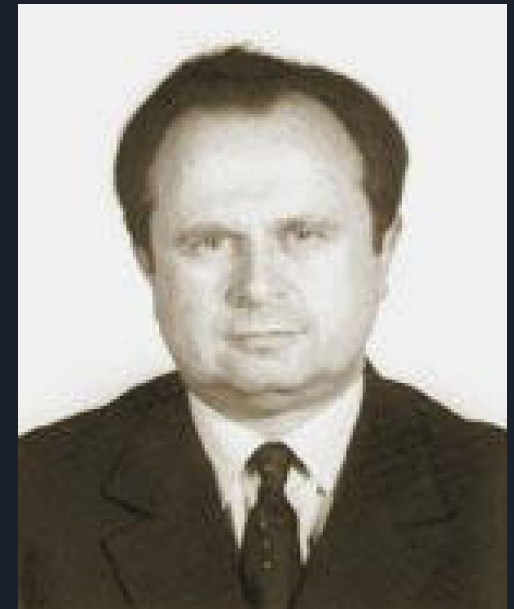


*Санкт-Петербургский Государственный Педиатрический  
Медицинский Университет*

# Масс-Спектрометрия

**Масс-спектрометрия –  
метод исследования вещества  
путем определения масс ионов  
этого вещества (чаще  
отношений  
масс ионов к их зарядам) и их  
количеств**

***В.Л. Тальрозе.***



# ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

- ❑ Масс-спектральный анализ для определения характеристик веществ давно и успешно применяется в химическом анализе. Еще в 1910 году Томпсону удалось записать масс-спектр обоих изотопов неона ( $^{20}\text{Ne}$  и  $^{22}\text{Ne}$ ).
- ❑ Ф.Астон из Кембриджа получил в 1922 г. Нобелевскую премию по химии за открытие с помощью масс-спектрографа ряда изотопов нерадиоактивных элементов.



Джозеф Джон Томсон  
(18.12.1856 –30.08.1940)

- ❑ 1912 г. —Дж. Дж. Томсон (Великобритания) создает первый масс-спектрограф и получает масс-спектры молекул  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$  и др.

- ❑ Некоторые из важнейших достижений:  
Середина 1950-х годов - Вольфганг Пол разработал квадрупольный масс-анализатор(Нобелевская премия по физике 1989 г.)

1985 г.-Коити Танака изобрел метод мягкой лазерной десорбции (Нобелевская премия по химии 2002 г.)

➤ Лишь с 1960 г. началось реальное практическое внедрение масс-спектрометрии, вскоре ставшей стандартным методом современной аналитики.

На данный момент масс-спектрометрия считается одним из наиболее эффективных способов абсолютного измерения атомной и молекулярной массы, она отличается высокой чувствительностью и большой информативностью спектров. Использование масс-спектрометрии весьма многообразно. Она находит применение не только в органической аналитике, но также и неорганической химии, в биологии, физике и других науках.

▶ Масс-спектрометрия подходит для проведения качественного и количественного анализа смесей, а также следового и изотопного анализов.

▶ С помощью масс-спектрометрии можно получить сведения об элементном составе, а следовательно и о структуре нового соединения.

▶ Можно доказать идентичность двух соединений.

# ОСНОВЫ МЕТОДА

Метод основан на переводе частиц исследуемого вещества в состояние ионизированного газа с последующим их разделением и детектированием.

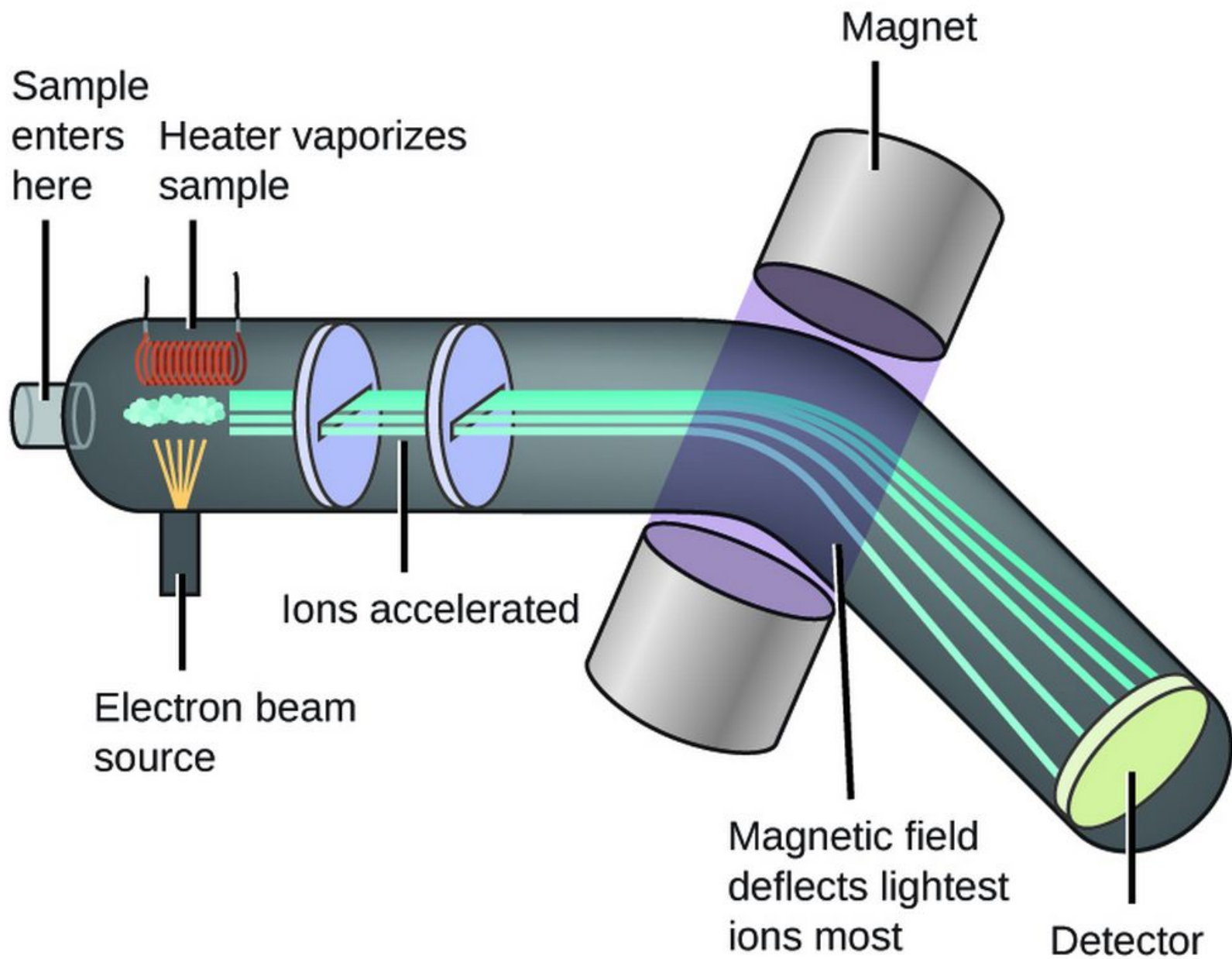
## *Стадии эксперимента:*

1. Предподготовка пробы (например: хроматографическое разделение)
2. Подготовка, ввод и ионизация пробы
3. Ускорение ионов
4. Разделение ионов
5. Детектирование ионов
6. Обработка сигналов



# Схема работы масс-анализатора







# Блок-схема масс-спектрометра

(Основные шаги при измерении масс-спектра)



# Состав масс-спектра

Масс-спектр может включать пики нескольких типов ионов (продуктов ионизации):

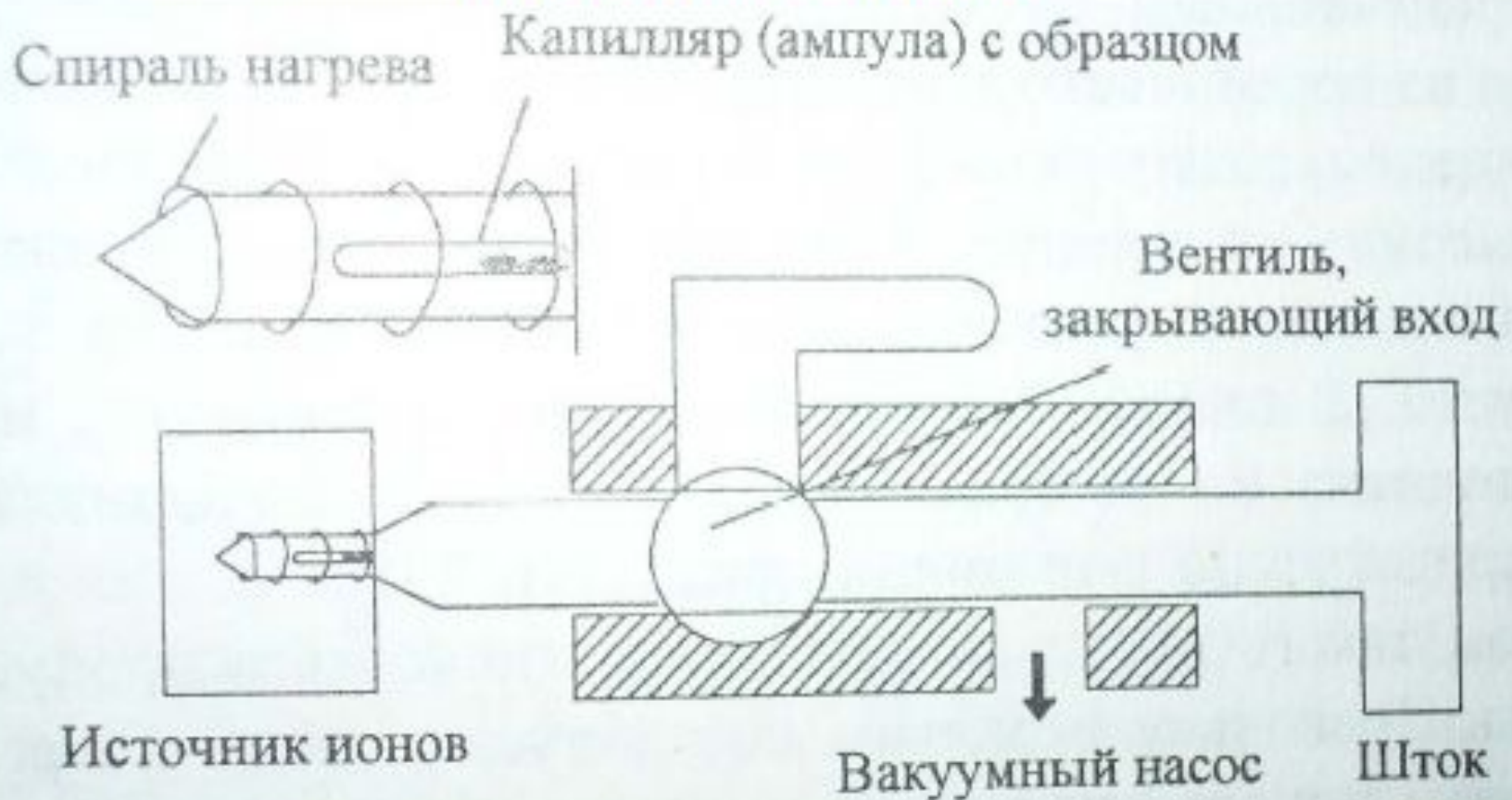
1. Молекулярный ион
2. Перегруппировочные ионы
3. Фрагментные ионы
4. Многозарядные ионы
5. Метастабильные ионы

**Важное условие напуска пробы – количество вводимой пробы не должно превышать нескольких микромолей, чтобы не нарушить вакуум внутри прибора.**

Существуют **прямой** и **непрямой** способы ввода пробы:

- **при непрямом способе** пробу вводят в масс-спектрометр в газообразном состоянии ( жидкие и твердые образцы необходимо предварительно перевести в пар путем нагревания в специальной камере до температур порядка  $500^{\circ}\text{C}$  в условиях вакуума  $\sim 10^{-4}$  Па)
- **прямой ввод** используют тогда, когда проба труднолетуча, образец вводят непосредственно в ионизатор с помощью штанги через систему шлюзовых камер, это обеспечивает резкое уменьшение потери вещества
- существует способ ввода пробы непосредственно после хроматографического разделения, такое сочетание масс-спектрометрии с хроматографией называется **хромато-масс-спектрометрией**

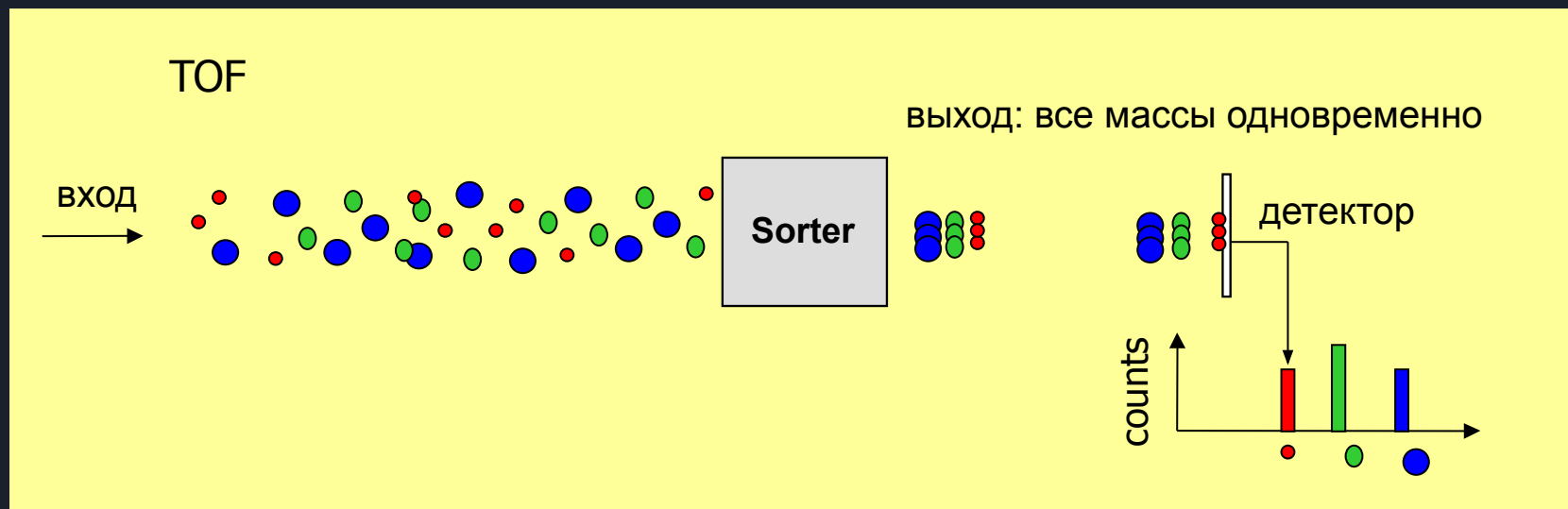
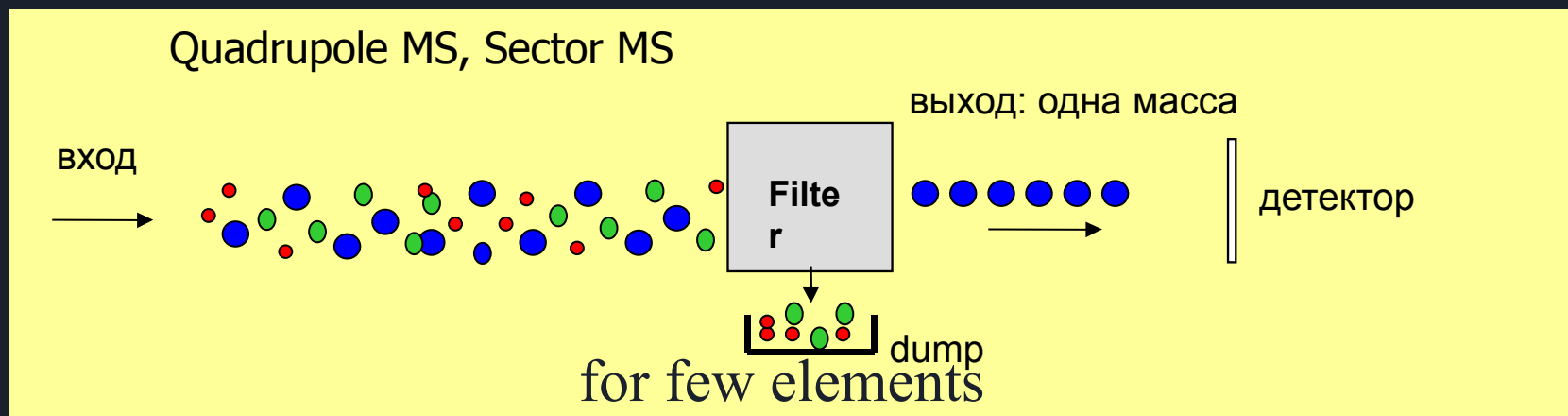
## Схема прямого ввода образца в масс-спектрометр:



# Динамические схемы масс-спектрометров

Два основных типа динамических масс-спектрометров:

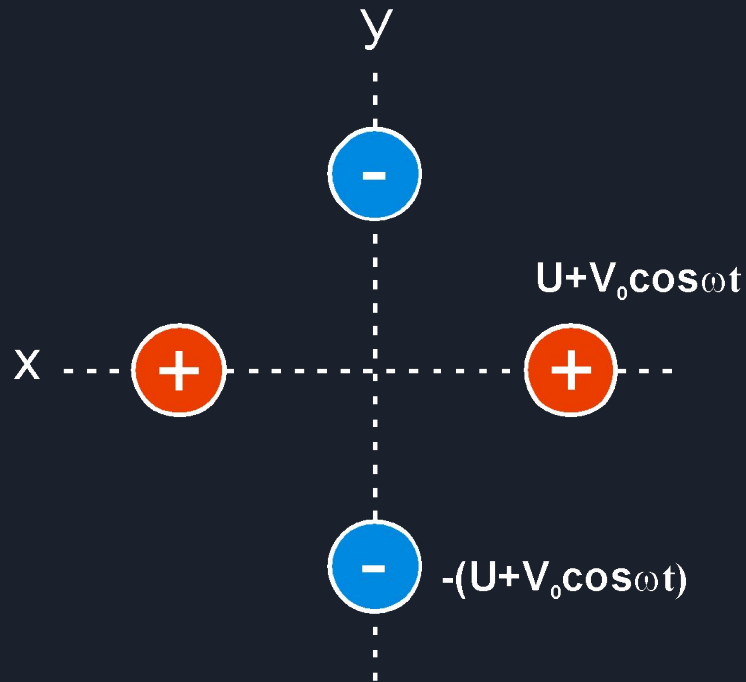
- времяпролетный масс-спектрометр
- квадрупольный масс-спектрометр.



# Времяпролетный масс-спектрометр



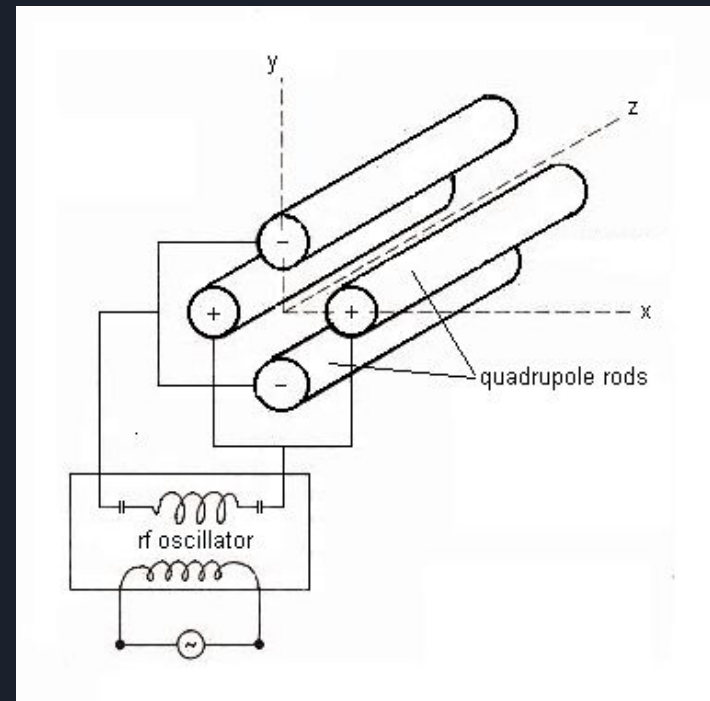
# Принцип работы квадрупольного масс-спектрометра



Квадруполь состоит из 4-х параллельных стержней

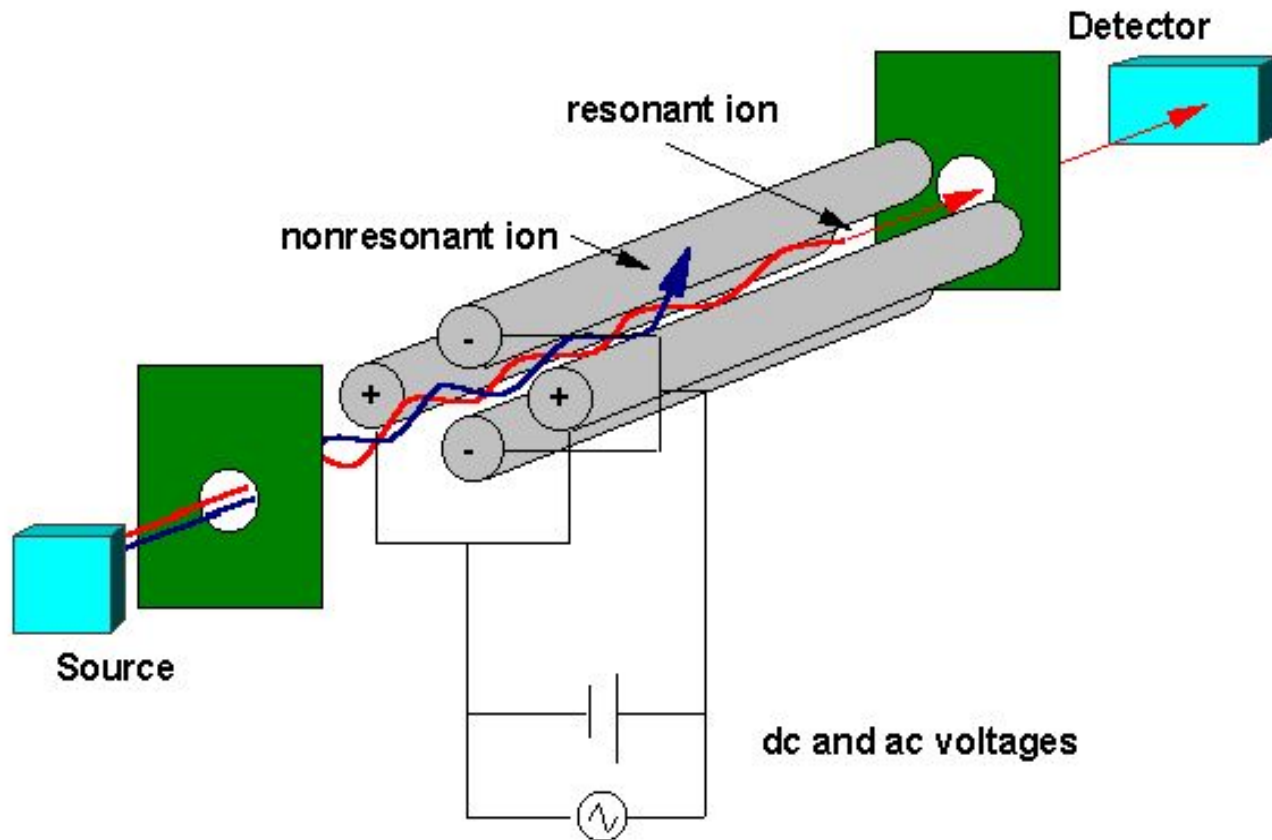
Обычная длина от 5 до 200 см  
Обычный радиус от 4 до 20 мм

Стержни диагонально связаны с постоянным и радиочастотным источниками питания



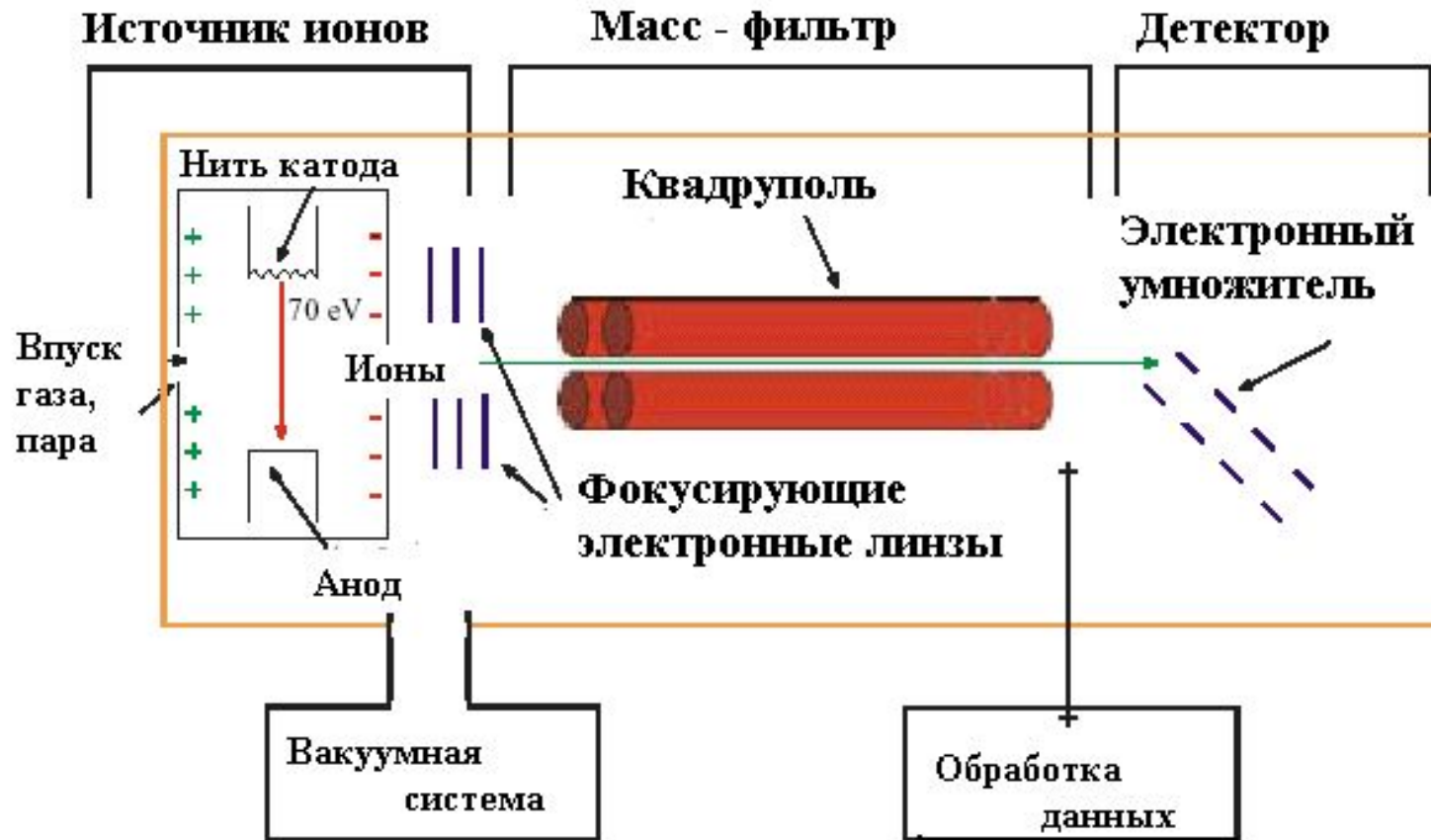


# КВАДРУПОЛЬНЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТР

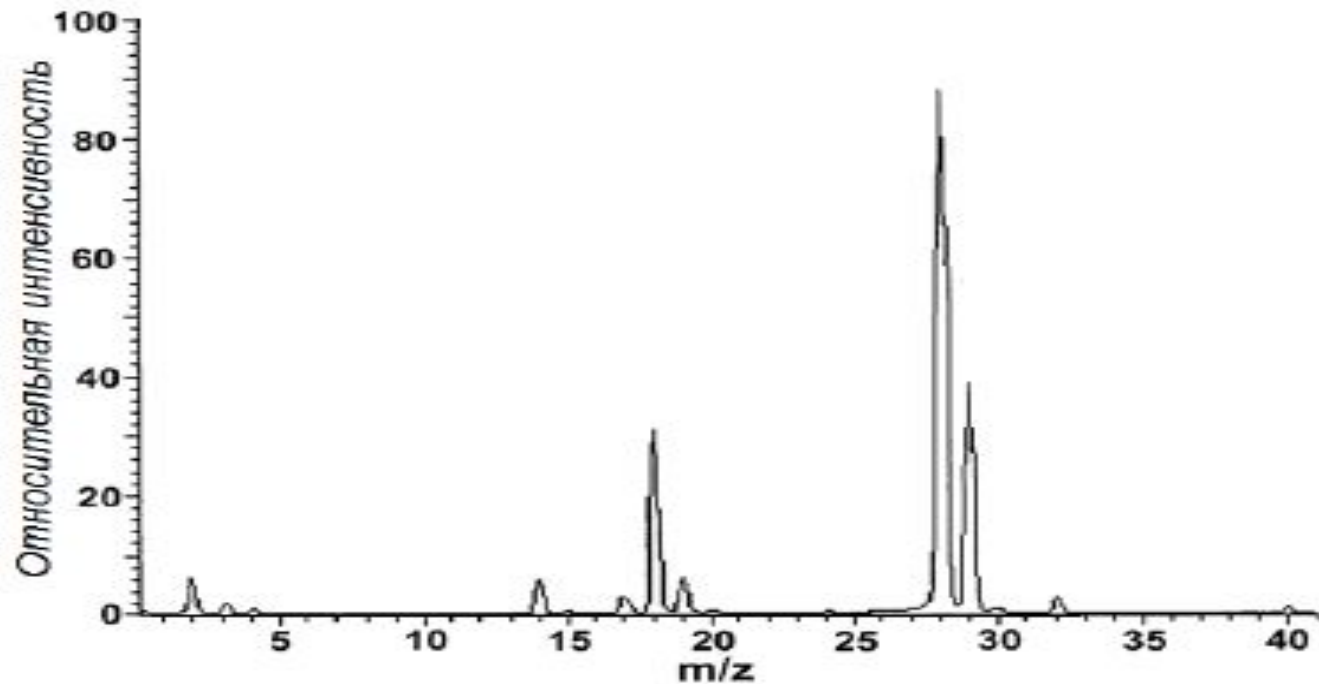




# СТРУКТУРА КВАДРУПОЛЬНОГО МАСС - СПЕКТРОМЕТРА



# Масс-спектр



**Единицы измерения атомных и молекулярных масс**

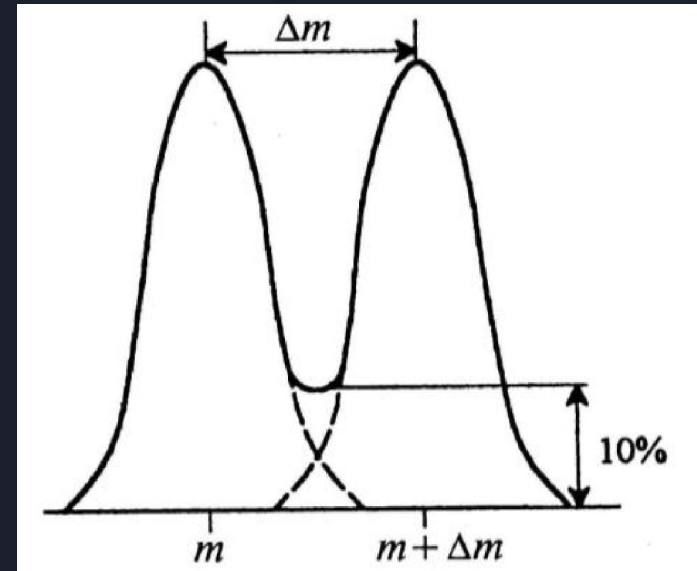
• **Единицы массы:**

• **а.е.м. (атомные) = у.е.(углеродные):  $1/12 \text{ }^{12}\text{C} = \text{Да}$**   
**(Дальтон)**

• **1 Th = 1Da/z**

# Характеристики масс-спектрометра. Разрешающая способность.

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



Идеальная форма пика ионов – прямоугольная, реальная – гауссова. 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.

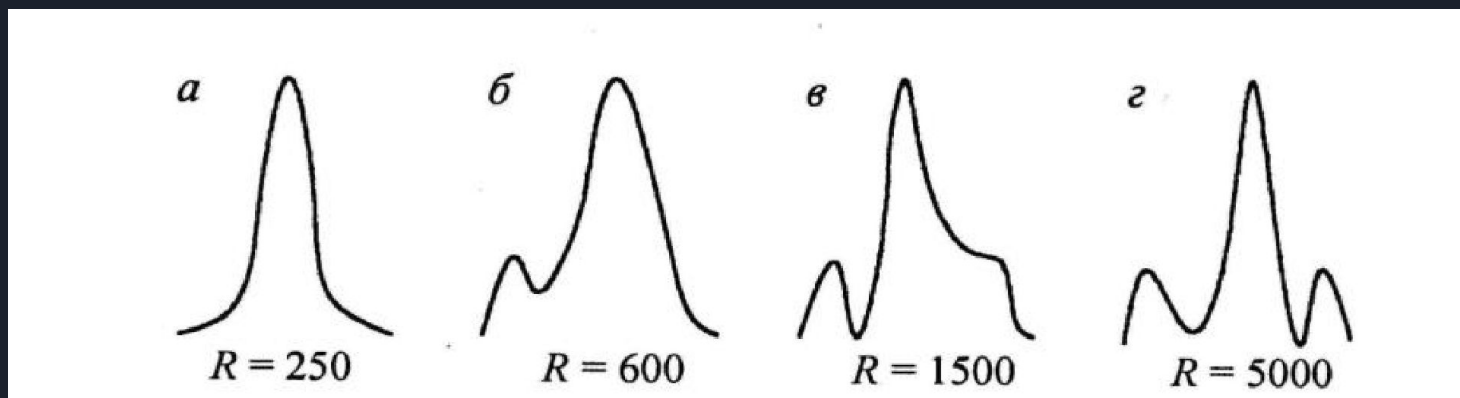
# РАЗРЕШЕНИЕ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРАХ

Установлено, что на разрешение в масс-спектрометрии влияют в основном следующие параметры:

1. Пространственная расходимость пучка ионов
2. Разброс по кинетической энергии ионов с одинаковым отношением массы к заряду
3. Радиус кривизны траектории движения ионов в магнитном поле
4. Ширина щелей ионного источника и коллектора

# Характеристики масс-спектрометра. Разрешающая способность.

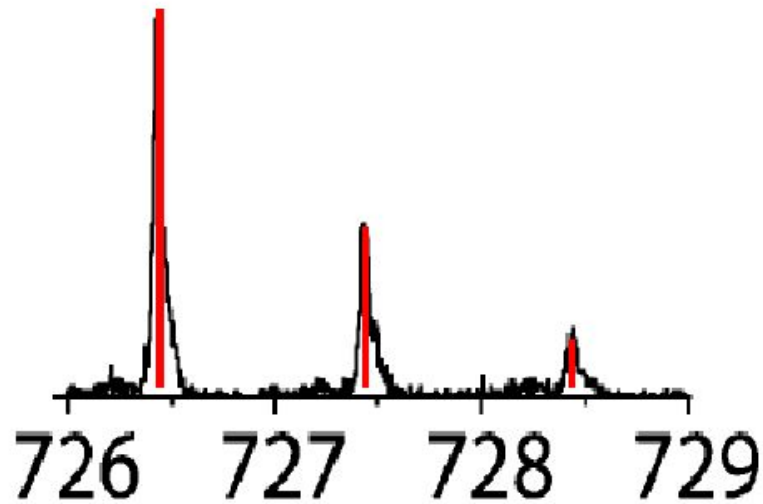
**Масс-спектрометрия высокого разрешения** (MCPB, HRMS—High Resolution Mass-Spectrometry) позволяет разделить и точно измерить массовые значения пиков, соответствующих одной целочисленной массе. Примером такого является мультиплет с целочисленной массой 28. Это может быть монооксид углерода CO, азот N<sub>2</sub>, этилен C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. Поскольку за стандарт принят основной изотоп углерода <sup>12</sup>C (12.000000), массы всех остальных изотопов элементов нецелые числа: масса основного изотопа водорода <sup>1</sup>H 1.00782506, азота <sup>14</sup>N 14.00307407, кислорода <sup>16</sup>O 15.99491475 ит.д. Тогда массы CO-27.9949, N<sub>2</sub>-28.0061, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-28.0313.



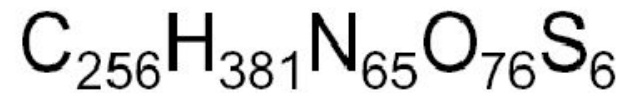
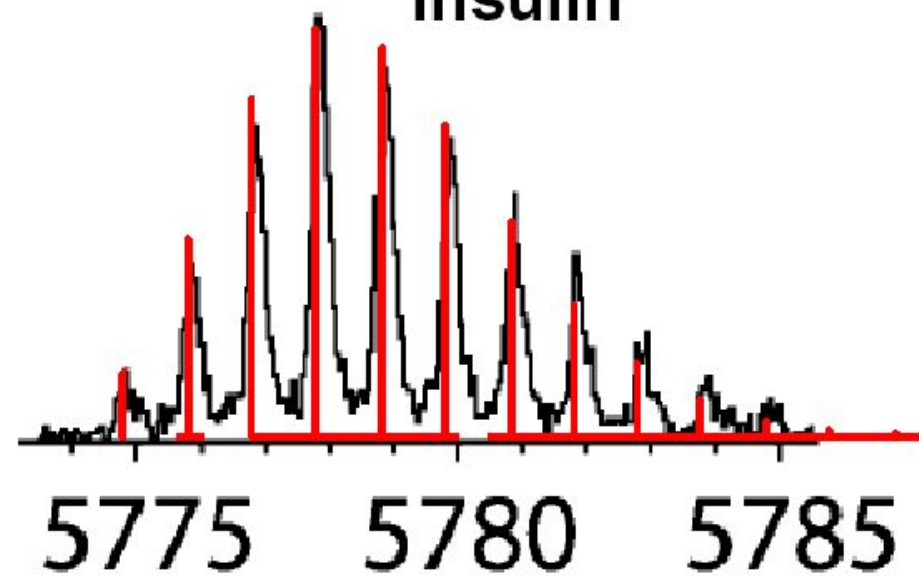
С ростом молекулярной массы резко возрастает число ионов с одинаковой целочисленной массой, что приводит к необходимости увеличения разрешения масс-спектрометров.

# Isotopic Distribution

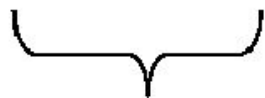
YAGFLR



Insulin



$$({}^{12}C + {}^{13}C)^m * ({}^1H + {}^2H)^n * ({}^{14}N + {}^{15}N)^o * ({}^{16}O + {}^{17}O + {}^{18}O)^p * ({}^{32}S + {}^{33}S + {}^{34}S + {}^{36}S)^q$$



$$(0.99 + 0.01)^m = 0.99 - m * 0.99 * 0.01 + \dots$$

# **ИСТОЧНИКИ ИОНОВ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Образование ионов является результатом взаимодействия молекулы, атома или радикала в газовой фазе (M) с электроном, фотоном, ионом или быстрой молекулой (X), а также с макроскопическим телом, обладающим электрическим полем с высоким градиентом.

## **Основные задачи источников ионов:**

- 1. Ионизация анализируемого вещества;**
- 2. Ускорение ионов;**
- 3. Формирование ионного пучка**

## ***Механизмы ионизации***

1. **Захват электрона** - при захвате электрона, отрицательный заряд  $-1$  сообщается молекуле при присоединении электрона. Этот механизм ионизации в первую очередь наблюдается для молекул с большим сродством к электрону, таких как галогенсодержащие соединения.

2. **Отрыв электрона** - как видно из названия механизма, отрыв электрона придаёт молекуле  $+1$  положительный заряд при выбивании электрона, так что при этом часто образуются катион-радикалы.

3. **Протонирование** – механизм ионизации, при котором к молекуле присоединяется протон, сообщая ей заряд  $+1$  на каждый присоединённый протон.



## *Механизмы ионизации (продолжение)*

4. **Депротонирование** – механизм ионизации, при котором отрицательный заряд  $-1$  получается при отрыве протона от молекулы.

5. **Катионизация** – механизм ионизации, в котором заряженный комплекс образуется при координационном присоединении положительно заряженного иона к нейтральной молекуле. В принципе, протонирование тоже подпадает под это определение, поэтому катионизацией считается присоединение иона, отличного от протона, например щелочного металла или аммония.

6. **Прямой перенос заряженной молекулы в газовую фазу** - перенос соединений, уже заряженных в растворе, легко достигается при использовании десорбции или выбрасыванием заряженных частиц из конденсированной фазы в газовую.

# **ИСТОЧНИКИ ИОНОВ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

**Требования, предъявляемые к источникам ионов:**

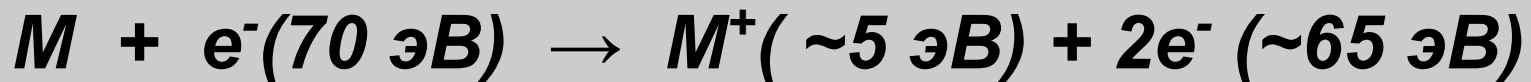
- 1. Источника должен давать, по возможности наибольший ионный ток, стабильный во времени;**
- 2. Минимальный разброс ионов по энергии в ионном пучке;**
- 3. Источник должен давать пучок с определенной геометрией (сечение 1:100) и малым углом расходимости**
- 4. Высокий коэффициент использования пробы;**
- 5. Источник не должен, по возможности, создавать других ионов (фон) кроме ионов исследуемого вещества;**
- 6. Источник при работе не должен ухудшать вакуум в масс-спектрометре;**
- 7. В источнике не должно быть дискриминации ионов; вероятность попадания в анализатор должна быть одинакова для всех ионов**

# Методы ионизации низкомолекулярных веществ

Метод ионизации	Сокращенное название	Процесс
Ионизация электронным ударом	IE	$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$
Фотоионизация	PI	$M + h\nu \rightarrow M^+ + e^-$
Химическая ионизация	CI	$M + CH_5^+ \rightarrow M \cdot H^+ + CH_4$
Полевая ионизация, полевая десорбция	FI, FD	$M \rightarrow M^+ + e^-$
Бомбардировка быстрыми атомами	FAB	$M + X \rightarrow M \cdot H^+$
Ионизация в индуктивно-связанной плазме	ICP	$M + e^- \rightarrow M_1 + M_2^+ + 2e^-$
Термоионизация	TI	$M \rightarrow M^+ + e^-$

# Электронная ионизация (EI)

**Электронная ионизация**—это ионизация паров вещества потоком электронов, разогнанных в электрическом поле. При этом электрон, пролетая рядом или через молекулу ионизируемого вещества, не захватывается ею, а передает часть своей энергии, что приводит к «возбуждению» молекулы, отрыву от нее одного или нескольких электронов с образованием положительного иона  $M^+$  (молекулярный ион), а также, в зависимости от энергии ионизирующих электронов, к разрыву связей в ионизируемой молекуле – к ее фрагментации.

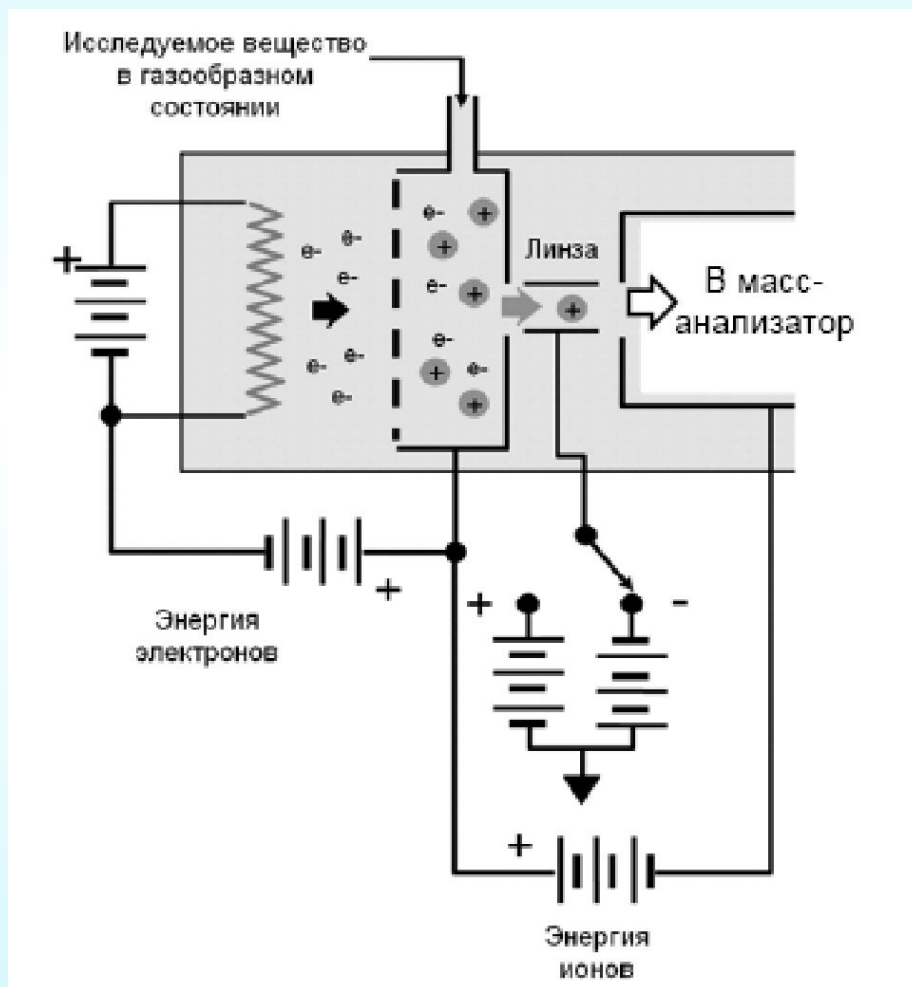


$M^+ \rightarrow$  молекулярные ионы + фрагментарные ионы + нейтральные фрагменты

Избыток внутренней энергии ( 5 эВ) в молекуле ведёт к некоторой фрагментации

# Электронная ионизация (EI)

Принципиальная схема ионного источника с электронным ударом

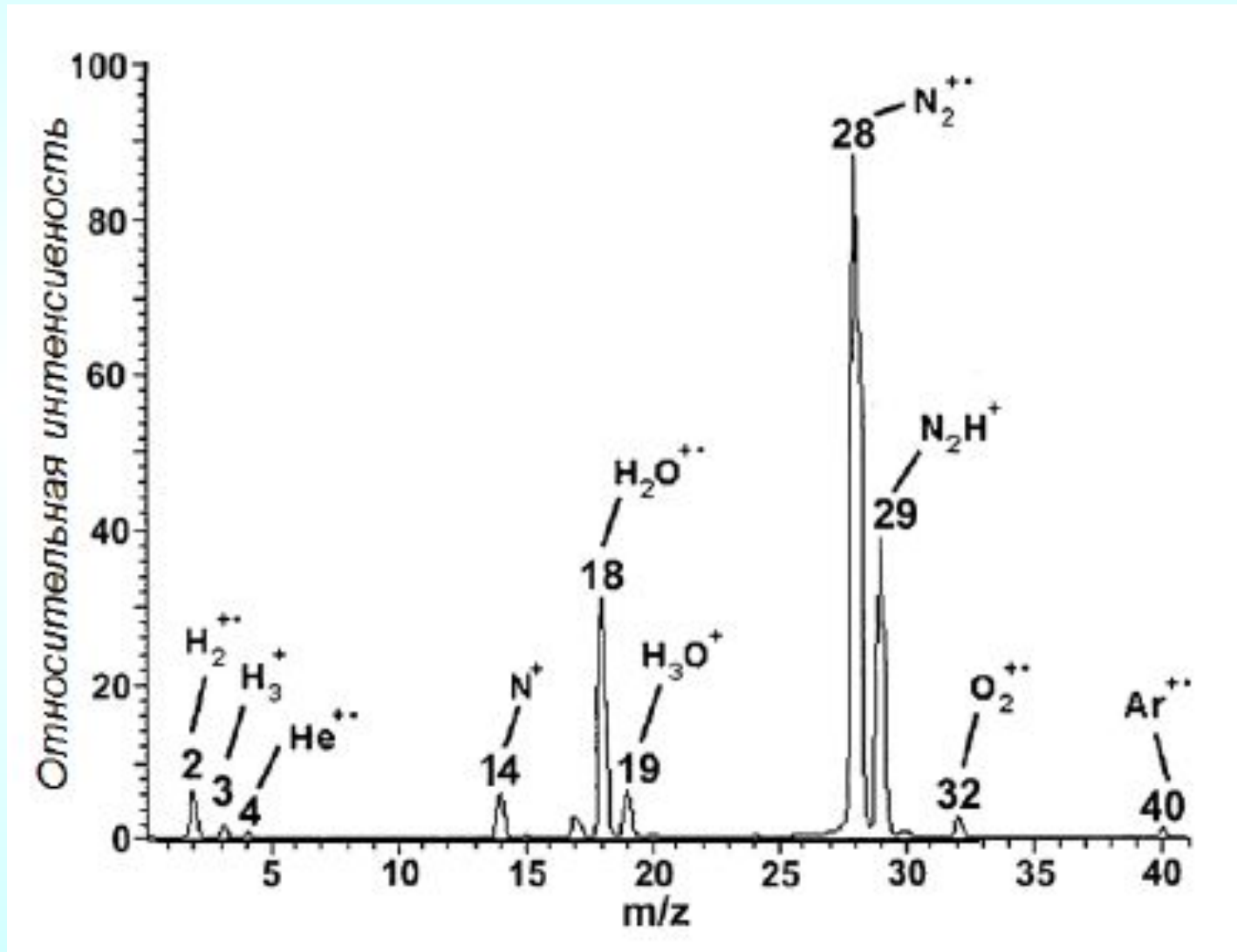


Эффективность ионизации зависит от энергии ионизирующих электронов, максимум эффективности достигается при энергии примерно в 70 эВ

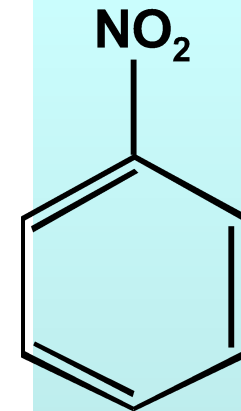




# Ионизация электронным ударом. Масс-спектр смеси газов

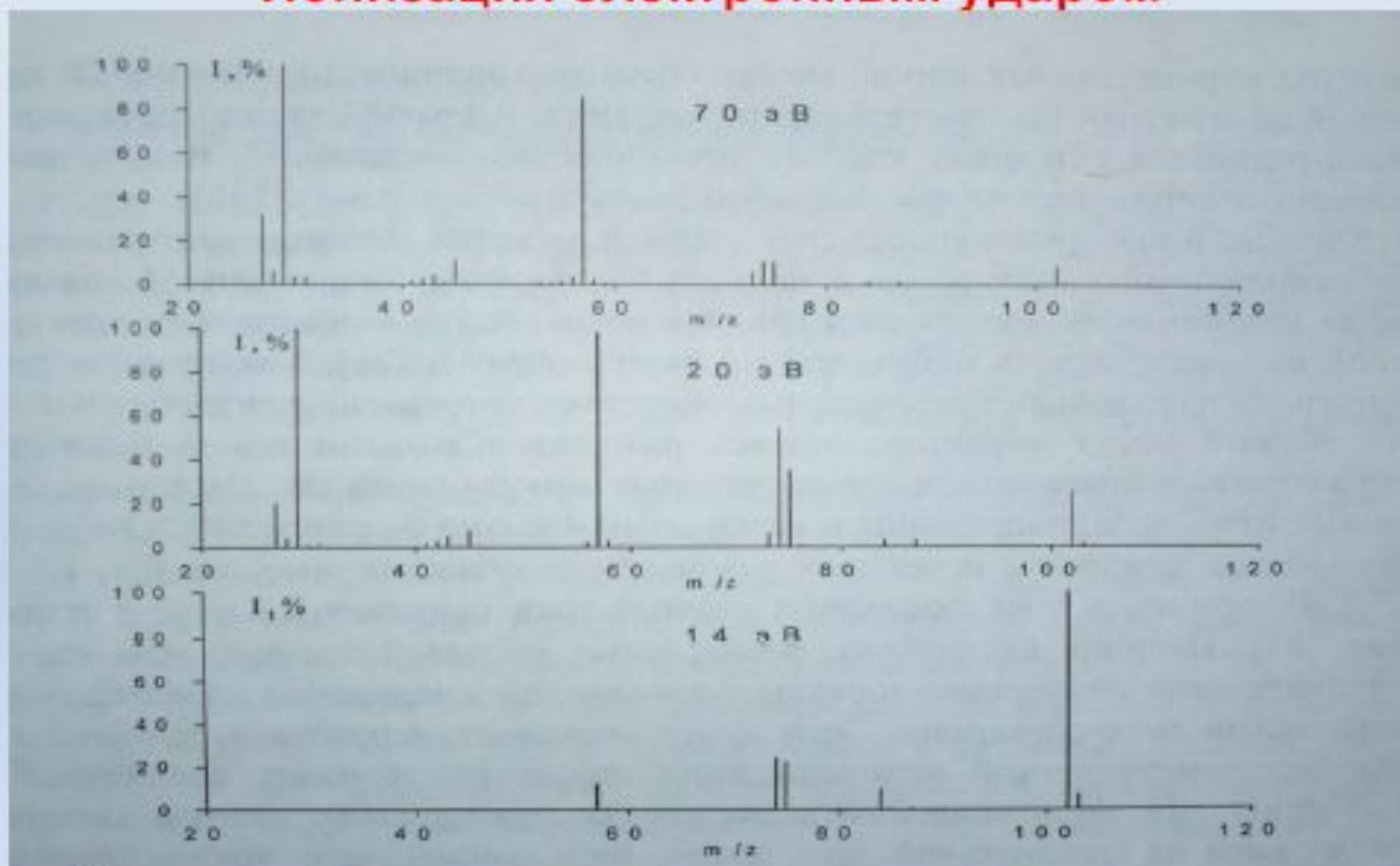


**Ионизация электронным ударом** - кинетической энергии электрона достаточно, для того чтобы резко увеличить потенциальную энергию образующегося иона – в первую очередь его колебательную и вращательную составляющие. В результате ион обычно претерпевает распад, фрагментацию. Образующиеся дочерние ионы, как правило, обладают меньшими массами, чем исходная молекула (этот вид ионизации относится к **жестким** способам ионизации). Недостаток: очень сложные спектры, которые сложно расшифровывать, может вообще не наблюдаться молекулярный пик. Аналитическое применение: изотопный анализ, молекулярный анализ неорганических газов.

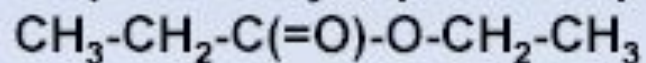


Масс-спектр нитробензола при ионизации электронным ударом

## Ионизация электронным ударом



Масс-спектр электронного удара этилпропионата:



(молекулярная масса 102) при энергиях ионизирующих электронов 70, 20 и 14 эВ



# Электронная ионизация (EI)

## Достоинства:

1. Наиболее распространенный и простой в реализации метод ионизации
2. Богатый фрагментами масс-спектр соединений, что позволяет проводить структурные исследования
3. Наличие больших баз данных масс-спектров, позволяющих быстро производить идентификацию соединений

## Недостатки:

1. Не всегда можно получить молекулярный ион
2. Большая фрагментация образца, иногда трудно по фрагментации проследить направление превращения иона
3. Невозможность работы с образцами, которые нельзя перевести в газовую фазу

# Химическая ионизация (CI)

**Химическая ионизация** - основана на взаимодействии пробы с ионами газа-реагента (более мягкий способ). Впервые была предложена в 60-е годы 20 века.

В этом способе ионизации пары анализируемой пробы смешивают с избытком (100 – 1000-кратным ) газа-реагента - обычно **метана**, а также **аммиака**, **NO** или **изобутана**.

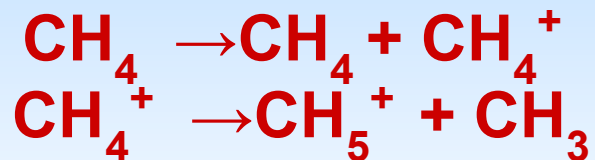
Газ-реагент ионизируют с помощью электронного удара, для того чтобы образовались положительно заряженные ионы. Избыток газа-реагента предохраняет молекулы пробы от ионизации.

Последующая ионизация молекул пробы происходит за счет переноса протона или гидрид-иона. Аналитическое применение: анализ органических соединений.

# Химическая ионизация (CI)

Химическая ионизация—это ионизация образца пучком предварительно ионизированных молекул газа, например, метана или аммиака.

Ионизация молекул газа происходит при помощи электронной ионизации при 150-200 эВ и дальнейшего химического превращения газа-ионизатора.



Сталкиваясь с молекулами образца, ионизированные молекулы газа передают свой заряд в виде протона:



## ***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.

## ***Недостатки:***

1. Отсутствие фрагментации, что не позволяет судить о структуре вещества и сравнить спектр с базами масс-спектральных данных.
2. Невозможность работы с образцами, которые нельзя перевести в газовую фазу.

# Химическая ионизация (CI)

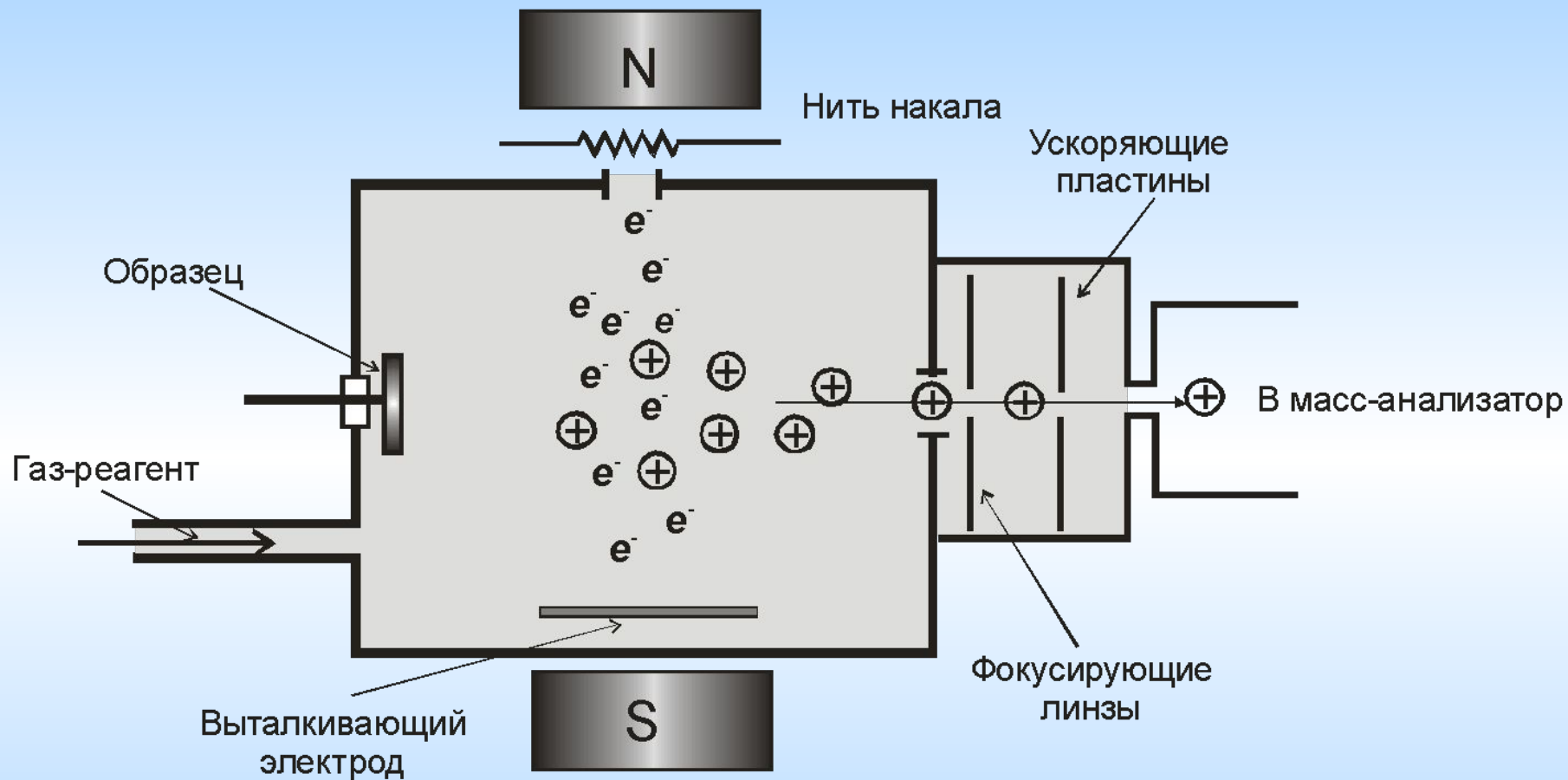


Схема источника ионов с CI.

# Ионизация электрораспылением (ESI)

**Электроспрей**(электрораспыление) – это метод, в котором вещество на ионизацию поступает в растворе полярного растворителя (им может быть вода, ацетонитрил, метанол и т.д.), при этом в растворе присутствуют катионы водорода или щелочных металлов, натрия или калия.

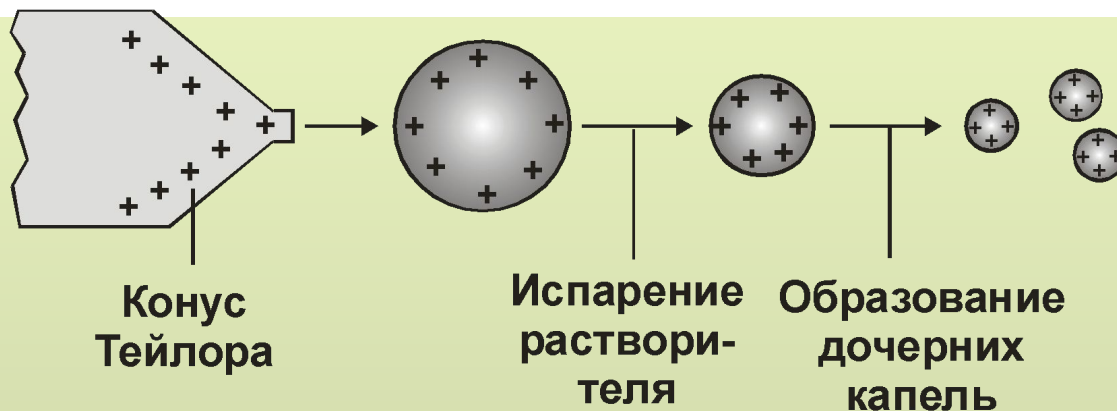
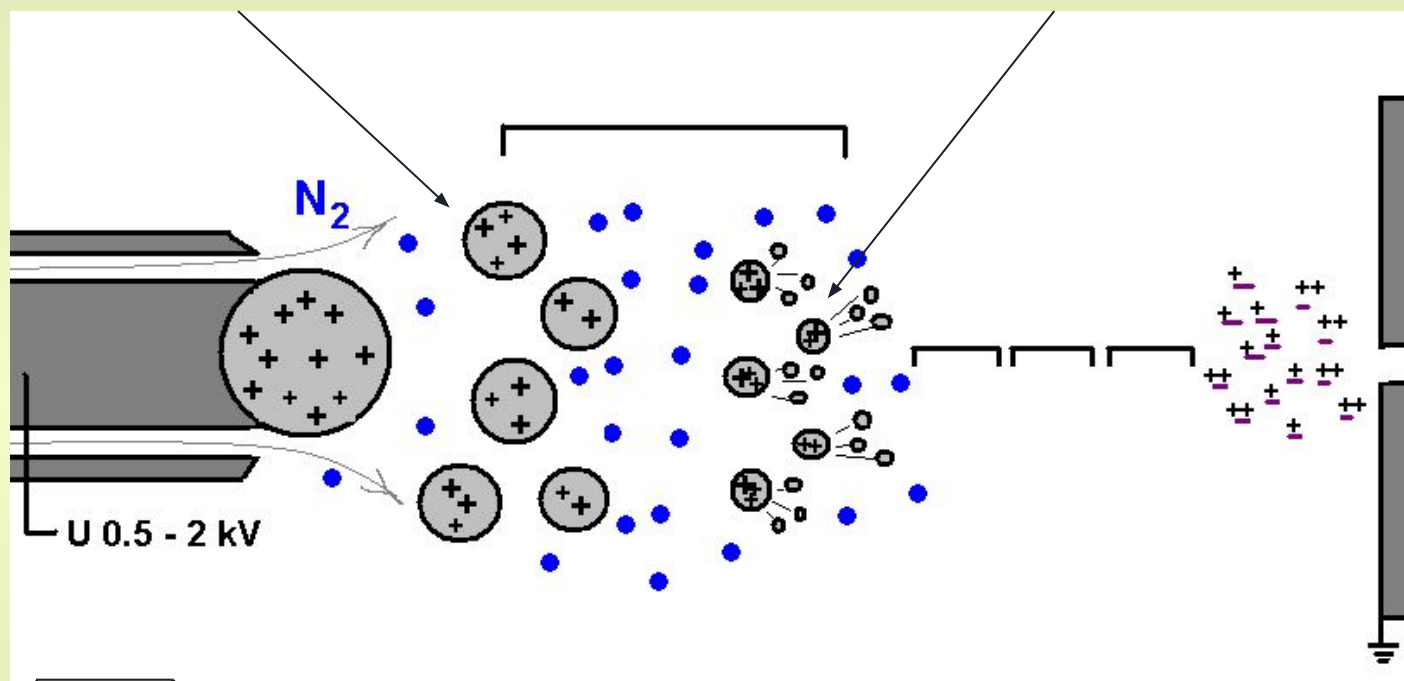
Небольшая капля раствора подается в металлический специальный капилляр-«небьюлайзер» («распылитель»), к которому одновременно приложено высокое (несколько кВ) электрическое напряжение, в результате чего капля с раствором образца, срываясь с конца капилляра, имеет положительный заряд. Далее, продвигаясь в электрическом поле, капля испаряется под действием нагретого потока инертного газа (чаще всего азота). Объем капли уменьшается, заряд ее поверхностный растет –и капля «взрывается» на ряд мелких капель, заряженных положительно, и продолжающих испарять молекулы растворителя под действием нагретого сухого инертного газа.

Далее, через узкие отверстия сепараторов, где происходит постепенное снижение давления с примерно атмосферного до глубокого вакуума, ионизированные частицы, состоящие из молекул исследуемого вещества и катиона ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ), попадают в ионную оптику.

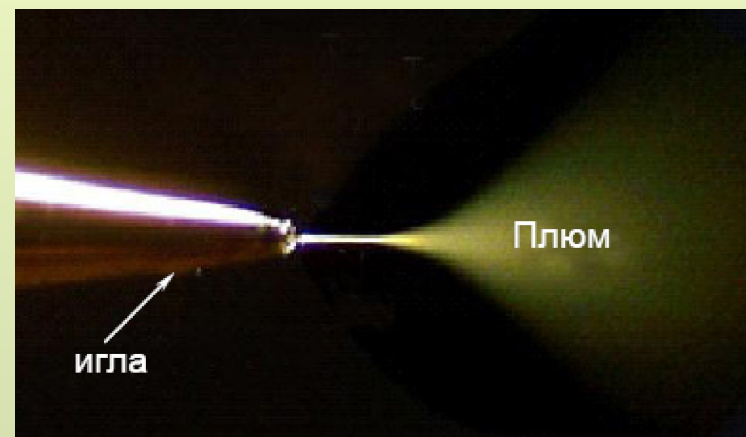
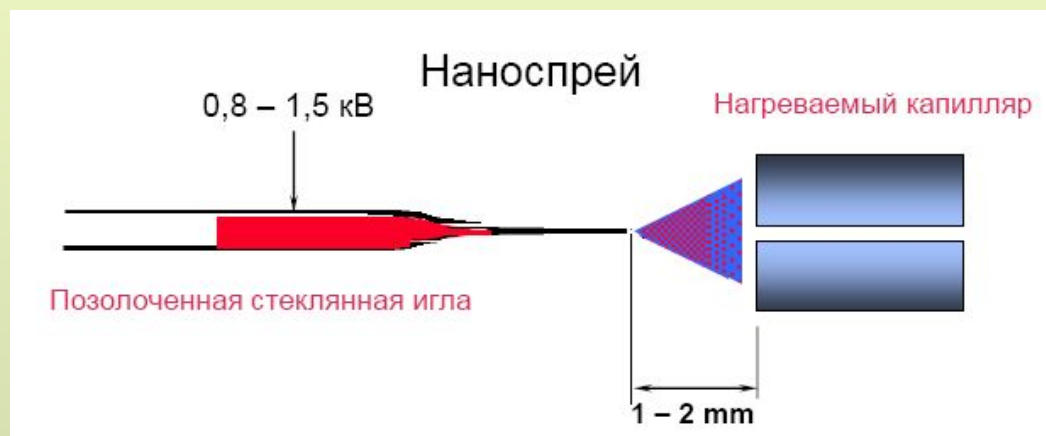


# Ионизация электрораспылением (ESI)

Анализируемое вещество подается в растворе через капилляр с поданным на него напряжением. **Растворители:** вода, ацетонитрил, метанол  
**несколько последовательных «упариваний взрывов» микрокапель**



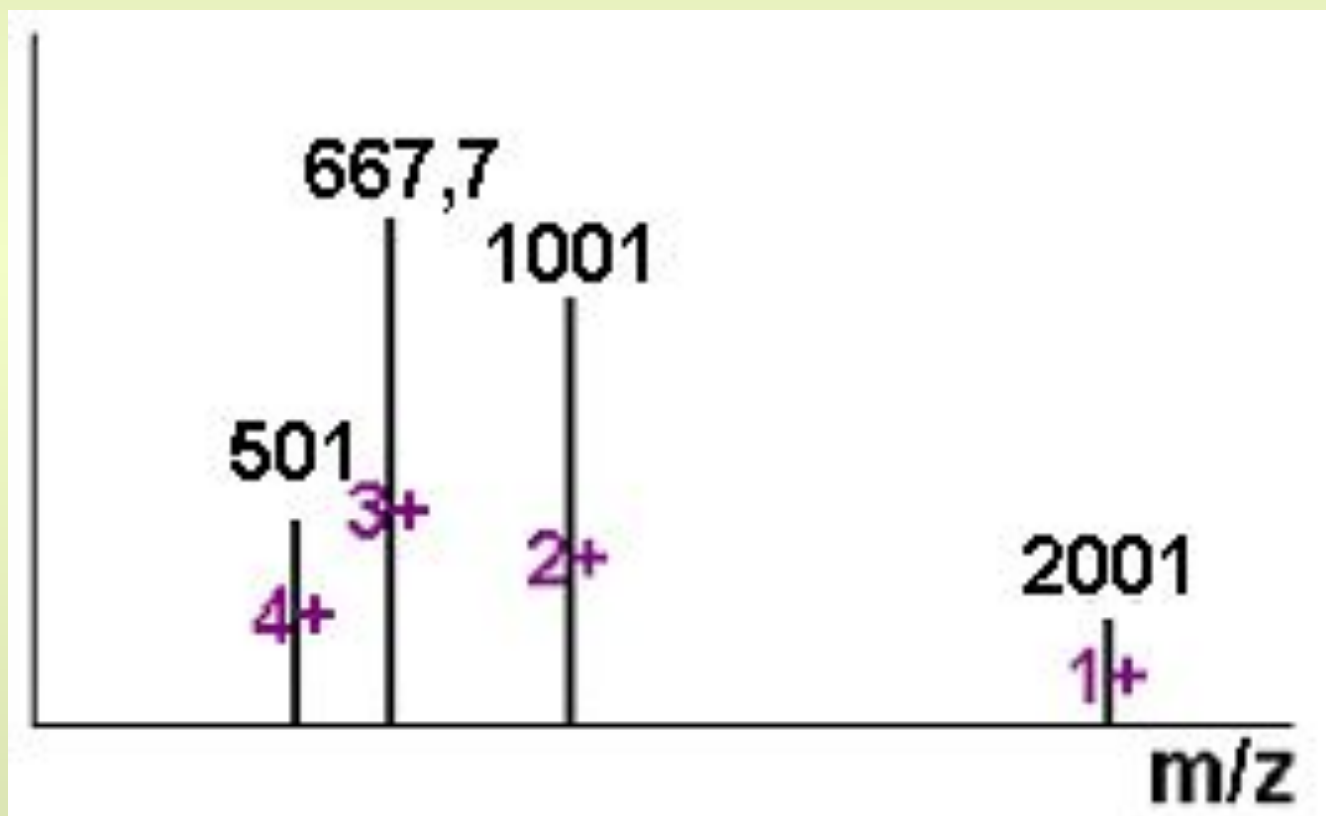
# Ионизация электрораспылением (ESI)





# Ионизация электрораспылением (ESI)

В результате получаются многозарядные газофазные ионы, захватившие на себя разное количество протонов, вплоть до максимально возможного.



# Фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)

Фотоионизация – это *ионизация* монохроматическими пучками фотонов с разбросом по энергии 0.01-0.02 эВ. Пучки могут быть получены излучением молекул инертных газов в газоразрядных трубках либо при помощи лазеров. Энергии самих фотонов лежат в диапазоне 10-40 эВ, что позволяет ионизировать любые органические соединения.

## Фотоионизация



# Интерпретация масс-спектров

На основании масс-спектров веществ решаются аналитические и структурные задачи.

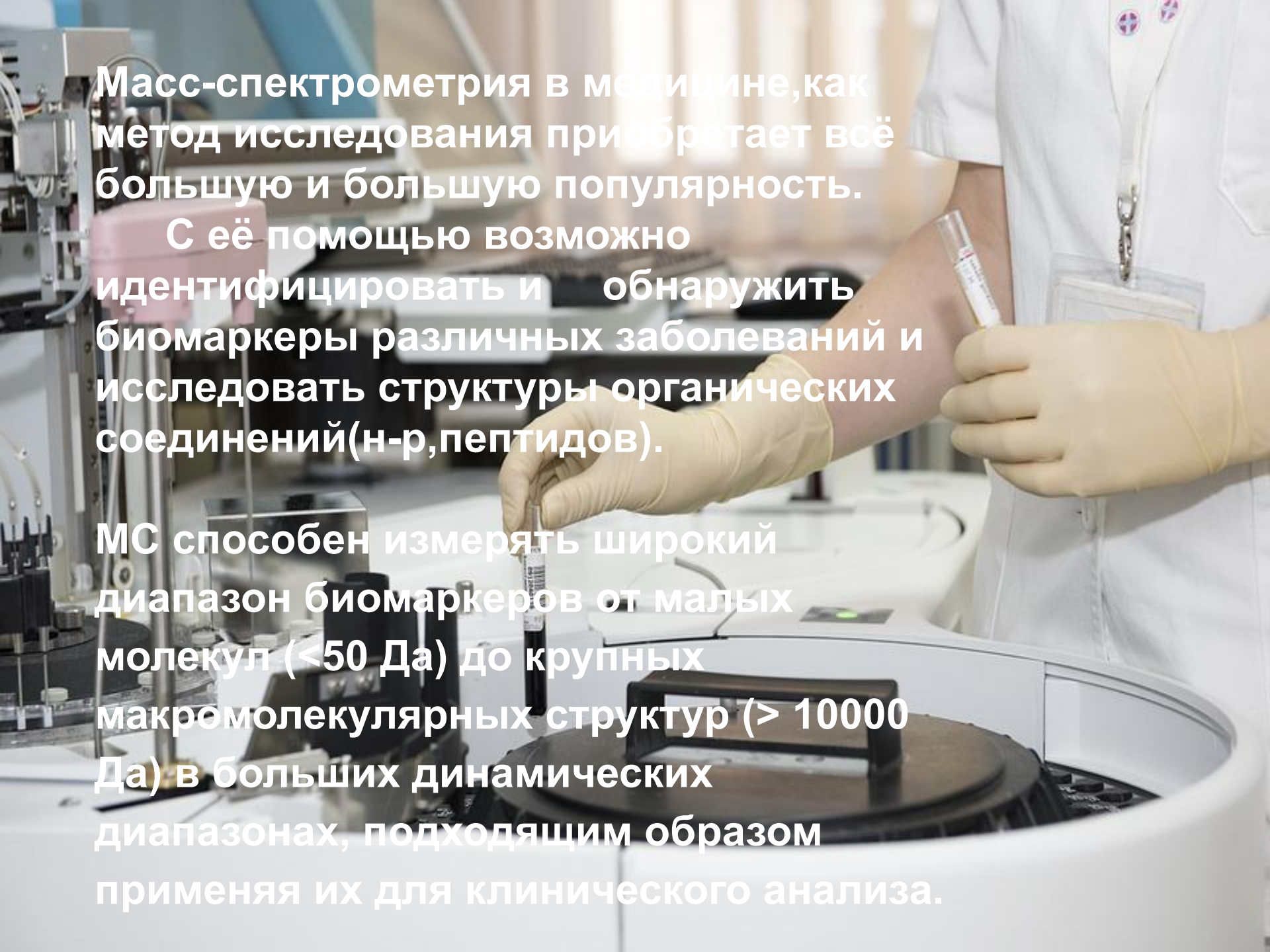
## Аналитические задачи

Идентификация веществ, определение качественного и количественного состава смесей производится путем сравнения полученного спектра со спектрами, имеющимися в базе данных.

## Структурные задачи

При определении структурной формулы молекулы используется три блока данных, представленных в масс-спектре:

1. Пик молекулярного иона, позволяющего определить молярную массу вещества.
2. Кластеры изотопных пиков
3. Пики ионов, полученных при трансформации молекулы (перегруппировочные, фрагментарные и пр.).



Масс-спектрометрия в медицине, как метод исследования приобретает всё большую и большую популярность.

С её помощью возможно идентифицировать и обнаружить биомаркеры различных заболеваний и исследовать структуры органических соединений (н-р, пептидов).

МС способен измерять широкий диапазон биомаркеров от малых молекул (<50 Да) до крупных макромолекулярных структур (> 10000 Да) в больших динамических диапазонах, подходящим образом применяя их для клинического анализа.

Анализ достигается за счет применения различных методов MS, которые могут быть модифицированы и настроены на целевой биомаркер (ы), представляющий интерес. Кроме того, возможен анализ нескольких матриц выборки, при этом методы MS, простирающиеся от традиционной крови (плазмы / сыворотки) и измерения мочи, включают летучие и нелетучие молекулы в слюне , выделения пота и кожи , выдыхаемые дыхательные газы и срезы тканей





*СПАСИБО ЗА  
ВНИМАНИЕ!*

