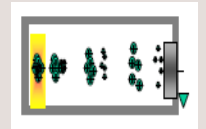
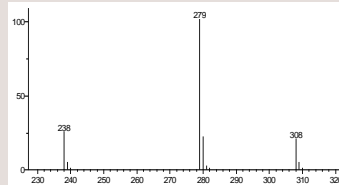
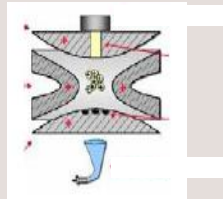
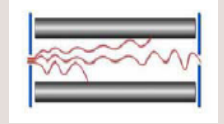
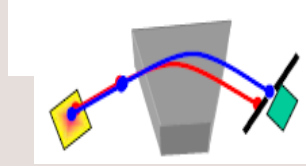
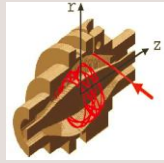


Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

Φασματομετρία Μαζών - Mass Spectrometry

Δρ. Μάριος Κωστάκης -

Καθ. Δρ. Νικόλαος Θωμαΐδης



1

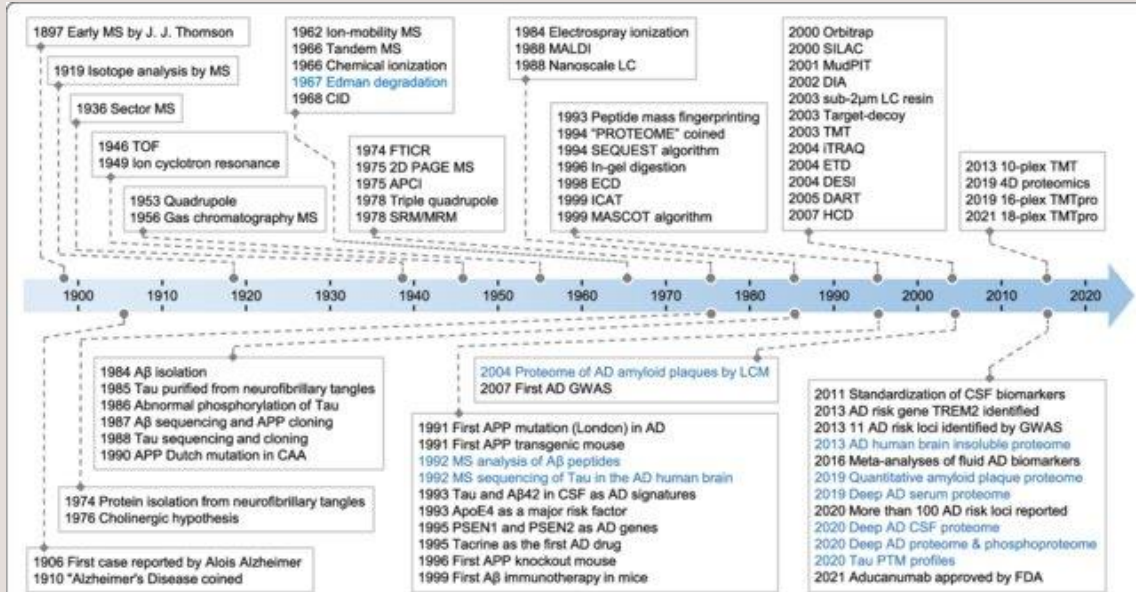
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

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

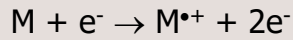
ΟΡΙΣΜΟΣ:

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)**

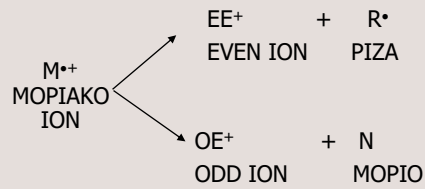
4

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Ιοντισμός :



Θραυσματοποίηση :

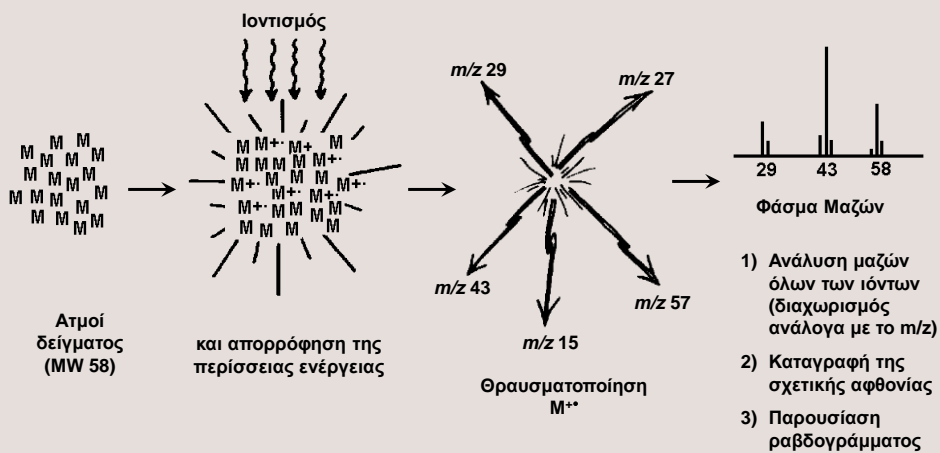


EE⁺: ιόν με άρτιο αριθμό e

OE⁺: ιόν με περιττό αριθμό e

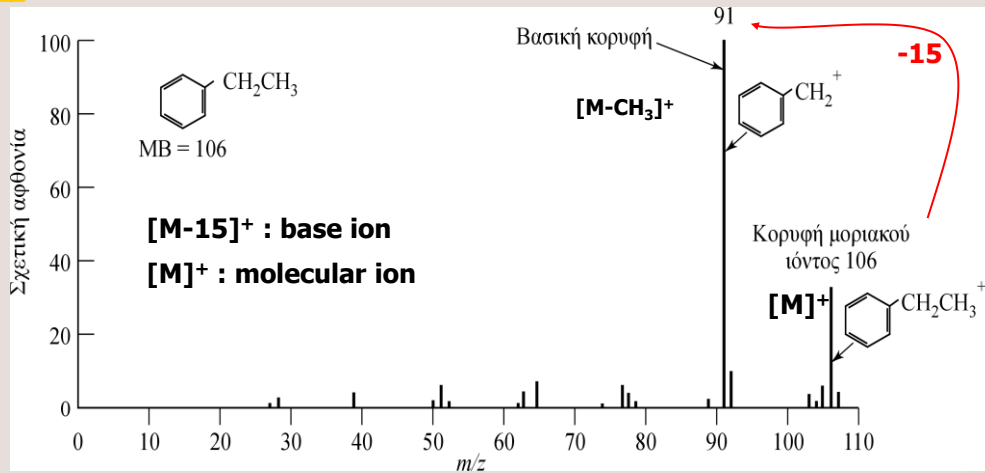
5

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ



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

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

Ακριβής μάζα (exact mass):

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

Μοριακή μάζα $^{12}C^1H_4$:

$$12,0000 \times 1 + 1,007825 \times 4 = 16,0313 \text{ Da}$$

Ονομαστική (μονοϊσοτοπική) μάζα (nominal mass)

Για το $^{12}C^1H_4$: 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

$$^{12}\text{C}^1\text{H}_4^+ : m/z = 16,0313 / 1 = 16,0313$$

$$^{12}\text{C}^1\text{H}_4^{2+} : m/z = 16,0313 / 2 = 8,0156$$

(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
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
Βρόμιο	⁷⁹ Br	⁸¹ Br	98,0
Πυρίτιο	²⁸ Si	²⁹ Si	5,1
		³⁰ Si	3,4

^α Τα φθόριο (¹⁹F), φωσφόρος (³¹P), νάτριο (²³Na) και ιώδιο (¹²⁷I) 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 ¹²C θα υπάρχουν κατά μέσο όρο 1,08 άτομα ¹³C.

10

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές

Στη φύση υπάρχουν τρεις κατηγορίες στοιχείων:

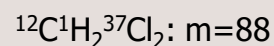
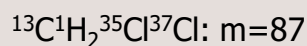
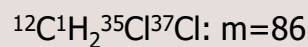
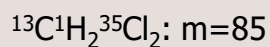
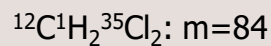
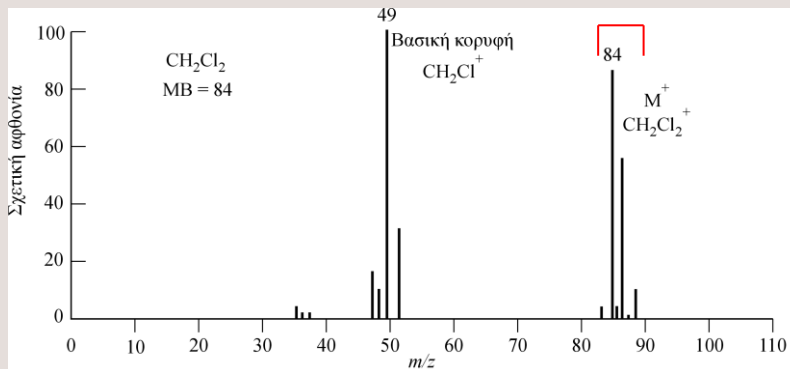
“A” στοιχεία – Μόνο ένα φυσικό ισότοπο υπάρχει
πχ Φθόριο

“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

Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R

Διακριτική ικανότητα φασματομέτρου μαζών:

$$R = m/\Delta m$$

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

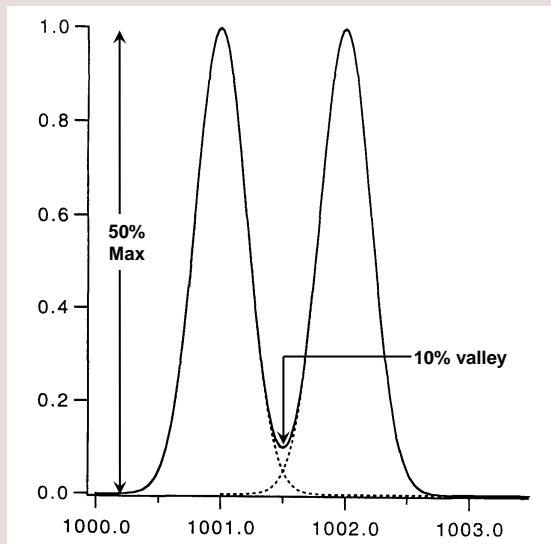
Διάκριση μεταξύ ιόντων ίδιας ονομαστικής μάζας, πχ:

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

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

13

Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R



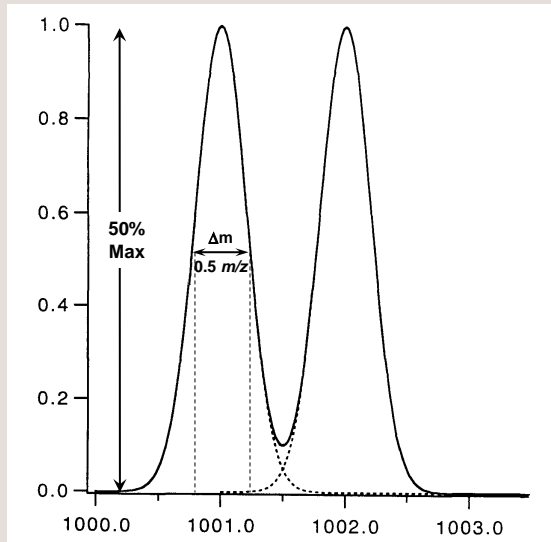
Δύο κορυφές (m/z) – ίσης έντασης – θεωρείται ότι διαχωρίζονται αν η επικάλυψη τους δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους τους (συνήθως)

..... έτσι:

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

14

Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R



Ο προηγούμενος ορισμός δύσκολα εφαρμόζεται πρακτικά.

Από μια μόνο κορυφή:

Full Width at Half Maximum

$$\text{FWHM} = \Delta m$$

Εδώ:

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

15

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:

$$\text{N}_2^+ : 28,0061 \text{ και } \text{CO}^+ : 27,9949$$

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

Πολλές φορές αναφέρεται και ως ακρίβεια (accuracy)

16

Ακρίβεια Μάζας Mass Accuracy

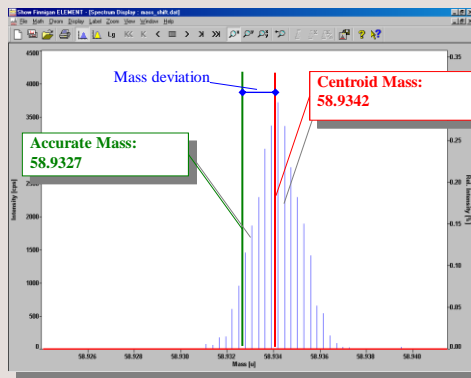
$$\Delta m = \text{Mass Offset} = \text{Centroid Mass} - \text{Accurate Mass}$$

$$0.0015 = 58.9342 - 58.9327$$

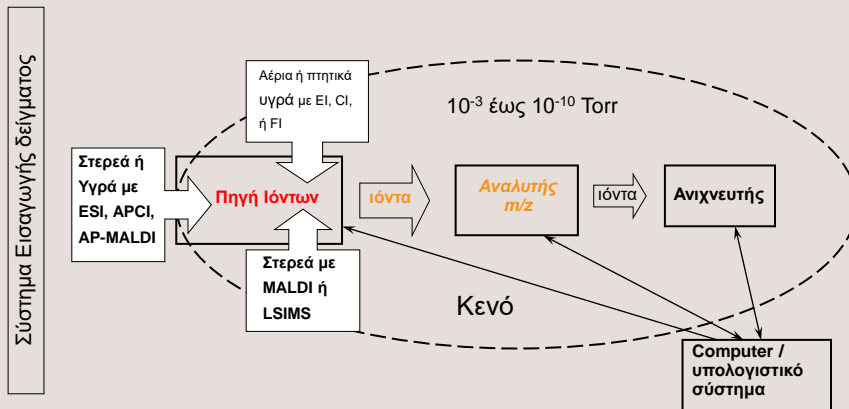
$$\text{Mass Accuracy (ppm)} = [(\text{Mass Offset}) / \text{Accurate Mass}] \times 10^6$$

$$\text{Mass Accuracy (ppm)} = (0.0015 / 58.9327) \times 10^6$$

$$\text{Mass Accuracy} = 25.4 \text{ ppm}$$



17



ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΩΝ

18

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)
 - Orbitrap

19

Διακριτική ικανότητα αναλυτών μαζών

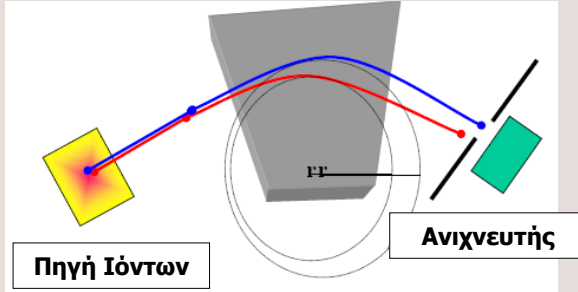
Η διακριτική ικανότητα (R) των φασματομέτρων μαζών διαφέρει σημαντικά:

- Τα **τετράπολα** και οι **παγίδες ιόντων** έχουν σταθερό FWHM σε όλο το εύρος μαζών (συνήθως 0,7-0,4 u). Επομένως, 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 $\Delta m=0,01u$ (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 (FTICR). Για το **Orbitrap** ισχύει κάτι ανάλογο: αν $R=6 \times 10^4$ σε m/z 400, τότε το $R=2 \times 10^4$ σε m/z 4000
- Αυτά τα όργανα είναι **υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS, HRMS)**

20

Αναλυτές μαγνητικού ή ηλεκτρικού τομέα

Μαγνητικός Αναλυτής

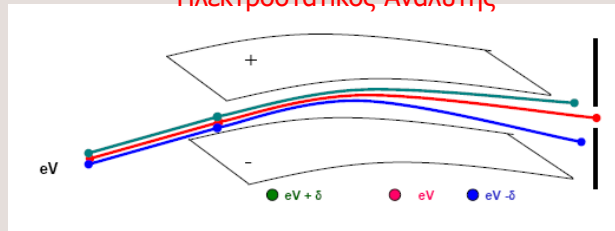


$$m/z = \frac{B^2 r^2 e}{2V}$$

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

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

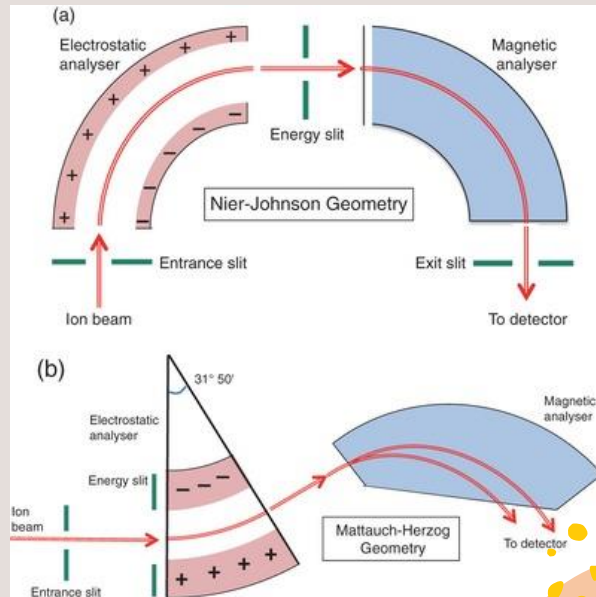
Ηλεκτροστατικός Αναλυτής



21

Αναλυτές μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης

Υψηλής διακριτικής ικανότητας
R = 100 000



22

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

23

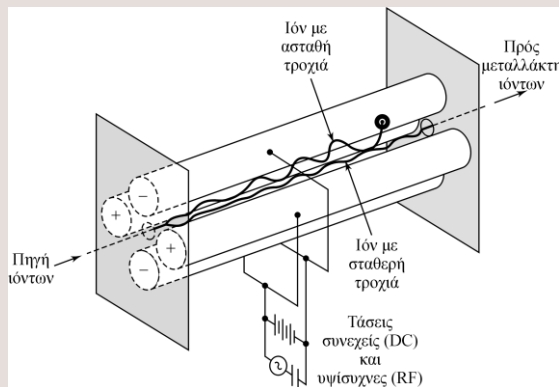
ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

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

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

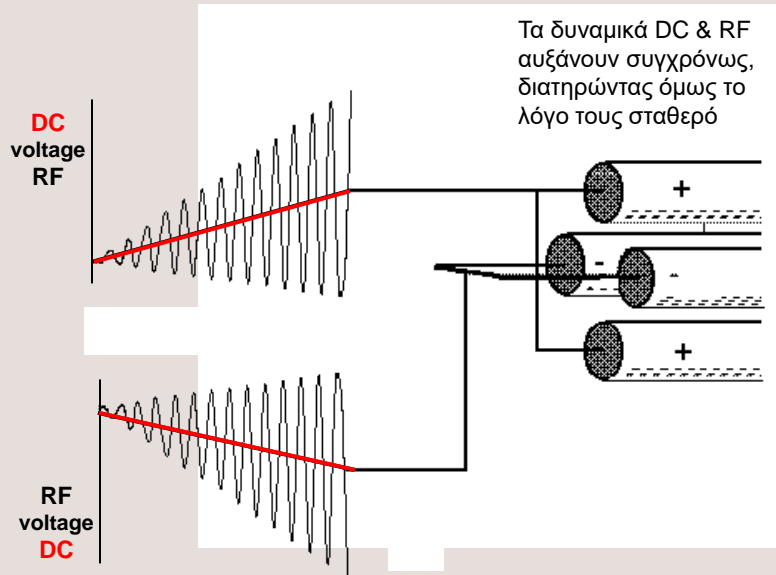
Χαμηλή Διακριτική ικανότητα: $\sim 1\text{Da}$ (u)

- Φίλτρο μαζών



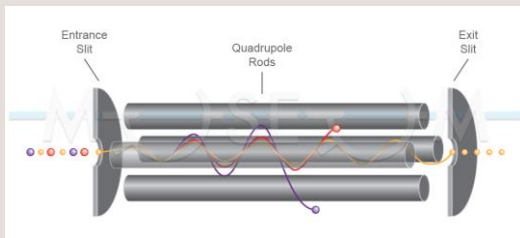
24

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ



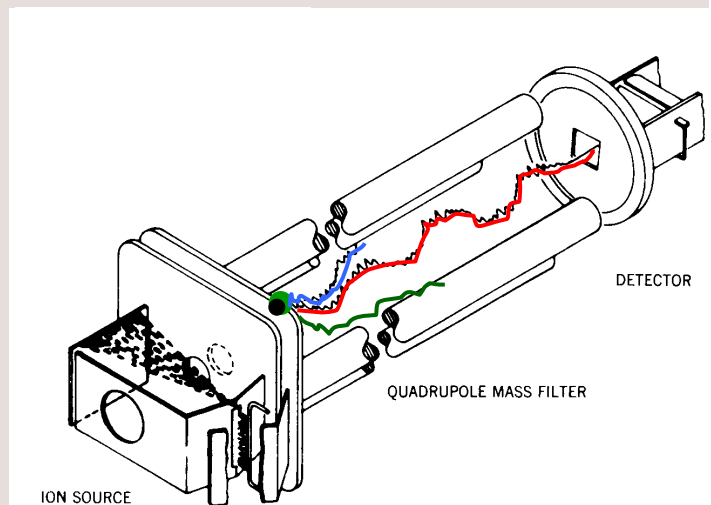
25

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ



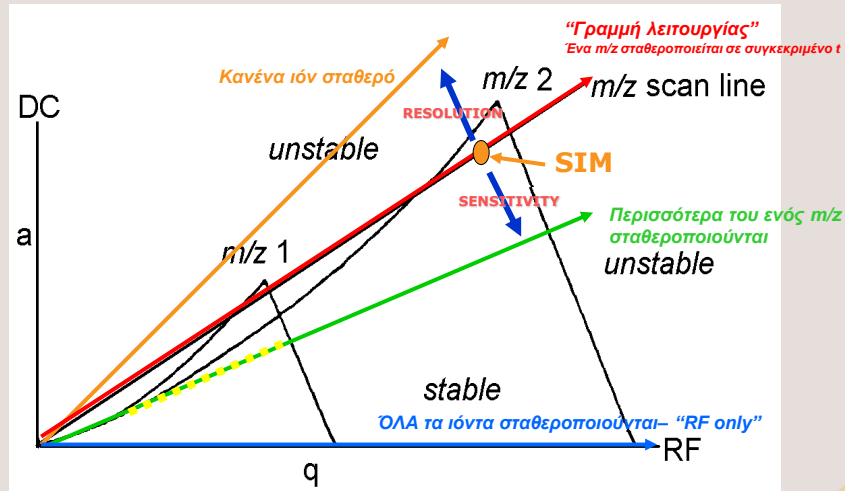
Όλες οι άλλες τιμές m/z
ΦΙΛΤΡΑΡΟΝΤΑΙ εκτός ιοντικής
δέσμης

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



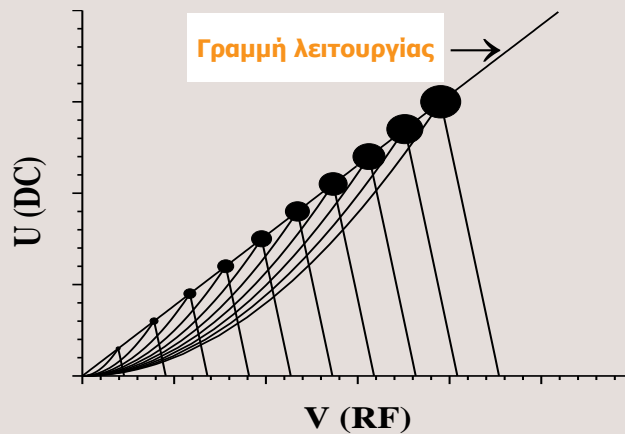
26

Διάγραμμα σταθερότητας ιόντων στο τετράπολο (Ion Stability Diagram)



27

Πλήρης σάρωση ιόντων σε τετράπολο



28

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 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

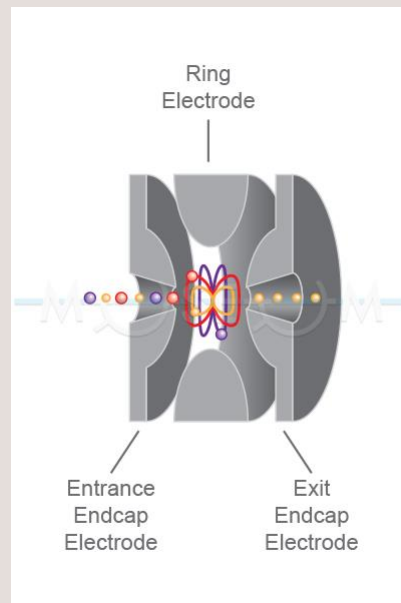
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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)

29

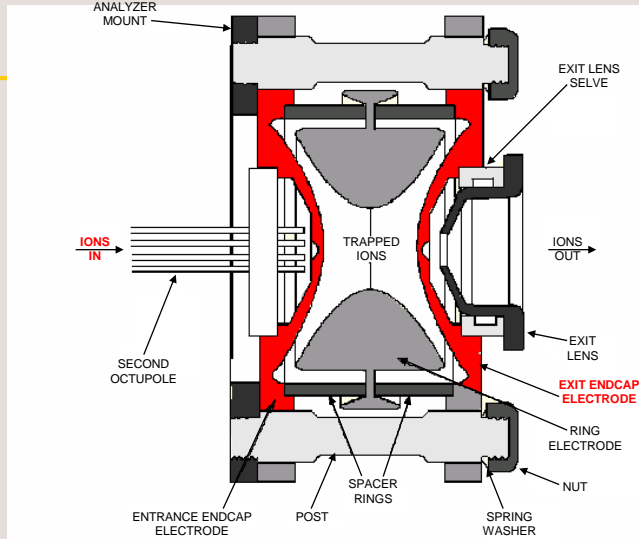
Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

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



30

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

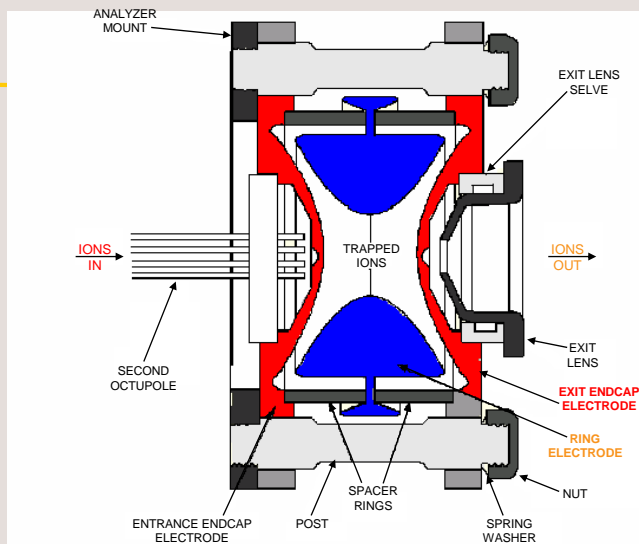


- Διο **πλευρικά ηλεκτρόδια**, γειωμένα, και ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο στο οποίο εφαρμόζεται ένα δυναμικό RF που αυξάνει

Courtesy of Ian Jardine - Thermo Electron

31

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



- Διο **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 αποσταθεροποιείται στο χρόνο αυξάνοντας το δυναμικό RF για την απόκτηση του φάσματος μαζί

32

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Φθηνός αναλυτής με μικρό μέγεθος
- Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης ($>(1000 \text{ m/z}) \text{ s}^{-1}$)
- 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

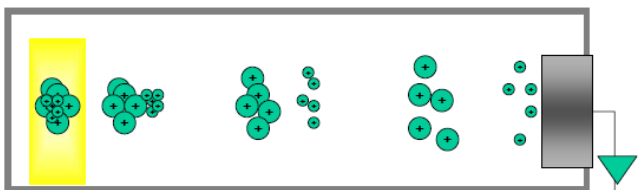
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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

33

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

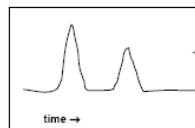
Σωλήνας πορείας ή «πτήσης»: Τα ιόντα διαχωρίζονται λόγω διαφορετικών ταχυτήτων



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

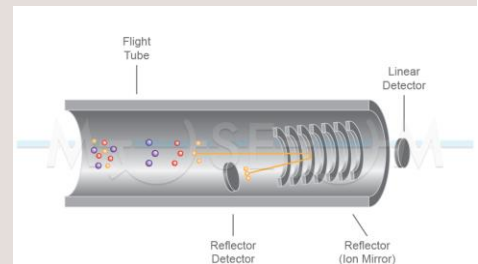
$$L = vt$$

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



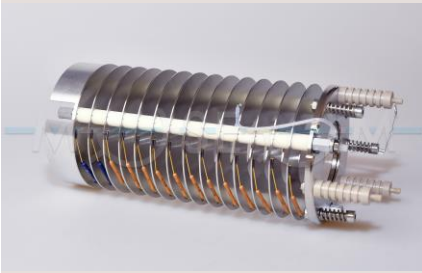
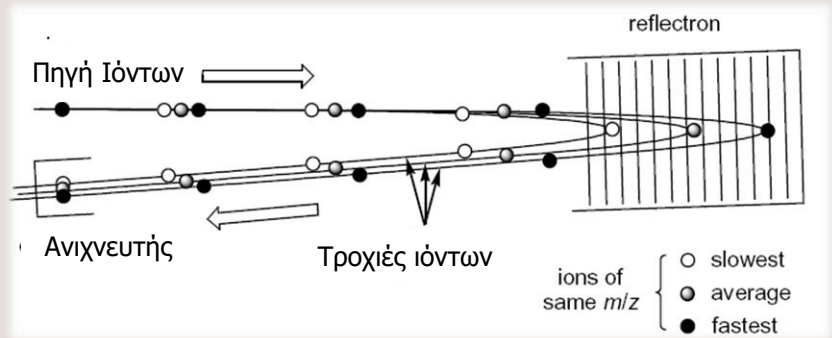
Παλμική
λειτουργία

Χρόνοι πτήσης
1-30 μs



34

Reflectron TOF-MS



35

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

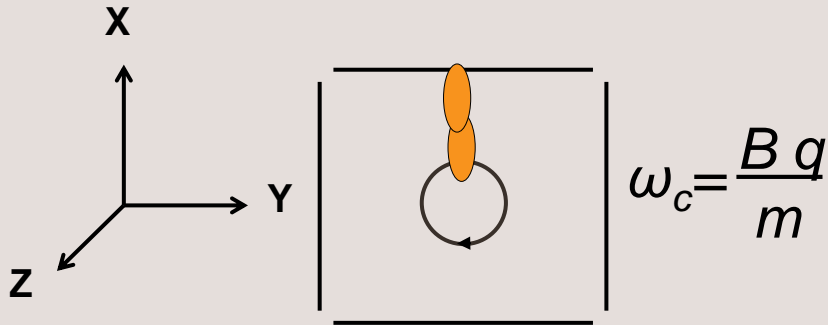
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

36

Ιοντικός κυκλοτρονικός συντονισμός Ion Cyclotron Resonance, ICR

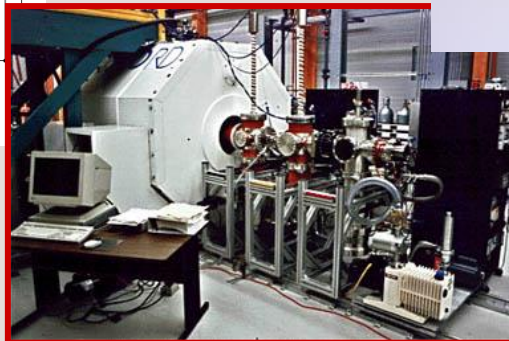
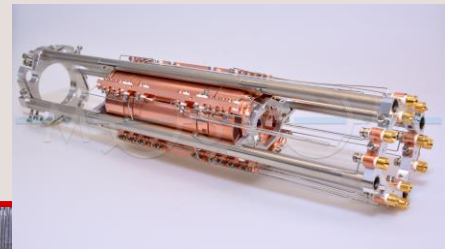
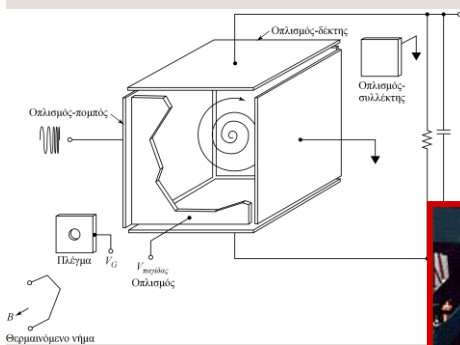
Ιοντική Κυκλοτρονική κίνηση - Ion Cyclotron Motion



ω_c : Ιοντική Κυκλοτρονική συχνότητα

37

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



38

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, πεππίδια

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

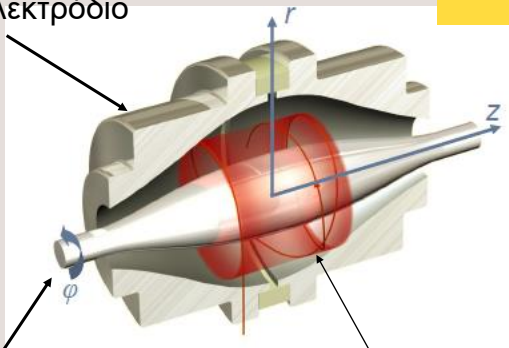
- Εξαιρετικά ακριβό όργανο – πολύπλοκη λειτουργία
- Μικρή ταχύτητα σάρωσης (τυπικά 1 Hz)
- Ογκώδες, ειδικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις
- Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-8} - 10^{-10} Torr)

39

Orbitrap

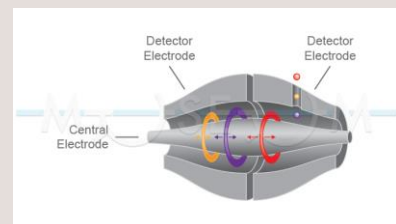
$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/q}}$$

Πλευρικό ηλεκτρόδιο



Αξονικό ηλεκτρόδιο

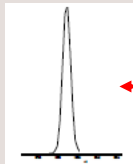
Τροχιά ιόντων ενός m/z



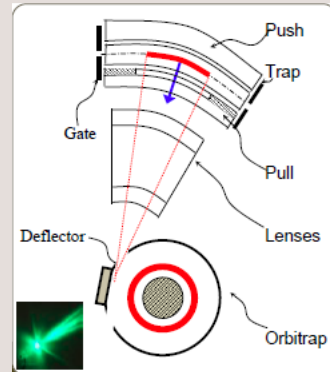
40

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



FT



41

Orbitrap

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

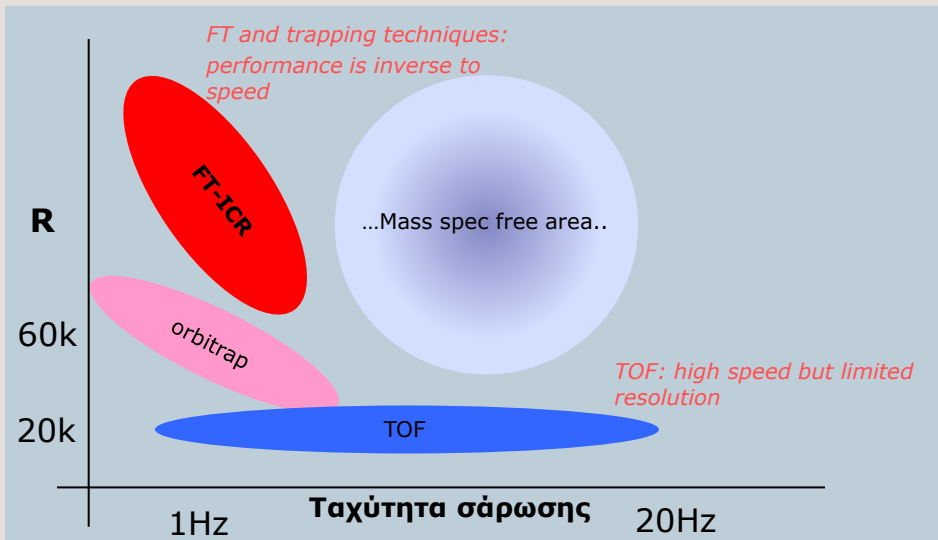
- Την υψηλότερη διακριτική ικανότητα μετά το FT-ICR ($R = 10000 - 140000$) μέχρι m/z 4000
- Μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό μαζών (<5 ppm)
- Μεγαλύτερη χωρητικότητα από τις ιοντικές παγίδες
- Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων
- Δυνατότητα MS/MS (σε συνδυασμό με ιοντική παγίδα)
- Ανάλυση εξαιρετικά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

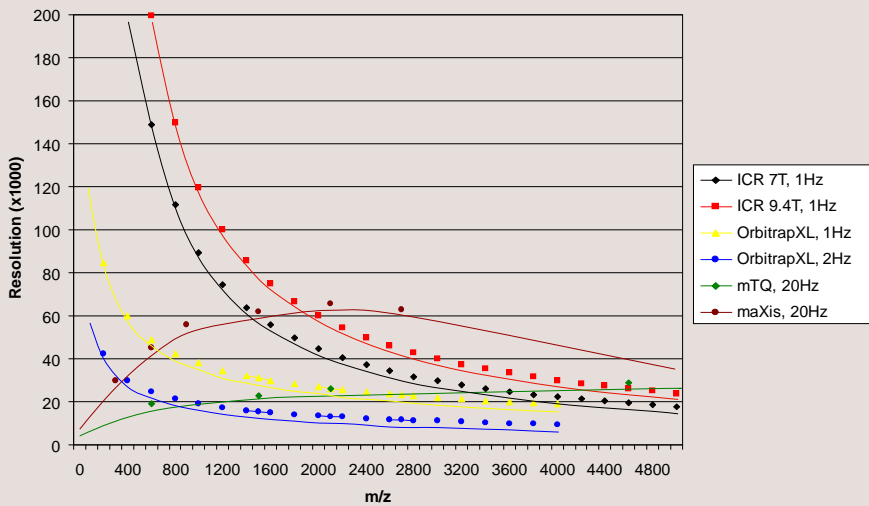
42

Απόδοση HR-MS : Συμβιβασμός ταχύτητας - R



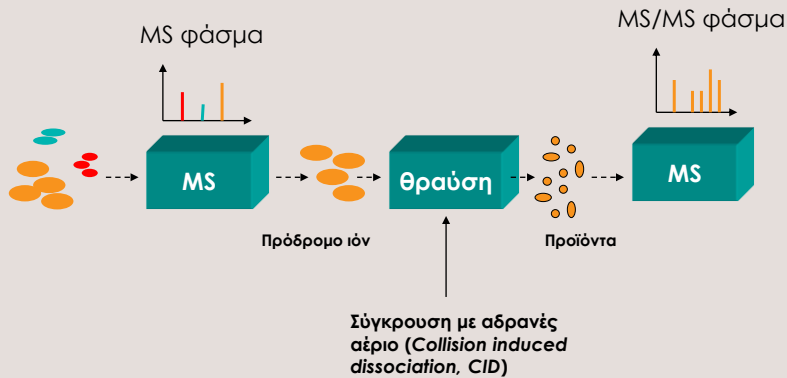
43

Resolution vs m/z



44

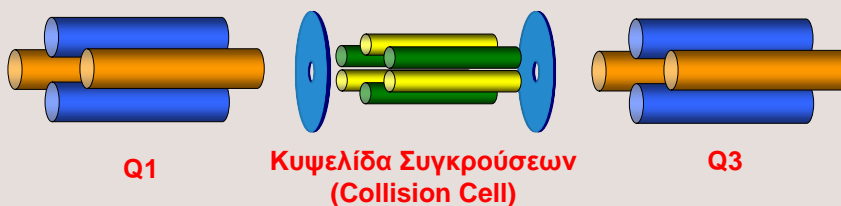
Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)



45

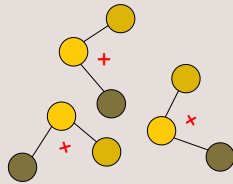
Τριπλό τετράπολο Triple Stage Quadrupole (TSQ ή QqQ)

1. Το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion) παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το 1^ο τετράπολο (MS1)
2. Οδηγείται στο 2^ο 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 3^ο τετράπολο (MS2)

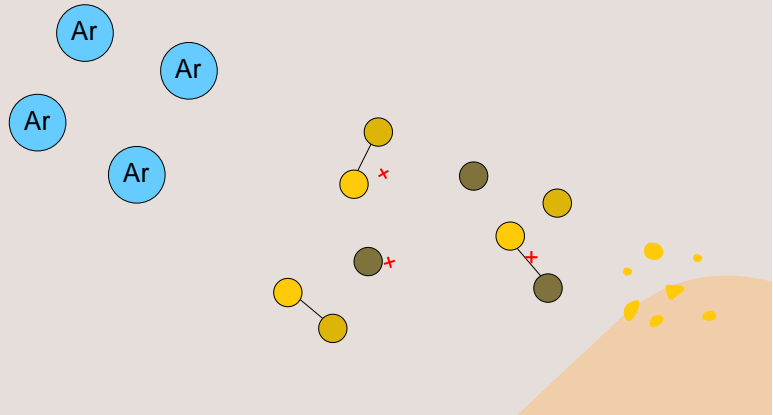


46

Θραυσματοποίηση μέσω συγκρούσεων



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

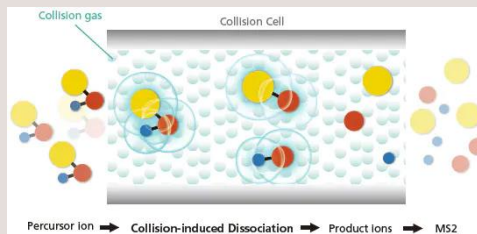
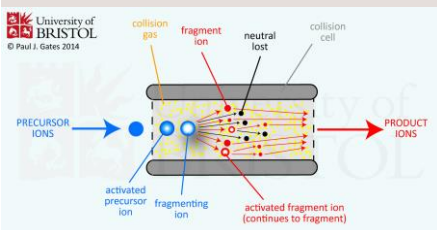


47

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.

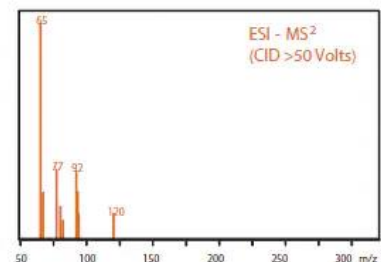
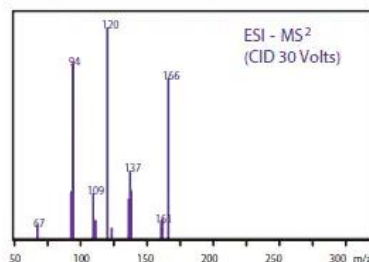
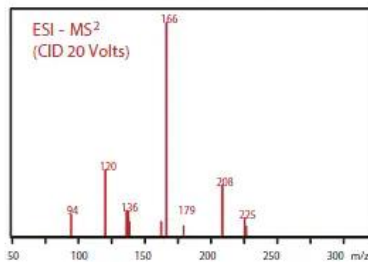
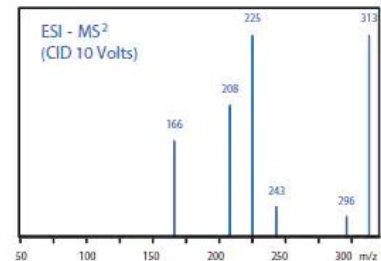
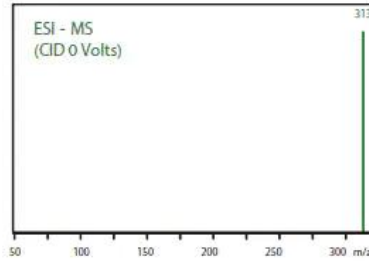
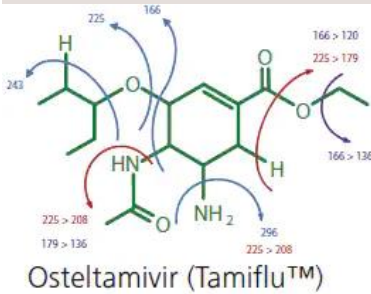
- Τα επιλεγμένα ιόντα (**Q1**) επιταχύνονται με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού και συγκρούονται με ένα ουδέτερο αδρανές αέριο (**Q2**).
- Η σύγκρουση προκαλεί μετατροπή της κινητικής ενέργειας σε εσωτερική με αποτέλεσμα την διάσπαση του ιόντος
- Η διαδικασία πραγματοποιείται στο δεύτερο τετράπολο (Q2) που ονομάζεται **κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell)**



48

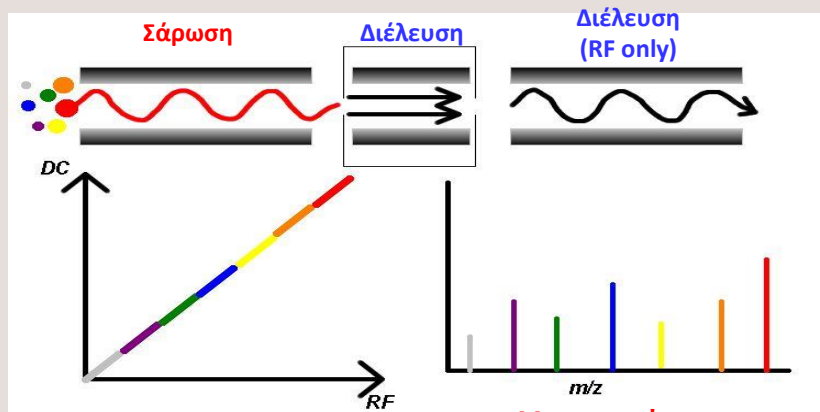
Θραυσματοποίηση μέσω συγκρούσεων

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



49

Φασματομετρία Μαζών Πλήρους Σάρωσης Full-Scan Mass Spectrometry



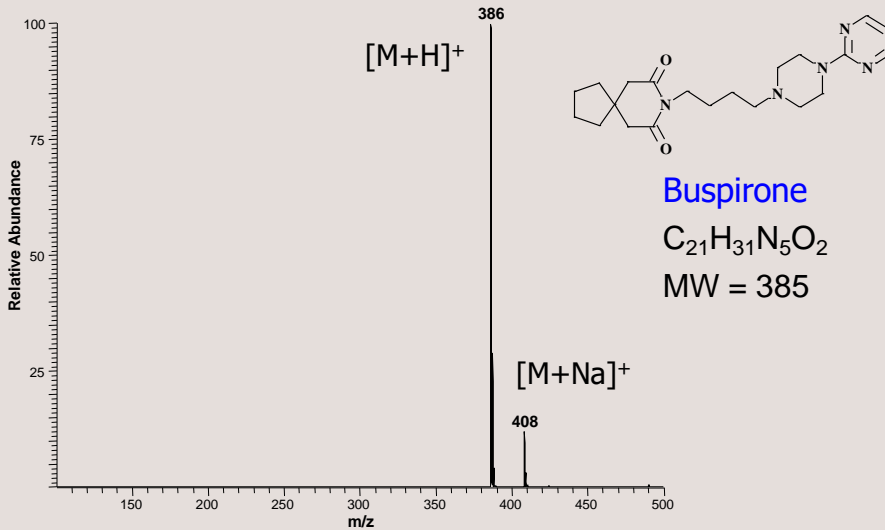
Πλεονέκτημα:
Πληροφορία για το MB

Μειονεκτήματα:

- Αργή σάρωση
- Όχι ποσοτικοποίηση

50

Full-Scan MS της Buspirone



51

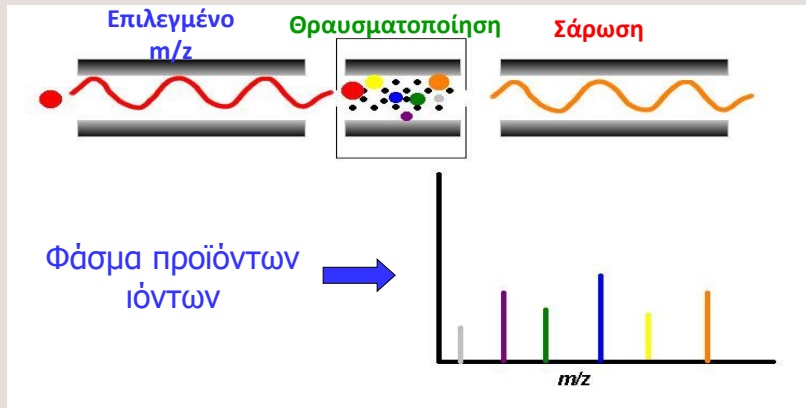
Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος Single Ion Monitoring (SIM)



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

52

MS/MS προϊόντων ιόντων Product Ion Scanning



- **Πλεονέκτημα:**

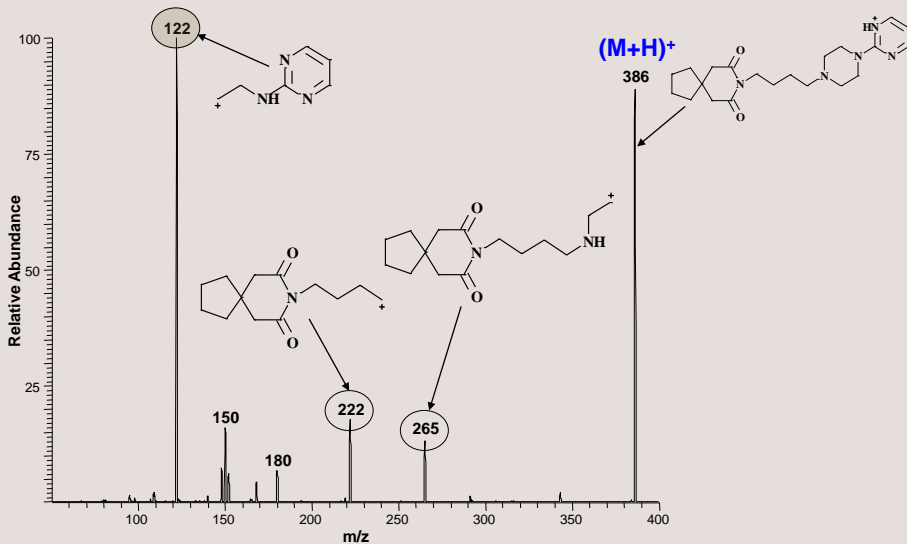
- Παρέχει πληροφορίες για τη δομή

- **Μειονέκτημα:**

- Αργή σάρωση
- Όχι ποσοτικοποίηση

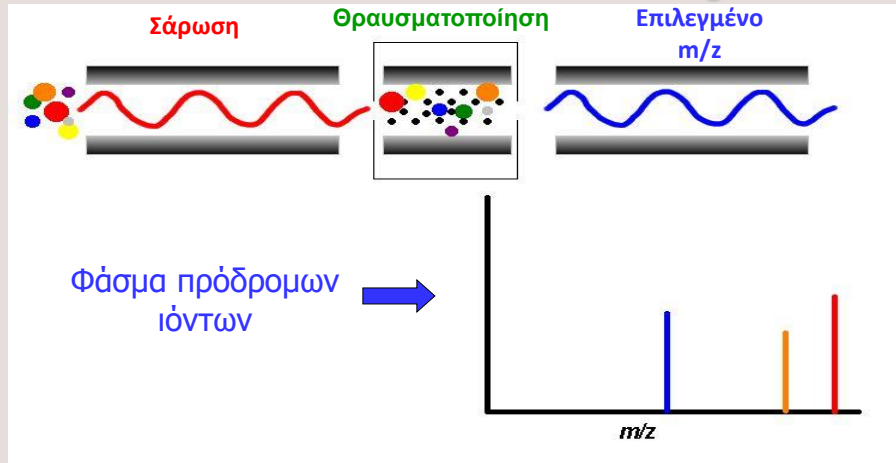
53

Φάσμα προϊόντων ιόντων της Buspirone



54

MS/MS πρόδρομων ιόντων Precursor Ion Scanning



- **Πλεονέκτημα:**

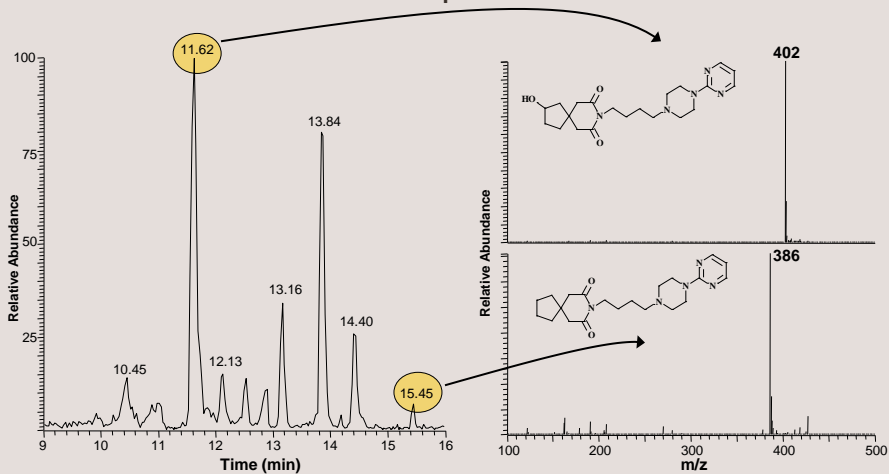
- Ταυτοποίηση ενώσεων που δίνουν ένα συγκεκριμένο προϊόν ιόν (π.χ., PO_3^- τα φωσφοπεπτίδια)

- **Μειονέκτημα:**

- Αργή σάρωση

55

MS/MS μητρικών ιόντων των μεταβολιτών της Buspirone



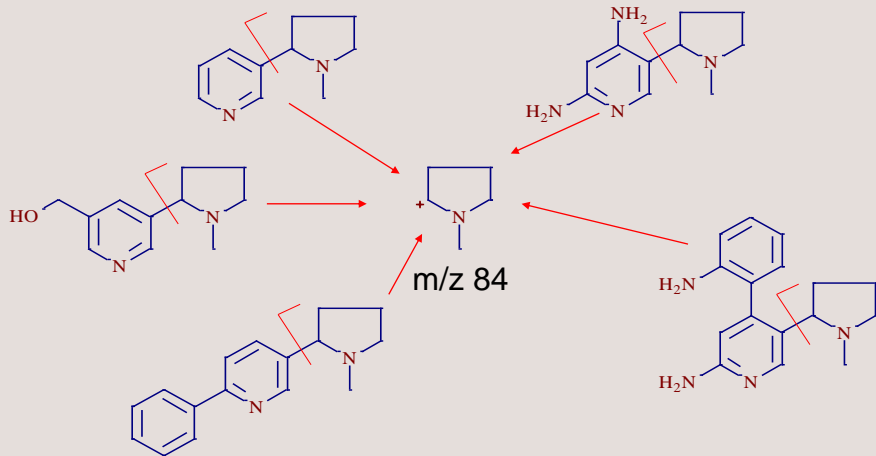
Precursor Ion Scan: Το Q3 παρακολουθεί μόνο το m/z 122

56

Precursor ion scans

Οι σαρώσεις πρόδρομων ιόντων χρησιμοποιούνται για πειράματα διαλογής (screening)

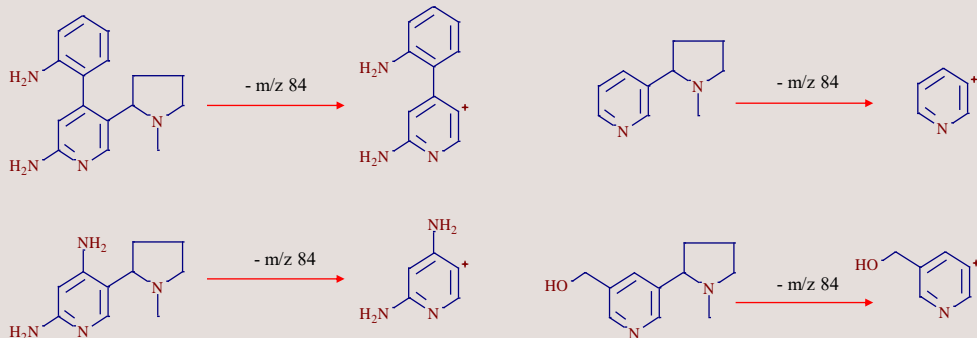
Όταν μια ομάδα ενώσεων, όλες δίνουν το ίδιο ιοντικό θραύσμα



57

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)



58

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
Irgarol	254,0 → 197,9 → 108,1
M1	214,0 → 158,0 → 68,3

Κοινό
προϊόν
m/z

96

59

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ:

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

	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
Irgarol	254,0 → 197,9 → 108,1
M1	214,0 → 158,0 → 68,3

Neutral loss:
m/z 56

Neutral loss:
m/z 56

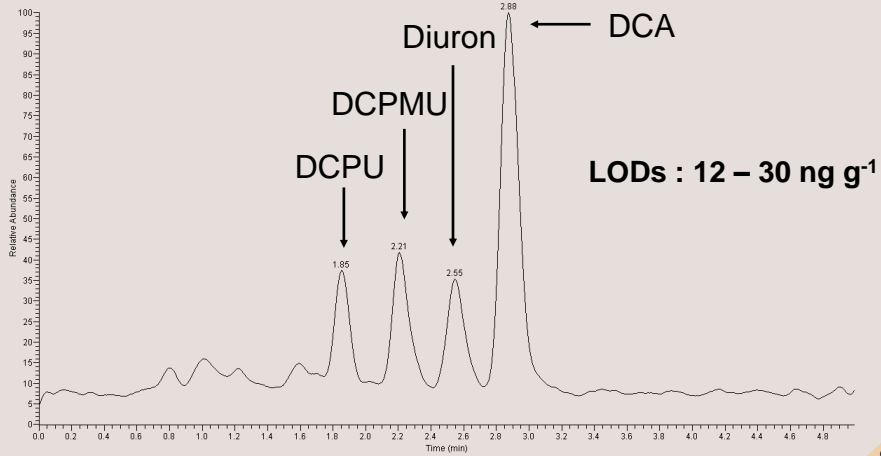
97

60

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

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

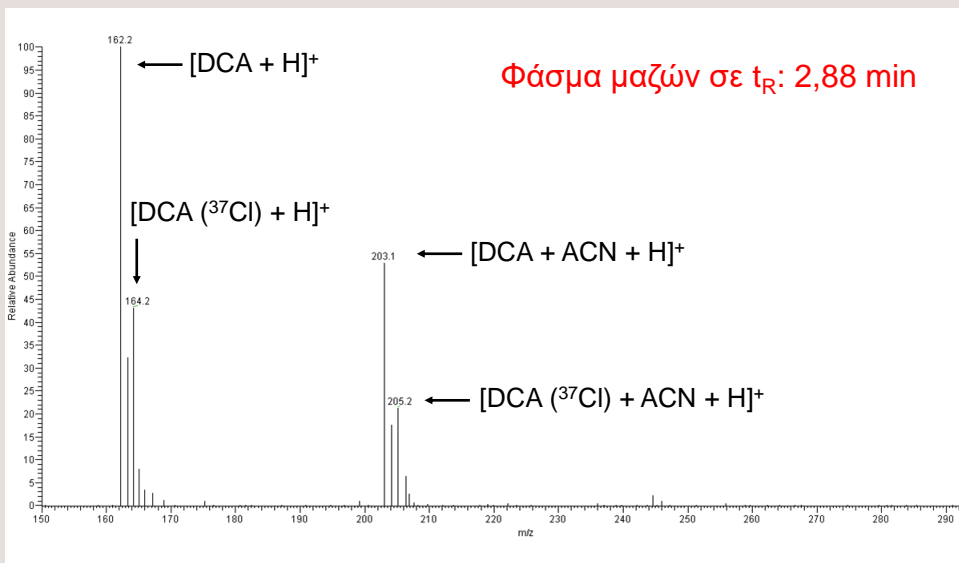


98

61

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

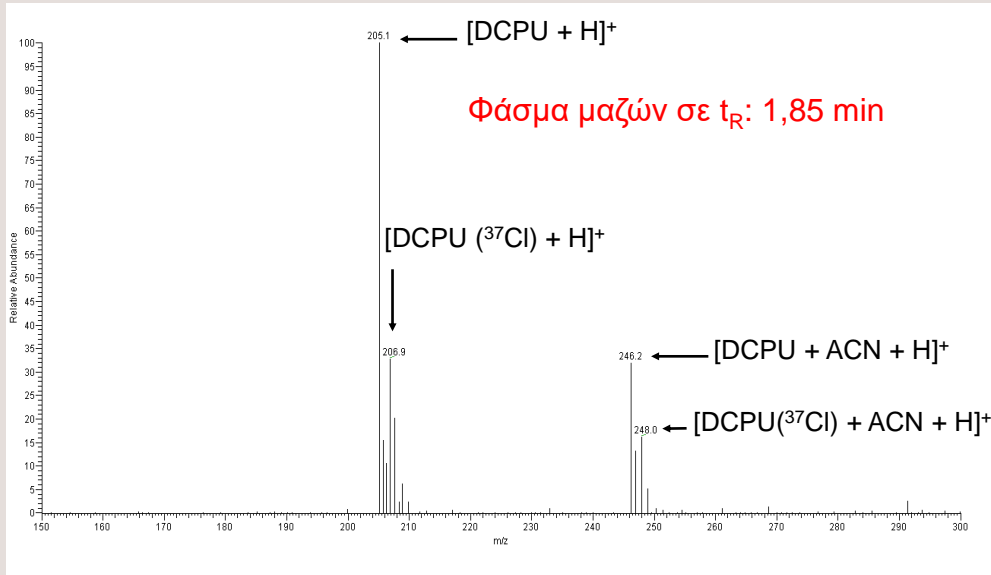
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



62

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

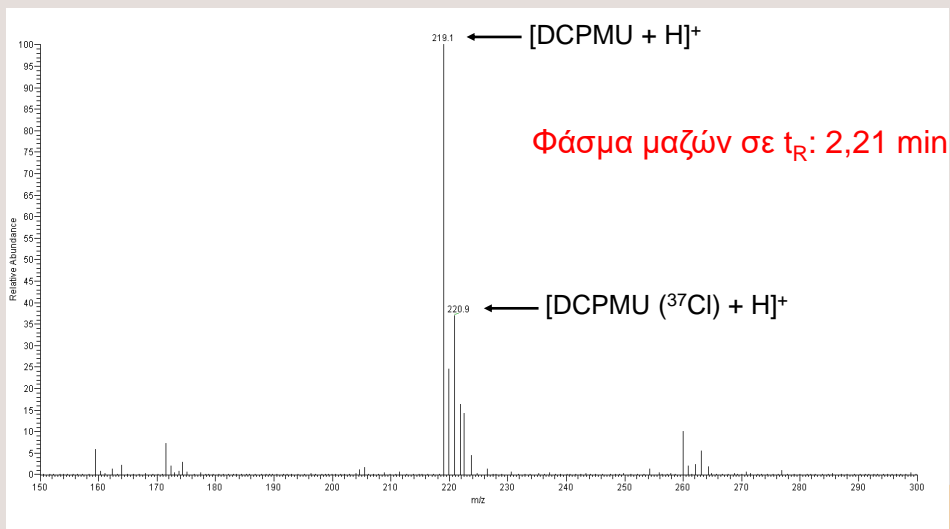


100

63

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

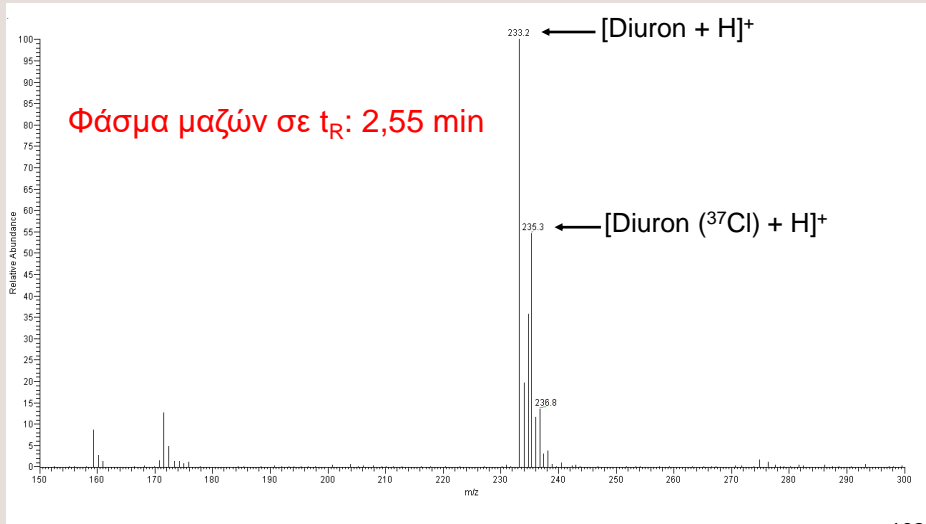


101

64

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

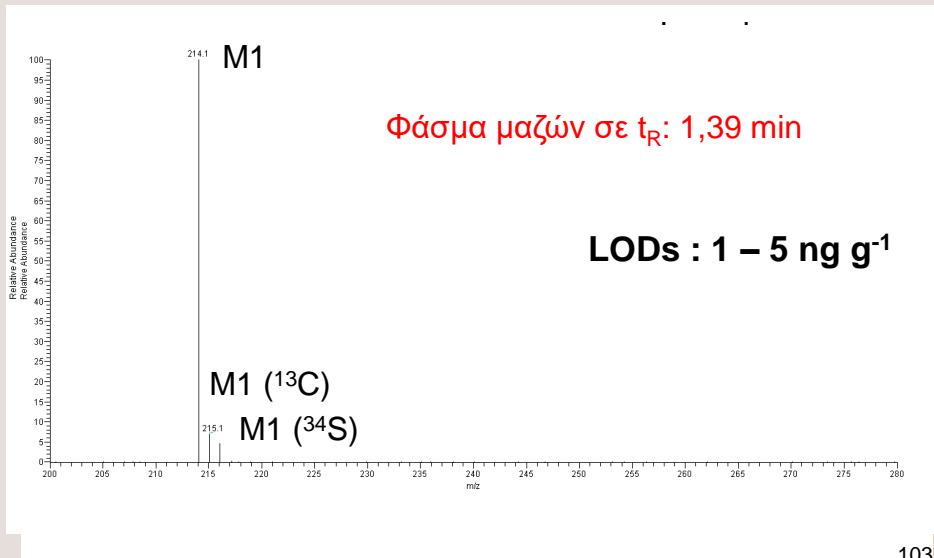
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



65

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

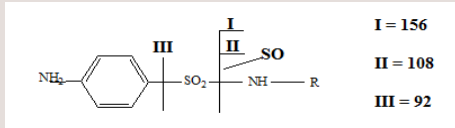
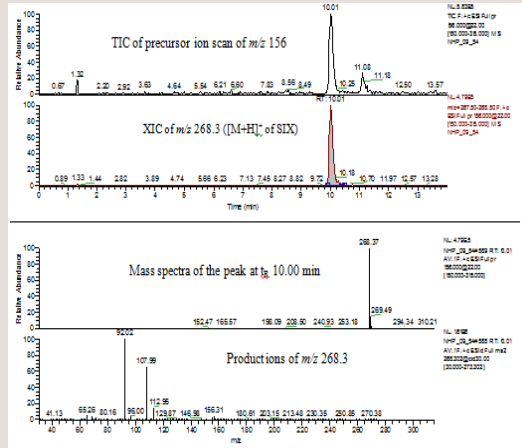
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ



66

DATA DEPENDENT SCANS

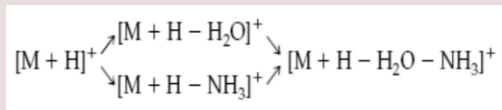
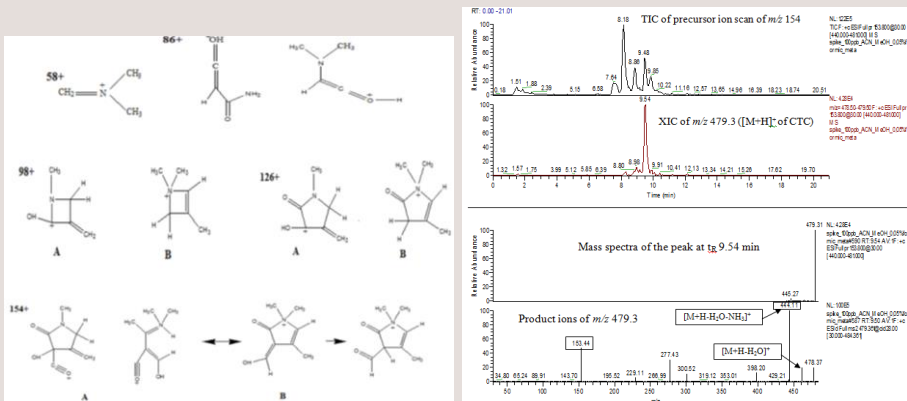
TIC και full-scan φάσμα της sulfisoxazole (SIX) σε δείγμα λαβράκι



67

DATA DEPENDENT SCANS

Θραυσματοποίηση τετρακυκλινών



68

Παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης Selected Reaction Monitoring (SRM)



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

• Πλεονεκτήματα:

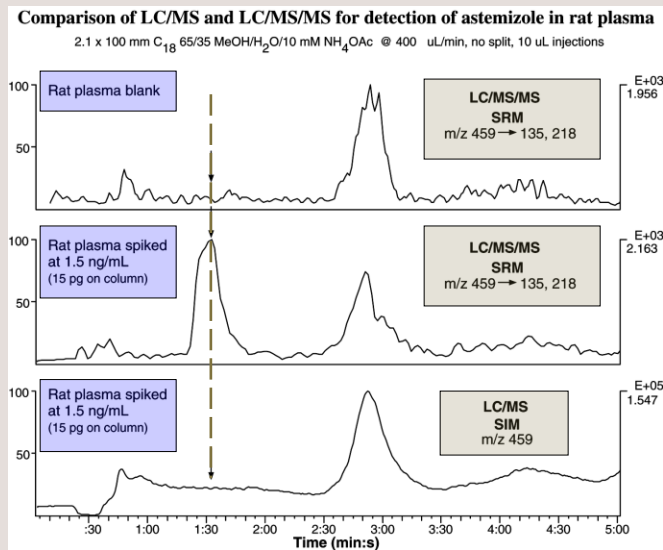
- Παρακολούθηση επιλεγμένου αναλύτη
- Γρήγορη σάρωση
- "Ταυτόχρονη" παρακολούθηση πολλών μεταπτώσεων (MRM)

• Μειονέκτημα:

- Οι πληροφορίες για τη δομή της ένωσης είναι περιορισμένες

69

Εκλεκτικότητα MS/MS σε δείγματα με πολύπλοκη μήτρα



70

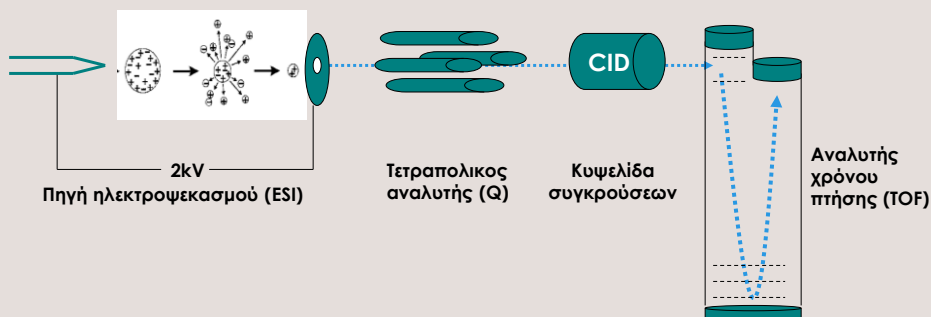
Scan Modes: Quadrupole MS

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

71

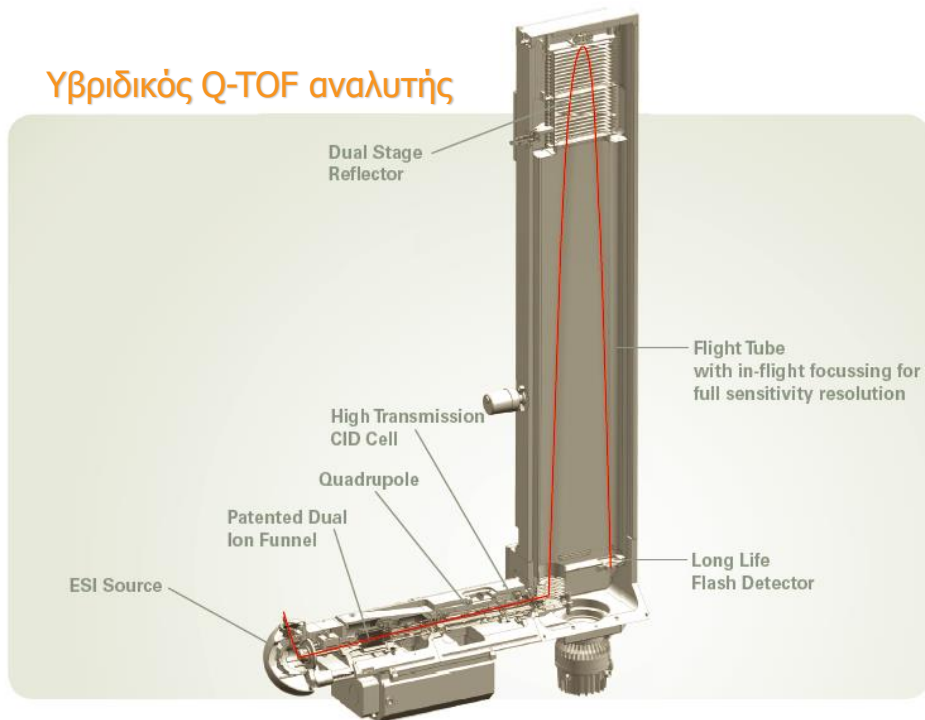
Υβριδικός Q-TOF αναλυτής



- Υψηλή διακριτική ικανότητα ($m/\Delta m \sim 10.000-20.000$, μέγιστο 40.000)
- Ακρίβεια μάζας: $(m_{\text{θεωρ}} - m_{\text{πειραμ}}) \times 10^6 / m_{\text{θεωρ}} \sim 1-5$ ppm
- Υψηλή ευαισθησία: Κατώτερο όριο ανίχνευσης 100 fmol/μL

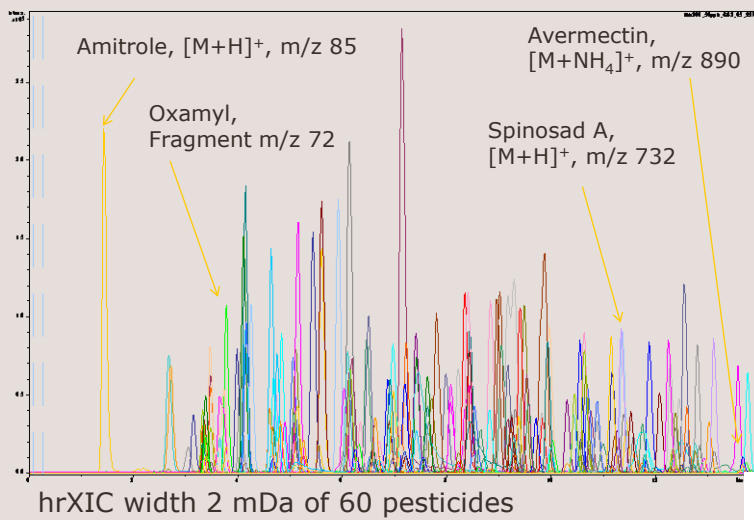
72

Υβριδικός Q-TOF αναλυτής



73

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

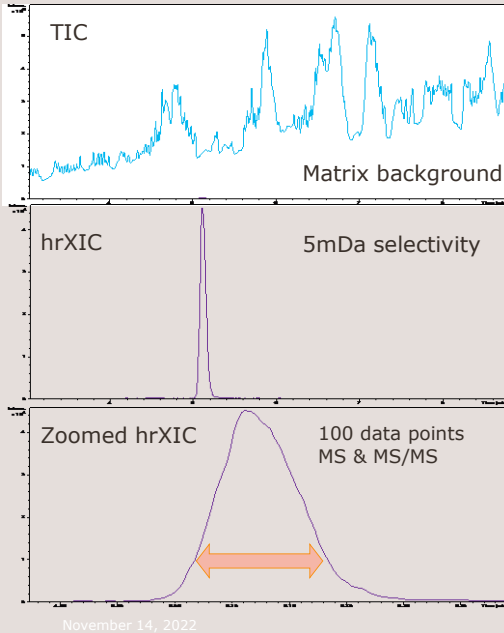


November 14, 2022



74

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)

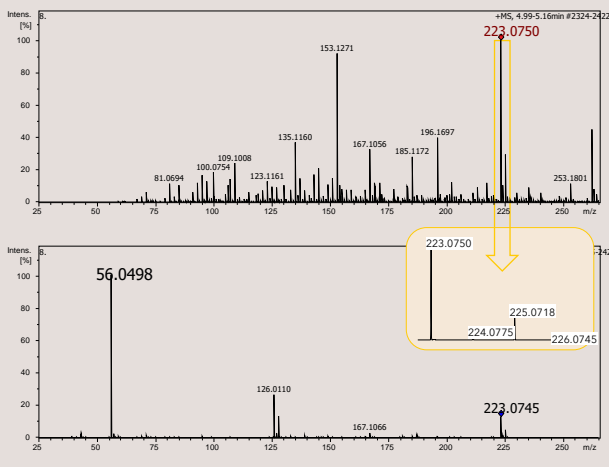
C) Magnified LC peak. High
speed acquisition rate in MS
and MS/MS mode. 100 data
points across this LS peak
allows precise quantitation.

November 14, 2022

75

75

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.

November 14, 2022

76

76

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΓΝΩΣΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ LC-Q-TOF-MS

6 Polyketomycin

Sub ppm mass accuracy

Sum formula generation with SmartFormula3D

SumFormula	m/z calc	err[mDa]	err[ppm]	nSigma	eConf	Comp.mol.wt
<input checked="" type="checkbox"/> C 44 H 49 O 18	865.2913	0.1	0.2	10.1	even	11.6

SumFormula	SumFormula Loss	m/z Loss	Delta SF	m/z calc
<input type="checkbox"/> C 28 H 29 O 13	C 16 H 20 O 5	292.1302	C 12 H 10 O 9	573.1603
<input type="checkbox"/> C 22 H 19 O 11	C 22 H 30 O 7	406.1986	C 6 O 7	459.0922
<input type="checkbox"/> C 22 H 17 O 10	C 22 H 32 O 8	424.2094		441.0816
<input type="checkbox"/> C 16 H 21 O 5	C 28 H 28 O 13	572.1530	H 2 O	293.1384
<input type="checkbox"/> C 16 H 19 O 4	C 28 H 30 O 14	590.1634		275.1278

#	Compound	Compound ID	Database
1	1	Found nothing	HMDB
2	2	Found nothing	METLIN
3	((2S,3R,4R,6S)-6-((3R,3S,6S)-5-((1S,...	4677656	ChemSpider

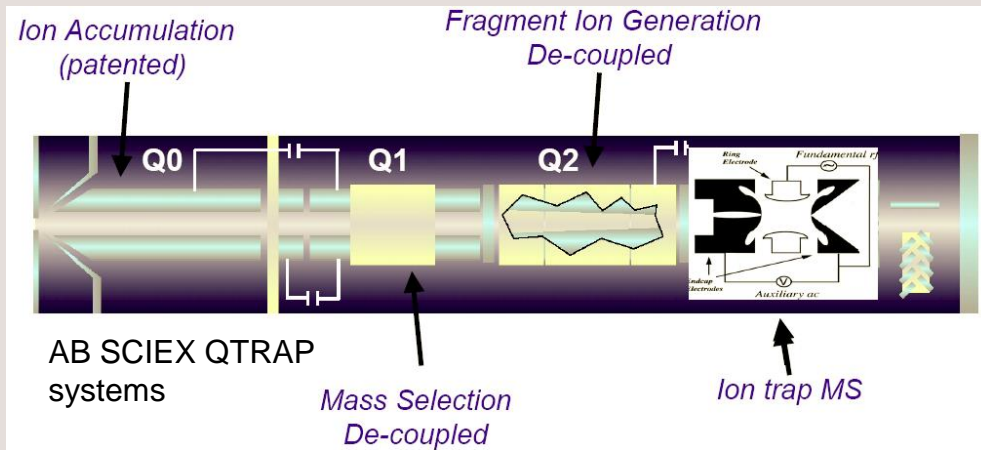
Single hit with interpretation of all fragments

Identification of compound by ChemSpider database search

77

Υβριδικός Q-TRAP αναλυτής

Δυνατότητες και λειτουργίες QqQ + δυνατότητα MSⁿ



78

Υβριδικός Q-TRAP αναλυτής

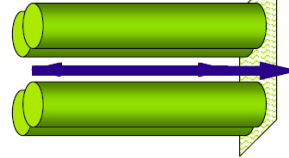
Ion Trap

Full Scan
Sensitivity

MS^3 (or greater)



Hybrid Linear Ion Trap Systems



Full Scan
Sensitivity

MS^3

MRM Sensitivity

Neutral Loss

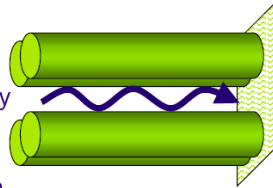
Precursor Scan

QqQ

MRM Sensitivity

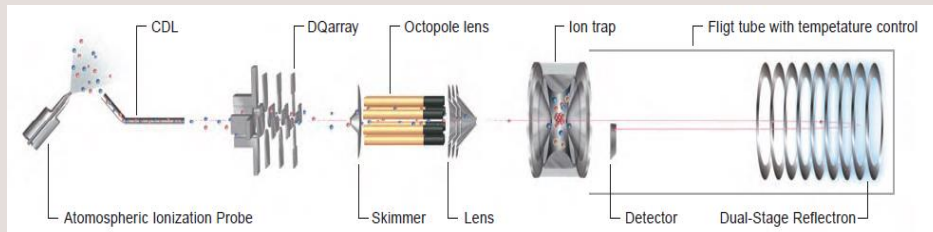
Neutral Loss

Precursor Scan



79

Υβριδικός IT-TOF αναλυτής



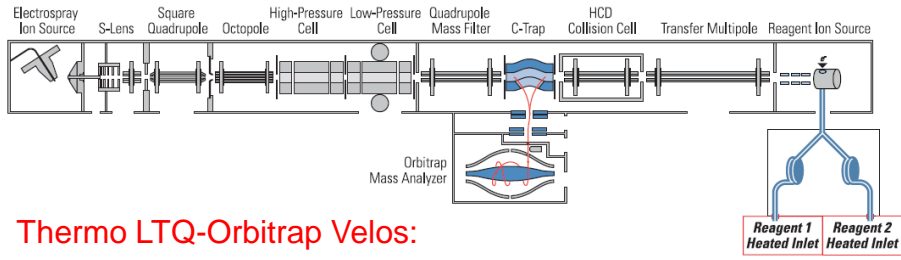
Shimadzu LCMS-IT-TOF

http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=lcms_it_tof

80

Υβριδικός LTQ-ORBITRAP αναλυτής

Schematic of the LTQ Orbitrap Velos



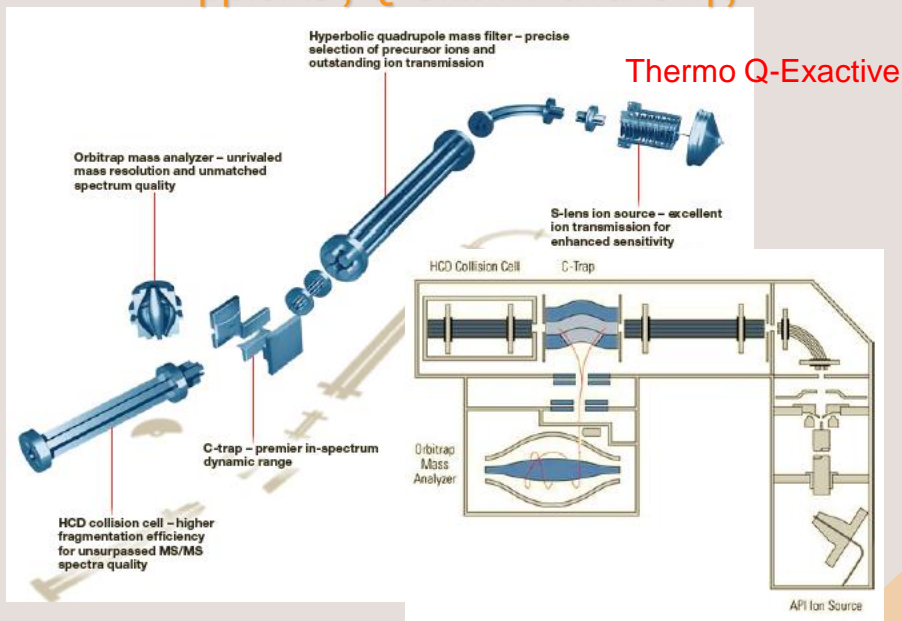
Thermo LTQ-Orbitrap Velos:

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

Πρωτομική, Μεταβολομική, ανακάλυψη και ανάπτυξη
φαρμακευτικών ενώσεων, βιοανάλυση

81

Υβριδικός Q-ORBITRAP αναλυτής



82