



# МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Масс-спектрометрический  
метод анализа

**“If you can't solve a problem by mass spectrometry, it probably isn't worth solving”**

**Fred McLafferty**

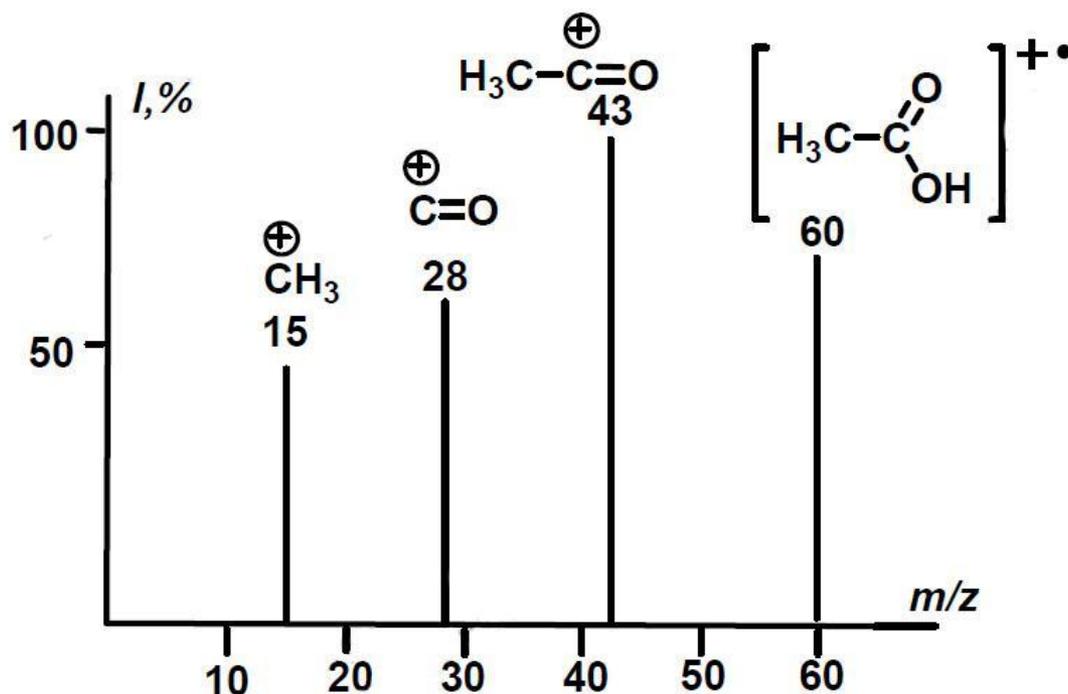
**«Если те не можешь решить проблему с помощью масс-спектрометрии, то, возможно, её вообще не стоит решать»**

**Масс-спектрометрия** – метод изучения химического состава и молекулярной структуры вещества, а также содержания изотопов конкретного химического элемента, **на основе** **разделения ионизированных частиц** исследуемого вещества (атомов и ионов) с помощью магнитного или электрического полей по величине отношения массы иона к его заряду ( $m/z$ ).

Благодаря разделению (сортировке) ионов по величине  $m/z$ , можно составить спектр масс атомов и молекул, входящих в состав изучаемого вещества, а также изотопов конкретного химического элемента.

**Масс-спектр** – график зависимости относительного количества ионизированных частиц, полученных при ионизации изучаемого вещества (**ось Y**), от величины **m/z** для каждой из этих частиц (**ось X**).

### Масс-спектр уксусной кислоты



1. Молекулярная масса – 60
2. Молекулярная формула –  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$
3. Строение вещества –  $\text{CH}_3\text{COOH}$

# Джозеф Джон Томсон

(1856 –1940)



Дж. Томсон (Великобритания) изучал влияние магнитного и электрического полей на движение ионов остаточного газа, которые образуются на катоде рентгеновской трубки. Оказалось, что ионы движутся по параболическим траекториям, кривизна которых пропорциональна отношению их массы к заряду ( $m/z$ ).

В 1906 году Дж. Томсон получил Нобелевскую премию по физике за "Выдающиеся заслуги в теоретическом и экспериментальном изучении электропроводимости газов".

В 1912 г. Дж. Томсон создал первый масс-спектрометр и получил масс-спектры молекул  $O_2$ ,  $N_2$  и ряда других хим. элементов.

Период с 1930-х по начало 1970-х годов особо отмечен выдающимися достижениями в области развития и совершенствования метода масс-спектрометрии.

Например, в 1950-е годы были соединены газовый хроматограф и масс-спектрометр (Голке, Маклаферти и Рихаге). Получилась гибридная установка *хромато-масс-спектрометр*, что значительно расширило возможности метода.

Также в середине 1950-х годов В. Пол разработал **квадрупольный масс-анализатор** (Нобелевская премия по физике 1989 г.).

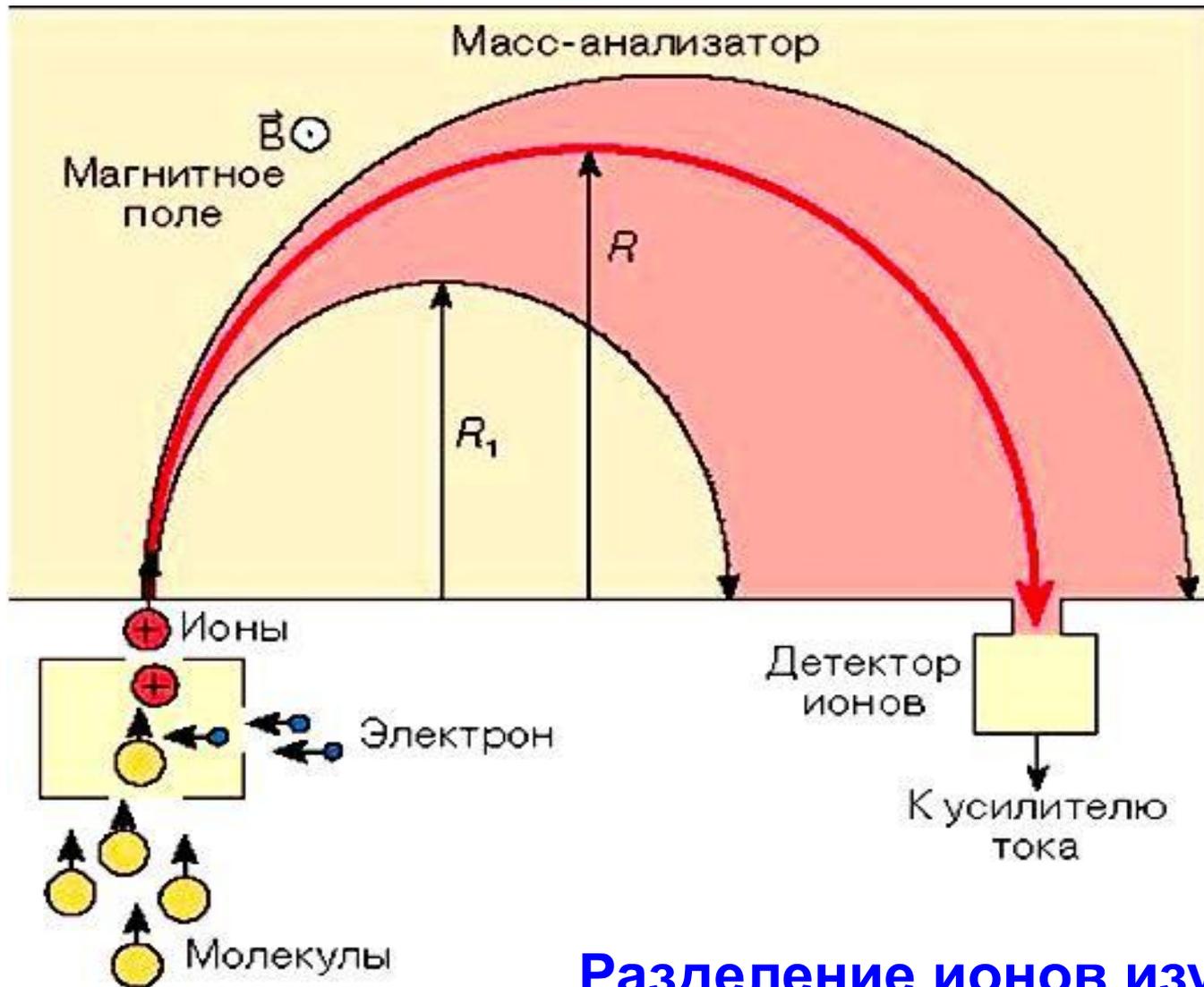
В 1985 г. К. Танака изобрел **метод мягкой лазерной десорбции** (Нобелевская премия по химии 2002 г.).

Это далеко не полный перечень нобелевских лауреатов, работавших в области масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрический метод продолжает совершенствоваться.

# Пять этапов реализации масс-спектрометрии

1. Перевод изучаемого вещества в газообразное состояние.
2. Ионизация вещества (превращение его нейтральной молекулы в ионы:  $M^+$  или  $M^-$ ).
3. Формирование потока ионов и придание им скорости и определенного направления движения в вакууме с помощью электрического поля высокой напряженности.
4. Разделение ионного потока по массам составляющих его ионов (точнее по величине  $m/z$ ), в магнитном или электрическом полях (определяется конструкцией анализатора).
5. Детектирование массы ионов и составление масс-спектра.

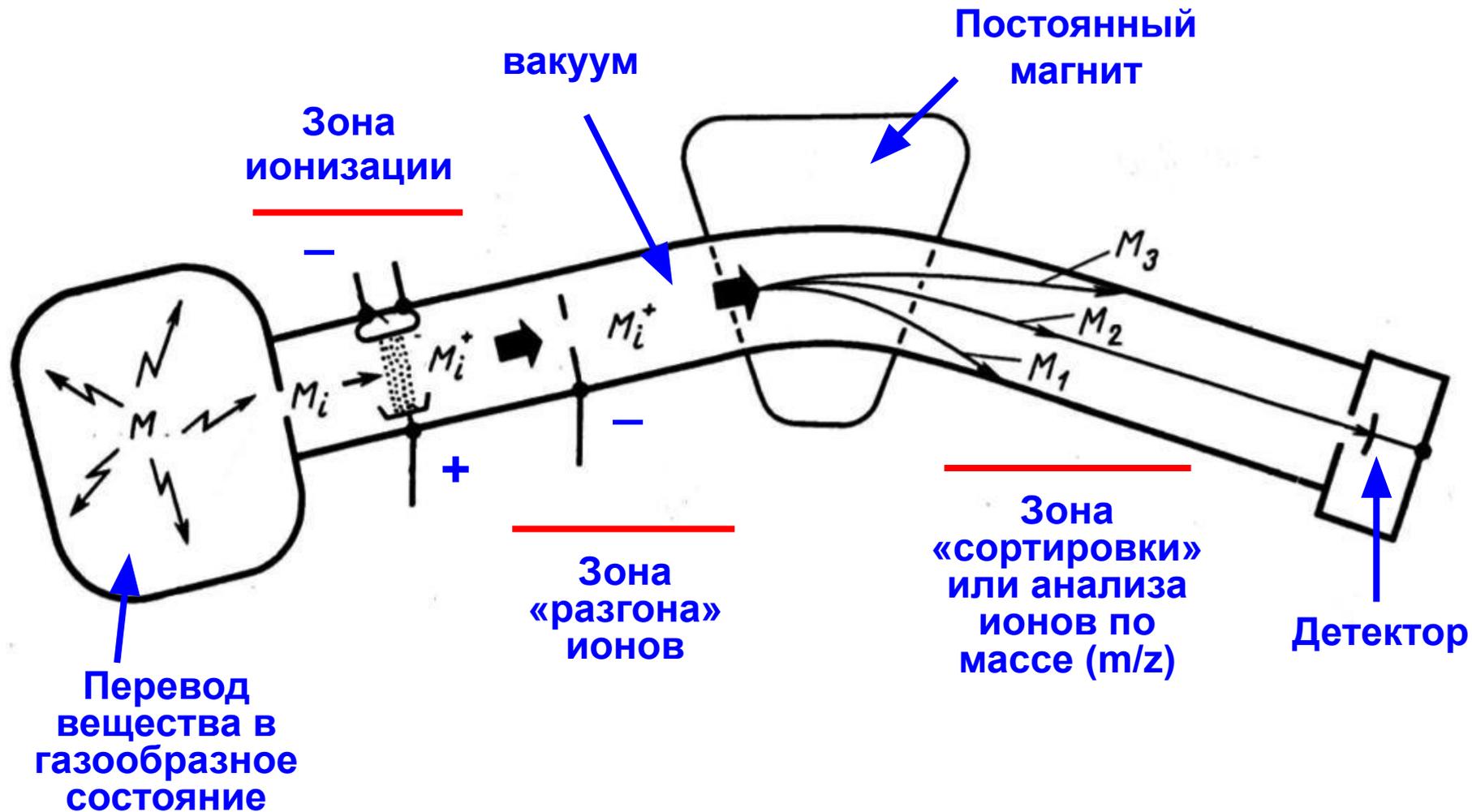


$$R = \frac{mV}{zB}$$

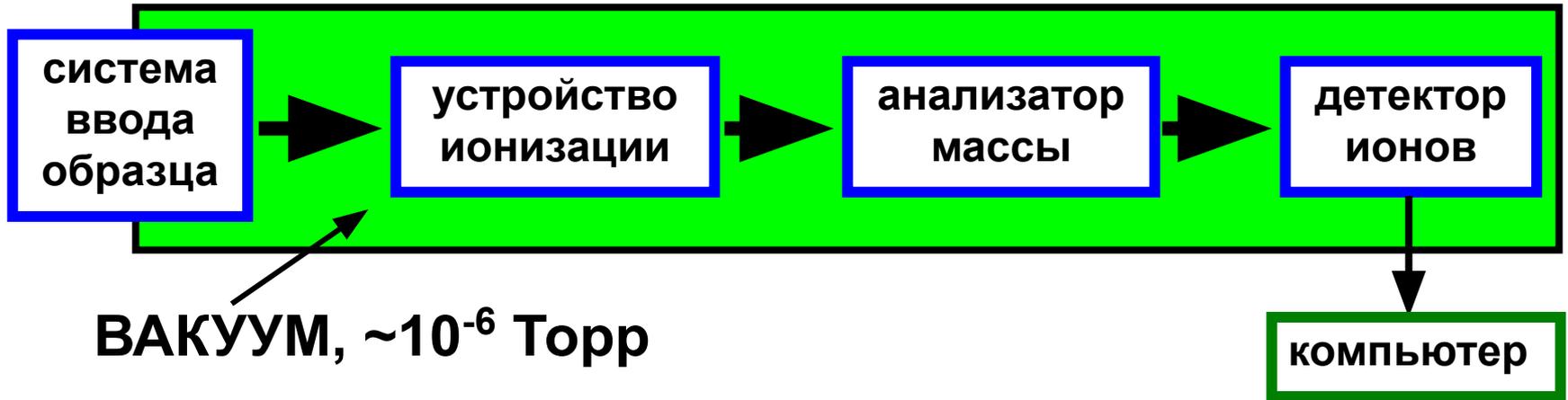
При одинаковой величине заряда иона, труднее «развернуть» ион, у которого больше масса (большая инерция) – траектория его полёта будет более полой.

**Разделение ионов изучаемого вещества по массе в магнитном поле масс-анализатора**

# Принципиальная схема магнитного масс-спектрометра



# Принципиальная схема масс-спектрометра (четыре базовых компонента конструкции)



В конструкции всех первых масс-спектрометров и в большинстве конструкций современных приборов, ваккум необходим для:

- продления «жизни» ионов, полученных из изучаемого вещества
- избежать образования новых соединений между ионами и молекулами воздуха

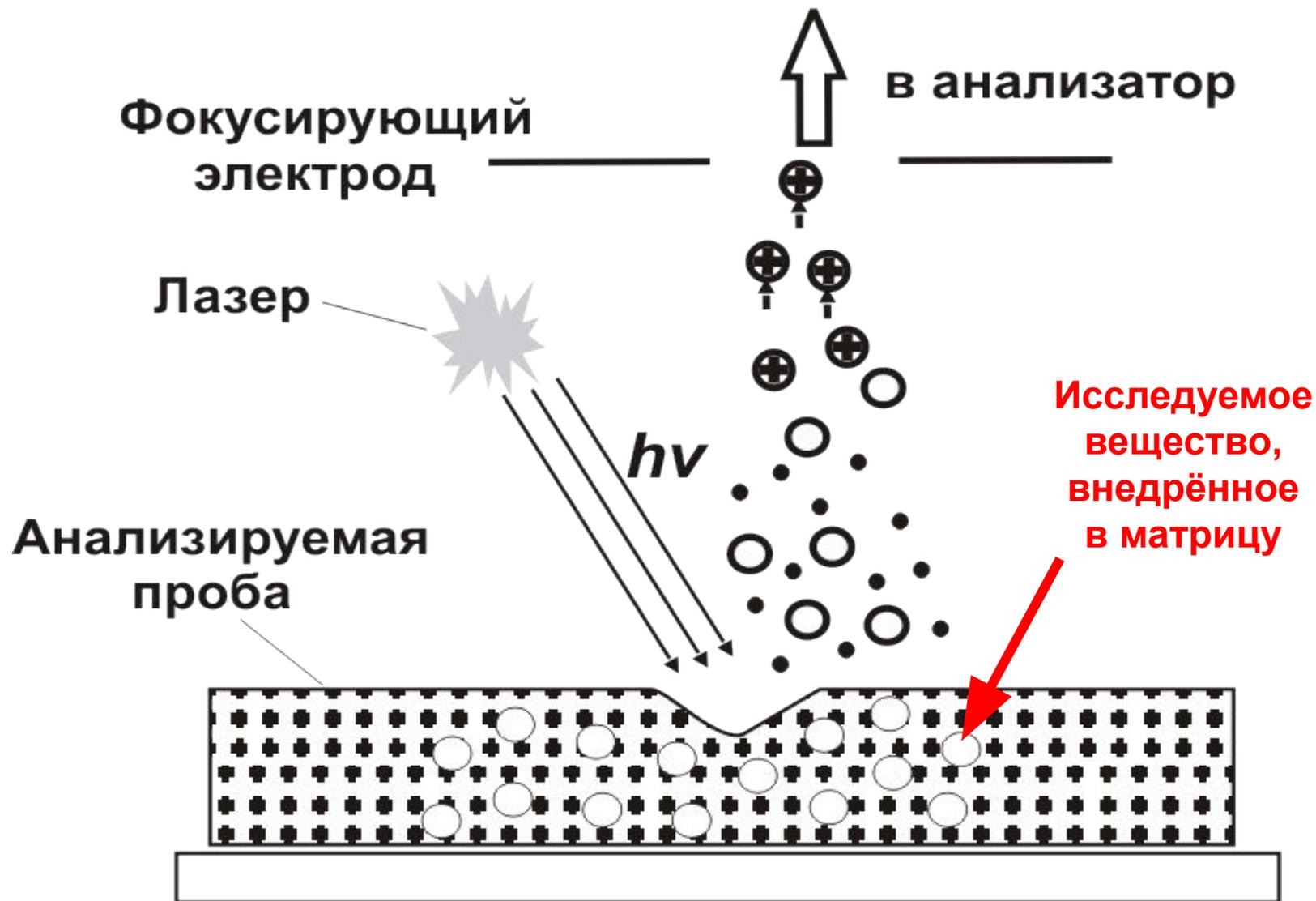
## А. Система ввода:

Используют **прямое введение/впрыскивание пробы** (в том числе - фракций на выходе из колонки газожидкостного хроматографа), либо **введение пробы, предварительно размещенной на специальной подложке**. Вакуум сохраняется благодаря использованию вакуумного клапана.

## Б. Устройство ионизации:

**1. Электронная ионизация:** ионизация паров вещества потоком  $e^-$ , разогнанных в электрическом поле до энергии 70 эв.  $e^-$  передает часть своей энергии нейтральной молекуле, что приводит к отрыву от нее одного или нескольких  $e^-$  с образованием иона  $M^+$ . В зависимости от энергии ионизирующих  $e^-$  - м.б. разрыв связей в ионизируемой молекуле и её фрагментация.

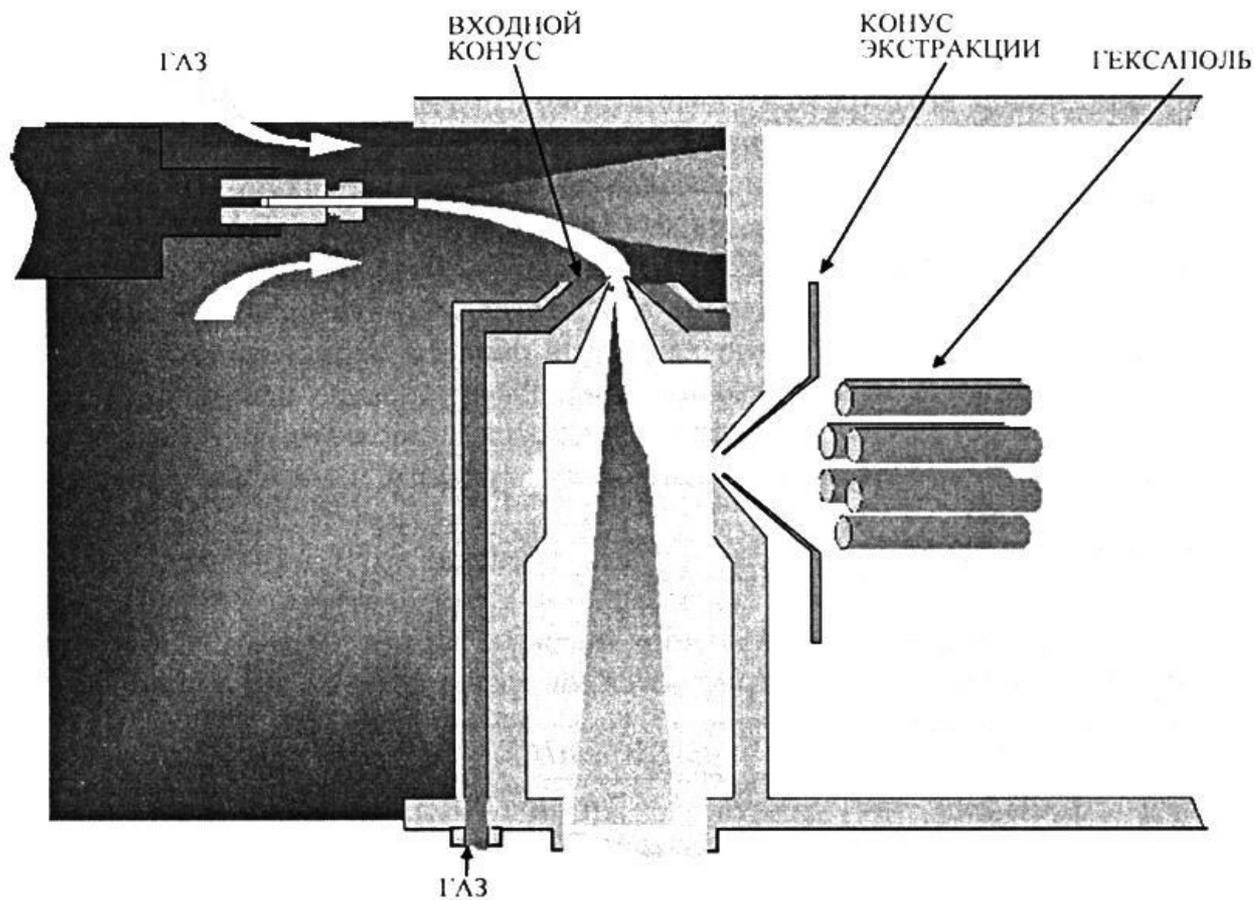
**2. Лазерная десорбция/ионизация из матрицы (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) [Танака, Карас и Хилленкамп, 1988].** Исследуемое вещество сначала вводят в матрицу - перемешивают с веществом с меньшим М.В. и высокой способностью поглощать лазерное излучение (коричная кислота) и наносят на подложку. Подложка с матрицей помещается в ионный источник, где в качестве ионизатора выступает короткий импульс (0.1 нс - 1 мкс) лазерного излучения. Луч вызывает испарение вещества матрицы, молекулы которой захватывают за собой молекулы исследуемого вещества. В процессе испарения часть молекул изучаемого вещества ионизируется и далее увлекается электрическим полем в сторону анализатора.

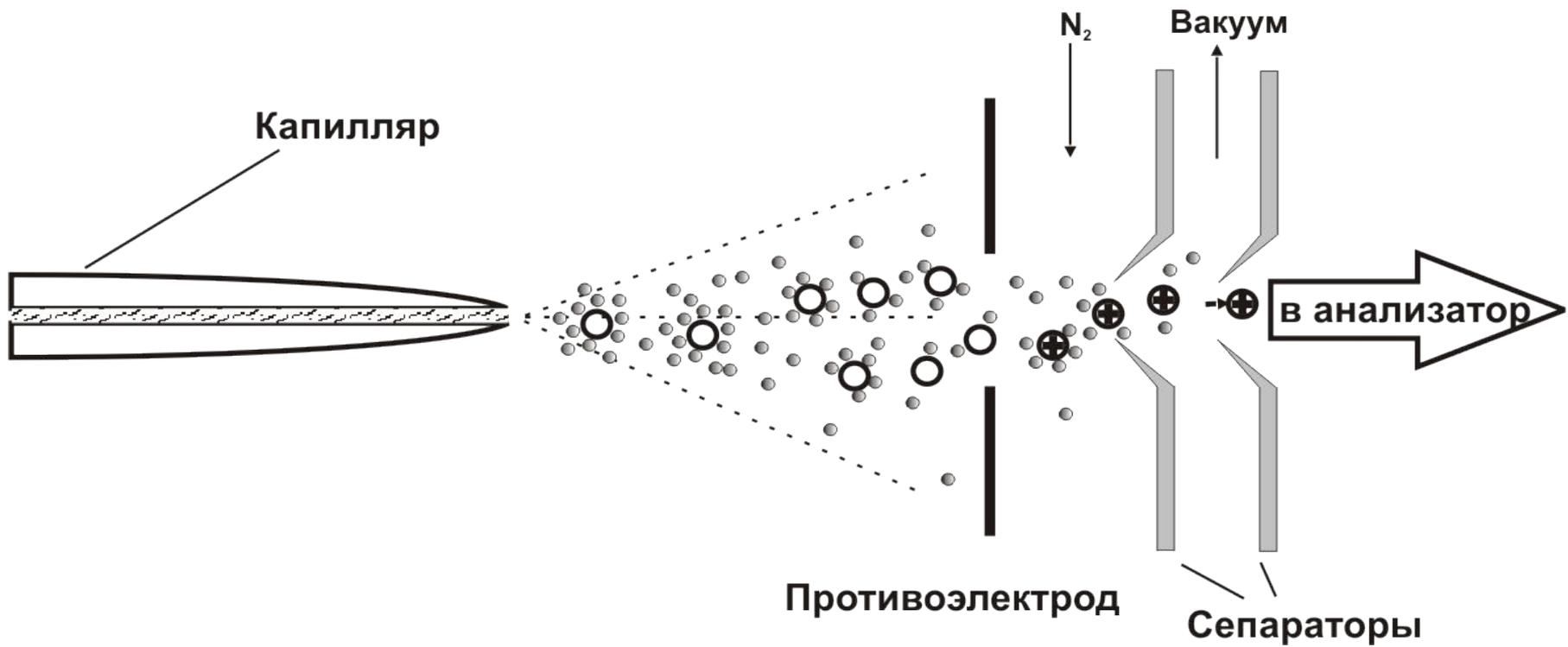


**Схема ионизации лазерной десорбцией из матрицы (MALDI)**

**3. Ионизация электроспрея (ESI, Electro Spray Ionization).** Электроспрей (электрораспыление) – относительно новый метод ионизации. Вещество на ионизацию поступает в растворе полярного растворителя (вода, метанол и т.д.). Капля раствора подается в специальный металлический капилляр, к которому приложено высокое (несколько кВ) напряжение. Капля с раствором образца, срываясь с конца капилляра, имеет положительный заряд. Далее, продвигаясь в электрическом поле, капля испаряется под действием нагретого потока инертного газа ( $N_2$ ). Объем капли уменьшается, ее поверхностный заряд растет – и капля «взрывается» на более мелкие капли, заряженные положительно.

Далее поток ионов проходит через сепаратор, где происходит постепенное снижение давления с примерно атмосферного до глубокого вакуума. Ионизированные частицы, состоящие из молекул исследуемого вещества, поступают на устройство анализатора массы.



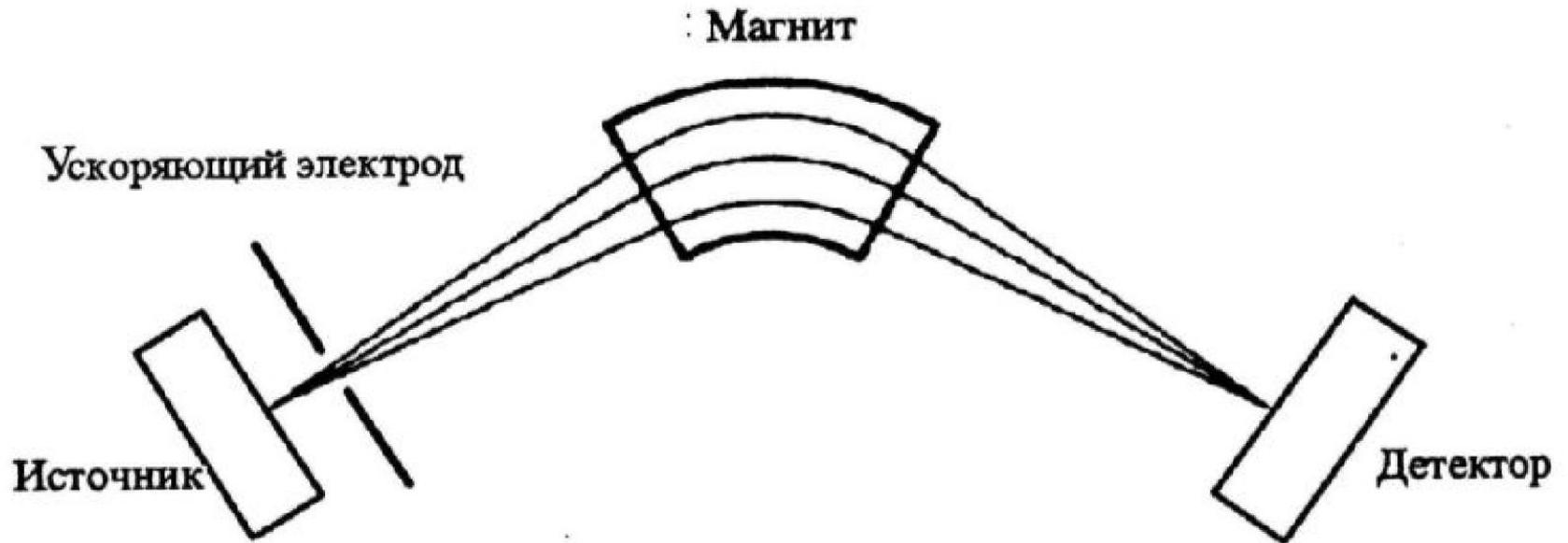


**Схема ионизации электроспрея  
(ESI, Electro Spray Ionization)**

**MALDI** и **ESI** являются в настоящее время самыми распространёнными способами ионизаций для биомолекулярной масс-спектрометрии: позволяют анализировать широкий диапазон масс и обладают высокой чувствительностью.

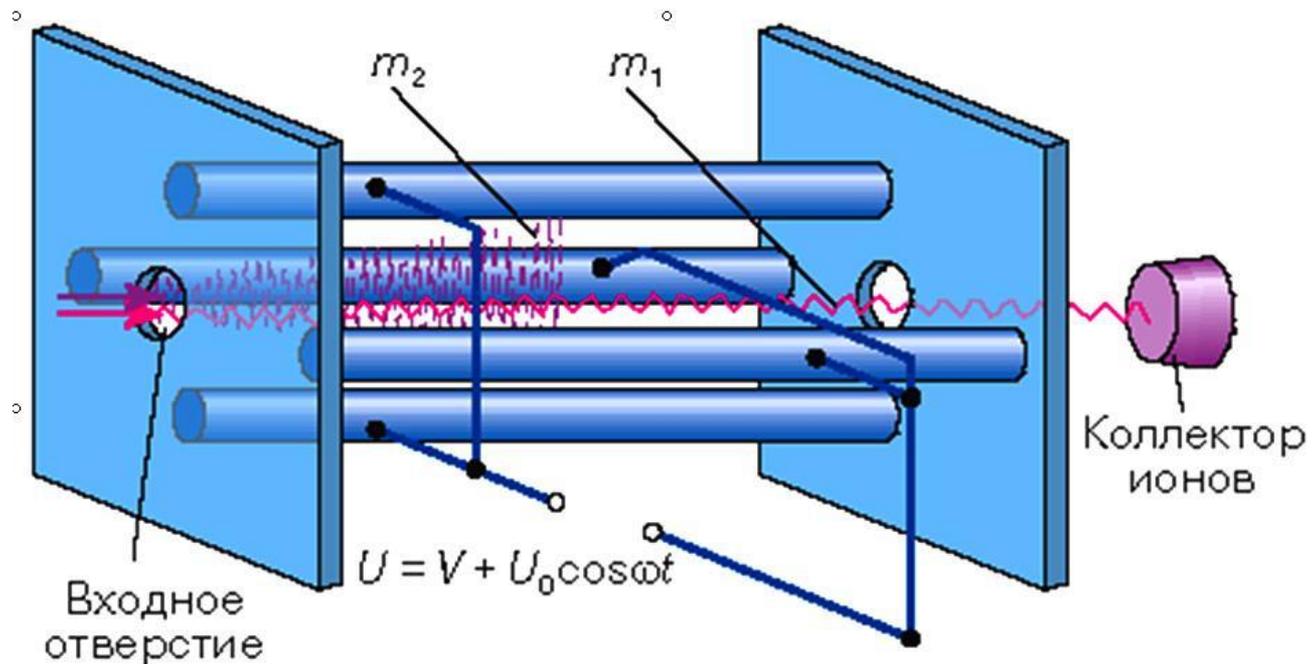
## В. Анализатор массы.

**1. Магнитный анализатор.** Исторически первый тип анализатора (Демпстер, 1918). Физическая основа – изменение траектории полёта заряженной частицы под действием магнитного поля.



**Схема масс-спектрометра с магнитным анализатором**

**2. Квадрупольный анализатор.** Разработан в середине 50-х годов (Вольфганг Пол, Германия). Анализатор представляет собой систему из четырех стержней – электродов. На пары противоположных стержней подается радиочастотное переменное напряжение и дополнительно — постоянное напряжение между парами.



Такая конструкция позволила создать очень компактный масс-спектрометр.

**Принцип работы квадрупольного анализатора:** под действием постоянного и переменного электрических полей ионы с конкретной массой ( $m/z$ ) испытывают стабильные колебания и могут пройти через квадрупольный «фильтр» (между электродами вдоль осевой линии) только при определенных значениях постоянного и переменного напряжения на электродах. Только эти ионы могут далее попасть на детектор. Ионы с другими массами при этом движутся слишком далеко от главной оси системы, выбывают из потока и не доходят до детектора.

Меняя напряжения на стержнях можно по очереди пропускать через такой «фильтр» ионы с разными значениями  $m/z$ , то есть, производить развертку масс-спектра.

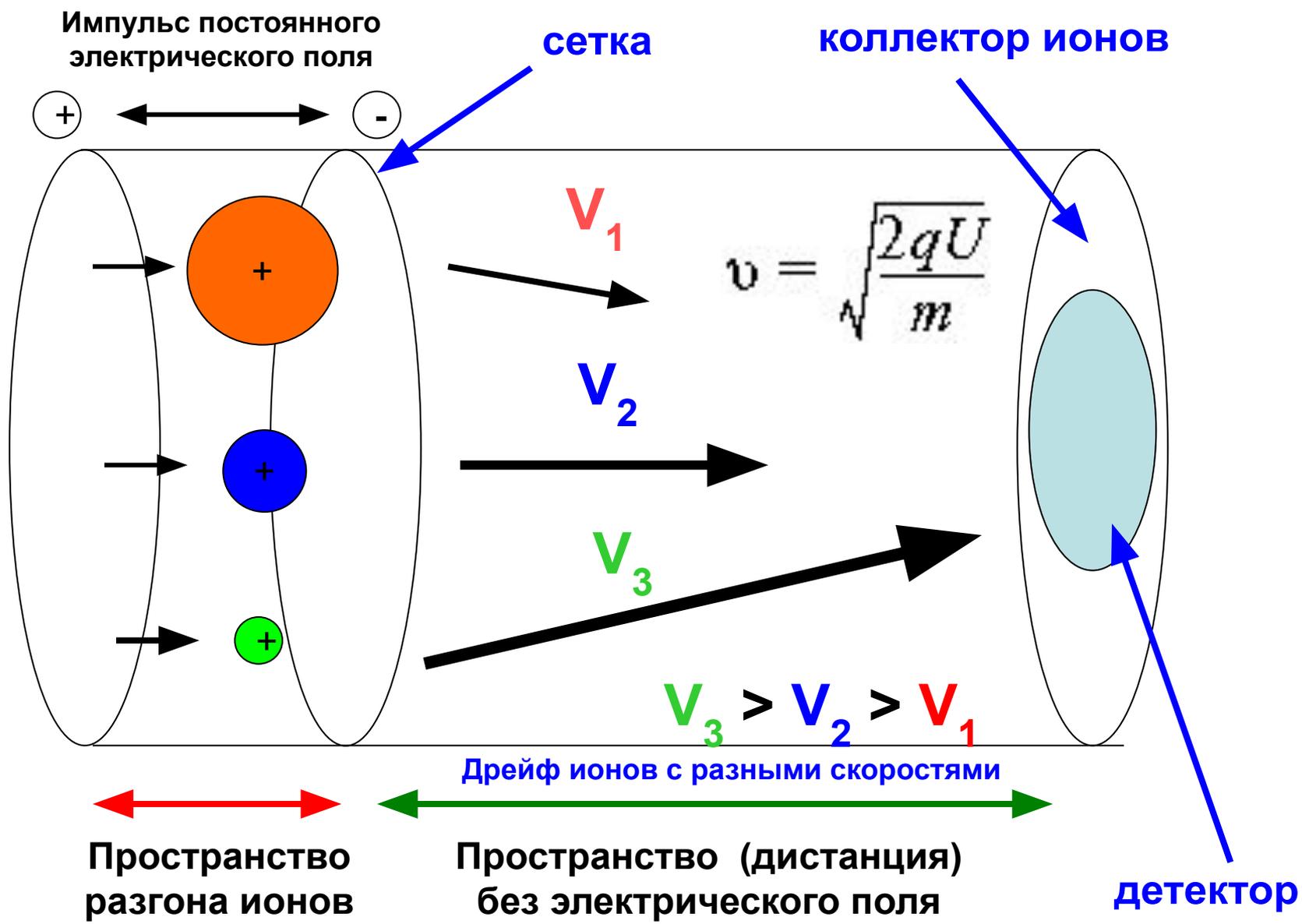
### **3. Время-пролетный анализатор (Time Of Flight, TOF).**

Разработан в 1946 году (Уильям Стефенс, США).

**Принцип работы:** ионы с большой массой труднее разогнать из-за их большой инерции. Эти ионы, после разгона электрическим полем, двигаются дальше уже в бесполовом отсеке. Они движутся медленнее и прилетают к детектору позже легких ионов.

Если принять, что все ионы заряжены одинаково, то **время в пути - прямо пропорционально квадратному корню из массы иона.** Иными словами, сначала к детектору прилетят легкие ионы, затем те, что тяжелее.

Время-пролетный масс-спектрометр несколько уступает по чувствительности магнитному, но обладает огромным быстродействием, поскольку спектр ионов в широком диапазоне их масс регистрируется за один проход.



**Схема время-пролетного анализатора (Time Of Flight, TOF)**

**Детектор ионов.** На первых масс-спектрометрах, интенсивность потоков ионов с определенными значениями  $m/z$ , регистрировали с помощью фотопластишки (чем интенсивнее поток конкретной группы ионов, тем сильнее засвечивалась зона на пластике).

В настоящее время используется электронный умножитель (ЭУ).

Схема действия электронного умножителя (ЭУ)



Разделенные с помощью анализатора потоки ионов фокусируются на вход ЭУ с помощью электрического поля.

# Тандемная масс-спектрометрия

**Тандем** (англ. *tandem*) — расположение один за другим. Расположение однородных машин или их частей в одном агрегате друг за другом, на одной оси, по одной линии.

Одним из недостатков прямого ввода образца в камеру масс-спектрометра для испарения является потенциально возможное **искажение будущего масс-спектра за счет примесей, изначально присутствующих в образце**. Возникают дополнительные пики, затрудняющие интерпретацию масс-спектра.

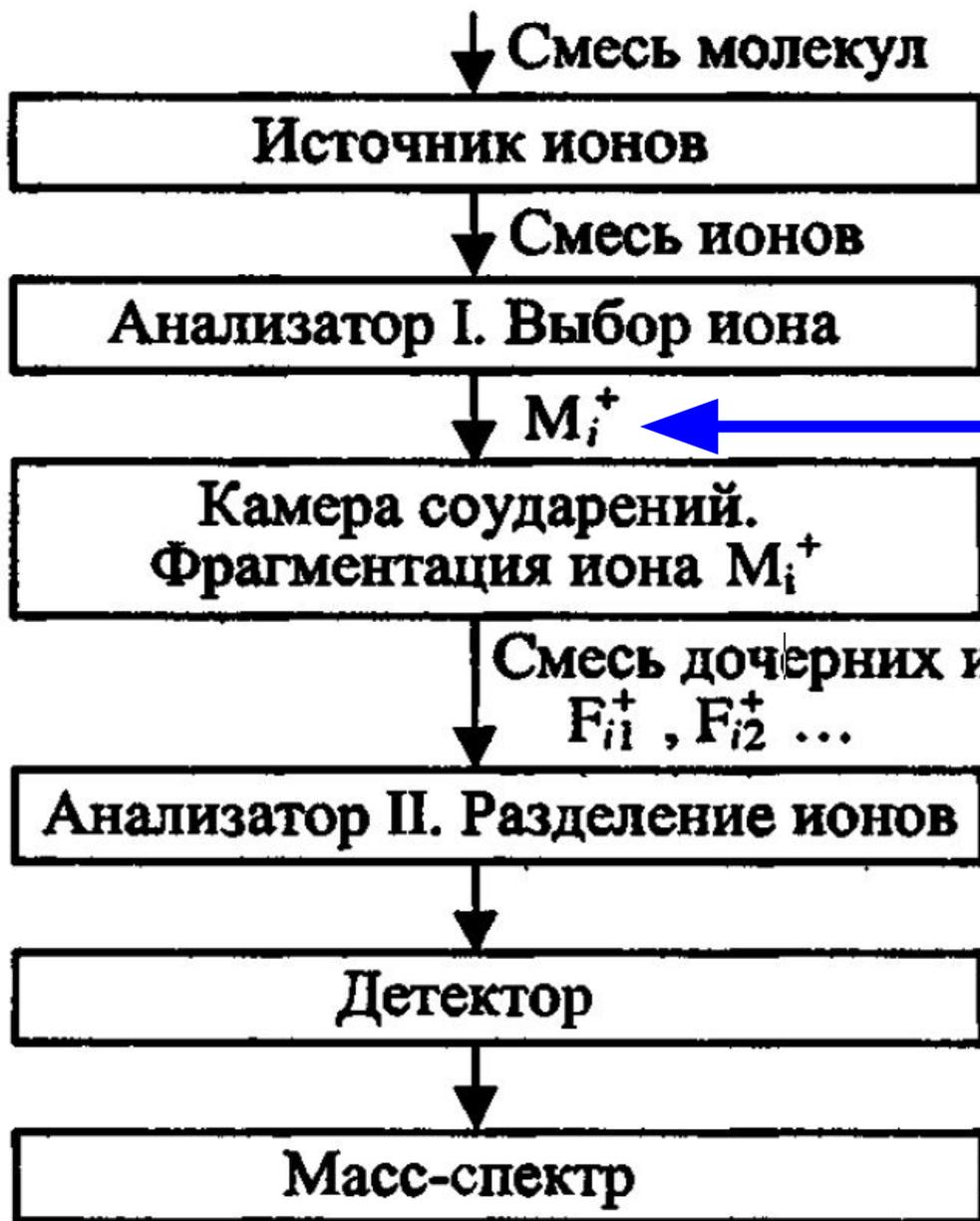
Одним из вариантов решения всех этих проблем стало использование **тандемной масс-спектрометрии**. Эта техника применяется со всеми описанными выше анализаторами и используется для анализа самых разных классов соединений.

**Изучаемую смесь веществ ионизируется мягким методом.**

**Образовавшиеся ионы по очереди проходят через **первый анализатор**. При этом, в анализаторе увеличивают внутреннюю энергию полученных ионов (спец. методом), что вызывает фрагментацию ионов.**

**Ионы с повышенной энергией направляют во **второй анализатор** и получают масс-спектр индивидуального соединения.**

# Принципиальная схема тандемной масс-спектрометрии



Ион, полученный в  
анализаторе I

Повышение энергии  
выбранного иона и  
его фрагментация

# Хромато-масс-спектрометрия

1950-е годы были соединены газовый хроматограф и масс-спектрометр (Голке, Маклаферти и Рихаге). Получилась гибридная установка, сочетающая физико-химический метод, предназначенный для разделения и анализа смесей (**газовая хроматография**) с **масс-спектрометрией**. Сначала на газовом хроматографе разделяют компоненты изучаемой смеси. Затем каждый компонент (находится в форме паров) по отдельности направляют на вход масс-спектрометра.

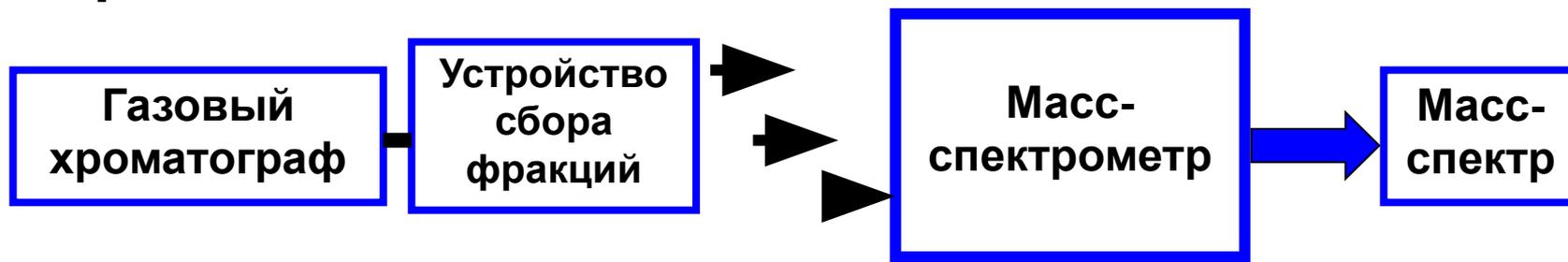


Схема установки для хромато-масс-спектрометрии

**Хромато-масс-спектрометрами** оснащены лаборатории допинг-контроля. С помощью хромато-масс-спектрометрии определяют содержание: анаболических стероидов, анальгетиков, диуретиков, биостимуляторов, кортикостероидов и др.

Современные масс-спектрометры довольно компактны и способны обнаружить в крови или моче спортсмена миллиардную долю этих запрещенных МОК препаратов или продуктов их распада в организме.

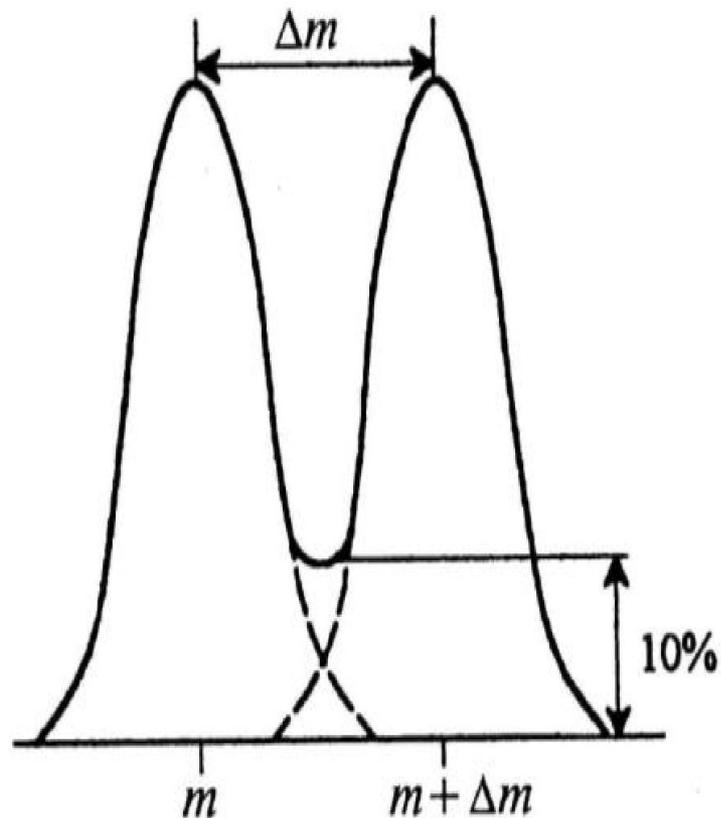
Хромато-масс-спектрометрия применяется для контроля загрязнения окружающей среды опасными для здоровья человека веществами-ксенобиотиками (экологический мониторинг). На таможнях – способ обнаружения следов наркотиков. При нефтеразведке - контроль состава нефти данного месторождения.

# Основные характеристики масс-спектрометра, как аналитического прибора

## 1. Разрешающая способность (разрешение).

Разрешение масс-спектрометра ( $R$ ) – возможность получать на данном приборе отдельный сигнал от двух ионов, с массами  $m$  и  $(m + \Delta m)$ .

В зависимости от глубины ложбины между двумя соседними пиками принято говорить о разрешении на уровне 10% от высоты пиков для магнитных приборов и 50% - для квадрупольных.



**2. Точность.** Способность данного масс-спектрометра точно определять величину  $m/z$  для каждого типа иона. **Пример:** прибор с точностью 0,01% даёт информацию о 1000 Да пептиде с точностью  $\pm 0,1$  Да, а для 10000 Да белка -  $\pm 1,0$  Да. Точность в большой степени зависит от разрешающей способности (разрешения) прибора.

**3. Диапазон масс.** Это диапазон значений  $m/z$ , который способен определить анализатор масс. **Пример:** квадрупольные анализаторы обычно определяют  $m/z$  до 3000. Анализатор магнитного сектора обычно определяет  $m/z$  до 10000, а время-пролётные анализаторы способны охватить практически неограниченный диапазон масс ионов.

# Кратко об информации, получаемой с помощью метода масс-спектрометрии

1. Непосредственно измерить массовое число молекулы вещества (её молекулярную массу).
2. Масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет не только с высокой точностью определить молекулярную массу, но и по данным соответствующих таблиц можно получить брутто-формулу вещества.
3. На основе полученного масс-спектра изучаемого вещества возможно провести его идентификацию с помощью библиотеки масс-спектральных данных, а также по характеру фрагментации изучаемой молекулы предположить её строение.

**Современные базы данных (библиотеки масс-спектров) позволяет идентифицировать не только компоненты исследуемой смеси и индивидуально охарактеризовать каждое из соединений.**

## **Области применения масс-спектрометрии:**

**В химии и нефтехимии, физике, геологии, биологии, медицине, в производстве полимеров, в производстве полупроводниковых и сверхчистых материалов, в ядерной технике, в с. х-ве и ветеринарии, в пищ. пром-сти, при анализе продуктов загрязнения окружающей среды и мн. др.**

**Большие успехи достигнуты при анализе биологически важных молекул; показана возможность структурного анализа полисахаридов с мол. м. до 15000, белков с мол. м. до 45000 и т.д.**

**Хромато-масс-спектрометрия нашла широкое применение в различных областях химии, медицины, фармацевтического производства, экологического мониторинга и технологического контроля в промышленности.**