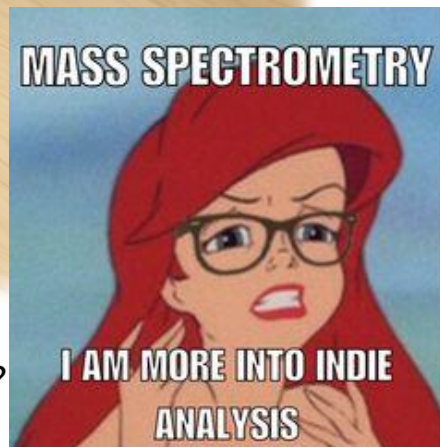
Основы постановки научного эксперимента

Лекция №9 Масс-спектрометрия

"Okay—who put my lunch through the mass spectrometer..?



Основы метода

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

Стадии эксперимента:

1. Предподготовка пробы
2. Подготовка, ввод и ионизация пробы
3. Ускорение ионов
4. Разделение ионов
5. Детектирование ионов
6. Обработка сигналов

Основные понятия

- **Вещество** - форма материи, состоящая из кварков и лептонов (ядер и электронов)
- **Ион** — заряженная частица вещества
- **Масс-спектрометрия** — метод исследования вещества при помощи разделения ионов по отношениям массы к заряду *(m/z)*
- **Масс-спектр** — зависимость интенсивности ионного сигнала от *m/z* (график или таблица)
- **Масс-спектрометр** — прибор для получения масс-спектра

Возможности масс-спектрометрии

- С помощью масс-спектрометрии можно анализировать высокомолекулярные соединения с массой до нескольких млн. Да (белки, полипептиды, синтетические полимеры и пр.).
- Можно детектировать следовые количества веществ до 10^{-14} грамм.
- В 2004 было сообщено о беспрецедентном пределе обнаружения в 480 молекул (800 иоктомоль) для брадикинина (пептид)*.

*https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac049657j

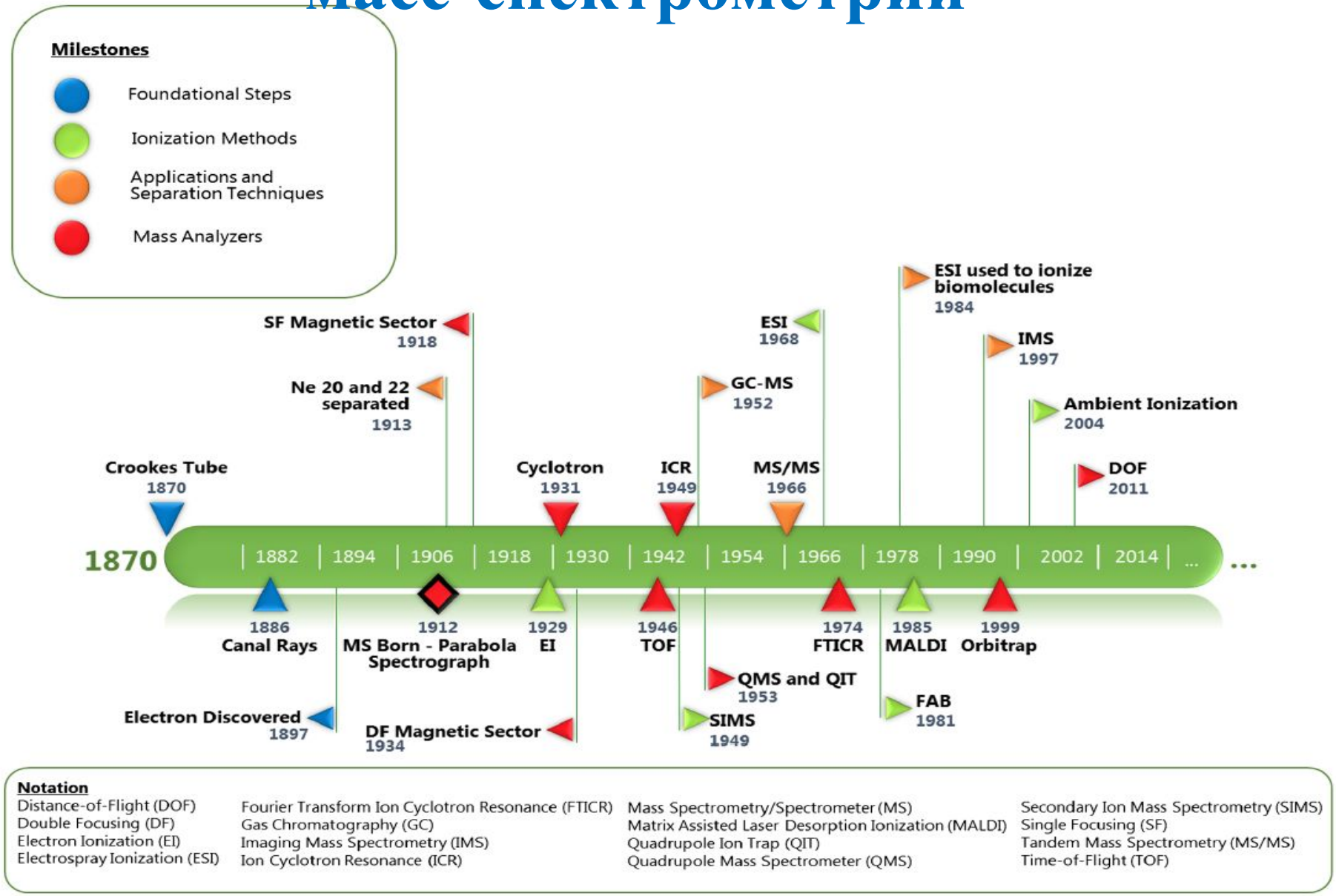
Возможности масс-спектрометрии

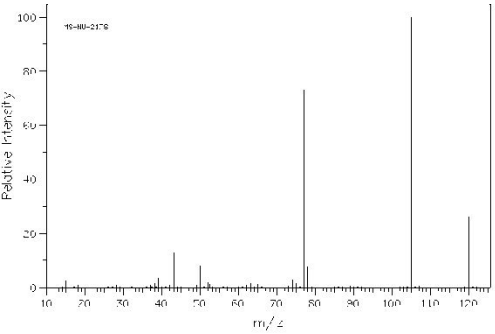
- Для низкомолекулярных веществ молекулярная масса (MW) может быть определена с точностью 1 м.д. или 0.0001%, что достаточно, чтобы подтвердить брутто-формулу исходя только из массы
- Для больших биомолекул MW может быть определена с точностью 0.002% (то есть 1 Да для белка массой 40 кДа)
- 1 Дальтон = 1 атомная единица массы (1 amu)

Информация, получаемая из масс-спектрометрии

- 1. Прямое измерение массового числа молекулы вещества, т.е. её молекулярной массы, в случае, если вещество в условиях масс-спектрометрического эксперимента дает молекулярный ион – заряженную частицу, имеющую ту же массу.
- 2. При использовании масс-спектрометрии высокого разрешения возможно получение очень точного значения молекулярной массы, что позволяет по известным табличным данным получить брутто-формулу вещества.
- 3. Получение масс-спектра вещества, что позволяет провести его идентификацию по библиотекам масс-спектральных данных или по характеру фрагментации предположить строение соединения.

Ключевые моменты развития масс-спектрометрии





Масс-спектрометрия

Общие положения метода

Структурная масс-спектрометрия основана на разрушении органической молекулы под действием электронного удара и регистрации массы образующихся осколков

Наименьшая энергия бомбардирующих (ионизующих) электронов, при которой возможно образование из данной молекулы иона, называется энергией (потенциалом) ионизации вещества

Энергия ионизации является мерой прочности, с какой молекула удерживает наименее сильно связанный с ней электрон

$M + e \rightarrow M^{+\bullet} + 2e$

$M + e \rightarrow M^{+\bullet} + 2e$

Для органических молекул энергия ионизации составляет 9-12 эВ

Стандартные масс-спектры электронного удара (ЭУ) принято снимать, используя ионизирующие электроны с энергией 70эВ

Типы ионов

Положительные: - захват протона либо другого катиона (Na, K);
- потеря электрона (катион-радикал).
Отрицательные: - утрата протона;
- захват электрона.

Только заряженные частицы (в основном катионы) могут ускоряться и фокусироваться электромагнитными полями, поэтому приёмник регистрирует только ионы. Незаряженные **радикалы не регистрируются**!!

Общая схема масс-спектрометра

Источник ионов → **Система разделения ионов** → **Детектор**

EI
CI
FAB
MALDI
ESI
Наноспрей

Времяпролетные (TOF)
Квадрупольные (Q)
Ионные ловушки (IT)
Ионно-циклотронного резонанса (ICR-FT)

Микроканальные пластины (MCP)
Диноды
Магнит (ICR-FT)

Общие положения метода

Образующийся в результате потери одного электрона катион-радикал называется молекулярным ионом

Фрагментация - распад молекулярного иона на частицы меньшей массы

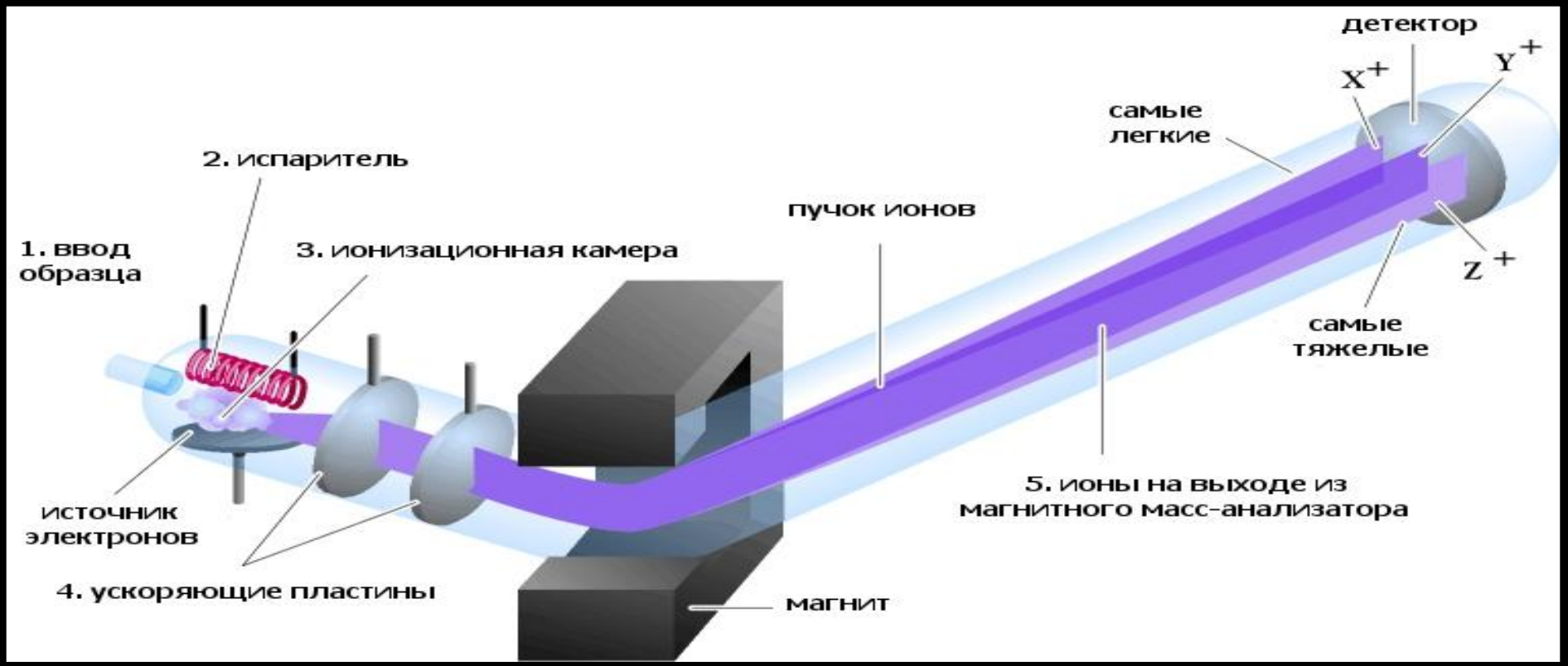
Фрагментация молекулярного иона приводит:

1) к образованию других ион-радикалов
2) к образованию нейтральных молекул
3) к внутримолекулярным перегруппировкам

Чаще всего масс-спектрометрия используется для решения двух задач:

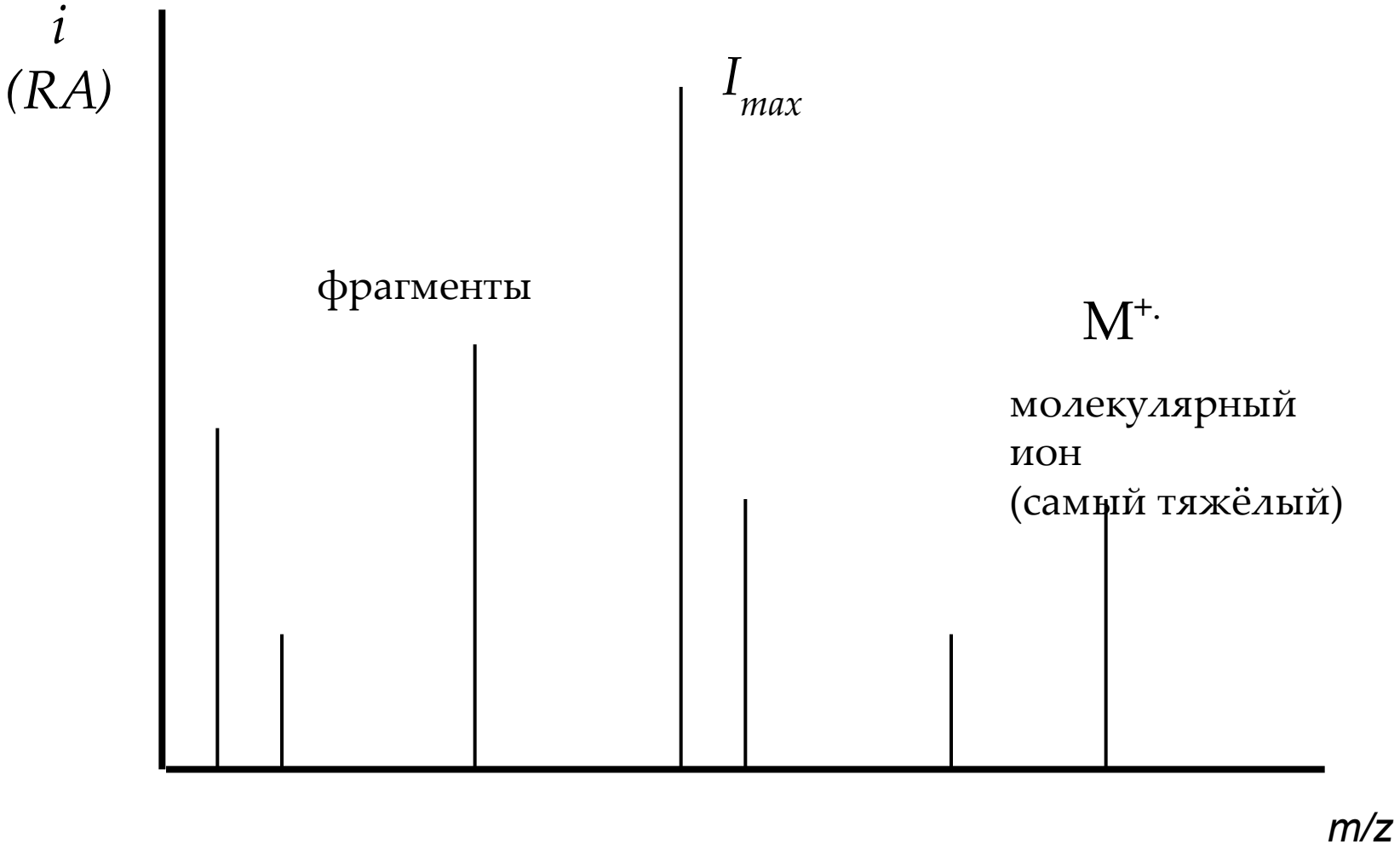
определение молекулярной массы → **идентификация молекулярного иона**

исследование строения молекулы → **распад молекулярного иона и анализ образующихся фрагментов**



1. Образец попадает в прибор через систему газового напуска либо прямого введения (шприц).
2. Вещество переводится в газообразное состояние и подается в ионизационную камеру.
3. Пары вещества сталкиваются с перпендикулярным потоком электронов, в результате чего происходит ионизация.
4. Образовавшиеся катионы ускоряются заряженными пластинами и попадают в магнитный масс-анализатор.
5. За счет различной массы однозарядные ионы приобретают различную траекторию, что позволяет получить масс-спектр.

Общий вид масс-спектра



Relative Abundance , $RA = \frac{I}{I_{max}} \times 100\%$

Масс-спектрометры

Thermo Fisher Scientific nano-UPLC
ESI LTQ-Orbitrap MS system

ABI ESI QSTAR Elite
MS System

ABI nano-UPLC ESI
QTRAP-4000 MS system

ABI API QTRAP 5500

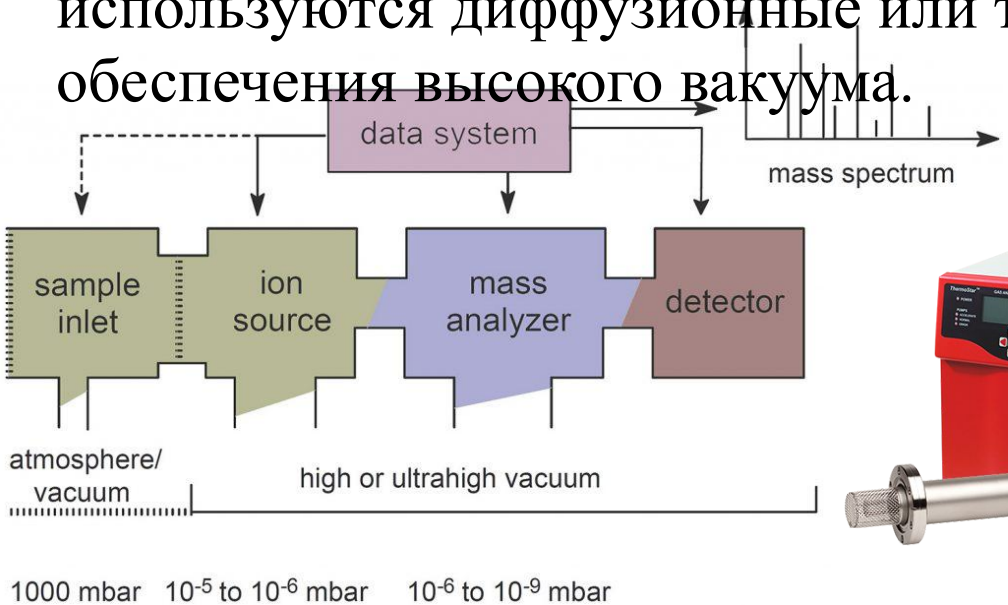
ABI 4800 MALDI
TOF/TOF Tandem MS
System

Bruker APEX 9.4 Tesla
ESI FT-ICR MS System

Waters CapLC-ESI
QTOF Micro MS System

Масс-спектрометрия проводится в вакууме!

- Все масс-спектрометры работают при очень низком давлении (высоком вакууме), чтобы уменьшить вероятность столкновения ионов с другими молекулами. Столкновения заставляют ионы реагировать, рассеиваться или фрагментироваться. Эти процессы будут мешать получению спектра.
- Эксперименты проводятся в условиях высокого вакуума (от 10^{-2} до 10^{-6} Па).
- Требуется две стадии вакуумирования: механический насос - обеспечивает грубый вакуум ~ 0,1 Па; на второй стадии используются диффузионные или турбомолекулярные насосы для обеспечения высокого вакуума.



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)

Твѐрдая 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

Ионизация электронным ударом

- **Электронный удар**, или, правильнее – 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^+, а также, в зависимости от энергии ионизирующих электронов, к разрыву связей в ионизируемой молекуле – к ее фрагментации.

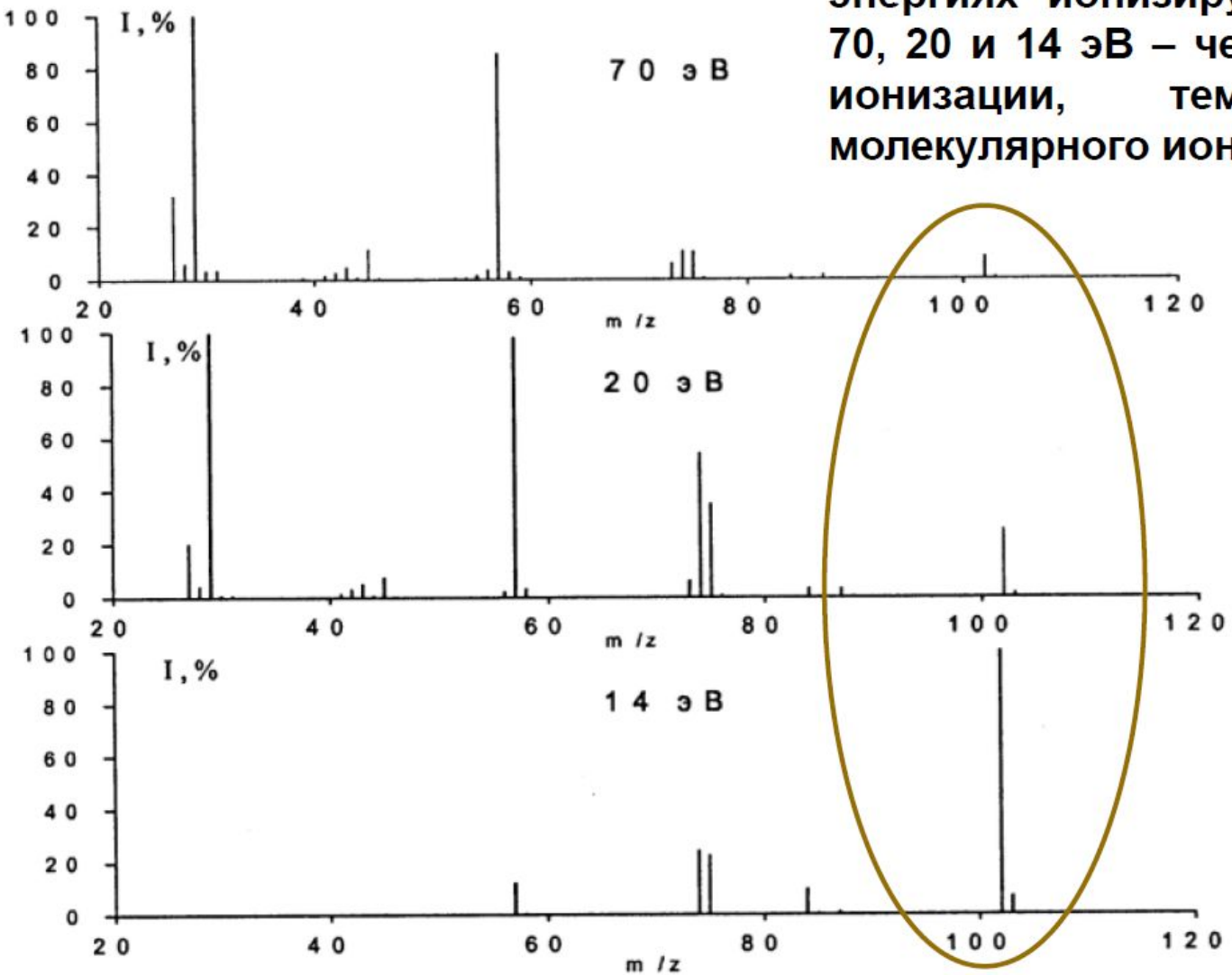
Эффективность ионизации зависит от энергии ионизирующих электронов, максимум эффективности достигается при энергии примерно в 70 эВ

Рис. Зависимость величины ионного тока от энергии ионизирующих электронов

Схема ионизации электронным ударом

Электронная ионизация

Масс-спектр электронного удара этилпропионата CH_3-CH_2-C(=O)-O-CH_2-CH_3 (молекулярная масса 102) при энергиях ионизирующих электронов 70, 20 и 14 эВ – чем меньше энергия ионизации, тем выше пик молекулярного иона



Ионизация электронным ударом

- Энергия в 70 эВ (6754 кДж/моль) для ионизирующих электронов принята за стандарт, приборы, выпускаемые промышленностью, как правило, имеют именно эту величину энергии ионизации.
- Также базы данных масс-спектров содержат спектры, записанные на приборах с электронной ионизацией образца и энергией ионизации в 70 эВ.
- Масс-спектры в научных изданиях (журналах, монографиях, сборниках трудов конференций) приводятся, как правило, именно с энергией ионизации образца в 70 эВ (исключения редки).

Ионизация электронным ударом

ПРЕИМУЩЕСТВА ЭЛЕКТРОННОЙ ИОНИЗАЦИИ

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 дальнейших превращений иона.
3. Невозможность работы с образцами, которые нельзя перевести в пары (биомолекулы, синтетические полимеры).

Химическая ионизация (CI, Chemical Ionization)

Химическая ионизация – второй по распространенности метод ионизации в настоящее время. Суть метода заключается в том, что ионизация образца происходит не пучком электронов, как в случае электронной ионизации, а 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. На примере метана:

$$CH_4 \rightarrow CH_4^{+\cdot}$$

$$CH_4^{+\cdot} + CH_4 \rightarrow CH_5^{+} + CH_3^{\cdot}$$

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

$$M + CH_5^{+} \rightarrow MH^{+} + CH_4$$

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.

Недостатки:

1. Отсутствие фрагментации, 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 (ESI, Electro Spray Ionization)

- *Электроспрей* (электрораспыление) – метод ионизации, суть которого заключается в следующем – 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:

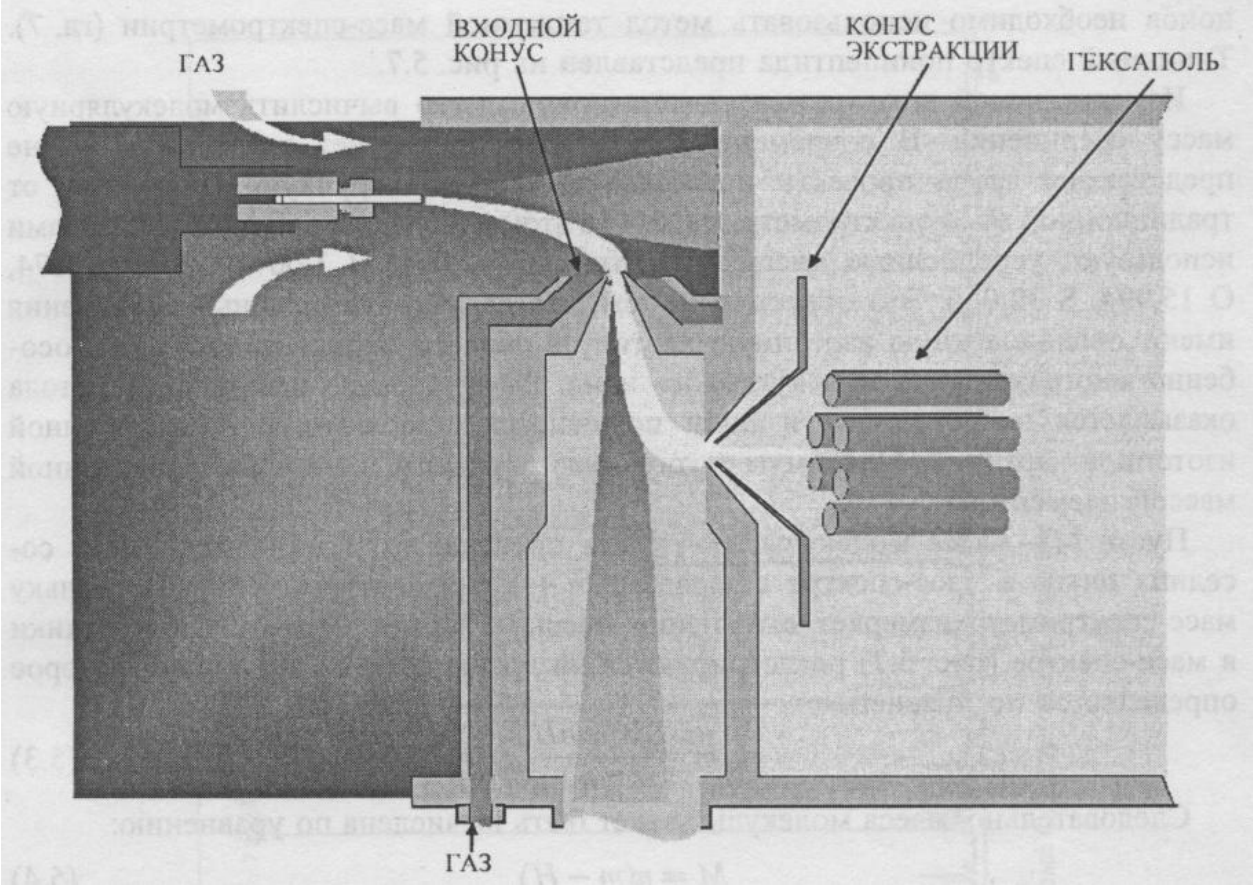
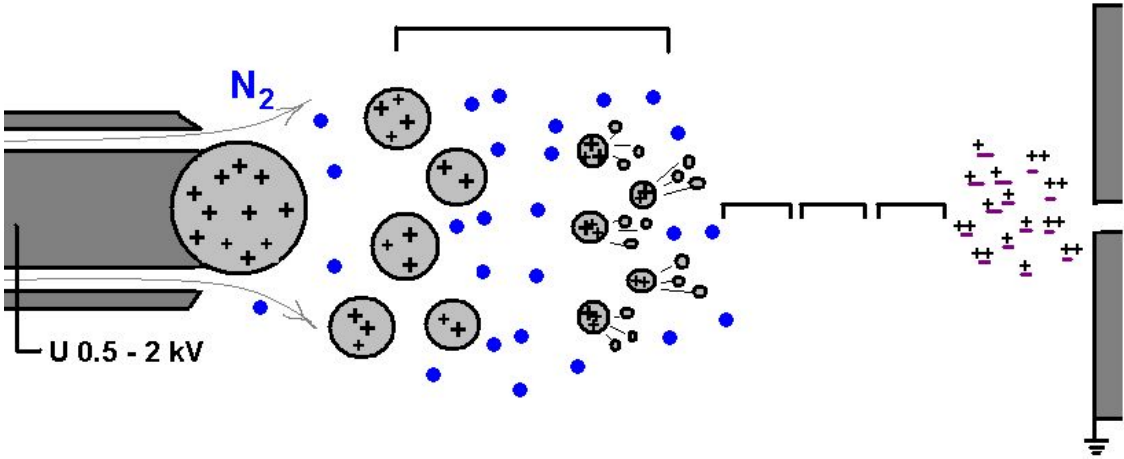


Рис. Z-образная геометрия движения потока образца в источнике ионов, работающем по принципу электрораспыления.

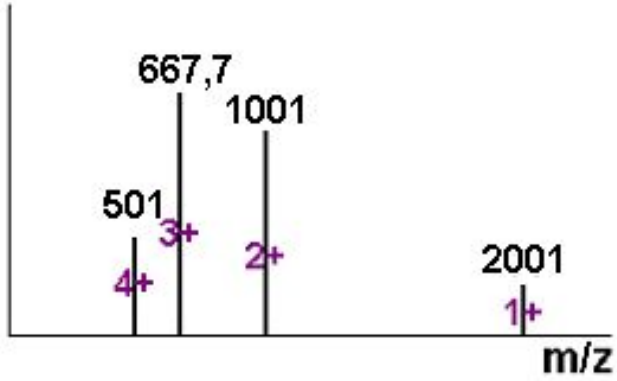
ESI – электрораспыление и ионизация

Анализируемое вещество подается в растворе через капилляр с поданым на него напряжением.

несколько последовательных «упариваний-взрывов» микрокапель

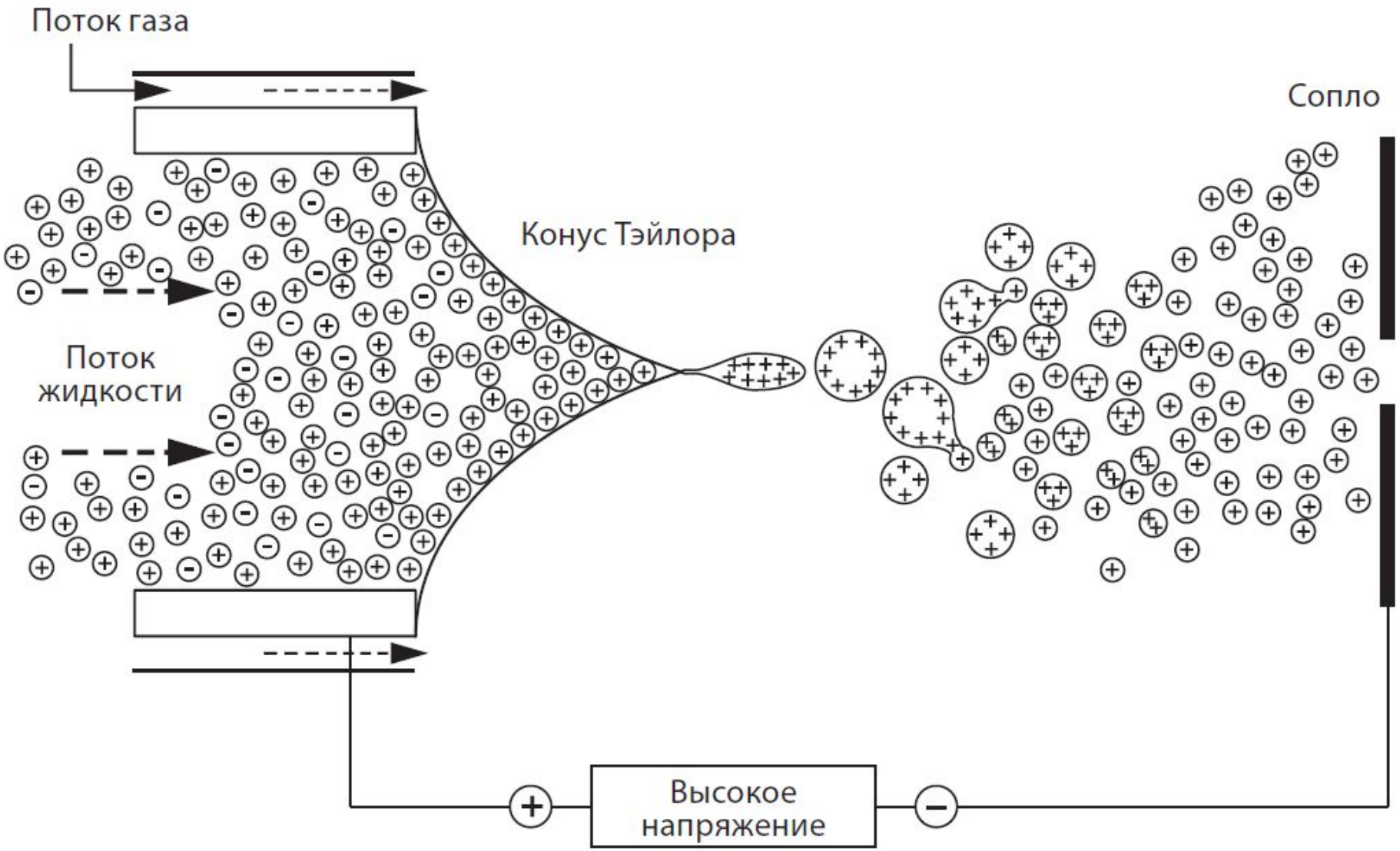


Растворители:
вода, ацетонитрил, метанол



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

Схема электрораспылительного источника ионов



Электроспрей (ESI, Electro Spray Ionization)

Достоинства:

1. Возможность работать с веществами, которые нельзя перевести в газовую фазу
2. Метод практически идеально подходит для стыковки масс-спектрометра и жидкостного хроматографа
3. Возможность анализа крупных (до нескольких миллионов дальтон) молекул
4. Мягкое (низкоэнергетическое) ионизационное воздействие

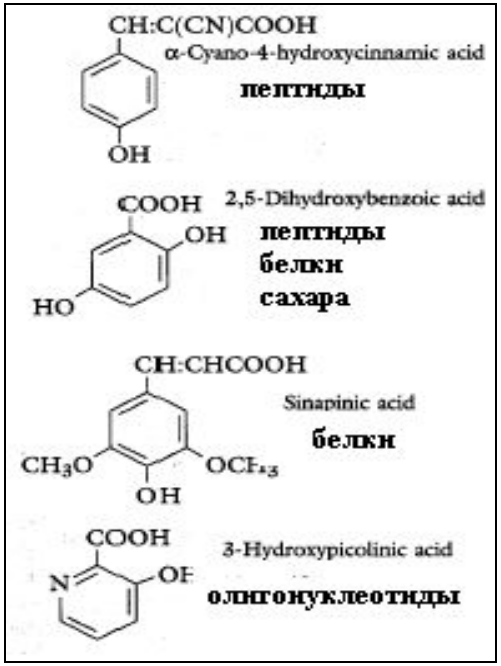
Недостатки:

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

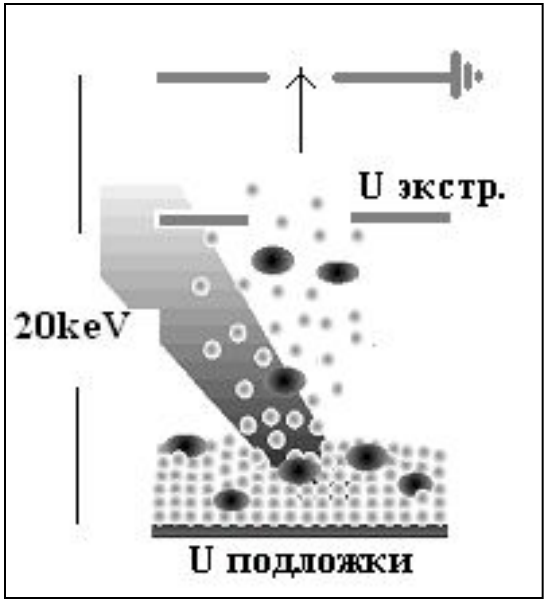
MALDI - matrix assisted laser desorption / ionization

лазерная десорбция и ионизация в присутствии вспомогательного вещества - матрицы

Матрицы для УФ лазера (336нм)



Анализируемое вещество (раствор 10^{-4} -10^{-8} М, <1 мкл) смешивается с матрицей (раствор 10^{-1} -10^{-2} М, <1 мкл), высушивается на подложке, образуя кристаллоиды



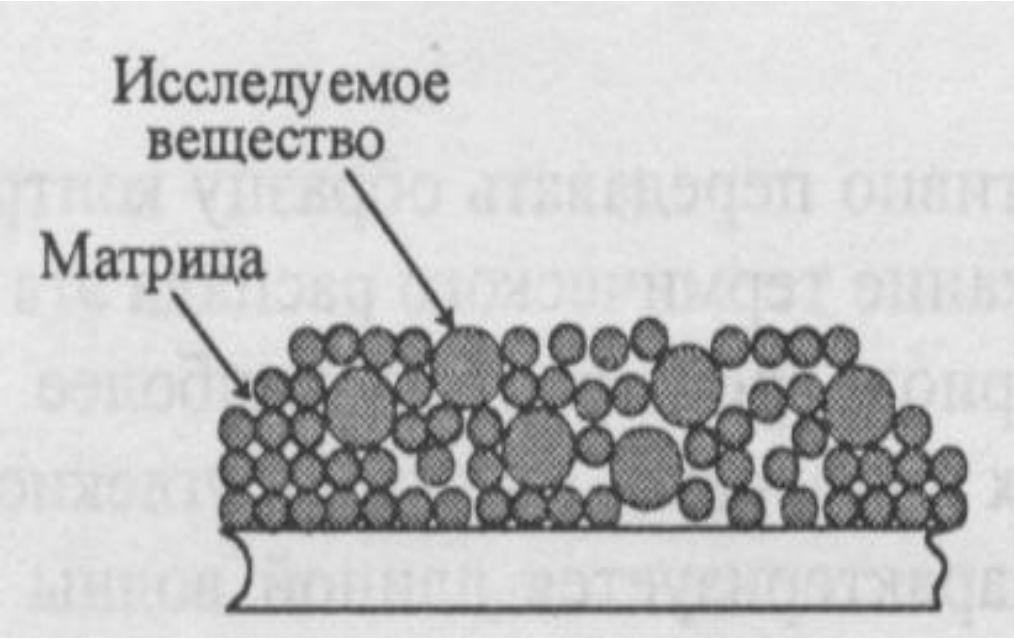
МАТРИЦА:

* Поглощает энергию лазерного излучения, “вскипая”, увлекает в газовую фазу молекулы анализируемого вещества
* Способствует ионизации

Лазер: 2 нс, 50-300 мкДж/имп , 50 мкм

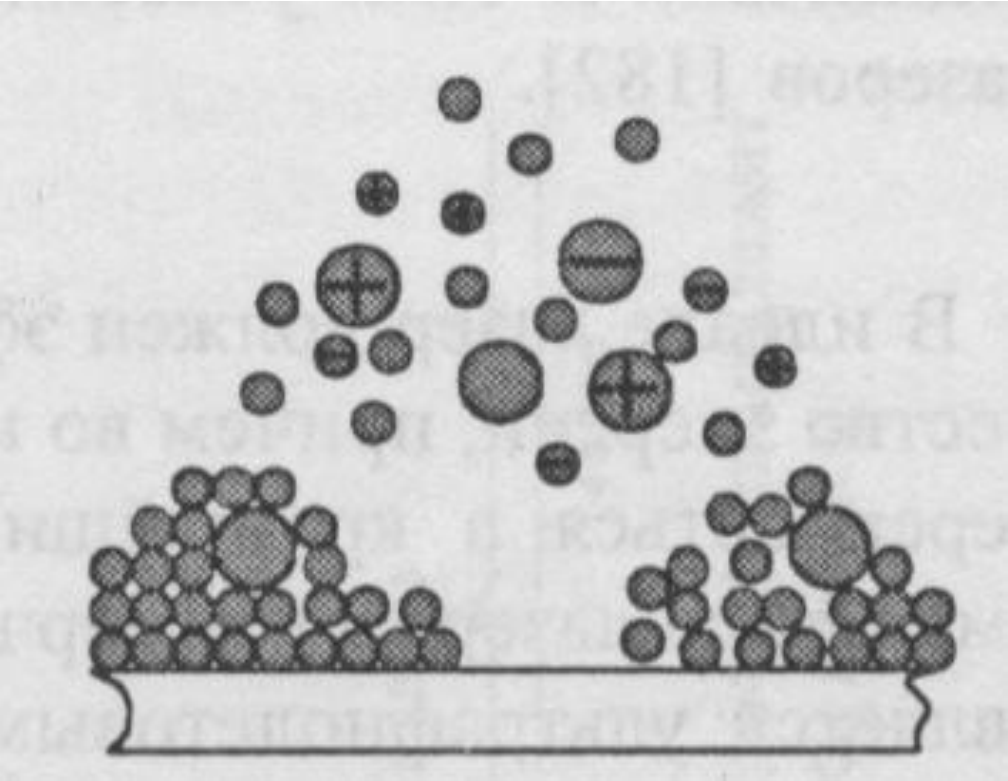
Лазерная десорбция (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

Матричная лазерная десорбция – метод, при котором исследуемое вещество помещают в «матрицу» - перемешивают с веществом, имеющим меньший молекулярный вес и отличающимся 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 подложка с матрицей помещается в ионный источник, где в качестве ионизатора выступает короткий импульс (0.1 нс…1 мкс) лазерного излучения (например, азотные лазеры с длиной волны 337 нм). Луч, попадая на подложку с матрицей, вызывает испарение вещества матрицы, молекулы которой ухватывают за собой молекулы исследуемого вещества. В процессе испарения часть молекул ионизируется и далее увлекается электрическим полем в сторону анализатора.



Лазерная десорбция (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

Достоинства:

1. Возможность анализа крупных молекул (массой до 100 000 дальтон и выше)
2. Мягкая ионизация образца

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

Замечания о ESI и MALDI:

* Оба метода ионизации требуют высокой химической чистоты анализируемого вещества.
* Диапазон концентрации аналита при ESI и MALDI 10^{-3} – 10^{-7} М.
* Поскольку разные вещества (например, пептиды) обладают разной способностью к ионизации (захвату протона либо другого катиона), то невозможно делать выводы о количественном соотношении компонентов сложной смеси на основании высот пиков в спектре.

ESI является более “мягким” способом ионизации, чем MALDI.

При ESI образуется непрерывный поток ионов,
при MALDI - сильно ограниченный во времени (до 10 нс) пакет ионов.

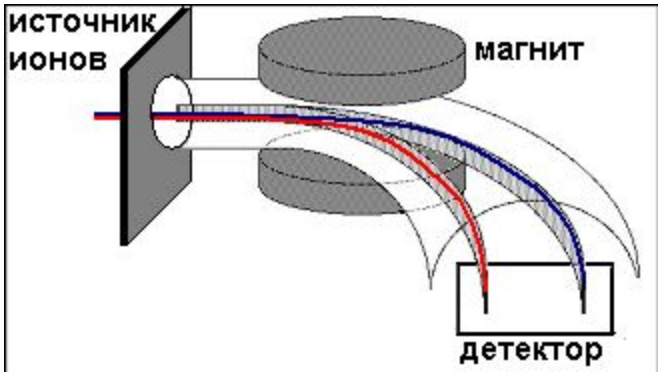
При ESI анализу подлежит более 10 фемтомолей вещества,
при MALDI - более 1 фемтомоля вещества.

При ESI образуются ионы *m/z* 0-5000,
возможно измерение белков до ~50 000 Да.
При MALDI возможно измерение белков до ~200 000 Да,
диапазон измеряемых масс ограничен снизу до ~500 Да
из-за присутствия в спектрах пиков матрицы.

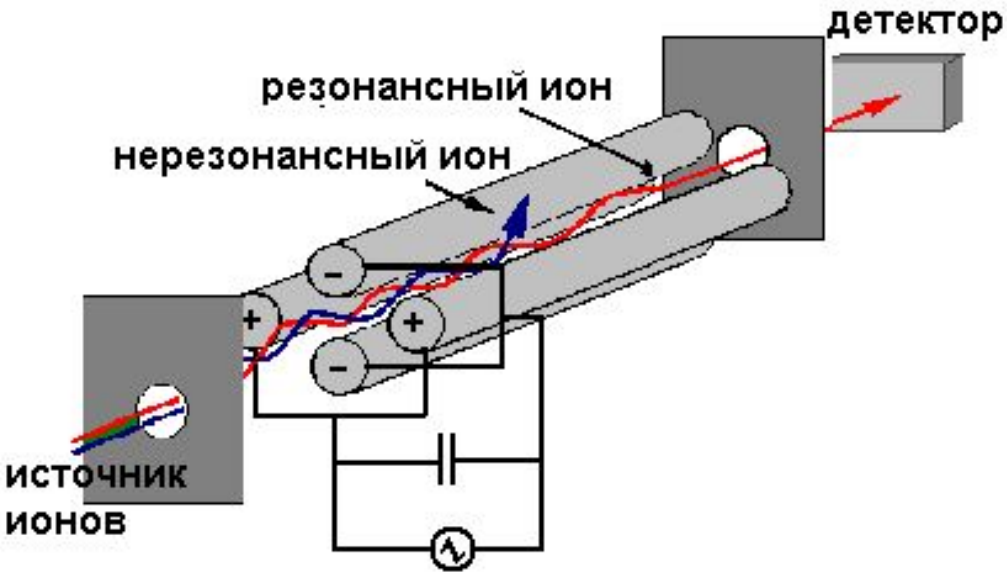
СИСТЕМЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ИОНОВ

Времяпролетный масс-анализатор

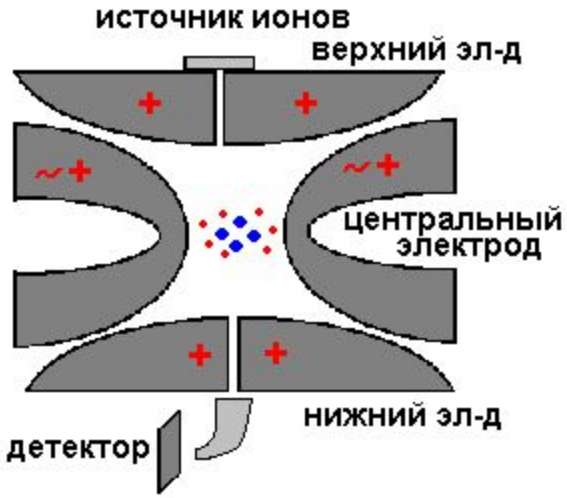
Магнитный анализатор



Квадрупольный анализатор

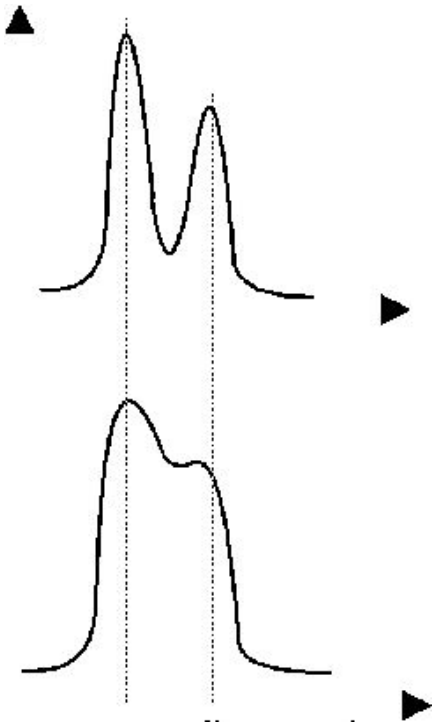


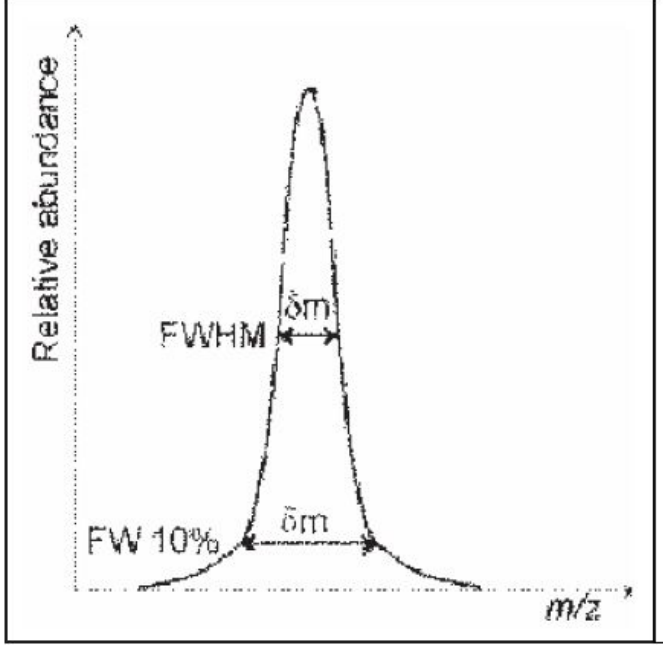
Ионная ловушка

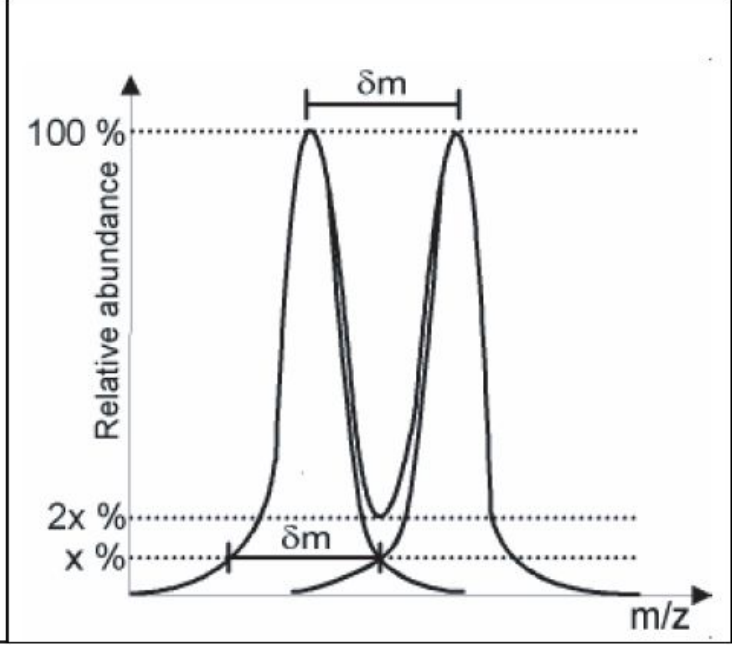


5 главных характеристик масс-анализатора

1. Лимит массы частицы
2. Скорость анализа
3. Пропускание (отношение количества ионов достигших детектора к числу ионов, поступивших в масс-анализатор
4. Точность, аккуратность (ppm)
5. Разрешение.





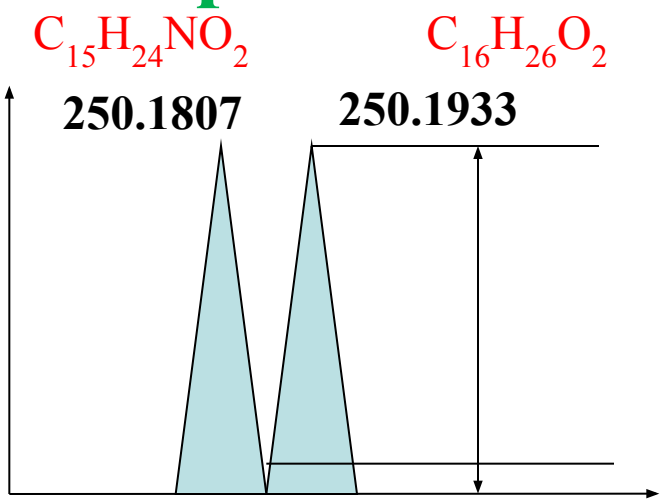


$R=m/\Delta m$

2 пика считаются разделенными, если ложбина между ними составляет 10% от пика с меньшей интенсивностью, если используется магнитный или циклотронный резонанс (ICR) и 50% когда используется квадрупольный, ионная ловушка, TOF и другие.

- Термины **Низкое разрешение** и **высокое разрешение** обычно используются для описания анализаторов, обладающих разрешающей способностью менее или более 10 000 (FWHM), соответственно.
- Полная ширина на уровне половинной амплитуды (англ. FWHM — full width at half maximum) — полная ширина, рассчитанная как разница между максимальным и минимальным значениями аргумента функции, взятыми на

Разрешение



Два близких пика с одинаковой интенсивностью

$$\frac{\text{высота}}{\text{ложбина}} < 10\%$$

$$R = \frac{250.1933}{250.1933-250.1807} = 20{,}000$$

Необходимые разрешающие способности для разделения пиков, имеющих массу, близкую к 400 а.е.м.

Δm	R
1	400
0.5	800
0.1	4 000
0.05	8 000
0.01	40 000
0.007	60 000

Масс-спектрометрия высокого разрешения

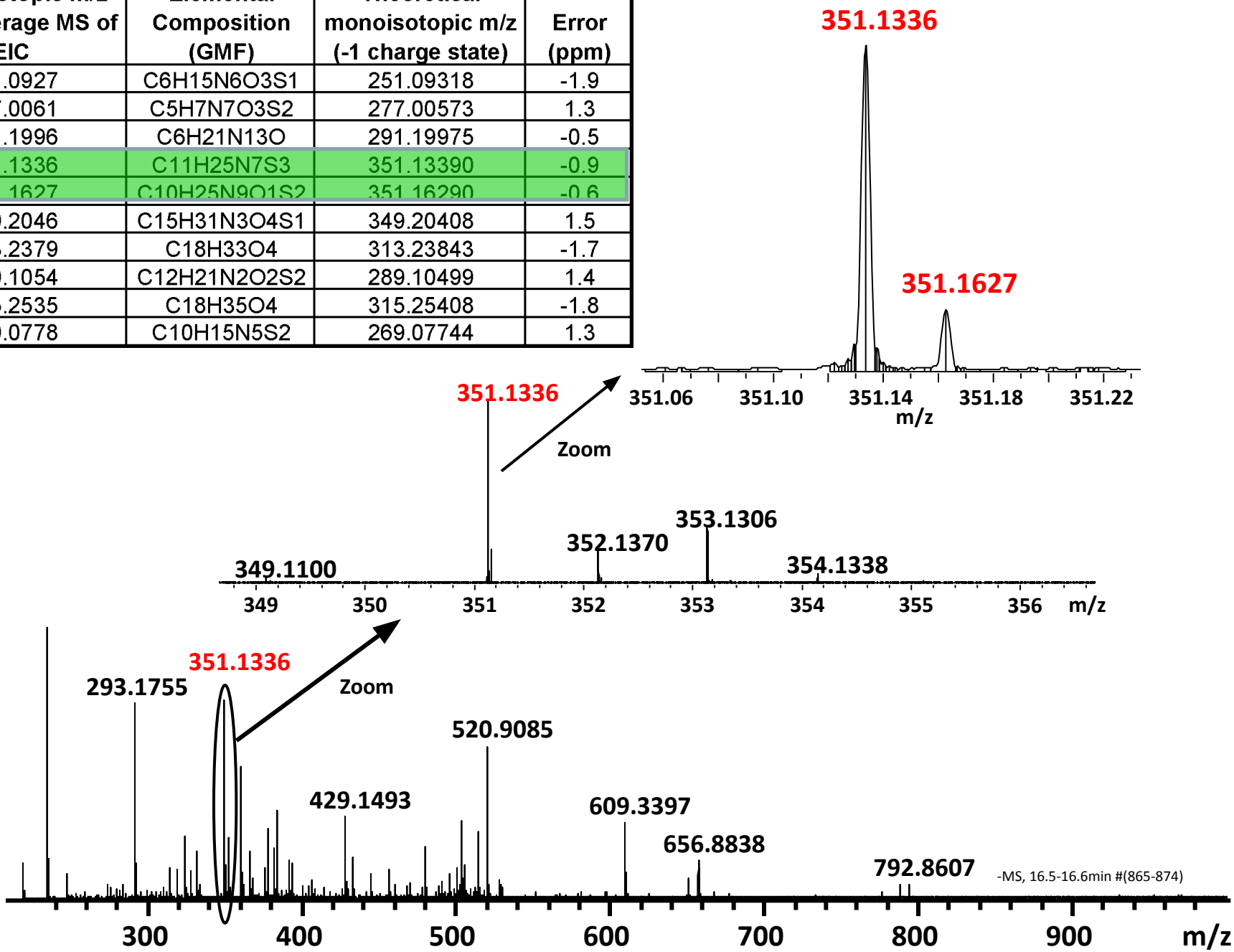
^{1}H 1,00782
^{14}N 14,0031
^{16}O 15,9949

CO 27,9949
C_2H_4 28,0313
N_2 28,0062

различимы на масс-спектрометрах высокого разрешения

Используют приборы с двойной фокусировкой.

Observed monoisotopic m/z from Average MS of EIC	Predicted Elemental Composition (GMF)	Theoretical monoisotopic m/z (-1 charge state)	Error (ppm)
251.0927	C6H15N6O3S1	251.09318	-1.9
277.0061	C5H7N7O3S2	277.00573	1.3
291.1996	C6H21N13O	291.19975	-0.5
351.1336	C11H25N7S3	351.13390	-0.9
351.1627	C10H25N9O1S2	351.16290	-0.6
349.2046	C15H31N3O4S1	349.20408	1.5
313.2379	C18H33O4	313.23843	-1.7
289.1054	C12H21N2O2S2	289.10499	1.4
315.2535	C18H35O4	315.25408	-1.8
269.0778	C10H15N5S2	269.07744	1.3



Магнитный анализатор

Исторически первый тип анализатора (Демпстер, 1918 г.). Физические основы действия – изменение траектории заряженной частицы под действием магнитного поля.

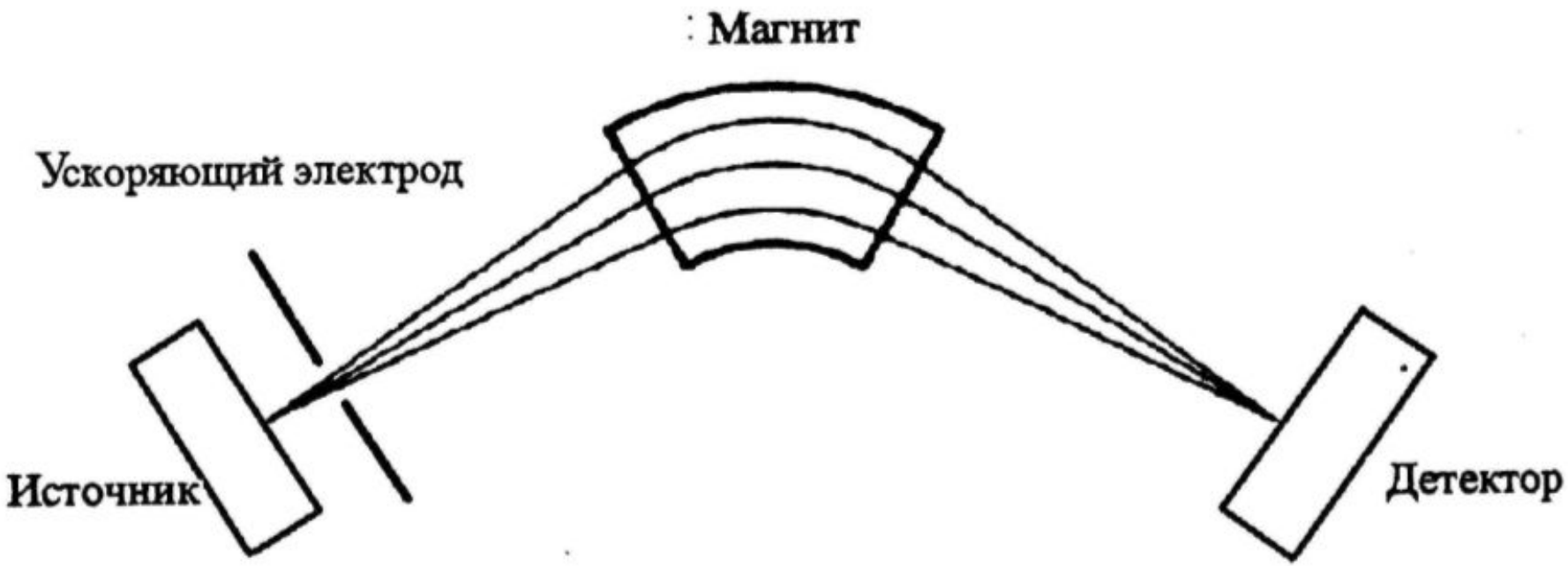
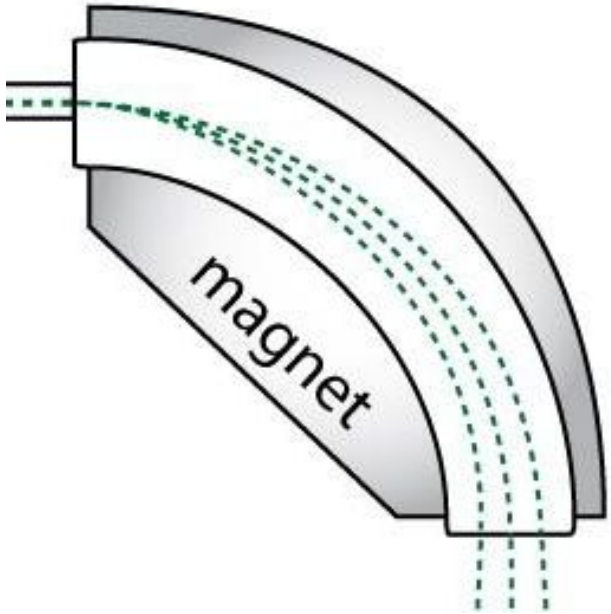


Рис. Схема масс-спектрометра с магнитным анализатором

Магнитный масс-анализатор

- Кинетическая энергия ионов определяется потенциалом ускоряющих пластин.
- Траекторию определяет сила Лоренца, зависящая от массы иона.



$$r = \frac{1}{B}\sqrt{2U\frac{m}{e}}$$

- Регистрируемой величиной в приборе является соотношение *m/z*. Производится также автоматический подсчёт числа ионов для каждого *m/z*.

Электрический (электростатический) анализатор

Электростатический анализатор по принципу действия примерно аналогичен магнитному, только роль магнитного поля у него выполняет электрическое поле (ионы движутся между двумя противоположно заряженными электродами), которое также может отклонять ионы тем или иным образом, причем ионы с разными массами будут отклоняться на разные углы (иметь другие траектории движения). Попадая в такой анализатор, ион движется по круговой орбите с радиусом R таким образом, чтобы сила электрического поля уравновешивалась центробежной силой:

$$mv^2 / R = zeV$$

Варьируя величину поля, возможно пропускать через анализатор ионы с разным значением масс, т.е. производить развертку масс-спектра.

Электрический (электростатический) анализатор

Как правило, этот вид анализатора применяется в дополнение к магнитному анализатору для обеспечения большего разрешения прибора (такие приборы называются «приборами с двойной фокусировкой») и для облегчения измерения точных масс, т.к. электрическое поле возможно варьировать более точно, чем магнитное.

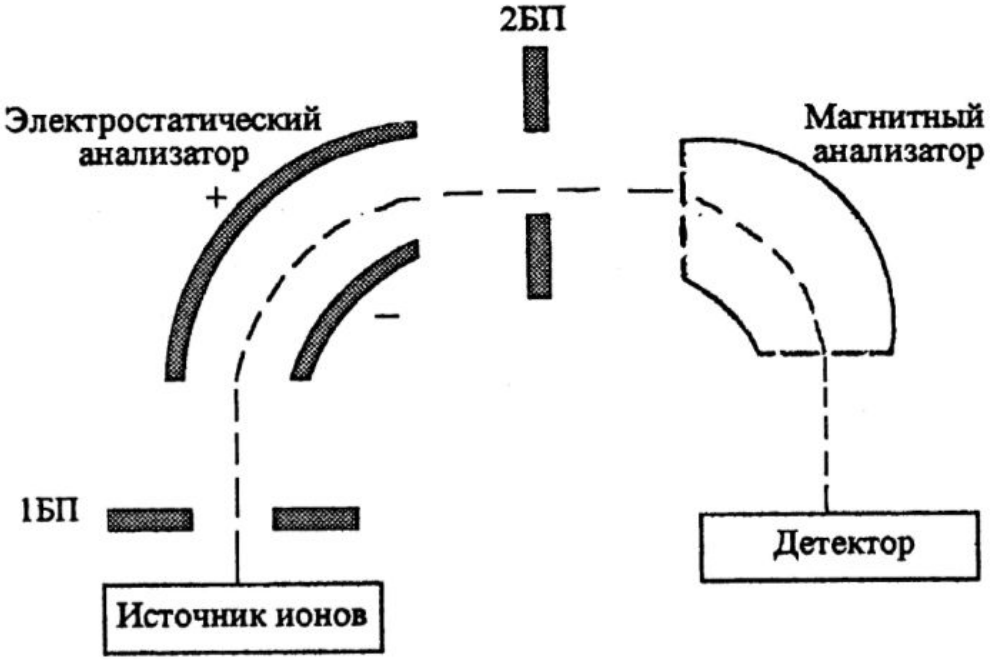


Рис. Схема масс-спектрометра с двойной фокусировкой ионов (БП – бесполевое пространство

Квадрупольный анализатор

Квадрупольный анализатор представляет собой систему из четырех стержней-электродов, к которым приложены высокочастотные переменное и постоянные напряжения, изменяющиеся во времени как U + V(cos ωt), противоположные стержни заряжены одинаково:

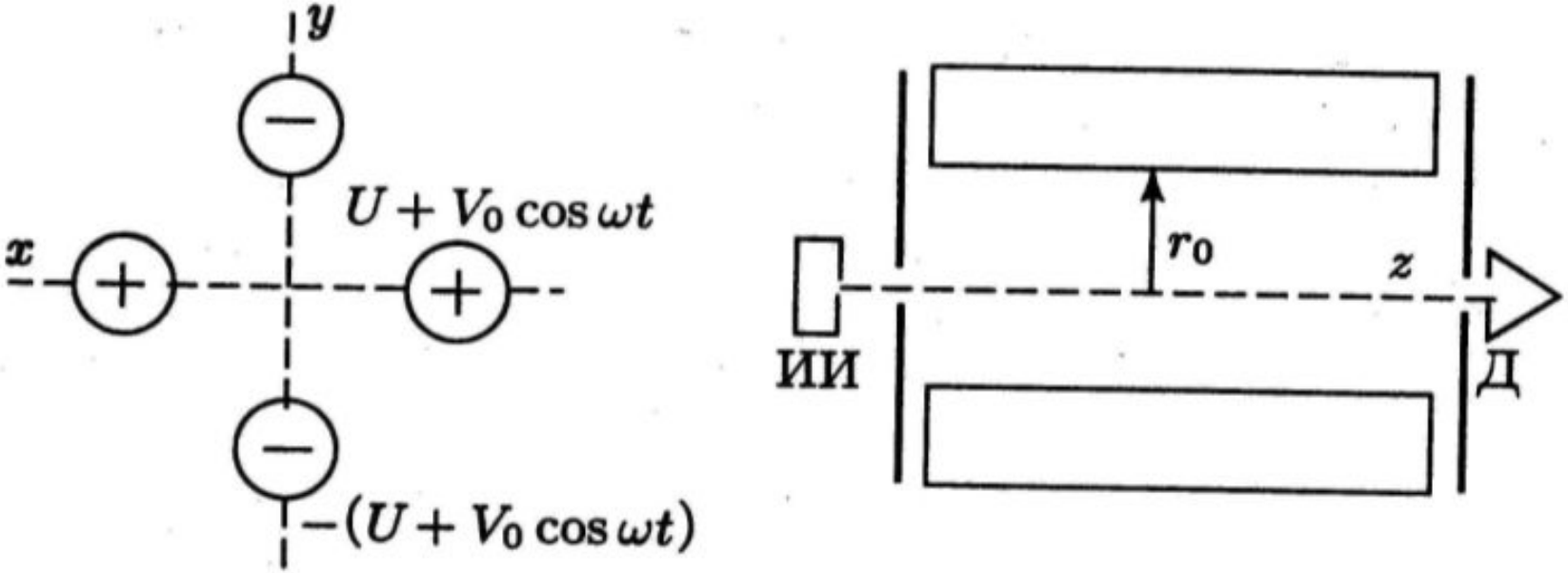
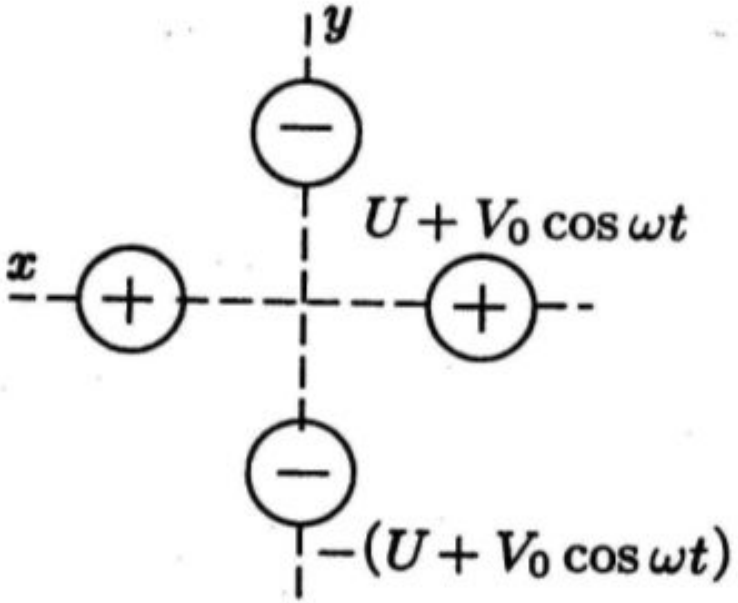
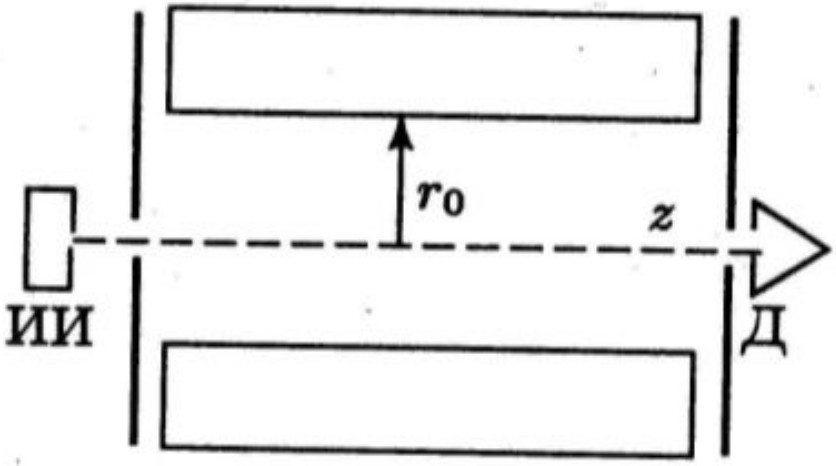


Рис. Квадрупольный анализатор, поперечный (слева) и продольный (справа) разрезы. Ионный пучок движется от источника ионов (ИИ) по направлению к детектору (Д).

Квадрупольный анализатор

Принцип работы анализатора состоит в том, что под действием постоянного и переменного электрических полей заряженные частицы с массой М испытывают стабильные колебания и могут пройти через квадрупольный фильтр (т.е. между электродами вдоль осевой линии) только при определенных значениях постоянного и переменного напряжения на электродах. Частицы с другими массами при этом движутся слишком далеко от главной оси системы и, сталкиваясь со стержнями, выбывают из потока. Меняя напряжения на стержнях, возможно производить развертку масс-спектра.





Квадрупольный анализатор (Q)

- Квадруполь легко управляется компьютером
- Имеет хороший динамический диапазон
- Стыкуется со всеми системами ввода
- Способен без модифицирования разделять и положительные, и отрицательные ионы
- Быстрота сканирования (полный спектр за 5 секунд)
- Небольшие размеры
- Дешевизна
- Возможность работы при повышенном (до 5 х $10^{\sim 5}$ мм рт.ст.) давлении

Времяпролетный анализатор (TOF, Time Of Flight)

Времяпролетный анализатор масс основан на простом принципе – скорость разогнанных ионов обратно пропорциональна их массам:

$$eV = mv^2 / 2 \quad \text{или} \quad m = 2eV / v^2$$

где V – ускоряющее напряжение. Если ионы движутся в полой трубе, где **отсутствует** электрическое поле, то детектора они достигают в порядке увеличения своей массы.

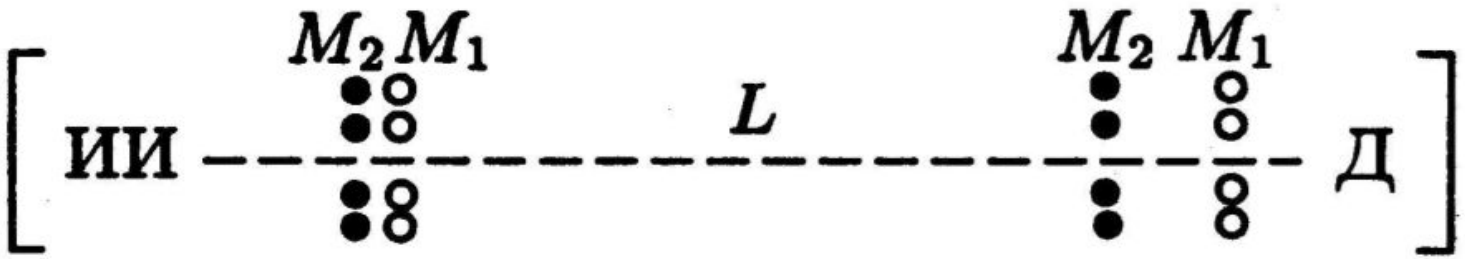
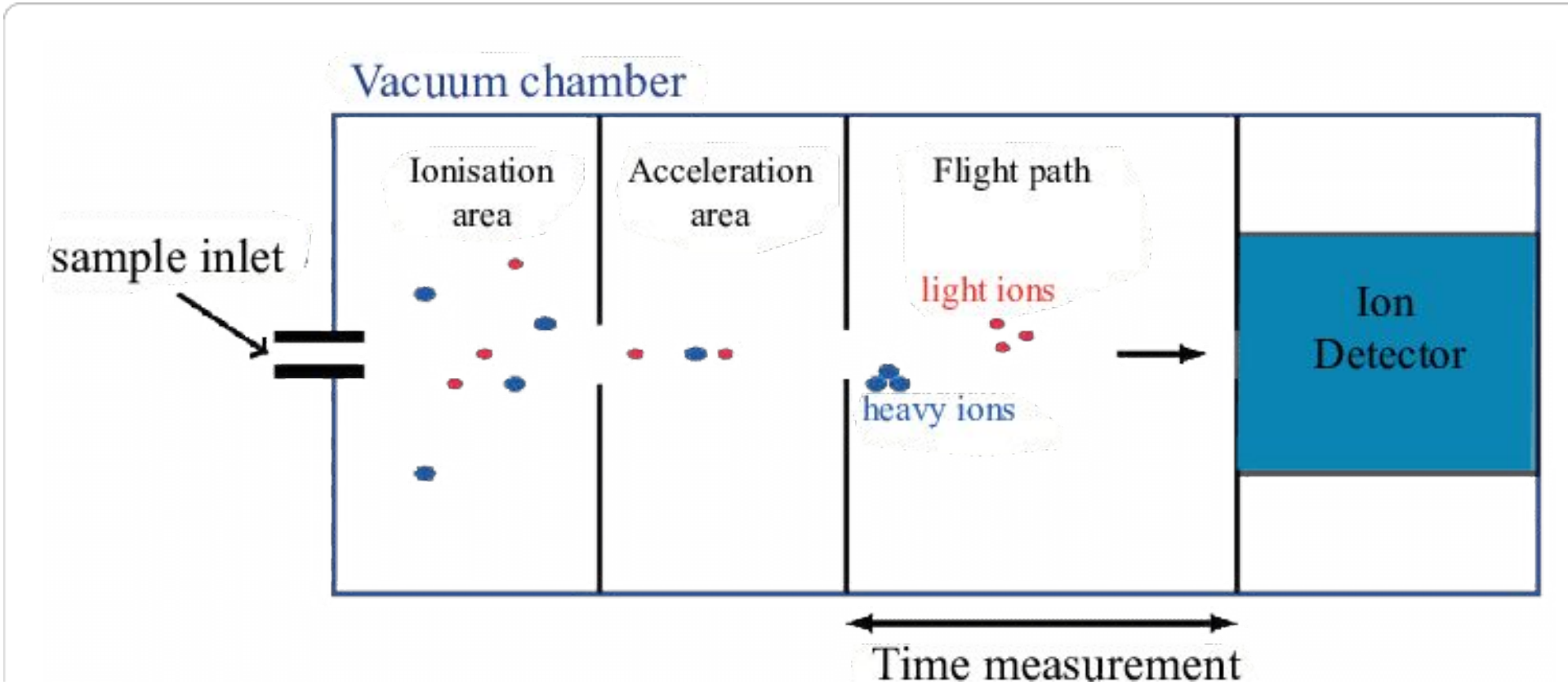


Рис. Схема принципа действия времяпролетного масс-спектрометра, показано разделение ионов с массой M_1 и M_2 на пути от ионного источника (ИИ) до детектора (Д)

Времяпролетный анализатор (TOF, Time Of Flight)



Времяпролетный анализатор (TOF)

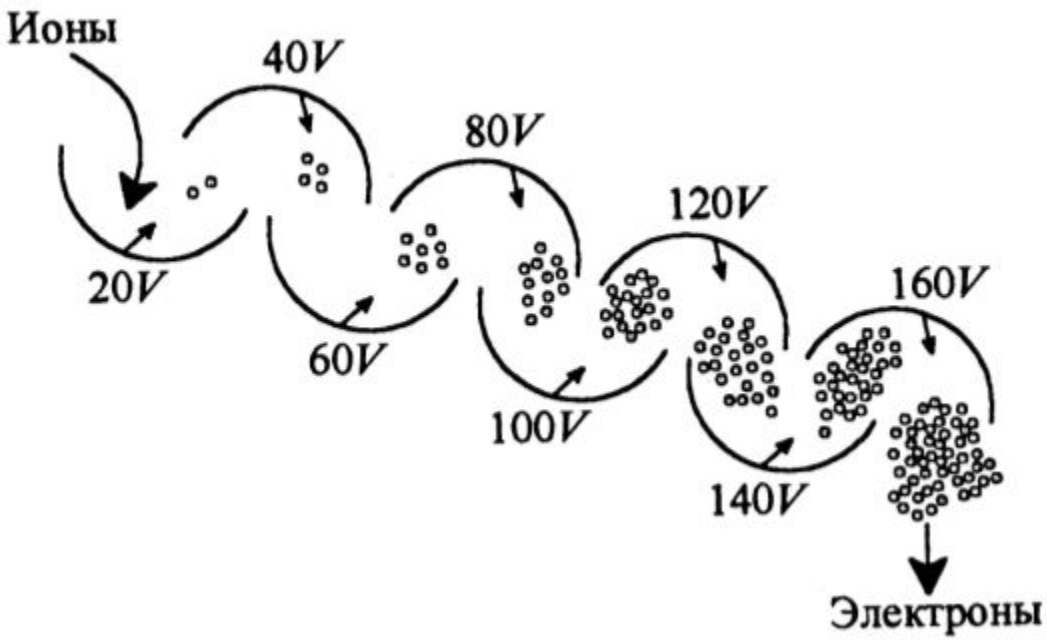
- имеет более высокую чувствительность по сравнению со сканирующими приборами;
- имеет очень высокую скорость записи спектра (несколько сот спектров в секунду);
- имеет практически неограниченный диапазон масс;
- имеет разрешающую способность более 10000;
- может работать с самыми разнообразными источниками ионов;
- является идеальным вторым анализатором для работы в режиме тандемной масс-спектрометрии;
- относительно небольшие размеры.

Детекторы

- Электрометр (коллектор ионов)
- Вторично-электронный умножитель (ВЭУ)
- Канальный ВЭУ
- Микроканальная пластина MCP
- ВЭУ с конверсионным динодом

Детектирование ионов – электронный умножитель

Схема действия электронного умножителя (ЭУ):



Электронный умножитель масс-спектрометра Thermo Electron DFS:

Электронный умножитель (ЭУ) - электронное устройство для усиления потока электронов на основе вторичной электронной эмиссии.

В ЭУ на дискретных динодах представляют собой трубку (канал) из стекла с высоким содержанием свинца либо из керамики — прямую или изогнутую. К трубке прикладывают напряжение и в результате в её полости возникает электростатическое поле. Под действием этого поля попавшие в канал электроны ускоряются и, соударяясь со стенками, вызывают вторичную электронную эмиссию.

Интерпретация масс-спектров

С чего начинать процесс расшифровки?

1. Информация об образце
2. Спектральная база данных
3. Анализ вида спектра:
   - Параметры съемки
   - Наиболее интенсивные пики
   - Характерные группы пиков
4. Установить молекулярный ион

- Если спектр характеризуется большим числом фрагментов, пики которых имеют все большую интенсивность при движении вниз по шкале масс, скорее всего это алифатическое соединение

- Редкие интенсивные пики характерны для ароматических структур

Определение молекулярного иона

Необходимые условия, которым должен удовлетворять молекулярный ион:

1. Иметь самую большую молекулярную массу в спектре
2. Быть нечетноэлектронным (определение ненасыщенности)
3. Быть способным образовывать важнейшие ионы с большой массой за счет выброса нейтральных частиц
4. Включать все элементы, наличие которых в образце можно увидеть по фрагментным ионам

Азотное правило: если в молекуле содержится нечетное число атомов азота, то молекулярный ион имеет нечетную массу.

 если масса молекулярного иона четная, то скорее всего в молекуле нет атомов азота (либо их два).

Расчет ненасыщенности

Степень ненасыщенности R (число кратных связей и циклов в ионе):

Формула: **U=(2C+2+N-X-H)/2**

C-количество атомов углерода

N- количество атомов азота

X- количество атомов галогена

H- количество атомов водорода

U – целое число, то ион нечетноэлектронный, U – дробь, ион четноэлектронный

Если ненасыщенный, при этом нечетноэлектронный, то может быть молекулярным ионом

Определение молекулярного иона

Обычно молекулярный ион легко отщепляет:

- Молекулы CO, CO_2, H_2O, C_2H_4, HHal
- Радикалы Alk$^{\cdot}$, H$^{\cdot}$, Hal$^{\cdot}$, OH$^{\cdot}$

Потери из молекулярного иона от 5 до 14 или от 21 до 25 а.е.м., приводящие к возникновению интенсивных пиков ионов, крайне маловероятны

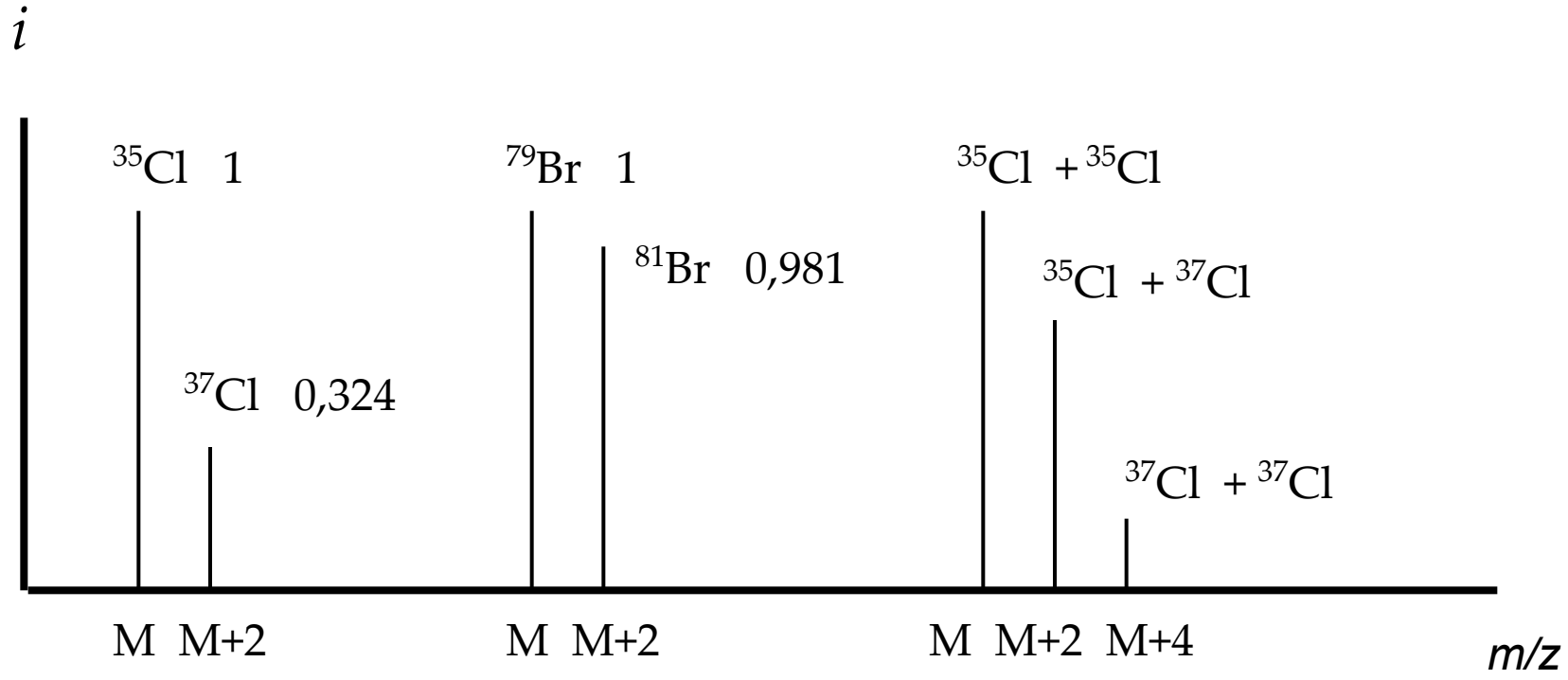
Например: в масс-спектре самый тяжелый ион 120, следующий за ним – 112.

Вывод: ион 120 – не молекулярный, а фрагментный

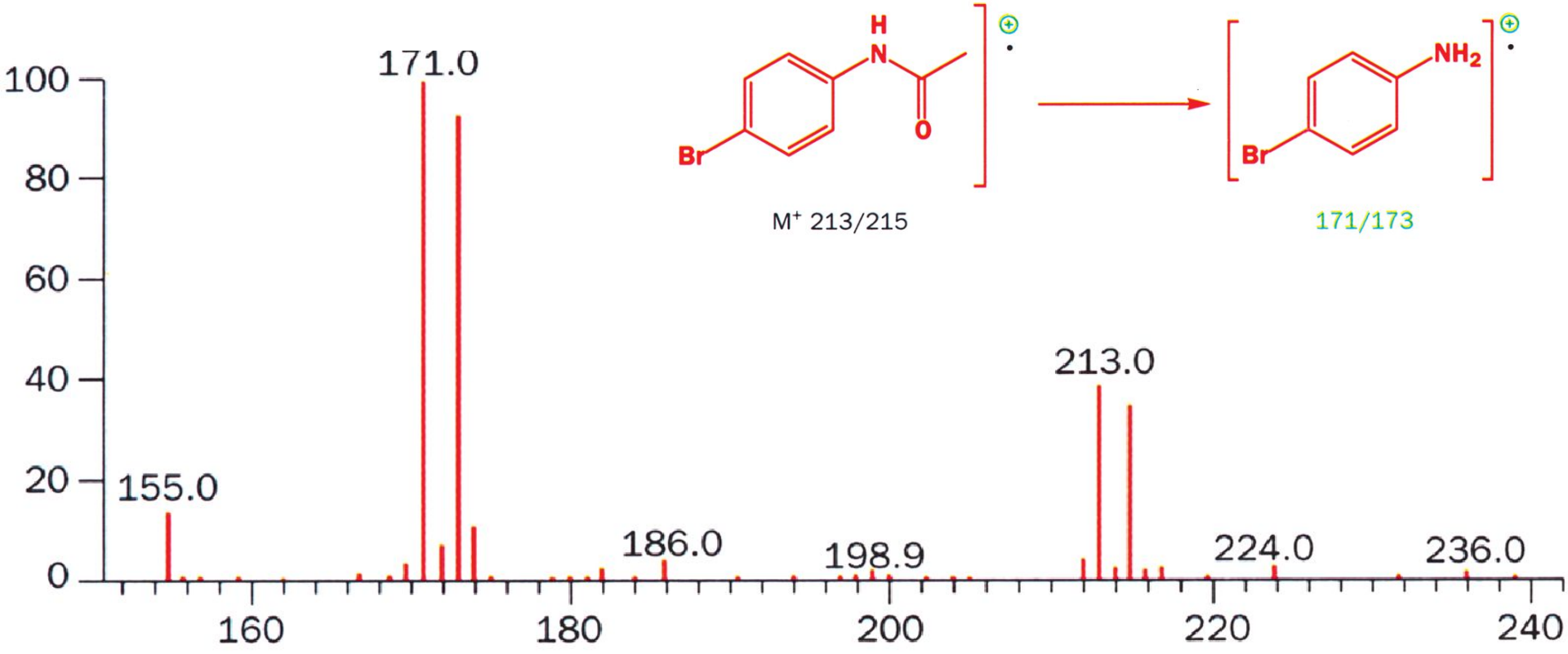
Интерпретация спектра

Изотопные рисунки

Наличие галогенов в молекуле определяется по характерным рисункам в спектре, которые проявляются за счет того, что распространенность тяжелых изотопов хлора и брома достаточно высока.



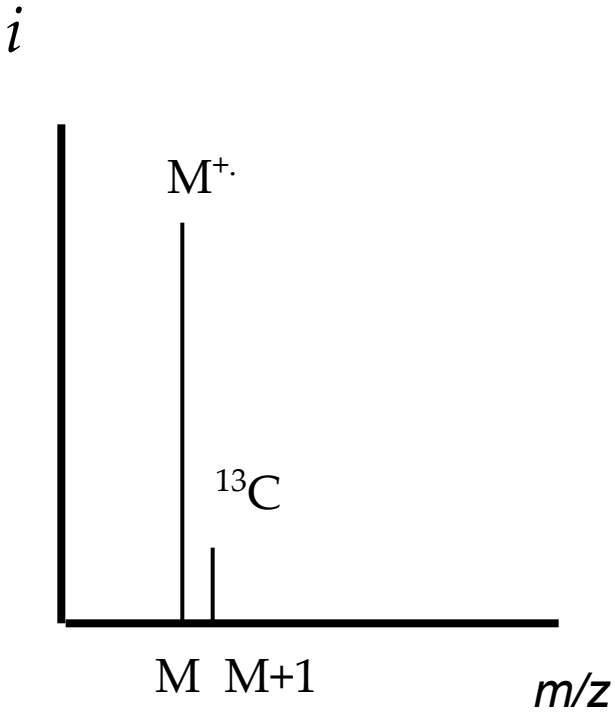
- В масс-спектре N-(*п*-бромфенил)ацетамида с ионизацией электронным ударом наблюдаются два пика 213 и 215 примерно одинаковой интенсивности. Два пика осколочных ионов (171/173) имеют совершенно тот же вид. Почему в спектре наблюдаются пары сигналов 213/215 и 171/173?



Интерпретация спектра

Изотопы углерода

Практически каждый пик в спектре сопровождают более мелкие изотопные пики углерода. По соотношению основного пика и изотопного можно вычислить соответствующее число атомов углерода.



$$\text{Relative Abundance, RA} = \frac{I}{{}^{12}C} \times 100\% = 0{,}011$$

в общем

$$\text{Relative Abundance, RA} = \frac{I}{{}^{12}C} \times 100\% = 0{,}011n$$

в молекуле
(n – число атомов C)

Определение числа атомов углерода по структуре пика молекулярного иона

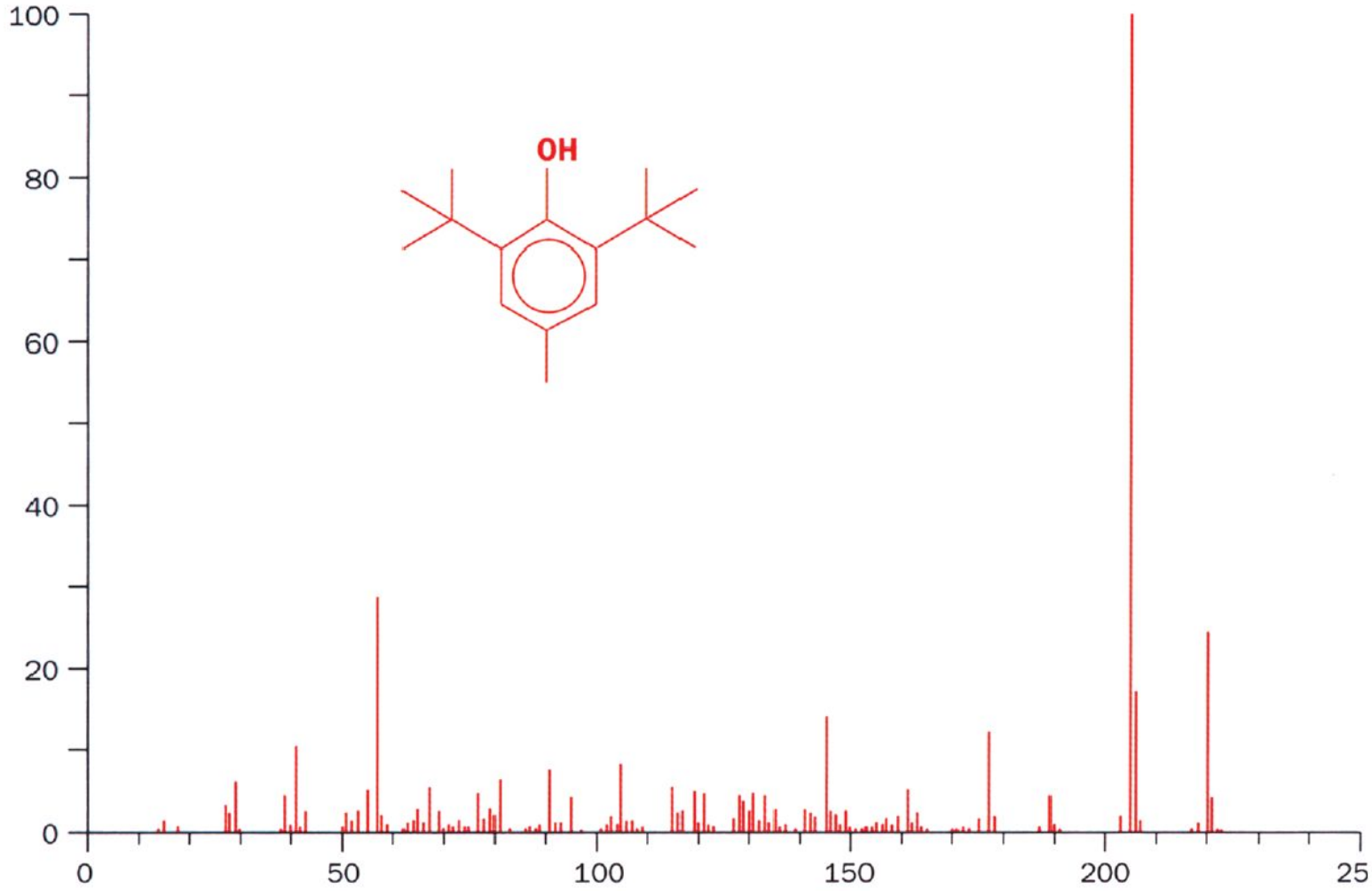
- Для определения числа атомов углерода в молекуле по масс-спектру необходимо разделить интенсивность пика M+1 в процентах от M на 1.1. Полученное число означает максимально возможное число атомов углерода в молекуле.
- Большое количество атомов углерода в молекуле приводит к увеличению вероятности одновременного присутствия в молекуле 2 или большего числа атомов ^{13}C, что вызывает рост интенсивностей пиков изотопных ионов [M+2], [M+3] и т.д.
- Для каждого атома другого элемента, присутствующего в ионе, необходимо увеличить интенсивность пика A+1 на 0.37% (для азота), на 0.04% (для кислорода), на 0.8% (для серы).

Пример: M+ пик 78 и M+1 79 с интенсивностью 7% :

#C x 1.1 = 7%

#C = 7%/1.1 = ~6 Вывод: молекула содержит 6 атомов углерода

- BHT – вещество, которое добавляют в пищевые продукты для защиты витаминов A и E от окисления. Ему присвоен E-индекс 321. Оно используется, например, в жевательных резинках. На масс-спектре вещества есть пик молекулярного иона с массой 220 и интенсивностью 24%. Рассчитайте ожидаемую интенсивность изотопного пика ^{13}C.



Основные правила и подходы к интерпретации масс-спектров

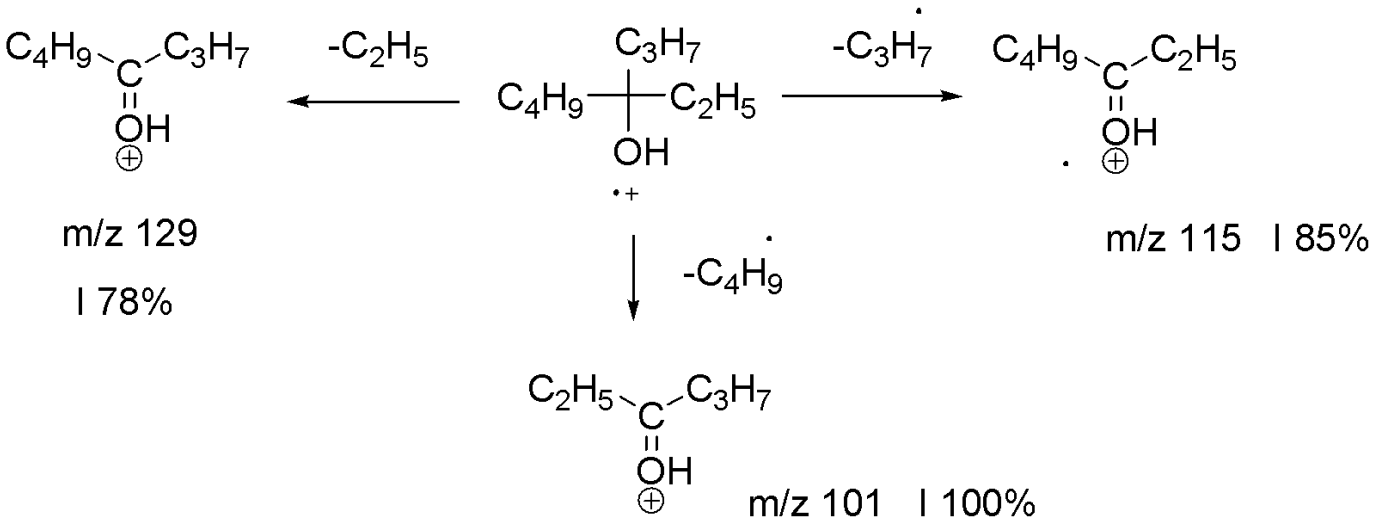
Наиболее признанные качественные теории масс-спектрометрического распада:

1. Концепция стабильности ионов и нейтральных частиц
2. Концепция локализации заряда и неспаренного электрона

Концепция стабильности ионов и нейтральных частиц

Эффективность фрагментации определяется устойчивостью образующихся продуктов

Правило выброса максимального алкильного радикала



Интенсивность пика ионов, образующихся при выбросе максимального радикала – наивысшая, при выбросе минимального радикала - низшая

Фрагментные (осколочные) ионы

Все важнейшие фрагментные ионы делятся на:

1. Наиболее тяжелые ионы, образующиеся из $M^{+\cdot}$ в результате выброса простейших частиц (важны для установления путей фрагментации)
2. Ионы, характеризующиеся наиболее интенсивными пиками в спектре
3. Характерные серии ионов, различающихся на гомологическую разность

Гомологические серии ионов

Гомологические серии ионов с низкой массой говорят о наличии гетероатомов, степени ненасыщенности, о классе соединения

Алкановая серия: 15, 29, 43, 57, 71, 85…
Спирты, простые эфиры: 31, 45, 59, 73, 87…
Алкилбензолы: 38, 39, 50-52, 63-65, 75-78, 91, 105, 119

Если степень ненасыщенности молекулы или количество функциональных групп велико, значимые серии ионов с низкой массой, отстоящих друг от друга на CH_2-группу, в спектре отсутствуют

Потеря нейтральных частиц и радикалов

Самые распространенные частицы:

- Потеря H, CH_3, H_2O (кислородсодержащие соединения)
- HC ≡ CH (ароматические соединения)

HC≡N (азотсодержащие ароматические соединения)

C=O, CH_2=CH_2 (оба 28)

Этильный радикал (29)

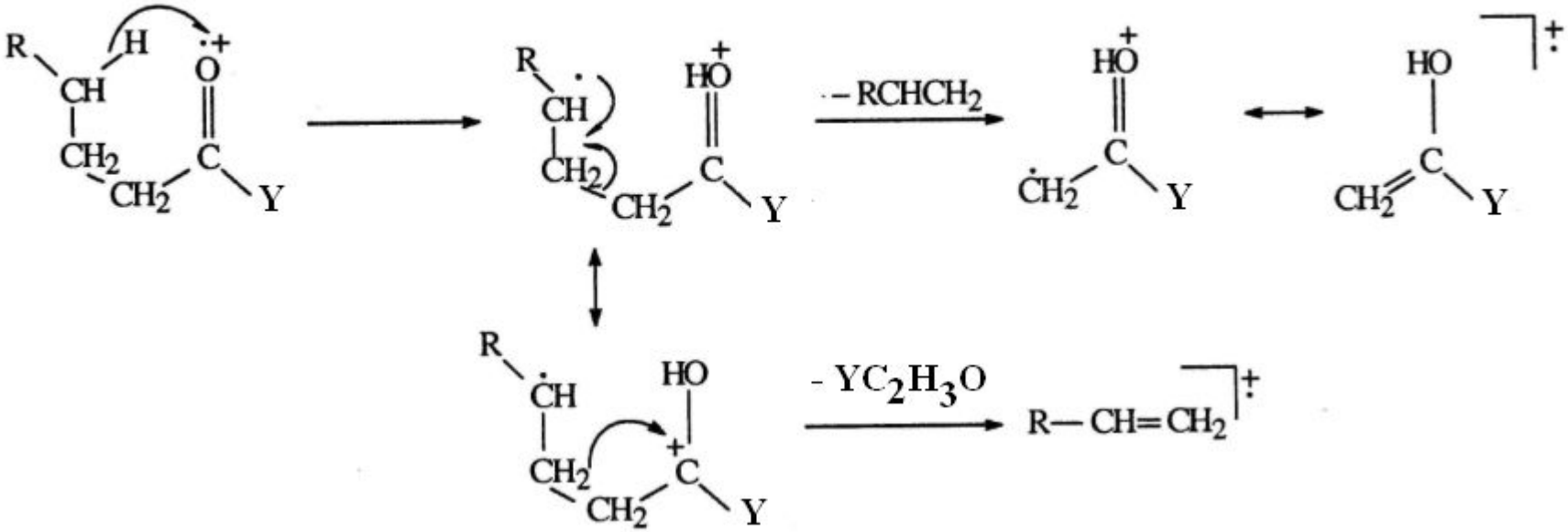
Метокси радикал (31)

Cl и HCl (35,36)

Ацетил (43)

Перегруппировочные ионы

- Ионы, образующиеся из первоначальной молекулы, путем перестройки ее геометрии. Наиболее распространена **перегруппировка Мак-Лафферти**:



R = углеводородный радикал, Y = H, R, OH, OR, NHR, NR_2

Заключается в миграции атома H в катион-радикале (мол. ионе) исследуемого соед. от γ-C к атому X через 6-членное переходное состояние

Условия протекания перегруппировки Мак-Лафферти:

1) Желательно наличие гетероатома в молекуле (необязательно).
2) наличие π-системы (обычно двойная связь).
3) водород у γ-атома (γ-положение по отношению к группе C-X, где X – гетероатом).

Схемы фрагментации

Схема фрагментации отражает основные характеристические направления распада молекулярного иона, а также состав фрагментных ионов, их структуру по возможности, взаимосвязь этих ионов друг с другом, удобно привести относительные интенсивности пиков.

Схема 1.

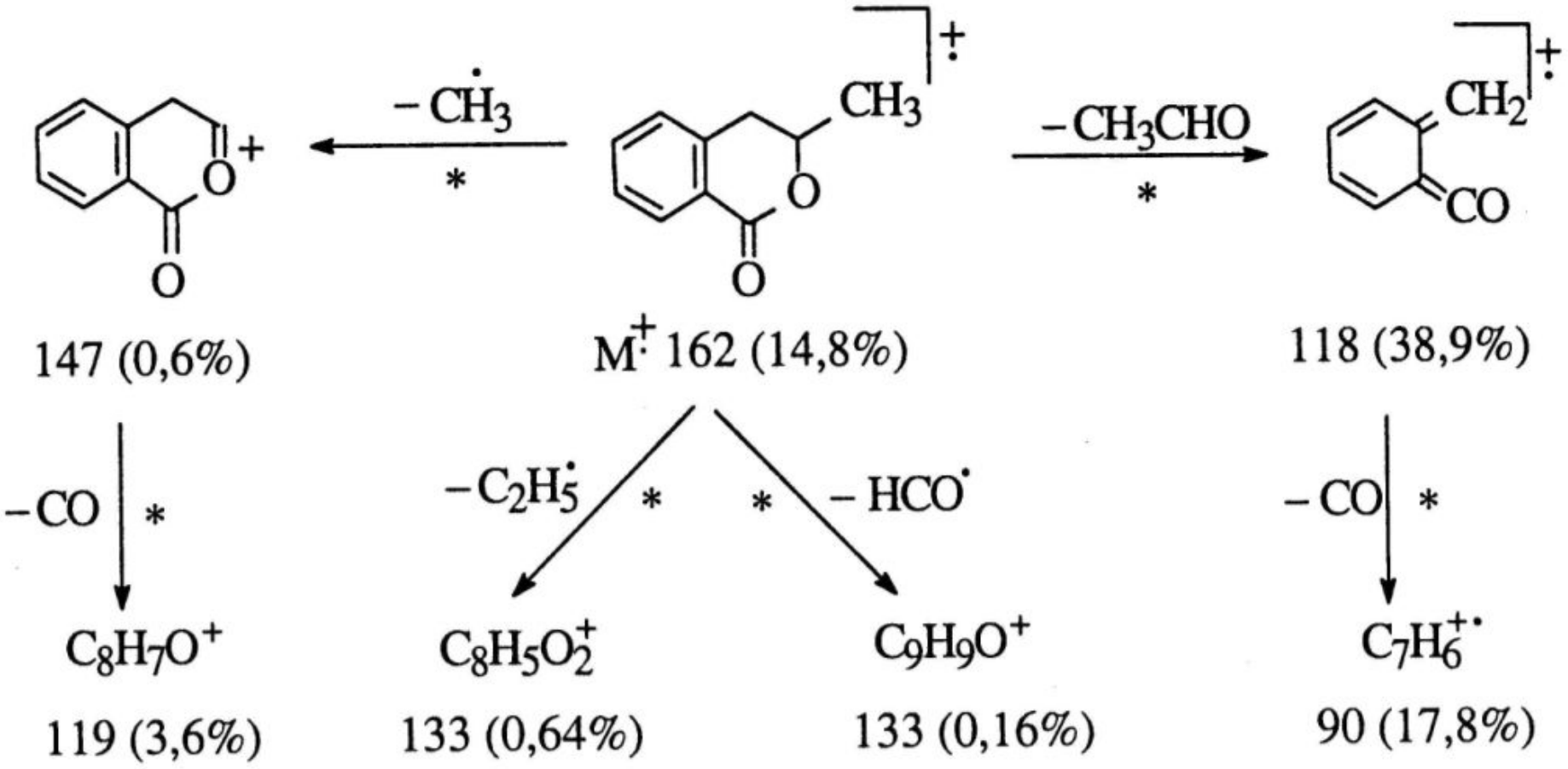
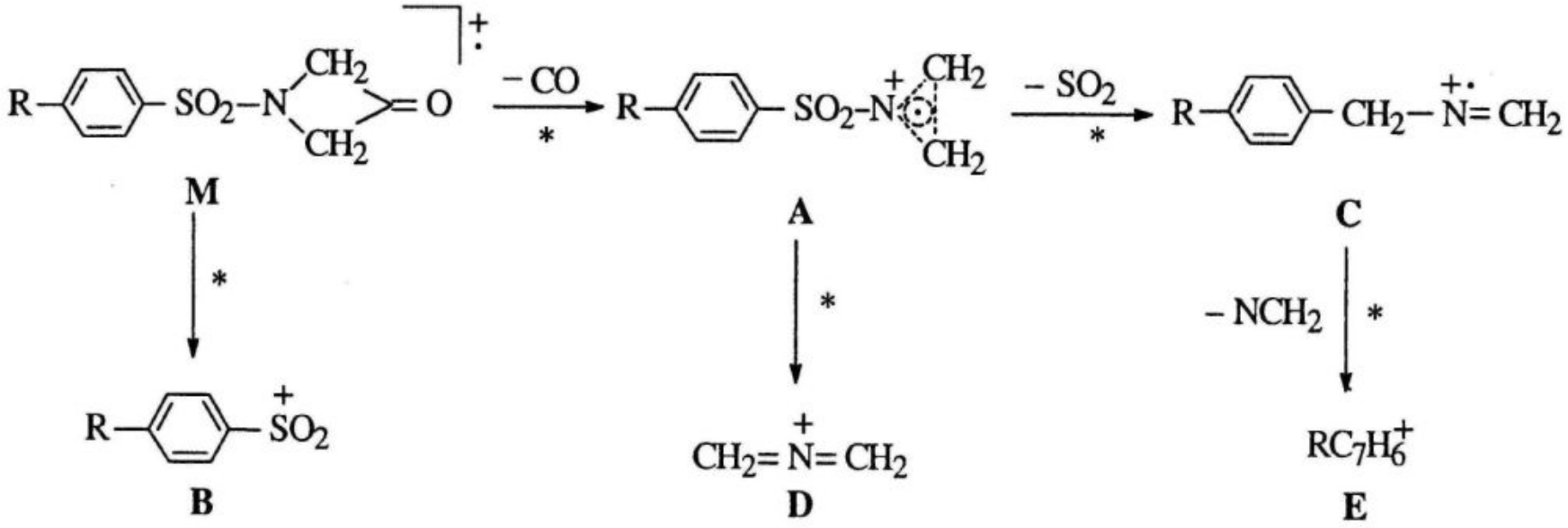


Схема 2.



Относительные интенсивности характеристических фрагментных ионов в масс-спектрах ЭУ N-арилсульфонилазетидин-3-онов

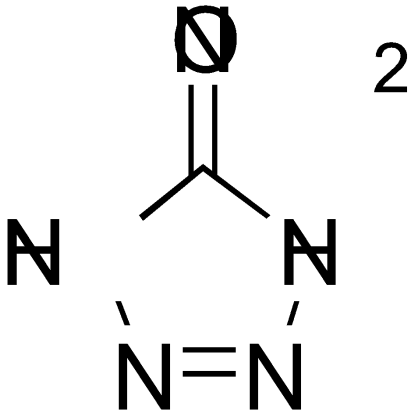
R	Интенсивности пиков ионов, % (относительно полного ионного тока)					
	M	A	B	C	D	E
H	–	0,5	0,3	0,1	75,0	1,1
CH_3	–	0,4	0,2	0,1	77,5	0,7
OCH_3	0,3	0,6	0,9	0,8	73,7	0,7
Cl	–	0,5	0,4	–	77,7	0,2
NO_2	-	0,1	0,1	0,1	65,7	0,5

Вариант представления фрагментации

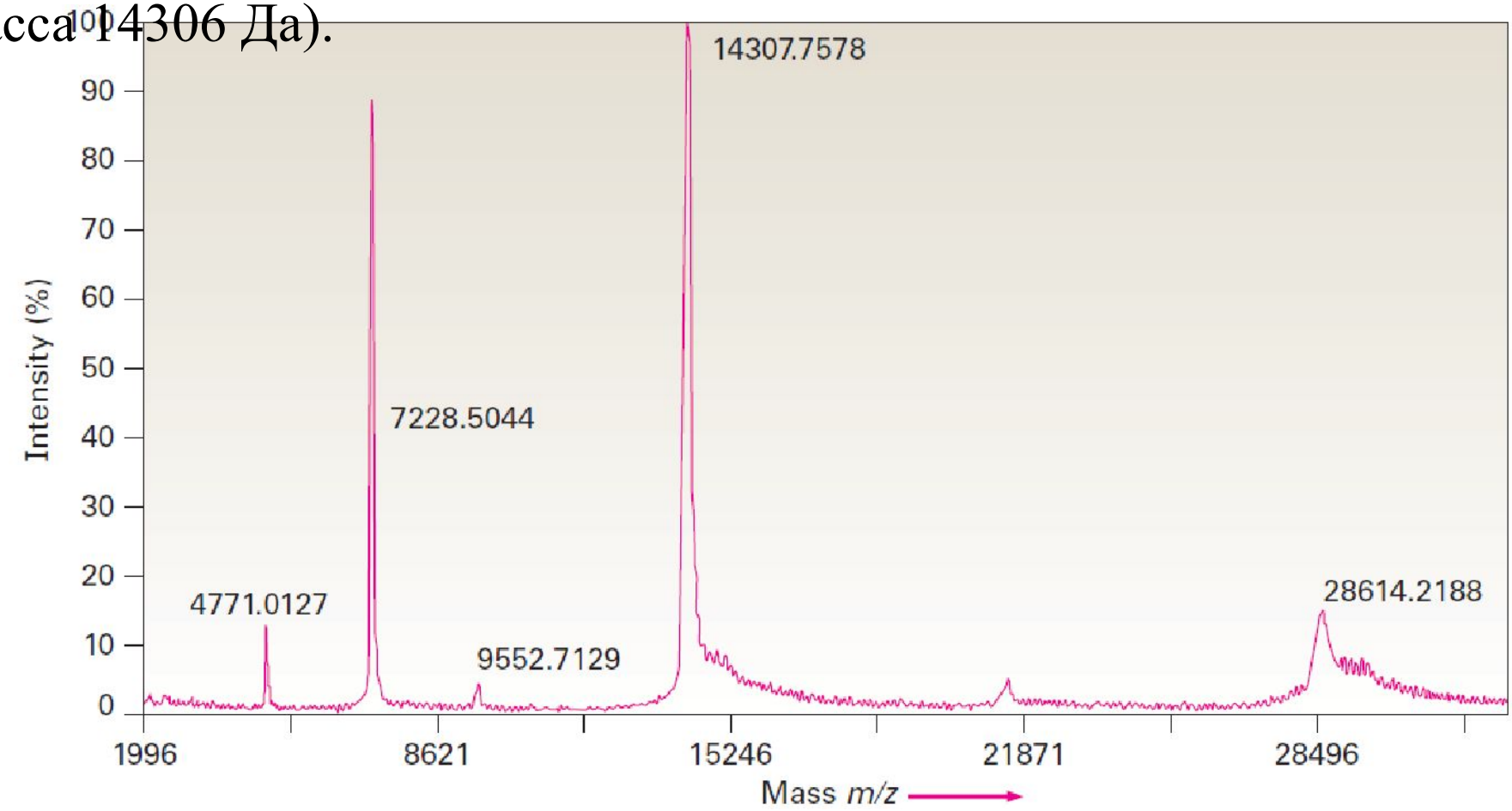
Масс-спектр $(NH_4^+)_2$[5-NATZ]$^{2-}$ из работы *Илюшин М.А., Терпигорев А.Н., Целинский И.В. Влияние изомерного строения (N-нитроамино)тетразолов на свойства их солей // ЖОХ. 1999. Т. 69. Вып. 10. С. 1727-1730.*

Соль	Осколочные ионы, m/z (% полного ионного тока)
$(NH_4^+)_2$[5-NATZ]$^{2-}$ M=164 г/моль	129(0.4), 97(0.7), 83(0.7), 69(1.2), 60(1.2), 55(1.6), 46(6.5), 44(4.0), 42(7.0), 41(2.6), 36(5.7), 30(14.0), 28(34.1), 18(20.3)

5-нитраминотетразол (5-NATZ):



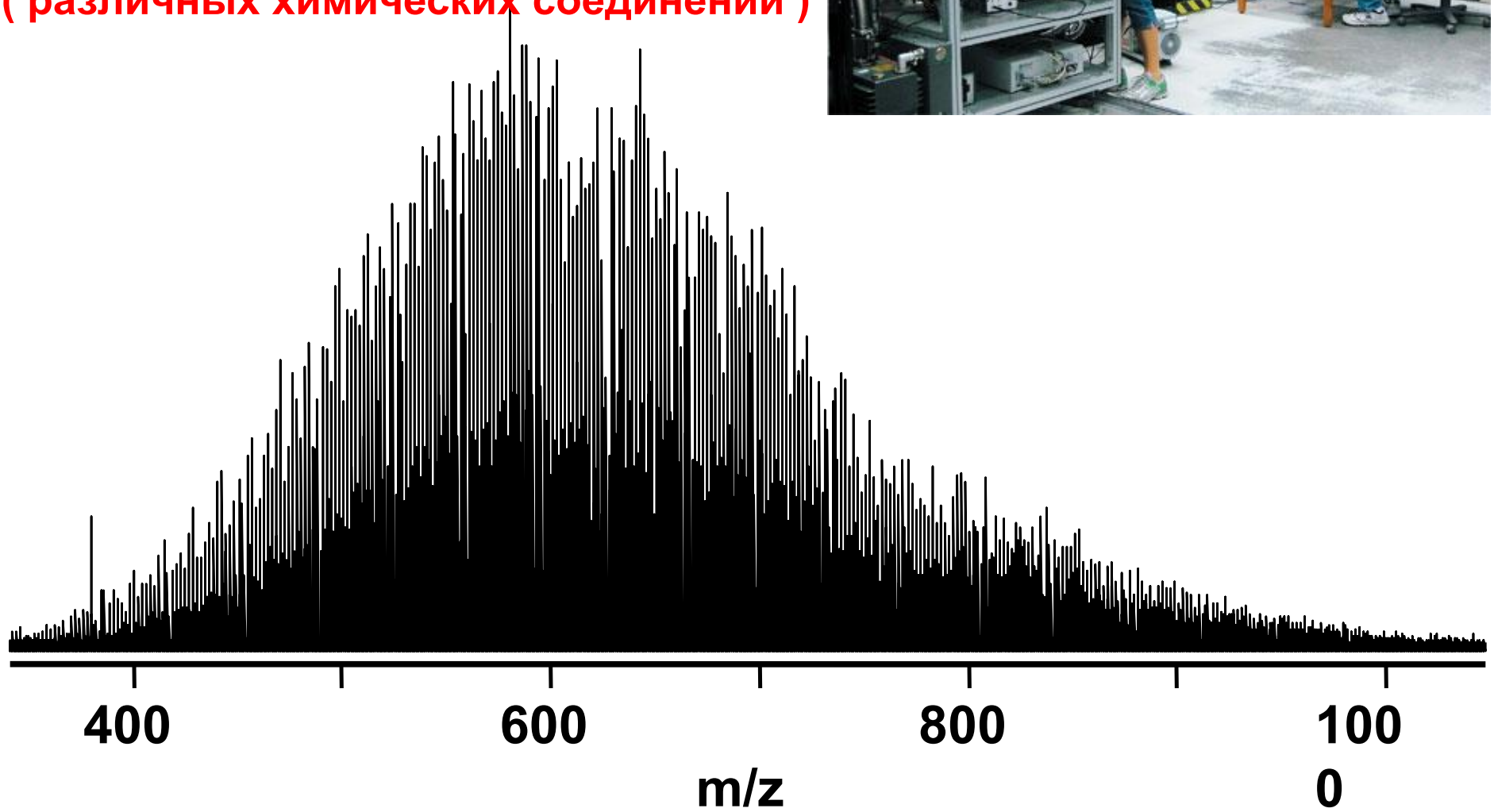
Большинство анализов олиго- и полипептидов с помощью масс-спектрометрии используют матричную лазерную десорбционную ионизацию (MALDI), обычно связанную с времяпролетным (TOF) масс-анализатором. MALDI является методом мягкой ионизации, производит заряженные молекулы с небольшой фрагментацией. На рисунке приведен MALDI-TOF спектр лизоцима (молекулярная масса 14306 Да).



Нефть Европы

Масс – спектр неполярных компонентов

21 499 пиков
(различных химических соединений)



Масс - спектры

Легкая нефть

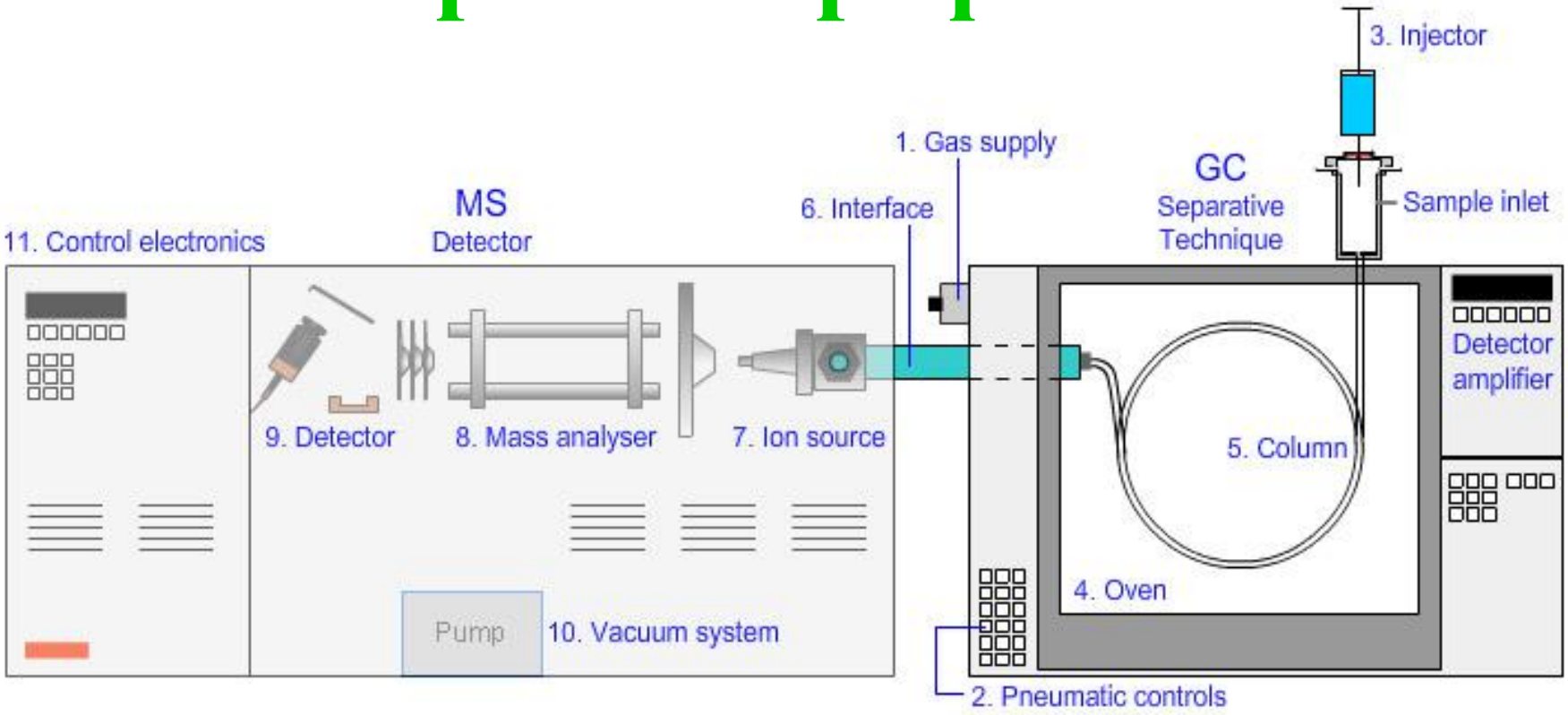
~15 000 пиков

Тяжелая нефть

~30 000 пиков

40 0 60 0 m/ 80 0 100 0 120 0

Комбинации масс-спектрометра с хроматографами



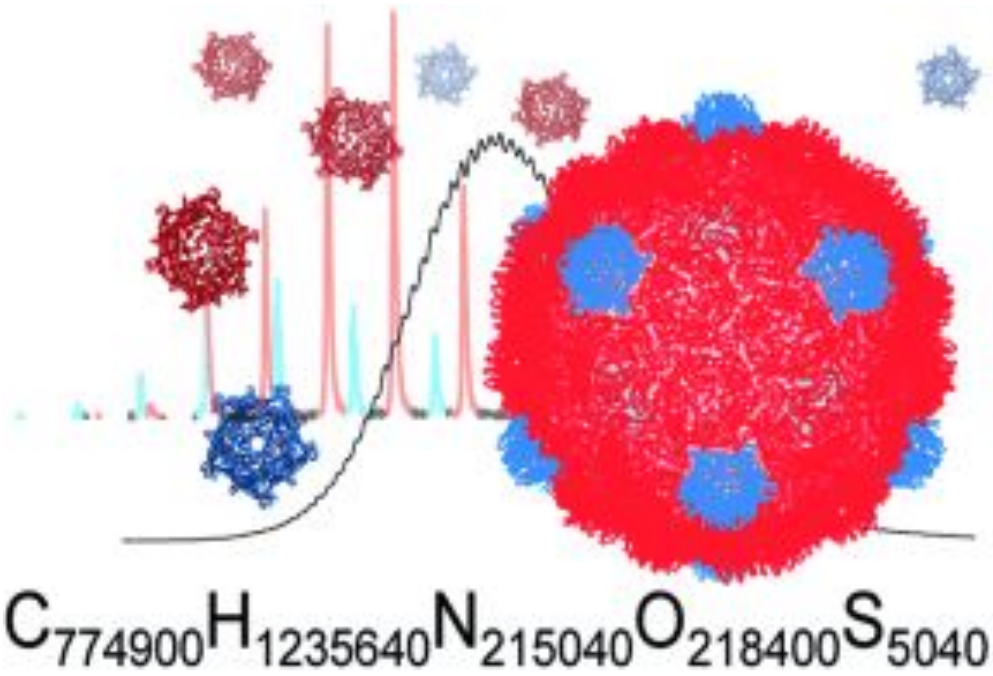
GCMS – Gas Chromatography / Mass Spectrometry
LCMS – Liquid Chromatography / Mass Spectrometry

Времяпролетный масс-спектрометр высокого разрешения Bruker micrOTOF-Q с жидкостным хроматографом Agilent 1100

Примеры использования масс-спектрометрии

Исследователи из Нидерландов и США использовали масс-спектрометрию [*quadrupole time-of-flight (QToF MS)*] для изучения неповрежденной капсиды батериофага – вируса, который инфицирует бактерии. Новую работу вполне можно считать рекордом в плане размеров и массы частицы, которая была изучена (18 мегадальтон).

Экспериментально было получено значение массы 17.942 мегадальтон с точностью плюс/минус 0.004 мегадальтон. Исследователи предполагают, что модификация метода, как, например, более эффективная десольватация объекта, позволит увеличить разрешение спектрометрии QToF MS и исследовать комплексы белков и другие вирусные частицы с массой 20 мегадальтон с хорошим разрешением



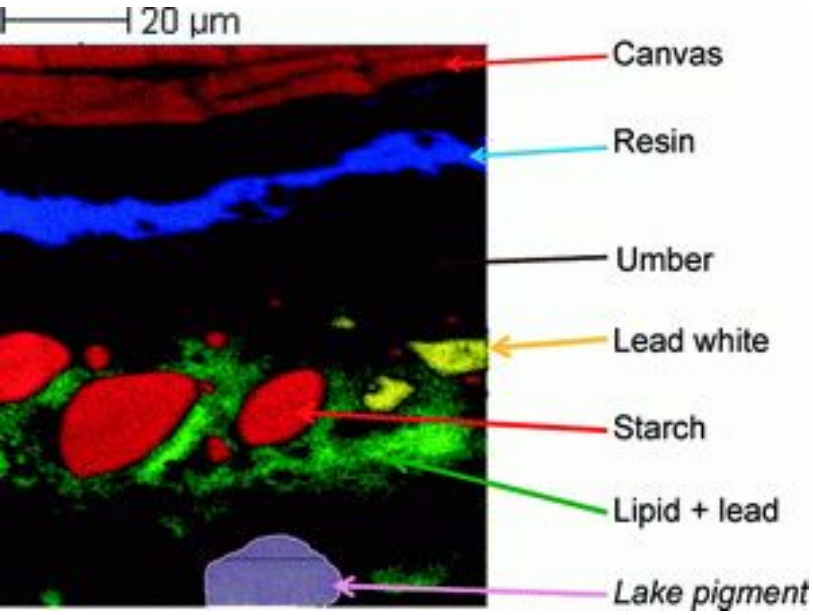
Источник: Angew. Chem., Int. Ed., 2013, DOI: 10.1002/anie.201210197

Исследователи из США разработали методику для анализа красителей, использовавшихся для изготовления текстильных артефактов. Новый способ анализа поможет музеям подбирать составы для сохранения предметов старины, и сможет подсказать историкам, какими технологиями пользовались наши предки

- Кэти Селвиус ДеРу и Рут Энн Армитаж для анализа четырёх наиболее распространенных волокон – хлопка, шерсти, льна и шелка – использовали методику масс-спектрометрии непосредственного анализа в режиме реального времени пролета осколков [*direct analysis in real time-time-of-flight mass spectrometry (DART-MS)*]. Для окраски тканей требуются крайне незначительные количества красителя, поэтому при наличии крошечных образцов такой ткани, анализ красящего вещества представляет собой непростую задачу.
- Масс-спектрометрия DART-MS представляет собой методику мягкой ионизации, которая ранее применялась для использования в криминалистике, а также анализа пищевых и лекарственных продуктов. Исследователи тестировали DART-MS на растворах трёх наиболее распространённых красителей, обнаруженных в артефактах, хранящихся в Институте Искусств Детройта – квертецина, индиготина и ализарина, а также на модельных волокнах, окрашенных этими соединениями. Разработанный подход позволил исследователям быстро и точно проводить определения красителей в небольших образцах окрашенных тканей. Возможность безошибочно идентифицировать флавоноидные, индигоидные и антрахиноновые красители позволяет говорить о том, что новый аналитический метод окажется полезным для определения органических красителей в древних предметах культурного наследия – исторической одежде, мягкой мебели, куклах и даже рукописях.

Источник: Anal. Chem., 2011, DOI: 10.1021/ac201747s

Последняя работа европейских исследователей, при выполнении которой они применяли методику масс-спектрометрии, позволила им обнаружить ранее неизвестный ингредиент в пигментах, применявшихся голландским живописцем XVII века – Рембрандтом ван Рейном.



Для изучения деталей состава полотна «Портрет Николаса Ван Бамбека» исследователи применили масс-спектрометрию. (Рисунок из Anal. Chem., DOI: 10.1021/ac1017748)

В одном из слоев краски на портрете реставраторы и аналитики обнаружили крахмал, ингредиент, который ранее не встречался в составах прежде изученных полотен голландского живописца.

Для получения более детальной химической информации исследователи решили использовать сравнительно новый для изучения предметов подход – масс-спектрометрию вторичных ионов [*secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS)*].

Работая с небольшим образцом темной основы полотна, исследователи подтвердили, что во втором слое грунтовки (слое, на котором перед работой маслом и кистью живописец делал наброски карандашом) содержался крахмал. Оценка формы и размеры зерен крахмала позволила определить, что Рембрандт использовал пшеничный крахмал. Исследователи планируют изучить еще одно полотно великого голландца, написанное также в 1641 – «Портрет Агаты Бас» - они собираются выяснить, не применялся ли Рембрандтом крахмал для изготовления грунтовки и в этом случае.

Кокаин в воздухе

J. Sep. Sci. 2007, 30, 1930 – 1935
DOI 10.1002/jssc.200700039

- **Анализ аэрозоля в Риме и Таранто методом HRGC–MS показал содержание кокаина, временами превышающее 100 пг/м^3**

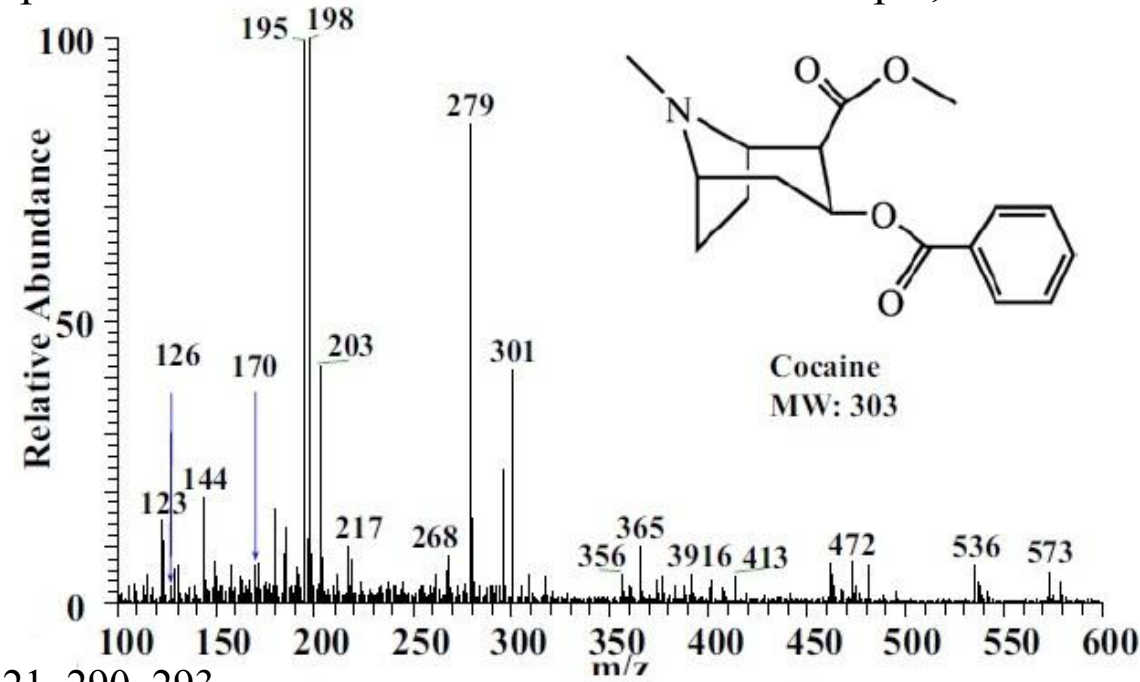
Университетский городок	Бизнес-центр	Canyon st.	Жилой квартал	Городской сад
98 ± 13 пг/м^3	12± 10 пг/м^3	15± 17 пг/м^3	21± 20 пг/м^3	70± 47 пг/м^3

Кокаин в газировке

- В 2009 году в газировке Red Bull был обнаружен кокаин.
- Анализ различных напитков был проведен с помощью nanoEESI-MS/MS: Pepsi, Coca-Cola, Red Bull.

Содержание кокаина:
Red Bull: 2.1*10^{-11} г/мл
Coca Cola: 6.5* 10^{-12} г/мл

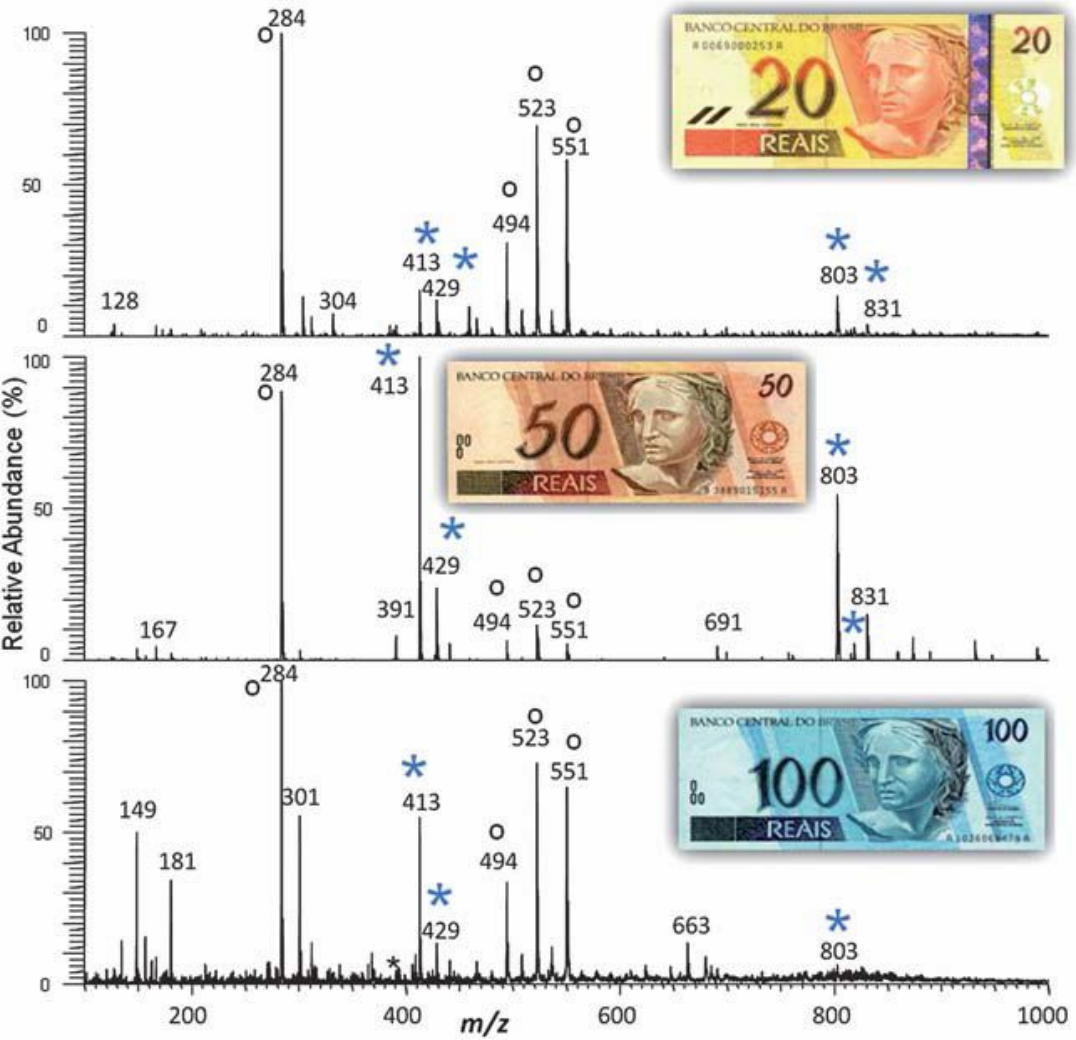
Pepsi Cola: 6.2*10^{-12} г/мл



Источник: J. Am Soc Mass Spectrom 2010, 21, 290–293

Масс-спектрометрия позволяет выявить контрафактные ценные бумаги

- В 2010 г. была разработана масс-спектрометрическая методика, позволяющая определить химический профиль банкноты в течение нескольких секунд. Для нового метода практически нет необходимости в предварительной подготовке образца, метод не является деструктивным, более того – он позволяет определить, какой метод использовали фальшивомонетчики для получения той или иной фальшивки.



Новая методика основана на изучении различных пятен банкноты с помощью масс-спектрометрии с десорбционной ионизацией (desorption ionisation mass spectrometry). Настоящие денежные знаки отличаются близким масс-спектрометрическим профилем (соотношением *m/z*) по всей поверхности банкноты, независимо от года выпуска банкноты, ее достоинства и цветового узора. Изучение банкноты методом масс-спектрометрии позволяет получить «отпечатки пальцев» настоящих банкнот. Анализ фальшивых денежных знаков, изготовленных с помощью лазерной или струйной печати, дает другой набор сигналов, который существенно отличается от масс-спектрометрического профиля настоящих денег.