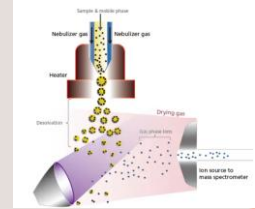
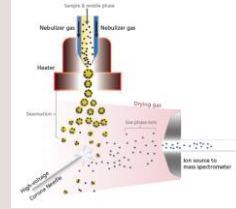
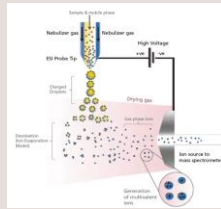
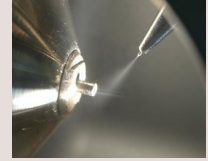
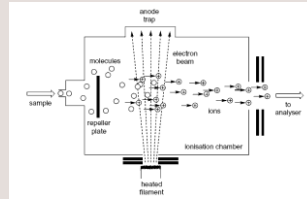


Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

Συζευγμένες Τεχνικές -
Hyphenated Techniques

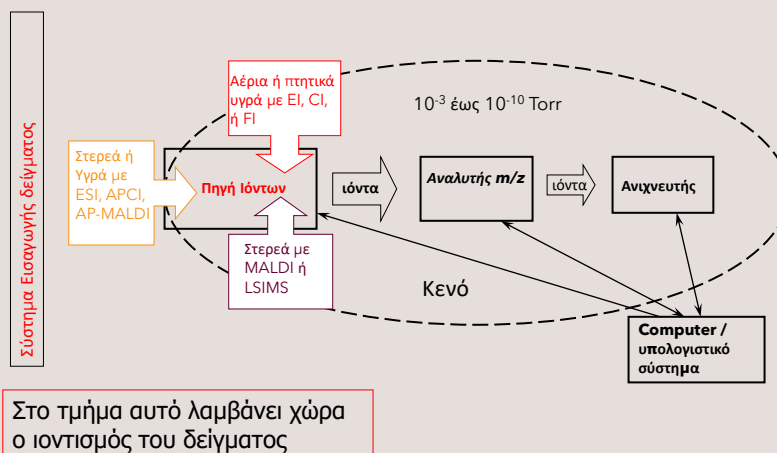
Δρ. Μάριος Κωστάκης -

Καθ. Δρ. Νικόλαος Θωμαΐδης



1

Πηγές Ιόντων



2

Πηγές Ιόντων

Πηγές Αέριας Φάσης:

Το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται

Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Impact, **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**)

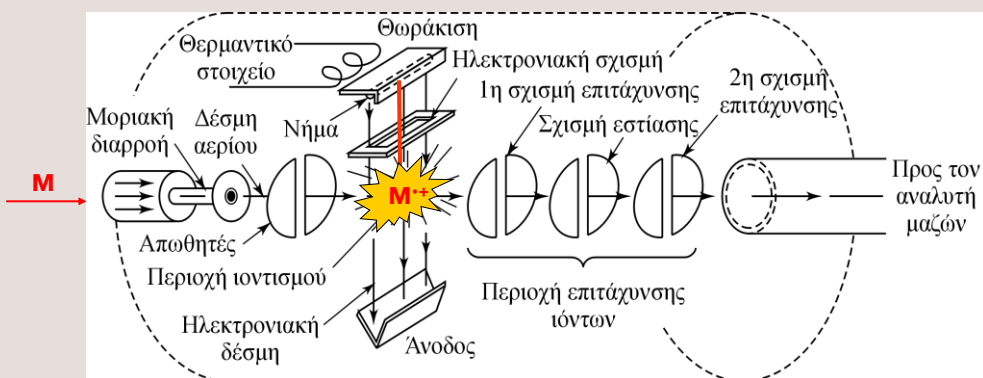
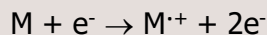
Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, **MALDI**)

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

3

Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - EI -

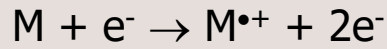
Τα e^- παράγονται από ένα θερμαινόμενο νήμα (W ή Re) και επιταχύνονται με μια τάση 70 V (σταθερή ενέργεια επιτάχυνσης):



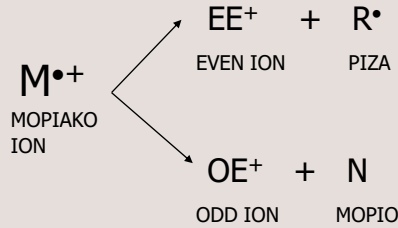
4

Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - EI -

Ιοντισμός :



Θραυσματοποίηση :



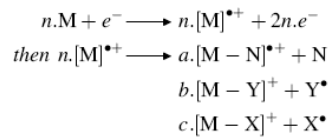
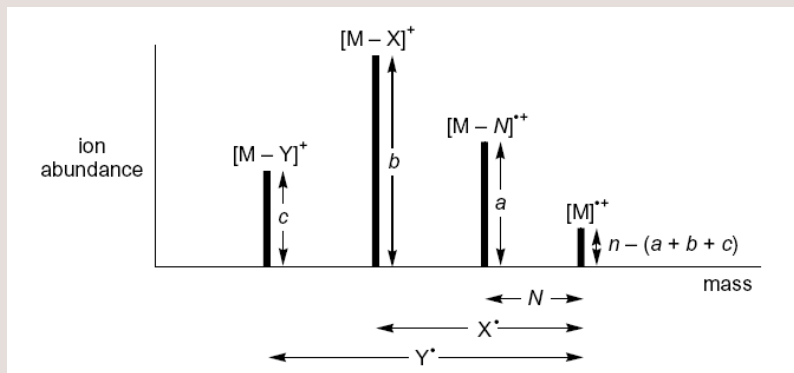
Θυγατρικά
ιόντα:

EE^+ : ιόν με άρτιο αριθμό e

OE^+ : ιόν με περιττό αριθμό e

5

Φάσματα EI - MS



Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds
W. HENDERSON AND J. S. MCINDOE
Wiley, 2005

6

Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - EI -

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).

7

Χημικός Ιοντισμός - CI -

Βομβαρδισμός **αέριου αντιδραστηρίου** (συντά 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.

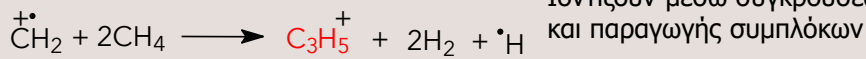
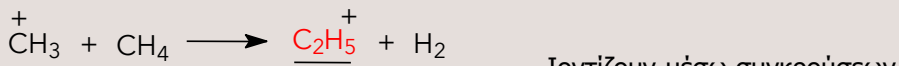
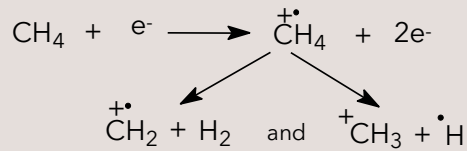
Προϋπόθεση: ο λόγος [αντιδραστηρίου]/[δείγματος] = 10^3 - 10^4

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

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

8

Χημικός Ιοντισμός - CI -



Interpretation of Mass Spectra
O. D. SPARKMAN AND J. T. WATSON
Copyright 1978, ©2004 USA

9

Τύποι Χημικού Ιοντισμού

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΦΟΡΤΙΟΥ



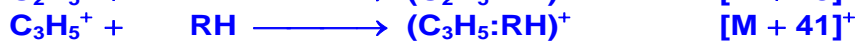
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΟΝΙΟΥ



ΑΠΟΣΠΑΣΗ ΥΔΡΙΔΙΟΥ

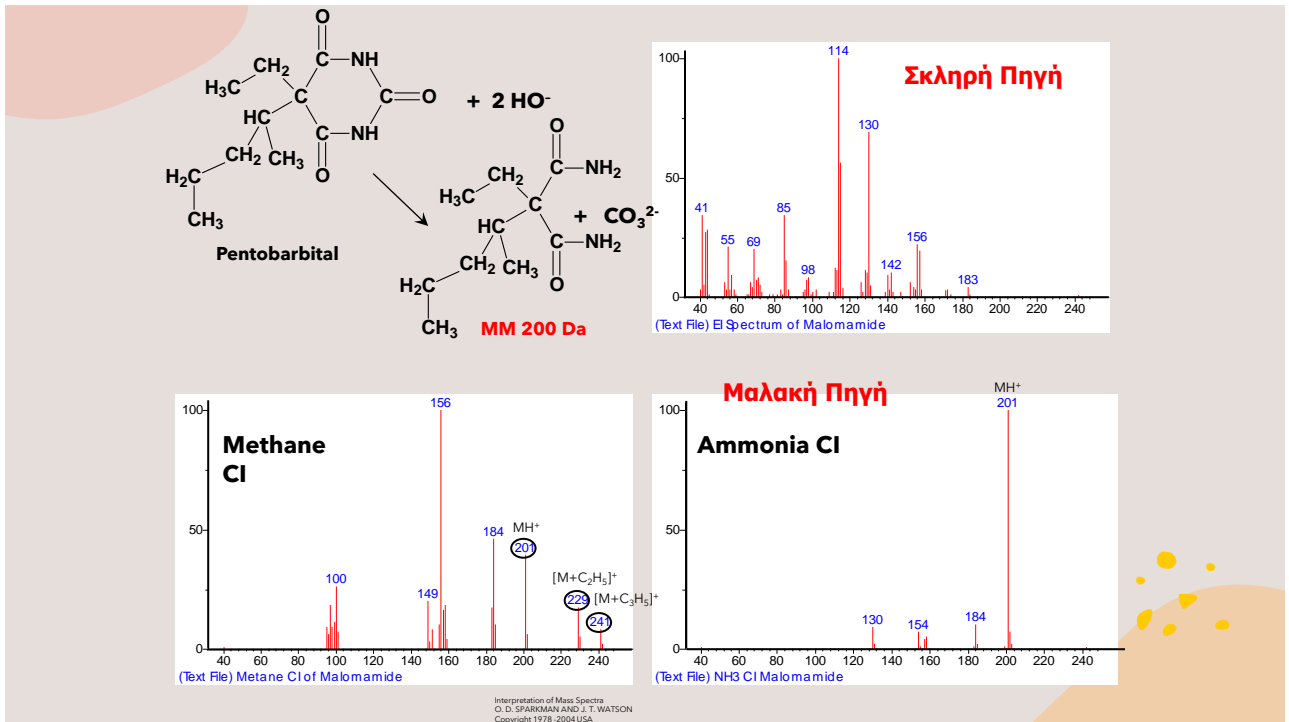


ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗ



Interpretation of Mass Spectra
O. D. SPARKMAN AND J. T. WATSON
Copyright 1978, ©2004 USA

10



11

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:

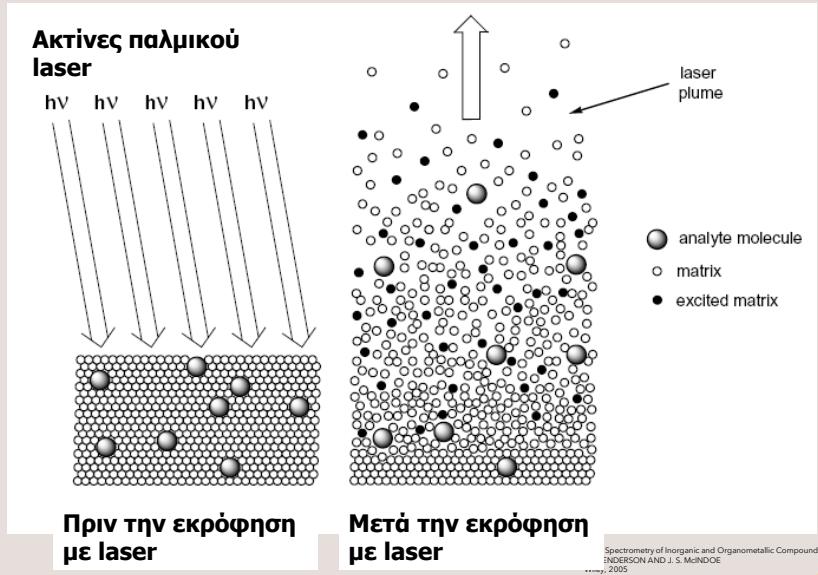
- Το δείγμα πρέπει να είναι θερμικά σταθερό και επαρκώς πτητικό
- Η ελλιπής θραυσματοποίηση δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση ένωσης μέσω έρευνας σε βιβλιοθήκες MS
- Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τον τύπο του αερίου, την πίεση ή τον χρόνο αντίδρασης και τη φύση του δείγματος

ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

12

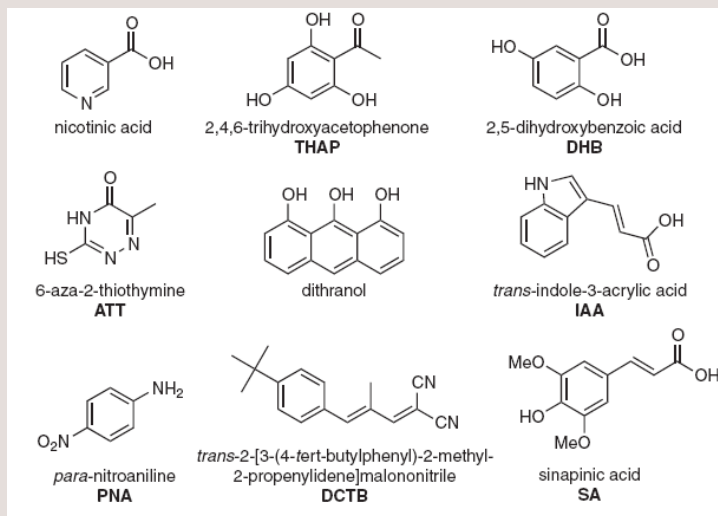
Ιοντισμός με εκρόφηση: (A) – MALDI



13

- MALDI -

Συχνότερα χρησιμοποιούμενες μήτρες για MALDI



14

- 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:

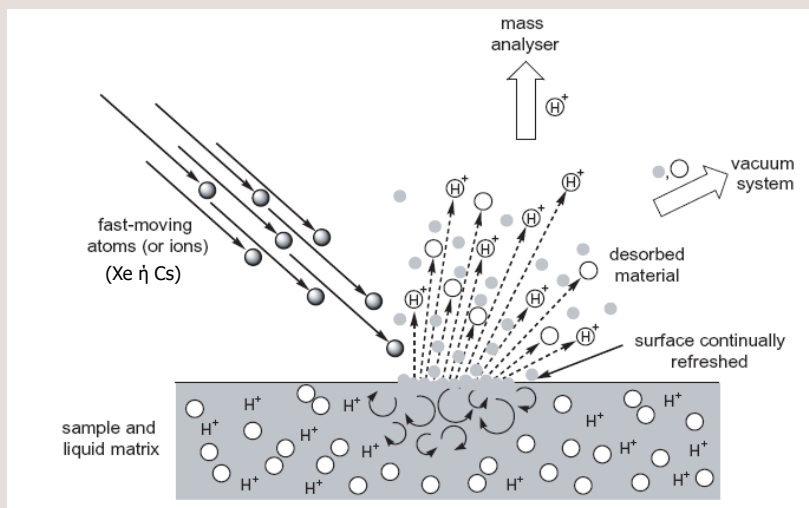
- Χαμηλή επαναληψιμότητα
- Ο αναλύτης δεν πρέπει να απορροφά την ακτινοβολία λέιζερ
- Απαιτεί παλμικό αναλυτή μαζών (TOF, IT)

ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

15

Ιοντισμός με εκρόφηση: (B) – FAB



Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds
W. HENDERSON AND J. S. McINDOE
Wiley, 2005

16

- 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).

17

Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση - API -

Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)

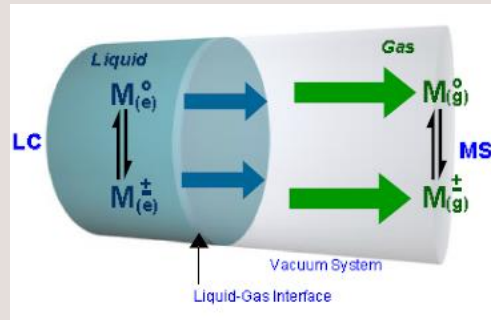
Το υγρό δείγμα ψεκάζεται μέσα από τριχοειδή σωλήνα στον οποίο εφαρμόζεται υψηλή τάση (3-4 kV) και σχηματίζεται αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων

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)

18

Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση - API -



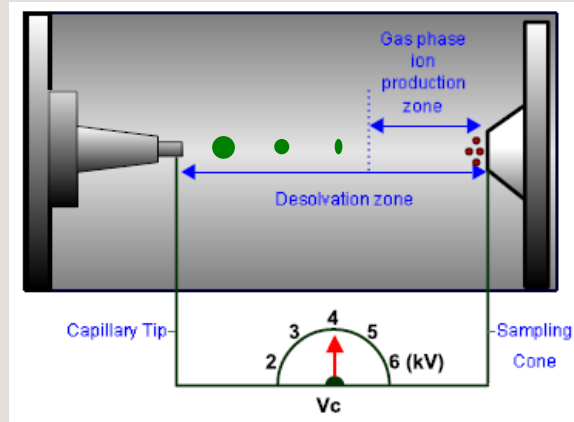
19

Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό - ESI -

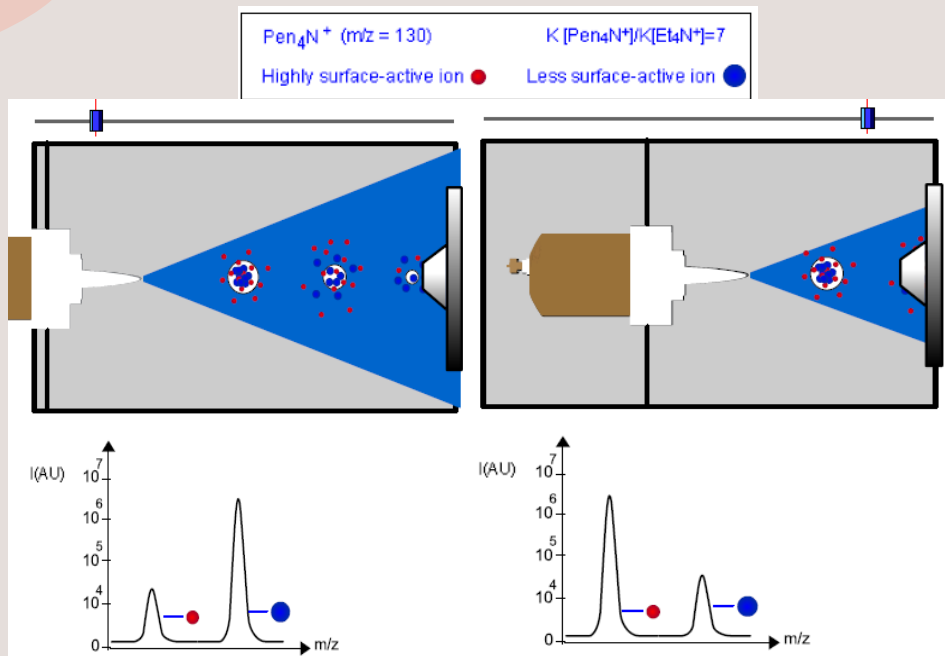


20

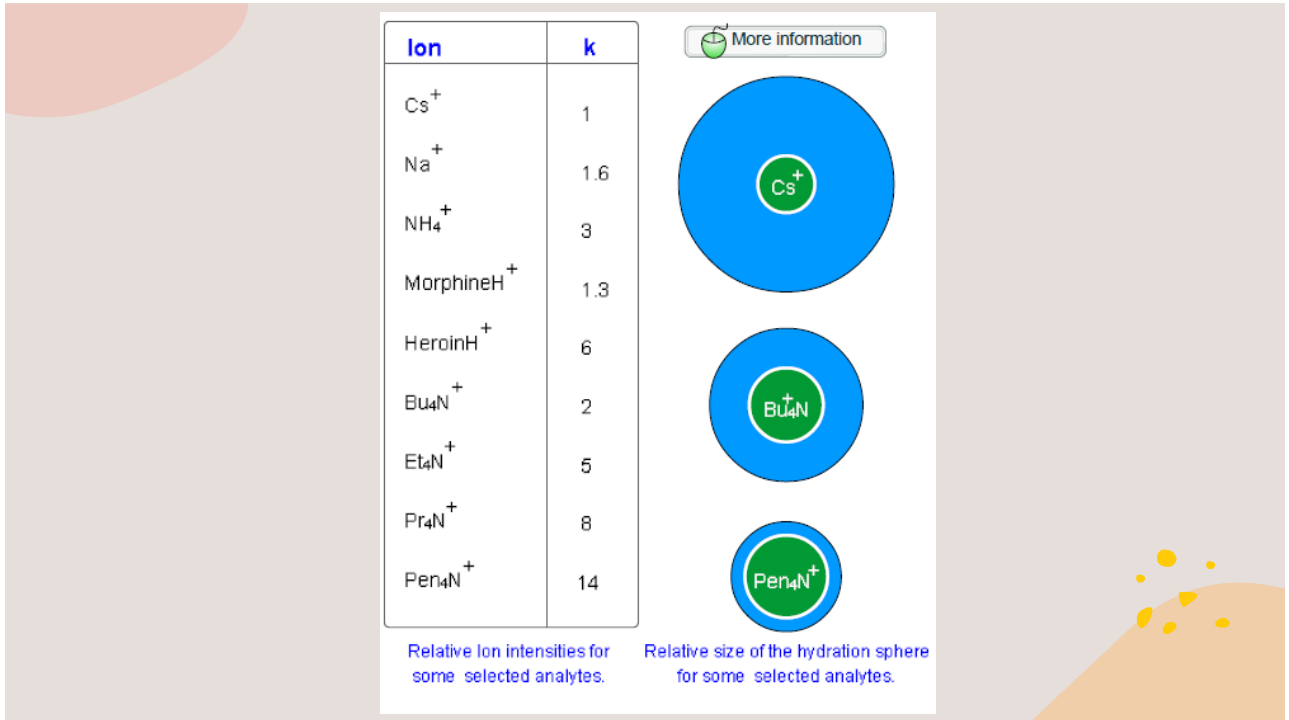
Ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο - ESI -



21

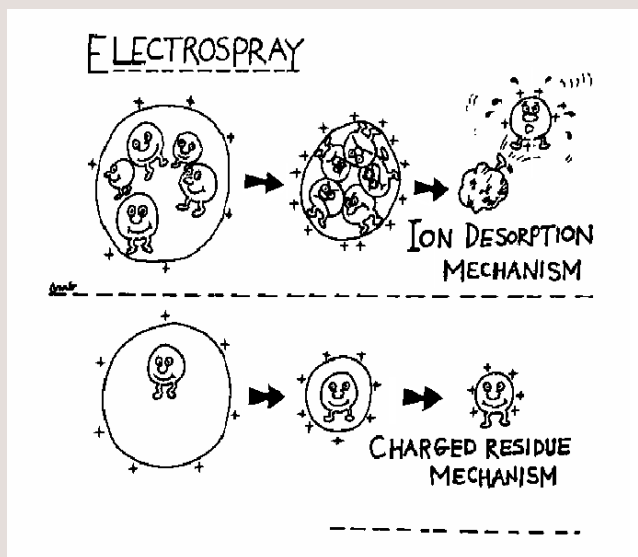


22



23

Ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο - ESI -



24

- ESI -

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Τεχνική προσδιορισμού ΜΒ 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:

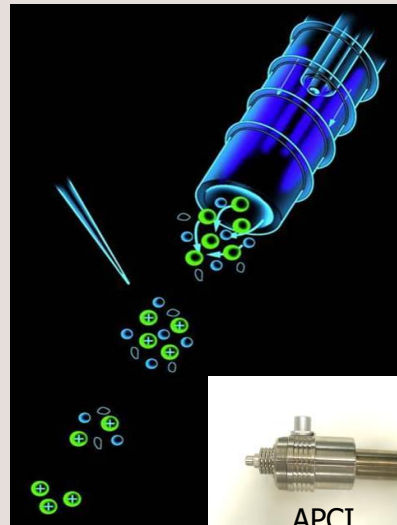
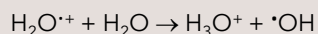
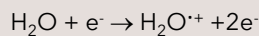
- Απαραίτητα χαμηλή ροή κινητής φάσης
- Τα ιόντα του αναλύτη δημιουργούνται στην υγρή φάση
- Απόσβεση σήματος σε διαλύματα με άλατα και ανταγωνιστική μήτρα
- Σχηματισμός ιόντων προσθήκης (adduct ions)

ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

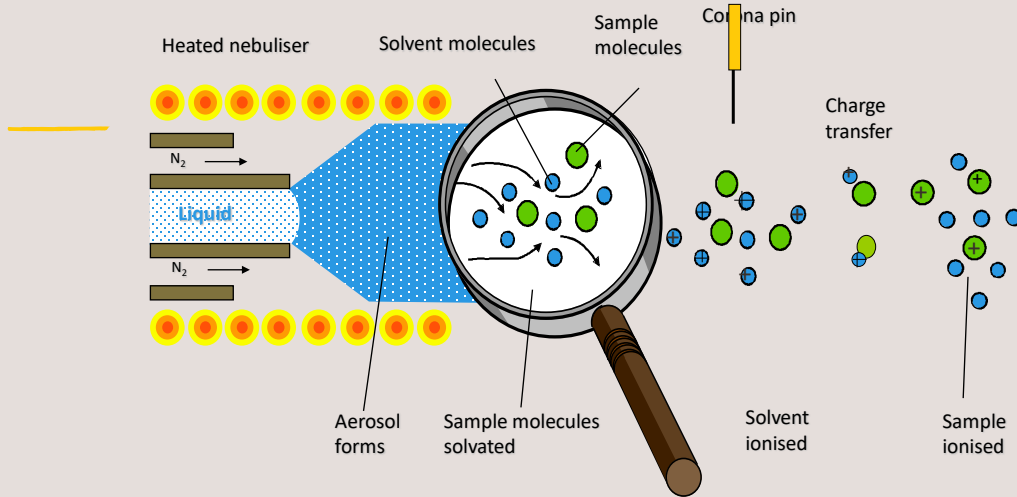
25

Χημικός Ιοντισμός σε Α.Π. - APCI -



26

Μηχανισμός παραγωγής ιόντων στον APCI



27

- 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

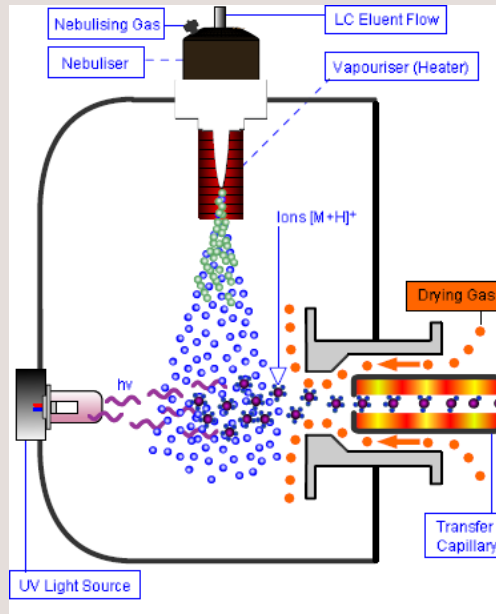
ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

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

28

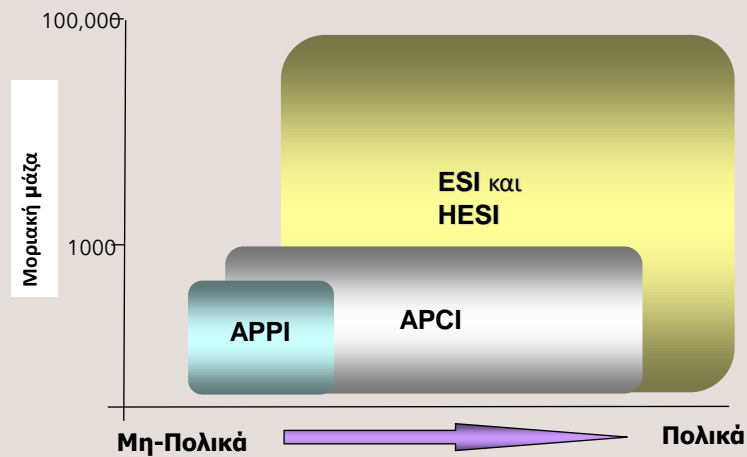
- APPI -

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



29

Σύγκριση ESI – APCI

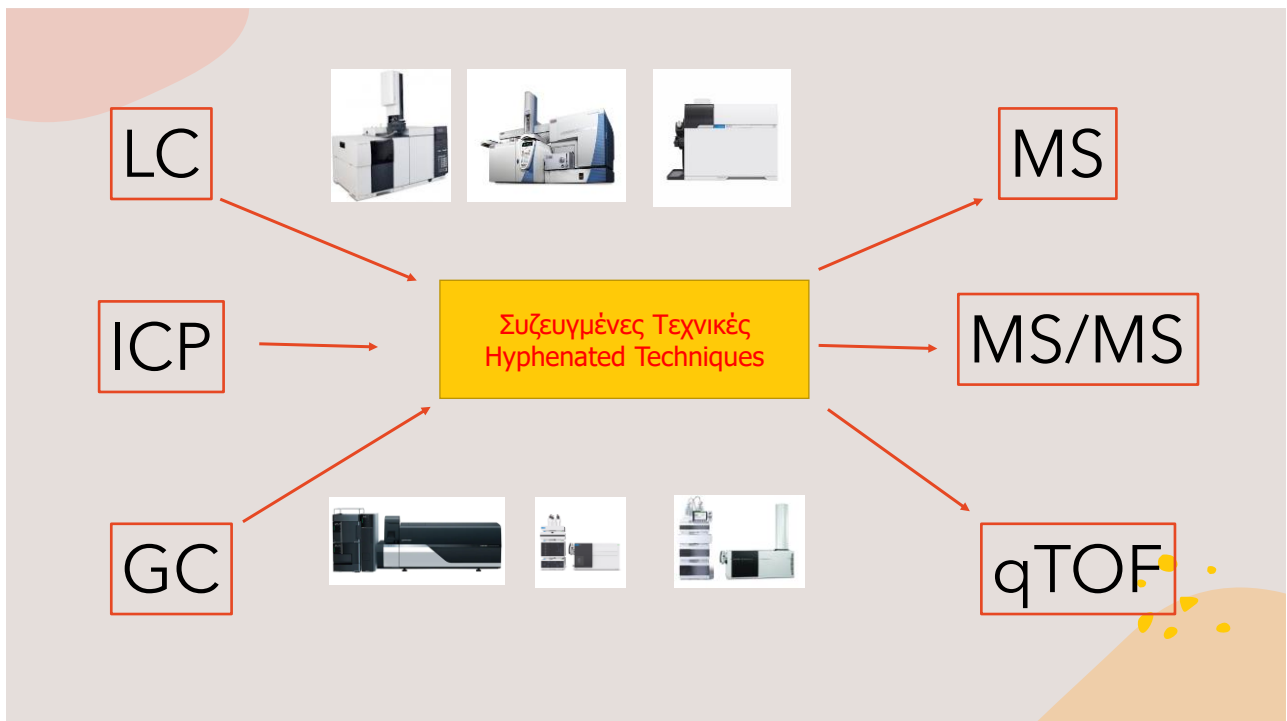


30

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
Ίοντα:	Μονοφορτισμένα	Μονοφορτισμένα και πολλαπλών φορτίων
Ροή κινητής φάσης	0,2-2 mL/min	0,001 – 1 mL/min (κυρίως <0,4 mL/min)

31



32

Σύζευξη GC με MS (GC-MS)

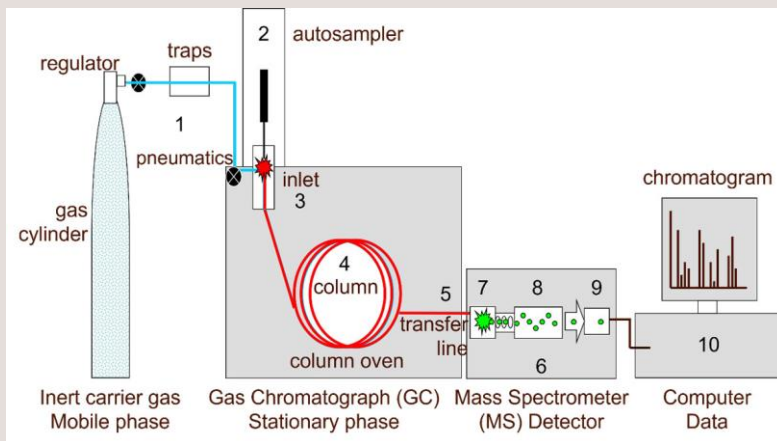
Συζευγμένη τεχνική

Χρησιμοποιείται στον:

1. Προσδιορισμό **πηθτικών 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.

33

Σύζευξη GC με MS (GC-MS)



34

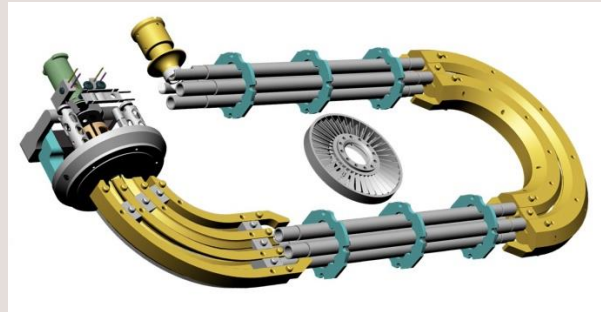
Από το GC-MS στο GC-MS/MS

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

Χαμηλότερα όρια ανίχνευσης

Ταυτόχρονος προσδιορισμός αναλυτών
που δεν διαχωρίζονται πλήρως,
χρωματογραφικά.

Ακριβότερος Εξοπλισμός



35

Προσδιορισμός 155 Φυτοφαρμάκων σε γάλα

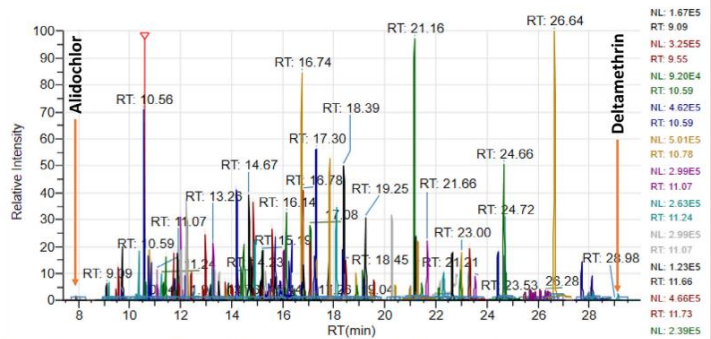


Figure 1. Overlay of extracted ion chromatograms for 155 compounds in a single window

Compound	RT min	Quantifier ion			Confirmatory ion			R ²	LOQ (mg/kg)	0.005 (mg/kg)		0.01 (mg/kg)		0.025 (mg/kg)	
		Q1	Q3	CE (V)	Q1	Q3	CE (V)			% Rec	% RSD	% Rec	% RSD	% Rec	% RSD
2,3,5,6-Tetrachloroaniline	10.6	231	158	20	231	160	22	0.9995	0.005	86.0	6.2	90.5	4.7	86.6	2.3
3,4-Dichloroaniline	9.1	160.9	126	10	160.9	99	20	0.9995	0.005	103.8	7.0	104.4	1.8	103.0	1.4
4,4'-Methoxychlor olefin	19.26	238.1	223.1	10	308	238.2	12	0.9993	0.005	96.7	2.0	101.2	1.7	98.6	1.7
Alachlor	13.27	188.1	130	32	188.1	160.1	8	0.9988	0.005	99.0	7.8	104.9	2.6	103.5	2.1
Aldrin	14.41	330	298.9	10	262.7	192.9	28	0.9995	0.005	95.0	8.5	102.9	4.7	102.1	2.3
Allidochlor	7.9	132	56.1	8	132	49	24	0.9990	0.005	97.4	6.0	101.0	4.2	102.0	2.2
Antraquinone	14.49	208	151.7	22	208	180	10	0.9972	0.005	97.9	3.1	101.0	2.7	96.7	1.3
Atrazine	11.67	200	122.1	8	215.1	173	8	0.9989	0.005	93.7	11.0	101.0	4.4	99.5	4.4
Azinphos-ethyl	23.54	160	77	16	132	77	12	0.9985	0.005	97.7	6.9	94.8	4.6	91.3	10.6

36

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.)

37

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

38

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

39

Προσδιορισμός αντιβιοτικών σε τρόφιμα - Συνθήκες

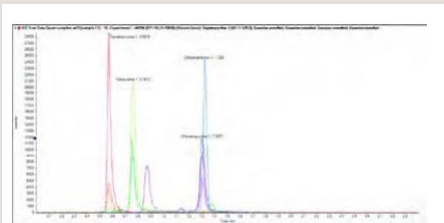


Figure 1. LC separation and detection in MRM mode of three tetracyclines and Chloramphenicol at 10 ng/mL.

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

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

40

Προσδιορισμός αντιβιοτικών σε τρόφιμα

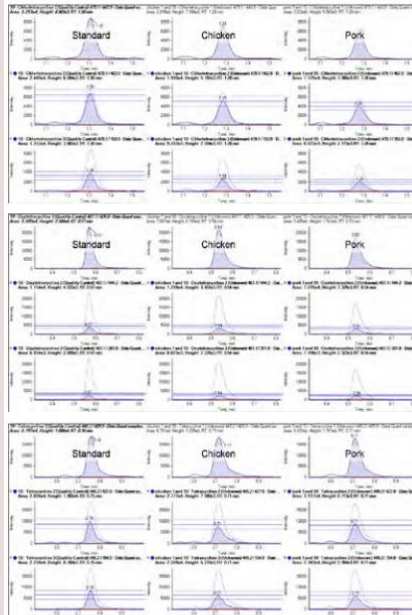


Figure 8. Side-by-side peak review of a standard injection (left) and spiked meat extracts (middle and right) with automatic calculation of MRM ratios, the MRM ratio tolerances are displayed in the peak review