



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
Σχολή Μηχανικών
Τμήμα Μηχανικών Βιοϊατρικής

Φασματοσκοπία Μάζας & Εφαρμογές στη
Βιοϊατρική Τεχνολογία

ΧΑΤΖΗΛΕΟΝΤΑΡΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

Αριθμός Μητρώου: 14112

Επιβλέπων Καθηγητής:

ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΚΑΛΥΒΑΣ, Αναπληρωτής καθηγητής

Αθήνα, Ιούλιος 2021

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Νεκτάριος Καλύβας (επιβλέπων)

Αικατερίνη Σκουρολιάκου

Χρήστος Μιχαήλ

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος **Αθανάσιος Χατζηλεονταρής** του **Παναγιώτη**, με αριθμό μητρώου **48014112** φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Μηχανικών του Τμήματος **Μηχανικών Βιοϊατρικής**, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Χατζηλεονταρής Αθανάσιος



Περίληψη

Στη παρούσα εργασία έγινε μία επισκόπηση της φασματοσκοπίας μάζας, μελετήθηκε η λειτουργία του φασματόμετρου μαζών και δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων σε περιβάλλον access του open office στην οποία περιλαμβάνονται εφαρμογές της τεχνολογίας αυτής στη βιοϊατρική τεχνολογία. Πιο συγκεκριμένα, περιγράφεται αναλυτικά ο τρόπος ιονισμού του δείγματος καθώς και ο διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Επιπλέον αναλύεται η βασική δομή ενός φασματόμετρου μαζών όπως το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, η πηγή ιόντων, ο αναλυτής μαζών, ο ανιχνευτής ιόντων και το σύστημα κενού. Ακόμα αναφέρονται ορισμένες ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες σύμφωνα με τις οποίες γίνεται η ταυτοποίηση του δείγματος. Τέλος στη βάση δεδομένων βρίσκονται πολλές εφαρμογές της φασματοσκοπίας μάζας στη βιοϊατρική τεχνολογία.

Λέξεις κλειδιά: Φασματοσκοπία μάζας, GC-MS, LC-MS, πηγή ιόντων, MALDI, αναλυτής μάζας, ανιχνευτής ιόντων, φάσμα μαζών, Tandem MS, βιβλιοθήκες φασμάτων

Abstract

In the present work, an overview of mass spectroscopy was performed, the function of the mass spectrometer was studied and an open office access database was created, which includes a variety of applications of this technology in biomedical technology. More specifically, the ionization mode of the sample is described in detail as well as the separation of ions according to the mass to charge ratio (m / z). In addition, the basic structure of a mass spectrometer such as the sample input system, the ion source, the mass analyzer, the ion detector and the vacuum system are analyzed. Some electronic libraries are also mentioned according to which the identification of the sample is done. Finally, there are many applications of mass spectroscopy in biomedical technology in the database.

Keywords: Mass spectroscopy, GC-MS, LC-MS, ion source, MALDI, mass analyzer, ion detector, mass spectrum, Tandem MS, spectrum libraries

Περιεχόμενα

Συντομογραφίες	7
Εισαγωγή.....	9
Ιστορική αναδρομή.....	10
Οργανολογία φασματομέτρου μαζών	10
Σύστημα εισαγωγής δείγματος	11
Σύστημα μεμονωμένης εισαγωγής (Batch Inlet System)	12
Σύστημα άμεσης εισαγωγής με δειγματολήπτη (direct insertion probe)	12
Σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.....	13
Σύστημα εισαγωγής αέριου χρωματογράφου (GC).....	14
Σύστημα εισαγωγής υγρού χρωματογράφου (LC).....	16
Πηγή ιόντων.....	17
Ιονισμός ηλεκτρονίων (EI)	19
Χημικός ιονισμός (CI).....	21
Ιοντισμός πεδίου (FI)	22
Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI).....	23
Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB).....	24
Θερμοψεκασμός.....	25
Αναλυτής μαζών	26
Αναλυτές μαγνητικού τομέα	28
Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (TOF)	30
Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole mass analyzer).....	32
Αναλυτές παγίδας ιόντων (Ion Trap).....	33
Αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (FTICR).....	38
Ανιχνευτές ιόντων.....	40
Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές.....	40
Φαρανταϊκό κύπελλο.....	42
Ανιχνευτής Daly	43
Σύστημα κενού.....	44
Ιοντισμός εκρόφησης με laser με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI).....	45
Στάδια της MALDI	45
Πλεονεκτήματα MALDI	47

Laser που χρησιμοποιούνται στη MALDI	47
Είδη μήτρας	48
Παρασκευή του δείγματος	50
Διαδικασία ιονισμού του δείγματος	52
Είδη κατακερματισμών	53
MALDI σε ατμοσφαιρική πίεση (AP-MALDI)	54
Φάσμα Μαζών	55
Τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μάζας	56
Τεχνική πλήρους σάρωσης (FS)	57
Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM)	57
Φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem – MS/MS)	57
Συζευγμένη φασματομετρία μαζών στο χώρο και στο χρόνο	58
Τεχνικές σάρωσης	59
Ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες φασμάτων	61
Εμπορικά συστήματα	64
Άλλες εφαρμογές της Φασματοσκοπίας Μάζας	66
Ιατροδικαστική τοξικολογία	66
Εγκληματολογία: αναγνώριση επιταχυντών σε πυρκαγιές & εκρηκτικών υλών	67
Βιβλιογραφία	68
Αναφορές Εικόνων	74
Βάση Δεδομένων με εφαρμογές της Φασματοσκοπίας Μάζας	I

Συντομογραφίες

MS	Mass Spectrometry
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
CE-MS	Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry
GC	Gas Chromatography
LC	Liquid Chromatography
Da	Dalton
EI	Electron Ionization
CI	Chemical Ionization
FI	Field Ionization
FD	Field Desorption
ESI	Electrospray Ionization
MALDI	Matrix – Assisted Laser Desorption/Ionization
PD	Plasma Desorption
FAB	Fast Atom Bombardment
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
TS	Thermospray
FWHM	Full Width at Half Maximum
ppm	part per million
ESA	Electrostatic Analyzer
TOF	Time of Flight
QIT	Quadrupole Ion Trap
LIT	Linear Ion Trap
RF	Radio Frequencies
FT-ICR	Fourier – Transform Ion Cyclotron Resonance
EM	Electron Multiplier
EIOD	Electrooptical Ion Detector
SLDI	Soft Laser Desorption Ionization
NC	Nitrocellulose Membranes
ISD	In-Source Decay Fragmentations
PSD	Post-Source Decay Fragmentations
AP-MALDI	Atmospheric Pressure Matrix – Assisted Laser Desorption/Ionization
FS	Full Scan
SIM	Single Ion Monitoring
MS/MS	Tandem Mass Spectroscopy
QQQ	Triple Quadrupole
Q1	Quadrupole 1
Q2	Quadrupole 3
Q3	Quadrupole 3
Q – TOF	Quadrupole – Time of Flight
IT – TOF	Ion Trap – Time of Flight
IT – Orbitrap	Ion Trap – Orbitrap
CNL	Constant Neutral Loss Scan

SRM	Single Reaction Monitoring
MRM	Multiple Reaction Monitoring
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
GS-MS-MS	Gas Chromatography Tandem Mass Spectroscopy
TNT	Trinitrotoluene
PETN	Pentaerythritol Tetranitrate
GCxGC	Two-Dimensional Gas Chromatography
HRD	High Resolution Deconvolution

Εισαγωγή

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectroscopy – MS) είναι μια αναλυτική τεχνική που μετρά τις μοριακές μάζες μεμονωμένων ενώσεων και ατόμων. Αυτό το επιτυγχάνει μετατρέποντας τα μόρια του δείγματος σε ιόντα, ενώ στη συνέχεια τα διαχωρίζει σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) που έχουν. Η φασματομετρία μάζας έχει την ικανότητα να μας παρέχει αποτελέσματα ακόμη και για πολύ μικρά δείγματα της τάξης των zeptomole. Επιπλέον, η φασματομετρία μάζας μας παρέχει δεδομένα για φυσικές ιδιότητες όπως ενέργεια ιονισμού, ενέργεια εμφάνισης, ενθαλπία αντίδρασης, συγγένεια πρωτονίων και ιόντων και άλλα. Τα αποτελέσματα, μας παρουσιάζονται με μία σειρά από φάσματα σε ένα γράφημα το οποίο ονομάζεται φάσμα μαζών. Έτσι, η φασματομετρία μάζας είναι πιθανώς η πιο ευέλικτη και ολοκληρωμένη αναλυτική τεχνική που βρίσκεται σήμερα στη διάθεση των χημικών και των βιοχημικών. Διάφοροι τομείς της φυσικής, της χημείας, της φαρμακευτικής, της γεωλογίας, της πυρηνικής επιστήμης, της επιστήμης των υλικών, της αρχαιολογίας, της βιομηχανίας πετρελαίου, της ιατροδικαστικής και της περιβαλλοντικής επιστήμης έχουν επωφεληθεί από αυτήν την εξαιρετικά ακριβή και ευαίσθητη τεχνική.

Η δημοτικότητα της φασματομετρίας μάζας οφείλεται στις εξής δυνατότητές της:

- παρέχει πολύ μεγάλη μοριακή εξειδίκευση λόγω της ικανότητάς της να μετρά την ακριβή μοριακή μάζα
- έχει πολύ μεγάλη ευαισθησία, ακόμη και για ποσότητες δείγματος της τάξης των 10^{21} mole
- μπορεί να προσδιορίσει τις περισσότερες κατηγορίες ενώσεων
- εφαρμόζεται σε όλα τα στοιχεία
- ισχύει για όλους τους τύπους δειγμάτων: πτητικά ή μη πτητικά, πολικά ή μη πολικά, στερεά, υγρά ή αέρια δείγματα

Ιστορική αναδρομή

Το 1897 ο Sir Joseph John Thomson με την εργασία του [1], η οποία τιμήθηκε και με βραβείο Nobel, έθεσε τις θεμελιώδεις αρχές της φασματοσκοπίας μάζας, ανακαλύπτοντας το ηλεκτρόνιο και προσδιόρισε μάλιστα το λόγο φορτίο προς μάζα (q/m) του ηλεκτρονίου. Το 1898 ο W. Wien έδειξε ότι οι ανοδικές ακτίνες, τις οποίες προσδιόρισε ως ένα σύνολο φορτισμένων σωματιδίων, μπορούσαν να εκτραπούν περνώντας τις μέσω παράλληλων ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων και ότι το βάρος τους δεν υπερβαίνει αυτό των ηλεκτρονίων ενώ ταυτόχρονα φορτίο τους είναι ένα θετικό ισοδύναμο του των καθοδικών ακτίνων (αναφερόταν στο πρωτόνιο). Το 1912 ο Thomson κατασκευάζει το πρώτο φασματόμετρο μάζας το οποίο ονομαζόταν παραβολικός φασματογράφος και μπορούσε να λάβει φάσματα των O_2 , N_2 , CO , CO_2 . Τα επόμενα χρόνια ακολούθησαν περαιτέρω εξελίξεις με αξιοσημείωτη τη κατασκευή φασματόμετρου μάζας για μελέτη ισοτόπων από τον F.W. Aston το 1919, όπου απέδειξε την ύπαρξη ισοτόπων μη ραδιενεργών στοιχείων. Στη δεκαετία του 1940, η φασματομετρία μάζας έπαιξε σημαντικό ρόλο στο πρόγραμμα Μανχάταν (Manhattan Project) όπου ο Alfred O. Nier κατάφερε να απομονώσει το ουράνιο-235 (^{235}U) και έτσι κατασκευάστηκε η πρώτη ατομική βόμβα. Το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο φασματόμετρο μάζας κυκλοφόρησε το 1943 από την εταιρία Consolidated Engineering Corporation. Ακολούθησαν εφευρέσεις όπως του τετραπολικού αναλυτή μάζας και παγίδας ιόντων το 1953, της πρώτης διάταξης αέριας χρωματογραφίας με φασματόμετρο μαζών (GS-MS) το 1959, του ιοντισμού με εκφόρηση από μήτρα υποβοηθούμενος από laser (MALDI) το 1987 και πολλές άλλες. Σήμερα με τα φασματόμετρα μαζών μπορούμε να αναλύσουμε ενώσεις με ένα πολύ μεγάλο εύρος μάζας (Daltons) [2,3].

Οργανολογία φασματόμετρου μαζών

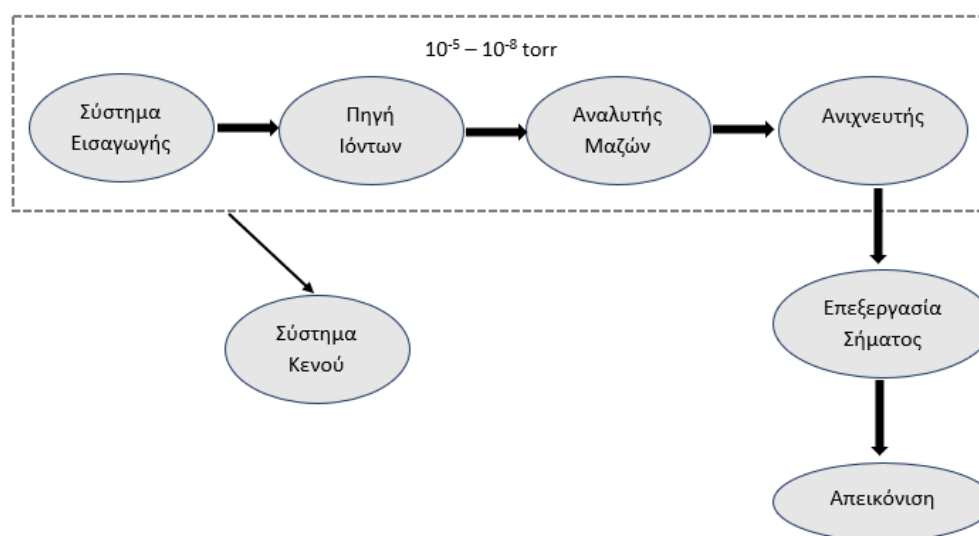
Το φασματόμετρο μάζας αποτελείται από πολλά και διαφορετικά τμήματα όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της εικόνας 1 όπου παρουσιάζονται τα επιμέρους τμήματά του.

- i. **Σύστημα εισαγωγής του δείγματος:** σκοπός του είναι προετοιμασία του δείγματος, το οποίο εισάγεται σε υγρή ή αέρια μορφή.
- ii. **Πηγή ιόντων:** τα συστατικά του δείγματος μετατρέπονται σε ιόντα. Συχνά το σύστημα εισαγωγής και η πηγή ιόντων ενώνονται σε μία ενιαία μονάδα.
- iii. **Αναλυτής μαζών:** αποτελεί το σημαντικότερο μέρος του μηχανήματος. Εδώ πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων που παράγονται στη πηγή ιόντων με βάση με το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z).
- iv. **Ανιχνευτής:** η λειτουργία του ανιχνευτή είναι να ανιχνεύει τα διαχωρισμένα από τον αναλυτή μάζας ιόντα και να τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.

- v. **Σύστημα κενού:** η μέχρι τώρα διαδικασία που πραγματοποιείται από τα παραπάνω τμήματα του φασματογράφου λαμβάνει χώρα σε συνθήκες κενού που δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού. Οι πιέσεις που επικρατούν είναι της τάξης των 10^{-5} έως 10^{-8} torr.

Στη συνέχεια γίνεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή:

- i. **Η επεξεργασία σήματος:** το ηλεκτρικό σήμα που δημιουργείται από τον ανιχνευτή επεξεργάζεται με κατάλληλο λογισμικό από Η/Υ.
ii. **Η ανάγνωση – απεικόνιση:** το επεξεργασμένο πλέον σήμα από τον Η/Υ απεικονίζεται ως γράφημα φάσματος μαζών.



Εικόνα 1- Βασική δομή Φασματογράφου Μάζας

Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η συγκεκριμένη διάταξη σκοπό έχει την εισαγωγή συγκεκριμένης ποσότητας δείγματος στο χώρο ιονισμού (πηγή ιόντων) ενώ ταυτόχρονα διασφαλίζεται η ελάχιστη απώλεια κενού, προϋπόθεση για την εύρυθμη λειτουργία του φασματογράφου μάζας. Το δείγμα μπορεί να βρίσκεται σε υγρή, αέρια ή και στερεά μορφή κατά την εισαγωγή του. Στο χώρο ιονισμού όμως φτάνει σε αέρια μορφή [4,5].

Υπάρχουν 5 κατηγορίες συστημάτων εισαγωγής δείγματος:

- Σύστημα μεμονωμένης εισαγωγής (Batch Inlet System)
- Σύστημα άμεσης εισαγωγής με δειγματολήπτη (direct insertion probe)
- Σύστημα εισαγωγής από αέριο ή υγρό χρωματογράφο (GC-MS / LC-MS)
- Μια συσκευή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (capillary electrophoresis)
- Μία σύριγγα αντλίας (Syringe Pump)

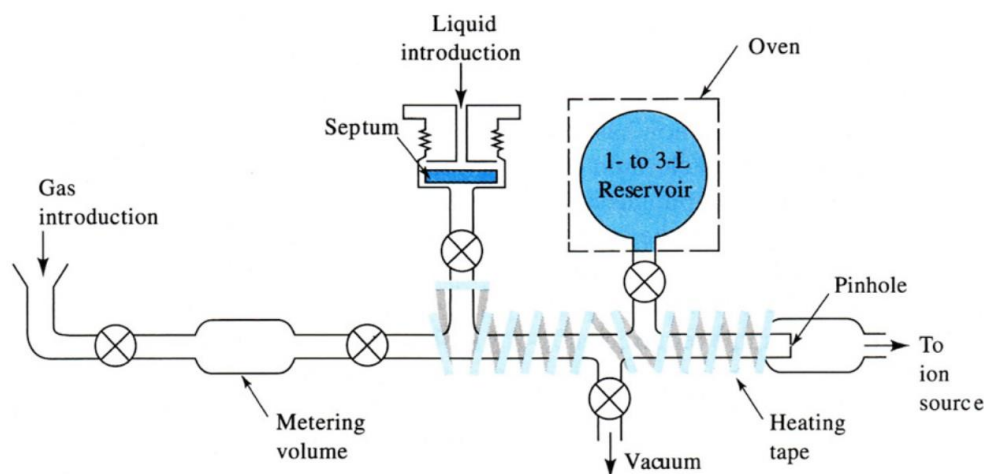
Σύστημα μεμονωμένης εισαγωγής (Batch Inlet System)

Η συγκεκριμένη διάταξη αποτελεί το απλούστερο σύστημα εισαγωγής δείγματος σε ένα φασματογράφο μάζας. Το δείγμα εξαερώνεται σε έναν εξωτερικό χώρο αποθήκευσης και στη συνέχεια περνάει στη πηγή ιόντων. Το δείγμα μπορεί να είναι είτε υγρό είτε αέριο. Στη περίπτωση που το δείγμα είναι αέριο εισέρχεται σε ένα χώρο γνωστού όγκου όπου και περιορίζεται εκεί χρησιμοποιώντας δύο βαλβίδες όπως φαίνεται και στην εικόνα 2. Στη συνέχεια το αέριο δείγμα εκτονώνεται και αποθηκεύεται στο χώρο αποθήκευσης.

Αν το δείγμα μας είναι υγρό τότε εισάγεται στο σύστημα από άλλο σημείο εισόδου χρησιμοποιώντας μία μικροσύριγγα. Είτε το δείγμα είναι αέριο είτε είναι υγρό διατηρούνται συνθήκες κενού με πιέσεις της τάξης των $10^{-4} - 10^{-5}$ torr. Για τα υγρά δείγματα με σημείο βρασμού μεγαλύτερο των $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, προκυμαίνονται να εξαερωθούν χρησιμοποιείται είτε ένας φούρνος είτε θερμαντικές ταινίες. Η μέγιστη θερμοκρασία που μπορεί να διατηρήσει ο φούρνος είναι $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, γεγονός που δημιουργεί πρόβλημα για υγρά με σημείο βρασμού μικρότερο των $500\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Συνεπώς το δείγμα πλέον βρίσκεται σε αέρια φάση και μέσω ενός μεταλλικού ή υάλινου διαφράγματος με μία ή περισσότερες οπές, κατευθύνεται στη πηγή ιόντων.

Η διάταξη μεμονωμένης εισαγωγής επικαλύπτεται συνήθως από γυαλί για να αποφευχθούν απώλειες πολικών ουσιών λόγω προσρόφησης [4,6].



Εικόνα 2- Σχηματικό διάγραμμα εξωτερικής εισαγωγής δείγματος

Πηγή: <http://sc.buu.ac.th/~chemistry/ezchem/mass-spectrometry.pdf>

Σύστημα άμεσης εισαγωγής με δειγματολήπτη (direct insertion probe)

Ένας άλλος τρόπος εισαγωγής δείγματος είναι αυτός της άμεσης εισαγωγής στο χώρο ιονισμού με δειγματολήπτη / υποδοχέα (probe). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για στερεά και μη πτητικά υγρά δείγματα. Ταυτόχρονα όμως όταν η ποσότητα του

δείγματος είναι σημαντικά περιορισμένη, επιλέγεται η συγκεκριμένη μέθοδος καθώς μας δίνει τη δυνατότητα να καταναλώσουμε πολύ λιγότερο δείγμα απ' ό,τι με το σύστημα μεμονωμένης εισαγωγής. Μπορούμε να εξάγουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα ακόμη και από μερικά νανογραμμάρια (ng) δείγματος.

Ο δειγματολήπτης εισέρχεται κατευθείαν στο θάλαμο ιονισμού χωρίς να διαταράσσει τις συνθήκες κενού που επικρατούν. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα που ονομάζεται vacuum lock, το οποίο είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να περιορίζει τον όγκο του αέρα που αντλείται από το σύστημα όταν εισέρχεται το δείγμα στο θάλαμο ιονισμού. Η ποσότητα που συλλέγουμε με το δειγματολήπτη είναι πολύ και βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια ενός γυάλινου ή αλουμινένιου τριχοειδούς σωλήνα, ενός λεπτού σύρματος ή ενός μικρού κυπέλλου. Έπειτα τοποθετείται το probe με το δείγμα σε πολύ μικρή απόσταση από τη πηγή ιόντων, της τάξεως των μερικών χιλιοστών, και στη σχισμή που οδηγεί στο φασματομέτρο. Συχνά υπάρχει η δυνατότητα να ψύξουμε ή να θερμάνουμε το δείγμα στον δειγματολήπτη.

Η συνθήκη κενού που επικρατεί στο θάλαμο ιονισμού μαζί με τη πολύ μικρή απόσταση δείγματος και πηγής ιονισμού έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη φασμάτων θερμικώς ασταθών ουσιών, πριν αρχίσει η εκτεταμένη διάσπαση. Επιπρόσθετα λόγω των πολύ χαμηλών πιέσεων αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των μη πτητικών ενώσεων στη περιοχή ιονισμού, δίνοντάς μας τη δυνατότητα να απεικονίσουμε φάσματα μαζών ουσιών όπως υδατάνθρακες, στεροειδή, μεταλλοργανικές ενώσεις και πολυμερείς ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους. Βασική προϋπόθεση όμως είναι το δείγμα να μπορεί να αναπτύξει μερική πίεση ατμών μεγαλύτερη των 10^{-8} torr πριν αρχίσει να διασπάται [4,6,7].

Σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

Το σύστημα εισαγωγής με διάταξη στήλης τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων διότι μας δίνει τη δυνατότητα να διαχωρίσουμε τα συστατικά του ώστε να τα προσδιορίσουμε.

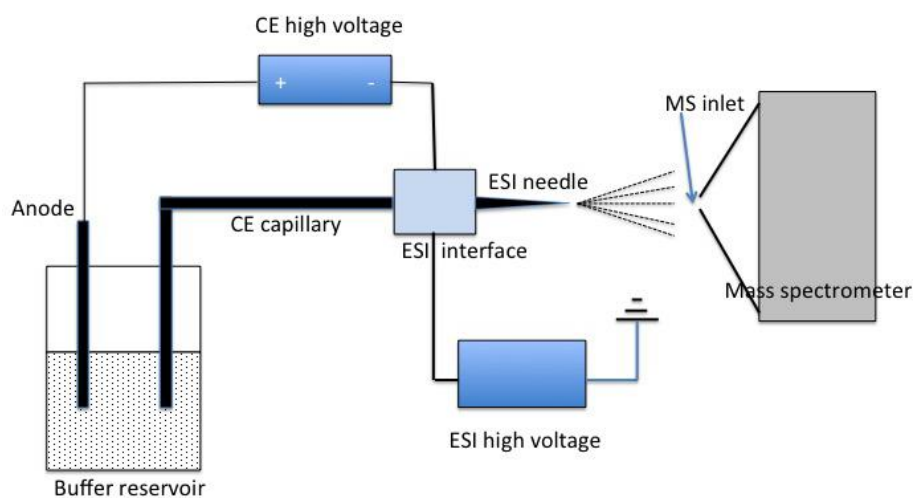
Η αρχή λειτουργίας του είναι αρκετά απλή. Ένα τριχοειδές κατασκευασμένο από τηγμένη πυριτία το οποίο είναι γεμάτο με ρυθμιστικό διάλυμα συνδέει δύο δοχεία με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (ενδεικτικά δείτε εικόνα 3). Το μήκος του τριχοειδούς κυμαίνεται από 30 έως 100cm με εσωτερική διάμετρο 10 – 100μm, ενώ τα εξωτερικά τοιχώματά του καλύπτονται από πολυιμίδιο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να είναι περισσότερο ανθεκτικά, πιο εύκαμπτα και σταθερά. Στα δύο δοχεία βυθίζουμε ηλεκτρόδια από λευκόχρυσο στα οποία συνδέουμε τροφοδοτικό υψηλής τάσης που παρέχει συνεχή τάση 5 – 30kV. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται στο δοχείο προέλευσης και εξαιτίας της τάσης που έχουμε εφαρμόσει κινούνται μέσα στο τριχοειδή σωλήνα. Κατά τη διάρκεια μετακίνησής τους από το ένα δοχείο στο άλλο

τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται και γίνεται η ανίχνευση από τον ανιχνευτή που βρίσκεται στο τέλος του τριχοειδούς σωλήνα [4].

Στην ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς οι απαιτούμενοι όγκοι δείγματος είναι εξαιρετικά μικροί, της τάξης των 0,1 – 10nL . Αυτό συμβαίνει διότι ο όγκος του τριχοειδούς είναι 4 – 5nL. Έτσι παρότι απλή διάταξη είναι δύσκολη η εισαγωγή του δείγματος.

Η φασματοσκοπία μάζας με σύστημα εισαγωγής τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE-MS) απαιτεί την άμεση σύζευξη της εισαγωγής του δείγματος με τη πηγή ιόντων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί λόγω της μικρής ροής του διαλύματος στο τριχοειδή σωλήνα. Για να εισαχθεί όμως το ρυθμιστικό διάλυμα στο φασματόμετρο μαζών πρέπει να είναι πτητικό για να μπορεί να εξατμιστεί [8].

Τα πλεονεκτήματα της σύζευξης φασματογράφου μάζας με σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης για την εισαγωγή του δείγματος είναι η υψηλή ανάλυση, η πολύ καλή ικανότητα διαχωρισμού του διαλύματος, η επιλεκτικότητα, η ευαισθησία και ότι σχεδόν οποιοδήποτε φορτισμένο δείγμα μπορεί να εγχυθεί στο φασματογράφο μάζας. Ταυτόχρονα η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση βιολογικών μεγαλομορίων όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, DNA [9].



Εικόνα 3- Σχηματικό διάγραμμα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης - φασματογράφου μάζας

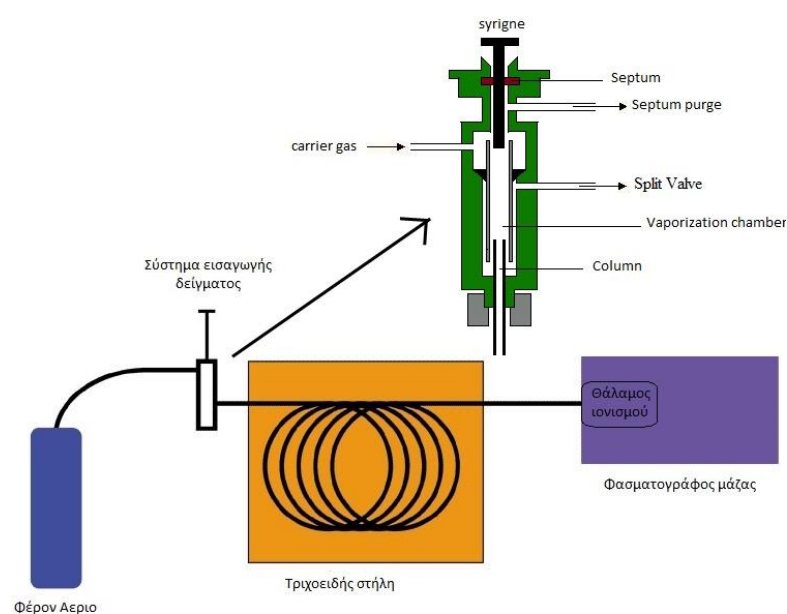
Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis%E2%80%93mass_spectrometry

Σύστημα εισαγωγής αέριου χρωματογράφου (GC)

Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού που χρησιμοποιείται όπως και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση για την αναγνώριση σύνθετων μιγμάτων. Η συγκεκριμένη τεχνική απαιτεί τα δείγματα να έχουν την ιδιότητα της υψηλής πτητικότητας όπως επίσης και να είναι θερμικά σταθερά με σημείο βρασμού μικρότερο των 350 °C ώστε να μπορούν να εξατμιστούν. Σε αντίθετη περίπτωση,

δηλαδή αν το δείγμα δεν αποτελείται από πτητικές ουσίες, υπάρχουν χημικές τεχνικές που μας δίνουν τη δυνατότητα να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα ώστε να διαχωριστούν και να απεικονισθούν στο φασματογράφο μάζας.

Το δείγμα εισάγεται στο χρωματογράφο στην κορυφή της στήλης μέσω μίας βαλβίδας εισαγωγής, με μία μικροσύριγγα (ενδεικτικά δείτε εικόνα 4). Η ποσότητα που εισάγουμε είναι της τάξης των 1 – 10 μL . Με τη βοήθεια του φέροντος αερίου το δείγμα συμπαρασύρεται κατά μήκος της στήλης ενώ ταυτόχρονα διαχωρίζονται τα συστατικά του. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο, άζωτο, αργό, υδρογόνο. Το φέρον αέριο διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Πρέπει να είναι ξηρό, και να μην έχει καθόλου οξυγόνο. Το ασφαλέστερο και πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είναι το ήλιο. Το άζωτο, το αργό και το υδρογόνο χρησιμοποιούνται ανάλογα με την απόδοση που θέλουμε να επιτύχουμε όπως επίσης και αναλόγως τον ανιχνευτή που χρησιμοποιούμε. Το υδρογόνο και το ήλιο, παρουσιάζουν μικρότερο χρόνο ανάλυσης και χαμηλότερες θερμοκρασίες έκλυσης του δείγματος εξαιτίας των υψηλότερων ποσοστών ροής και χαμηλό μοριακό βάρος. Η εξάτμιση του δείγματος γίνεται με ελεγχόμενη θέρμανση από φούρνο. Τα σύγχρονα συστήματα αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιούν τριχοειδείς στήλες οι οποίες κατασκευάζονται από λιωμένο πυρίτιο με περίβλημα πολυϊμιδίου. Το μήκος τους συνήθως είναι 25-100 m με εσωτερική διάμετρο 0.03-1 mm. Οι τριχοειδείς στήλες θεωρείται ότι έχουν υψηλή ανάλυση και ο αριθμός των θεωρητικών πλακών μπορεί να φτάσει τις 5000 ανά 1m. Η ροή που επιτυγχάνεται μέσα στη στήλη είναι περίπου 1 -2 mL/min. Η έξοδος της τριχοειδούς στήλης συνδέεται απευθείας με το θάλαμο ιονισμού. Τα συστατικά που έχουν διαχωριστεί και έχουν ιονιστεί στο θάλαμο ιονισμού, αναλύονται στο φασματογράφο μάζας με βάση τη σειρά εξαγωγής τους από τη στήλη του αερίου χρωματογράφου [7, 10 – 12].



Εικόνα 4- Σχηματικό διάγραμμα GS-MS και συστήματος εισαγωγής δείγματος

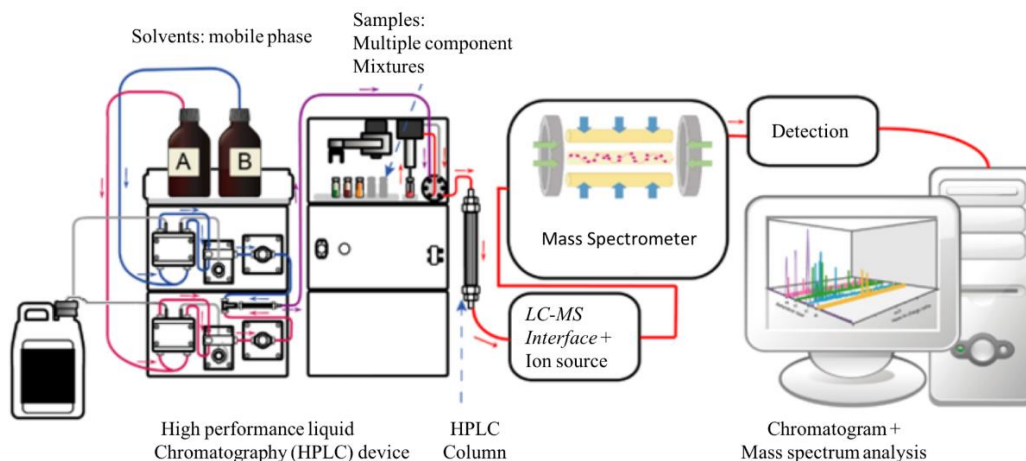
Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography

Σύστημα εισαγωγής υγρού χρωματογράφου (LC)

Η υγρή χρωματογραφία αποτελεί μία επιπλέον τεχνική διαχωρισμού των συστατικών του μείγματος πριν εισέλθουν στο φασματογράφο μάζας. Αυτός ο διαχωρισμός γίνεται με βάση τις αλληλεπιδράσεις του δείγματος με τις κινητές και σταθερές φάσεις. Τα συστατικά μέσα σε ένα μείγμα διαχωρίζονται σε μια στήλη με βάση τη συνάφεια κάθε συστατικού για την κινητή φάση. Αν τα στοιχεία έχουν διαφορετικές πολικότητες και μια κινητή φάση διακριτής πολικότητας περάσει μέσω της στήλης, ένα στοιχείο θα μετακινηθεί μέσω της στήλης ταχύτερα από το άλλο. Επειδή τα μόρια της ίδιας ένωσης γενικά κινούνται σε ομάδες, οι ενώσεις διαχωρίζονται σε ξεχωριστές ζώνες εντός της στήλης. Η υγρή χρωματογραφία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική που συνδυάζεται με φασματογράφο μάζας (ενδεικτικά δείτε εικόνα 5). Πρόκειται για διάταξη που χρησιμοποιείται για την ανάλυση μη πτητικών, θερμοευαίσθητων ενώσεων όπως επίσης και μεγαλομορίων. Η πλειοψηφία των μεγαλομορίων της βιοχημείας δεν μπορούν να αναλυθούν με GC-MS λόγω της ευαισθησίας τους στις θερμοκρασίες που αναλύει η GC-MS. Περίπου το 85% των ενώσεων στη φύση είναι είτε πολικές είτε θερμικά ασταθείς ενώσεις, που δε μπορούν να εξεταστούν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματογράφο μάζας. Η LC-MS θεωρείται πια απαραίτητο εργαλείο για πολλές αναλυτικές εργασίες που πραγματοποιούνται εργαστήρια φαρμακευτικής ανάλυσης, βιοανάλυσης, ελέγχου τροφίμων, βιοτεχνολογίας κ.α.

Η σύζευξη του LC με φασματομετρία μάζας δεν είναι τόσο απλή όσο η σύνδεση αέριου χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας. Ένα πρόβλημα είναι ο ρυθμός ροής του διαλύτη. Ο διαχωρισμός σε συμβατικές αναλυτικές στήλες ευρείας οπής επιτυγχάνεται με ρυθμούς ροής υγρού 0,5 έως 1,5 mL/min. Αυτό το υγρό παράγει πολύ μεγάλη ροή αερίου σε σημείο που θα διαταράσσονταν οι συνθήκες κενού κάτω από τις οποίες δουλεύει ο φασματογράφος μάζας (10^{-5} έως 10^{-8} torr). Τα ασφαλή όρια είναι ρυθμοί ροής υγρού κάτω από 10 μ L/min. Ένα άλλο πρόβλημα είναι ότι ο υγρός χρωματογράφος λειτουργεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ ο φασματογράφος μάζας απαιτεί αυξημένη θερμοκρασία. Τέλος, ένα επιπλέον πρόβλημα που εμποδίζει την απευθείας σύνδεση ενός LC με ένα φασματογράφο μάζας είναι ότι ο υγρός χρωματογράφος χρησιμοποιεί ανόργανα ρυθμιστικά ενώ ο φασματογράφος μάζας, πτητικά ρυθμιστικά.

Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν διάφορες διατάξεις που καθιστούν εφικτή τη σύνδεση υγρού χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας. Αυτές οι διατάξεις ονομάζονται interface. Μερικές από αυτές είναι: Direct Liquid Introduction, Moving Belt/Wire, Thermospray, Particle Beam, Atmospheric Pressure Ionization, Electrospray, Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Continuous-Flow Fast Atom Bombardment. Η πιο σημαντική από αυτές τις διατάξεις και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι αυτή του ηλεκτροψεκασμού [2,11, 13 – 17].



Εικόνα 5- Σχηματικό διάγραμμα LC-MS

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry

Πηγή ιόντων

Ο ιονισμός μιας ουσίας είναι το πρώτο κρίσιμο στάδιο για την ανάλυση οποιασδήποτε ένωσης με φασματομετρία μάζας. Στο στάδιο αυτό μετατρέπεται μία ουδέτερη ένωση σε ιοντικό είδος αερίου φάσης με αρνητικό ή θετικό φορτίο. Ο ιονισμός των μορίων του δείγματος είναι απαραίτητος διότι έτσι είναι εφικτό να χειριστούμε τη κατεύθυνση και ταχύτητα των ιόντων. Εφαρμόζοντας ηλεκτρικές και μαγνητικές δυνάμεις, η ενέργεια και η ταχύτητα των ιόντων μπορούν να ελεγχθούν, να διαχωριστούν και να ανιχνευθούν. Αντίθετα, τα ουδέτερα είδη αέριας φάσης κινούνται τυχαία [2]. Η τελική πληροφορία, δηλαδή η μορφή του φάσματος εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη τεχνική παραγωγής των ιόντων.

Οι πηγές ιόντων χωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες:

- Πηγές αέριας φάσης
- Πηγές εκφόρησης

Στις πηγές αέριας φάσης το δείγμα πρώτα θα εξαερωθεί και μετά θα ιονιστεί. Αυτή η κατηγορία πηγών εφαρμόζεται σε θερμικά σταθερές ενώσεις, με σημεία ζέσεως μικρότερα των 500°C. Συνεπώς είναι αδύνατη η εφαρμογή αυτών των πηγών ιονισμού σε ενώσεις με μοριακά βάρη μικρότερα των 10³ Da. Υπάρχουν δύο υποκατηγορίες, αυτές που εφαρμόζονται σε συνθήκες κενού και συνήθως το συναντάμε σε συστήματα GS - MS και σε αυτές που εφαρμόζονται σε ατμοσφαιρική πίεση όπως για παράδειγμα ο ηλεκτροψεκασμός που συναντάται κυρίως σε συστήματα LC - MS. Στην άλλη κατηγορία των πηγών εκφόρησης, το δείγμα είτε είναι σε υγρή είτε σε στερεά κατάσταση μετατρέπεται απευθείας σε φορτισμένα σωματίδια αέριας κατάστασης. Επίσης δεν απαιτείται να εξατμιστούν τα μόρια του αναλυτή και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενώσεις με μοριακά βάρη έως

και 10^5 Da [4,10]. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται πολλές από τις μεθόδους ιονισμού του δείγματος:

Πίνακας 1- Πηγές ιόντων στη φασματομετρία μαζών

Πηγή ιόντων	Κατηγορία	Τρόπος ιονισμού
Ιονισμός ηλεκτρονίων (EI)	Αέριας φάσης	Ηλεκτρόνια μεγάλης ενέργειας
Χημικού ιονισμού (CI)		Αντιδραστήρια – ιόντα σε αέρια κατάσταση
Ιοντισμού πεδίου (FI)		Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
Εκρόφησης πεδίου (FD)	Εκρόφησης	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)		Ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο
Ιοντισμός εκρόφησης με laser με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI)		Ακτίνα laser
Εκρόφησης πλάσματος (PD)		Θραύσματα σχάσης ^{252}Cf
Βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB)		Δέσμη ατόμων μεγάλης ενέργειας
Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος (SIMS)		Δέσμη ιόντων μεγάλης ενέργειας
Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (TS)		Υψηλή θερμοκρασία

Εκτός όμως από τις δύο παραπάνω κατηγορίες, οι πηγές ιονισμού διακρίνονται και σε δύο επιπλέον κατηγορίες:

- Μαλακές πηγές
- Σκληρές πηγές

Οι μαλακές πηγές προκαλούν στο δείγμα περιορισμένο κατακερματισμό με αποτέλεσμα το απεικονιζόμενο φάσμα μαζών να αποτελείται από τη κορυφή του μοριακού ιόντος και από ελάχιστες μόνο επιπλέον κορυφές. Αντίθετα οι σκληρές πηγές μεταδίδουν στα μόρια του αναλυτή μεγάλες ποσότητες ενέργειας. Σαν αποτέλεσμα τα μόρια παραμένουν σε έντονα διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση και η αποδιέγερσή τους περιλαμβάνει επιπλέον σπάσιμο δεσμών και παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων με λόγους m/z μικρότερους από του μοριακού ιόντος. Σε κάθε περίπτωση όμως τόσο τα φάσματα των σκληρών πηγών όσο και των μαλακών έχουν τη διαγνωστική τους αξία. Στις μαλακές πηγές το φάσμα μας παρέχει πιο ακριβείς πληροφορίες ως προς το μοριακό βάρος των μορίων του αναλυτή, ενώ στις σκληρές πηγές οι επιπλέον κορυφές μας πληροφορούν για τη δομή του αναλυτή [4].

Όλα τα είδη των πηγών έχουν ορισμένα βασικά δομικά στοιχεία [2]:

- Ένα μπλοκ πηγής
- Μια πηγή ενέργειας (π.χ. ένα ηλεκτρόνιο, σωματίδιο ή δέσμη ιόντων)
- Ένας θερμαντήρας πηγής
- Μια σύντομη περιοχή εξαγωγής ιόντων που επιταχύνει τα ιόντα σε μια καθορισμένη κινητική ενέργεια
- Ένα συγκρότημα σχισμής εξόδου

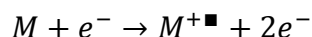
Επίσης κάθε πηγή πρέπει να τηρεί ορισμένα πρότυπα [2]:

- Υψηλή απόδοση ιονισμού (απαίτηση για υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης)
- Σταθερή δέσμη ιόντων
- Χαμηλή ενεργειακή εξάπλωση στη δέσμη δευτερευόντων ιόντων
- Ελάχιστο ρεύμα ιόντων υποβάθρου
- Ελάχιστη διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ διαδοχικών δειγμάτων.

Ιονισμός ηλεκτρονίων (EI)

Ο ιονισμός ηλεκτρονίων, ο οποίος παλαιότερα ονομαζόταν και ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, αποτελεί μία παλιά και κλασική μέθοδο [5,18]. Αρχικά εξατμίζεται ο αναλυτής με θέρμανση της άκρης του καθετήρα (probe) στον οποίο βρίσκεται ένα σταγονίδιο του δείγματος. Η παραγωγή της δέσμης ηλεκτρονίων γίνεται από ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή ρηνίου. Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται προς την εξαερωμένη ουσία λόγω μιας διαφοράς δυναμικού μεταξύ του νήματος και της ανόδου της τάξης των 70V και αφού περάσουν μέσα από μία σχισμή στο θάλαμο ιονισμού, προσκρούουν κάθετα στα μόρια του εξαερωμένου δείγματος (ενδεικτικά δείτε εικόνα 6). Από αυτή τη σύγκρουση προκαλεί απόσπαση ηλεκτρονίων από τα μόρια του δείγματος λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης και έτσι παίρνουμε τα ιόντα τα οποία έχουν θετικό φορτίο. Για να συμβεί ιονισμός, είναι απαραίτητο η κινητική ενέργεια των ηλεκτρονίων βομβαρδισμού να υπερβαίνει την ενέργεια ιονισμού του μορίου δείγματος. Ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων δεν είναι πολύ αποδοτικός καθώς μόνο ένα μόριο στο ένα εκατομμύριο υφίσταται την πρωταρχική αντίδραση η οποία ακολουθεί τη σχέση:

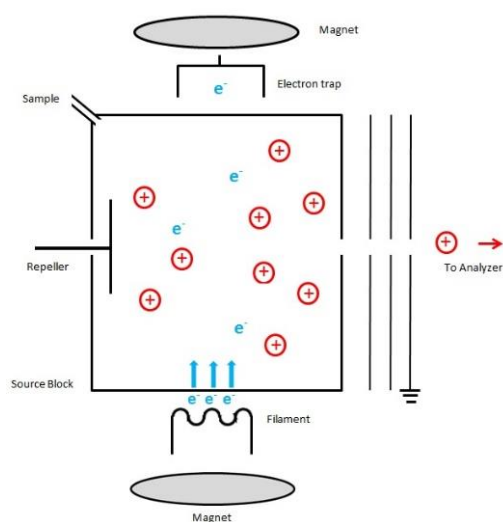
Σχέση 1



Όπου M το μόριο του αναλυτή και M^{+} το μοριακό ιόν του.

Το κύριο σώμα της πηγής είναι ένα μεταλλικό μπλοκ με τρύπες σε αυτό. Το μπλοκ πηγής θερμαίνεται συνήθως στους 300 °C για να αποφευχθεί η συμπύκνωση του δείγματος. Μια παγίδα ηλεκτρονίων (άνοδος) τοποθετημένη ακριβώς έξω από τον

θάλαμο ιονισμού απέναντι από την κάθοδο διατηρείται σε ένα ελαφρώς θετικό δυναμικό σε σχέση με το μπλοκ πηγής ιόντων. Αφού ταξιδέψει όλο το μήκος του θαλάμου ιονισμού, τα αχρησιμοποίητα ηλεκτρόνια, συλλέγονται από την παγίδα. Τα δείγματα μορίων εισάγονται στον θάλαμο ιονισμού μέσω μιας άλλης οπής ως ρεύμα αέριας φάσης. Για να αυξηθεί η πιθανότητα ιονισμού, τα ηλεκτρόνια κατασκευάζονται σε μια στενή ελικοειδή τροχιά αυξημένου μήκους διαδρομής εφαρμόζοντας ένα ασθενές μαγνητικό πεδίο παράλληλο προς την κατεύθυνση της δέσμης ηλεκτρονίων. Τα θετικά ιόντα που δημιουργούνται περνάνε μέσω μιας μικρής σχισμής στην περιοχή επιτάχυνσης. Αυτό γίνεται εφαρμόζοντας ένα θετικό δυναμικό σε ένα ηλεκτρόδιο απωθητή. Πριν μπουν στον αναλυτή μάζας, όλα τα ιόντα πρέπει να επιταχυνθούν σε μια συγκεκριμένη σταθερή τιμή κινητικής ενέργειας, εφαρμόζοντας ένα δυναμικό στο μπλοκ πηγής ιόντων, ενώ ταυτόχρονα η σχισμή εξόδου είναι γειωμένη. Στα όργανα μαγνητικού τομέα εφαρμόζονται υψηλές τάσεις ($10^3 - 10^4$ V) που τους δίνουν την τελική τους ταχύτητα πριν μπουν στον αναλυτή μάζας. Η ενέργεια που αποκτάται από το ιονισμένο μόριο το αναγκάζει αμέσως να διασπαστεί μικρότερα ιόντα, μερικά από τα οποία μπορεί να έχουν αρκετή ενέργεια για να κατακερματιστούν περαιτέρω σε δευτερεύοντα ιόντα. Ο κατακερματισμός των μοριακών ιόντων συμβαίνει κυρίως εντός πηγής ιόντων. Η αποτελεσματικότητα του ιονισμού και του κατακερματισμού αυξάνεται με υψηλότερη ενέργεια ηλεκτρονίων. Για να έχουμε αποδοτικότερο ιονισμό των μορίων του δείγματος πρέπει να βελτιστοποιήσουμε το ρεύμα νήματος, το ρεύμα εκπομπής και το ρεύμα ιονισμού. Το ρεύμα νήματος είναι το ρεύμα που παρέχεται στο νήμα και το πυρακτώνει. Το ρεύμα εκπομπής (ένα μέτρο του ρυθμού εκπομπής ηλεκτρονίων από το νήμα) είναι το ρεύμα που μετράται μεταξύ του νήματος και της σχισμής εισόδου ηλεκτρονίων. Το ρεύμα ιονισμού (ο ρυθμός άφιξης ηλεκτρονίων στην παγίδα) είναι ένα μέτρο του αριθμού των ηλεκτρονίων που θα προκαλέσουν ιονισμό, στον θάλαμο ιονισμού [2,4,6].



Εικόνα 6- Σχηματικό διάγραμμα διάταξης ιονισμού ηλεκτρονίων

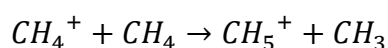
Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_ionization

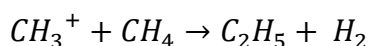
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Υψηλό ρεύμα ιονισμού δηλαδή καλή ευαισθησία	Δύσκολη διάκριση μεταξύ ισομερών
Πολύ καλή ταυτοποίηση του δείγματος λόγω υψηλού κατακερματισμού και άρα πολλών κορυφών φάσματος μάζας	Ο υψηλός κατακερματισμός μπορεί να οδηγήσει στο να χαθεί η κορυφή του μοριακού ιόντος δηλαδή να μη μπορούμε να το αναγνωρίσουμε
	Λόγω των θερμοκρασιών που απαιτούνται για την εξαέρωση του δείγματος μπορεί να διασπαστούν ουσίες πριν τον ιονισμό
	Εφαρμογή σε ουσίες με μοριακό βάρος μικρότερο των 10^3 Da

Χημικός ιονισμός (CI)

Τα σύγχρονα συστήματα φασματομετρίας μάζας είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να μπορούν να ιονίσουν το δείγμα τόσο με τη τεχνική του ιονισμού με ηλεκτρόνια, όσο και με χημικό ιονισμό. Είναι ο δεύτερος πιο διαδεδομένος τρόπος ιονισμού του δείγματος. Εδώ τα μόρια του δείγματος ιονίζονται μέσω σύγκρουσής τους με ιόντα ενός ρυθμιστικού αερίου το οποίο έχει ιονιστεί με πρόσκρουση ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια έχουν παραχθεί και πάλι από θερμαινόμενο νήμα. Μετά τον ιονισμό του το ρυθμιστικό αέριο αποκτάει θετικό φορτίο. Ταυτόχρονα για να πραγματοποιηθεί ο χημικός ιονισμός, προστίθεται μία αντλία κενού και μειώνεται το εύρος της σχισμής που οδεύει προς τον αναλυτή μάζας. Έτσι η πίεση του αερίου αντιδραστήριου σε σχέση με τη πίεση του αναλυτή είναι 5 φορές μεγαλύτερη. Επιπροσθέτως η συγκέντρωση του ρυθμιστικού αερίου είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή του δείγματος με το λόγο της ποσότητας αντιδραστήριο/δείγμα να είναι $10^3 - 10^4$. Εξαιτίας αυτής της συνθήκης, δηλαδή της πολύ μεγάλης διαφοράς συγκεντρώσεων η δέσμη των ηλεκτρονίων αντιδρά μόνο με τα μόρια του ρυθμιστικού αερίου. Το αέριο αυτό είναι συνήθως μεθάνιο (CH_4) ή μπορεί να είναι και αμμωνία (NH_3) ή ισοβουτάνιο [$(CH_3)_3CH$]. Όσον αφορά το μεθάνιο το οποίο αντιδρά με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας, παράγει ιόντα CH_4^+ , CH_3^+ τα οποία αποτελούν το 90% των προϊόντων αντίδρασης, ενώ το υπόλοιπο 10% είναι CH_2^+ . Τα ιόντα αυτά αντιδρούν με τα υπόλοιπα μόρια του μεθανίου σύμφωνα με τις παρακάτω σχέσεις:

Σχέση 2





Γενικά οι συγκρούσεις μεταξύ των μορίων του αναλυτή ΜΗ και των CH_5^+ ή $C_2H_5^+$ είναι πολύ έντονες και περιλαμβάνουν τη μεταφορά πρωτονίου ή υβριδίου. Τέλος το φάσμα μαζών που παίρνουμε από το χημικό ιονισμό αποτελείται συνήθως από καλά διαχωρισμένες κορυφές $(M - 1)^+$ ή $(M - 1)^+$ που προκύπτουν από τη προσθήκη ή την αφαίρεση ενός πρωτονίου παρουσία ιόντος του αντιδραστηρίου [4, 19 – 21].

Ιοντισμός πεδίου (FI)

Ο ιοντισμός πεδίου αποτελεί μία μέθοδο στην οποία χρησιμοποιούνται πολύ ισχυρά μαγνητικά πεδία προκυμμένου να ιονιστεί το δείγμα. Συγκαταλέγεται στη κατηγορία των μαλακών πηγών ιονισμού. Το δείγμα απαιτείται και σε αυτή τη μέθοδο να είναι στη μορφή αερίου πριν ιονιστεί. Για τη παραγωγή των μαγνητικών πεδίων εφαρμόζεται μία διαφορά δυναμικού της τάξης των 10 – 20 kV, μεταξύ των εκπομπών και της καθόδου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργούνται πολύ ισχυρά μαγνητικά πεδία, περίπου 10^8 V/cm. Οι εκπομποί είναι πολύ λεπτά σύρματα βολφραμίου με διάμετρο περίπου 10μm, πάνω στους οποίους έχουν αναπτυχθεί μικροσκοπικοί δενδρίτες άνθρακα διαμέτρου μικρότερη του 1μm. Για τη κατασκευή αυτών των δενδριτών ακολουθήθηκε η διαδικασία της πυρόλησης βενιζολίου σε υψηλό ηλεκτρικό πεδίο. Ταυτόχρονα οι εκπομποί βρίσκονται σε πολύ κοντινή απόσταση από τη κάθοδο (0,5 – 2mm), η οποία κάθοδος χρησιμεύει και ως σχισμή. Το δείγματα μορίων στην αέρια φάση πλησιάζει την επιφάνεια του πομπού που διατηρείται σε υψηλό θετικό δυναμικό. Εάν το ηλεκτρικό πεδίο στην επιφάνεια είναι αρκετά έντονο, ένα από τα ηλεκτρόνια από το μόριο του δείγματος μεταφέρεται στον πομπό μέσω του φαινομένου της κβαντομηχανικής σήραγγας, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό κατιόντος $M^{+\bullet}$. Αυτό το ιόν απωθείται από τον πομπό και κινείται προς τη κάθοδο. Μέσω της σχισμής στην κάθοδο το ιόν περνάει στον αναλυτή μάζας. Αυτή η πηγή ιονισμού έχει ως πλεονέκτημα ότι τα ιόντα που δημιουργούνται έχουν πολύ μικρό πλεόνασμα ενέργειας, με αποτέλεσμα τα μόρια να μη κατακερματίζονται. Επειδή η εσωτερική ενέργεια των ιόντων είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή των δύο προηγούμενων μεθόδων, θεωρείται μία από τις πιο μαλακές μεθόδους παραγωγής ιόντων από οργανικά μόρια. Παρ' όλα αυτά, η θερμική αποσύνθεση του αναλυτή μπορεί να συμβεί κατά την εξάτμισή του πριν από τον ιονισμό. Επομένως, το FI επιτρέπει στα μοριακά είδη να αναγνωρίζονται εύκολα μόνο για ενώσεις που είναι αρκετά πτητικές και θερμικά σταθερές. Για το λόγο αυτό ο ιοντισμός πεδίου αποτελεί μια μέθοδο για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων όπως τα ορυκτά καύσιμα. Τέλος αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται συμπληρωματικά με τον ιονισμό πεδίου και το χημικό ιονισμό, καθότι έχει χαμηλή απόδοση ιονισμού [4,5].

Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Η φασματομετρία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ανήκει στη κατηγορία των πηγών εκφόρησης. Αυτό σημαίνει ότι μπορούμε να εξετάσουμε δείγματα στερεά ή υγρά, μη πτητικά ή θερμικά ασταθή. Σε αυτές τις κατηγορίες εντάσσονται οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια, τα ολιγοπεπτίδια και μερικά ανόργανα μόρια. Γενικά στη τεχνική αυτή εξετάζονται δείγματα με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10^5 Da ($1 \text{ Da} = 1/12$ της μάζας ενός ατόμου άνθρακα, $1 \text{ Da} = 1 \text{ amu}$). Η επικρατέστερη πρακτική είναι ο ιονισμός με ηλεκτρόνια να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με υγροχρωματογραφικές στήλες ή τριχοειδείς στήλες ηλεκτροφόρησης [5]. Στο ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό εφαρμόζεται ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο πάνω στο υγρό δείγμα που διέρχεται μέσω ενός ανοξειδωτού τριχοειδούς σωλήνα με χαμηλή ροή, περίπου 1 – 10 mL/min. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και θερμοκρασίας. Το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται από μία διαφορά δυναμικού 3 – 6kV μεταξύ του τριχοειδούς και ενός κυλινδρικού ηλεκτροδίου που περιβάλλει τη βελόνα. Η απόσταση αυτών των δύο είναι 0,3 – 2 cm και έτσι δημιουργούνται ηλεκτρικά πεδία της τάξης 10^6 V/m. Μέσα από το κυλινδρικό ηλεκτρόδιο εγχέεται αέριο (συνήθως άζωτο) με χαμηλό ρυθμό ροής έτσι ώστε η διασπορά του αερίου να είναι μικρή στο χώρο. Το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο δημιουργεί μικρά σταγονίδια στην άκρη του τριχοειδούς όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόρια του αναλυτή. Τα μόρια συνεχίζουν να μικραίνουν λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη και κατά συνέπεια έχουμε αύξηση της πυκνότητας του φορτίου.

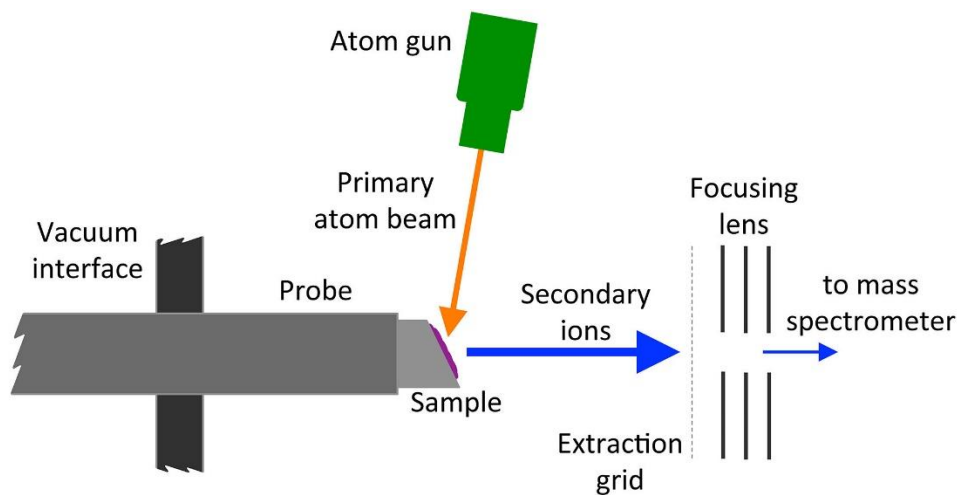
Αν η τάση ήταν χαμηλή, η σταγόνα θα ήταν σφαιρική. Με την αυξημένη τάση και τη δημιουργία πολύ ισχυρών ηλεκτρικών πεδίων η σταγόνα επιμηκύνεται και τελικά αλλάζει σε «κώνο Taylor» και έχουμε την εμφάνιση σπρέι. Σύμφωνα με τους Gomez και Tang [22] το φαινόμενο αυτό μπορεί να συμβεί πριν από το όριο του Rayleigh, επειδή τα σταγονίδια παραμορφώνονται μηχανικά, «σπάζοντας» έτσι τα σταγονίδια πιο εύκολα. Λόγω λοιπόν της εξάτμισης του διαλύτη, η επιφανειακή τάση δε μπορεί να υποστηρίξει το φορτίο. Η σταγόνα παραμορφώνεται, επιμηκύνεται και τότε έχουμε την αποκαλούμενη έκρηξη Coulomb, δημιουργώντας ένα κώνο Taylor. Από αυτό το κώνο Taylor απελευθερώνονται περίπου 20 μικρότερα σταγονίδια. Τυπικά ένα σταγονίδιο πρώτης γενιάς από το τριχοειδές θα έχει διάμετρο περίπου 1,5 μm και θα έχει φορτίο περίπου 10 – 14C. Τα σταγονίδια που σκορπίστηκαν θα έχουν διάμετρο 0,1 μm με φορτίο 300 – 400C. Η διαδικασία θα επαναληφθεί μέχρι τη πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη από τον αναλυτή, δημιουργώντας έτσι ένα πολλαπλώς φορτισμένο μόριο αναλυτή [4,5, 22 – 25].

Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB)

Αυτή η τεχνική ιονισμού του δείγματος χρησιμοποιείται κυρίως για τη παραγωγή ιόντων από πολικά δείγματα με μεγάλο μοριακό βάρος. Ταυτόχρονα το δείγμα στη προκυμμένη περίπτωση είναι σε στερεά κατάσταση. Πρώτα πρέπει να διαλυθεί σε μία μη πτητική υγρή μήτρα. Αυτή η μήτρα διαλύματος είναι συχνά γλυκερόλη. Άλλο υλικό μήτρας μπορεί να είναι η m-νιτροβενζυλαλκοόλη. Μετά τη διάλυσή του από το διαλύτη, το δείγμα βομβαρδίζεται από άτομα ξένου (Xe) ή αργού (Ar). Τα άτομα αυτά είναι μεγάλης ενέργειας περίπου 5keV. Μέσα στο θάλαμο επικρατούν πιέσεις της τάξης των $10^{-3} - 10^{-4}$ torr [26]. Η ενέργεια των ατόμων απορροφάται από τα μόρια της γλυκερόλης, ιονίζοντάς τα, ενώ με τη σειρά τους ιονίζουν τα μόρια του αναλυτή. Τα ιόντα, θετικά και αρνητικά, εκροφόνται και εκτινάσσονται από την επιφάνεια του δείγματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το δείγμα να θερμαίνεται απότομα, περιορίζοντας έτσι τη θραύση του. Τα εκτινασσόμενα ιόντα κατευθύνονται προς τον αναλυτή μάζας. Στην εικόνα 7 παρουσιάζεται το σχηματικό διάγραμμα μιας διάταξης FAB. Ο λόγος που επιλέγεται υγρή μήτρα είναι διότι βοηθά στη μείωση της ενέργειας πλέγματος, που πρέπει να υπερνικηθεί για να εκροφηθεί ένα ιόν από τη στερεή φάση, και προκαλεί ένα είδος αποκατάστασης της φθοράς που προκαλείται από το βομβαρδισμό [4,5,27].

Η τεχνική FAB έχει αρκετά πλεονεκτήματα, αλλά έχει όμως και μειονεκτήματα:

- Πλεονεκτήματα:
Στα πλεονεκτήματα ανήκει το γεγονός ότι με αυτή τη τεχνική παίρνουμε καλά αποτελέσματα ακόμη και από θερμικά ασταθείς αναλυτές μεγάλου μοριακού βάρους, καθώς δίνουν μεγάλες ποσότητες μοριακών ιόντων αλλά και θραυσμάτων ιόντων. Επίσης έχουν ληφθεί αρκετά ακριβείς πληροφορίες για ενώσεις με μοριακά βάρη 3000 Da και έχουν προσδιοριστεί ενώσεις για μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 10^4 Da.
- Μειονεκτήματα:
Στα μειονεκτήματα ανήκει το γεγονός ότι απαιτεί σε σχέση με τον ιοντισμό ηλεκτρονίων μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος, έχει περιορισμένο εύρος μοριακών βαρών και είναι απαραίτητα η αναζήτηση κατάλληλου υλικού μήτρας. [4]

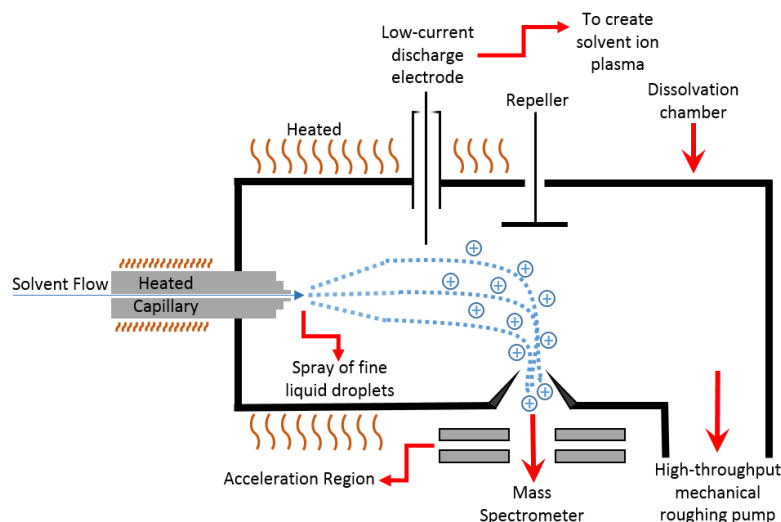


Εικόνα 7- Σχηματικό διάγραμμα διάταξης FAB

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Fast_atom_bombardment

Θερμοψεκασμός

Η πηγή ιόντων θερμοψεκασμού αναπτύχθηκε αρχικά ως μέθοδος εισαγωγής των σχετικά μεγάλων όγκων υγρού (ροής 1 – 1,5mL/min), από ένα υγρό χρωματογραφικό σύστημα σε ένα φασματόμετρο μάζας. Η πηγή έχει στο εσωτερικό της ένα χαλύβδινο θερμαινόμενο τριχοειδές εσωτερικής διαμέτρου 100μm, μέσω του οποίου ρέει ο διαλύτης σε μια θερμαινόμενη περιοχή πηγής (ενδεικτικά δείτε εικόνα 8). Εκεί βρίσκεται ένας ορθογώνια τοποθετημένος κώνος που μεταφέρει τα ιόντα στο φασματόμετρο μάζας. Ταυτόχρονα για την απομάκρυνση του ατμού που δημιουργείται υπάρχει μία αντλία με παγίδα διαλύτη. Για τη μεταφορά των ιόντων στο φασματόμετρο μάζας φροντίζει επίσης ένα ηλεκτρόδιο απέναντι από τον κώνο. Η πηγή μπορεί ακόμη, να διαθέτει ένα ηλεκτρόδιο εκκένωσης, ή ένα νήμα, προκειμένου να διευκολύνει τον ιονισμό του δείγματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η τεχνική είναι γνωστή ως πλαστικός ψεκασμός. Επίσης η θερμοκρασία του τριχοειδούς ρυθμίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε το 95% του διαλύτη να εξατμιστεί δημιουργώντας ένα αέριο νεφελοποίησης που προκαλεί τον υπόλοιπο διαλύτη, ο οποίος κανονικά περιέχει ένα πτητικό ρυθμιστικό όπως το οξικό αμμώνιο, για να σχηματίσει μικρά σταγονίδια που στη συνέχεια εξατμίζονται. Η συγκεκριμένη τεχνική πλέον έχει αντικατασταθεί ως επί το πλείστον από τον ηλεκτροψεκασμό [5,28].



Εικόνα 8- Σχηματικό διάγραμμα διάταξης θερμοψεκασμού

Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Thermospray>

Αναλυτής μαζών

Μετά τη πηγή ιονισμού τα ιόντα φτάνουν στον αναλυτή μάζας. Εδώ διαχωρίζονται όχι σύμφωνα με τη μάζα τους, αλλά με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο που φέρουν (m/z). Αυτός ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος για να μπορέσει στη συνέχεια ο ανιχνευτής να παράξει το ανάλογο ρεύμα για κάθε στοιχείο που «διαβάζει». Όλοι οι αναλυτές μάζας χρησιμοποιούν στατικά ή δυναμικά ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία που μπορούν να είναι μόνα ή συνδυασμένα για να ασκήσουν δύναμη στα φορτισμένα σωματίδια [5]. Οι μαθηματικές σχέσεις που εκφράζουν την επίδραση των μαγνητικών ή ηλεκτρικών πεδίων πάνω στα ιόντα είναι οι εξής:

Σχέση 4

$$F = ma - (2^{\text{ος}} \text{ νόμος του Νεύτωνα})$$

Όπου F = τη δύναμη που ασκείται στο ιόν, m = μάζα, a = επιτάχυνση

Σχέση 5

$$F = z(E + U * B) - (\text{Δύναμη Lorentz})$$

Όπου F = τη δύναμη που ασκείται στο ιόν, E = ένταση ηλεκτρικού πεδίου, z = το φορτίο του ιόντος, U = η ταχύτητά του, B = η ένταση του μαγνητικού πεδίου

Με βάση το νόμο του Νεύτωνα η δύναμη που ασκείται επάνω στα ιόντα, τα επιταχύνει, συναρτήσκει όμως της μάζας τους. Ο νόμος του Lorentz μας λέει ότι η δύναμη αυτή εξαρτάται και από το φορτίο z του κάθε ιόντος. Εξαιτίας λοιπόν του

διαφορετικού για κάθε ιόν λόγο m/z , στον ανιχνευτή φτάνουν ομάδες αυτών των ιόντων με χρονική καθυστέρηση μεταξύ τους [29].

Όλοι οι αναλυτές μάζας έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους [30]:

A) Διακριτική ικανότητα:

είναι η ικανότητα του φασματογράφου μάζας να διακρίνει δύο γειτονικά ιόντα που διαφέρουν ελάχιστα ως προς τη μάζα τους

Σχέση 6

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Όπου R = διακριτική ικανότητα, Δm = η διαφορά των δύο μαζών από δύο γειτονικές κορυφές φάσματος μαζών, m = η μάζα της πρώτης κορυφής (μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η μέση τιμή των μαζών δύο γειτονικών κορυφών)

Δύο κορυφές με ίδιο ύψος, οι οποίες βρίσκονται η μία δίπλα στην άλλη, θεωρείται ότι διαχωρίζονται όταν η επικάλυψή τους δεν υπερβαίνει το 10%. Ένας άλλος τρόπος υπολογισμού της διακριτικής ικανότητας είναι αυτός με το πλήρες εύρος του μισού του μεγίστου (FWHM) όπου μπορούμε να την υπολογίσουμε με μία μόνο κορυφή. Εδώ το m είναι ο λόγος m/z και το Δm είναι το πλάτος στο μισό του μεγίστου ύψους της κορυφής [2].

B) Ακρίβεια μάζας:

είναι ο λόγος του σφάλματος του μετρούμενου m/z (δηλαδή, η διαφορά μεταξύ του m που μετρήσαμε και του πραγματικού m) προς το πραγματικό m/z . Συνήθως μετράται σε μέρη ανά εκατομμύριο (part per million – ppm).

Γ) Εύρος μάζας:

Είναι το εύρος του λόγου m/z που μπορεί να διαβάσει ο αναλυτής μάζας

Δ) Γραμμικό δυναμικό εύρος:

είναι το εύρος μέσα στο οποίο το σήμα ιόντων είναι γραμμικό σε σχέση με τη συγκέντρωση του αναλυτή

Ε) Ευαισθησία αφθονίας:

είναι το αντίστροφο του λόγου που παίρνουμε διαιρώντας το σήμα που σχετίζεται με μια μεγάλη κορυφή, με το σήμα του υποβάθρου σε μία χαμηλότερη ή υψηλότερη μονάδα m/z .

ΣΤ) Επαναληψιμότητα:

Είναι η ικανότητα του αναλυτή να μπορεί να διαβάζει πολλές φορές την ίδια ποσότητα ιόντων. Η εξωτερική επαναληψιμότητα αναφέρεται στην αναπαραγωγή των ίδιων αποτελεσμάτων για μετρήσεις ονομαστικά

πανομοιότυπων δειγμάτων ενώ η εσωτερική για μετρήσεις του ίδιου δείγματος.

Ζ) Ταχύτητα:

Είναι η χρονική διάρκεια του πειράματος. Χρησιμοποιείται για να μετρήσουμε τον αριθμό των φασμάτων ανά μονάδα χρόνου που μπορούν να δημιουργηθούν.

Αναλυτές μαγνητικού τομέα

Οι αναλυτές μαγνητικού τομέα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Αυτούς της απλής εστίασης και αυτούς της διπλής εστίασης. Αναλυτικότερα:

Αναλυτής μαγνητικού τομέα απλής εστίασης

Οι αναλυτές μάζας μαγνητικού τομέα απλής εστίασης είναι από τα παλαιότερα και πιο απλοϊκά συστήματα. Διαθέτουν ένα μαγνήτη ή ένα ηλεκτρομαγνήτη τα πιο σύγχρονα, ο οποίος αλλάζει τη τροχιά που θα διαγράψουν τα φορτισμένα ιόντα που έχουν εξέλθει από τη πηγή ιοντισμού, και τα αναγκάζει σε μία τροχιά 90°, ενώ υπάρχουν και άλλοι 60° ή 180° (ενδεικτικά δείτε εικόνα 9). Ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z), ενώ η διαδικασία πραγματοποιείται υπό πιέσεις τις τάξης των 10^{-7} torr.

Τα ιόντα όταν εξέρχονται από τη πηγή ιόντων, περνάνε από μία σχισμή Α, επιταχύνονται με μία τάση V και εξέρχονται προς τον αναλυτή μέσω μία άλλης σχισμής Β. Η κινητική ενέργεια που αποκτούνε δίνεται από τη σχέση 7.

Σχέση 7

$$K = qV = zeV = \frac{1}{2}mv^2$$

Όπου z = φορτίο ιόντος, V = η τάση μεταξύ των σχισμών Α και Β, v = η ταχύτητα του ιόντος, e = το φορτίο του ηλεκτρονίου και ισούται με $1,6 \times 10^{-19}$ C

Από τη παραπάνω σχέση συμπεραίνουμε ότι όλα τα ιόντα με ίδιο αριθμό φορτίου z , θεωρητικά αποκτούν την ίδια κινητική ενέργεια ανεξαρτήτως της μάζας τους. Συνεπώς λύνοντας τη σχέση ως προς την ταχύτητα v , καταλαβαίνουμε ότι τα ιόντα με μικρότερη μάζα θα αναπτύξουν μεγαλύτερη ταχύτητα, ενώ αυτά με μεγαλύτερη μάζα, μικρότερη ταχύτητα.

Όταν περνάνε μέσα από το μαγνητικό πεδίο έντασης B , τα ιόντα δέχονται μία δύναμη η οποία είναι η δύναμη Lorentz:

Σχέση 8

$$F_L = Bzev$$

Η δύναμη αυτή είναι κάθετη προς την κατεύθυνση του μαγνητικού πεδίου καθώς και προς την κατεύθυνση της κίνησης του ιόντος. Ως αποτέλεσμα, το ιόν ταξιδεύει σε καμπύλη διαδρομή που έχει ακτίνα r σε επίπεδο κάθετο προς την κατεύθυνση του μαγνητικού πεδίου. Η δύναμη FB αντισταθμίζεται από τη κεντρομόλο δύναμη F_c .

Σχέση 9

$$F_c = \frac{mv^2}{r}$$

Όπου r = ακτίνα καμπυλότητας του μαγνητικού τομέα

Εξισώνοντας λοιπόν τις δύο αυτές δυνάμεις έχουμε:

Σχέση 10

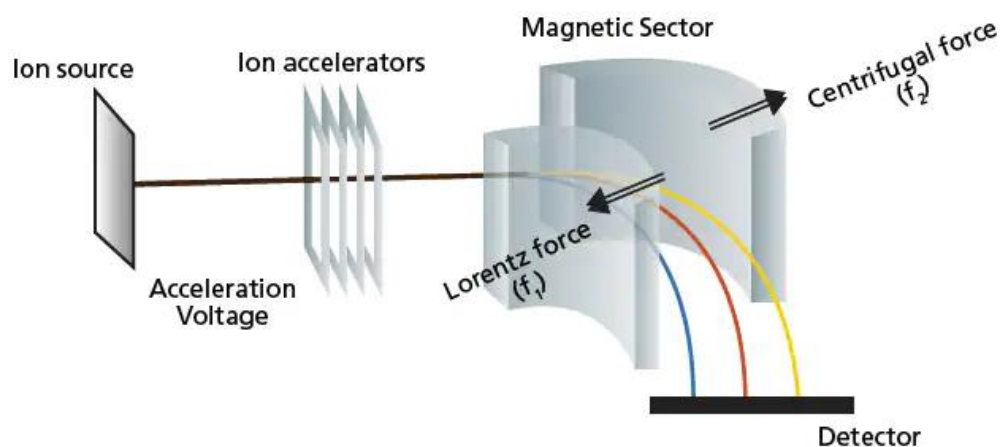
$$F_L = F_c \Leftrightarrow Bzev = \frac{mv^2}{r} \Leftrightarrow v = \frac{Bzer}{m}$$

Από τη σχέση 7 και τη σχέση 10, έχουμε ότι:

Σχέση 11

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

Από τη παραπάνω σχέση προκύπτει ότι όλα τα φάσματα μαζών μπορούν να ληφθούν παραμετροποιώντας είτε το B , είτε το r , είτε το V . Όπως αναφέρθηκε τα σύγχρονα συστήματα διαθέτουν ηλεκτρομαγνήτη και όχι ένα σταθερό μαγνήτη. Ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται μεταβάλλοντας το ρεύμα στον ηλεκτρομαγνήτη, με αποτέλεσμα να αλλάζει η ένταση του μαγνητικού πεδίου B [2,4,5].



Εικόνα 9 – Σχηματικό διάγραμμα αναλυτή μαγνητικού τομέα απλής εστίασης

Πηγή: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html#section1

Αναλυτής μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης

Με τους αναλυτές απλής εστίασης λόγω ανομοιογενειών του πεδίου της πηγής τα ιόντα αποκτούν διαφορετικές ενέργειες και έτσι δεν εστιάζονται ούτε κατανέμονται, αλλά ακολουθούν κατανομή Maxwell-Boltzmann. Η δέσμη διευρύνεται και δε φτάνει στον ανιχνευτή ολόκληρη με αποτέλεσμα να έχουμε μειωμένη διακριτική ικανότητα. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε μία διάταξη η οποία διορθώνει τις ανομοιογένειες στη κατεύθυνση και τη ταχύτητα των ιόντων. Αυτή η διάταξη ονομάζεται ηλεκτροστατικός αναλυτής (ESA).

Ένας ηλεκτροστατικός αναλυτής (ESA) αποτελείται από δύο κυρτές ομοαξονικές μεταλλικές πλάκες. Η μία έχει θετικό δυναμικό και η άλλη αρνητικό δυναμικό ίσου μεγέθους. Ο σκοπός του είναι να παράγει ιόντα ομογενή στην κινητική ενέργεια (δηλαδή, τα ιόντα που έχουν την ίδια ενέργεια αφού διασχίζουν αυτήν τη συσκευή εστιάζονται σε ένα μόνο σημείο). Όταν περνάνε ιόντα με ενέργειες μεγαλύτερες ή μικρότερες από αυτή που ορίζει ο αναλυτής, προσκρούουν στην άνω ή την κάτω πλάκα. Έχουμε δηλαδή μία δέσμη στην οποία έχει γίνει εστίαση της ενέργειας. Η εστίαση της κατεύθυνσης γίνεται στο μαγνητικό αναλυτή.

Αν ορίσουμε ένα επίπεδο A στο οποίο έχουμε εστίαση της ενέργειας (από το ESA) και ένα επίπεδο B στο οποίο έχουμε εστίαση των κατευθύνσεων (από τον ηλεκτρομαγνήτη), τότε θα τοποθετήσουμε τον ανιχνευτή ιόντων ακριβώς στο σημείο που τέμνονται τα δύο επίπεδα γιατί στο συγκεκριμένο σημείο θα έχουμε ιόντα διπλά εστιασμένα.

Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (TOF)

Ο αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης διαχωρίζει τα ιόντα στο σωλήνα πτήσης με βάση τις ταχύτητές τους. Τα ιόντα δημιουργούνται ανά ομάδες με βομβαρδισμό του δείγματος με παλμούς ηλεκτρονίων, δευτερογενών ιόντων ή φωτονίων απλό δέσμη laser. Οι παλμοί έχουν διάρκεια 0,25μs και συχνότητες 10 – 50Hz. Αυτά τα ιόντα στη συνέχεια επιταχύνονται προς τον σωλήνα πτήσης μέσω ενός παλμικού ηλεκτρικού πεδίου. Το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται από ηλεκτρικό παλμό της τάξης των $10^3 - 10^4$ V. Η συχνότητα των παλμών του ηλεκτρικού πεδίου είναι η ίδια με αυτή που δημιουργεί τα ιόντα, εφαρμόζεται όμως με μία μικρή χρονική καθυστέρηση. Αυτή η μικρή καθυστέρηση επιτρέπει στα ιόντα και να αποκτούν μια μέση ορμή πριν να επιταχυνθούν από το ηλεκτρικό πεδίο. Όλα τα ιόντα που εισέρχονται στο σωλήνα πτήσης έχουν την ίδια αρχική κινητική ενέργεια. Ο σωλήνας πτήσης είναι απαλλαγμένος από ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία και έχει μήκος περίπου 100cm. Εκεί ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται αναλόγως με τις ταχύτητές τους. Έπειτα θα πάνε στον ανιχνευτή ο οποίος βρίσκεται στο άλλο άκρο του σωλήνα πτήσης. Ο λόγος m/z καθορίζεται μετρώντας το χρόνο που χρειάζονται τα ιόντα για να φτάσουν στον ανιχνευτή. Επειδή η αρχική κινητική ενέργεια (E_k) των ιόντων και η απόσταση (L)

πηγής με ανιχνευτή παραμένουν σταθερά, η μάζα είναι συνάρτηση του χρόνου που απαιτείται για την ανίχνευση των ιόντων μετά την αρχική επιτάχυνση [4 – 6 , 31 – 33].

Πριν φύγει από την πηγή, ένα ιόν με μάζα m και συνολική φόρτιση $q = ze$ επιταχύνεται από δυναμικό V_s . Η ενέργεια ηλεκτρικού δυναμικού E_{el} μετατρέπεται σε κινητική ενέργεια E_k :

Σχέση 12

$$E_k = \frac{mu^2}{2} = qV_s = zeV_s = E_{el}$$

Άρα από την σχέση 12 προκύπτει ότι η ταχύτητα u ενός ιόντος που φεύγει από τη πηγή είναι:

Σχέση 13

$$u = \sqrt{\frac{2zeV_s}{m}}$$

Ύστερα το ιόν ταξιδεύει κατά μήκος του σωλήνα με σταθερή ταχύτητα σε ευθεία γραμμή. Συνεπώς κάνει ευθύγραμμη ομαλή κίνηση και άρα ο χρόνος t που χρειάζεται για να διανύσει το μήκος του σωλήνα L , είναι:

Σχέση 14

$$t = \frac{L}{u}$$

Από τις σχέσεις 13 & 14 προκύπτει ότι ο χρόνος που χρειάζεται για να φτάσει το ιόν στον ανιχνευτή είναι:

Σχέση 15

$$t = L \sqrt{\frac{m}{z} \frac{1}{2eV}}$$

Από τη παραπάνω σχέση καταλαβαίνουμε ότι τα ελαφρύτερα σωματίδια φτάνουν στον ανιχνευτή γρηγορότερα από αυτά με μεγαλύτερη μάζα m . Ουσιαστικά, εάν δύο ιόντα διαφορετικών λόγων m/z επιταχυνθούν από την πηγή ιόντων με την ίδια αρχική κινητική ενέργεια και μέσω του σωλήνα πτήσης ταξιδέψουν προς τον ανιχνευτή, τότε ο ανιχνευτής θα ανιχνεύσει πρώτο το ιόν με τη μικρότερη μάζα διότι αυτό θα φτάσει πρώτο.

Οι μετρούμενοι χρόνοι άφιξης όλων των ιόντων παρέχουν ένα φάσμα χρόνου που μετατρέπεται σε φάσμα μάζας με βαθμονόμηση του οργάνου. Μια εξίσωση βαθμονόμησης είναι η εξής [2]:

$$\frac{m}{q} = at^2 + b$$

με $q=ze$

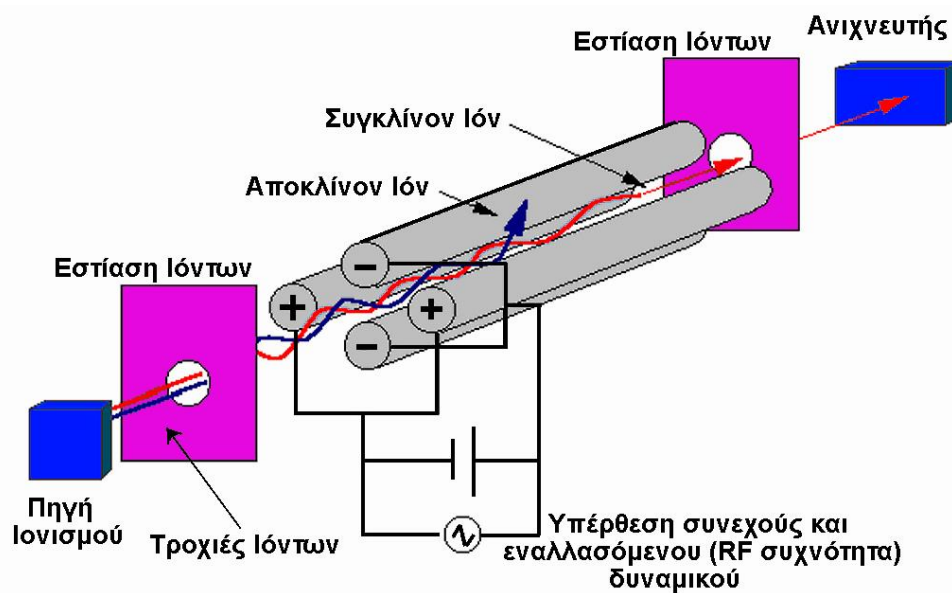
Η γραμμική σχέση μεταξύ m/q και t^2 δεν υπάρχει πλέον. Σε αυτήν την εξίσωση, το a είναι η σταθερά της αναλογικότητας μεταξύ του χρόνου άφιξης ενός ιόντος και του m/q του, και b είναι μια χρονική αντιστάθμιση που προκύπτει από τη διαφορά χρόνου μεταξύ της εξαγωγής ιόντων και του παλμού έναρξης της απόκτησης δεδομένων. Αυτές οι σταθερές προσδιορίζονται με δύο διαφορετικά ιόντα γνωστών τιμών m/q .

Επειδή απαιτείται ένα καθορισμένο σήμα εκκίνησης - διακοπής για τη μέτρηση του χρόνου, μια βασική προϋπόθεση στη λειτουργία TOF είναι ότι όλα τα ιόντα εισέρχονται στον σωλήνα πτήσης την ίδια στιγμή. Για το λόγο αυτό, οι αναλυτές μάζας χρόνου πτήσης συνδυάζονται ιδανικά με τη MALDI.

Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole mass analyzer)

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών ή φίλτρο μάζας όπως αλλιώς ονομάζεται είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος αναλυτής μαζών. Έχει μικρό μέγεθος και κόστος αγοράς, ενώ ταυτόχρονα είναι πολύ ανθεκτική κατασκευή με υψηλή ταχύτητα σάρωσης της τάξης των 100ms.

Τα φίλτρα μαζών αποτελούνται από 4 μεταλλικά κυλινδρικά ηλεκτρόδια, κάθετα ανά δύο μεταξύ τους όπως φαίνεται στην εικόνα 10. Σε όλα τα ηλεκτρόδια εφαρμόζεται δυναμικό μεταβαλλόμενης τάσης DC. Το ένα ζεύγος ηλεκτροδίων έχει θετικό δυναμικό ενώ το άλλο αρνητικό. Ταυτόχρονα υπερθέτουμε σε κάθε ζεύγος ηλεκτροδίων, με διαφορά φάσης 180° μεταξύ τους, δυναμικό μεταβαλλόμενης τάσης AC με συχνότητα στο φάσμα των ραδιοσυχνοτήτων (RF). Τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο από τη πηγή ιόντων και επιταχύνονται εξαιτίας μίας διαφοράς δυναμικού 5 – 10V. Όταν ένα θετικό ιόν εισέρχεται στο φίλτρο μαζών συγκλίνει ή αποκλίνει προς τα ηλεκτρόδια ανάλογα με το πρόσημο της εναλλασσόμενης τάσης DC. Αν μέχρι να αλλάξει το πρόσημο της DC τάσης το ιόν ακουμπήσει ένα ηλεκτρόδιο, τότε το φορτίο του εξουδετερώνεται και το ουδέτερο πλέον μόριο απομακρύνεται. Με το συνδυασμό της τάσης DC και της τάσης RF, τα ιόντα ενός συγκεκριμένου λόγου m/z μπορούν να διασχίσουν το τετράπολο, ενώ ιόντα υψηλότερων ή χαμηλότερων τιμών m/z , λόγω της ασταθή τροχιάς τους θα ακουμπήσουν στα ηλεκτρόδια και θα απομακρυνθούν. Αυξάνοντας τις τάσεις DC και RF, ενώ παράλληλα διατηρούμε το λόγο αυτών των δύο τάσεων σταθερό, το εύρος μάζας μπορεί να σαρωθεί και να περάσουν ιόντα διαφόρων λόγων m/z , έτσι ώστε να απεικονισθεί το επιθυμητό φάσμα μαζών [4,30,34].



Εικόνα 10 – Σχηματικό διάγραμμα τετραπολικού αναλυτή μαζών

Πηγή: https://tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab_AMS.htm

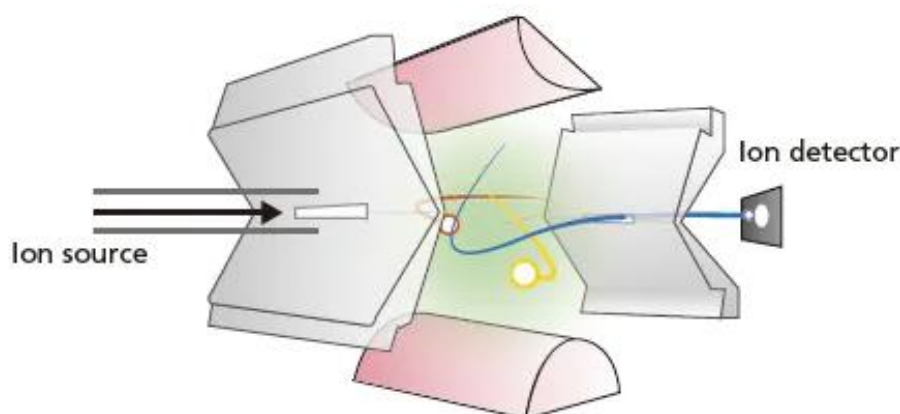
Αναλυτές παγίδας ιόντων (Ion Trap)

Υπάρχουν 3 κυριότεροι τύποι αναλυτών παγίδας ιόντων. Η τετραπολική παγίδα ιόντων (Quadrupole ion trap – QIT), η γραμμική παγίδα ιόντων (Linear Ion Trap – LIT) και ο αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap) [35].

Τετραπολική παγίδα ιόντων

Η τετραπολική παγίδα ιόντων ή τρισδιάστατη παγίδα ιόντων όπως αλλιώς αποκαλείται, είναι μια 3D τροποποίηση του τετραπολικού αναλυτή μάζας. Αποτελούνται από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο (ring electrode) σε σχήμα δακτυλίου και από δύο ελλειψοειδή πλευρικά ηλεκτρόδια καλύμματα – end cap (ενδεικτικά δείτε εικόνα 11). Τα δύο πλευρικά ηλεκτρόδια είναι γειωμένα, ενώ στο κεντρικό ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται μεταβαλλόμενο δυναμικό συχνότητας τέτοιας ώστε να είναι στο φάσμα των ραδιοσυχνοτήτων. Έτσι δημιουργείται ένα εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Αυτό το ηλεκτρικό πεδίο παγιδεύει τα ιόντα ανάμεσα στα 3 ηλεκτρόδια. Τα ιόντα μετά τον ιοντισμό τους στην πηγή εισέρχονται στη παγίδα μέσα από μία μικρή οπή του ενός εκ των δύο πλευρικών ηλεκτροδίων. Ιόντα διαφορετικών μαζών τώρα υπάρχουν μαζί μέσα στην παγίδα. Λόγο της αλληλεπίδρασης των ιόντων μεταξύ τους, οι τροχιές τους επεκτείνονται ως συνάρτηση του χρόνου. Για να αποφευχθούν απώλειες ιόντων από αυτήν την επέκταση διατηρείται στην παγίδα μια πίεση αερίου ηλίου (He) που αφαιρεί την περίσσεια ενέργειας από τα ιόντα που συγκρούονται.

Αυτή η πίεση κυμαίνεται γύρω στα 10^{-3} Torr (0,13 Pa). Στη συνέχεια μεταβάλλεται το πλάτος της εναλλασσόμενης τάσης που εφαρμόζεται στο κεντρικό ηλεκτρόδιο, ενώ η συχνότητα παραμένει σταθερή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αυξάνεται το πλάτος της ταλάντωσης που πραγματοποιούν στον οριζόντιο άξονα τα ιόντα, οι τροχιές τους να αποσταθεροποιούνται και να εκτοξεύονται έξω από την παγίδα μέσω ενός εκ των δύο πλευρικών ηλεκτροδίων όπου και καταλήγουν στον ανιχνευτή. Η εκτόξευση αυτή γίνεται με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) του κάθε ιόντος. Επειδή υπάρχουν ιόντα με τον ίδιο λόγο m/z , τα ιόντα περνάνε στον ανιχνευτή σε ομάδες. Ανάλογα με την τάση που εφαρμόζεται στο κεντρικό ηλεκτρόδιο, μία ομάδα εκτοξεύεται προς τον ανιχνευτή. Πρώτα οι ομάδες με το μικρότερο λόγο m/z και ύστερα αυτές με μεγαλύτερους λόγους [5,6,11,31,36].



Εικόνα 11 – Αναπαράσταση εκτόξευσης ιόντος από 3D παγίδα ιόντων

Πηγή: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html#section4

Η ανάλυση της παγίδας ιόντων μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρόπο μάζας επιλεκτικής αστάθειας, εκτόξευσης συντονισμού, αξονικής διαμόρφωσης ή μη γραμμικού συντονισμού.

Αναλυτικότερα η λειτουργία αστάθειας επιλεκτικής μάζας:

Εδώ το δυναμικό RF εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο δακτυλίου. Η συχνότητά του δυναμικού RF παραμένει σταθερή, αντιθέτως η τιμή του δυναμικού μεταβάλλεται. Επίσης τα σφαιρικά ηλεκτρόδια είναι γειωμένα. Αρχικά το δυναμικό RF που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο δακτυλίου έχει μηδενική τιμή με σκοπό την απομάκρυνση όλων των ιόντων από την παγίδα πριν από την επόμενη ανάλυση. Κατά τη διάρκεια που τα ιόντα εισέρχονται στον αναλυτή, η τιμή του δυναμικού RF δε μεταβάλλεται. Αυτή είναι και η τάση αποθήκευσης. Δηλαδή με αυτή τη σταθερή τιμή τάσης συλλέγονται στην παγίδα μόνο τα ιόντα με λόγο m/z υψηλότερα από την τιμή αυτή. Αυτό είναι σημαντικό ειδικά κατά την ανάλυση σύνθετων μιγμάτων. Επιπλέον, με αυτή τη τεχνική εξαλείφονται σήματα που προέρχονται από τον αέρα, το διαλύτη ή άλλες ακαθαρσίες χαμηλού μοριακού βάρους από το φάσμα. Τα ιόντα αυτών των

ουσιών δεν θα συλλέγονται στην παγίδα, καθώς δεν είναι σε θέση να επιτύχουν μια σταθερή τροχιά υπό τέτοιες συνθήκες.

Όταν όλα τα ιόντα με ίδιο λόγο m/z φτάσουν στη παγίδα, η τιμή του δυναμικού V αρχίζει να αυξάνεται. Έτσι ενεργοποιείται η ταχύτερη κίνηση ιόντων αυξανόμενων διαδοχικών τιμών m/z . Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αποσταθεροποιείται η τροχιά τους σε κατεύθυνση z και να εκτοξεύονται στον ανιχνευτή μέσω της οπής σε ένα από τα σφαιρικά ηλεκτρόδια. Με κάθε ομάδα ιόντων εκτοξευόμενων ιόντων του ίδιου m/z που ανιχνεύουμε έχουμε και τη λήψη του φάσματος μάζας [11].

Γραμμική παγίδα ιόντων

Η γραμμική παγίδα ιόντων αποτελεί την εξέλιξη της τετραπολικής παγίδας. Συχνά αποκαλείται και ως δισδιάστατη (2D) παγίδα ιόντων. Η σύνθεσή της μοιάζει πολύ με το τετραπολικό αναλυτή μάζας, δηλαδή κατασκευάζεται επίσης από τέσσερις παράλληλες ράβδους και χρησιμοποιεί δυναμικά RF και DC για διαχωρισμό και ανάλυση μάζας. Παρ' όλα αυτά ο τρόπος λειτουργίας του είναι παρόμοιος με αυτό της τετραπολικής παγίδας ιόντων. Αποτελείται, λοιπόν, από δύο ζεύγη ράβδων, το καθένα χωρισμένο σε τρία τμήματα. Τα δύο ακριανά τμήματα διαφέρουν σε μέγεθος σε σύγκριση με το κεντρικό. Πιο συγκεκριμένα είναι 3 φορές μικρότερα. Τα ιόντα για να εκτοξευθούν στον ανιχνευτή, χρειάζεται να δημιουργηθεί μία σχισμή κατά μήκος ενός από των κεντρικών ράβδων. Η εφαρμογή 3 ξεχωριστών τάσεων DC στα τρία τμήματα της παγίδας, έχει ως αποτέλεσμα την παγίδευση των ιόντων στην αξονική διεύθυνση (επίπεδο $y-z$). Για την ακτινική παγίδευση ιόντων, το πεδίο παγίδευσης RF δημιουργείται εφαρμόζοντας την κύρια τάση RF μεταξύ των ζευγών x και y ηλεκτροδίων. Επιπλέον, συμπληρωματική τάση AC εφαρμόζεται στα x -ηλεκτρόδια (ράβδοι εξόδου) για την ενεργοποίηση, απομόνωση και εξαγωγή των ιόντων. Όπως και με την τρισδιάστατη παγίδα ιόντων, έχουμε τη λειτουργία αστάθειας επιλεκτικής μάζας με ακτινική εκτόνωση για την ανάλυση μάζας των παγιδευμένων ιόντων. Για την εκτέλεση αυτής της λειτουργίας, η κύρια τάση RF αυξάνεται με σταθερό ρυθμό, έτσι ώστε τα ιόντα αυξανόμενης μάζας να γίνονται διαδοχικά ασταθή στην ακτινική κατεύθυνση και εκτοξεύονται από τις εγκοπές στις ράβδους εξόδου. Η τάση AC χρησιμοποιείται επίσης για διέγερση συντονισμού και εξαγωγή ιόντων κατά τη διάρκεια της κύριας σάρωσης τάσης RF [37]. Όταν η συχνότητα του συμπληρωματικού πεδίου εναλλασσόμενου ρεύματος είναι ίδια με τη θεμελιώδη συχνότητα των παγιδευμένων ιόντων, έχουμε διέγερση συντονισμού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το αυξημένο ακτινικό εύρος κίνησης ιόντων που ακολουθείται από την εκτόξευση των ιόντων προς τον ανιχνευτή. Συνήθως υπάρχουν δύο παράλληλες εγκοπές στο κεντρικό τμήμα. Σε αυτές τοποθετούνται δύο ανιχνευτές για να διπλασιαστεί η ευαισθησία ανίχνευσης των ιόντων που εκτοξεύονται [2].

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της γραμμικής παγίδας ιόντων σε σύγκριση με τις τετραπολικές παγίδες ιόντων, είναι ότι έχουν υψηλότερη απόδοση παγίδευσης. Όταν έχουμε έγχυση ιόντων μέσα στη παγίδα ιόντων 2D, από εξωτερική πηγή, παρατηρείται αποτελεσματικότητα παγίδευσης άνω του 50%. Ταυτοχρόνως η

απόδοση παγίδευσης για την παγίδα ιόντων 3D είναι μόνο 5% [5]. Επιπροσθέτως έχουμε αυξημένη ικανότητα αποθήκευσης ιόντων, βελτιωμένη απόδοση εκτόξευσης ιόντων, γρηγορότερες ταχύτητες σάρωσης και μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης. Τέλος, η τεχνική της ακτινωτής συγκράτησης ιόντων μέσα σε μια παγίδα ιόντων 2D, έχει ως αποτέλεσμα την έντονη εστίαση κατά μήκος της κεντρικής γραμμής της παγίδας σε αντίθεση με την τρισδιάστατη παγίδα στην οποία τα πεδία τείνουν να εστιάζουν τα παγιδευμένα ιόντα σε ένα σημείο [2,38].

Αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap)

Ο αναλυτής orbitrap αποτελεί το πιο εξελιγμένο και πιο σύγχρονο σύστημα ανάλυσης μαζών και βασίζεται στην παγίδα Kingdon (ενδεικτικά δείτε εικόνα 12). Λειτουργεί με βάση την αρχή της τροχιακής παγίδευσης ιόντων γύρω από ένα αξονικό κεντρικό ηλεκτρόδιο τύπου spindle με ηλεκτροστατικό πεδίο. Γύρω από αυτό υπάρχει ένα εξωτερικό, ομοαξονικό με το κεντρικό, ηλεκτρόδιο σε σχήμα βαρελιού. Εφαρμόζεται μια υψηλή τάση DC μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού ηλεκτροδίου, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα ηλεκτρικό πεδίο που διαχωρίζεται σε συντεταγμένες r και z , ακτινικές και αξονικές αντίστοιχα. Η κατανομή $U(r,z)$ δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

Σχέση 17

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[\frac{r}{R_m} \right] + C$$

όπου το C είναι μια σταθερά, το k είναι ανάλογο με τη σταθερά αξονικής δύναμης αποκατάστασης και το R_m είναι η χαρακτηριστική ακτίνα

Τα ιόντα περιστρέφονται γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο (r, ϕ -κίνηση, όπου ϕ είναι η γωνιακή συντεταγμένη) και ταυτόχρονα ταλαντώνονται κατά μήκος του άξονα z .

Τα ιόντα κινούνται κατά μήκος του άξονα z . Η κίνηση τους αυτή μπορεί να περιγραφεί ως αρμονικός ταλαντωτής και είναι ανεξάρτητη από την περιστροφή που πραγματοποιούν γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο. Θα παγιδευτούν μόνο ιόντα με τροχιακή ακτίνα μικρότερη από R_m . Επιπλέον, η εξίσωση 17 δείχνει ότι τα ειδικά διαμορφωμένα ηλεκτρόδια παράγουν ηλεκτροστατικό δυναμικό που δεν περιέχει διασταυρούμενους όρους σε r και z , πράγμα που σημαίνει ότι η κίνηση κατά μήκος του z είναι ανεξάρτητη από την r, ϕ -κίνηση. Έτσι, το δυναμικό στην κατεύθυνση z είναι αποκλειστικά τετραγωνικό. Αυτή η κίνηση δίνεται από τη παρακάτω εξίσωση:

Σχέση 18

$$z(t) = z_0 \cos(\omega t) + \left(\frac{2E_z}{k} \right)^{1/2} \sin(\omega t)$$

όπου z_0 είναι το αρχικό αξονικό πλάτος, E_z η αρχική κινητική ενέργεια ιόντων κατά μήκος του άξονα z και:

Σχέση 19

$$\omega = \left(\frac{kq}{m}\right)^{1/2}$$

ω είναι η συχνότητα αξονικής ταλάντωσης (κυκλική συχνότητα – σε rad/sec), m είναι η μάζα του ιόντος και q είναι το φορτίο του.

Η τιμή του k καθορίζεται από το σχήμα των ηλεκτροδίων Orbitrap όπως επίσης και από το δυναμικό που εφαρμόζεται. Από τη παραπάνω εξίσωση φαίνεται η συσχέτιση της συχνότητας με το λόγο μάζας προς φορτίο του ιόντος αλλά και από το δυναμικό (το οποίο διατηρείται σταθερό) μεταξύ των ηλεκτροδίων.

Διαφορετικά ιόντα διαφορετικού λόγου μάζας – φορτίου ταλαντώνονται σε άλλη συχνότητα. Αυτή η ταλάντωσή τους δημιουργεί ένα ρεύμα το οποίο και ανιχνεύουμε. Το ρεύμα αυτό μετράται συναρτησί του χρόνου και μετασχηματίζεται με Fourier για να παράξει ένα φάσμα συχνοτήτων. Οι συχνότητες μετατρέπονται σε λόγους μάζας – φορτίου με την εξίσωση 19.

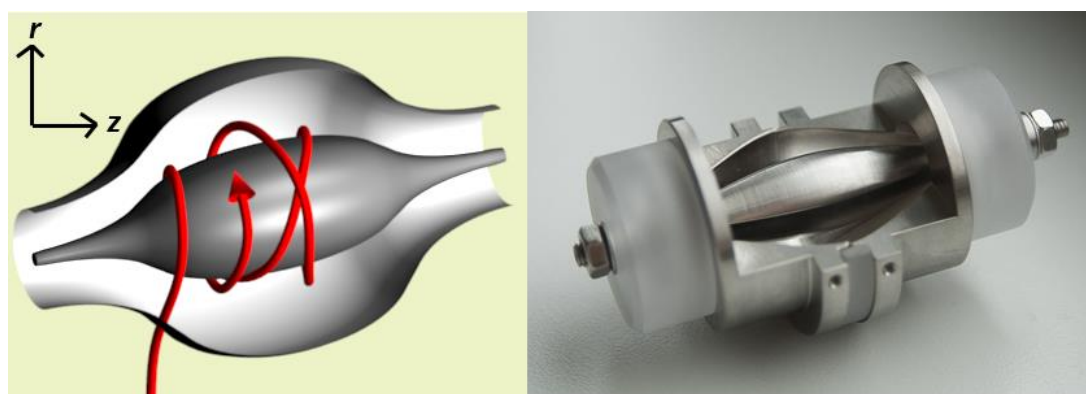
Σύμφωνα με την εξίσωση του Μακαρον, το ρεύμα αυτό είναι ανάλογο με τον αριθμό των ιόντων N (για δεδομένο λόγο μάζας/φορτίου) και το Δz που είναι το αξονικό πλάτος κίνησης των ιόντων, και δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

Σχέση 20

$$I(t) = -qN\omega \frac{\Delta z}{\lambda} \sin(\omega t)$$

όπου λ σχετίζεται με τη γεωμετρία των ηλεκτροδίων του orbitrap

Όταν υπάρχουν περισσότεροι από έναν λόγο μάζας – φορτίου στο Orbitrap, το ρεύμα ιόντων είναι το άθροισμα των ρευμάτων για κάθε λόγο μάζας – φορτίου [2,39,40].



Εικόνα 12

Αριστερά: η κίνηση των ιόντων μέσα στο orbitrap Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Orbitrap>

Δεξιά: τομή αναλυτή μάζας orbitrap Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Ion_trap

Αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (FTICR)

Οι αναλυτές FT-ICR προσδιορίζουν το λόγο m/z μετρώντας τη συχνότητα των ιόντων κυκλοτρονίου κάτω από ένα σταθερό μαγνητικό πεδίο. Αρχικά τα ιόντα εισέρχονται σε μια παγίδα Penning.

Μικρή ταχύτητα των ιόντων ταυτοχρόνως με ένα έντονο πεδίο, συνεπάγεται μικρή ακτίνα τροχιάς. Το ιόν έτσι μπορεί να παγιδευτεί σε μια κυκλική τροχιά στο μαγνητικό πεδίο: αυτή είναι η αρχή της ιοντικής κυκλοτρονικής ή της παγίδας Penning. Η παγίδα Penning μοιάζει με την τετραπολική παγίδα ιόντων, αλλά αντί να χρησιμοποιεί ηλεκτρικό πεδίο για την παγίδευση των ιόντων, χρησιμοποιεί μαγνητικό πεδίο. Τα ιόντα περνάνε από τη πηγή στο μαγνητικό πεδίο όλα μαζί ταυτόχρονα. Όταν ένα ιόν εισέρχεται σε μαγνητικό πεδίο B με ταχύτητα u , υφίσταται δύο δυνάμεις. Την κεντρομόλο (σχέση 21) και την φυγόκεντρο δύναμη (σχέση 22).

Σχέση 21

$$F = quB$$

Σχέση 22

$$\hat{F} = \frac{mu^2}{r}$$

Η κεντρομόλος δύναμη είναι η δύναμη Lorentz, η οποία εξαναγκάζει τα ιόντα σε κυκλική κίνηση, σε επίπεδο κάθετο προς το μαγνητικό πεδίο.

Για να σταθεροποιηθεί η τροχιά του ιόντος πρέπει αυτές οι δύο δυνάμεις να είναι ίσες. Από αυτή την ισότητα προκύπτει ότι:

Σχέση 23

$$qB = \frac{mu}{r}$$

Το ιόν συμπληρώνει κυκλική τροχιά $2\pi r$ με συχνότητα f :

Σχέση 24

$$f = \frac{u}{2\pi r}$$

Η γωνιακή συχνότητα με την οποία κινούνται τα ιόντα ονομάζεται αλλιώς και συχνότητα κυκλοτρονίου και δίνεται από την εξίσωση:

Σχέση 25

$$\omega = 2\pi f \xrightarrow{\text{(Σχέση 24)}} \omega = \frac{qB}{m}$$

όπου ω είναι η γωνιακή συχνότητα των ιόντων σε rad/sec, m η μάζα του ιόντος, q το φορτίο του και B είναι η ισχύς του μαγνητικού πεδίου.

Τα ιόντα είναι συγκεντρωμένα στο κέντρο του θαλάμου ICR και περιστρέφονται με συχνότητα κυκλοτρονίου ανάλογα με το λόγο m/z που έχουν. Δεν μπορούμε όμως να μετρήσουμε αυτή τη συχνότητα επειδή οι ακτίνες τροχιάς τους είναι πολύ μικρές για να ανιχνευθούν από τις πλάκες ανίχνευσης και τα όμοια ιόντα δε κινούνται συντεταγμένα μεταξύ τους (δεν είναι σε φάση). Πρέπει, λοιπόν, οι τροχιές να διεγερθούν και να αποκτήσουν μεγαλύτερη ακτίνα όπως επίσης και να αποκτήσουν την ίδια φάση για να καταστεί δυνατή η ανίχνευσή τους. Έτσι, οι διεγερμένες ομάδες ιόντων που κινούνται σε υψηλότερες τροχιές πλησιάζουν τις πλάκες ανίχνευσης, γεγονός που τις καθιστά μετρήσιμες. Για τη διέγερση των περιστρεφόμενων ιόντων, εφαρμόζεται μια τάση μεταβλητής ραδιοσυχνότητας RF (chirp) στις πλάκες διέγερσης. Εάν η συχνότητα του εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται από τη τάση RF, σε κάποιο σημείο αντιστοιχεί στη συχνότητα κυκλοτρονίου του αναλυθέντος ιόντος, αυτό διεγείρεται. Τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z έχουν διαφορετικές συχνότητες. Τη στιγμή της διέγερσης, όλα τα ιόντα με τον ίδιο λόγο m/z , απορροφούν ενέργεια από το εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ των πλακών διέγερσης, και αυξάνετε η κινητική τους ενέργεια. Τα διεγερμένα ιόντα κινούνται σε σπειροειδή κίνηση σε τροχιά με μεγαλύτερη ακτίνα, διατηρώντας τη συχνότητά τους. Η ακτίνα αυτής της τροχιάς εξαρτάται από τη διάρκεια και το πλάτος του μεταβαλλόμενου δυναμικού. Όταν η ακτίνα των ιόντων μεγαλώσει πολύ και περάσει τις διαστάσεις του θαλάμου ICR, αυτά θα αποβληθούν.

Όταν τα περιστρεφόμενα πακέτα ιόντων κινούνται πολύ κοντά στις πλάκες ανίχνευσης μεταδίδουν ένα πολύπλοκο σήμα RF (ρεύμα εικόνας) που περιέχει στοιχεία συχνότητας χαρακτηριστικά κάθε ιόντος. Το σήμα αυτό περνάει από ένα κύκλωμα σύνθετης αντίστασης και ενίσχυσης και με τους κατάλληλους μετασχηματισμούς Fourier, το σήμα αυτό μετατρέπεται σε φάσμα μαζών.

Επειδή οι αναλυτές FT-ICR χρησιμοποιούν πολύ ισχυρά μαγνητικά πεδία, είναι επιτακτική ανάγκη η χρήση μεγάλων υπεραγωγών μαγνητών. Για τη λειτουργία τους και ψύξη τους αυτοί οι μαγνήτες χρησιμοποιούν υγρό ήλιο. Η λειτουργία ενός αναλυτή FTICR απαιτεί ειδικές εγκαταστάσεις ενώ ταυτόχρονα είναι και πολύ υψηλό το κόστος αγοράς. Επίσης τα φασματομέτρα μάζας που χρησιμοποιούν FT-ICR έχουν αργές ταχύτητες σάρωσης σε σύγκριση με άλλους αναλυτές.

Παρ' όλα αυτά, ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα των αναλυτών FT-ICR είναι η πολύ υψηλή ακρίβεια μάζας και η ικανότητα επίλυσης. Όσο μεγαλύτερο μαγνητικό πεδίο τόσο μεγαλύτερη ανάλυση, αυξημένη ακρίβεια μάζας, αυξημένος αριθμός ιόντων που μπορούν να τοποθετηθούν στο κελί, μειωμένη συνένωση ιόντων. Τα μαγνητικά πεδία χρησιμοποιούν οι περισσότεροι αναλυτές FT-ICR είναι μεταξύ 7T και 12T [2,5,11,31,41].

Ανιχνευτές Ιόντων

Μετά τον αναλυτή μάζας τα ιόντα εισέρχονται στον ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής (ή μεταλλάκτης) ανάλογα με το πλήθος των ιόντων διαφορετικού λόγου m/z που θα ανιχνεύσει, παράγει και το αντίστοιχο ρεύμα. Αυτό το ηλεκτρικό σήμα είναι που επεξεργάζεται ο ηλεκτρονικός υπολογιστής ώστε να απεικονισθεί το φάσμα μαζών. Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού ανιχνευτή είναι: υψηλή ενίσχυση, γρήγορη απόκριση, χαμηλό θόρυβο, υψηλή απόδοση συλλογής ιόντων, χαμηλό κόστος, στενή κατανομή των αποκρίσεων, ίδια απόκριση για όλες τις μάζες, μεγάλο δυναμικό εύρος, μακροπρόθεσμη σταθερότητα, μεγάλη διάρκεια ζωής. [42]

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται. Μερικοί από αυτούς είναι:

Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές

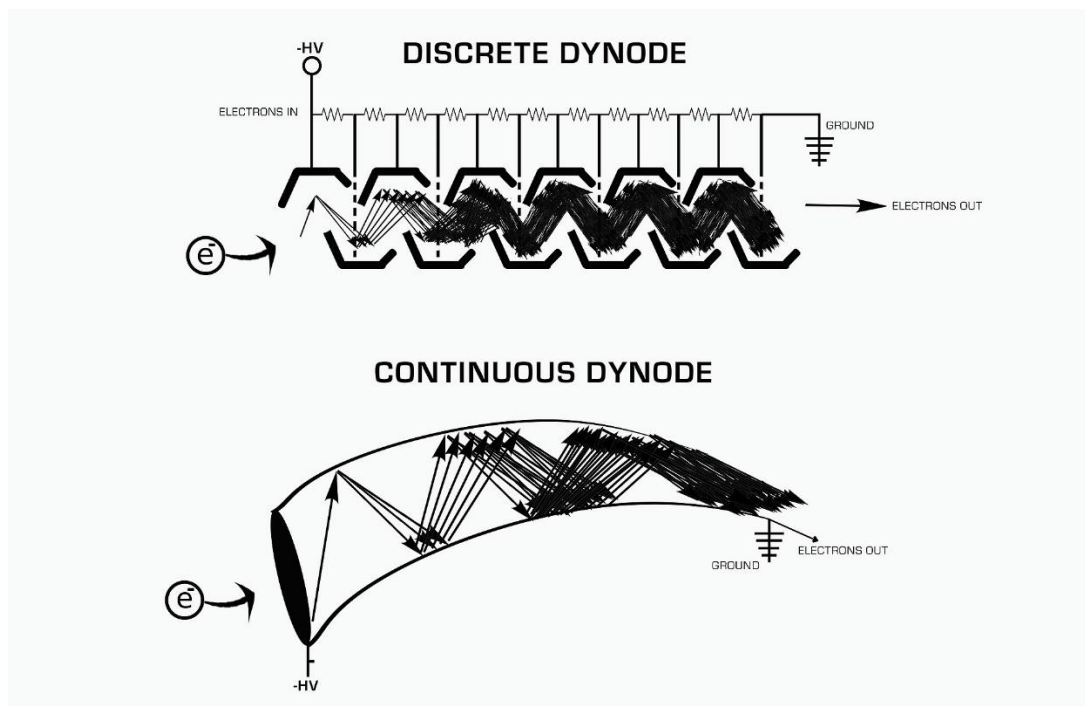
Οι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές ή αλλιώς πολλαπλασιαστές ηλεκτρονίων (Electron Multiplier – EM) αποτελούν τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές ιόντων στη φασματομετρία μάζας. Η βασική αρχή λειτουργίας σύμφωνα με την οποία λειτουργούν ονομάζεται εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων. Όταν ένα ιόν ή ένα ηλεκτρόνιο προσκρούει σε μια επιφάνεια, απελευθερώνονται δευτερογενή ηλεκτρόνια από άτομα που βρίσκονται στην επιφάνεια αυτή. Ο αριθμός των δευτερευόντων ηλεκτρονίων που απελευθερώνονται εξαρτάται από τον τύπο του σωματιδίου που προσέκρουσε, την ενέργειά του και τα χαρακτηριστικά της ίδιας της επιφάνειας. Υπάρχουν δύο τύποι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστών [43]:

- Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής Διακριτών Δυνόδων
- Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής Συνεχούς Δυνόδου

Αρχικά τα ιόντα από τον αναλυτή μάζας επιταχύνονται έτσι ώστε να αποκτήσουν μεγαλύτερη κινητική ενέργεια. Όταν το ιόν το οποίο κινείται με μεγάλη ταχύτητα πέσει επάνω σε μία δύνοδο και η κινητική ενέργεια που θα αποδώσει στην επιφάνεια είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια που χρειάζεται για να απελευθερωθεί ένα ηλεκτρόνιο, τότε έχουμε εκπομπή ηλεκτρονίων [44].

Ο πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων διακριτών δυνόδων έχει συνήθως 12 – 20 δυνόδους. Κάθε δύνodos είναι κατασκευασμένη από χαλκό (Cu) και βηρύλλιο (Be), ενώ όλες οι δύνodos συνδέονται μεταξύ τους μέσω μία αλυσίδας αντιστάσεων. Στην πρώτη δύνοδο εφαρμόζεται υψηλή τάση της τάξης των -1kV έως -5kV, ενώ για κάθε επόμενη δύνοδο η τάση αυτή μειώνεται, όπως φαίνεται και στην εικόνα 13. Τα ιόντα πέφτουν στην πρώτη δύνοδο, εκπέμπονται ηλεκτρόνια, τα οποία επιταχύνονται λόγω της θετικότερης τάσης της δεύτερης δυνόδου. Χτυπάνε το δεύτερο δυναμό προκαλώντας την εκπομπή περισσότερων ηλεκτρονίων. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται και για τις επόμενες δυνόδους, με αποτέλεσμα να παίρνουμε στην

τελευταία δύνοδο σημαντικά περισσότερα ηλεκτρόνια σε σχέση με τη πρώτη δύνοδο. Το κέρδος αυτό μπορεί να φτάσει ακόμη και το 10^7 . Δηλαδή για κάθε προσπίπτον ιόν να πήραμε στο τέλος 10^7 ηλεκτρόνια. Τέλος υπάρχουν δύο λειτουργίες ανάγνωσης του σήματος. Στην αναλογική λειτουργία (analog mode) το σήμα που παίρνουμε μετατρέπεται σε τάση μέσω ενός ενισχυτή ρεύματος σε τάση και στη συνέχεια ψηφιοποιείται. Στη λειτουργία ανίχνευσης παλμών (pulse counting mode detection) οι μεμονωμένοι παλμοί ηλεκτρονίων που λαμβάνουμε από κάθε πρωτογενές ιόν ρυθμίζονται ηλεκτρονικά, σχηματίζονται και μετρούνται ως διακριτά συμβάντα [2,5,45].



Εικόνα 13 – Επάνω αναπαράσταση ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή διακριτών δυνόδων & κάτω αναπαράσταση ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή συνεχούς δυνόδου

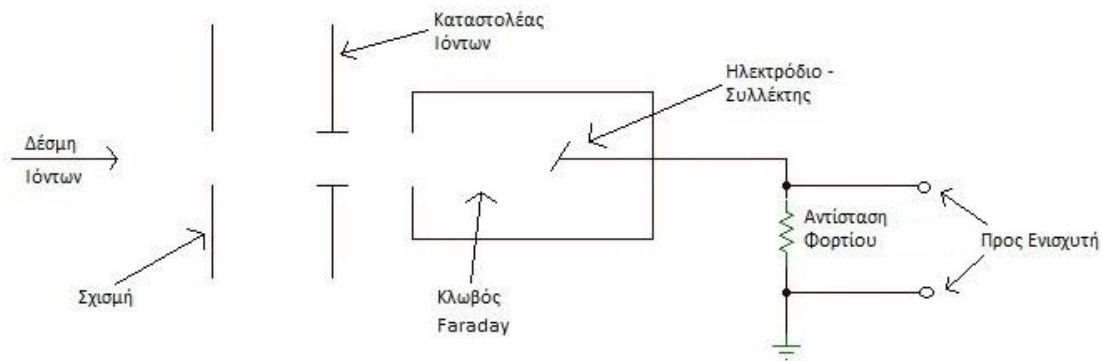
Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_multiplier

Στο πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων συνεχούς δυνόδου, οι διακριτές δύνοδοι αντικαθίσταται από μία συνεχή δύνοδο. Έχει ένα σχήμα σαν κέρατο όπως φαίνεται και στην εικόνα 13. Η δύνodos είναι κατασκευασμένη από ειδικού τύπου γυαλί το οποίο είτε είναι επενδυμένο με μόλυβδο είτε η εσωτερική του επιφάνεια έχει βηρύλλιο. Τα τοιχώματα του σωλήνα έχουν ομοιόμορφη ηλεκτρική αντίσταση ενώ εφαρμόζεται στα άκρα του διαφορά δυναμικού της τάξης των 1,8 – 2kV. Η τάση αυτή δημιουργεί στο εσωτερικό της δυνόδου ένα συνεχές επιταχυνόμενο πεδίο σε όλο το μήκος της. Η δέσμη των ιόντων που διαχωρίζονται στον αναλυτή προσκρούει κοντά στην είσοδο του ανιχνευτή και τα ηλεκτρόνια που εκτοξεύονται ανακλώνται προς την αντίθετη επιφάνεια έως ότου φτάσουν στο άλλο άκρο του ανιχνευτή. Με κάθε πρόσκρουση στην εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα, το ρεύμα ενισχύεται, λόγω της εκπομπής αρκετών περισσότερων ηλεκτρονίων για κάθε ηλεκτρόνιο. Έτσι

δημιουργείται ένας καταρράκτης ηλεκτρονίων και τέλος μια μεταλλική άνοδος συλλέγει το ρεύμα των δευτερογενών ηλεκτρονίων στην έξοδο του ανιχνευτή και μετράμε το ρεύμα αυτό. Μεταλλάκτες συνεχούς δυνόδου παρέχουν κέρδος της τάξης των $10^5 - 10^8$ [2,4,5].

Φαρανταϊκό κύπελλο

Το φαρανταϊκό κύπελο (Faraday cup) είναι ένα κύπελλο επενδυμένο με γραφίτη, ενώ στο κέντρο του έχει ένα ηλεκτρόδιο συλλέκτη. Το κύπελλο πρέπει να είναι βαθύ και στενό (ενδεικτικά δείτε εικόνα 14). Επειδή το φορτίο ενός ηλεκτρονίου που φεύγει από το τοίχωμα του ανιχνευτή αντιστοιχεί με την άφιξη ενός θετικού ιόντος στον ανιχνευτή, τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια που εκπέμπονται όταν ένα ιόν χτυπά το τοίχωμα του ανιχνευτή αποτελούν μια σημαντική πηγή σφαλμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ο γραφίτης, διότι αποτρέπει τη διαφυγή ανακλώμενων ιόντων και εκτοξευόμενων δευτερογενών ηλεκτρονίων. Τα ιόντα έρχονται από τον αναλυτή μάζας και προσπίπτουν επάνω στο ηλεκτρόδιο συλλέκτη το οποίο είναι συνήθως κατασκευασμένο από οξειδίο του βηρυλλίου (BeO), φωσφίδιο του γαλλίου (GaP) ή καίσιο και αντιμόνιο (CsSb) [46]. Το ηλεκτρόδιο βρίσκεται σε απόλυτη ευθυγράμμιση με τον αναλυτή αλλά ταυτόχρονα έχει μία μικρή κλίση έτσι ώστε τα σωματίδια που προσπίπτουν επάνω του να ανακλώνται προς το κλωβό faraday. Ο ίδιος ο κλωβός αποτρέπει τη διαφυγή των ανακλώμενων ιόντων και δευτερογενών ηλεκτροδίων. Η μάζα, η ενέργεια, το φορτίο των ιόντων, η γωνία πρόσπτωσης τους στο ηλεκτρόδιο, το υλικό του κυπέλλου και η φύση των ιόντων (μονοατομικά ή πολυατομικά) καθορίζει τον αριθμό των δευτερογενών ηλεκτρονίων. Επειδή οι δέσμες ιόντων που έρχονται από τον αναλυτή μπορεί να έχουν πολύ μικρά ρεύματα της τάξης των fA - nA (femto = 10^{-15} , 1 fA = 6242 ιόντα/δευτερόλεπτο), απαιτείται μεγάλη ενίσχυση ($10^9 - 10^{13}$) όταν το ρεύμα μετατρέπεται σε τάση για να επεξεργαστούμε το σήμα και να εξάγουμε το φάσμα μαζών. Αυτή η ενίσχυση επιτυγχάνεται με υψηλή αντίσταση εισόδου και μεγάλη αντίσταση ανάδρασης. Έτσι έχουμε υψηλό κέρδος, αλλά και αυξημένο θόρυβο ενώ ταυτόχρονα αργή αλλά σταθερή απόκριση. Παρ' όλο το μεγάλο κέρδος που επιτυγχάνουμε από την ηλεκτρονική ενίσχυση, το κύπελλο faraday παραμένει λιγότερο ευαίσθητο σε σχέση με του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές διότι δεν υπάρχει η ενδογενής αντίσταση από τις δυνόδους [5,42,45,47].



Εικόνα 14 – Σχηματικό διάγραμμα ανιχνευτή φαρανταϊκού κυπέλλου

Ανιχνευτής Daly

Ο ανιχνευτής Daly είναι ο πιο κοινός ηλεκτροοπτικός ανιχνευτής ιόντων (Electrooptical ion detector – EOID). Συνδυάζει συσκευές ανίχνευσης ιόντων και φωτονίων. Αποτελείται από δύο δυνόδους, μία φθορίζουσα οθόνη και ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Αυτή η συσκευή έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης θετικών και αρνητικών ιόντων. Τα ιόντα με θετικό φορτίο επιταχύνονται προς τη δύνοδο με αρνητικό φορτίο, ενώ τα αρνητικά ιόντα, επιταχύνονται προς τη δύνοδο με θετικό φορτίο. Έπειτα τα δευτερογενή ιόντα επιταχύνονται προς τη φθορίζουσα οθόνη με αποτέλεσμα όταν προσκρούουν επάνω της να έχουμε την εκπομπή φωτονίων. Η φθορίζουσα οθόνη έχει μία επένδυση από ένα λεπτό στρώμα αλουμινίου έτσι ώστε να αποτρέπεται ο σχηματισμός φορτίου ο οποίος και θα εμπόδιζε άλλα ηλεκτρόνια να πέσουν επάνω στο φθορίζον υλικό. Πίσω ακριβώς από τη φθορίζουσα οθόνη βρίσκεται ο φωτοπολλαπλασιαστής. Αυτός με τη σειρά του ανιχνεύει τα φωτόνια και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό ρεύμα [5].

Ο ανιχνευτής Daly αν και ακολουθεί μία σχετικά περίπλοκη διαδικασία, με τη μετατροπή των ιόντων σε ηλεκτρόνια, τα ηλεκτρόνια σε φωτόνια και τα φωτόνια σε ηλεκτρόνια, έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά η διάρκεια ζωής του είναι μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστών επειδή ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι σφραγισμένος σε γυαλί και διατηρείται υπό κενό. Αυτό αποτρέπει τη μόλυνση και επιτρέπει στον ανιχνευτή να διατηρήσει την απόδοσή του για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ταυτόχρονα λόγω της φθορίζουσας οθόνης η οποία λειτουργεί ως «παράθυρο κενού» ο φωτοπολλαπλασιαστής μπορεί να βρίσκεται εκτός του θαλάμου κενού του φασματογράφου μάζας. Τέλος, έχει γρήγορο χρόνο απόκρισης και παρόμοια ευαισθησία στους πολλαπλασιαστές ηλεκτρονίων με ενίσχυση που κυμαίνεται από 10^4 έως 10^5 [5],[45].

Σύστημα κενού

Ένα φασματόμετρο μαζών απαιτεί για την εξαγωγή σωστών αποτελεσμάτων να δουλεύει υπό συνθήκες υψηλού κενού. Όλα τα τμήματα του φασματόμετρου μάζας εκτός από αυτά που πραγματοποιούν την επεξεργασία των δεδομένων και απεικόνιση των αποτελεσμάτων, πρέπει να βρίσκονται σε συνθήκες πολύ χαμηλής πίεσης της τάξης των $10^{-4} - 10^{-8}$ Torr [2]. Αυτό συμβαίνει διότι σε οποιαδήποτε άλλη πίεση, τα μόρια του αερίου κινούνται σε τυχαίες κατευθύνσεις, με αποτέλεσμα να συγκρούονται μεταξύ τους και με πολλά άλλα αέρια όπως το φέρον αέριο (He) και το εναπομένον αέριο (αέρας, νερό). Έτσι θα είχαμε αλλοίωση των αποτελεσμάτων. Η μέση απόσταση μιας ελεύθερης πτήσης ιόντων χωρίς σύγκρουση ονομάζεται «μέση ελεύθερη διαδρομή» και σύμφωνα με την κινητική θεωρία των αερίων δίνεται από την εξίσωση 26:

Σχέση 26

$$L = \frac{kT}{\sqrt{2}p\sigma}$$

Όπου L =η μέση ελεύθερη διαδρομή (σε m), k =σταθερά Boltzmann, T =θερμοκρασία (σε Kelvin), p =πίεση (σε Pascal) και σ = διατομή της σύγκρουσης (σε m^2) [34]

Σχέση 27

$$\sigma = \pi d^2$$

Όπου d = η απόσταση των κέντρων των μορίων στο σημείο της πλησιέστερης επαφής (σε m)

Όταν η μέση ελεύθερη διαδρομή των μορίων αερίου υπερβαίνει τις διαστάσεις του σωλήνα κενού, το σύστημα βρίσκεται υπό συνθήκες μοριακής ροής. Υπό τέτοιες συνθήκες, τα εναπομένοντα μόρια αερίου κινούνται χωρίς σύγκρουση με άλλα μόρια αερίου και φτάνουν εύκολα στον ανιχνευτή [48,49].

Για να δημιουργηθεί το κενό χρησιμοποιούνται αντλίες κενού. Οι συνηθέστεροι τύποι είναι οι εξής [50,51]:

- Αντλίες διάχυσης (Vapor Jet/ Diffusion Pumps)
- Στροβιλομοριακές αντλίες (Turbomolecular Pumps)
- Κρυοαντλίες (Cryopumps)
- Διαφορικές αντλίες (Differential Pumps)

Ιοντισμός εκρόφησης με laser με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI)

Πριν από αρκετές δεκαετίες η φασματομετρία μάζας αποτελούσε την ιδανική μέθοδο για τον προσδιορισμό της μάζας μικρών μορίων. Όταν επρόκειτο όμως για την ανάλυση μεγάλων μορίων η φασματομετρία μάζας ήταν αδύνατο να εφαρμοστεί με την τεχνολογία εκείνης της εποχής. Το 1948 η Ame Tiselius πήρε το βραβείο Νόμπελ για την ανακάλυψη της ηλεκτροφόρησης που έδινε τη δυνατότητα να αναλυθούν μεγάλα μόρια, όπως πρωτεΐνες. Έτσι η ηλεκτροφόρηση γέλης και άλλες τεχνικές που βασίζονταν σε αυτή αποτέλεσε βασικό εργαλείο στη μοριακή βιολογία καθώς μπορούσε να γίνει διαχωρισμός χιλιάδων πρωτεϊνών από βιολογικά δείγματα και ταυτοποίηση των μορίων με ακρίβεια περίπου 1kDa. Ωστόσο η συγκεκριμένη μέθοδος δεν έδινε τη δυνατότητα να καθοριστεί το πραγματικό μοριακό βάρος και να ταυτοποιηθούν επακριβώς πολλές ουσίες.

Η αδυναμία της φασματομετρίας μάζας ήταν ότι τα μεγάλα μόρια παρουσίαζαν μικρή πτητικότητα και δεν μπορούσαν να πάνε στην αέρια φάση χωρίς να κατακερματιστούν. Προσδίδοντας σε ένα μεγάλο μόριο την απαραίτητη ενέργεια που χρειάζεται για να εξατμιστεί, ξεκινάει μία σειρά από άλλες διαδικασίες με αποτέλεσμα το μόριο να κατακερματίζεται. Έτσι, λοιπόν, έχουμε δύο διαδικασίες που ανταγωνίζονται μεταξύ τους. Αυτή της εξάτμισης (ή εκρόφησης) και αυτή του κατακερματισμού. Ως λύση προτάθηκε η μέθοδος της ταχείας θέρμανσης του δείγματος με σκοπό να ελαχιστοποιηθεί ο κατακερματισμός. Στην αρχή χρησιμοποιήθηκαν λέιζερ των οποίων η δέσμη είχε μήκος παλμού μικρότερο του ενός μs (10^{-6} δευτερόλεπτα), αλλά ο λόγος m/z των βιομορίων που μπορούσαν να αναλυθούν ήταν μικρότερος του 1500 ($m/z < 1500$). Τελικά το 1988 κατάφεραν να ιονίσουν μεγάλα πεπτίδια και πρωτεΐνες με τη βοήθεια παλμικής ακτινοβολίας λέιζερ. Αυτές οι τεχνικές που χρησιμοποιούν παλμική ακτινοβολία λέιζερ για να ιονίσουν το δείγμα είναι τεχνικές μαλακού ιονισμού και ονομάζονται SLDI (Soft Laser Desorption Ionization). Η πιο διαδεδομένη από αυτές είναι ο ιοντισμός με λέιζερ με τη βοήθεια υλικού μήτρας – MALDI (Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization) η οποία συνδυάζεται ιδανικά με αναλυτές μάζας TOF (time of flight) [52].

Στάδια της MALDI

Ο ιοντισμός με MALDI πραγματοποιείται – χωρίζεται σε δύο στάδια.

- Στο πρώτο στάδιο το δείγμα μας αναμιγνύεται με διαλύτη μικρού μοριακού βάρους που ονομάζεται μήτρα. Η μήτρα είναι απαραίτητη για τον αποτελεσματικό ιονισμό του δείγματος γιατί έτσι επιτυγχάνεται η μεταφορά των συστατικών του δείγματος στην αέρια φάση και τον ιοντισμό τους, μεταφέροντας πρωτόνια από τη μήτρα προς το δείγμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μη κατακερματίζεται το δείγμα. Αυτά τα μικρά οργανικά

μόρια που περιέχονται στο διαλύτη πρέπει να έχουν ισχυρή απορρόφηση στο μήκος κύματος εκπομπής του λέιζερ. Έπειτα το μείγμα αυτό τοποθετείται σε μία μεταλλική πλάκα (ενδεικτικά δείτε εικόνα 15) προκειμένου να αναλυθεί. Πριν την ανάλυση το μείγμα στεγνώνει – ξηραίνεται με αποτέλεσμα την απομάκρυνση οποιουδήποτε υγρού διαλύτη χρησιμοποιήθηκε για να κατασκευάσουμε το μείγμα. Το αποτέλεσμα αυτής της ξήρανσης είναι το δείγμα μας και ο διαλύτης να συν-κρυσταλλώνονται. Έτσι το μόρια του δείγματός μας έχουν ενσωματωθεί σε όλη τη μήτρα και είναι απομονωμένα το ένα από το άλλο [5].

- Το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται υπό συνθήκες απόλυτου κενού εντός της πηγής του φασματομέτρου μάζας. Εδώ το δείγμα δέχεται ισχυρούς παλμούς λέιζερ σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Συνήθως χρησιμοποιείται δέσμη λέιζερ N₂ με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας να είναι στα 337nm. Εφαρμόζοντας τη δέσμη λέιζερ για πολύ σύντομο χρονικό διάστημα αποφεύγεται η καταστροφή του δείγματος διότι δεν υπερθερμαίνεται. Ταυτόχρονα η δέσμη αυτή εστιάζεται σε μία πολύ μικρή περιοχή του δείγματος, της τάξης των 0,05 – 0,2 mm. Ο ακριβής μηχανισμός που λαμβάνει χώρα στη MALDI δεν είναι απόλυτα σαφής. Παρ' όλα αυτά ακτινοβολώντας το δείγμα, θερμαίνονται πολύ γρήγορα οι κρύσταλλοι που είχαν σχηματιστεί το πρώτο στάδιο, προκαλείται εξάχνωση των κρυστάλλων της μήτρας δηλαδή μεταφέρονται στην αέρια φάση, παρασύροντας ταυτόχρονα τα μόρια του δείγματος τα οποία παραμένουν άθικτα. Έτσι δημιουργείται ένα νέφος και ακολουθεί ο ιονισμός του δείγματος [5,53].



Εικόνα 15 – Μεταλλική πλάκα δείγματος πηγής MALDI

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Matrix-assisted_laser_desorption/ionization

Πλεονεκτήματα MALDI

Στο MALDI η μήτρα απορροφά την ενέργεια το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που αποδίδεται στο μείγμα μήτρας – αναλυτή. Αυτό έχει ως πλεονέκτημα [5]:

1. Την μεγάλη ευαισθησία: Το MALDI να είναι μία διαδικασία με αρκετά μεγάλη ευαισθησία αφού απορροφώντας η μήτρα το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας μεταφέρεται αποτελεσματικότερα η ενέργεια του λέιζερ στον αναλυτή, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία.
2. Δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούμε λέιζερ με μήκος κύματος ακτινοβολίας ίδιο με αυτό που μπορεί να απορροφήσει το δείγμα μας. Αρκεί να μπορεί να το απορροφήσει η μήτρα.
3. Το MALDI μας δίνει τη δυνατότητα να αναλύσουμε δείγματα με πολύ μεγάλα μοριακά βάρη καθώς είναι ανεξάρτητο από τις ιδιότητες απορρόφησης και το μέγεθος του δείγματός μας. Μπορούν να αναλυθούν δείγματα με μοριακή μάζα μεγαλύτερη των 10^5 Da.

Laser που χρησιμοποιούνται στη MALDI

Στη MALDI χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι λέιζερ με διαφορετικό μήκος κύματος το καθένα. Ωστόσο τα πιο ευρέως διαδεδομένα και αυτά που χρησιμοποιούνται περισσότερο απ' όλα λόγω της προσιτής τιμής τους και της ευκολίας που έχουνε στη χρήση είναι τα λέιζερ υπεριώδους ακτινοβολίας UV. Πιο συγκεκριμένα τα λέιζερ N₂ (αζώτου), με μήκος κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα 337nm είναι τα συνηθέστερα. Δεύτερα έρχονται τα λέιζερ Nd:YAG (neodymium-doped yttrium aluminum garnet) με μήκος κύματος στα 266nm ή στα 355nm.

Εκτός από τα λέιζερ υπεριώδους ακτινοβολίας που είναι και τα συνηθέστερα, στη MALDI μπορούνε να χρησιμοποιηθούνε και λέιζερ υπέρυθρης ακτινοβολίας IR, όπως τα λέιζερ Er: YAG με μήκος κύματος $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$) και τα λέιζερ CO₂ με μήκος κύματος $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται όλα τα ήδη λέιζερ με τα αντίστοιχα μήκη κύματος που χρησιμοποιούνται.

Πίνακας 3 – Τύποι laser που χρησιμοποιούνται στη MALDI

Laser	Μήκος Κύματος	Ενέργεια Δέσμης (eV)	Πλάτος Παλμού
Nitrogen	337 nm	3.68	<1 ns μέχρι μερικά ns
Nd:YAG μ 3	355 nm	3.49	5 ns
Nd:YAG μ 4	266 nm	4.66	5 ns
Er:YAG	2.94 μm	0.42	85 ns
CO ₂	10.6 μm	0.12	100 ns

Η συνολική ενέργεια κάθε παλμού ακτινοβολίας του λέιζερ για το συγκεκριμένο μήκος κύματος που εκπέμπει παίζει καθοριστικό ρόλο για την επιτυχή ανάλυση του δείγματος. Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα το πλάτος παλμού της δέσμης του λέιζερ κυμαίνεται από δεκάδες ns έως και εκατοντάδες μs. Επίσης η διάμετρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας του λέιζερ είναι περίπου 5 – 200μm. Τέλος, για την αποτελεσματική ανάλυση του δείγματός μας, πρέπει να γνωρίζουμε την ισχύ της δέσμης του λέιζερ, με την οποία θα ξεκινήσει η εκρόφηση της μήτρας. Η εξάχνωση των κρυστάλλων της μήτρας παρατηρείται σε ελαφρώς αυξημένες ενέργειες αλλά ταυτόχρονα όσο μεγαλύτερη είναι η ισχύ του λέιζερ τόσο περισσότερο κατακερματισμός των μορίων [5].

Είδη μήτρας

Η μήτρα διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιτυχή ανάλυση του δείγματός μας. Η πρώτη αιτία για την οποία χρησιμοποιείται η μήτρα είναι διότι απορροφά την ενέργεια της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας από το λέιζερ και ύστερα ιονίζει τα μόρια του δείγματός μας. Ο μηχανισμός ιονισμού του αναλυτή μας δεν είναι απόλυτα γνωστός, ωστόσο μία από τις επικρατέστερες θεωρίες είναι ότι μεταφέρεται ένα πρωτόνιο από τη μήτρα στα μόρια του δείγματός μας με αποτέλεσμα αυτά να ιονίζονται. Ο δεύτερος λόγος ύπαρξης της μήτρας είναι διότι η μήτρα απορροφά μεγάλο μέρος της ακτινοβολίας από το λέιζερ με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά ο κατακερματισμός των μορίων του αναλυτή και έτσι μας δίνεται η δυνατότητα να εξετάσουμε και μεγαλύτερου μοριακού βάρους μόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες [2,5].

Η μήτρα, λοιπόν, πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά [2,53]:

- Να μπορεί να απορροφάει μεγάλο μέρος της ακτινοβολίας λέιζερ στο μήκος κύματος που βρίσκεται αυτή η ακτινοβολία
- Να μπορεί να αναμιγνύεται καλά με τον αναλυτή προκειμένου κατά το στέγνωμα να σχηματίζονται μεγάλοι κρύσταλλοι
- Να έχει χαμηλή θερμοκρασία εξάχνωσης
- Κατά τη ακτινοβόλησή του να προσδίδει στα μόρια του αναλυτή πρωτόνια έτσι ώστε αυτά να ιονιστούν
- Κατά την ανάμειξή του με το δείγμα να μην έχει οποιαδήποτε χημική αντίδραση έτσι ώστε να παραμένει το δείγμα μας ακέραιο και αναλλοίωτο

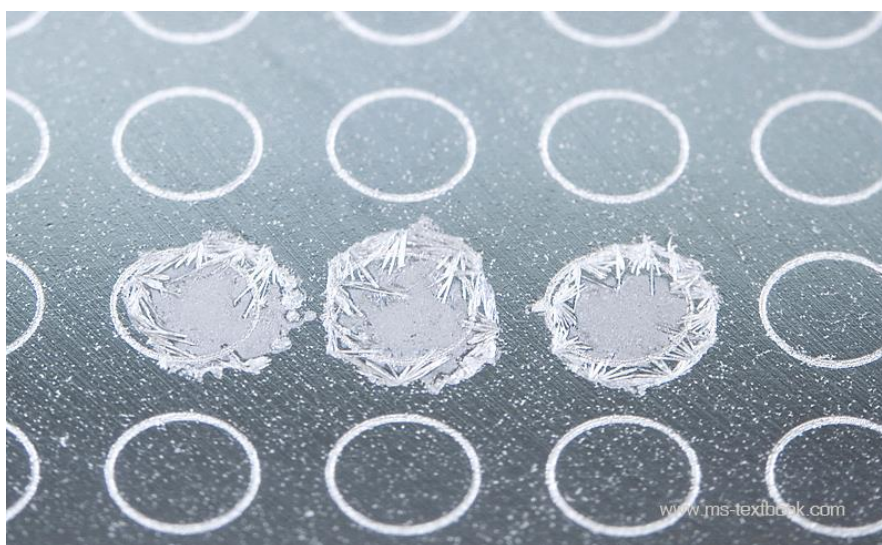
Οι μήτρες είναι συνήθως ασθενή οργανικά οξέα. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται όλα τα είδη μήτρας που χρησιμοποιούνται.

Πίνακας 4 – τα διάφορα είδη μήτρας που υπάρχουν και χαρακτηριστικά τους - Πηγή: [4]

Υλικό Μήτρας	Αναλυτές	Μήκος κύματος (nm)
Νιτροπυριδίνες		
2-Αμινο-4μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη	Πρωτεΐνες, ολιγονουκλεοτίδια	355
2-Αμινο-5- νιτροπυριδίνη	Ολιγονουκλεοτίδια	355
Νικοτινικό οξύ	Πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, ολιγονουκλεοτίδια	266, 220 – 290
Παράγωγα βενζοϊκού οξέως		
2,5-Διωδροξυβενζοϊκό οξύ	Πρωτεΐνες	266, 337, 355, 2940
Βανιλλικό οξύ	Πρωτεΐνες	266
2-Αμινο-βενζοϊκό οξύ	Πρωτεΐνες	266, 337, 355
2-(4-Υδροξυφαινυλαζω)βενζοϊκό οξύ	Πρωτεΐνες, γαγγλιοζίτες, πολυμερή	266, 337
2-Πυραζινοκαρβοξυλικό οξύ	Πρωτεΐνες	266
3-Αμινοπυραζινο-2-καρβοξυλικό οξύ	Πρωτεΐνες	337
Παράγωγα κινναμωμικού οξέως		
Φερουλικό οξύ	Πρωτεΐνες, ολιγονουκλεοτίδια	266, 337, 355, 488
Συναπινικό οξύ	Πρωτεΐνες, βιομηχανικά πολυμερή	337, 355
Καφεϊκό οξύ	Πρωτεΐνες, ολιγονουκλεοτίδια	266, 337, 355, 10600
α-Κυανο-4-υδροξυ κινναμωμικό οξύ	Πρωτεΐνες, ολιγοσακχαρίτες	337
3-Νιτροβενζυλική αλκοόλη	Πρωτεΐνες	266
3-Νιτροβενζυλική αλκοόλη με ροδαμίνη 6G	Πρωτεΐνες	532
3-Νιτροβενζυλική αλκοόλη με 1,4- διφαινυλο-1,3-βουταδιένιο	Πρωτεΐνες	337
3-Υδροξυπικολινικό οξύ	Ολιγονουκλεοτίδια, γλυκοπρωτεΐνες	266, 308, 355
Ηλεκτρικό οξύ	Πρωτεΐνες	2940, 10600

Παρασκευή του δείγματος

Στη MALDI το δείγμα μας προκειμένου να αναλυθεί αναμιγνύεται με τη μήτρα. Το μείγμα αυτό στεγνώνει και έχουμε τη δημιουργία κρυστάλλων (ενδεικτικά δείτε εικόνα 16). Ωστόσο υπάρχει η πιθανότητα αυτή η συν-κρυστάλλωση να μη πραγματοποιηθεί επιτυχώς. Μπορεί τα μόρια της μήτρας με τα μόρια του δείγματός μας να μη αναμιχθούν ομοιόμορφα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να πρέπει να αναζητήσουμε ένα σημείο επάνω στους κρυστάλλους που να παίρνουμε πολύ πληροφορία για το δείγμα μας.



Εικόνα 16 - Παρασκευή δείγματος: απεικονίζεται μήτρα 2,5 – DHB που προέκυψε σε στόχο MALDI από φασματογράφο μάζας Bruker Scout 384™.

Πηγή: <http://www.ms-textbook.com/2nd/home/instructors.html>

Υπάρχουν 7 διαφορετικές τεχνικές για την παρασκευή του δείγματος. Το κοινό τους χαρακτηριστικό είναι ότι όλες δημιουργούν λεπτόκοκκους ομοιογενείς κρυστάλλους [2].

1. Τεχνική αποξηραμένων σταγονιδίων (Dried-droplet technique): αποτελεί το πιο δημοφιλή πρακτική για τη παρασκευή των δειγμάτων. Αναμιγνύουμε μία πολύ μικρή ποσότητα διαλύματος του δείγματος, της τάξης των μL (10^{-6} λίτρα) με μία εξίσου μικρή ποσότητα κορεσμένου διαλύματος μήτρας. Η αναλογία είναι 1/1000 έως 1/10.000. Ύστερα τοποθετούμε μία σταγόνα του μείγματος που παρασκευάσαμε στη MALDI και την αφήνουμε να αποξηραθεί σε θερμοκρασία δωματίου ή σε ένα ελαφρώς κρύο αέρα. Τέλος αν αφήσουμε τη σταγόνα να ξηραθεί σε ψυγείο ή υπό συνθήκες κενού, επιτυγχάνουμε καλύτερη ομοιογένεια.

2. Τεχνική γρήγορης εξάτμισης ή τεχνική δύο στρωμάτων (Fast-evaporation technique or two-layered technique): σε αυτή τη τεχνική τοποθετούμε μία μικρή σταγόνα του διαλύματος της μήτρας σε ένα πτητικό διαλύτη. Αυτός μπορεί να είναι για παράδειγμα η ακετόνη. Ο διαλύτης εξατμίζεται πολύ γρήγορα δημιουργώντας μία πολύ λεπτή στρώση (φιλμ) ομοιογενών μικρών κρυστάλλων μήτρας. Στη συνέχεια τοποθετούμε επάνω σε αυτή τη λεπτή στρώση κρυστάλλων το διάλυμα του δείγματός μας, το οποίο το έχουμε παρασκευάσει σε νερό. Τέλος αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα του περιβάλλοντος.
3. Τεχνική μήτρα σάντουιτς (Sandwich matrix technique): εδώ έχουμε πρώτα τη δημιουργία ενός λεπτού στρώματος του διαλύματος της μήτρας και ύστερα προσθέτουμε και αποξηραίνουμε μικρούς όγκους 0,1% υδατικό TFA, το διάλυμα του αναλυτή μας καθώς επίσης και ένα επιπλέον διάλυμα μήτρας [54].
4. Τεχνική περιστροφής στεγνώματος (Spin-dry technique): εδώ αναμιγνύοντας τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (NC) και τη μήτρα κατασκευάζουμε ένα διάλυμα. Για τη κατασκευή αυτού του διαλύματος χρησιμοποιούμε ίση ποσότητα και από τα δύο συστατικά. Έπειτα το διάλυμα αυτό τοποθετείται επάνω σε ένα περιστρεφόμενο στόχο όπου και αποξηραίνεται. Εξαιτίας της περιστροφής δημιουργείται μία ομοιογενής επιφάνεια μήτρας και NC. Τέλος επάνω σε αυτή την ομοιογενή επιφάνεια προσθέτουμε μία μικρή σταγόνα του διαλύματος του αναλυτή μας.
5. Τεχνική στρώματος σπόρων (Seed-layer technique): στη τεχνική τοποθετούμε μία μικρή σταγόνα, όγκου περίπου 0,5μL, του διαλύματος της μήτρας σε ένα δείγμα στόχο. Έπειτα το αφήνουμε να ξηραθεί. Έτσι έχουμε τη δημιουργία ενός στρώματος σπόρου μήτρας. Στη συνέχεια παίρνουμε ένα μικρό όγκο από μείγμα αναλυτή – μήτρας και το τοποθετούμε επάνω στο στρώμα σπόρου. Τέλος το αφήνουμε να ξηραθεί στον αέρα του περιβάλλοντος.
6. Απόθεση ηλεκτροψεκασμού (Electrospray deposition): στη τεχνική αυτή δε κατασκευάζουμε το διάλυμα μήτρας – αναλυτή στη μεταλλική πλάκα δείγματος της MALDI. Αντιθέτως το διάλυμα αυτό το ψεκάζουμε επάνω στη μεταλλική πλάκα μέσω ενός τριχοειδούς το οποίο βρίσκεται σε υψηλό δυναμικό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολύ ομοιογενούς παρασκευάσματος.
7. Παρασκευή δείγματος χωρίς διαλύτες (Solvent-free sample preparation): πρόκειται για μία καινούργια τεχνική στην οποία αλέθουμε τη μήτρα, το δείγμα μας και αλάτι μαζί. Το άλεσμα μπορεί να γίνει με το κλασικό γουδί και γουδοχέρι. Το ξηρό αυτό μείγμα τοποθετείται στο στόχο της MALDI με ταινία

διπλής όψεως προκειμένου να αναλυθεί. Πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί και σε αδιάλυτους αναλυτές.

Διαδικασία ιονισμού του δείγματος

Η MALDI αποτελεί μία αρκετά πολύπλοκη διαδικασία. Για το λόγο αυτό δεν υπάρχει ένας μόνο μηχανισμός ο οποίος να εξηγεί τη διαδικασία ιονισμού των μορίων κάθε αναλυτή και δεν είναι απόλυτα αποσαφηνισμένο πως ιονίζονται τα μόρια στη MALDI. Για αρκετά χρόνια η επιστημονική κοινότητα προσπαθεί να κατανοήσει τους μηχανισμούς ιονισμού στη MALDI, παραμετροποιώντας διαφόρους παραμέτρους [55].

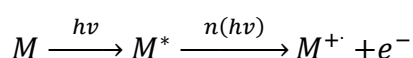
Τέτοιες παράμετροι είναι:

- ενσωμάτωση αναλυτών σε μήτρες
- ρύθμιση της αναλογίας μήτρας – δείγματος
- δοκιμασία διαφόρων τύπου συστατικά διαλύτη
- ρύθμιση των συνθηκών κάτω από τις οποίες διεγείρονται οι κρύσταλλοι από το λέιζερ
- δημιουργία διαφορετικών κρυστάλλων

Η επικρατέστερη θεωρία για το μηχανισμό ιονισμού στη MALDI είναι η εξής [53]:

Η διαδικασία χωρίζεται σε δύο βήματα. Σε πρωτογενή και δευτερογενή ιονισμό. Αρχικά η δέσμη του λέιζερ προσπίπτει επάνω στους κρυστάλλους δείγματος – μήτρας και αφαιρούνται ηλεκτρόνια από τα μόρια της μήτρας δημιουργώντας έτσι ρίζες κατιόντων της μήτρας όπως φαίνεται και στην παρακάτω εξίσωση.

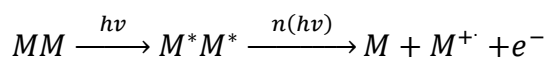
Σχέση 28



Για να ικανοποιηθεί η σχέση 28 πρέπει να απορροφηθούν από τα μόρια της μήτρας δύο φωτόνια. Εδώ όμως συναντάμε ένα πρόβλημα. Οι ενέργειες των λέιζερ δεν φτάνουν να ιονίσουν τη μήτρα καθώς το δυναμικό ιονισμού της είναι 9 – 10eV, ενώ τα λέιζερ έχουν 7,36eV και 6,98eV για λέιζερ N₂ και Nd:YAG αντίστοιχα.

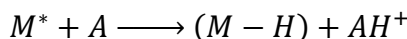
Έτσι δημιουργήθηκε η θεωρία «Energy Pooling Theory» που υποστηρίζει το σχηματισμό ριζών της μήτρας σε δύο στάδια. Εδώ δύο ή περισσότερα μόρια της μήτρας τα οποία έχουν διεγερθεί παράγουν μία θετική ρίζα. Αναλυτικότερα, ένα φωτόνιο που απορροφάται από ένα μόριο της μήτρας που έχει διεγερθεί (M^*), μεταφέρεται σε ένα άλλο διεγερμένο μόριο της μήτρας. Αυτό έχει ως συνέπεια να σχηματίζεται μία θετική ρίζα σε μόριο της μήτρας ($M^{+\cdot}$), ένα μόριο της μήτρας χωρίς ρίζα (M), όπως επίσης και να έχουμε ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο (e^-). Δηλαδή:

Σχέση 29



Στη συνέχεια μεταφέρεται ένα πρωτόνιο από ένα μόριο της μήτρας που έχει διεγερθεί σε ένα μόριο του δείγματός μας (A), με αποτέλεσμα να έχουμε ένα ιονισμένο μόριο από το δείγμα μας.

Σχέση 30

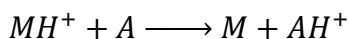


Έπειτα εξαιτίας των δευτερογενών αντιδράσεων μεταξύ των μορίων της μήτρας και μεταξύ των μορίων της μήτρας και του δείγματος, έχουμε τη δημιουργία νέων ιόντων του δείγματος. Αυτές οι αντιδράσεις ευνοούνται θερμοδυναμικά διότι η συγγένεια των πρωτονίων για τις μήτρες MALDI είναι χαμηλότερη από αυτή του δείγματός μας (πχ πρωτεΐνες). Αναπαριστώντας τι παραπάνω αντιδράσεις έχουμε τι εξισώσεις:

Σχέση 31



Σχέση 28



Είδη κατακερματισμών

Στη MALDI κατά τη διαδικασία της εκρόφησης, μπορεί να έχουμε ορισμένους ανεπιθύμητους κατακερματισμούς ιόντων, εξαιτίας πλεονάζουσας ενέργειας που προσδίδεται στον αναλυτή.

Γενικά υπάρχουν 3 είδη κατακερματισμών που διαφέρουν ως προς το μέρος στο οποίο πραγματοποιούνται [5].

1. Κατακερματισμοί αποσύνθεσης στη πηγή (ISD – in-source decay fragmentations) ή άμεσος κατακερματισμός: είναι ο κατακερματισμός που πραγματοποιείται στην επιφάνεια του δείγματος. Χρονικά συμβαίνει πριν ή και κατά τη διάρκεια της εκρόφησης και διαρκεί μερικά ps (10^{-12} δευτερόλεπτα) έως ns. Ο συγκεκριμένος τύπος κατακερματισμού είναι πάντα ορατός στην απεικόνιση του φάσματος.

2. Γρήγορος κατακερματισμός: είναι ο κατακερματισμός που πραγματοποιείται μετά την εκρόφηση και πριν τα ιόντα επιταχυνθούν. Αυτή η κατηγορία διαρκεί μερικά ns έως μs.
3. Κατακερματισμός μετά-πηγής – PSD (post-source decay fragmentations): είναι ο κατακερματισμός που λαμβάνει χώρα μετά την περιοχική επιτάχυνση των ιόντων. Αυτά τα ιόντα καταφέρνουν να φύγουν από τη πηγή αλλά έχουν αρκετό πλεόνασμα ενέργειας με αποτέλεσμα να κατακερματίζονται πριν φτάσουν στον ανιχνευτή. Ο συγκεκριμένος τύπος κατακερματισμού προκειμένου να απεικονιστεί στο φάσμα χρειάζονται ορισμένες οργανικές συνθήκες.

Ο λόγος που τα ιόντα κατακερματίζονται εξηγείται μέσω δύο μηχανισμών απόκτησης της πλεονάζουσας ενέργειας που τελικά οδηγεί και στη καταστροφή τους. Κατά τον πρώτο μηχανισμό η απόκτηση της επιπλέον ενέργειάς του ιόντος οφείλεται στην αλληλεπίδραση φωτονίου και μορίου, στην ενέργεια του λέιζερ που χρησιμοποιείται και στο γεγονός ότι ενεργοποιούνται μόρια που βρίσκονταν σε στερεή κατάσταση. Στο δεύτερο μηχανισμό τα ιόντα υφίστανται στη πηγή επαναλαμβανόμενες συγκρούσεις. Όταν η δέσμη του λέιζερ προσκρούει επάνω στους κρυστάλλους μήτρας – δείγματος δημιουργείται ένα νέφος από ουδέτερα μόρια. Για να φύγουν τα ιόντα από τη πηγή εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο. Επιταχύνοντας όμως τα ιόντα μακριά από την πηγή προκαλούνται πολλές συγκρούσεις μεταξύ τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αυξάνεται ενέργεια των ιόντων. Ρυθμίζοντας το ηλεκτρικό πεδίο, καταφέρνουμε να ρυθμίσουμε και τη πληθώρα των συγκρούσεων που γίνονται μεταξύ των ιόντων. Όσο μεγαλύτερο ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζουμε τόσο η ενέργεια σύγκρουσης μεταξύ ιόντων και ουδέτερων μορίων αυξάνεται, συμπαρασύροντας έτσι προς τα πάνω την εσωτερική ενέργεια των ιόντων. Αντιθέτως με ασθενέστερο ηλεκτρικό πεδίο, επιτυγχάνουμε το σκοπό μας δηλαδή τη μικρότερη εσωτερική ενέργεια των ιόντων [5].

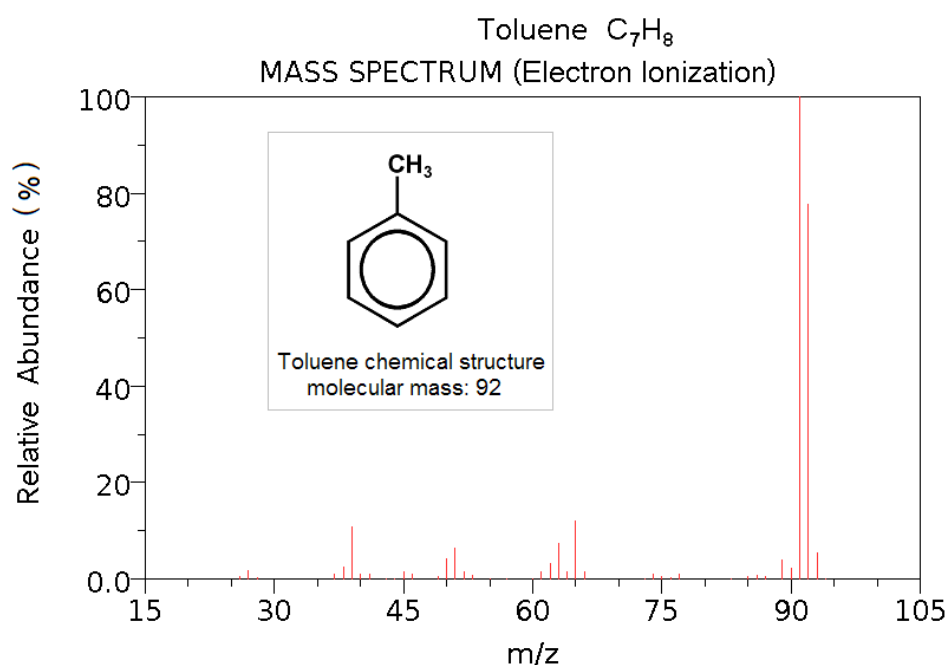
MALDI σε ατμοσφαιρική πίεση (AP-MALDI)

Ο ιονισμός με MALDI σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure MALDI) είναι μία σχετικά νέα τεχνική καθώς υλοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2000. Πρακτικά ο κλασικός ιονισμός MALDI – TOF με την AP-MALDI δεν διαφέρουν. Η προετοιμασία του δείγματος (αναλογία μήτρας – αναλυτή), τα υλικά της μήτρας που χρησιμοποιούνται, η δέσμη λέιζερ που προσπίπτει επάνω στη μεταλλική πλάκα παραμένουν ίδια με το συμβατικό τρόπο MALDI. Η μόνη διαφορά ανάμεσα σε αυτές τις δύο τεχνικές, εντοπίζεται στις συνθήκες κάτω από τις οποίες ιονίζεται το δείγμα μας. Στη συμβατική πηγή MALDI ο ιονισμός πραγματοποιείται υπό συνθήκες κενού, ενώ στη AP-MALDI το δείγμα ιονίζεται υπό κανονικές συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, έξω από το κενό του φασματογράφου μάζας. Η μεταφορά των ιόντων στον αναλυτή μάζας πραγματοποιείται με τη βοήθεια μίας διάταξης ιονισμού σε ατμοσφαιρικής πίεσης, όπως για παράδειγμα ο ηλεκτροψεκασμός. Προκειμένου τα

ιόντα να μεταφερθούν από τη πηγή ιόντων που βρίσκεται υπό κανονικές συνθήκες πίεσης, σε συνθήκες υψηλού κενού, εφαρμόζουμε μία διαφορά δυναμικού της τάξης των 2 – 3kV στην επιφάνεια της μεταλλικής πλάκας όπου βρίσκεται το μείγμα μήτρας – αναλυτή. Ταυτόχρονα υπάρχει στην περιοχή της μεταλλικής πλάκας και ένα ρεύμα ξηρού αζώτου. Λόγω της διαφοράς των πιέσεων που υπάρχουν, η μεταφορά των ιόντων στον αναλυτή μάζας δεν είναι και ο βέλτιστη. Για το λόγο αυτό καταναλώνεται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος στην AP-MALDI απ’ ότι στη συμβατική MALDI. Ωστόσο αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα διότι η ποσότητα του δείγματος που καταναλώνεται ούτως ή άλλως είναι ελάχιστη σύγκριση με τη διαθέσιμη ποσότητα [5,56].

Φάσμα Μαζών

Τα ιόντα φεύγοντας από τον αναλυτή μάζας φτάνουν στον ανιχνευτή. Ανάλογα με το πλήθος των ιόντων με τον ίδιο λόγο m/z που θα ανιχνεύσει ο ανιχνευτής, θα παράξει και αντίστοιχο ρεύμα. Στη συνέχεια αυτό το ηλεκτρικό σήμα στη θα υποστεί επεξεργασία από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η σύνθεση του αρχικού δείγματος απεικονίζεται στο τελικό χρήστη με μία γραφική παράσταση ραβδογράμματος που ονομάζεται φάσμα μαζών (mass spectrum). Το φάσμα μαζών απεικονίζει όπως φαίνεται και στην εικόνα 17, τη «σχετική» ένταση ως προς το λόγο μάζας m/z όλων των ιόντων (του μοριακού ιόντος και των θραυσμάτων του).



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Εικόνα 17 – παράδειγμα φάσματος μάζας

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrum

Στο ραβδόγραμμα απεικονίζονται διάφορες κορυφές. Η κύρια κορυφή (base peak) είναι αυτή με τη μεγαλύτερη ένταση, δηλαδή το μεγαλύτερο ρεύμα άρα και το μεγαλύτερο πλήθος ιόντων, και παίρνει τη τιμή 100. Όλες οι υπόλοιπες κορυφές απεικονίζονται σε σχέση με τη κύρια κορυφή, γι' αυτό και ο όρος «σχετική» ένταση στο κάθετο άξονα. Επίσης σε ένα φάσμα μάζας υπάρχει και η μοριακή ή μητρική κορυφή (molecular or parent peak) ή οποία και απεικονίζει τη σχετική μοριακή μάζας της ένωσης που θέλουμε να αναλύσουμε.

Εκτός από τις παραπάνω κορυφές στο φάσμα μάζας διακρίνουμε και άλλες κορυφές. Αυτές είναι:

- θυγατρικές κορυφές
- κορυφές ισοτόπων
- κορυφές υποστρώματος – υποβάθρου

Οι θυγατρικές κορυφές υπάρχουν εξαιτίας των θυγατρικών ιόντων που προήλθαν από θραύση των μοριακών ιόντων. Συνήθως οι θυγατρικές κορυφές είναι οι κύριες κορυφές. Ακόμα οι κορυφές ισοτόπων προέρχονται από τα ισότοπα ενός στοιχείου και αποτελούν πολύ σημαντικό δεδομένο διότι μας δίνουν πληροφορία για να προσδιορίσουμε τις μοριακές μάζες, να επεξεργαστούμε τα φάσματα αλλά και να ταυτοποιήσουμε άγνωστες ενώσεις. Τέλος οι κορυφές υποστρώματος – υποβάθρου προέρχονται από διαρροές αερίων, ή ακόμη και από ατμούς από λάδια προερχόμενοι από την αντλία κενού. Πιο συγκεκριμένα στη MALDI το νικοτινικό οξύ που χρησιμοποιείται συχνά ως υλικό μήτρας απεικονίζεται στο φάσμα μάζας. Οι συνηθέστερες κορυφές υποστρώματος έχουν λόγο m/z : 18, 28, 32, 40, 44.

Το φάσμα μάζας δίνει πολύ σημαντικές πληροφορίες για τη μοριακή μάζα του αναλυτή. Κοιτώντας τη μοριακή μάζα ενός μοριακού ιόντος συμπεραίνουμε και τη μοριακή μάζα του αναλυτή, αφού σε ένα μοριακό ιόν λείπει μόνο ένα ηλεκτρόνιο σε σχέση με το αρχικό μόριο.

Τέλος εκτός από το φάσμα μάζας υπάρχει η δυνατότητα τα αποτελέσματα να τα πάρουμε από τον υπολογιστή σε μορφή λίστας, όπου σε ένα πίνακα παρουσιάζονται το πλήθος των ιόντων και οι λόγοι m/z που αντιστοιχούν σε κάθε ομάδα ιόντων [2,15,57].

Τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μάζας

Υπάρχουν 3 βασικές τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μάζας οι οποίες εφαρμόζονται ανεξαρτήτως από το τρόπο ιονισμού ή την τεχνική διαχωρισμού των ιόντων. Πιο συγκεκριμένα αυτές είναι:

1. Τεχνική πλήρους σάρωσης (Full scan – FS)
2. Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM – Single ion monitoring)
3. Φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem mass spectroscopy – MS/MS)

Τεχνική πλήρους σάρωσης (FS)

Στη συγκεκριμένη τεχνική παίρνουμε πλήρη φάσματα του αναλυτή μεταξύ δύο ακραίων τιμών m/z για ορισμένο πάντα χρόνο. Για να αυξήσουμε την ευαισθησία υπάρχουν δύο τρόποι. Ο πρώτος τρόπος είναι να αυξήσουμε το χρόνο σάρωσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να λαμβάνουμε μεγαλύτερο αριθμό ιόντων στον ανιχνευτή και κατά συνέπεια αύξηση της ευαισθησίας. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να χαθούν ορισμένες πληροφορίες. Ο δεύτερος τρόπος είναι να μειώσουμε το εύρος σάρωσης, δηλαδή τις ακραίες τιμές m/z . Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι το φάσμα μπορεί να μην είναι το βέλτιστο. Τέλος η τεχνική πλήρους σάρωσης μας δίνει τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε μια άγνωστη ουσία προσδιορίζοντας το μοριακό της βάρος ή συγκρίνοντας το φάσμα της με πρότυπα φάσματα [3,6,10,34, 57,58].

Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM)

Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόζεται όταν έχουμε να αναλύσουμε ενώσεις με γνωστά φάσματα. Πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ότι έχει πολύ μεγάλη ευαισθησία. Αυτό επιτυγχάνεται με την επιλογή ορισμένων χαρακτηριστικών ιόντων της ουσίας που εξετάζουμε και ο αναλυτής μεταβαίνει τάχιστα από τη μία μάζα στην άλλη. Ωστόσο το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι εγκυμονεί ο κίνδυνος να πάρουμε ψευδός θετικά αποτελέσματα διότι κάθε άλλη ένωση που δίνει το συγκεκριμένο ιόν μπορεί να συμπεροδιοριστεί [3,6,10,34, 57,58].

Φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem – MS/MS)

Η φασματομετρία μαζών σε σειρά (ή συζευγμένη φασματομετρία μάζας ή διαδοχική φασματομετρία μάζας) είναι η τεχνική κατά την οποία περιλαμβάνονται 2 ή και περισσότερα επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης. Με τη συγκεκριμένη τεχνική μπορούμε να επιλέξουμε να περάσει μόνο ένα ιόν ή να αφήσουμε να περάσουν όλα τα ιόντα. Αυτό επιτυγχάνεται με το διάφορους συνδυασμούς όπως είναι τα τριπλά τετράπολα QQQ (Triple Quadrupole) ή υβρίδια αυτών δηλαδή Q – TOF (Quadrupole – TOF), IT – TOF (Ion Trap – TOF), IT – Orbitrap (Ion Trap – Orbitrap). Ανάμεσα σε αυτά τα επίπεδα τα ιόντα υφίστανται διάφορες διαδικασίες. Είναι πολύ πιθανό να αλληλοεπιδράσουν με το φως ή με άλλα ιόντα, να συγκρουστούν με αδρανή ή δραστικά αέρια, με επιφάνειες ή ακόμη και να επιταχυνθούν, να επιβραδυνθούν και τέλος να σταθεροποιηθούν.

Το γεγονός ότι μπορούμε να επιλέξουμε αναλυτές σάρωσης ή μη σάρωσης καθώς και να καθορίσουμε τις διαδικασίες που θα υποστούν τα ιόντα ανάμεσα στους αναλυτές,

μας δίνει τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε πολυάριθμα αναλυτικά πειράματα, αποκομίζοντας έτσι σημαντικές πληροφορίες για τη δομή πολύπλοκων ενώσεων, βελτιώνοντας ταυτόχρονα την ευαισθησία και την ειδικότητα της μέτρησης [10].

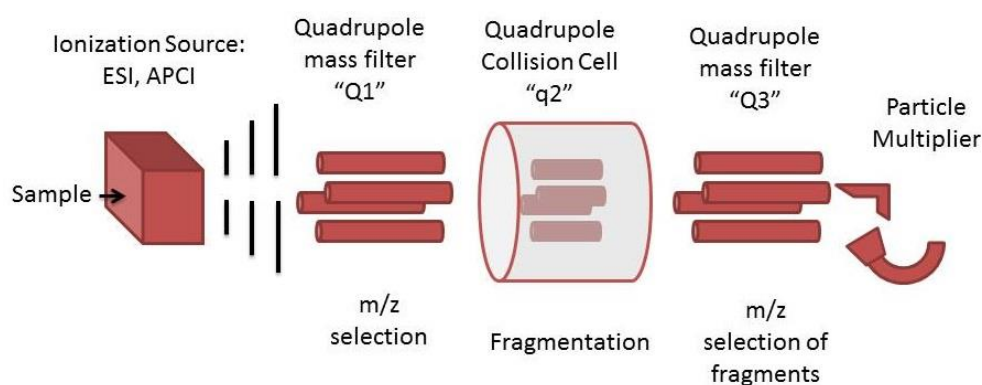
Συζευγμένη φασματομετρία μαζών στο χώρο και στο χρόνο

Σε σύγκριση με την Τεχνική πλήρους σάρωσης και με την Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων, η Φασματομετρία μαζών σε σειρά είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική. Αυτό συμβαίνει διότι υπάρχει η δυνατότητα να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους:

- Στο χώρο, με σύνδεση τουλάχιστον δύο ξεχωριστών αναλυτών
- Στο χρόνο, αποθηκεύοντας ιόντα σε μία συσκευή

Στο χώρο

Για την πρώτη κατηγορία (στο χώρο) απαιτούνται δύο ή περισσότεροι αναλυτές μάζας. Η συνηθέστερη πρακτική είναι τα πειράματα στο χώρο να πραγματοποιούνται με το τριπλό τετράπολο (QQQ), όπως φαίνεται και στην εικόνα 18. Το πρώτο τετράπολο (Q1) και το τρίτο Q3, χρησιμοποιούνται ως αναλυτές μάζας, ενώ το δεύτερο τετράπολο Q2, λειτουργεί ως θάλαμος κρούσης των ιόντων που φεύγουν από το τετράπολο Q1. Ταυτόχρονα στο τετράπολο Q2 εισάγεται και ένα αδρανές αέριο, όπως είναι το αργό, και διαδραματίζει το ρόλο του αερίου κρούσης [6,10].



Εικόνα 18 – Σχηματικό διάγραμμα τριπλού τετραπόλου

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Triple_quadrupole_mass_spectrometer

Στο χρόνο

Στη δεύτερη κατηγορία (στο χρόνο) χρησιμοποιούνται ως παγίδες ιόντων αναλυτές FT – ICR ή Orbitrap. Με αυτή τη τεχνική μπορούν να επιλεγθούν τα ιόντα που μας ενδιαφέρουν, να υποθηκευθούν στον αναλυτή, να διασπαστούν και τα ιόντα που προκύπτουν έχουμε τη δυνατότητα να τα αναλύσουμε εκ νέου σε άλλο πείραμα αλλά στον ίδιο αναλυτή. Δηλαδή η διαδικασία γίνεται σε δύο χρόνους. Το πλεονέκτημα

αυτής της διαδικασίας είναι ότι μπορούν να επαναληφθούν τα στάδια ανάλυσης, γι' αυτό και συχνά γράφονται και MS^n , όπου το n είναι ο αριθμός των επαναλήψεων. Εύκολα οι επαναλήψεις μπορούν να φτάσουν τις 8 ($n=8$), αλλά έχουν υπάρξει και περιπτώσεις με $n=12$. Ωστόσο οι αναλυτές που λειτουργούν ως παγίδες παρουσιάζουν ένα σημαντικό μειονέκτημα. Αδυνατούν να παγιδεύσουν θυγατρικά ιόντα με λόγο m/z μικρότερο του $1/3$ του αρχικού λόγου που είχε το μητρικό ιόν. Τέλος τα φάσματα που παίρνουμε από tandem ms στο χρόνο, διαφέρουν από αυτά που παίρνουμε με tandem ms στο χώρο [6,10].

Τεχνικές σάρωσης

Οι τέσσερις πιο διαδεδομένες τεχνικές σάρωσης στη φασματομετρία μάζας σε σειρά είναι:

1. Τεχνική σάρωσης παραγόμενων ιόντων (Product Ion Scan)
2. Τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion Scan)
3. Τεχνική σάρωσης για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (Constant Neutral Loss Scan, CNL)
4. Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης θραυσματοποίησης ιόντων

Τεχνική σάρωσης παραγόμενων ιόντων

Η τεχνική σάρωσης παραγόμενων ιόντων (ή σάρωση θυγατρικού ιόντος – daughter ion scan) αποτελεί την πλέον πιο διαδεδομένη μέθοδο σάρωσης στη Φασματοσκοπία μαζών σε σειρά. Υπάρχουν 3 αναλυτές σε σειρά. Ο σκοπός του πρώτου αναλυτή Q1, είναι να επιλέξει ένα ιόν το οποίο καλείται πρόδρομο ιόν. Έπειτα το πρόδρομο ή πατρικό ιόν, περνάει στον 2^ο αναλυτή (Q2) ο οποίος παίζει το ρόλο του χώρου θραύσης. Για το λόγο αυτό ο αναλυτής Q2 ονομάζεται θάλαμος σύγκρουσης. Εκεί εξαιτίας της υψηλής ενέργειας και του αδρανές αερίου που υπάρχει (συνήθως άζωτο ή αργό), το πρόδρομο ιόν συγκρούεται με τα μόρια του αδρανούς αερίου. Σαν συνέπεια αυτής της σύγκρουσης, το πρόδρομο ιόν θραυσματοποιείται και παράγονται ιόντα από αυτό καθώς και ένα ή και περισσότερα ουδέτερα μόρια. Άλλοι τρόποι με τους οποίους παράγονται ιόντα είναι με σύγκρουση του πρόδρομου ιόντος με στερεές επιφάνειες, με διέγερση των ιόντων μέσω απορρόφησης φωτονίων ή με τη χρήση μίας δέσμης ηλεκτρονίων. Τέλος τα ιόντα αυτά θα πάνε στον αναλυτή Q3 ο οποίος λειτουργεί με τη τεχνική της πλήρους σάρωσης.

Η τεχνική σάρωσης παραγόμενων ιόντων χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων, για παράδειγμα τα βιολογικά δείγματα. Ωστόσο έχει ως μειονέκτημα την αργή σάρωση [3,6,10,34,58].

Τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος

Όπως και στις προηγούμενες τεχνικές, έτσι και εδώ έχουμε 3 αναλυτές στη σειρά, οι οποίοι είναι όλοι τετράπολα (QQQ). Το πρώτο τετράπολο Q1 λειτουργεί σε πλήρη σάρωση. Από εκεί πρώτα θα περάσουν τα ιόντα και έπειτα θα κατευθυνθούν στον αναλυτή Q2, όπου και θα υποστούν θραυσματοποίηση με αποτέλεσμα να πάρουμε θυγατρικά ιόντα. Στη συνέχεια τα ιόντα θα κατευθυνθούν στον αναλυτή Q3, ο οποίος θα αφήσει να περάσουν στον ανιχνευτή μόνο τα ιόντα συγκεκριμένου λόγου m/z . Στο φάσμα μαζών απεικονίζονται μόνο τα μητρικά ιόντα τα οποία διασπάστηκαν και παρήγαγαν τα θυγατρικά ιόντα συγκεκριμένου λόγου m/z , όπου και αφήσαμε να περάσουν. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε αναλύσεις όπου μελετάται η δομή και η θραυσματοποίηση μίας ένωσης [10,58].

Τεχνική σάρωσης για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου

Στη τεχνική σάρωσης για την ανίχνευση ουδέτερου μορίου ο πρώτος και ο τρίτος αναλυτής μάζας (Q1 & Q3) σαρώνουν τα ιόντα τα οποία έχουν συγκεκριμένη διαφορά λόγων m/z (με m/z του Q1 > m/z του Q3). Τα ιόντα που καλύπτουν αυτή τη συνθήκη, δηλαδή που χάνουν συγκεκριμένη μάζα μέχρι να φτάσουν στο Q3 από το Q1, είναι και αυτά που περνάνε στον ανιχνευτή. Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται σε ενώσεις με παρόμοια δομή, όπως είναι τα λιπίδια [10].

Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης θραυσματοποίησης ιόντων

Σε αυτή τη τεχνική εστιάζουμε και παρακολουθούμε μία συγκεκριμένη διάσπαση ιόντος ή μία ομάδα διασπάσεων. Στη πρώτη περίπτωση, δηλαδή όταν παρακολουθούμε μία ορισμένη θραύση ενός πρόδρομου ιόντος με ένα παραγόμενο, έχουμε τη λεγόμενη μέθοδο «επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης θραυσματοποίησης ιόντων» (Single Reaction Monitoring – SRM). Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η πολύ καλή ευαισθησία και η μεγάλη εκλεκτικότητα, που έρχονται σαν αποτέλεσμα της μείωσης του σήματος του υποβάθρου, δηλαδή του χημικού θορύβου. Στη δεύτερη περίπτωση, δηλαδή όταν παρακολουθούμε παραπάνω από μία διασπάσεις, η μέθοδος ονομάζεται «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ταχεία σάρωση και η μεγάλη εκλεκτικότητα [10].

Ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες φασμάτων

Ο φασματογράφος μάζας απεικονίζει το φάσμα μαζών του δείγματος που αναλύσαμε. Η ταυτοποίηση όμως των χημικών στοιχείων από τα οποία αποτελείται και της ένωσης που αναλύσαμε, πραγματοποιείται μέσω βάσεων δεδομένων - βιβλιοθηκών. Αυτές οι βάσεις δεδομένων εμπεριέχουν γνωστά φάσματα μέσω των οποίων γίνεται και η ταύτιση με το δικό μας φάσμα μαζών.

Υπάρχουν 3 κατηγορίες βάσεων δεδομένων:

- Οι τοπικές
- Οι εμπορικές
- Οι ανοιχτές

Στη πρώτη κατηγορία μπορούμε να φτιάξουμε μία δικιά μας βάση, τοπικά, με σκοπό την αποθήκευση του φάσματος πρότυπων ουσιών. Η δεύτερη κατηγορία είναι αυτή των εμπορικών βιβλιοθηκών. Αυτές έχουν κατασκευαστεί από εταιρίες ή οργανισμούς με πιστοποιημένα εργαστήρια. Εμπεριέχουν χιλιάδες ενώσεις που έχουν αναλυθεί, ενώ ο ιονισμός τους έχει πραγματοποιηθεί με ιονισμό με ηλεκτρόνια. Συνήθως οι εμπορικές βιβλιοθήκες παρέχονται μαζί με το λογισμικό της εταιρίας. Τέλος οι ανοιχτές βιβλιοθήκες είναι άμεσα διαθέσιμες στο διαδίκτυο. Ο εμπλουτισμός τους μπορεί να πραγματοποιηθεί από τον κάθε έναν ανεξάρτητο ερευνητή που επιθυμεί να προσθέσει ένα καινούργιο αποτέλεσμα μίας ένωσης. Ωστόσο αυτές οι βάσεις δεν είναι και απόλυτα αξιόπιστες καθώς ο ιονισμός γίνεται υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες. Οι ελάχιστες διαφορές στις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η ανάλυση, μπορούν να δώσουν διαφορετικό φάσμα για την ίδια ένωση, με την ίδια τεχνική ανάλυσης [10]. Η ταυτοποίηση μέσω των βιβλιοθηκών δεν εξάγει μόνο το αποτέλεσμα της ταύτισης, αλλά και τη βαθμολογία ταύτισης, δηλαδή το κατά πόσο το δικό μας φάσμα θεωρεί το σύστημα ότι ταυτίζεται με το φάσμα της βιβλιοθήκης [59].

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών:

Πηγές: [5,10,11,53,60 – 66]

Βιβλιοθήκη	Εφαρμογές	Ιστοσελίδα
Biotyper	Αρνητικά κατά gram και θετικά κατά gram βακτήρια, στελέχη μυκοβακτηρίων, στελέχη μυκήτων, δειγμάτα θετικών αιμοκαλλιιεργειών	-
Andromas	Κλινική διαγνωστική	-
Vitek MS	Βακτήρια, μύκητες, μυκοβακτήρια	-
NCBI	Πρωτεΐνες (μοριακή βιολογία)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
ExpASy	Πρωτεωμική	https://www.expasy.org/
ProFound	Πρωτεϊνική χημεία	
Protein Prospector	Πεπτίδια	https://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm
MASCOT	Πεπτίδια και πρωτεΐνες	https://www.matrixscience.com/search_form_select.html
Willey	Γενικές ενώσεις	-
MPW Drug Library	Φάρμακα, δηλητήρια, φυτοφάρμακα, περιβαλλοντικοί ρύποι	-
Pesticide Library	Κατάλοιπα φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και πόσιμο νερό	-
FFNSC 3 (Flavor and Fragrance Natural and Synthetic Compounds)	Αρώματα και αρωματικές ενώσεις	-
VOC Analysis S/W	Πτητικές οργανικές ενώσεις	-
MicrobeNet	Σπάνιοι και ασυνήθιστοι παθογόνοι (δημιουργήθηκε από το CDC)	https://www.cdc.gov/microbenet/index.html
Fiehn Metabolomics	Μεταβολίτες	https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/fiehnlib
NIST	Διάφοροι οργανισμοί, πρωτεΐνες	https://chemdata.nist.gov/

Eight-Peak Index of Mass Spectra	Διάφορες ενώσεις	-
UniProt	Αλληλουχία πρωτεϊνών και λειτουργικές πληροφορίες	https://www.uniprot.org/
Human Metabolome Database (HMDB)	Μεταβολίτες μικρών μορίων που εντοπίζονται στο ανθρώπινο σώμα	https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/search
The Madison Metabolomics Consortium Database (MMCD)	Μεταβολίτες σε βιολογικά δείγματα	https://www.g6g-softwaredirectory.com/bio/metabolomics/dbs-kbs/20670-Univ-Madison-WI-MMCD.php
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG)	Γονιδιώματα και βιολογικές οδοί	https://www.genome.jp/kegg/
The Small Molecule Pathway Database (SMPDB)	Διαδρομές μικρών μορίων που βρίσκονται μόνο σε ανθρώπινους οργανισμούς	https://smpdb.ca/
WikiPathways	Βιολογικές οδοί	https://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways
PubChem	Μικρά μόρια, μεγαλύτερα μόρια (π.χ. νουκλεοτίδια, υδατάνθρακες, λιπίδια, πεπτίδια και χημικά τροποποιημένα μακρομόρια), χημικές δομές, χημικές και φυσικές ιδιότητες, βιολογικές δραστηριότητες, τοξικότητα και άλλα.	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
ChemIDplus	Φυσικές και χημικές πληροφορίες	https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/
ChEBI	Μεταβολίτες, φάρμακα, τοξίνες	https://www.ebi.ac.uk/chebi/
Escherichia coli Metabolome Database	Μεταβολικά δεδομένα και διαγράμματα μεταβολικής οδού για το Escherichia coli	https://ecmdb.ca/
DrugBank	Φάρμακα	https://go.drugbank.com/
Pharmacogenomics Database	Φάρμακα	https://www.pharmgkb.org/
STITCH	Δίκτυα αλληλεπίδρασης χημικών και πρωτεϊνών	http://stitch.embl.de/

Golm Metabolome Database	Βιολογικοί μεταβολίτες	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/
Direct Infusion Metabolite Database	Βιολογικές δομές και μεταβολίτες	https://dimedb.ivers.aber.ac.uk/
METLIN	Μεταβολίτες	https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage
MassBank	Μεταβολίτες	https://massbank.eu/MassBank/Search

Εμπορικά συστήματα

Σήμερα υπάρχουν αρκετές εταιρίες που διαθέτουν ολοκληρωμένα εμπορικά συστήματα φασματομέτρων μάζας. Ορισμένες από αυτές είναι:

- Agilent: <https://www.agilent.com/>
- Bruker: <https://www.bruker.com/en.html>
- Shimadzu: <https://www.shimadzu.com/>
- Leco: <https://www.leco.com/>
- Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home.html>

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ορισμένα εμπορικά συστήματα τα οποία είναι διαθέσιμα από τις παραπάνω εταιρίες.

Πίνακας 6 – Διαθέσιμα εμπορικά συστήματα

Εταιρία	Τύπος	Μηχάνημα
Agilent	GC/MS	5977B GC/MSD
		7010B Triple Quadrupole GC/MS
		7250 GC/Q-TOF
	Triple Quadrupole LC/MS	Ultivo Triple Quadrupole LC/MS
		6495C Triple Quadrupole LC/MS
		6470B Triple quadrupole LC/MS
	Quadrupole Time of Flight LC/MS	6545 LC/Q-TOF
		6546 LC/Q-TOF
		6560 Ion Mobility LC/Q-TOF
		6530 Q-TOF LC/MS
	Single Quadrupole LC/MS	LC/MSD iQ

	Single Quadrupole LC/MS	LC/MSD XT
		6230B Time of Flight (TOF) LC/MS
Bruker	MALDI-TOF	rapifleX MALDI Tissue typer
		rapifleX
		ultrafleXtreme
		autoflex maX
		microflex LRF
	LC-MS	nanoElute
		Elute LC series
	TRIPLE QUAD LC-MS	EVOQ LC-TQ
	TRIPLE QUAD GC-MS	EVOQ GC-TQ
	LC-QTOF MS	impact II
maXis II		
QTOF	Target Screener HR	
Shimadzu	MALDI TOF	MALDI-7090
		MALDI-8020
		AXIMA Performance
		AXIMA Confidence
		MALDImini-1
	Triple Quadrupole GC-MS	GCMS-TQ8050 NX
		GCMS-TQ8040 NX
	Single Quadrupole GC-MS	GCMS-QP2020 NX
	Triple Quadrupole LC-MS	LCMS-8050
		LCMS-8045
Nexera Mikros		
Single Quadrupole LC-MS	LCMS-2020	
Quadrupole TOF – LC-MS	LCMS-9030	
Leco	GC-TOF-MS	Pegasus BT GC-TOFMS
		Pegasus GC-HRT+
	GCxGC-TOF-MS	Pegasus BT 4D GCxGC-TOFMS
	HRD GCxGC TOF MS	Pegasus GC-HRT+ 4D
Thermo Fisher Scientific	LC-MS Triple Quadrupole	TSQ Altis
	GC-MS	Q Exactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS

Άλλες εφαρμογές της Φασματοσκοπίας Μάζας

Η φασματοσκοπία μάζας καλύπτει ένα ευρύ πεδίο ειδικοτήτων στις οποίες μπορεί να εφαρμοστεί. Ορισμένες από αυτές είναι και η ιατροδικαστική, η εγκληματολογία.

Ιατροδικαστική τοξικολογία

Η φασματοσκοπία μάζας διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ιατροδικαστική τοξικολογία. Οι ειδικοί χρησιμοποιώντας το φασματογράφο μάζας, είναι σε θέση να πουν με βεβαιότητα και στοιχεία αν κάποιος έχει κάνει χρήση ναρκωτικών, αν κάποιος δηλητηριάστηκε και άλλα. Αρχικά το φασματόμετρο μάζας συζευγμένο με αέριο χρωματογράφο (GC-MS) με πηγή ιόντων των ιονισμό με ηλεκτρόνια (EI) και μετέπειτα με χημικό ιονισμό (CI), ήταν το μόνο σύστημα που χρησιμοποιούνταν στην ιατροδικαστική. Με την πάροδο των χρόνων όμως συστήματα όπως LC-MS με ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI) ή χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) και tandem MS με τριπλό τετραπόλο ή παγίδα ιόντων είναι ίσως από τα κυριότερα που χρησιμοποιούνται.

Όσον αφορά τη χρήση των ναρκωτικών, η εύρεσή τους στον οργανισμό ενός ατόμου που οδηγούσε για παράδειγμα υπό την επήρεια ναρκωτικών είναι δυνατόν να επηρεάσουν στην απόδοση της ποινικής του ευθύνης. Ακόμη στην κλινική τοξικολογία, είναι πολύ σημαντική η διάγνωση ή ο αποκλεισμός οξείας ή χρόνιας δηλητηρίασης. Ταυτόχρονα για τα άτομα τα οποία παρουσιάζουν εθισμό σε ναρκωτικά, αλκοόλ ή ακόμη και φάρμακα, με τη φασματοσκοπία μάζας είναι δυνατή η παρακολούθησή τους.

Εξαιρετικά σημαντική είναι και η συνεισφορά της φασματοσκοπίας μάζας στον έλεγχο ντόπινγκ. Όπως είναι ευρέως γνωστό η χρήση παράνομων ουσιών από αθλητές οι οποίες τους δίνουν πλεονέκτημα έναντι των συναθλητών τους, πρέπει να αποτρέπονται και να τιμωρούνται οι παραβάτες. Τέτοιες ουσίες έχουν τη δυνατότητα να διεγείρουν τους μύες, να ενισχύσουν την αντοχή κατά τη διάρκεια του αγώνα, να μειώσουν το σωματικό τους βάρος καθώς επίσης και να μειώσουν τον πόνο από την υπερβολική προπόνηση. Η παρακολούθηση και η εύρεση τέτοιων ουσιών πραγματοποιείται από ελέγχους στα ούρα των αθλητών και στο αίμα. Αυτές οι δύο εξετάσεις δίνουν βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα.

Μία άλλη τεχνική είναι αυτή της εξέτασης των μαλλιών η οποία μπορεί να μας πει σε μεγαλύτερο βάθος χρόνου αν έχει γίνει χρήση ουσιών. Αρχικά τη δεκαετία του '60 και του '70, η εξέταση των μαλλιών γινόταν για να την ανίχνευση τοξικών βαρέων μετάλλων όπως το αρσενικό, ο μόλυβδος και ο υδράργυρος. Οι τεχνικές ανάλυσης εκείνης της εποχής δεν ήταν τόσο ευαίσθητες ώστε να ανιχνεύσουν και άλλες ουσίες στα μαλλιά. Σήμερα που η τεχνολογία έχει προχωρήσει τα συστήματα συζευγμένης φασματομετρίας μάζας με αέριο χρωματογράφο (GC-MS) χρησιμοποιούνται για την

ανάλυση μαλλιών. Το βασικό πλεονέκτημα της ανάλυσης των μαλλιών έναντι των ούρων ή του αίματος είναι ότι μπορούν να δώσουν αποτελέσματα σε μεγαλύτερο βάθος χρόνου, αναλόγως το μήκος της τρίχας, από εβδομάδες έως και μήνες. Ωστόσο η ανάλυση μαλλιών με την εξέταση ούρων ή αίματος πραγματοποιούνται συμπληρωματικά ή μία της άλλης για πληρέστερα και ακριβέστερα αποτελέσματα [67].

Εγκληματολογία: αναγνώριση επιταχυντών σε πυρκαγιές & εκρηκτικών υλών

Μετά από μία πυρκαγιά είναι πολύ δύσκολο να διαπιστωθεί αν έχει διαπραχθεί εμπρησμός ή όχι. Οι κύριοι λόγοι είναι ότι τυχόν φυσικά αποδεικτικά στοιχεία καταστράφηκαν από τη φωτιά και επίσης είναι δύσκολο να βρεθούν υπολείμματα από αναφλέξιμα υγρά. Το αν χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι επιταχυντές ή όχι είναι από τα πρωταρχικά στοιχεία που πρέπει να βρεθούν και να ταυτοποιηθούν, προκειμένου να διαπιστωθεί αν πρόκειται για εμπρησμό ή όχι. Ο φασματογράφος μάζας που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση επιταχυντών έπειτα από πυρκαγιά είναι GS-MS-MS. Η συγκεκριμένη διάταξη έχει την δυνατότητα να ταυτοποιήσει αναφλέξιμα υγρά υπολείμματα παρουσία ισχυρού υποστρώματος που μπορεί να καλύψει τους στόχους αναλύτες που μας ενδιαφέρουν.

Η φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιείται ακόμα και για την αναγνώριση εκρηκτικών υλών. Το πιο απαιτητικό στάδιο για την ανάλυση των εκρηκτικών είναι ο εντοπισμός των υπολειμμάτων τους. Η ποσότητα κατάλοιπων από τα εκρηκτικά μετά την έκρηξη είναι πολύ μικρή και βρίσκεται ανάμεσα σε αρκετά συντρίμια, πράγμα που δυσκολεύει τον εντοπισμό τους. Ωστόσο όταν βρεθούν και αναλυθούν από το φασματογράφο μάζας, τα αποτελέσματα μας δίνουν πληροφορίες για το είδος του εκρηκτικού, όπως επίσης και τη χώρα προέλευσης και το κατασκευαστή. Η διάταξη που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των εκρηκτικών υπολειμμάτων είναι υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματόμετρο μαζών (LC-MS). Για τον ιονισμό του δείγματος χρησιμοποιείται είτε θερμοψεκασμός (TS), είτε ηλεκτροψεκασμός (ESI), είτε χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI). Η ανάλυση των δειγμάτων από κατάλοιπα εκρηκτικών με διάταξη TS-LC-MS με τετραπολικό φασματόμετρο μάζας για τη τεχνική ανάλυσης πλήρους σάρωσης (FS), έχει όρια ανίχνευσης 200 pg για TNT και 1 ng PETN [67].

Σήμερα το φασματόμετρο μάζας αποτελεί για τα εγκληματολογικά και ιατροδικαστικά εργαστήρια αναπόσπαστο κομμάτι.

Βιβλιογραφία

1. J. J. Thomson, *Philos. Mag.* V 44, 293 (1897)
2. Chhabil Dass (2007). *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, Published by John Wiley & Sons
3. Θεοδώρα Κασιόλα (2011). *In vivo βιολογική αξιολόγηση και φαρμακοκινητική μελέτη με χρήση HPLC-MS-MS του Leuprolide και αναλόγων του που εμπλέκονται στη θεραπεία του καρκίνου*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών
4. Μυλτιάδης Ι. Καραγιάννης, Κωνσταντίνος Η. Ευσταθίου. *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης 6^η έκδοση*, Εκδόσεις: Κωσταράκη
5. Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant (2007). *Mass Spectrometry Principles and Applications 3rd Edition*, John Wiley & Sons
6. Γκλαβίδου Τελιώ (2018), *Υγρή Χρωματογραφία και Φασματομετρία Μάζας. Βασικές Αρχές, Οργανολογία και Εφαρμογές σε περιβαλλοντικές αναλύσεις*. Διπλωματική εργασία, Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο
7. Κουφόπουλος Νικηφόρος (2015), *Ανακάλυψη βιοδεικτών με τη χρήση NMR και MS μεταβολικής. Εφαρμογή στο διαβήτη*. Διπλωματική εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Τομέας Τεχνολογίας Πληροφορικής και Υπολογιστών
8. Jianyi Cai, Jack Henion (1995). *Review Capillary electrophoresis – mass spectrometry*,
9. Virginia Rodríguez Robledo, William Franklin Smyth (2014). *Review of the CE-MS platform as a powerful alternative to conventional couplings in bio-omics and target-based applications*
10. Γ. Θεοδωρίδης, Σ. Γηρούση, Γ. Ζαχαριάδης, Α. Ζώτου, Β. Σαμανίδου (2015). *Βιοαναλυτική Χημεία. Ελληνικά Ακαδημαϊκά Συγγράμματα και Βοηθήματα*
Ανακτήθηκε από: <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/3667>
(last accessed 1 July 2021)
11. Marek Smoluch, Giuseppe Grasso, Piotr Suder, Jerzy Silberring (2019). *Mass Spectrometry An Applied Approach 2nd Edition*, John Wiley & Sons

12. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography)
(last accessed 1 July 2021)
13. Franz Hillenkamp, Jasna Peter – Katalinic (2014). MALDI MS A Practical Guide to Instrumentation, Methods, and Applications 2nd Edition, Wiley-Blackwell
14. Όλγα Μπέγου (2015), Ανάπτυξη μεθόδου UPLC-MS/MS για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών σε πλάσμα αίματος και εφαρμογή σε κλινικές μελέτες. Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης, Διαπανεπιστημιακό Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας», Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
15. Κακλαμάνου Π. Γεωργίου (2009), Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ορμονών με αυξητική δράση σε βιολογικά δείγματα με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών. Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
16. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography)
(last accessed 1 July 2021)
17. <https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf>
(last accessed 1 July 2021)
18. Alfred O. Nier (1947), A Mass Spectrometer for Isotope and Gas Analysis, The review of scientific instruments
19. Burnaby Munson (2000). Development of chemical ionization mass spectrometry, International Journal of Mass Spectrometry
20. T. Keough, A. J. DeStefano (1981). Factors Affecting Reactivity in Ammonia Chemical Ionization Mass Spectrometry, Organic Mass Spectrometry
21. Milne, G. W. A., Fales, H. M., & Axenrod, T. (1971). Identification of dangerous drugs by isobutane chemical ionization mass spectrometry. Analytical Chemistry
22. Gomez, A., & Tang, K. (1994). Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. Physics of Fluids

23. Niessen, W. M.A. (2019). Mass spectrometry | Electrospray ionization, Encyclopedia of Analytical Science
24. Fernández De La Mora (1995). On the Outcome of the Coulombic Fission of a Charged Isolated Drop, Journal of Colloid and Interface Science
25. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometers_\(Instrumentation\)/Electrospray_Ionization_Mass_Spectrometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometers_(Instrumentation)/Electrospray_Ionization_Mass_Spectrometry)
(last accessed 1 July 2021)
26. Michael Barber, Robert S. Bordoli, R. Donald Sedgwick, Andrew N. Tyler (1981). Fast Atom Bombardment of Solids (F.A.B.) : A New Ion Source for Mass Spectrometry, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications
27. Barber, M., Bardoli, R.S., Sedgwick, R.D. and Tyler, A.H. (1981) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 325
28. D. J. Harvey (2004). Mass Spectrometry - Ionization Methods Overview, Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition
29. https://tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab_AMS.htm
(last accessed 1 July 2021)
30. McLuckey, S.A. and Wells, J.M. Mass Analysis at the Advent of the 21st Century. Chem. Rev. 2001, 101, 571-606.
31. Haag, A. M. (2016). Mass Analyzers and Mass Spectrometers. Advances in Experimental Medicine and Biology, 157–169.
32. Vestal ML, Juhasz P, Martin SA (1995) Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-offlight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 9(11):1044–1050
33. Juhasz P, Vestal ML, Martin SA (1997) On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra. J Am Soc Mass Spectrom 8:209–217
34. Φωτεινή Ν. Μπαζώτη (2006). Ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τη μελέτη βιοδραστικών συστατικών του είδους *olea europaea* και των αλληλεπιδράσεων αυτών των ουσιών με πεπτίδια. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ανακτήθηκε από: <https://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/18980>
(last accessed 1 July 2021)

35. <https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/several-types-of-mass-analyzer/>
(last accessed 1 July 2021)
36. Wong PSH, Cooks RG (1997) Ion trap mass spectrometry. *Currentseparations.com* 16(3)
37. J. C. Schwartz, M. W. Senko, and J. E. P. Syka, A two dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 659–669 (2002).
38. James W. Hager (2002). A new linear ion trap mass spectrometer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*
39. Perry, R. H., Cooks, R. G., & Noll, R. J. (2008). Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(6), 661–699.
40. Hu, Q., Makarov, A. A., Cooks, R. G., & Noll, R. J. (2006). Resonant ac Dipolar Excitation for Ion Motion Control in the Orbitrap Mass Analyzer. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110(8), 2682–2689.
41. <https://nationalmaglab.org/education/magnet-academy/watch-play/interactive/fourier-transform-ion-cyclotron-resonance-ft-icr>
(last accessed 1 July 2021)
42. Sharad Medhe (2018). *Mass Spectrometry: Detectors Review*, Chemical and Biomolecular Engineering
43. <https://www.restek.com/globalassets/pdfs/literature/GNBR1000A-UNV.pdf>
(last accessed 1 July 2021)
44. Michael L. Gross (1992). *Mass Spectrometry in the Biological Sciences: A Tutorial*, Springer Dordrecht
45. Koppelaar, D. W., Barinaga, C. J., Denton, M. B., Sperline, R. P., Hieftje, G. M., Schilling, G. D., ... IV, I. (2005). MS Detectors. *Analytical Chemistry*, 77(21), 418 A–427 A.
46. Princy Agarwal, Anju Goyal (2017). A review on analyzers for mass spectrometry, *International Journal of pharma and Bio Sciences*

47. A. Kashefian Naieni , F. Bahrami, N. Yasrebi , B. Rashidian (2009). Design and study of an enhanced Faraday cup detector, Vacuum
48. Kenneth I. Busch (2001). High Vacuum Pumps in Mass Spectroscopy, High Vacuum Pumps
Ανακτήθηκε από:
https://www2.chemistry.msu.edu/courses/cem832/Vacuum_pumps.pdf
(last accessed 1 July 2021)
49. https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/gcms/fundamentals/vacuum/ms_require_high_vacuum.html
(last accessed 1 July 2021)
50. https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Vacuum_Technology_for_Mass_Spectrometry_Instruments_5172018.pdf
(last accessed 1 July 2021)
51. https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/gcms/fundamentals/vacuum/differential_pumping.html
(last accessed 1 July 2021)
52. Vertes, A. (n.d.). Soft Laser Desorption Ionization — Maldi, Dios and Nanostructures. Springer Series in Optical Sciences, 505–528.
53. Μαρία Κυρίτση (2019). Τυποποίηση στελεχών Legionella Pneumophila από περιβαλλοντικά δείγματα και συρροές κρουσμάτων με Matrix assisted laser desorption ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ανακτήθηκε από: <https://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/46517>
(last accessed 1 July 2021)
54. M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm, and P. Roepstorff, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes, J. Mass Spectrom. 32, 593–601 (1997).
55. Lai, Y.-H., & Wang, Y.-S. (2017). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Mechanistic Studies and Methods for Improving the Structural Identification of Carbohydrates. Mass Spectrometry
56. Laiko, V. V., Baldwin, M. A., & Burlingame, A. L. (2000). Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. Analytical Chemistry, 72(4), 652–657.

57. Κωνσταντίνος Σάμιος (2020). Φασματοσκοπικές τεχνικές για την ταυτοποίηση της γεωγραφικής προέλευσης του ελαιόλαδου. Διδακτική προσέγγιση. Διπλωματική εργασία, Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο
Ανακτήθηκε από: <https://apothesis.eap.gr/handle/repo/47565>
(last accessed 1 July 2021)
58. Χαρίκλεια Καλτσή (2017). Αξιοποίηση της ms/ms λειτουργίας στη μεταβολομική ανάλυση με χρωματογραφία υγρών – φασματομετρία μάζας. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών
Ανακτήθηκε από:
<https://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/11240/1/%CE%9C%CE%B5%CF%84%CE%B1%CF%80%CF%84%CF%85%CF%87%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CE%AE%20%CE%95%CF%81%CE%B3%CE%B1%CF%83%CE%AF%CE%B1%20%CE%A7%CE%B1%CF%81%CE%B9%CE%BA%CE%BB%CE%B5%CE%B9%CE%B1%CF%82%20%CE%9A%CE%B1%CE%BB%CF%84%CF%83%CE%AE%20.pdf>
(last accessed 1 July 2021)
59. Stephen Stein (2012). Mass Spectral Reference Libraries: An Ever-Expanding Resource for Chemical Identification. *Analytical Chemistry*, 84(17), 7274–7282.
60. Γεώργιος Οικονομίδης (2019). Εφαρμογές της φασματοφωτομετρίας μάζας (MALDI – TOF) στη διερεύνηση της μικροβιακής αντοχής. Διπλωματική Εργασία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
61. <https://www.creative-proteomics.com/support/introduction-to-mass-spectrometer.htm>
(last accessed 1 July 2021)
62. <https://shimadzu.com.au/mass-spectral-libraries-and-databases>
(last accessed 1 July 2021)
63. <https://www.shimadzu.eu/ffnsc-3>
(last accessed 1 July 2021)
64. https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en
(last accessed 1 July 2021)
65. Eight Peak Index of Mass Spectra, 3rd Edition. (1985). *Analytical Chemistry*, 57(13), 1442A–1442A.
66. <https://smpdb.ca/others>
(last accessed 1 July 2021)

67. Jehuda Yinon (2003). Advances in Forensic Applications of Mass Spectrometry, CRC Press

Αναφορές Εικόνων

Εικόνα 2 – Σχηματικό διάγραμμα εξωτερικής εισαγωγής δείγματος

Πηγή: Somsak Sirichai lectures <http://sc.buu.ac.th/~chemistry/ezchem/mass-spectrometry.pdf> (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 3 – Σχηματικό διάγραμμα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης - φασματογράφου μάζας

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis%E2%80%93mass_spectrometry (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 4 – Σχηματικό διάγραμμα GS-MS και συστήματος εισαγωγής δείγματος

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 5 – Σχηματικό διάγραμμα LC-MS

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 6 – Σχηματικό διάγραμμα διάταξης ιονισμού ηλεκτρονίων

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_ionization (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 7 – Σχηματικό διάγραμμα διάταξης FAB

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Fast_atom_bombardment (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 8 – Σχηματικό διάγραμμα διάταξης θερμοψεκασμού

Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/Thermospray> (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 9 – Σχηματικό διάγραμμα αναλυτή μαγνητικού τομέα απλής εστίασης

Πηγή: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html#section1 (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 10 – Σχηματικό διάγραμμα τετραπολικού αναλυτή μαζών

Πηγή: Π. Παπαγιαννακόπουλος, Γ. Λαζάρου, Σημειώσεις Φασματοσκοπίας Μάζας, Εργ. Φωτοχημείας και χημικής κινητικής, Παν. Κρήτης. https://tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab_AMS.htm (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 11 – Αναπαράσταση εκτόξευσης ιόντος από 3D παγίδα ιόντων

Πηγή: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html#section4 (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 12 – Αριστερά: η κίνηση των ιόντων μέσα στο orbitrap / Δεξιά: τομή αναλυτή μάζας orbitrap

Πηγές: <https://en.wikipedia.org/wiki/Orbitrap>, https://en.wikipedia.org/wiki/Ion_trap (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 13 – Επάνω αναπαράσταση ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή διακριτών δυνόδων & κάτω αναπαράσταση ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή συνεχούς δυνόδου

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_multiplier (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 15 – Μεταλλική πλάκα δείγματος πηγής MALDI

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Matrix-assisted_laser_desorption/ionization (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 16 – Παρασκευή δείγματος: απεικονίζεται μήτρα 2,5 – DHB που προέκυψε σε στόχο MALDI από φασματογράφο μάζας Bruker Scout 384™.

Πηγή: <http://www.ms-textbook.com/2nd/home/instructors.html> (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 17 – Παράδειγμα φάσματος μάζας

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrum (last accessed 1 July 2021)

Εικόνα 18 – Σχηματικό διάγραμμα τριπλού τετραπόλου

Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Triple_quadrupole_mass_spectrometer

(last accessed 1 July 2021)

Βάση Δεδομένων με εφαρμογές της Φασματοσκοπίας Μάζας

Δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων σε Access του Open Office. Σε αυτή τη βάση δεδομένων είναι καταγεγραμμένες μία σειρά από εφαρμογές της Φασματοσκοπίας Μάζας σχετικές με τη Βιοϊατρική Τεχνολογία.

Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται εικόνες στις οποίες απεικονίζεται αυτή η βάση δεδομένων:

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Κατασκευή μήτρας MALDI-TOF-MS και βάση δεδομένων για βακτήρια από άλογα	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073708062100294X
Μέθοδος ταχείας ανίχνευσης των εντεροβακτηριδίων που παράγουν καρβαπενεμάση από MALDI-TOF-MS με δίσκο ιμιπενέμης/σιλαστατίνης (KB) και θειικού ψευδαργύρου	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X20303330
Απομονώνονται από υγρό μέσο κα ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών μυκοβακτηρίων με τη χρήση MALDI - TOF MS	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2529993X21000873
Ταχεία αναγνώριση βακτηριδίων απευθείας από καλλιέργειες αίματος με εμπλουτισμό συν-μαγνητικών σφαιριδίων με τη χρήση MALDI-TOF MS	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914021003933
Χρήση MALDI-MSI για φάρμακα κατά του καρκίνου: Σημασία, πρόοδος και εφαρμογές	MALDI-MSI	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993621000054
Χρήση MALDI-MS για τη διερεύνηση των λιπιδικών αλλαγών σε διαφοροποιημένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος μετά από φαρμακευτική αγωγή	MALDI-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914021004914
Ταυτοποίηση με τη χρήση MALDI-TOF-MS βακτηρίων σε κατεψηγμένο κρέας αρνιού το οποίο βρίσκεται σε αεροστεγείς συσκευασίες	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030917402100084X
Καθιέρωση ποσοτικού δείκτη υδρόλυσης μεροπενέμης, με τη χρήση MALDI-TOF MS, για την ανίχνευση βακτηρίων που παράγουν KPC και NDM	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701221001366

Εικόνα 1

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Δείκτες για την αναγνώριση των γονιδιωματικών του βακτηρίου <i>Campylobacter concisus</i> με τη χρήση MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666517420300213
Διερεύνηση του σεξουαλικού προσδιορισμού μέσω MALDI MS ανάλυσης πεπτιδίων και πρωτεϊνών σε φυσικά σημεία των δακτύλων μέσω ολοκληρωμένης στατιστικής μοντελοποίησης	MALDI-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S246817092030059X
Ανάπτυξη σειράς πεπτιδίων, με τη χρήση MALDI-MS, για τη διαλογή των πιθανών αναστολέων θρομβίνης	MALDI-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914021000503
Πρωτομική ανάλυση πτυέλων προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει πνευμονική φυματίωση ή όχι. Χρήση MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1198743X21001154
Ποσοτικός προσδιορισμός των στεροειδών ορμονών στο πλάσμα με βάση τον σχηματισμό παραγώγων υδροξυλαμίνης	MALDI-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269720306217
Αύξηση της ανίχνευσης χοληστερόλης με τη χρήση MALDI-TOF-MS χρησιμοποιώντας χημικά ετερογενείς κουκκίδες άνθρακα	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979721001338
Χρήση οξειδίου γραφενίου ως μήτρα MALDI με σκοπό την ανάλυση ισομερών δισακχαρίτη. MALDI-MS	MALDI-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814620322184
Ταυτοποίηση των <i>Cimex lectularius</i> και <i>Cimex hemipterus</i> κοριών με χρήση MALDI-TOF MS	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134820303671

Εικόνα II

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Ποσοτική απεικόνιση φασματομετρίας μάζας MALDI για τη διερεύνηση της δερματικής παροχής φαρμάκου τοφασιτινίμπης στο ανθρώπινο δέρμα	MALDI-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641120303660
Βελτίωση της πρώιμης αντιβιοτικής θεραπείας για εντεροκοκκική λοίμωξη (λοίμωξη του αίματος) με χρήση MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X20303676
Χρήση MALDI-TOF MS για την έγκαιρη διάγνωση λοιμώξεων της κυκλοφορίας του αίματος σε ένα νοσοκομείο τέταρτου επιπέδου στην Κολομβία	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971220321858
Χρήση MALDI-TOF MS για την ταχεία αναγνώριση και ανίχνευση των εντεροβακτηριδίων που παράγουν β-λακταμάση από θετικές καλλιέργειες αίματος	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716520303301
Άμεση καταγραφή, με χρήση MALDI-TOF-MS, των ιζημάτων των ούλων στα κοκκώδη υγρά για τη διάγνωση περιοδοντίτιδας	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020312479
Αξιολόγηση του καρκίνου του προστάτη με βάση τα αποτυπώματα MALDI-TOF-MS πρωτεϊνών και πεπτιδίων ορού που έχουν υποστεί επεξεργασία με νανοσωματίδια	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020306226
Επικύρωση του MALDI-TOF-MS για την έγκαιρη ανίχνευση του κλώνου υψηλού κινδύνου ST175 του <i>Pseudomonas aeruginosa</i> σε κλινικά απομονωμένα προϊόντα	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2529993X2100112X
Χρήση MALDI-TOF-MS για την ανίχνευση ενδοноσοκομειακής διάδοσης KPC-3 που παράγει <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPN)	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2529993X20302173

Εικόνα III

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Ανίχνευση σε ανθρώπινα ούρα του ρουθηνίου (Ru) στο οποίο βασίζονται τα "μεταλλικά φάρμακα" (metallo drugs), με τη χρήση MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020308420
Χρήση MALDI-TOF-MS για γρήγορη αναγνώριση και επιδημιολογικό χαρακτηρισμό του <i>Francisella tularensis</i>	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701220307715
Διάγνωση μυκοβακτηριακών λοιμώξεων με χρήση MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X20305103
Χρήση MALDI-TOF-MS για τον εντοπισμό στοματικών απομονωμένων στελεχών <i>Streptococcus salivarius</i> και <i>Lactobacillus spp</i>	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996920303617
Ανίχνευση παραγωγής β-λακταμάσης σε κλινικά είδη <i>Prevotella</i> με τη χρήση MALDI-TOF MS	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996420300962
Χρήση MALDI-TOF MS για τη δημιουργία πλατφόρμας σε συνδυασμό με μηχανική μάθηση για τη κατασκευή μοντέλου ταχείας αναγνώρισης του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη <i>Staphylococcus aureus</i>	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701220308253
Βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου GC-MS/MS για τη μέτρηση προϊόντων βλάβης του DNA που προκαλούνται από οξειδωτικά καθώς και του ρόλου των αντιοξειδωτικών στο μηχανισμό οξείδωσης	GC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708521001795
Ταχεία ανάλυση των περιεχομένων πολυυδροξυαλκανοϊκού και των μονομερών του συνθέσεων με χρωματογραφία πυρόλυσης-αερίου σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Py-GC / MS)	Py-GC / MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021001392

Εικόνα IV

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μιγμάτων μικροπλαστικών παρουσία ανθρακικού ασβεστίου με πυρόλυση αερίου σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Py-GC / MS)	Py-GC / MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165237021001741
Χρήση της μεθόδου GC-MS για ανάλυση μεταβολικής των ούρων των κληρονομικών μεταβολικών παθήσεων και έλεγχος σταθερού μεταβολικού βιοδείκτη	GC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X21004343
Χρήση της μεθόδου GC-MS για την παρακολούθηση του θεραπευτικού φαρμάκου της ατομοξετίνης (ανάλυση της ατομοξετίνης σε δείγματα πλάσματος)	GC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X21000382
Χρήση των μεθόδων HPLC, GC-MS και FT-IR για την ανάλυση βιοδραστικών φυτοχημικών που υπάρχουν σε υδατικό εκχύλισμα φύλλου <i>Clerodendrum phlomidis</i> με σκοπό τη χρήση τους σε φάρμακα	HPLC, GC-MS, FT-IR	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785321040141
Χρήση της μεθόδου GC-MS/MS για προσδιορισμό και τη φαρμακοκινητική της σκλαρεόλης στο πλάσμα αρουραίου μετά από ενδοφλέβια χορήγηση	GC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023221001835
Χρήση της μεθόδου GC-MS για την ανακάλυψη αντιδράσεων νιτρώδους στο αιμολυτικό χρησιμοποιώντας ¹⁸ O-labelled nitrite και θειόλες με βάση την κυστεΐνη	GC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269720305571
Χρήση των μεθόδων GC-MS και GC-IR για την ανάλυση της μεθυλενοδιοξυφαινυλαλκυλαμίνης (methylenedioxyphenylalkylamine) σε ψυχοδραστικά φάρμακα 25X-NBOMe	GC-MS, GC-IR	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468170921000102
Χρήση της μεθόδου GS-MS για τον προσδιορισμό της θειικής υδροξυχλωροκίνης που χρησιμοποιείται σε ασθενείς με COVID-19 σε δείγματα ούρων, ορού και σάλιου	GS-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177921000150

Εικόνα V

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Χρήση των τεχνικών GC-MS και LC-MS για την ανίχνευση διαφόρων μεταβολιτών σε μελέτες της μεταβολικής	GC-MS, LC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708520313959
Χρήση της τεχνικής GC-MS σε εγκληματολογικές έρευνες, για συγκριτικές μελέτες ή μελέτες προέλευσης δειγμάτων του εδάφους, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η προέλευσή τους.	GC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020305956
Ποσοτικός προσδιορισμός των τροποποιήσεων mRNA, έπειτα από ενζυμική τροποποίηση του 5' cap (5' cap=χαρακτηριστικό του ευκαρυωτικού mRNA)	LC-QQQ-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104620232100150X
Μέτρηση της ορεξίνης-A στη ναρκοληψία (νευρολογική διαταραχή)	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912021000254
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της ετεξιλικής δαβιγατράνης και των ενεργών μεταβολιτών της στο ανθρώπινο πλάσμα και την εφαρμογή της σε φαρμακοκινητική μελέτη	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708521003319
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για την ταυτόχρονη ανάλυση των μεταβολιτών της βιταμίνης D3	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023221001343
Χρήση της τεχνικής LC-MS για το χαρακτηρισμό μη ζευγαρωμένων κυστεϊνών σε μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1	LC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269721000737
Μεταβολική ανάλυση με τη χρήση της τεχνικής LC-MS για την αποτελεσματική αναγνώριση και σχετική ποσοτικοποίηση των βιοδιαθέσιμων φαινολικών δεικτών κακάου στα ανθρώπινα ούρα	LC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621012048

Εικόνα VI

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
<p>Ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση της οξυκωδόνης, της τραμαδόλης και της φαιντανύλης και των μεταβολιτών τους (νοροξικοδόνη, οξυμορφόνη, Ο-δεμεθυλτραμαδόλη, Ν-δεμεθυλτραμαδόλη και νορφεντανύλη) σε ανθρώπινο πλάσμα και ολικό αίμα που συλλέγονται μέσω της βενεπισκόπησης και της ογκομετρικής απορροφητικής μικρο-δειγματοληψίας</p>	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073170852100282X
<p>Καθορισμός της μεθόδου LC-MS / MS για τον προσδιορισμό της αλοπρίνης στο πλάσμα αρουραίου και η εφαρμογή της στην προκλινική φαρμακοκινητική</p>	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023221001513
<p>Προσδιορισμός αντιισταμινικών φαρμάκων σε δείγματα επιφανειακών υδάτων</p>	SPE-LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X20338169
<p>Μελέτη των οξυγονωμένων λιπιδίων και αναζήτηση πιθανών βιοδεικτών</p>	LC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993621001904
<p>Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον γρήγορο προσδιορισμό της πηγής της πρόσμιξης διμερούς μεθυλενίου σετρορελίξης στη σετρορελίξη (cetrotrelax) και προσδιορίστηκε η θέση αντίδρασης της πρόσμιξης διμερούς μεθυλενίου σετρορελίξης</p>	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708521000583
<p>Η μη επεμβατική ανίχνευση της ανθρώπινης δεϋδροεπιανδροστερόνης, της προγεστερόνης και της τεστοστερόνης χρησιμοποιώντας τη τεχνική LC-MS/MS αποκάλυψε επιπτώσεις των αντισυλληπτικών χαπιών / συσκευών και της μεγάλης απώλειας σωματικού βάρους στην πρόβλεψη της ωορρηξίας</p>	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023221001963

Εικόνα VII

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον προσδιορισμό 42 νευρολογικών και μεταβολικά σημαντικών μορίων στα ούρα	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023221003275
Βελτιστοποίηση και σύγκριση δύο προσεγγίσεων μικροδειγματοληψίας για ανάλυση LC-MS / MS μιας ομάδας ανοσοκατασταλακτικών σε δείγματα αίματος	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352554121000607
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναστολέων της 5-φωσφοδιεστεράσης, στο ανθρώπινο πλάσμα	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157002322100310X
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για ποσοτικό προσδιορισμό της 3-θειικής και 3-γλυκουρονίδης 25-υδροξυβιταμίνης D3.	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X21000246
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ενδογενούς κορτιζόλης στο ανθρώπινο αίμα	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708521001400
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για την ανάλυση σεροτονίνης στον ανθρώπινο ορό σε συνδυασμό με καθίζηση πρωτεϊνών ενός σταδίου για κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με καρκινοειδείς όγκους	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157002322031271X
Ποσοτικός προσδιορισμός του βιοδείκτη αλκοόλης PEth 16:0/18:1 και άλλων 33 ενώσεων με χρήση της τεχνικής LC-MS/MS	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056871920302707
Ανάλυση ανέπαφης πρωτεΐνης με την τεχνική LC-MS για την καταγραφή των ποιοτικών χαρακτηριστικών των βιοφαρμακευτικών προϊόντων	LC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166921000756

Εικόνα VIII

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βιοδείκτη τριμεθυλαμίνης-N-οξειδίου (TMAO) και άλλων βιοδεικτών καρδιαγγειακής νόσου (CVD)	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177921000277
Προσδιορισμός συγκεκριμένων μεταβολιτών της εννεύλοφαινόλης στα ούρα από online-SPE-LC-MS/MS ως νέοι βιοδείκτες έκθεσης στον άνθρωπο	Online-SPE-LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023221002750
Ανάπτυξη της τεχνικής LC-MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αμπικιλίνης και της σουλβακτάμης στο ανθρώπινο πλάσμα και την εφαρμογή της σε κλινική φαρμακοκινητική μελέτη	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073170852100011X
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον προσδιορισμό της υποφίφιας για τη θεραπεία κατά του ιού SARS-CoV-2 φαβιπιραβίρης (favipiravir), στο ανθρώπινο πλάσμα	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708521001680
Ανάπτυξη μιας απλής και ταχείας μεθόδου για τον προσδιορισμό του μη δεσμευμένου κλάσματος της ντολουτεγκραβίρης, της ραλτεγκραβίρης και της δαρουναβίρης στο ανθρώπινο πλάσμα χρησιμοποιώντας υπερδιήθηση και LC-MS/MS	Ultrafiltration,LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708521000352
Χρήση των τεχνικών εκχύλιση στερεάς φάσης και LC-MS/MS για την ποσοτική ανάλυση της δέλτα-9-τετραϋδροκανναβινόλης (THC, το κύριο δραστικό συστατικό της κάνναβης) στο αίμα	SPE,LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073821000645
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον προσδιορισμό της λινκομυκίνης στο ανθρώπινο αίμα με σκοπό την εφαρμογή σε περίπτωση αλλεργίας στην ιατροδικαστική επιστήμη	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1752928X20302018

Εικόνα IX

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για ποσοτική βιοανάλυση της ρανιβιζουμάμπης και της μπεβασιζουμάμπης στο ανθρώπινο πλάσμα μετά από χορήγηση στα μάτια.	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023220313507
Χρήση των τεχνικών LC-MS/MS και LC-Q / TOF-MS για την αξιολόγηση της καταστολής των ιόντων που προκαλούνται από φάρμακα και μετρίασμός των επιπτώσεων αυτών	LC-MS / MS, LC-Q / TOF - MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023219315223
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ισταμίνης	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020313473
Χρήση των τεχνικών LC-MS/MS και GC-MS/MS για την ταυτόχρονη ανάλυση 300 καταλοίπων φυτοφαρμάκων στα μαλλιά και εφαρμογή της τεχνικής αυτής στη βιοπαρακολούθηση των εργαζομένων στη γεωργία	LC-MS/MS, GC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653521006846
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της φαινοβαρβιτάλης, της φαινυτοΐνης και της τοπιραμάτης από δείγματα μαλλιών. Τα παραπάνω αποτελούν αντιπροσωπευτικά αντιεπιληπτικά φάρμακα και απαντώνται συχνά σε τοξικολογικές εξετάσεις	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056871920302628
Χρήση των τεχνικών LC-MS/MS και LC-MS/HRMS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της νιβολουμάμπης (nivolumab) στο ανθρώπινο πλάσμα	LC-MS/MS,LC-MS/HRMS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020311802
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τον προσδιορισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πιθανών γονοτοξικών προσμείξεων (IMP A και B) στη φαρμακευτική ουσία της εφινάκοναζόλης	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785320368188

Εικόνα X

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για ανάλυση του C-πεπτιδίου στον ανθρώπινο ορό το οποίο χρησιμοποιείται ως δείκτης ενδογενούς έκκρισης ινσουλίνης στην εκτίμηση της υπολειπόμενης λειτουργίας των β-κυττάρων στον διαβήτη και στη διαγνωστική επεξεργασία της υπογλυκαιμίας	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667145X20300018
Χρήση των τεχνικών LC-MS/MS και NMR για το προσδιορισμό και χαρακτηρισμό προϊόντων αναγκαστικής αποικοδόμησης της βορτιοξετίνης (Η βορτιοξετίνη είναι ένα νέο πολυτροπικό αντικαταθλιπτικό φάρμακο που επηρεάζει τα σεροτονινεργικά και νοραδρενεργικά συστήματα)	LC-MS/MS,NMR	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708520313285
Ανάπτυξη τεχνολογίας κατακερματισμού ιόντων (AIF) βασισμένη σε LC-MS για μη στοχευμένη ανάλυση στερολών σε βιολογικά δείγματα.	LC-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267020310904
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS με σκοπό τη διερεύνηση των διαφορών του περιεχομένου των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος σε ένα μοντέλο ποντικού καρκίνου του μαστού	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708520316496
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για γρήγορο προσδιορισμό διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης αλλά και σύνθετες καθινόνες σε δείγματα ολικού αίματος	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X20338376
Χρήση της τεχνικής LC-MS-TOF για τον ποσοτικό προσδιορισμό ασκορβικού και ουρικού οξέος σε βιολογικά δείγματα.	LC-MS-TOF	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023221000684
Χρήση της τεχνικής MALDI-TOF-MS για την άμεση ανάλυση της γλυκοζυλίωσης hCGβcf σε φυσιολογική και μη φυσιολογική εγκυμοσύνη	MALDI-TOF-MS	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24905406/

Εικόνα XI

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Χρήση της τεχνικής MALDI-TOF-MS με σκοπό την ανάλυση των μεταβολών που προκαλούνται από την ακτινοβολία στα λιπιδώματα του ορού των ασθενών με καρκίνο κεφαλής και λαιμού	MALDI-TOF-MS	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4013650/
Χρήση της τεχνικής LC-TOF-MS για τη διερεύνηση των παραλλαγών των ενδογενών μεταβολιτών σε κύτταρα μυελού των οστών και πλάσμα σε ποντίκια C3H/He που εκτίθενται σε βενζόλιο	LC-TOF-MS	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3975436/
Χρήση των τεχνικών MALDI-TOF MS ή LC-MS/MS και της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης για τη ταυτοποίηση των πρωτεΐνες ανθρώπινου σπέρματος και τη σχέση τους με μια μεταγραφική ανάλυση	MALDI-TOF-MS ή LC-MS/MS, δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1642431X1730205X
Πολυλειτουργική διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων για τη μέτρηση των φυτοοιστρογόνων στο γάλα, τα δημητριακά και τη βρεφική τροφή με LC-MS/MS και προσδιορισμό της οιστρογονικής δραστηριότητάς τους χρησιμοποιώντας μεταγραφική ανάλυση	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267008019880
Χρήση της τεχνικής LC-MS/MS για τη διερεύνηση των μοριακών αποτελεσμάτων των συμπληρωμάτων γλυκοζαμίνης, η οποία είναι μία εναλλακτική λύση έναντι των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, για τη μείωση του πόνου, της φλεγμονής και της διατήρησης υγιών αρθρώσεων	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535947620337580
Χρήση της τεχνικής GC/Q-TOF-MS με σκοπό την άντληση πληροφοριών για την οστεοαρθρίτιδα μέσω ολοκληρωμένης ανάλυσης της μεταβολικής και της μεταγραφικής	GC/Q-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898120303260

Εικόνα XII

Εφαρμογή	Τεχνική	Αναφορές
Προσδιορισμός της τεστοστερόνης στον ορό και το σάλιο με τη τεχνική LC-MS/MS με εφαρμογή σε κλινικά και εγκληματολογικά δείγματα	LC-MS/MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073170852031709X
Χρήση της τεχνικής MALDI-TOF-MS για την αξιολόγηση του διηθητικού χαρτιού ως μέσου μεταφοράς αδραντοποιημένων βακτηρίων για αναγνώριση	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701219310814
Αξιολόγηση του MALDI-TOF-MS ως εργαλείου για την ανίχνευση του βακτηρίου <i>Listeria</i> η μονοκυτταρογόνος, απευθείας από επιλεκτικό ζωμό εμπλουτισμού από δείγματα τροφίμων και κοπράνων	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770122030169X
Μια συνδυασμένη προσέγγιση της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF και της πολυμεταβλητής ανάλυσης ως πιθανό εργαλείο για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 σε ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093420302433
Χρήση της τεχνικής MALDI-TOF-MS για την ανάλυση των κύριων συστατικών των παθογόνων βακτηρίων που μεταδίδονται από ολόκληρα κύτταρα	MALDI-TOF-MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269719312138
Χρήση της τεχνικής MALDI-TOF-MS για τη μελέτη της επίδρασης της καθυστέρησης ανάλυσης θετικών καλλιιεργειών αίματος, όσον αφορά την αναγνώριση των βακτηρίων	MALDI-TOF MS	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701220307430

Εικόνα XIII