

ЛЕКЦИЯ 8

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Масс-спектрометрия является наиболее чувствительным **спектроскопическим методом молекулярного анализа** по сравнению с такими методами, как ЯМР- и ИК-спектроскопия.

В отличие от других методов, детектирующих излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, **имеет дело с самими частицами вещества.**

Существенное отличие от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что она сочетает в себе и **метод разделения и метод определения.**

Сущность метода

Масс-спектрометрия - физический метод, основанный на **ионизации молекул** изучаемого вещества с последующим **разделением ионов** по величине отношения массы к заряду и детектированием.

Масс-спектрометрия - это метод измерения **отношения массы заряженных частиц к их заряду (m/z)**.

Проведения анализа:

- образец переводят в ионизированную форму.
- производят разделение ионов по отношению их массы к зарядам и
- регистрируют эти ионы, которые могут быть как положительными, так и отрицательными.

Сущность метода

Анализ дает **важную информацию** для определения молекулярной массы, молекулярной формулы или элементного состава и структуры молекул.

Масс-спектрометрию используют для определения *относительной молекулярной массы* M_r соединения, которую выражают в атомных единицах массы (а.е.м.) или дальтонах, Да,

В масс-спектре **линии** с определенным отношением m/z , соответствуют **молекулярным фрагментам** и также обозначаются целым числом, полученным при округлении точного значения m/z .

Существует три различных понятия массы.

- *Средняя молекулярная масса* вычисляется на основании элементного состава и средних атомных масс. Важна при изучении больших молекул.
- *Номинальная молекулярная масса* вычисляется с учетом элементного состава и номинальных атомных масс наиболее распространенных в природе изотопов.
- *Точная молекулярная масса* вычисляется из значений точных масс наиболее распространенных изотопов.

Современное состояние

Рутинно используется в тысячах лабораторий по всему миру.

Объединение с хроматографией значительно увеличило возможности метода и расширило круг изучаемых объектов

Возможны:

- органический анализ,
- неорганический анализ,
- исследования по выяснению механизмов реакций в органической химии,
- анализ поверхности.

Качественный анализ

Используют в определении структуры неизвестного соединения, в частности, природных веществ, метаболитов лекарственных препаратов и других ксенобиотиков, синтетических соединений.

Количественный анализ

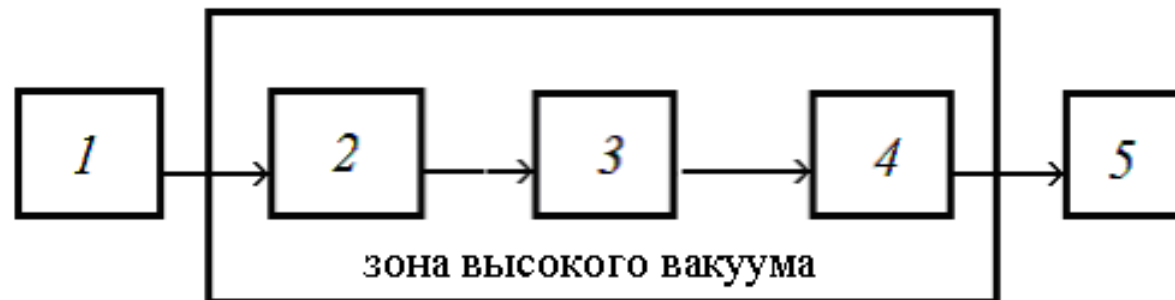
Используют при разработке арбитражных методов и методов сравнения.

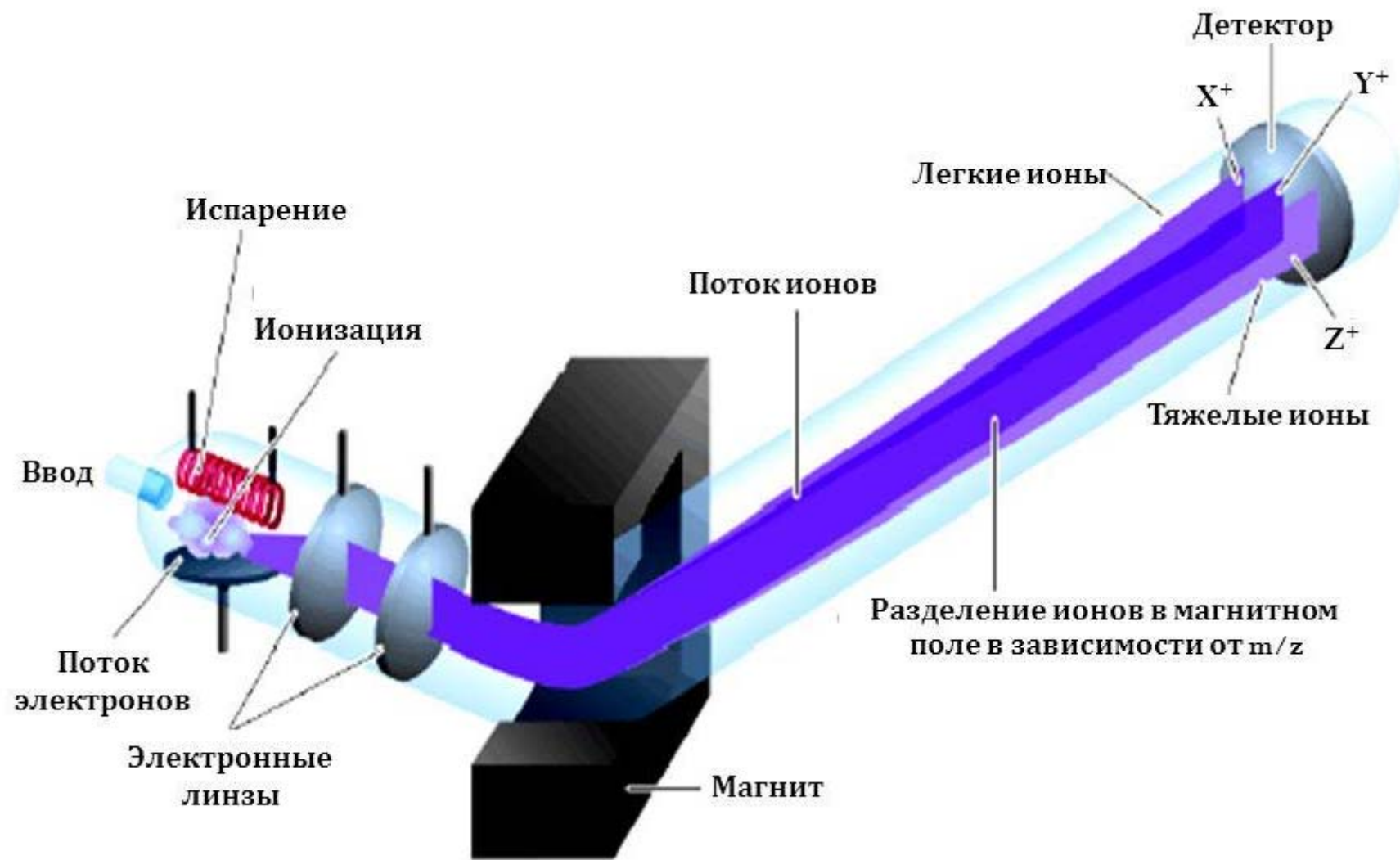
Аппаратурное оформление

Чрезвычайно сложный компьютеризованный прибор.

Состоит из пяти узлов, отражающих пять важных разделов аналитической масс-спектрометрии:

1. система ввода пробы,
2. система ионизации аналита,
3. система разделения ионов по массам (зарядам),
4. система детектирования ионов
5. система обработки данных.

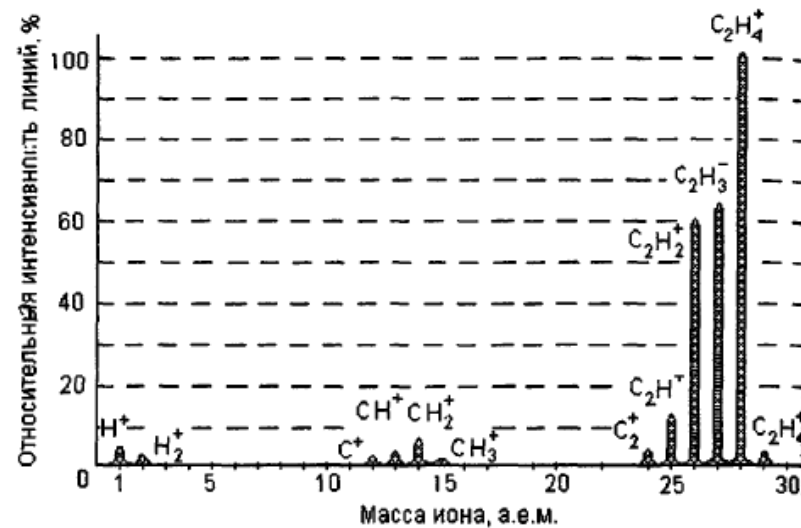






По полученному масс-спектру делается вывод

- о составе образца и структуре его молекул,
- по величине тока соответствующих ионов судят о количественном составе образца.



- по оси абсцисс откладывается отношение массы иона к его заряду, m/z
- по оси ординат откладывается интенсивность, характеризующая относительное количество ионов данного вида.

Интенсивность выражается в процентах по отношению к полному ионному току (суммарной интенсивности всех ионов в масс-спектре) или по отношению к максимальной интенсивности ионного тока в масс-спектре.

Система ввода образца

Система ввода образца должна обеспечить необходимые условия при вводе образца в область его ионизации.

Используются три типа систем ввода пробы:

- холодные или обогреваемые стеклянные резервуары с натекателями,
- различные штоки для ввода через вакуумный шлюз,
- системы, соединяющие масс-спектрометр с хроматографом в режиме *on-line*.

Способы ионизации

Для газовой фазы

1. Электронный удар (ЭУ)

Пары образца подвергают бомбардировке ускоренными электронами. Источником электронов служит электрически нагретая вольфрамовая или ренийевая нить. Для увеличения эффективности ионизации молекул газа в источнике используется магнитное поле, силовые линии которого направлены вдоль пучка электронов. Столкновение электронов с молекулами образца приводит к их возбуждению, фрагментации и ионизации.

ЭУ дает богатые фрагментами масс-спектры, которые обеспечивают структурную информацию.

2. Химическая ионизация (ХИ)

Источник ионов заполняется газом (обычно метан, изобутан, аммиак или вода) при повышенном давлении, из которого в результате ионизации под действием электронного удара генерируются ионы. Определяемые молекулы ионизируются непосредственно за счет ряда реакций ионами реагентного газа.

ХИ дает очень простые масс-спектры (мягкая ионизация) с меньшей фрагментации, дает меньше информации о том, как устроена структура молекулы, зато с его помощью легче определить ее молекулярную массу. В зависимости от газа-реагента получаются положительно или отрицательно заряженные ионы.

Для жидкой фазы

1. Ионизация электрораспылением (ИЭР)

Поток жидкой фазы направляется в иглу диаметром 0,1 мм, которая находится под высоким потенциалом. На выходе из иглы образуется аэрозоль из заряженных капель, имеющих высокий поверхностный заряд.

ИЭР используется для чрезвычайно мягкой ионизации без фрагментации очень неустойчивых молекул и нелетучих соединений, таких, как пептиды, белки, нуклеотиды, сахараиды.

2. Химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД)

Поток образца направляется в распылитель, где он превращается в мелкодисперсный аэрозоль под действием нагретого газа. Происходит термораспыление. После испарения растворителя из капелек аэрозоля поток поступает в область ионизации. Потенциал прикладывается к электроду в области распыления, что приводит к образованию коронного разряда. В этом случае фрагментация значительно меньше, чем в методе ИЭР. Данный метод используется при анализе пестицидов, стероидов, лекарств.

Для сильно полярных и/или высокомолекулярных веществ

1. Бомбардировка быстрыми атомами (ББА)

Вещество растворяют в подходящей нелетучей матрице, обычно в глицерине. Раствор помещают в виде тонкой пленки на металлическую подложку специального штока. Образец переносят в ионный источник и после вакуумирования облучают потоком атомов с энергиями. Для бомбардировки используют также высокоэнергетические ионы цезия.

2. Полевая десорбция (ПД)

Раствор образца помещают на вольфрамовую проволоку диаметром 5-10 мкм (эмиттер), которую перед нанесением образца активируют для образования на ее поверхности микроигл. Эмиттер помещают в сильное электрическое поле, при этом происходит локальное усиление напряженности поля на кончиках игл. Ионы генерируются в результате различных процессов.

3. Ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы (МАЛДИ)

Образец смешивают с раствором подходящей матрицы и помещают на подложку из нержавеющей стали. После высушивания происходит кристаллизация образца и матрицы. Кристаллы подвергают воздействию лазерного излучения, образуются ионы, которые можно проанализировать.

Разделение ионов по отношению массы к заряду

1. Квадрупольный масс-анализатор
2. Масс-анализатор с двойной фокусировкой
3. Трехмерная квадрупольная ионная ловушка
4. Времяпролетный масс-анализатор
5. Циклотронно-резонансный масс-анализатор с фурье-преобразованием

Детектирование ионов

Величина токов, создаваемых ионами после прохождения масс-анализатора, составляет $10^{-7} - 10^{-18}$ А. Такие токи можно регистрировать с помощью специальных измерительных устройств.

1. Фотопластинка.

2. Динодные вторично-электронные умножители, дискретного или непрерывного типа.

Детектирование ионов основано на эмиссии вторичных электронов в результате столкновения ионов с динодом умножителя. Ион, попадая на первый динод, выбивает из него пучок электронов, которые в свою очередь, попадая на следующий динод, выбивают из него еще большее количество электронов и т.д.

Дискретный диодный умножитель состоит из 12-20 бериллиево-медных диодов, связанных посредством резистивной цепи.

Непрерывный диодный умножитель состоит из покрытой свинцом изогнутой воронкообразной трубки. Напряжение, прикладываемое между концами трубки, создает непрерывное поле по всей ее длине.

3. Фотоумножители.

Регистрируют свечение, возникающее при бомбардировке ионами люминофора.

4. Микроканальные умножители.

системы типа диодных матриц и коллекторы, собирающие все ионы, попавшие в данную точку пространства.

Гибридные методы

Понятие и термин «гибридные методы» введено Золотовым Ю. А. в 1977 г. Этот термин охватывает диапазон от комбинации двух спектроскопических методов или двух хроматографических методов до сочетания метода разделения с методами спектроскопического определения

	Масс- спектрометрия	ИК	Оптическая эмиссия	Атомная абсорбция	Флоуресценция	УФ-видимая спектроскопия
ГХ	***	***	**	*	**	*
ЖХ	***	**	*	**	***	***
ТСХ	*	**			***	***
Капиллярный электрофорез	**	*			***	***

Преимуществом гибридных методов является возможность получения дополнительной информации, по сравнению с методами разделения.

С одной стороны, **хроматографические методы** обеспечивают отличное разделение и количественное определение, в то же время идентификация разделяемых соединений на основе одних лишь хроматографических данных часто невозможна.

С другой стороны, **спектроскопические методы** имеют превосходные возможности для идентификации, однако возможность идентификации решающим образом зависит от чистоты соединения в хроматографическом пике.

А **сочетание** хроматографического разделения и спектроскопических методов демонстрирует свою мощь и эффективность.

Основной **проблемой гибридной системы** является адаптация одного набора параметров к условиям работы второго метода. Обычно для этого требуется специфический способ соединения.

Газовая хромато-масс-спектрометрия

ГХ-МС - наиболее популярен из всех гибридных методов, как комбинация одного из наиболее мощных методов разделения с методом, обеспечивающим высокую степень структурной информации. Это позволяет использовать ГХ-МС для следового анализа органических веществ.

Сочетание газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием требует введения анализируемой пробы, находящейся при атмосферном давлении, в высокий вакуум масс-анализатора.

Объединение капиллярного хроматографа и масс-спектрометра в режиме *on-line* можно осуществить двумя способами: напрямую или посредством открытого ввода с делителем потока.

Жидкостная хромато — масс-спектрометрия

Сочетание жидкостной хромато-масс-спектрометрии ЖХ-МС осуществить по ряду причин гораздо труднее, чем ГХ-МС:

- слишком велика газовая нагрузка на вакуумную систему вследствие испарения подвижной фазы;
- состав подвижной фазы часто несовместим с МС-детектированием;
- затруднен перенос полярных или ионных веществ из жидкой в газовую фазу.

Для решения первой проблемы разработаны разнообразные системы ввода образца.

Вторую проблему нужно решать выбором летучих буферов или использованием переключения колонок.

Третья проблема в основном решается использованием новых методов ионизации, в частности термо- и электрораспылительной, разработанных для сочетания ЖХ-МС.

Тандемная масс-спектрометрия

Этот метод масс-спектрометрического анализа (масс-спектрометрия масс-спектрометрии, МС/МС) широко используется в настоящее время.

Он особенно эффективен при анализе смесей. Смесь, вводимая в ионный источник, подвергается ионизации одним из "мягких" методов ионизации, когда, в основном, образуются молекулярные ионы с небольшой энергией возбуждения.

После прохождения первого массанализатора, эти ионы каким-либо образом дополнительно активируются, распадаются на фрагменты, которые проходят через другой масс-анализатор и дают масс-спектр индивидуального соединения.

Рентгеноструктурный анализ

Один из **дифракционных методов** исследования структуры вещества.

В основе данного метода лежит явление **дифракции рентгеновских лучей** на трёхмерной кристаллической решётке.

Метод **позволяет определять** атомную структуру вещества, включающую в себя пространственную группу элементарной ячейки, её размеры и форму, а также определить группу симметрии кристалла.

К **достоинствам** рентгенофазового анализа должна быть отнесена высокая достоверность метода, а также то, что метод прямой, то есть дает сведения непосредственно о структуре вещества, а анализ проводят без разрушения исследуемого образца.