

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Μέρος Πρώτο: Βασική Θεωρία, Οργανολογία και Τεχνικές Προετοιμασίας Δειγμάτων

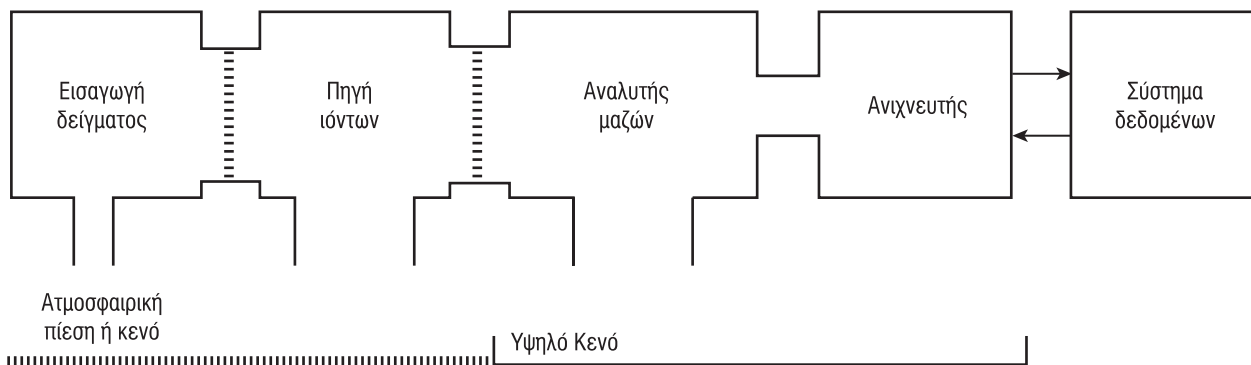
Οι αρχές που αποτελούν τη βάση της φασματομετρίας μαζών (mass spectrometry, MS) προϋπάρχουν από όλες τις βασικές τεχνικές που περιγράφονται στο βιβλίο αυτό. Οι βασικές αρχές χρονολογούνται από τα τέλη του 1890, όταν ο J. J. Thomson καθόρισε τη σχέση της μάζας ως προς το φορτίο του ηλεκτρονίου, και ο Wien μελέτησε τη μαγνητική εκτροπή δέσμης ιόντων στην άνοδο και προσδιόρισε ότι τα ιόντα αυτά ήταν θετικά φορτισμένα. Και οι δύο τιμήθηκαν με το Βραβείο Νόμπελ για τα επιτεύγματα τους (ο Thomson το 1906 και ο Wien το 1911). Την περίοδο 1912-1913, ο J. J. Thomson μελέτησε τα φάσματα μαζών ατμοσφαιρικών αερίων και απέδειξε την ύπαρξη του ισότοπου Ne-22 σε ένα δείγμα του Ne-20, τεκμηριώνοντας έτσι ότι τα στοιχεία μπορούσαν να έχουν και ισότοπα. Το πρώτο φασματόμετρο μαζών, όπως γνωρίζουμε σήμερα, κατασκευάστηκε από τον A. J. Dempster το 1918. Εν τούτοις, η μέθοδος της φασματομετρίας μαζών δεν βρήκε ευρεία χρήση στην επιστημονική κοινότητα μέχρι και περίπου 50 χρόνια αργότερα, όταν κατασκευάστηκαν αξιόπιστα και οικονομικά προσιτά όργανα.

Η συνεχής ανάπτυξη των τεχνικών της εισαγωγής δείγματος και του ιοντισμού για μεγάλου μοριακού βάρους (MB) ενώσεις και βιολογικά δείγματα στις δεκαετίες του 1980 και 1990 εισήγαγε την τεχνική της φασματομετρίας μαζών σε μια νέα κοινότητα ερευνητών. Η κατασκευή και διάθεση στην επιστημονική κοινότητα εύκολα συντηρούμενων και χαμηλότερου-κόστους οργάνων έχει κάνει τη φασματομετρία μαζών μια αναγκαία τεχνική σε αρκετά πεδία, πολύ διαφορετικά από αυτά στα εργαστήρια των Thomson και Wien. Σήμερα, η βιομηχανία της βιοτεχνολογίας χρησιμοποιεί τη φασματομετρία μαζών στην ανάλυση της ακολουθίας πρωτεϊνών, ολιγονουκλεοτιδίων και πολυσακχαριτών. Η φαρμακευτική βιομηχανία χρησιμοποιεί τη φασματομετρία μαζών σε όλες τις φάσεις της διαδικασίας ανάπτυξης φαρμάκων, από την ανακάλυψη ενώσεων οδηγών και την ανάλυση δομής, μέχρι την ανάπτυξη συνθετικών διαδικασιών, τη συνδυαστική χημεία, τη φαρμακοκινητική και το μεταβολισμό των φαρμάκων. Η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται στις αναλύσεις αίματος και ούρων για οτιδήποτε από την παρουσία και τα επίπεδα ορισμένων ενώσεων, τα οποία είναι «δείκτες» για την κατάσταση ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων πολλών καρκίνων, μέχρι την εύρεση της παρουσίας και την ποσοτική ανάλυση παράνομων φαρμάκων ή αναβολικών ουσιών. Οι περιβαλλοντολόγοι βασίζονται στη φασματομετρία μαζών για τον έλεγχο της ποιότητας του νερού και του αέρα, ενώ οι γεωλόγοι την χρησιμοποιούν για τον ποιοτικό έλεγχο των κοιτασμάτων πετρελαίου. Η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται επίσης σε ελέγχους ρουτίνας στην ασφάλεια των αεροδρομίων και στην εγκληματολογική έρευνα, για την ανακάλυψη εκρηκτικών ουσιών σε ίχνη.

Μέχρι σήμερα έχουν απονεμηθεί τέσσερα Βραβεία Νόμπελ σε ερευνητικά πεδία που σχετίζονται άμεσα με τη φασματομετρία μαζών: J. J. Thomson (Νόμπελ Φυσικής, 1906) για «θεωρητικές και πειραματικές έρευνες στη μετάδοση του ηλεκτρισμού μέσω αερίων»· F. W. Aston (Νόμπελ Χημείας, 1922) για «την ανακάλυψη ισότόπων σε ένα μεγάλο αριθμό μη ραδιενεργών στοιχείων με φασματόμετρο μαζών»· W. Paul (Νόμπελ Φυσικής, 1989) «για την ανάπτυξη της τεχνικής της παγίδας ιόντων»· και πιο πρόσφατα στους J. B. Fenn και K. Tanaka (Χημείας, 2002) «για την ανάπτυξη μεθόδων ήπιου ιοντισμού εκρόφησης σε αναλύσεις βιολογικών μακρομορίων με φασματομετρία μαζών».

3.1 ΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΩΝ: ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

Στην **απλούστερη** του μορφή, ένα φασματόμετρο μαζών αποτελείται από πέντε τμήματα (Εικόνα 3.1), και καθένα από αυτά θα αναπτυχθεί χωριστά σε αυτό το κεφάλαιο. Το πρώτο είναι το τμήμα εισαγωγής



ΕΙΚΟΝΑ 3.1. Τα τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών (Μεταφορά από Gross, J. H., Mass Spectrometry: A Textbook, Springer, Berlin, 2004. Ανατύπωση κατόπιν αδείας.)

δείγματος (Ενότητα 3.2), στο οποίο εισάγεται το δείγμα από το περιβάλλον του εργαστηρίου (1 atm) στον χαμηλότερης πίεσης θάλαμο του φασματομέτρου μαζών. Οι πιέσεις εντός του φασματομέτρου μαζών ποικίλουν από λίγα mm Hg στην πηγή χημικού ιοντισμού σε λίγα μm Hg στις περιοχές του αναλυτή μαζών και του ανιχνευτή του οργάνου. Το δείγμα κατόπιν οδηγείται στην πηγή ιοντισμού (Ενότητα 3.3), όπου τα μόρια του δείγματος ιοντίζονται στην αέρια φάση. Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί ορισμένα όργανα, που συνδυάζουν την εισαγωγή δείγματος και την πηγή ιοντισμού υπό συνθήκες περιβάλλοντος, απλοποιώντας έτσι πολύ την διαδικασία. Τα ιόντα στη συνέχεια επιταχύνονται από ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Μετά, στον αναλυτή μαζών (Ενότητα 3.4) διαχωρίζονται τα ιόντα του δείγματος βάσει της σχέσης μάζα προς φορτίο (m/z). Ο πληθυσμός των ιόντων καταμετρείται από τον ανιχνευτή (Ενότητα 3.5), και τα σήματα καταγράφονται και επεξεργάζονται από το σύστημα δεδομένων, έναν απλό ηλεκτρονικό υπολογιστή (PC). Το αποτέλεσμα από το σύστημα δεδομένων είναι η καταγραφή του φάσματος μαζών—ένα γράφημα του πληθυσμού των ιόντων, που ανιχνεύθηκαν ως συνάρτηση με τον λόγο m/z .

3.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Όταν εξετάζουμε με λεπτομέρεια καθεμιά από τις βασικές λειτουργίες ενός φασματομέτρου μαζών, βλέπουμε ότι το φασματόμετρο μαζών είναι κάπως πιο πολύπλοκο απ' ό,τι μόλις περιγράφηκε. Για να σχηματισθούν τα προς ανάλυση ιόντα, πρέπει να εισαχθεί στην **πηγή ιόντων** (θάλαμος ιοντισμού) ένα ρεύμα μορίων δείγματος, όπου και γίνεται ο ιοντισμός. Το σύστημα **εισαγωγής δείγματος** παρέχει αυτό το ρεύμα μορίων.

Ένα δείγμα που μελετάται στο φασματόμετρο μαζών μπορεί να είναι αέριο, υγρό ή στερεό. Αρκετό από το δείγμα θα πρέπει να μεταβεί στην αέρια φάση για να προκύψει ένα ρεύμα μορίων, το οποίο εισέρχεται στο θάλαμο ιοντισμού. Στα δείγματα αερίων, βεβαίως, η ουσία είναι ήδη ατμοποιημένη, και έτσι χρησιμοποιείται ένα απλό σύστημα εισαγωγής. Σε αυτό το σύστημα εισαγωγής η πίεση είναι χαμηλή, όχι όμως τόσο, όση στο θάλαμο ιοντισμού. Το δείγμα εισάγεται σε ένα μεγαλύτερο θάλαμο, απ' όπου τα μόρια του αερίου οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού, που βρίσκεται σε χαμηλότερη πίεση. Για να διασφαλιστεί ότι μέσα από το θάλαμο ιοντισμού διέρχεται ένα σταθερό ρεύμα μορίων, το αέριο δείγμα διοχετεύεται μέσα από μια μικρή οπή, την **μοριακή οπή**, πριν να εισέλθει στο θάλαμο. Το ίδιο σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για πτητικά υγρά ή στερεά. Για λιγότερο πτητικές ουσίες, το σύστημα μπορεί να σχεδιαστεί ώστε να συνδέεται με έναν φούρνο, ο οποίος θερμαίνει το δείγμα και αυξάνει την τάση ατμών του. Πρέπει ωστόσο να ληφθεί φροντίδα, ώστε να μη θερμαίνεται το δείγμα σε θερμοκρασία, όπου μπορεί να αποσυντεθεί.

Για μη πτητικά δείγματα, πρέπει να χρησιμοποιηθούν άλλα συστήματα εισαγωγής δείγματος. Ένα σύνηθες σύστημα είναι η μέθοδος της **απ' ευθείας εισαγωγής δείγματος (direct probe)**. Το δείγμα τοποθετείται σε ένα βρόγχο ή ακίδα λεπτού σύρματος, και μετά εισέρχεται στο θάλαμο ιοντισμού μέσω

μιας θύρας κενού. Το σύρμα αυτό είναι τοποθετημένο κοντά στην πηγή ιοντισμού και μπορεί να θερμαίνεται, συντελώντας ώστε οι ατμοί από το δείγμα να αναπτύσσονται κοντά στη δέσμη των ηλεκτρονίων που προκαλεί τον ιοντισμό. Ένα τέτοιο σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη δειγμάτων μορίων με τάσεις ατμών μικρότερες από 10^{-9} mm της στήλης Hg σε θερμοκρασία δωματίου.

Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι εισαγωγής δείγματος στις οποίες δεν απαιτείται η προεργασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε διάφορες τεχνικές χημικού ιοντισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI), το δείγμα τοποθετείται σε ένα ρεύμα ιοντισμένου αερίου (Ενότητα 3.3B) ή εκνέφωμα (aerosol) διαλύτη (Ενότητα 3.3Δ), μεταξύ της πηγής ιοντισμού και της εισόδου στον αναλυτή μαζών.

Τα πλέον εύχρηστα συστήματα εισαγωγής δείγματος κατασκευάζονται ενώνοντας έναν χρωματογράφο με το φασματόμετρο μαζών. Σε αυτή η τεχνική εισαγωγής δείγματος, ένα πολύπλοκο μίγμα συστατικών μπορεί να διαχωριστεί στον χρωματογράφο, και κατόπιν λαμβάνεται το φάσμα μαζών κάθε συστατικού. Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ανάγκη για γρήγορη λήψη του φάσματος μαζών. Το όργανο θα πρέπει να καταγράψει το φάσμα μαζών κάθε συστατικού του μείγματος πριν εξέλθει το επόμενο συστατικό από τη στήλη χρωματογραφίας. Χρησιμοποιώντας χρωματογράφους που φέρουν χρωματογραφικές στήλες υψηλής διαχωριστικής ανάλυσης, στις περισσότερες περιπτώσεις οι ενώσεις ενός μίγματος διαχωρίζονται τελείως χωρίς να υπάρχει επικάλυψη των εκλούμενων κορυφών. Το όργανο θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα να επιτυγχάνει τουλάχιστον μια σάρωση ανά δευτερόλεπτο στην περιοχή των τιμών m/z που μας ενδιαφέρει. Ακόμη περισσότερες σαρώσεις είναι απαραίτητες αν πρόκειται να αναλυθεί μια πιο στενή περιοχή μαζών. Το φασματόμετρο μαζών που συνδυάζεται με έναν χρωματογράφο θα πρέπει να είναι σχετικά συμπαγές και επιδεκτικό υψηλής ανάλυσης.

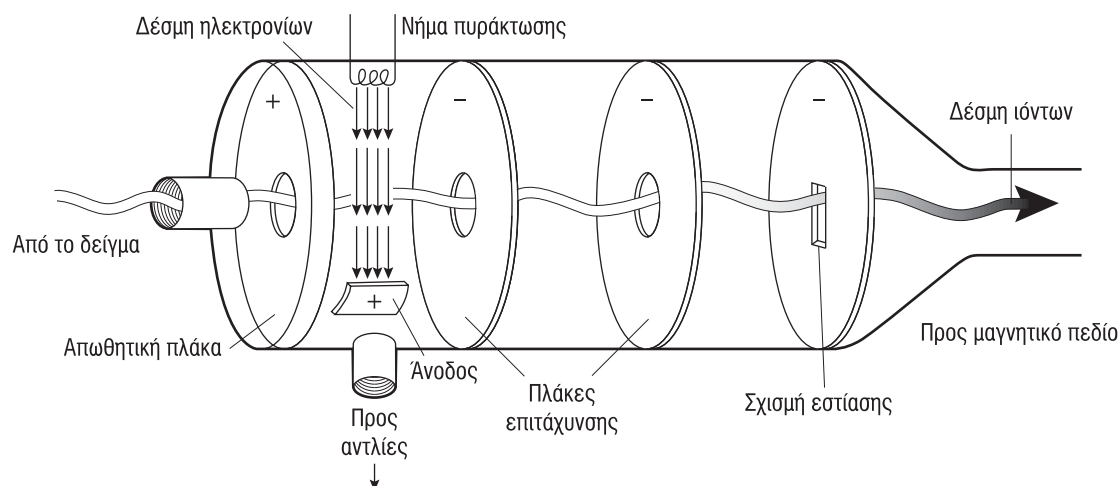
Στην συνδυαστική τεχνική **αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS)**, το αεροποιημένο δείγμα που προέρχεται από ένα αέριο χρωματογράφο εισέρχεται μέσω μιας βαλβίδας σε ένα σωλήνα, όπου περνά από μια μοριακή οπή. Μέρος του δείγματος αυτού εισέρχεται στον θάλαμο ιοντισμού του φασματομέτρου μαζών. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατό να ληφθεί το φάσμα μαζών κάθε συστατικού ενός μίγματος που εγχύθηκε στην στήλη του αερίου χρωματογράφου. Στη πράξη, το φασματόμετρο μαζών παίζει το ρόλο ανιχνευτή. Παρομοίως, η τεχνική της **υψηλής-ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (HPLC-MS, ή πιο απλά LC-MS)** συνδυάζει ένα όργανο HPLC με ένα φασματόμετρο μαζών μέσω μιας ειδικής σύνδεσης. Οι ενώσεις που εκλύονται από τη στήλη HPLC ανιχνεύονται από το φασματόμετρο μαζών, και το φάσμα μαζών τους αναλύεται και συγκρίνεται με φάσματα που βρίσκονται στη βιβλιοθήκη του υπολογιστή του οργάνου.

3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ

A. Ιοντισμός με Δέσμη Ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI)

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο εισαγωγής δείγματος, όταν το ρεύμα μορίων ενός δείγματος εισέλθει στο φασματόμετρο μαζών, τα μόρια του δείγματος θα πρέπει να μετατραπούν σε φορτισμένα σωματίδια από την **πηγή ιοντισμού** πριν να αναλυθούν και να ταυτοποιηθούν. Η απλούστερη και πιο συνήθης μέθοδος για μετατροπή του δείγματος σε ιόντα είναι ο **ιοντισμός με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI)**. Στην τεχνική EI-MS, μια δέσμη υψηλής-ενέργειας ηλεκτρονίων εκβάλλεται από ένα **νήμα πυράκτωσης** το οποίο έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία μερικών χιλιάδων βαθμών Κελσίου. Αυτά τα υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια προσβάλλουν τη δέσμη των μορίων τα οποία προέρχονται από το σύστημα εισαγωγής δείγματος. Με τη σύγκρουση ηλεκτρονίων-μορίων αποβάλλεται ένα ηλεκτρόνιο από το μόριο, δημιουργώντας ένα κατιόν. Μια **απωθητική πλάκα**, που φέρει ένα θετικό ηλεκτρικό δυναμικό, κατευθύνει τα νεοδημιουργηθέντα ιόντα προς μια σειρά από **πλάκες επιτάχυνσης**. Η μεγάλη διαφορά δυναμικού, (μεταξύ 1 και 10 KV) που εφαρμόζεται κατά μήκος των πλακών επιτάχυνσης δημιουργεί μια δέσμη ταχέως κινουμένων θετικών ιόντων. Μια ή περισσότερες **σχισμές εστίασης** κατευθύνουν τα ιόντα ως μια ομοιόμορφη δέσμη (Εικόνα 3.2).

Τα περισσότερα μόρια του δείγματος δεν ιοντίζονται αλλά συνεχώς απομακρύνονται από αντλίες κενού που είναι συνδεδεμένες στον θάλαμο ιοντισμού. Μερικά από τα μόρια μετατρέπονται σε αρνητικά



ΕΙΚΟΝΑ 3.2. Θάλαμος στην τεχνική ιοντισμού με δέσμη ηλεκτρονίων (EI).

ιόντα μέσω πρόσληψης ηλεκτρονίων. Η απωθητική πλάκα απορροφά αυτά τα αρνητικά ιόντα. Είναι δυνατό να αντιστραφεί η πολικότητα της απωθητικής και των πλακών επιτάχυνσης σε κάποια όργανα, επιτρέποντας έτσι την ανάλυση των μαζών και των αρνητικών ιόντων (ανιόντων), τα οποία δημιουργούνται από την πρόσληψη ηλεκτρονίων, όταν τα μόρια του δείγματος προσκρούουν με τη δέσμη ηλεκτρονίων. Μια μικρή ποσότητα των θετικών ιόντων που σχηματίζονται μπορούν να έχουν φορτίο μεγαλύτερο του ενός (με απώλεια περισσότερων από ένα ηλεκτρονίων). Αυτά επιταχύνονται κατά τον ίδιο τρόπο όπως και τα απλώς φορτισμένα θετικά ιόντα.

Η ενέργεια που απαιτείται για να εκτοπιστεί ένα ηλεκτρόνιο από ένα άτομο ή μόριο είναι το **δυναμικό ιοντισμού** ή η **ενέργεια ιοντισμού** του. Οι περισσότερες οργανικές ενώσεις έχουν δυναμικά ιοντισμού μεταξύ 8 και 15 eV. Εν τούτοις, για να δημιουργηθούν αποτελεσματικά τα απαραίτητα ιόντα, θα πρέπει να προσβληθεί η δέσμη των μορίων με μια δέσμη ηλεκτρονίων δυναμικού 50 έως 70 eV. Για να ληφθούν αναπαραγόμενα φάσματα, όσον αφορά τους τύπους θραυσματοποίησης, που να μπορούν εύκολα να συγκριθούν με τις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιείται μια σταθερή δέσμη ηλεκτρονίων 70-eV.

Η τεχνική EI-MS έχει διακριτά πλεονεκτήματα για τη λήψη φασμάτων μαζών ρουτίνας μικρών οργανικών μορίων. Το λειτουργικό σύστημα της τεχνικής EI είναι οικονομικό και αξιόπιστο. Η υπερβολική κινητική ενέργεια που μεταδίδεται στο δείγμα κατά τη διαδικασία του ιοντισμού οδηγεί σε εκτεταμένη θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος (Κεφάλαιο 4). Η μορφή θραυσματοποίησης κάθε ένωσης είναι αναπαραγόμενη, και υπάρχουν διαθέσιμες πολλές βιβλιοθήκες δεδομένων φασμάτων EI-MS. Αυτό μας επιτρέπει να συγκρίνουμε το φάσμα μαζών μιας ένωσης του δείγματος με τα δεδομένα της βιβλιοθήκης φασμάτων χρησιμοποιώντας έναν υπολογιστή, απλοποιώντας έτσι τη διαδικασία προσδιορισμού ή επιβεβαίωσης της ταυτότητας μιας ένωσης.

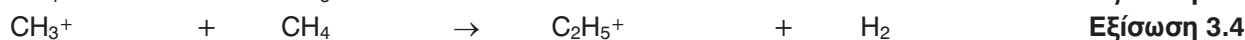
Η περαιτέρω θραυσματοποίηση του αρχικά παραγόμενου μοριακού ιόντος υπό τις συνθήκες ιοντισμού EI μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως μειονέκτημα. Ορισμένες ενώσεις θραυσματοποιούνται τόσο εύκολα ώστε ο χρόνος ζωής του μοριακού ιόντος είναι πολύ σύντομος και δεν ανιχνεύεται από τον αναλυτή μαζών. Έτσι, σε τέτοιες περιπτώσεις δεν μπορεί να προσδιοριστεί η μοριακή μάζα μιας ένωσης (Ενότητα 3.6). Ένα άλλο μειονέκτημα της τεχνικής EI-MS είναι ότι το δείγμα πρέπει να είναι σχετικά πτητικό ώστε να μπορεί να εισέλθει στο θάλαμο ιοντισμού. Εξαιτίας αυτού, είναι δύσκολο να αναλυθούν με EI-MS οι υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις όπως και τα περισσότερα βιομόρια.

B. Χημικός Ιοντισμός (CI)

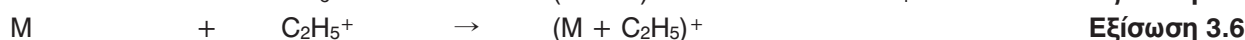
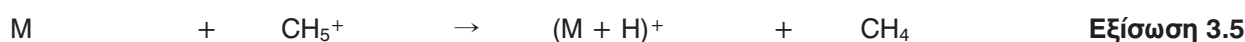
Στην τεχνική **χημικού ιοντισμού-φασματομετρίας μαζών (Chemical Ionization-Mass Spectrometry,**

CI-MS), τα μόρια του δείγματος ενώνονται σε ένα ρεύμα ιοντισμένου αερίου αντιδραστήριου το οποίο είναι σε μεγάλη περίσσεια ως προς το αναλυόμενο δείγμα. Όταν τα μόρια του δείγματος συγκρούονται με το προϊόντισμένο αέριο αντιδραστήριο, ορισμένα από τα μόρια του δείγματος ιοντίζονται με ποικίλους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των: μεταφοράς πρωτονίου, μεταφοράς ηλεκτρονίου και σχηματισμού προϊόντος προσθήκης. Στην τεχνική CI-MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αέριο αντιδραστήριο σχεδόν οποιοδήποτε εύκολα διαθέσιμο αέριο ή πολύ πτητικό υγρό.

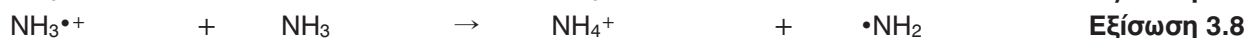
Στα συνήθη αντιδραστήρια ιοντισμού της τεχνικής CI-MS, περιλαμβάνονται τα: μεθάνιο, αμμωνία, ισοβουτάνιο και μεθανόλη. Όταν χρησιμοποιείται το μεθάνιο, ο κυρίαρχος μηχανισμός ιοντισμού που λαμβάνει χώρα είναι η μεταφορά πρωτονίου από το ιόν CH_5^+ στο δείγμα. Σε μικρότερη αναλογία σχηματίζονται ιόντα από το σχηματισμό προϊόντων προσθήκης του C_2H_5^+ ή μεγαλύτερων ομολόγων στο δείγμα. Το μεθάνιο μετατρέπεται σε ιόντα με βάση τις αντιδράσεις που φαίνονται στις Εξισώσεις 3.1-3.4.



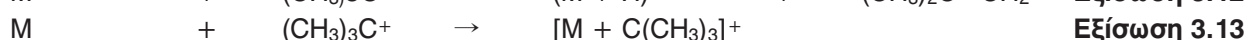
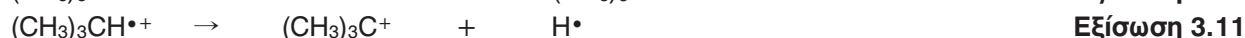
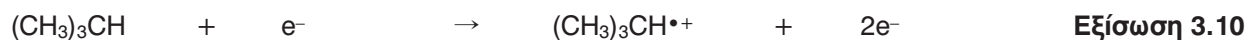
Το μόριο M του δείγματος ιοντίζεται ακολούθως μέσω των αντιδράσεων ιόντος-μορίου που παρατίθενται στις Εξισώσεις 3.5 και 3.6:



Η κατάσταση είναι παρόμοια όταν χρησιμοποιείται ως αέριο αντιδραστήριο η αμμωνία (Εξισώσεις 3.7-3.9):



Χρησιμοποιώντας ως αέριο αντιδραστήριο το ισοβουτάνιο παράγονται *tert*-βούτυλο κατιόντα (Εξισώσεις 3.10 και 3.11), τα οποία εύκολα πρωτονιώνουν τα μόρια του δείγματος (Εξίσωση 3.12). Ο σχηματισμός προϊόντος προσθήκης είναι επίσης πιθανόν να λάβει χώρα στην τεχνική CI-MS χρησιμοποιώντας ισοβουτάνιο (Εξίσωση 3.13).



Η αλλαγή στο αέριο αντιδραστήριο μας επιτρέπει να μεταβάλλουμε την εκλεκτικότητα του ιοντισμού και το βαθμό θραυσματοποίησης των ιόντων. Η επιλογή του αερίου αντιδραστήριου πρέπει να γίνεται προσεκτικά ώστε να είναι αποτελεσματική η **πρωτονίωση των μορίων** του δείγματος από το αέριο αντιδραστήριο, και να διασφαλίζεται ο επαρκής ιοντισμός του δείγματος χωρίς να λαμβάνει χώρα υπερβολική θραυσματοποίηση των μορίων του. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά στη χημική συγγένεια πρωτονίωσης μεταξύ του δείγματος και του αερίου αντιδραστήριου, τόσο μεγαλύτερη είναι η ενέργεια που μεταφέρεται στο δείγμα κατά τη διαδικασία του ιοντισμού. Η περίσσεια ενέργειας παράγει ένα ιόν σε μια υψηλά διεγερμένη δονητική κατάσταση. Αν έχει μεταφερθεί αρκετή περίσσεια κινητικής ενέργειας, το ιόν του δείγματος θα θραυσματοποιηθεί μέσω διάσπασης των ομοιοπολικών του δεσμών. Έτσι, η χρησιμοποίηση ενός αερίου αντιδραστήριου με χημική συγγένεια πρωτονίωσης που να προσεγγίζει πολύ με

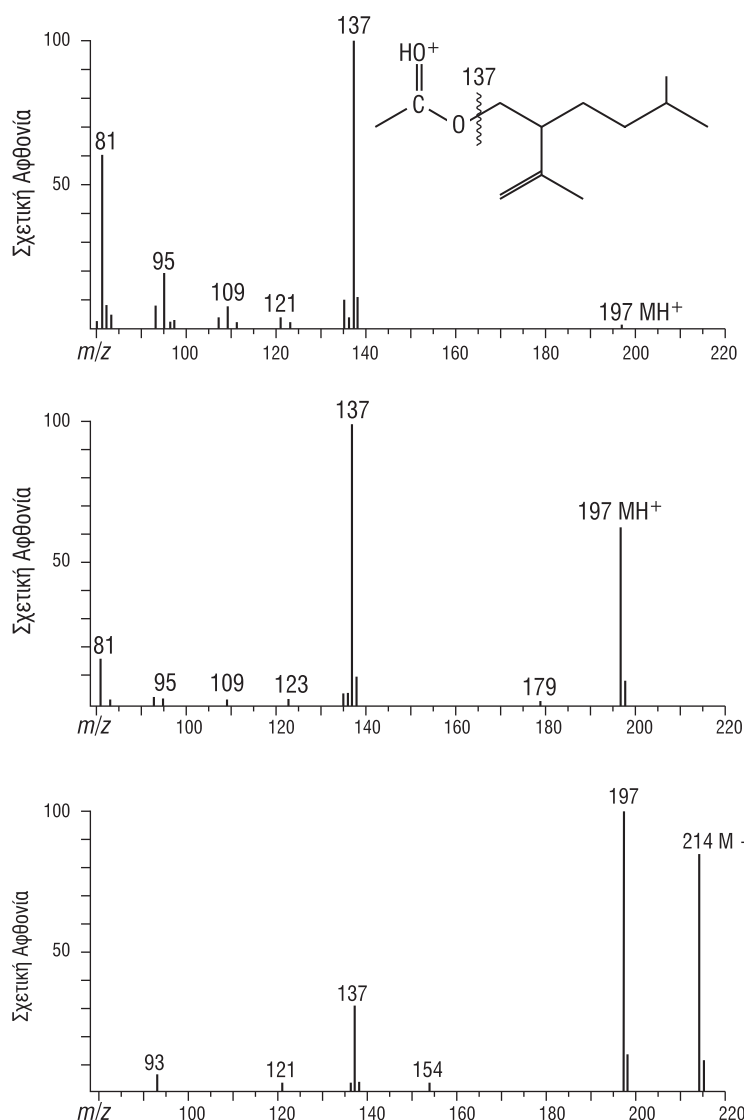
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΑΕΡΙΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΧΗΜΙΚΟΥ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ (CI)				
Αέριο Αντιδραστήριο	Χημική συγγένεια πρωτονίωσης (kcal/mole)	Ιόν(τα) Αντιδραστηρίου	Ιόν(τα) Αναλυτή	Παρατηρήσεις
H ₂	101	H ₃ ⁺	(M + H) ⁺	Οδηγεί σε εκτεταμένη θραυσματοποίηση
CH ₄	132	CH ₅ ⁺ , C ₂ H ₅ ⁺	(M + H) ⁺ , (M + C ₂ H ₅) ⁺	Μικρότερης έκτασης θραυσματοποίηση θραυσματοποίηση απ' ότι χρησιμοποιώντας H ₂ , σχηματίζονται προϊόντα προσθήκης
NH ₃	204	NH ₄ ⁺	(M + H) ⁺ , (M + NH ₄) ⁺	Εκλεκτικός ιοντισμός, μικρής έκτασης θραυσματοποίηση, μερικός σχηματισμός προϊόντων προσθήκης
(CH ₃) ₃ CH	196	(CH ₃) ₃ C ⁺	(M + H) ⁺ , [M + C(CH ₃) ₃] ⁺	Ήπια, εκλεκτική πρωτονίωση, μικρής έκτασης θραυσματοποίηση
CH ₃ OH	182	CH ₃ OH ₂ ⁺	(M + H) ⁺	Παρατηρείται θραυσματοποίηση σε βαθμό ενδιάμεσο μεταξύ της χρήσης μεθανίου και ισοβουτανίου
CH ₃ CN	188	CH ₃ CNH ⁺	(M + H) ⁺	Παρατηρείται θραυσματοποίηση σε βαθμό ενδιάμεσο μεταξύ της χρήσης μεθανίου και ισοβουτανίου

αυτήν του δείγματος, θα έχει ως αποτέλεσμα ένα μεγαλύτερο πληθυσμό μη θραυσματοποιημένων μοριακών ιόντων. Είναι απίθανο, βεβαίως, να γνωρίζει κάποιος την ακριβή χημική συγγένεια πρωτονίωσης ενός δείγματος, αλλά μπορεί να την εκτιμήσει με βάση τις τιμές ενώσεων με παρόμοιες λειτουργικές ομάδες που είναι καταχωρημένες σε πίνακες στη βιβλιογραφία. Μια σύνοψη των πιο κοινών αερίων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην τεχνική CI και των ιδιοτήτων των ιόντων τους παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.

Όπως μπορεί να παρατηρήσει κάποιος στην Εικόνα 3.3, το φάσμα μαζών CI-MS του οξικού λαβαντουλεστέρα (MB = 196) είναι αρκετά διαφορετικό, ανάλογα με το αέριο αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τον ιοντισμό του δείγματος. Στο φάσμα στο πάνω τμήμα της Εικόνας, το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν του οξικού λαβαντουλεστέρα [(M + H)⁺, m/z = 197] φαίνεται ελάχιστα, και η μεγαλύτερη κορυφή στο φάσμα ανήκει στο θραύσμα με m/z = 137. Στο μεσαίο φάσμα, που λήφθηκε χρησιμοποιώντας ως αέριο αντιδραστήριο το ισοβουτάνιο, το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν με m/z = 197 είναι πολύ περισσότερο εμφανές, υπάρχει δηλαδή μικρότερος βαθμός θραυσματοποίησης του, ωστόσο, το θραύσμα με m/z = 137 εξακολουθεί να έχει τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία στο φάσμα. Όταν ο οξικός λαβαντουλεστέρας ιοντίζεται χρησιμοποιώντας αμμωνία, το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν με m/z = 197 (η βασική κορυφή) έχει τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία, και σχεδόν δεν παρατηρείται θραυσματοποίηση. Παρατηρείστε την ύπαρξη στο φάσμα ενός ιόντος προσθήκης [(M + NH₄)⁺, m/z = 214].

Σαν μια πρακτική σημείωση, παρατηρείστε ότι στα φάσματα που λαμβάνονται με συνθήκες CI, οι τιμές στον άξονα m/z αρχίζουν συνήθως πάνω από την τιμή m/z των ιόντων του χρησιμοποιούμενου αερίου αντιδραστηρίου. Ο λόγος είναι ότι το αέριο αντιδραστήριο επίσης ιοντίζεται, και επειδή υπάρχει σε μεγάλη περίσσεια ως προς το δείγμα, ιόντα οφειλόμενα σε αυτό επικρατούν στο φάσμα. Έτσι, το φάσμα CI παρουσία μεθανίου καταγράφεται τυπικά πάνω από την τιμή m/z = 50 (το CH₅⁺ έχει m/z = 17, αλλά υπάρχουν και τα C₂H₅⁺ [m/z = 29] και C₃H₅⁺ [m/z = 41], ενώ το φάσμα CI με αέριο αντιδραστήριο το ισοβουτάνιο καταγράφεται τυπικά πάνω από τις τιμές με m/z = 60 ή 70.



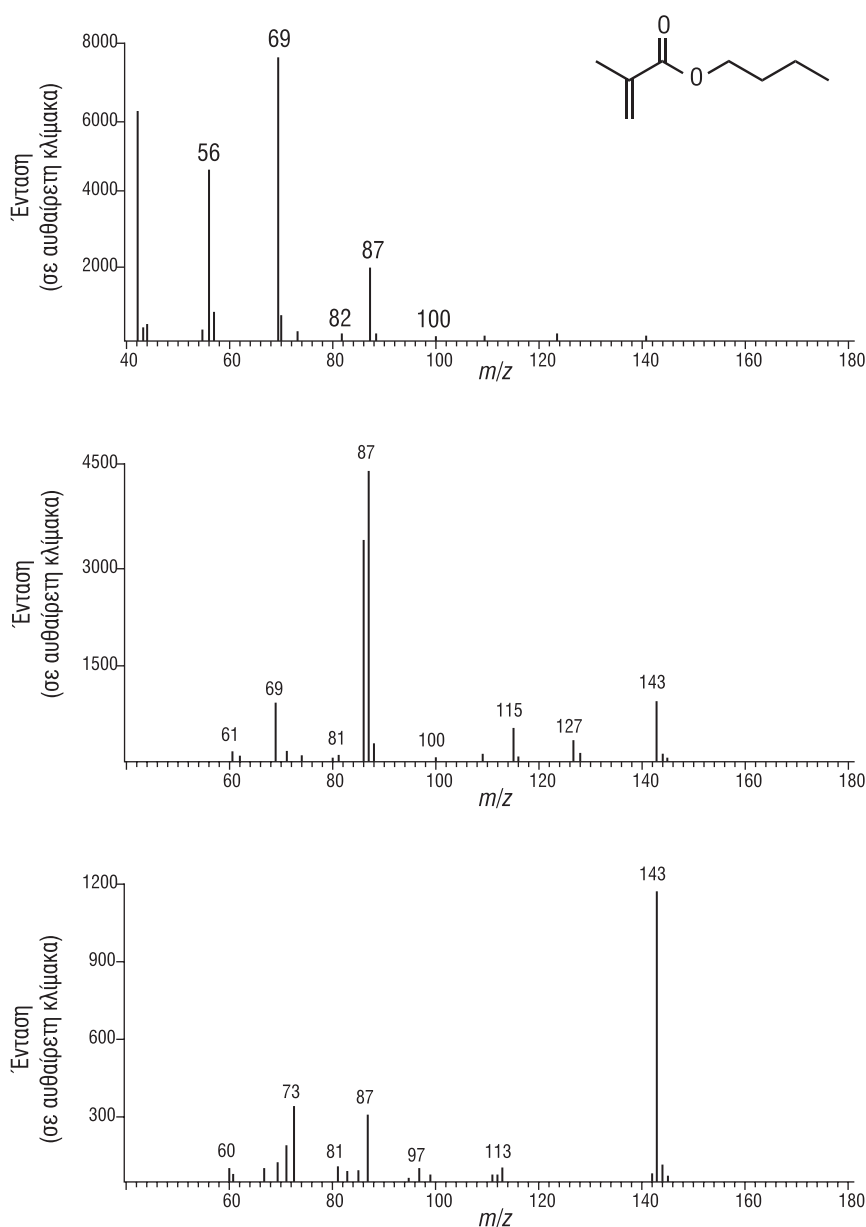
ΕΙΚΟΝΑ 3.3. Σύγκριση δεδομένων φασμάτων μαζών με την τεχνική CI-MS του οξικού λαβαντουλεστέρα χρησιμοποιώντας ως αέρια αντιδραστήρια μεθάνιο (κορυφή), ισοβουτάνιο (μέσο) και αμμωνία (βάση). (Από McLafferty, F. W., and F. Turecek, *Interpretation of Mass Spectra*, 4th ed., University Science Books, Mill Valley, CA, 1993. Αναπαράχθηκε κατόπιν αδείας.)

Το βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής CI-MS είναι η βέβαιη παρατήρηση των μοριακών ιόντων ($M + H$)⁺ για μια ένωση με μοριακό βάρος M . Στην Εικόνα 3.4 παρατίθεται το φάσμα μαζών του μεθακρυλικού βουτυλεστέρα που καταγράφηκε υπό διαφορετικές συνθήκες ιοντισμού. Το μοριακό ιόν ($m/z = 142$) φαίνεται ελάχιστα στο φάσμα EI-MS, αλλά το ιόν ($M + H$)⁺ με $m/z = 143$ είναι εμφανές στο φάσμα CI-MS. Στο φάσμα CI-MS με αέριο αντιδραστήριο το ισοβουτάνιο φαίνεται πολύ λιγότερη θραυσματοποίηση απ' ό,τι στο αντίστοιχο φάσμα με μεθάνιο. Στα άλλα πλεονεκτήματα της τεχνικής CI-MS περιλαμβάνονται το χαμηλό κόστος της οργανολογίας και ο μεγάλος χρόνος ζωής των οργάνων. Παρόλα αυτά, όπως και στην τεχνική EI-MS, το δείγμα θα πρέπει να έχει ικανοποιητική τάση ατμών ώστε να υποστεί το χημικό ιοντισμό, προϋπόθεση που αποκλείει την ανάλυση των υψηλού μοριακού βάρους ενώσεων και πολλών βιομορίων. Οι πηγές ιοντισμού των οργάνων CI είναι πολύ όμοιες στη σχεδίαση με αυτές των οργάνων EI, και τα περισσότερα σύγχρονα φασματόμετρα μαζών μπορούν να μετατρέπονται από EI σε CI μέσα σε λίγα λεπτά.

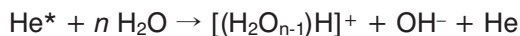
Αν και η πρωτονίωση είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος ιοντισμού στην τεχνική CI-MS, μπορούν να αξιοποιηθούν και άλλες μέθοδοι ιοντισμού. Για παράδειγμα, με τη χρήση μιγμάτων νιτρώδους μεθυλεστέρα/μεθανίου ως αέριο αντιδραστήριο παράγεται ανιόν CH_3O^- , το οποίο αποσπά ένα πρωτόνιο από το δείγμα, οδηγώντας σε ένα μητρικό ιόν ($M - H$)⁻. Ομοίως, χρησιμοποιώντας NF_3 ως αέριο αντιδραστήριο, παράγεται ιόν F^- το οποίο επίσης αποσπά ένα πρωτόνιο και σχηματίζονται ιόντα ($M - H$)⁻. Είναι επίσης πιθανό υπό συνθήκες CI να σχηματιστούν και αρνητικά φορτισμένα προϊόντα προσθήκης.

Ο χημικός ιοντισμός χρησιμοποιείται επίσης στην τεχνική λήψης φασμάτων MS σε συνθήκες πε-

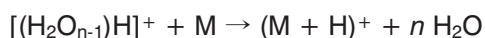
ΕΙΚΟΝΑ 3.4. Φάσματα MS του μεθακρυλικού βουτυλεστέρα υπό συνθήκες EI (κορυφή) και CI (με αέριο αντιδραστήριο το μεθάνιο στη μέση και με ισοβουτάνιο στη βάση). (Από De-Hoffmann, E., and V. Stroobant, Mass Spectrometry: Principles and Applications, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, 1999. Αναπαράχθηκε κατόπιν αδείας.)



ριβάλλοντος, γνωστή ως κατευθείαν ανάλυση σε πραγματικό χρόνο (direct analysis in real time, DART). Σε αυτή τη μέθοδο ιοντισμού (Εικόνα 3.5) ένα αέριο αντιδραστήριο, συνήθως He ή Ar, διαβιβάζεται μέσω ενός ηλεκτροδίου βελόνας με ένα δυναμικό 1-5 kV, δημιουργώντας διεγερμένα άτομα του αερίου. Το αέριο σε διεγερμένη-κατάσταση συγκρούεται με μόρια H₂O του περιβάλλοντος και δημιουργούνται σύμπλοκα (clusters) ενυδατωμένων πρωτονίων (Εξίσωση 3.14). Συγκρούσεις μεταξύ του δείγματος και των ενυδατωμένων πρωτονίων μεταφέρουν ένα πρωτόνιο στο δείγμα (Εξίσωση 3.15). Τα προς ανάλυση μοριακά ιόντα στη συνέχεια εισέρχονται στον αναλυτή μαζών μέσω μιας μικρής οπής.



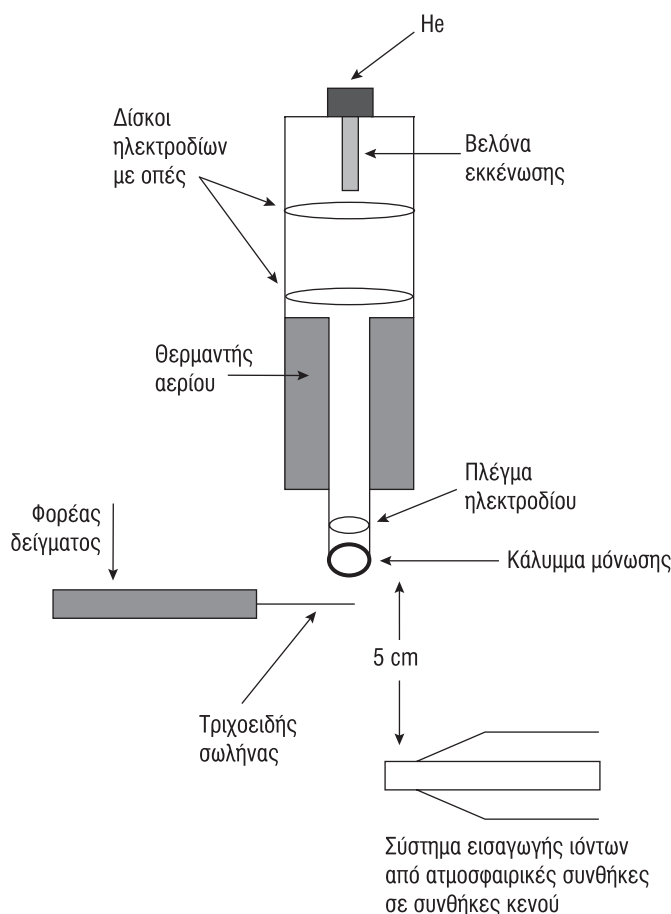
Εξίσωση 3.14



Εξίσωση 3.15

Γ. Τεχνικές Ιοντισμού Εκρόφησης (SIMS, FAB και MALDI)

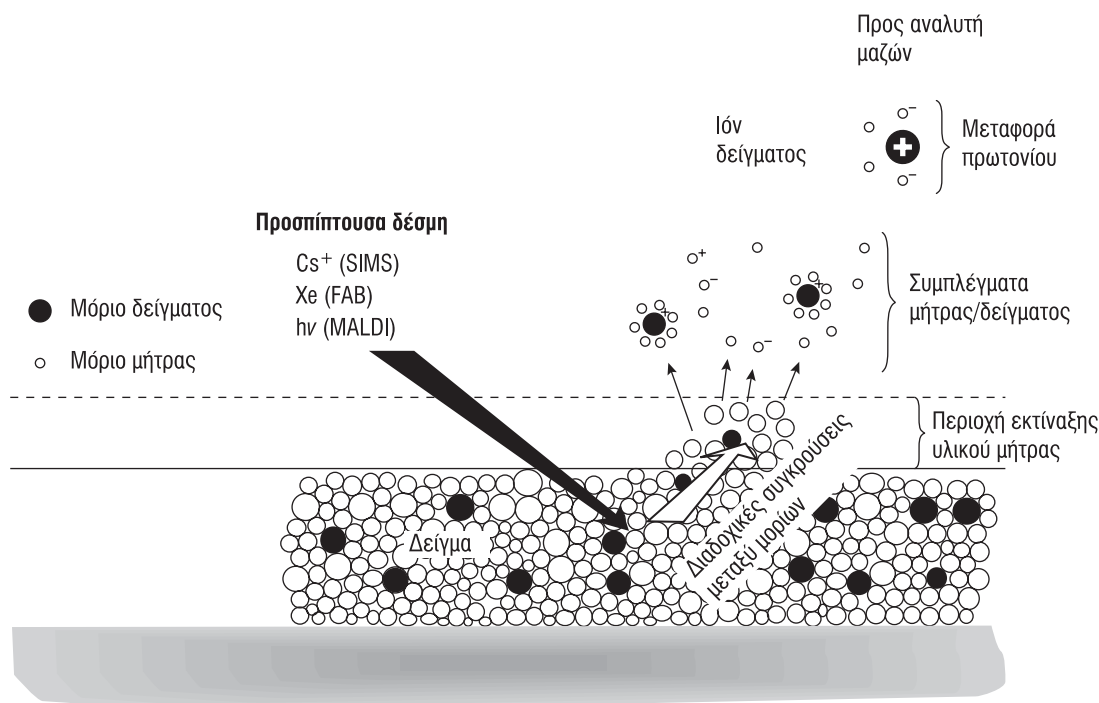
Οι μέθοδοι EI και CI μπορούν να εφαρμοστούν σε σχετικώς πτητικά (μικρού μοριακού βάρους) δείγματα. Πιο πρόσφατα αναπτυχθείσες τεχνικές ιοντισμού επιτρέπουν την ανάλυση με φασματομετρία μαζών, των μη πτητικών και μεγάλου μοριακού βάρους μορίων. Τρεις από αυτές τις μεθόδους, η **φασματομετρία μαζών δευτερογενών ιόντων** (secondary ion mass spectrometry, SIMS), ο **βομβαρδισμός με άτομα**



ΕΙΚΟΝΑ 3.5 Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου DART. (Από Petucci, C. et al., *Analytical Chemistry* 79, (2007): 5064.)

υψηλής ταχύτητας (fast atom bombardment, FAB), και ο ιοντισμός εκρόφησης με laser υποβοηθούμενος από μήτρα (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI), είναι όλες τεχνικές **ιοντισμού με εκρόφηση (desorption ionization, DI)**. Στην τεχνική του ιοντισμού με εκρόφηση, το προς ανάλυση δείγμα διαλύεται ή διασπείρεται σε μια μήτρα η οποία τοποθετείται στην πορεία μιας δέσμης ιόντων υψηλής ενέργειας, 1-10 keV (τεχνική SIMS), είτε ουδετέρων ατόμων (τεχνική FAB), ή υψηλής-έντασης φωτονίων (τεχνική MALDI). Στην τεχνική SIMS χρησιμοποιούνται συνήθως δέσμες Ar^+ ή Cs^+ , ενώ στην FAB δέσμες ουδετέρων ατόμων Ar ή Xe. Στα περισσότερα φασματόμετρα MALDI χρησιμοποιείται ένα laser αζώτου το οποίο εκπέμπει στα 337 nm, αλλά μερικές εφαρμογές χρησιμοποιούν ένα laser υπερύθρου (IR) για την απευθείας ανάλυση δειγμάτων που περιέχονται σε ζελέ ή σε πλάκες χρωματογραφίας λεπτής-στοιβάδος (TLC). Η σύγκρουση αυτών των ιόντων/ατόμων/φωτονίων με το δείγμα προκαλεί ιοντισμό σε ένα μέρος των μορίων του δείγματος με παράλληλη εκνέφωση τους πάνω από την επιφάνεια της μήτρας (Εικόνα 3.6). Τα εκτινασσόμενα ιόντα επιταχύνονται και κατευθύνονται προς τον αναλυτή μαζών όπως και στις άλλες μεθόδους ιοντισμού. Εφόσον η τεχνική FAB χρησιμοποιεί ουδέτερα άτομα για να ιοντίσει το δείγμα, είναι πιθανή η ανίχνευση και θετικών και των αρνητικών ιόντων. Τα τυπικά μοριακά ιόντα που παρατηρούνται στις τεχνικές SIMS και FAB είναι τα $(M + H)^+$ και $(M - H)^-$, αλλά ανακαλύφθηκε τυχαία ότι και τα αλκαλιμέταλλα μπορούν επίσης να δημιουργήσουν ιόντα όπως $(M + \text{Na})^+$ και $(M + \text{K})^+$. Οι τεχνικές ιοντισμού SIMS και FAB χρησιμοποιούνται κυρίως σε δείγματα ενώσεων με μοριακά βάρη μέχρι περίπου 20.000, όπως σε πολυπεπτίδια και ολιγονουκλεοτίδια.

Η μήτρα πρέπει να μην είναι πτητική, σχετικά αδρανής και καλός ηλεκτρολύτης ώστε να υποβοηθήσει τον σχηματισμό ιόντων του δείγματος. Αν η ένωση της μήτρας είναι πιο όξινη από το προς ανάλυση δείγμα, τότε κυρίως θα σχηματισθούν ιόντα $(M + H)^+$, ενώ θα προκύψουν κυρίως ιόντα $(M - H)^-$ όταν η μήτρα είναι λιγότερο όξινη από το αναλυόμενο δείγμα. Η μήτρα απορροφά μεγάλο μέρος της περισσεύουσας ενέργειας που μεταδίδεται από τη δέσμη των ιόντων/ατόμων και έτσι παράγονται μέσω ποικίλων χημικών αντιδράσεων ιόντα που παρατηρούνται ως κορυφές υποβάθρου στο φάσμα μαζών σε όλη σχεδόν



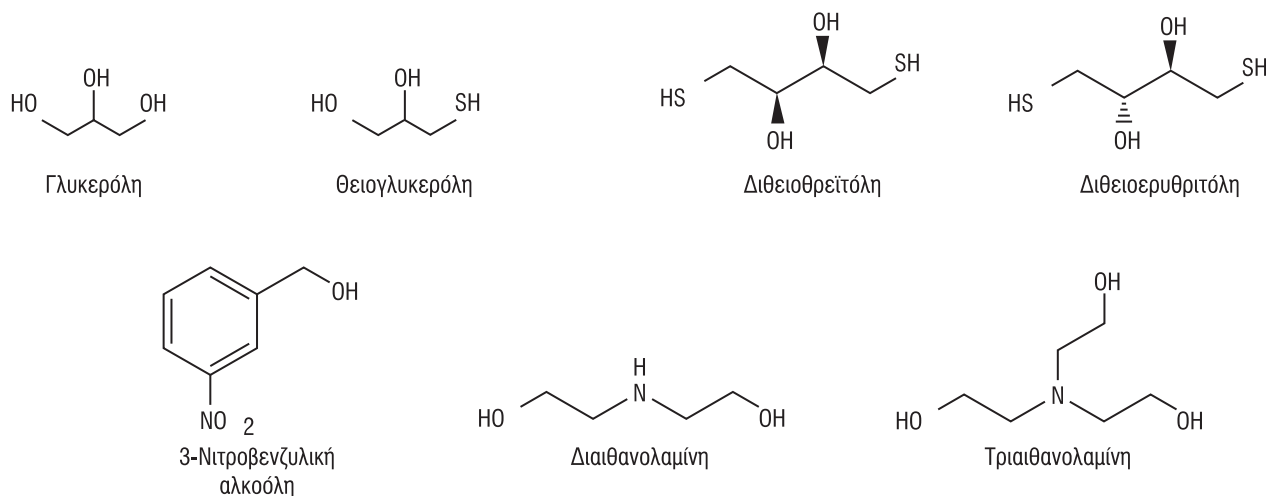
ΕΙΚΟΝΑ 3.6. Σχηματικές αναπαραστάσεις των τεχνικών ιοντισμού με εκρόφηση.

την περιοχή κάτω από τα περίπου 600 m/z. Οι συνήθεις ενώσεις των μητρών στις τεχνικές SIMS και FAB περιλαμβάνουν τις: γλυκερόλη,θειογλυκερόλη, 3-νιτροβενζυλική αλκοόλη, δι- και τριαιθανολαμίνη, καθώς και μίγματα διθειοθρεϊτόλης (DTT) και διθειοερυθριτόλης (Εικόνα 3.7).

Οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται σε μήτρες στη τεχνική MALDI επιλέγονται με βάση την ικανότητα τους να απορροφούν το υπεριώδες φως (UV) από ένα παλμό laser (337 nm για laser N₂). Τέτοιες ενώσεις είναι υποκατεστημένα παράγωγα των νικοτινικού, πικολινικού και κινναμωμικού οξέος (Εικόνα 3.8). Η μήτρα απορροφά την περισσότερη ενέργεια από τον παλμό laser, επιτρέποντας έτσι την δημιουργία μοριακών ιόντων του δείγματος που δεν θραυσματοποιούνται περαιτέρω, τα οποία και εκτινάσσονται από τη μήτρα. Η τεχνική φασματομετρίας μαζών MALDI είναι χρήσιμη για αναλυόμενα δείγματα που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα μοριακών βαρών, από μικρά πολυμερή με μέσο όρο μοριακών βαρών λίγων χιλιάδων ατομικών μονάδων μάζας (amu), μέχρι ολιγοσακχαρίτες, ολιγονουκλεοτίδια και πολυπεπτίδια, αντισώματα, και μικρές πρωτεΐνες με μοριακά βάρη μέχρι και 300.000 amu. Επιπλέον, στην τεχνική MALDI απαιτούνται μόνο λίγα femtomoles (1×10^{-15} mole) δείγματος!

Δ. Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)

Μια ακόμη περισσότερο χρήσιμη τεχνική για μελέτη βιομορίων υψηλού μοριακού βάρους και άλλων ασταθών και μη πτητικών ενώσεων είναι ο **ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI)** και ο συναφής με αυτόν **ιοντισμός με θερμοψεκασμό (thermospray ionization, TSI)**. Στην τεχνική ESI, ένα διάλυμα που περιέχει το δείγμα των μορίων ψεκάζεται από το άκρο ενός λεπτού τριχοειδούς σωλήνα σε ένα θερμαινόμενο θάλαμο, ο οποίος είναι σχεδόν υπό ατμοσφαιρική πίεση. Κατά μήκος της επιφάνειας του τριχοειδούς σωλήνα μέσω του οποίου διέρχεται το διάλυμα του δείγματος εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό, οπότε φορτισμένα σταγονίδια του διαλύματος εκτοξεύονται στο θάλαμο του ιοντισμού. Τα φορτισμένα σταγονίδια υπόκεινται σε ένα ρεύμα αερίου (συνήθως αζώτου) το οποίο εξατμίζει τα μόρια του διαλύτη από τα σταγονίδια. Έτσι, η πυκνότητα φορτίου κάθε σταγονιδίου αυξάνεται έως ότου οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις υπερβούν την επιφανειακή τάση του σταγονιδίου (το όριο Rayleigh), οπότε και τα σταγονίδια διασπώνται σε μικρότερα σταγονίδια (κουλομπική έκρηξη φορτίου). Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να μείνουν ιόντα δείγματος στην αέρια φάση χωρίς

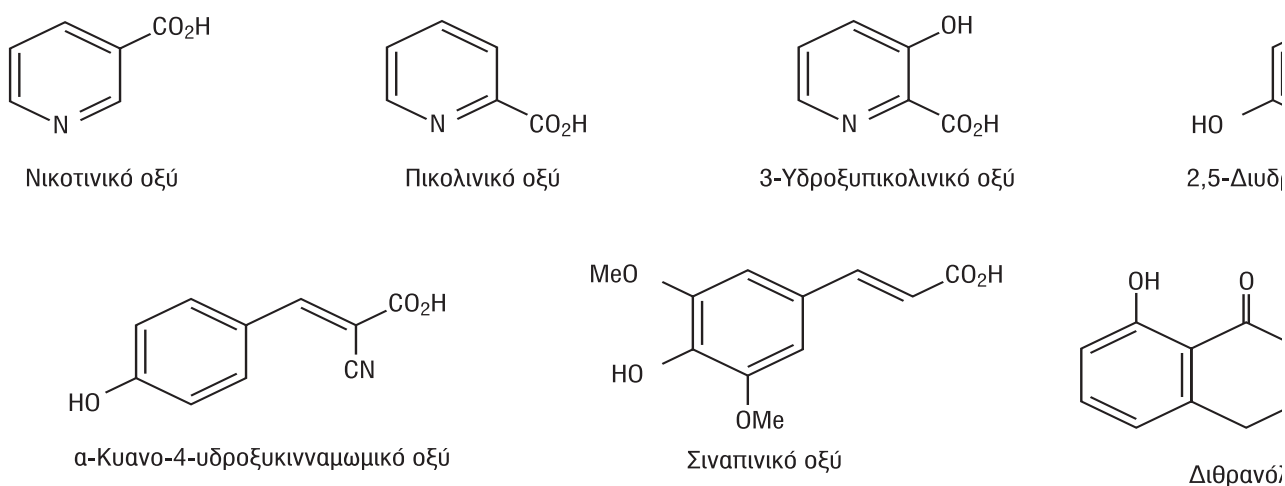


ΕΙΚΟΝΑ 3.7. Συνήθη υλικά σε μήτρες στις τεχνικές φασματομετρίας μαζών SIMS και FAB.

την παρουσία μορίων διαλύτη (Εικόνα 3.9). Η τεχνική TSI λειτουργεί με παρόμοιο μηχανισμό αλλά για τον σχηματισμό των φορτισμένων σταγονιδίων χρησιμοποιείται ένας θερμαινόμενος τριχοειδής, χωρίς την εφαρμογή ηλεκτροστατικού δυναμικού, όπως στην ESI. Στην μέθοδο ESI μπορούν επίσης να σχηματιστούν και αρνητικά ιόντα, από την απώλεια πρωτονίων στα αναλυόμενα μόρια, λόγω της ύπαρξης βασικών ενώσεων στο διάλυμα. Τα τελευταία χρόνια, η τεχνική ESI χρησιμοποιείται περισσότερο από την TSI, και επειδή μάλιστα εφαρμόζεται σε διαλύματα δειγμάτων, η ESI αποτελεί την κύρια τεχνική ανάλυσης στα όργανα LC-MS.

Τα φορτία των ιόντων που δημιουργούνται χρησιμοποιώντας την τεχνική ESI δεν αντανakλούν απαραίτητα τα φορτία του δείγματος στο διάλυμα. Το φορτίο στα αναλυόμενα μόρια του δείγματος (συνήθως με τη μορφή πρωτονίων) προκύπτει από ένα συνδυασμό της συγκέντρωσης του φορτίου στα μικροσταγονίδια κατά τη διάρκεια της εξάτμισης των μορίων διαλύτη και ηλεκτροχημικών διαδικασιών οφειλόμενες στο ηλεκτροστατικό δυναμικό του τριχοειδούς.

Τα ιόντα ενός δείγματος μπορούν να έχουν απλό (+1) ή και πολλαπλό φορτίο. Στην Εικόνα 3.10 φαίνεται η ανάλυση ESI-MS της λυσοζύμης από το ασπράδι του αυγού πουλερικών απουσία ή παρουσία διθειοθρεϊτόλης. Στο πάνω φάσμα, παρατηρούνται ιόντα οφειλόμενα σε μόρια πρωτεΐνης που φέρουν



ΕΙΚΟΝΑ 3.8. Συνήθεις μήτρες σε εφαρμογές της τεχνικής φασματομετρίας μαζών MALDI.

φορτία 10^+ , 11^+ , 12^+ και 13^+ . Στο κάτω φάσμα φαίνονται ακόμη υψηλότερα φορτισμένα ιόντα-συμπεριλαμβανομένης μια κορυφής οφειλόμενης σε πρωτεΐνη που φέρει φορτίο 20^+ . Ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στην ανάλυση MS των πρωτεϊνών. Οι περισσότερες πρωτεΐνες μπορούν να πολυ-πρωτονιωθούν στις βασικές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων τους, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται κορυφές σε $m/z = 600-2000$ για πρωτεΐνες με μοριακά βάρη που πλησιάζουν τις 200.000 amu.

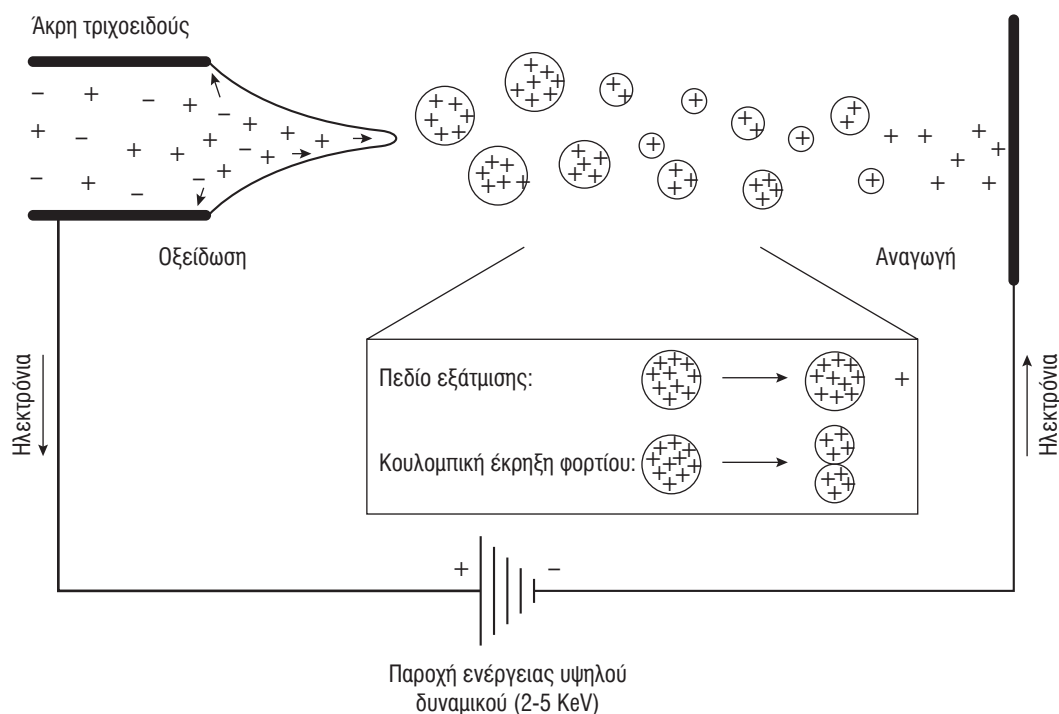
Τα δεδομένα που φαίνονται στην Εικόνα 3.10 μπορούν να χρησιμεύσουν για να υπολογισθεί η μοριακή μάζα για τη λυσοζύμη. Η μάζα υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας το φορτίο της λυσοζύμης με την τιμή m/z . Για παράδειγμα:

$$\begin{aligned}(10)(1432) &= 14,320 \text{ AMU} \\ (12)(1193) &= 14,316 \\ (15)(955) &= 14,325\end{aligned}$$

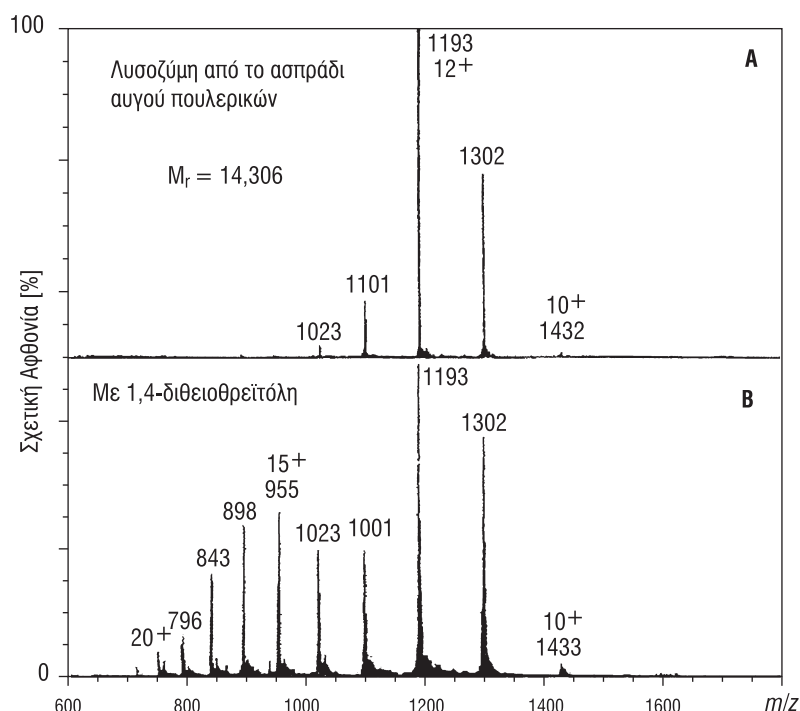
Έτσι η μοριακή μάζα της λυσοζύμης είναι περίπου 14,320 AMU.

Η τεχνική ESI-MS δεν περιορίζεται μόνο στη μελέτη μεγάλων βιομορίων. Μικρά μόρια με μοριακό βάρος στην περιοχή 100-1500 μπορούν επίσης να μελετηθούν με την ESI-MS. Ενώσεις που δεν είναι πτητικές ώστε να μπορούν να αναλυθούν με μεθόδους απ' ευθείας εισαγωγής δείγματος ή είναι πολύ πολικές ή θερμικά ασταθείς ώστε να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος GC-MS, είναι ιδανικές για μελέτη με LC-MS χρησιμοποιώντας την τεχνική ESI.

Η τεχνική που επιτυγχάνεται ιοντισμός από ηλεκτροψεκασμό με εκρόφηση (desorption electrospray ionization, DESI) συνδυάζει τον ήπιο ιοντισμό της τεχνικής ESI, με την εκρόφηση των ιοντισθέντων μορίων του δείγματος από μια επιφάνεια. Σε αντίθεση με την τεχνική MALDI, δεν απαιτείται ή ύπαρξη μήτρας. Η τεχνική DESI χρησιμοποιεί υδατικά αερολύματα που έχουν ηλεκτροψεκαστεί, τα οποία ιοντίζουν και παράλληλα εκροφούν τα ιόντα του αναλυόμενου δείγματος. Η τεχνική DESI, που αναπτύχθηκε



ΕΙΚΟΝΑ 3.9. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ESI, όπου φαίνονται το πεδίο εξάτμισης και η κουλομπική έκρηξη φορτίου. (Από Gross, J. H., Mass Spectrometry: A Textbook, Springer, Berlin, 2004. Αναπαράχθηκε κατόπιν άδειας.)



ΕΙΚΟΝΑ 3.10. Ανάλυση ESI-MS πρωτεϊνών. Λυσοζύμη από το ασπράδι του αυγού πουλερικών απουσία (κορυφή) και παρουσία (μέση) διθειοθρεϊτόλης. (Από Gross, J. H., *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer, Berlin, 2004. Αναπαράχθηκε κατόπιν άδειας.)

περίπου την ίδια περίοδο με την DART (Ενότητα 3.3B), μπορεί να συζευχθεί με έναν αναλυτή μαζών χρησιμοποιώντας ένα θερμαινόμενο σωλήνα μεταφοράς ιόντων, ο οποίος είναι σε μερικές περιπτώσεις εύκαμπτος και μπορεί να κρατείται στο χέρι του ερευνητή κατευθείαν πάνω από την επιφάνεια του δείγματος.

Οι ήπιες τεχνικές ιοντισμού όπως οι DESI και DART μπορούν να συζευχθούν με κατάλληλο αναλυτή μαζών ώστε να λαμβάνονται ακριβείς μετρήσεις όταν ζητείται ο προσδιορισμός του μοριακού τύπου μιας ένωσης (Ενότητα 3.7). Πλέον, η εύχρηστη διάταξη των οργάνων αυτών επιτρέπει τη δειγματοληψία από ένα αριθμό επιφανειών που ποικίλουν, από ιστούς φυτών, ρούχων, τσιμέντου, ακόμη και ανθρώπινου δέρματος. Η μετακίνηση ενός δείγματος στη δέσμη ιόντων του οργάνου, επιτρέπει στον ερευνητή να παρατηρεί τη μεταβολή της σύστασης σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου δείγματος. Αυτές οι τεχνικές είναι χρήσιμες στις εγκληματολογικές έρευνες, αφού έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν έως και πικογραμμάρια (pg) μιας ουσίας, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων βιομορίων ή υπολειμμάτων εκρηκτικών υλών.

3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΑΖΩΝ

Αφού έχει ιοντιστεί ένα δείγμα, η δέσμη ιόντων επιταχύνεται από ένα ηλεκτρικό πεδίο και εισέρχεται στον **αναλυτή μαζών**, την περιοχή ενός φασματομέτρου μαζών όπου τα ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο της μάζας τους προς το φορτίο (m/z). Ακριβώς όπως υπάρχουν πολλές διαφορετικές τεχνικές ιοντισμού για διάφορες εφαρμογές, υπάρχουν επίσης και πολλοί τύποι αναλυτών μαζών, αλλά δεν μπορούν να συζευχθούν με όλες τις τεχνικές ιοντισμού.

A. Ο Αναλυτής Μαζών με Μαγνητικό Τομέα

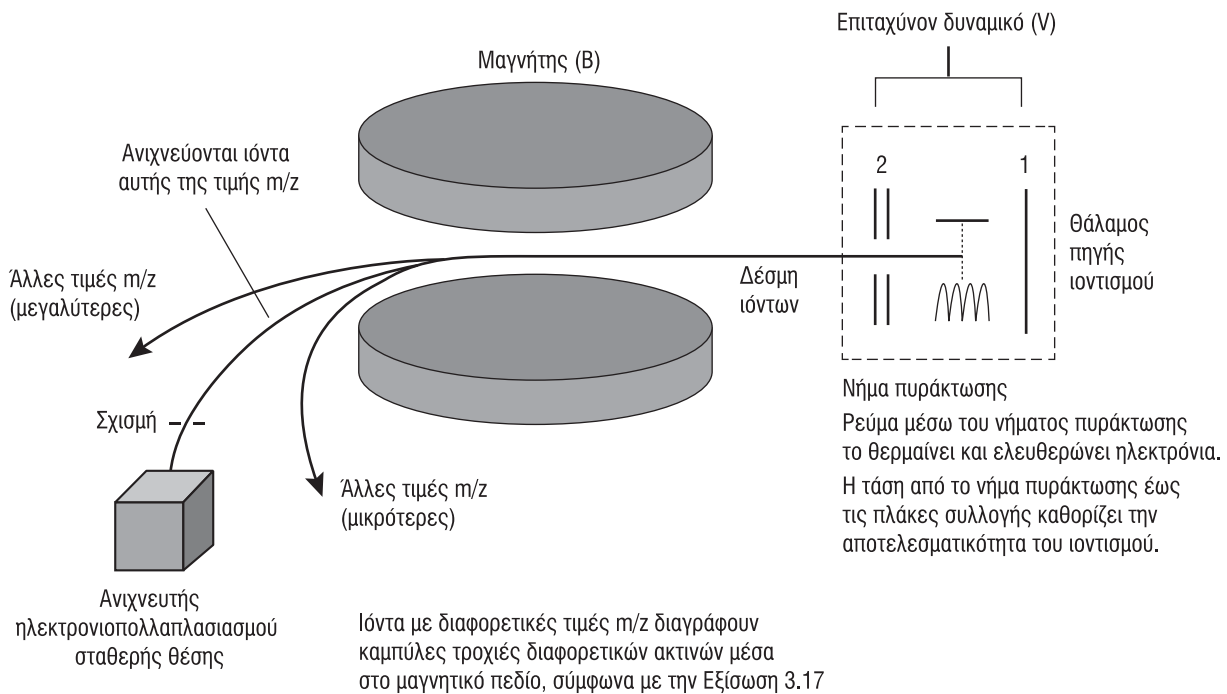
Η κινητική ενέργεια ενός επιταχυνθέντος ιόντος είναι ίση με

$$\frac{1}{2} m v^2 = z V \quad \text{Εξίσωση 3.16}$$

όπου m είναι η μάζα του ιόντος, v η ταχύτητα του, z το φορτίο του και V η διαφορά δυναμικού μετα-

ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟ ΤΟΜΕΑ

Είτε η ισχύς του μαγνητικού πεδίου (B) είτε το επιταχύνον δυναμικό (V) μπορούν να μεταβάλλονται ώστε να ανιχνεύονται τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z



ΕΙΚΟΝΑ 3.11. Σχηματική παράσταση ενός αναλυτή μαζών με μαγνητικό τομέα.

ξύ των πλακών που επιταχύνουν το ιόν. Σε ένα αναλυτή μαζών με **μαγνητικό τομέα** (Εικόνα 3.11), τα ιόντα διέρχονται μεταξύ των πόλων ενός μαγνήτη. Παρουσία μαγνητικού πεδίου, ένα φορτισμένο σωματίδιο διαγράφει μια κυκλική τροχιά. Η εξίσωση που δίνει την ακτίνα της καμπύλης αυτής της πορείας είναι

$$r = \frac{mv}{zB} \quad \text{Εξίσωση 3.17}$$

όπου r είναι η ακτίνα της κυκλικής τροχιάς, και B ή ένταση του μαγνητικού πεδίου. Αν αυτές οι δύο εξισώσεις συνδυαστούν ώστε να απαλειφθεί ο όρος της ταχύτητας, το αποτέλεσμα είναι

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V} \quad \text{Εξίσωση 3.18}$$

Όπως φαίνεται στην Εξίσωση 3.18, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του λόγου m/z , τόσο μεγαλύτερη είναι η ακτίνα της κυκλικής τροχιάς. Ο σωλήνας του αναλυτή του οργάνου είναι κατασκευασμένος ώστε να έχει συγκεκριμένη ακτίνα καμπυλότητας. Σωματίδια με κατάλληλο λόγο m/z μπορούν να διέλθουν από τον καμπύλο σωλήνα του αναλυτή και να καταλήξουν στον ανιχνευτή. Αυτά που έχουν είτε πολύ μεγάλες είτε πολύ μικρές τιμές m/z συγκρούονται στα τοιχώματα του σωλήνα του αναλυτή και δεν φθάνουν στον ανιχνευτή. Η μέθοδος δεν θα παρουσίαζε πολύ ενδιαφέρον αν ανιχνευόταν τα ιόντα μιας μόνο μάζας. Έτσι, η ένταση του **μαγνητικού πεδίου** μεταβάλλεται συνεχώς, ώστε όλα τα παραγόμενα ιόντα στο θάλαμο ιοντισμού να μπορούν να προσπέσουν και να καταγραφούν στον ανιχνευτή. Η καταγραφή που γίνεται από το σύστημα του ανιχνευτή είναι με τη μορφή ενός γραφήματος της αφθονίας των ιόντων αυτών σε σχέση με τις τιμές m/z .

Μια σημαντική παράμετρος στη φασματομετρία μαζών είναι η **διακριτική ικανότητα** (*resolution*), που καθορίζεται από τη σχέση