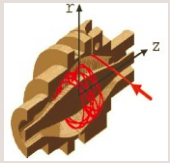
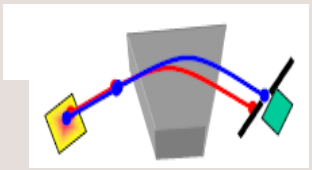
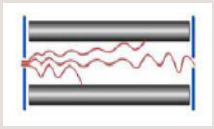
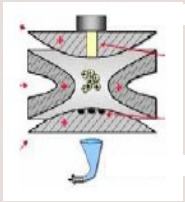
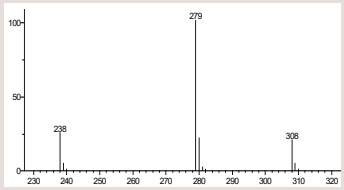
Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

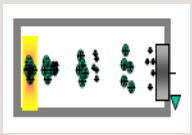












Φασματομετρία Μαζών – Mass Spectrometry

Δρ. Μάριος Κωστάκης –

Καθ. Δρ. Νικόλαος Θωμαΐδης

1

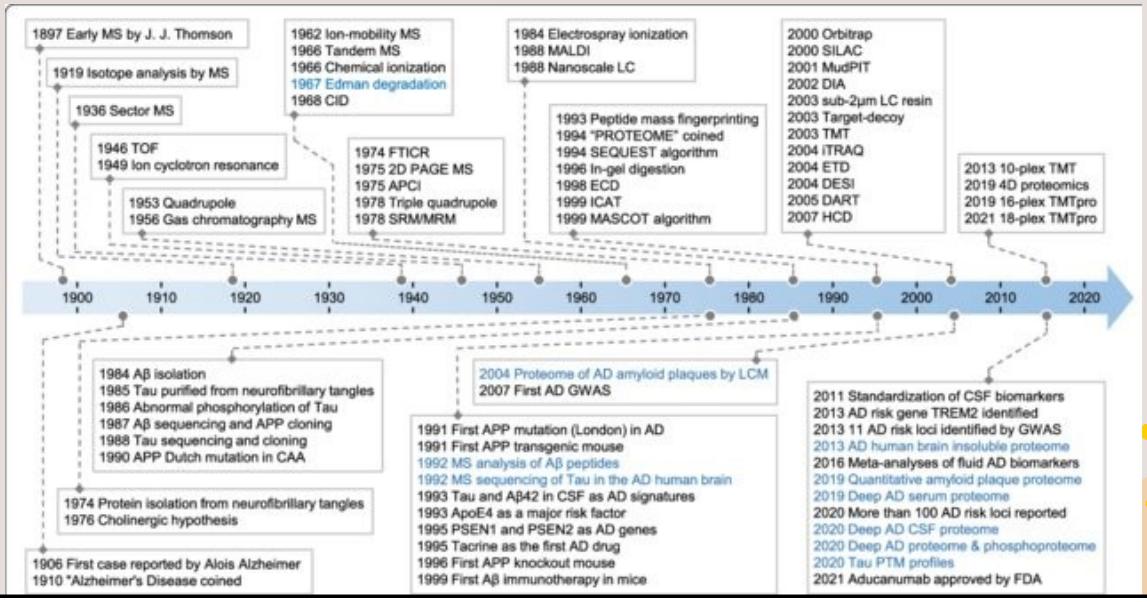
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

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 ισοτόπων 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)

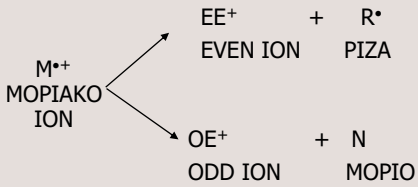
4

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Ιοντισμός :

$$M + e^- \rightarrow M^{\bullet +} + 2e^-$$

Θραυσματοποίηση :

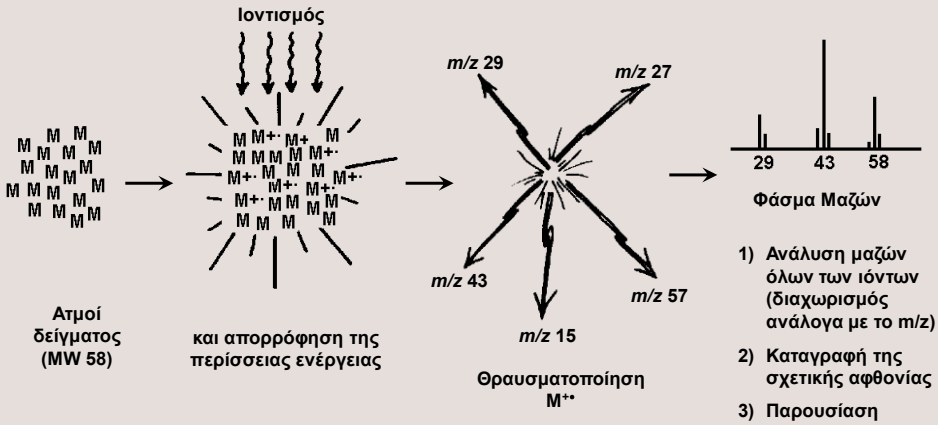


EE^+: ιόν με άρτιο αριθμό e

OE^+: ιόν με περιττό αριθμό e

5

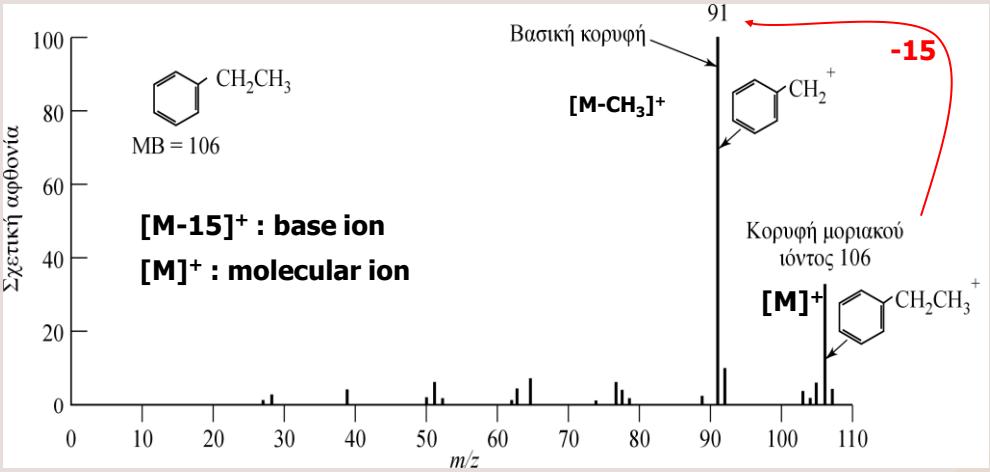
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ



1) Ανάλυση μαζών όλων των ιόντων (διαχωρισμός ανάλογα με το m/z)
2) Καταγραφή της σχετικής αφθονίας
3) Παρουσίαση ραβδογράμματος

6

ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ



Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full Scan MS)

7

ΑΤΟΜΙΚΗ & ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ

Μονάδα ατομικής μάζας (u ή Da) :

Το 1/12 της μάζας ενός ουδέτερου ατόμου ^{12}C

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

Ακριβής μάζα (exact mass):

Ατομική μάζα ^{35}Cl : 2,91407×12,0000 Da = 34,9688 Da

Μοριακή μάζα $^{12}C^{1}H_4$:

12,0000×1 + 1,007825×4 = 16,0313 Da

Ονομαστική (μονοϊσοτοπική) μάζα (nominal mass)

Για το $^{12}C^{1}H_4$: 16 u

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

8

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

$^{12}C^{1}H_4^+$: m/z = 16,0313 / 1 = 16,0313

$^{12}C^{1}H_4^{2+}$: m/z = 16,0313 / 2 = 8,0156

(χωρίς μονάδες)

9

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 20-3 Φυσική αφθονία ισοτόπων μερικών συνηθισμένων στοιχείων

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

[α] Τα φθόριο (^{19}F), φωσφόρος (^{31}P), νάτριο (^{23}Na) και ιώδιο (^{127}I) δεν διαθέτουν άλλα φυσικά ισότοπα.
[β] Οι αριθμοί δείχνουν το μέσο όρο του πλήθους των ισοτόπων ατόμων που υπάρχουν ανά 100 άτομα του αφθονότερου ισοτόπου. Δηλαδή για κάθε 100 άτομα ^{12}C θα υπάρχουν κατά μέσο όρο 1,08 άτομα ^{13}C.

10

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές

Στη φύση υπάρχουν τρεις κατηγορίες στοιχείων:

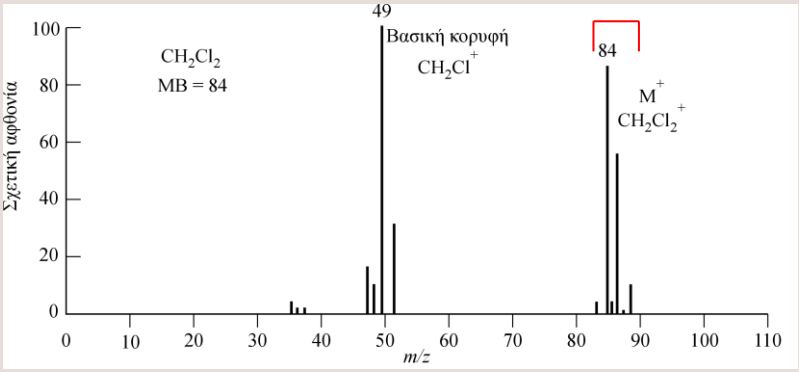
"A" στοιχεία – Μόνο ένα φυσικό ισότοπο υπάρχει
πχ Φθόριο

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

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

11

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές



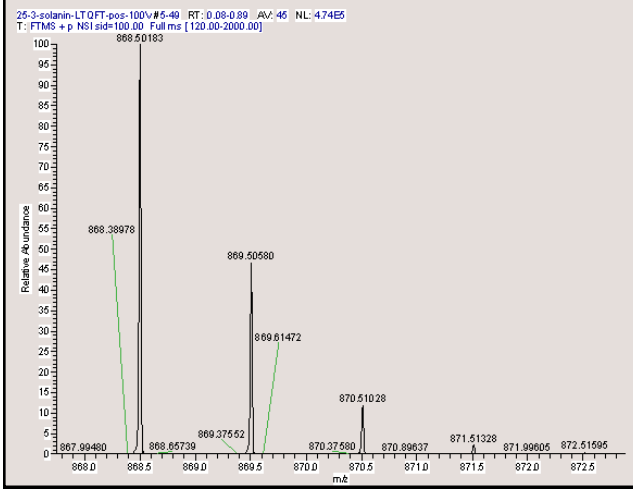
$^{12}C^1H_2{}^{35}Cl_2$: m=84

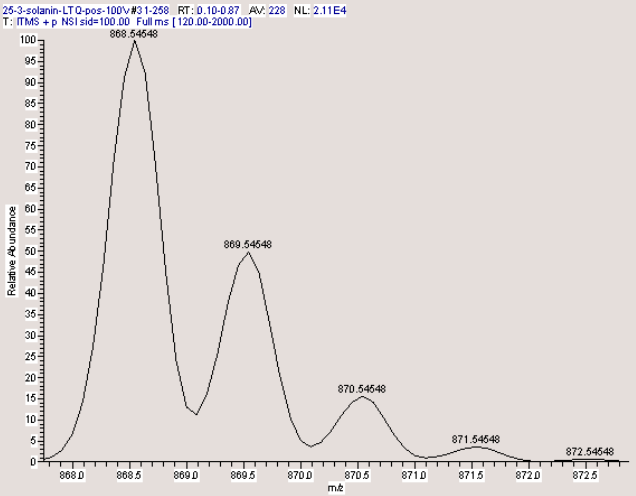
$^{13}C^1H_2{}^{35}Cl_2$: m=85 $^{12}C^1H_2{}^{35}Cl^{37}Cl$: m=86

$^{13}C^1H_2{}^{35}Cl^{37}Cl$: m=87 $^{12}C^1H_2{}^{37}Cl_2$: m=88

12

Ποιες είναι οι διαφορές;





13

Διακριτική Ικανότητα
Resolving Power, R

Διακριτική ικανότητα φασματόμετρου μαζών:

$$R = m/\Delta m$$

Η ικανότητα να διακρίνει δύο μόλις διαχωριζόμενες κορυφές, m και m+Δm.

Διάκριση μεταξύ ιόντων ίδιας ονομαστικής μάζας, πχ:

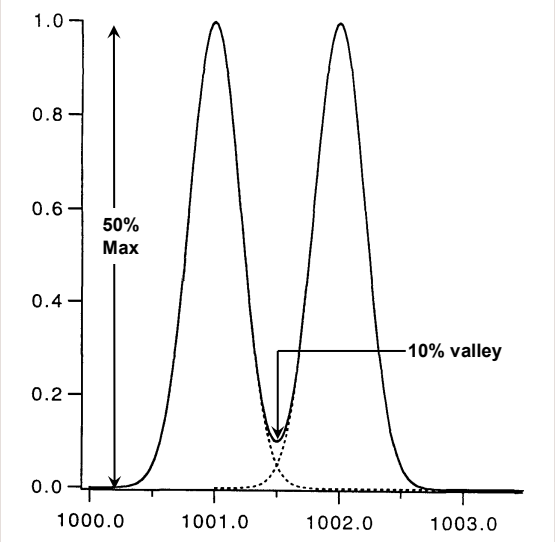
N_2^+ : 28,0061
CO^+ : 27,9949

} Δm = 28,0061 – 27,9949 = = 0,0112

Άρα: R = m/Δm = 27,9949/0,0112 = 2500

14

Διακριτική Ικανότητα
Resolving Power, R



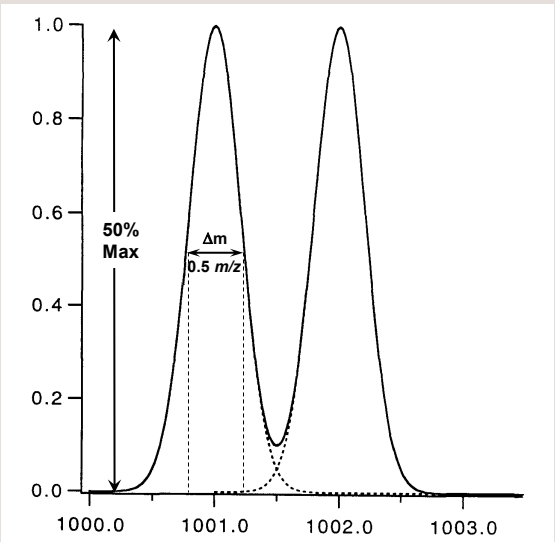
Δύο κορυφές (m/z) – ίσης έντασης – θεωρείται ότι διαχωρίζονται αν η επικάλυψη τους δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους τους (συνήθως)

..... έτσι:

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

15

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/(2×0,5) = 1001

16

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

$\Delta m/m_1 = 0{,}0004$ ή 400 ppm

Πολλές φορές αναφέρεται και ως ακρίβεια (accuracy)

17

Ακρίβεια Μάζας
Mass Accuracy

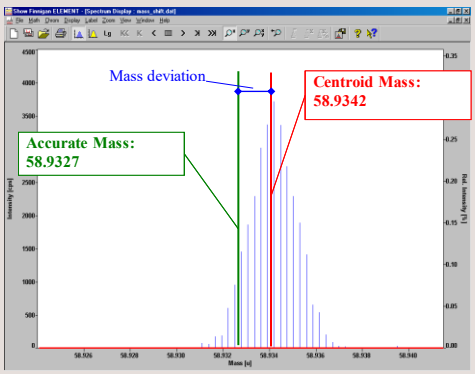
Δm = Mass Offset = Centroid Mass - Accurate Mass

0.0015 = 58.9342 - 58.9327

Mass Accuracy (ppm) = [(Mass Offset)/Accurate Mass]×10^6

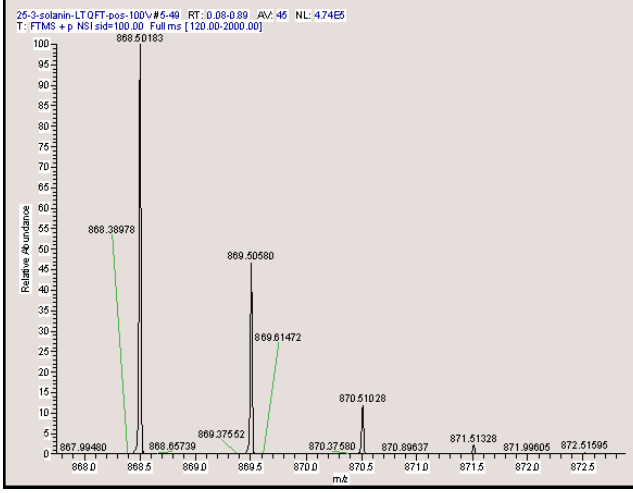
Mass Accuracy (ppm) = (0.0015/ 58.9327) ×10^6

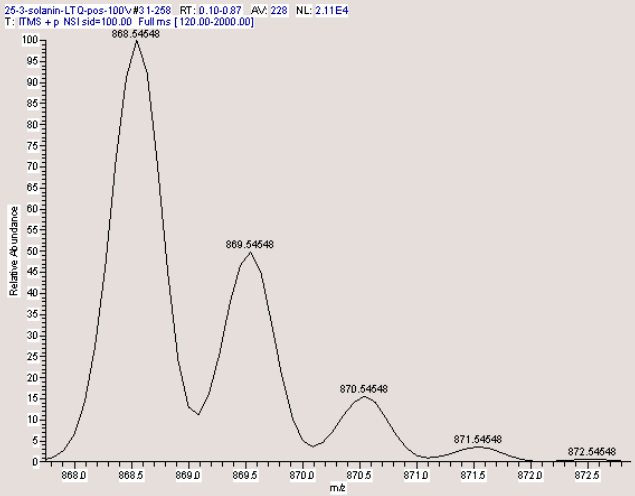
Mass Accuracy = 25.4 ppm



18

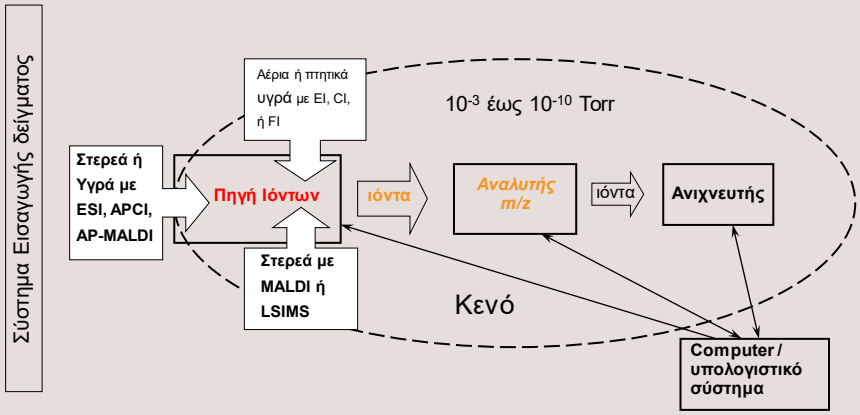
R=48250





R=1737

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 φασματόμετρων μαζών διαφέρει σημαντικά:

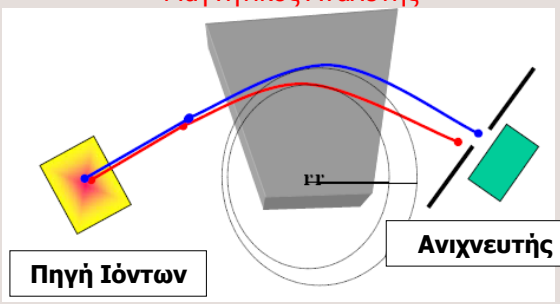
- Τα τετράπολα και οι παγίδες ιόντων έχουν σταθερό FWHM σε όλο το εύρος μαζών (συνήθως 0,7-0,4 u). Επομένως, η R μεταβάλλεται ανάλογα με το m/z. Αυτά είναι όργανα χαμηλής διακριτικής ικανότητας (Low Resolution MS)
- Τα TOF και οι μαγνητικοί αναλυτές έχουν σταθερή R σε όλο το εύρος μαζών. Αν π.χ. R=20000 σε m/z 200, τότε το Δm=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 $R=6\times10^4$ σε m/z 400, τότε το $R=2\times10^4$ σε m/z 4000

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

22

Αναλυτές μαγνητικού ή ηλεκτρικού τομέα

Μαγνητικός Αναλυτής



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

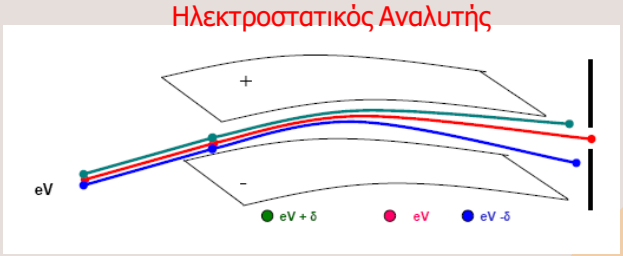
Διαχωρισμός των ιόντων επιτυγχάνεται με σάρωση της έντασης του μαγνητικού πεδίου (V, r: σταθερά)

Φασματόμετρα Απλής Εστίασης

(Single focusing MS)

[R≤2000]

Ηλεκτροστατικός Αναλυτής

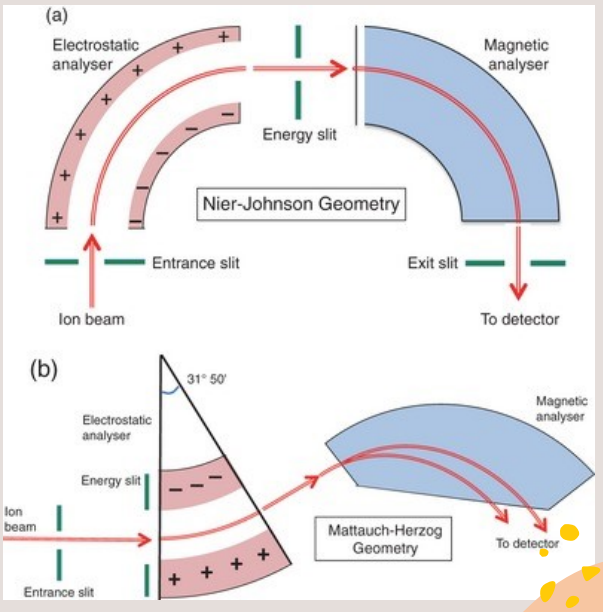


23

Αναλυτές μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης

Υψηλής διακριτικής ικανότητας

R = 100 000



24

Φασματόμετρα 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

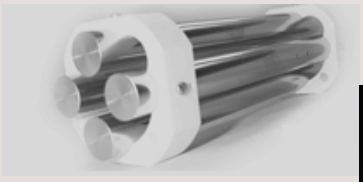
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

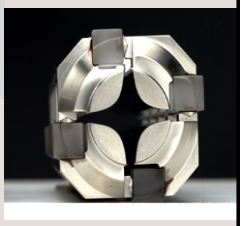
- Ογκώδη όργανα
- Υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης
- Απαιτούν υψηλό κενό και υψηλές τάσεις λειτουργίας
- Μειωμένη ευαισθησία σε υψηλή R
- Προβληματική σύζευξη με πηγές ιοντισμού AP (ESI)
- Ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό

25

ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

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

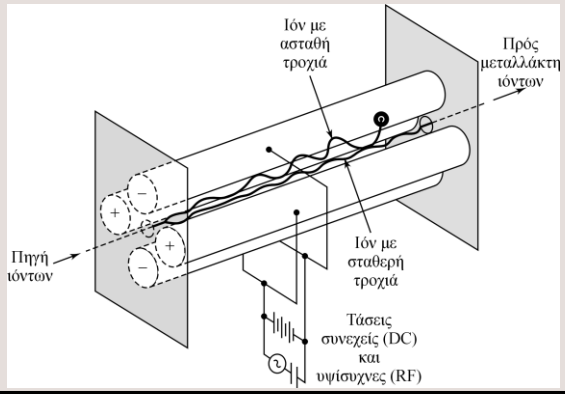




Μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένο m/z φτάνουν στον μεταλλάκτη ιόντων

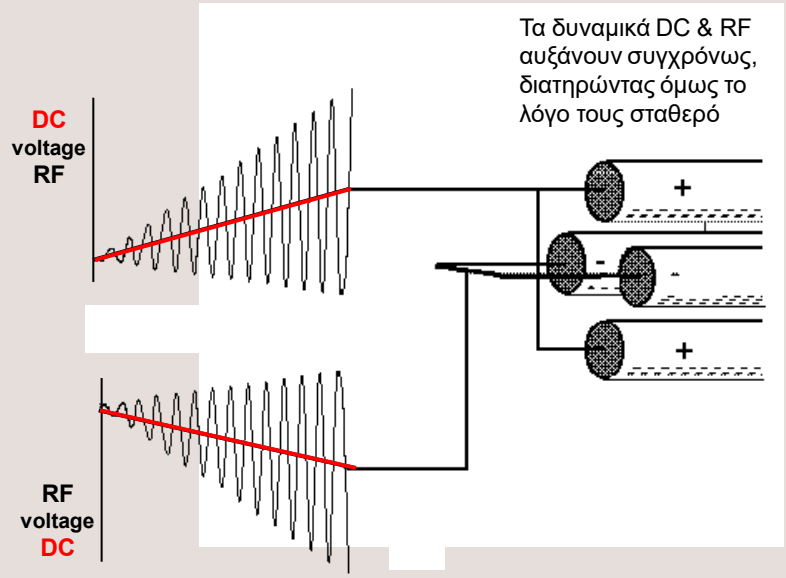
Χαμηλή Διακριτική ικανότητα: ~1Da (u)

- Φίλτρο μαζών



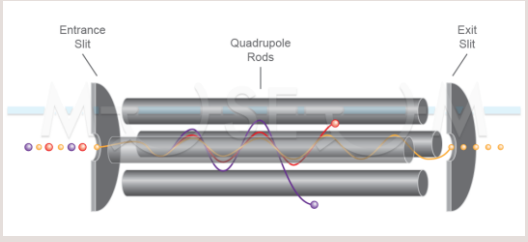
26

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ (1)



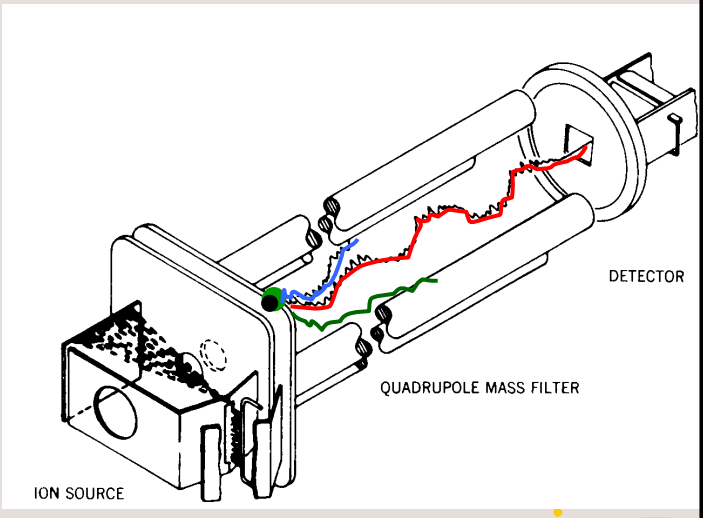
27

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ (2)



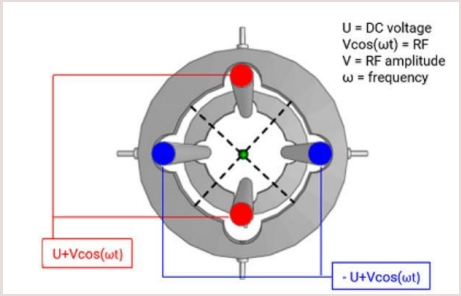
Όλες οι άλλες τιμές *m/z* ΦΙΛΤΡΑΡΟΝΤΑΙ εκτός ιοντικής δέσμης

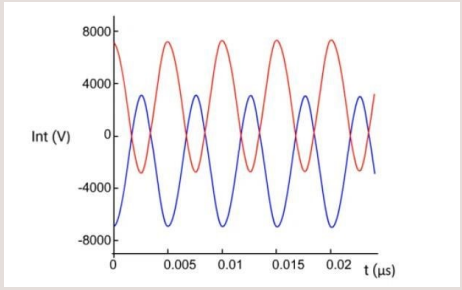
Σε συγκεκριμένο λόγο δυναμικών DC:RF, ΜΟΝΟ ένα ιόν έχει σταθερή τροχιά (ένα *m/z φτάνει στον ανιχνευτή)*

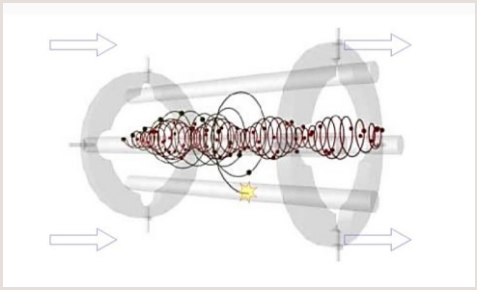


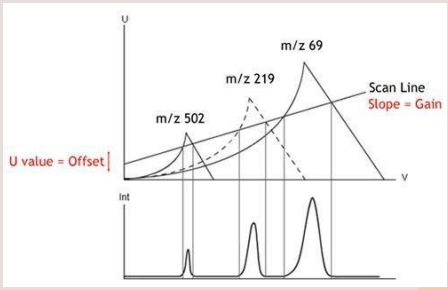
28

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ (3)





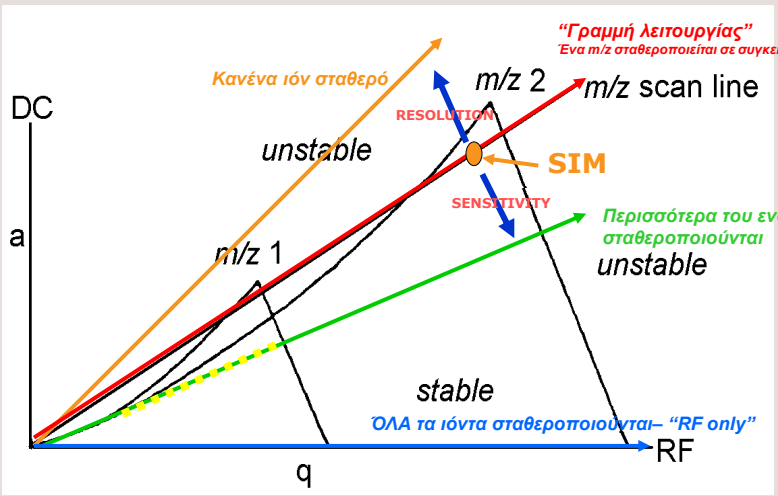




29

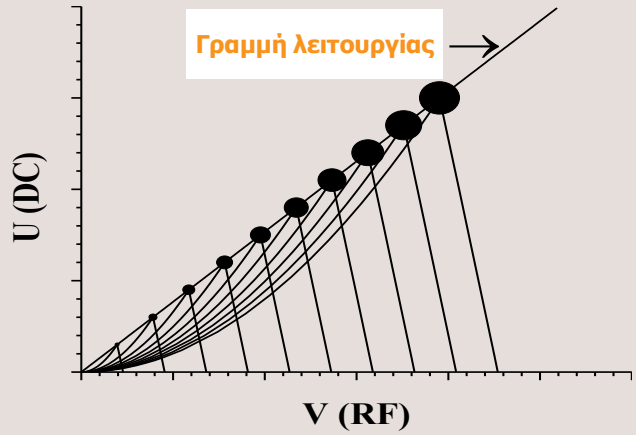
Διάγραμμα σταθερότητας ιόντων στο τετράπολο

(Ion Stability Diagram)



30

Πλήρης σάρωση ιόντων σε τετράπολο



31

Φασματόμετρα μαζών με τετράπολο

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Ο πιο αξιόπιστος και διαδεδομένος αναλυτής μαζών
- Κατάλληλος για ποσοτική ανάλυση
- Κατάλληλος ανιχνευτής χρωματογραφίας
- Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης (>(1000 m/z) 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

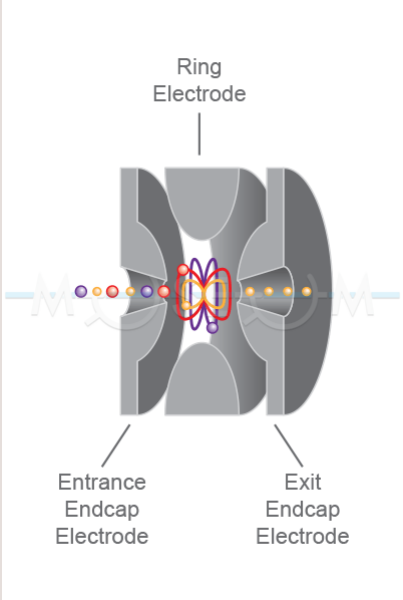
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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)

32

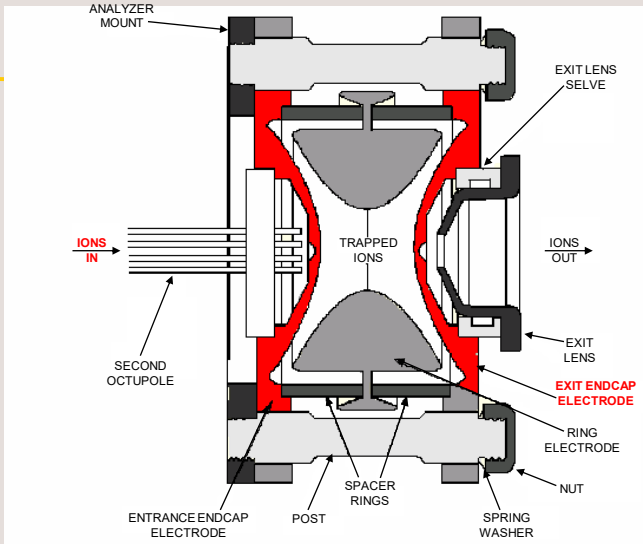
Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

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



33

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

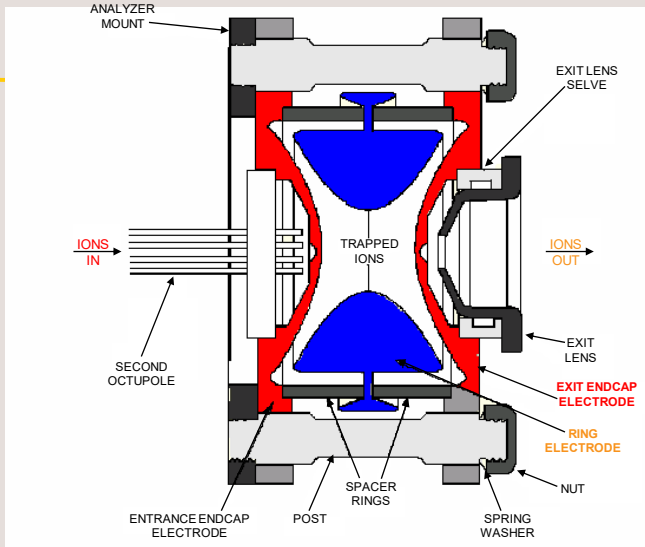


- Δυο **πλευρικά ηλεκτρόδια,** γειωμένα, και ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο στο οποίο εφαρμόζεται ένα δυναμικό RF που αυξάνει

Courtesy of Ian Jardine - Thermo Electron

34

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* αποσταθερο-ποιείται στο χρόνο αυξάνοντας το δυναμικό RF για την απόκτηση του φάσματος μαζών

35

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Φθηνός αναλυτής με μικρό μέγεθος
- Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης (>(1000 m/z) s^{-1})
- Χαμηλή απαίτηση κενού (10^{-3} Torr)
- Δυνατότητα MS/MS και MS^n (ταυτοποίηση δομής)
- Υψηλή ευαισθησία (περιορισμό στις ενώσεις)
- Κατάλληλος ανιχνευτής χρωματογραφίας
- Μεταβολίτες φαρμάκων, μελέτες δομής πρωτεϊνών

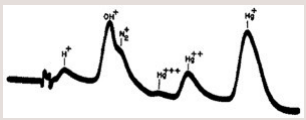
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

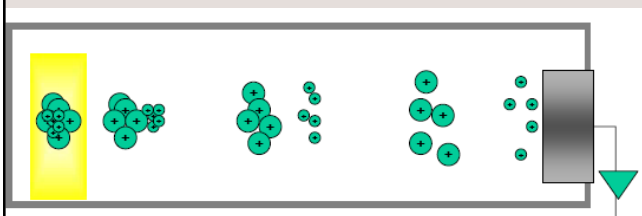
- Χαμηλή διακριτική ικανότητα (FWHM: 0,3 u – R< 4000)
- Περιορισμένο εύρος m/z (ελάχιστο 100, μέγιστο 6000 u)
- Περίπλοκη λειτουργία (παλμική), μεγάλος χρόνος από τη στιγμή που παράγονται τα ιόντα μέχρι την καταγραφή τους
- Ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση, κορεσμός παγίδας
- Μικρή ακρίβεια ποσοτικοποίησης,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

36

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

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

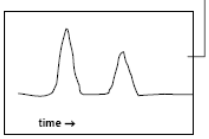




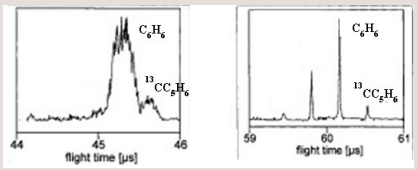
$K.E. = \frac{1}{2} mv^2 = zV$

$L = vt$

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



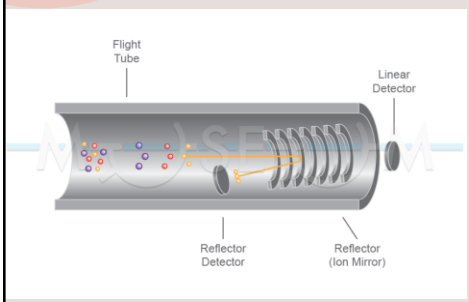
Παλμική λειτουργία

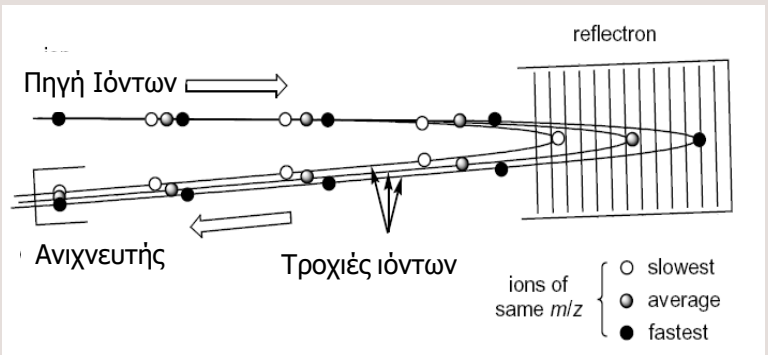


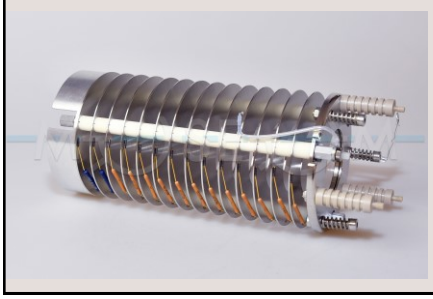
Χρόνοι πτήσης
1-30 μs

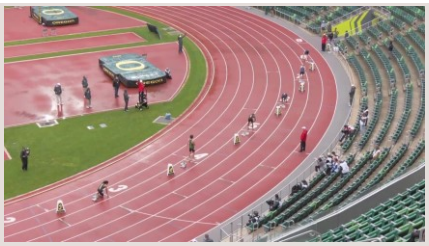
37

Reflectron TOF-MS



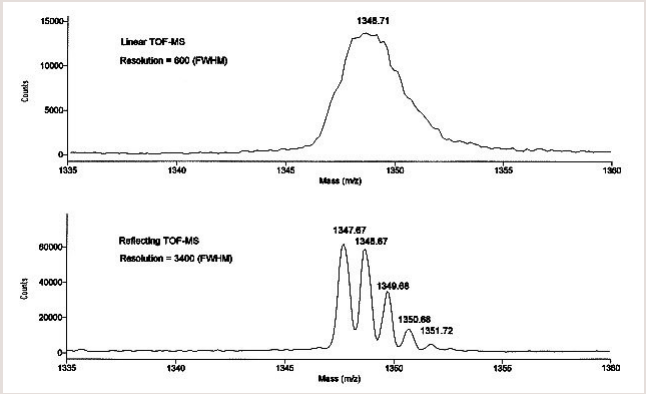


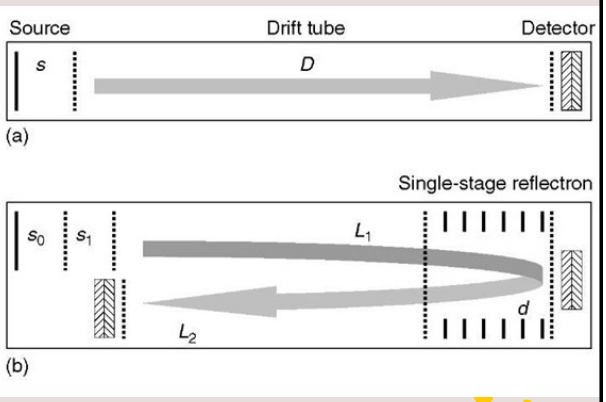




38

Reflectron TOF-MS





39

TOF-MS

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

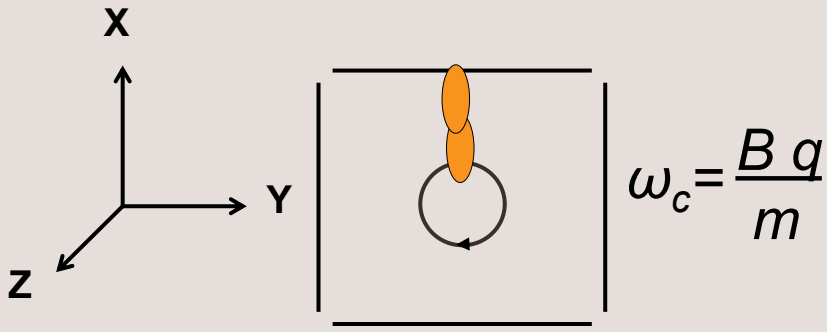
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

40

Ιοντικός κυκλοτρονικός συντονισμός
Ion Cyclotron Resonance, ICR

Ιοντική Κυτροτρονική κίνηση - Ion Cyclotron Motion

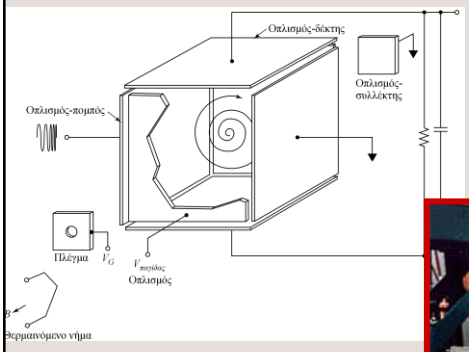


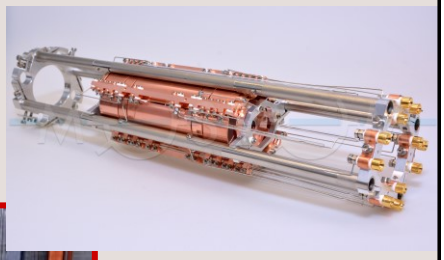
$$\omega_c = \frac{B\,q}{m}$$

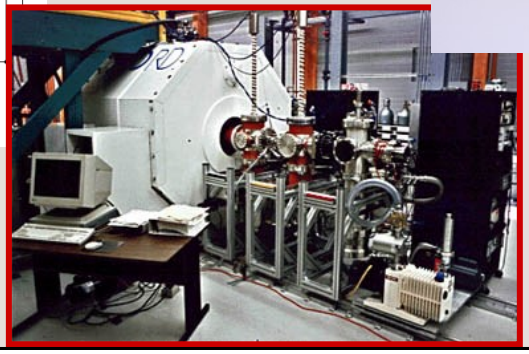
ω_c : **Ιοντική Κυκλοτρονική συχνότητα**

41

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







42

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, πεπτίδια

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

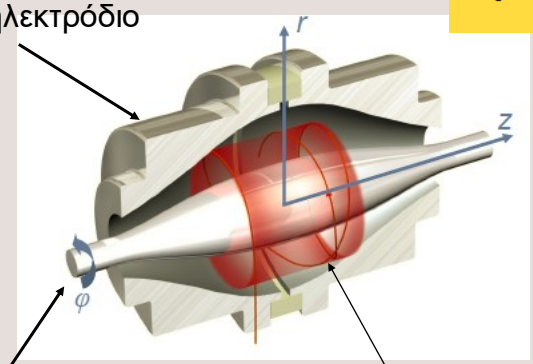
- Εξαιρετικά ακριβό όργανο – πολύπλοκη λειτουργία
- Μικρή ταχύτητα σάρωσης (τυπικά 1 Hz)
- Ογκώδες, ειδικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις
- Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-8} -10^{-10} Torr)

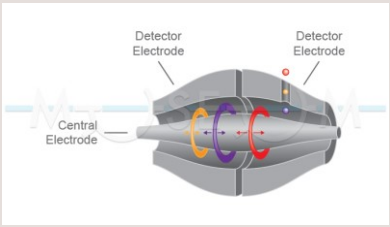
43

Orbitrap

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/q}}$$

Πλευρικό ηλεκτρόδιο





Αξονικό ηλεκτρόδιο

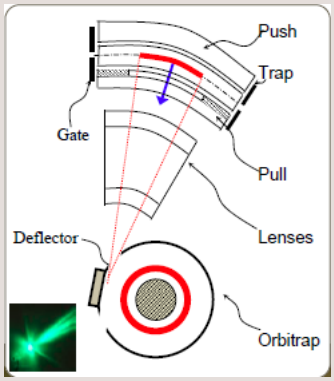
Τροχιά ιόντων ενός m/z

44

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





45

Orbitrap

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

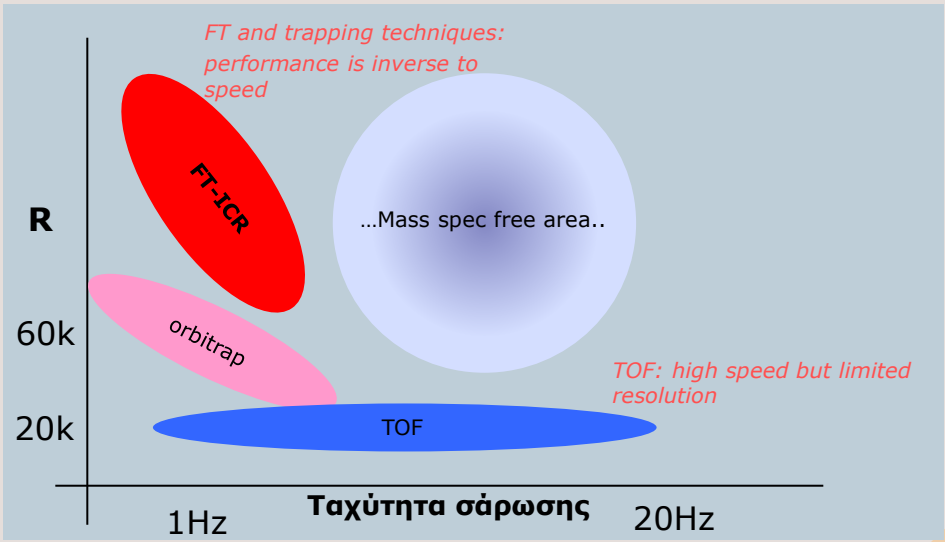
- Την υψηλότερη διακριτική ικανότητα μετά το FT-ICR (R= 10000 – 140000) μέχρι m/z 4000
- Μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό μαζών (<5 ppm)
- Μεγαλύτερη χωρητικότητα από τις ιοντικές παγίδες
- Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων
- Δυνατότητα MS/MS (σε συνδυασμό με ιοντική παγίδα)
- Ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων 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)

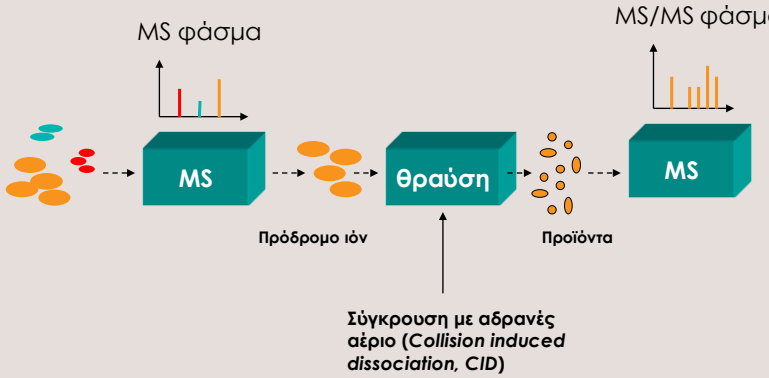
46

Απόδοση HR-MS : Συμβιβασμός ταχύτητας - R



47

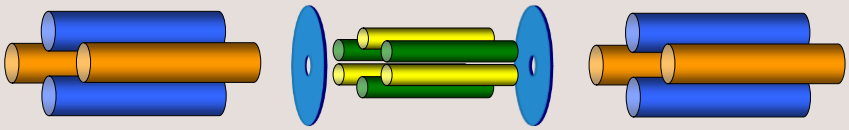
Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών
Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)



48

Τριπλό τετράπολο
Triple Stage Quadrupole (TSQ ή QqQ)

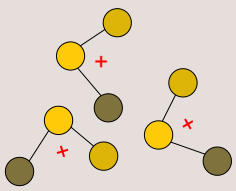
1. Το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion) παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το 1ο τετράπολο (MS1)
2. Οδηγείται στο 2ο τετράπολο (κυψελίδα συγκρούσεων) όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (Ar ή He), παράγοντας θυγατρικά ιόντα (daughter or product ions)
3. Ο διαχωρισμός και μέτρηση των θυγατρικών ιόντων γίνεται στο 3ο τετράπολο (MS2)



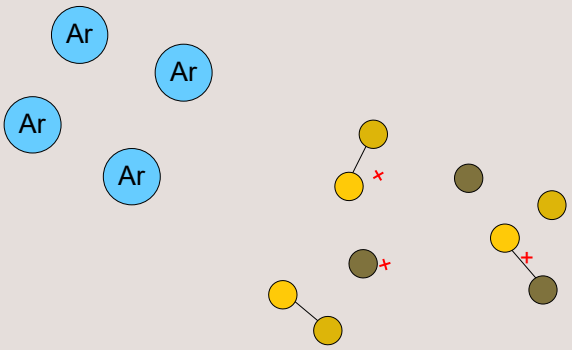
Q1 **Κυψελίδα Συγκρούσεων (Collision Cell)** **Q3**

49

Θραυσματοποίηση μέσω συγκρούσεων



Collision Induced Dissociation (CID)
ή
Collision Activated Dissociation (CAD)

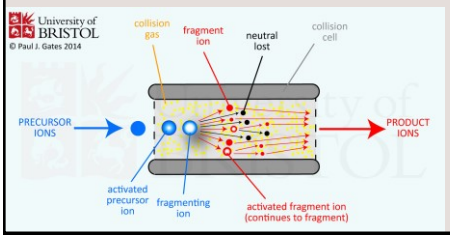


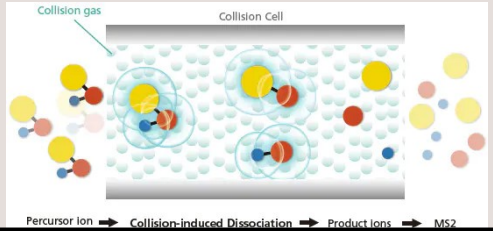
50

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 δυναμικό 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**)

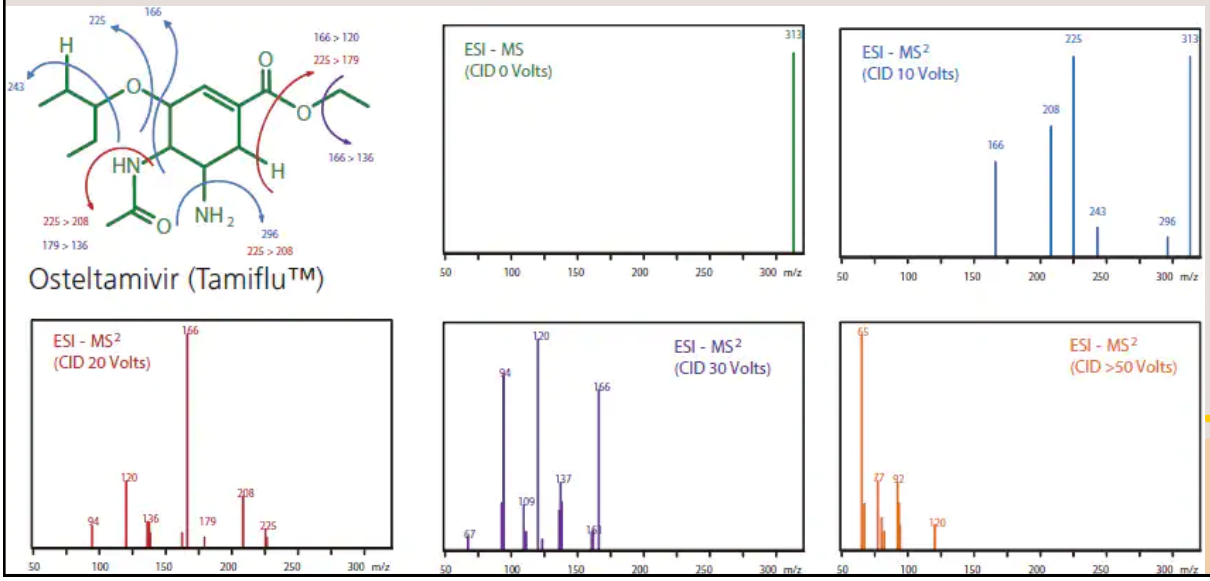




51

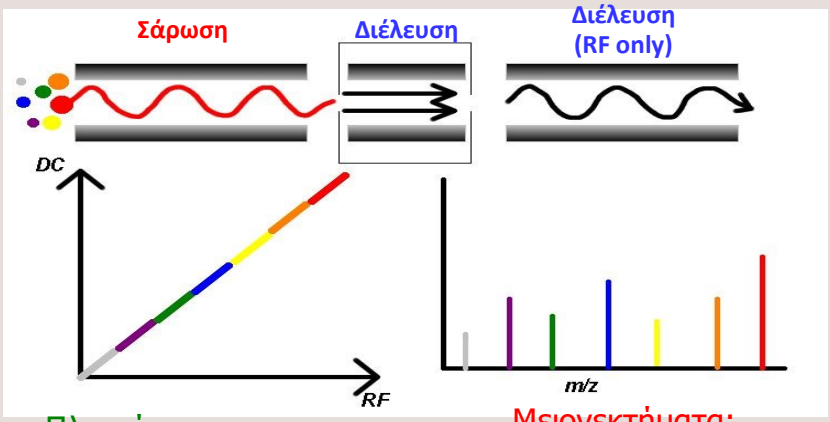
Θραυσματοποίηση μέσω συγκρούσεων

Ο βαθμός θραυσματοποίησης και παραγωγής προιόντων εξαρτάται από την ενέργεια που παρέχεται στην κυψελίδα συγκρούσεων



52

Φασματομετρία Μαζών Πλήρους Σάρωσης
Full-Scan Mass Spectrometry



Πλεονέκτημα:

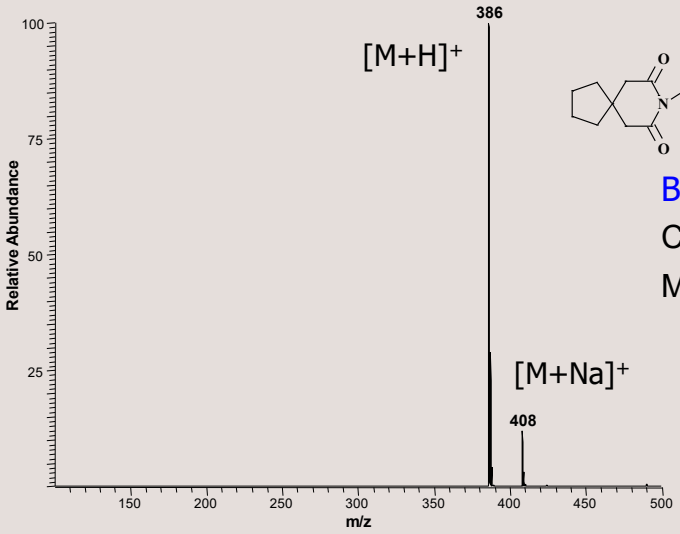
Πληροφορία για το MB

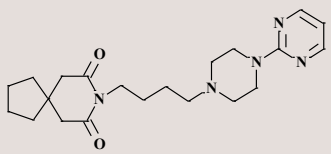
Μειονεκτήματα:

- Αργή σάρωση
- Όχι ποσοτικοποίηση

53

Full-Scan MS της Buspirone





Buspirone

$C_{21}H_{31}N_5O_2$

MW = 385

54

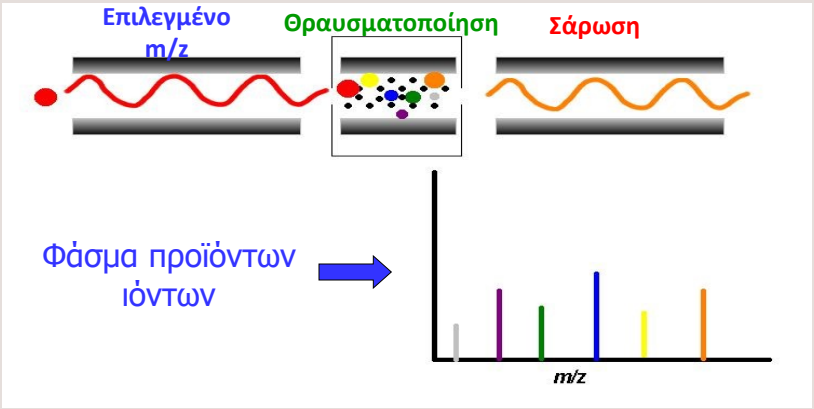
Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος
Single Ion Monitoring (SIM)



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

55

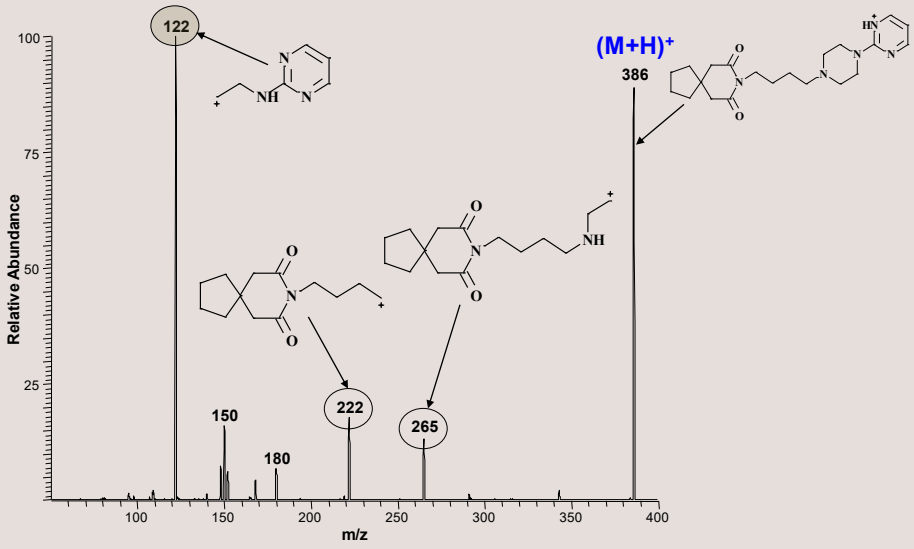
MS/MS προϊόντων ιόντων
Product Ion Scanning



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

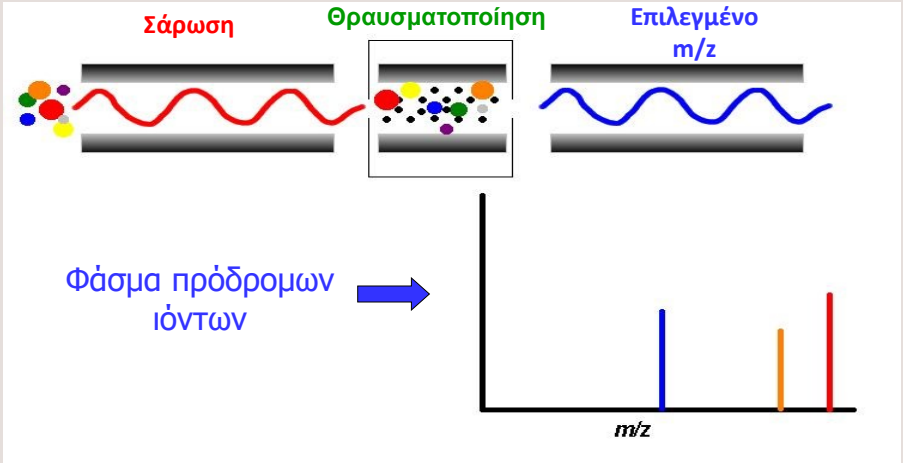
56

Φάσμα προϊόντων ιόντων της Buspirone



57

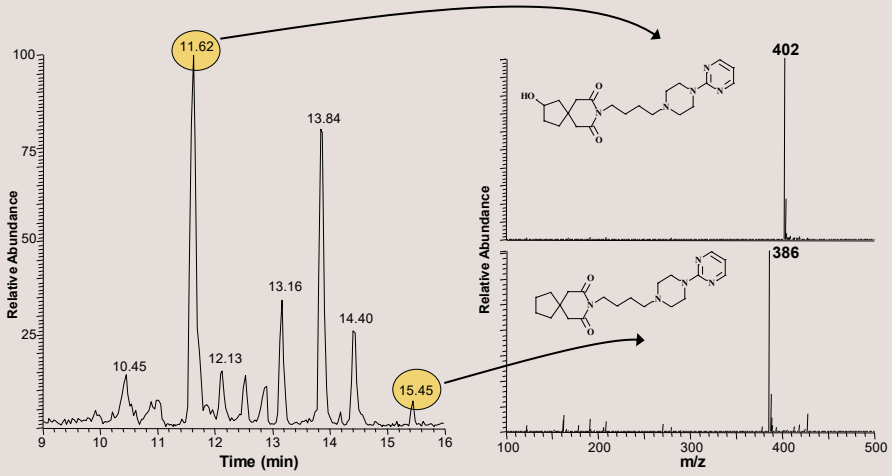
MS/MS πρόδρομων ιόντων
Precursor Ion Scanning



- Πλεονέκτημα:
  - Ταυτοποίηση ενώσεων που δίνουν ένα συγκεκριμένο προϊόν ιόν (π.χ., PO_3^- τα φωσφοπεπτίδια)
- Μειονέκτημα:
  - Αργή σάρωση

58

MS/MS μητρικών ιόντων των μεταβολιτών της Buspirone



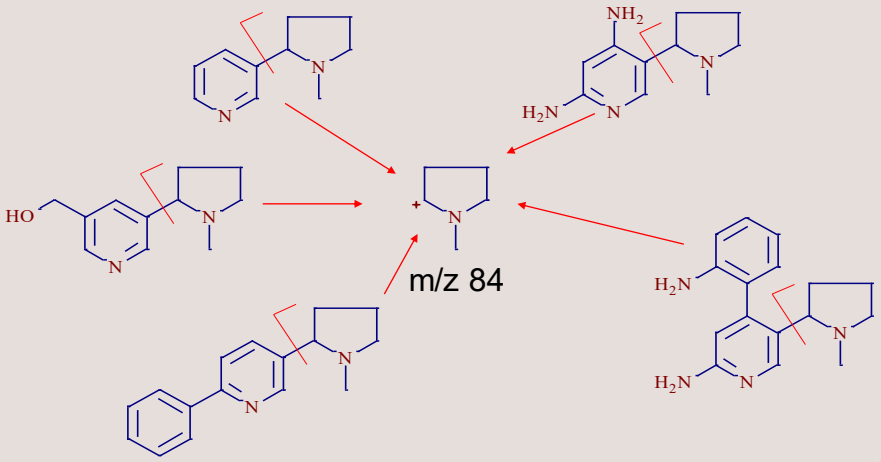
Precursor Ion Scan: Το Q3 παρακολουθεί μόνο το m/z 122

59

Precursor ion scans

Οι σαρώσεις πρόδρομων ιόντων χρησιμοποιούνται για πειράματα διαλογής (screening)

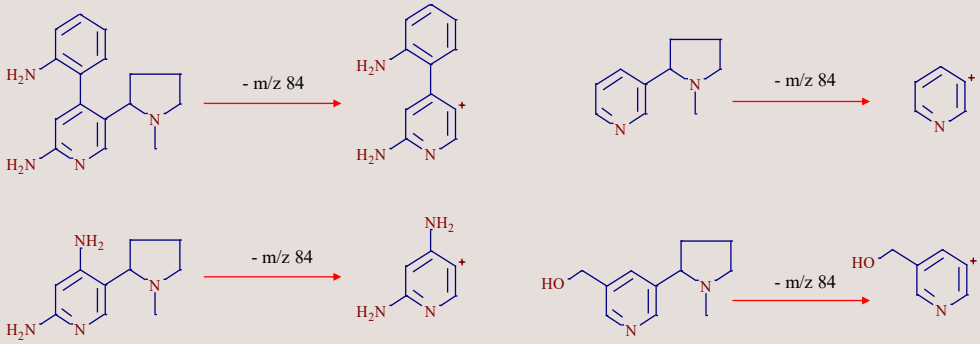
Όταν μια ομάδα ενώσεων, όλες δίνουν το ίδιο ιοντικό θραύσμα



60

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)



61

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
DCPMU	218,9 → **127,0** → 161,9
DCPU	205,0 → **127,1** → 161,9
DCA	162,0 → **127,1** → 109,1
Ligand	254,0 → 197,9 → 109,1
M1	214,0 → 158,0 → 98,3

Κοινό προϊόν *m/z*

96

62

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ:

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

	Μετάπτωση	
Diuron	232,0 → 72,3 → 46,3	
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	Neutral loss: *m/z* 56
M1	**214,0 → 158,0** → 68,3	Neutral loss: *m/z* 56

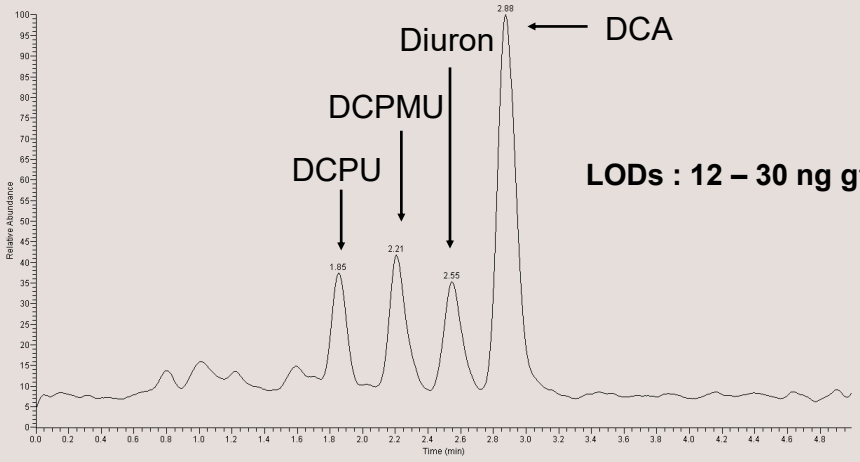
97

63

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

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

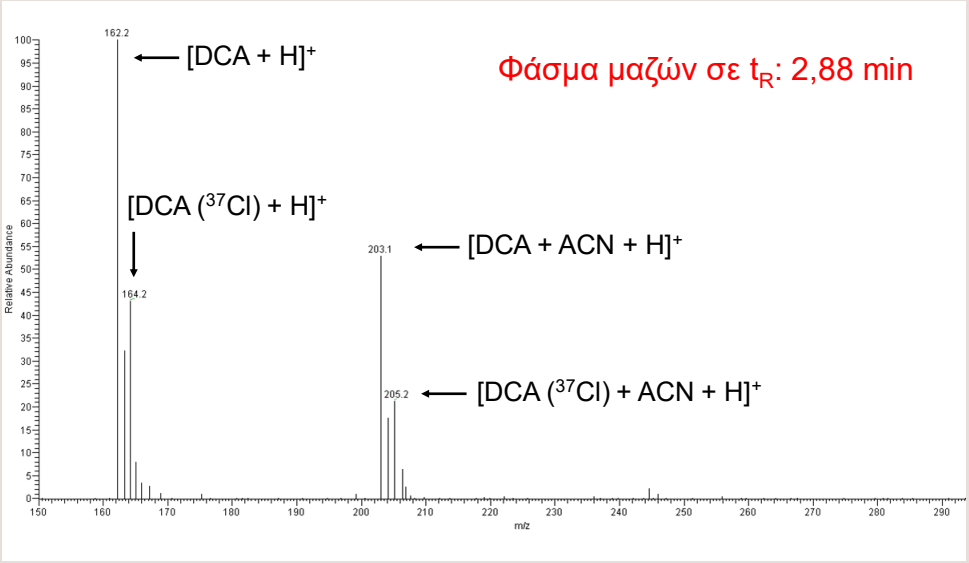


98

64

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

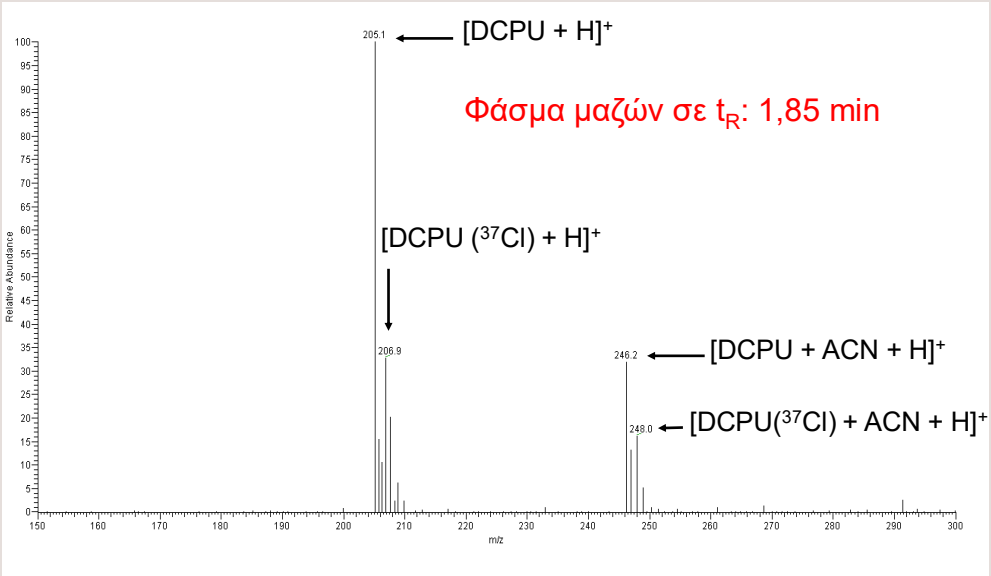
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



65

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

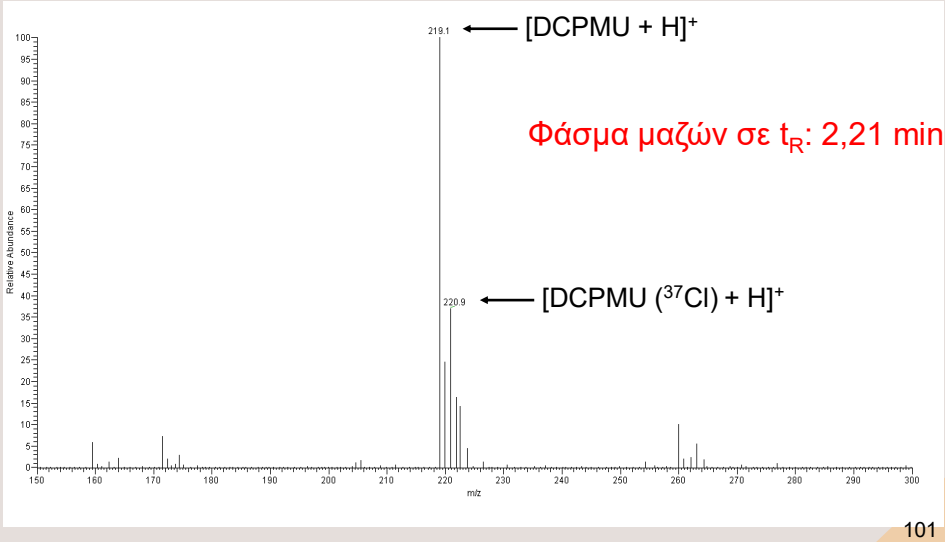


100

66

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

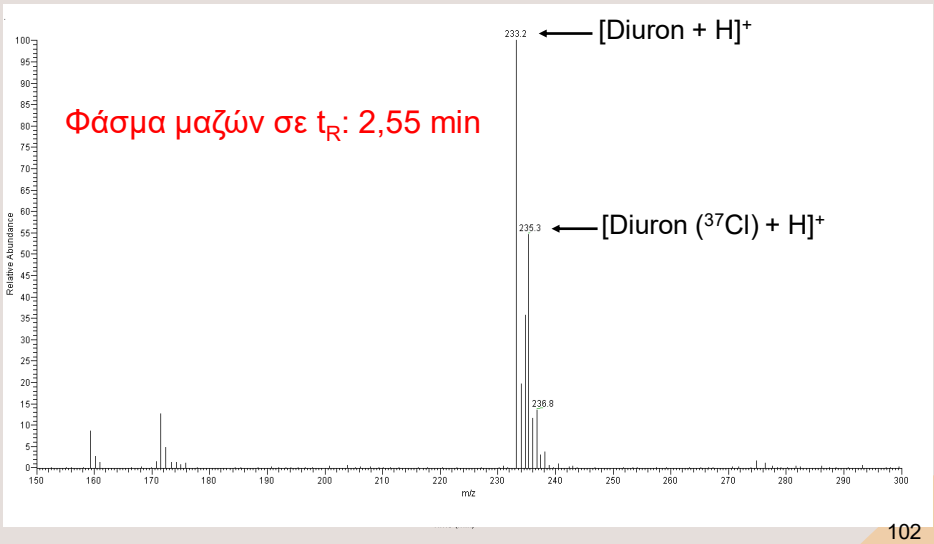


101

67

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

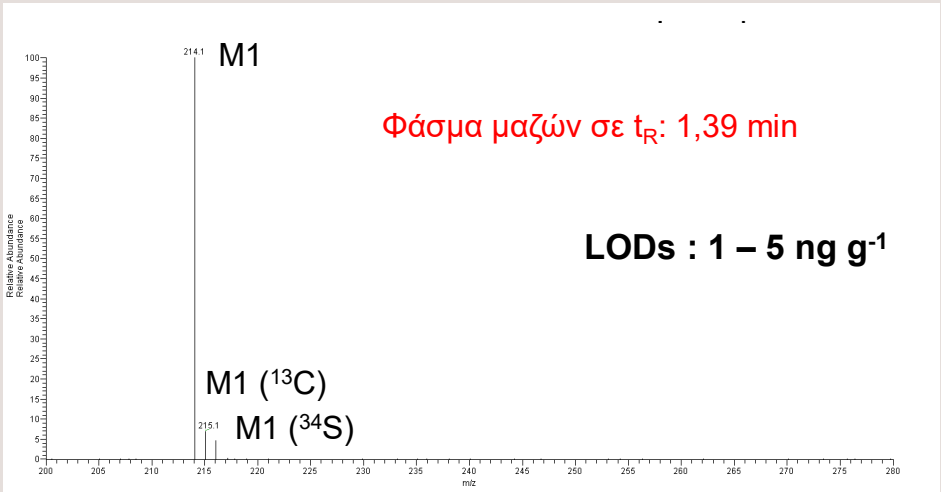


102

68

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ



Φάσμα μαζών σε t_R: 1,39 min

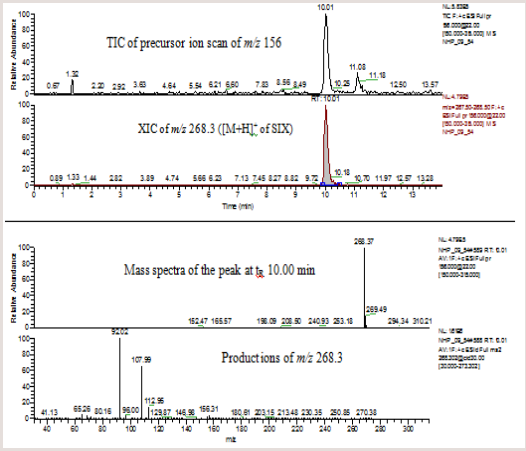
LODs : 1 – 5 ng g^{-1}

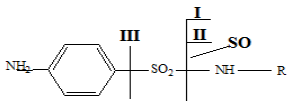
103

69

DATA DEPENDENT SCANS

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





I = 156

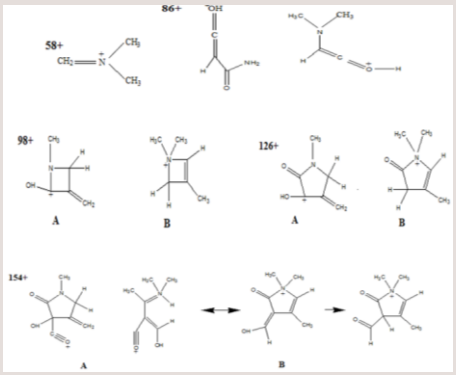
II = 108

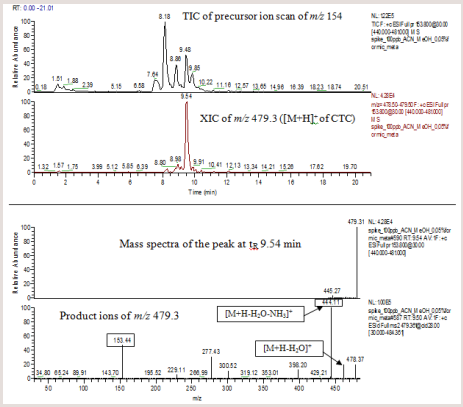
III = 92

70

DATA DEPENDENT SCANS

Θραυσματοποίηση τετρακυκλινών





$$[M+H]^+ \nearrow [M+H-H_2O]^+ \searrow$$
$$[M+H]^+ \searrow [M+H-NH_3]^+ \nearrow [M+H-H_2O-NH_3]^+$$

71

Παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης Selected Reaction Monitoring (SRM)

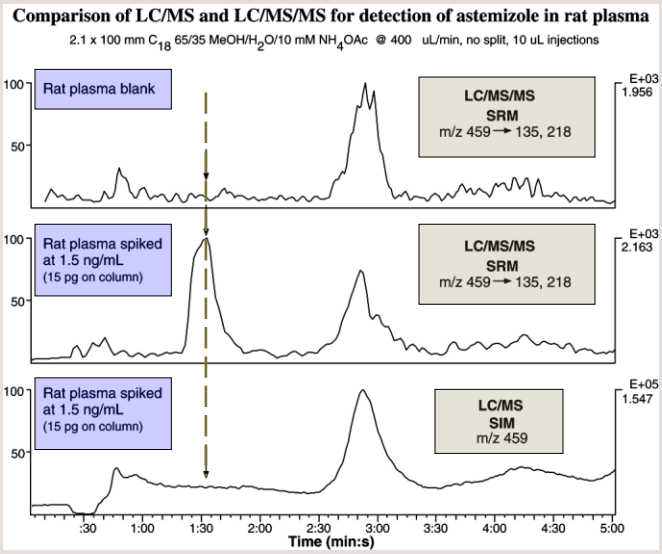


Μετάπτωση ή «αντίδραση» : $m_1/z \rightarrow m_2/z$

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

72

Εκλεκτικότητα MS/MS σε δείγματα με πολύπλοκη μήτρα



73

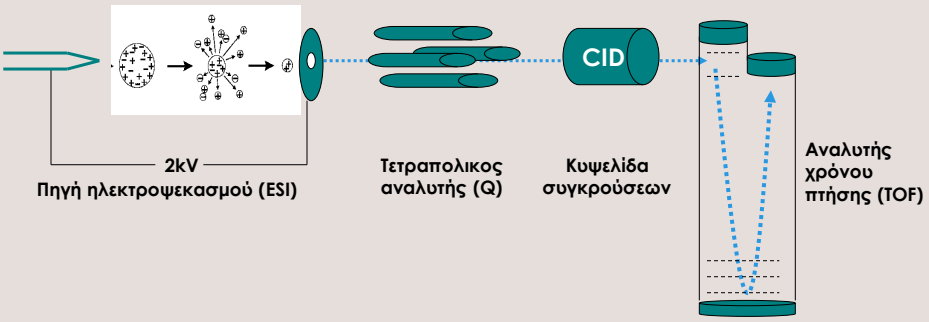
Scan Modes: Quadrupole MS

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**

74

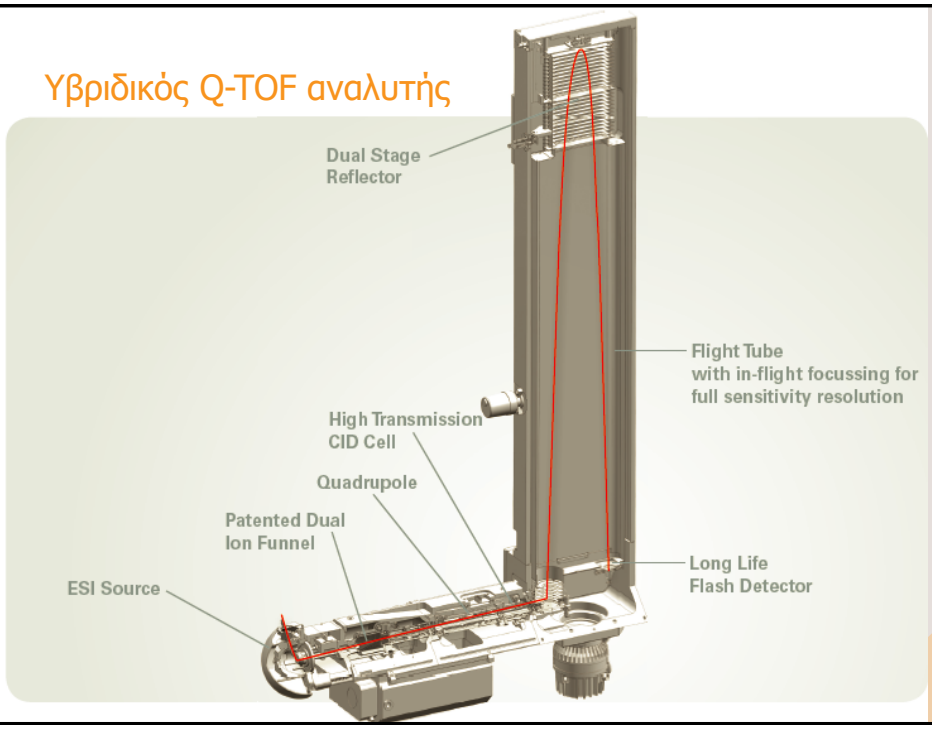
Υβριδικός Q-TOF αναλυτής



- Υψηλή διακριτική ικανότητα (m/Δm ~10.000-20.000, μέγιστο 40.000)
- Ακρίβεια μάζας: $(m_{\theta\epsilon\omega\rho} - m_{\pi\epsilon\iota\rho\alpha\mu})\times 10^6/m_{\Theta\epsilon\omega\rho.}$ ~ 1-5 ppm
- Υψηλή ευαισθησία: Κατώτερο όριο ανίχνευσης 100 fmol/μL

75

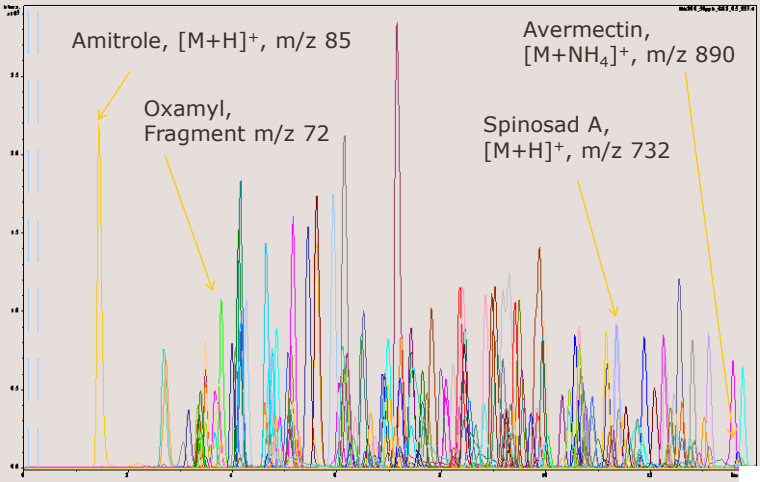
Υβριδικός Q-TOF αναλυτής



76

Broad mass bandwidth

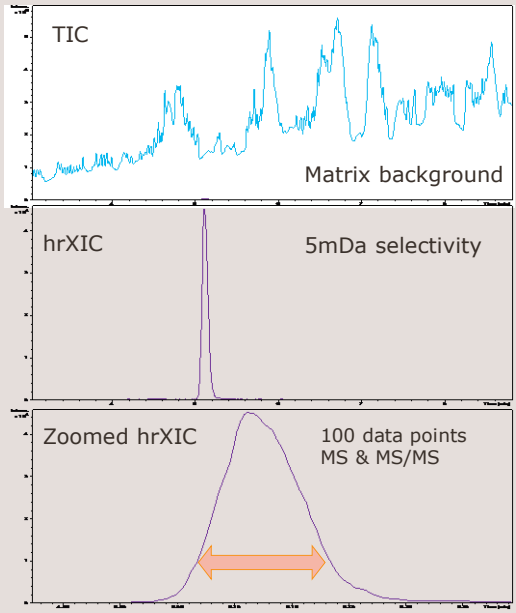
One-shot acquisition mode from 70 to 900 m/z



hrXIC width 2 mDa of 60 pesticides

77

TARGET SCREENING ME LC-Q-TOF-MS



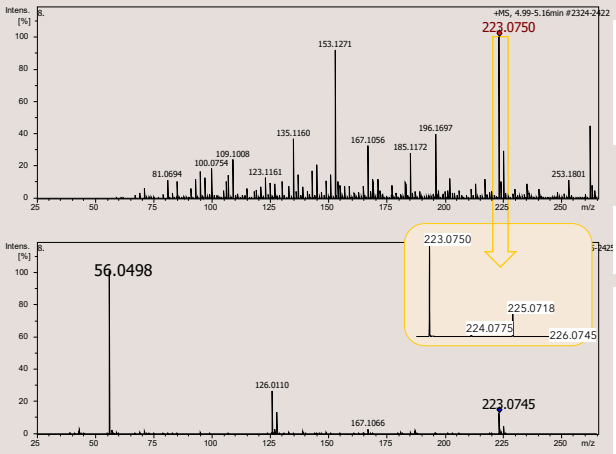
A) TIC from complex sample 60 pesticides spike into ginger (QuEChERS)

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.

78

TARGET SCREENING ME LC-Q-TOF-MS



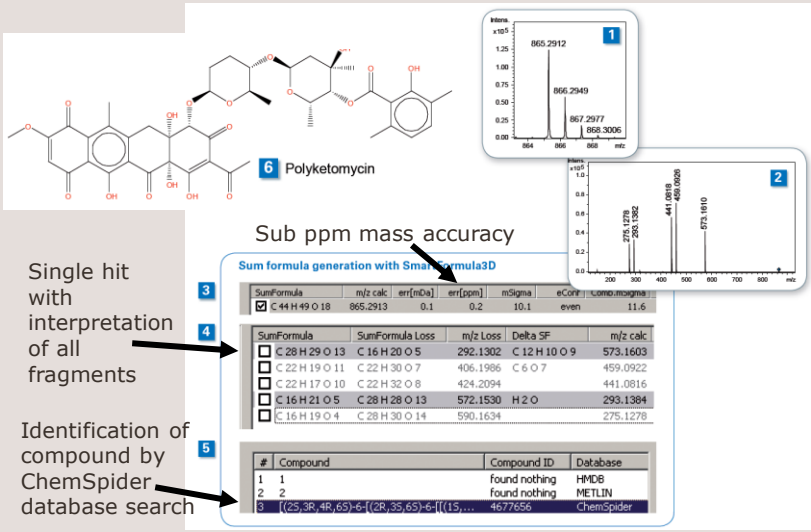
D) High-resolution survey MS with m/z 223.0745 selected as precursor.

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.

79

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΓΝΩΣΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ LC-Q-TOF-MS



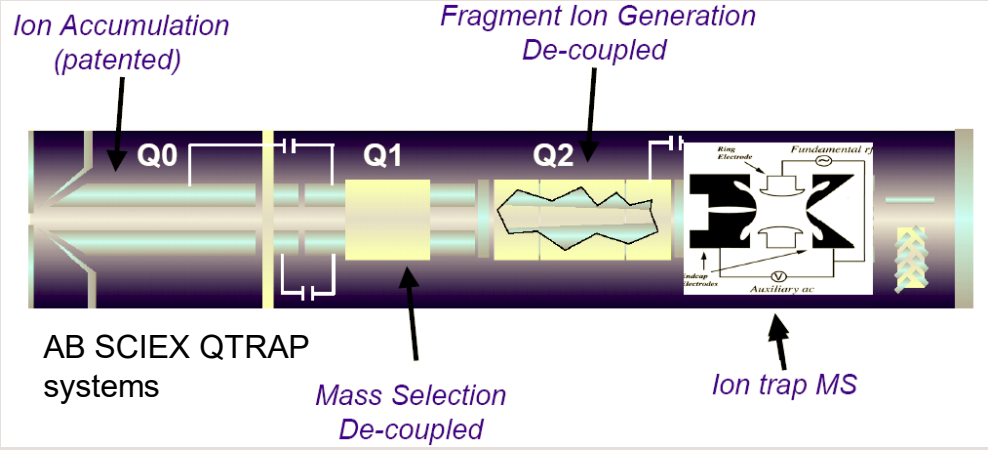
Single hit with interpretation of all fragments

Identification of compound by ChemSpider database search

80

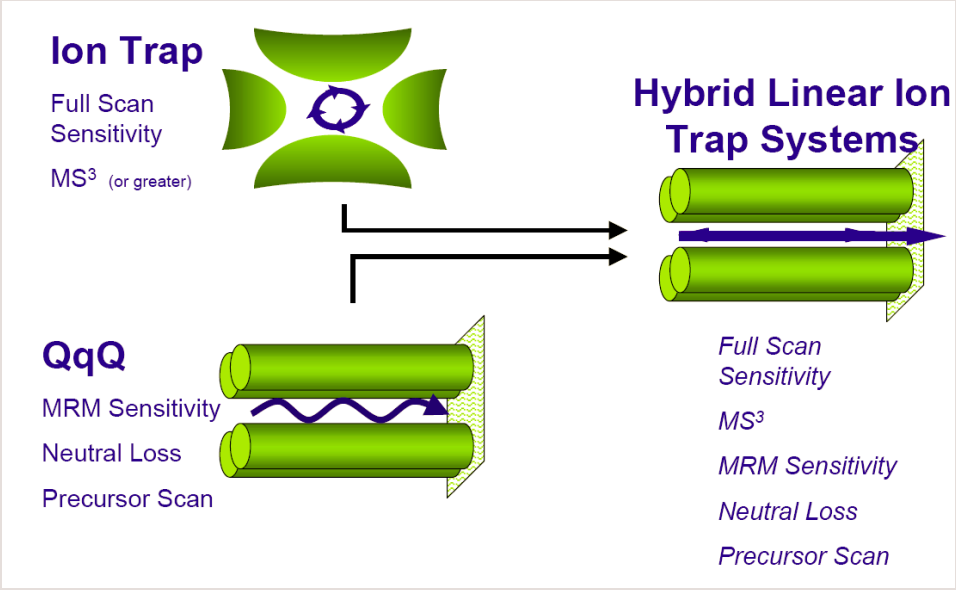
Υβριδικός Q-TRAP αναλυτής

Δυνατότητες και λειτουργίες QqQ + δυνατότητα MS^n



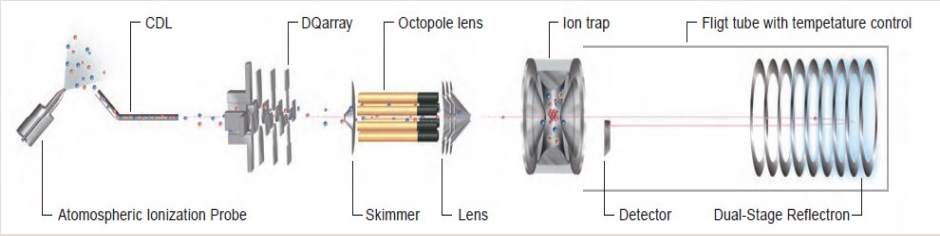
81

Υβριδικός Q-TRAP αναλυτής



82

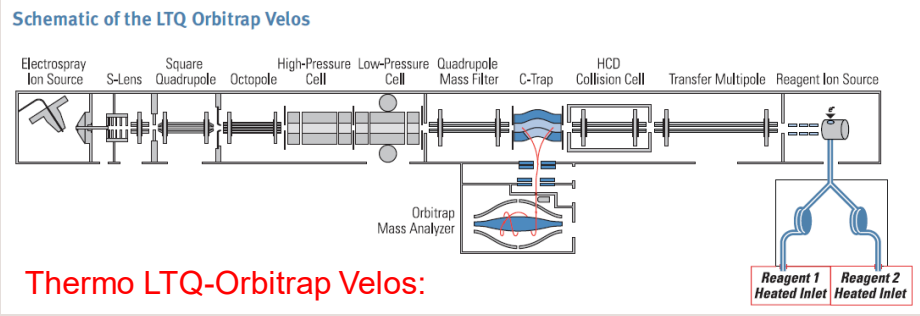
Υβριδικός IT-TOF αναλυτής



Shimadzu LCMS-IT-TOF
http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=lcms_it_tof

83

Υβριδικός LTQ-Orbitrap αναλυτής



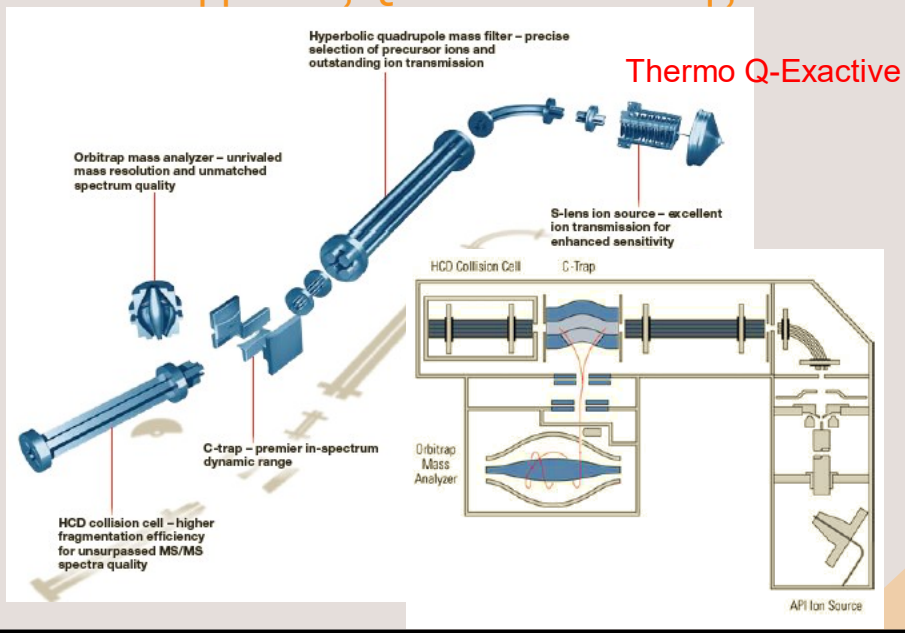
Thermo LTQ-Orbitrap Velos:

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

Πρωτεομική, Μεταβολομική, ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμακευτικών ενώσεων, βιοανάλυση

84

Υβριδικός Q-Orbitrap αναλυτής



85