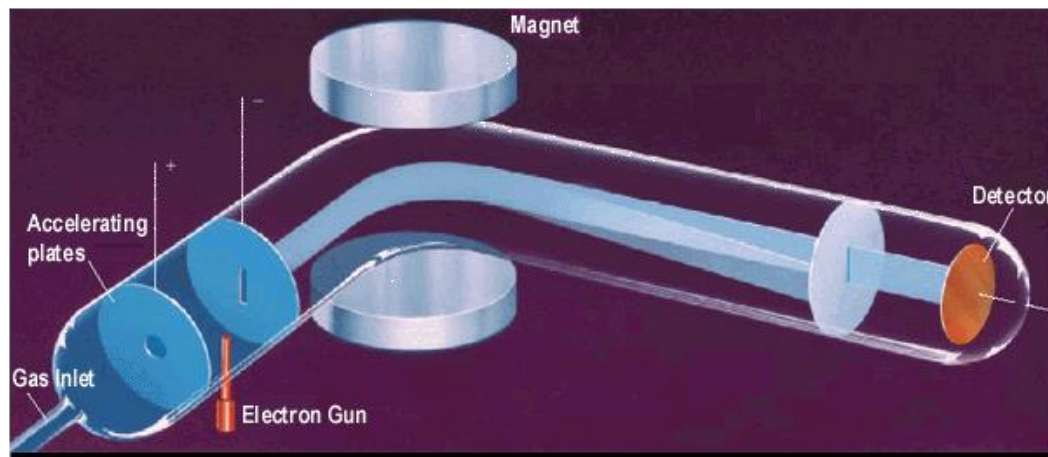




# Хроматографияның заманауи аспектілері

## Лекция тақырыбы: Масс-спектрометрия



**Минажева Гүлшарат Салауатқызы – педагогика ғылымдарының  
докторы, химия ғылымдарының кандидаты, АКХЖСЭТ  
кафедрасының профессоры**

# Масс-спектрометрия (МС)

- МС әдісі - заттарды зерттеу және талдау әдісі
- заттың атомдары мен молекулаларының иондануына және нәтижесінде пайда болған иондардың олардың массалық санына, яғни  $m/z$  - ион массасының оның зарядына қатынасына сәйкес электр немесе магнит өрісінде бөлінуіне негізделген.
- Алғашқы масс-спектрлер Ұлыбританияда 1910 жылы (Томсон) және 1919 жылы (Астон) алынды



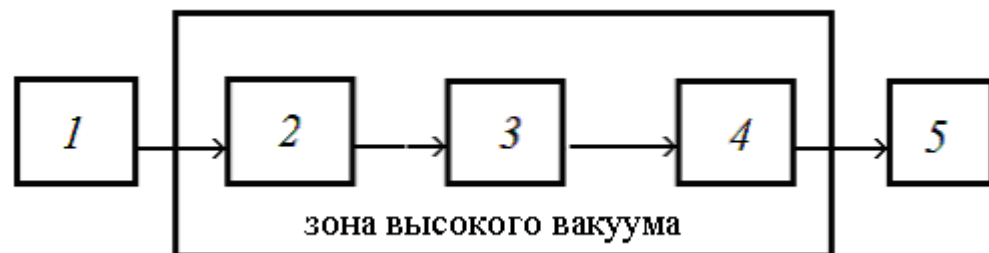
**Джозеф Джон Томсон**  
(18.12.1856 – 30.08.1940)

- **Әдістің артықшылығы** - талдау үшін заттың өте аз мөлшері жеткілікті, **негізгі кемшілігі** – әдіс деструктивті болып табылады, яғни заттың өзі емес, оның бұзылғаннан кейінгі өнімдері зерттеледі.
- Шынын айтқанда, МС әдісі спектроскопиялық әдіске жатпайды, өйткені оның негізінде заттың электромагниттік сәулеленумен өзара әрекеттесуі жоқ.
- Алайда, иондардың массалық сандар бойынша графикалық таралуының пайда болуы - иондық ток қарқындылығының масса-заряд қатынасына тәуелділігі - **спектрге ұқсайды** және ол масс-спектр деп аталады, ал әдістің өзі масс-спектрометрия деп аталады.

- Масс-спектрометр-магниттік және электр өрістеріндегі зарядталған бөлшектердің қозғалысының физикалық заңдылықтарын қолданатын және масс-спектрді алу үшін қажет **вакуумдық** құрылғы.



## Масс-спектрометрдің блок-схемасы



- 1 – үлгіні енгізу жүйесі
- 2 – иондық үдеткіші бар иондану көзі
- 3 – масс-анализатор (иондарды бөлуге арналған құрылғы)
- 4 – детектор
- 5 – өлшеу немесе тіркеу құрылғысы
- Иондардың басқа атомдармен немесе молекулалармен соқтығысуын болдырмау үшін талдау вакуумда жүреді (ионизатордағы қысым:  $10^{-3} - 10^{-4}$  Па, масс-анализатордағы қысым:  $10^{-3} - 10^{-8}$  Па)

## Әдіс принципі

- Үлгі молекулалар иондалатын иондану көзіне енгізіледі;
- Түзілген оң иондар иондану аймағынан шығарылады, электр өрісі арқылы үдетіледі және бір уақытта сәулеге шоғырланады. Бейтарап молекулалар вакуумдық сорғымен жойылады;
- Үдетілген иондар ағыны масса анализаторына түседі, онда иондар масса бойынша бөлінеді;
- Бөлінген ион сәулелері детекторға түседі, онда иондық ток күшейіп, жазылатын электр сигналына айналады.

Масс-спектрометрияда оң иондар бірнеше себептерге байланысты жиі қолданылады:

- **Оң иондардың тұрақтылығы:** көптеген жағдайларда оң иондар теріс иондармен салыстырғанда үлкен тұрақтылыққа ие. Себебі оң зарядталған молекулаларда электрондар әдетте Атом қабықшаларының ішінде болады, бұл олардың фрагментацияға бейімділігін төмендетеді.
- **Иондану тиімділігі:** электроспрей және maldi (лазерлік десорбция ионизациясы) сияқты кейбір иондау әдістері оң иондарды жасау үшін тиімдірек. Бұл қолданылатын реагенттердің немесе матрицалардың химиялық қасиеттеріне байланысты, олар әдетте оң зарядтарды жақсы көреді.
- **Оң иондармен жұмыс істеу ыңғайлылығы:** оң иондарды зарядына байланысты масс-спектрометрде басқару оңайырақ. Оларды электр өрістері арқылы анализаторда жеделдетуге және фокустауға болады, бұл оларды анықтау мен талдауды жеңілдетеді.
- **Органикалық қосылыстарды талдаудағы таралуы:** белоктар, пептидтер, липидтер және басқа биомолекулалар сияқты көптеген органикалық қосылыстар оң жағдайларда оңай иондалады және масс-спектрометрияда сәтті талдауға болатын тұрақты оң иондар түзеді.
- Жалпы, масс-спектрометриядағы оң иондарды таңдау нақты иондау әдісіне, талданатын үлгілердің түріне және зерттеушінің қалауына байланысты.

Теріс иондарды масс-спектрометрияда да қолдануға болады және кейбір жағдайларда үлгілердің белгілі бір түрлерін талдау үшін қолайлы. Масс-спектрометриядағы теріс иондары бар мысалдар:

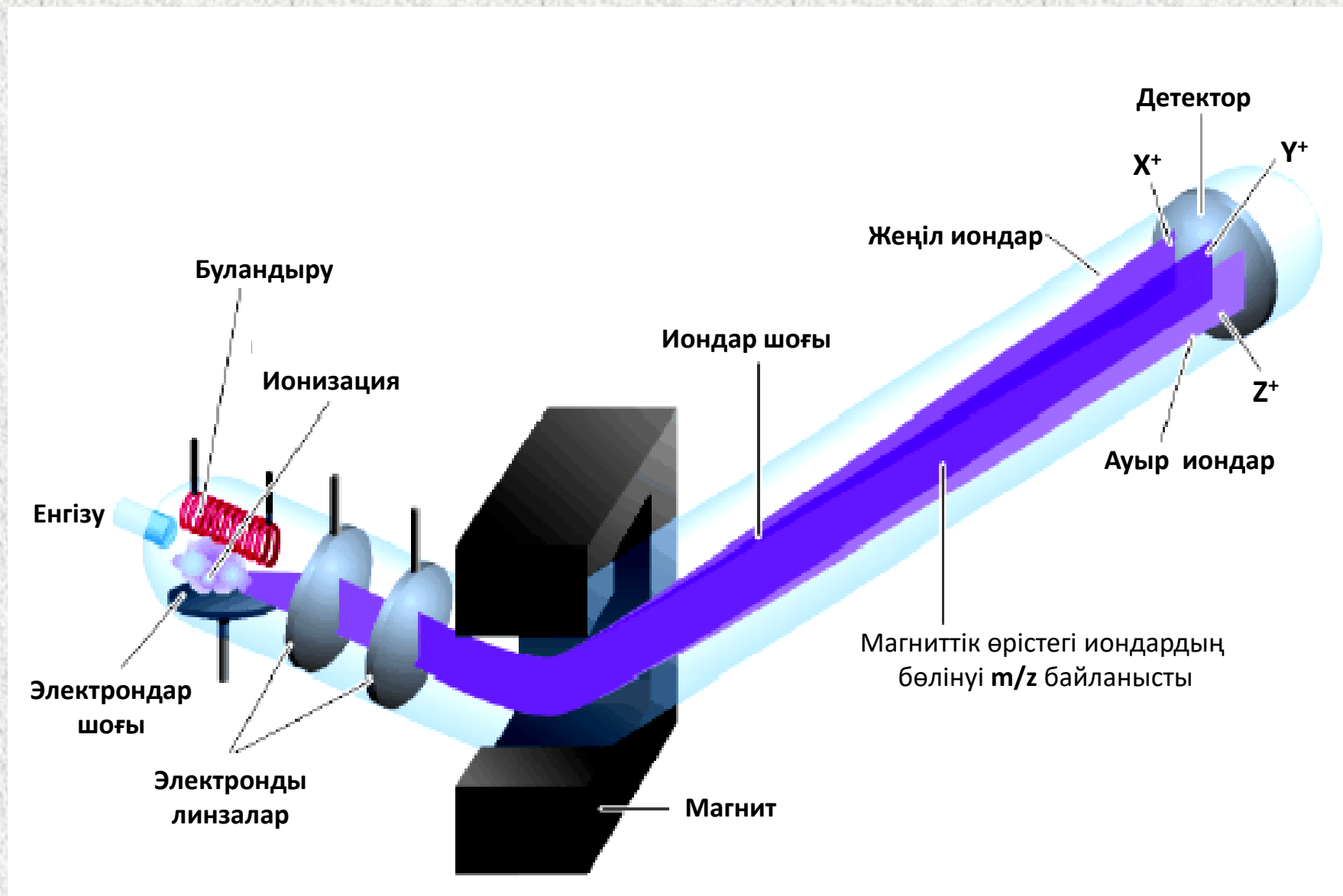
**Теріс иондану:** теріс иондарды жасау үшін арнайы жасалған иондау әдістері бар. Мысалы, электроспрей және суық электронды иондану (CI) теріс зарядталған молекулалардың түзілуін қамтамасыз ете алады.

**Бейорганикалық қосылыстарды талдау:** теріс иондар көбінесе металл немесе органикалық қышқыл аниондары сияқты бейорганикалық қосылыстарды талдау үшін қолданылады.

**Антибиотиктерді және басқа қышқыл қосылыстарды зерттеу:** көптеген антибиотиктер мен басқа препараттар тұрақты теріс иондар түзе алады, бұл оларды масс-спектрометрияда талдауға жарамды етеді.

**Молекулалық құрылымның анықтамасы:** кейбір қосылыстар теріс жағдайларда жақсы иондалады және тұрақты иондық фрагменттерді құрайды, бұл зерттеушілерге олардың молекулалық құрылымын анықтауға мүмкіндік береді.

Оң және теріс иондану арасындағы таңдау үлгінің түріне, талданатын қосылыстардың химиялық табиғатына және белгілі бір зерттеудің талаптарына байланысты.



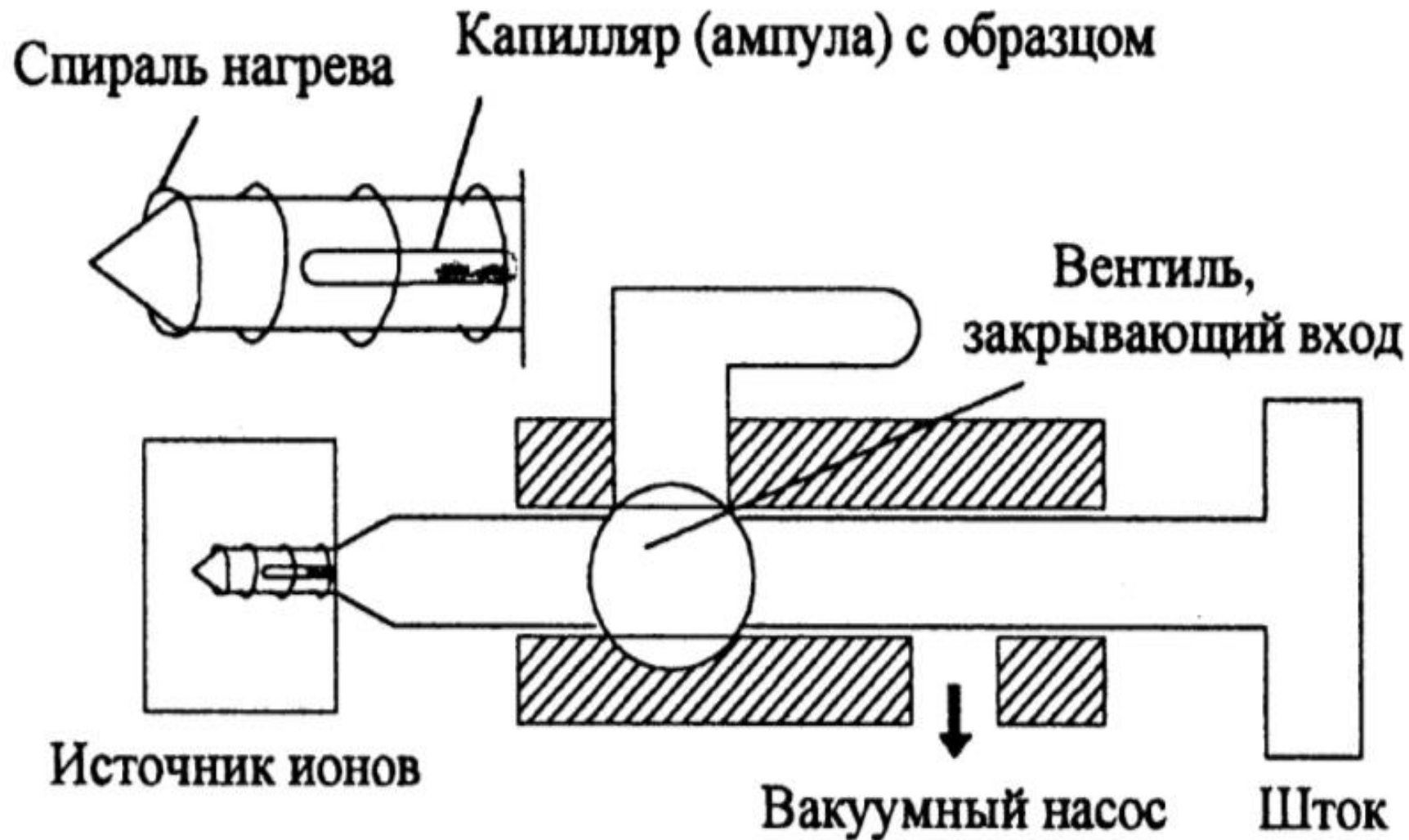
**Масс-спектрометр схемасы**



## Үлгіні енгізу жүйесі

- Құрылғының ішіндегі вакуумды бұзбау үшін енгізілетін сынаманың мөлшері бірнеше микромольден аспау керек.
- **1.Жанама әдіс** - сынама газ күйінде ионизаторға енгізіледі.
- Сұйық және қатты сынамалар вакуумдық камерада ( **~500 °C**) буланып, арнайы тесік арқылы булар ионизаторға түседі.
- **2.Тура әдіс** – қиын ұшатын сынамалар үшін:
- Үлгі шлюз камерасы жүйесі арқылы штанганы пайдаланып ионизаторға тікелей енгізіледі.
- Бұл жағдайда заттың жоғалуы едәуір аз, сынаманың массасы бірнеше *нг* құрайды.

# Үлгіні масс-спектрометрге тікелей енгізу схемасы:



- **3.** Талданатын зат хроматографиялық бөліну кезінде масс-спектрометрге түседі. Қазіргі уақытта on-line режимінде газ және сұйық хроматография мен масс-спектрометрияның (ГХ-МС, СХ-МС) үйлесімі аналитикалық химияның көптеген салаларында күнделікті талдау үшін қолданылады.
- **МЫСАЛЫ:**
- **Фармацевтикалық препараттарды өндірудегі бақылау процесі:** ГХ-МС және СХ-МС фармацевтикалық препараттарды өндіру процесін онлайн бақылау үшін пайдаланылуы мүмкін. Бұл өндіріс кезінде өнімнің құрамы мен тазалығын үздіксіз бақылауға мүмкіндік береді, бұл сапаның ықтимал проблемаларын болдырмауға көмектеседі.
- **Ауыз су сапасын бақылау:** сумен жабдықтаушы компаниялар ауыз су сапасын үздіксіз бақылау үшін GC-MS және LC-MS онлайн жүйелерін пайдалана алады. Бұл органикалық қосылыстар, пестицидтер және фармацевтикалық қалдықтар сияқты әртүрлі ластаушы заттарды анықтауға және анықтауға мүмкіндік береді.
- **Атмосфералық ауаны талдау:** ГХ-МС онлайн жүйелері көмірсутектер, альдегидтер және басқа органикалық қосылыстар сияқты әртүрлі ластаушы заттардың болуы мен концентрациясын бақылау үшін атмосфералық ауаны бақылау үшін орнатылуы мүмкін.
- **Азық-түлік өндірісіндегі сапаны бақылау:** Азық-түлік өндірушілері өнімнің сапасы мен қауіпсіздігін бақылау үшін LC-MS онлайн жүйелерін пайдалана алады. Бұл пестицидтер, антибиотиктер және хош иістер сияқты әртүрлі қоспалар мен ластаушы заттарды анықтауға және анықтауға мүмкіндік береді.
- **Өнеркәсіптегі газ шығарындыларын бақылау:** ГХ-МС онлайн жүйелері өнеркәсіптік кәсіпорындардағы газ шығарындыларын үздіксіз бақылау үшін пайдаланылуы мүмкін. Бұл көмірсутектер, аммиак және басқа зиянды заттар сияқты әртүрлі газдардың концентрациясын анықтауға және өлшеуге мүмкіндік береді.

# Иондану әдістері

- Атомдар мен молекулаларды иондау әдістерін таңдау талдаудың нақты мақсатына байланысты

| Иондау әдістері                        | Аналитикалық қолданылуы  |
|--|--|
| Электрондық соққы (электронды иондану) | Изотоптық талдау, бейорганикалық иондардың молекулалық талдауы |
| Химиялық иондану                       | Органикалық қосылыстарды талдау                                |
| Электроспрей (электрораспыление)       | Ірі (бірнеше миллион далтонға дейін) молекулаларды талдау      |
| Лазерлік сәулелену                     |  |
| Иондар шоғырымен бомбалау              |  |

Миллиондаған Дальтон болатын ірі молекулаларға белоктар, нуклеин қышқылдары (ДНҚ және РНҚ), полисахаридтер және басқа полимерлер сияқты үлкен биомолекулалар жатады. Мұндай молекулалардың массасы әдетте масс-спектрометрияда талданатын шағын органикалық молекулалардың массасынан едәуір үлкен болуы мүмкін.

Дальтон (Da) - көміртегі атомының массасының он екіден біріне тең молекулалық массаның өлшем бірлігі. Мысалы, ақуыздардың массасы бірнеше ондаған мыңнан бастап бірнеше жүздеген мың Дальтонға дейін болуы мүмкін, ал ақуыз агрегаттары немесе вирустық бөлшектер сияқты ірі кешендер жағдайында ол миллиондаған Дальтон болуы мүмкін.

Ірі биомолекулалар әдетте масс-спектрометрия, сепаративті бөлу техникасы (мысалы, гельді сүзу) және т.б. сияқты талдау әдістері арқылы зерттеледі.

## 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

- Бейорганикалық химияда элементтік құрамды талдау үшін қатқыл иондану әдістері қолданылады, өйткені қатты денедегі атомдардың байланыс энергиялары әлдеқайда үлкен және осы байланыстарды үзіп, иондар алу үшін едәуір қатаң әдістерді қолдану қажет.
  - Индуктивті байланысқан плазмадағы иондану (ICP)
  - термоионизация немесе беттік иондану;
  - жану разрядындағы иондану және ұшқындық иондану;
  - лазерлік абляция процесінде иондану.
- Тарихи тұрғыдан иондаудың алғашқы әдістері газ фазасына арналған;
- Өкінішке орай, көптеген органикалық заттарды буландыру мүмкін емес, яғни оларды ыдыратпай газ фазасына ауыстыру мүмкіндігі жоқ, яғни оларды электронды соққымен иондауға болмайды.

- Бірақ мұндай заттардың ішінде тірі ұлпаны құрайтын барлық дерлік (белоктар, ДНҚ және т. б.), физиологиялық белсенді заттар, полимерлер, яғни бүгінгі күні ерекше қызығушылық тудыратын барлық нәрсе.
- Масс-спектрометрия орнында болмады және соңғы жылдары мұндай органикалық қосылыстарды иондаудың арнайы әдістері жасалды.
- Бүгінде негізінен олардың екеуі қолданылады:
- 1. **Атмосфералық қысымдағы иондану** және оның кіші түрлері – электроспрей (Electrospray Ionization, ESI), атмосфералық қысымдағы химиялық иондану (APCI - Atmospheric pressure Chemical Ionization), атмосфералық қысымдағы фотоионизация (APPI - Atmospheric pressure Photoionization)
- 2. **Лазерлік десорбция арқылы иондану** (MALDI - ағылш. *MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)
- Алынған масс-спектрдің пішіні иондану әдісіне өте тәуелді
- Көбінесе электронды соққымен иондау қолданылады



- **Электрондық соққы әдісі** - органикалық қосылыстарды иондау үшін кеңінен қолданылады.
- Үлгі жұптары жеделдетілген электрондармен атқыланады.
- Электрондар органикалық молекуламен соқтығысқан кезде алдымен катион-радикал түзіледі  $M + e \rightarrow M^{\cdot+} + 2e$
- Содан кейін оның ыдырауы (фрагментациясы) жүреді және массасы аз еншілес иондар түзіледі.

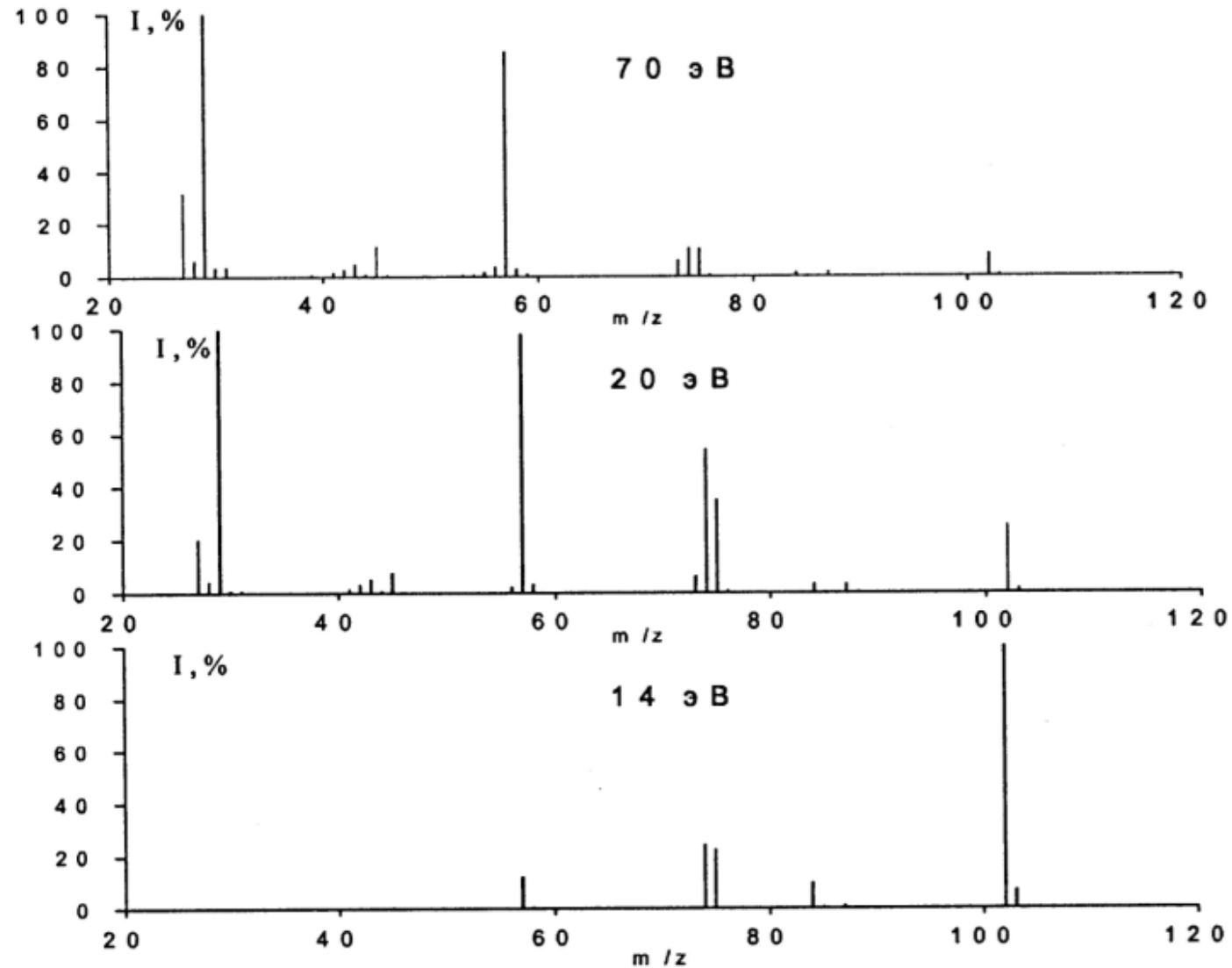


- Иондану тиімділігі иондаушы электрондардың энергиясына байланысты, тиімділіктің максимумына шамамен 70 эВ энергиямен қол жеткізуге болады



- Иондық ток шамасының иондаушы электрондардың энергиясына тәуелділігі

## Электронды соққымен иондау - молекулалық ион шыңының қарқындылығының иондану энергиясының шамасына тәуелділігі:



19

Этил пропионатының электронды соққыдан алынған массалық спектрі  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$  (молекулалық массасы 102) иондаушы электрондардың 70, 20 және 14 эВ энергияларында - иондану энергиясы неғұрлым аз болса, молекулалық ионның шыңы соғұрлым жоғары болады

Масс-спектрометр тек оң иондарды тіркеп, теріс иондар мен бейтарап радикалдарды және молекулаларды тіркемейді.

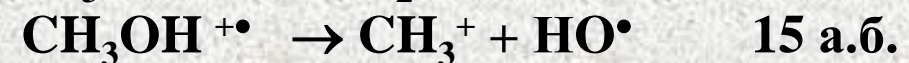
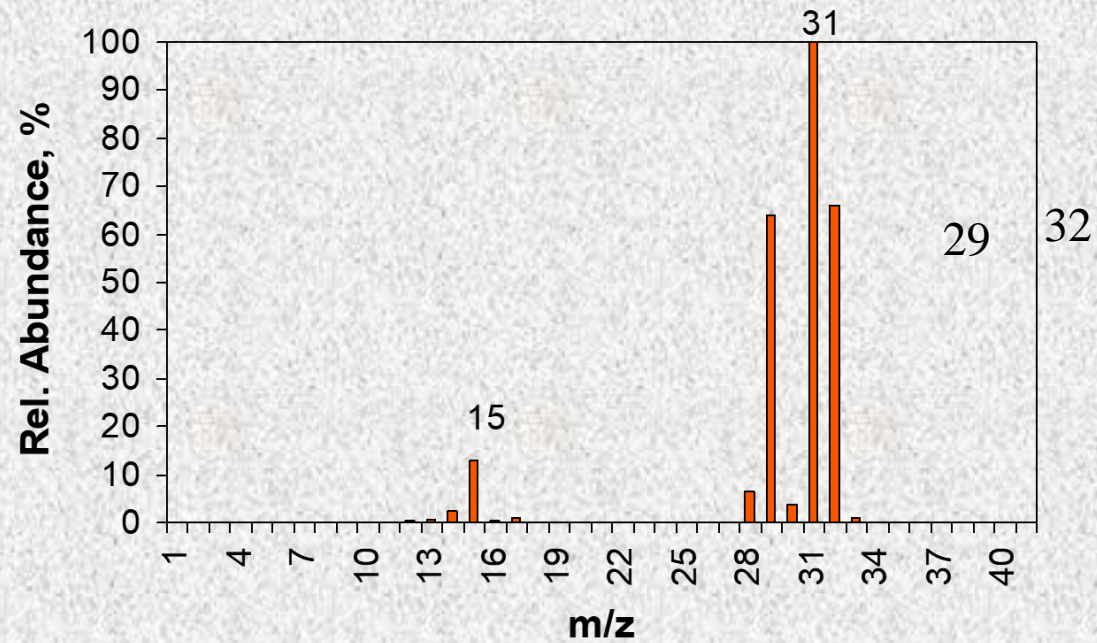
### Әдістің артықшылықтары:

- Электронды соққымен иондау әдісі заттарды анықтауға ыңғайлы молекуланың құрылымын ерекше сипаттайтын фрагменттерге бай масс-спектрлерді береді;
- Электрондық соққының масс-спектрометриясы – сезімталдығы жоғары талдау әдісі, заттың пикомольдік мөлшерін талдауға мүмкіндік береді;
- 70 000-нан астам органикалық қосылыстардың спектрлері бар масс-спектрлердің "кітапханалары" бар, олар арқылы заттарды компьютер қолданып идентификациялауға болады.

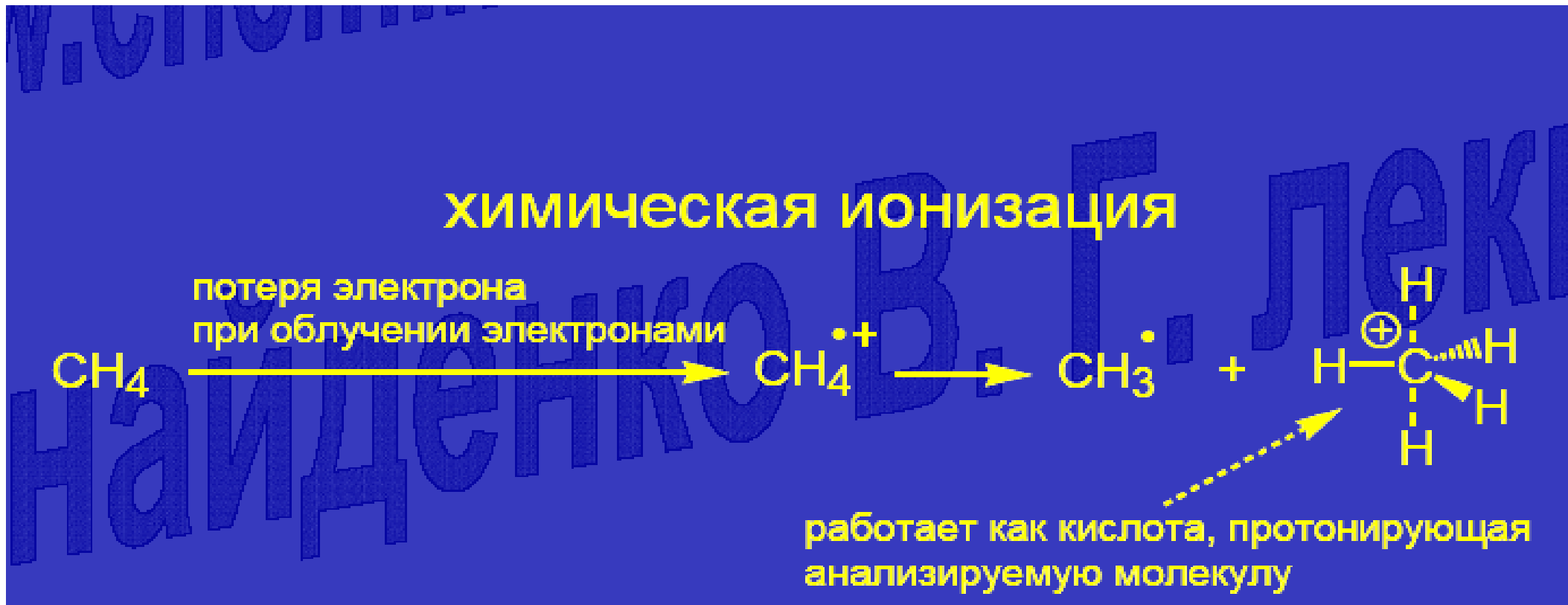
## Әдістің кемшіліктері:

- Молекулалық иондар органикалық қосылыстардың тек 20% - да түзіледі;
- Бұл әдіс тек ұшқыштығы жеңіл, термиялық тұрақты қосылыстарды анықтау үшін қолданылады;
- Молекулалық масса және функционалдық топтар туралы ақпарат беретін  $m/z$  мәндері үлкен болатын иондар толық иондық ток мәндеріне аз үлес қосады;
- Құрылымдық талдауда үлкен маңызы бар теріс зарядталған иондар органикалық қосылыстардың шектеулі санында және өте аз мөлшерде түзіледі.

# Метанолдың (CH<sub>3</sub>OH) масс-спектрі



- Химиялық иондану - ионданудың жұмсақ әдісі.
- Сынама буы газ-реагенттің (метан, изобутан, аммиак немесе NO) тым артық мөлшерімен араластырылып, газ-реагент электрондық соққы арқылы иондалады.

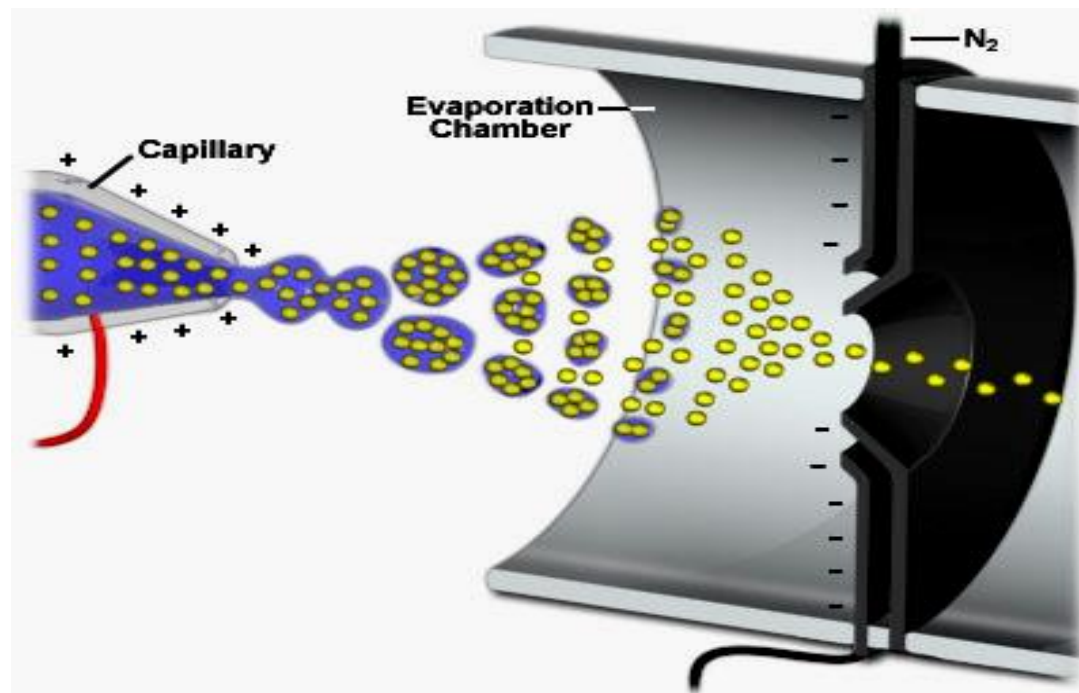


- Анықталған ХН молекулалары бірқатар реакциялар арқылы тікелей газ-реагент иондарымен иондалады, мысалы:  $\text{CH}_5^+ + \text{XH} \rightarrow \text{XH}_2^+ + \text{CH}_4$
- Әрі қарай, протондалған үлгі молекуласы электр өрісі арқылы масс-анализаторына қарай итеріледі;
- *Артықшылықтары:*
  - 1. Жұмсақ иондану әдісі, үлгі молекуласына шамамен 5 эВ-дай артық энергия беріледі, бұл фрагментация процестеріне кедергі келтіреді және тұрақсыз молекулаларды талдауға мүмкіндік береді;
  - 2. Молекулалық массаны анықтауға мүмкіндік беретін молекулалық ионның қарқынды шыңы.
- *Кемшіліктері:*
  - 1. Фрагментацияның болмауы, өте қарапайым масс-спектрлер, бұл заттың құрылымын бағалауға және спектрді масс-спектрлік мәліметтер базасымен салыстыруға мүмкіндік бермейді;
  - 2. Тек газ фазасына (буландыруға) ауыстыруға болатын қосылыстарға ғана талдау жасауға болады.



## Электроспрей (электршашырату)

- Иондануға зат құрамында сутегі иондары мен сілтілі металл катиондары (натрий, калий) бар полярлы еріткіште (су, метанол, ацетонитрил және т. б.), жоғары кернеу берілген металл капилляр (бүріккіш) арқылы енеді.
- Электр өрісінде алға жылжу кезінде ерітінді тамшысы инертті газдың (азот) қыздырылған ағынының әсерінен буланып, масс-анализаторға енетін шағын, оң зарядталған тамшыларға ыдырайды.



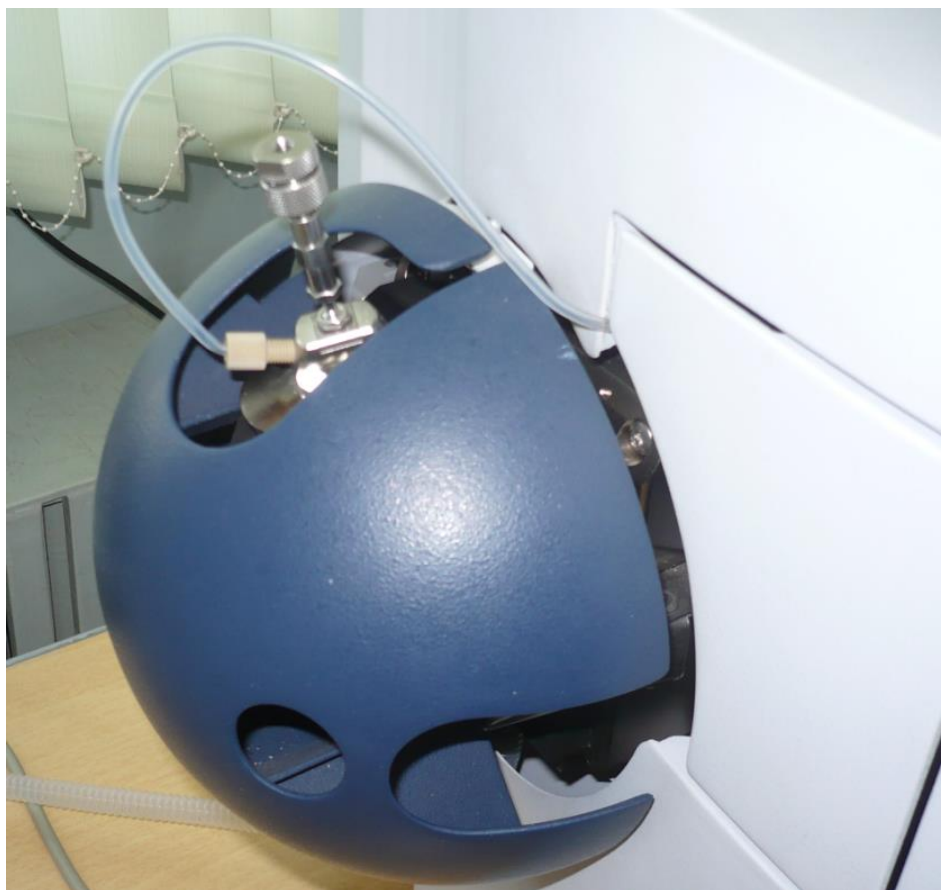
## Артықшылықтары:

- Әдіс газ фазасына ауыстыруға болмайтын заттармен жұмыс істеуге мүмкіндік береді;
- Масс-спектрометрді сұйық хроматографпен біріктіруге ыңғайлы
- Ірі (бірнеше миллион дальтонға дейін) молекулаларды талдау мүмкіндігі;
- Жұмсақ (төмен энергиялы) иондану әсері.

## Кемшіліктері:

- Зат полярлы еріткіштерде еруі керек;
- Масс-спектр аз ақпаратты, әдетте, құрамында катионы ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) бар, көп зарядты иондардың молекулалық ион кешендерінің шыңдары ғана болады.

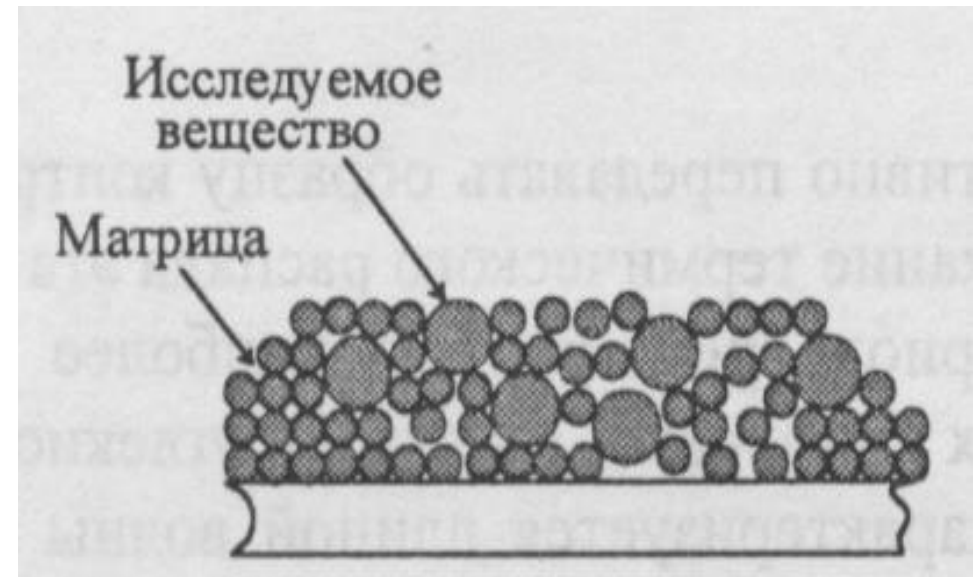
Bruker micrOTOFQ ұшу уақыты  
масс-спектрометріне қосылған  
электроспрей иондау қорабы



## Лазерлі десорбция

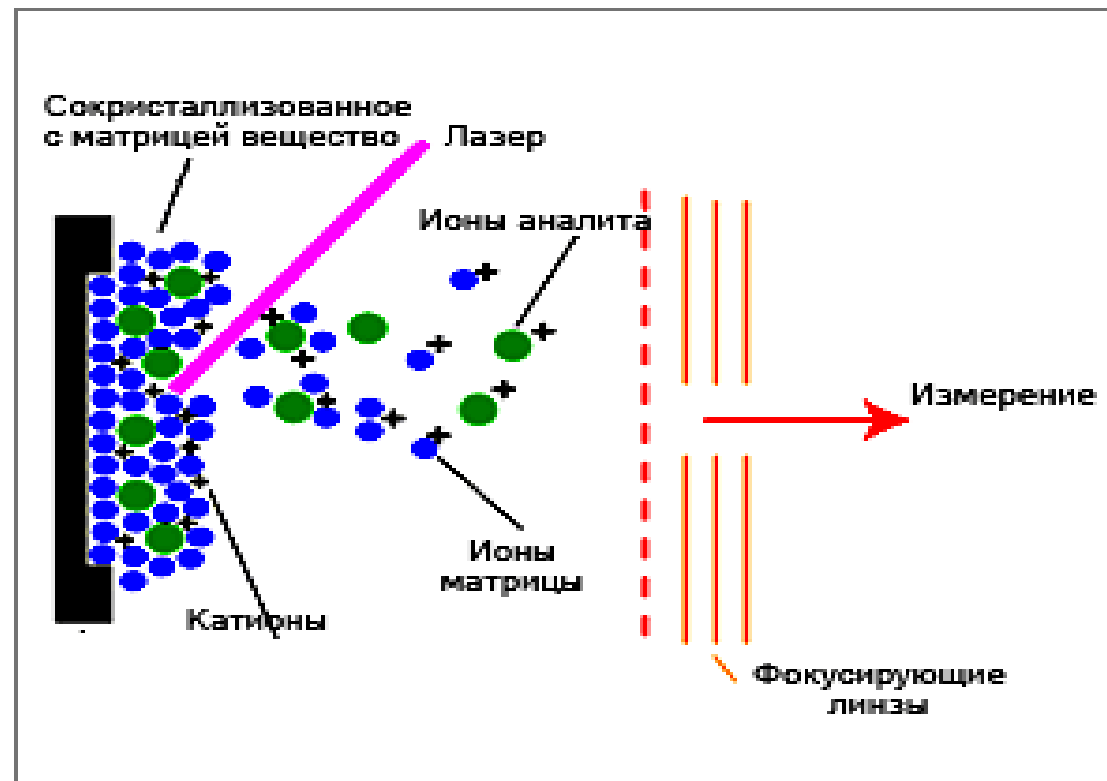
- *Матрицалық лазерлік десорбция* - зерттелетін зат "матрицаға" орналастырылатын әдіс-молекулалық салмағы аз және лазерлік сәулеленуді сіңіру қабілеті жоғары затпен араласады (мысалы, даршын қышқылы, 3-гидроксипиколин қышқылы, 6,7-гидроксикумарин және т.б.).

Үлгі заты мен матрица затын бір еріткіште еріту және кейіннен арнайы субстратта еріткіштің булануы арқылы араластыру жүзеге асырылады.



Субстраттағы қоспаны құрылғыға салып, әрі қарай қысқа лазерлік импульстармен сәулелендіреді.

Матрицаның заты буланып, зерттелетін заттың молекулаларын өзіне ілестіріп алады, содан олар ішінара иондалады және электр өрісіне тартылып, масс-анализаторға түседі.



### *Артықшылықтары:*

- 1. Ірі молекулаларды талдау мүмкіндігі (салмағы 100 000 далтонға дейін және одан да жоғары);
- 2. Үлгінің жұмсақ иондануы;
- 3. Қоспалармен ластанған үлгілерді талдау мүмкіндігі.

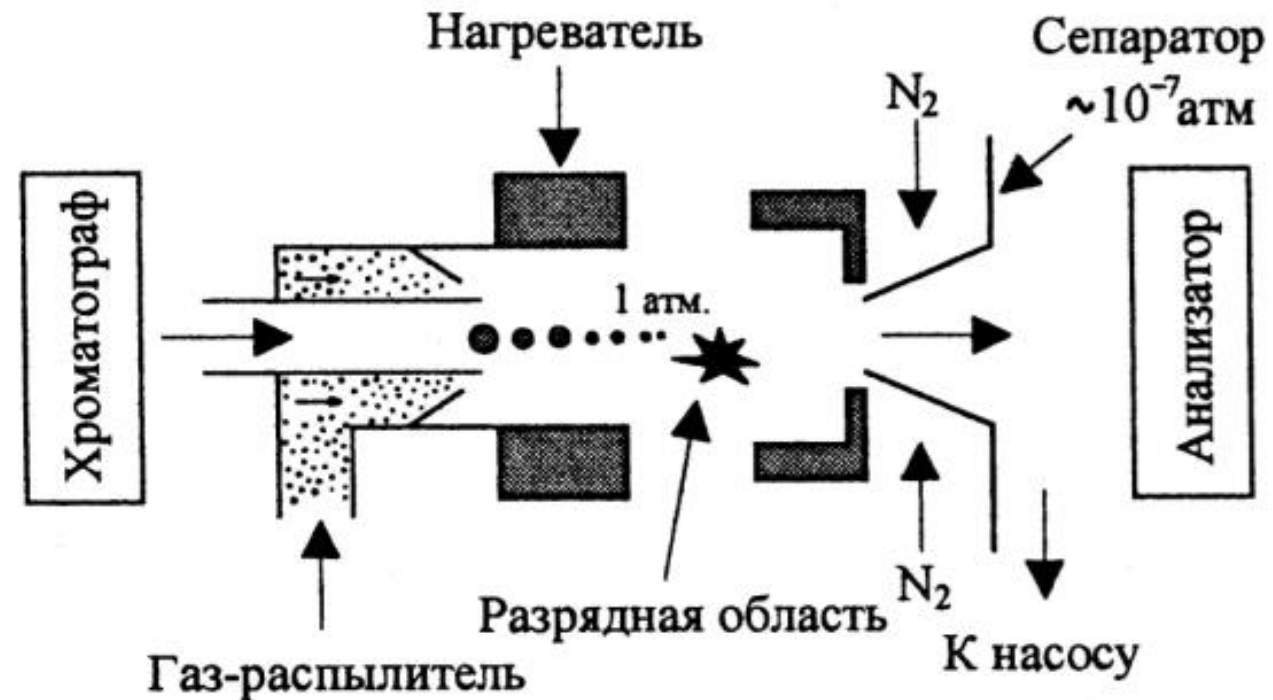
### *Кемшіліктері:*

- 1. Аз ақпараттандырылған масс-спектр - молекулалық ионның және оның "мультимерлерінің" +1 заряды бар бірнеше үлгі молекулаларынан тұратын бөлшектердің шыңдары ғана болады;
- 2. Сынама дайындаудың ұзақтығы және әр үлгі үшін жағдайды таңдаудың қажеттілігі - матрица үшін затты таңдау.

## Далалық иондану:

- Бұл әдісте иондану жоғары кернеулі электр өрісінің әсерінен жүреді (108 В/см-ге дейін);
- Иондану пироликалық көміртегімен қапталған **эммиттерде** – яғни вольфрам сымында жүреді. Көміртек бөлшектері сымның бетінде микроскопиялық нүктелер түзеді, олар өрістің жергілікті кернеуін арттырады және иондануға ықпал етеді;
- әдіс ионданудың жұмсақ әдісін білдіреді;
- Алынған фрагменттердің саны аз, спектрі өте қарапайым және молекулалық шыңы бар;
- Қарастырылған иондану әдістері үлгіні алдын ала буландыруды қажет етеді (**~500 °C**) және молекулалық салмағы 1000-нан аз молекулаларды зерттеуге қолданылады.

- **Атмосфералық қысымдағы химиялық иондану** - электроспрейге ұқсас әдіс. Сұйық хроматографты масс-анализаторға жалғастыру үшін қолданады. Сұйық хроматограф бағанынан ағын бүркігішке жіберіледі, онда ол жұқа аэрозольге айналады және қыздырылған газдың (азот немесе ауа) көп мөлшерімен араласады, содан кейін аэрозоль тамшылары булану аймағына ауысады, онда еріткіш молекулаларының көп бөлігі газ фазасына өтеді. Әрі қарай, газ тәрізді үлгі иондану аймағына өтеді:





Иондану атмосфералық қысымда тәждік разрядпен немесе бета-эмитенттермен жүреді. Әрі қарай, электр өрісі мен ағын иондалған бөлшектерді сериялық сепараторларға тартады, онда жеңіл молекулалар (газ, еріткіш) тез сорылады, ал үлгінің иондалған бөлшектері терең вакуумдық анализаторға түседі.

### **Артықшылықтары:**

1. Атмосфералық қысымдағы ион көзінің жұмысы;
2. Үлгі үшін тек полярлы еріткіштерді қолданудың (электроспрей жағдайындағыдай) қажеті жоқ;
3. Газ фазасына қарапайым әдістермен ауыстыру қиын болатын үлгілермен жұмыс істеу мүмкіндігі.

### **Кемшіліктері:**

1. Салмағы шамамен 1500 дальтонға дейінгі үлгілерді талдауға болады, бұл салыстырмалы түрде аз.
2. Алынған масс-спектрлердің ақпараттылығы төмен және оларды құрылымдық зерттеулер үшін пайдалануға мүмкіндік бермейді (аз сызықтар).

- **Десорбциялық әдістер** молярлық массалары шамамен 10 000 болатын биоорганикалық заттарды зерттеуде қолданылады;
- Алдын ала буландырылмайтын қатты немесе сұйық сынама иондануға ұшырайды;
- Масс-спектрлер өте қарапайым және шекті жағдайда тек молекулалық ионнан тұрады;
- Қазіргі уақытта лазерлер иондану үшін көбірек қолданылады, мысалы, толқын ұзындығы 337 нм ультрафиолет лазері.
- **Далалық десорбция**
- Өрісті иондау әдісіндегідей, үлгі жоғары кернеу әсерінен эмиттерде иондалады. Иондануды жеңілдету үшін эмитент электр тогымен қызады.

- Жылдам атомдармен атқылаған кезде үлгі ионизаторға тікелей орналастырылады немесе сәйкес ұшпайтын матрицада, әдетте глицеринде ерітіледі;
- Содан кейін үлгі бейтарап жоғары энергиялы (шамамен 8 кэВ) атомдар ағынымен сәулеленеді, мысалы, Ar немесе Xe;
- Үлгіні атқылау десорбция нәтижесінде бетінен бөлінетін + және - иондардың пайда болуына әкеледі;
- Талданатын үлгінің иондарының шығымы неғұрлым көп болса, соғұрлым жеделдетілген атомдардың массасы көп болады.



**СҰРАҚТАР ???**