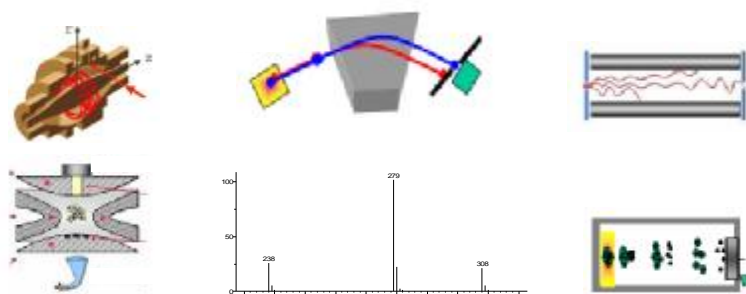


ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

MASS SPECTROMETRY

Νίκ. Σ. Θωμαΐδης
Εργ. Αναλυτικής Χημείας, ΕΚΠΑ

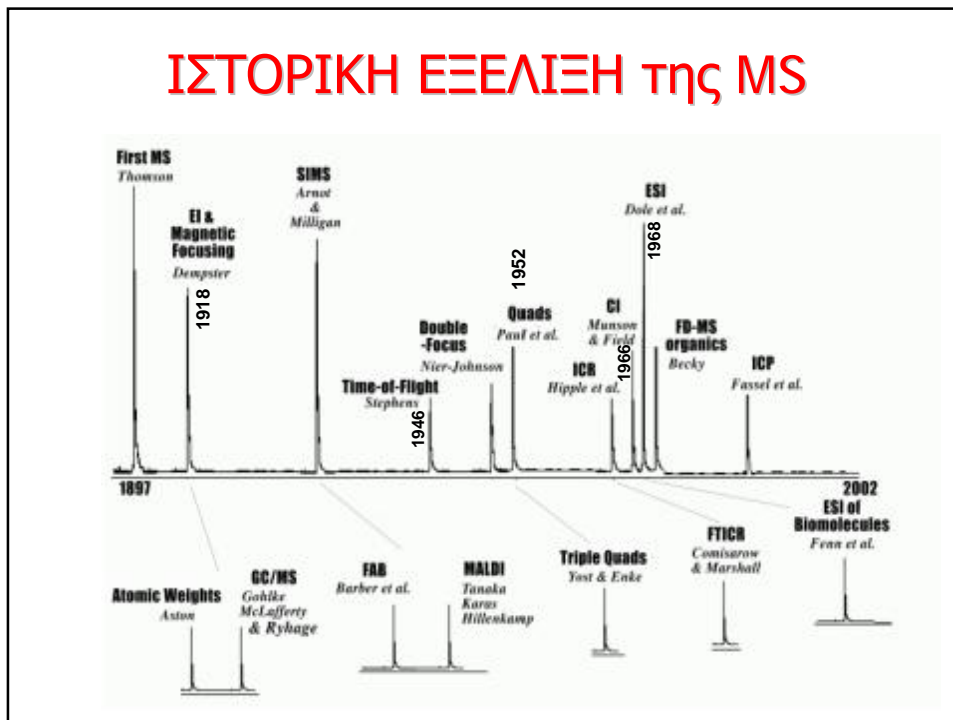


ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

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



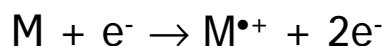
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

ΟΡΙΣΜΟΣ:

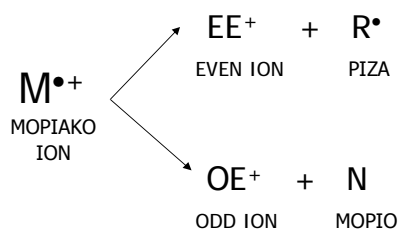
Οικογένεια τεχνικών προσδιορισμού δομής και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων, οι οποίες βασίζονται στον **ιοντισμό** ατόμων ή μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων στην αέρια φάση και την καταγραφή της **σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος** που αντιστοιχεί σε κάθε **λόγο μάζας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

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Ιοντισμός :



Θραυσματοποίηση :



EE⁺: ιόν με άρτιο αριθμό e

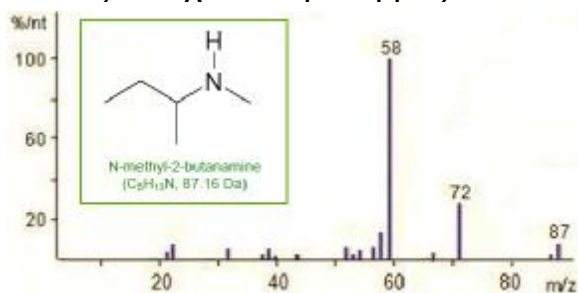
OE⁺: ιόν με περιττό αριθμό e

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

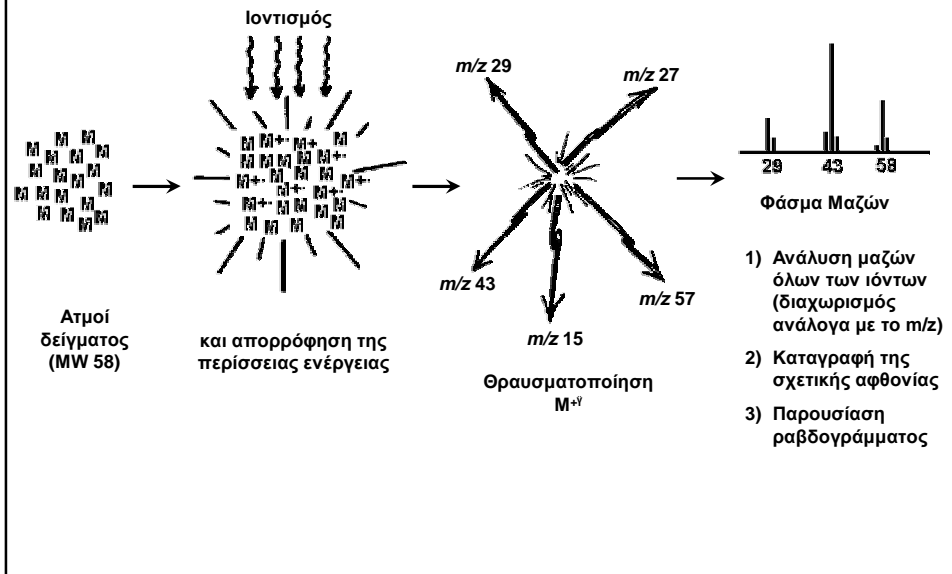
Nitrogen Rule:

Μόρια με περιττό αριθμό ατόμων N θα έχουν περιττό MB. Τα ιοντικά θραύσματα που προκύπτουν με απλή θραυσματοποίηση θα έχουν άρτια μάζα.

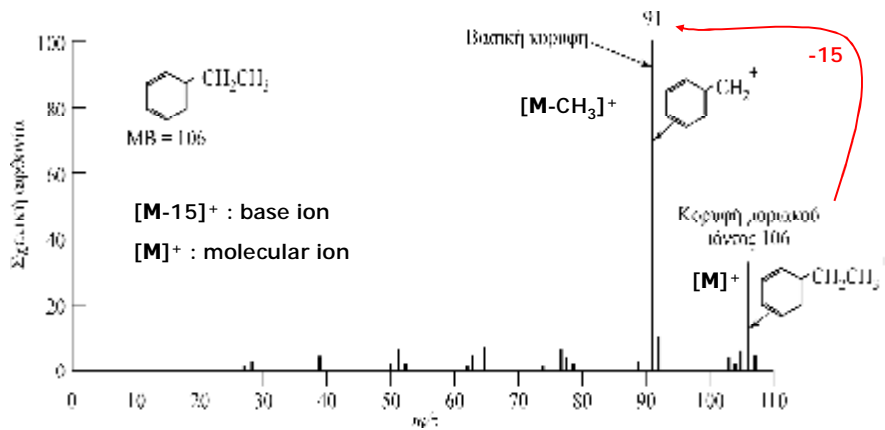
Μόρια με άρτιο αριθμό N θα έχουν άρτιο MB. Τα θραύσματα τους θα έχουν περιττή μάζα.



ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ



ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ



ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ

Λογικές απώλειες μαζών για την εύρεση του μοριακού ιόντος

From Bond Cleavage		From rearrangements	
Fragment	Mass	Neutral Molecule	Mass
H	1	H ₂	2
CH ₃	15	NH ₃	17
NH ₂ or O (from NO)	16	H ₂ O	18
OH	17	C ₂ H ₂	26
F	19	HCN	27
CN	26	CO or C ₂ H ₄	28
C ₂ H ₃	27	CH ₂ O	30
C ₂ H ₅ or CHO	29	CH ₃ OH	32
NO	30	H ₂ S	34
OCH ₃ or CH ₂ OH	31	C ₃ H ₆ or C ₂ H ₂ O	42
SH or H ₂ O+CH ₃	33	CO ₂	44
Cl	35	C ₂ H ₅ OH	46
C ₃ H ₇ or CH ₃ CO	43	C ₃ H ₇ OH or CH ₃ CO ₂ H	60
NO ₂	46	C ₆ H ₆	78
C ₄ H ₉	57	HBr	80

ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ

Τυπικά ιοντικά θραύσματα οργανικών μορίων

Compound type	Formula	Typical Fragments
Alkanes	$C_nH_{2n+1}^+$	15, 29, 43, 57, 71, 85...
Alkenes, Cycloalkanes	$C_nH_{2n}^+$	28, 42, 56, 70, 84...
Cycloalkenes	$C_nH_{2n-1}^+$	27, 41, 55, 69, 83...
Aldehydes, Ketones	$C_nH_{2n-1}O^+$	29, 41, 55, 69, 83...
Amines	$C_nH_{2n+2}N^+$	30, 44, 58, 72, 86...
Alcohols, Ethers	$C_nH_{2n+1}O^+$	31, 45, 59, 73, 87...
Acids, Esters	$C_nH_{2n-1}O^+$	45, 59, 73, 87...
Aromatic compounds		91, 77

ΑΤΟΜΙΚΗ & ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ

Μονάδα ατομικής μάζας (u ή Da) :

Το 1/12 της μάζας ενός ουδέτερου ατόμου ^{12}C

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

Ακριβής μάζα (exact mass):

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

Μοριακή μάζα $^{12}\text{C}^1\text{H}_4$:

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

Ονομαστική (μονοϊσοτοπική) μάζα (nominal mass)

Για το $^{12}\text{C}^1\text{H}_4$: 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

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

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

(χωρίς μονάδες)

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 20-3 Φυσικά αφθονία ισοτοπων μερικών συνηθισμένων στοιχείων

Στοιχείο ^a	αφθονότερο ισοτόπο	Αφθονία άλλων ισοτοπων σε σχέση με 100 μέρος του αφθονότερου ^b	
Υδρογόνο	^1H	^2H	0,015
Ανθρακας	^{12}C	^{13}C	1,08
Άζωτο	^{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	4,10
Χλώριο	^{35}Cl	^{37}Cl	32,5
Βρόμιο	^{79}Br	^{81}Br	98,0
Ιωδίτιο	^{127}I	^{129}I	0,1
		^{131}I	3,4

^a Τα φθόριο (^{19}F), φασφόρος (^{31}P), κάλιο (^{39}K) και ιωδίο (^{127}I) δεν διαθέτουν άλλα φυσικά ισοτόπα.
^b Οι αριθμοί δείχνουν το μέσο όρο του πλήθους των ισοτοπων ατόμων που υπάρχουν ανά 100 άτομα του αφθονότερου ισοτόπου. Δηλαδή για κάθε 100 άτομα ^{12}C θα υπάρχουν κατά μέσο όρο 1,08 άτομα ^{13}C .

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές

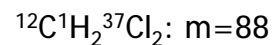
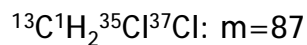
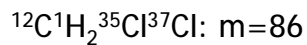
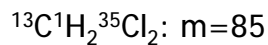
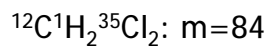
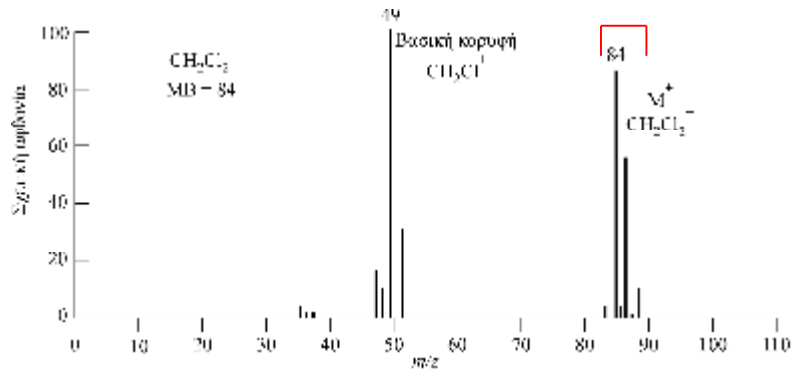
Στη φύση υπάρχουν τρεις κατηγορίες στοιχείων:

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

“A+1” στοιχεία – Δύο φυσικά ισότοπα υπάρχουν τα οποία διαφέρουν κατά 1 Da
πχ Ανθρακας

“A+2” στοιχεία – Δύο φυσικά ισότοπα υπάρχουν τα οποία διαφέρουν κατά 2 Da
πχ Χλώριο

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές



Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R

Διακριτική ικανότητα φασματομέτρου μαζών:

$$R = m/\Delta m$$

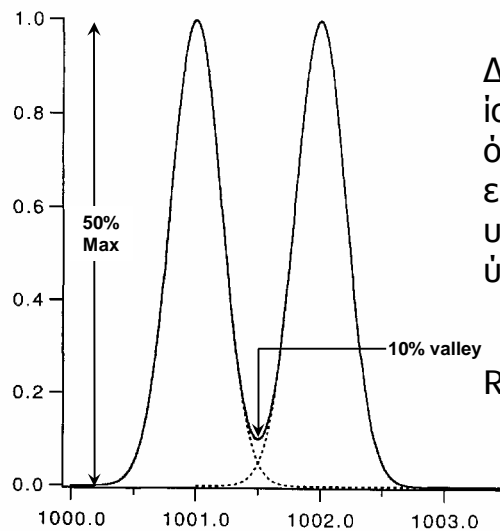
Η ικανότητα να διακρίνει δύο μόλις διαχωριζόμενες κορυφές, m και $m+\Delta m$.

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

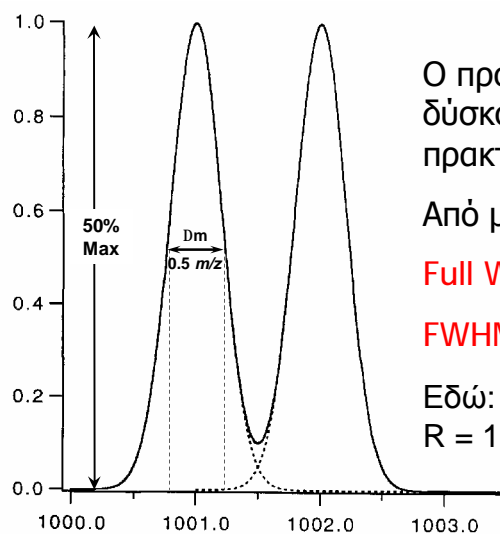


Δύο κορυφές (m/z) – ίσης έντασης – θεωρείται ότι διαχωρίζονται αν η επικάλυψη τους δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους τους (συνήθως)

..... 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:

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

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

Πολλές φορές αναφέρεται και ως ακρίβεια (accuracy)

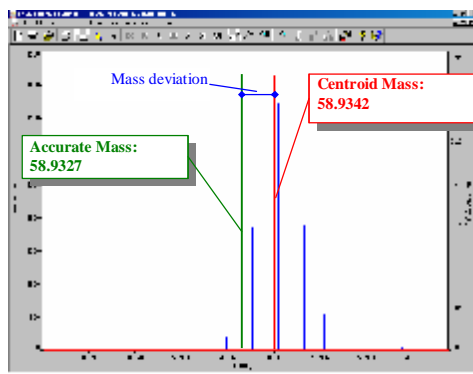
Ακρίβεια Μάζας Mass Accuracy

$$\Delta m = \text{Mass Offset} = \text{Centroid Mass} - \text{Accurate Mass}$$
$$0.0015 = 58.9342 - 58.9327$$

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

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

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



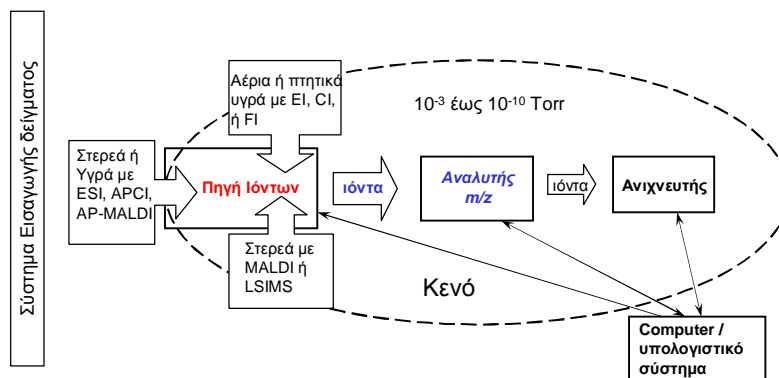
Ταχύτητα και εύρος σάρωσης Scan Rate and Scan Range

Εύρος σάρωσης: ελάχιστο – μέγιστο m/z που μπορεί να «καταγράψει» ο αναλυτής μάζας

Ταχύτητα σάρωσης: αριθμός των φασμάτων (ένα συγκεκριμένο εύρος μαζών) που μπορεί να καταγράψει ο αναλυτής μάζας σε 1 sec.
Μονάδες: Hz (HR-MS) ή u/sec (Q)

Scan Time / Dwell time: ο χρόνος που ο αναλυτής μάζας ολοκληρώνει ένα «scan event» και καταγράφει τις ιοντικές κρούσεις του

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

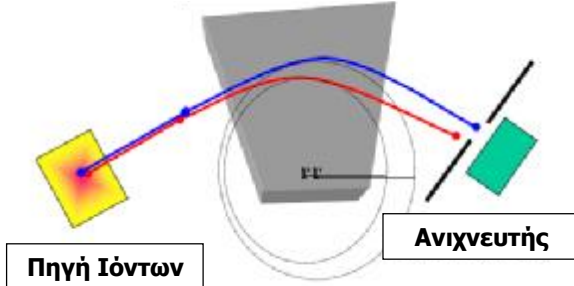
Διακριτική ικανότητα αναλυτών μαζών

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)**

Αναλυτές μαγνητικού ή ηλεκτρικού τομέα

Μαγνητικός Αναλυτής

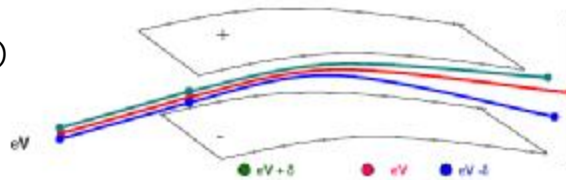


$$m/z = \frac{B^2 r^2 e}{2V}$$

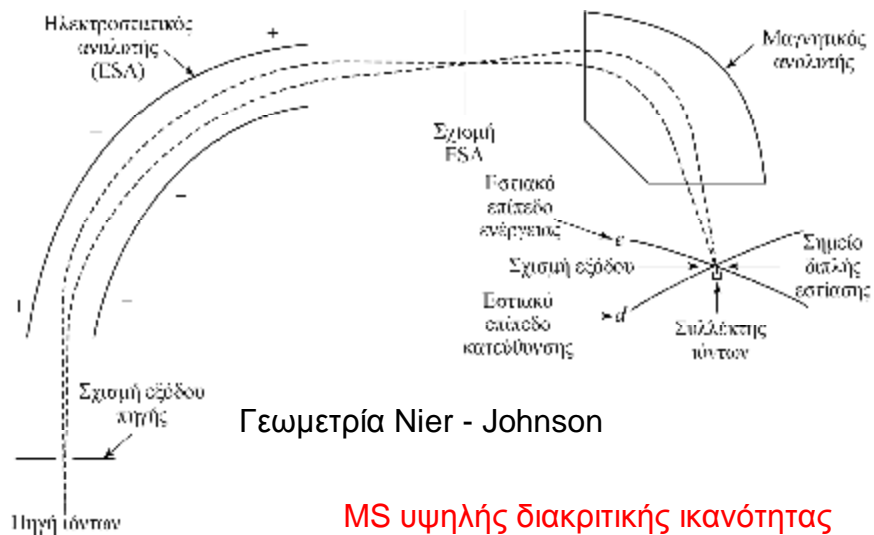
Διαχωρισμός των ιόντων επιτυγχάνεται με σάρωση της έντασης του μαγνητικού πεδίου (V, r : σταθερά)

Φασματόμετρα Απλής Εστίασης
(Single focusing MS)
[$R \leq 2000$]

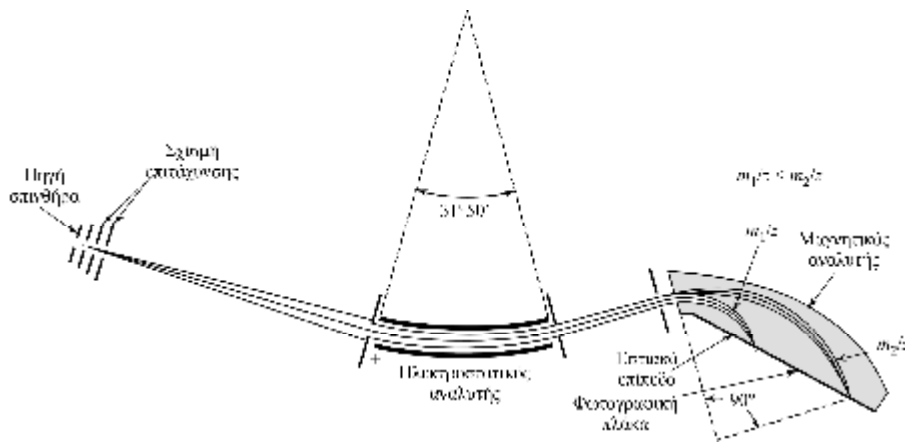
Ηλεκτροστατικός Αναλυτής



Αναλυτές μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης



Αναλυτές μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης



Γεωμετρία Mattachuh - Herzog

Φασματομέτρα μαζών μαγνητικού τομέα

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

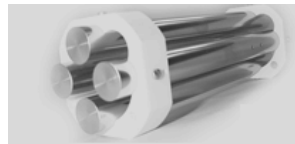
- Υψηλή διακριτική ικανότητα (διπλής εστίασης)
- Προσδιορισμός μοριακών μαζών
- Δυνατότητα προσδιορισμού ισοτόπων
- Πολύ καλή ευαισθησία σε χαμηλή R
- Δυνατότητα MS/MS
- Εφαρμογή στον προσδιορισμό διοξινών, ουσιών doping

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

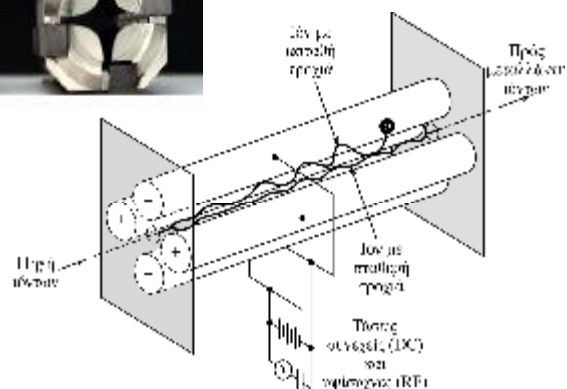
- Μικρό μέγεθος
- Το μικρότερο κόστος
- Υψηλή ταχύτητα σάρωσης (<100ms)
- Ανθεκτικός αναλυτής



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

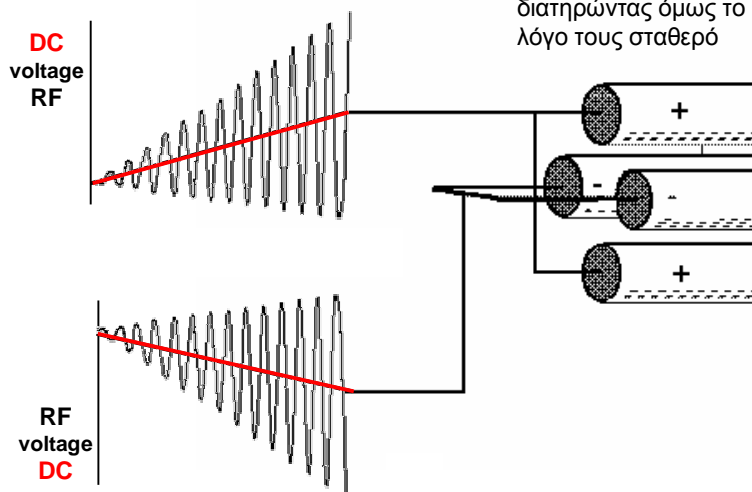
Χαμηλή Διακριτική ικανότητα: $\sim 1\text{Da}$ (u)

- Φίλτρο μαζών



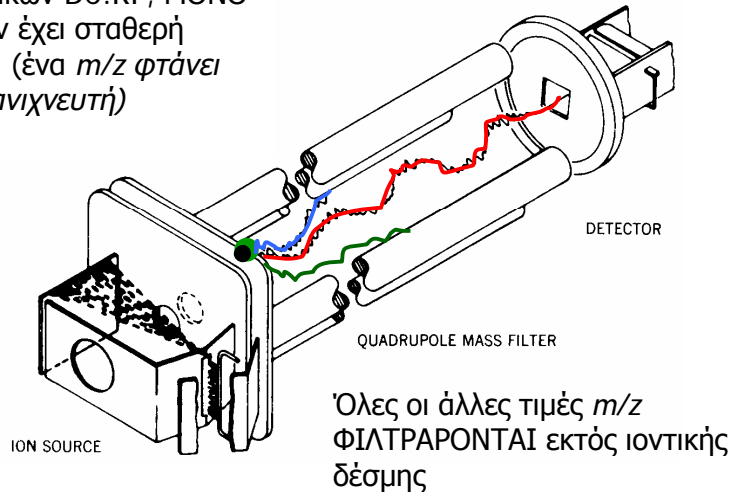
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ

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



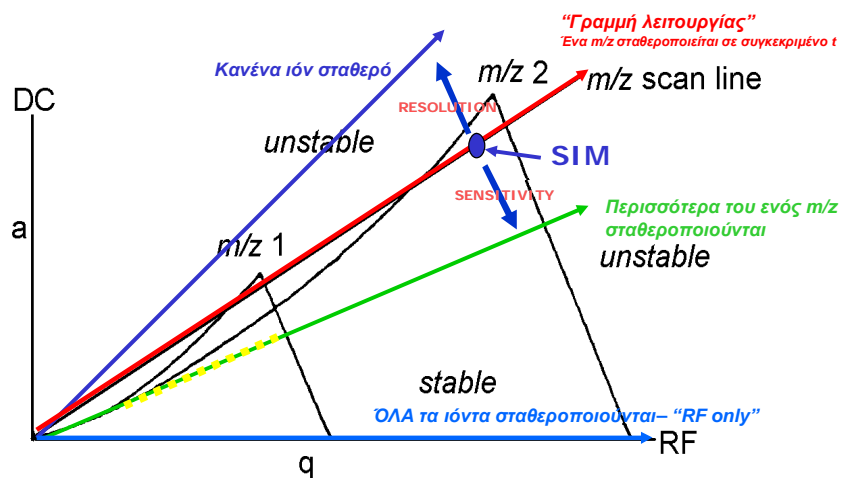
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ

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

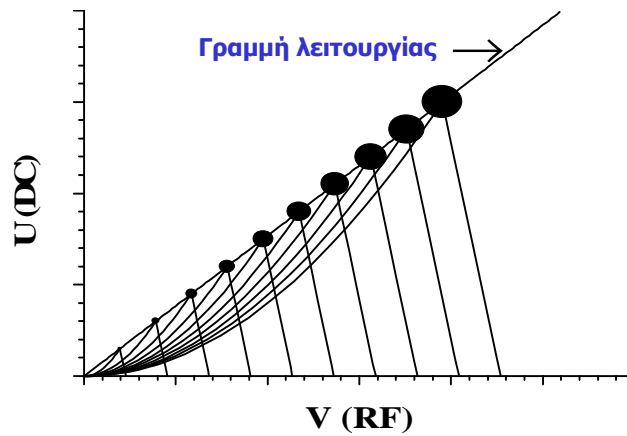


Διάγραμμα σταθερότητας ιόντων στο τετράπολο

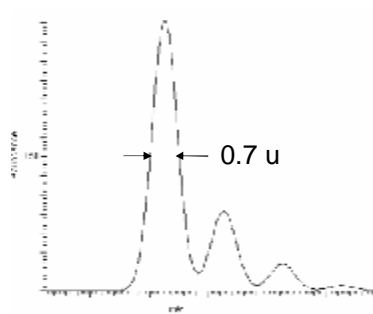
(Ion Stability Diagram)



Πλήρης σάρωση ιόντων σε τετράπολο



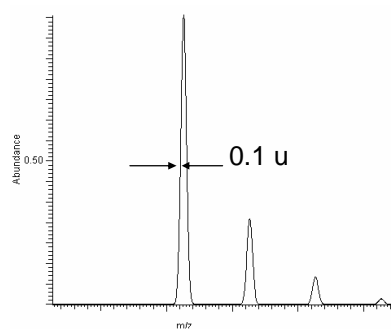
FWHM vs R στο τετράπολο



$$m/z \ 300 / 0.7 = R \ 428$$

$$m/z \ 500 / 0.7 = R \ 714$$

$$m/z \ 1000 / 0.7 = R \ 1.428$$

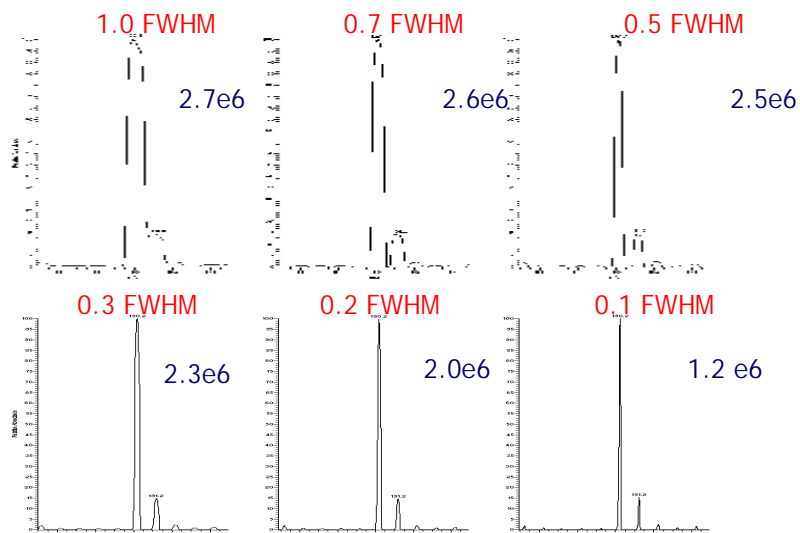


$$m/z \ 300 / 0.1 = R \ 3000$$

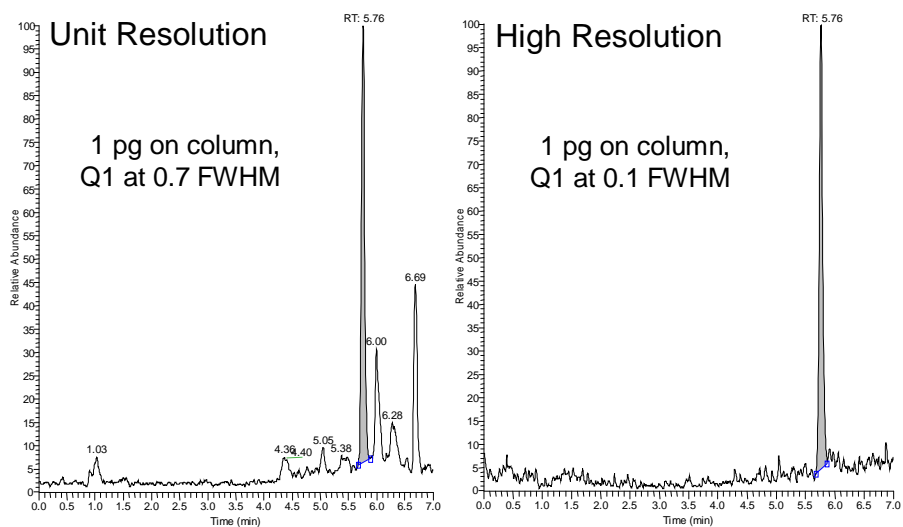
$$m/z \ 500 / 0.1 = R \ 5000$$

$$m/z \ 1000 / 0.1 = R \ 10.000$$

Resolution vs Intensity



LC/ESI/SRM of Clenbuterol – Urine matrix



Φασματομέτρα μαζών με τετράπολο

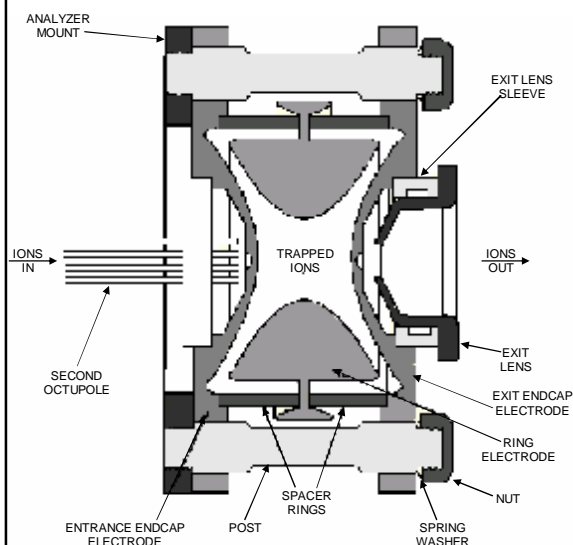
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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)

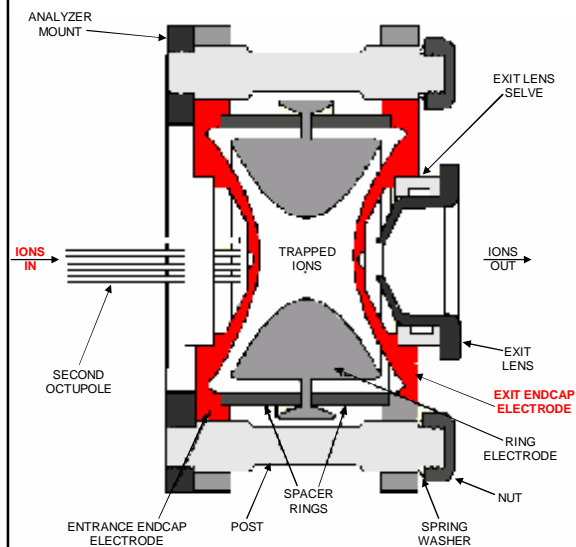
Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



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

Courtesy of Ian Jardine - Thermo Electron

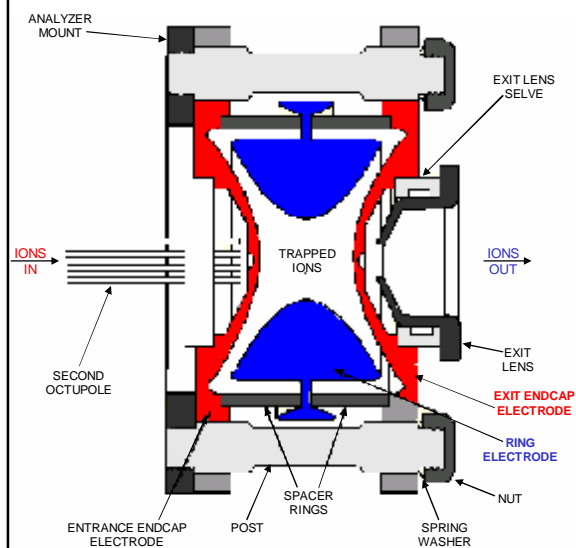
Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



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

Courtesy of Ian Jardine - Thermo Electron

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

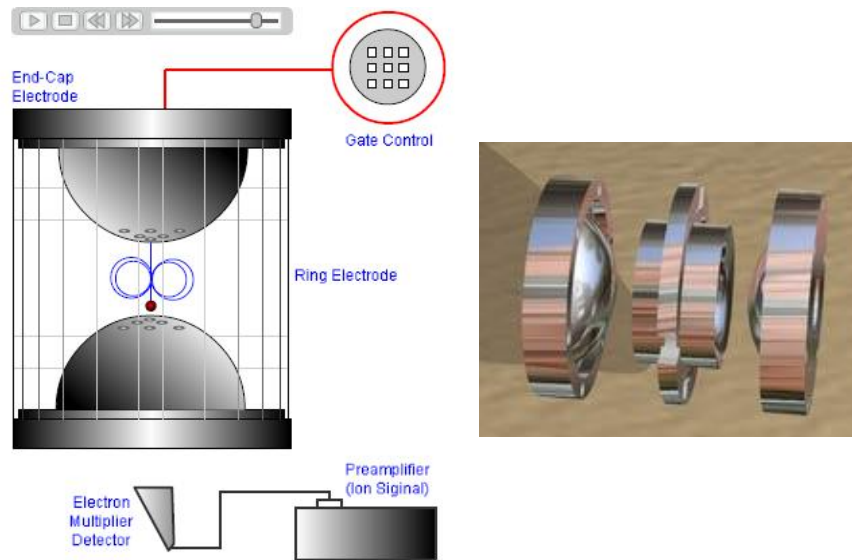


Ø Δυο **πλευρικά ηλεκτρόδια**, γειωμένα, και ένα **δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο** στο οποίο εφαρμόζεται ένα δυναμικό RF που αυξάνει

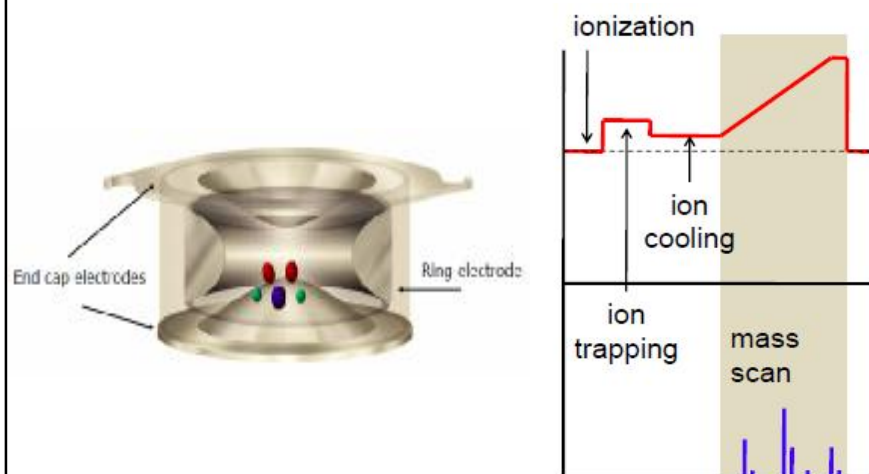
Ø Τα ιόντα είτε σχηματίζονται (GC/MS) είτε ενιόνται (LC/MS ή GC/MS) στην παγίδα και αποθηκεύονται

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

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



Τετραπολική Παγίδα Ιόντων (3D-IT)

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

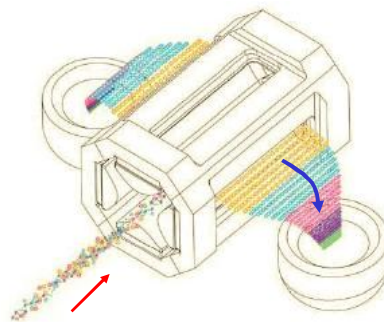
- Φθηνός αναλυτής με μικρό μέγεθος
- Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης ($> (1000 \text{ m/z}) \text{ s}^{-1}$)
- Χαμηλή απαίτηση κενού (10^{-3} Torr)
- Δυνατότητα MS/MS και MS^n (ταυτοποίηση δομής)
- Υψηλή ευαισθησία (περιορισμό στις ενώσεις)
- Κατάλληλος ανιχνευτής χρωματογραφίας
- Μεταβολίτες φαρμάκων, μελέτες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

Γραμμική Παγίδα Ιόντων (2D-IT ή LIT)

Στις 2D-IT, τα ιόντα ενίονται αξονικά στην παγίδα, και κατά τη σάρωση εκβάλλονται ακτινικά σε 2 ανιχνευτές (Thermo LTQ)



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

Έχει μεγαλύτερη χωρητικότητα σε ιόντα από την 3D-IT, αυτό βελτιώνει τη γραμμική περιοχή και μειώνει τις ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιόντων, δεν έχει κατώτατο περιορισμό μαζών, μπορεί να λειτουργήσει σαν κυψελίδα θραυσματοποίησης χωρίς παγίδευση (ταχύτερη λειτουργία), συμβατή με Orbitrap.

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

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



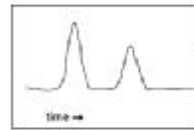
Παλμική λειτουργία

Χρόνοι πτήσης
1-30 μ s

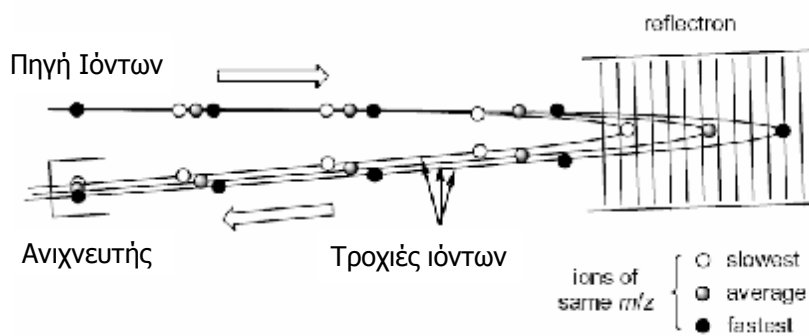
$$\text{K.E.} = \frac{1}{2} mv^2 = zV$$

$$L = vt$$

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



Reflectron TOF-MS



TOF-MS

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

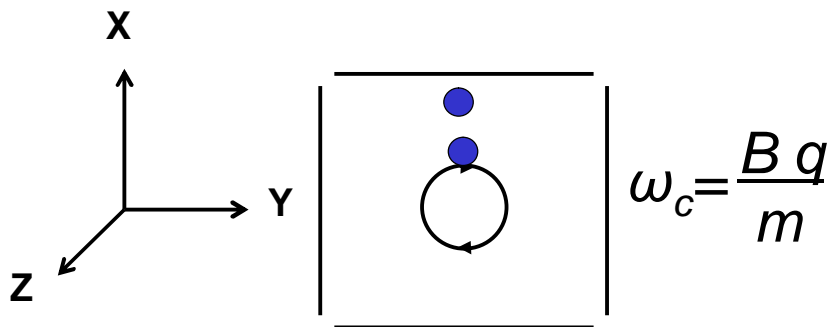
- Απλότητα λειτουργίας αναλυτή μαζών
- Θεωρητικά απεριόριστο εύρος μαζών (reflectron TOF: 10000 u)
- Τη μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης (10^6 m/z s⁻¹ ή τυπικό εύρος σάρωσης σε 50Hz)
- Υψηλή διακριτική ικανότητα (R: 10000 - 40000)
- Δυνατότητα MS/MS (υβριδικό Q-TOF-MS)
- Βιομόρια, μελέτες δομής πρωτεϊνών

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)

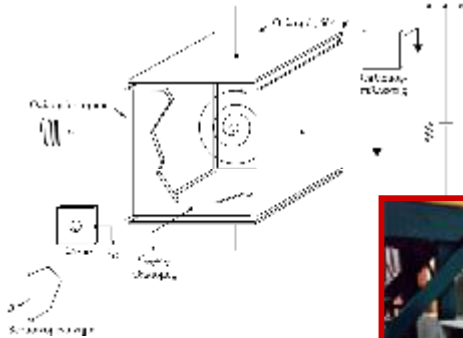
Ιοντικός κυκλοτρονικός συντονισμός Ion Cyclotron Resonance, ICR

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

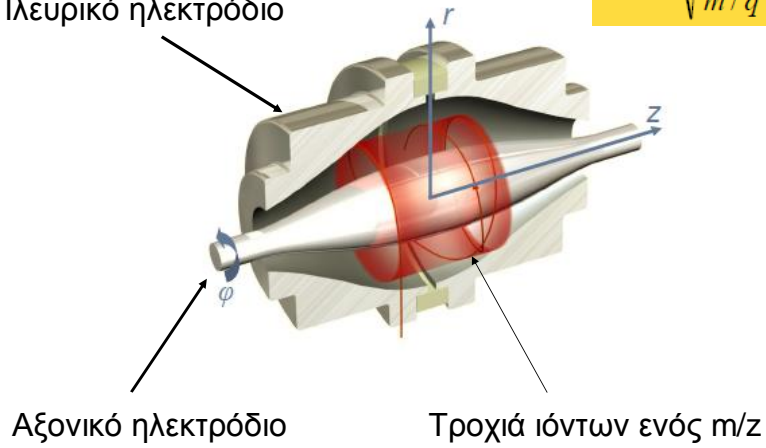
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

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

Orbitrap

Πλευρικό ηλεκτρόδιο

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



Αξονικό ηλεκτρόδιο

Τροχιά ιόντων ενός m/z

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



Orbitrap

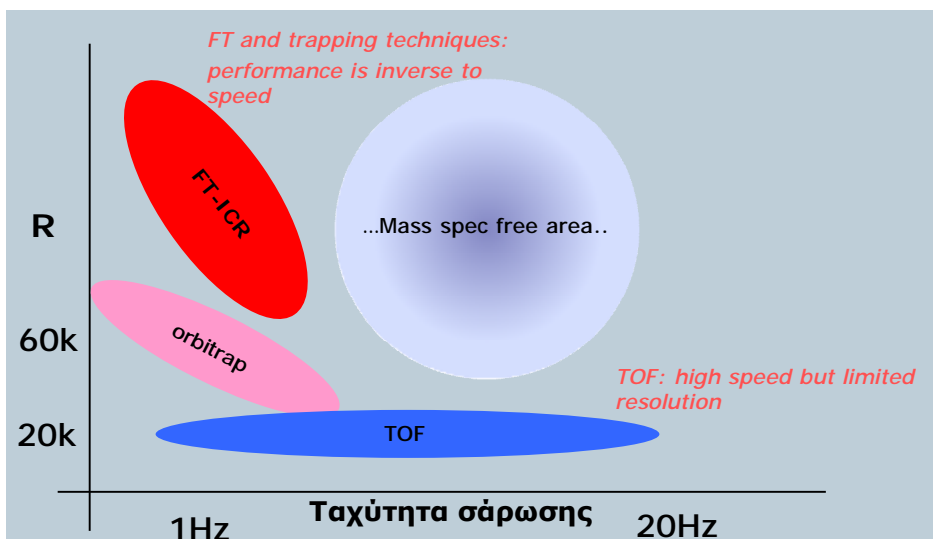
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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

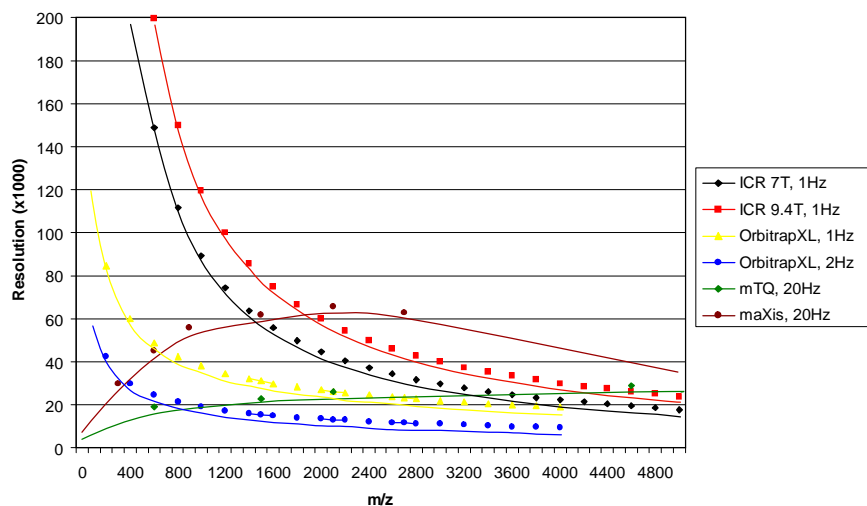
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Ακριβό όργανο (ειδικά τα υβριδικά) – πολύπλοκη λειτουργία
- Σχετικά αργή σάρωση για εφαρμογές UPLC
- Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-8} Torr)

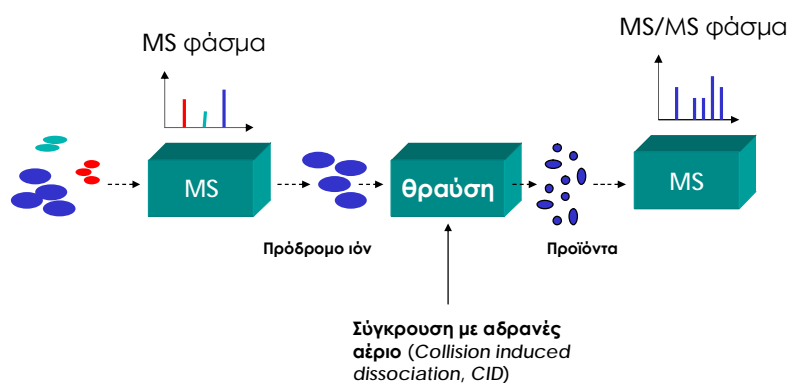
Απόδοση HR-MS : Συμβιβασμός ταχύτητας - R



Resolution vs m/z

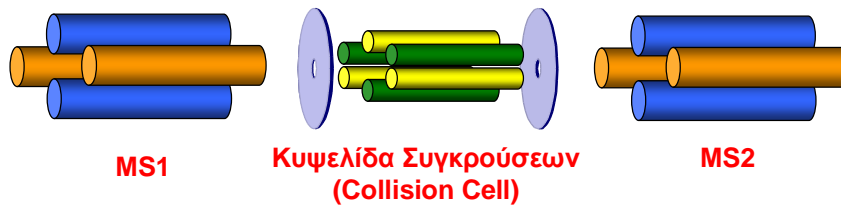


Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)

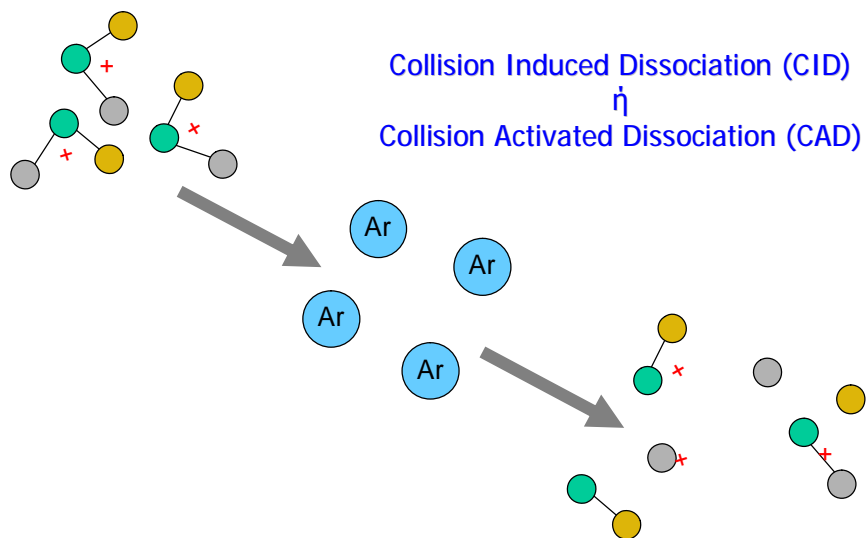


Τριπλό τετράπολο Triple Stage Quadrupole (TSQ ή QqQ)

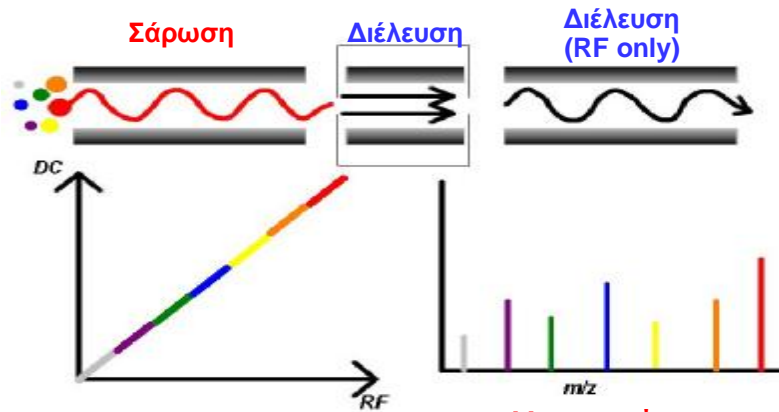
1. Το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion) παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το 1^ο τετράπολο (MS1)
2. Οδηγείται στο 2^ο τετράπολο (κυψελίδα συγκρούσεων) όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (Ar ή He), παράγοντας θυγατρικά ιόντα (daughter or product ions)
3. Ο διαχωρισμός και μέτρηση των θυγατρικών ιόντων γίνεται στο 3^ο τετράπολο (MS2)



Θραυσματοποίηση μέσω συγκρούσεων



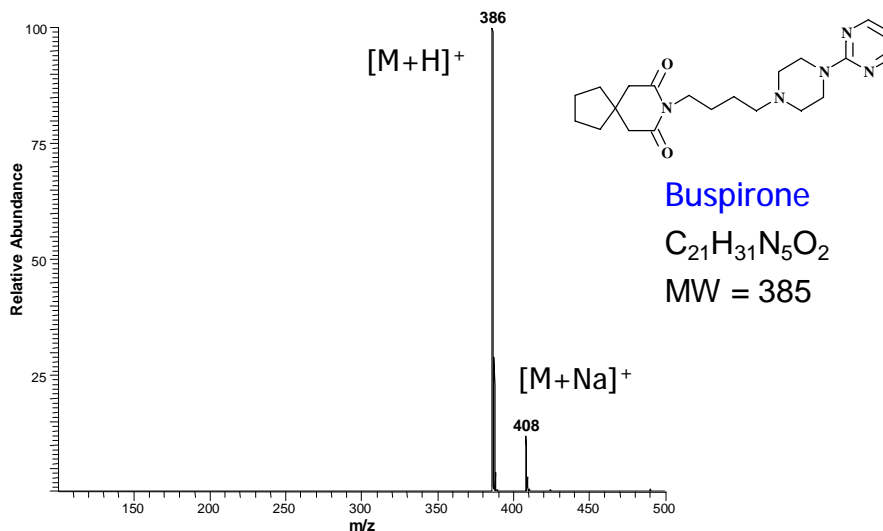
Φασματομετρία Μαζών Πλήρους Σάρωσης Full-Scan Mass Spectrometry



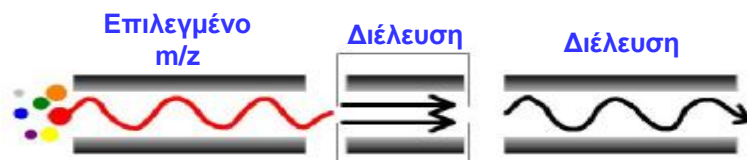
Πλεονέκτημα:
Πληροφορία για το MB

Μειονεκτήματα:
- Αργή σάρωση
- Όχι ποσοτικοποίηση

Full-Scan MS της Buspirone

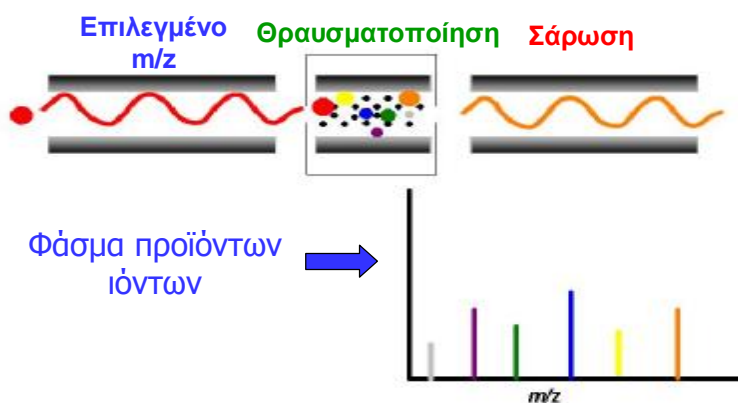


Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος Single Ion Monitoring (SIM)



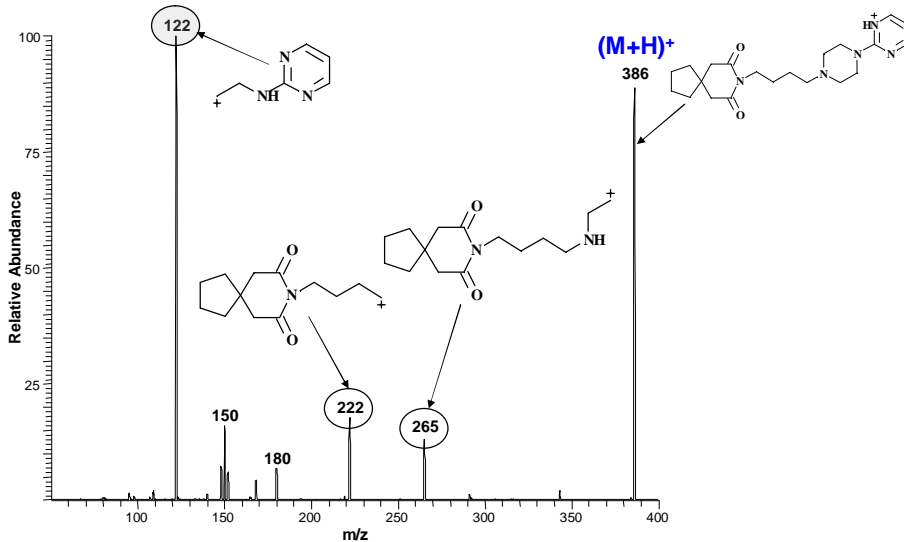
- **Πλεονεκτήματα:**
 - Παρακολούθηση συγκεκριμένου αναλύτη
 - Γρήγορη σάρωση
 - Απλότητα
- **Μειονεκτήματα:**
 - Παρεμποδίσεις
 - Όχι τόσο ευαίσθητο όσο η SRM λειτουργία

MS/MS προϊόντων ιόντων Product Ion Scanning

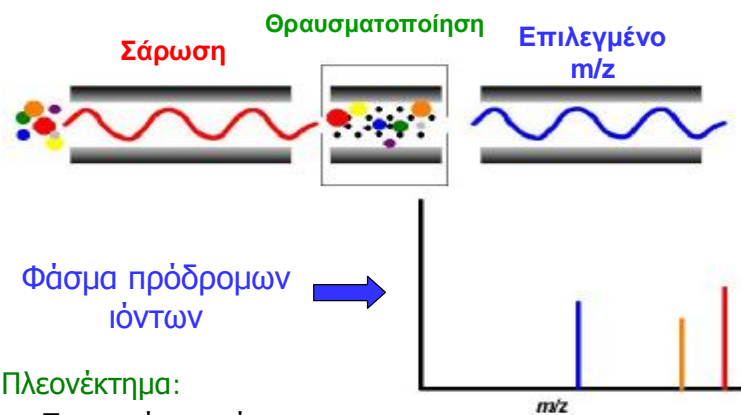


- **Πλεονέκτημα:**
 - Παρέχει πληροφορίες για τη δομή
- **Μειονέκτημα:**
 - Αργή σάρωση
 - Όχι ποσοτικοποίηση

Φάσμα προϊόντων ιόντων της Buspirone



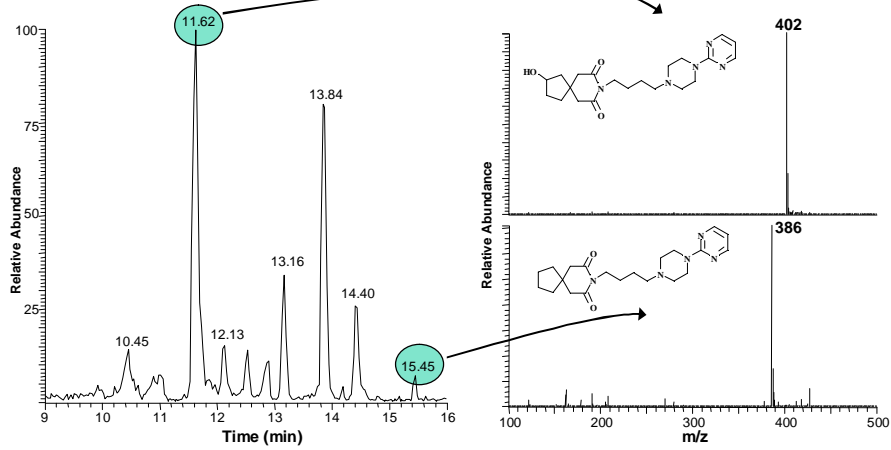
MS/MS πρόδρομων ιόντων Precursor Ion Scanning



- **Πλεονέκτημα:**
 - Ταυτοποίηση ενώσεων που δίνουν ένα συγκεκριμένο προϊόν ιόν (π.χ., PO₃⁻ τα φωσφοπεπτίδια)

- **Μειονέκτημα:**
 - Αργή σάρωση

MS/MS μητρικών ιόντων των μεταβολιτών της Buspirone

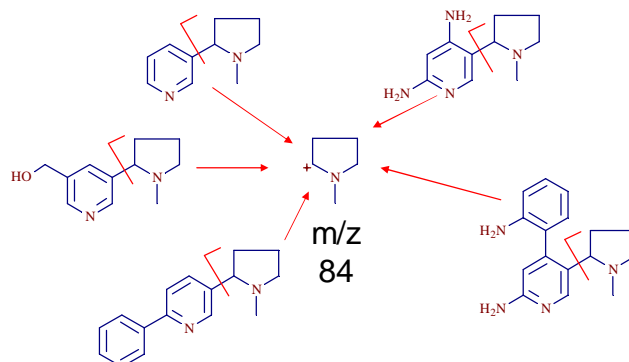


Precursor Ion Scan: Το Q3 παρακολουθεί μόνο το m/z 122

Precursor ion scans

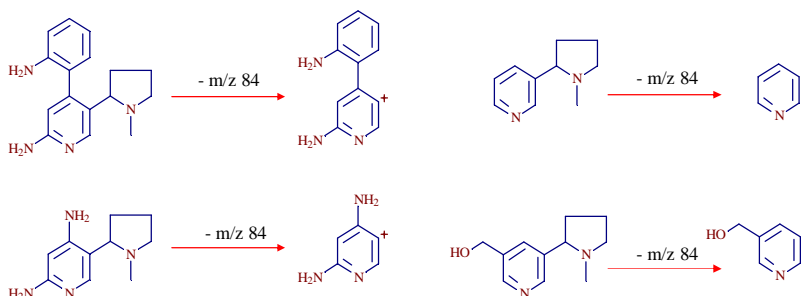
Οι σαρώσεις πρόδρομων ιόντων χρησιμοποιούνται για πειράματα διαλογής (screening)

Όταν μια ομάδα ενώσεων, όλες δίνουν το ίδιο ιοντικό θραύσμα



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)



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

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

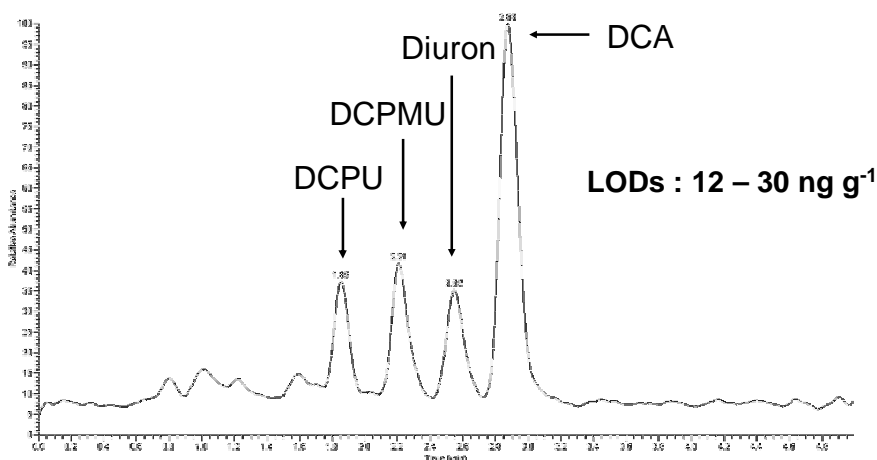
Neutral loss:
m/z 56

Neutral loss:
m/z 56 97

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

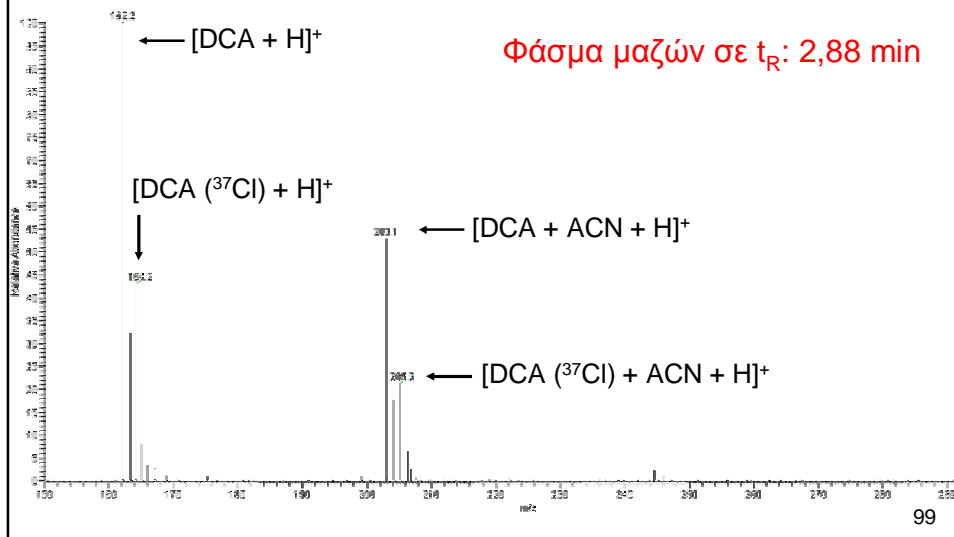
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

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



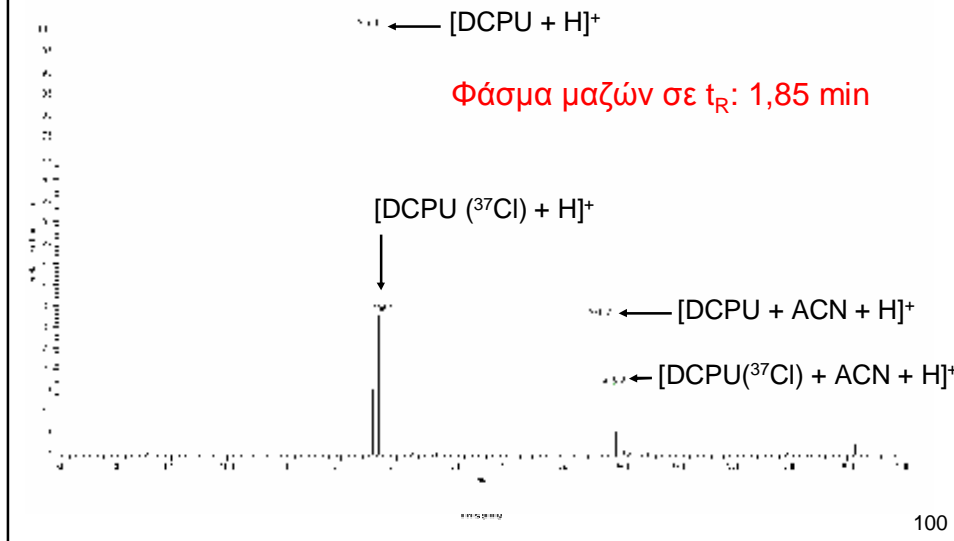
ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



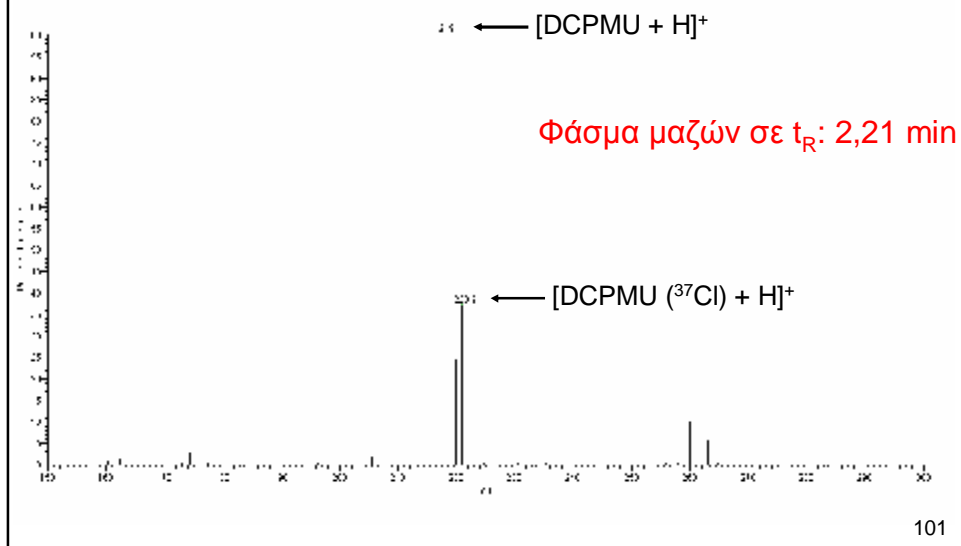
ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



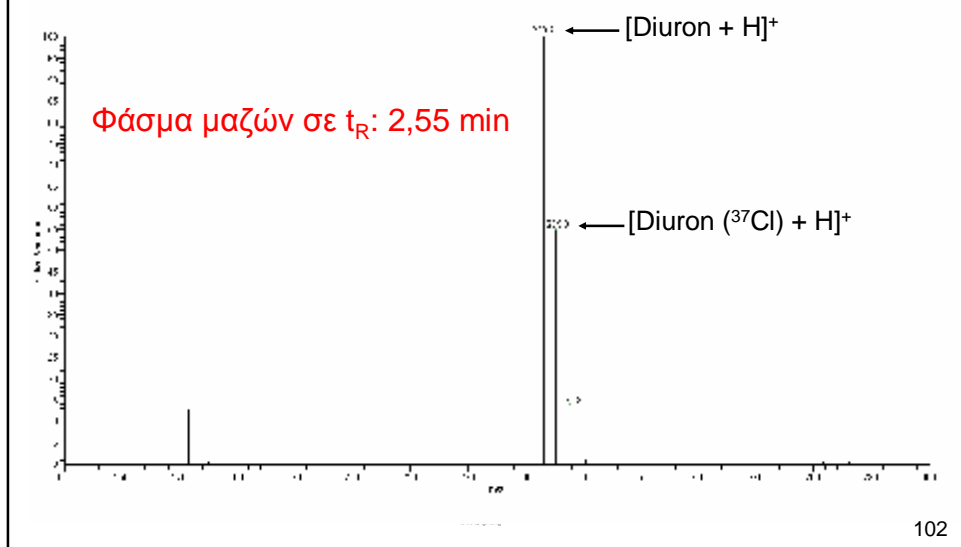
ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



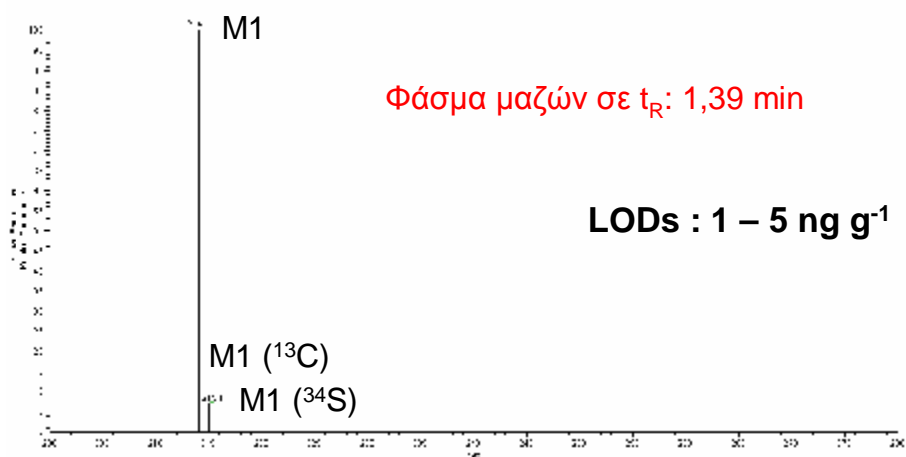
ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ



103

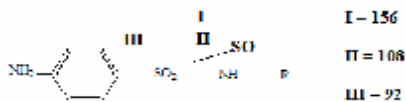
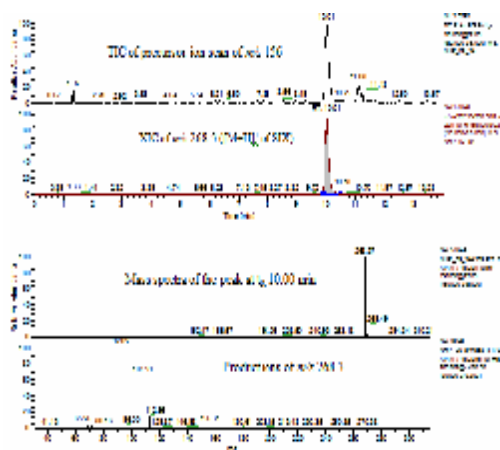
ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

- Ø Ημιοσοτικοί προσδιορισμοί: διαχωρισμός δειγμάτων που περιέχουν τις ενώσεις από μία δεδομένη συγκέντρωση (LOD) και πάνω από εκείνα που τις περιέχουν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις
- Ø Ποιοτική εφαρμογή: μέσω των φασμάτων μαζών, για την ανίχνευση ενώσεων με παρόμοια δομή ή άγνωστους μεταβολίτες μιας ένωσης που είτε δίνουν κοινό προϊόν ιόν ή έχουν κοινή απώλεια ουδέτερου μορίου

104

DATA DEPENDENT SCANS

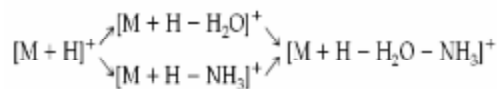
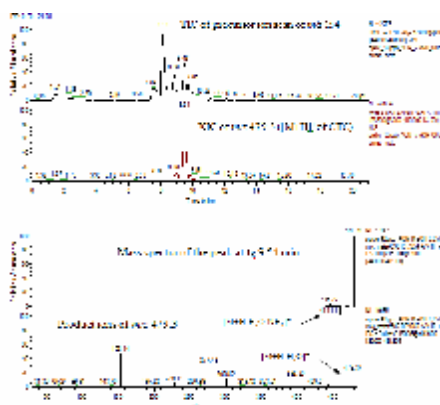
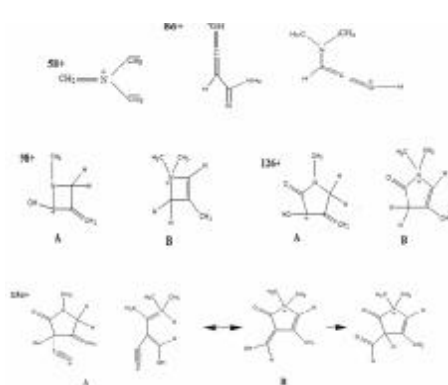
TIC και full-scan φάσμα της sulfisoxazole (SIX) σε δείγμα λαβράκι



I – 156
 II – 108
 III – 92

DATA DEPENDENT SCANS

Θραυσματοποίηση τετρακυκλινών



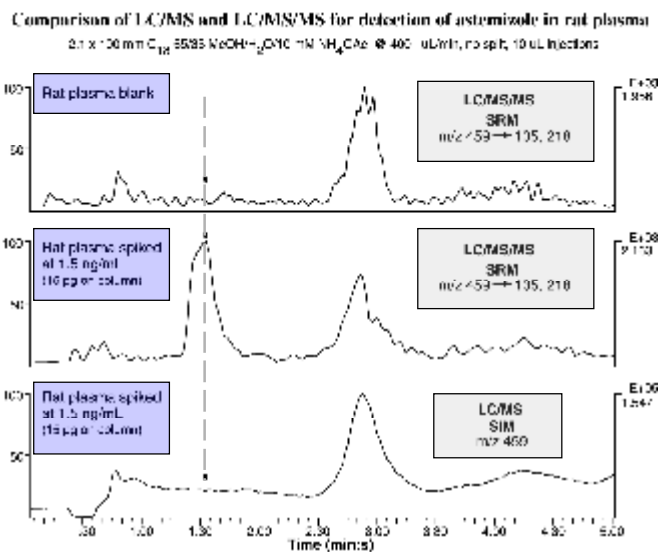
Παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης Selected Reaction Monitoring (SRM)



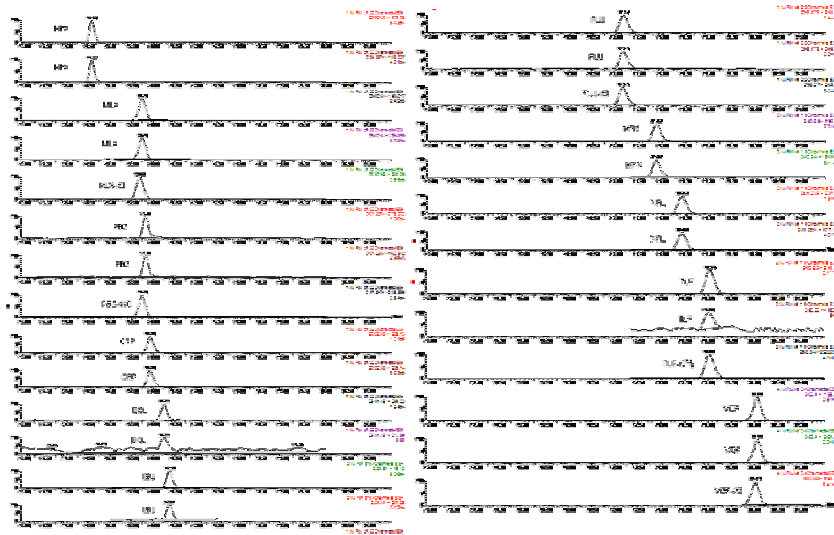
Μεταπτώση ή «αντίδραση» : $m_1/z \rightarrow m_2/z$

- Πλεονεκτήματα:
 - Παρακολούθηση επιλεγμένου αναλύτη
 - Γρήγορη σάρωση
 - "Ταυτόχρονη" παρακολούθηση πολλών μεταπτώσεων (MRM)
- Μειονέκτημα:
 - Οι πληροφορίες για τη δομή της ένωσης είναι περιορισμένες

Εκλεκτικότητα MS/MS σε δείγματα με πολύπλοκη μήτρα



MRM Χρωματογράφημα προσδιοριζόμενων ουσιών

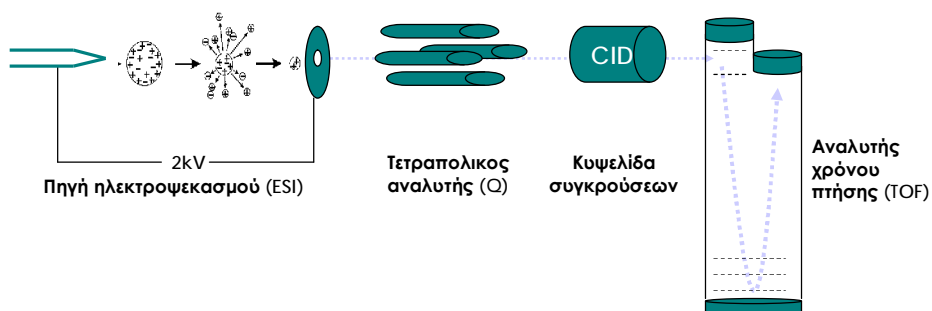


Scan Modes: Quadrupole MS

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

Υβριδικός Q-TOF αναλυτής

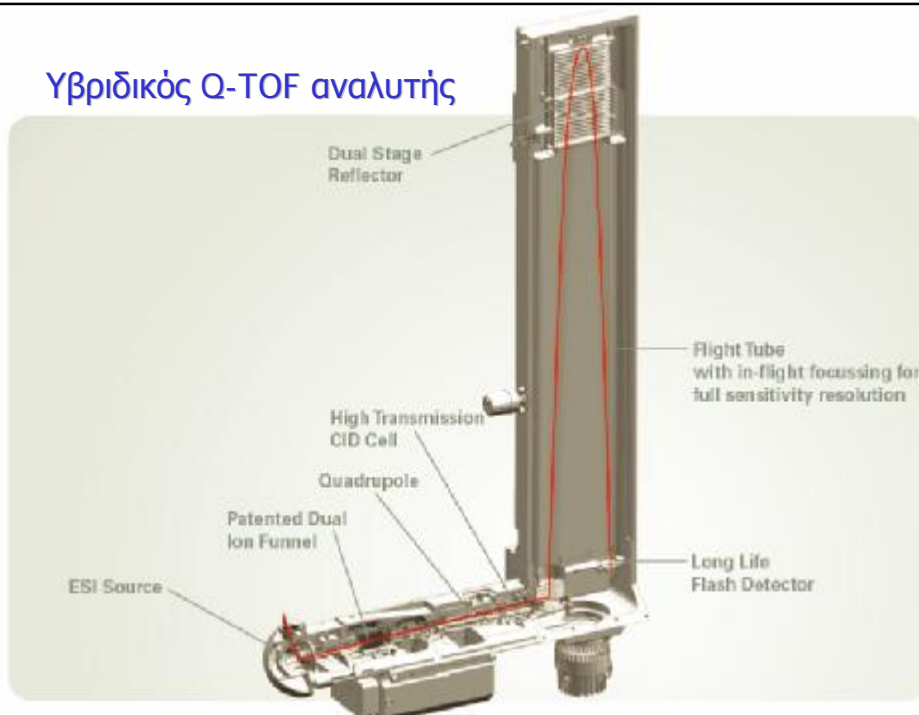


Ø Υψηλή διακριτική ικανότητα ($m/\Delta m \sim 10.000-20.000$, μέγιστο 40.000)

Ø Ακρίβεια μάζας: $(m_{\text{θεωρ}} - m_{\text{πειραμ}}) \times 10^6 / m_{\text{θεωρ}} \sim 1-5$ ppm

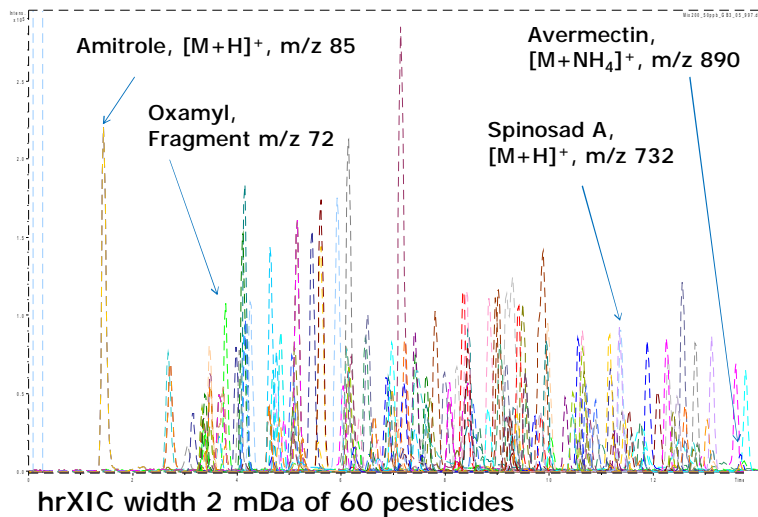
Ø Υψηλή ευαισθησία: Κατώτερο όριο ανίχνευσης 100 fmol/μL

Υβριδικός Q-TOF αναλυτής

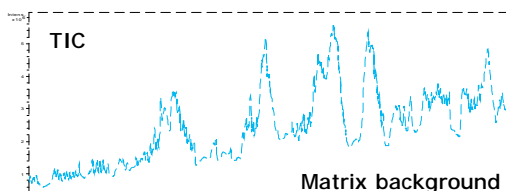


Broad mass bandwidth

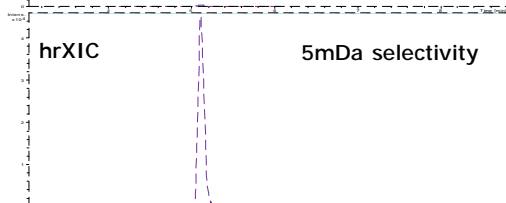
One-shot acquisition mode from 70 to 900 m/z



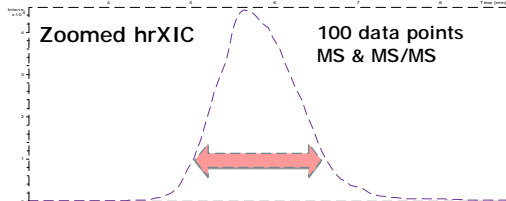
TARGET SCREENING ME LC-Q-TOF-MS



A) TIC from complex sample
60 pesticides spike into
ginger (QuEChERS)

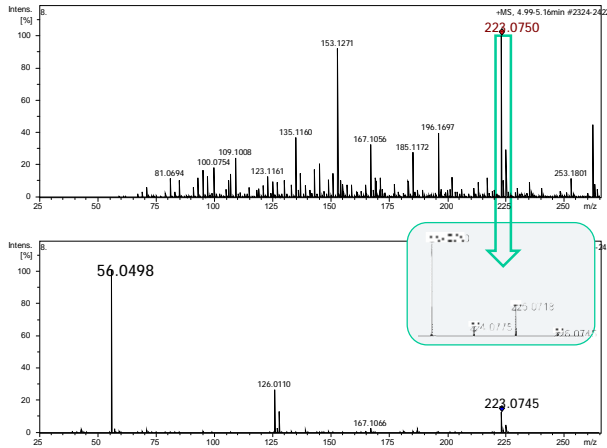


B) High resolution extracted
ion chromatogram (hrXIC)
of m/z 223.0745 with 5mDa
discrimination width.
(Acetamiprid)



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

TARGET SCREENING ME LC-Q-TOF-MS

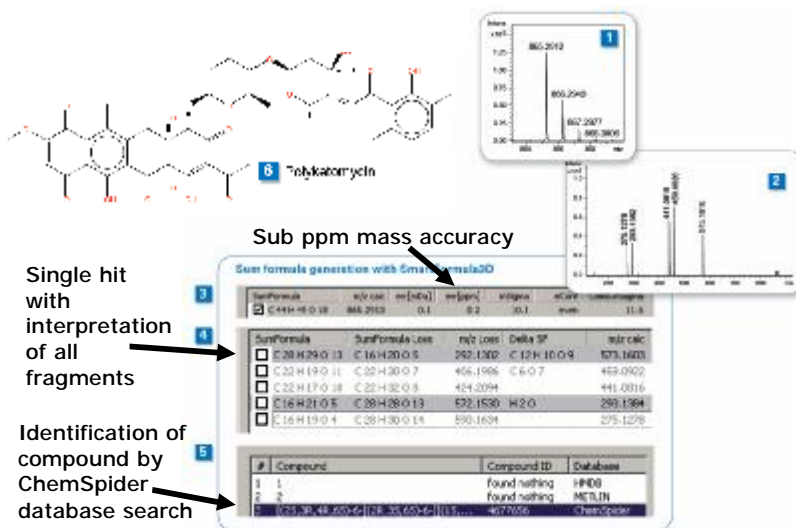


D) High-resolution survey MS with m/z 223.0745 selected as precursor.

E) High spectral accuracy for ID

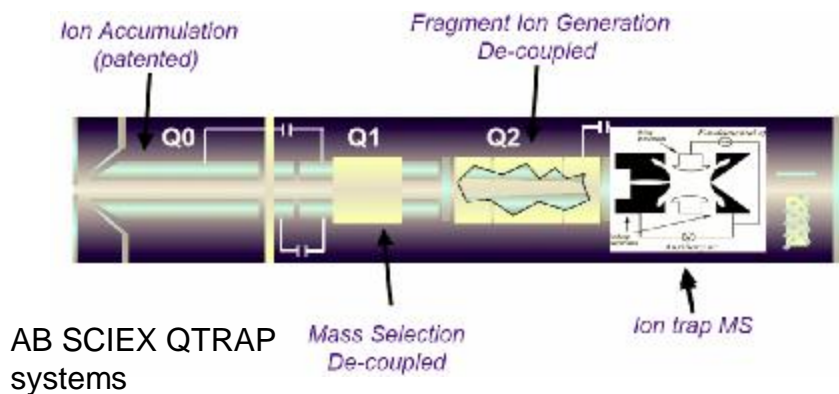
F) High sensitive MS/MS spectrum even at very low MW (56.0498 m/z) for confirmation by fragment information.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΓΝΩΣΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ LC-Q-TOF-MS

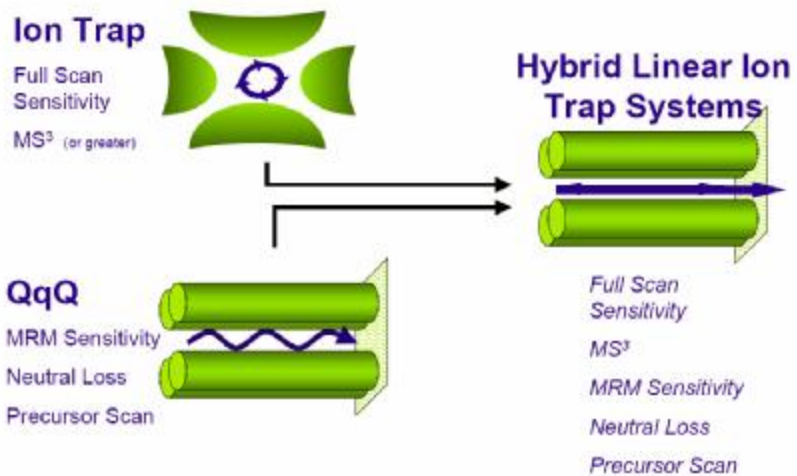


Υβριδικός Q-TRAP αναλυτής

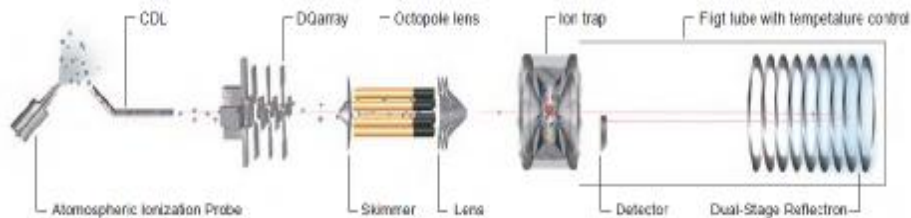
Δυνατότητες και λειτουργίες QqQ + δυνατότητα MSⁿ



Υβριδικός Q-TRAP αναλυτής



Υβριδικός IT-TOF αναλυτής

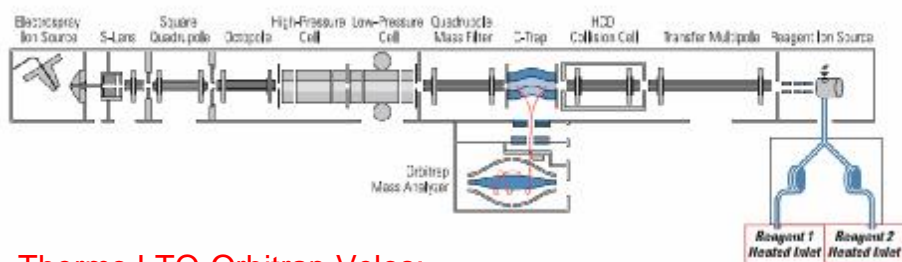


Shimadzu LCMS-IT-TOF

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

Υβριδικός LTQ-ORBITRAP αναλυτής

Schematic of the LTQ Orbitrap Velos

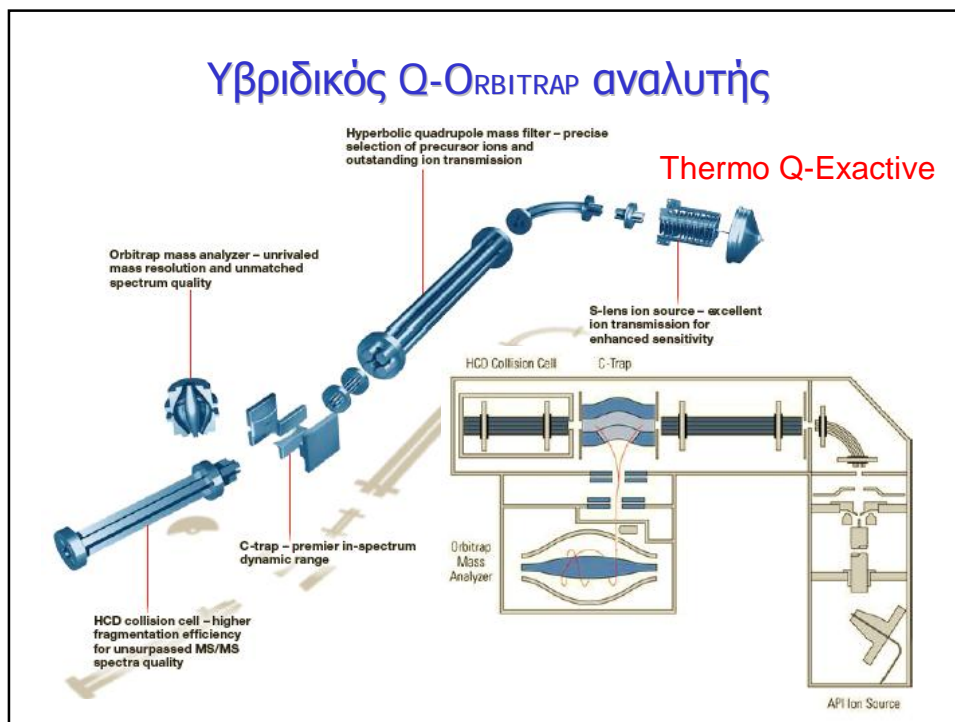


Thermo LTQ-Orbitrap Velos:

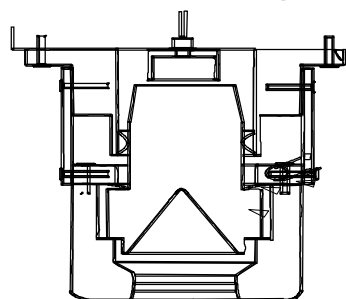
<http://fscimage.thermoscientific.com/images/D13092~.pdf>

Πρωτομική, Μεταβολομική, ανακάλυψη και ανάπτυξη
φαρμακευτικών ενώσεων, βιοανάλυση

Υβριδικός Q-ORBITRAP αναλυτής

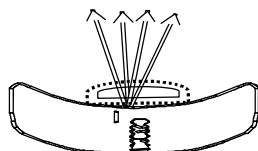


Μεταλλάκτης: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής



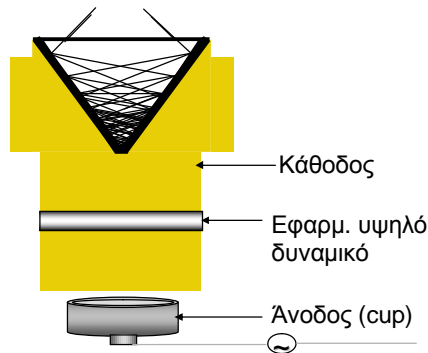
Δύνοδος μετατροπής

Τα εξερχόμενα από τον αναλυτή μάζας ιόντα συγκρούονται στη δύνοδο και παράγουν δευτερογενή σωματίδια (e^-). Αυτά εισέρχονται στον (ηλεκτρονιο) πολλαπλασιαστή.



Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής

Τα 2 γενή
σωματίδια
εισερχονται στον
πολλαπλασιαστή



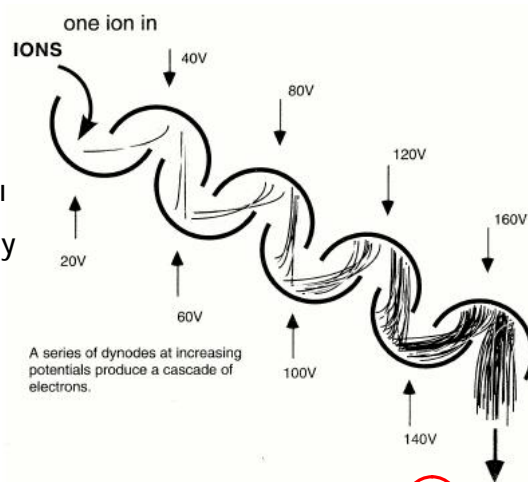
Κάθε κρούση σωματιδίου στον πολλαπλασιαστή παράγει πολλαπλάσια σωματίδια.

Το αποτέλεσμα είναι παραγωγή φορτίου στην άνοδο.

Το φορτίο αυτό είναι «ανάλογο» του σήματος που παράγεται από το ιόν.

Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής Διακριτών δυνόδων

- Χαμηλό θόρυβο
- Πολύ ευαίσθητοι
- Χρόνος ζωής ~2y

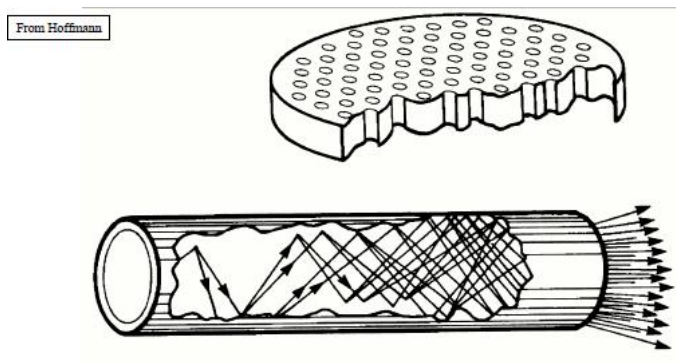


A series of dynodes at increasing potentials produce a cascade of electrons.

Ενίσχυση $\times 10^6$ \longrightarrow 10^6 electrons out
current generated, amplified, and sent to computer.

www.vias.org/simulations/simsoft_emultiplier.html

Microchannel plate (MCP) ανιχνευτής



Χρήσιμος σε παλμική λειτουργία (TOF-MS)

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
- Thermo
- Brucker
- Shimadzu
- AB Sciex

ntho@chem.uoa.gr

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ