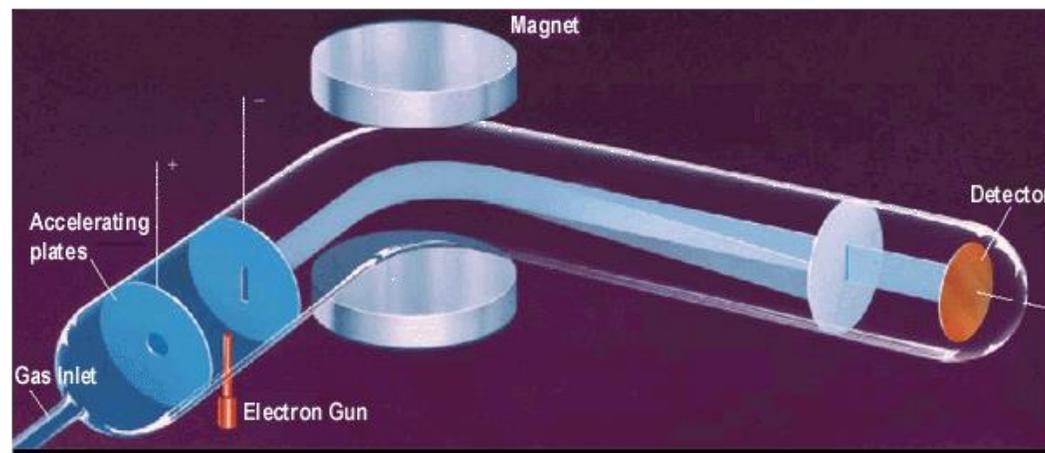




Современные аспекты хроматографии

Лекция на тему: Масс-спектрометрия



**Минажева Гүлшарат Салауатовна –
доктор педагогических наук, кандидат
химических наук, профессор кафедры
АКХиТРЭ**

Масс-спектрометрия (МС)

- **Метод МС** - метод исследования и анализа веществ
- **основан** на ионизации атомов и молекул вещества и последующем разделении образующихся ионов в соответствии с их массовым числом m/z - отношением массы иона к его заряду - в электрическом или магнитном поле
- Первые масс-спектры были получены в Великобритании в 1910 г. (Томсон) и 1919 г. (Астон)



Джозеф Джон Томсон
(18.12.1856 – 30.08.1940)

- **Преимущество метода** в том, что для анализа достаточно очень малое количество вещества, **основной недостаток** – метод является разрушающим, т. е. исследуется не само вещество, а продукты его превращения
- Строго говоря, метод МС не относится к спектроскопическим, поскольку в его основе нет взаимодействия вещества с электромагнитным излучением,
- но **внешний вид** графического распределения ионов по массовым числам - зависимость интенсивности ионного тока от отношения массы к заряду - **напоминает спектр** и получил название масс-спектр, а сам метод - масс-спектрометрия

- Масс-спектрометр — это **вакуумный** прибор, использующий физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях, и необходимый для получения масс-спектра



Блок-схема масс-спектрометра



- 1 – система ввода образца
- 2 – источник ионизации с ускорителем ионов
- 3 – масс-анализатор (устройство для разделения ионов)
- 4 – детектор
- 5 – измерительное или регистрирующее устройство
- Чтобы исключить соударение ионов с другими атомами или молекулами, анализ происходит в вакууме (в ионизаторе давление $10^{-3} - 10^{-4}$ Па, в масс-анализаторе - $10^{-3} - 10^{-8}$ Па)

Принцип метода

- Пробу вводят в источник ионизации, где молекулы ионизируются;
- Образующиеся положительные ионы выводятся из зоны ионизации, ускоряются электрическим полем и одновременно фокусируются в пучок. Нейтральные молекулы удаляются вакуум-насосом;
- Поток ускоренных ионов попадает в масс-анализатор, где ионы разделяются по массе;
- Разделенные пучки ионов попадают в детектор, где ионный ток преобразуется в электрический сигнал, который усиливается и регистрируется.

В масс-спектрометрии положительные ионы часто используются по нескольким причинам:

- **Стабильность положительных ионов:** Во многих случаях положительные ионы обладают большей стабильностью по сравнению с отрицательными. Это связано с тем, что в положительно заряженных молекулах электроны обычно находятся внутри атомных оболочек, что делает их менее склонными к фрагментации.
- **Эффективность ионизации:** Некоторые методы ионизации, такие как электроспрей и MALDI (ионизация лазерной десорбции), более эффективны для создания положительных ионов. Это обусловлено химическими свойствами используемых реагентов или матриц, которые обычно предпочитают положительные заряды.
- **Удобство в работе с положительными ионами:** Положительные ионы легче управлять в масс-спектрометре из-за их заряда. Они могут быть ускорены и сфокусированы в анализаторе с помощью электрических полей, что облегчает их детекцию и анализ.
- **Распространенность в анализе органических соединений:** Многие органические соединения, такие как белки, пептиды, липиды и другие биомолекулы, легко ионизируются в положительных условиях и образуют стабильные положительные ионы, которые могут быть успешно анализированы в масс-спектрометрии.

В целом, выбор положительных ионов в масс-спектрометрии зависит от конкретного метода ионизации, типа анализируемых образцов и предпочтений исследователя.

Отрицательные ионы также могут быть использованы в **масс-спектрометрии**, и в некоторых случаях они являются предпочтительными для анализа определенных типов образцов. Примеры с отрицательными ионами в масс-спектрометрии:

Отрицательная ионизация: Существуют методы ионизации, специально разработанные для создания отрицательных ионов. Например, электроспрей и холодная электронная ионизация (CI) могут обеспечить образование отрицательно заряженных молекул.

Анализ неорганических соединений: Отрицательные ионы часто используются для анализа неорганических соединений, таких как анионы металлов или органических кислот.

Изучение антибиотиков и других кислотных соединений: Многие антибиотики и другие лекарственные препараты могут образовывать стабильные отрицательные ионы, что делает их подходящими для анализа в масс-спектрометрии.

Определение молекулярной структуры: Некоторые соединения лучше ионизируются в отрицательных условиях и образуют более стабильные ионные фрагменты, что позволяет исследователям определить их молекулярную структуру.

Выбор между положительной и отрицательной ионизацией зависит от типа образца, химической природы анализируемых соединений и требований конкретного исследования.

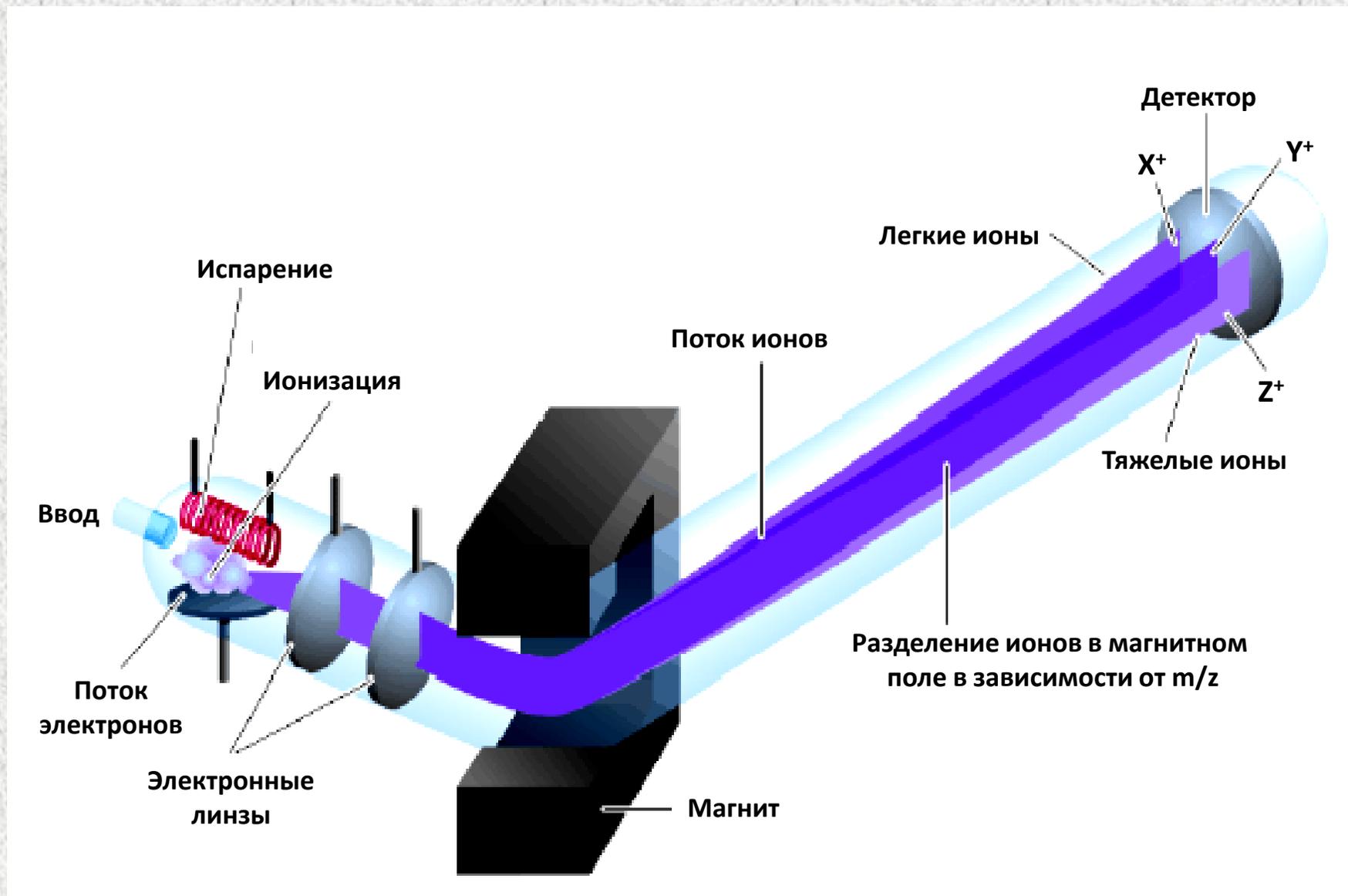
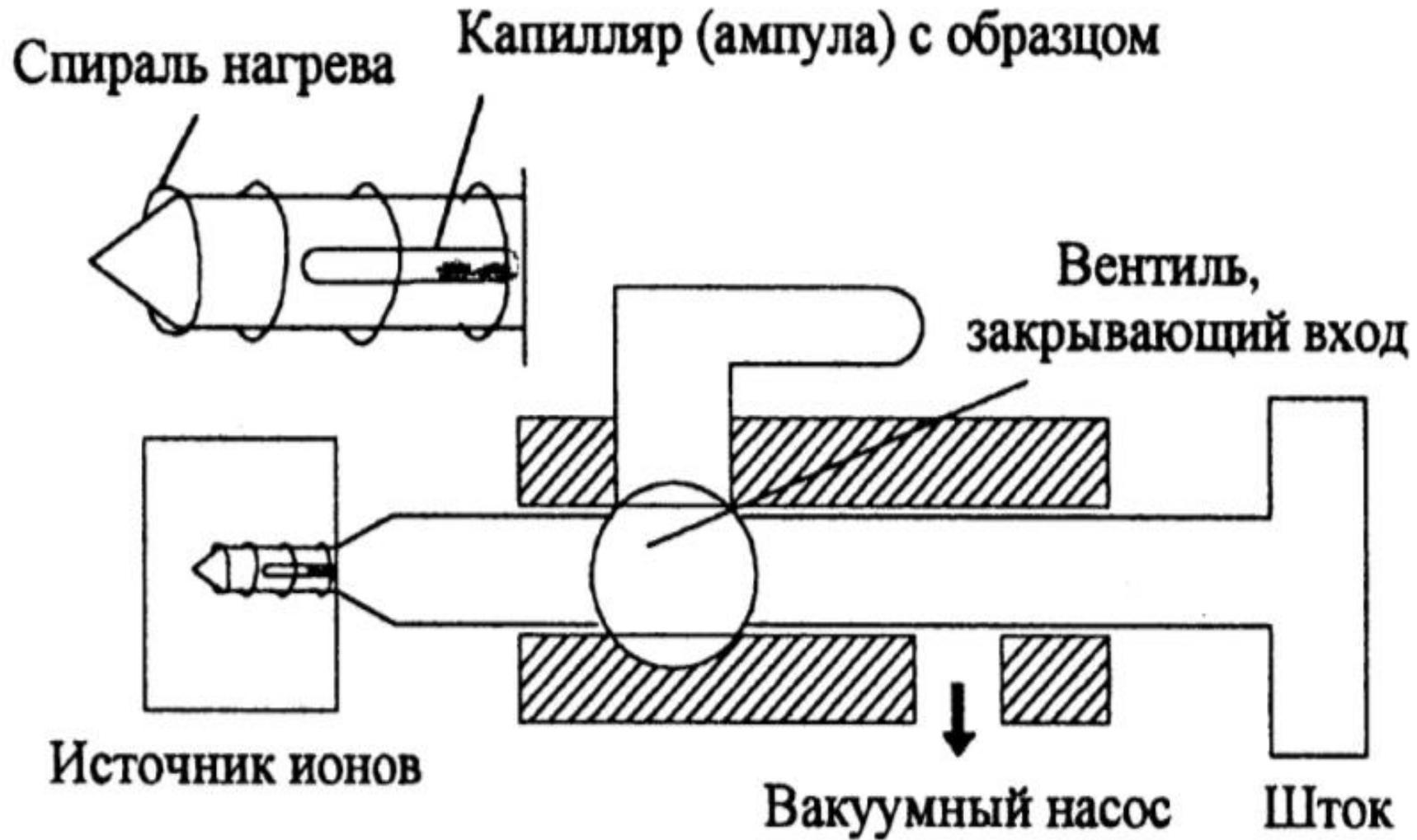


Схема масс-спектрометра

Система ввода пробы

- Количество вводимой пробы не превышает нескольких микромолей, чтобы не нарушить вакуум внутри прибора
- *1. Непрямой способ* - пробу вводят в ионизатор в газообразном состоянии
- Жидкие и твердые пробы испаряют ($\sim 500\text{ }^{\circ}\text{C}$) в вакуумной камере, и пары через специальное отверстие поступают в ионизатор
- *2. Прямой способ* - используется для труднолетучих проб
- Образец непосредственно вводят в ионизатор с помощью штанги через систему шлюзовых камер
- В этом случае потери вещества значительно меньше, масса пробы - несколько нг

Схема прямого ввода образца в масс-спектрометр:



- **3.** Анализируемое вещество поступает в масс-спектрометр в ходе хроматографического разделения.

В настоящее время сочетание газовой и жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС, ЖХ-МС) в режиме *on-line* используют для рутинного анализа во многих областях аналитической химии.

- **К ПРИМЕРУ:**

- **Процесс контроль в производстве фармацевтических препаратов:** ГХ-МС и ЖХ-МС могут использоваться для мониторинга процесса производства фармацевтических препаратов онлайн. Это позволяет непрерывно отслеживать состав и чистоту продукта во время производства, что помогает предотвратить потенциальные проблемы качества.
- **Контроль качества питьевой воды:** Водоснабжающие компании могут использовать онлайн-системы ГХ-МС и ЖХ-МС для непрерывного мониторинга качества питьевой воды. Это позволяет обнаруживать и идентифицировать различные загрязнители, такие как органические соединения, пестициды и фармацевтические остатки.
- **Анализ атмосферного воздуха:** Онлайн-системы ГХ-МС могут быть установлены для мониторинга атмосферного воздуха на предмет наличия и концентрации различных загрязнителей, таких как углеводороды, альдегиды и другие органические соединения.
- **Контроль качества производства пищевых продуктов:** Производители пищевых продуктов могут использовать онлайн-системы ЖХ-МС для мониторинга качества и безопасности продукции. Это позволяет обнаруживать и идентифицировать различные примеси и загрязнители, такие как пестициды, антибиотики и ароматизаторы.
- **Мониторинг газовых выбросов в промышленности:** Онлайн-системы ГХ-МС могут использоваться для непрерывного мониторинга газовых выбросов в промышленных предприятиях. Это позволяет обнаруживать и измерять концентрации различных газов, таких как углеводороды, аммиак и другие вредные вещества.

Способы ионизации

- Способы ионизации атомов и молекул зависят от конкретной цели анализа

| Способ ионизации | Аналитическое использование |
|--|--|
| Электронный удар (электронная ионизация) | Изотопный анализ, молекулярный анализ неорганических ионов |
| Химическая ионизация | Анализ органических соединений |
| Электроспрей (электрораспыление) | Анализ крупных (до нескольких млн дальтон) молекул |
| Лазерное излучение | |
| Бомбардировка пучком ионов | |

К крупным молекулам в миллионах Дальтон относятся большие биомолекулы, такие как белки, нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), полисахариды и другие полимеры. Масса таких молекул может быть значительно больше массы малых органических молекул, которые обычно анализируются в масс-спектрометрии.

Дальтон (Da) - это единица измерения молекулярной массы, которая равна одной двенадцатой массы атома углерода. Масса белков, *например*, может составлять от нескольких десятков до нескольких сотен тысяч Дальтон, а в случае крупных комплексов, таких как белковые агрегаты или вирусные частицы, она может достигать миллионов Дальтон.

Крупные биомолекулы обычно изучают с помощью методов анализа, таких как масс-спектрометрия, сепаративные техники (*например*, гель-фильтрация) и другие.

Методы ионизации пробы

Газовая фаза

- электронная ионизация (EI)
- химическая ионизация (CI)
- электронный захват (EC)
- ионизация в электрическом поле (FI)

Жидкая фаза

- фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)
- электроспрей (APESI)
- термоспрей
- ионизация при атмосферном давлении (AP)
- химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)

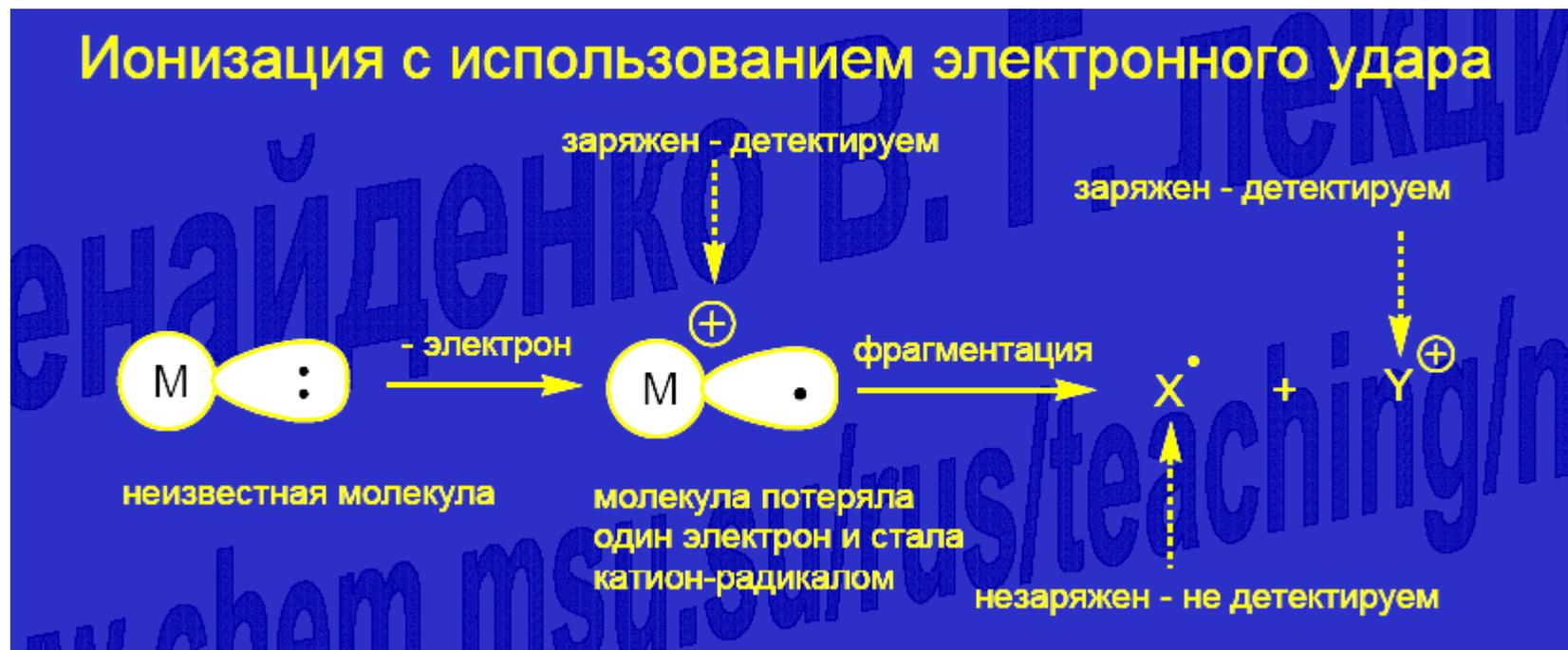
Твёрдая фаза

- прямая лазерная десорбция - масс-спектрометрия (LDMS)
- матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI)
- масс-спектрометрия вторичных ионов (SIMS)
- бомбардировка быстрыми атомами (FAB)
- десорбция в электрическом поле (FD)
- плазменная десорбция (PD)
- ионизация в индуктивно-связанной плазме (ICP)
- термоионизация или поверхностная ионизация
- ионизация в тлеющем разряде и искровая ионизация
- ионизация в процессе лазерной абляции

- В неорганической химии для анализа элементного состава применяются жёсткие методы ионизации, так как энергии связи атомов в твёрдом теле гораздо больше и значительно более жёсткие методы необходимо использовать для того, чтобы разорвать эти связи и получить ионы
- Ионизация в индуктивно связанной плазме (ICP)
 - термоионизация или поверхностная ионизация
 - ионизация в тлеющем разряде и искровая ионизация
 - ионизация в процессе лазерной абляции
- Исторически первые методы ионизации были разработаны для газовой фазы
- К сожалению, очень многие органические вещества невозможно испарить, то есть перевести в газовую фазу, без разложения, а это значит, что их нельзя ионизовать электронным ударом

- Но среди таких веществ почти всё, что составляет живую ткань (белки, ДНК и т. д.), физиологически активные вещества, полимеры, то есть всё то, что сегодня представляет особый интерес
- Масс-спектрометрия не стояла на месте и последние годы были разработаны специальные методы ионизации таких органических соединений
- Сегодня используются, в основном, два из них
- 1. **ионизация при атмосферном давлении** и её подвиды –
 - электроспрей (Electrospray Ionization, ESI)
 - химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
 - фотоионизация при атмосферном давлении (APPI - Atmospheric Pressure Photoionization)
- 2. **ионизация лазерной десорбцией** (MALDI - от [англ.](#) MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
- Форма получаемого масс-спектра сильно зависит от способа ионизации
- Наиболее часто используют ионизацию электронным ударом

- **Электронный удар** – метод широко применяется для ионизации органических соединений
- Пары образца бомбардируют ускоренными электронами
- При столкновении электронов с органической молекулой вначале образуется катион-радикал $M + e \rightarrow M^{+\cdot} + 2e$
- затем происходит его распад (фрагментация), и образуются дочерние ионы с меньшими массами

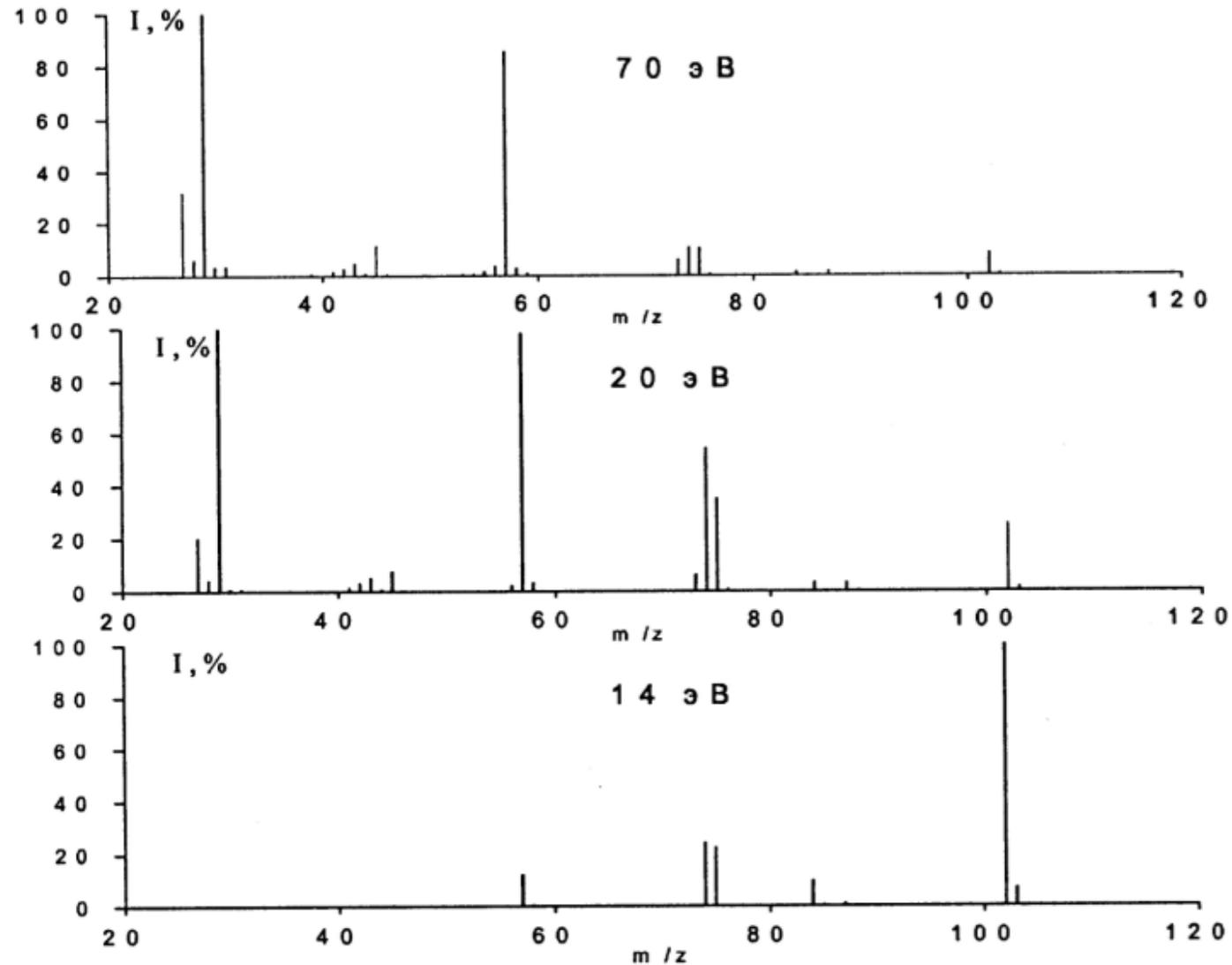


- Эффективность ионизации зависит от энергии ионизирующих электронов, максимум эффективности достигается при энергии примерно в 70 эВ



- Зависимость величины ионного тока от энергии ионизирующих электронов

Ионизация электронным ударом – зависимость интенсивности пика молекулярного иона от величины энергии ионизации:



19

Масс-спектр электронного удара этилпропионата $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$ (молекулярная масса 102) при энергиях ионизирующих электронов 70, 20 и 14 эВ – чем меньше энергия ионизации, тем выше пик молекулярного иона

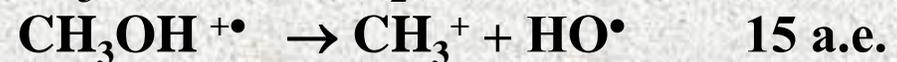
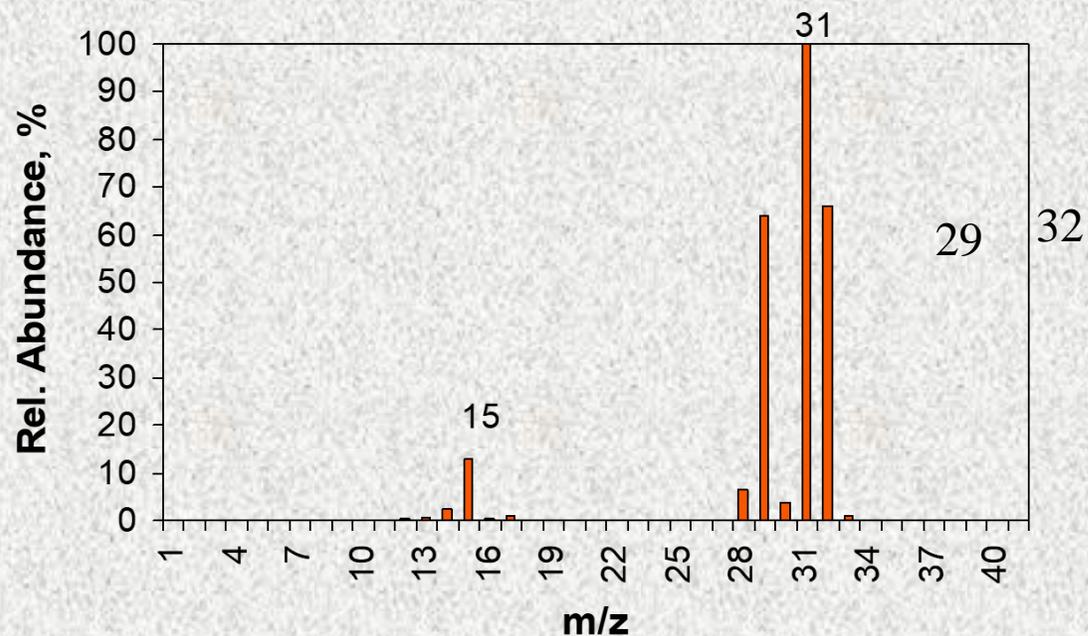
- Масс-спектрометр регистрирует лишь положительные ионы, отрицательные ионы, нейтральные радикалы и молекулы не регистрируются

Достоинства метода

- Метод ионизации электронным ударом дает богатые фрагментами масс-спектры, которые однозначно характеризуют структуру молекулы, что удобно для идентификации веществ
- Масс-спектрометрия электронного удара - высокочувствительный метод анализа, позволяет анализировать пикомольные количества вещества
- Существуют "библиотеки" масс-спектров, содержащие спектры более 70000 органических соединений, по которым можно проводить их идентификацию с применением ЭВМ

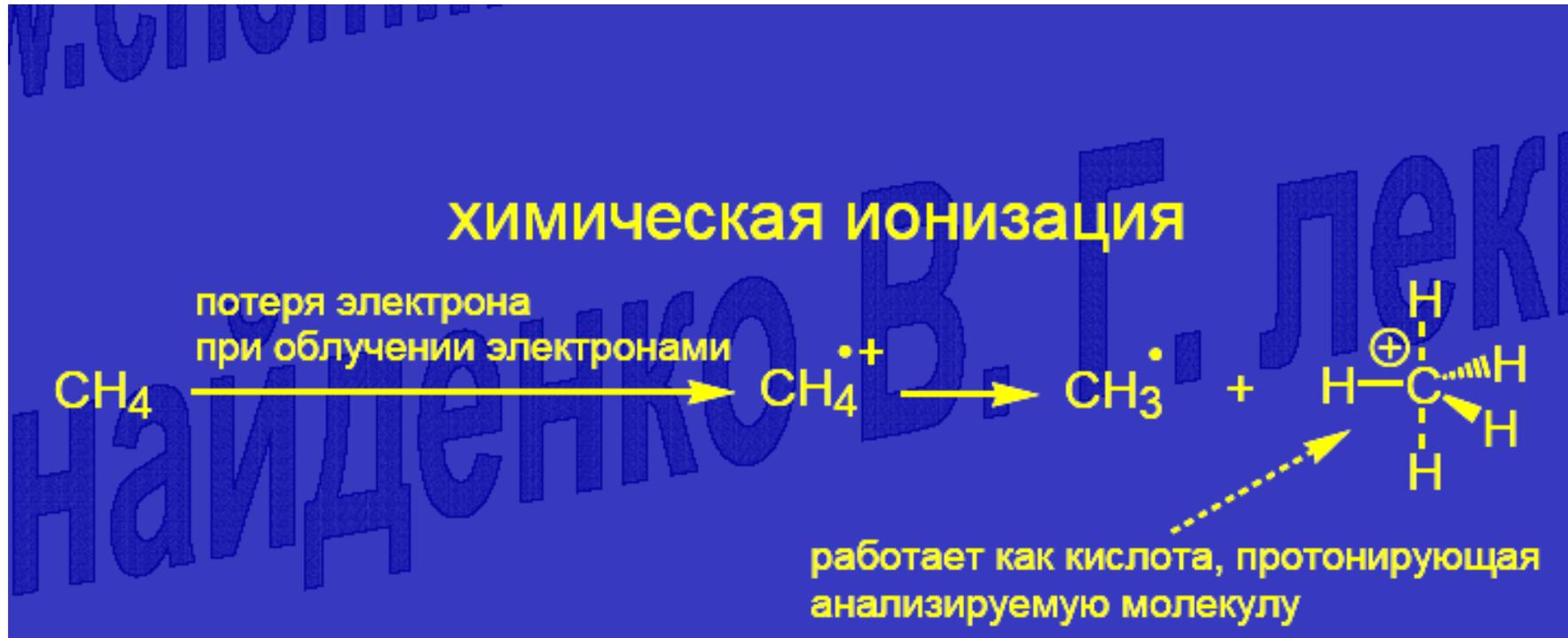
- **Недостатки метода:**
- Молекулярные ионы образуются лишь у 20% органических соединений
- метод применим только для определения легколетучих термически стабильных соединений;
- ионы с большими значениями m/z , дающие информацию о молекулярной массе и наличии функциональных групп обеспечивают небольшой вклад в значения полного ионного тока
- отрицательно заряженные ионы, имеющие большое значение в структурном анализе, образуются в очень небольшом количестве и ограниченным числом органических соединений

Масс-спектр метанола (CH₃OH)



Химическая ионизация – более мягкий способ ионизации

- Пары пробы смешивают с большим избытком газа-реагента (метан, изобутан, аммиак или NO), газ-реагент ионизируют действием электронного удара



- Определяемые молекулы ХН ионизируются непосредственно ионами реагентного газа за счет ряда реакций, например:
- $\text{CH}_5^+ + \text{XH} \rightarrow \text{XH}_2^+ + \text{CH}_4$
- Далее протонированная молекула образца выталкивается электрическим полем в сторону масс-анализатора

Достоинства:

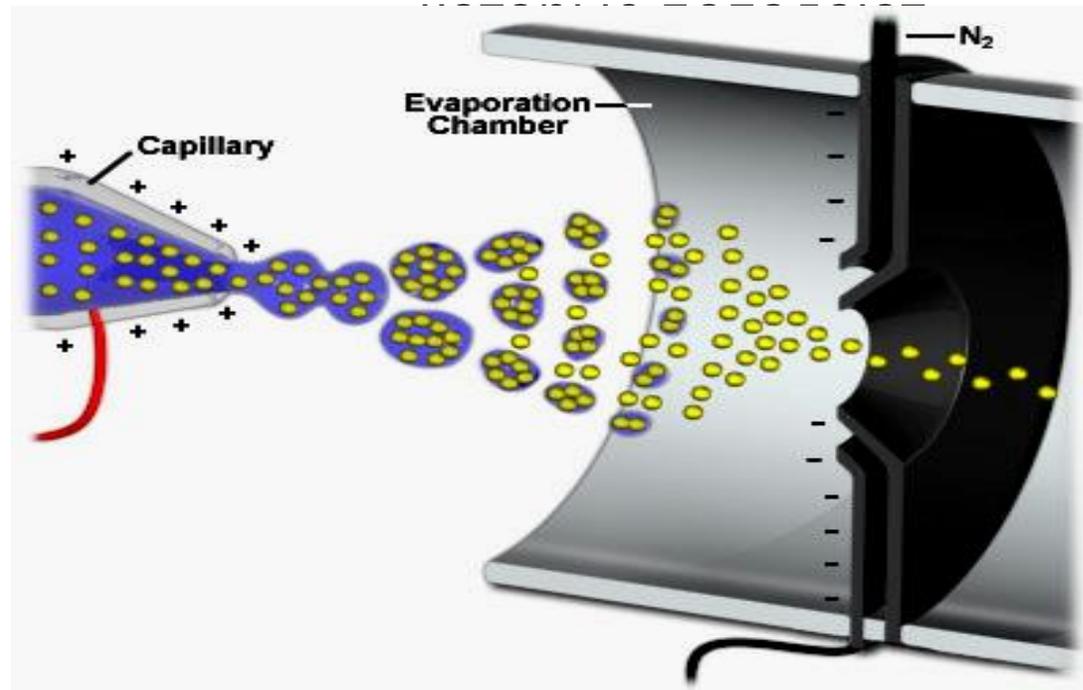
- 1. Мягкий метод ионизации, молекуле образца передается около 5 эВ избыточной энергии, что препятствует процессам фрагментации и позволяет подвергать анализу нестойкие молекулы
- 2. Интенсивный пик молекулярного иона, что позволяет определить молекулярную массу

Недостатки:

- 1. Отсутствие фрагментации, очень простые масс-спектры, что не позволяет судить о структуре вещества и сравнить спектр с базами масс-спектральных данных
- 2. Возможно провести анализ только тех соединений, которые можно перенести в газовую фазу (испарить)

Электроспрей (электрораспыление)

- Вещество на ионизацию поступает **в полярном растворителе** (вода, метанол, ацетонитрил и др.), содержащем ионы водорода и катионы щелочных металлов (натрий, калий), через металлический капилляр (распылитель), к которому приложено высокое напряжение
- Продвигаясь в электрическом поле капля раствора испаряется под действием нагретого потока инертного газа (азот) и распадается на ряд мелких положительно заряженных капель,
в масс-анализатор



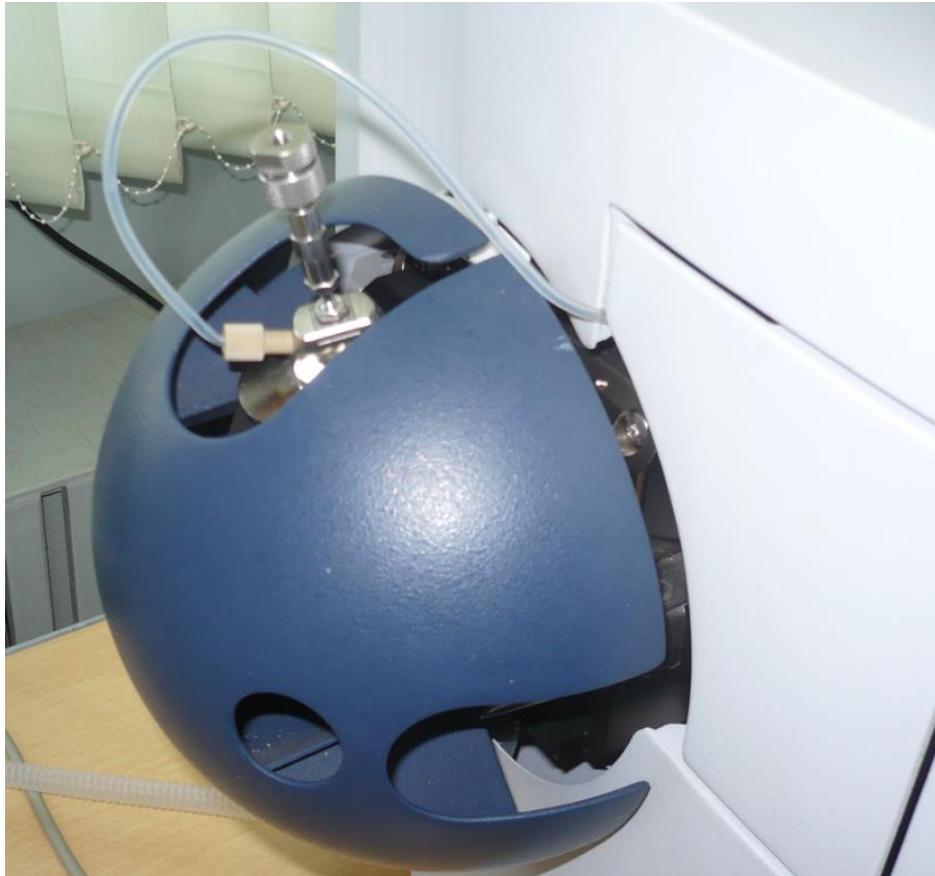
Достоинства:

- Метод позволяет работать с веществами, которые нельзя перевести в газовую фазу
- Удобен для сочетания масс-спектрометра с жидкостным хроматографом
- Возможность анализа крупных (до нескольких миллионов дальтон) молекул
- Мягкое (низкоэнергетическое) ионизационное воздействие

Недостатки:

- Вещество должно быть растворимо в полярных растворителях
- Масс-спектр малоинформативен, как правило, присутствуют лишь пики комплексов молекулярного иона с катионом (H^+ , Na^+ , K^+), многозарядных ионов таких комплексов

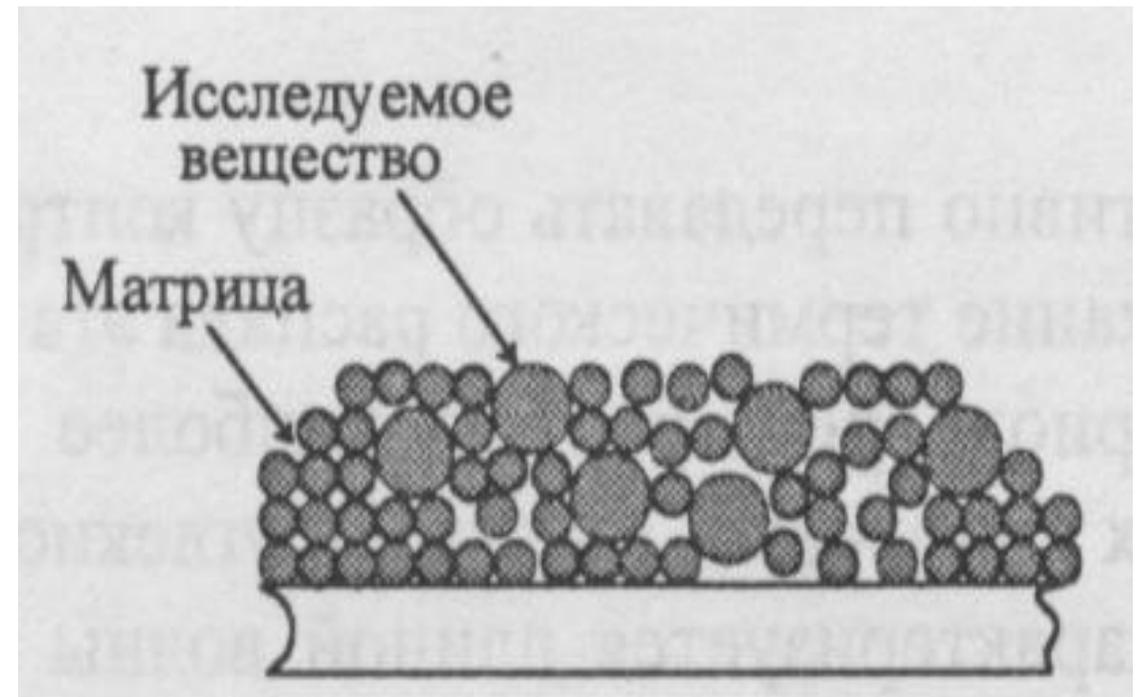
Приставка для электроспрей-ионизации, подключенная к времяпролетному масс-спектрометру Bruker micrOTOFQ



Лазерная десорбция

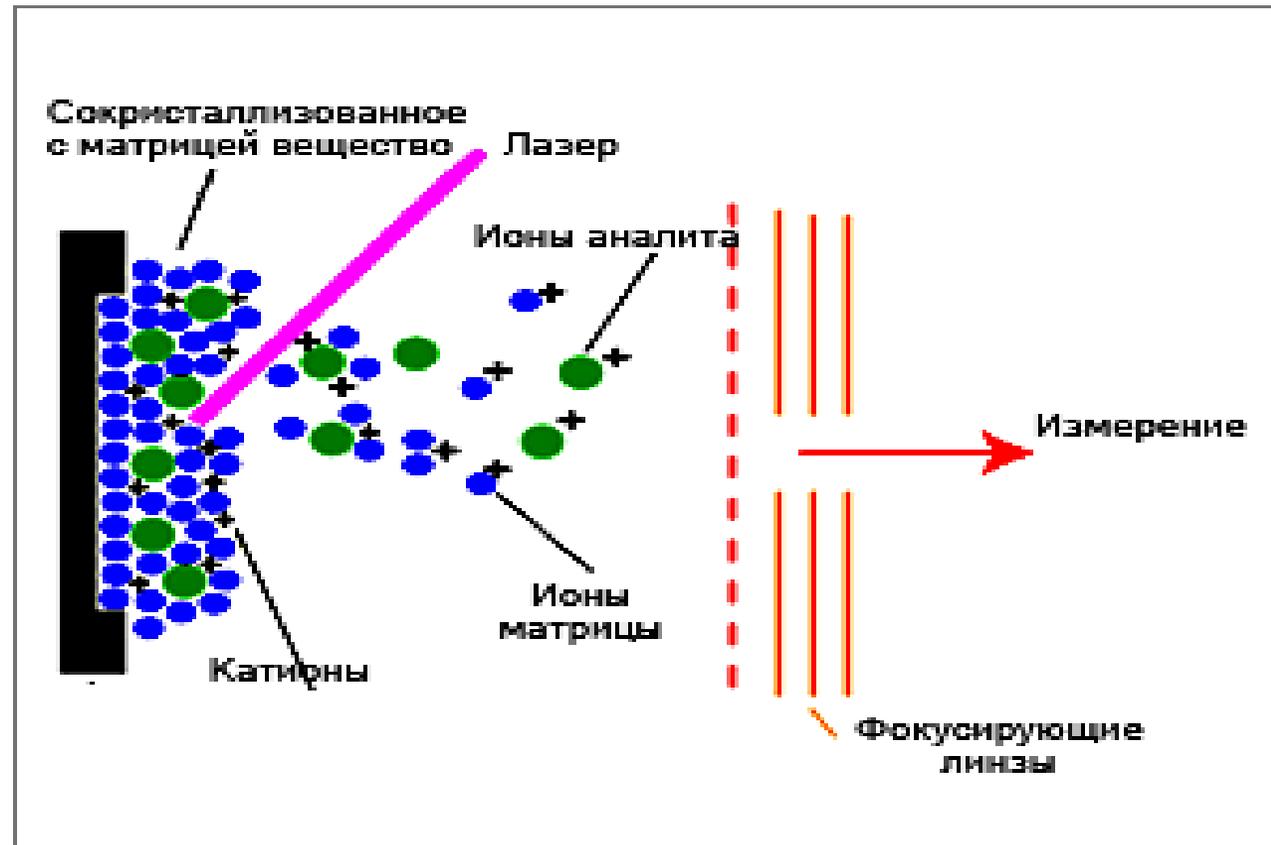
Матричная лазерная десорбция – метод, при котором исследуемое вещество помещают в «матрицу» - перемешивают с веществом, имеющим меньший молекулярный вес и обладающим высокой способностью поглощать лазерное излучение (например, коричная кислота, 3-гидроксипиколиновая кислота, 6,7-гидроксикумарин и т.д.).

Перемешивание происходит при помощи растворения вещества-образца и вещества матрицы в одном растворителе и последующем испарении растворителя на специальной подложке.



Далее смесь на подложке помещают в прибор и облучают короткими лазерными импульсами.

Вещество матрицы испаряется и захватывает с собой молекулы исследуемого вещества, которые частично ионизируются и увлекаются электрическим полем в масс-анализатор.



Достоинства:

- 1. Возможность анализа крупных молекул (массой до 100 000 дальтон и выше)
- 2. Мягкая ионизация образца
- 3. Возможность анализа загрязненных примесями образцов

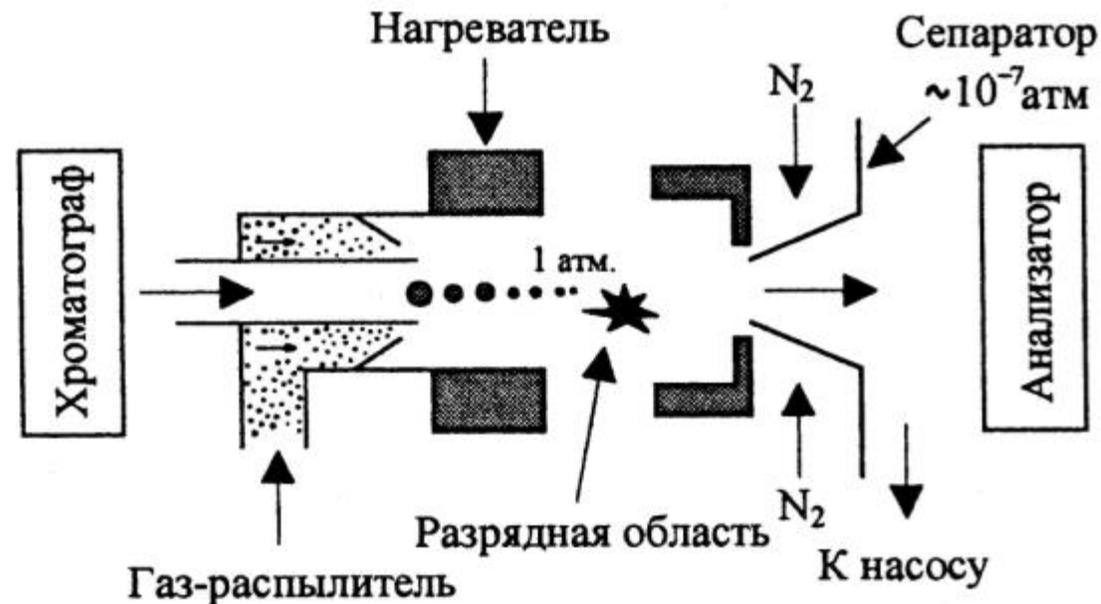
Недостатки:

- 1. Малоинформативный масс-спектр – присутствуют лишь пики молекулярного иона и его «мультимеров» - частиц, состоящих из нескольких молекул образца с зарядом +1
- 2. Долгая пробоподготовка и необходимость подбора условий под образец - подбирать вещество для матрицы

Полевая ионизация

- В этом методе ионизация происходит под действием электрического поля высокой напряженности (до 10^8 В/см)
- Ионизация происходит на **эмиттере** – вольфрамовой проволоке, покрытой пиролитическим углеродом. Частицы углерода образуют на поверхности проволоки микроскопические острия, они увеличивают локальную напряженность поля и способствуют ионизации
- метод относится к мягким способам ионизации
- Количество образующихся фрагментов невелико, спектр достаточно простой и содержит молекулярный пик
- Рассмотренные способы ионизации требуют предварительного испарения пробы (**~ 500 °C**) и применимы для изучения молекул с молекулярными массами менее 1000

- **Химическая ионизация при атмосферном давлении** – метод, похожий на электрораспыление. Используется для стыковки жидкостного хроматографа с масс-анализатором. Поток из колонки жидкостного хроматографа направляется в распылитель, где он превращается в мелкодисперсный аэрозоль и смешивается с большим количеством нагретого газа (азота или воздуха), далее капли аэрозоля перемещаются в область испарения, где в газовую фазу переходит большая часть молекул растворителя. Далее на пути уже газообразного образца следует область ионизации:



Ионизация происходит при атмосферном давлении либо коронным разрядом, либо бета-излучателями. Далее электрическое поле и поток увлекает ионизированные частицы в последовательные сепараторы, где происходит быстрая откачка легких молекул (газ, растворитель), а ионизированные частицы образца попадают в анализатор с глубоким вакуумом

Достоинства:

1. Работа ионного источника при атмосферном давлении
2. Необязательно использовать только полярные растворители для образца (как в случае электрораспыления)
3. Возможность работы с образцами, которые сложно перевести в газовую фазу обычными методами

Недостатки:

1. Возможен анализ образцов с массой примерно до 1500 дальтон, что относительно немного
2. Полученные масс-спектры малоинформативны и не позволяют использовать их для структурных исследований (мало линий)

- **Десорбционные методы** используют при исследовании биоорганических веществ с молярными массами порядка 10 000;
- Ионизации подвергается твердая или жидкая проба без предварительного испарения;
- Масс-спектры крайне просты и в предельном случае состоят только из молекулярного иона;
- В настоящее время для ионизации все шире используют лазеры, например, УФ-лазер с длиной волны 337 нм.
- **Полевая десорбция**
- Как и в методе полевой ионизации пробу ионизируют на эмиттере под действием высокого напряжения. Для облегчения ионизации эмиттер нагревают электрическим током.

- При **бомбардировке быстрыми атомами** пробу помещают в ионизатор непосредственно или растворяют в подходящей нелетучей матрице, обычно в глицерине;
- Затем пробу облучают потоком нейтральных высокоэнергетических (около 8кэВ) атомов, например, Ar или Xe;
- Бомбардировка пробы приводит к образованию + и – ионов, которые в результате десорбции отрываются от поверхности;
- Выход ионов анализируемого образца тем больше, чем больше масса ускоренных атомов.



ВОПРОСЫ ???