

Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

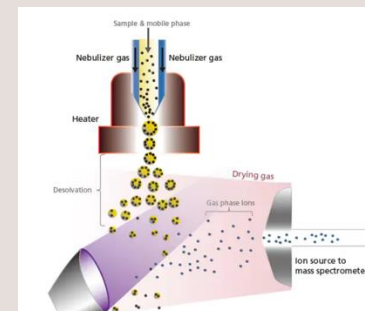
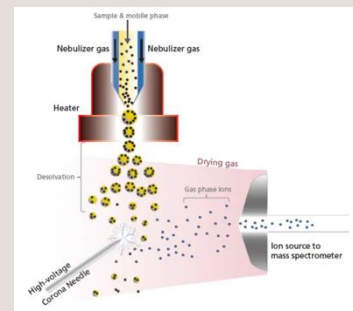
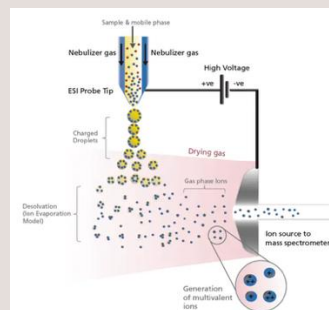
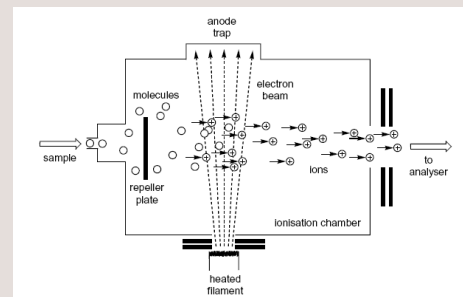
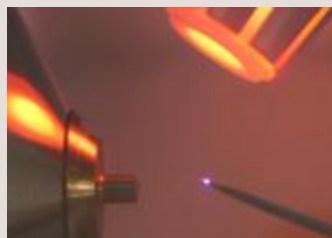
Πηγές ιόντων—

Συζευγμένες Τεχνικές –
Hyphenated Techniques

Δρ. Εμμανουήλ Σεμιδαλάς

Δρ. Μάριος Κωστάκης –

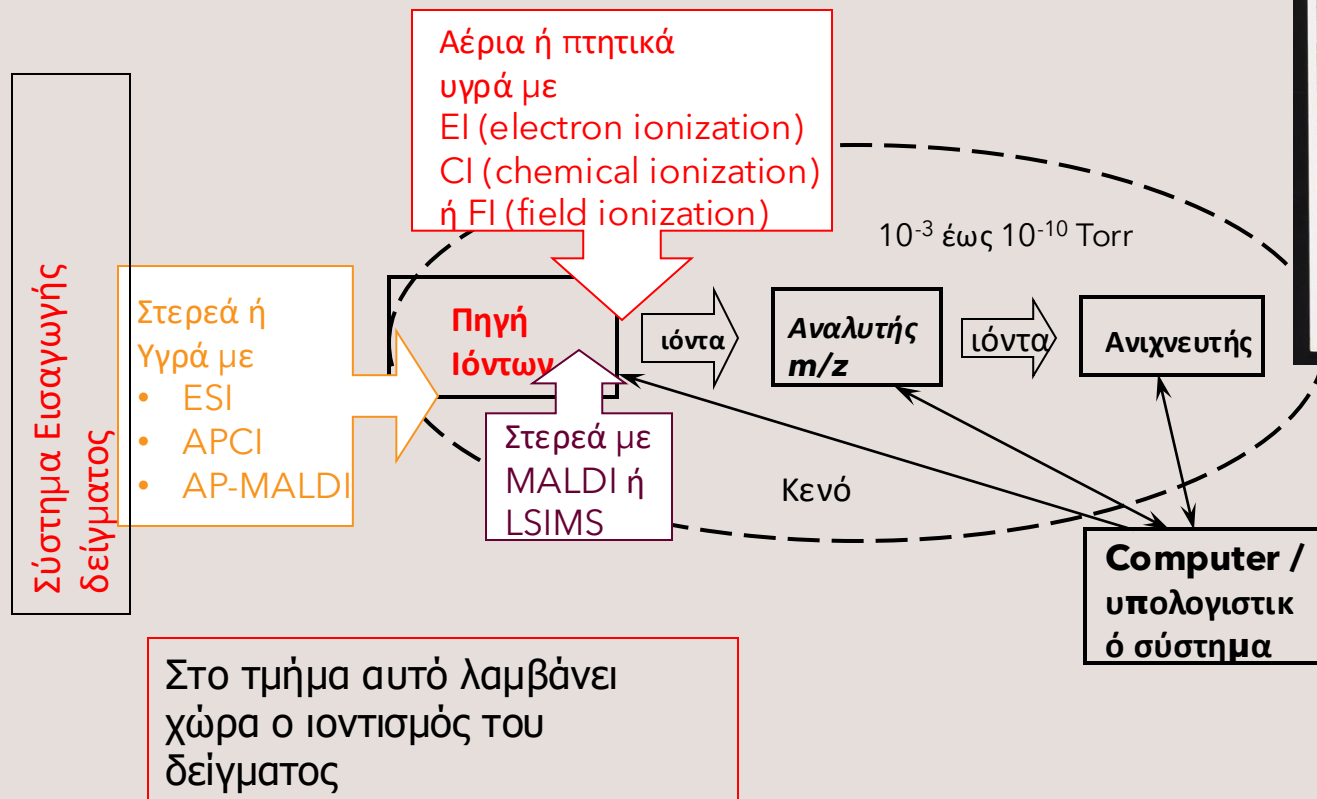
Καθ. Δρ. Νικόλαος Θωμαΐδης



Agenda

- Πηγές ιοντισμού
- Πηγές αέριας φάσης
- Πηγές εκρόφησης
- Συζευγμένες τεχνικές
- GC/MS
- HPLC/MS
- UPLC/TOF

Πηγές Ιόντων



Πηγές Ιόντων

Πηγές Αέριας Φάσης:

Το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται

Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Impact/Electron ionization, **EI**)

Χημικού ιοντισμού (Chemical Ionization, **CI**)

Πηγές εκρόφησης:

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

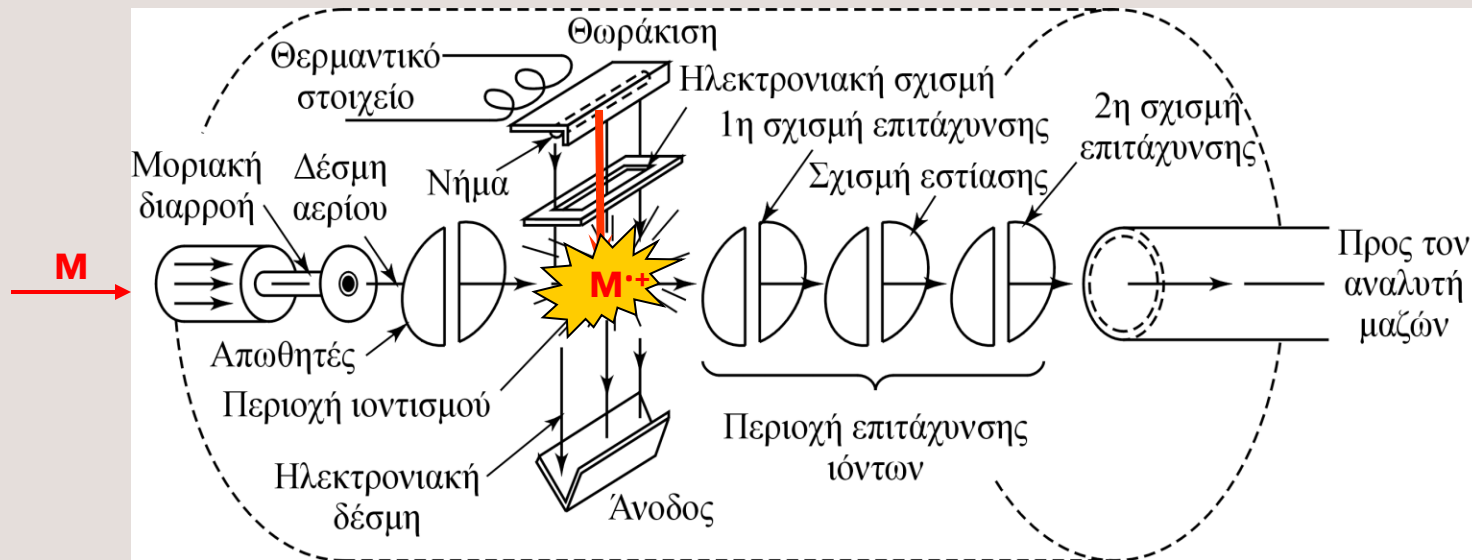
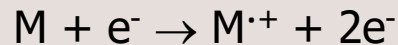
Βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment, **FAB**)

Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, **MALDI**)

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

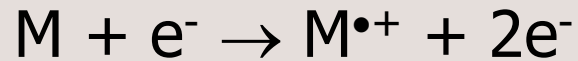
Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - EI -

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

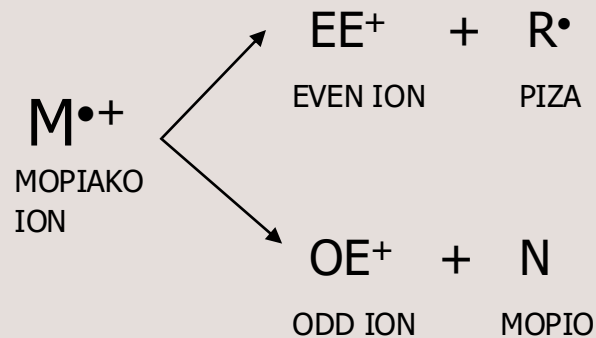


Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - EI -

Ιοντισμός :



Θραυσματοποίηση :

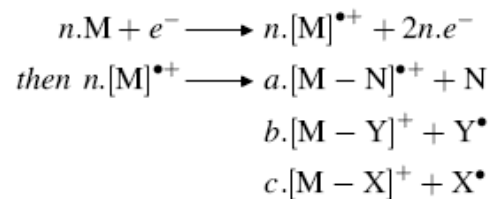
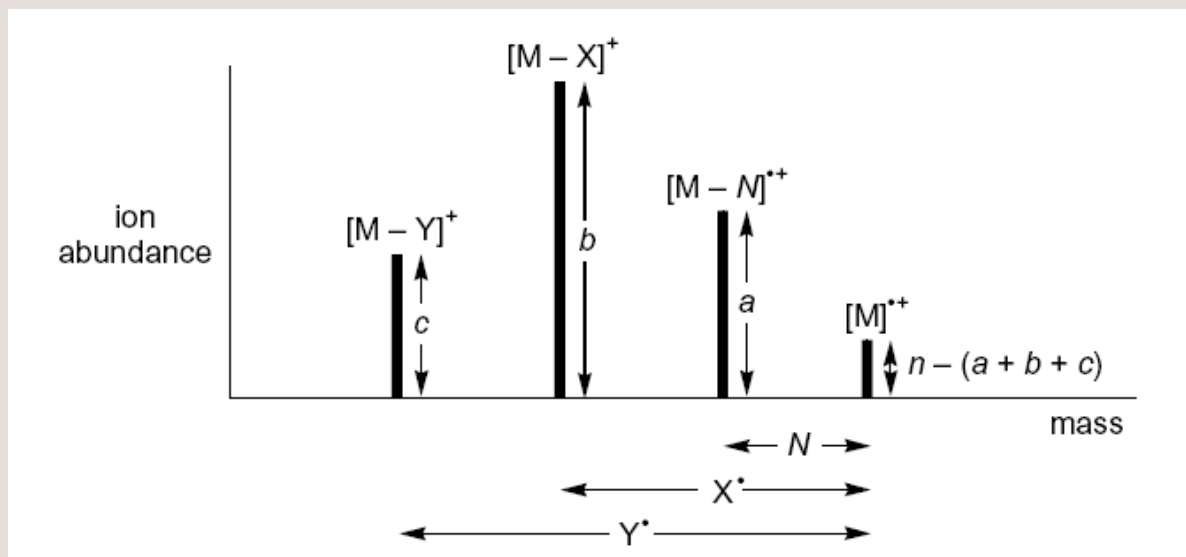


Θυγατρικά
ιόντα:

EE^+ : ιόν με άρτιο αριθμό e

OE^+ : ιόν με περιττό αριθμό e

Φάσματα ΕΙ - MS



Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - ΕΙ -

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

Χημικός Ιοντισμός - CI -

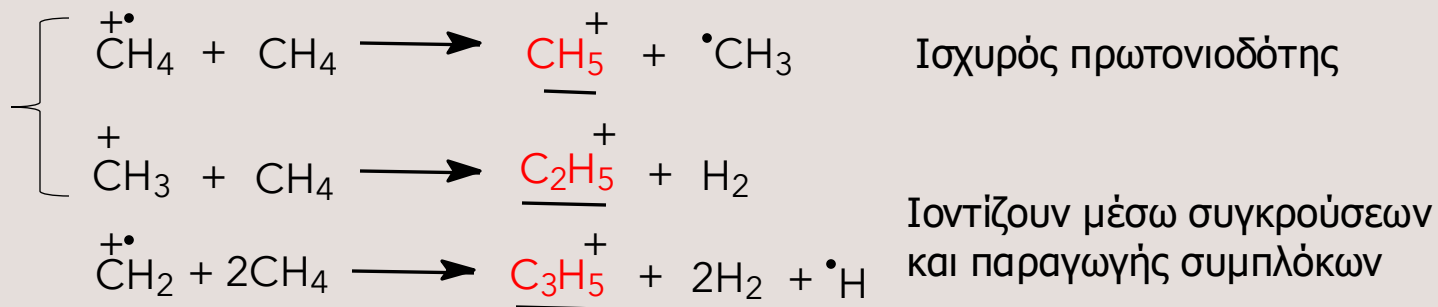
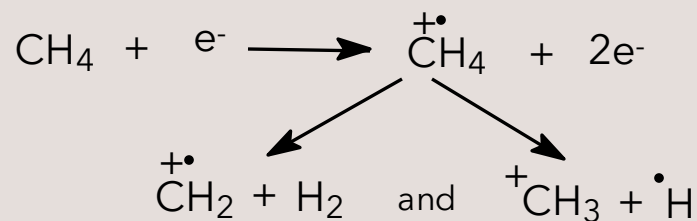
Βομβαρδισμός **αέριου αντιδραστηρίου** (συχνά CH_4 , NH_3 ή N_2) με e^- υψηλής ενέργειας με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιόντων του αντιδραστηρίου. Τα **αέρια μόρια (M) του δείγματος** συγκρούονται με τα ιόντα του αντιδραστηρίου και τα ιοντίζουν με αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων ή φορτίου, προσθήκης, ακόμα και πυρηνόφιλης υποκατάστασης.

Προϋπόθεση: ο λόγος $[\text{αντιδραστηρίου}]/[\text{δείγματος}] = 10^3\text{-}10^4$

CI Χαμηλής πίεσης: $10^{-3} - 10^{-4}$ Torr, ιδανική για **GC-MS**

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

Χημικός Ιοντισμός - CI -



Τύποι Χημικού Ιοντισμού

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΦΟΡΤΙΟΥ



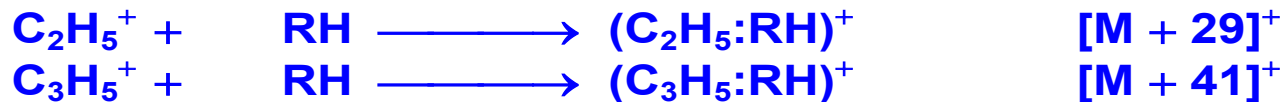
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΟΝΙΟΥ

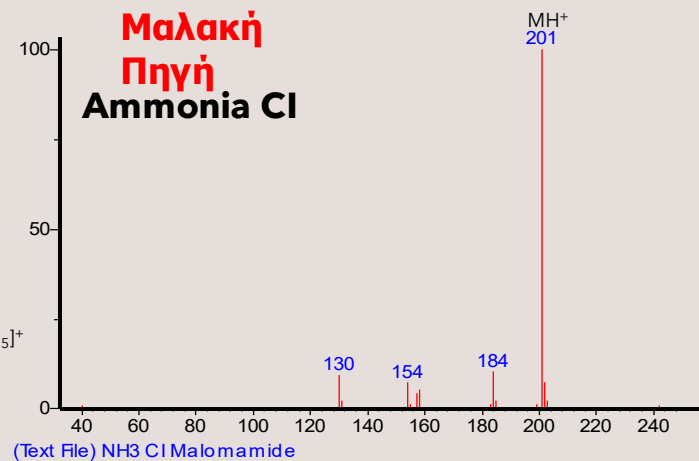
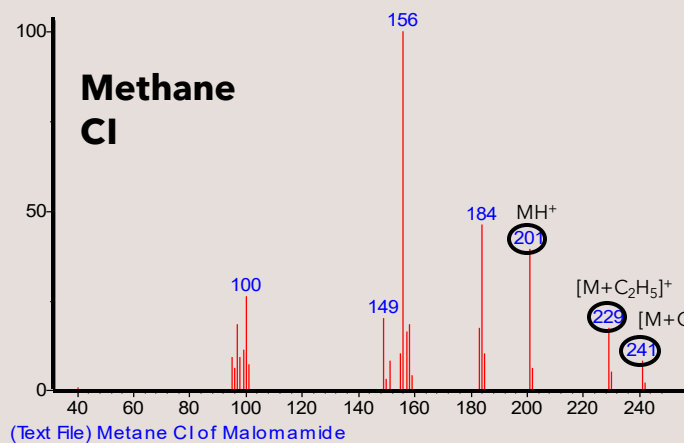
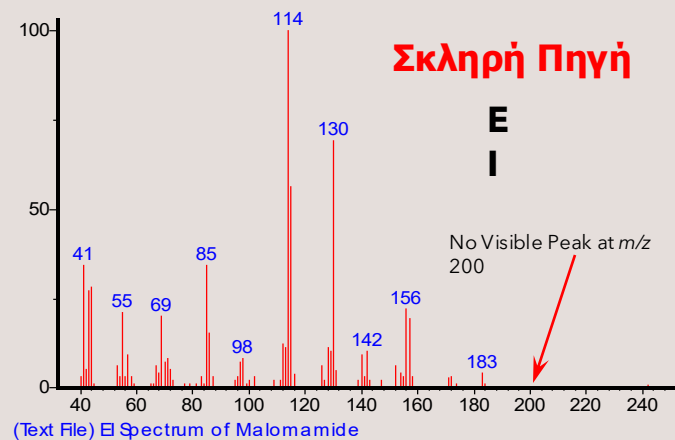
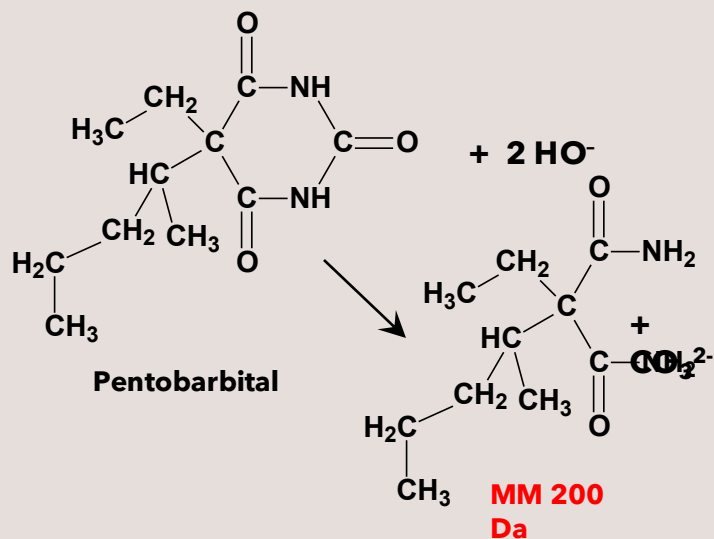


ΑΠΟΣΠΑΣΗ ΥΔΡΙΔΙΟΥ



ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗ





Χημικός Ιοντισμός - CI -

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

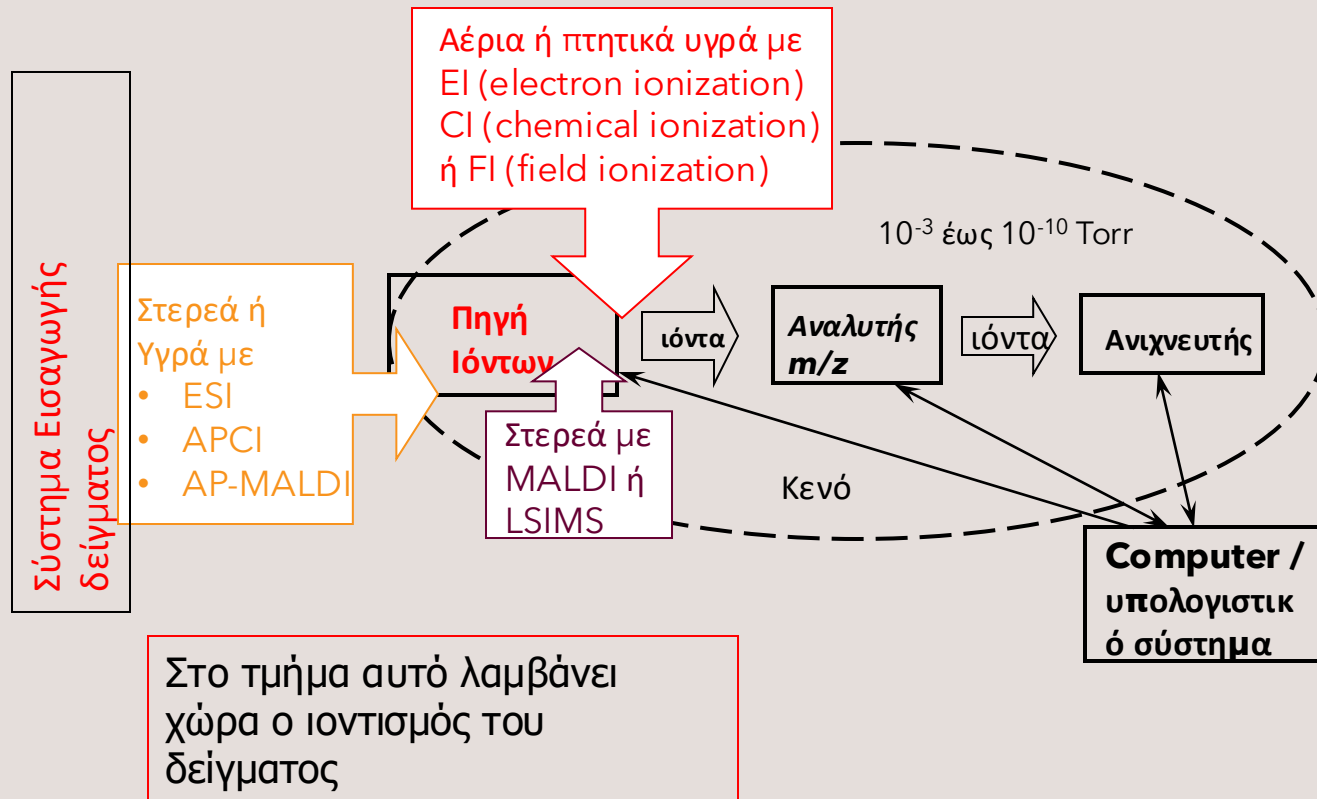
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

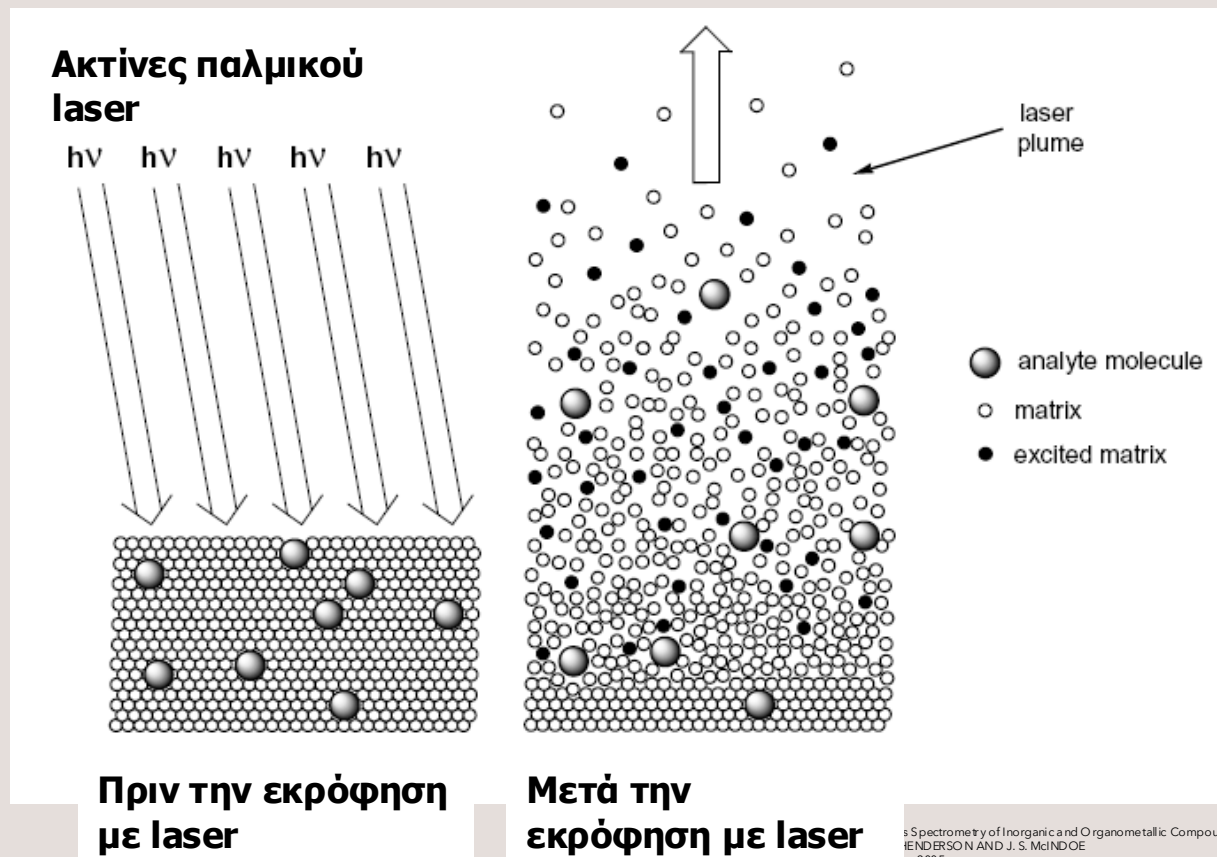
ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

Πηγές Ιόντων



Ιοντισμός με εκρόφηση: (A) – MALDI



Ιοντισμός με εκρόφηση: (A) – MALDI



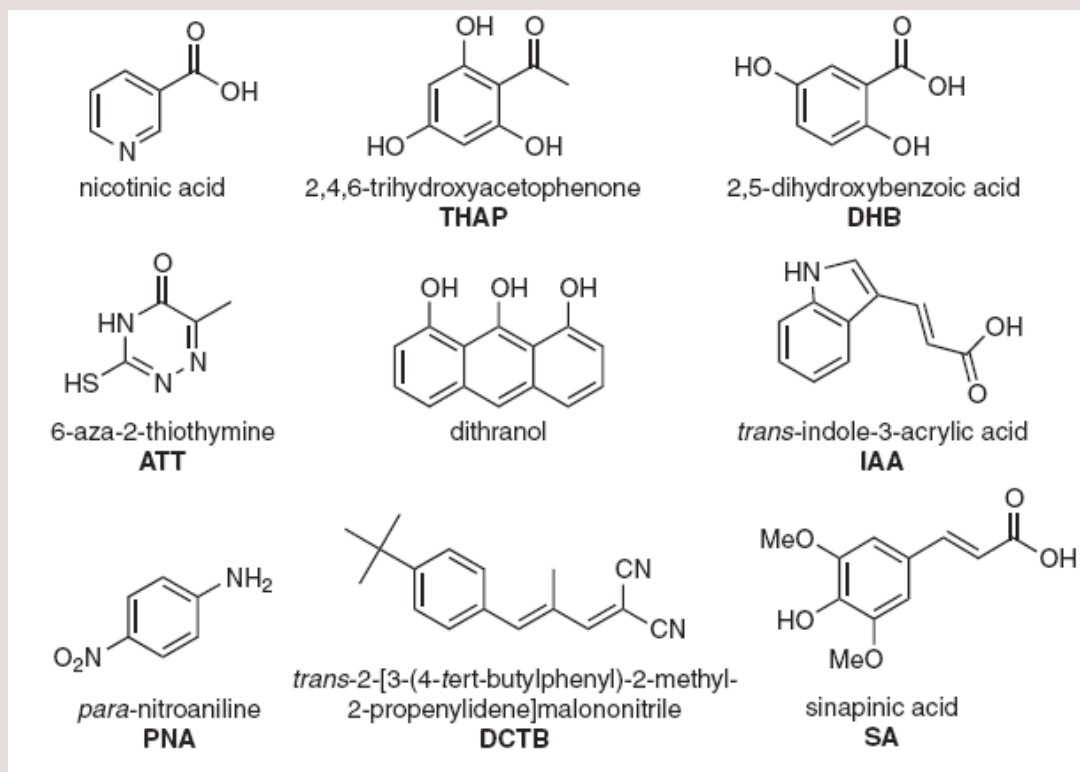
AB SCIEX 5800 MALDI TOF/TOF System equipped with a Nd: YAG (355 nm) laser with 1 KHZ pulse.



<https://www.youtube.com/watch?v=0jeFpXHZ8W0>

- MALDI -

Συχνότερα χρησιμοποιούμενες μήτρες για MALDI



- MALDI -

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

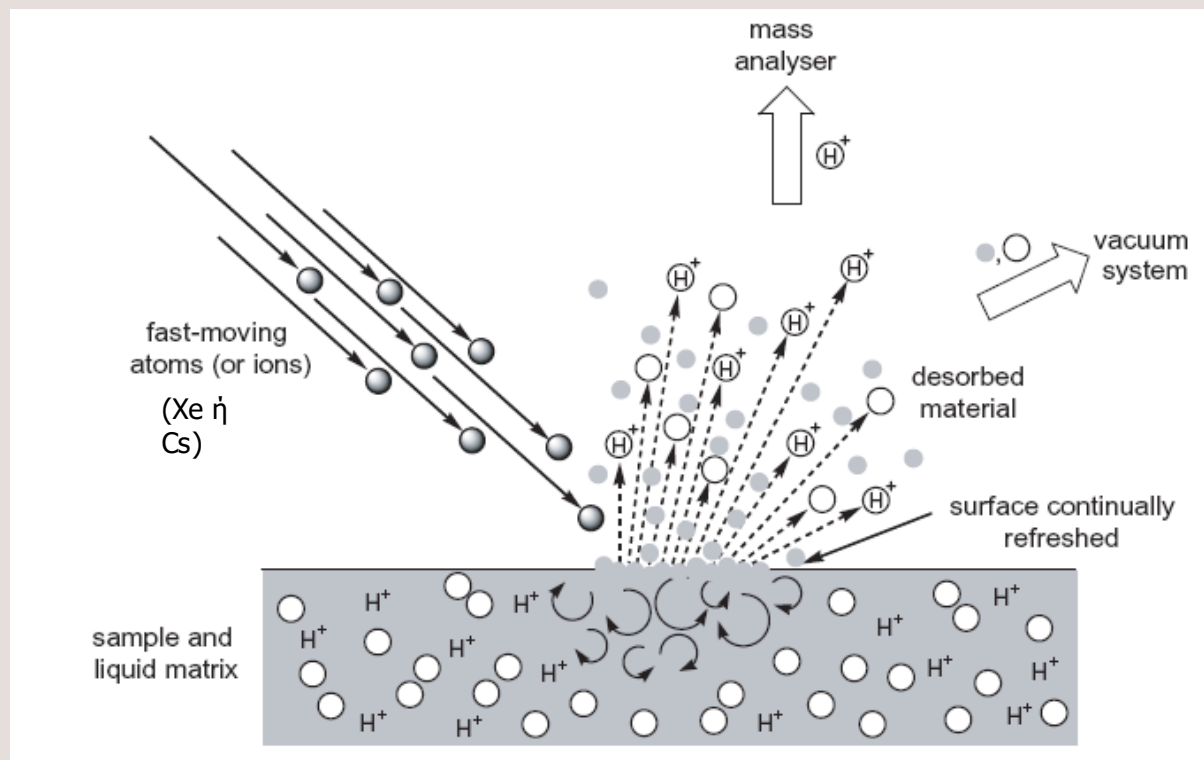
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

Ιοντισμός με εκρόφηση Fast atom bombardment (FAB)



- FAB -

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

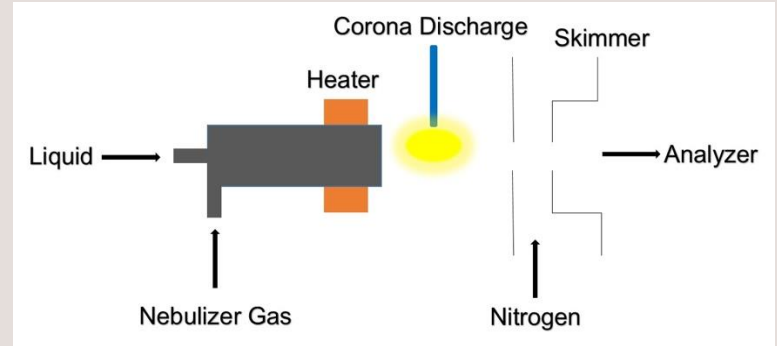
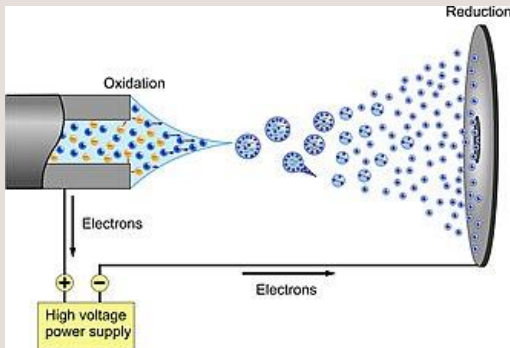
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση - API -



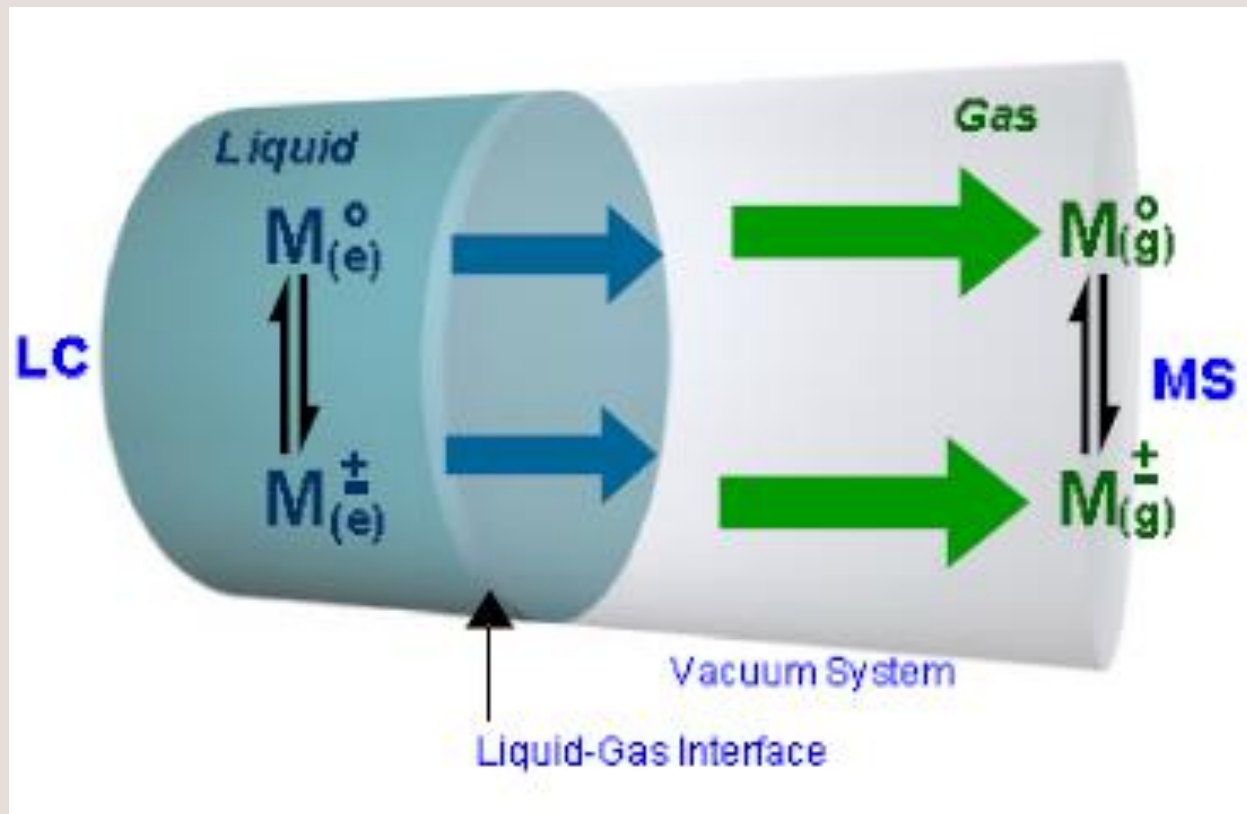
Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure CI, APCI)

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

Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)

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

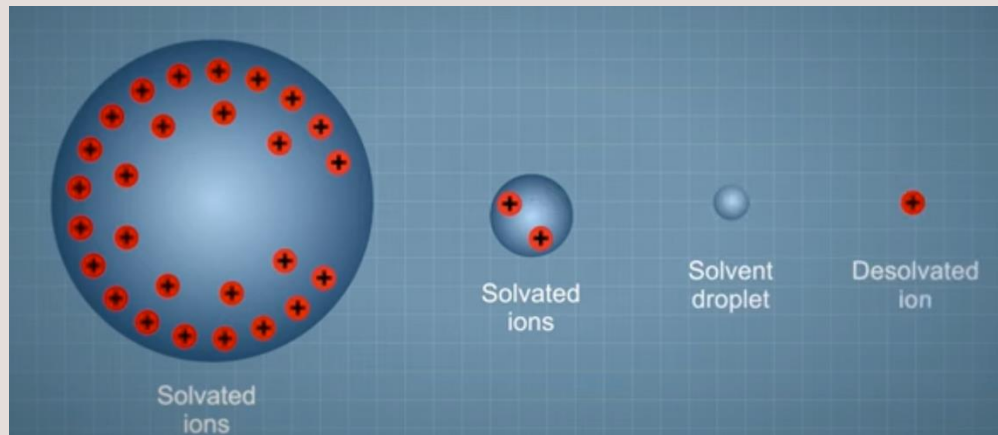
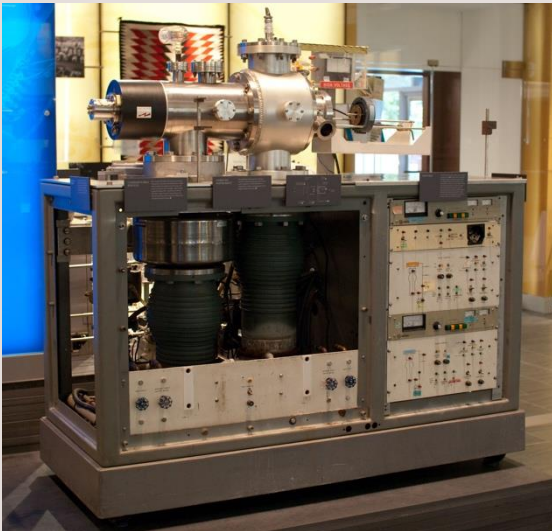
Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση - API -



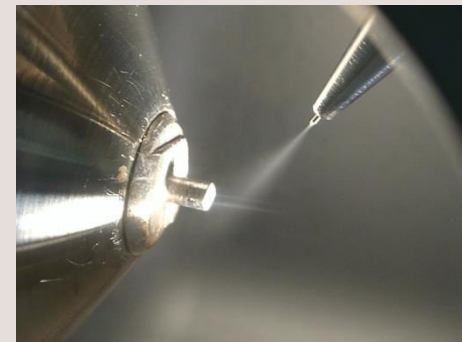
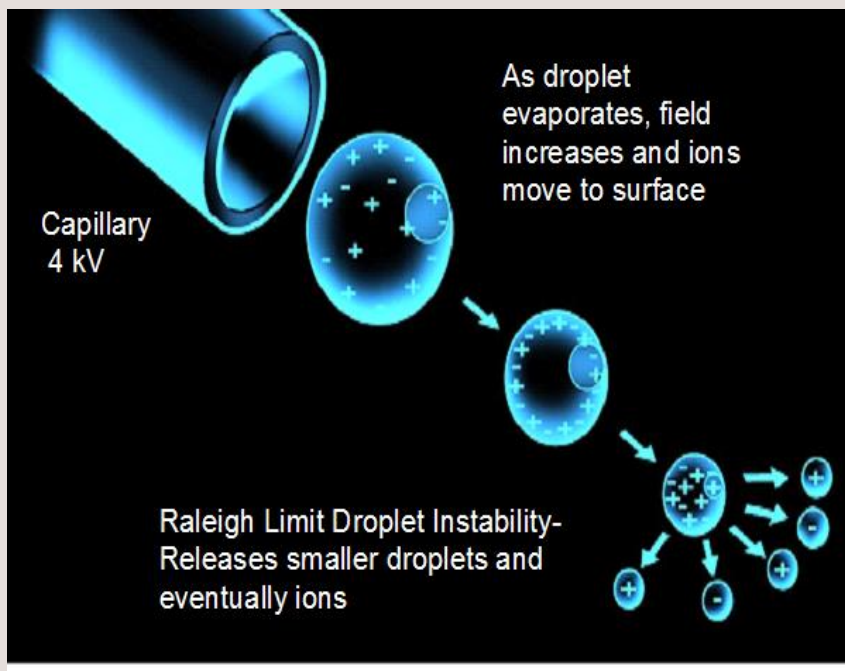
Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό - ESI -



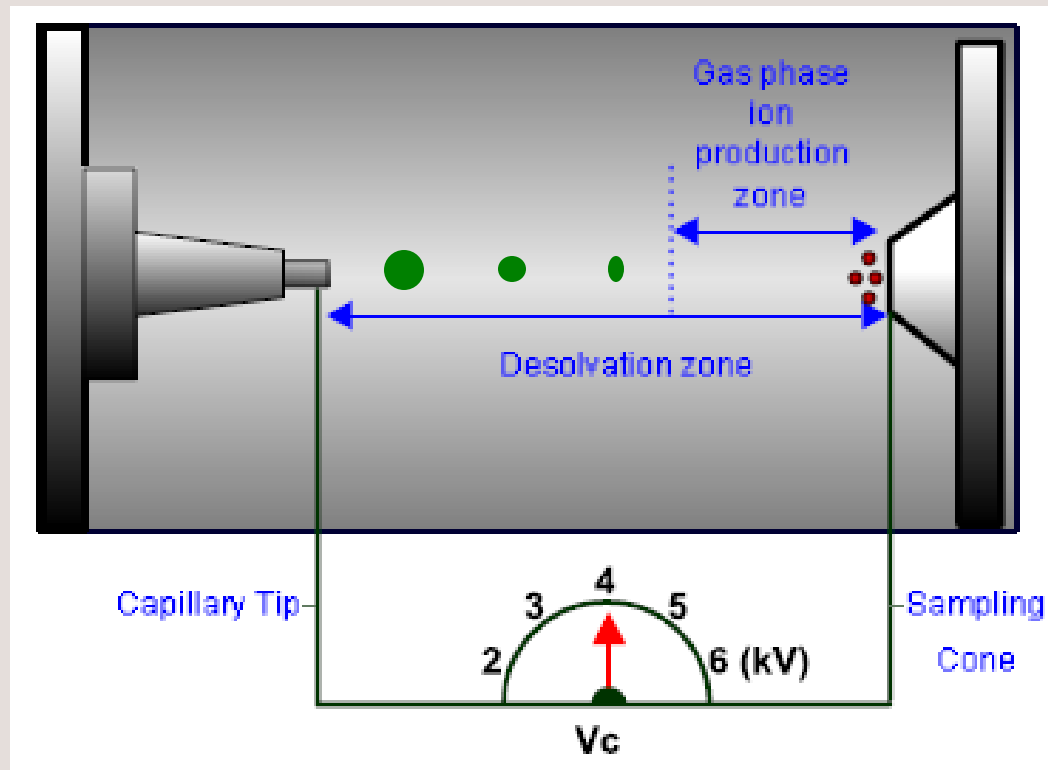
John B. Fenn



Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό - ESI -



Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό - ESI -

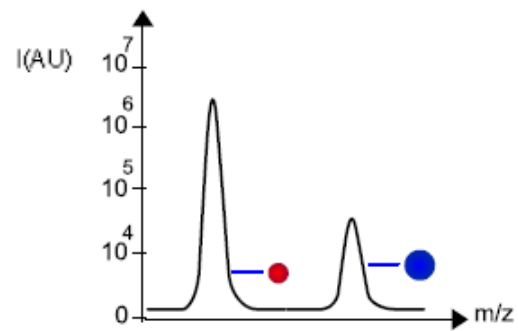
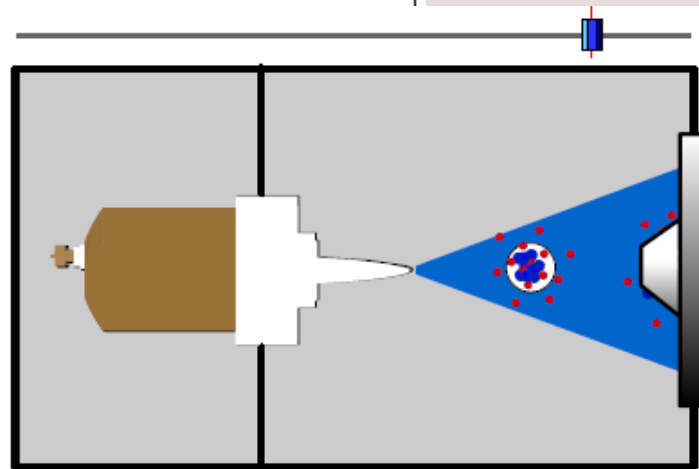
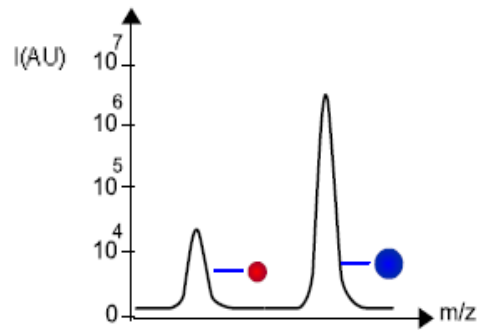
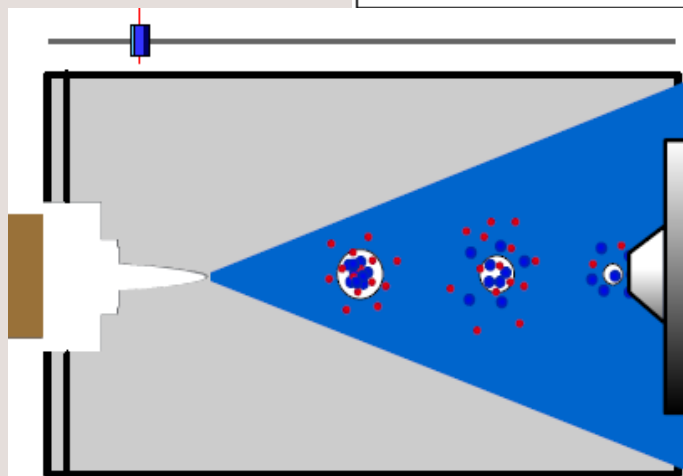


Pen_4N^+ ($m/z = 130$)

$K[\text{Pen}_4\text{N}^+]/K[\text{Et}_4\text{N}^+] = 7$

Highly surface-active ion ●

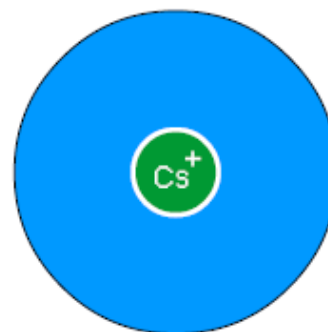
Less surface-active ion ●



Ion	k
Cs^+	1
Na^+	1.6
NH_4^+	3
MorphineH^+	1.3
HeroinH^+	6
Bu_4N^+	2
Et_4N^+	5
Pr_4N^+	8
Pen_4N^+	14

Relative ion intensities for some selected analytes.

 More information



Relative size of the hydration sphere for some selected analytes.

- ESI -

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

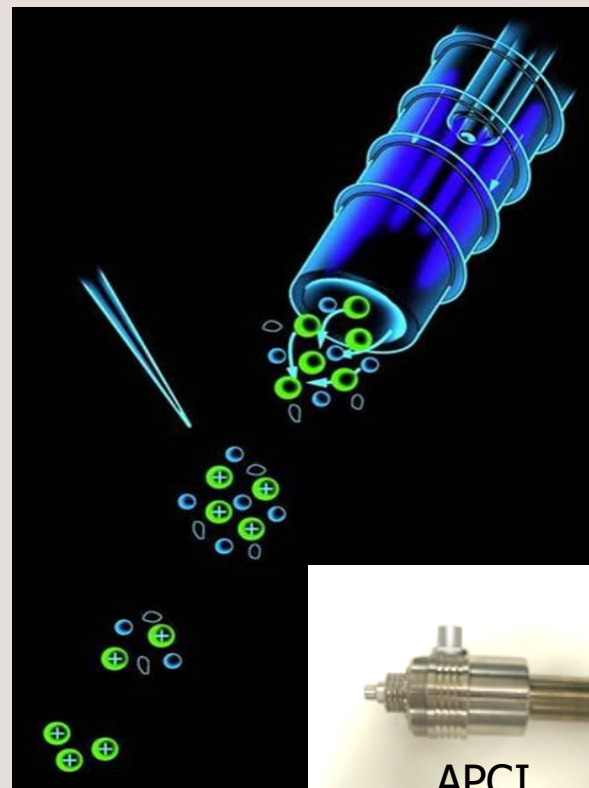
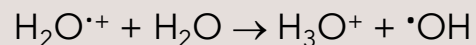
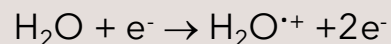
- Απαραίτητα χαμηλή ροή κινητής φάσης
- Τα ιόντα του αναλύτη δημιουργούνται στην υγρή φάση
- Απόσβεση σήματος σε διαλύματα με άλατα και ανταγωνιστική μήτρα
- Σχηματισμός ιόντων προσθήκης (adduct ions)

ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

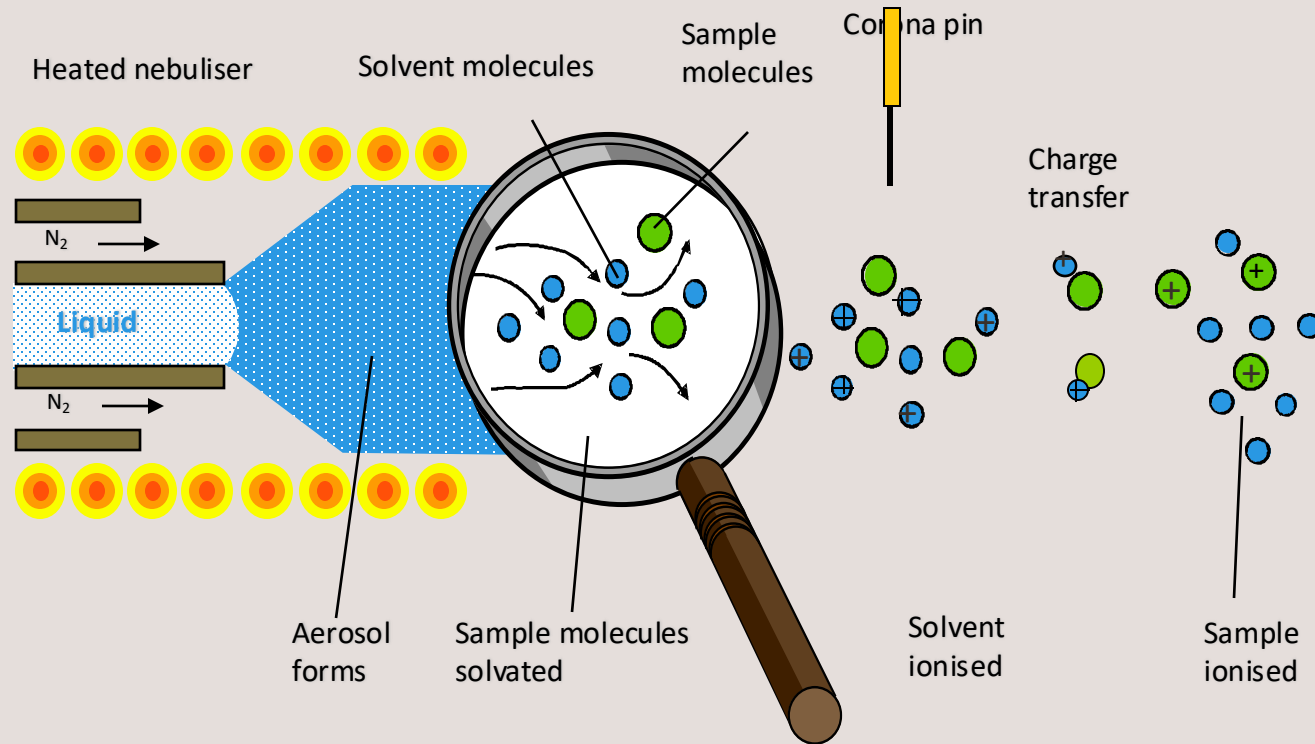
Χημικός Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση

Atmospheric-pressure chemical ionization - APCI



APCI

Μηχανισμός παραγωγής ιόντων στον APCI



- APCI -

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

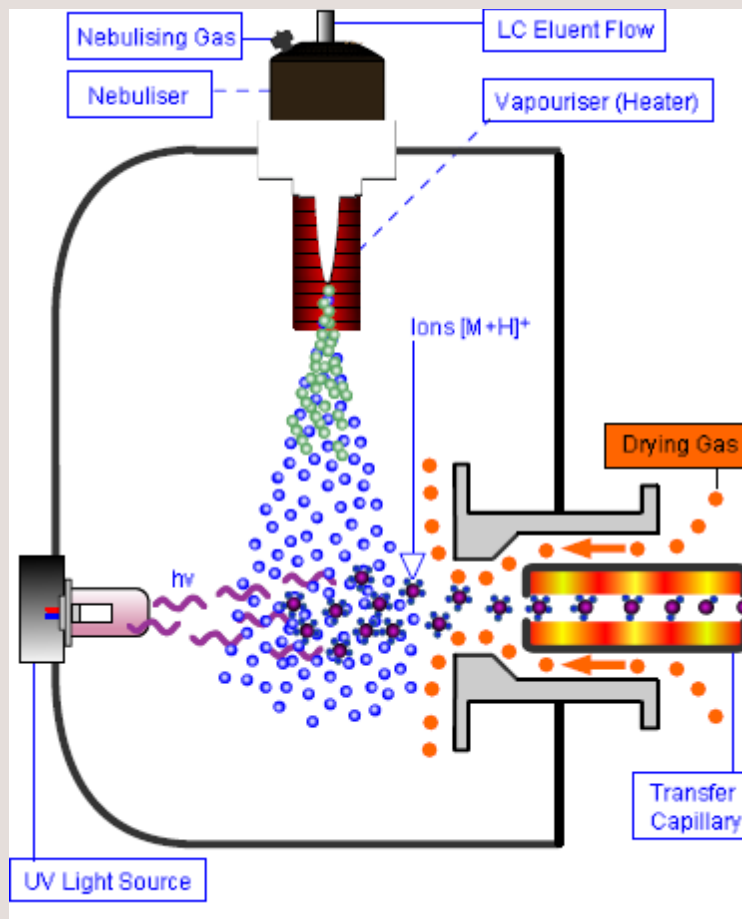
ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

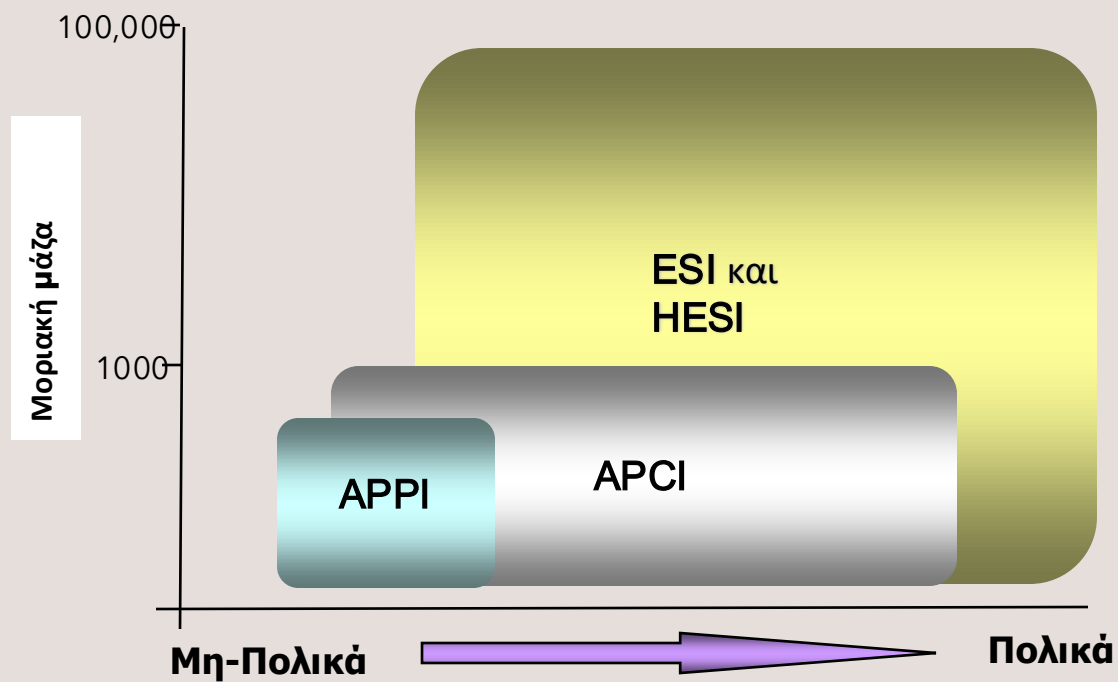
-Atmospheric Pressure Photoionization

-APPI -

Η ενέργεια της UV ακτινοβολίας > από το δυναμικό ιοντισμού των οργανικών ενώσεων και έτσι παράγονται (ψευδο)μοριακά ιόντα (θετικά ή αρνητικά)



Σύγκριση ESI – APCI

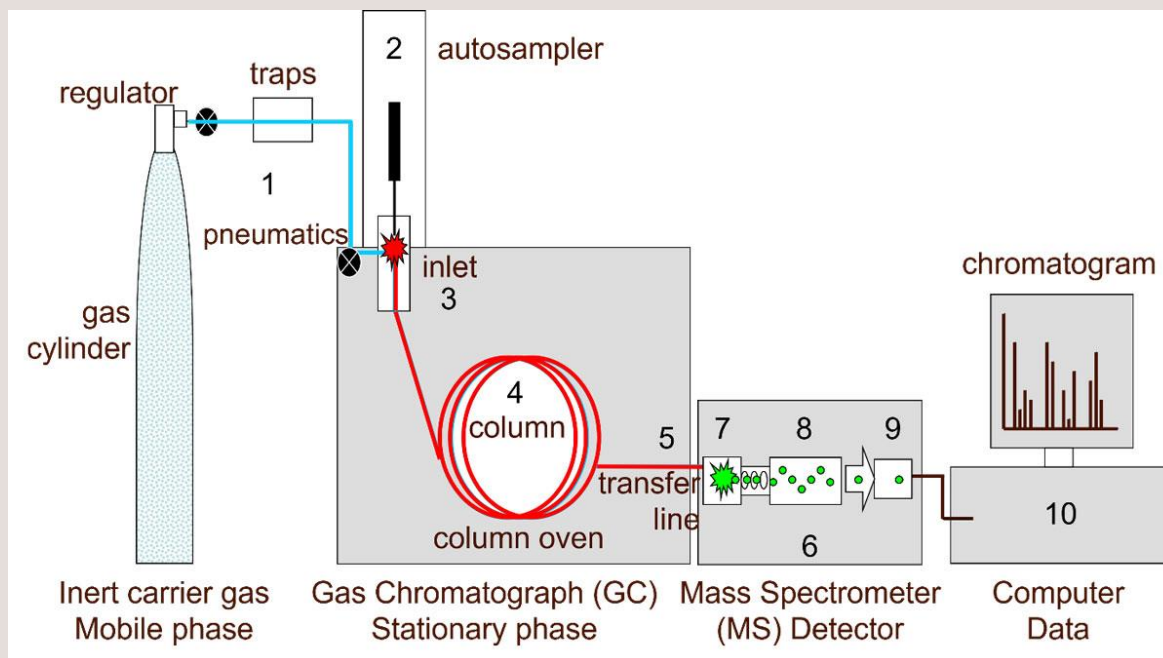


Σύγκριση ESI – APCI

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



Σύζευξη GC με MS (GC-MS)



Σύζευξη GC με MS (GC-MS)

Συζευγμένη τεχνική

Χρησιμοποιείται στον:

1. Προσδιορισμό **πτητικών ενώσεων**
2. Υψηλή **εκλεκτικότητα** για τις ενώσεις που μπορούν να ιοντιστούν.
3. Χαμηλά όρια **ανίχνευσης** σε σχέση με τους υπόλοιπους ανιχνευτές.
4. Εύκολη διασύνδεσης γιατί το έκλουσμα είναι ήδη στην αέρια φάση.

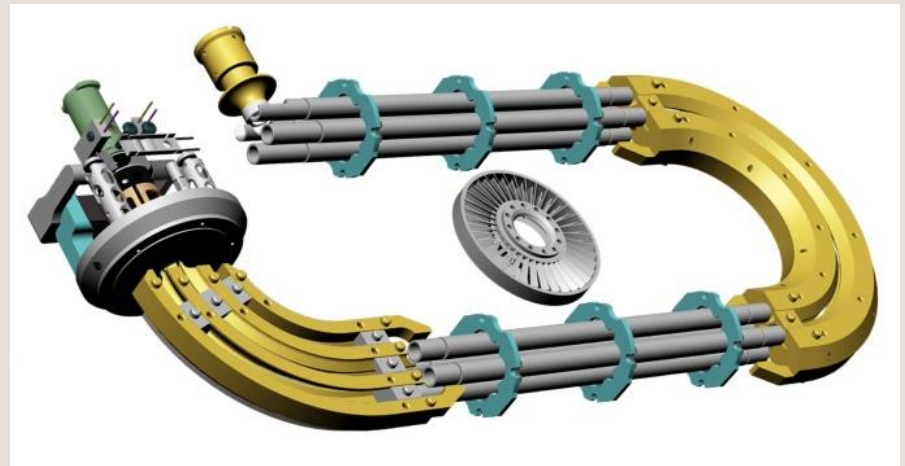
Από το GC –MS στο GC-MS/MS

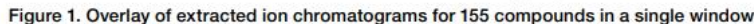
Δυνατότητα χρήσης περισσότερων τρόπων σάρωσης (SRM, neutral loss κλπ).

Χαμηλότερα όρια ανίχνευσης

Ταυτόχρονος προσδιορισμός αναλυτών που δεν διαχωρίζονται πλήρως, χρωματογραφικά.

Ακριβότερος Εξοπλισμός





38

Άσκηση: Ανάλυση ουσιών με GC/MS

<https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-drugs-of-abuse-gc-mass-spectrometry-5994-1012en-agilent.pdf>

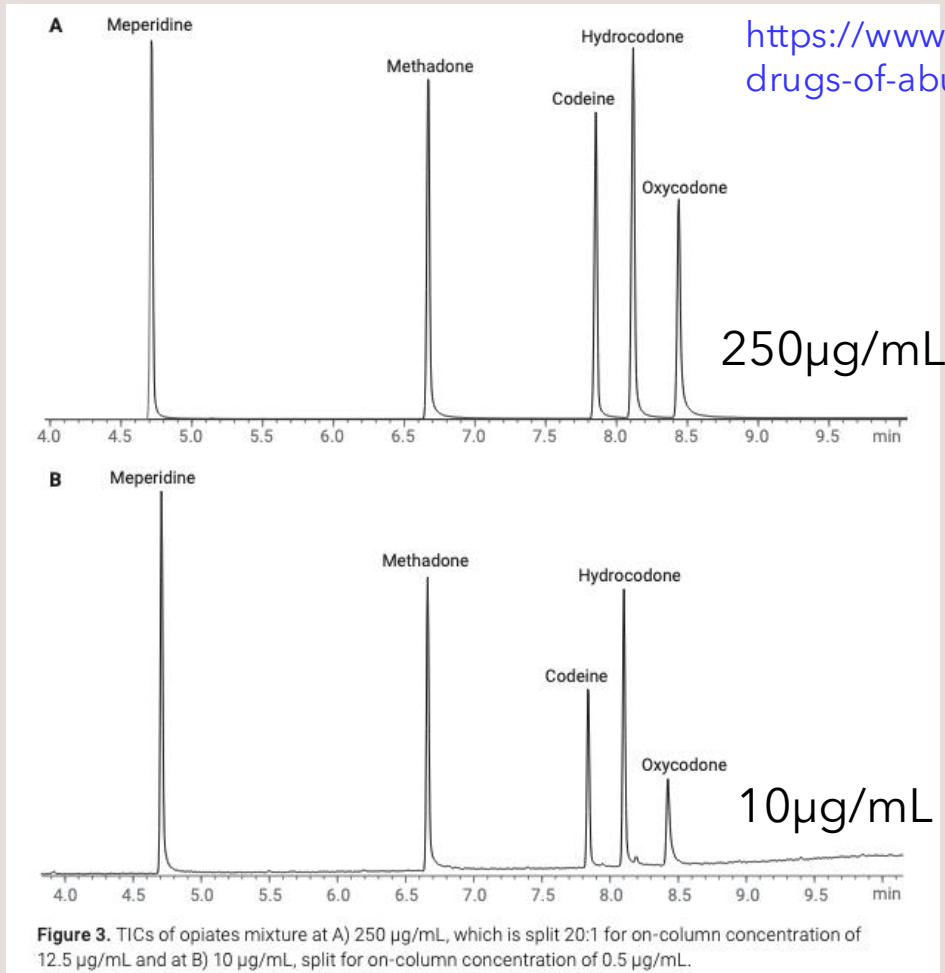
Ε1: Γιατί μειώνεται η εμφάνιση ουράς (tailing) σε χαμηλές συγκεντρώσεις;

Α. Οι υψηλές συγκεντρώσεις υπερφορτώνουν την είσοδο και τη στήλη.

Β. Οι ενεργές θέσεις εμφανίζονται μόνο σε χαμηλή συγκέντρωση.

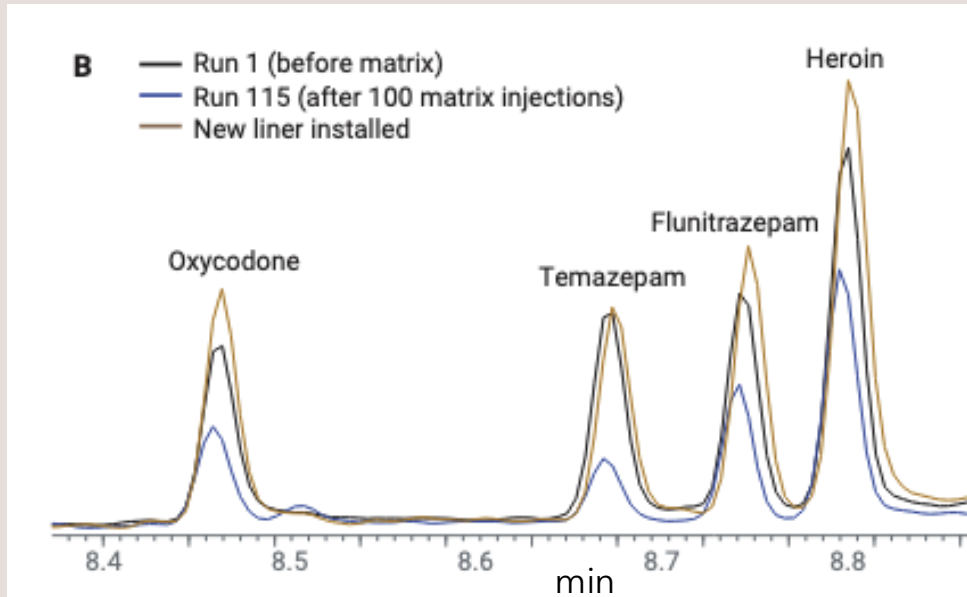
Γ. Η εξατμισή είναι λιγότερο πλήρης όταν εισέρχεται υπερβολική ποσότητα αναλύτη ταυτόχρονα.

Δ. Η ευαισθησία του φασματομέτρου μάζας μειώνεται σε χαμηλή συγκέντρωση.



Άσκηση: Ανάλυση ουσιών με GC/MS

<https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-drugs-of-abuse-gc-mass-spectrometry-5994-1012en-agilent.pdf>



Ε2: Γιατί μειώνεται το σήμα μετά από 100 ενέσεις;

Α. Βρώμικη μήτρα που σχηματίζει ενεργά σημεία στο υλικό επένδυσης

Β. Βλάβη στη ρύθμιση του οργάνου

Γ. Λάθος αέριο φορέας

Δ. Υπερφόρτωση τετραπόλου

Άσκηση: Ανάλυση ουσιών με GC/MS

<https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-drugs-of-abuse-gc-mass-spectrometry-5994-1012en-agilent.pdf>

Table 6. Test of inertness stability with average RF and %RSD values from 15 injections of a 5 µg/mL checkout mixture throughout a sequence with 100 acetaminophen extract injections.

No.	Compound	Average RF	% RSD
1	Amphetamine	0.284	12.45
18	THC	0.085	11.55
19	Oxycodone	0.049	20.25
20	Temazepam	0.069	40.06
21	Flunitrazepam	0.032	12.96
22	Heroin	0.079	10.31

Ο πίνακας 6 δείχνει το %RSD για 15 δοκιμές μείγματος ελέγχου κατά τη διάρκεια των ενέσεων μήτρας.

**Ε3. Ποια ένωση αποτελεί τον καλύτερο «δείκτη προειδοποίησης» ότι απαιτείται συντήρηση;
(Υπόδειξη: αναζητήστε το υψηλότερο %RSD λόγω απώλειας αδράνειας.)**

$$RSD = \frac{SD}{Mean} \times 100\%$$

Σύζευξη HPLC με MS (LC-MS)

Συζευγμένη τεχνική

Χρησιμοποιείται στον:

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

Σύζευξη HPLC με MS

Προβλήματα Σύζευξης

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

Σύζευξη HPLC με MS

Επίλυση προβλημάτων σύζευξης

1. Χρήση στηλών μικρής διαμέτρου και μήκους (με ταυτόχρονη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού) και ελαχιστοποίηση του νεκρού όγκου
2. Διαχωρισμός ροής κινητής φάσης, ώστε ένα μόνο μικρό κλάσμα να εισάγεται στην πηγή ιόντων
3. Χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων ($\text{HCOOH}/\text{HCOONH}_4$) και ρυθμιστών pH της κινητής φάσης της HPLC (HCOOH , CH_3COOH , τριαιθυλαμίνη)
4. Χρήση νέων τεχνικών ιοντισμού: ESI, APCI, MALDI

Προσδιορισμός αντιβιοτικών σε τρόφιμα - Συνθήκες

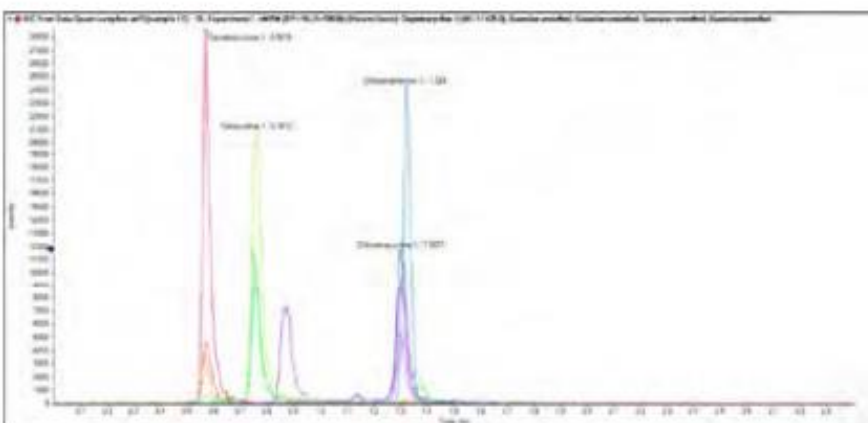


Figure 1. LC separation and detection in MRM mode of three tetracyclines and Chloramphenicol at 10 ng/mL

Table 1. Gradient conditions used for the separation

Step	Time (min)	A (%)	B (%)
0	0.0	80	20
2	4.0	5	95
3	7.0	5	95
4	7.1	80	20
5	10.0	80	20

Table 2. MRM transitions and retention times (RT) used for the detection of Chloramphenicol and tetracyclines

Compound	Polarity	RT (min)	Q1 (amu)	Q3 (amu)
Chloramphenicol 1	negative	1.32	321	152
Chloramphenicol 2	negative	1.32	321	257
Chlortetracycline 1	positive	1.30	479	444
Chlortetracycline 2	positive	1.30	479	462
Chlortetracycline 3	positive	1.30	479	154
Oxytetracycline 1	positive	0.57	461	426
Oxytetracycline 2	positive	0.57	461	444
Oxytetracycline 3	positive	0.57	461	201
Tetracycline 1	positive	0.76	445	410
Tetracycline 2	positive	0.76	445	427
Tetracycline 3	positive	0.76	445	154

Προσδιορισμός αντιβιοτικών σε τρόφιμα

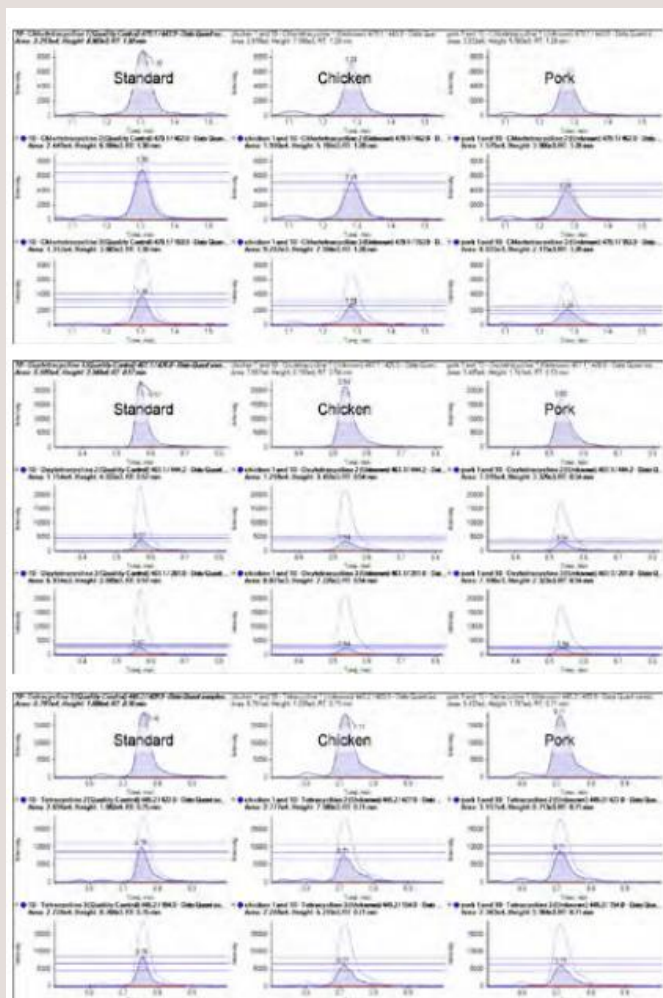
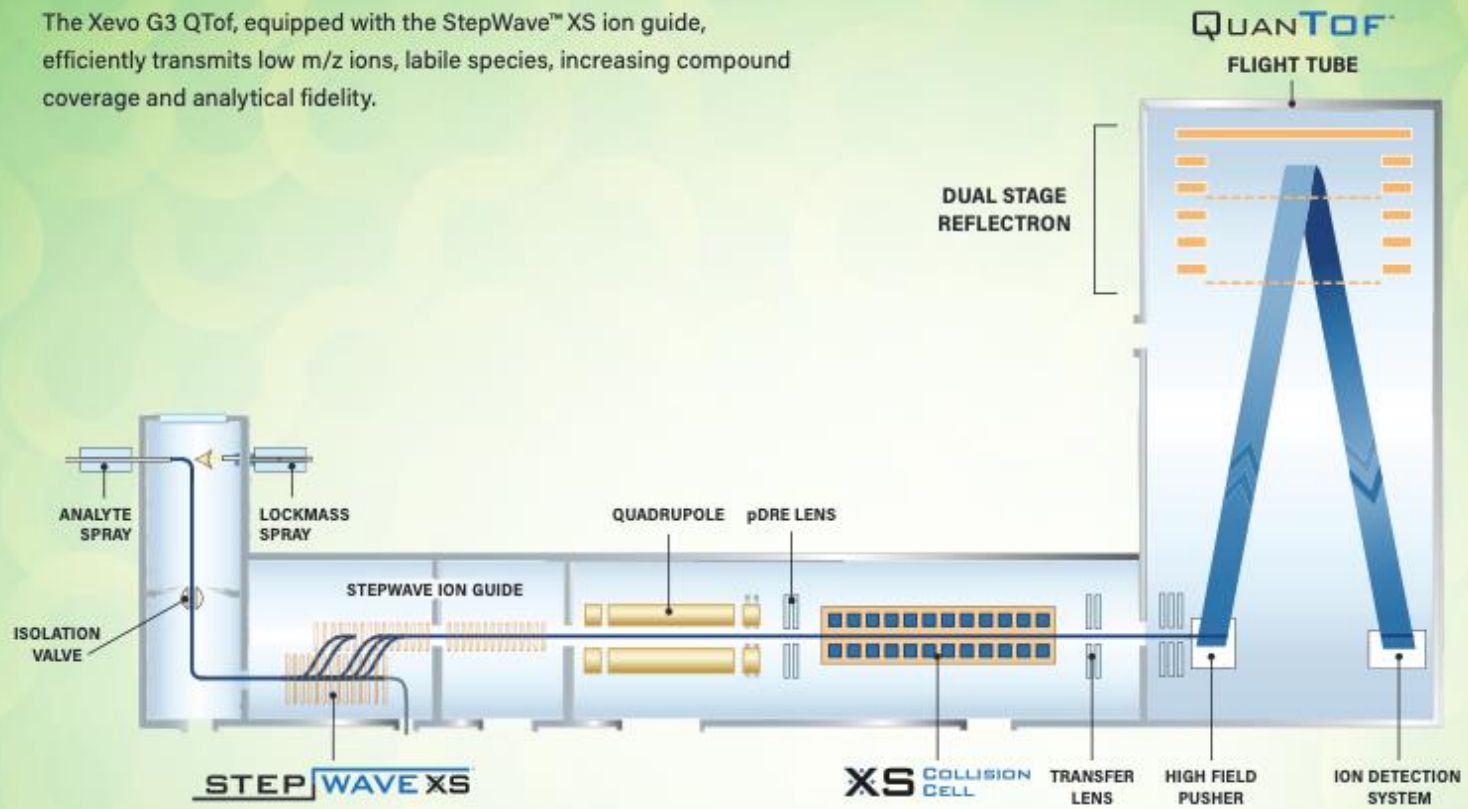


Figure 8. Side-by-side peak review of a standard injection (left) and spiked meat extracts (middle and right) with automatic calculation of MRM ratios. the MRM ratio tolerances are displayed in the peak review

The Xevo G3 QTof, equipped with the StepWave™ XS ion guide, efficiently transmits low m/z ions, labile species, increasing compound coverage and analytical fidelity.



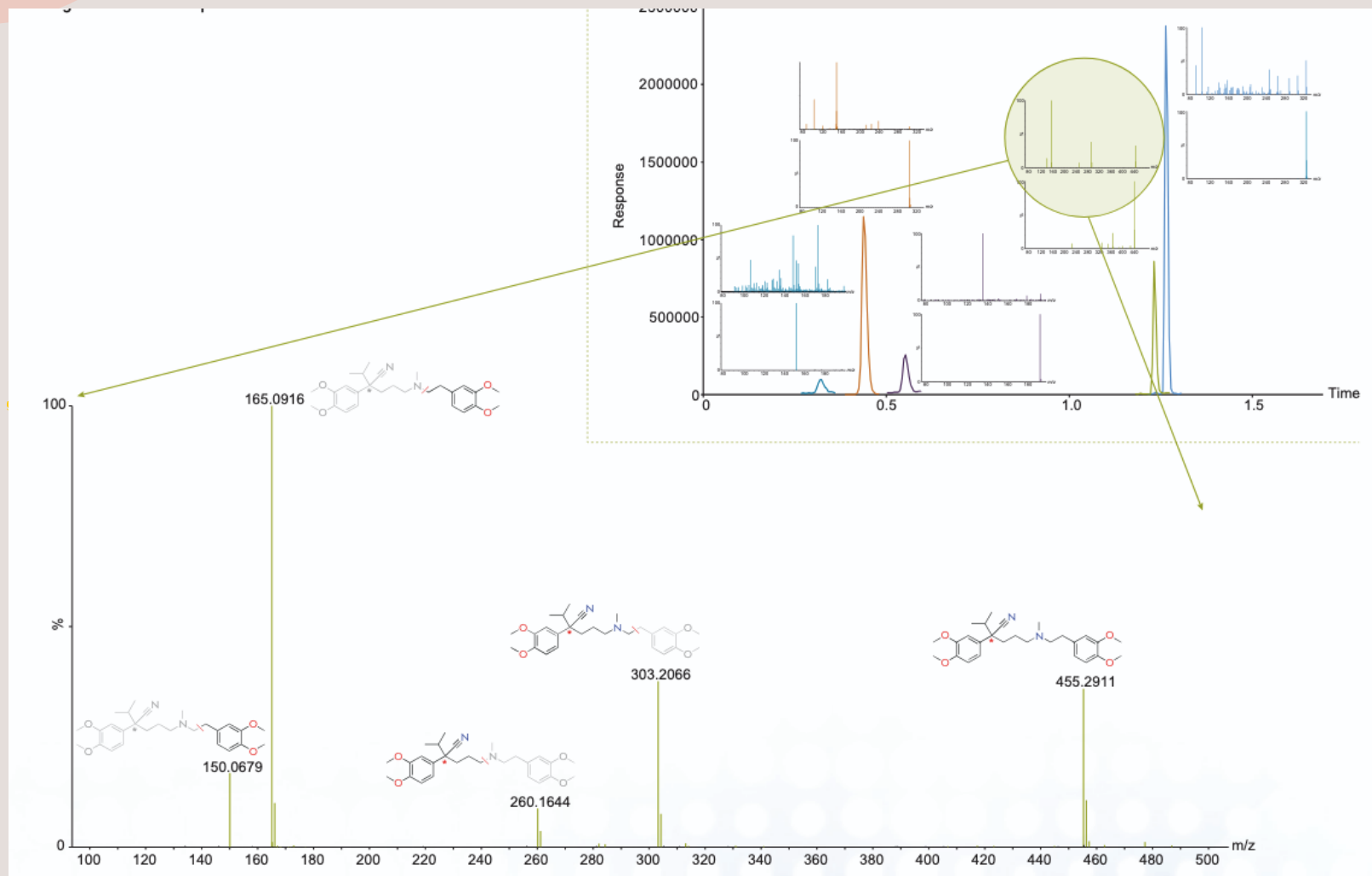
Extended application coverage with the latest technology.

Improved Confidence From <1ppm Mass Errors

Replicate	Observed m/z	Error (ppm)
1	235.1811	0.4
50	235.1812	0.9
100	235.1812	0.9
150	235.1812	0.9
200	235.1810	0.0
250	235.1811	0.4
300	235.1811	0.4
350	235.1812	0.9
400	235.1810	0.0
450	235.1810	0.0
500	235.1811	0.4

Το φάρμακο λιδοκαΐνη προστέθηκε σε πλάσμα με καταβύθιση πρωτεϊνών και τα δεδομένα UPLC/MS συλλέχθηκαν με ρυθμό 10 φάσματα ανά δευτερόλεπτο. Το θεωρητικό m/z για το πρωτονιωμένο μόριο με στοιχειακή σύνθεση $C_{14}H_{23}N_2O$ είναι 235,1810. Το σφάλμα μάζας RMS για 11 επαναλαμβανόμενα δείγματα που εκτελέστηκαν σε μια σειρά 500 ενέσεων είναι 0,6 ppm.





Xevo G2-XS QToF, συζευγμένο με UPLC ή APGC

