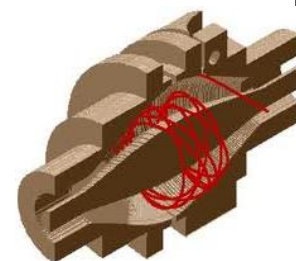




NATIONAL & KAPODISTRIAN
UNIVERSITY OF ATHENS

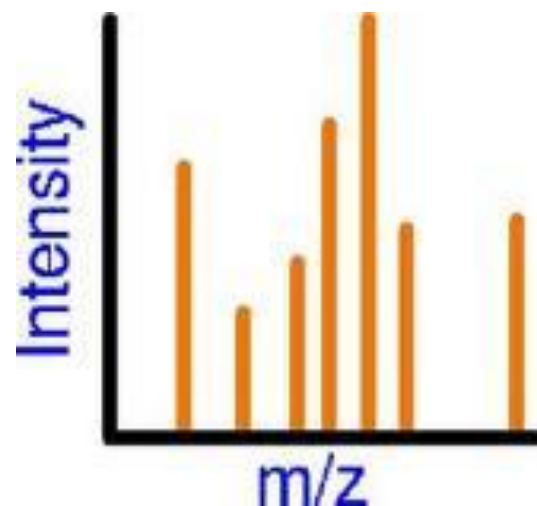
Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας Ι
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Φαρμακευτικό Τμήμα
Πανεπιστήμιο Αθηνών

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



Ορισμός

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"



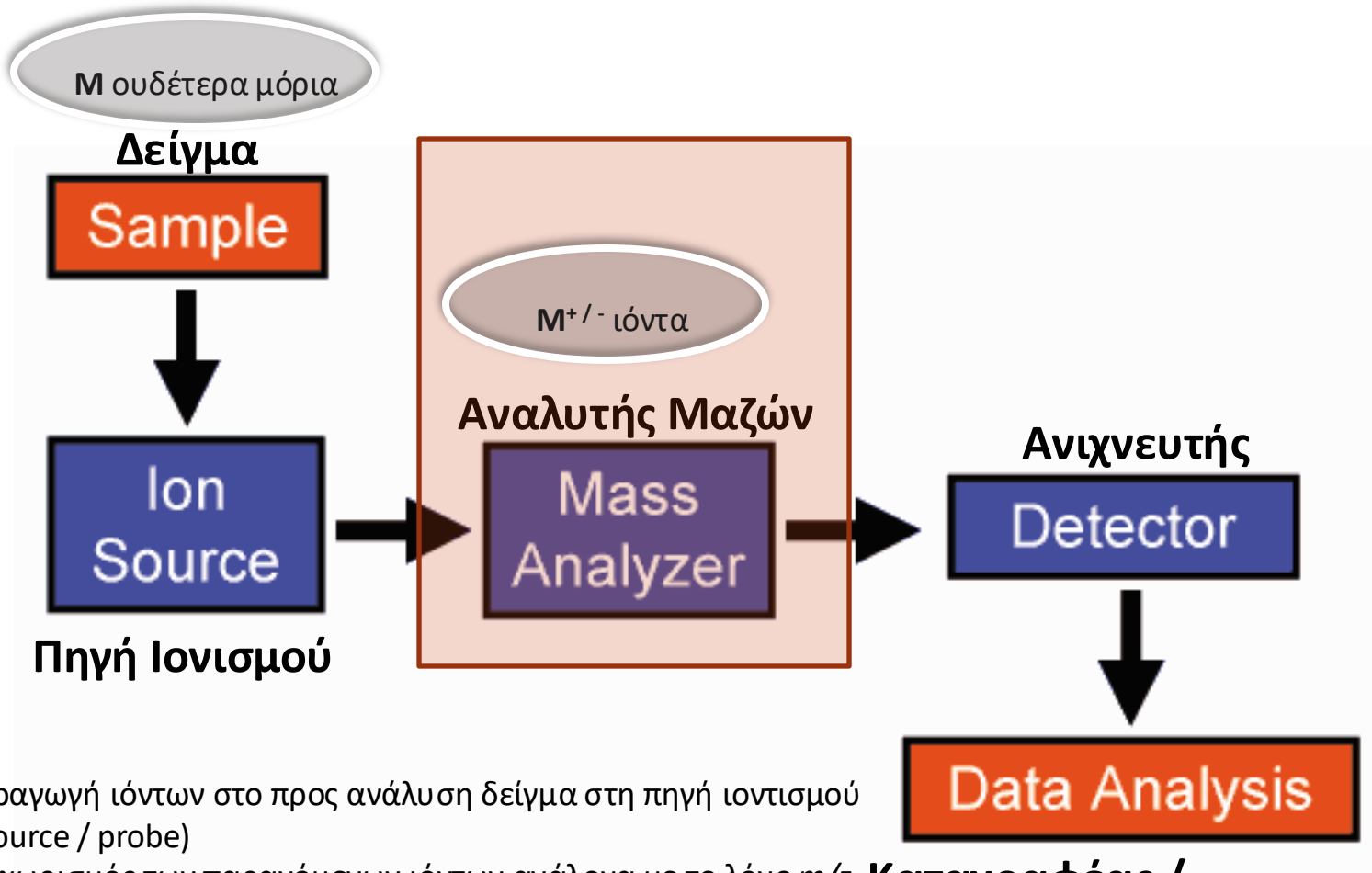
Koichi Tanaka

**2002 Βραβείο Nobel
Χημείας**

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



Κύρια μέρη ενός Φασματογράφου Μάζας



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

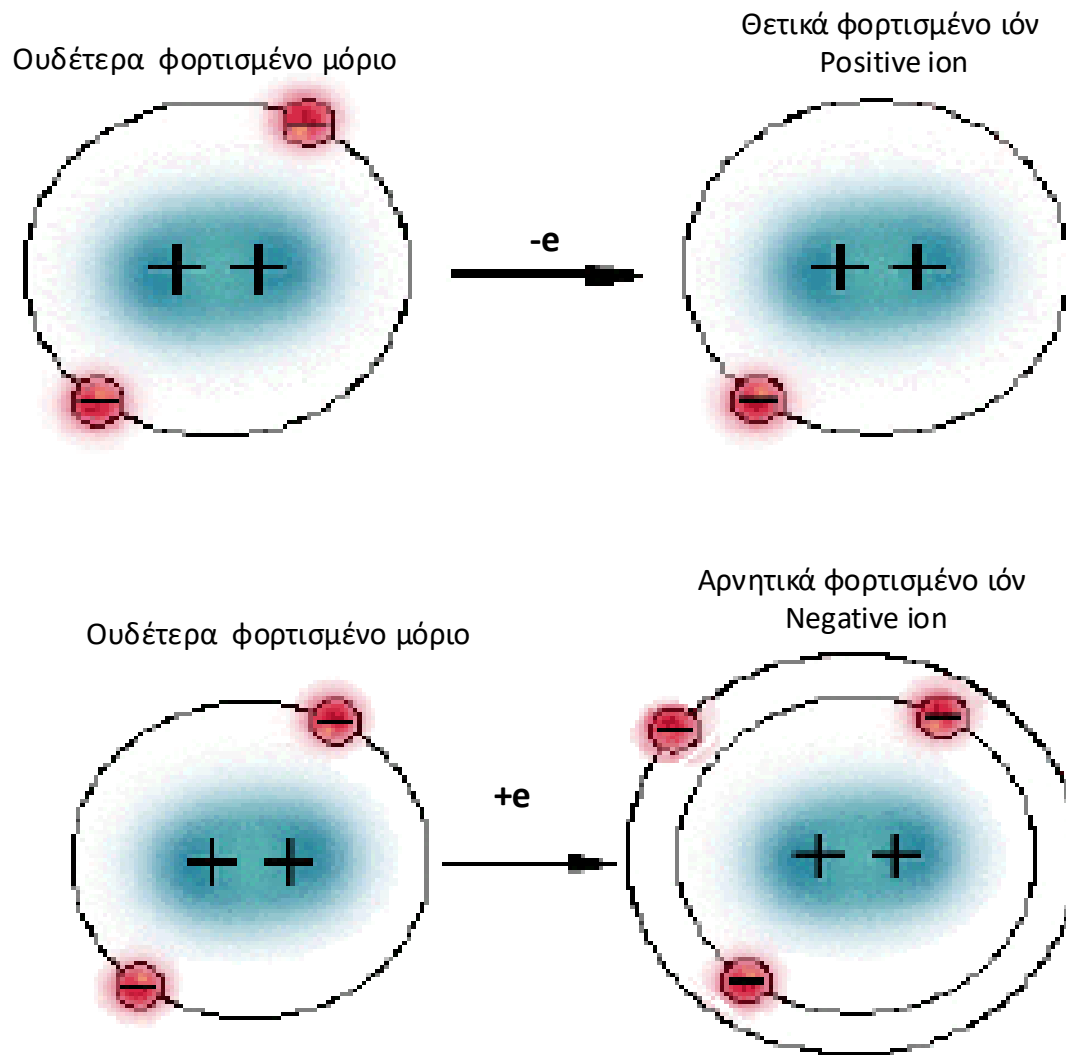
B) Διαχωρισμός των παραγόμενων ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z στον αναλυτή μαζών (mass analyzer)

Γ) Ανίχνευση ιόντων (detector)

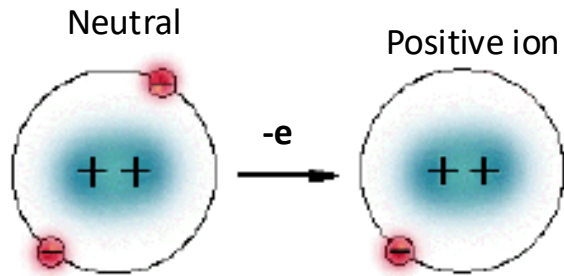
Δ) Έλεγχος οργάνου και επεξεργασία φασμάτων

**Καταγραφείας /
Ανάλυση αποτελεσμάτων**

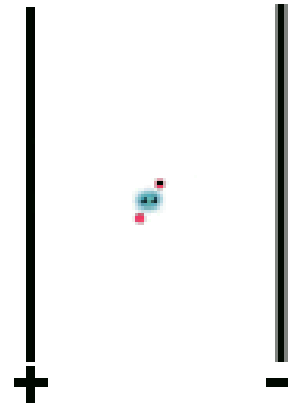
Ιοντισμός – Μέθοδοι/πηγές ιοντισμού



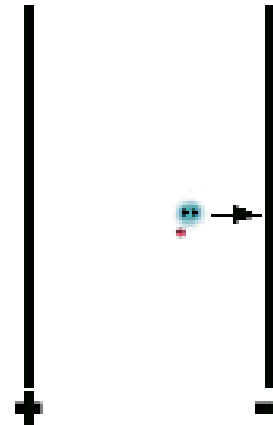
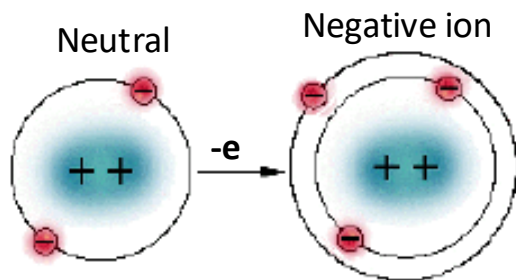
Ιοντισμός – Αναλυτές μαζών



Ηλεκτρικό πεδίο

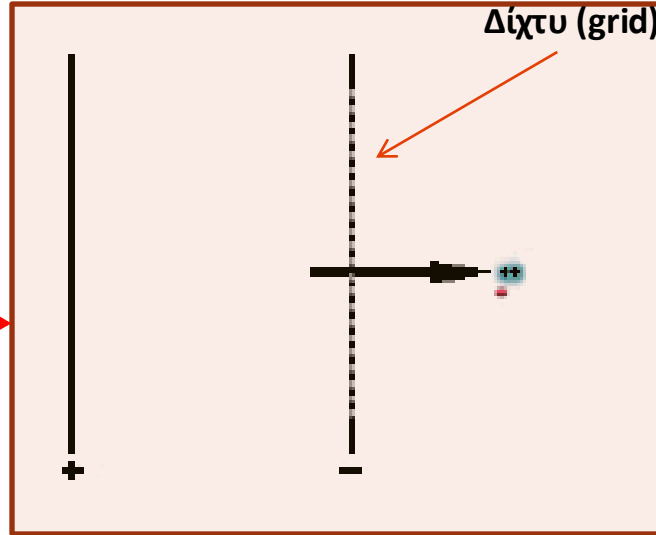
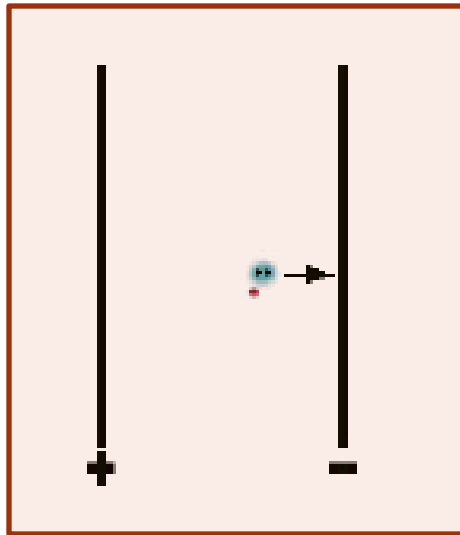


Ουδέτερο μόριο
Καμία επίδραση

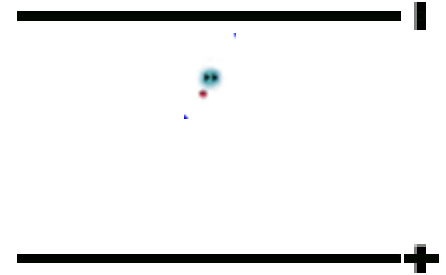


Κατιόν
Κατευθύνεται προς το αντίθετα
φορτισμένο ηλεκτρόδιο

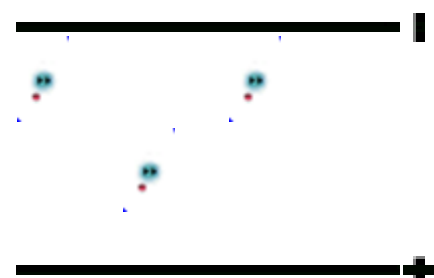
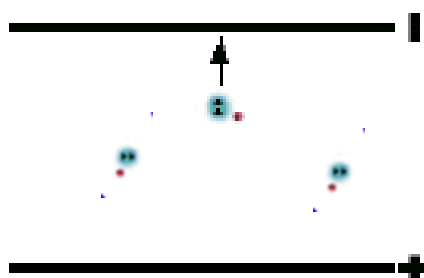
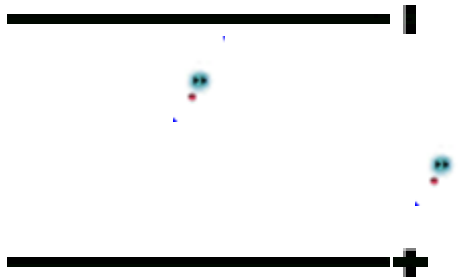
Αναλυτές μαζών



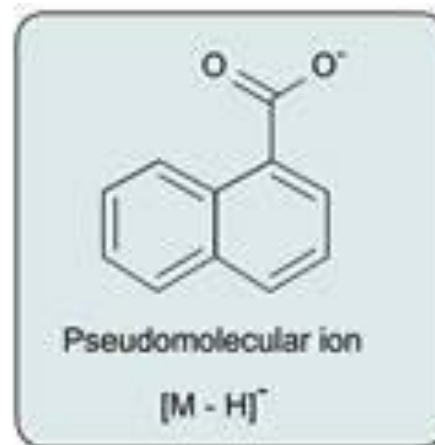
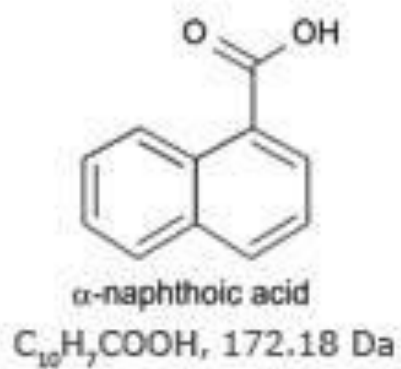
Σταθερό ηλεκτρικό πεδίο
Δυναμικό συνεχούς ρεύματος
(*dc voltage*)



Electromagnetic field
dc voltage + rf voltage

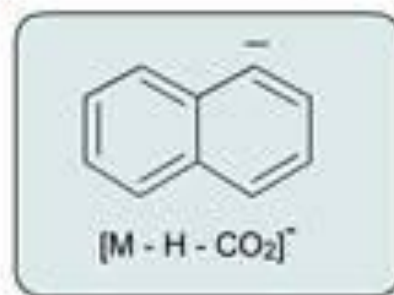
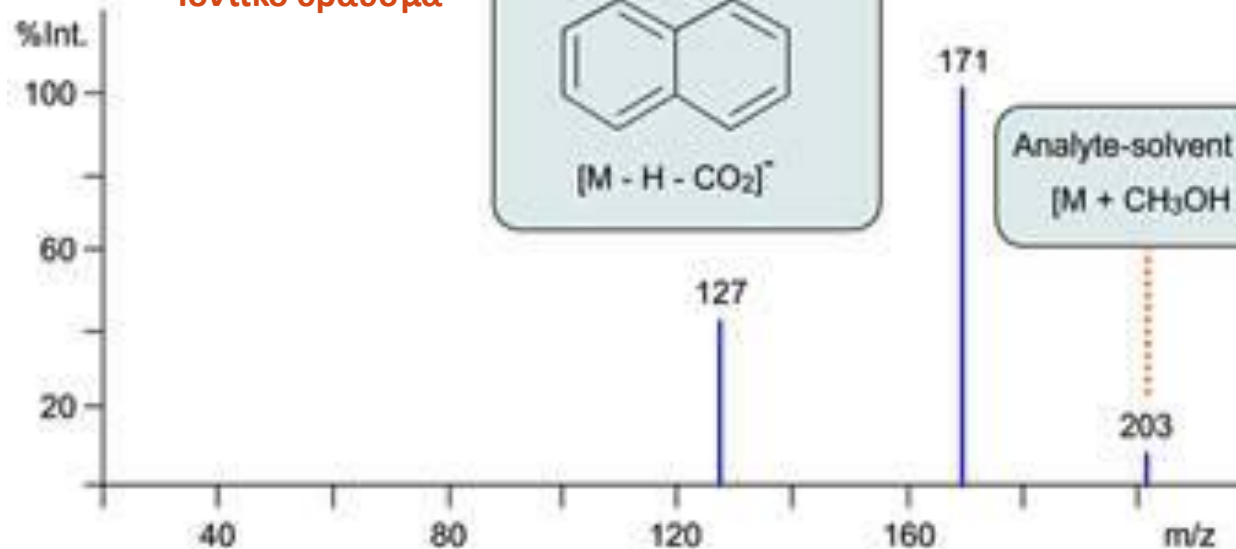


Φάσμα μάζας

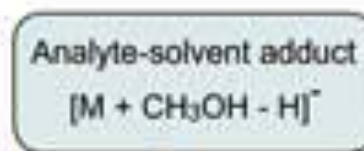


Ψευδομοριακό ιόν

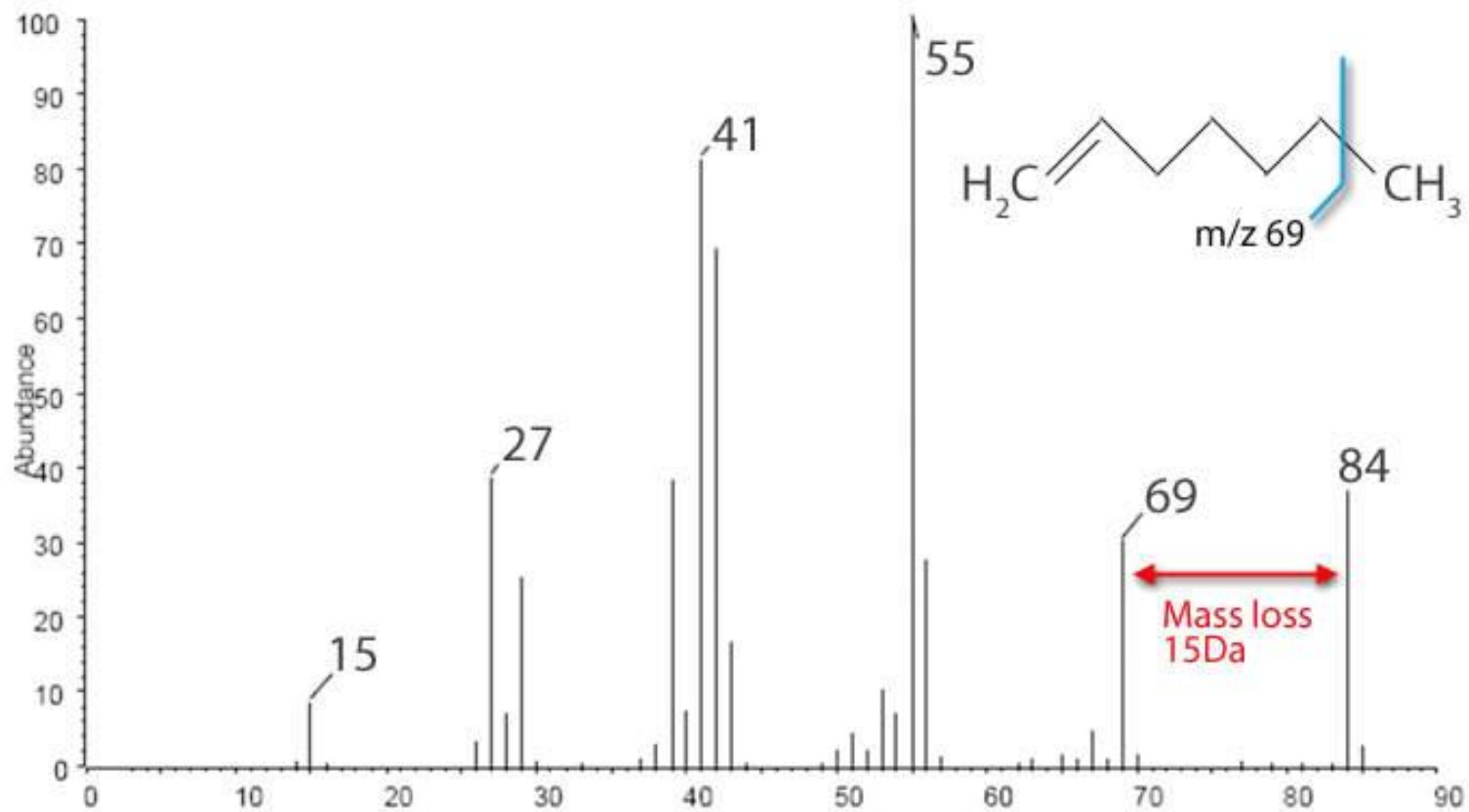
Ιοντικό θραύσμα



Ιόν προσθήκης



Φάσματα μάζας

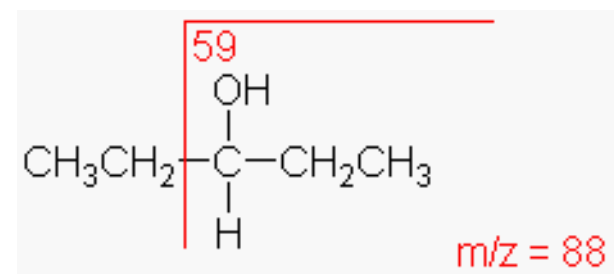
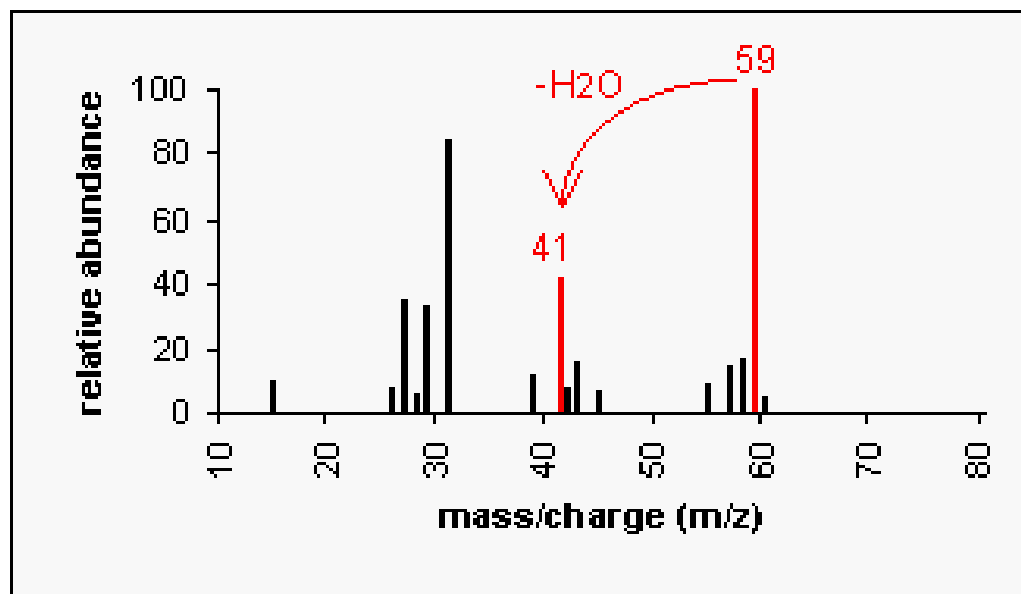


Alcohols:

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_2O may occur as in the spectra below.



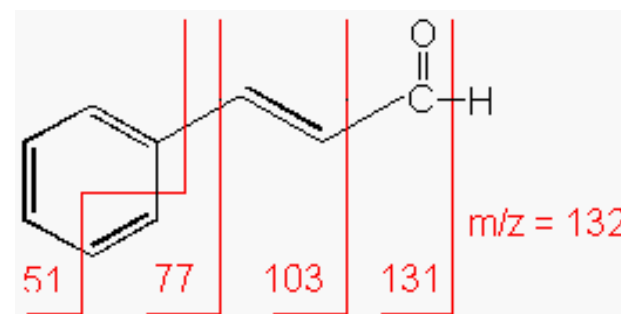
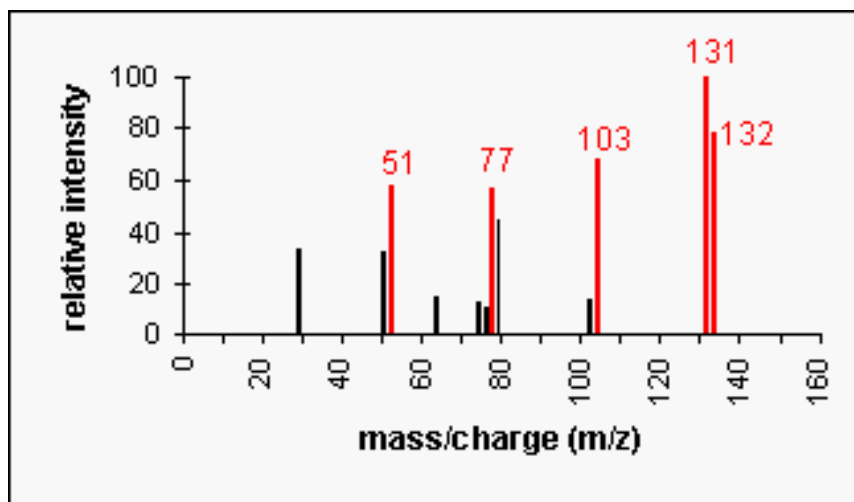
3-Pentanol

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

MW = 88.15

Aldehydes

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



3-Phenyl-2-propenal

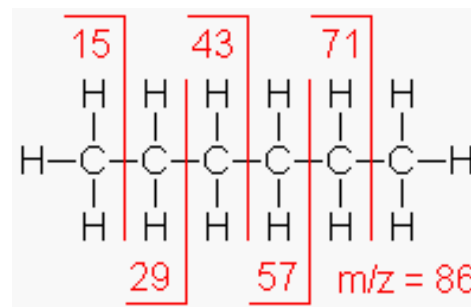
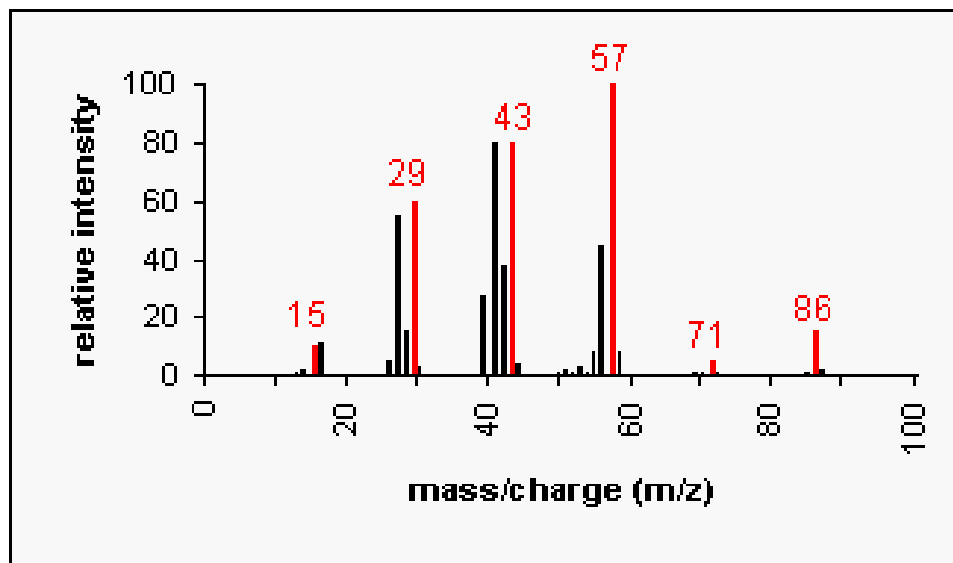
C₉H₈O

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 $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$).



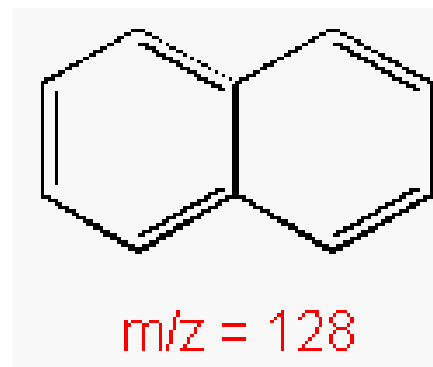
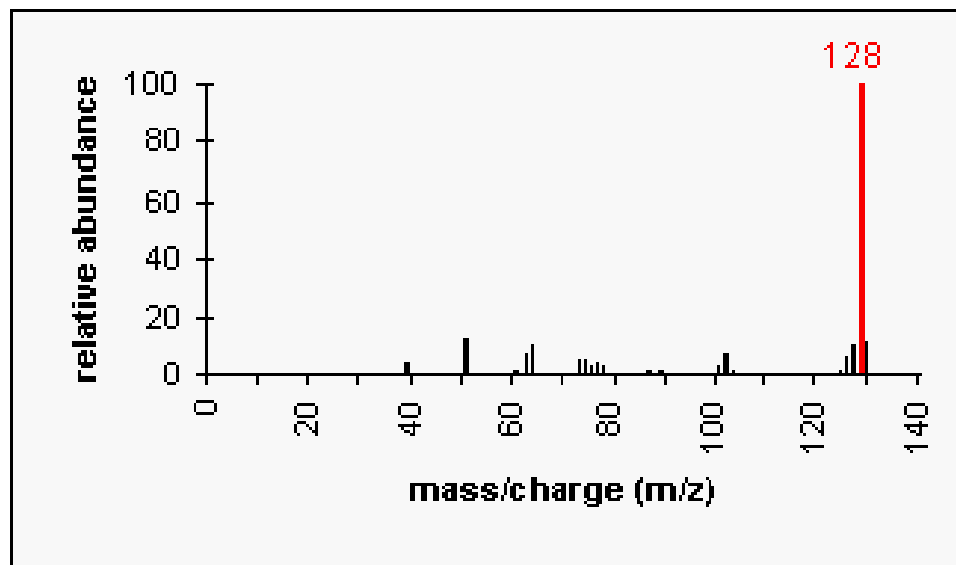
Hexane

C_6H_{14}

MW = 86.18

Aromatics

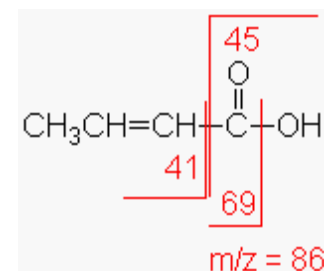
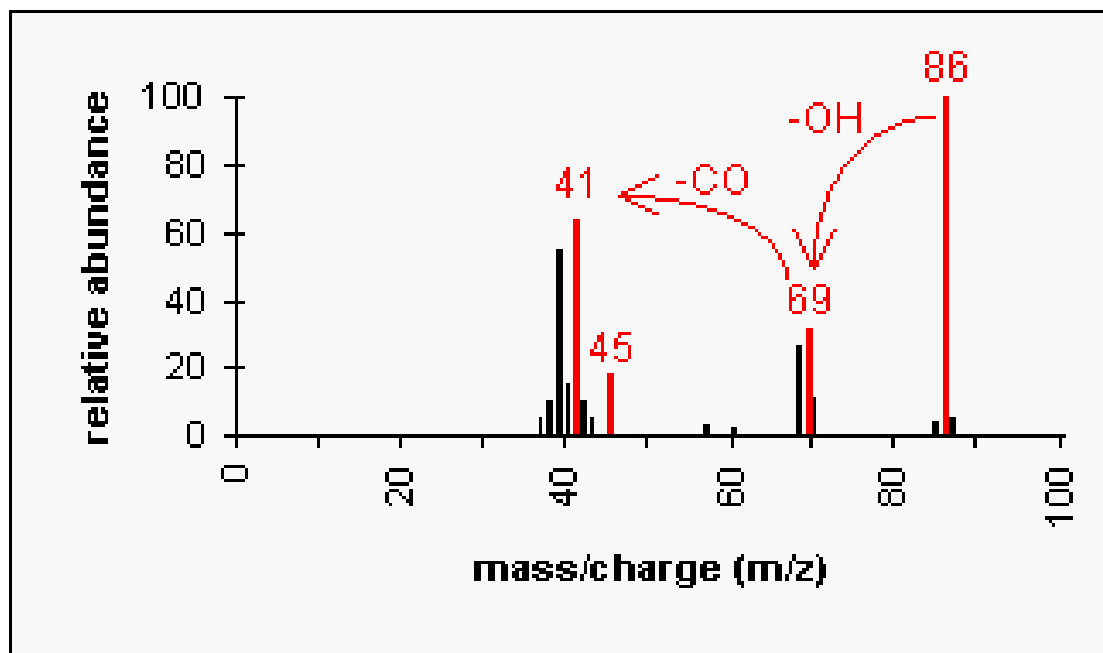
Molecular ion peaks are strong due to the stable structure.



Naphthalene
C₁₀H₈
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

Isotopic Abundances

(Ισοτοπική αφθονία)

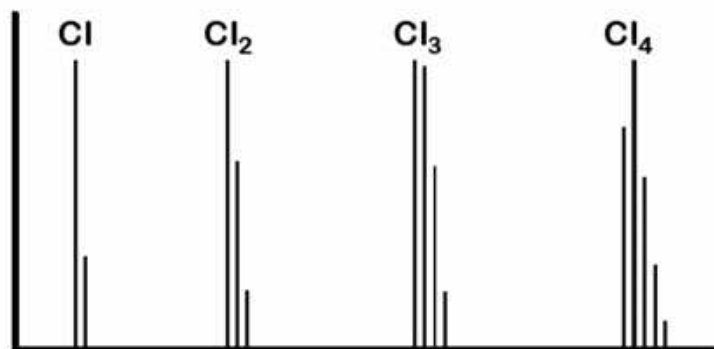
$$\text{Mass: } M = \sum m_e \cdot n_e$$

m_e – mass of an element

n_e – number of atoms of this element in the molecule

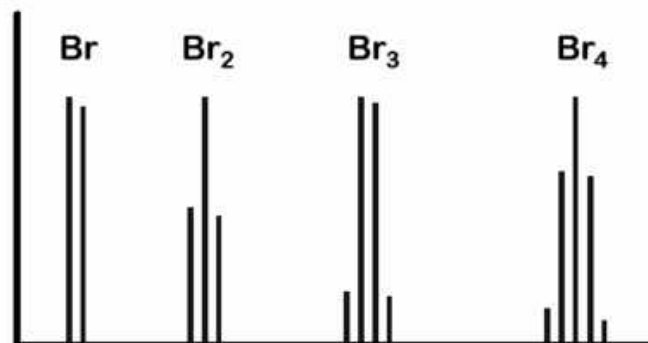
<i>Isotope</i>	<i>Mass</i>	<i>Abundance</i>	<i>Chemical mass</i>	<i>Deviation from the whole number</i>
¹ H	1.00782510	99.9852%	1.00794	+0.0079
² H (D)	2.01410222	0.0148%		
¹² C	12.0(0)	98.892%	12.011	+0.011
¹³ C	13.0033544	1.108%		
¹⁴ N	14.00307439	99.635%	14.00674	+0.007
¹⁵ N	15.0001077	0.365%		
¹⁶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

Chlorine



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

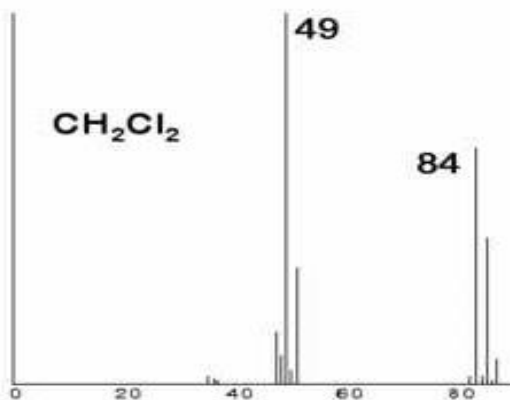
Bromine



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

Another example

Dichloromethane - a common GC/MS solvent



Note the Cl₂ pattern at 84 and the Cl pattern at 49

Ιοντισμός – Μέθοδοι/πηγές ιοντισμού

■ Μέθοδοι παραγωγής μοριακών ιόντων από πτητικά δείγματα

- Ιοντισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron impact – EI)
- Χημικός ιοντισμός (Chemical ionization – CI)
- Φωτοϊοντισμός (Photoionization)
- Ιοντισμός πεδίου (Field ionization)

■ Μέθοδοι παραγωγής μοριακών ιόντων από μη πτητικά δείγματα

○ Τεχνικές ψεκασμού (Spray techniques)

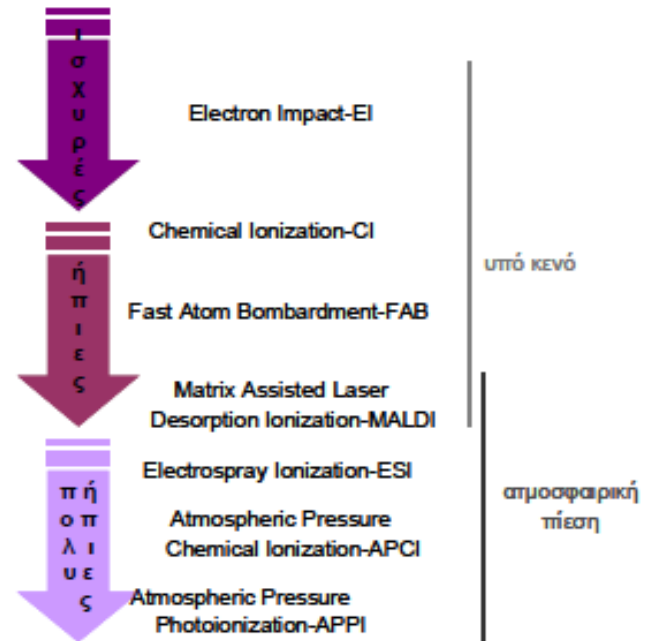
- Ηλεκτροψεκασμός (ElectoSpray Ionization – ESI)
- Χημικός Ιοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization - APCI)
- Θερμοψεκασμός (ThermoSPray - TSP)

○ Τεχνικές εκρόφησης που επάγονται από πρόσκρουση σωματιδίων

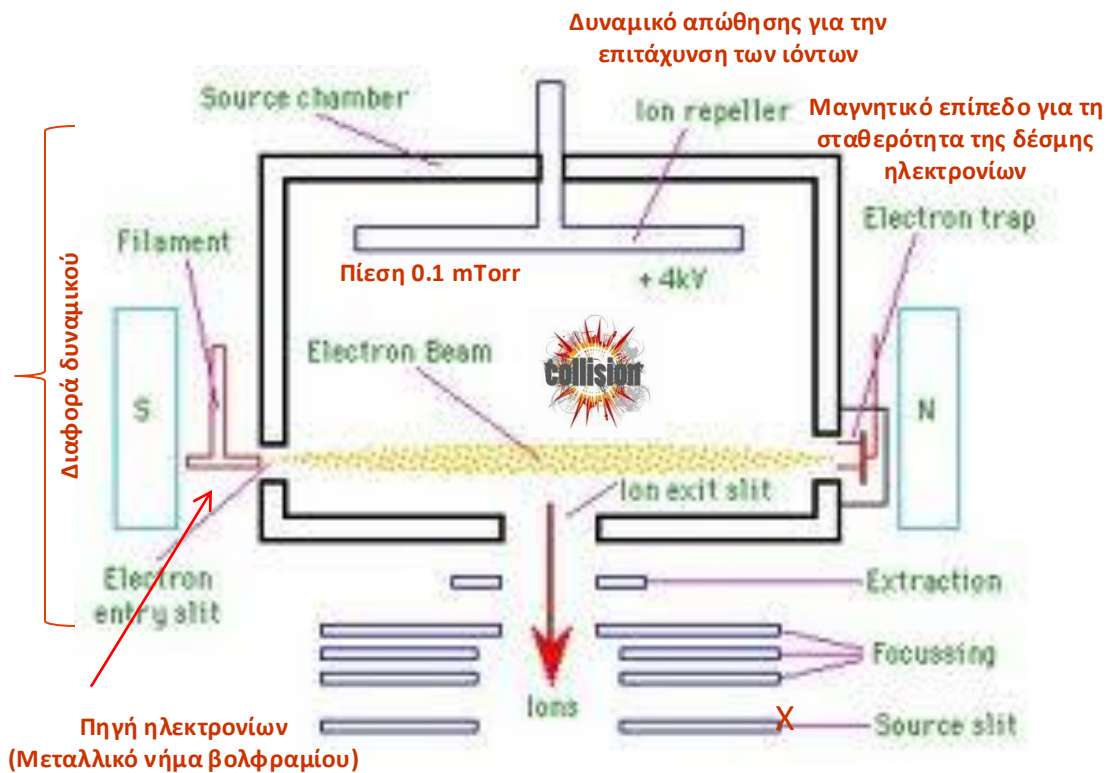
- Ιοντισμός μέσω πρόσκρουσης με σωματίδια χαμηλής ενέργειας (Low –energy Particle Impact)
- Ιοντισμός ροής ατόμων μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment – FAB)
- Ιοντισμός εκρόφησης από επιφάνειες (Desorption from Surfaces)
- Ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από πλάσμα (Plasma Desorption – PD)
-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

■ Μέθοδοι παραγωγής ατομικών ιόντων

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



Ιοντισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron impact – EI)



ΙΟΝΙΣΜΟΣ



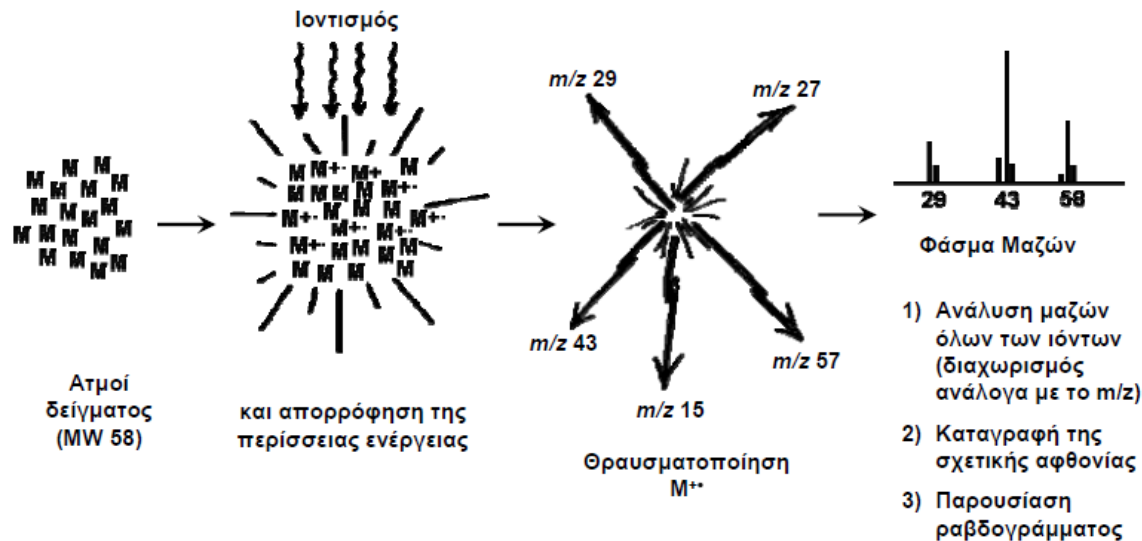
ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ



$EE^+ \rightarrow$ Ιόν με άρτιο αριθμό e^-

$OE^+ \rightarrow$ Ιόν με περιττό αριθμό e^-

Ιοντισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron impact – EI)

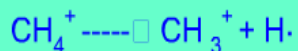


- Ευρεία χρήση /μέθοδος επιλογής για πτητικές ενώσεις (σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες)
- Συχνή χρήση παραγωγοποίησης (π.χ. σιλυλίωση)
- Εκτεταμένη θραυσματοποίηση – συχνά απουσία μοριακού ιόντος
- Αυξημένη δομική πληροφορία
- Υψηλή επαναληψιμότητα σχεδόν απόλυτα συνδεδεμένη με τη μοριακή δομή → Μοριακό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

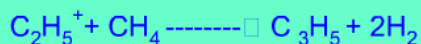
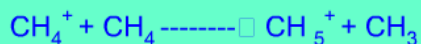
Χημικός ιοντισμός (Chemical ionization – CI)

- Λιγότερο ισχυρή μέθοδος από την EI
 - μειωμένη θραυσματοποίηση
 - πιο απλά φάσματα
 - πιο πιθανή η παρατήρηση μοριακού ιόντος (MI)
- Αέρια π.χ. CH₄, NH₃, i-butane χρησιμοποιούνται τόσο ως φέροντα αέρια αλλά και για τη δημιουργία ιόντων

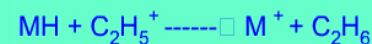
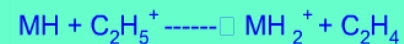
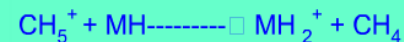
1.Primary Ion Formation



2.Secondary Reagent Ions



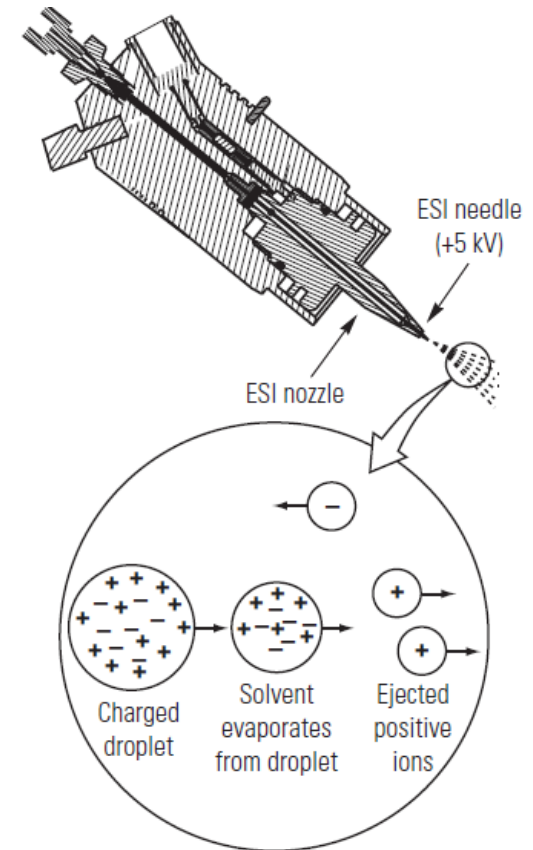
3.Product ion Formation



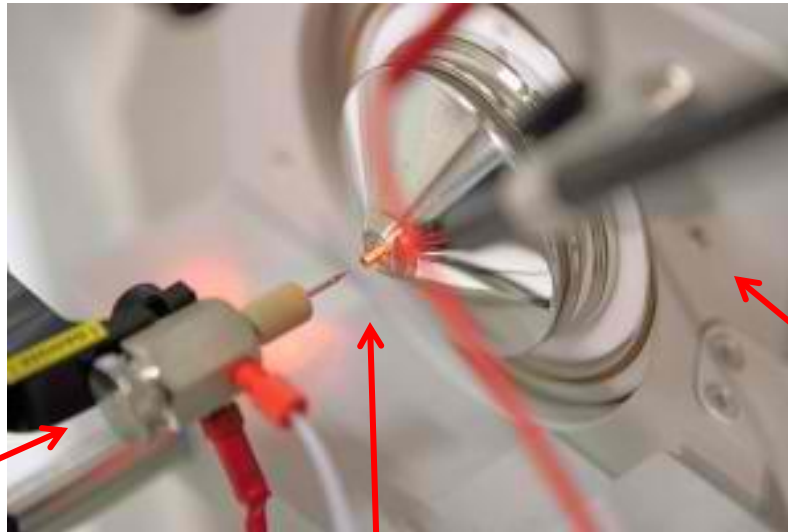
Ηλεκροψεκασμός (ElectoSpray Ionization – ESI)

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.



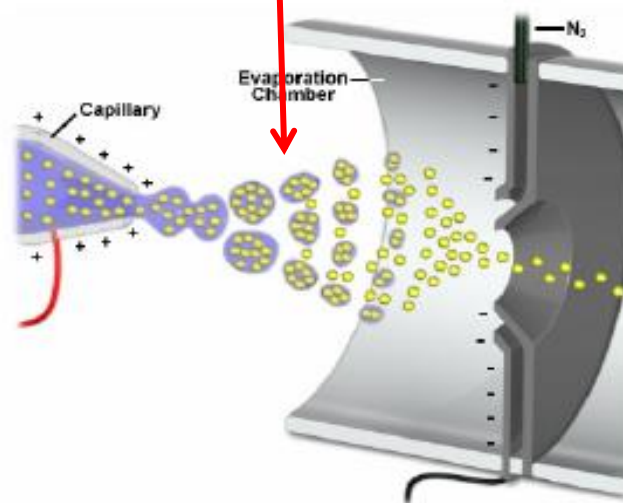
Ηλεκροψεκασμός (ElectoSpray Ionization – ESI)



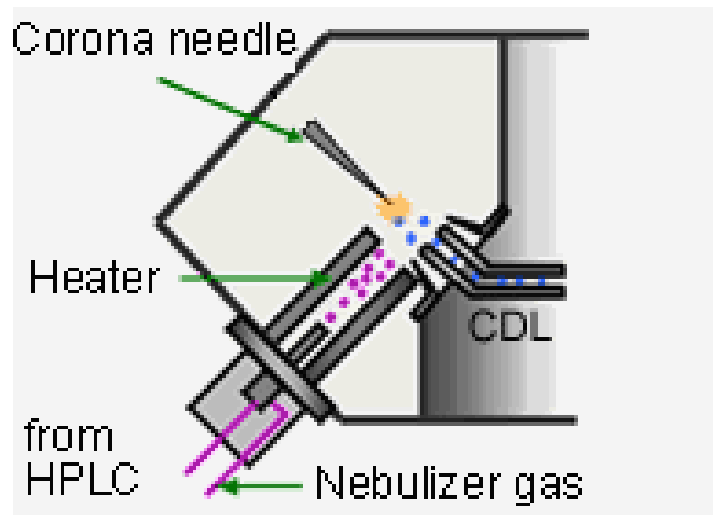
Τριχοειδές -
Είσοδος δείγματος

Παρογωγή Ιόντων

Αναλυτής Μαζών



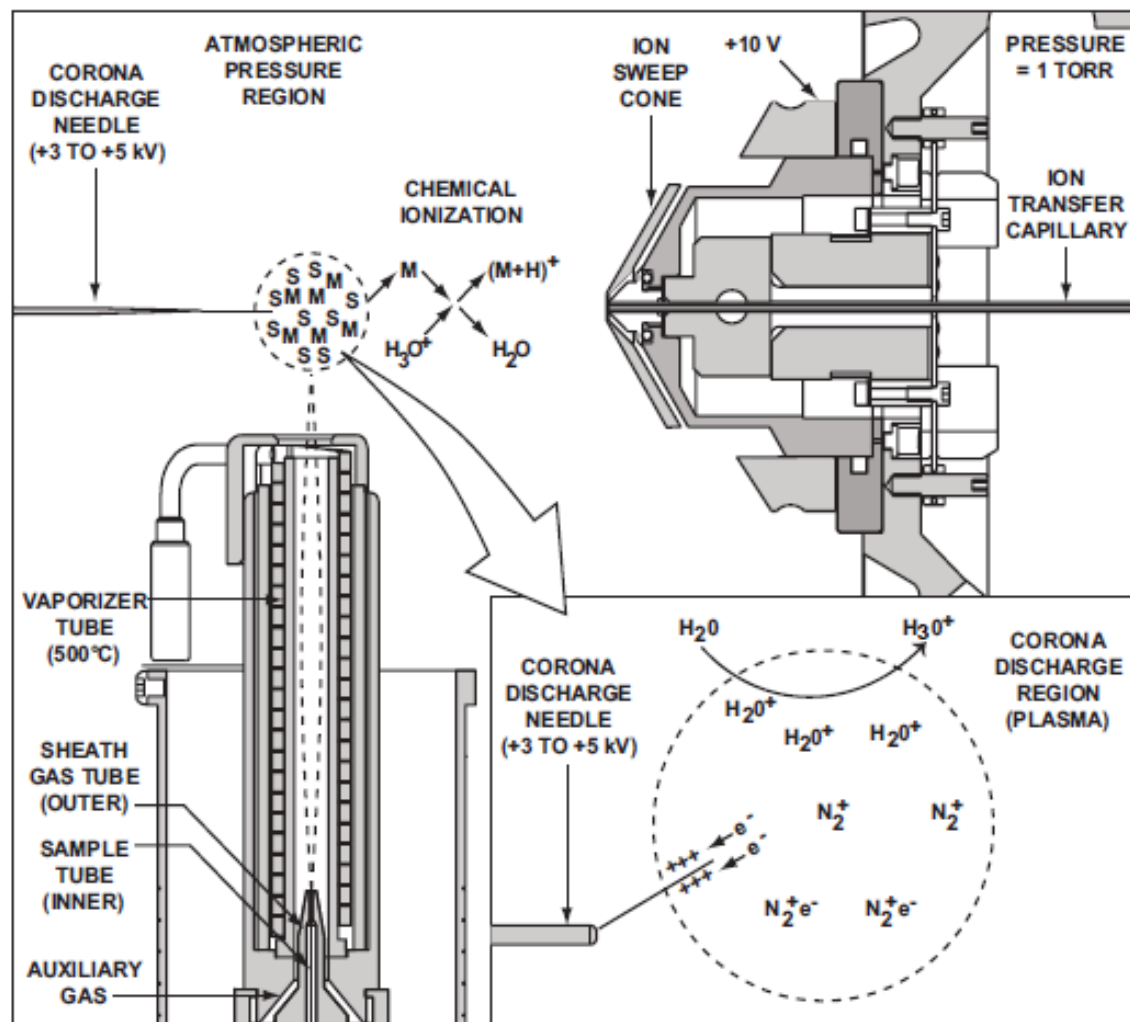
Χημικός Ιοντισμός υπό Ατμοσφαιρική Πίεση – APCI)



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.

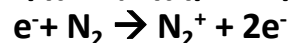
Χημικός Ιοντισμός υπό Ατμοσφαιρική Πίεση – APCI)



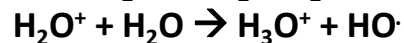
Χημικός Ιοντισμός υπό Ατμοσφαιρική Πίεση – APCI)

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

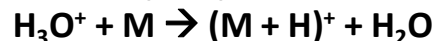
Αρχικός σχηματισμός ιόντων:



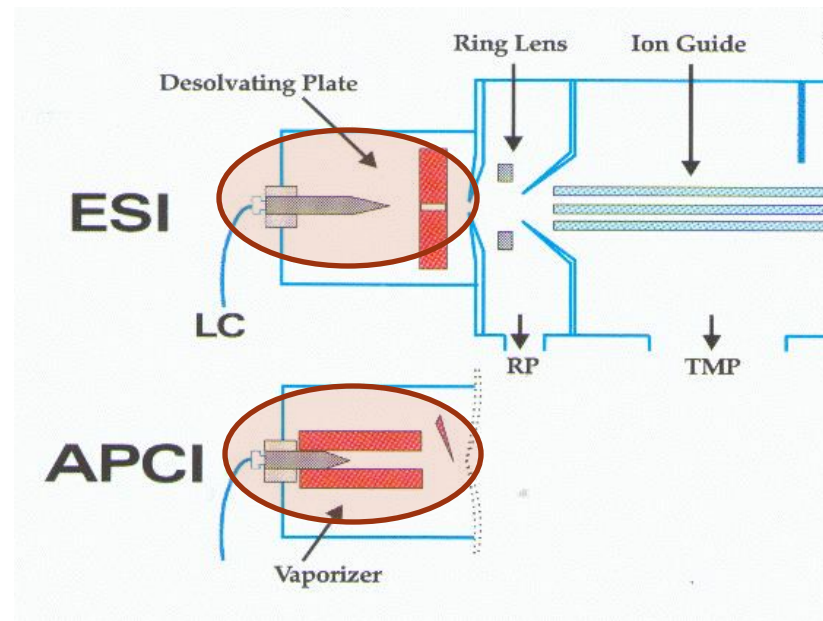
Δευτερεύον σχηματισμός ιόντων:



Μεταφορά πρωτονίου:

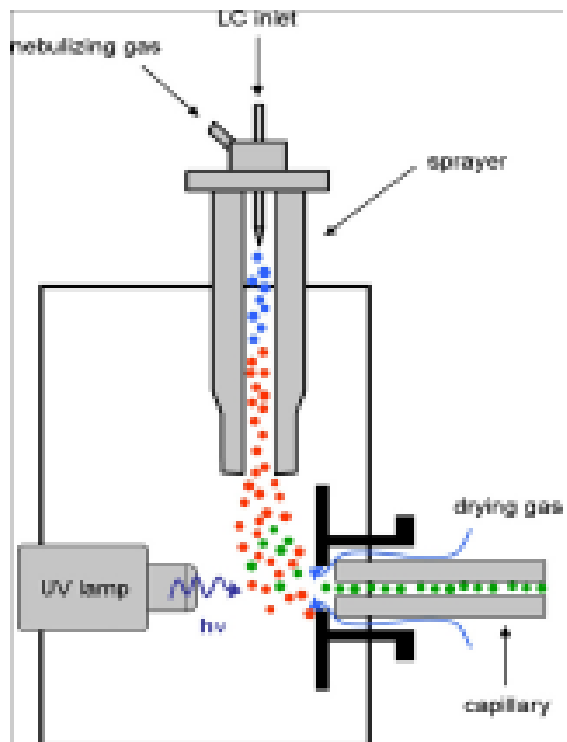


Στην περίπτωση του αρνητικού ιονισμού ο σχηματισμός του $(M - H)^-$ πραγματοποιείται συνήθως μέσω απόσπασης ενός πρωτονίου από την ομάδα του OH·



Φωτοϊοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση - APPI)

Πιο πρόσφατα, ένας τρίτος τύπος πηγής ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης είναι διαθέσιμος, ο φωτοϊοντισμός 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).



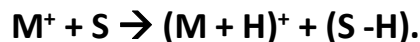
1. Το διάλυμα του προς ανάλυση δείγματος εκνεφώνεται από το ακροφύσιο της πηγής δημιουργώντας σταγονίδια.

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 :

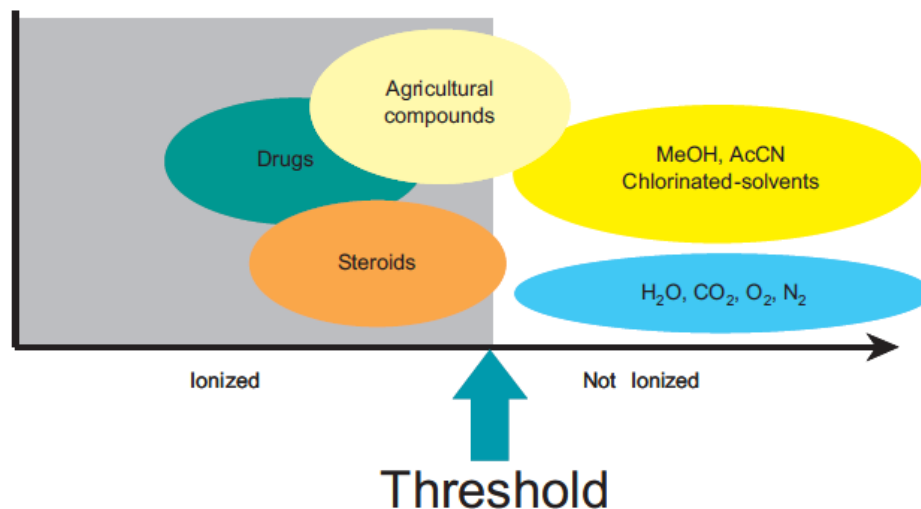
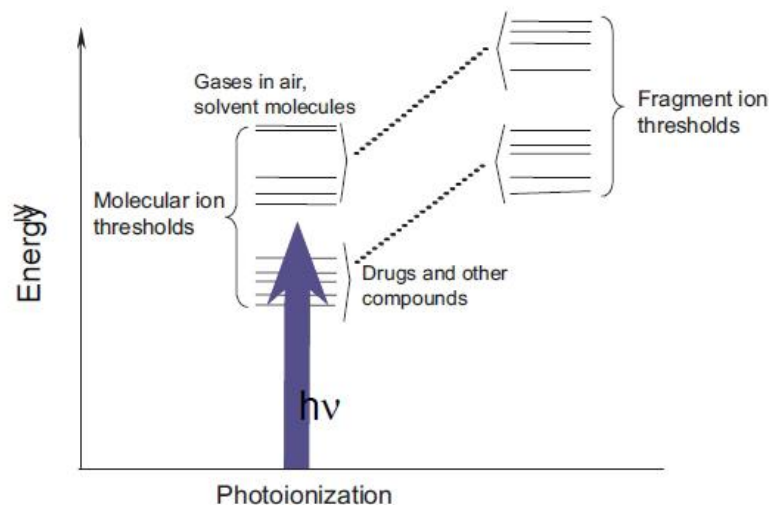


4. Στη περίπτωση παρουσίας πρωτικού διαλύτη το αναλυόμενο ιόν ανταλλάσει ένα υδρογόνο με το διαλύτη αυτό και σχηματίζεται το ψευδομοριακό ιόν :



5. Τα ιόντα του δείγματος εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.

Φωτοϊοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση - APPI)



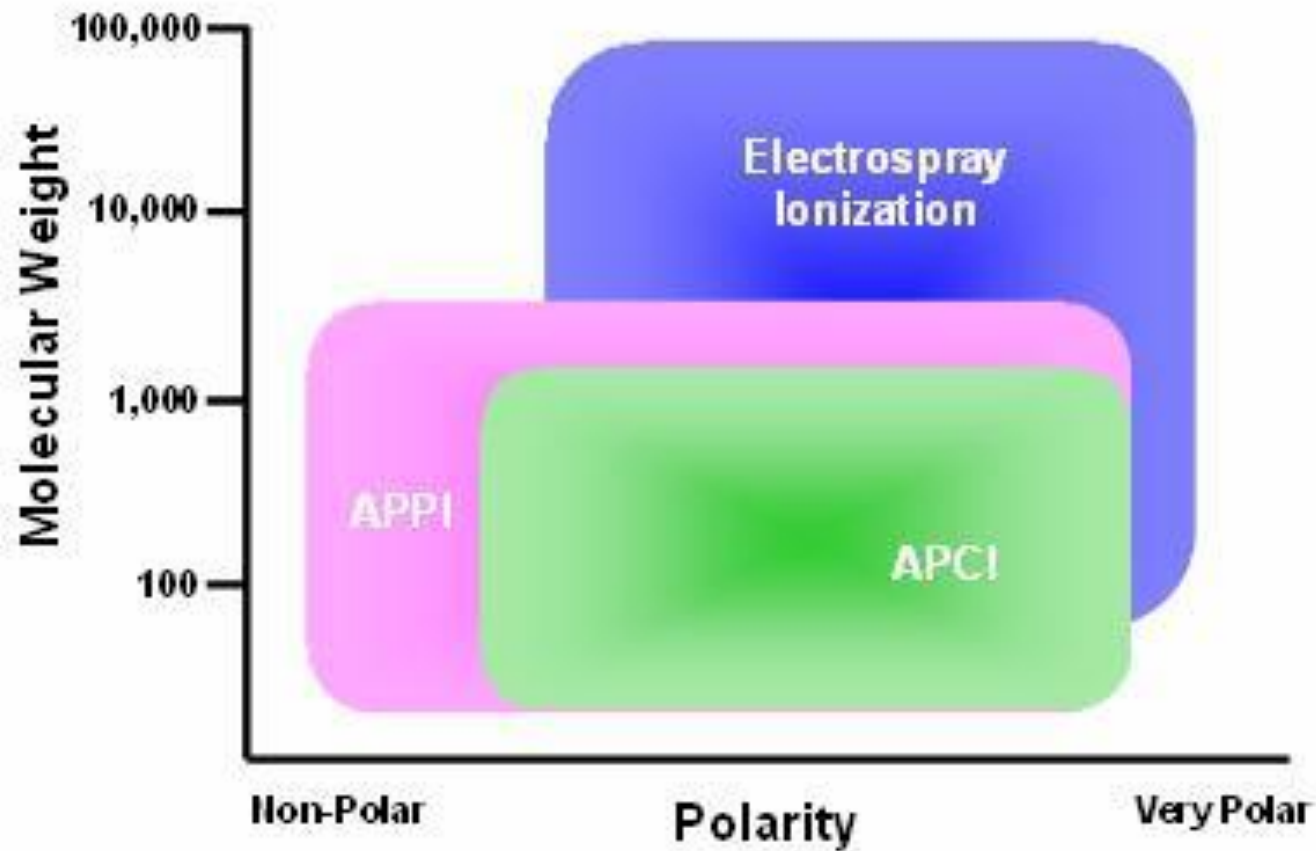
Για τον ιοντισμό των μορίων απαραίτητη προϋπόθεση είναι το δυναμικό ιονισμού τους να είναι χαμηλότερο από την ενέργεια των φωτονίων που εκπέμπονται από την πηγή.

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 ιοντίζονται αφού το δυναμικό ιονισμού τους είναι μεγαλύτερο από την ενέργεια των φωτονίων που εκπέμπονται από την φωτεινή πηγή.

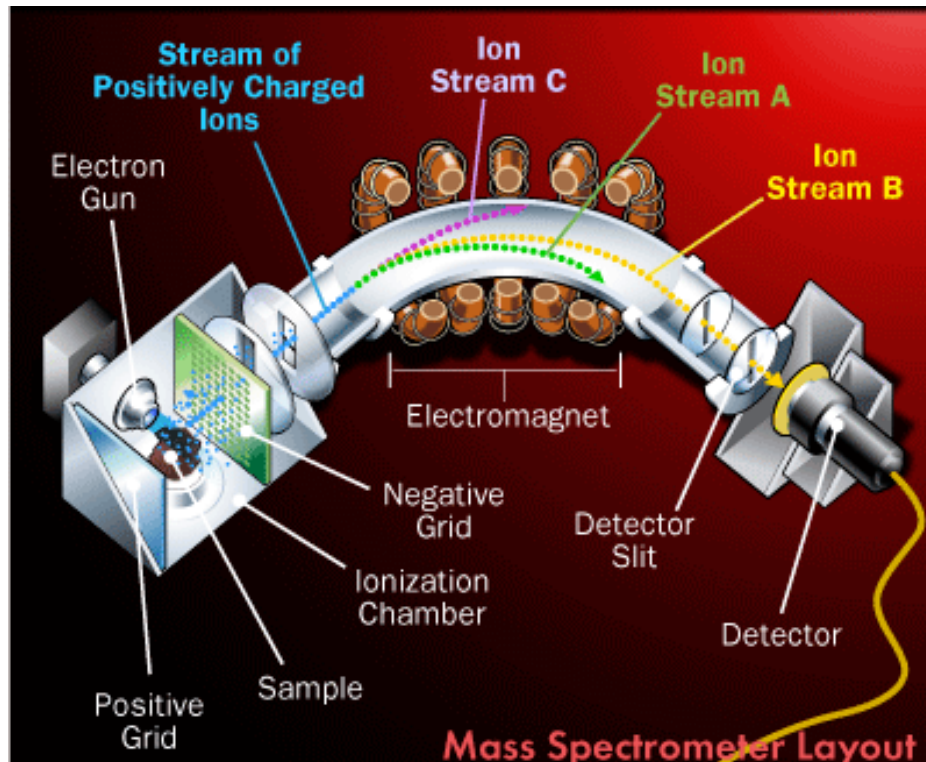
Σύγκριση μεθόδων ιοντισμού



	Πλεονεκτήματα	Πηγές ιονισμού	Μειονεκτήματα
Μέθοδοι αέριας φάσης	- Μεγάλη ευαισθησία (picomole) - Δυνατότητα δημιουργίας βάσης δεδομένων για τον προσδιορισμό αγνώστων δειγμάτων - Συμβατό με αέρια χρωματογραφία (Adaptable to GC)	Electron Impact (EI)	- Περιορισμένο εύρος ανίχνευσης μαζών - Πιθανότητα καταστροφής δείγματος λόγω υψηλής θερμοκρασίας πριν την εξατμίση - Υψηλή θραυσματοποίηση, ανικανότητα προσδιορισμού μοριακού ιόντος
	- Μεγάλη ευαισθησία (picomole) - Τεχνική ήπιου ιονισμού	Chemical Ionization (CI)	- Δεν υπάρχει δυνατότητα δημιουργίας βάσης δεδομένων για τον προσδιορισμό αγνώστων δειγμάτων - Δείγματα σχετικά πτητικά και σταθερά σε υψηλές θερμοκρασίες
Μέθοδοι εξόχνωσης	- Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 7000 Da - Τεχνική ήπιου ιονισμού, μικρή θραυσματοποίηση, προσδιορισμός μοριακού ιόντος	Fast Atom Bombardment (FAB)	- Μικρή ευαισθησία (nanomole) - Απαραίτητη η διάλυση του δείγματος σε μήτρα (matrix) - Υψηλός θόρυβος λόγω κορυφών μήτρας
	- Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 300000 Da - Μεγάλη ευαισθησία (femtomole) - Τεχνική ήπιου ιονισμού - Ανεκτικότητα σε ύπαρξη αλάτων, συνκέντρωσης τάξης millimole	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)	- Χαμηλή ανάλυση - Πιθανότητα χημικής αποικοδόμησης ουσίας λόγω ακτινοβολίας - Υψηλός θόρυβος μήτρας που μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα σε ανίχνευση μαζών μικρότερων από
Μέθοδοι ψεκασμού	- Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 2000 Da - Μεγάλη ευαισθησία (femtomole) - Τεχνική πολύ ήπιου ιονισμού - Συμβατό με υγρή χρωματογραφία	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)	- Πιθανότητα χημικής αποικοδόμησης ουσίας λόγω θερμότητας - Η ευαισθησία ποικίλει ανάλογα με την ουσία που μελετάται
	- Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 70000 Da - Μεγάλη ευαισθησία (femtomole) - Τεχνική πολύ ήπιου ιονισμού - Κατάλληλο για υγρή χρωματογραφία	Electrospray Ionization (ESI)	- Μη ανεκτικότητα σε ύπαρξη αλάτων - Η καθαρότητα των ουσιών που εισέρχονται στην πηγή είναι σημαντική

Αναλυτές μαζών

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 μαζών

- **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 Furier (Furier Transform Ion Cyclotron, FT ICR)
- **Αναλυτές χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)**

Αναλυτές μαζών

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

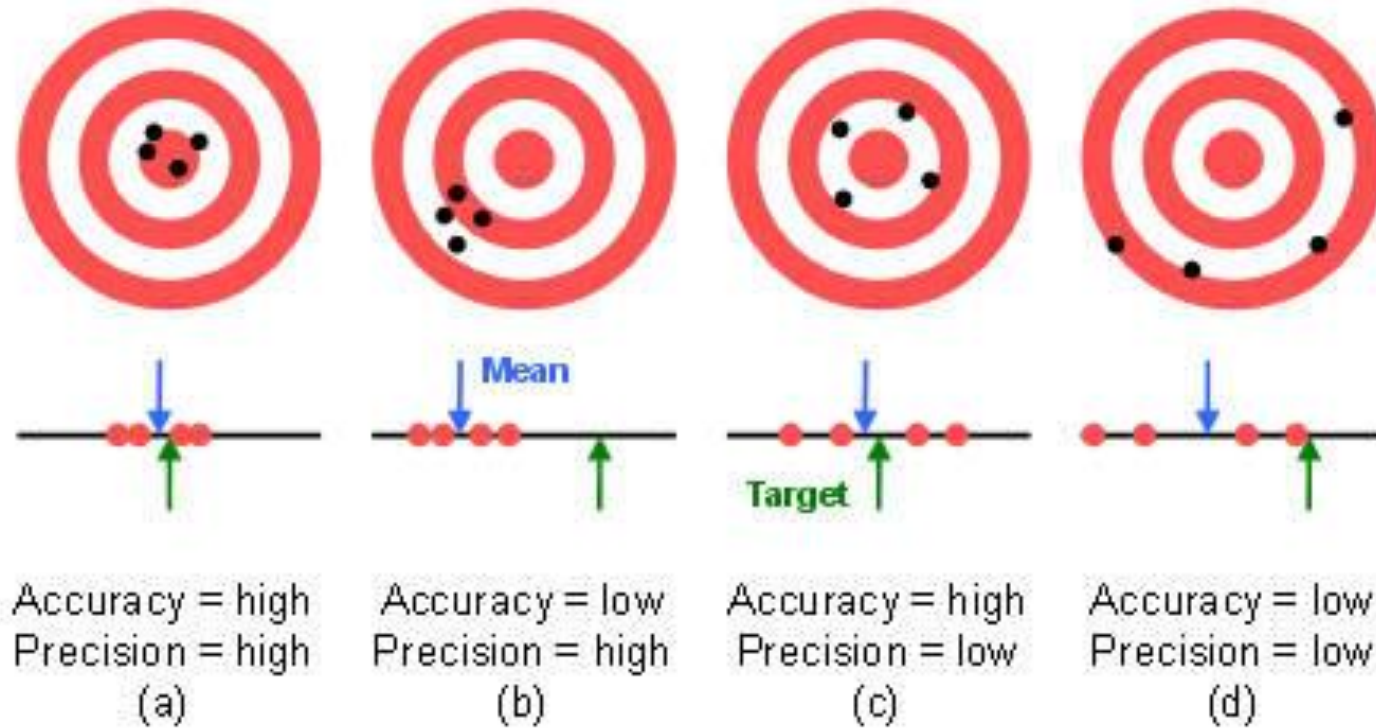
$$R = M/\Delta M_x$$

M: ο μέσος λόγος m/z των δύο κορυφών

ΔM_x : 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

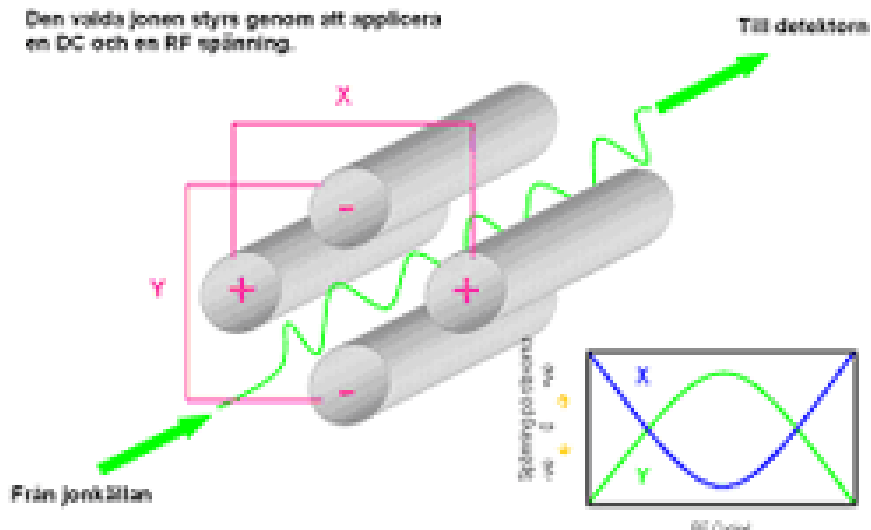


- Ορθότητα μέτρησης (Accuracy)
- Ακρίβεια μέτρησης-επαναληψιμότητα (Precision-reproducibility)

Τετραπολικός αναλυτής ή Φίλτρο μαζών (Quadrupole)

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° ανά ζεύγος.

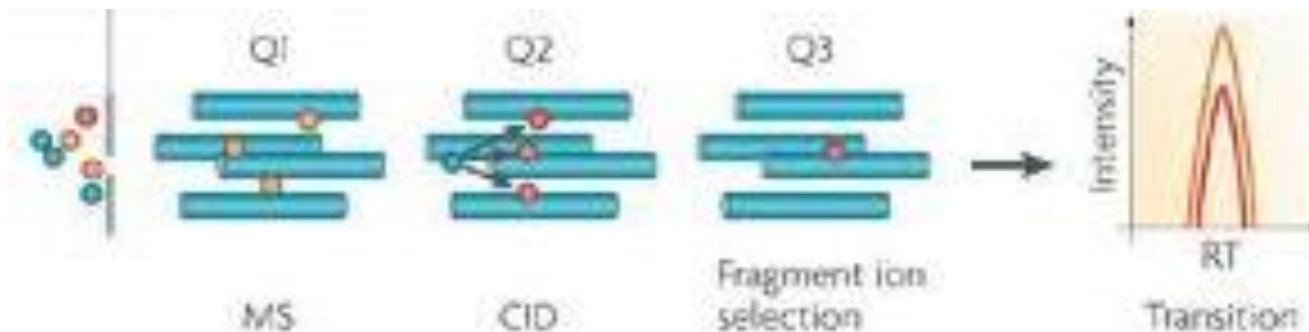
Η συνολική εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού επιδρά με διαφορετικό τρόπο στην τροχιά των ιόντων που διέρχονται από τον χώρο μεταξύ των ηλεκτροδίων ανάλογα με το λόγο m/z . Τα ιόντα εκείνα που αντιστοιχούν στο δυναμικό που εφαρμόζεται θα διαπεράσουν και θα εξέλθουν από το τετράπολο προς τον ανιχνευτή. Τα 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.



Τριπλός Τετραπολικός αναλυτής (Triple Quadrupole)

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.

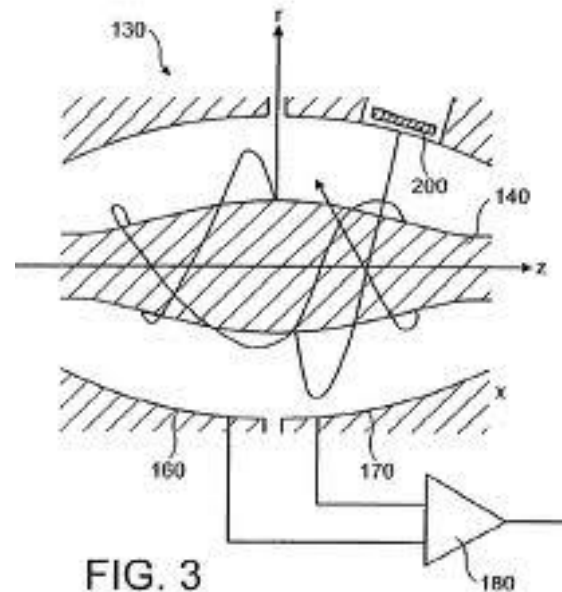
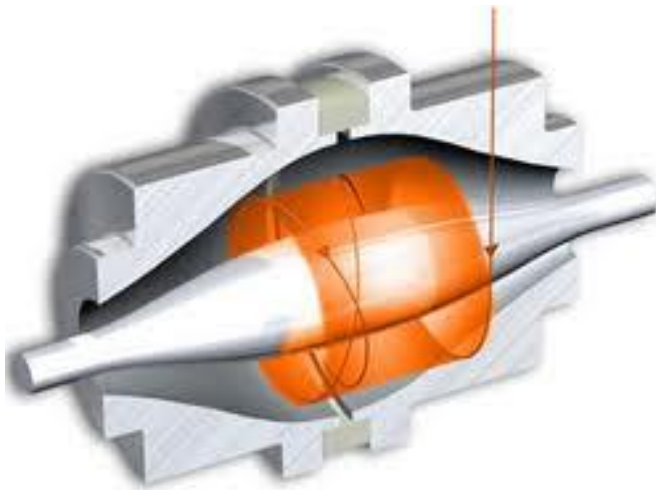
Στο **Q1** γίνεται η αρχική επιλογή ιόντων (φίλτρο μαζών) τα οποία οδηγούνται στο **q2** όπου θα πραγματοποιηθεί η θραυσματοποίησή τους. Τα ιόντα που προκύπτουν θα εισέλθουν στο **Q3** όπου και θα ανιχνευτούν. Η θραυσματοποίηση στο **q2** επιτυγχάνεται μέσω σύγκρουσης των ιόντων με ουδέτερα μόρια κάποιου 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.



Αναλυτές τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbital Trap analyzers, Orbitrap)

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: 30000-100000), μεγάλη ακρίβεια μάζας (mass accuracy: 2-5 ppm) καθώς επίσης έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μεγάλου εύρους μαζών (mass range: 50-4000).

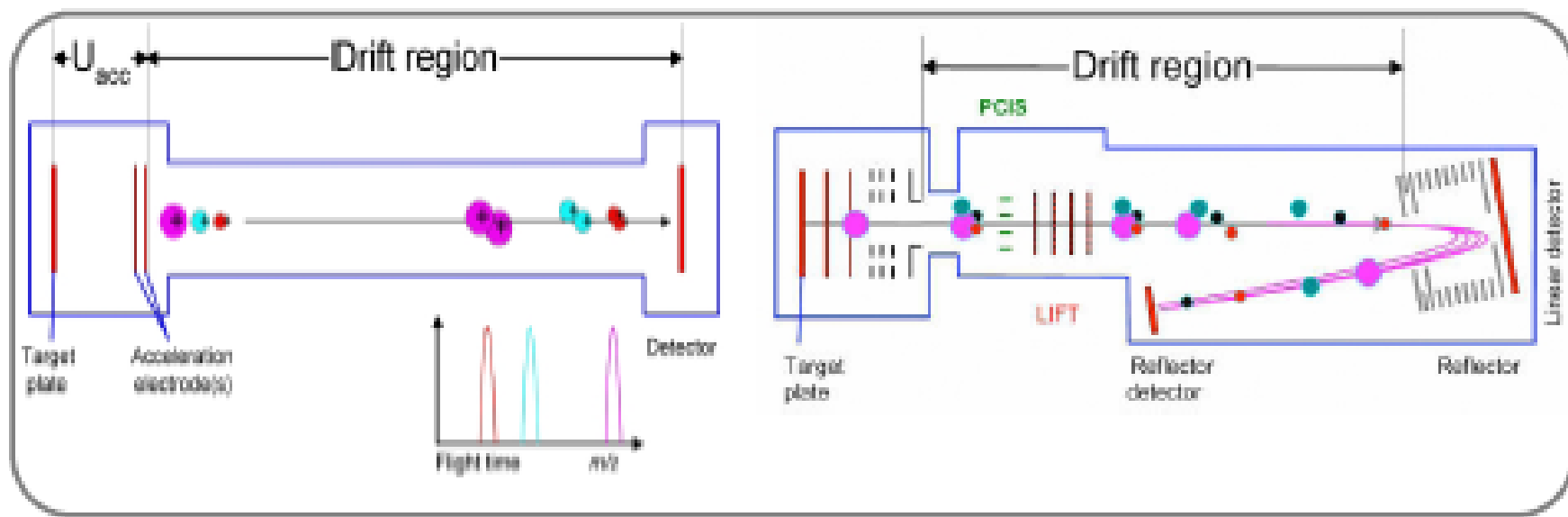


Αναλυτές χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)

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



Συνδεδεμένες τεχνικές (Hyphenated techniques)

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

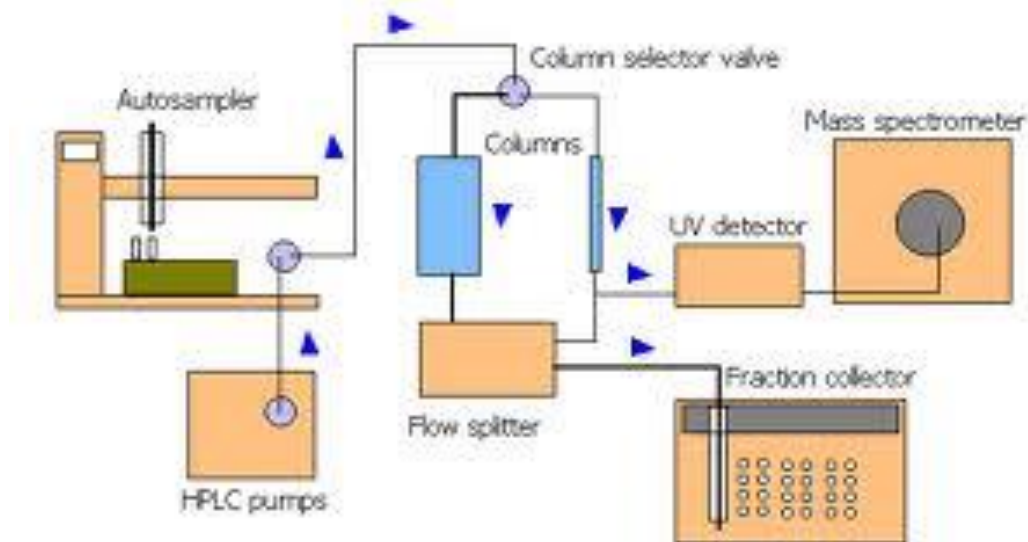
Spectroscopy – Produces selective information for identification using standards or library spectra

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 :

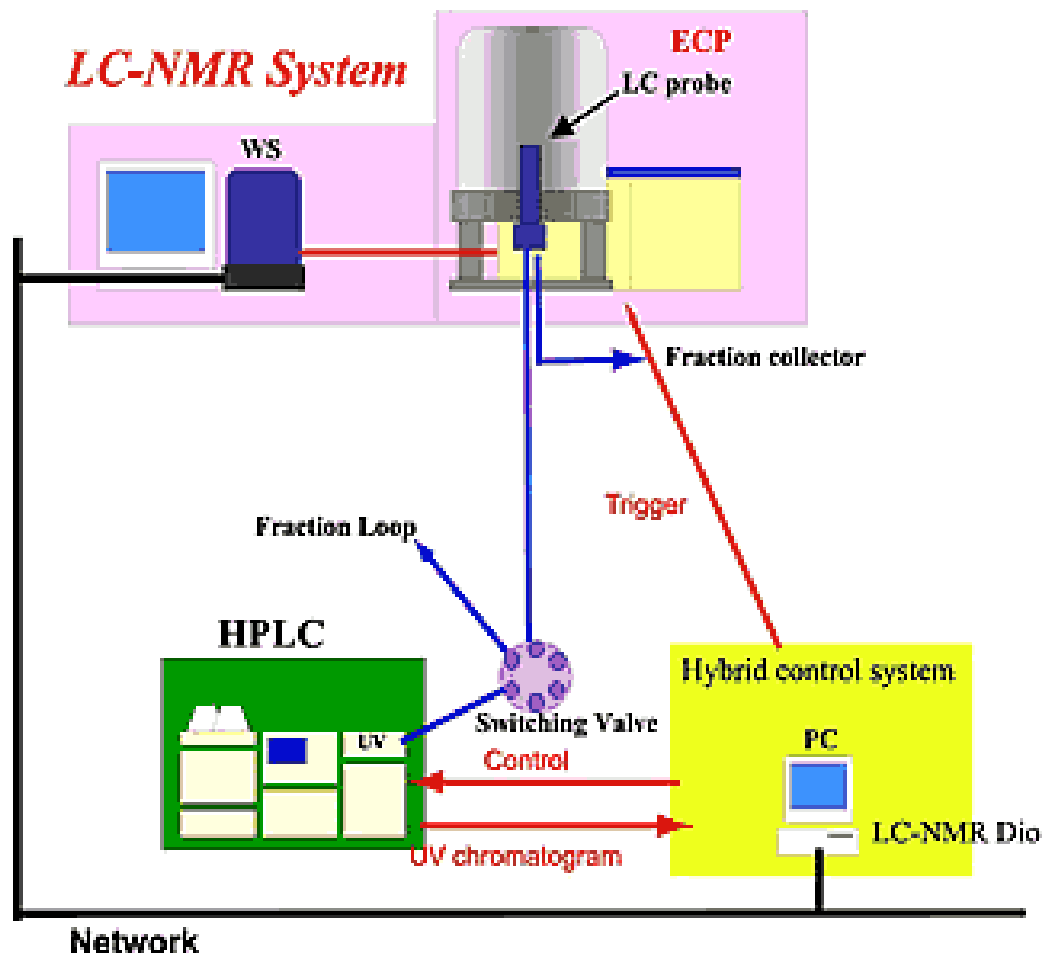
- Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με ανιχνευτή UV-Vis, σειράς φωτοδιόδων (LC-PDA)
- Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματόμετρο Μάζας (LC-MS) και
- Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Πυρηνικού και Μαγνητικού Συντονισμού (LC-NMR)

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

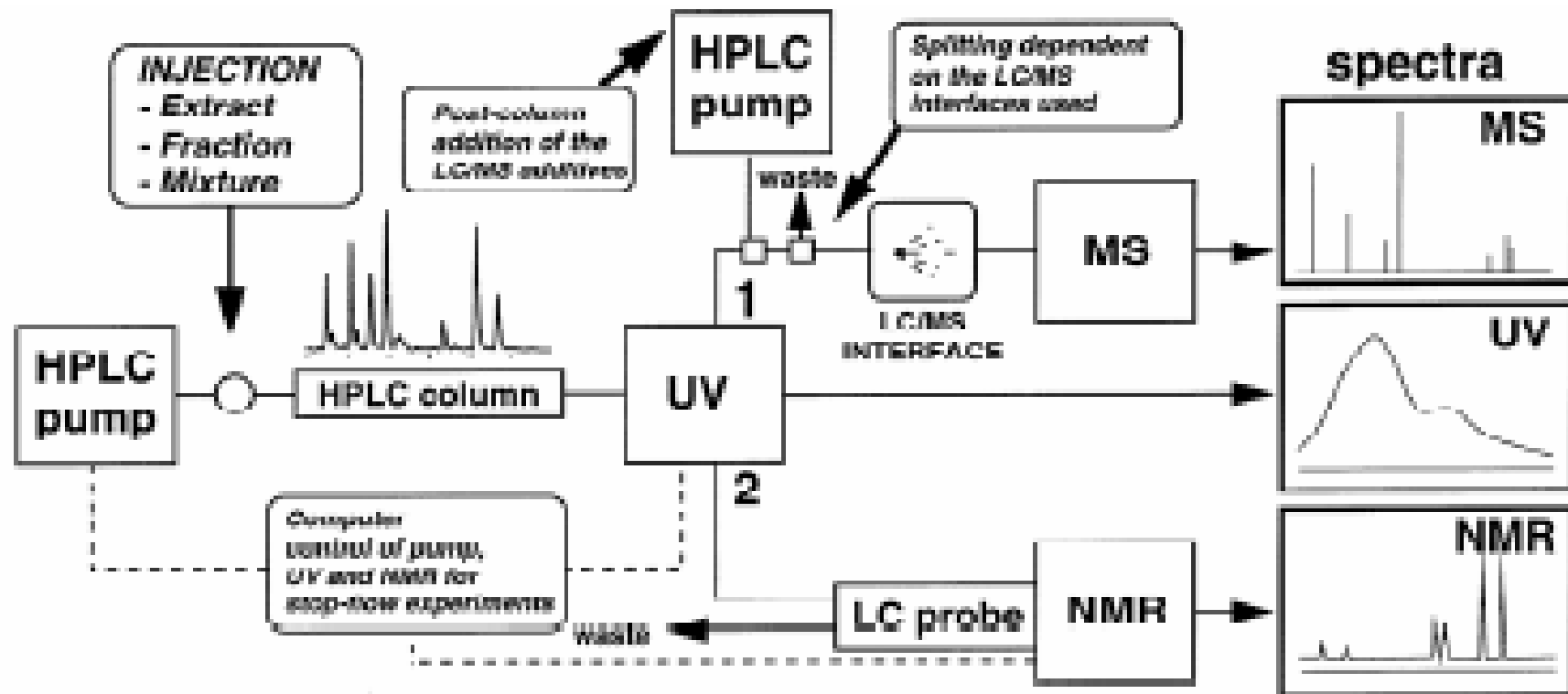
Liquid Chromatography – Mass spectrometry (LC-MS)



Liquid Chromatography – Nuclear Magnetic Resonance (LC-NMR)



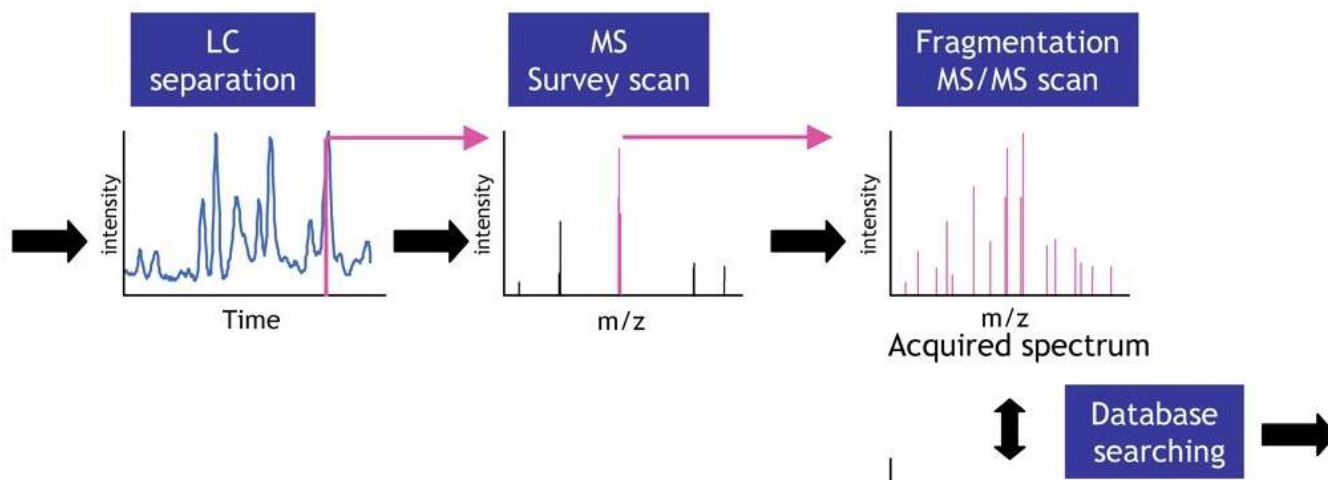
Hyphenated techniques



Dereplication

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)



MEANWHILE, JUST A FEW DOORS AWAY...

I WASN'T ALWAYS A HOMELESS VAGRANT. I'M A DOCTOR, A RESEARCH SCIENTIST.



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

MY SPECIALTY, MAY HEAVEN HELP ME-- WAS chromatography!'

