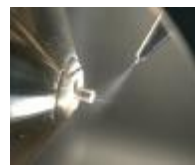
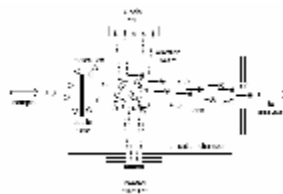
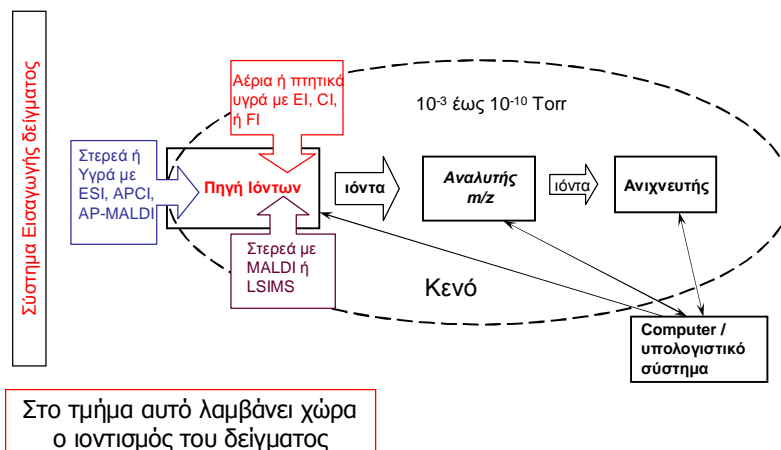


# ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

## MASS SPECTROMETRY (μέρος 2)



## Πηγές Ιόντων



# Πηγές Ιόντων

## Πηγές Αέριας Φάσης:

Το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται

- Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Impact, **EI**)
- Χημικού ιοντισμού (Chemical Ionization, **CI**)

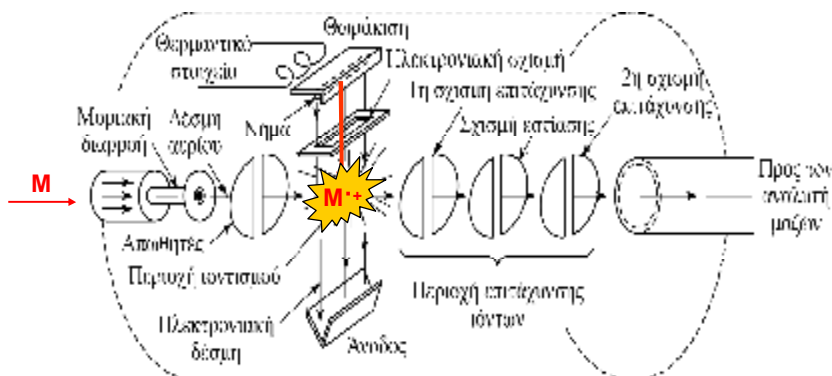
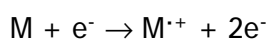
## Πηγές εκρόφησης:

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 Desorption Ionization, **MALDI**)
- Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, **ESI**)

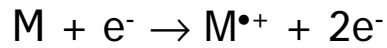
## Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - EI -

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

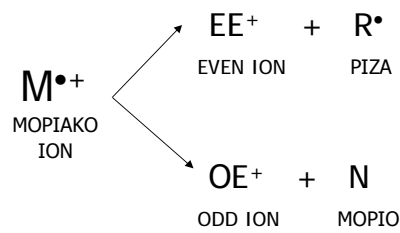


## Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - ΕΙ -

Ιοντισμός :

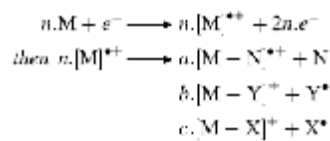
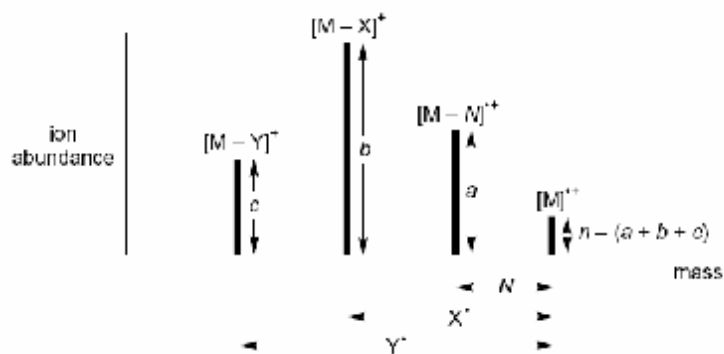


Θραυσματοποίηση :



**Θυγατρικά**  $EE^+$ : ιόν με άρτιο αριθμό e  
**ιόντα:**  $OE^+$ : ιόν με περιττό αριθμό e

## Φάσματα ΕΙ - MS



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

## 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).

## Χημικός Ιοντισμός - CI -

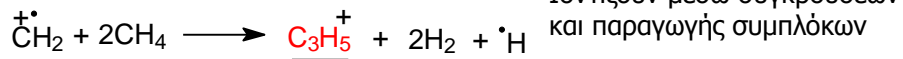
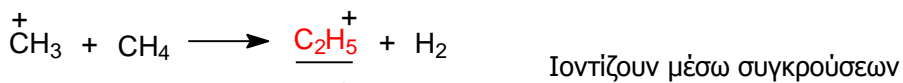
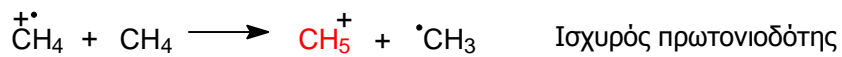
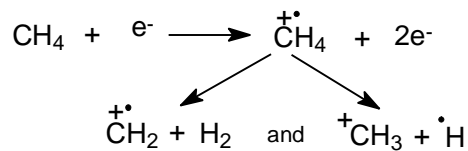
Βομβαρδισμός **αέριου αντιδραστηρίου** (συχνά CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub> ή N<sub>2</sub>) με e<sup>-</sup> υψηλής ενέργειας με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιόντων του αντιδραστηρίου. Τα **αέρια μόρια (M) του δείγματος** συγκρούονται με τα ιόντα του αντιδραστηρίου και τα ιοντίζουν με αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων ή φορτίου, προσθήκης, ακόμα και πυρηνόφιλης υποκατάστασης.

Προϋπόθεση: ο λόγος [αντιδραστηρίου]/[δείγματος]= 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>

**CI Χαμηλής πίεσης:** 10<sup>-3</sup> – 10<sup>-4</sup> Torr, ιδανική για GC-MS

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

## Χημικός Ιοντισμός - CI -



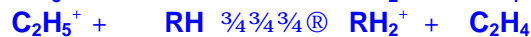
Interpretation of Mass Spectra  
O. D. SPARKMAN AND J. T. WATSON  
Copyright 1978 - 2004 USA

## Τύποι Χημικού Ιοντισμού

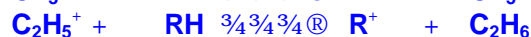
### ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΦΟΡΤΙΟΥ



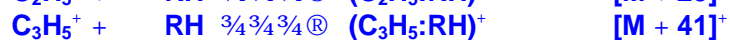
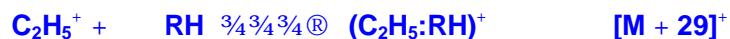
### ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΟΝΙΟΥ



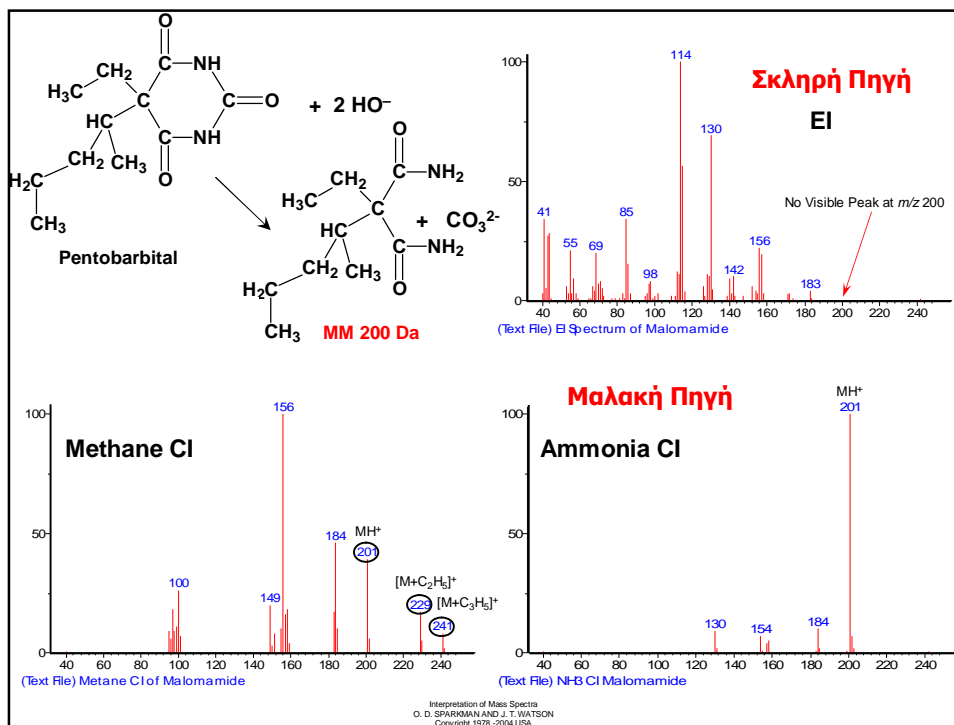
### ΑΠΟΣΠΑΣΗ ΥΔΡΙΔΙΟΥ



### ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗ



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



## 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

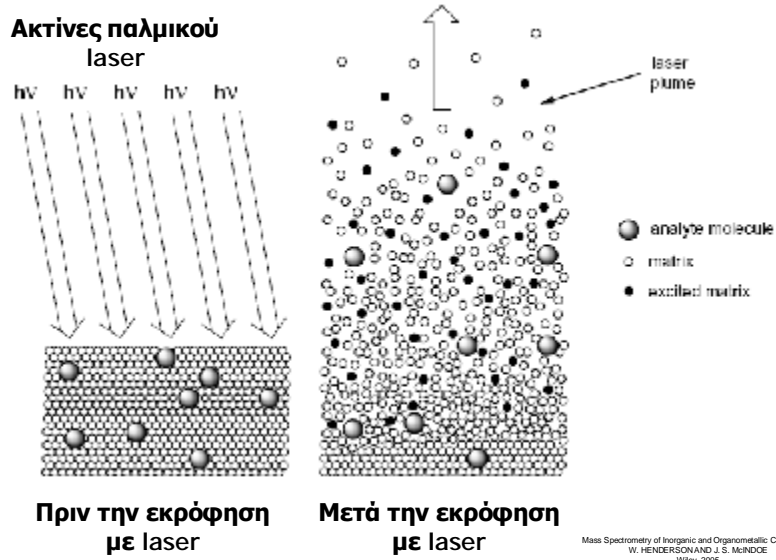
### ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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:

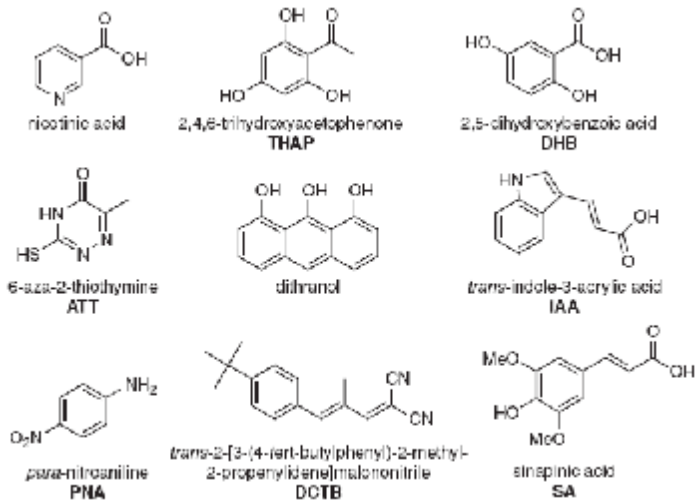
§ Χρησιμοποιείται στην τεχνική GC-MS (Q ή IT) για τον προσδιορισμό μη πολικών μορίων χαμηλής μοριακής μάζας (< 1000 Da).

## Ιοντισμός με εκρόφιση: (A) – MALDI



## - MALDI -

Συχνότερα χρησιμοποιούμενες μήτρες για MALDI



## - 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

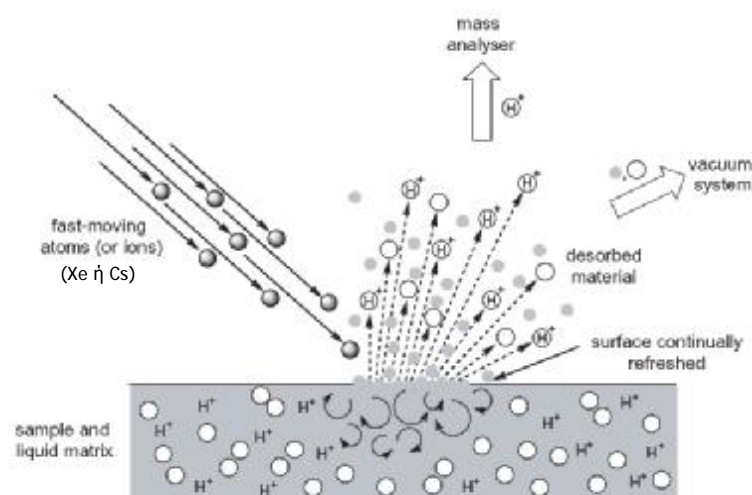
### ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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).

## Ιοντισμός με εκρόφιση: (B) – FAB



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



## - 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).

## Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση

### - API -

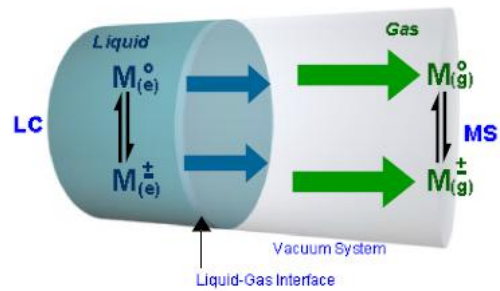
#### • Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)

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

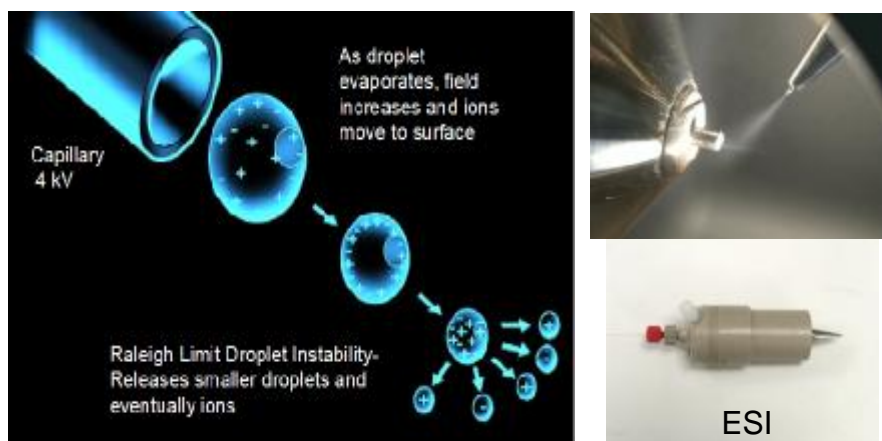
#### • Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure CI, APCI)

Το υγρό δείγμα διέρχεται μέσα από ένα θερμαινόμενο τριχοειδή σωλήνα ( $450^{\circ}\text{C}$ ) και εξατμίζεται, παράγοντας αεριώδη μόρια. Πλησίον της εξόδου του σωλήνα, υπάρχει μια ακίδα σε υψηλή τάση που ιοντίζει τον αέριο διαλύτη ή το  $\text{N}_2$  ( $\text{N}_2^+$ ), το οποίο με τη σειρά του ιοντίζει τα μόρια του αναλύτη στην αέρια φάση (μεταφορά φορτίου)

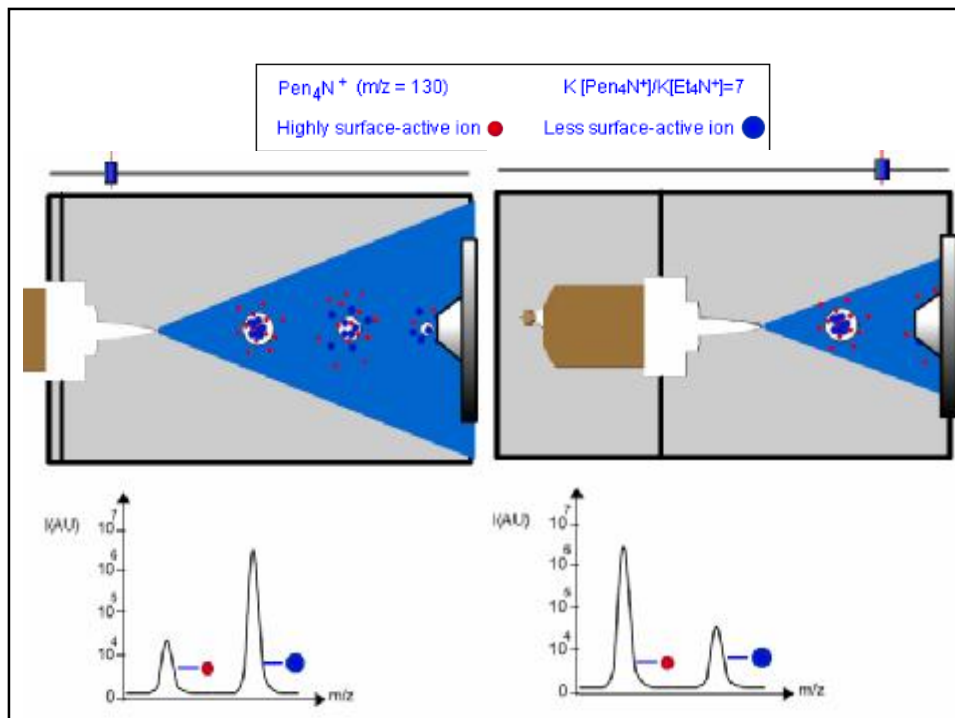
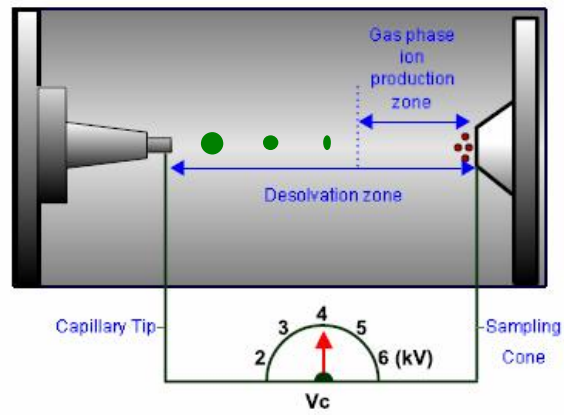
## Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση - API -

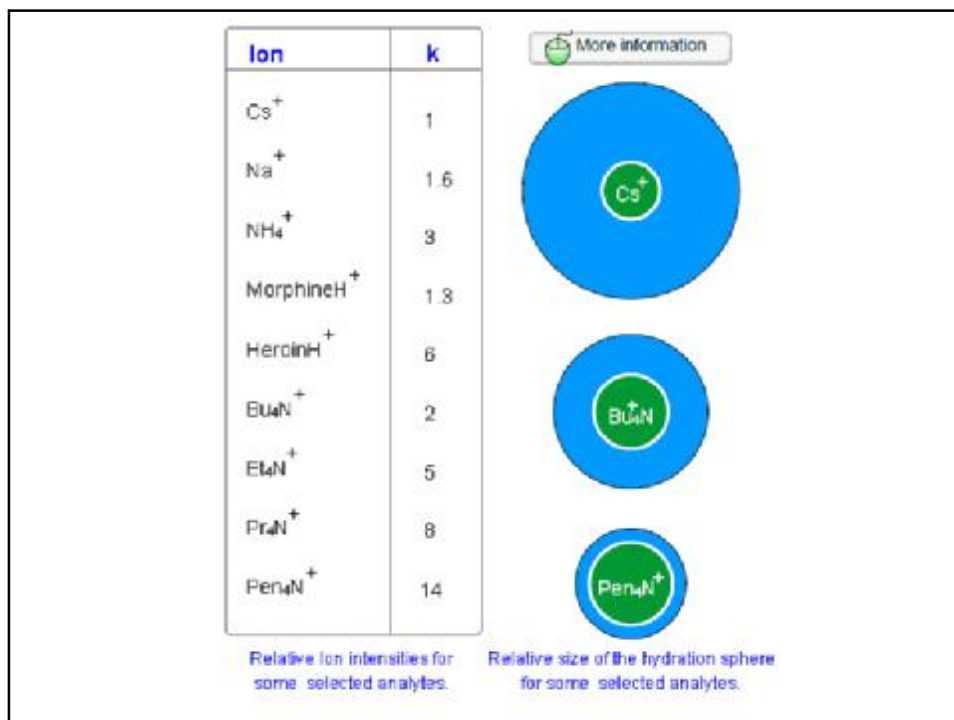


## Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό - ESI -

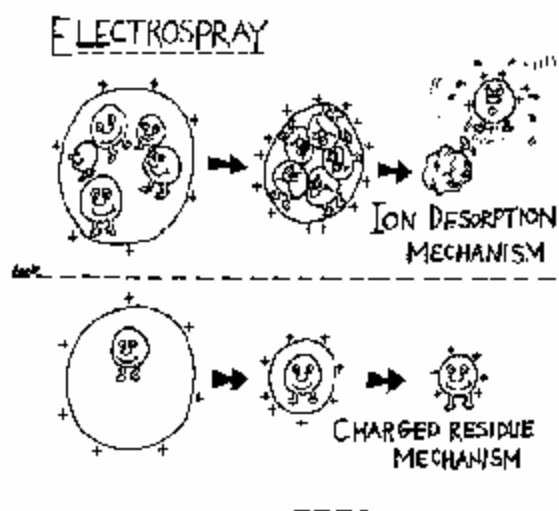


## Ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο - ESI -





## Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό - ESI -



## Electrospray is concentration dependent



$$\text{Conc}_{\max} \propto \frac{D^2 \text{ Column 1}}{D^2 \text{ Column 2}}$$

*nanospray*

Column Diameter	4.6 mm	3.0 mm	2.1 mm	1.0 mm	300 $\mu\text{m}$	180 $\mu\text{m}$	75 $\mu\text{m}$
Flow Rate	1.0 ml/min	0.5 ml/min	0.2 ml/min	50 $\mu\text{l}/\text{min}$	3.0 $\mu\text{l}/\text{min}$	700 nl/min	200 nl/min
Theoretical increase	1	2.3	5	21	235	653	3765



## - 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

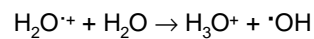
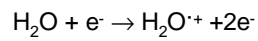
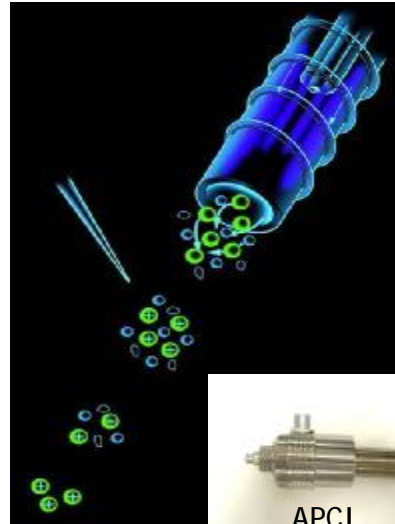
### ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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:

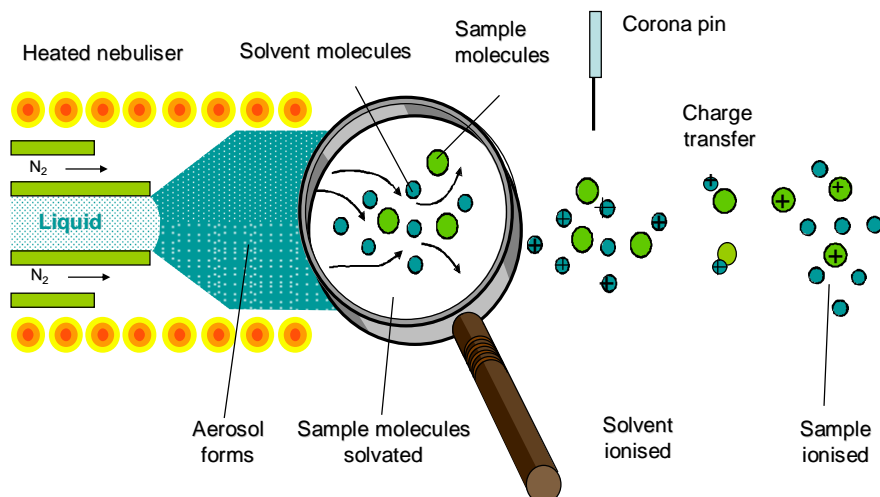
§ Χρησιμοποιείται με όργανα LC-MS για τον προσδιορισμό μορίων μεγάλου εύρους μαζών (από μικρά πολικά μόρια έως μεγάλα βιομόρια)

## Χημικός Ιοντισμός σε Α.Π. - APCI -



APCI

## Μηχανισμός παραγωγής ιόντων στον APCI



## - 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:

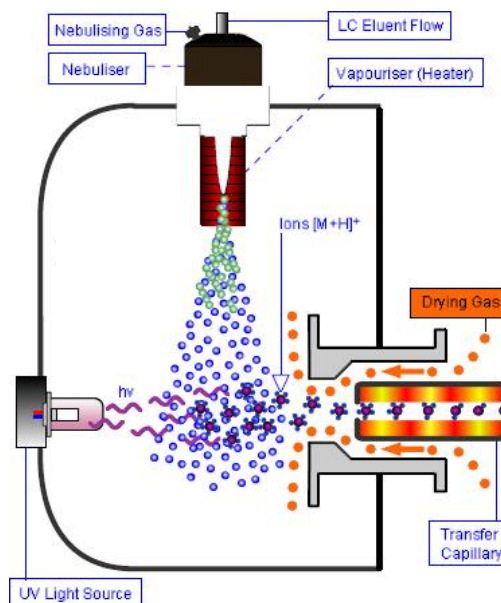
- Ακατάλληλη για ενώσεις με  $MB > 2000$ . Δεν σχηματίζει σειρές πολλαπλών φορτίων και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προσδιορισμούς μεγάλων βιομορίων
- Οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες δεν επιτρέπουν τη μελέτη θερμοκά ασταθών μορίων (θερμοδιάσπαση ευπαθών μορίων)
- Αυξημένος θόρυβος σε χαμηλές τιμές m/z
- Απαραίτητη η χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων

### ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

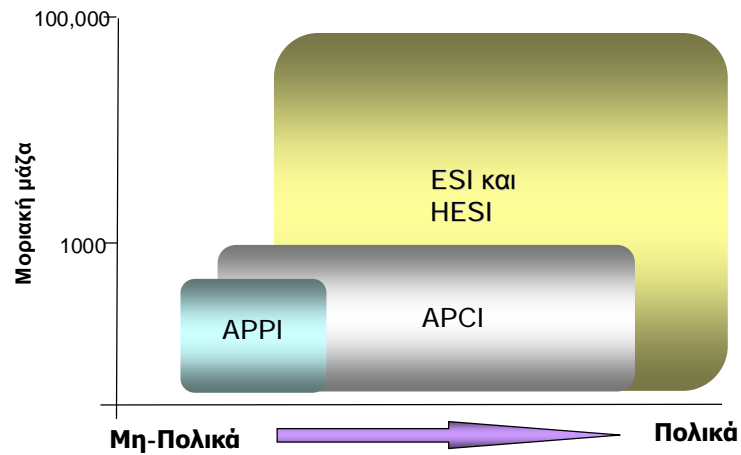
§ Χρησιμοποιείται με όργανα LC-MS για τον προσδιορισμό μετρίως πολικών μορίων μικρών μοριακών μαζών

## - APPI -

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



## Σύγκριση ESI – APCI



## 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)



## Σύζευξη HPLC με 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.)

## Σύζευξη HPLC με MS

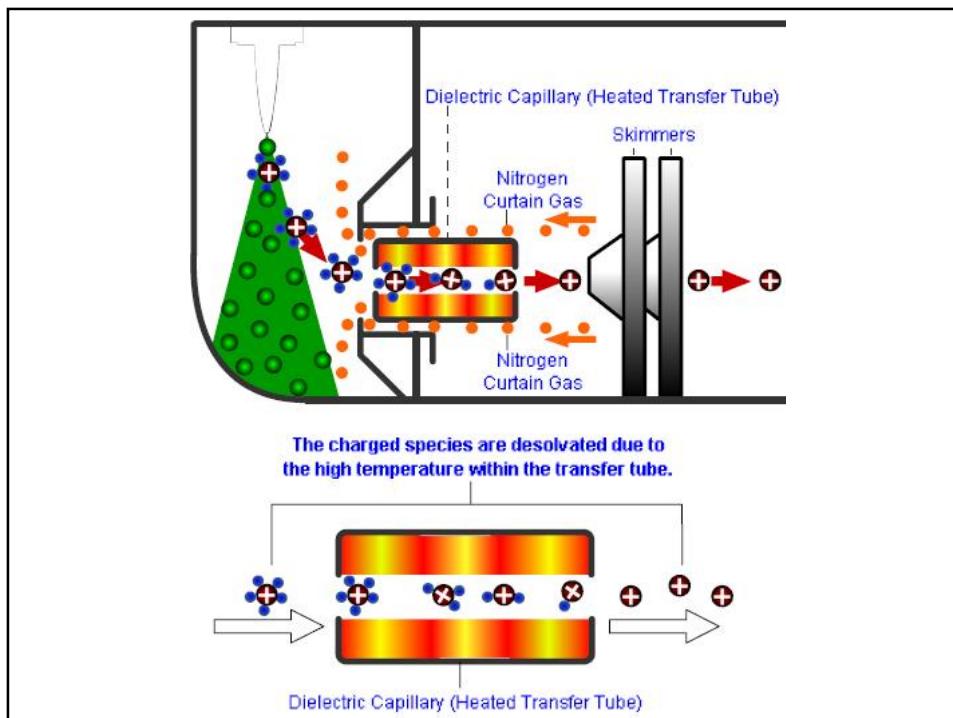
### Προβλήματα Σύζευξης

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**

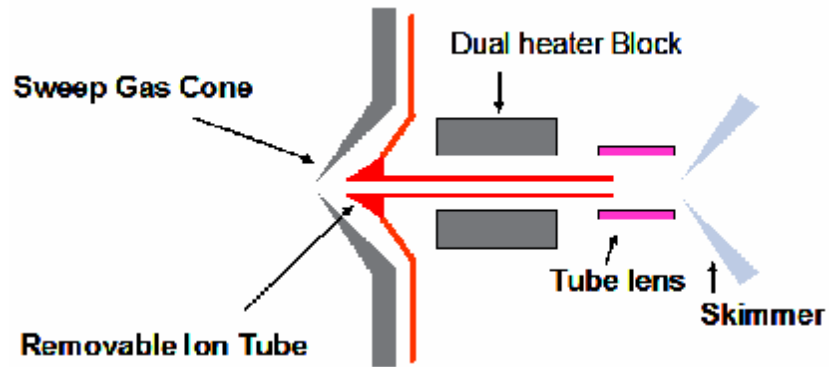
## Σύζευξη HPLC με MS

### 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 ( $\text{HCOOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , τριαιθυλαμίνη)
4. Χρήση νέων τεχνικών ιοντισμού: ESI, APCI, MALDI

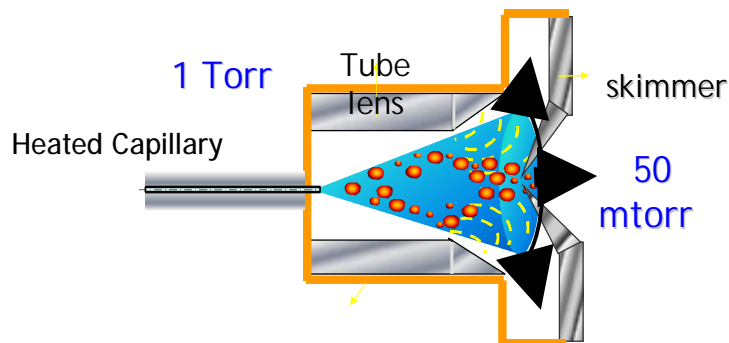


## API Stack Components



Ion Transfer Capillary is offset relative to skimmer

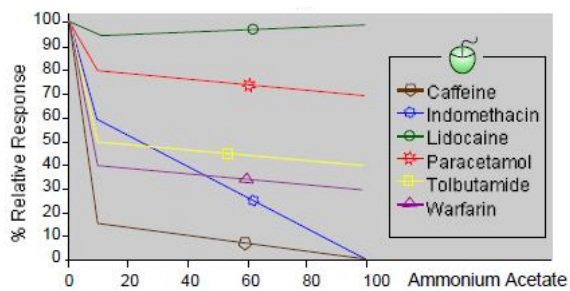
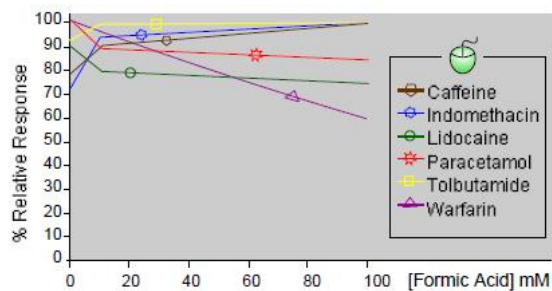
## API Stack – Heated Capillary, Tube lens and Skimmer



- ü Heated Capillary is slightly off-axis to assist with the removal of neutrals.
- ü Tube lens is tunable and is important for sensitivity: **The tube lens is flow rate, temperature and mass dependent**
- ü Skimmer is at ground potential, Ions are “pushed” towards the skimmer

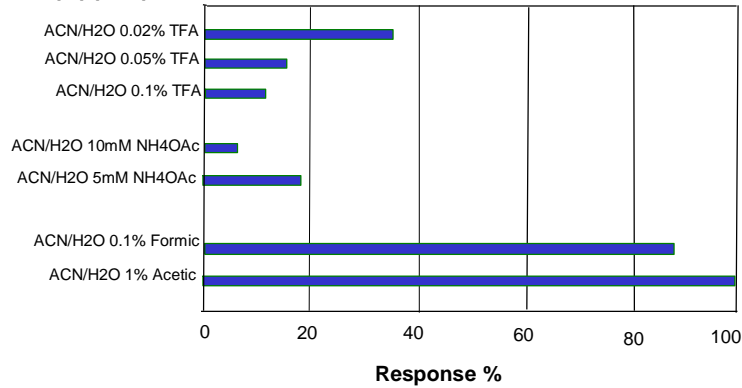
## Προτεινόμενα LC/MS Additives & Buffers

Acetic Acid (0.05 – 0.5%)	}	Proton Donors
Formic Acid (0.01 – 0.5%)		
Ammonium Hydroxide	}	Proton Acceptors
Ammonia Solutions		
Trichloroacetic Acid (< 0.1% v/v)	}	Chromatographic Separation
Trifluoroacetic Acid (< 0.1% v/v)		
Ammonium Acetate (5 - 10 mM)	}	Buffers
Ammonium Formate (5 - 10mM)		



## Παράδειγμα επίδρασης της επιλογής κινητής φάσης στο σήμα

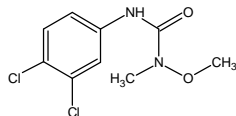
### Κινητή φάση



## LC – MS

### Θετικός ιοντισμός

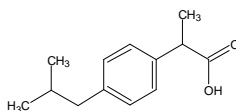
- Βάσεις (-NH<sub>2</sub>):
- |                            |      |                                      |
|----------------------------|------|--------------------------------------|
| <chem>[M+H]^+</chem>       | M+1  | <b>Ιόντα προσθήκης<br/>(Adducts)</b> |
| <chem>[M+NH4]^+</chem>     | M+18 |                                      |
| <chem>[M+Na]^+</chem>      | M+23 |                                      |
| <chem>[M+K]^+</chem>       | M+39 |                                      |
| <chem>[M+MeOH+H]^+</chem>  | M+32 |                                      |
| <chem>[M+CH3CN+H]^+</chem> | M+42 |                                      |



Linuron

### Αρνητικός ιοντισμός

- Οξέα (-COOH, -OH):
- |                              |      |
|------------------------------|------|
| <chem>[M-H]^-</chem>         | M-1  |
| <chem>[M+CH3COOH-H]^-</chem> | M+59 |
| <chem>[M+HCOOH-H]^-</chem>   | M+45 |

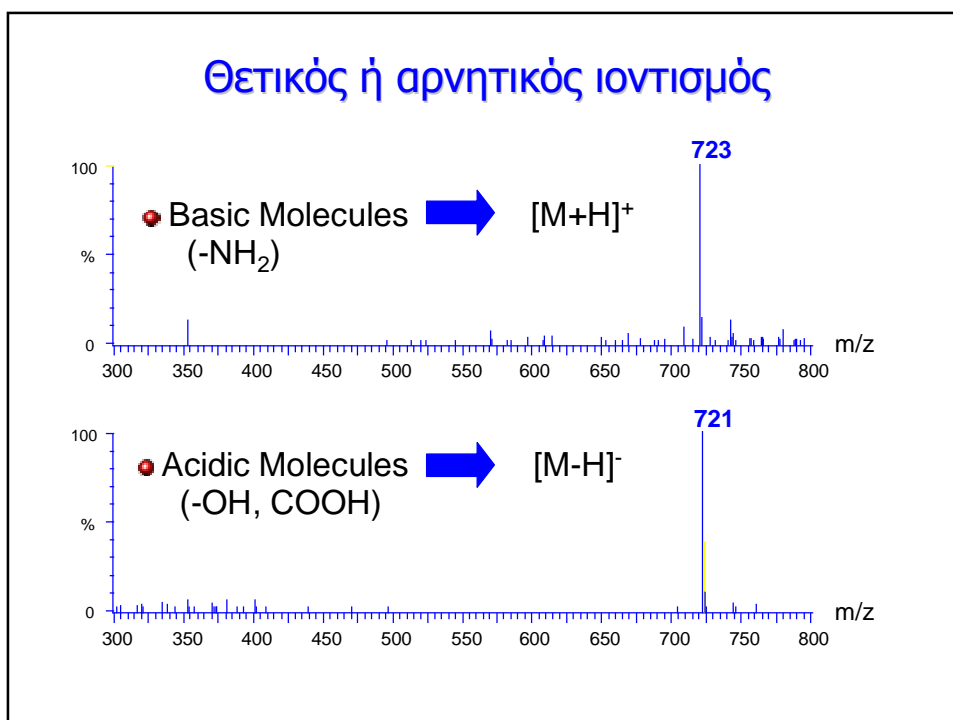


Ibuprofen

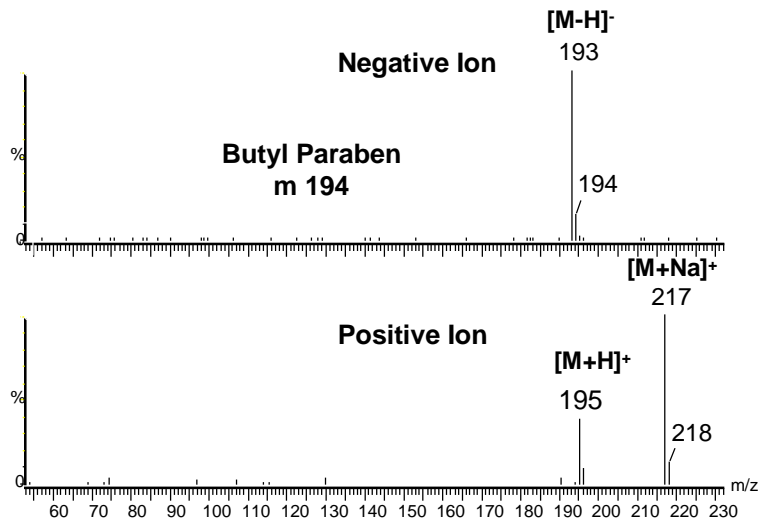
Adduct ions Positive ESI		
Observed	Explanation	Mass
$[M+H]^+$	Protonation	$M + 1$
$[M+H+NH_4]^+$	Mainly when using $CH_3NH_4$	$M + 18$
$[M+H+nH_2O]^+$	$M + H_2O$ adduct	$M + 1 + 18 \cdot n$
$[M+H+H_2O]^+$	$M + H_2O$ adduct	$M + 19$
$[M+H+Na]^+$	$M + Na$ adduct	$M + 24$
$[M+H+K]^+$	$M + K$ adduct	$M + 40$
$[M+H+CH_3CN]^+$	Mainly when using acetonitrile	$M + 42$
$[2M+H]^+$	Analyte dimerization	$2 \cdot M + 1$
$[M+H+CH_3CN]^+$	In presence of $CH_3CN$	$M + 42$
$[M+H+CH_3CN+nH_2O]^+$	Adduct of $CH_3CN$ and $H_2O$	$M + 42 + 18 \cdot n$

Adduct ions Negative ESI		
Observed	Explanation	Mass
$[M-H]^-$	Deprotonation	$M - 1$
$[M-H+nH_2O]^-$	Deprotonation and water	$M - 1 - 18 \cdot n$
$[M+Cl]^-$ ( $M+35.5$ )	Ion attachment	$M + 35.5$
$[M-2H+Na]^-$	$M + Na$ adduct	$M + 21$
$[M-H-CO_2]^-$	Carbon dioxide losses	$M - 45$



## Polarity Switching



## ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

### LC-MS/MS ΜΕΘΟΔΟΥ:

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΙΟΚΤΟΝΩΝ IRGAROL 1051,  
DIURON ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ  
ΤΟΥΣ ΜΕ LC-MS/MS ΣΕ ΝΕΡΟ, ΙΖΗΜΑ ΚΑΙ ΜΥΔΙΑ

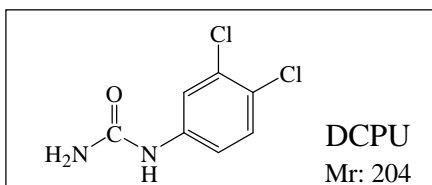
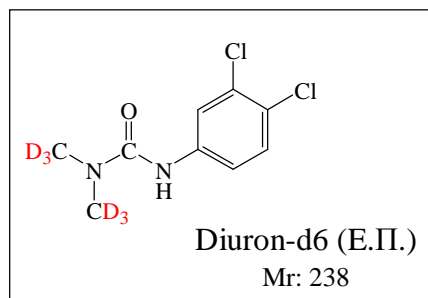
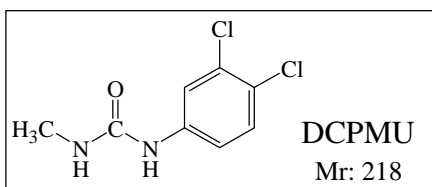
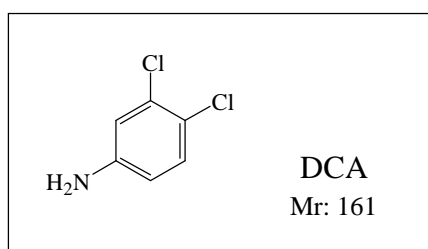
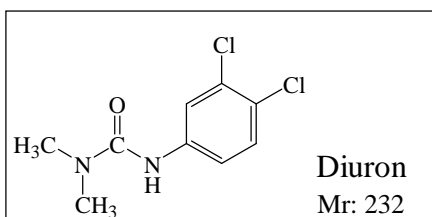
Maragou NC, Rosenberg E, Thomaidis NS\*, Koupparis MA, *Journal of Chromatography A*, 2008, 1202, 47-57

Maragou NC, Thomaidis NS\*, Koupparis MA, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2011, 22, 1826-1838

## ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

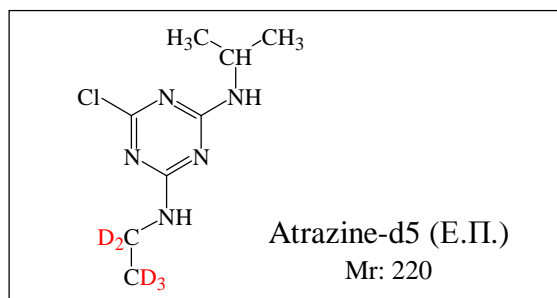
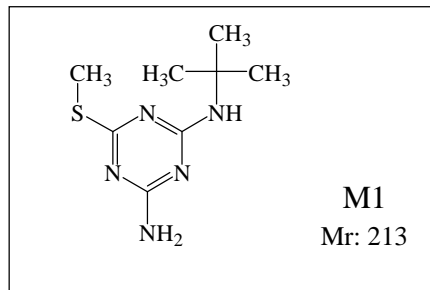
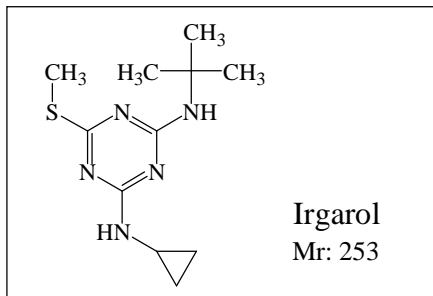
- Ανάπτυξη μεθόδου SRM για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 2 βιοκτόνων ενώσεων και των 4 προϊόντων αποικοδόμησής τους σε περιβαλλοντικά δείγματα με την ελάχιστη δυνατή προετοιμασία.
- **Ανάπτυξη ενιαίας στρατηγικής βελτιστοποίησης μεθόδων LC-MS/MS με εφαρμογή πειραματικού σχεδιασμού.**
- Ιοντισμός DCA. Μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων ιοντισμού με ESI και APCI και σύγκριση.
- Μελέτη του φαινομένου μήτρας με περιβαλλοντικά δείγματα.

## ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΦΑΙΝΥΛΟΥΡΙΩΝ + DCA





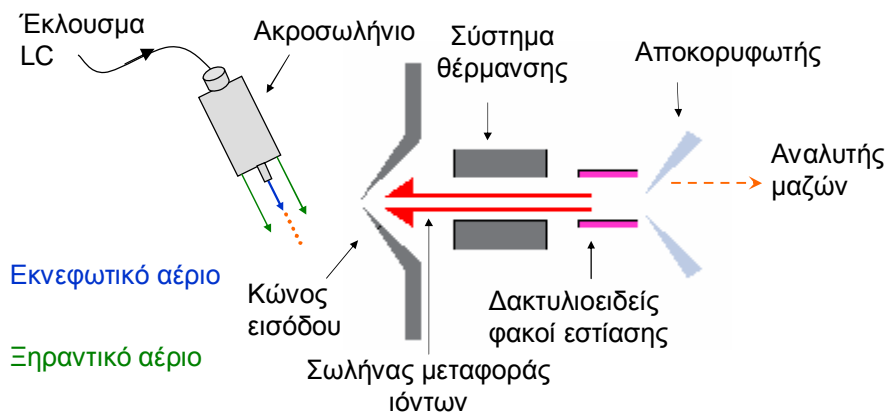
## ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΤΡΙΑΖΙΝΩΝ



## ΣΥΣΤΗΜΑ LC – API – MS/MS

ØThermo TSQ Quantum Access

ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΔΙΑΔΡΟΜΗ ΕΣΤΙΑΣΗΣ ΙΟΝΤΩΝ



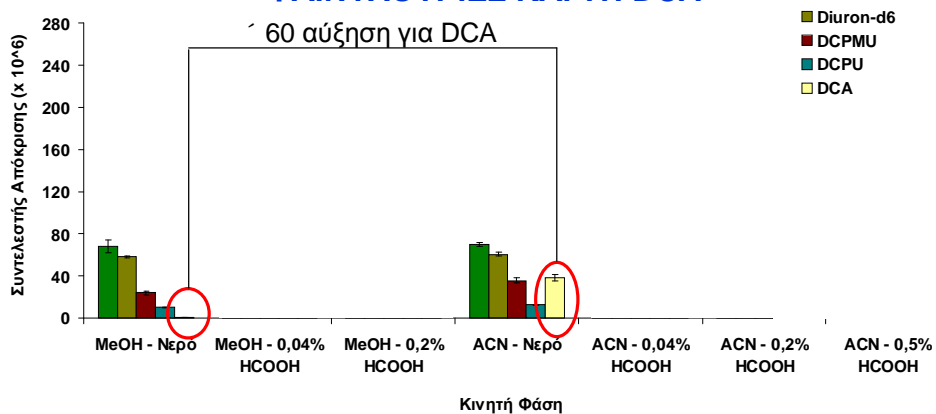
ØUHPLC Accela, Στήλη: Thermo C18 Hypersil Gold, (50 mm × 2,1 mm, 1,9 μm)

## ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS/MS



## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΟ ESI(+) ΓΙΑ ΤΙΣ ΦΑΙΝΥΛΟΥΡΙΕΣ ΚΑΙ ΤΗ DCA

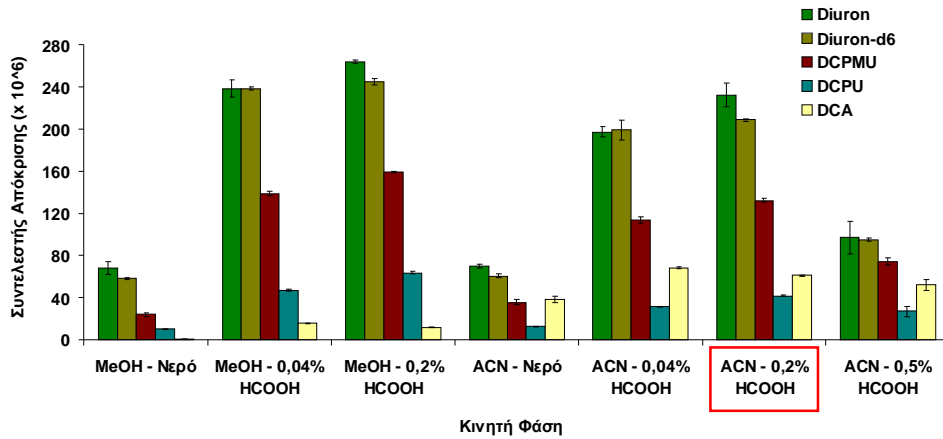


⊗ Μοντέλο εξάτμισης ιόντος - Ισχυρότεροι διαμοριακοί δεσμοί DCA-MeOH (δεσμοί-H)

⊗ Χαμηλότερο ιξώδες μίγματος ACN/H<sub>2</sub>O → μεγαλύτερη κινητικότητα ιόντων → ευκολότερος διαχωρισμός φορτίων

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

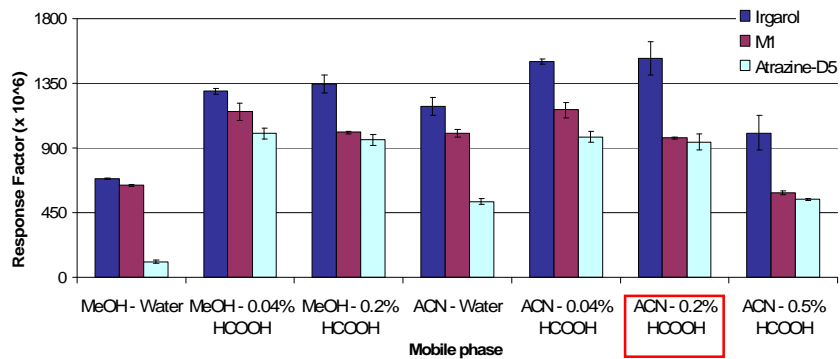
### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΟ ESI(+) ΓΙΑ ΤΙΣ ΦΑΙΝΥΛΟΥΡΙΕΣ ΚΑΙ ΤΗ DCA



- Ø Επίδραση HCOOH: Σημαντική βελτίωση όλων των Σ.Α. και στους 2 δ/τες
- Ø Μετατόπιση της ισορροπίας διάστασης των μορίων προς την πρωτονιωμένη τους μορφή μέσα στο διάλυμα.

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

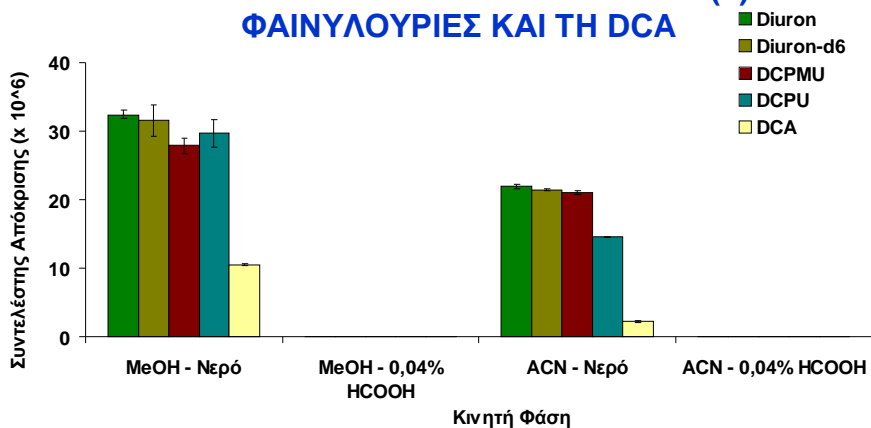
### Effect of MP on ESI (+) for triazines



- Ø Effect of organic solvent: improvement of RF with ACN
- Ø Effect of formic acid: improvement of RF in both solvents - optimum

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

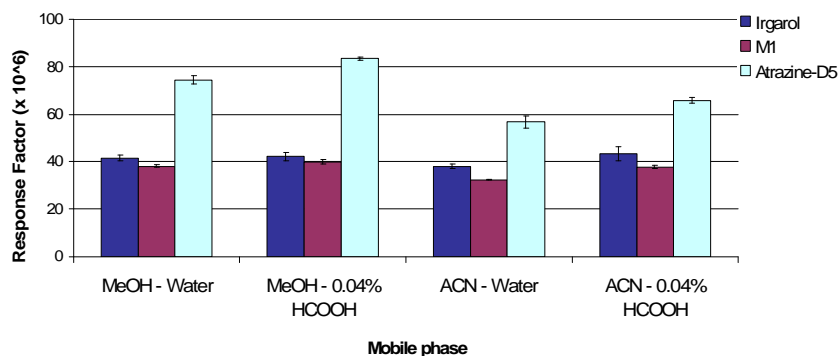
### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΟ ΑΡCΙ(+) ΓΙΑ ΤΙΣ ΦΑΙΝΥΛΟΥΡΙΕΣ ΚΑΙ ΤΗ DCA



- Ø Επίδραση οργανικού διαλύτη: μείωση των Σ.Α. παρουσία ACN.  $[\text{MeOH}+\text{H}]^+$  ισχυρότερο οξύ → καλύτερο “αντιδρών-ιόν” χημικού ιοντισμού
- Ø Επίδραση HCOOH: Μη σημαντική επίδραση σε κανέναν δ/τη

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

### Effect of MP on APCI (+) for triazines



- Ø Effect of organic solvent: No significant impact of RF
- Ø Effect of formic acid: No significant impact of RF in both solvents

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

### Σύγκριση ESI και APCI

Κανονικοποιημένοι Συντελεστές Απόκρισης στις βέλτιστες Κ.Φ.

	ESI (+)	ESI (-)	APCI (+)	APCI (-)
Diuron	100	2	14	0
Diuron-D6	93	n.a.	14	n.a.
DCPMU	60	4	12	0
DCPU	24	2	12	0
DCA	26	0	4	0
Irgarol	100	0	3	0
M1	76	0	3	0
Atrazine-D5	66	0	5	0

n.a.: not applicable

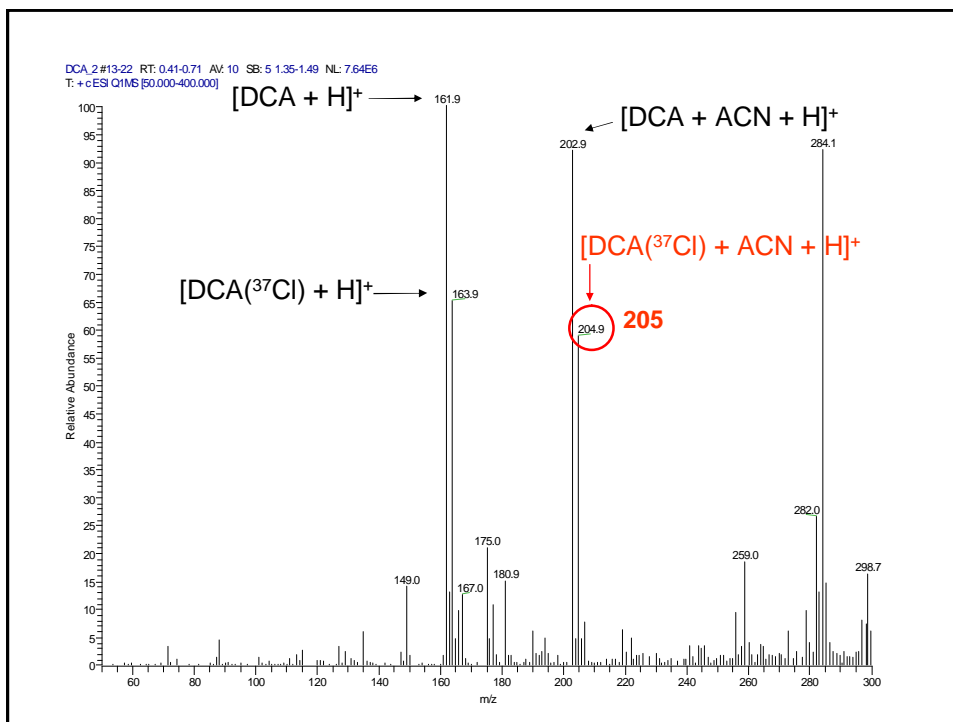
## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

### Σύγκριση ESI και APCI

Κανονικοποιημένοι Συντελεστές Απόκρισης στις βέλτιστες Κ.Φ.

	ESI (+)	ESI (-)	APCI (+)	APCI (-)
Diuron	100	2	14	0
Diuron-D6	93	n.a.	14	n.a.
DCPMU	60	4	12	0
DCPU	24	2	12	0
DCA	26	0	4	0
Irgarol	100	0	3	0
M1	76	0	3	0
Atrazine-D5	66	0	5	0

n.a.: not applicable



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ (DESIGN OF EXPERIMENTS, DOE)

Συστηματικός τρόπος εκτέλεσης πειραμάτων που επιτρέπει την εξαγωγή του μέγιστου αριθμού πληροφοριών από τον ελάχιστο αριθμό δεδομένων.

∅ Σχεδιασμός σειράς πειραμάτων με καθορισμένες μεταβολές πολλαπλών μεταβλητών ταυτόχρονα

∅ Ανάλυση των δεδομένων → ταυτοποίηση:

(α) μεταβλητών που επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα

(β) μεταβλητών που δεν επηρεάζουν τα αποτελέσματα

(γ) παρουσίας αλληλεπιδράσεων, και

(δ) βέλτιστων συνθηκών

### Εργαλεία στατιστικής:

επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, συνθήκες τυχαιότητας, εκτέλεση ομαδοποιημένων μετρήσεων



### Αντικειμενικά συμπεράσματα

παρουσία σφαλμάτων, θορύβου και άγνωστων μεταβλητών

Παραγοντικός σχεδιασμός: 2 ή 3 επίπεδα για κάθε παράγοντα, k παράγοντες (αριθμός πειραμάτων  $2^k$  ή  $3^k$ )

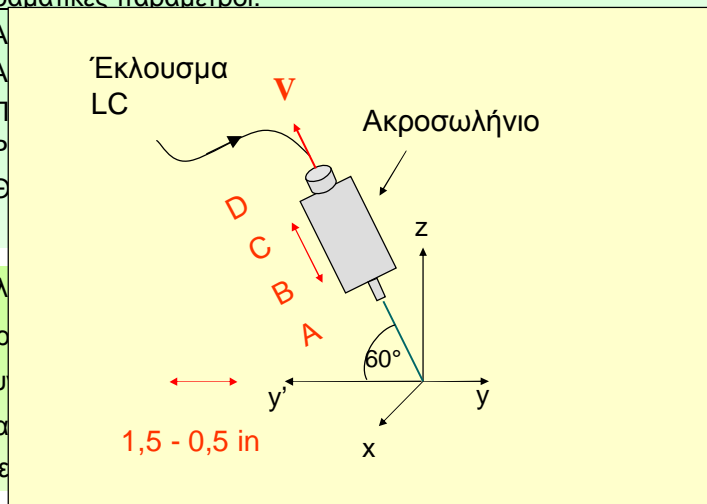
## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ESI

### Πειράματα διαλογής

Πειραματικές παράμετροι:

1. A
2. A
3. Π
4. Ρ
5. Θ

- Πλ
- Πρ
- Συ
- Κα
- Με



ράματα

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ESI

### Πειράματα διαλογής

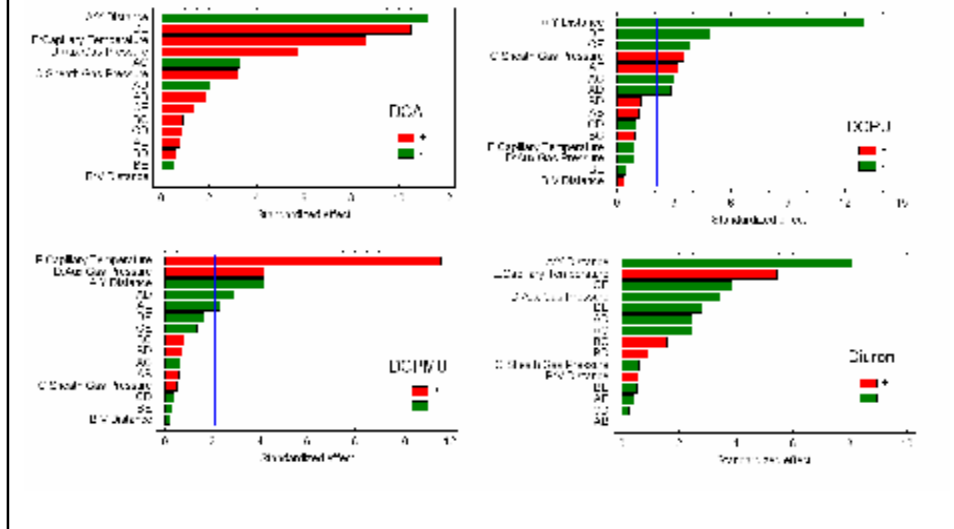
Κανονικοποιημένο διαγράμμα pareto



✓ Η DCA απαιτεί έντονες συνθήκες αποδιαλύτωσης

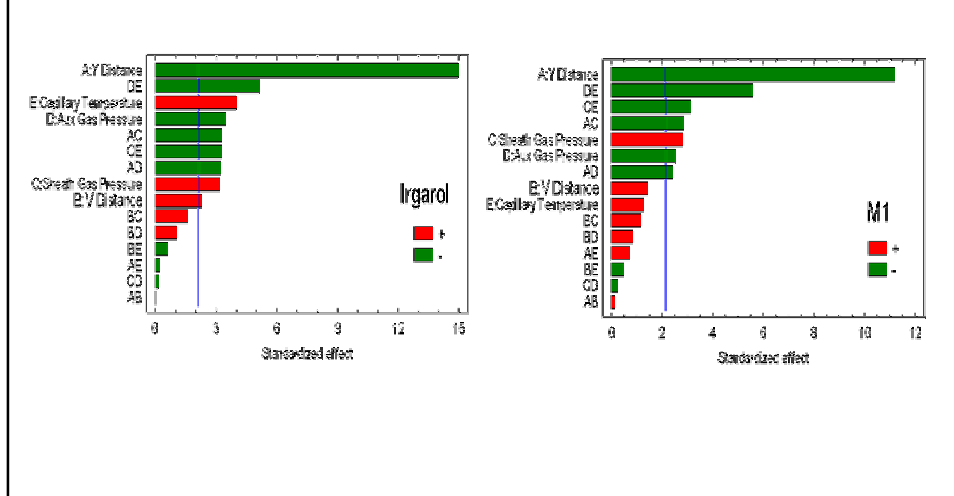
## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ESI

Standardised pareto charts (A)



## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ESI

Standardised pareto charts (B)





## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ESI

### Πειράματα διαλογής

- Οι επιδράσεις των παραμέτρων ESI εξαρτώνται από τη φύση της ουσίας
- Κρίσιμες παράμετροι: Απόσταση-Υ (για όλες τις ενώσεις), Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων > Εκνεφωτικό αέριο, Ξηραντικό αέριο
- Συνδυασμένες επιδράσεις: Θερμοκρασία – Ξηραντικό αέριο > Θερμοκρασία – Εκνεφωτικό αέριο, Απόσταση-Υ – Εκνεφωτικό αέριο, Απόσταση-Υ – Ξηραντικό αέριο, Απόσταση-Υ – Θερμοκρασία

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ESI

### Πειράματα απόκρισης επιφάνειας

- Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (CCD):  $2^4 + \text{star}$ , 36 πειράματα
- Πρότυπο δ/μα μίγματος 200 ng mL<sup>-1</sup>
- Συνθήκες FIA
- Καταγραφή σημάτων SIM
- Μεταβλητές απόκρισης: Εμβαδά κορυφής [M+1]<sup>+</sup>

Παράμετροι	Επίπεδα				
	-α	-1	0	+1	+α
Απόσταση-Υ (in)	0,55	0,7	0,85	1,0	1,15
Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (°C)	270	300	330	360	390
Ροή ξηραντικού αερίου (αυθ.μον.)	7	13	19	25	31
Πίεση εκνεφωτικού αερίου(psi)	20	30	40	50	60

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ESI

### Πειράματα απόκρισης επιφάνειας

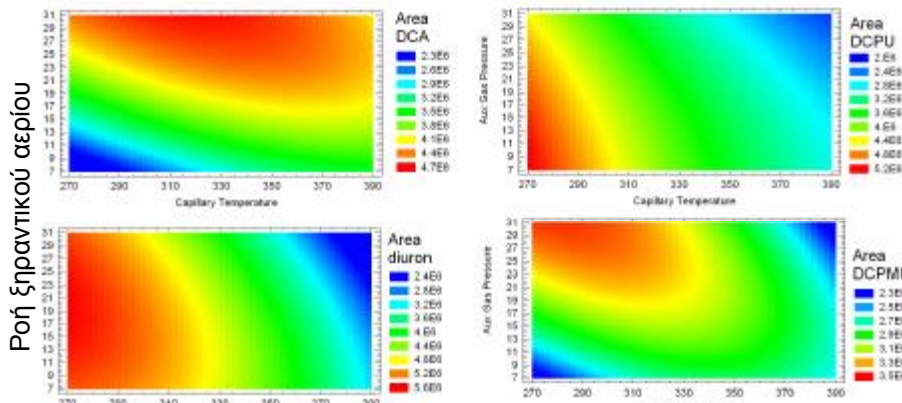
Βέλτιστες τιμές για όλες τις ενώσεις:

Απόσταση-Y: 0,55 in, Πίεση εκνεφ. αερίου: 60 psi

∅ Οι DCA + DCPU έχουν τη χαμηλότερη ευαισθησία



∅ Διαφορετικά βέλτιστα

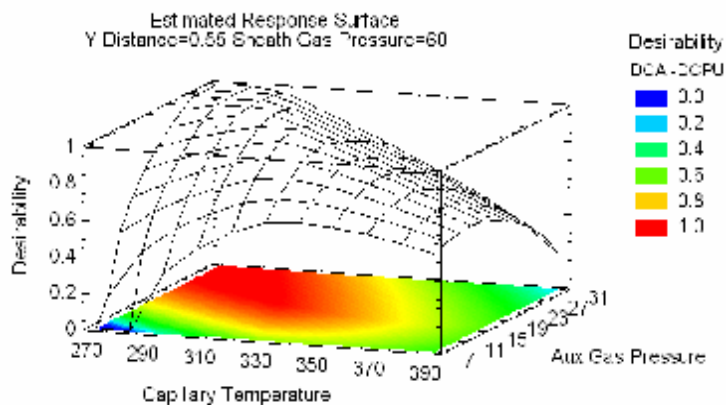


Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ESI

### Βελτιστοποίηση πολλαπλών αποκρίσεων για τη DCA και τη DCPU

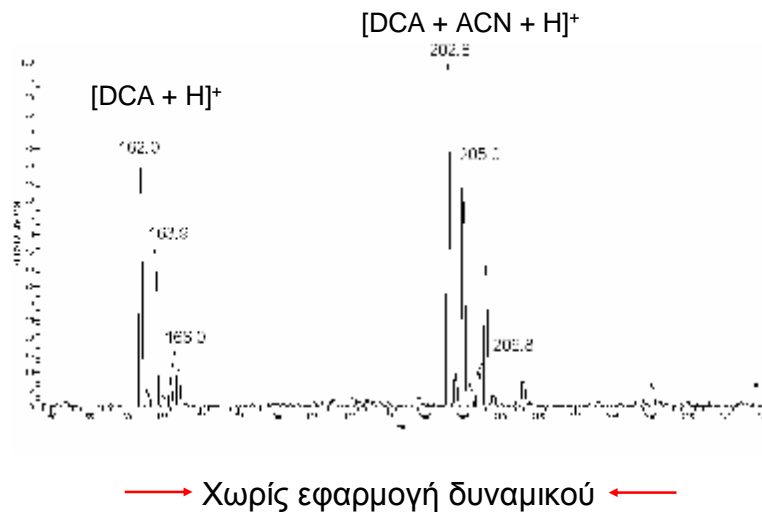
- Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των δύο αποκρίσεων συνδυασμένες σε μία συνάρτηση επιθυμητού αποτελέσματος



Βέλτιστες τιμές: Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων: 270 °C  
Ροή ξηραντικού αερίου: 27 μονάδες

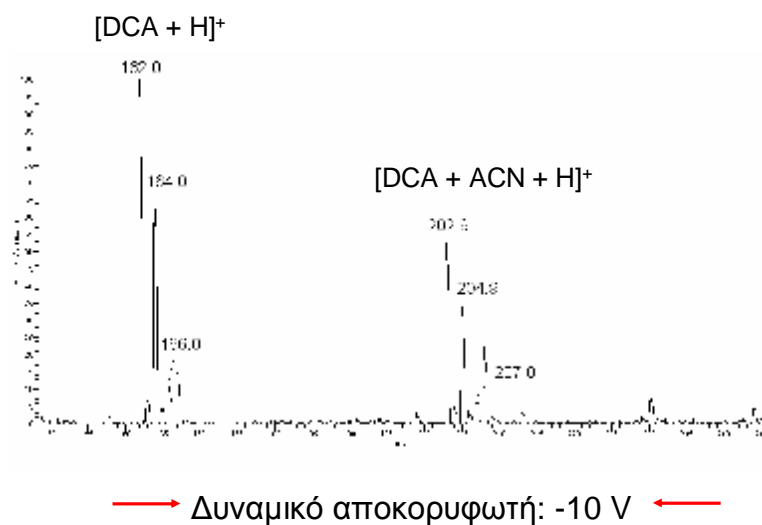
## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

### Βελτιστοποίηση δυναμικού αποκορυφωτή



## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

### Βελτιστοποίηση δυναμικού αποκορυφωτή



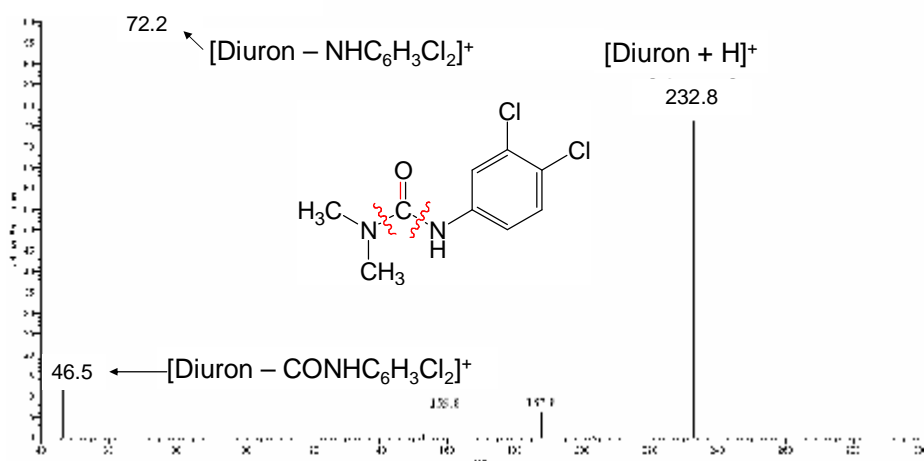
## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΩΝ SRM

Πίεση σύγκρουσης: 1,6 mTorr

	SRM μετάπτωση	Ενέργεια Σύγκρουσης (V)
Diuron	232,9 → 72,3 (Q) → 46,5 (C)	17 15
Diuron-d6	239,0 → 78,3	20
DCPMU	218,9 → 127,0 (Q) → 161,9 (C)	28 14
DCPU	205,0 → 127,1 (Q) → 161,9 (C)	26 13
DCA	162,0 → 127,1 (Q) → 109,1 (C)	19 30
Irgarol	254,0 → 197,9 (Q) → 108,1 (C)	18 29
M1	214,0 → 158,0 (Q) → 68,3 (C)	16 36

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΩΝ SRM

Φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων του diuron με ενέργεια σύγκρουσης 17 V



## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ESI(+) – MS/MS

### ΣΥΝΘΗΚΕΣ ESI (+)

- Δυναμικό ESI: 4 KV
- Πίεση εκνεφωτικού αερίου: 60 psi
- Πίεση ξηραντικού αερίου: 27 μονάδες (8 L min<sup>-1</sup>)
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων: 270°C
- Θέση ακροσωληνίου (0,55 in, D)
- Δυναμικό αποκορυφωτή: -10 V

### ΣΥΝΘΗΚΕΣ MS/MS

- Πίεση αερίου σύγκρουσης: 1,6 mTorr
- Χρόνος σάρωσης: 0,02 s
- Φίλτρο χρωματογραφίας: 10 s

## Βελτιστοποίηση παραμέτρων ESI

### Εφαρμογή πολυπαραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού

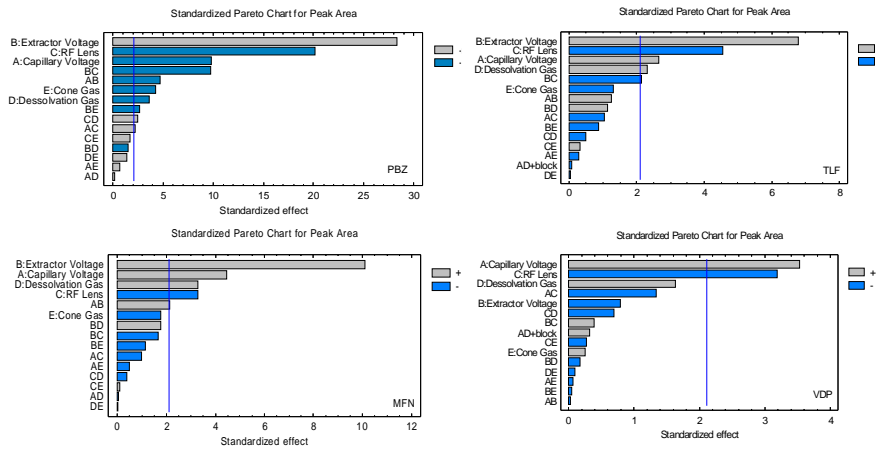
Προσδιορισμός 11 NSAIDs σε ζωικά τρόφιμα με LC-ESI-MS/MS  
Z-Spray ESI, Quattro Premier XE Mass Spectrometer

#### **Πείραμα Ανίχνευσης Κρίσιμων Παραμέτρων (Screening Experiment)**

- Full factorial experimental design: 2<sup>5</sup> + 1, 2 επίπεδα, 34 πειράματα
- Ένεση προτύπου διαλύματος σε κινητή φάση (FIA)
- Μετρούμενη τιμή: εμβαδόν κορυφής ιόντος [M-1]
- Παράμετροι που μελετήθηκαν:
  - Capillary Voltage (1 - 3KV)
  - Extractor Voltage (0 -10V)
  - RF Lens (0 - 5 V)
  - Desolvation Gas Flow (500 – 900 L/h)
  - Cone Gas Flow (0 – 300 L/h )

## Βελτιστοποίηση παραμέτρων ESI

### Εφαρμογή πολυπαραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού



**Critical Factors :** Extractor Voltage > RF Lens > Capillary Voltage > Desolvation Gas

**Joint effects :** Extractor Volt – RF Lens > Extractor Volt – Capillary Volt

## Βελτιστοποίηση παραμέτρων ESI

### Εφαρμογή πολυπαραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού

#### Πείραμα Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Experiment)

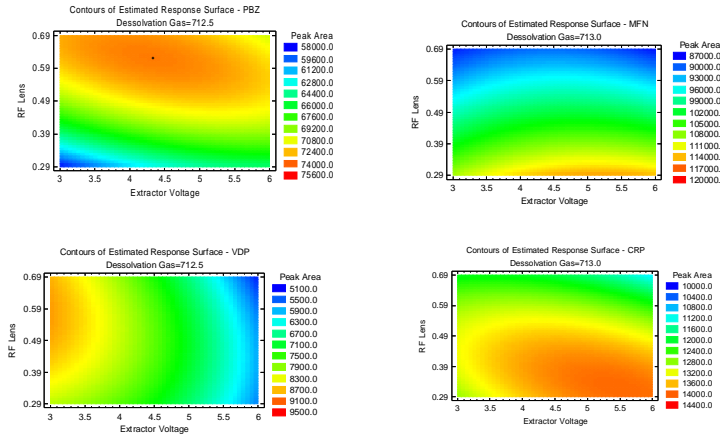
- Central Composite Design:  $2^3$  + star point, rotatable, orthogonal, 23 πειράματα
- Μετρούμενη τιμή: εμβαδόν κορυφής ιόντος [M-1]

Factors	Levels				
	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Extractor Voltage	2	3	5	6	7
RF Lens	0.2	0.3	0.5	0.6	0.7
Desolvation Gas Flow	523	600	713	825	902

## Βελτιστοποίηση παραμέτρων ESI

### Εφαρμογή πολυπαραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού

#### Χάρτες Επιφάνειας Απόκρισης



## Βελτιστοποίηση παραμέτρων ESI

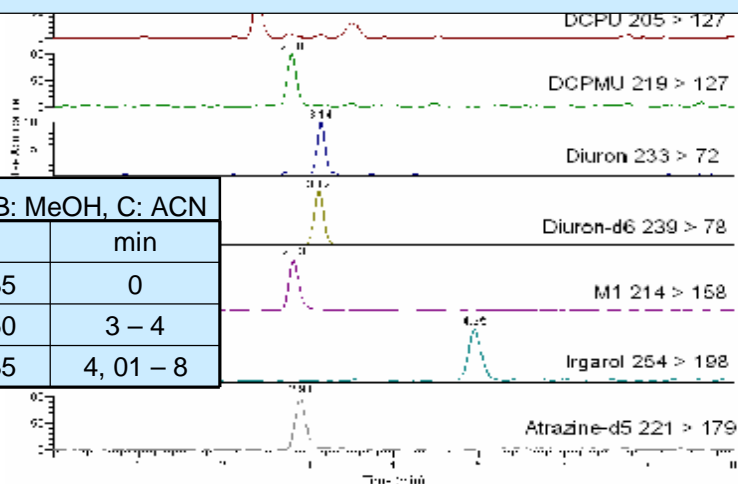
### Εφαρμογή πολυπαραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού

	ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΤΙΜΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ			ΤΕΛΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ	
	Extractor Voltage	RF Lens	Desolvation Gas		
PBZ	4.33	0.62	708.53	Capillary Voltage (kV)	3.00
MFN	4.27	0.20	902.00	Extractor voltage (V)	3.00
TLF	4.16	0.20	902.00	RF Lens (V)	0.7
CRP	2.48	0.53	902.00	Source Temperature (°C)	120 °C
NFL	4.53	0.48	834.75	Desolvation Temperature (°C)	300
FLU	2.45	0.68	902.00	Desolvation Gas (L/hr)	900
VDP	2.00	0.70	902.00	Cone Gas (L/hr)	50
MLX	2.60	0.70	878.49		
DCL	2.65	0.70	902.00		

➔ Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός όλων των εξεταζόμενων ουσιών προϋποθέτει ένα **συμβιβασμό** μεταξύ των βέλτιστων τιμών, και αυτό γίνεται εις βάρος των ενώσεων με τη μεγαλύτερη ευαισθησία.

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΡCI (+)

DCPU + DCPMU + diuron  $\xrightarrow{\text{sCID}}$   $[\text{DCA}+\text{H}]^+$   $\xrightarrow{\text{Q2}}$  κοινά προϊόντα



Χρωματογραφήματα SRM πρότυπου δ/τος  $40 \text{ ng mL}^{-1}$  DCA και  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  για τις υπόλοιπες ενώσεις

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΑΡCI

### Πειράματα διαλογής

#### Πειραματικές παράμετροι:

1. Ταχύτητα ροής Κ.Φ. ( $0,1 - 1 \text{ mL min}^{-1}$ )
2. Θερμοκρασία εξάτμισης ( $300 - 450 \text{ }^\circ\text{C}$ )
3. Πίεση εκνεφωτικού αερίου ( $20 - 40 \text{ psi}$ )
4. Ροή ξηραντικού αερίου ( $5 - 25$  μονάδες,  $1,5 - 7,5 \text{ L min}^{-1}$ )
5. Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων ( $150 - 350 \text{ }^\circ\text{C}$ )
6. Ρεύμα εκκένωσης ( $3 - 8 \text{ } \mu\text{A}$ )

- Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός :  $2^6 + 2$ , 2 τμημάτων, 68 πειράματα
- Πρότυπο δ/μα μίγματος DCA – diuron – irgarol ( $1 - 3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ )
- Συνθήκες FIA
- Καταγραφή σημάτων SIM
- Μεταβλητές απόκρισης: Εμβαδά κορυφής  $[\text{M}+1]^+$



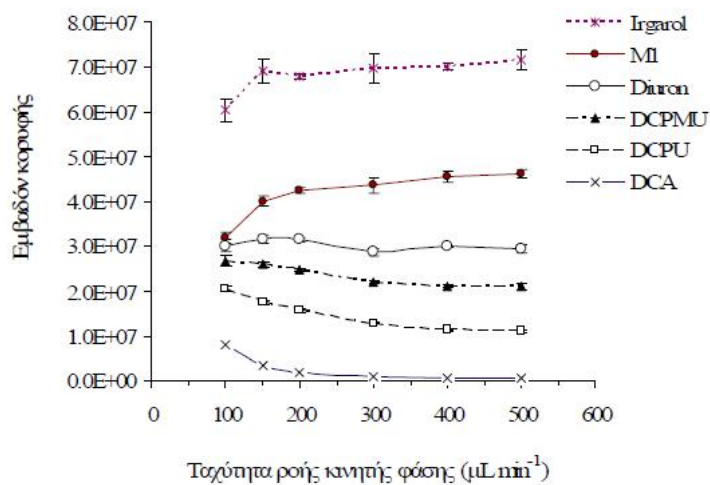
## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ APCI

### Πειράματα διαλογής

- Ø Επίδραση παραμέτρων στο σήμα της DCA διαφορετική από την επίδραση στα σήματα irgarol και diuron. **Εξάρτηση από τη φύση της ουσίας.**
- Ø Κρίσιμες παράμετροι για DCA: **Ταχύτητα ροής Κ.Φ > Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων > Ροή ξηραντικού αερίου > Πίεση εκνεφωτικού αερίου.**
- Ø Η DCA απαιτεί πιο έντονες συνθήκες αποδιαλυτοποίησης σε σχέση με το irgarol και diuron.
- Ø Συνδυασμένη επίδραση: Ταχύτητα ροής Κ.Φ – Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων

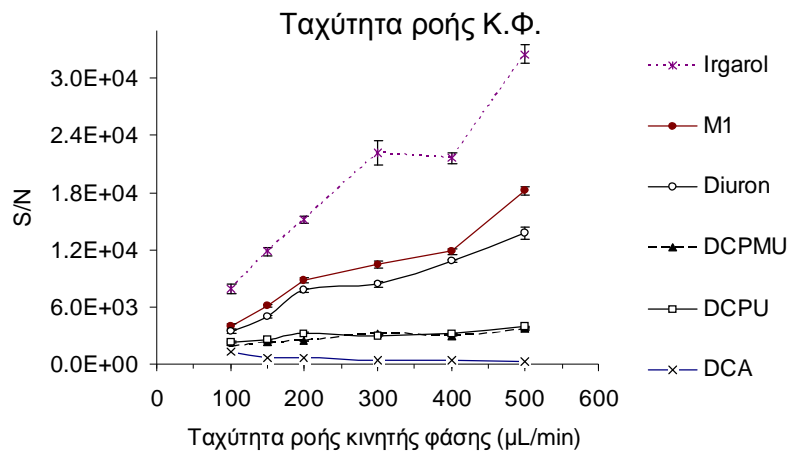
## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ APCI

### Πειράματα πολλαπλών επιπέδων



## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ APCI

### Πειράματα πολλαπλών επιπέδων



∅ Εξάρτηση από τη φύση της ένωσης

∅ Επιλογή ταχύτητας ροής : 150  $\mu\text{L min}^{-1}$ , εξαιτίας της χαμηλής ευαισθησίας της DCA

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ APCI

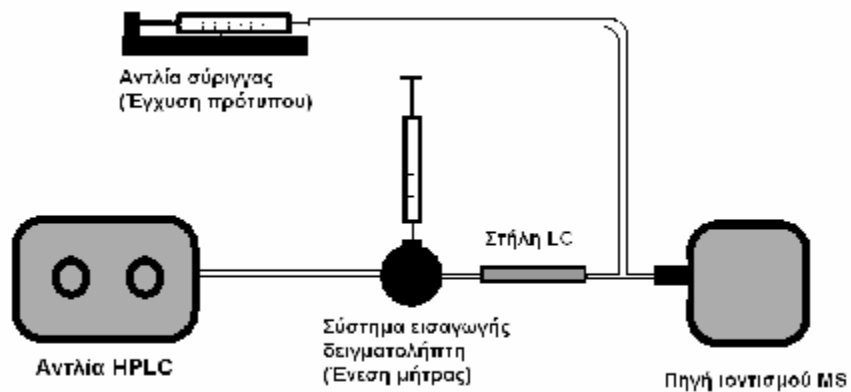
### Πειράματα πολλαπλών επιπέδων

- **Θέση ακροσωληνίου (0,5 – 1,5 in):** η DCA χρειάζεται μακρύτερη διαδρομή για να αποδιαλυτωθεί, να μεταφερθεί στην αέρια φάση και στη συνέχεια να ιοντιστεί ≠ με το ESI.
- **Θερμοκρασία εξάτμισης, Πίεση εκνεφωτικού αερίου, Ταχύτητα ροής ξηραντικού αερίου**

### ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ APCI (+)

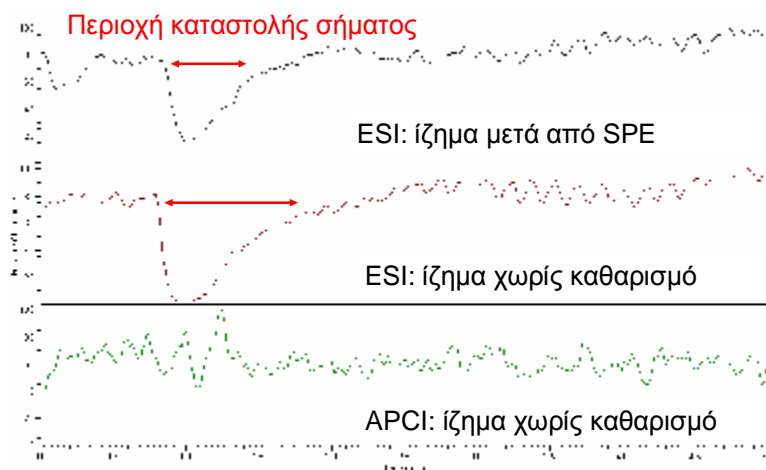
- Ρεύμα εκκένωσης: 3,5  $\mu\text{A}$
- Πίεση εκνεφωτικού αερίου: 40 psi
- Πίεση ξηραντικού αερίου: 30 μονάδες ( $9 \text{ L min}^{-1}$ )
- Θερμοκρασία εξάτμισης: 300  $^{\circ}\text{C}$
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων: 150 $^{\circ}\text{C}$
- Θέση ακροσωληνίου (1,5 in, C)
- Δυναμικό αποκορυφωτή: -10 V (τριαζίνες), -15V (DCA, DCPU)

## ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΜΗΤΡΑΣ: Διάταξη LC-MS



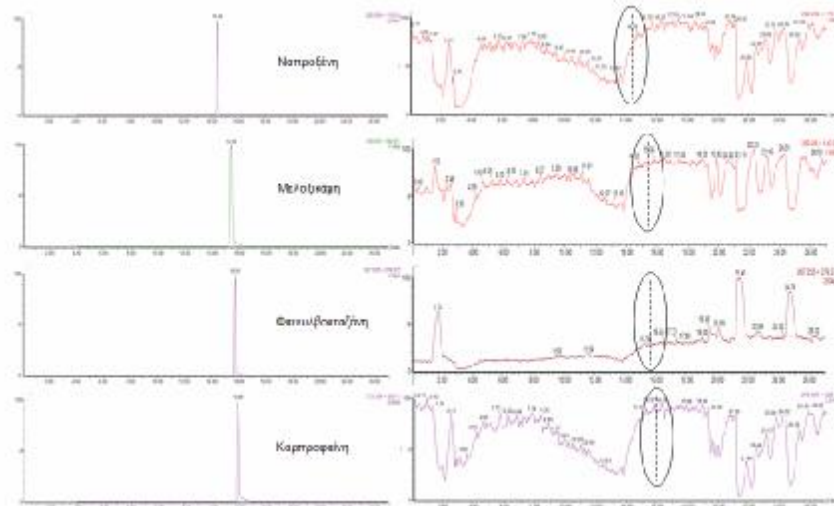
## ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΜΗΤΡΑΣ

∅ Συνεχής διοχέτευση πρότυπου μίγματος στην Κ.Φ. μετά τη στήλη με σύνδεσμο-T.



Χρωματογραφήματα SRM της DCA (162 > 127)

## ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΜΗΤΡΑΣ



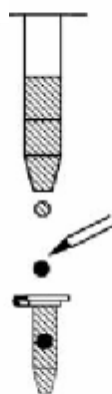
## ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΜΗΤΡΑΣ

$$ME(\%) = 100 - \frac{B}{A} \times 100$$

Matrix  
 Spiking Solution

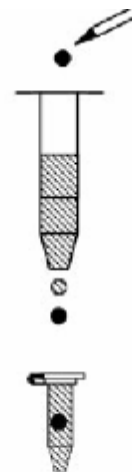


(A) Standard



(B) Matrix Matched

Standard



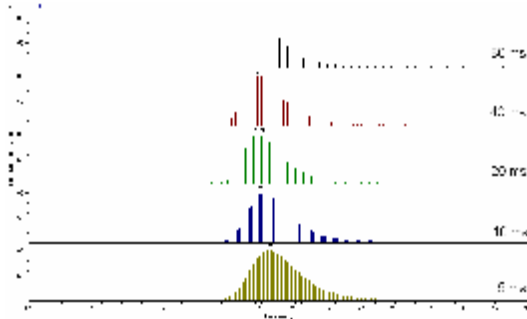
(C) Pre-Spiked

Standard

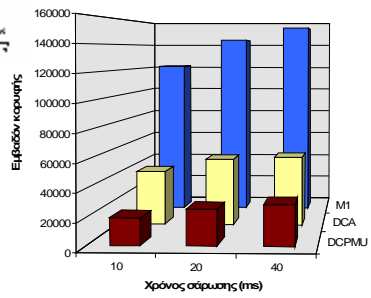
B/A = Matrix Effects (ME), C/B = Extraction Recovery (RE), C/A = Process Efficiency (PE)

Trufelli et al., Mass Spectrometry Reviews, 2011, 30, 491– 509

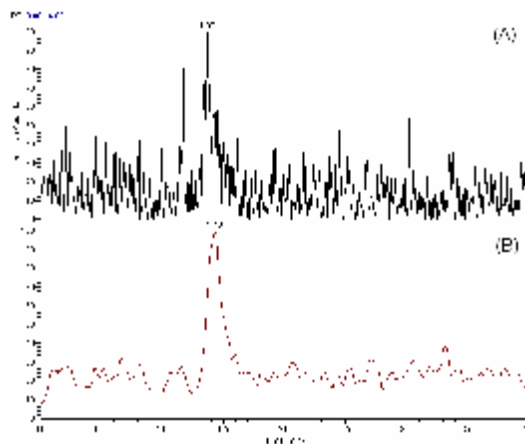
Χρωματογραφήματα SRM του irgarol με απεικόνιση με  
ράβδους για διαφορετικούς χρόνους σάρωσης



Επίδραση του χρόνου σάρωσης στο  
εμβαδό κορυφής των DCA, DCPMU και  
M1.



Χρωματογραφήματα SRM (214 > 158) του M1 συγκέντρωσης  
0,1 ng mL<sup>-1</sup> (A) χωρίς εφαρμογή φίλτρου χρωματογραφίας  
εύρους κορυφής και (B) με φίλτρο χρωματογραφίας εύρους  
κορυφής 10 s.



Σημαντική  
βελτίωση  
LOD

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### Θαλασσινό νερό – νερό βρύσης

- Ø 500 mL
- Ø SPE μικροστήλες C18 (έκλουση με MeOH)
- Ø Εξάτμιση μέχρι 500 µL (N<sub>2</sub>, 35°C)
- Ø Προσθήκη 500 µL ACN/νερού (20:80) με 0,2% HCOOH

### Θαλασσινό ίζημα και λυοφιλιωμένο μύδι

- Ø Εκχύλιση 0,2 g ξηρού ιζήματος ή λυοφιλιωμένου μυδιού με 1 mL ACN
- Ø Υπέρηχοι (30 min)
- Ø Φυγοκέντριση (2500 rpm, 10 min)
- Ø Αραίωση 0,4 mL του εκχυλίσματος ACN με 0,2 mL 0,2% υδ. HCOOH

## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ LC-ESI-MS/MS

Ø Προσαρμογή δεδομένων εμβολιασμένων δειγμάτων στο γραμμικό μοντέλο με  $r \geq 0,99$ .

Ø Μέσες ανακτήσεις: 70,8% – 110%  
Ø %RSD: 4,1 – 14 (N = 6) } Επίπεδο εμβολιασμού  
10 ng g<sup>-1</sup> και 10 ng mL<sup>-1</sup>

✓ Βελτίωση ορθότητας μεθόδων με χρήση των δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων

Ø LODs οργάνου: 0,02 – 0,33 ng mL<sup>-1</sup> (LODs APCI: 0,3 – 4,9 ng mL<sup>-1</sup>)

Ø LODs ίζημα και μύδι : 0,6 – 3,5 ng g<sup>-1</sup>

Ø LODs νερό: 1,3 – 1,8 ng L<sup>-1</sup>

## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ LC-ESI-MS/MS

C: Εμβαδόν κορυφής SRM μετάπτωσης ιόντος επιβεβαίωσης

Q: Εμβαδόν κορυφής SRM μετάπτωσης ιόντος ποσοτικοποίησης

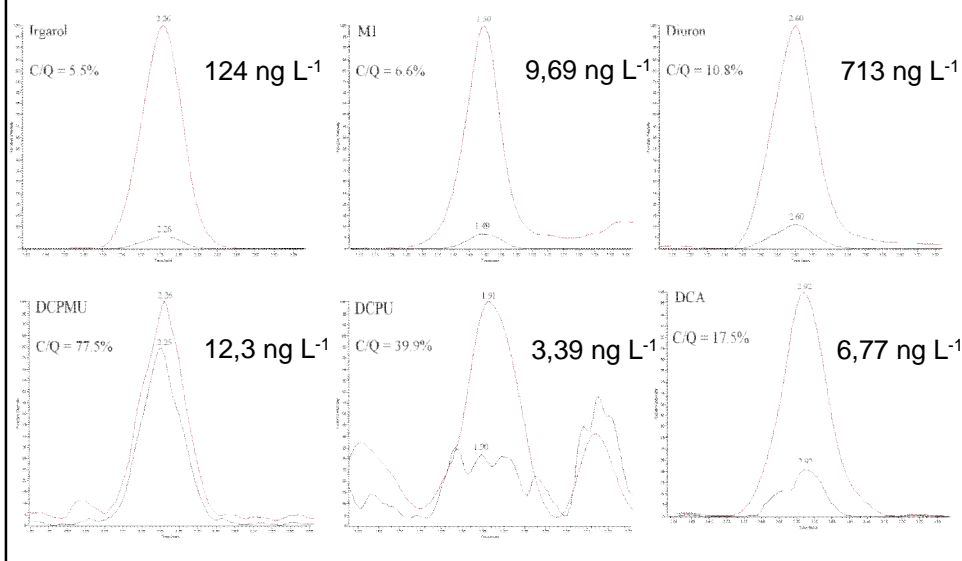
(C/Q · 100) ± SD (N = 6)

	Πρότυπο 1-10 ng mL <sup>-1</sup>	Θ.Νερό 1 ng mL <sup>-1</sup>	Νερό βρύσης 10 ng L <sup>-1</sup>	Ίζημα 10 ng g <sup>-1</sup>	Μύδι 10 ng g <sup>-1</sup>
Irgarol	5,7 ± 0,4	5,60 ± 0,04	5,8 ± 0,3	5,3 ± 0,5	5,7 ± 0,6
M1	6,5 ± 0,7	6,6 ± 0,2	6,6 ± 0,2	7,0 ± 0,4	7,5 ± 0,9
Diuron	9,0 ± 1,5	9,9 ± 0,3	6,2 ± 1,4	6,7 ± 3,0	8,1 ± 3,0
DCPMU	76,0 ± 6,7	76,2 ± 1,8	76,3 ± 7,1	75,3 ± 12,4	74,0 ± 7,9
DCPU	41,1 ± 6,2	38,4 ± 0,9	35,6 ± 6,9	34,4 ± 8,7	45,6 ± 7,8
DCA	18,0 ± 0,8	19,2 ± 0,4	15,8 ± 2,6	15,9 ± 3,6	14,8 ± 3,5

- Κριτήριο επιβεβαίωσης για άγνωστα δείγματα

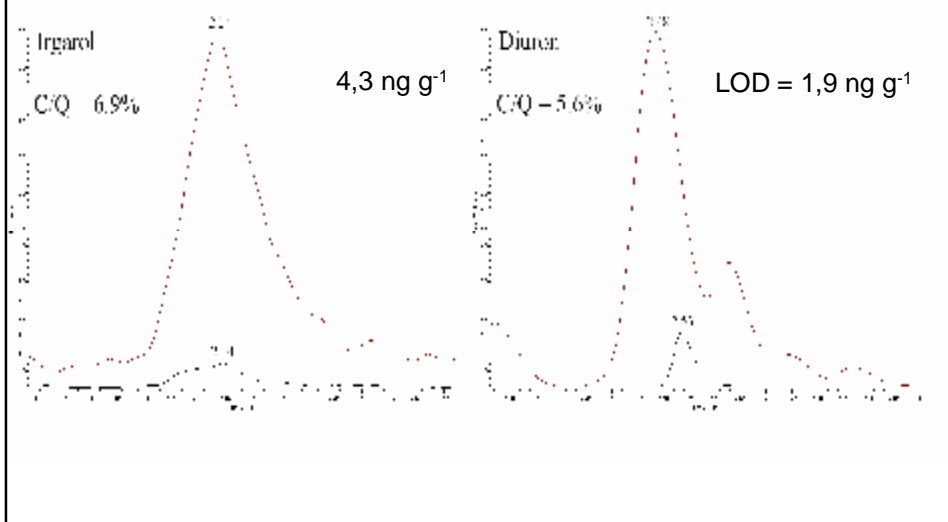
## ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-ESI-MS/MS

SRM χρωματογραφήματα μεταπτώσεων Q και C των ανιχνευθέντων ενώσεων σε θαλασσινό νερό



## ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-ESI-MS/MS

SRM χρωματογραφήματα μεταπτώσεων Q και C των ανιχνευθέντων ενώσεων σε μύδι.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ (1/2)

Ø Επιτυχής ιοντισμός DCA με ESI(+): παρουσία ACN και HCOOH, απαιτούνται έντονες συνθήκες αποδιαλύτωσης, και εφαρμογή δυναμικού αποκρουφωτή λόγω ενώσεων προσθήκης με μόριο ACN.

Ø Βέλτιστη τεχνική ιοντισμού για τριαζίνες, φαινυλουρίες και διχλωροανιλίνη είναι το ESI(+).

Ø Απαραίτητος υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός:

α) Μερική θραυσματοποίηση μητρικών ενώσεων στην πηγή ιοντισμού και β) κοινό  $m/z$  της DCPU και της ένωσης προσθήκης με ACN ισοτόπου της DCA και κοινού προϊόντος στις SRM μεταπτώσεις.



## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ (2/2)**

∅ DOE ESI και APCI : Εξάρτηση της επίδραση των παραμέτρων από τη φύση της ουσίας προς ιοντισμό. Ύπαρξη συνδυασμένων αλληλεπιδράσεων.

∅ Απαραίτητη εξετάση της επίδρασης των παραμέτρων για κάθε μία προσδιοριζόμενη ουσία ή για κάθε ομάδα ουσιών με παρόμοια δομή στο συγκεκριμένο όργανο.

**ΙΣΟΤΟΠΙΚΑ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΩΣ  
ΕΣΩΤΕΡΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΙΣ  
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ  
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ**

## Outline

- Μέθοδος εσωτερικού προτύπου
- Ισοτοπικά επισημασμένες ενώσεις ως εσωτερικά πρότυπα
- Παραδείγματα εκτίμησης αβεβαιότητας μετρήσεων με και χωρίς τη χρήση δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου σε τεχνικές MS

## ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

- Προσθήκη μιας κατάλληλης ένωσης (εσωτερικό πρότυπο, IS) στα πρότυπα διαλύματα, τυφλά και δείγματα, αν είναι δυνατό από την αρχή της αναλυτικής πορείας
- Αναλυτικό σήμα: **λόγος σήματος αναλύτη προς σήμα IS,  $RF = A_{\text{analyte}}/A_{\text{IS}}$**

## ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

- Αντιστάθμιση τυχαίων και συστηματικών σφαλμάτων
  - Οργανολογική αστάθεια
  - Επίδραση μήτρας και της αναλυτικής πορείας

ύ ...αν γίνει σωστή επιλογή IS!

## ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

### ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ IS:

- Σταθερή και διαθέσιμη ένωση
- Απουσία από το δείγμα
- Προσομοιάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη
  - è Παρόμοια ευαισθησία
  - è Παρόμοιοι χρόνοι ανάσχεσης, αν έχουμε την απαραίτητη εκλεκτικότητα στο σύστημα ανίχνευσης

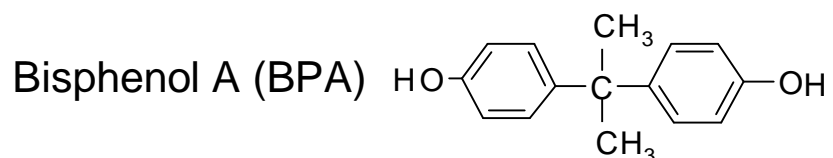
## ΤΕΧΝΙΚΕΣ MS → ΙΣΟΤΟΠΙΚΑ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΑ IS

- Αναλύτης και το ισοτοπικά επισημασμένο ανάλογο (IS) έχουν σχεδόν ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες
- Ίδιες απώλειες κατά την αναλυτική πορεία
- Ίδια χρωματογραφική συμπεριφορά
- Διαφοροποιούνται σημαντικά στο  $m/z$  που παρακολουθείται

## ΙΣΟΤΟΠΙΚΑ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΑ IS

- Δευτεριωμένα (αρκεί επισήμανση  $-CD_3$ )
  - Διαθέσιμα
  - Πιο φθηνά
  - Ασταθή σε πρωτικό περιβάλλον
- Επισημασμένα με  $^{13}C$  ή  $^{15}N$  (ή άλλα στοιχεία)
  - Σταθερά
  - Υψηλό κόστος

## ΙΣΟΤΟΠΙΚΑ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΙΣ



- BPA                    **50 g ® 36 Euro**
- BPA-d<sub>16</sub>            **50 mg ® 171 Euro**
- BPA-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>        **100 µg/mL ® 325 \$**

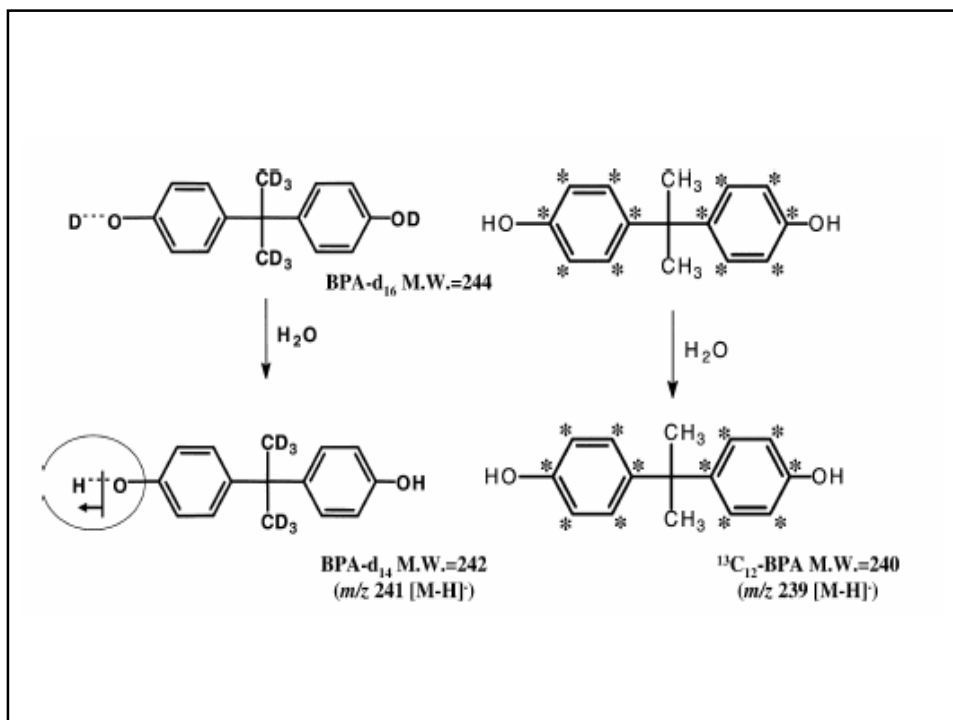
## ΙΣΟΤΟΠΙΚΑ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΙΣ

Σεμικαρβαζίδιο (SCA)

NH<sub>2</sub>CONHNH<sub>2</sub>                    **Τα 100 g ® 32 Euro**

Ισοτοπικά επισημασμένο SCA-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>

NH<sub>2</sub><sup>13</sup>CO<sup>15</sup>NH<sup>15</sup>NH<sub>2</sub>            **Τα 10 mg ® 310 Euro**  
**100 µg/mL ® 695 \$**



## ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ MS ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ IS

- ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ 1ο  
 Προσδιορισμός BPA σε γάλα με LC-ESI-MS με χρήση ως IS την BPA-d<sub>16</sub>
- ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ 2ο  
 Προσδιορισμός Irgarol σε θαλάσσια ιζήματα με GC-EI-MS (ion trap) με χρήση ως IS την ατραζίνη-d<sub>5</sub>

## ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΡΑ ΣΕ ΓΑΛΑ

Εμβολιασμός 1 g δείγματος με 100  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  ΒΡΑ-d<sub>16</sub>.

Αραίωση με 9 mL MeOH-H<sub>2</sub>O (1/8 v/v)



Εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγιο C18

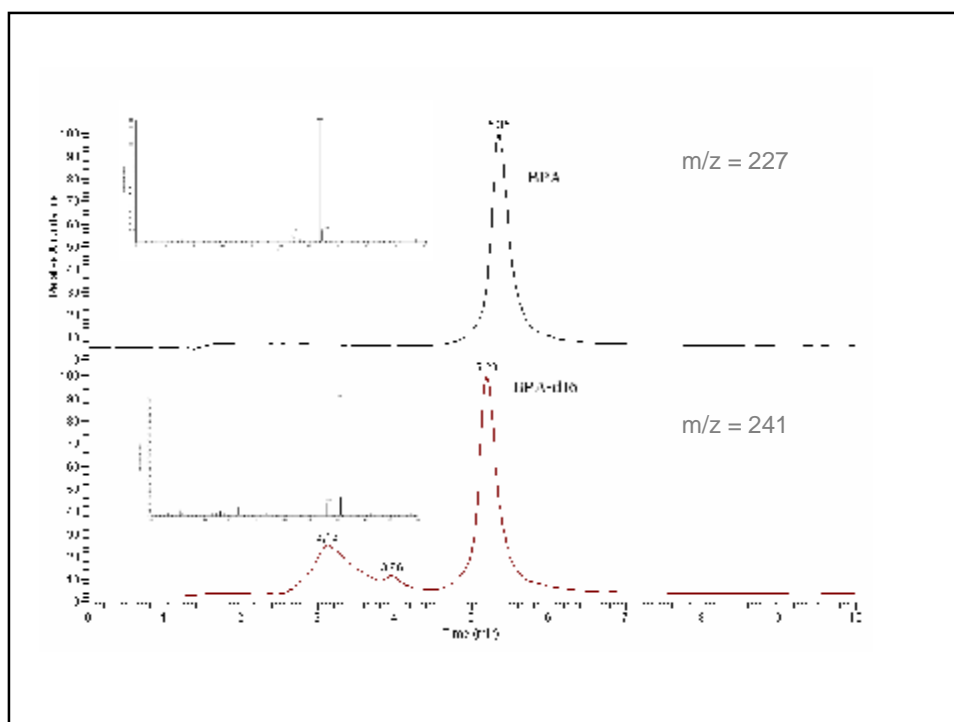


Εξάτμιση εκχυλίσματος μέχρι ξηρού.

Επαναδιάλυση σε 1 mL νερού



Ανάλυση LC-ESI-MS



## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

	Εμβαδόν κορυφής BPA	Λόγος RF
Εξίσωση καμπύλης εμβολιασμένων δειγμάτων γάλακτος	$AREA_{BPA} = -15642 + 3644 C_{BPA}$	$F = -0,0412 + 0,0073 C_{BPA}$
Εξίσωση καμπύλης αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων	$AREA_{BPA} = 19474 + 6291 C_{BPA}$	$F = 0,0008 + 0,0070 C_{BPA}$
Λόγος κλίσεων $\times 100$	Ανάκτηση BPA $\% \bar{R}_{BPA}$ <b>58%</b>	Σχετική ανάκτηση BPA $\% \bar{R}_F$ <b>104%</b>

LOD μεθόδου  $1,7 \mu\text{g Kg}^{-1}$  LOQ μεθόδου  $5,1 \mu\text{g Kg}^{-1}$

## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

### ∅ Αβεβαιότητα

Πηγές αβεβαιότητας :

1. Τυχαία σφάλματα ( $RSD_{\text{ΜΕΘΟΔΟΥ}}$ )
2. Συστηματικά σφάλματα ( $RSD_{\text{bias}} = \frac{SD_{\bar{R}}}{\bar{R}}$ )
3. Καμπύλη αναφοράς ( $\frac{u(C)}{C}$ )
4. Μέτρηση μάζας ( $\frac{u(m)}{m}$ )
5. Μέτρηση όγκου ( $\frac{u(V)}{V}$ )
6. Καθαρότητα πρότυπης ουσίας ( $\frac{u(P)}{P}$ )



## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

§ Συνδυασμένη σχετική αβεβαιότητα :

$$\frac{u([BPA])}{[BPA]} = \sqrt{RSD^2_{\text{ΜΕΘ}} + RSD^2_{\text{bias}} + \left(\frac{u(C)}{C}\right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{u(P)}{P}\right)^2}$$

§ % διευρυμένη σχετική αβεβαιότητα (Σ.Ε. 95%, k = 2) :

$$U(\%) = \frac{u([BPA])}{[BPA]} \times 2 \times 100$$

## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ø Αβεβαιότητα - με χρήση εσωτερικού προτύπου

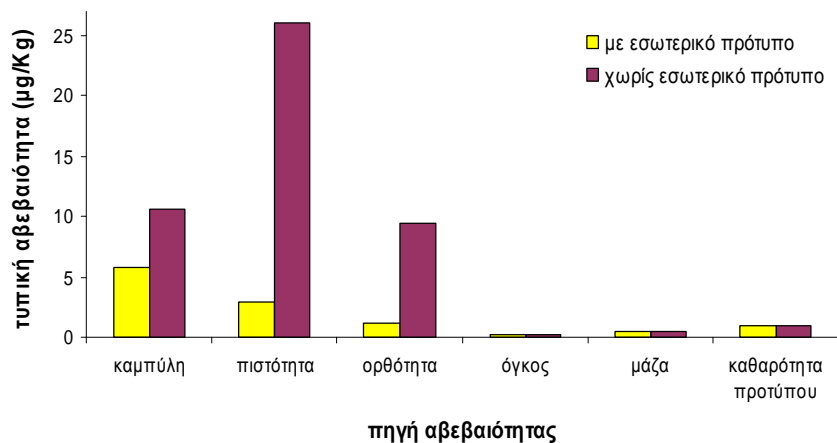
	5 µg Kg <sup>-1</sup>	50 µg Kg <sup>-1</sup>	500 µg Kg <sup>-1</sup>
% διευρυμένη σχετική αβεβαιότητα (Σ.Ε. 95%, k=2)	57	27	12

Ø Αβεβαιότητα – χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου

	5 µg Kg <sup>-1</sup>	50 µg Kg <sup>-1</sup>	500 µg Kg <sup>-1</sup>
% διευρυμένη σχετική αβεβαιότητα (Σ.Ε. 95%, k=2)	108	119	128

## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

### Ø Αβεβαιότητα (50 µg Kg<sup>-1</sup>)



## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

### Ø Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

1. Διαχρονική σταθερότητα αναλυτικού σήματος πρότυπου διαλύματος 100 µg L<sup>-1</sup> ( διάρκεια 2 μηνών )

	AREA BPA	AREA BPA-d <sub>16</sub>	F	C (µg L <sup>-1</sup> )
%RSD	41,5	40,9	4,8	4,9

➔ Σημαντική βελτίωση στην αναπαραγωγικότητα της αναλυτικής παραμέτρου με τη χρήση εσωτερικού προτύπου

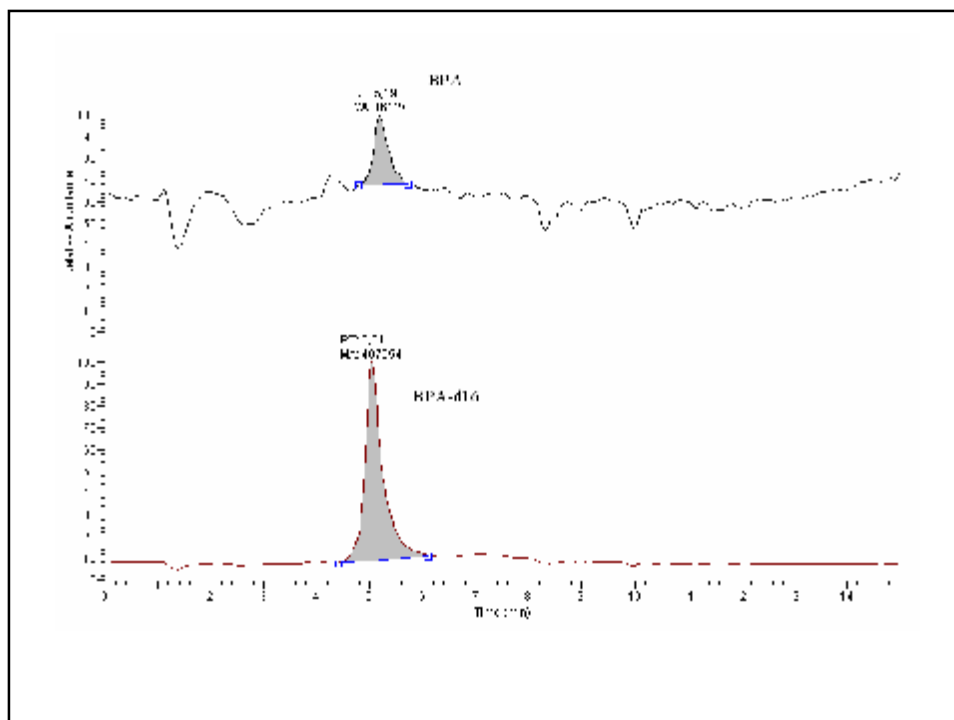
## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

### Ø Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος

2. Διαχρονική σταθερότητα χρόνου ανάσχεσης και σχετικού χρόνου ανάσχεσης πρότυπου διαλύματος 100 µg L<sup>-1</sup> (διάρκεια 2 μηνών)

	$t_R$ (BPA)	$t_R$ (BPA-d <sub>16</sub> )	$t_R$ (BPA)/ $t_R$ (BPA-d <sub>16</sub> )
%RSD	3,3	3,2	<b>0,2</b>

➔ Χρήση σχετικού χρόνου ανάσχεσης ως επιπρόσθετο στοιχείο επιβεβαίωσης της παρουσίας της BPA



## ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ IRGAROL 1051 ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΙΖΗΜΑ

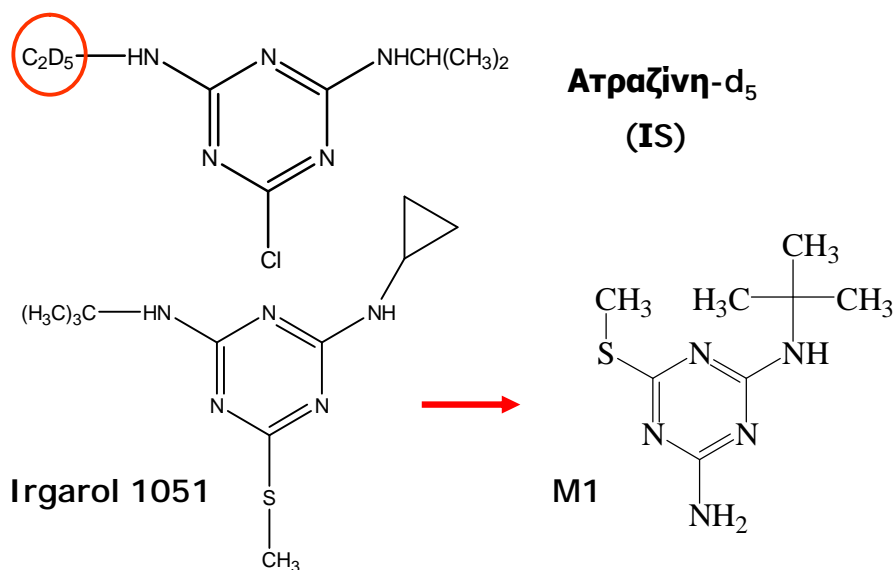
Εμβολιασμός 3 g δείγματος με 100 ng atrazine-d<sub>5</sub> (IS)  
Εκχύλιση με 40 mL H<sub>2</sub>O με μικροκύματα (ΜΑΕ) για 10 min  
στους 115 °C

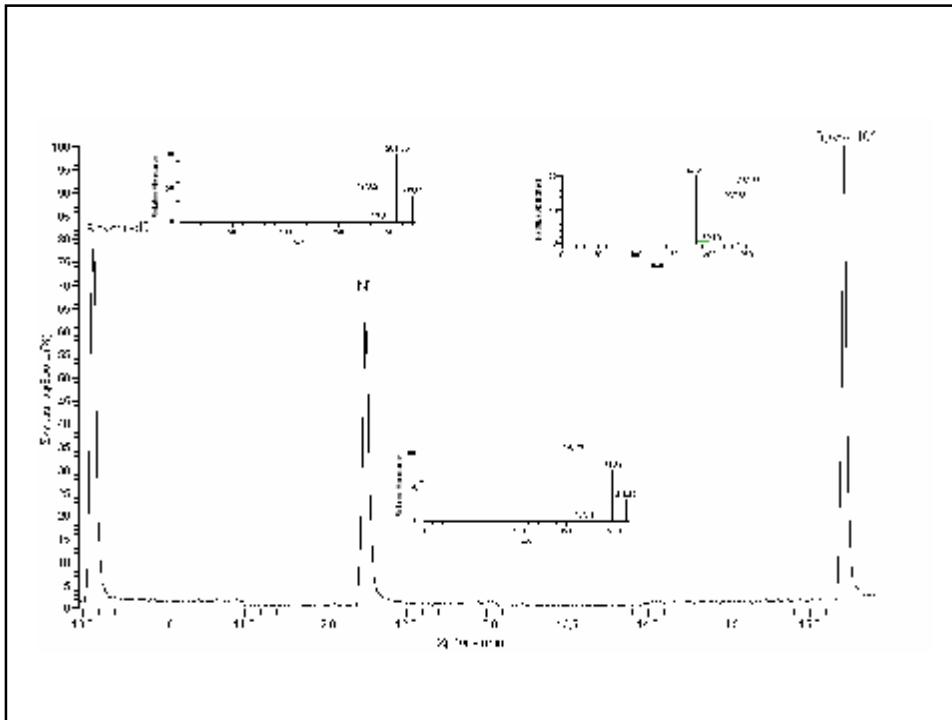
↓  
Εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγιο C18

↓  
Εξάτμιση εκχυλίσματος μέχρι ξηρού.  
Επαναδιάλυση σε 0,3 mL οξικό αιθυλεστέρα

↓  
Ανάλυση GC- EI - ion trap MS

### Συμμετρικές τριαζίνες





## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

### ☉ Αβεβαιότητα - με χρήση εσωτερικού προτύπου

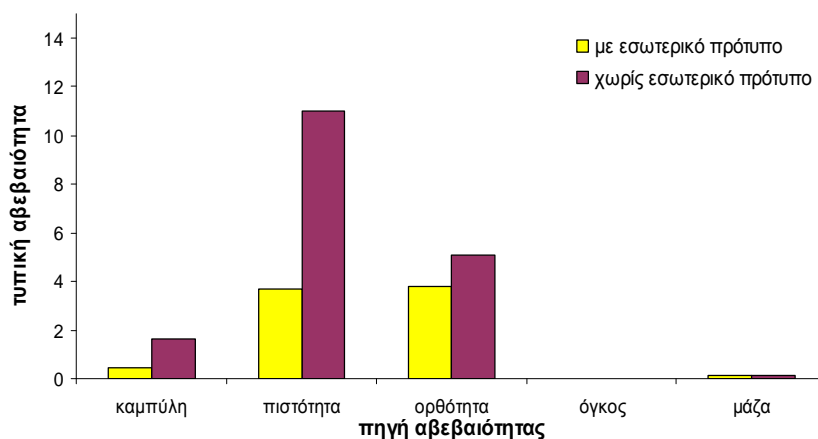
	<b>33 <math>\mu\text{g Kg}^{-1}</math></b>
% διευρυμένη σχετική αβεβαιότητα ( $\Sigma.Ε. 95\%, k=2$ )	<b>32</b>
Αποτέλεσμα	<b>(33<math>\pm</math>11) <math>\mu\text{g Kg}^{-1}</math></b>

### ☉ Αβεβαιότητα – χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου

	<b>33 <math>\mu\text{g Kg}^{-1}</math></b>
% διευρυμένη σχετική αβεβαιότητα ( $\Sigma.Ε. 95\%, k=2$ )	<b>74</b>
Αποτέλεσμα	<b>(33<math>\pm</math>24) <math>\mu\text{g Kg}^{-1}</math></b>

## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

### ∅ Αβεβαιότητα (33 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )



## ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

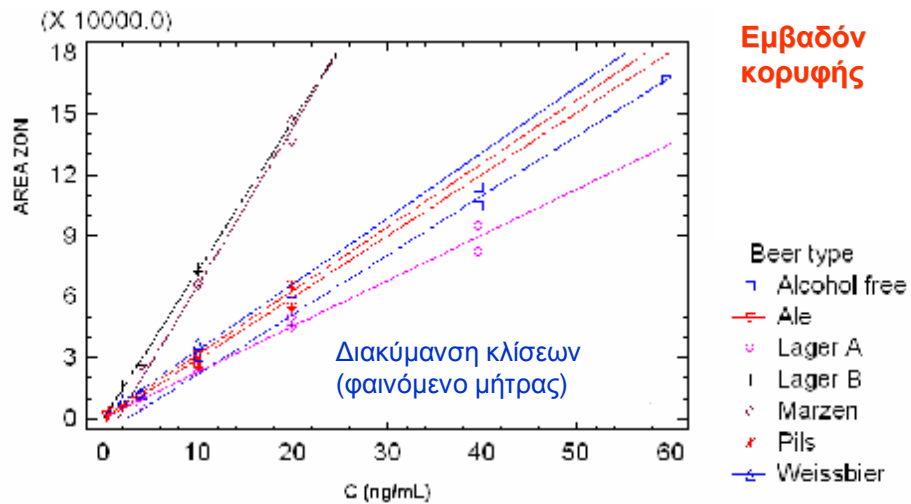
Ανακτήσεις των ενώσεων R(%) από εμβολιασμένα δείγματα μπίρας και τα αντίστοιχα %RSD υπό συνθήκες επαναληψιμότητας. Συγκέντρωση εμβολιασμού: 8  $\text{ng mL}^{-1}$  των αναλυτών και 30  $\text{ng mL}^{-1}$  για τα δύο εσωτερικά πρότυπα

Ένωση	R(%) (%RSD, N = 4)		
	Εμβαδόν κορυφής	I <sub>ZAN</sub>	I <sub>DHC</sub>
ZON	104 (11)	106 (7,2)	97,8 (10)
$\alpha$ -ZOL	87,4 (4,3)	92,9 (2,6)	84,5 (8,3)
$\beta$ -ZOL	68,6 (5,6)	74,7 (3,9)	67,7 (8,9)
8-PN	68,8 (8,8)	78,5 (2,0)	78,8 (8,9)

### ∅ Βελτίωση πιστότητας μεθόδου με τη ZAN

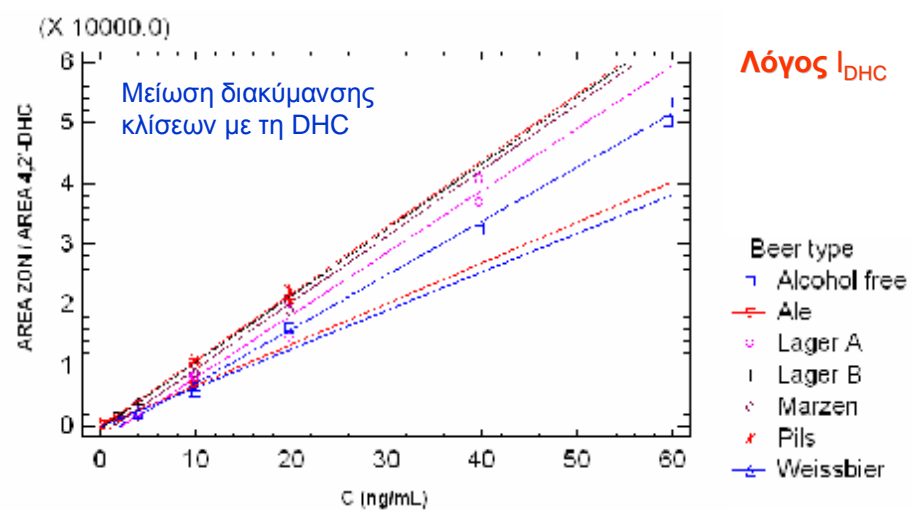
## ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

Καμπύλες βαθμονόμησης της ZON σε διαφορετικά δείγματα μπίρας



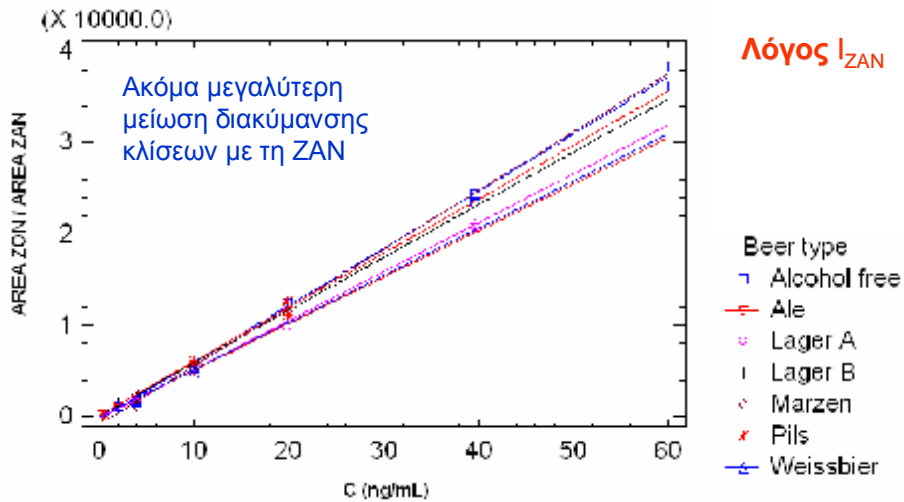
## ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

Καμπύλες βαθμονόμησης της ZON σε διαφορετικά δείγματα μπίρας



## ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

Καμπύλες βαθμονόμησης της ZON σε διαφορετικά δείγματα μπύρας



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Αντισταθμίζονται σημαντικά τα συστηματικά και τυχαία σφάλματα κατά την εφαρμογή της μεθόδου και της μέτρησης
- Σταθερότητα σχετικής ανάσχεσης
- Σημαντική βελτίωση των μεθόδων MS



## Χρήσιμοι ισότοποι για MS

### **American Society for Mass Spectrometry (ASMS)**

<http://www.asms.org/>

Γενική εισαγωγή στην τεχνική MS:

<http://www.asms.org/whatisms/index.html>

Εκπαιδευτικές πηγές:

[http://www.asms.org/whatisms/edu\\_resources.html](http://www.asms.org/whatisms/edu_resources.html)

<http://www.gems.de/mass.html>

University of Arizona - Dept. of Chemistry:

<http://www.chem.arizona.edu/massspec/>

<http://www.bmss.org.uk/education.htm>

Michigan State University - Dept. of Chemistry

<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectry/MassSpec/masspec1.htm>

Michigan State University - Dept. of Chemistry:

<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectry/MassSpec/masspec1.htm>

<http://www.shef.ac.uk/chemistry/chemputer/isotopes.html>

Isotope Pattern Calculator:

<http://winter.group.shef.ac.uk/chemputer/isotopes.html>

## 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. 20, 27Δ-3 και 28Γ-6 (σελ.859)
- 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" 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley & Sons, 2007
- K. Downard "Mass Spectrometry – A Foundation Course" 2<sup>nd</sup> Edition, RSC, 2007

## Σχήματα

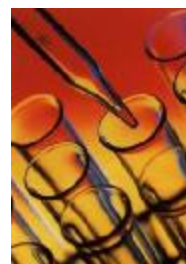
Τα σχήματα της παρουσίασης ήταν από τις παρακάτω πηγές:

- Ευγενική παραχώρηση σχημάτων 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
- W. Henderson, J. S. McIndoe, "Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds" Wiley, 2005
- Thermo "Quantum TSO Training course", 2007
- CHROMacademy (<http://www.chromacademy.com/mass-spec-training.asp>)
- N. Μαραγκού, Διδακτορική Διατριβή, ΕΚΠΑ, 2010.



ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ

[ntho@chem.uoa.gr](mailto:ntho@chem.uoa.gr)



Trace Analysis and Mass Spectrometry Group

<http://trams.chem.uoa.gr>

