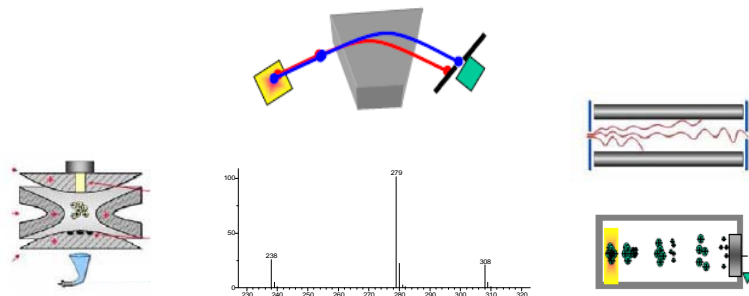


ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

MASS SPECTROMETRY

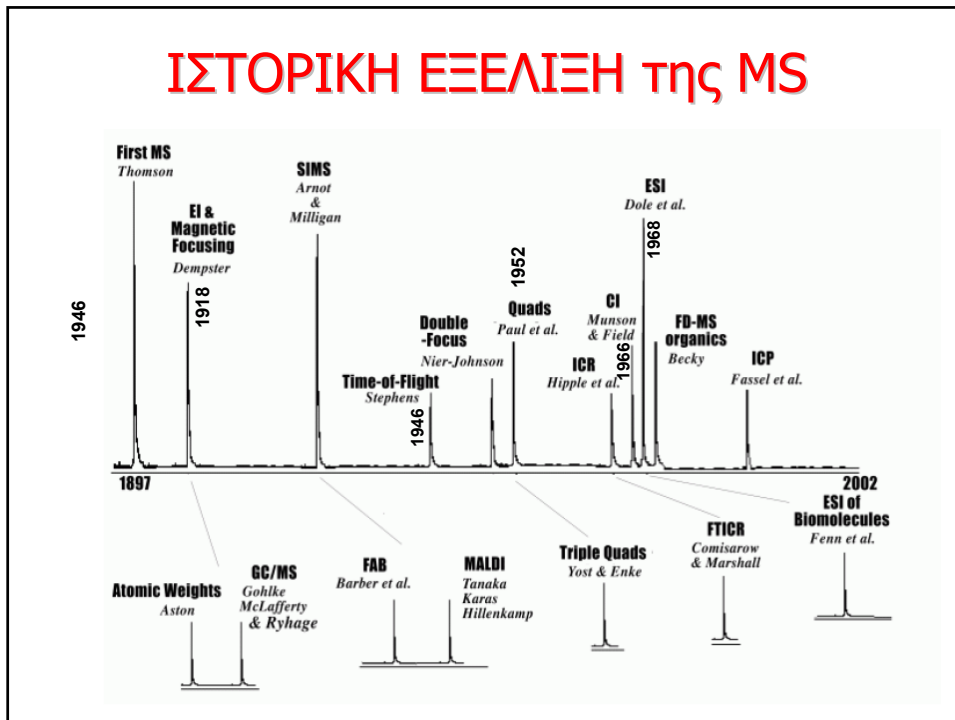


ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

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, οργανομεταλλικών και βιολογικών μορίων
- Την ποιοτική και ποσοτική σύσταση μιγμάτων
- Τη δομή και τη σύσταση επιφανειών
- Την αναλογία ισοτόπων στοιχείων

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ της MS



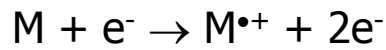
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

ΟΡΙΣΜΟΣ:

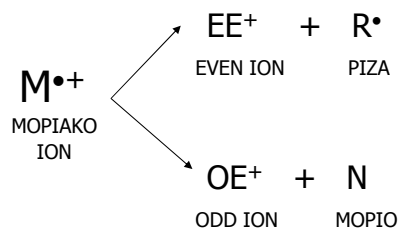
Οικογένεια τεχνικών προσδιορισμού δομής και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων, οι οποίες βασίζονται στον **ιοντισμό** ατόμων ή μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της **σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος** που αντιστοιχεί σε κάθε **λόγο μάζας προς φορτίο (m/z)**

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Ιοντισμός :



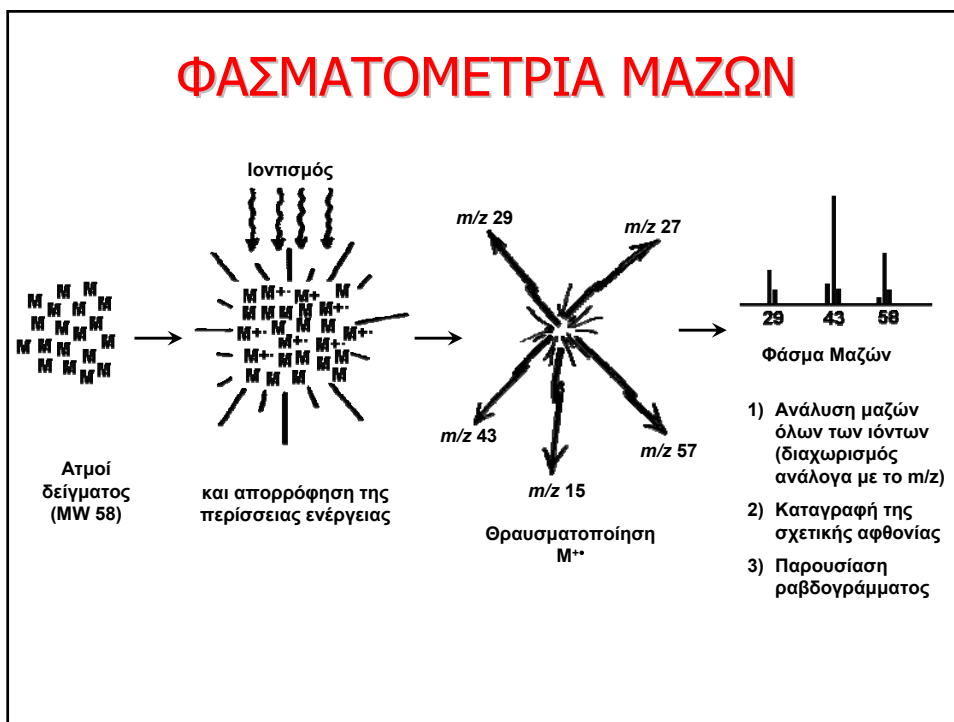
Θραυσματοποίηση :



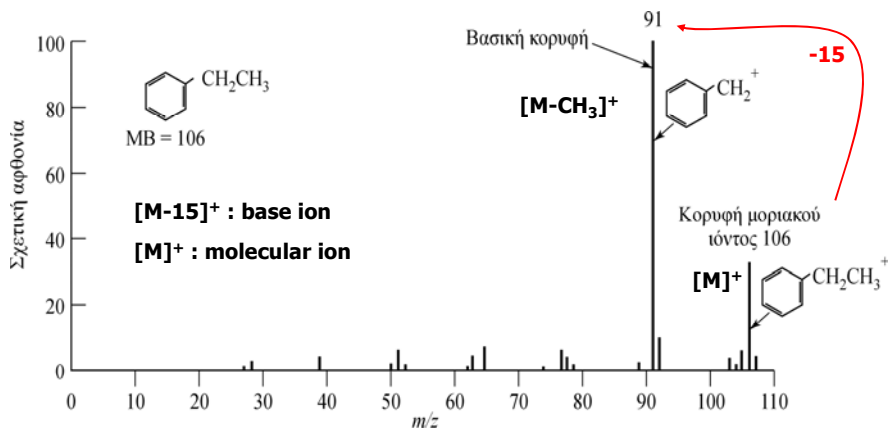
EE⁺: ιόν με άρτιο αριθμό e

OE⁺: ιόν με περιττό αριθμό e

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ



ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ



Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full Scan MS)

ΑΤΟΜΙΚΗ & ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ

Μονάδα ατομικής μάζας (u ή Da) :

Το 1/12 της μάζας ενός ουδέτερου ατόμου ¹²C

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

Ακριβής μάζα (exact mass):

Ατομική μάζα ³⁵Cl : $2,91407 \times 12,0000 \text{ Da} = 34,9688 \text{ Da}$

Μοριακή μάζα ¹²C¹H₄ :

$$12,0000 \times 1 + 1,007825 \times 4 = 16,031 \text{ Da}$$

Ονομαστική (μονοϊσοτοπική) μάζα (nominal mass)

Για το ¹²C¹H₄: 16 u

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

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

$$^{12}\text{C}^1\text{H}_4^+ : m/z = 16,035 / 1 = 16,035$$

$$^{12}\text{C}^1\text{H}_4^{2+} : m/z = 16,035 / 2 = 8,018$$

(χωρίς μονάδες)

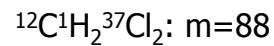
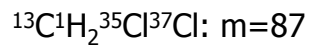
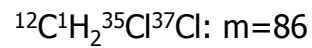
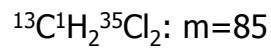
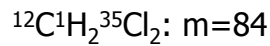
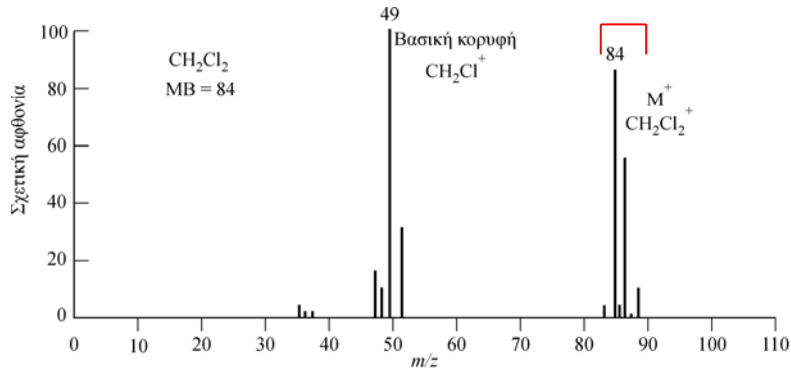
Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 20-3 Φυσική αφθονία ισοτόπων μερικών συνηθισμένων στοιχείων

Στοιχείο ^a	αφθονότερο ισότοπο	Αφθονία άλλων ισοτόπων σε σχέση με 100 μέρη του αφθονότερου ^b	
Υδρογόνο	¹ H	² H	0,015
Άνθρακας	¹² C	¹³ C	1,08
Αζώτο	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

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

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές



Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R

Διακριτική ικανότητα φασματομέτρου μαζών:

$$R = m/\Delta m$$

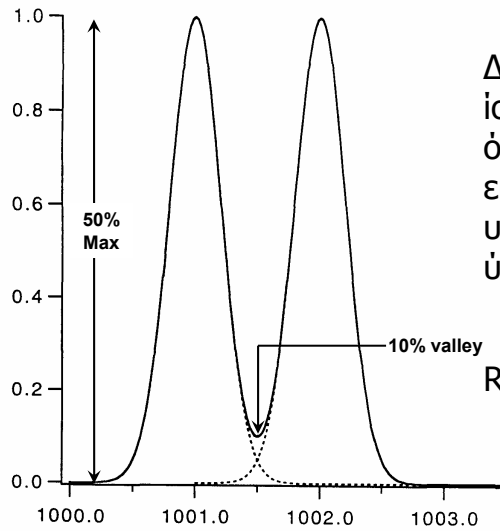
Η ικανότητα να διακρίνει δύο μόλις διαχωριζόμενες κορυφές, m και $m+\Delta m$.

Διάκριση μεταξύ ιόντων ίδιας ονομαστικής μάζας, πχ:

$$\left. \begin{array}{l} \text{N}_2^+ : 28,0061 \\ \text{CO}^+ : 27,9949 \end{array} \right\} \Delta m = 28,0061 - 27,9949 = 0,0112$$

$$\text{Άρα: } R = m/\Delta m = 27,9949/0,0112 = 2500$$

Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R

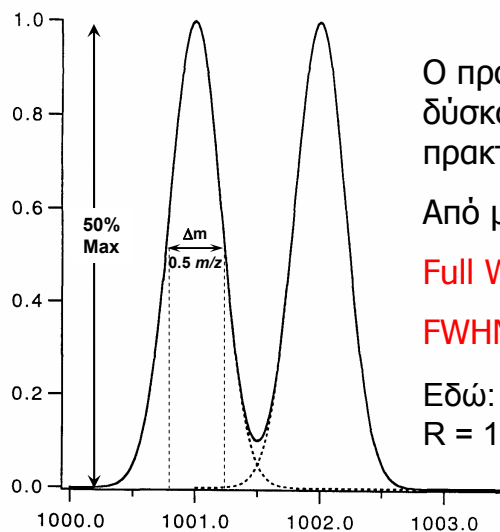


Δύο κορυφές (m/z) – ίσης έντασης – θεωρείται ότι διαχωρίζονται αν η επικάλυψη τους δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους τους (συνήθως)

..... έτσι:

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

Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R



Ο προηγούμενος ορισμός δύσκολα εφαρμόζεται πρακτικά.

Από μια μόνο κορυφή:

Full Width at Half Maximum

$$FWHM = \Delta m$$

Εδώ:

$$R = 1001 / (2 \times 0,5) = 1001$$

Διακρισιμότητα Resolution

Διακρισιμότητα είναι η διαφορά δυο γειτονικών τιμών m/z ($m_2 - m_1$) και εκφράζεται σε ppm:

$$(m_2 - m_1)/m_1 = \Delta m/m_1$$

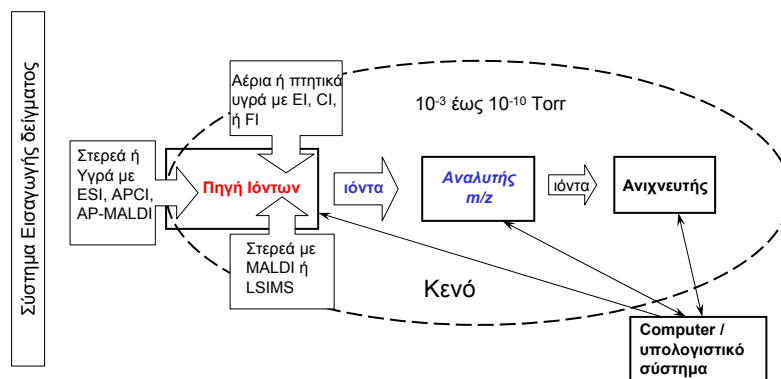
Π.χ. για:

N_2^+ : 28,0061 και CO^+ : 27,9949

$$\Delta m/m_1 = 0,0004 \text{ ή } 400 \text{ ppm}$$

Πολλές φορές αναφέρεται και ως ακρίβεια (accuracy)

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΩΝ



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 κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance, FTICR)

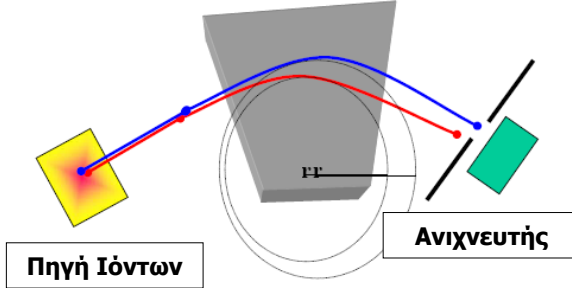
Διακριτική ικανότητα αναλυτών μαζών

Η διακριτική ικανότητα (R) των φασματομέτρων μαζών διαφέρει σημαντικά:

- Τα **τετράπολα** και οι **παγίδες ιόντων** έχουν σταθερό FWHM σε όλο το εύρος μαζών (συνήθως 0,7-0,4 u). Επομένως το R μεταβάλλεται ανάλογα με το m/z . Αυτά είναι όργανα **χαμηλής διακριτικής ικανότητας (Low Resolution MS)**
 - Τα **TOF** και οι **μαγνητικοί αναλυτές** έχουν σταθερό R σε όλο το εύρος μαζών. Αν π.χ. $R=20000$ σε m/z 200, τότε το $\Delta m=0,01u$ (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
- Αυτά τα όργανα είναι **υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS, HRMS)**

Αναλυτές μαγνητικού ή ηλεκτρικού τομέα

Μαγνητικός Αναλυτής

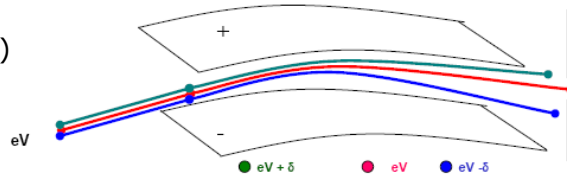


$$m/z = \frac{B^2 r^2 e}{2V}$$

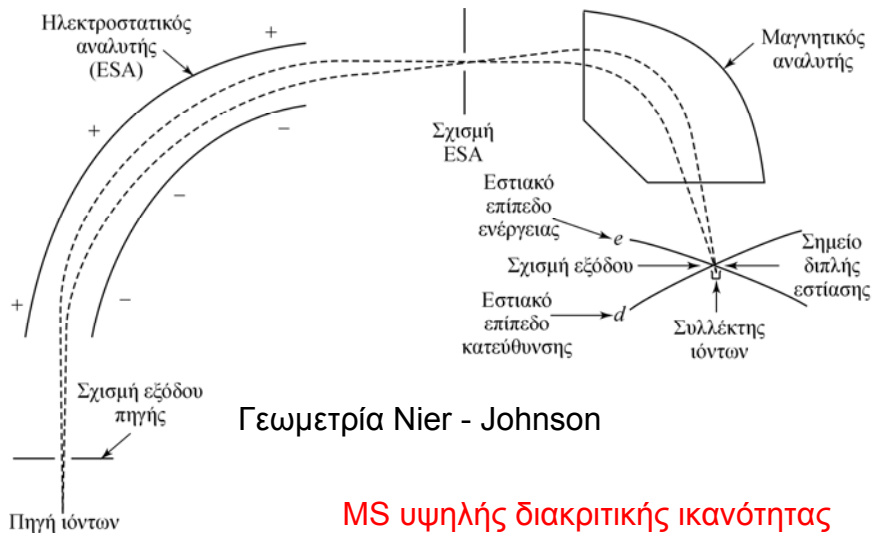
Διαχωρισμός των ιόντων επιτυγχάνεται με σάρωση της έντασης του μαγνητικού πεδίου (V, r: σταθερά)

Φασματομέτρα Απλής Εστίασης
(Single focusing MS)
[R ≤ 2000]

Ηλεκτροστατικός Αναλυτής

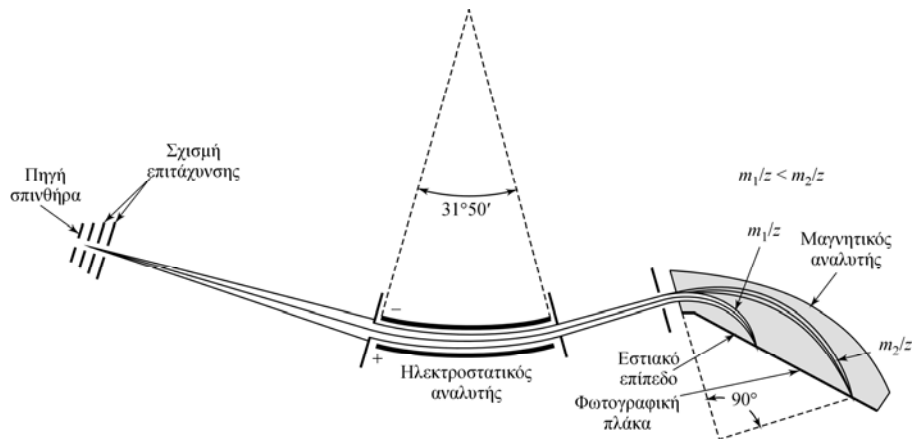


Αναλυτές μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης



MS υψηλής διακριτικής ικανότητας
R = 100 000

Αναλυτές μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης



Γεωμετρία Mattachuh - Herzog

Φασματομέτρα μαζών μαγνητικού τομέα

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

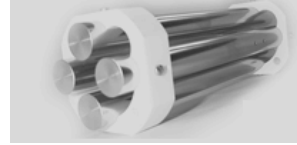
- Υψηλή διακριτική ικανότητα (διπλής εστίασης)
- Προσδιορισμός μοριακών μαζών
- Δυνατότητα προσδιορισμού ισοτόπων
- Πολύ καλή ευαισθησία σε χαμηλή R
- Δυνατότητα MS/MS
- Εφαρμογή στον προσδιορισμό διοξινών, ουσιών doping

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

ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

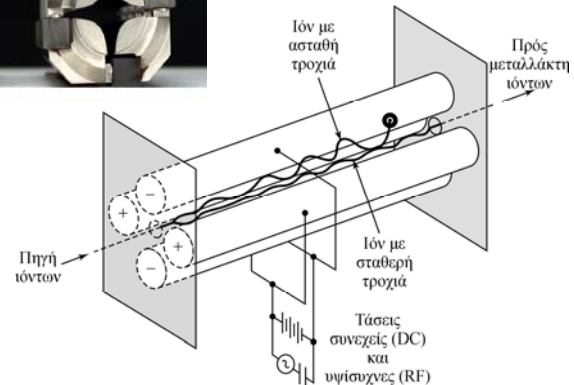
- ✓ Μικρό μέγεθος
- ✓ Το μικρότερο κόστος
- ✓ Υψηλή ταχύτητα σάρωσης (<100ms)
- ✓ Ανθεκτικός αναλυτής



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

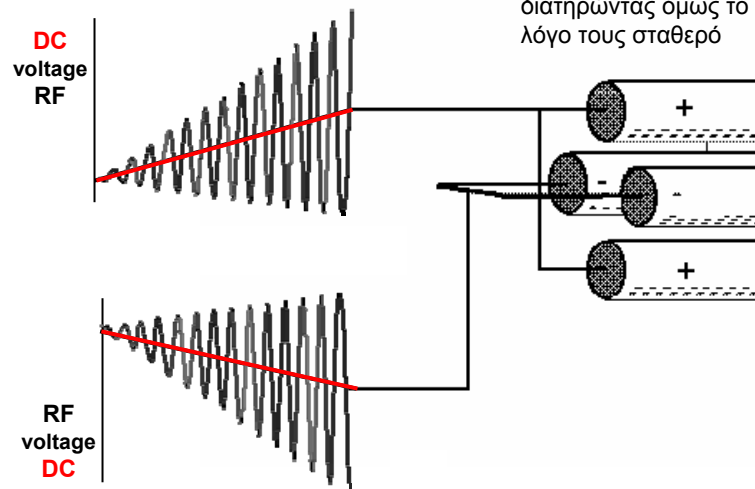
Χαμηλή Διακριτική ικανότητα: ~1Da (u)

- Φίλτρο μαζών



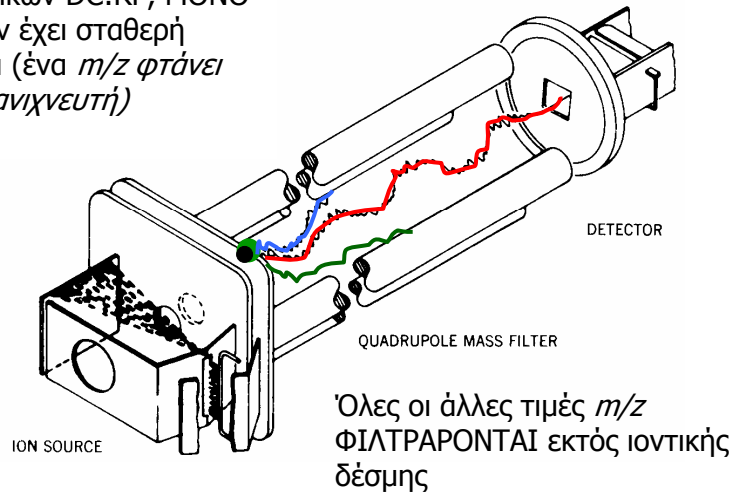
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ

Τα δυναμικά DC & RF αυξάνουν συγχρόνως, διατηρώντας όμως το λόγο τους σταθερό



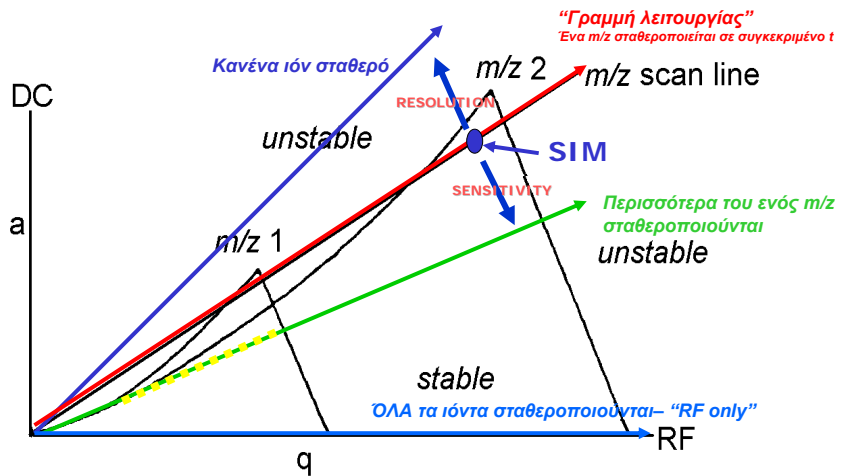
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ

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

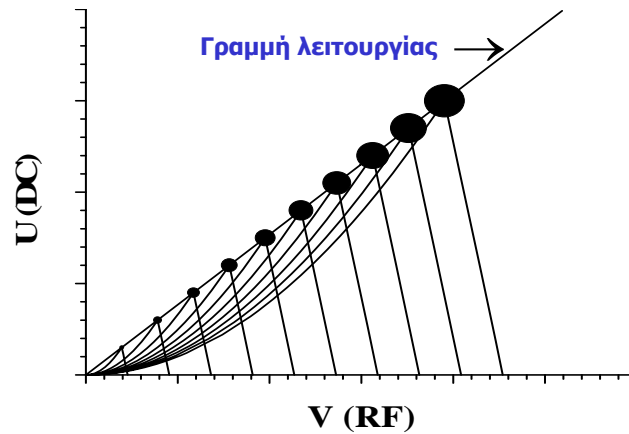


Διάγραμμα σταθερότητας ιόντων στο τετράπολο

(Ion Stability Diagram)



Πλήρης σάρωση ιόντων σε τετράπολο



Φασματομέτρα μαζών με τετράπολο

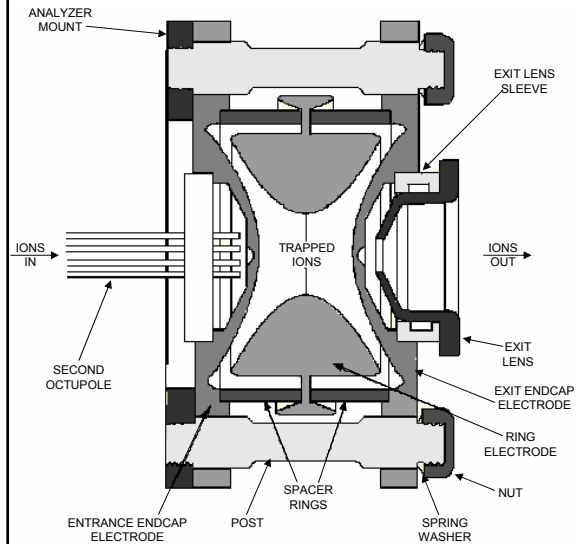
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Ο πιο αξιόπιστος και διαδεδομένος αναλυτής μαζών
- Κατάλληλος για ποσοτική ανάλυση
- Κατάλληλος ανιχνευτής χρωματογραφίας
- Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης ($>(1000 \text{ m/z}) \text{ s}^{-1}$)
- Φθηνός – 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: $0,5 \text{ u}$ – R: 1000-2000)
- Περιορισμένο εύρος m/z (μέγιστο 4000 u)
- Μειωμένη ευαισθησία σε υψηλή R

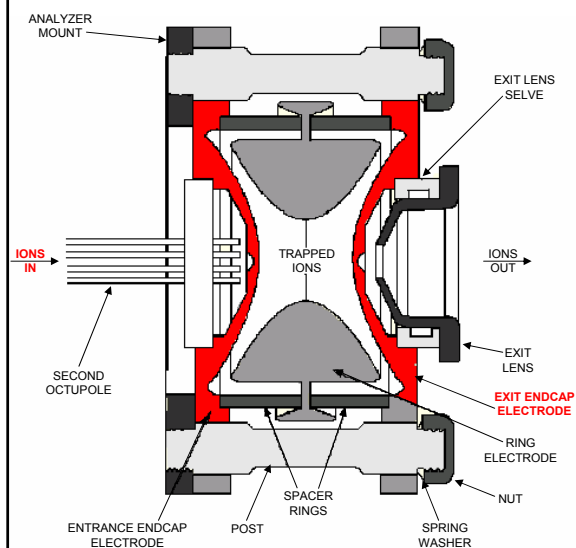
Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



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

Courtesy of Ian Jardine - Thermo Electron

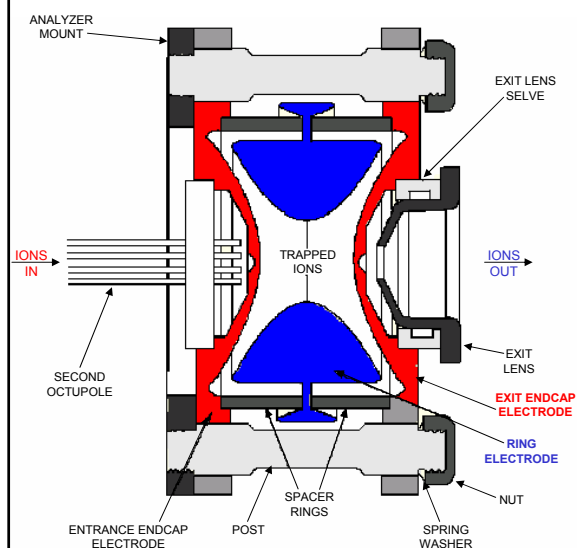
Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



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

Courtesy of Ian Jardine - Thermo Electron

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

➤ Ένα m/z αποσταθεροποιείται στο χρόνο αυξάνοντας το δυναμικό RF για την απόκτηση του φάσματος μαζών

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

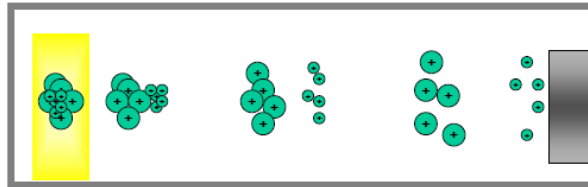
- Φθηνός αναλυτής με μικρό μέγεθος
- Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης ($>(1000 m/z) s^{-1}$)
- Χαμηλή απαίτηση κενού (10^{-3} Torr)
- Δυνατότητα MS/MS και MS^n (ταυτοποίηση δομής)
- Υψηλή ευαισθησία
- Κατάλληλος ανιχνευτής χρωματογραφίας
- Μεταβολίτες φαρμάκων, μελέτες δομής πρωτεϊνών

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Χαμηλή διακριτική ικανότητα (FWHM: 0,1 u – R: 4000)
- Περιορισμένο εύρος m/z (μέγιστο 6000 u)
- Περίπλοκη λειτουργία (παλμική)
- Ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση
- Μικρή ακρίβεια ποσοτικοποίησης

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

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



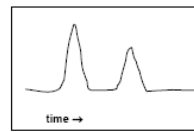
Παλμική λειτουργία

Χρόνοι πτήσης
1-30 μ s

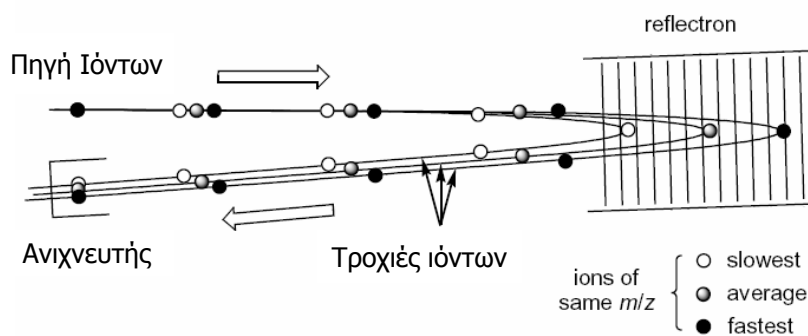
$$\text{K.E.} = \frac{1}{2} mv^2 = zV$$

$$L = vt$$

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



Reflectron TOF-MS



TOF-MS

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

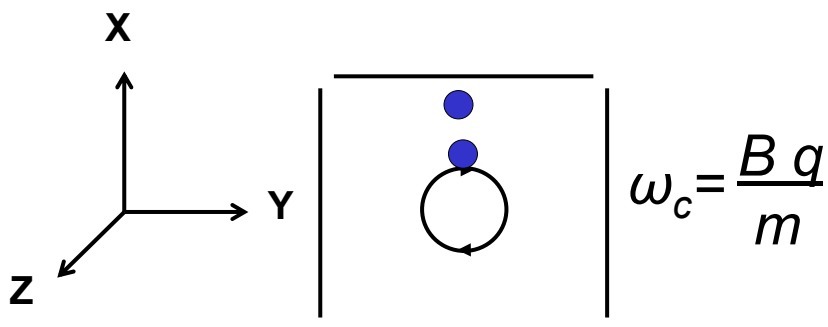
- Απλότητα λειτουργίας αναλυτή μαζών
- Θεωρητικά απεριόριστο εύρος μαζών (reflectron TOF: 10000 u)
- Τη μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης (10^6 m/z s⁻¹)
- Υψηλή διακριτική ικανότητα (R: 20 000)
- Δυνατότητα MS/MS
- Βιομόρια, μελέτες δομής πρωτεϊνών

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Περιορισμένη δυναμική περιοχή σε ποσοτική ανάλυση
- Απαιτούνται ακριβιά και ταχύτατα ηλεκτρονικά
- Περιορισμένη ευαισθησία
- Παλμική πηγή ιοντισμού (MALDI)
- Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-7} Torr)

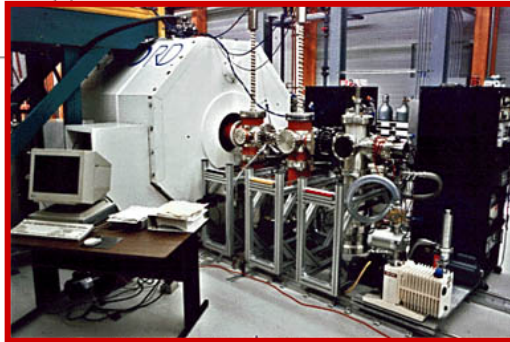
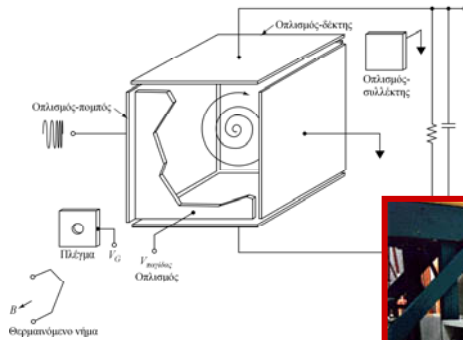
Ιοντικός κυκλοτρονικός συντονισμός Ion Cyclotron Resonance, ICR

Ιοντική Κυκλοτρονική κίνηση - Ion Cyclotron Motion



ω_c : Ιοντική Κυκλοτρονική συχνότητα

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



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, πεπτιδία

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Εξαιρετικά ακριβό όργανο – πολύπλοκη λειτουργία
- Ογκώδες, ειδικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις
- Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-10} Torr)

Μεταλλάκτης: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών δυνόδων

An ETP electron multiplier
in operation.

Συγγράμματα

- D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman «Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης», Μτφ. Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ.Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2002: Κεφ. 11 και 20
- J. Throck Watson and O. David Sparkman "Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation" 4th Edition, John Wiley & Sons, 2007
- E. De Hoffmann and V. Stroobant "Mass Spectrometry, Principles and Applications" 3rd Edition, John Wiley & Sons, 2007
- K. Downard "Mass Spectrometry – A Foundation Course" 2nd Edition, RSC, 2007

Σχήματα

Τα σχήματα της παρουσίασης ήταν από τις παρακάτω πηγές:

- Ευγενική παραχώρηση από τον Prof. O. David Sparkman (από το βιβλίο του J. Throck Watson and O. David Sparkman "Introduction to Mass Spectrometry, 4th Edition: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation" John Wiley & Sons, 2007)
- D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman «Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης», Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2002: Κεφ. 11 και 20