

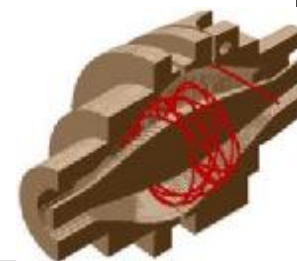


NATIONAL & KAPODISTRIAN  
UNIVERSITY OF ATHENS

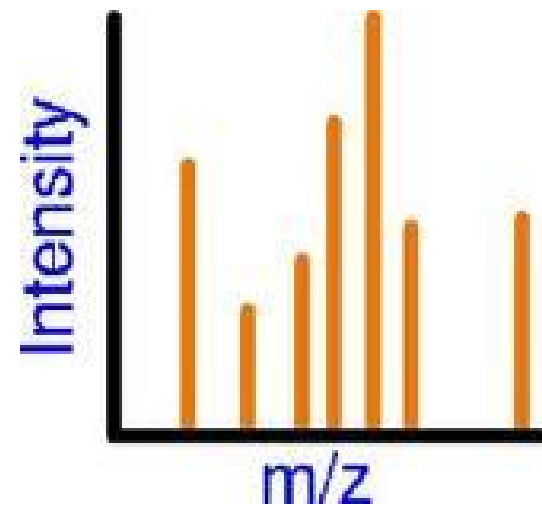
Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας Ι  
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων  
Φαρμακευτικό Τμήμα  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry – MS) και  
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης  
συνδεδεμένη με Φασματομετρία μάζας (LC-MS)**

Δρ Χαλαμπαλάκη Μαρία



**Φασματομετρία Μάζας:** τεχνική ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων η οποία βασίζεται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων ή στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί στο λόγο μάζα προς φορτίο ( $m/z$ )





**Joseph John Thomson**

**1906 Βραβείο Nobel  
Φυσικής**

*"in recognition of the great merits of his theoretical and experimental investigations on the conduction of electricity by gases"*



**Francis William Aston**

**1922 Βραβείο Nobel  
Χημείας**

*"for his discovery, by means of his mass spectrograph, of isotopes, in a large number of non-radioactive elements, and for his enunciation of the whole-number rule"*



**Wolfgang Paul**

**1989 Βραβείο Nobel  
Φυσικής**

*"for the development of the ion trap technique"*



**John Bennet Fenn**

**2002 Βραβείο Nobel  
Χημείας**

*"for the development of soft desorption ionization methods (ESI) for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"*



**Koichi Tanaka**

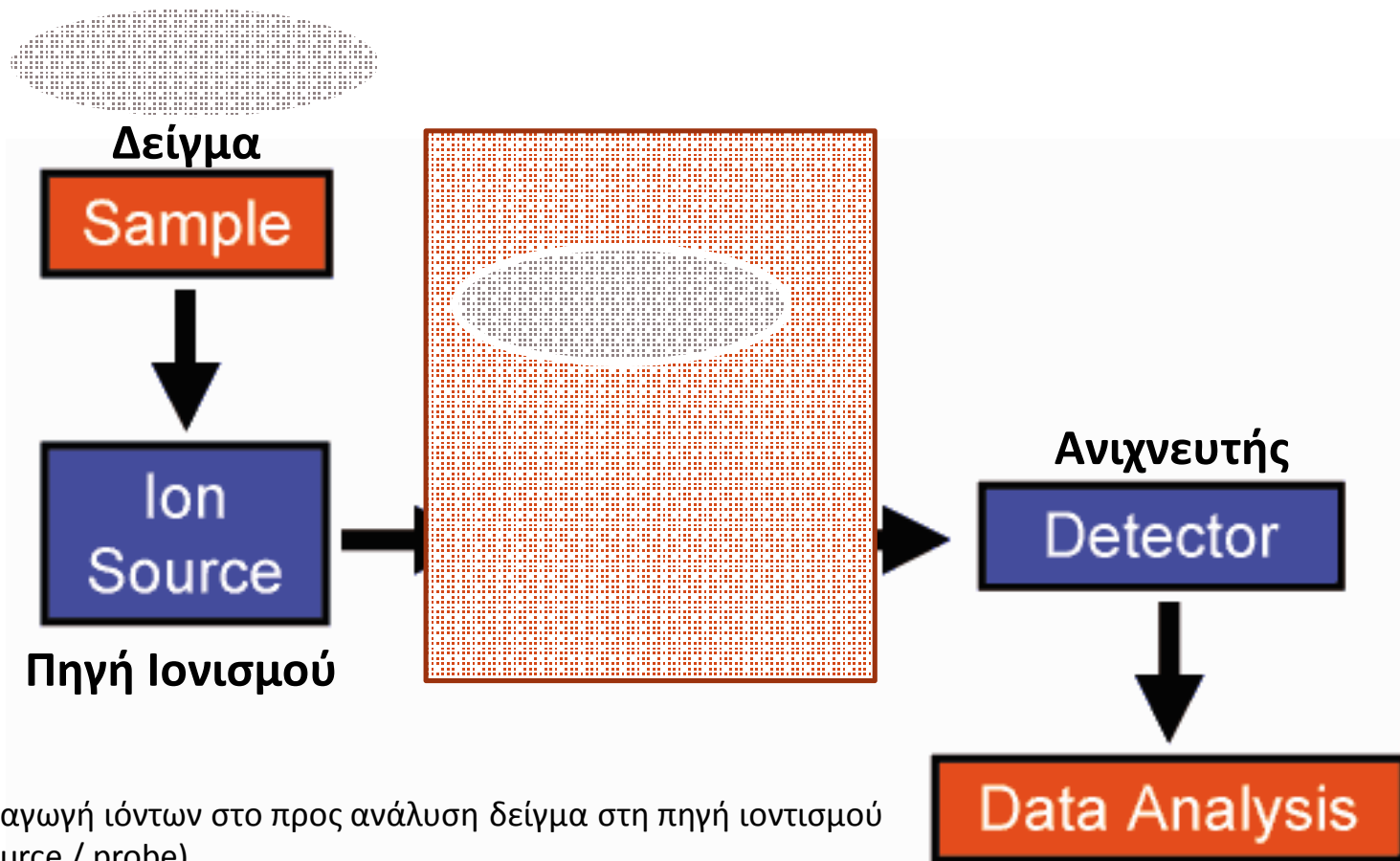
**2002 Βραβείο Nobel  
Χημείας**

*"for the development of soft desorption ionization methods (MALDI) for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"*



4

**Πρώτος Φασματογράφος Μάζας**



**A)** παραγωγή ιόντων στο προς ανάλυση δείγμα στη πηγή ιοντισμού (Ion source / probe)

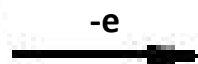
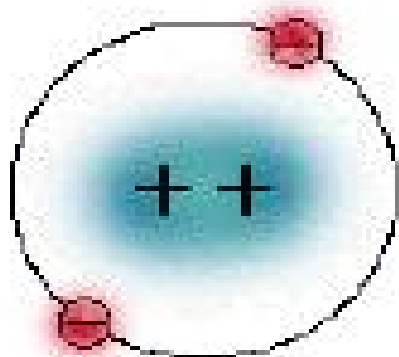
**B)** Διαχωρισμός των παραγόμενων ιόντων ανάλογα με το λόγο  $m/z$  στον αναλυτή μαζών (mass analyzer)

**Γ)** Ανίχνευση ιόντων (detector)

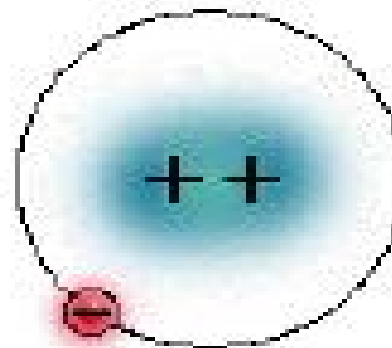
**Δ)** Έλεγχος οργάνου και επεξεργασία φασμάτων

**Καταγραφέας /  
Ανάλυση αποτελεσμάτων**

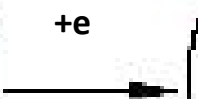
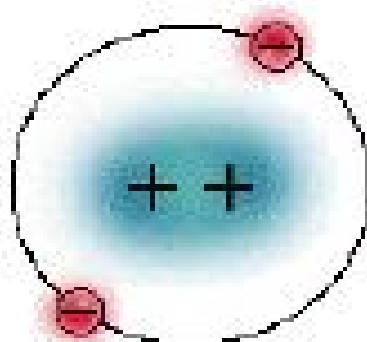
Ουδέτερα φορτισμένο μόριο



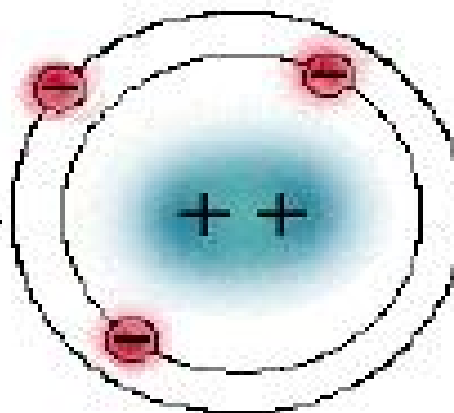
Θετικά φορτισμένο ιόν  
Positive ion



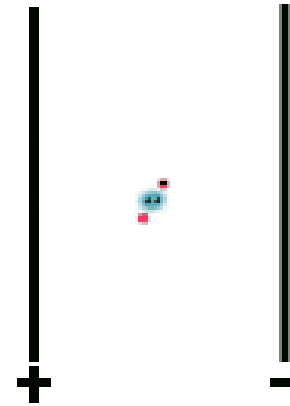
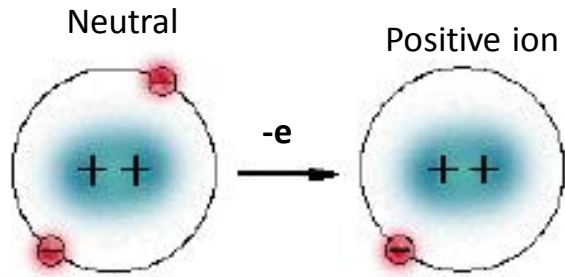
Ουδέτερα φορτισμένο μόριο



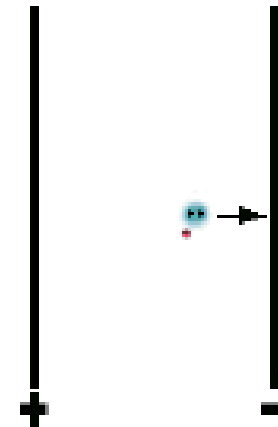
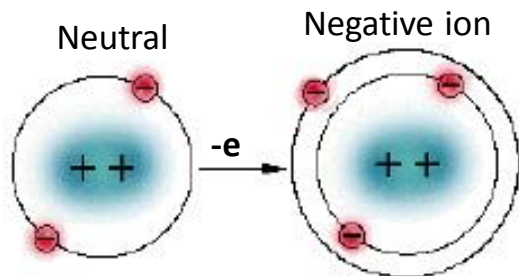
Αρνητικά φορτισμένο ιόν  
Negative ion



Ηλεκτρικό πεδίο

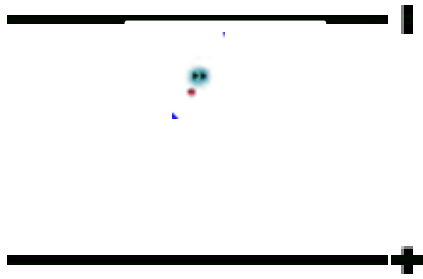


Ουδέτερο μόριο  
Καμία επίδραση

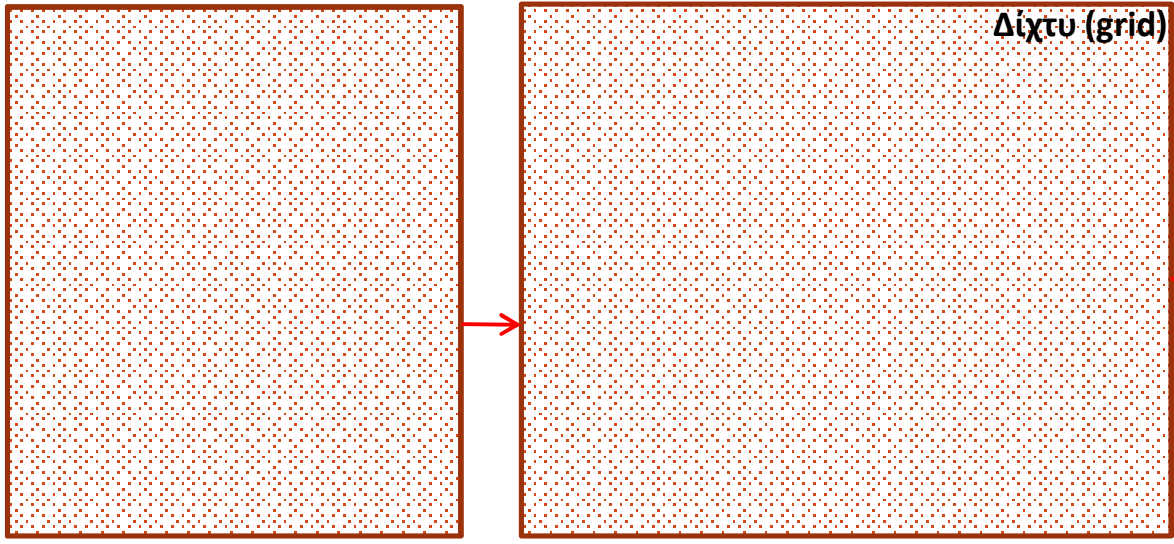


Κατιόν  
Κατευθύνεται προς το αντίθετα  
φορτισμένο ηλεκτρόδιο

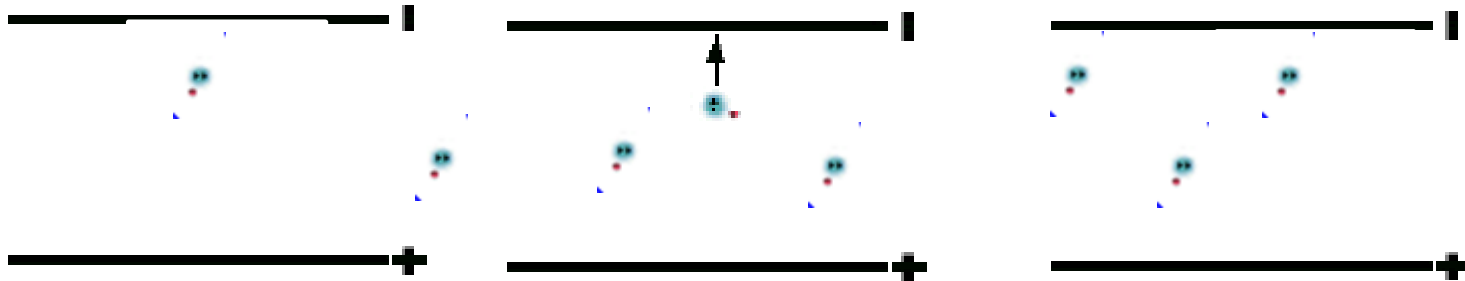
Σταθερό ηλεκτρικό πεδίο  
Δυναμικό συνεχούς ρεύματος  
(*dc voltage*)



Δίκτυο (grid)



Electromagnetic field  
*dc voltage + rf voltage*





# Isotopic Abundances

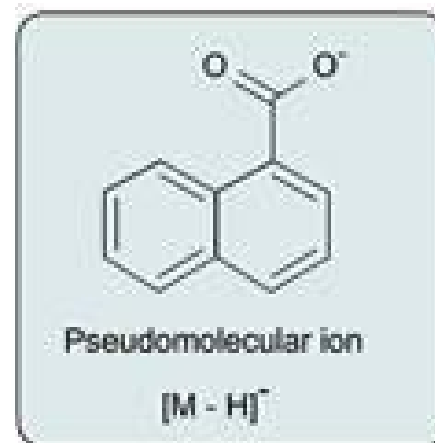
(Ισοτοπική αφθονία)

$$\text{Mass: } M = \sum m_e \cdot n_e,$$

$m_e$  – mass of an element

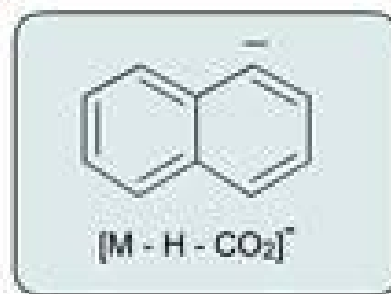
$n_e$  – number of atoms of this element in the molecule

<i>Isotope</i>	<i>Mass</i>	<i>Abundance</i>	<i>Chemical mass</i>	<i>Deviation from the whole number</i>
<b><sup>1</sup>H</b>	<b>1.00782510</b>	<b>99.9852%</b>	<b>1.00794</b>	<b>+0.0079</b>
<b><sup>2</sup>H (D)</b>	<b>2.01410222</b>	<b>0.0148%</b>		
<b><sup>12</sup>C</b>	<b>12.0(0)</b>	<b>98.892%</b>	<b>12.011</b>	<b>+0.011</b>
<b><sup>13</sup>C</b>	<b>13.0033544</b>	<b>1.108%</b>		
<b><sup>14</sup>N</b>	<b>14.00307439</b>	<b>99.635%</b>	<b>14.00674</b>	<b>+0.007</b>
<b><sup>15</sup>N</b>	<b>15.0001077</b>	<b>0.365%</b>		
<b><sup>16</sup>O</b>	<b>15.99491502</b>	<b>99.759%</b>	<b>15.9994</b>	<b>-0.0006</b>
<b><sup>17</sup>O</b>	<b>16.9991329</b>	<b>0.037%</b>		
<b><sup>18</sup>O</b>	<b>17.99916002</b>	<b>0.204%</b>		
<b><sup>31</sup>P</b>	<b>30.9737647</b>	<b>100%</b>	<b>30.9737647</b>	<b>-0.0262</b>
<b><sup>32</sup>S</b>	<b>31.9720737</b>	<b>95.0%</b>	<b>32.066</b>	<b>+0.066</b>
<b><sup>33</sup>S</b>	<b>32.9714619</b>	<b>0.76%</b>		
<b><sup>34</sup>S</b>	<b>33.9678646</b>	<b>4.22%</b>		
<b><sup>36</sup>S</b>	<b>35.967090</b>	<b>0.014%</b>		

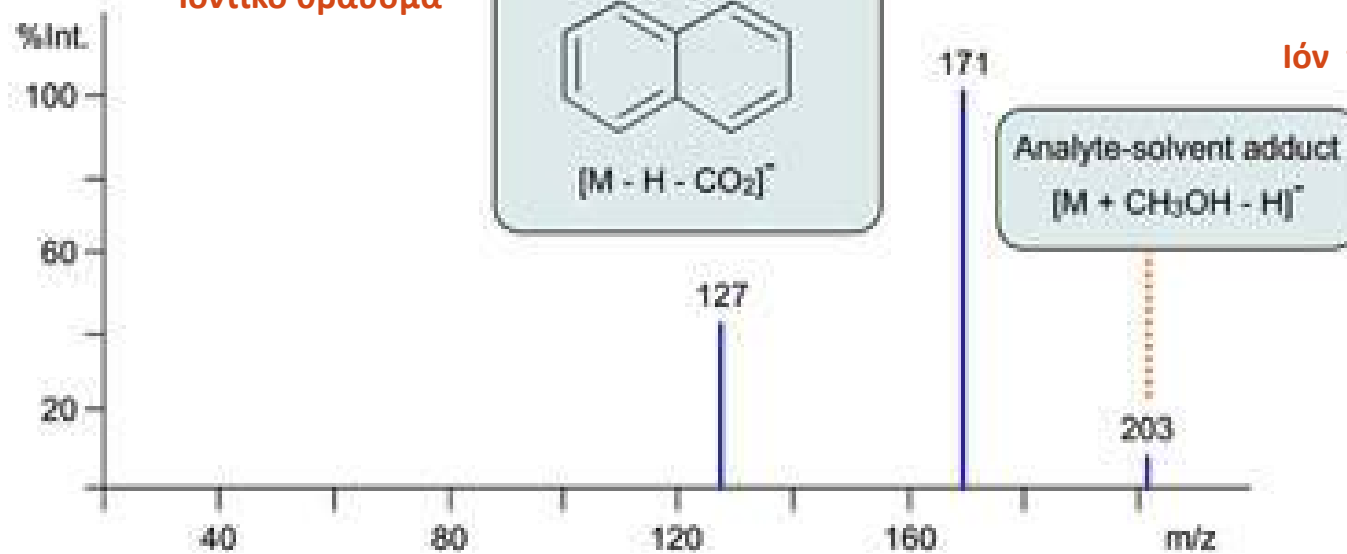


Ψευδομοριακό ιόν

Ιοντικό θραύσμα

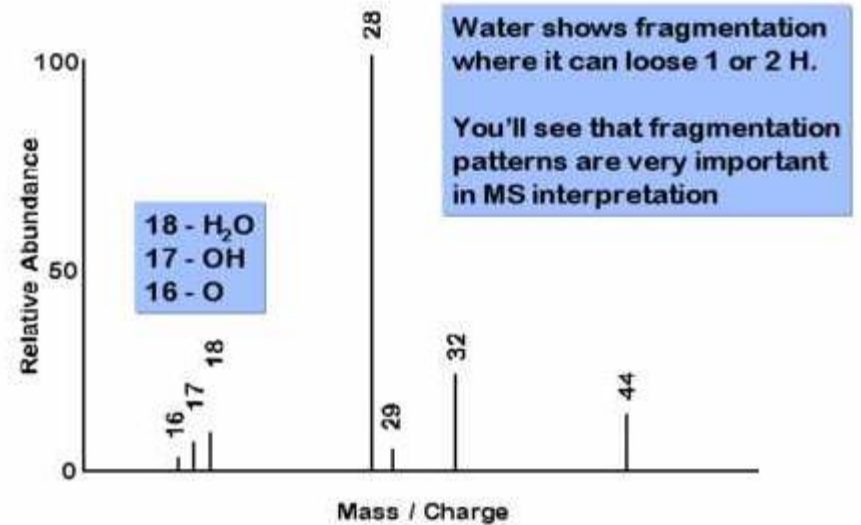
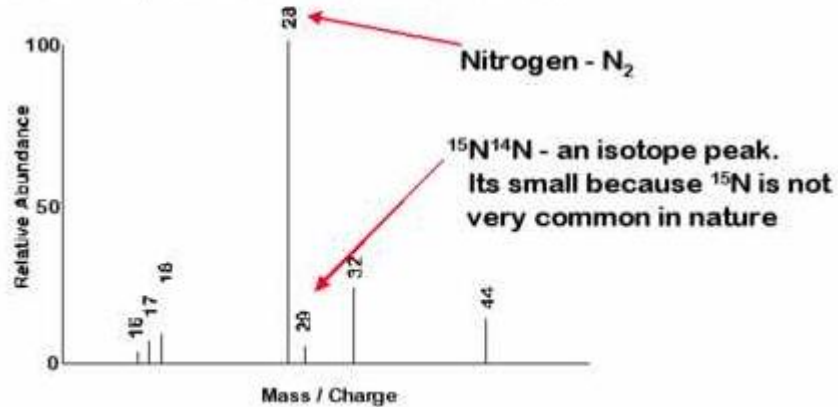


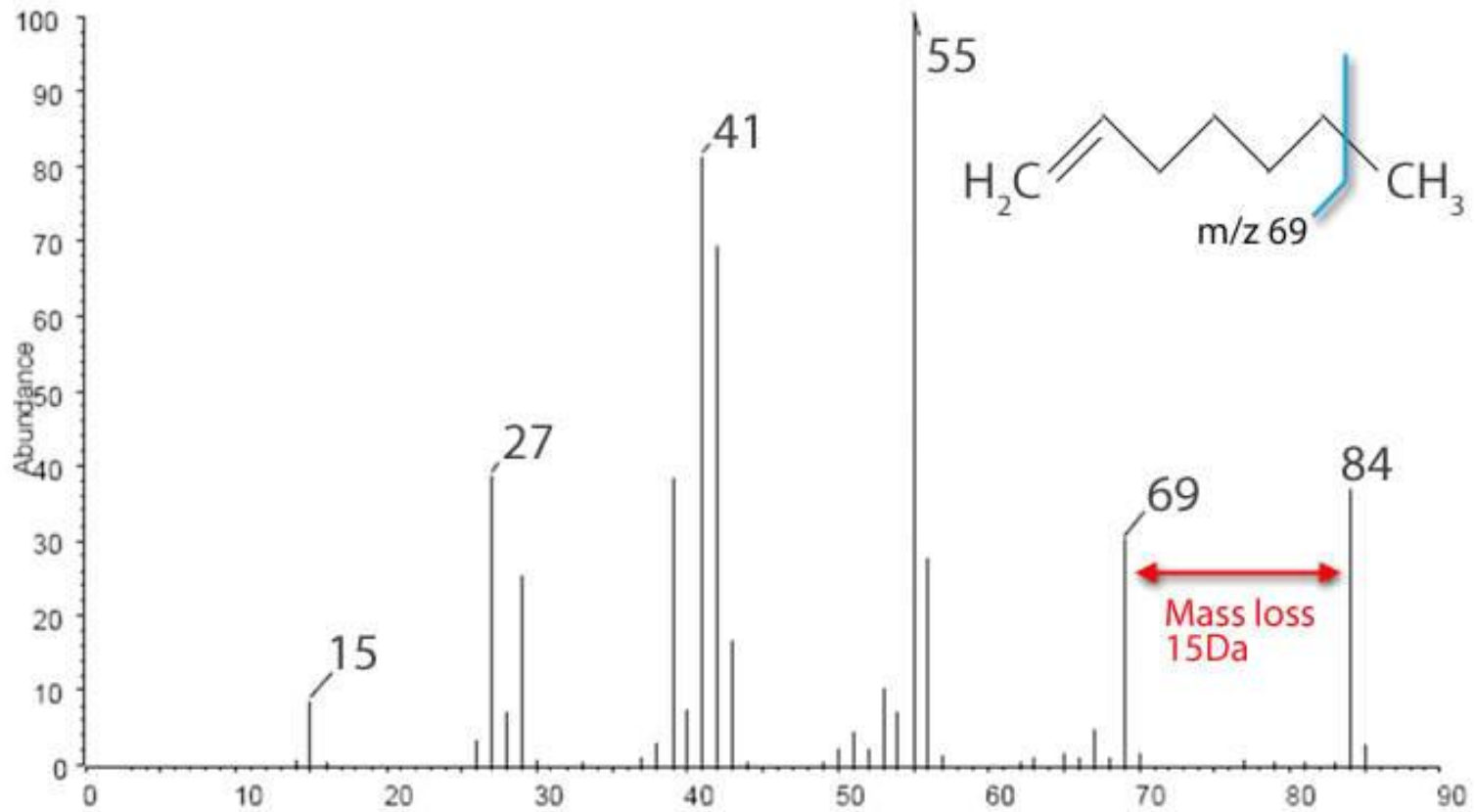
Ιόν προσθήκης



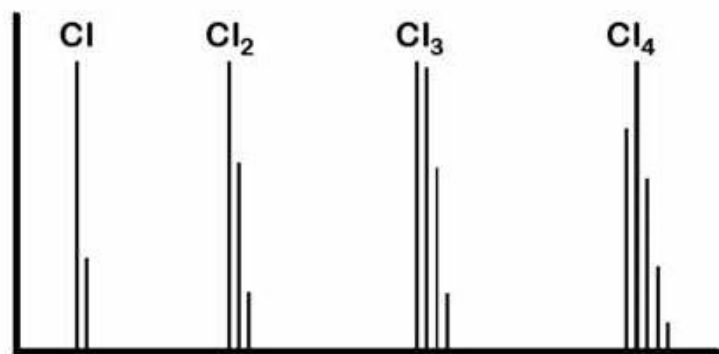
## A simple mass spectrum

The masses in this example should look familiar.  
This is a spectrum for air - a mixture.



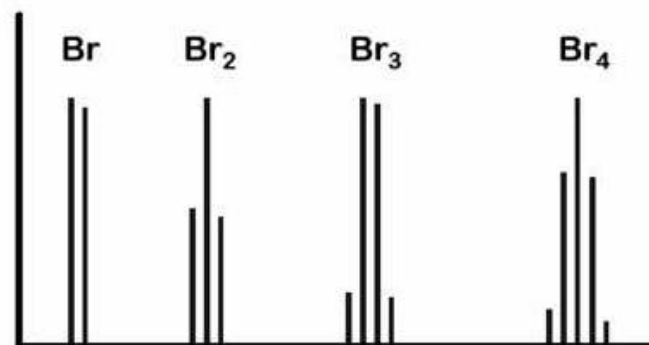


## Chlorine



By the time you have 4 chlorine, the A+2 line is significantly larger than the A line.

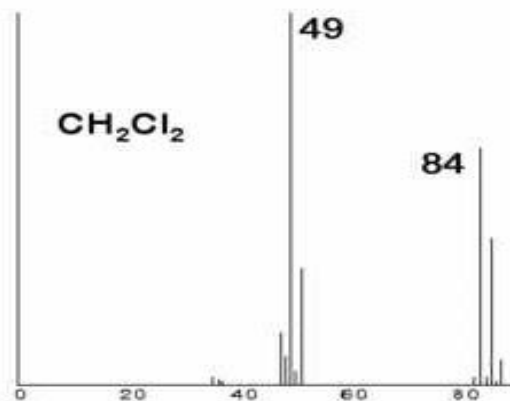
## Bromine



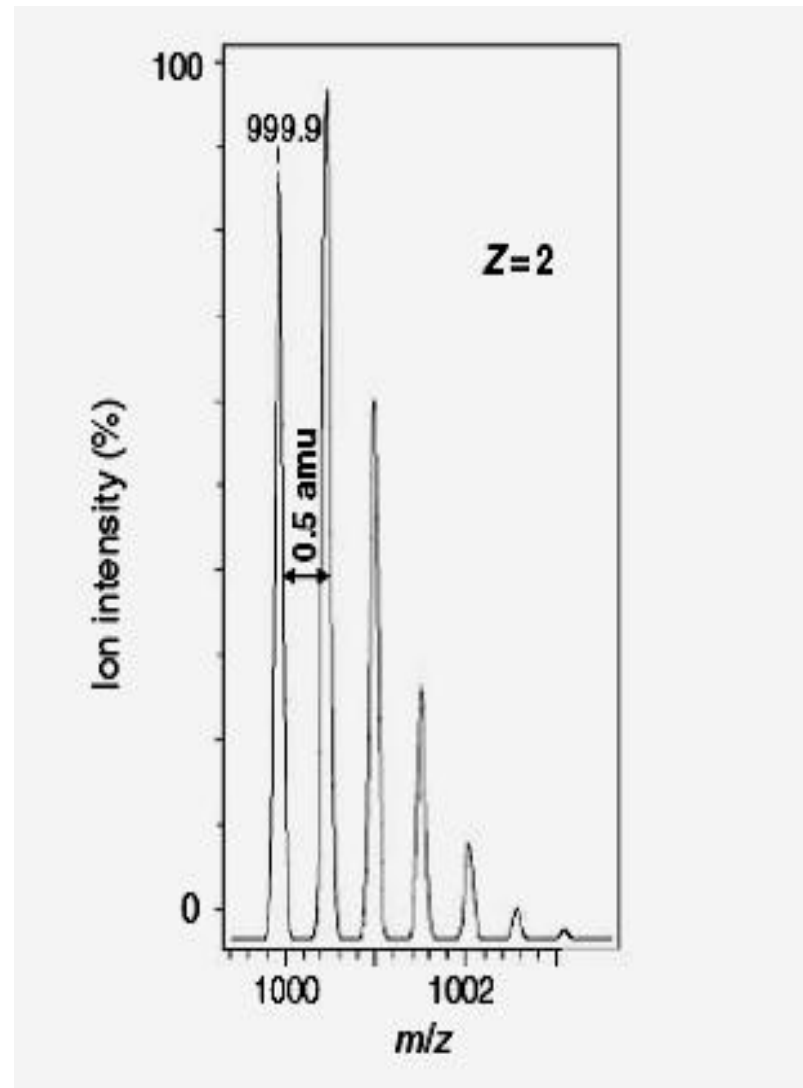
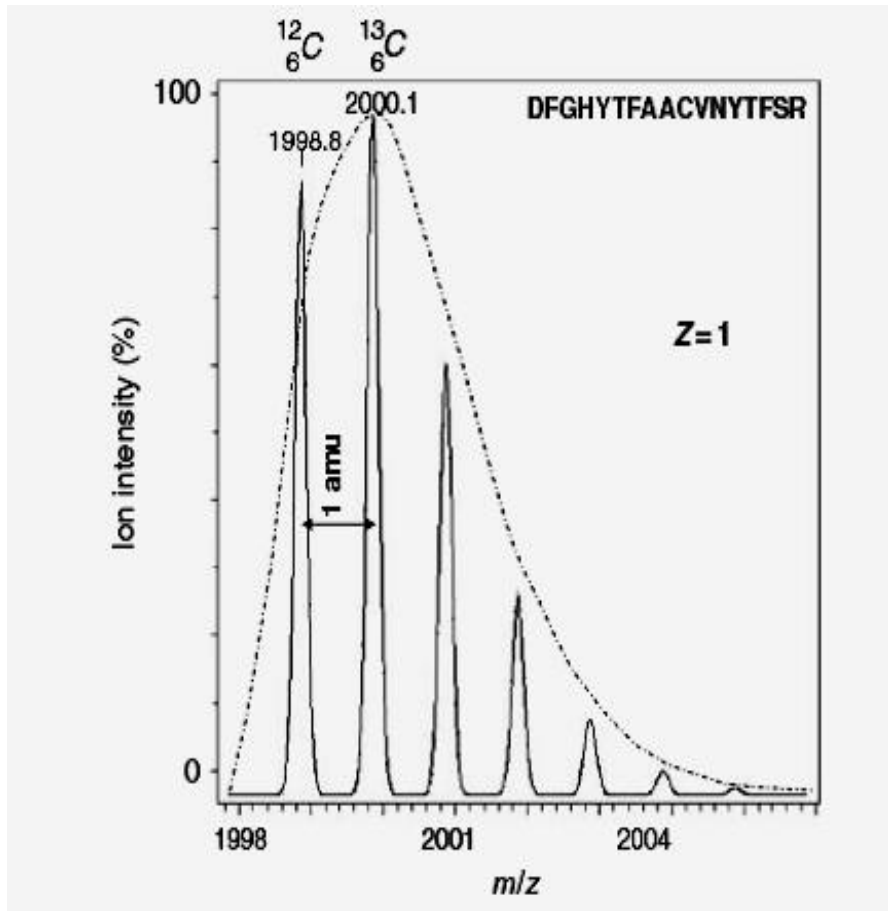
Bromine, which is almost a 1:1 mixture of <sup>79</sup>Br and <sup>81</sup>Br also has a distinctive pattern.

## Another example

Dichloromethane - a common GC/MS solvent



Note the Cl<sub>2</sub> pattern at 84 and the Cl pattern at 49

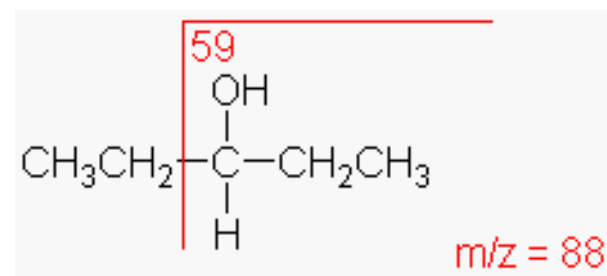
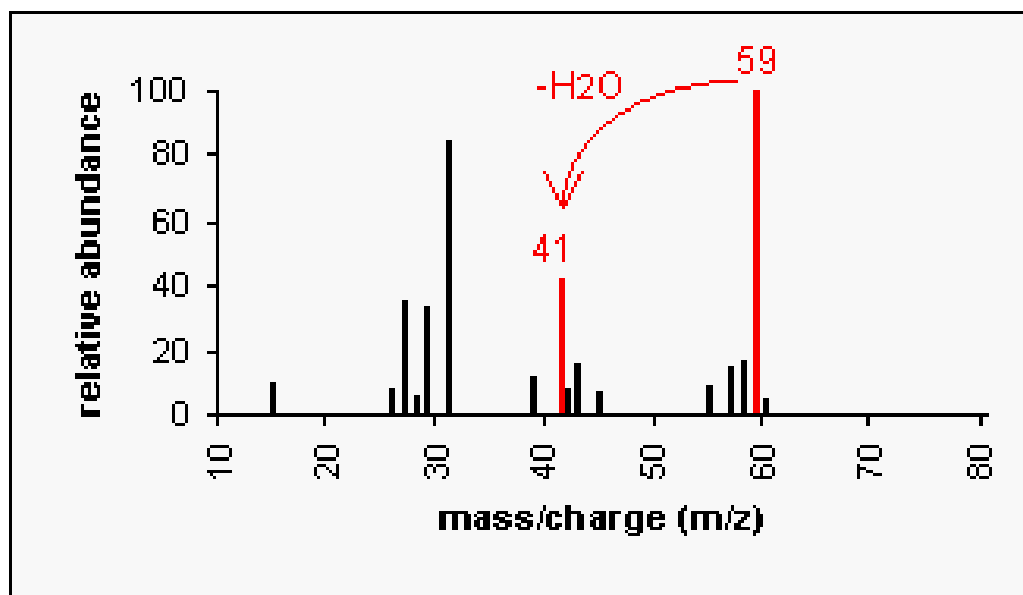


## Alcohols:

An alcohol's molecular ion is small or non-existent.

Cleavage of the C-C bond next to the oxygen usually occurs.

A loss of H<sub>2</sub>O may occur as in the spectra below.



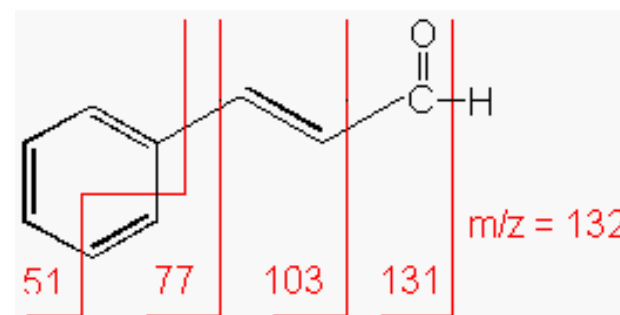
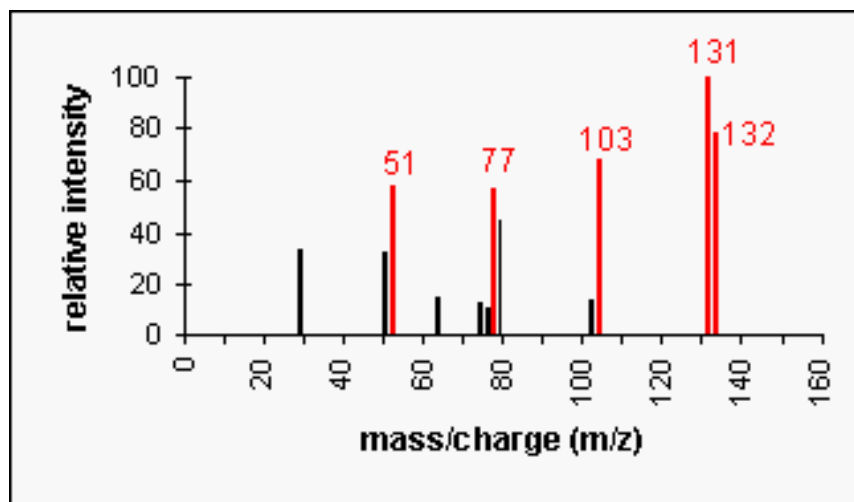
3-Pentanol

$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$

MW = 88.15

## Aldehydes

Cleavage of bonds next to the carbonyl group results in the loss of hydrogen (molecular ion less 1) or the loss of CHO (molecular ion less 29).



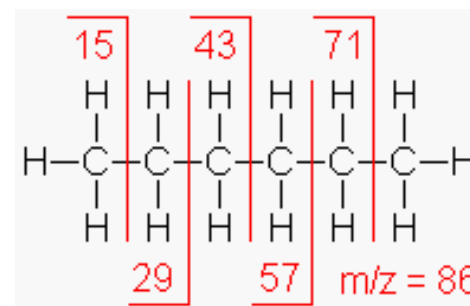
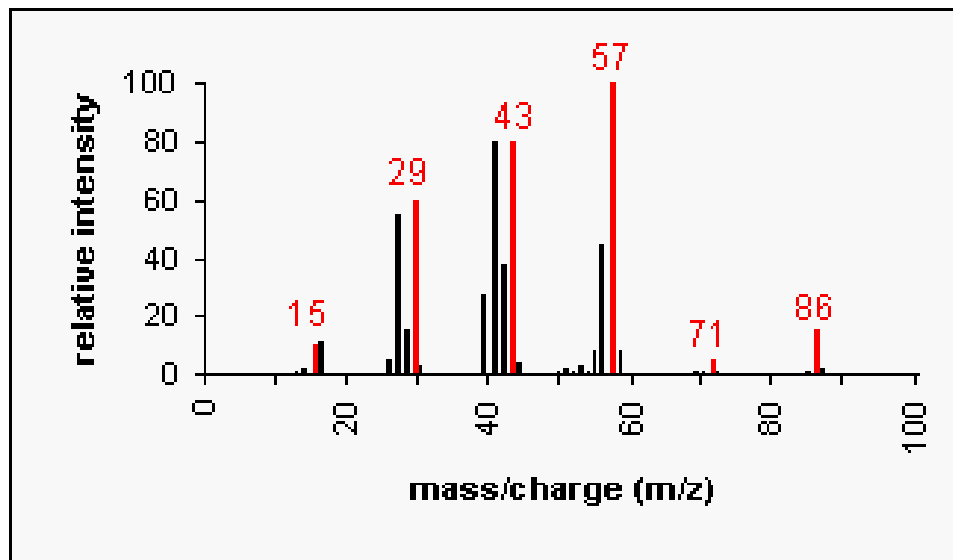
**3-Phenyl-2-propenal**  
**C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O**  
**MW = 132.16**



## Alkanes

Molecular ion peaks are present, possibly with low intensity.

The fragmentation pattern contains clusters of peaks 14 mass units apart (which represent loss of  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ).



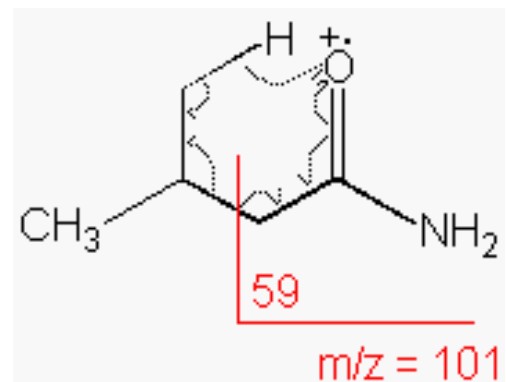
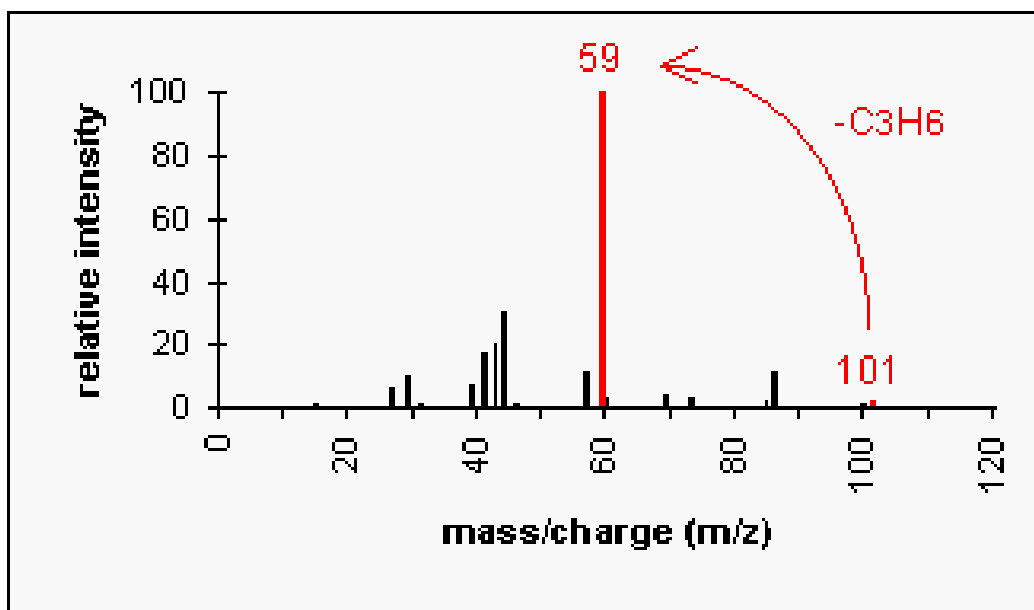
Hexane

$\text{C}_6\text{H}_{14}$

MW = 86.18

## Amides

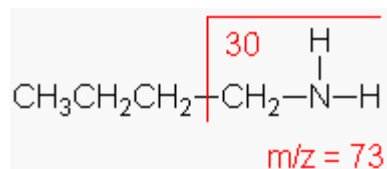
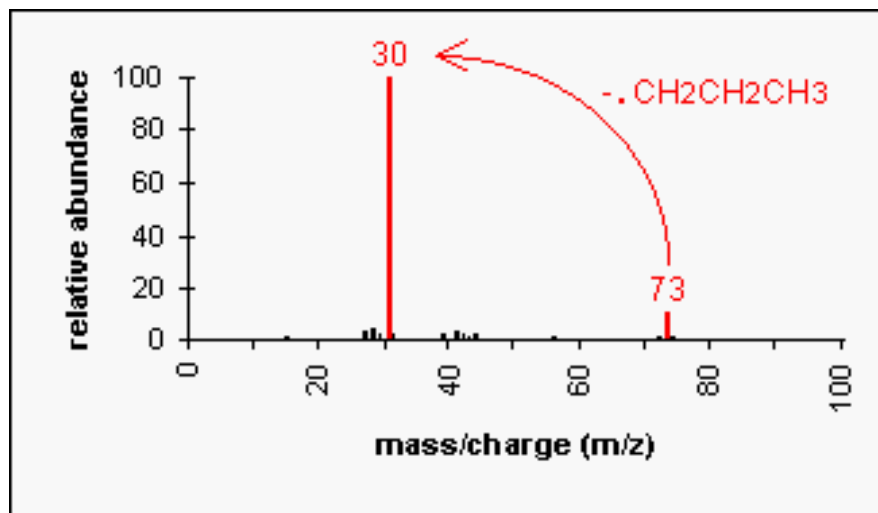
Primary amides show a base peak due to the McLafferty rearrangement.



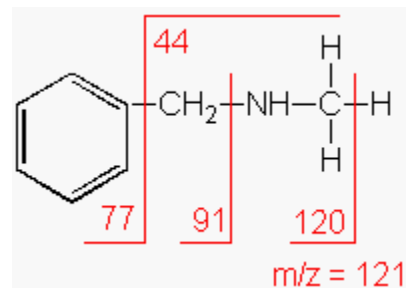
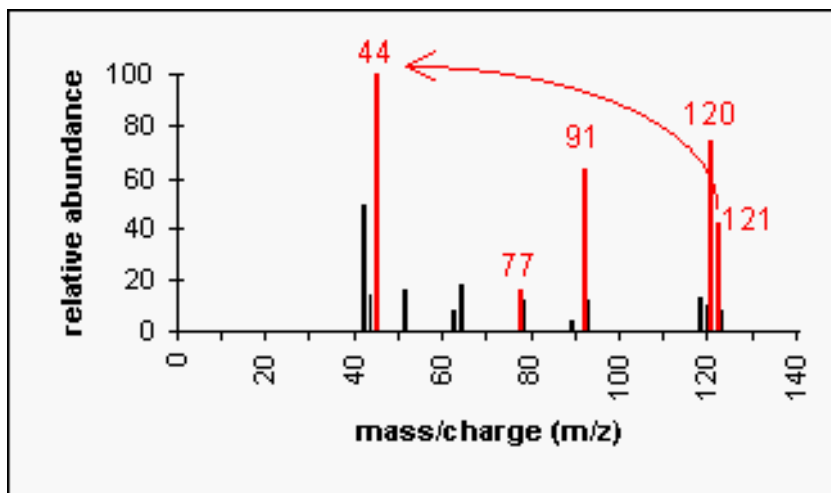
**3-Methylbutyramide**  
**C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO**  
**MW = 101.15**

## Amines

Molecular ion peak is an odd number. Alpha-cleavage dominates aliphatic amines.



**n-Butylamine**  
**C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N**  
**MW = 73.13**

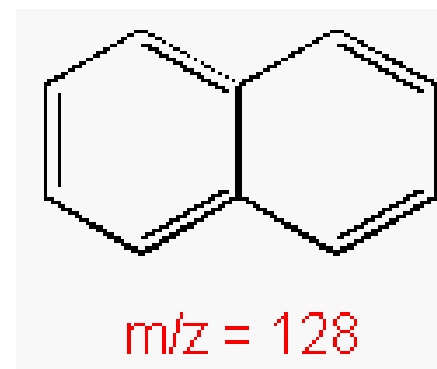
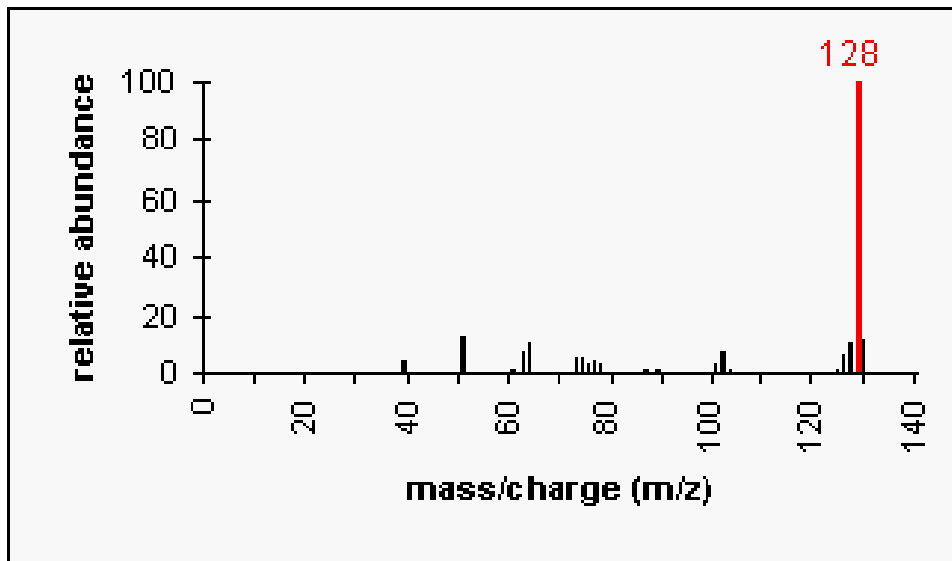


**n-Methylbenzylamine**  
**C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N**  
**MW = 121.18**

The molecular ion peak is an odd number.  
The base peak is from the C-C cleavage adjacent to the C-N bond.

## Aromatics

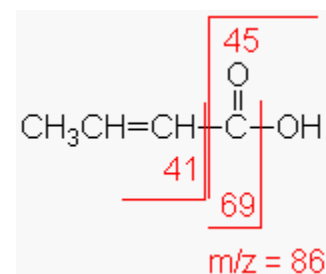
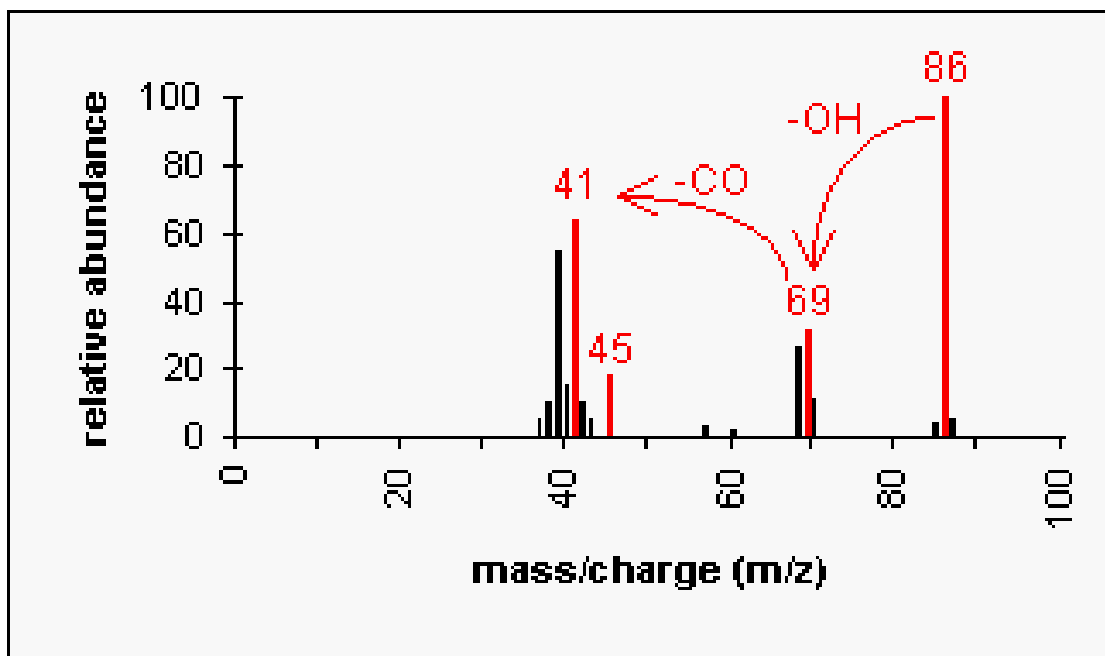
Molecular ion peaks are strong due to the stable structure.



**Naphthalene**  
**C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>**  
**MW = 128.17**

## Carboxylic Acids

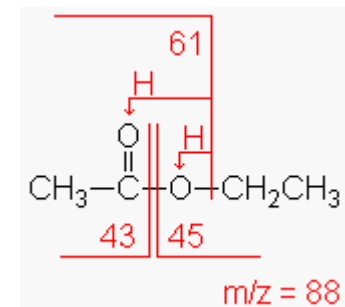
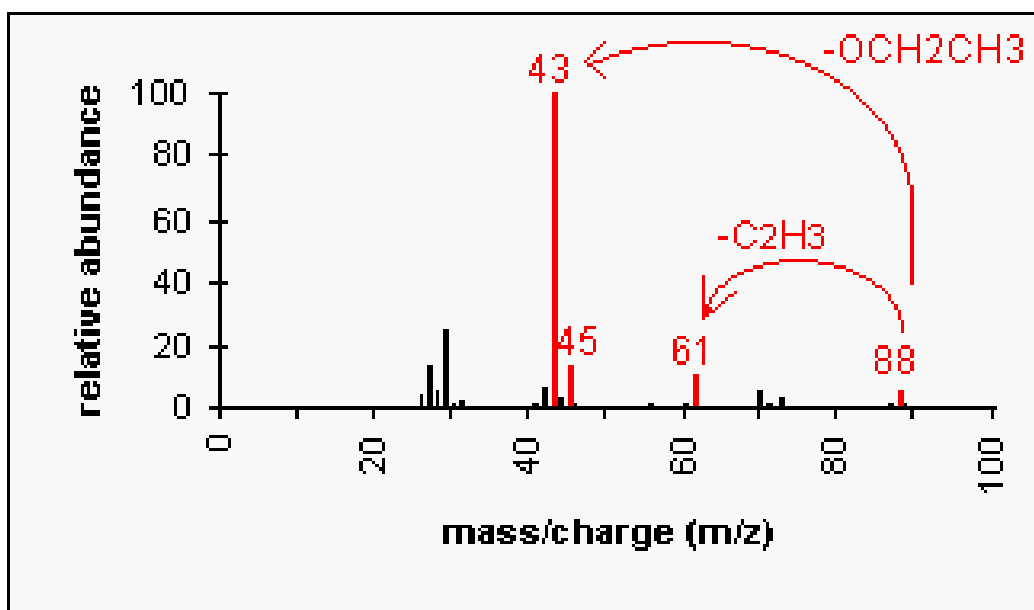
In short chain acids, peaks due to the loss of OH (molecular ion less 17) and COOH (molecular ion less 45) are prominent due to cleavage of bonds next to C=O.



2-Butenoic acid  
 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$   
MW = 86.09

## Esters

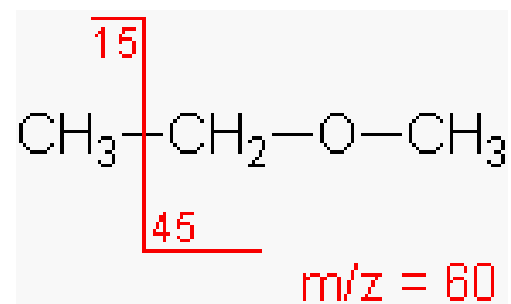
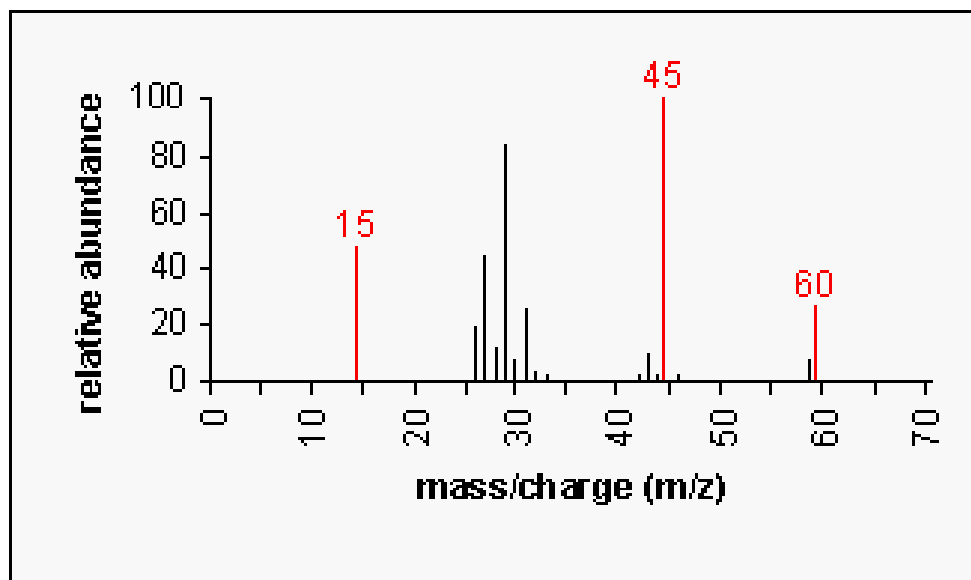
Fragments appear due to bond cleavage next to C=O (alkoxy group loss, -OR) and hydrogen rearrangements.



**Ethyl acetate**  
**C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>**  
**MW = 88.11**

## Ethers

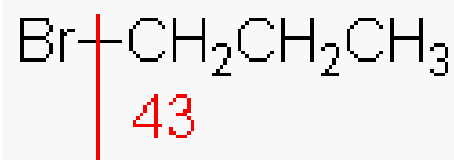
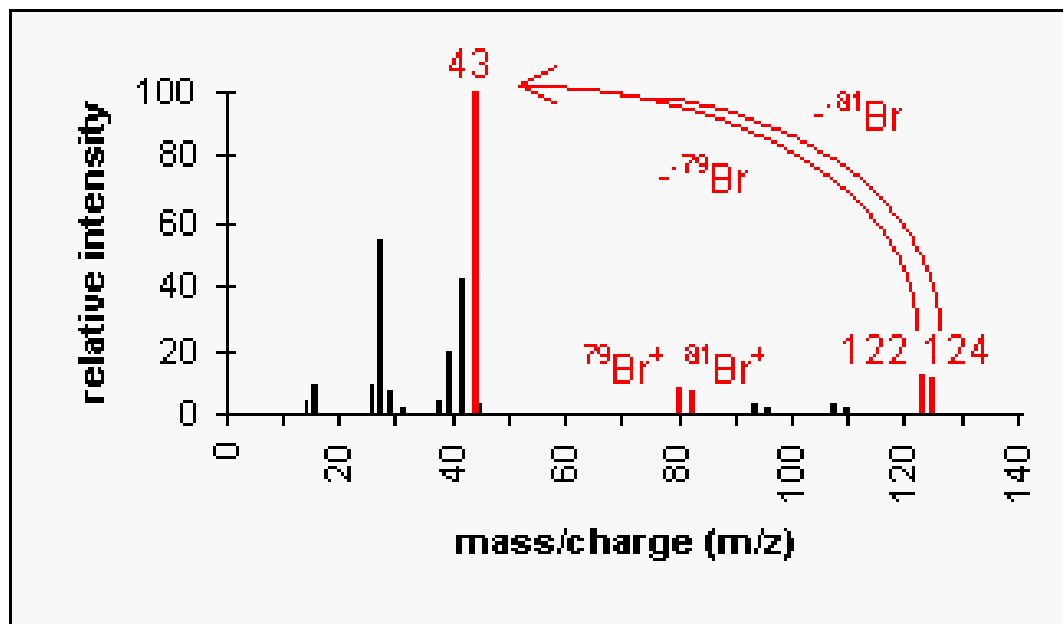
Fragmentation tends to occur alpha to the oxygen atom (C-C bond next to the oxygen).



Ethyl methyl ether  
 $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$   
MW = 60.10

## Halides

The presence of chlorine or bromine atoms is usually recognizable from isotopic peaks.



$$m/z (^{79}\text{Br}) = 122$$

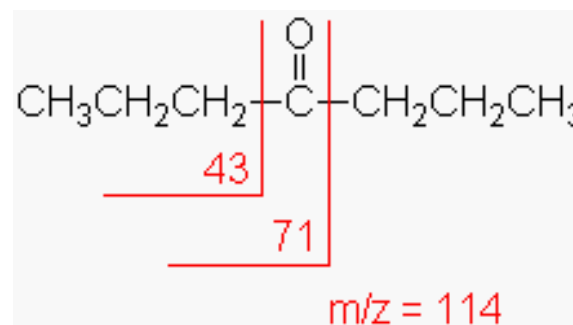
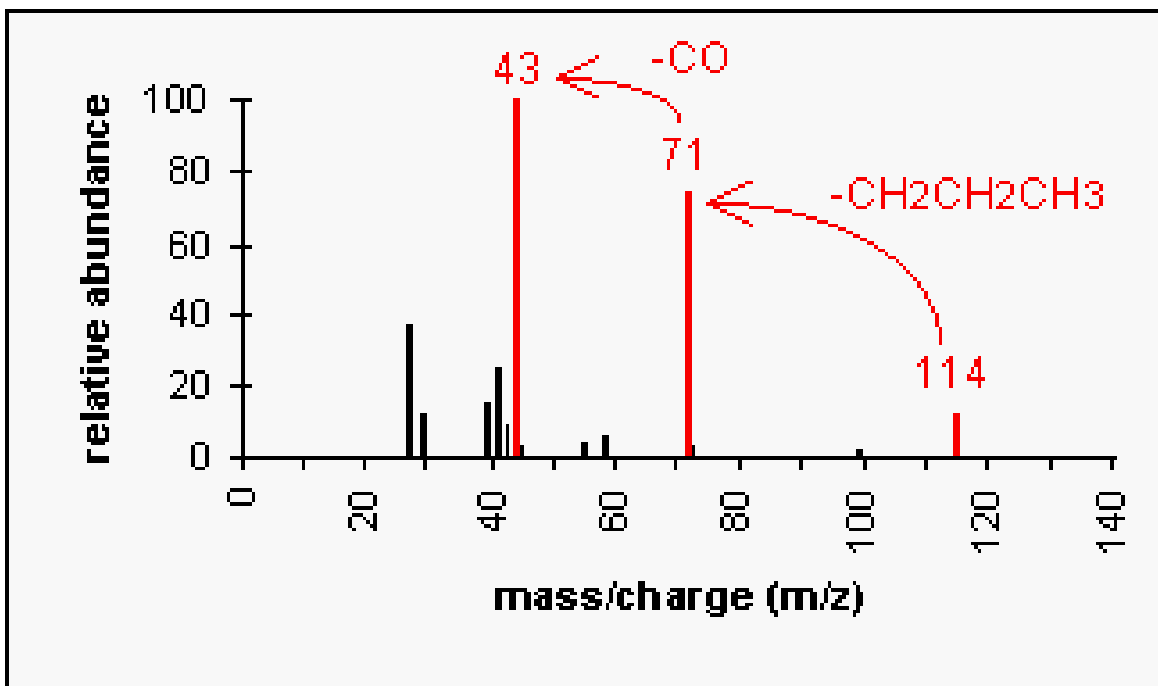
$$m/z (^{81}\text{Br}) = 124$$

1-Bromopropane  
 $\text{C}_3\text{H}_7\text{Br}$   
MW = 123.00



## Ketones

Major fragmentation peaks result from cleavage of the C-C bonds adjacent to the carbonyl.



4-Heptanone  
 $C_7H_{14}O$   
MW = 114.19

### ○ Μέθοδοι παραγωγής μοριακών ιόντων από πτητικά δείγματα

- Φωτιοντισμός (Photoionization)
- Ιοντισμός πεδίου (Field ionization)

### q Μέθοδοι παραγωγής μοριακών ιόντων από μη πτητικά δείγματα

- Τεχνικές ψεκασμού (Spray techniques)

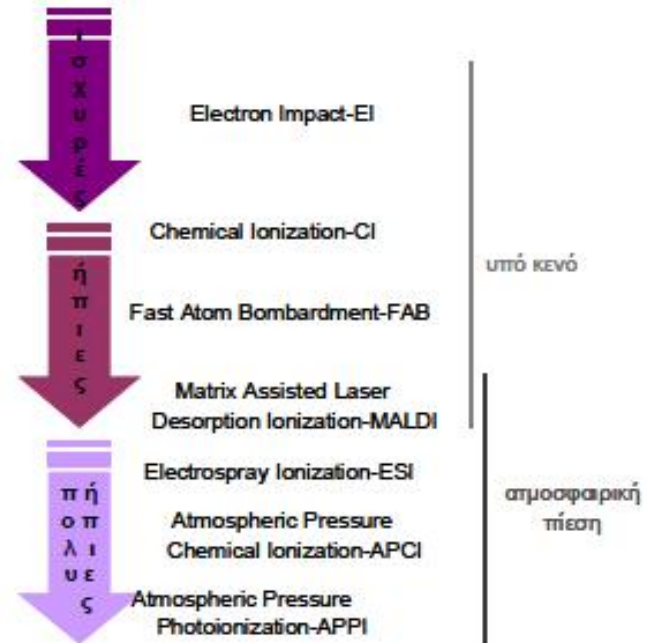
- Θερμοψεκασμός (ThermoSpray - TSP)

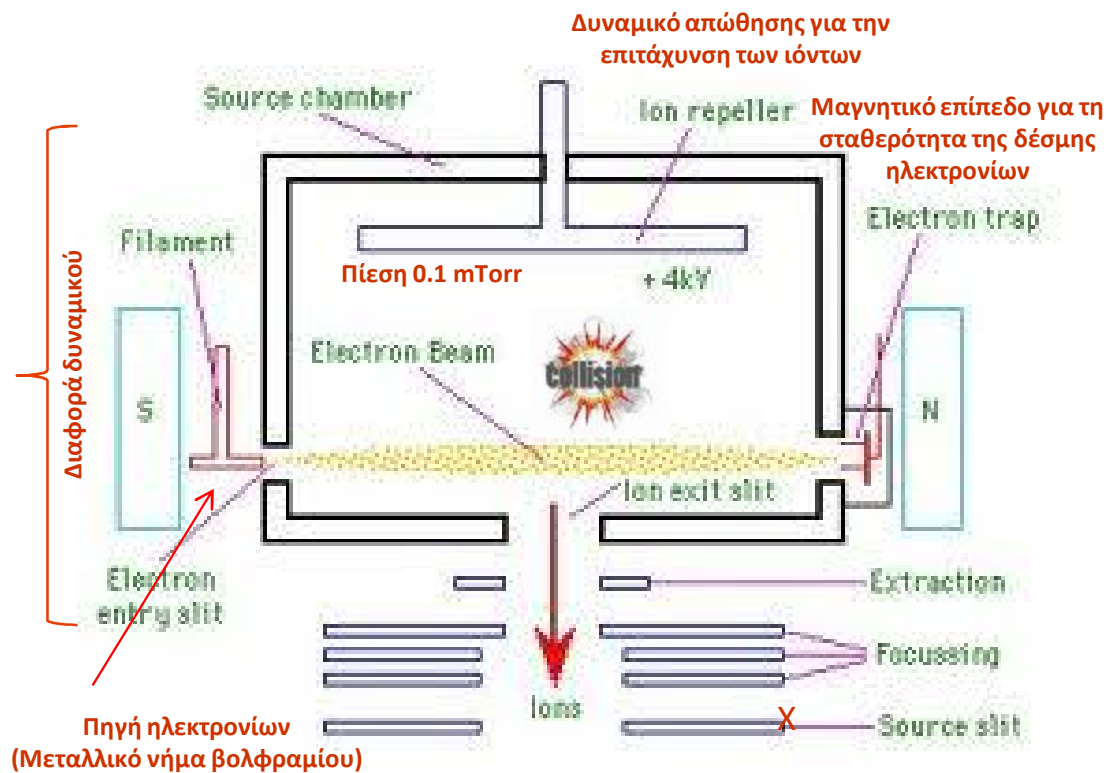
- Τεχνικές εκρόφησης που επάγονται από πρόσκρουση σωματιδίων

- Ιοντισμός μέσω πρόσκρουσης με σωματίδια χαμηλής ενέργειας (Low –energy Particle Impact)
- Ιοντισμός ροής ατόμων μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment – FAB)
- Ιοντισμός εκρόφησης από επιφάνειες (Desorption from Surfaces)
- Ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από πλάσμα (Plasma Desorption – PD)
- Ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και laser (Laser Ionisation – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – MALDI)

### q Μέθοδοι παραγωγής ατομικών ιόντων

- Θερμικός ιοντισμός (Thermal Ionization)
- Ιοντισμός μέσω επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma, ICP)





## ΙΟΝΙΣΜΟΣ

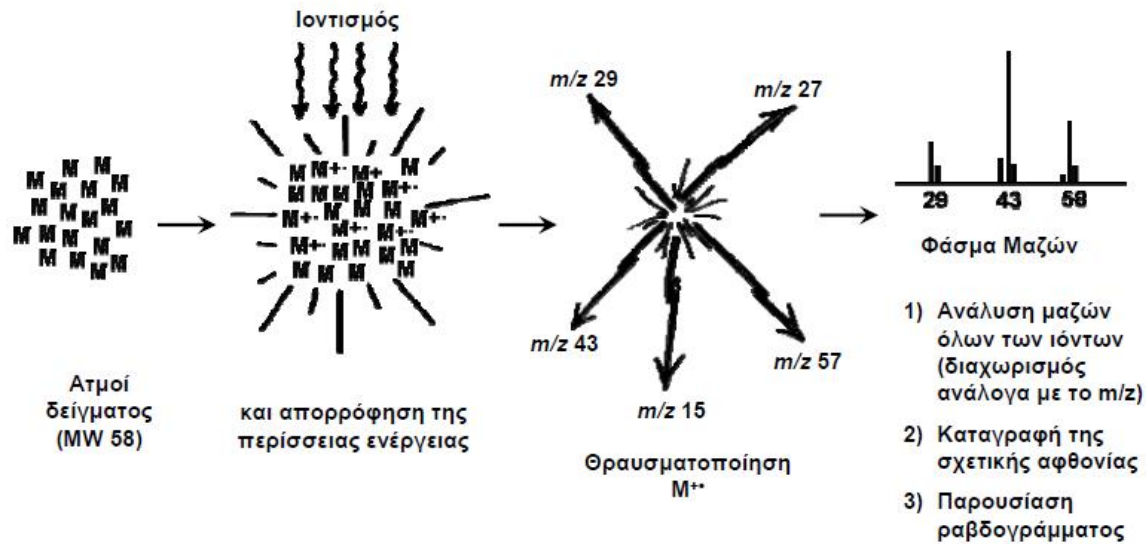


## ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ



$EE^+$  → Ιόν με άρτιο αριθμό  $e^-$

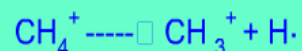
$OE^+$  → Ιόν με περιττό αριθμό  $e^-$



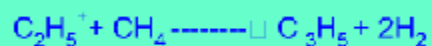
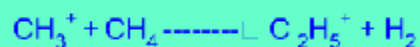
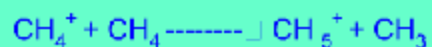
- Ευρεία χρήση /μέθοδος επιλογής για πτητικές ενώσεις (σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες)
- Συχνή χρήση παραγωγοποίησης (π.χ. σιλυλίωση)
- Εκτεταμένη θραυσματοποίηση – συχνά απουσία μοριακού ιόντος
- Αυξημένη δομική πληροφορία
- Υψηλή επαναληψιμότητα σχεδόν απόλυτα συνδεδεμένη με τη μοριακή δομή à Μοριακό αποτύπωμα
- Δημιουργία βιβλιοθηκών
- Profiling, fingerprinting, metabolomics

- Λιγότερο ισχυρή μέθοδος από την EI
  - à μειωμένη θραυσματοποίηση
  - à πιο απλά φάσματα
  - à πιο πιθανή η παρατήρηση μοριακού ιόντος (MI)
- Αέρια π.χ. CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, i-butane χρησιμοποιούνται τόσο ως φέροντα αέρια αλλά και για τη δημιουργία ιόντων

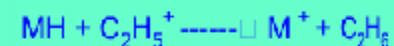
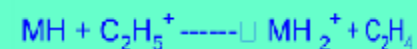
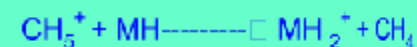
### 1.Primary Ion Formation



### 2.Secondary Reagent Ions

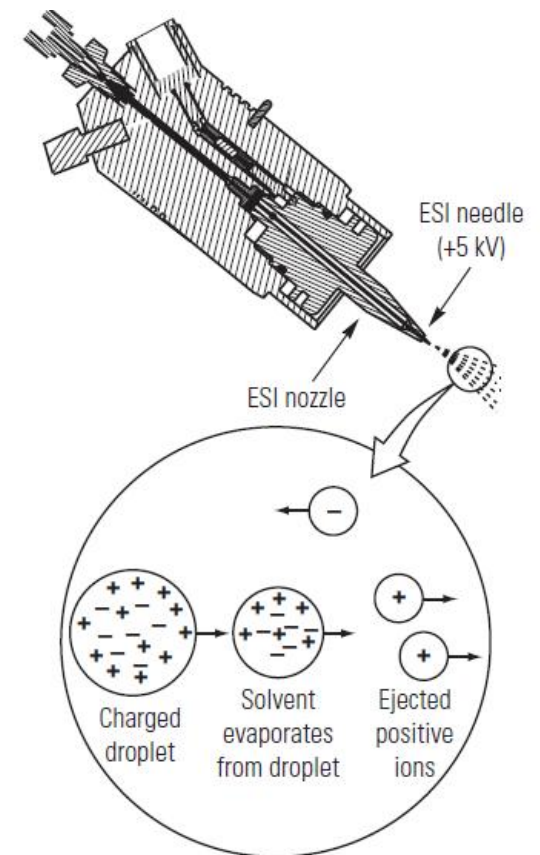


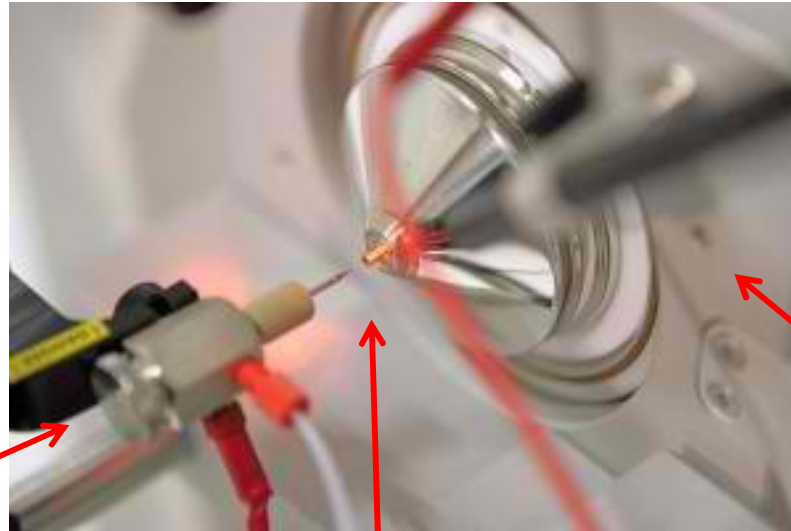
### 3.Product ion Formation



Η ESI ανήκει στις ήπιες μεθόδους και αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο ιοντισμού. Βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση πολικών μορίων και μεγαλομορίων όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, γλυκοπρωτεΐνες και νουκλεοτίδια, στην μελέτη φαρμακευτικών προϊόντων και των μεταβολιτών τους καθώς και φυσικών προϊόντων.

1. Το προς ανάλυση δείγμα υπό τη μορφή διαλύματος εισέρχεται στο τριχοειδές (needle) του ESI όπου εφαρμόζεται ισχυρό δυναμικό.
2. Το διάλυμα εξέρχεται από ακροφύσιο και εκνεφώνεται (Taylor cone) σχηματίζοντας φορτισμένα στην επιφάνειά τους σταγονίδια.
3. Το φορτίο των σταγονιδίων ενισχύεται όσο εξατμίζεται ο διαλύτης.
4. Η ενίσχυση του φορτίου των σταγονιδίων συνεχίζεται μέχρι ενός σημείου -όριο σταθερότητας Rayleigh- κατά το οποίο τα σταγονίδια διασπώνται σε μικρότερα σταγονίδια αφού η ηλεκτροστατική απώθηση (δυνάμεις Coulomb) είναι μεγαλύτερη της επιφανειακής τους τάσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέχρι να σχηματιστούν μικροσκοπικά σταγονίδια.
5. Τα ιόντα που προκύπτουν απωθούνται από τα σταγονίδια λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων.
6. Τα ιόντα, σε αέρια φάση, εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.

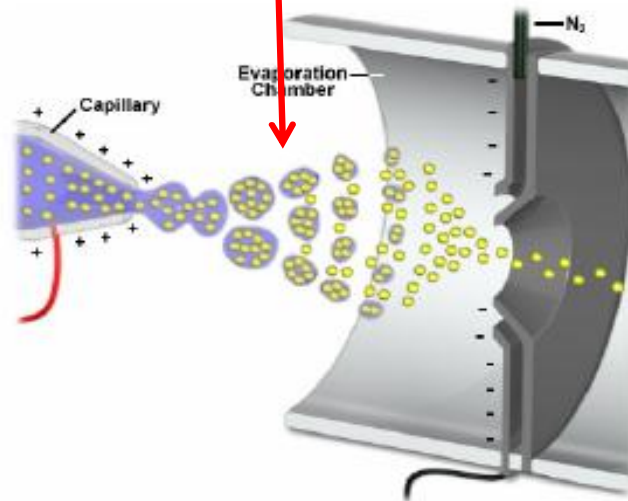


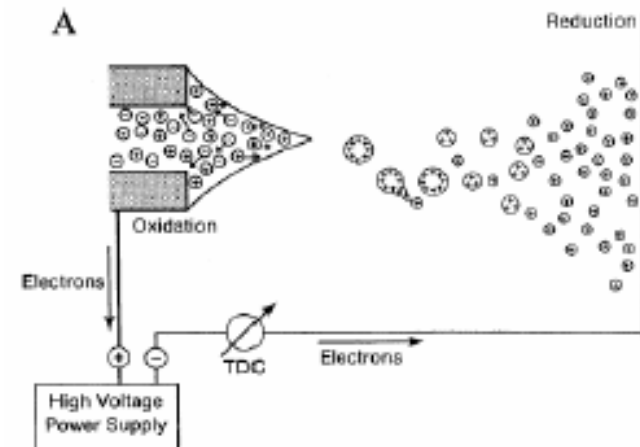
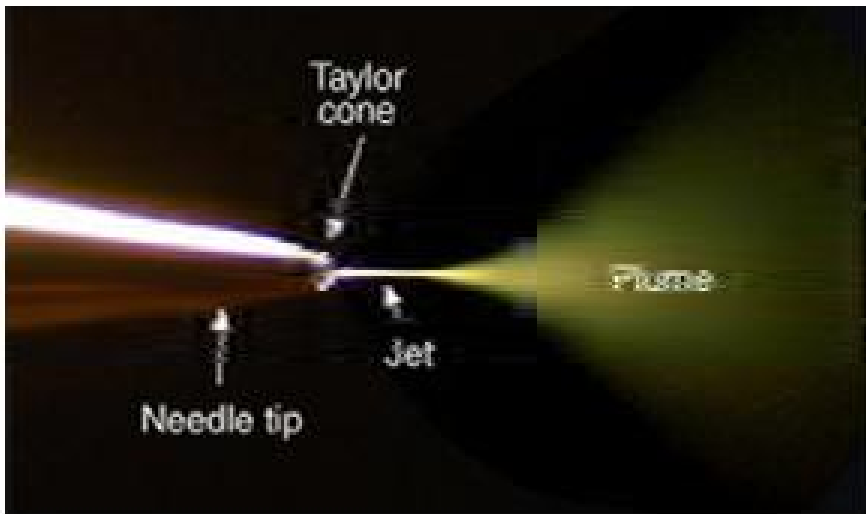


Τριχοειδές -  
Είσοδος δείγματος

Παρογωγή Ιόντων

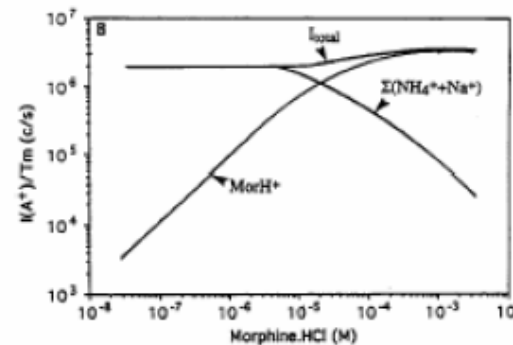
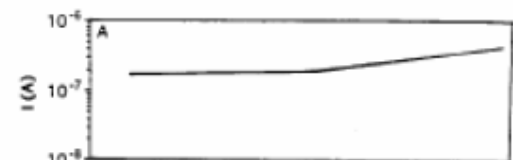
Αναλυτής Μαζών





$$I_{A^*} = pf \frac{k_A C_A}{k_A C_A + k_B C_B + k_E C_E} I$$

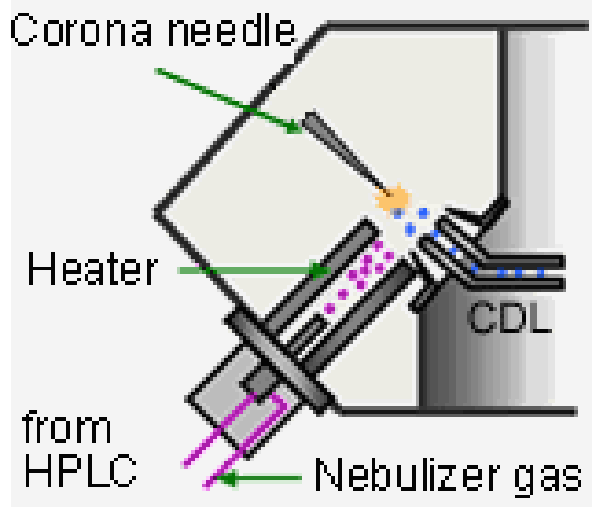
A, B, C: αναλύτης / ηλεκτρολύτης  
 C: συγκέντρωση  
 I : ένταση συνολικού ρεύματος ηλεκτροψεκασμού  
 k: συντελεστής μετατροπής  
 pf: σταθερά



• Ανταγωνισμός ιόντων

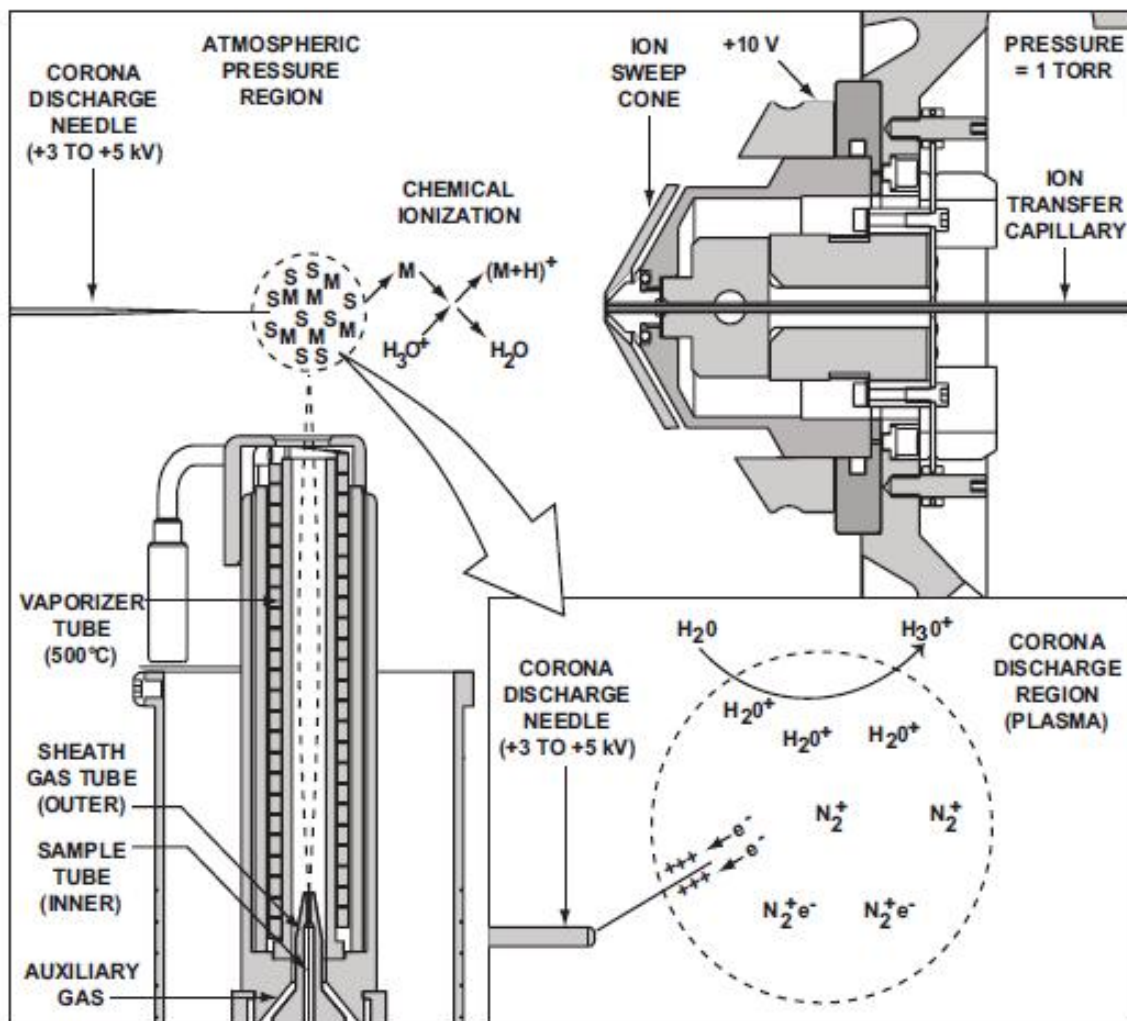
• Η ευαισθησία μέτρησης εξαρτάται από την συγκέντρωση του αναλύτη





Η πηγή ιοντισμού APCI, παρόλο που θεωρείται πολύ ήπια πηγή ιοντισμού διαφέρει από το ESI στο μηχανισμό παραγωγής και ανάλυσης ιόντων:

1. Το διάλυμα του δείγματος εκνεφώνεται από το ακροφύσιο της πηγής δημιουργώντας σταγονίδια.
2. Τα σταγονίδια διερχόμενα από έναν θερμαινόμενο θάλαμο μεταπίπτουν στην αέρια φάση με εξάτμιση του διαλύτη.
3. Ισχυρό δυναμικό το οποίο ασκείται σε ακίδα εκφόρτισης που βρίσκεται κοντά στην έξοδο του θαλάμου συντελεί στη δημιουργία ιόντων μέσω μιας σειράς χημικών αντιδράσεων μεταξύ των μορίων του διαλύτη και των μορίων αζώτου.
4. Τα σχηματισμένα ιόντα αλληλεπιδρούν με τα μόρια του δείγματος προκαλώντας τον ιονισμό τους.
5. Τα ιόντα του δείγματος εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.

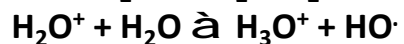


Ο σχηματισμός ιόντων, σε θετικό ιοντισμό, είναι αποτέλεσμα μιας σειράς αντιδράσεων. Συνοπτικά :

Αρχικός σχηματισμός ιόντων:



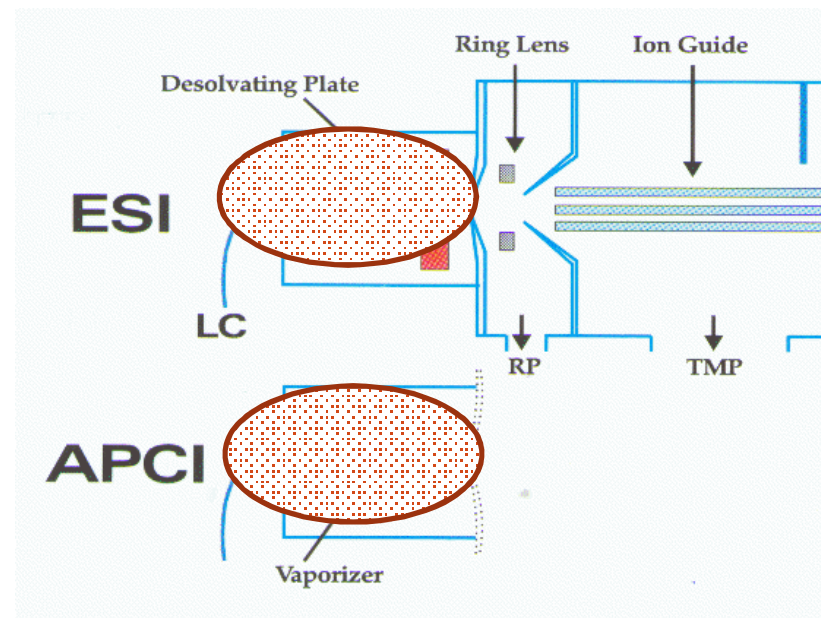
Δευτερεύον σχηματισμός ιόντων:



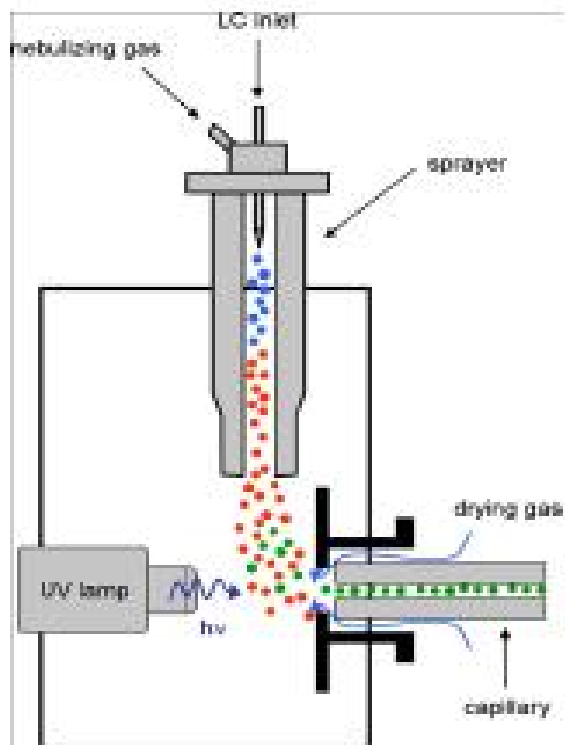
Μεταφορά πρωτονίου:



Στην περίπτωση του αρνητικού ιονισμού ο σχηματισμός του  $(M - H)^-$  πραγματοποιείται συνήθως μέσω απόσπασης ενός πρωτονίου από την ομάδα του OH·



Πιο πρόσφατα, ένας τρίτος τύπος πηγής ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης είναι διαθέσιμος, ο φωτοϊονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Photoionization-APPI). Ο ιονισμός επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης των προς ανάλυση μορίων με φωτόνια τα οποία παράγονται από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (λυχνία UV).



1. Το διάλυμα του προς ανάλυση δείγματος εκνεφώνεται από το ακροφύσιο της πηγής δημιουργώντας σταγονίδια.

2. Τα σταγονίδια εξατμίζονται σε ένα θερμαινόμενο θάλαμο.

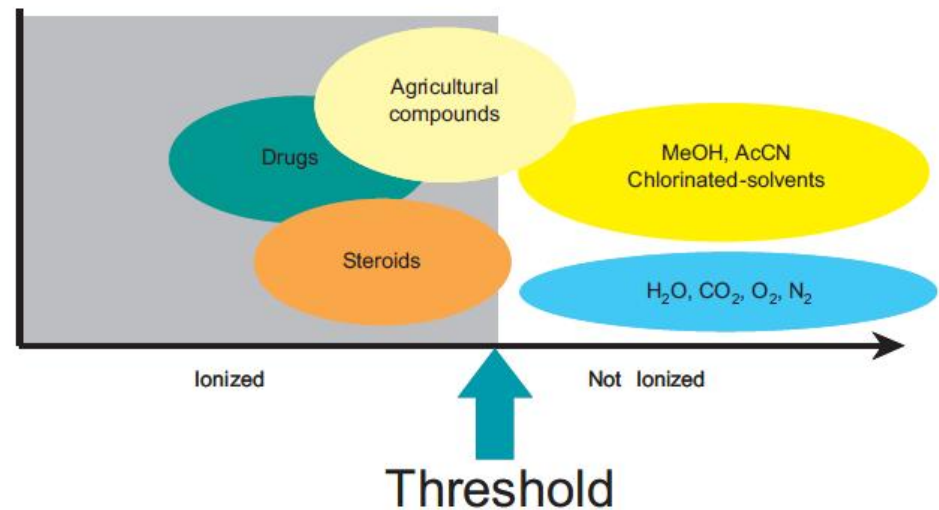
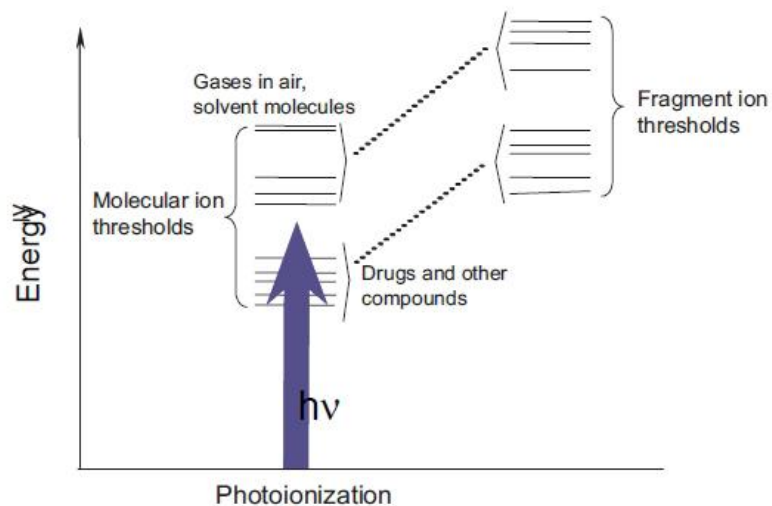
3. Τα προς ανάλυση μόρια αλληλεπιδρά με τα παραγόμενα από την πηγή φωτόνια. Αν το δυναμικό ιονισμού του μορίου είναι χαμηλότερο από την ενέργεια των φωτονίων που εκπέμπονται από την φωτεινή πηγή τότε παράγονται τα μοριακά ιόντα της υπό εξέταση ένωσης :



4. Στη περίπτωση παρουσίας πρωτικού διαλύτη το αναλυόμενο ιόν ανταλλάσει ένα υδρογόνο με το διαλύτη αυτό και σχηματίζεται το ψευδομοριακό ιόν :



5. Τα ιόντα του δείγματος εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.

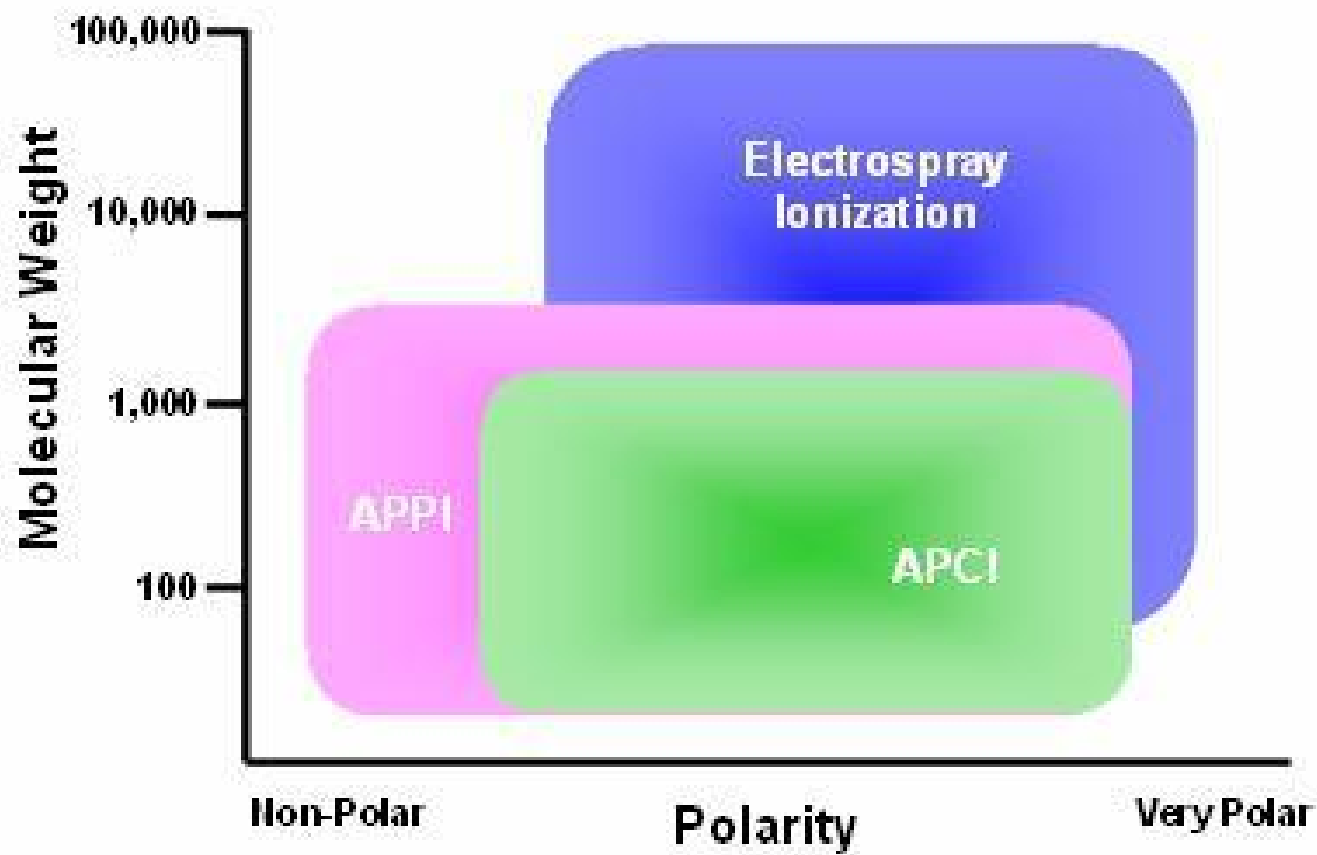


Για τον ιοντισμό των μορίων απαραίτητη προϋπόθεση είναι το δυναμικό ιονισμού τους να είναι χαμηλότερο από την ενέργεια των φωτονίων που εκπέμπονται από την πηγή.

Ενώσεις όπως τα στεροειδή και τα εντομοκτόνα έχουν δυναμικό ιονισμού χαμηλότερο από το όριο της ενέργειας των φωτονίων και έτσι σχηματίζουν μοριακά ιόντα .

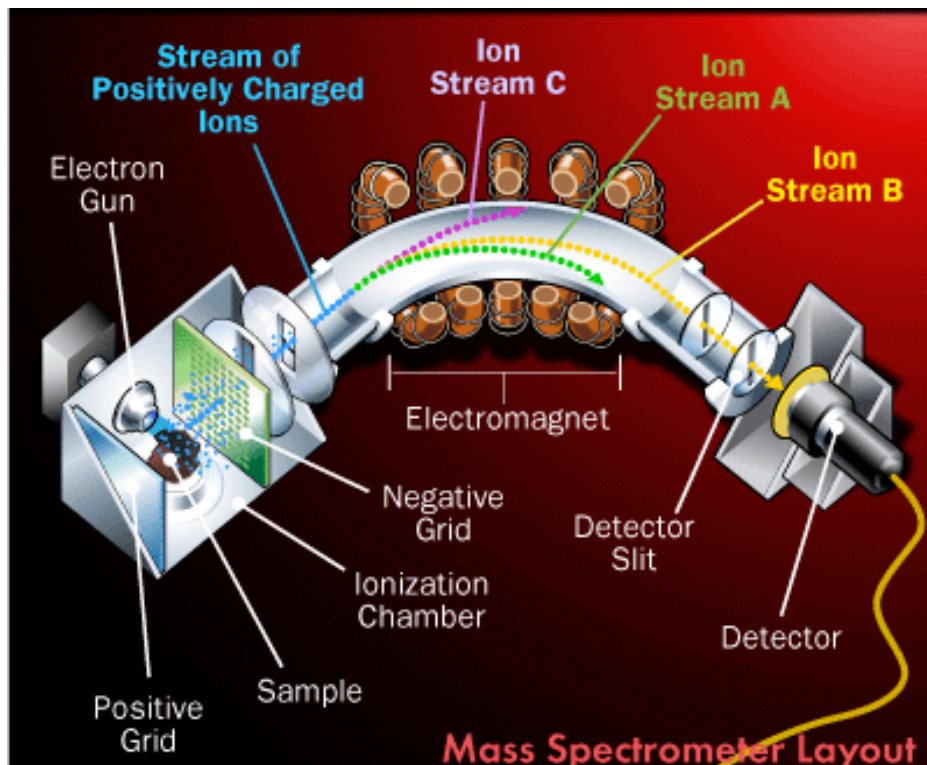
Με τη μέθοδο APPI παρατηρείται περιορισμένη θραυσματοποίηση αφού μεταφέρεται ένα μικρό ποσό ενέργειας στο μόριο.

Τα μόρια του αερίου αζώτου και των διαλυτών δεν ιονίζονται αφού το δυναμικό ιονισμού τους είναι μεγαλύτερο από την ενέργεια των φωτονίων που εκπέμπονται από την φωτεινή πηγή.



	Πλεονεκτήματα	Πηγές ιονισμού	Μειονεκτήματα
Μέθοδοι αέριας φάσης	<ul style="list-style-type: none"> <li>Μεγάλη ευαισθησία (picomole)</li> <li>Δυνατότητα δημιουργίας βάσης δεδομένων για τον προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων</li> <li>Συμβατό με αέρια χρωματογραφία (Adaptable to GC)</li> </ul>	<b>Electron Impact (EI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Περιορισμένο εύρος ανίχνευσης μαζών</li> <li>Πιθανότητα καταστροφής δείγματος λόγω υψηλής θερμοκρασίας πριν την εξάτμιση</li> <li>Υψηλή θραυσματοποίηση, ανικανότητα προσδιορισμού μοριακού ιόντος</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Μεγάλη ευαισθησία (picomole)</li> <li>Τεχνική ήπιου ιονισμού</li> </ul>	<b>Chemical Ionization (CI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Δεν υπάρχει δυνατότητα δημιουργίας βάσης δεδομένων για τον προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων</li> <li>Δείγματα σχετικά πτητικά και σταθερά σε υψηλές θερμοκρασίες</li> </ul>
Μέθοδοι εξάχνωσης	<ul style="list-style-type: none"> <li>Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 7000 Da</li> <li>Τεχνική ήπιου ιονισμού, μικρή θραυσματοποίηση, προσδιορισμός μοριακού ιόντος</li> </ul>	<b>Fast Atom Bombardment (FAB)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Μικρή ευαισθησία (nanomole)</li> <li>Απαραίτητη η διάλυση του δείγματος σε μήτρα (matrix)</li> <li>Υψηλός θόρυβος λόγω κορυφών μήτρας</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 30000 Da</li> <li>Μεγάλη ευαισθησία (femtomole)</li> <li>Τεχνική ήπιου ιονισμού</li> <li>Ανεκτικότητα σε ύπαρξη αλάτων, συνκέντρωσης τάξης millimole</li> </ul>	<b>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Χαμηλή ανάλυση</li> <li>Πιθανότητα χημικής αποικοδόμησης ουσίας λόγω ακτινοβολίας</li> <li>Υψηλός θόρυβος μήτρας που μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα σε ανίχνευση μαζών μικρότερων από</li> </ul>
Μέθοδοι υεκούσιου	<ul style="list-style-type: none"> <li>Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 2000 Da</li> <li>Μεγάλη ευαισθησία (femtomole)</li> <li>Τεχνική πολύ ήπιου ιονισμού</li> <li>Συμβατό με υγρή χρωματογραφία</li> </ul>	<b>Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Πιθανότητα χημικής αποικοδόμησης ουσίας λόγω θερμότητας</li> <li>Η ευαισθησία ποικίλει ανάλογα με την ουσία που μελετάται</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 70000 Da</li> <li>Μεγάλη ευαισθησία (femtomole)</li> <li>Τεχνική πολύ ήπιου ιονισμού</li> <li>Κατάλληλο για υγρή χρωματογραφία</li> </ul>	<b>Electrospray Ionization (ESI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Μη ανεκτικότητα σε ύπαρξη αλάτων</li> <li>Η καθαρότητα των ουσιών που εισέρχονται στην πηγή είναι σημαντική</li> </ul>

Οι αναλυτές μαζών είναι συσκευές που διαχωρίζουν τα παραγόμενα από την πηγή ιονισμού ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο ( $m/z$ ). Το ιοντικό ρεύμα που καταγράφεται αντιστοιχεί σε ένα μόνο  $m/z$  ανά μονάδα χρόνου. Υπάρχουν διαθέσιμοι πολλοί τύποι ανιχνευτών, οι οποίοι διακρίνονται από διαφορετικά χαρακτηριστικά και δυνατότητες.



## Lorentz force law

$$\mathbf{F} = q[\mathbf{E} + (\mathbf{v} \times \mathbf{B})]$$

where

$\mathbf{F}$  is the force (in newtons)

$\mathbf{E}$  is the electric field (in volts per metre)

$\mathbf{B}$  is the magnetic field (in teslas)

$q$  is the electric charge of the particle (in coulombs)

$\mathbf{v}$  is the instantaneous velocity of the particle (in metres per second)

$\times$  is the vector cross product

All the quantities written in boldface are vectors (in particular,  $\mathbf{F}$ ,  $\mathbf{E}$ ,  $\mathbf{v}$ ,  $\mathbf{B}$ ).





- **Αναλυτές τύπου δέσμης (Beam – Type Analyzers)**

- Φίλτρα μαζών (Mass filters)
- Φασματοφωτόμετρα μαζών τομέα πεδίου (Sector Field Mass Spectrometers)

- **Αναλυτές παγίδας ιόντων (Ion-Trapping Mass Analyzers, IT)**

- Τετραπολική παγίδα ιόντων (Quadrupole Ion Trap)
- Ηλεκτροστατική παγίδα ιόντων (Electrostatic Ion Trap)
- Αναλυτές τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbital Trap analyzers)
- Αναλυτές ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron, FT ICR)

- **Αναλυτές χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)**

- **Διακριτική ισχύς μαζών (Mass Resolving Power)** : χαρακτηρίζει τον βαθμό διαχωρισμού δύο κορυφών ίδιου σχήματος και μεγέθους και εκφράζεται από την **διακριτική ικανότητα (Resolution, R)**

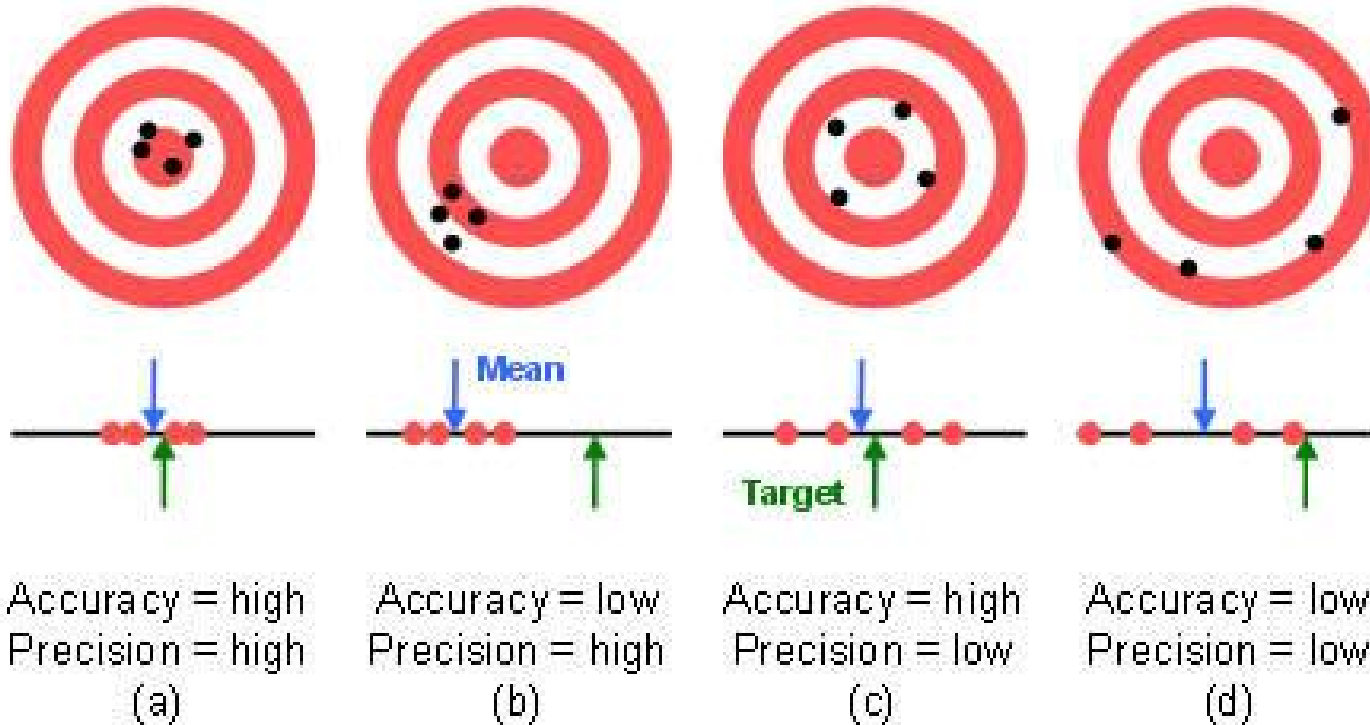
$$R = M/\Delta M \times$$

M: ο μέσος λόγος  $m/z$  των δύο κορυφών

$\Delta M \times$ : διαφορά του λόγου  $m/z$  δύο γειτονικών κορυφών

x: δείκτης που καθορίζει το ποσοστό επικάλυψης των κορυφών

- **Ευαισθησία (Sensitivity)**: χαρακτηρίζει τη το κατώτερο όριο μέτρησης και εκφράζεται από το λόγο σήμα/θόρυβο (signal / noise)
- **Εύρος μέτρησης μαζών (mass range)**: πρόκειται για το εύρος της περιοχής  $m/z$  που μπορεί να αναλύσει ένας αναλυτής μαζών
- **Γραμμικότητα (Linear Dynamic range)**: είναι η περιοχή όπου το σήμα των ιόντων μεταβάλλεται γραμμικά με τη συγκέντρωση του αναλύτη και εξαρτάται κυρίως από το είδος του αναλυτή και τη μέθοδο ιοντισμού.
- **Αποδοτικότητα (Efficiency)**: εκφράζει το ποσοστό των ιόντων που τελικά αναλύονται μετά τον ιοντισμό
- **Ταχύτητα (speed)**: εκφράζει τη χρονική διάρκεια που απαιτείται για τη λήψη συγκεκριμένων φασμάτων στη μονάδα του χρόνου και δίνεται σε Hz

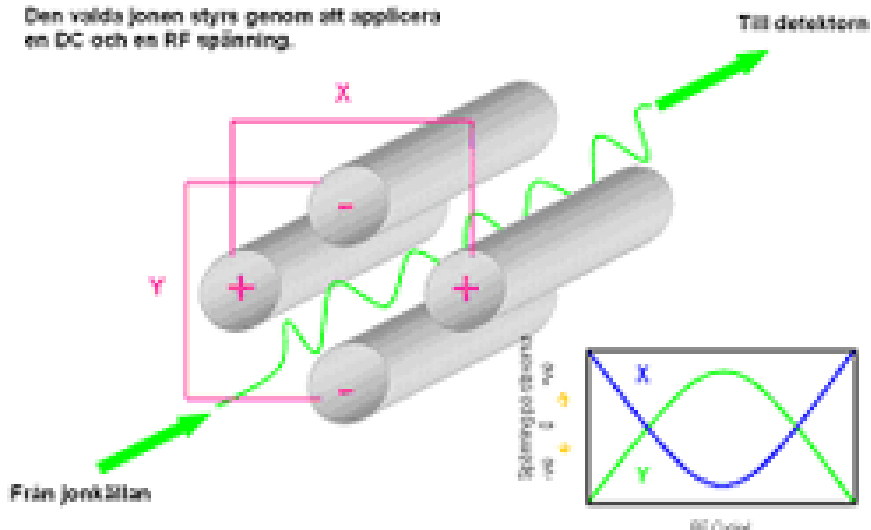


- Ορθότητα μέτρησης (Accuracy)
- Ακρίβεια μέτρησης-επαναληψιμότητα (Precision-reproducibility)

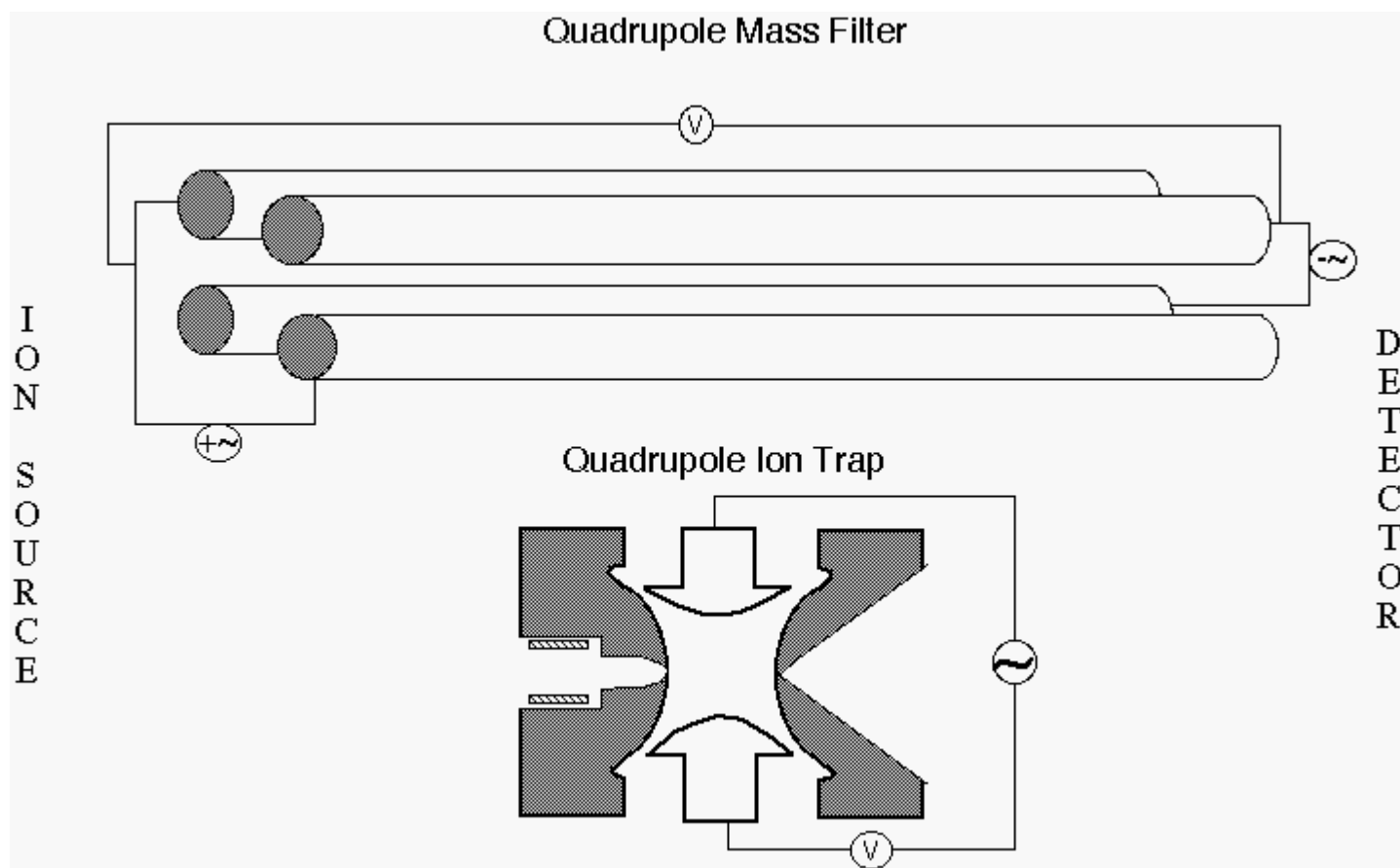
Οι τετραπολικοί ανιχνευτές αποτελούνται από τέσσερα κυλινδρικά ή ιδανικά υπερβολικά ηλεκτρόδια τοποθετημένα ανά ζεύγη απέναντι σχηματίζοντας σταυρό. Σε κάθε ζεύγος εφαρμόζεται δυναμικό συνεχούς ρεύματος (dc) που ανά ζεύγος διαθέτει αντίθετη πολικότητα. Σε αυτά τα δυναμικά επίσης υπερτίθεται ένα δυναμικό εναλλασσόμενου ρεύματος (rf) με διαφορά φάσης  $180^\circ$  ανά ζεύγος.

Η συνολική εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού επιδρά με διαφορετικό τρόπο στην τροχιά των ιόντων που διέρχονται από τον χώρο μεταξύ των ηλεκτροδίων ανάλογα με το λόγο  $m/z$ . Τα ιόντα εκείνα που αντιστοιχούν στο δυναμικό που εφαρμόζεται θα διαπεράσουν και θα εξέλθουν από το τετράπολο προς τον ανιχνευτή. Τα υπόλοιπα ιόντα χάνονται στα τοιχώματα του τετραπόλου και αποβάλλονται στα απόβλητα με τη βοήθεια των συστήματος κενού. Λόγω του γεγονότος αυτού, κάποιες φορές αναφέρεται και ως «φίλτρο μαζών» αφού μόνο ένα ιόν το οποίο αντιστοιχεί σε μία μοναδική τιμή του λόγου  $m/z$  διαπερνά το σύστημα των τετραπόλων.

Den valda jonen styrs genom att applicera en DC och en RF spänning.



Οι αναλυτές παγίδας ιόντων έχουν παρόμοια αρχή λειτουργίας με τους τετραπολικούς αναλυτές μαζών. Στις παγίδες τα ιόντα παγιδεύονται μεταξύ ηλεκτροδίων συγκεκριμένης κατασκευής που προσομοιάζει αυτήν των τετραπόλων. Αν και γενικά πρόκειται για απλές συσκευές, η αρχή μεθόδου στους αναλυτές παγίδας ιόντων είναι αρκετά πιο πολύπλοκη σε σύγκριση με τους τετραπολικούς αναλυτές μαζών και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι τετραπολικής παγίδας ιόντων η τρισδιάστατη (3D) και η γραμμική.



**Η τρισδιάστατη παγίδα ιόντων** χρησιμοποιεί σταθερής έντασης συνεχές ρεύμα και ραδιοσυχνότητες δημιουργώντας εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο με σκοπό τη παγίδευση των ιόντων. (Wolfgang Paul, βραβείο Nobel φυσικής 1989). Αποτελείται από 2 πλευρικά μεταλλικά ηλεκτρόδια σε σχήμα υπερβολής και ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο μεταξύ των δύο πλευρικών. Τα ιόντα παγιδεύονται στο χώρο μεταξύ των τριών αυτών ηλεκτροδίων μέσω του επαγομένου ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται από τη χρήση συνεχούς (DC) και εναλλασσόμενου (AC) ρεύματος.

Τα ιόντα των μορίων του δείγματος εισέρχονται στην παγίδα μετά τον ιοντισμό τους μέσω μίας μικρής οπής. Υψηλής συχνότητας τάση, ραδιοσυχνότητα (RF) εφαρμόζεται στο κεντρικό δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο. Τα εισερχόμενα ιόντα ακολουθώντας πολύπλοκες τροχιές επιβραδύνονται και προστατεύονται από τις μεταξύ τους συγκρούσεις με τη χρήση συνήθως ηλίου. Καθώς το μήκος κύματος της εφαρμοζόμενης ραδιοσυχνότητας μεταβάλλεται αποσταθεροποιούνται σταδιακά τα ιόντα ανάλογα με τη μάζα τους. Η δημιουργούμενη διαφορά δυναμικού έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται το μήκος κύματος της ταλάντωσης που ακολουθούν στον οριζόντιο άξονα και τελικά να εκτοξεύονται έξω από την παγίδα μέσω ενός εκ των δύο πλευρικών ηλεκτροδίων. Τα ιόντα στη συνέχεια κατευθύνονται στον ανιχνευτή και στο καταγραφικό σύστημα και έτσι προκύπτουν τα φάσματα μαζών.

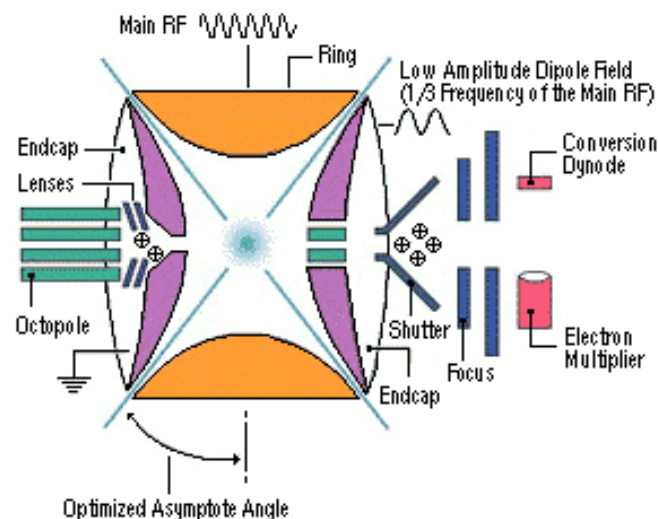


Cross section of ion trap, along z-axis

End Cap Electrode

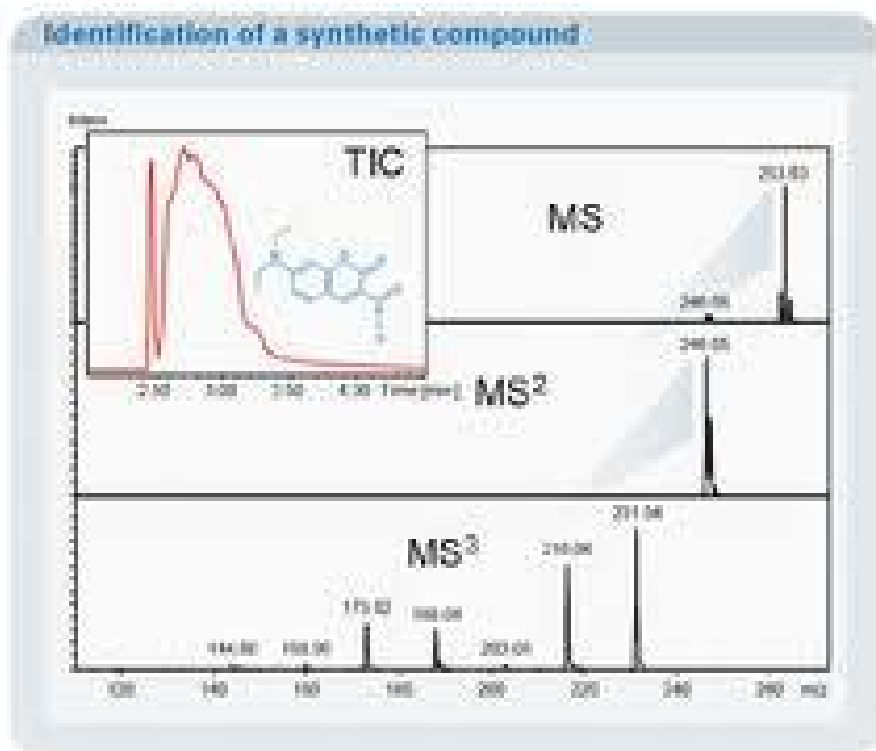
Ring Electrode

See R. March, *K. Mass Spectrom.*, 32, 351-369, 1997.



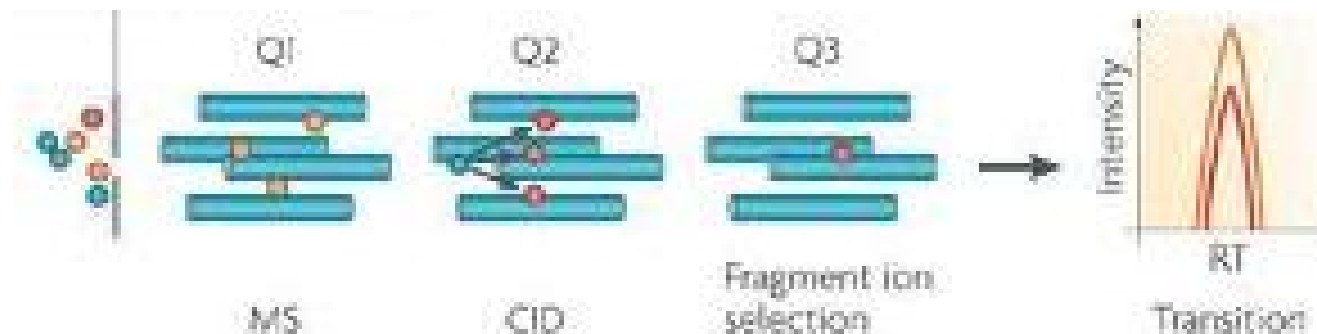
**Η γραμμική παγίδα ιόντων** αποτελεί εξέλιξη της τρισδιάστατης παγίδας ιόντων με τροποποιημένη γεωμετρία και μηχανισμό παγίδευσης ιόντων. Βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές αφού παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών παγίδων ιόντων όπως αυξημένη χωρητικότητα ιόντων, ταχύτητα σάρωσης και απλότητα κατασκευής.

Σημαντικό πλεονέκτημα της παγίδας ιόντων είναι η δυνατότητα καταγραφής  $MS^n$  δεδομένων, το χαμηλό κόστος του και ο μικρός όγκος του μηχανήματος.



Δίδυμη φασματομετρία μάζας (Tandem MS) επιτυγχάνεται με τη σύνδεση τριών τετραπόλων στη σειρά (triple quadrupole-QqQ). Το πρώτο (**Q1**) και το τρίτο τετράπολο (**Q3**) λειτουργούν ως αναλυτές μαζών ενώ το ενδιάμεσο τετράπολο (**q2**) χρησιμοποιείται για τη θραυσματοποίηση των ιόντων.

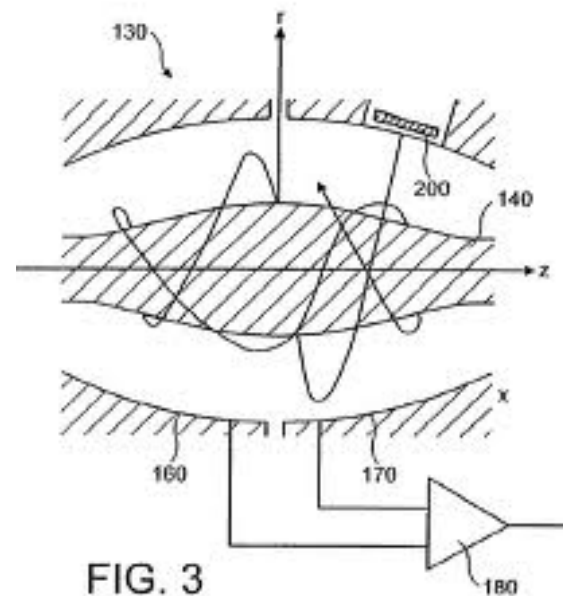
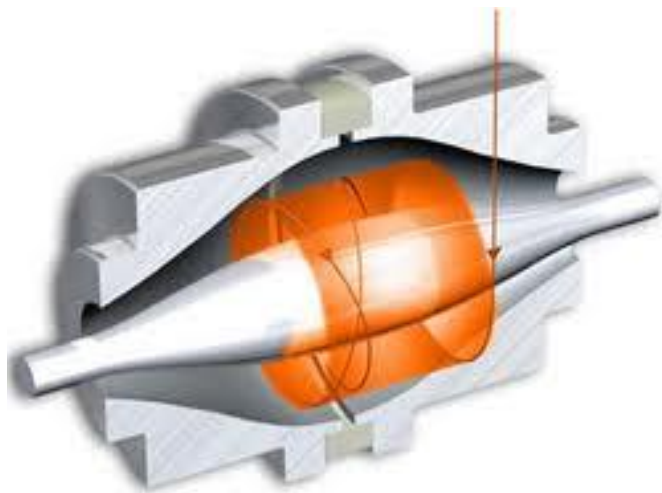
Στο **Q1** γίνεται η αρχική επιλογή ιόντων (φίλτρο μαζών) τα οποία οδηγούνται στο **q2** όπου θα πραγματοποιηθεί η θραυσματοποίησή τους. Τα ιόντα που προκύπτουν θα εισέλθουν στο **Q3** όπου και θα ανιχνευτούν. Η θραυσματοποίηση στο **q2** επιτυγχάνεται μέσω σύγκρουσης των ιόντων με ουδέτερα μόρια κάποιου αέριου όπως ήλιο, άζωτο ή αργό. Κατά τη σύγκρουση ποσοστό της κινητικής ενέργειας απορροφάται από τα ιόντα με αποτέλεσμα τη διάσπαση δεσμών και τη δημιουργία θραυσμάτων. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική θραυσματοποίησης είναι η **CID** ή CAD (Collision Induced Dissociation ή Collisionally Activated Dissociation) και πρόκειται για μηχανισμό που η θραυσματοποίηση πραγματοποιείται σε αέρια φάση. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα του αναλυτή αυτού είναι η απλή κατασκευή, η ταχύτητα, το χαμηλό κόστος καθώς και το γεγονός ότι είναι συμβατός με πηγές ιονισμού API.





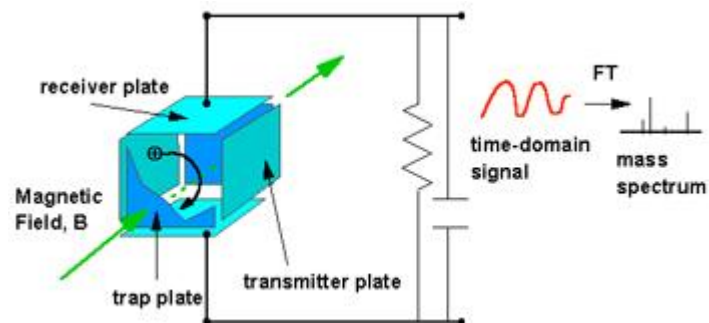
Ο αναλυτής Orbitrap είναι ο πιο πρόσφατος, τελευταίας τεχνολογίας αναλυτής μαζών και λειτουργεί παγιδεύοντας ιόντα σε κυκλική κίνηση. Αποτελείται από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο με σχήμα ατράκτου και ένα εξωτερικό κυλινδρικό ηλεκτρόδιο, ομοαξονικό με το κεντρικό ηλεκτρόδιο.

Η διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων αναγκάζει τα ιόντα σε περιστροφική κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και ταυτόχρονα σε ταλάντωση στον άξονα  $z$ . Μετά την ανίχνευση του ιοντικού ρεύματος εφαρμόζεται μετασχηματισμός Fourier (FT) για τη μετατροπή του σήματος σε φάσμα  $m/z$ . Ο αναλυτής Orbitrap παρουσιάζει πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα (mass resolution: 30000-10000), μεγάλη ακρίβεια μάζας (mass accuracy: 2-5 ppm) καθώς επίσης έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μεγάλου εύρους μαζών (mass range: 50-4000).



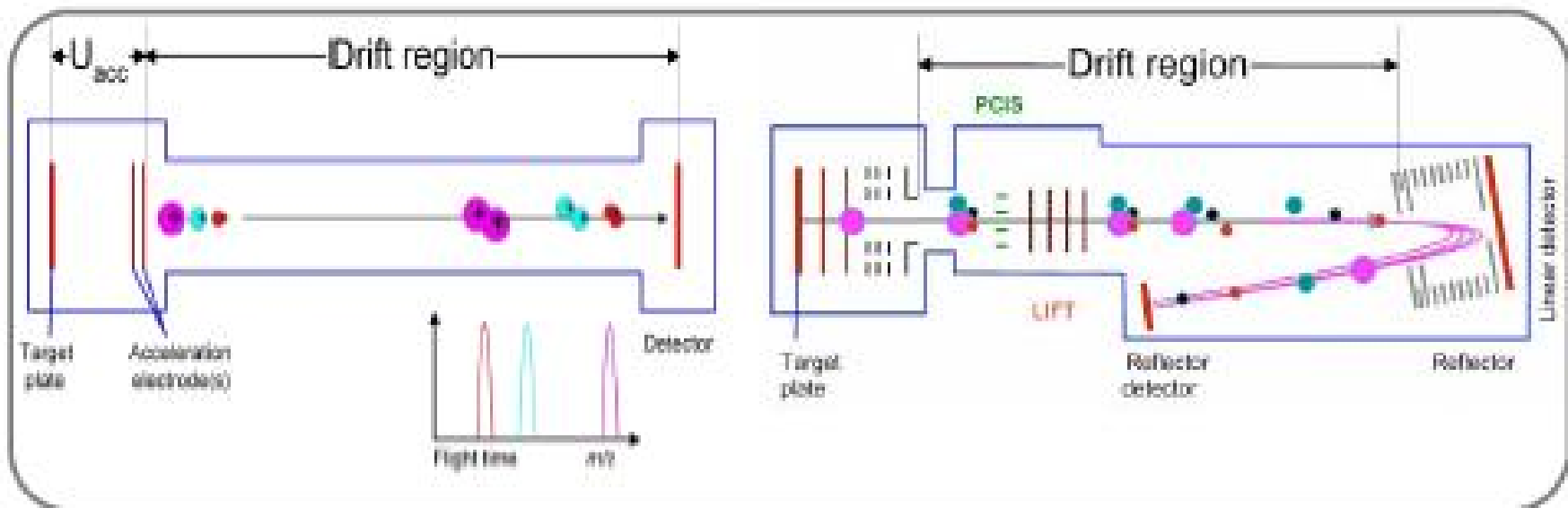
Ο αναλυτής μετασχηματισμού κατά Fourier (Fourier Transform-FT) είναι η πιο πρόσφατη εκδοχή του αναλυτή κυκλοτρονικού συντονισμού (Ion Cyclotron Resonance-ICR). Πρόκειται για ένα ηλεκτρομαγνητικό αναλυτή στον οποίο εφαρμόζεται τόσο ισχυρό μαγνητικό πεδίο που η ακτίνα της τροχιάς του ιόντος γίνεται μικρότερη από τις εσωτερικές διαστάσεις του αναλυτή. Έτσι τα ιόντα παγιδεύονται σε μια κυκλική διαδρομή μέσα στο ICR και ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται εμποδίζει την έξοδο τους από την παγίδα. Η ραδιοσυχνότητα του κύκlotρου σχετίζεται άμεσα με το λόγο  $m/z$  του ιόντος.

Όταν ασκηθεί κατάλληλη ραδιοσυχνότητα τα ιόντα που αντιστοιχούν σε αυτή τη ραδιοσυχνότητα διεγείρονται, οπότε και ανιχνεύονται. Μια άλλη μέθοδος είναι η διέγερση όλων των ιόντων με μια γρήγορη σάρωση συχνοτήτων και το πολύπλοκο σήμα που προκύπτει αναλύεται στις επιμέρους συχνότητες με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT). Αυτού του είδους ο αναλυτής είναι πιο εξελιγμένος σε ότι αφορά την ανάλυση, την ταχύτητα, την ακρίβεια και τη δυνατότητα MSn αναλύσεων, όμως είναι πολύ ακριβός και έχει μεγάλες απαιτήσεις σε τεχνολογική υποστήριξη (πχ. μεγάλο κενό).



Ένας πολύ γνωστός αναλυτής μαζών είναι ο αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight-TOF). Η λειτουργία του βασίζεται στην μέτρηση του χρόνου πτήσης ενός ιόντος μέσα στον αναλυτή. Οι διαστάσεις του αναλυτή, η ενέργεια που δίνεται στο ιόν καθώς και το ηλεκτρικό πεδίο είναι γνωστά οπότε εύκολα υπολογίζεται ο λόγος  $m/z$  του ιόντος. Ο πιο απλός τύπος αναλυτή είναι ο ευθύγραμμος που παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα όπως χαμηλή διακριτική ικανότητα και υψηλές απαιτήσεις ειδίκευσης για τη χρήση του.

Σημαντικό για τη βελτιστοποίηση της ανάλυσης του συγκεκριμένου αναλυτή είναι η είσοδος των ιόντων με παλμούς αφού δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού ιόντων με ίδιο λόγο  $m/z$  και διαφορετική κινητική ενέργεια. Επιπλέον η εισαγωγή ανακλαστήρα (reflector) συμβάλει στον έλεγχο της αρχικής διανομής της κινητικής ενέργειας στα ιόντα επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανίχνευση ιόντων με ίδια μάζα και διαφορετική κινητική ενέργεια

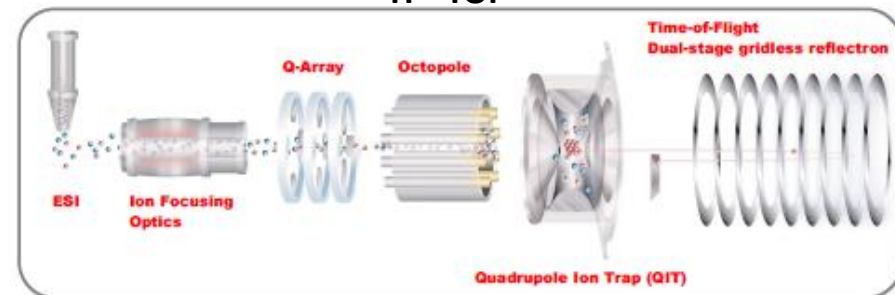


Παράλληλα με την ανάπτυξη νέας τεχνολογίας αναλυτών, αναπτύσσονται συνεχώς συστήματα που αποτελούνται από περισσότερους του ενός αναλυτές σε σειρά. Σε κάποιες διατάξεις παρεμβάλλονται κυψελίδες θραυσματοποίησης (collision cells) ανάμεσα στους αναλυτές για επίτευξη δίδυμης (Tandem Mass Spectrometry), ή /και διαδοχικής ( $MS^n$ ) φασματομετρίας μαζών. Τα υβριδικά συστήματα συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των ανιχνευτών που τα απαρτίζουν και έτσι δημιουργούνται ανιχνευτές με πολλαπλές δυνατότητες.

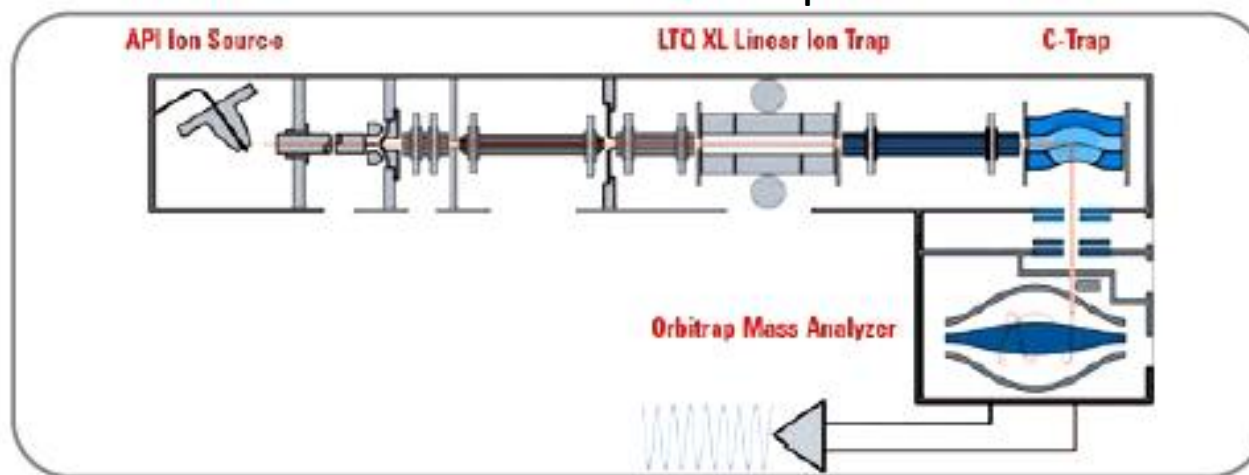
Κάποια τέτοια υβριδικά συστήματα είναι τα εξής:

- Q-IT (Quadrupole - Ion Trap)
- Q-TOF (Quadrupole - TOF)
- IT-TOF (Ion Trap - TOF)
- LIT-FTICR (Linear Ion Trap - Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)
- LIT-Orbitrap (Linear Ion Trap - Orbitrap)

IT - TOF



IT – Orbital trap



Hyphenated Techniques combine chromatographic and spectral methods to exploit the advantages of both

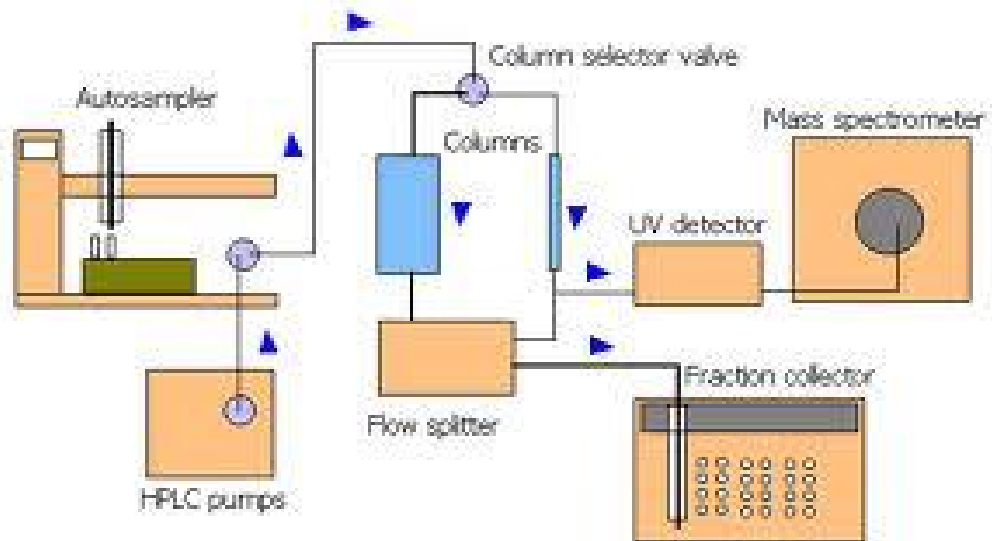
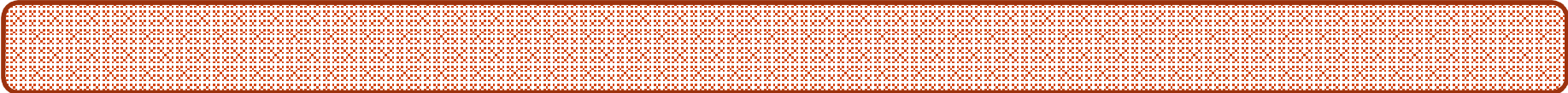
**Chromatography** - Produces pure or nearly pure fractions of chemical components in a mixture

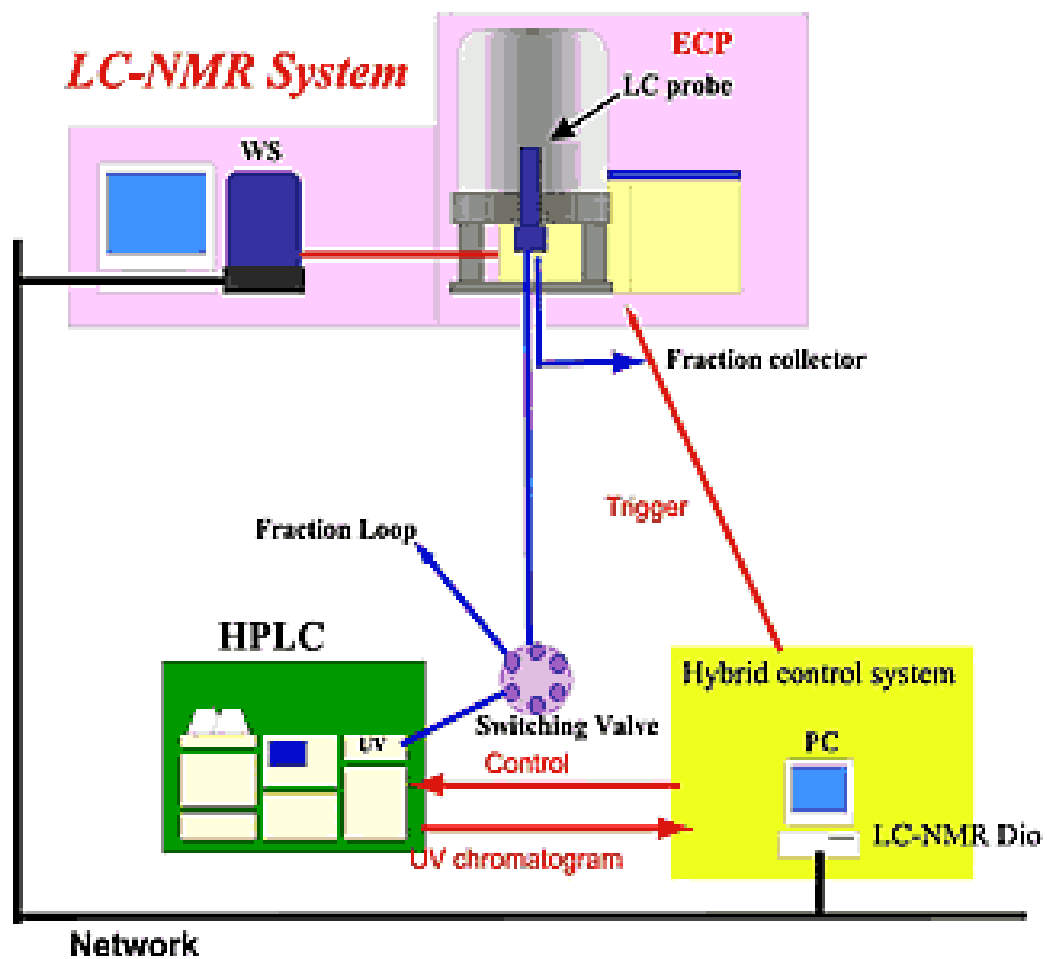
**Spectroscopy** – Produces selective information for identification using standards or library spectra

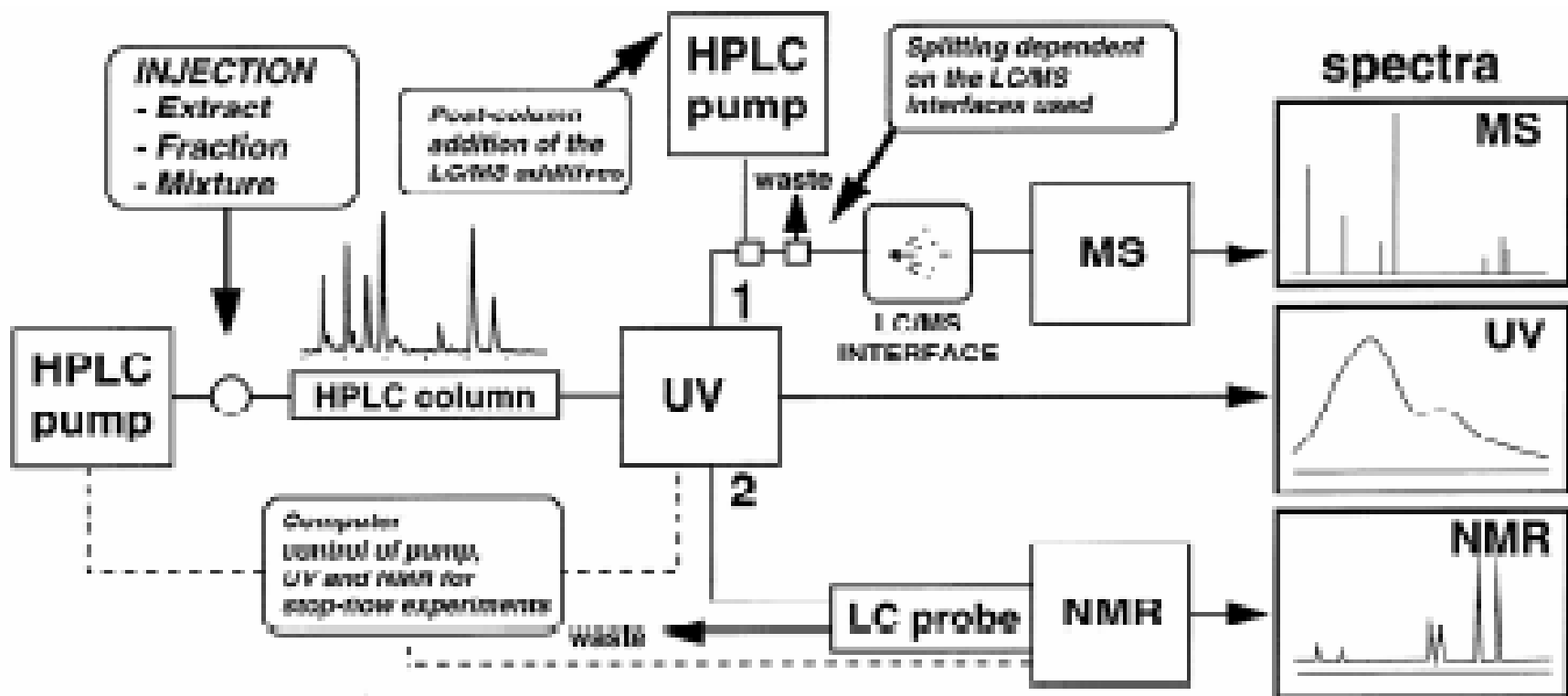
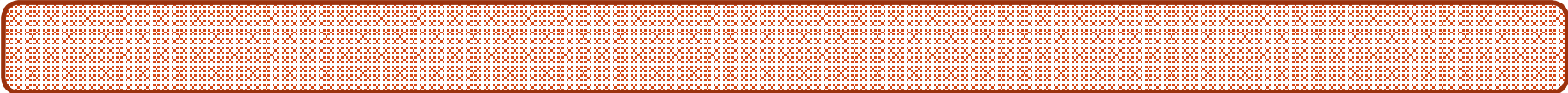
Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη της τεχνολογίας έχει επηρεάσει δραματικά τη μελέτη των φυσικών προϊόντων διευρύνοντας σημαντικά το πεδίο έρευνας και ανάπτυξης. Πολλές αναλυτικές συσκευές έχουν τεχνολογικά αναβαθμιστεί βελτιώνοντας, διευκολύνοντας, επιταχύνοντας και αυτοματοποιώντας την πειραματική διαδικασία. Συγκεκριμένα, η δυνατότητα σύνδεσης συστημάτων Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με διάφορους ανιχνευτές (UV, FD, EC, RID, ELSD, CAD), καθώς και οι λεγόμενες Συνδεδεμένες Τεχνικές (Hyphenated Techniques), με σημαντικότερες :

- **Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με ανιχνευτή UV-Vis, σειράς φωτοδιόδων (LC-PDA)**
- **Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματόμετρο Μάζας (LC-MS) και**
- **Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Πυρηνικού και Μαγνητικού Συντονισμού (LC-NMR)**

Οι τεχνικές αυτές έχουν συμβάλει καθοριστικά στην ανάλυση και στο χαρακτηρισμό δευτερογενών μεταβολιτών και γενικότερα στη φαρμακογνωσία και τη χημεία των φυσικών προϊόντων



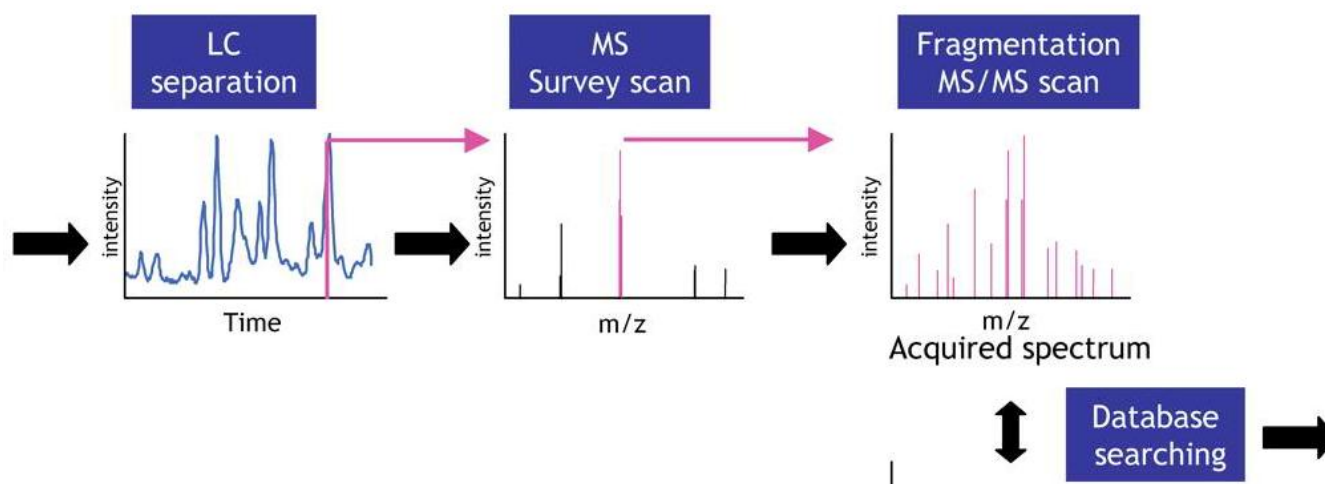






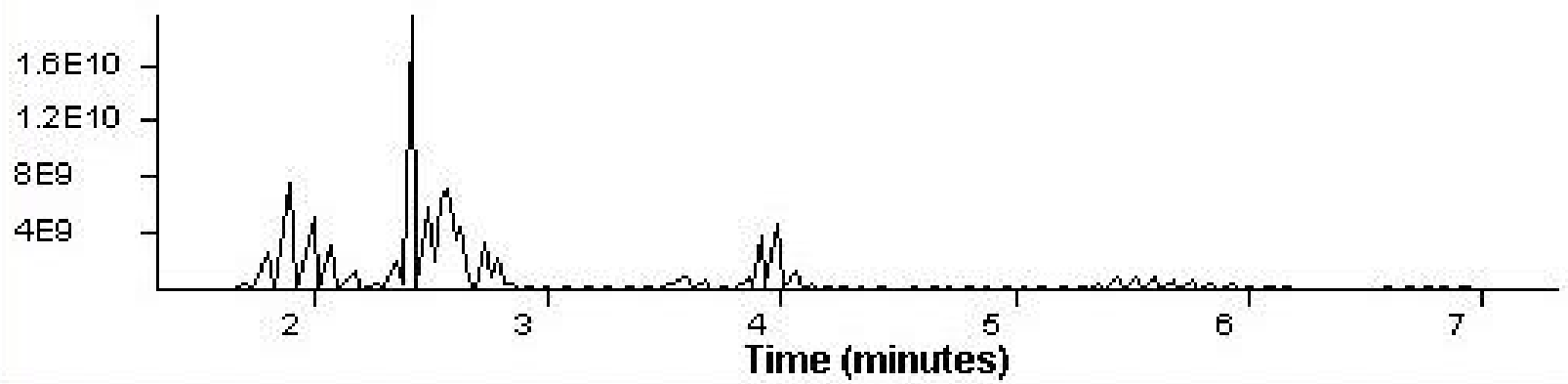
**Στρατηγική στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων βιοδραστικών μορίων που σκοπεύει στην ταυτοποίηση των φυσικών προϊόντων όσο το δυνατόν πιο νωρίς στην πειραματική διαδικασία. Ειδικότερα:**

- στοχεύει στη συλλογή πληροφοριών σχετικά με τα φυσικά προϊόντα (δομή, ιδιότητες, δράση) περιορίζοντας την απομονωτική διαδικασία
- χρησιμοποιεί νέες, αυτοματοποιημένες και γρήγορες κυρίως αναλυτικές τεχνικές (state of the art, high throughput techniques)
- ιδιαίτερο ρόλο διαδραματίζουν ειδικά λογισμικά (software) και μηχανές αναζήτησης (search engines)
- κεντρικό ρόλο καταλαμβάνουν οι βιβλιοθήκες (in house or commercial databases)

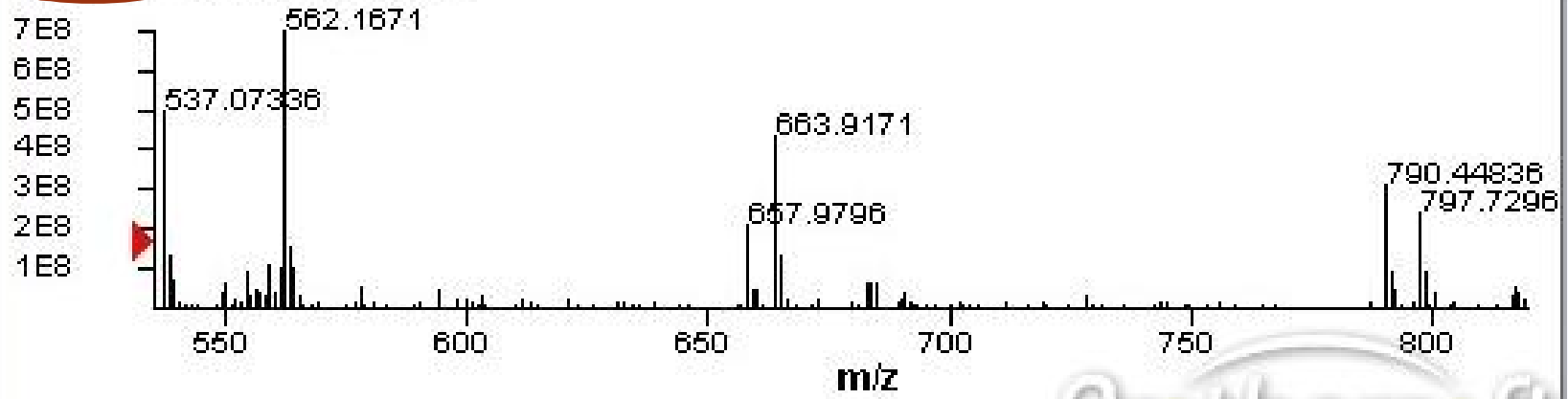


msLevel 1 Display Type TIC

lot of msLevel 1



ID 85 msLevel 1





COPYRIGHT © 1988 MARVEL ENTERTAINMENT GROUP, INC.  
ALL RIGHTS RESERVED. DISTRIBUTED BY KING FEATURES SYNDICATE

