

МФК МГУ

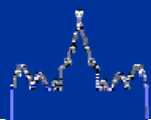
**«ХИМИЯ ПРИРОДНОГО ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА И
ПРИРОДОПОДОБНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ»**

Лекция 4

Введение в масс-спектрометрический анализ органических веществ

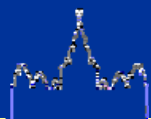
И.В. Перминова

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова



Содержание

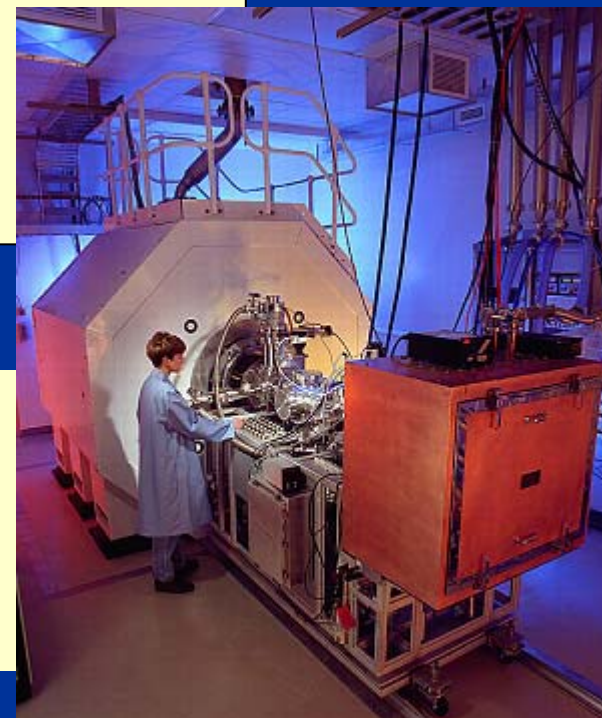
- Основные определения масс-спектрометрии
- Общая схема масс-спектрометра
- Основные способы ионизации вещества
- Основные типы масс-анализаторов: достоинства и недостатки
- Рекомендуемая литература



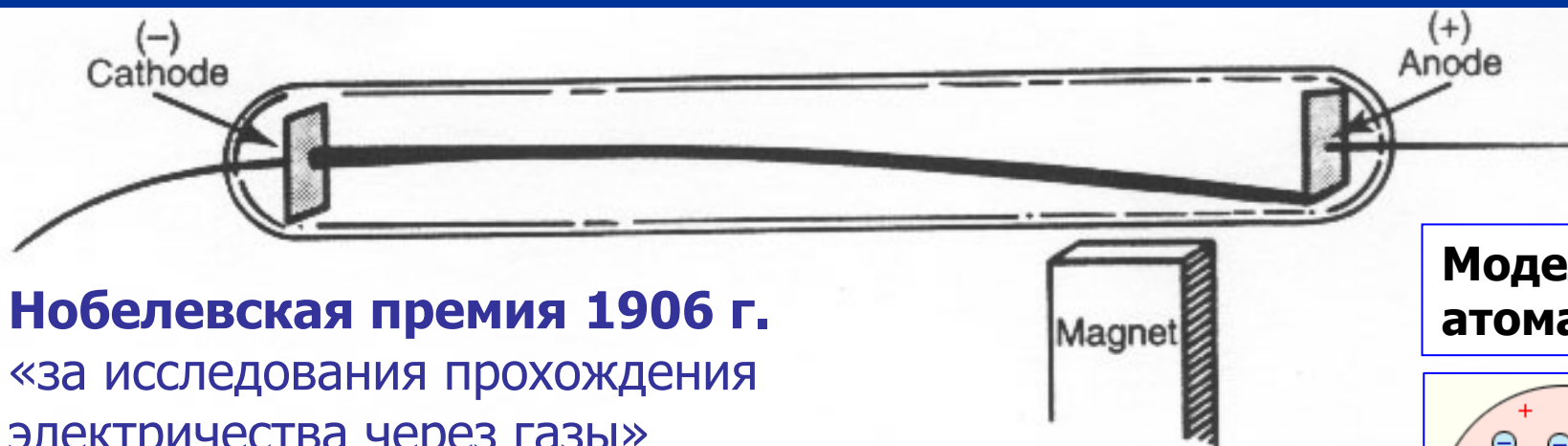
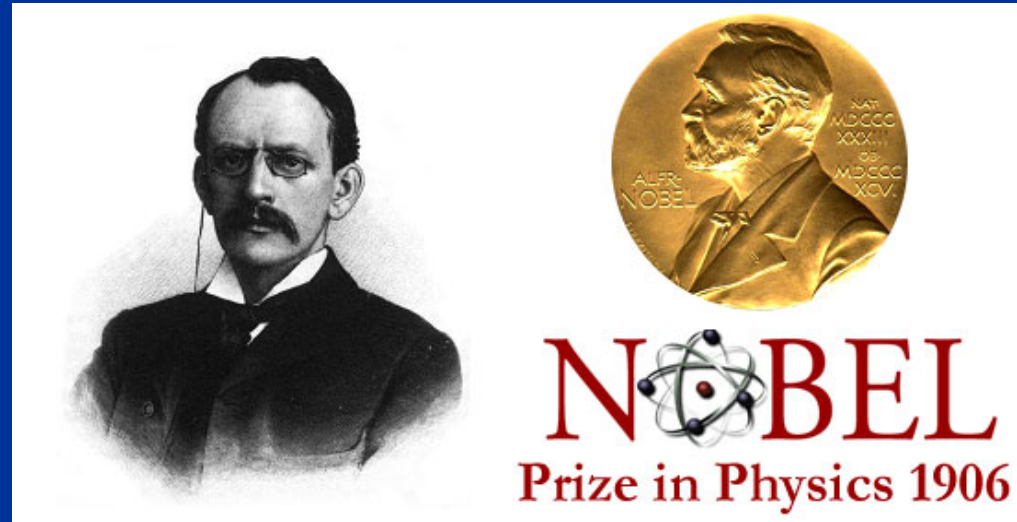
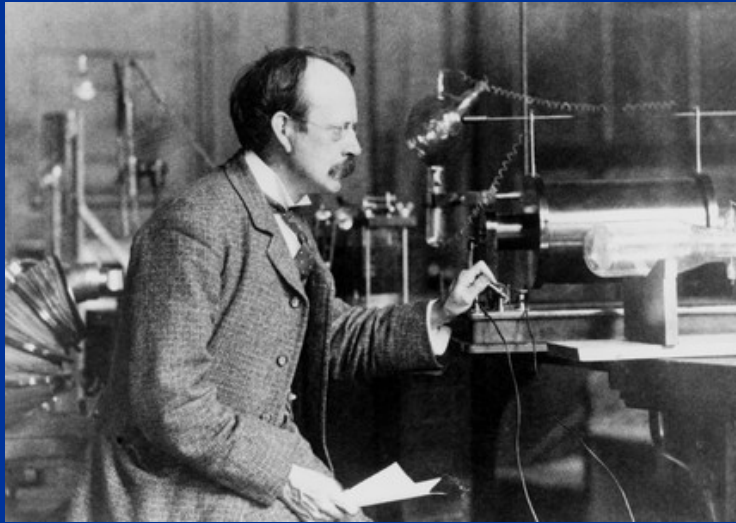
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ – это физический метод анализа вещества путем определения массы (или отношения массы к заряду, m/z) и относительного количества ионов, получаемых при ионизации исследуемого вещества

Масс-спектр – это совокупность значений m/z и относительных величин токов этих ионов, представленная в виде графика или таблицы



СЭР ДЖОЗЕФ ТОМСОН (J. Thomson)

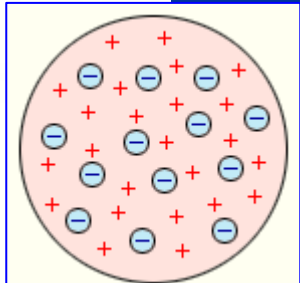


Нобелевская премия 1906 г.

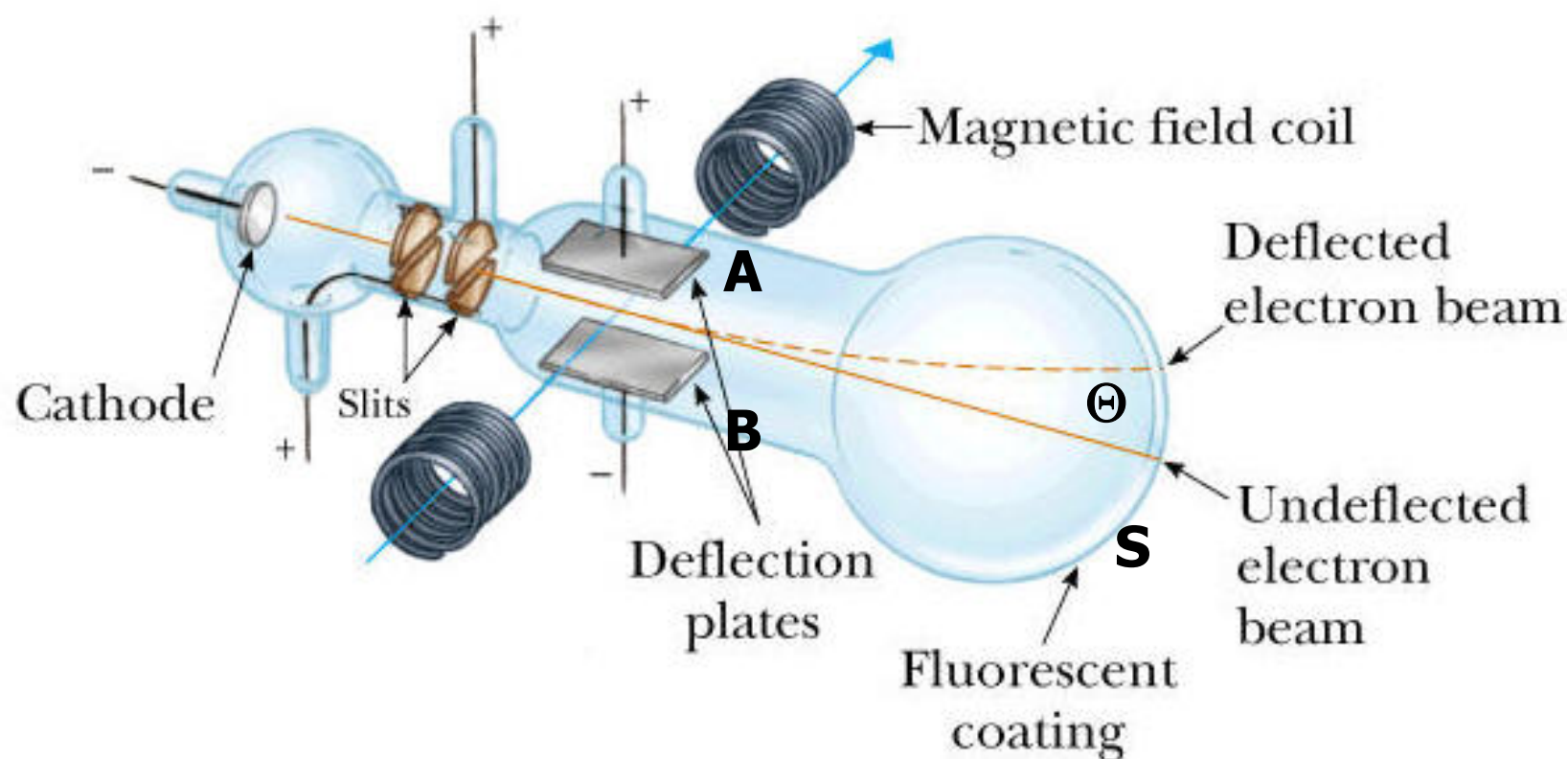
«за исследования прохождения электричества через газы»

«Атомы не неделимы, отрицательно заряженные частицы могут вылетать из них под действием электрических сил, удара быстро движущихся атомов, ультрафиолетового света или тепла »

Модель атома



ЭКСПЕРИМЕНТ ТОМСОНА: РОЖДЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ



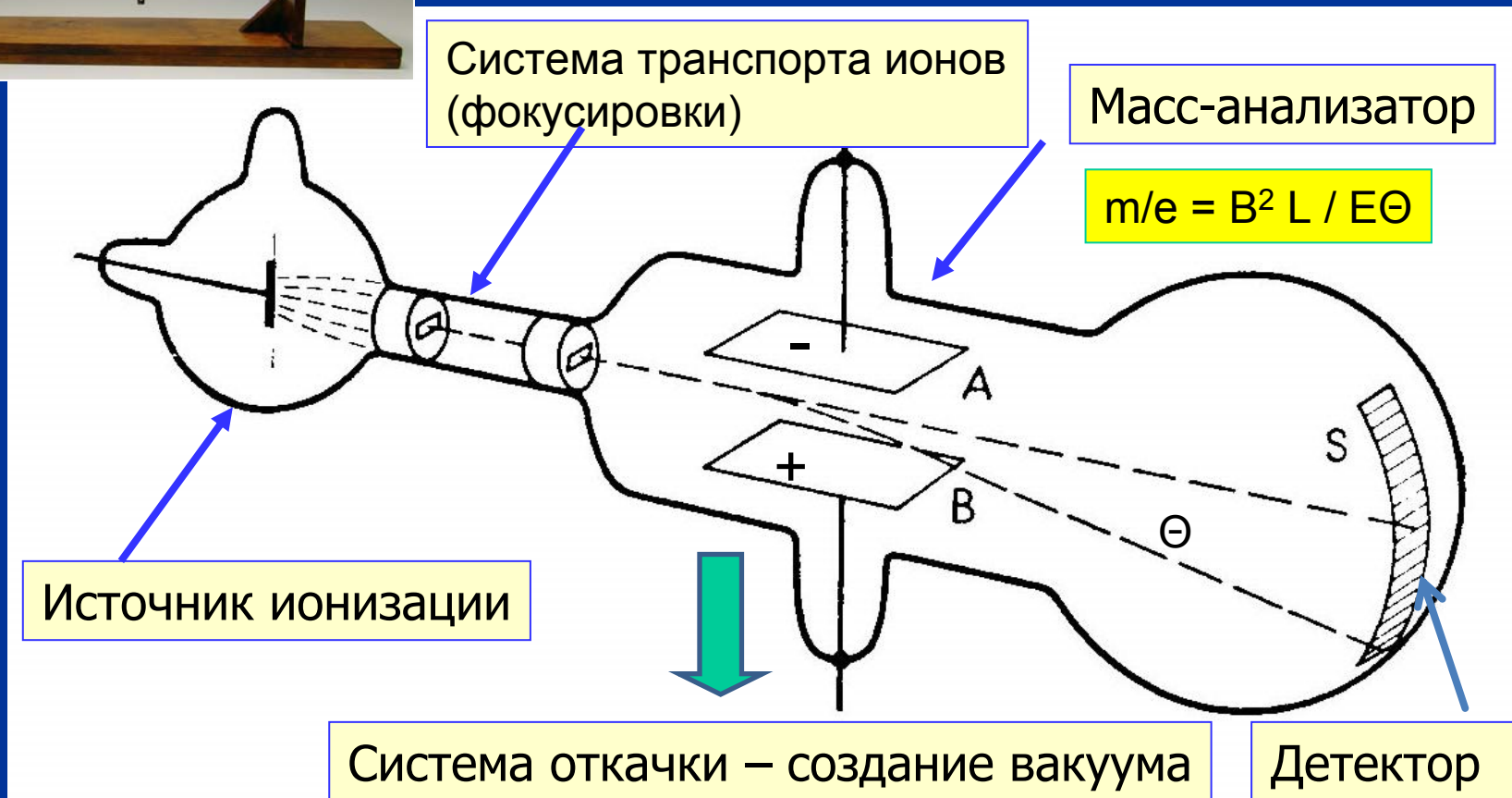
$$m/e = B^2 L / E \Theta$$

E, B - напряженность электрического и магнитного полей

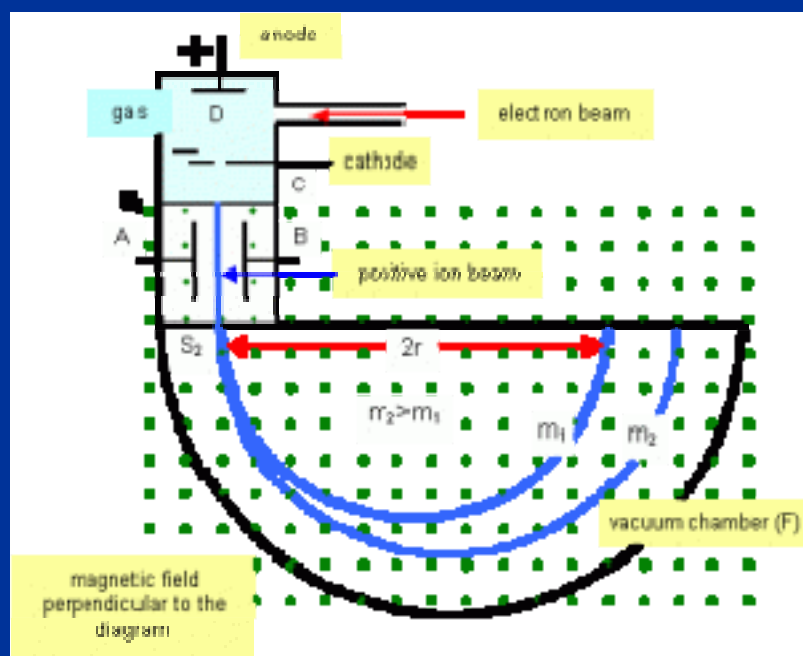
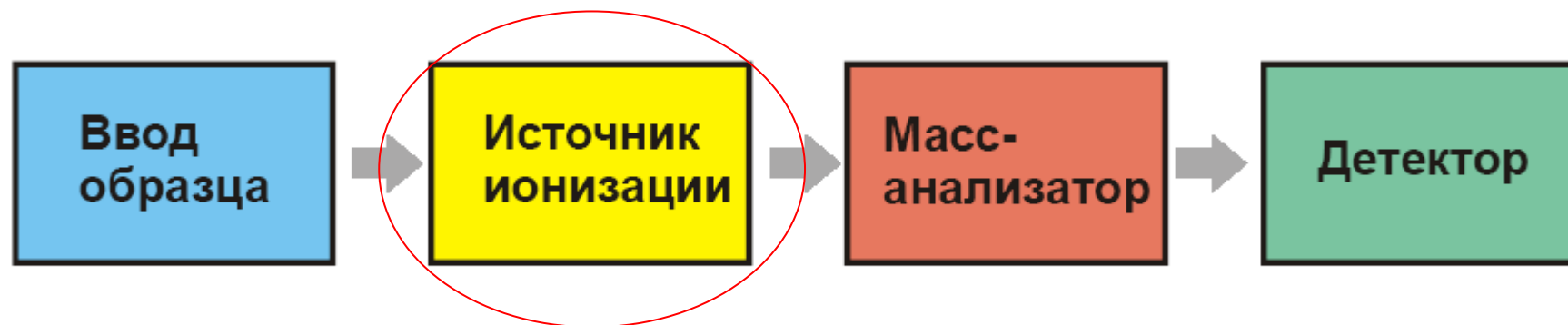
L - длина электрических пластинок (A, B)

Θ – угол отклонения частицы на фотопластинке (S)

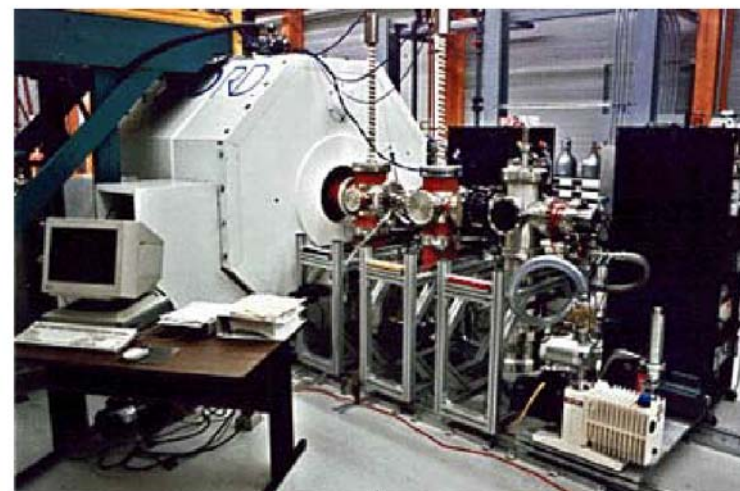
КАТОДНО-ЛУЧЕВАЯ ТРУБКА: ПЕРВЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТР



БЛОК-СХЕМА МАСС-СПЕКТРОМЕТРА



FT-ICR Mass Spectrometer



9.4 Tesla Super magnet at Alan Marshall Laboratory, Florida University

ИСТОЧНИКИ ИОНИЗАЦИИ ВЕЩЕСТВА

ЖЕСТКАЯ ИОНИЗАЦИЯ:

EI - Электронный удар

ICP - Ионизация в индуктивно связанной плазме

МЯГКАЯ ИОНИЗАЦИЯ:

ESI - электрораспыление (ЭР)

APPI - фотоионизация при атмосферном давлении

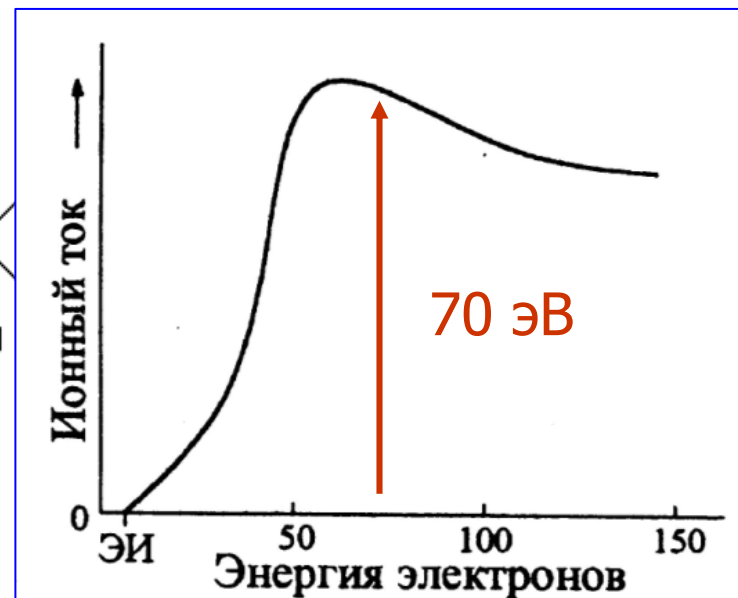
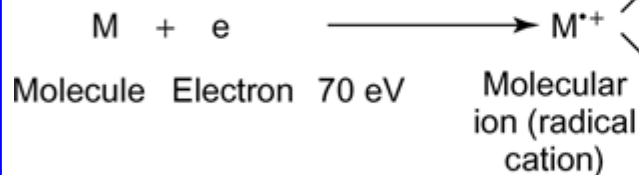
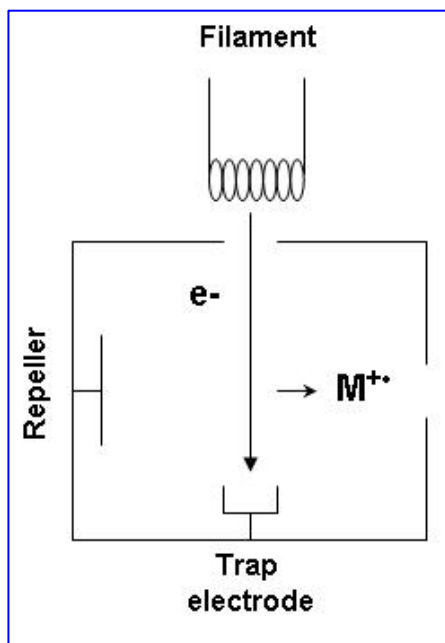
APCI - химическая ионизация при
атмосферном давлении (ХИАД)

MALDI - матрично-активированная лазерная
десорбция (МАЛДИ)



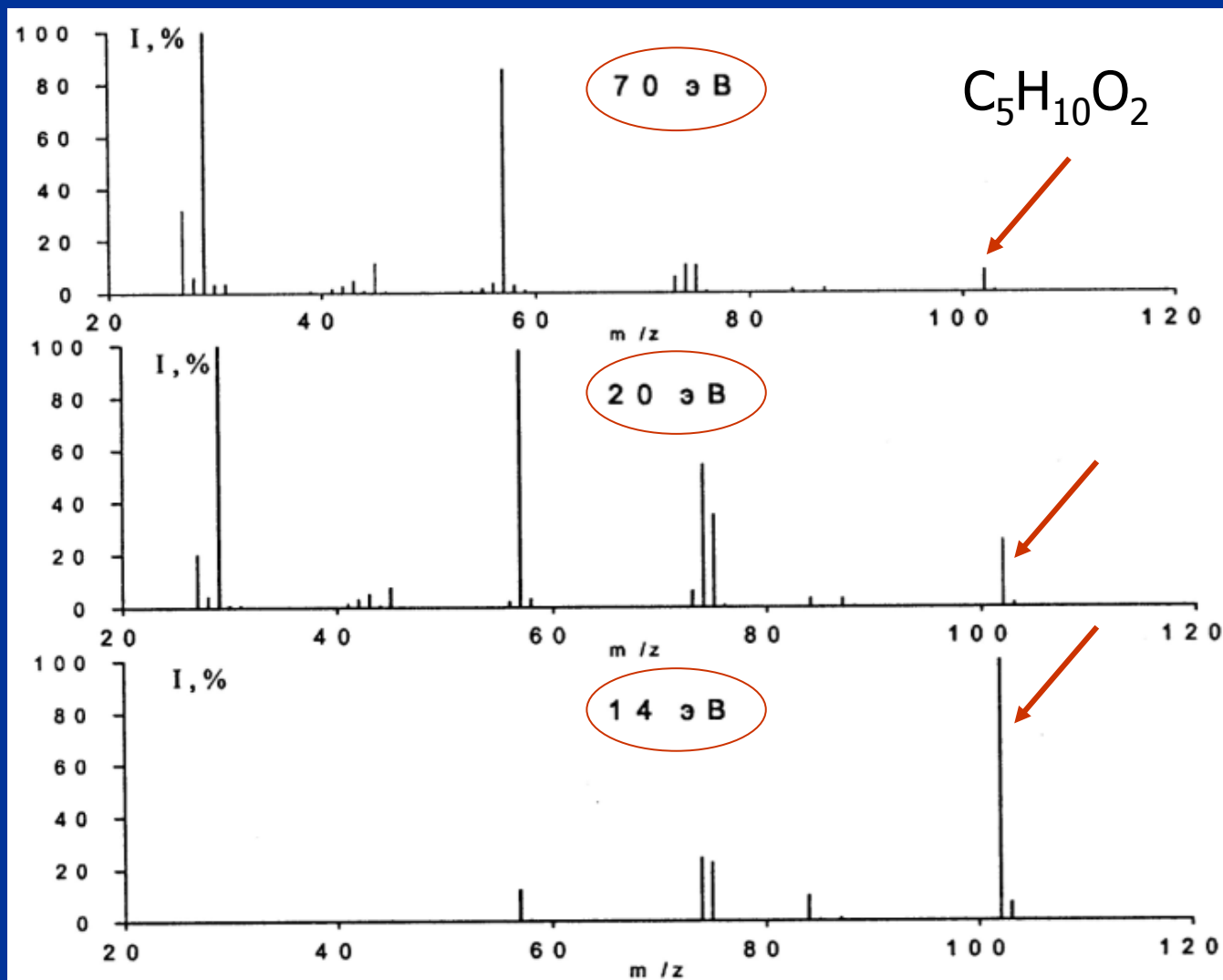
ИОНИЗАЦИЯ ЭЛЕКТРОННЫМ УДАРОМ

Электронный удар — это ионизация паров вещества потоком электронов, разогнанных в электрическом поле. При этом электрон, пролетая 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 ее фрагментации



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

ЭЛЕКТРОННЫЙ УДАР: ЗАВИСИМОСТЬ ИНТЕНСИВНОСТИ ПИКА МОЛЕКУЛЯРНОГО ИОНА ОТ ЭНЕРГИИ ИОНИЗАЦИИ



Из: Ельцов ИВ
и Нефедов АА,
НГУ

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

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**

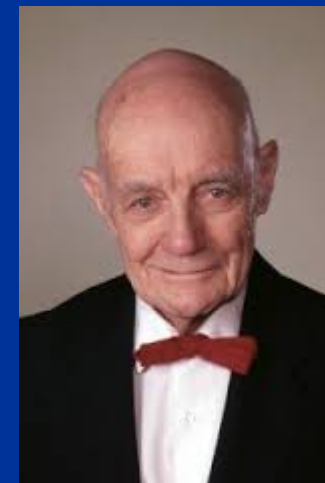
НЕДОСТАТКИ

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

ИОНИЗАЦИЯ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЕМ (ELECTROSPRAY IONIZATION, ESI)

Электрораспыление – ионизация распылением в электрическом поле. Метод был разработан под руководством Лидии Галль, но Нобелевская премия по химии за разработку мягкого метода ионизации была вручена в 2002 г. Джону Фенну.

Суть метода: анализируемый раствор превращается в тонкодиспергированный заряженный аэрозоль, который испаряется в области с атмосферным давлением газа, а продукты испарения, в том числе и ионы, отбираются в камеру анализатора ионов через газодинамическую транспортирующую систему.



John Fenn



Лидия Галль

ИОНИЗАЦИЯ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЕМ

Техническая реализация метода:

Вещество на ионизацию поступает в растворе полярного растворителя (вода, ацетонитрил, метанол и т.д.), при этом в растворе присутствуют катионы водорода или щелочных металлов. Капля раствора подается в специальный капилляр-«небьюлайзер» («распылитель»), к которому приложено высокое напряжение (несколько кВ), в результате чего капля, 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 поверхности растет, и когда поверхностное натяжение и отталкивание ионов выравниваются, капля «взрывается» на ряд мелких капель, заряженных положительно, и продолжающих испарять молекулы растворителя под действием нагретого сухого инертного газа.

Капилляр-распылитель

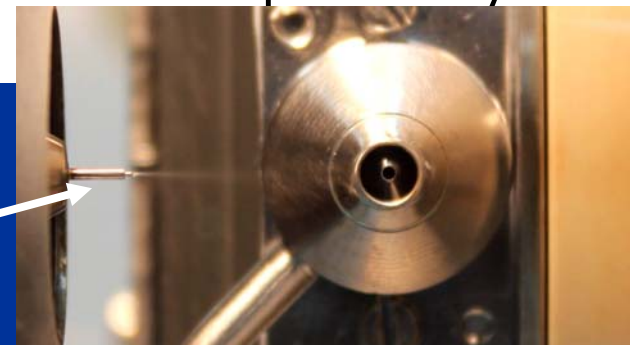
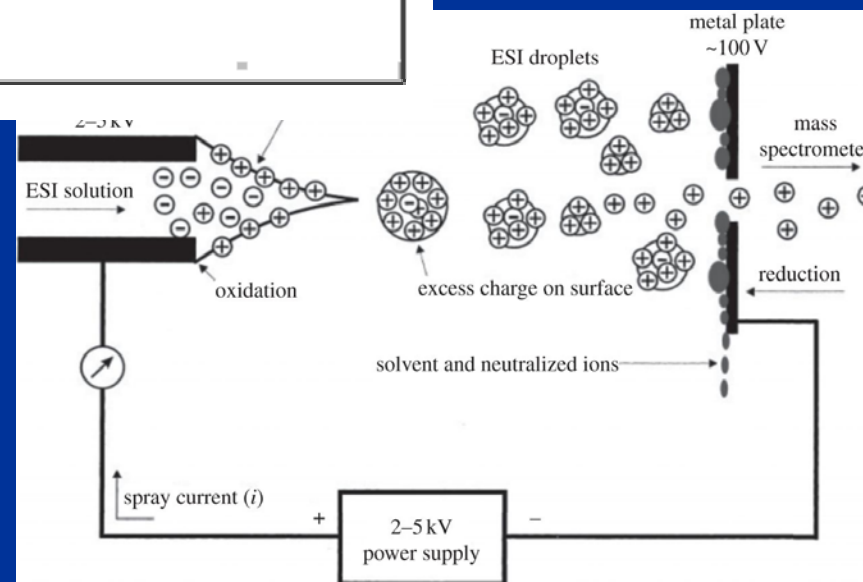
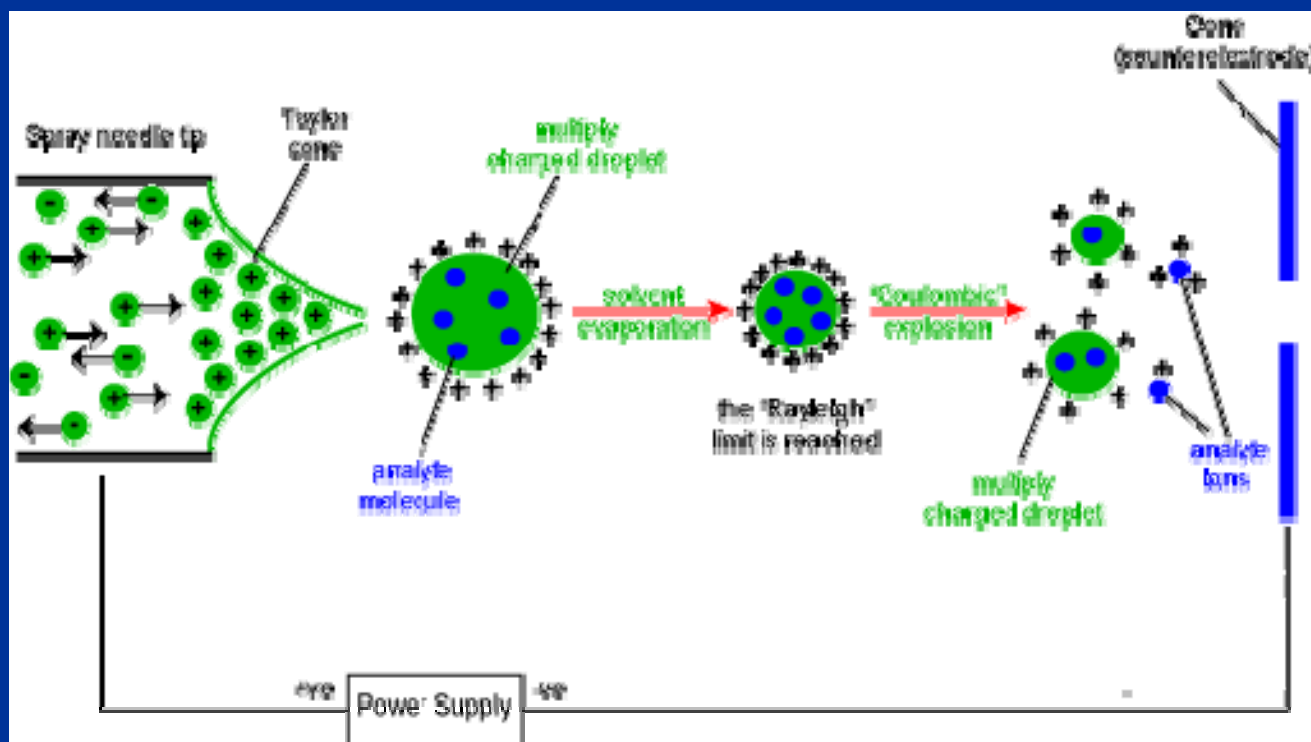
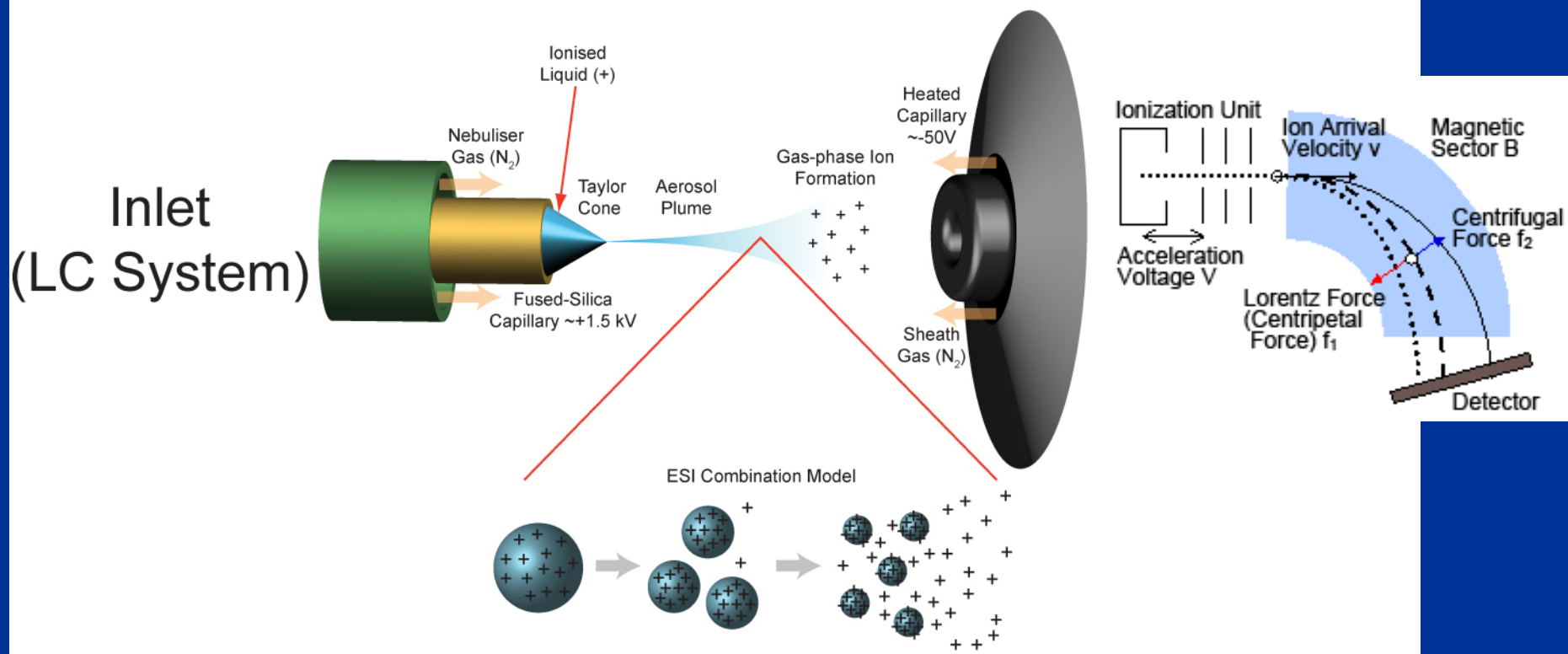


СХЕМА ГЕНЕРАЦИИ ЭЛЕКТРОСПРЕЯ



ИНТЕРФЕЙС ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФА И МАСС-СПЕКТРОМЕТРА

Electrospray Ionisation (ESI) and Ion Source Overview



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

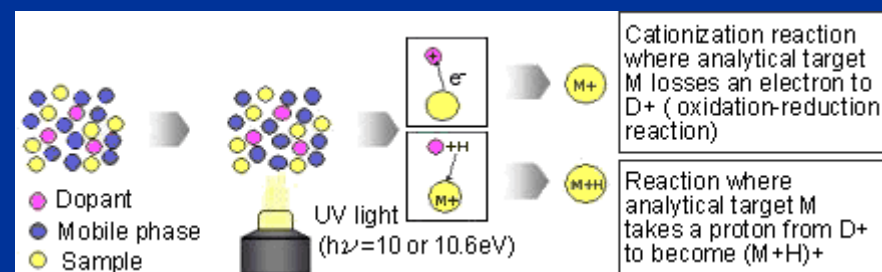
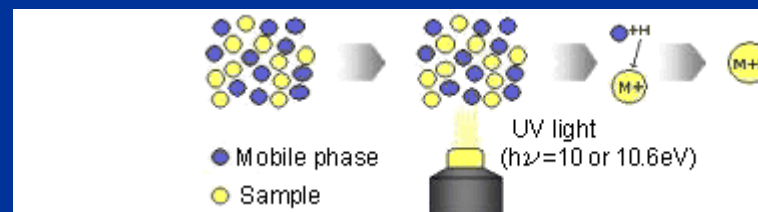
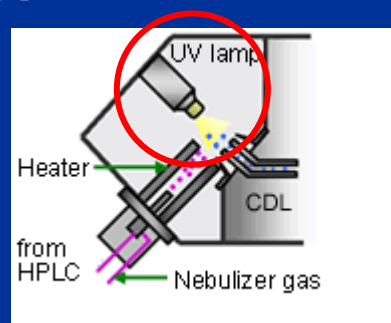
Недостатки:

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

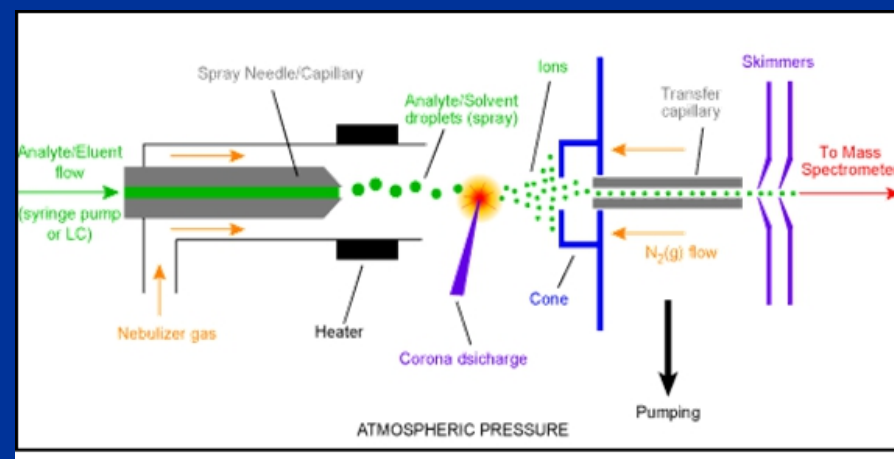
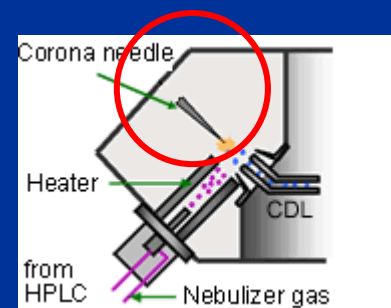
ИОНИЗАЦИЯ НЕПОЛЯРНЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ АТМОСФЕРНОМ ДАВЛЕНИИ

ФОТОИОНИЗАЦИЯ ПРИ АТМОСФЕРНОМ ДАВЛЕНИИ

APPI

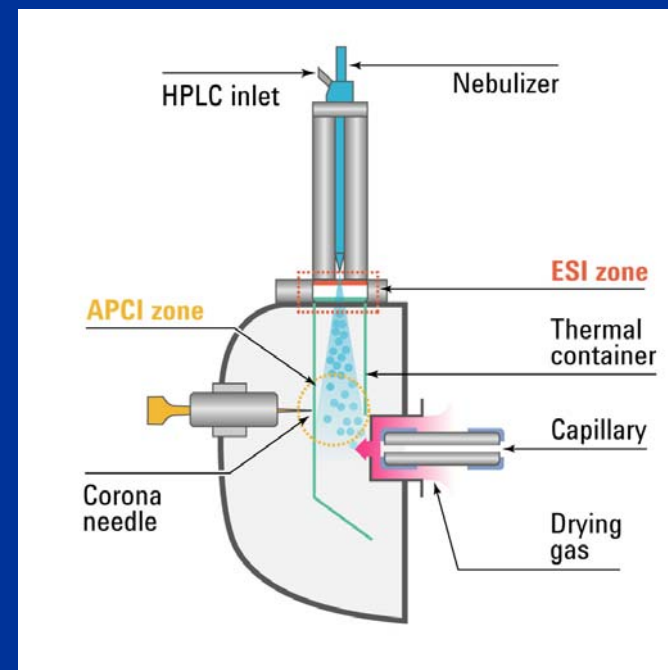
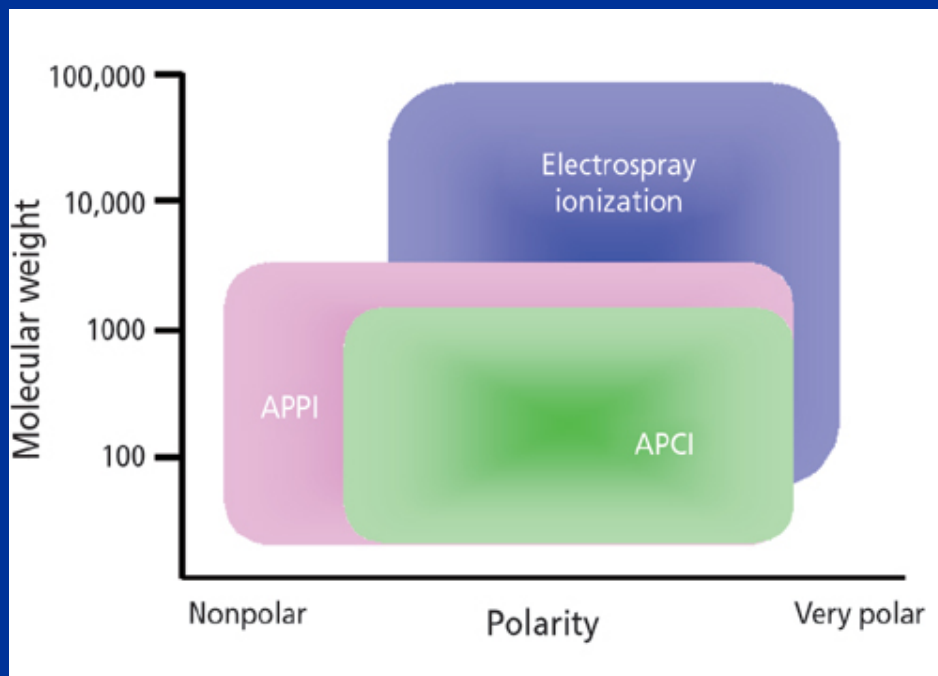


APCI



ХИМИЧЕСКАЯ ИОНИЗАЦИЯ ПРИ АТМОСФЕРНОМ ДАВЛЕНИИ (APCI)

ИОНИЗАЦИЯ ПРИ АТМОСФЕРНОМ ДАВЛЕНИИ



Достоинства:

- высокая чувствительность,
- использование в качестве интерфейса для комбинации высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (HPLC/MS).

Недостатки:

- сильная зависимость спектров от параметров ионизации,
- ограниченная информативность масс-спектров.

МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННАЯ ЛАЗЕРНАЯ ДЕСОРБЦИЯ, МАЛДИ (*MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)



Koichi Tanaka
Нобелевская
премия 2002 г.

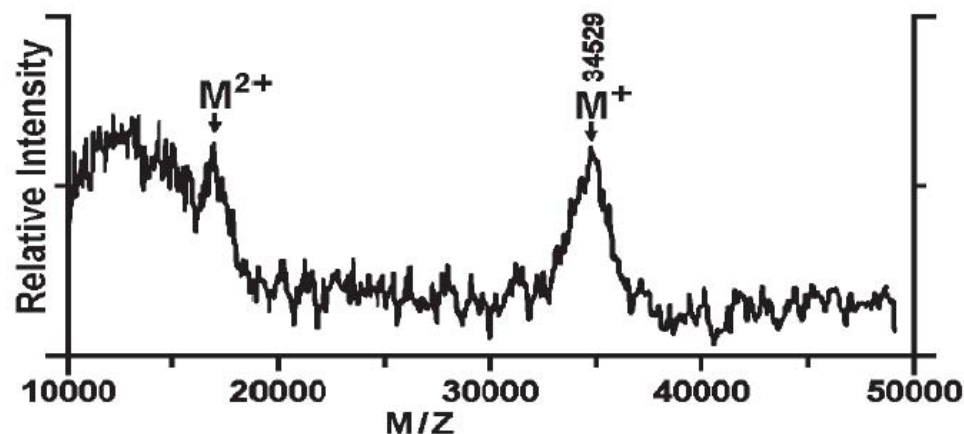
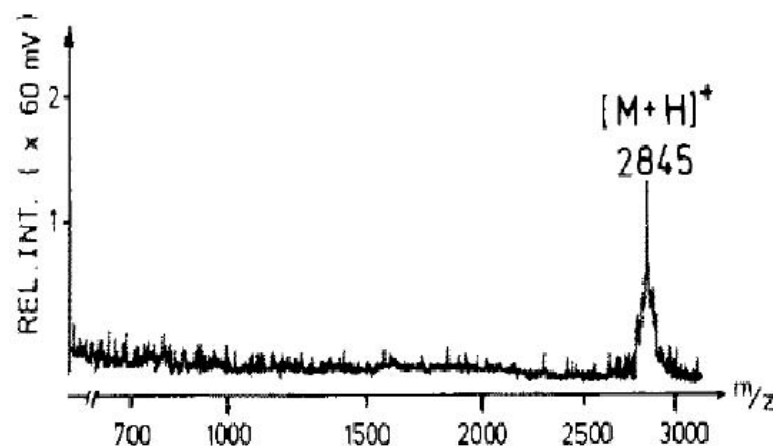


Figure 17. Molecular Ion Measurement of Carboxypeptidase-A (M.W.: ~35k Da).

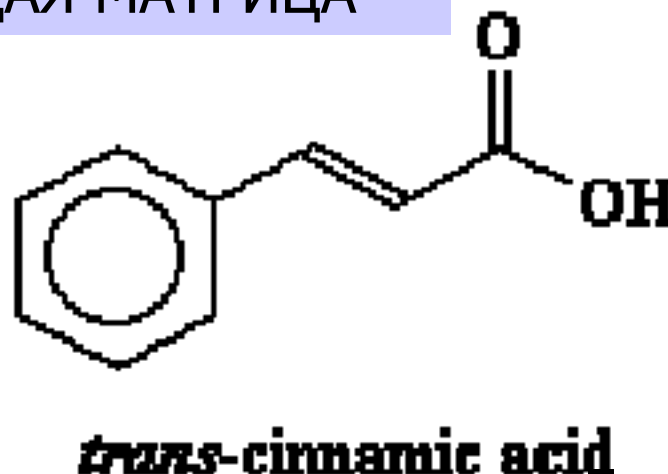
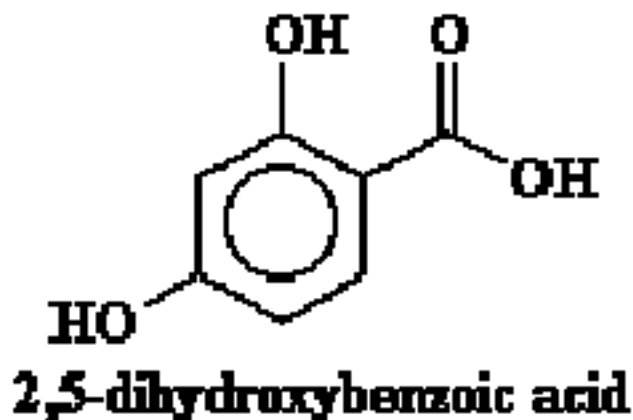


Karas M, Bachmann D, Bahr, U, Hillenkamp F Int J Mass Spectrom Ion Proc **1987**

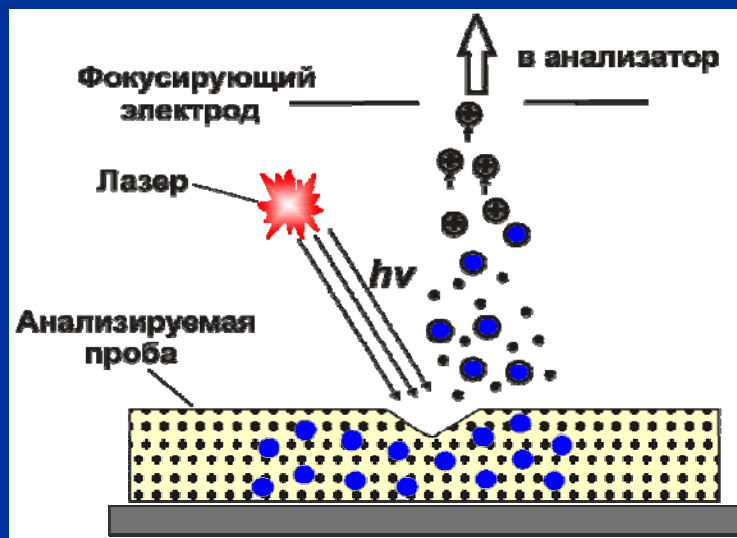
МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННАЯ ЛАЗЕРНАЯ ДЕСОРБЦИЯ, МАЛДИ (*MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)

Матрично-активированная лазерная десорбция: исследуемое вещество помещают в «матрицу», которая представляет собой вещество с меньшей молекулярной массой и с высокой способностью к поглощению лазерного излучения (например, коричневая кислота, 3-гидроксипиколиновая кислота, 6,7-гидроксикумарин и т.д.). Перемешивание происходит при помощи растворения вещества-образца и вещества матрицы в одном и том же растворителе и последующем испарении на спец. подложке.

УФ-ПОГЛОЩАЮЩАЯ МАТРИЦА



МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННАЯ ЛАЗЕРНАЯ ДЕСОРБЦИЯ, МАЛДИ



Лебедев, с.112.

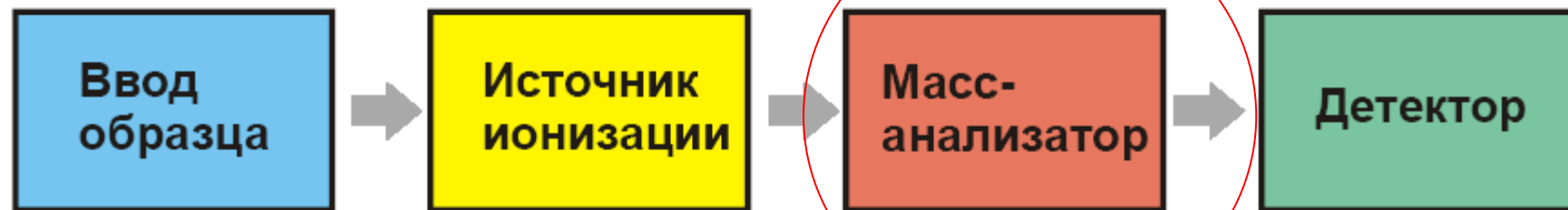
Достоинства:

1. Возможность анализа крупных молекул (массой до 100 000 Д и выше)
2. Мягкая ионизация образца
3. Возможность анализа загрязненных примесями образцов

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

БЛОК-СХЕМА МАСС-СПЕКТРОМЕТРА



МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ИОНОВ (ТИПЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ)

- 1. Магнитный анализатор**
- 2. Электрический анализатор**
- 3. Квадрупольный анализатор**
- 4. Времяпролетный анализатор**
- 5. Ионная ловушка**
- 6. Ловушка Пеннинга (ионный циклотронный резонанс)**
- 7. Орбитальная ловушка**

МАГНИТНЫЙ АНАЛИЗАТОР

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

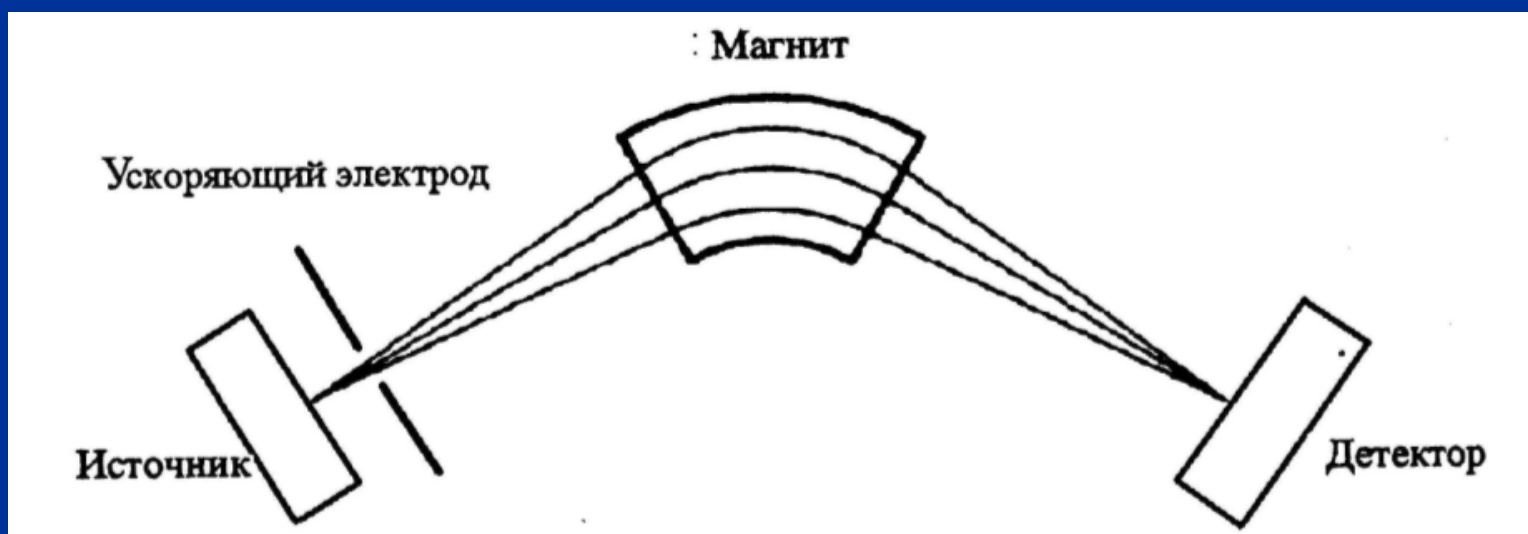
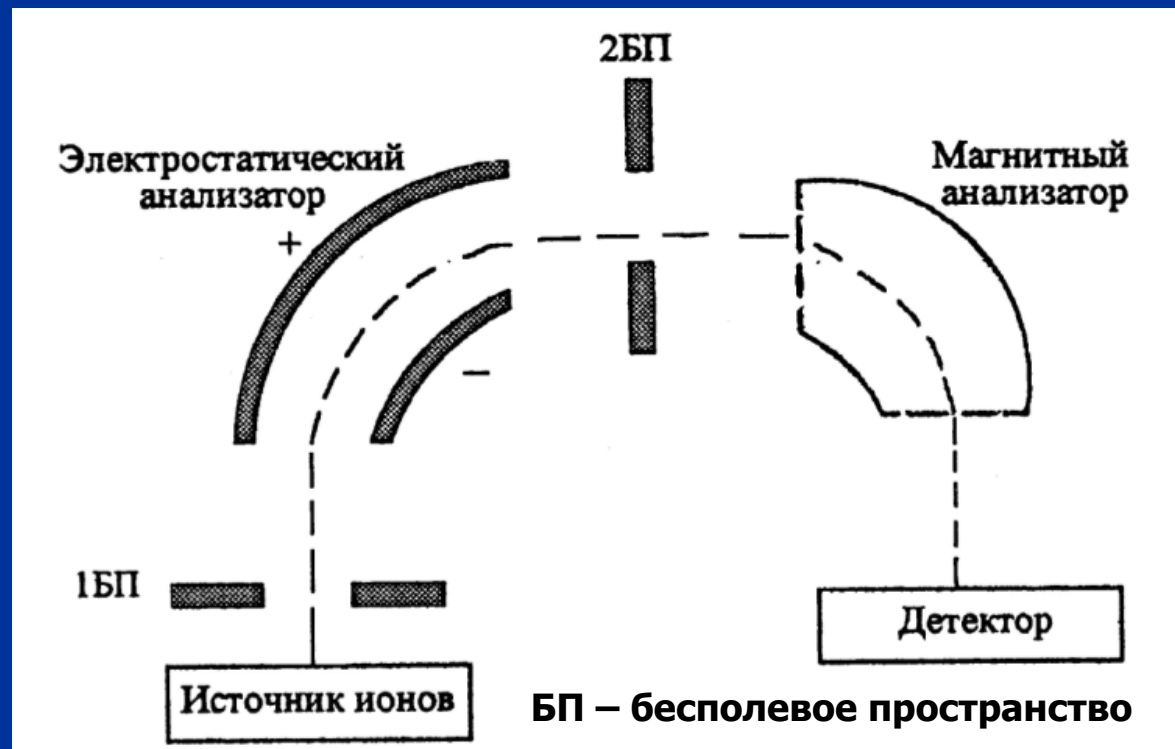


Схема масс-спектрометра с магнитным анализатором

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ (ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЙ) АНАЛИЗАТОР

В электростатическом анализаторе ионы движутся в электрическом поле, создаваемом двумя противоположно заряженными электродами.

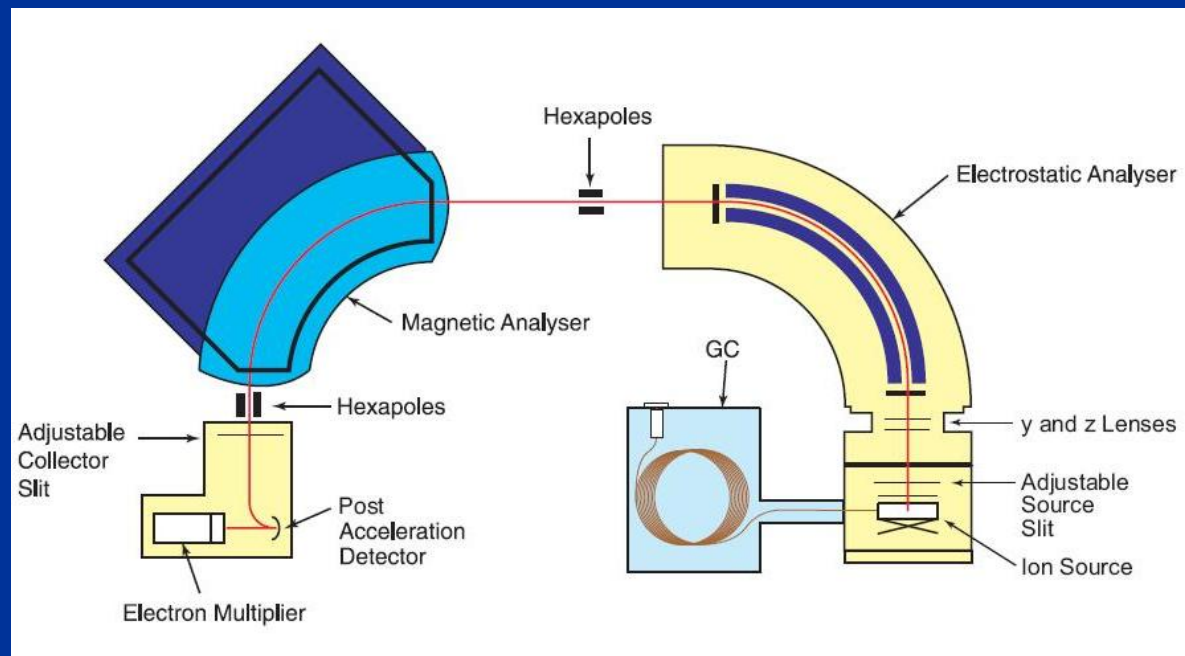


Этот вид анализатора применяется в дополнение к магнитному анализатору для обеспечения большего разрешения прибора (такие приборы называются «приборами с двойной фокусировкой») и для облегчения измерения точных масс, т.к. электрическое поле возможно варьировать более точно, чем магнитное.

Использование двойной фокусировки
позволяет более, чем на порядок, увеличить
разрешающую способность:

с 300, 3000 до 30000,

а в специальных приборах - до 10^6 !!!!

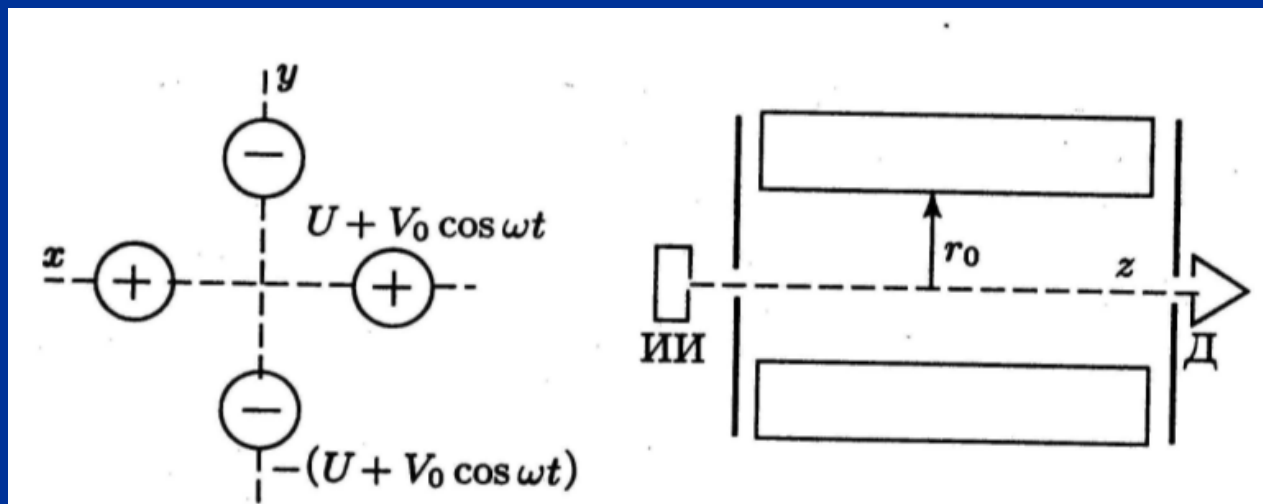


КВАДРУПОЛЬНЫЙ АНАЛИЗАТОР (ЛОВУШКА ПАУЛЯ)



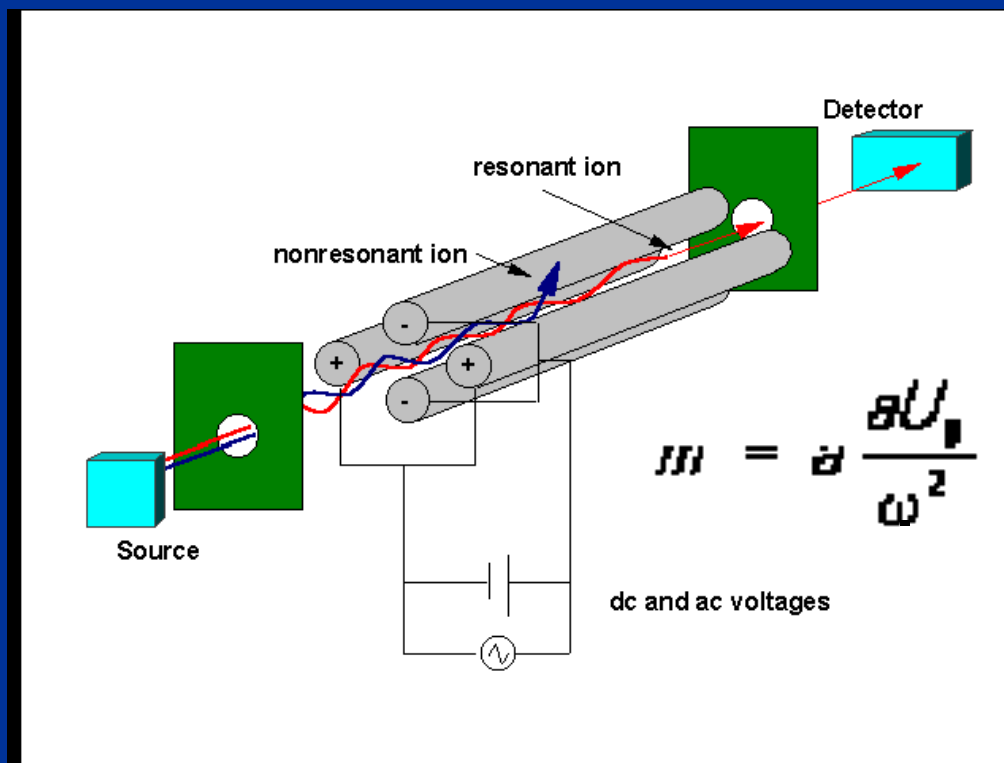
Wolfgang Paul
The Nobel Prize in Physics, 1989

Квадрупольный анализатор представляет собой систему из четырех стержней-электродов, к которым приложены высокочастотные переменное и постоянные напряжения, изменяющиеся во времени как $U + V(\cos \omega t)$, противоположные стержни заряжены одинаково. Внизу показан продольный и поперечный разрез анализатора. Пучок ионов движется от источника ионов (ИИ) к детектору (Д)



КВАДРУПОЛЬНЫЙ АНАЛИЗАТОР

Принцип работы анализатора состоит в том, что под действием постоянного и переменного электрических полей заряженные частицы с массой M 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.

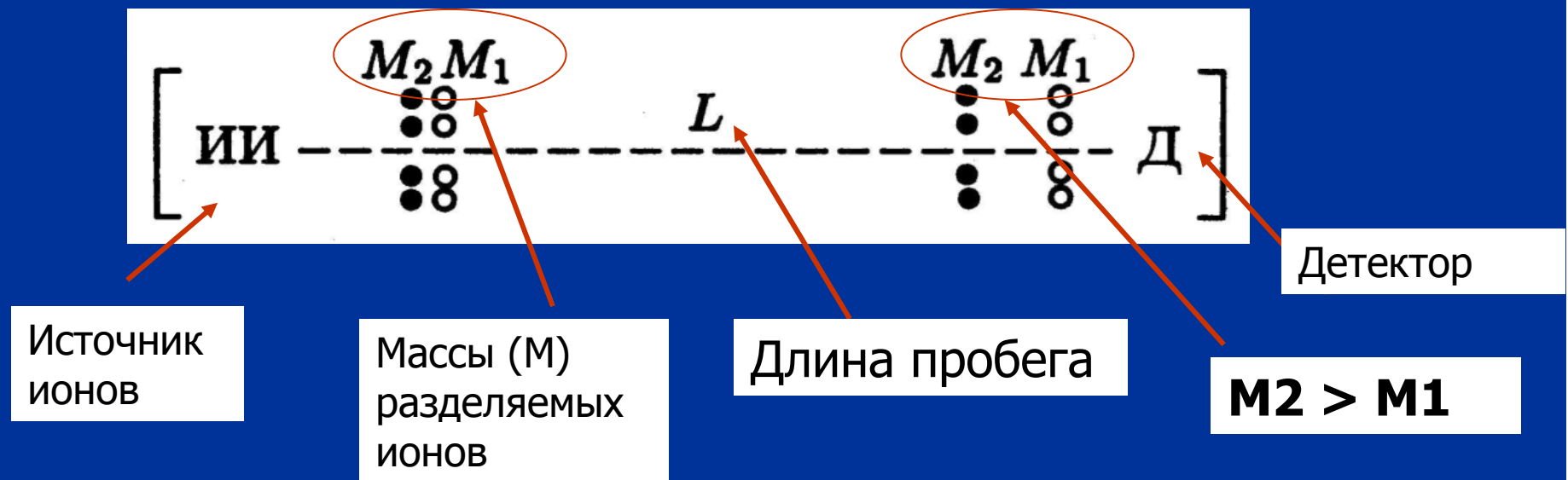


ВРЕМЯПРОЛЕТНЫЙ АНАЛИЗАТОР (TOF, TIME OF FLIGHT)

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

$$eV = mv^2 / 2 \longrightarrow m = 2eV / v^2$$

где V – ускоряющее напряжение. Если ионы движутся в полый трубе, то детектора они достигают в порядке увеличения своей массы.



ВРЕМЯ-ПРОЛЕТНЫЙ АНАЛИЗАТОР

ДОСТОИНСТВА:

Очень быстрый

Можно измерить очень широкий диапазон масс - могут использоваться для измерений масс огромных молекул (с массами в десятки и сотни тысяч атомных единиц).

Наиболее подходящий метод ионизации – MALDI

Относительно небольшая стоимость

НЕДОСТАТКИ:

Низкая точность измерения массы для больших масс:
+/- 500 Да.



СХЕМА MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРА

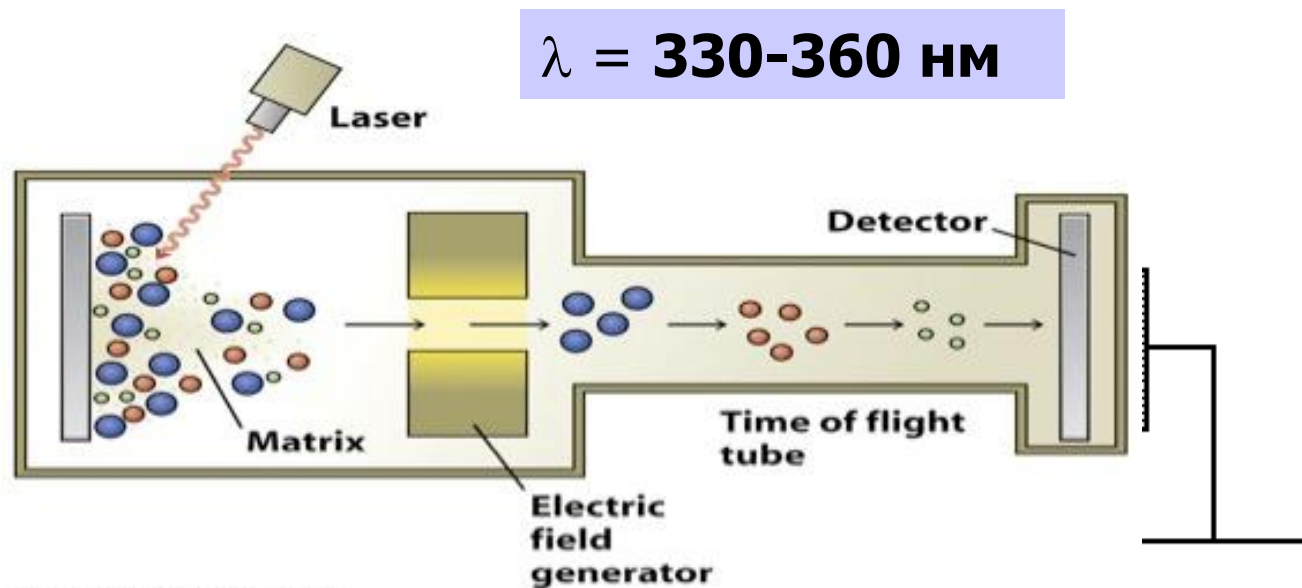
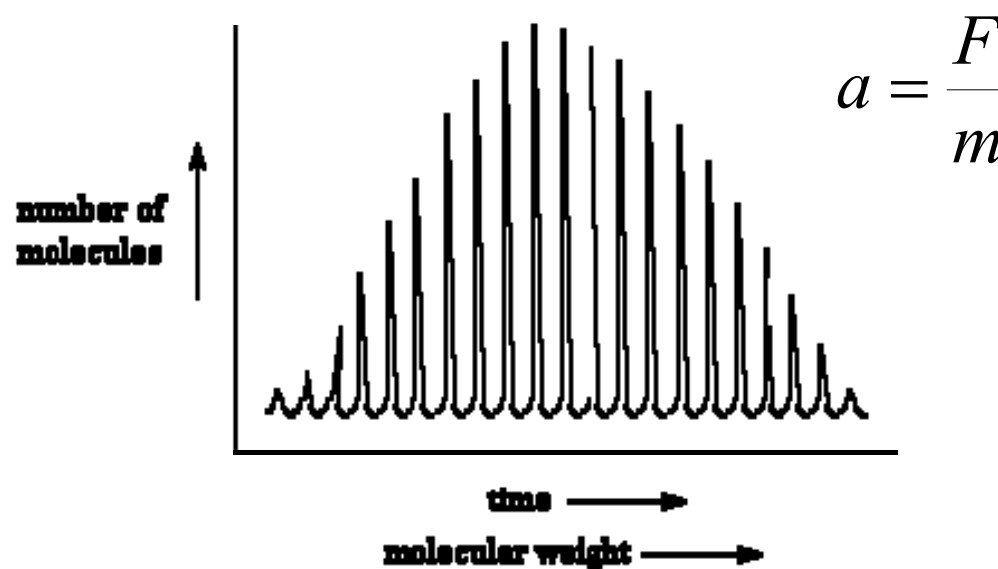


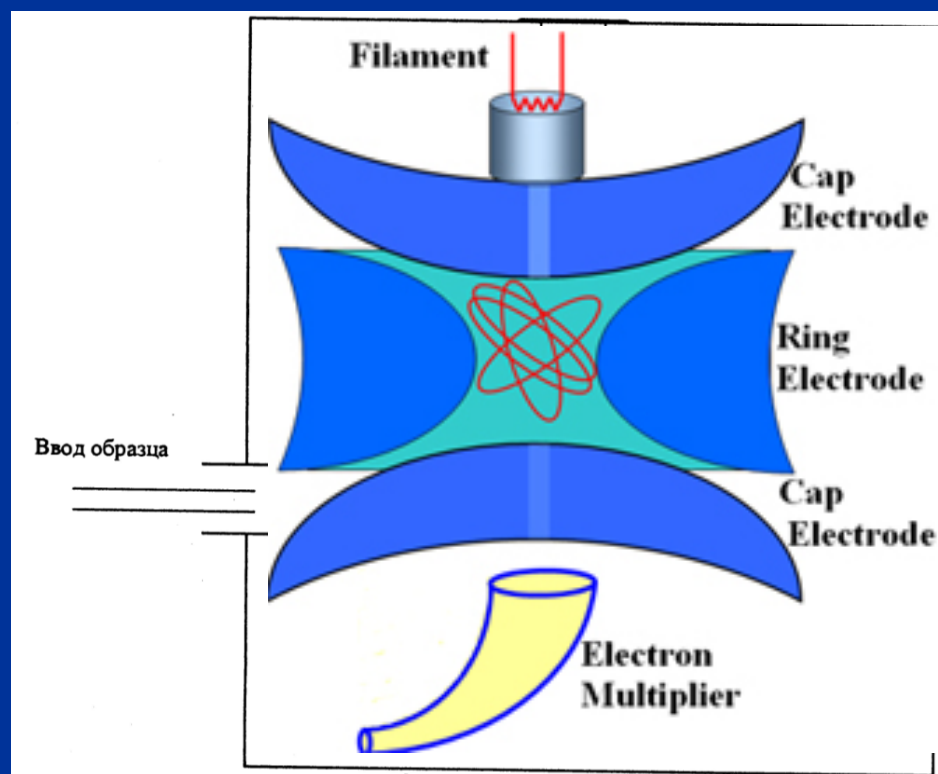
Figure 3-14b Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.



ИОННАЯ ЛОВУШКА

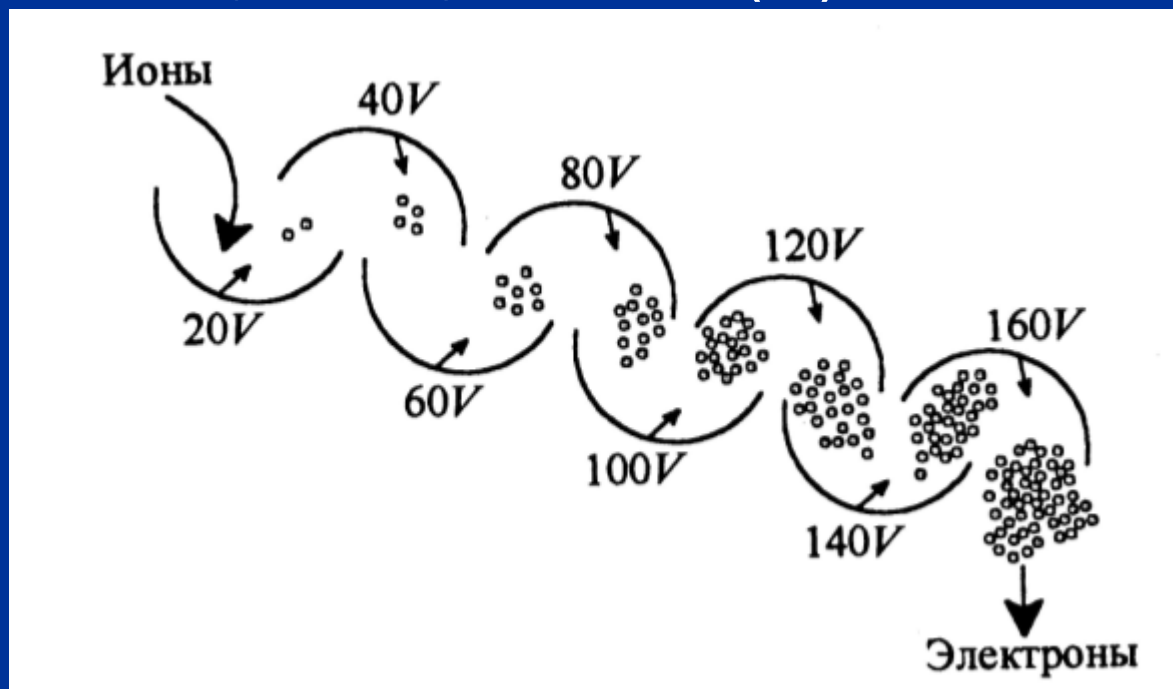
Эта система электродов создает поле, позволяющее удерживать ионы достаточно долгое время. Для ионизации образца используется электронная или химическая ионизация в импульсном режиме (0,1 – 10 мс). Образовавшиеся ионы удерживаются полем центрального электрода, под воздействием которого ионы с определенным m/z начинают орбитальное вращение.

Импульсное изменение амплитуды радиочастотного напряжения на центральном электроде заставляет ионы с определенным m/z переходить на нестабильные траектории и покидать ловушку (образованную полем центрального электрода), попадая в систему регистрации - на **электронный умножитель**.



ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ИОНОВ – ЭЛЕКТРОННЫЙ УМНОЖИТЕЛЬ

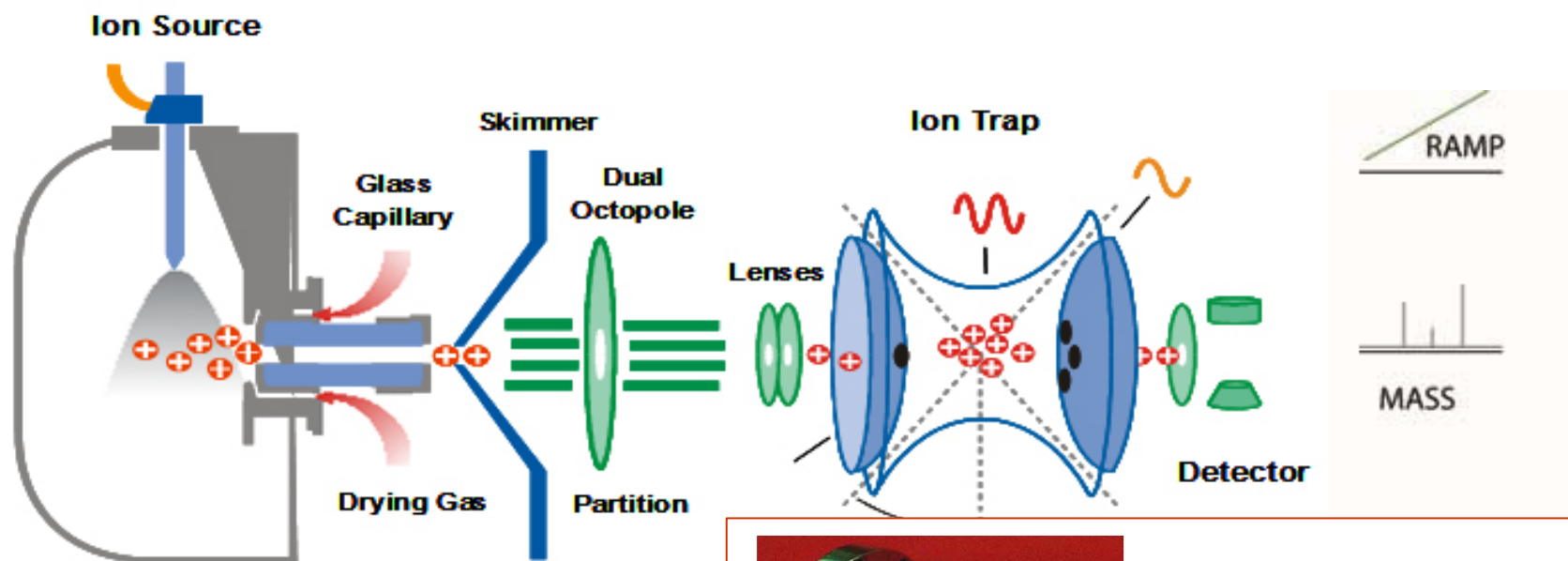
Схема действия электронного умножителя (ЭУ):



Электронный умножитель масс-спектрометра Thermo Electron DFS:

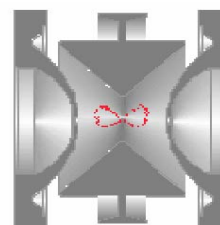


СХЕМА МАСС-СПЕКТРОМЕТРА С ИОННОЙ ЛОВУШКОЙ



<http://www.chem.wm.edu/dept/faculty/jcpout/faculty.html>

Траектория
ДВИЖЕНИЯ ИОНОВ



Ion path in a trap

ИОННАЯ ЛОВУШКА

Преимущества:

- Высокая чувствительность;
- Самый маленький и дешевый из всех применяемых анализаторов;
- В отличие от ранее описанных анализаторов позволяет работать с импульсными методами ионизации

Недостатки:

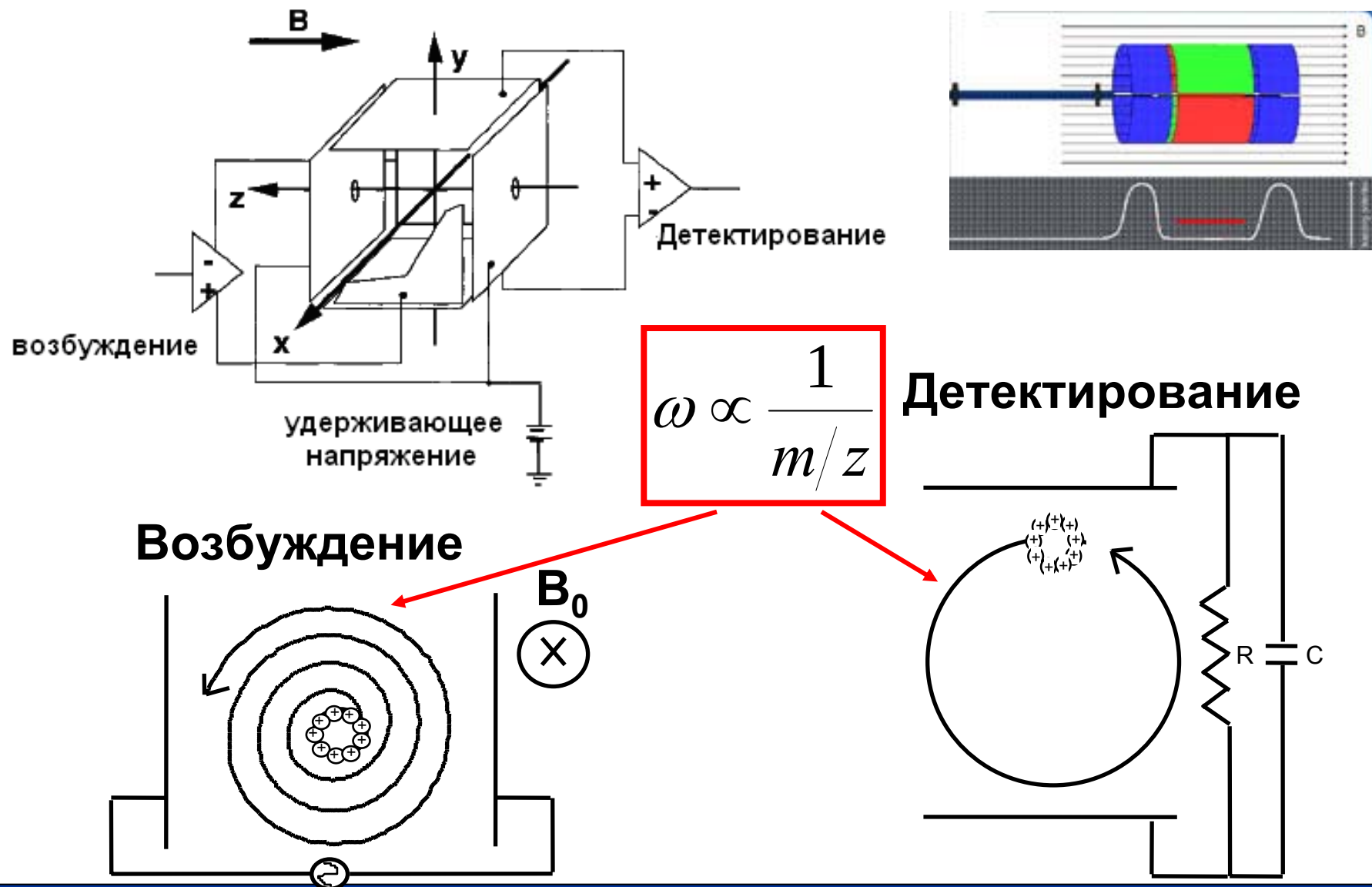
- в ионной ловушке протекают реакции между ионами, что приводит к искажению спектров и сложностям при компьютерной идентификации соединений
- Низкое разрешение и диапазон анализируемых масс

Ion Trap Mass Spectrometer

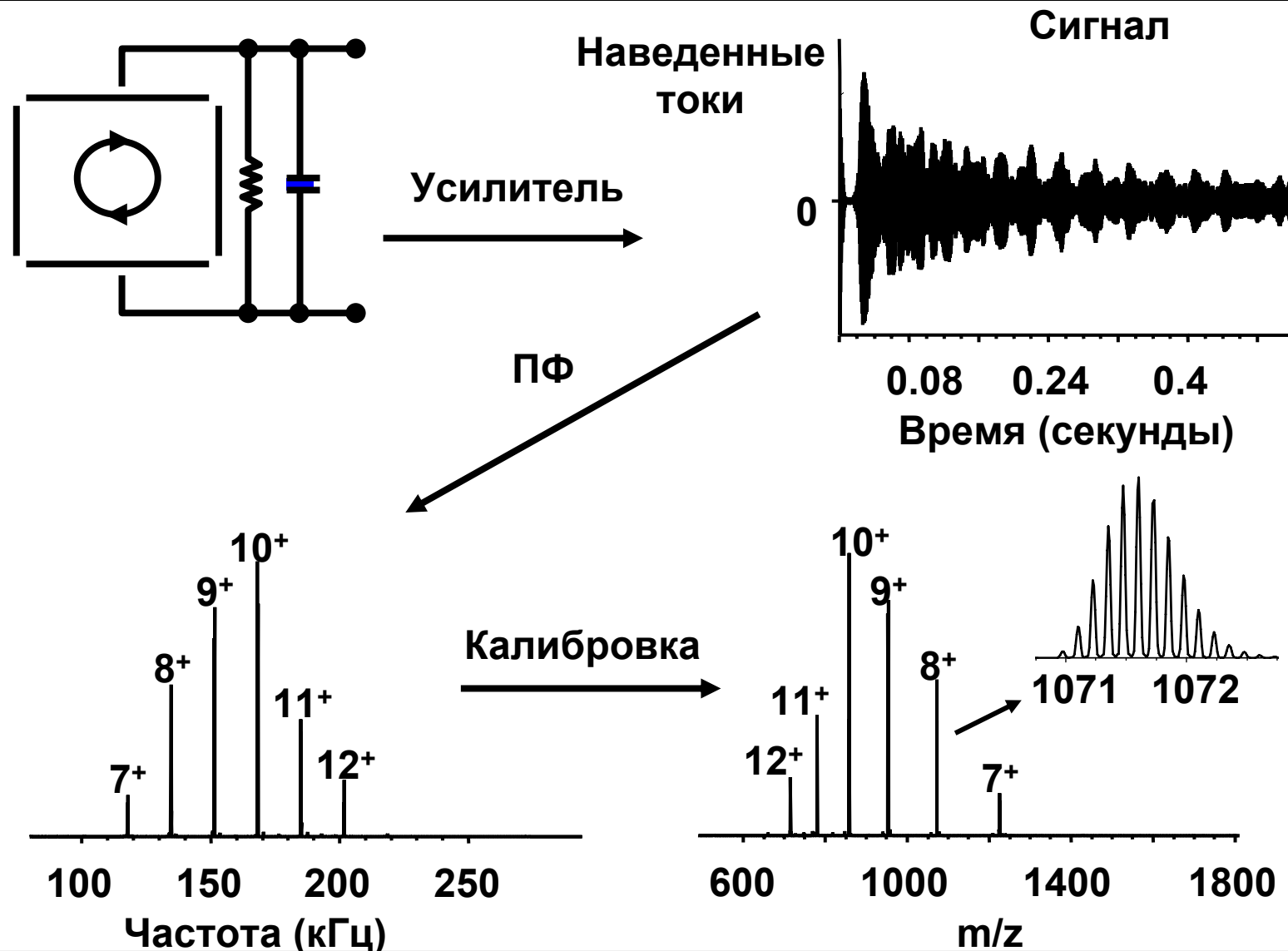


LC000092

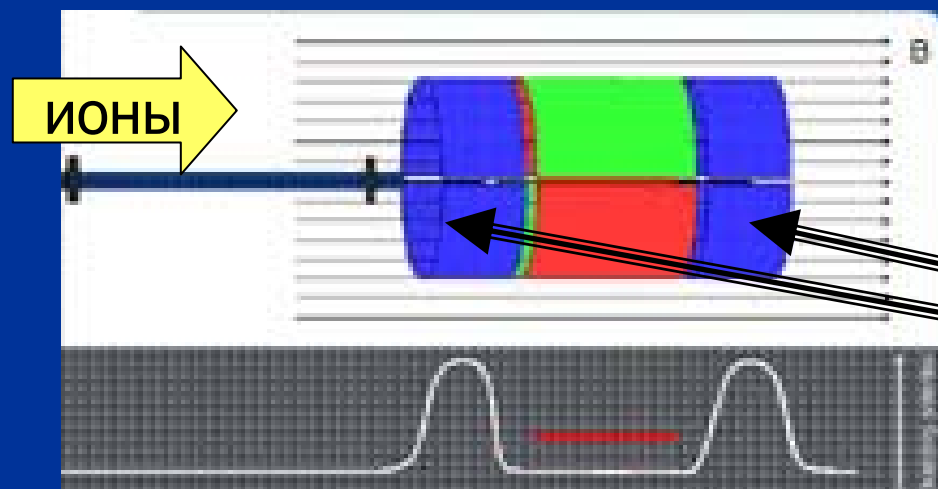
ЛОВУШКА ПЕННИНГА (ЯЧЕЙКА ИОННОГО ЦИКЛОТРОННОГО РЕЗОНАНСА)



ИОННЫЙ ЦИКЛОТРОННЫЙ РЕЗОНАНС С ПРЕОБРАЗОВАНИЕМ ФУРЬЕ



ПРИНЦИПИАЛЬНАЯ СХЕМА FTICR-MS

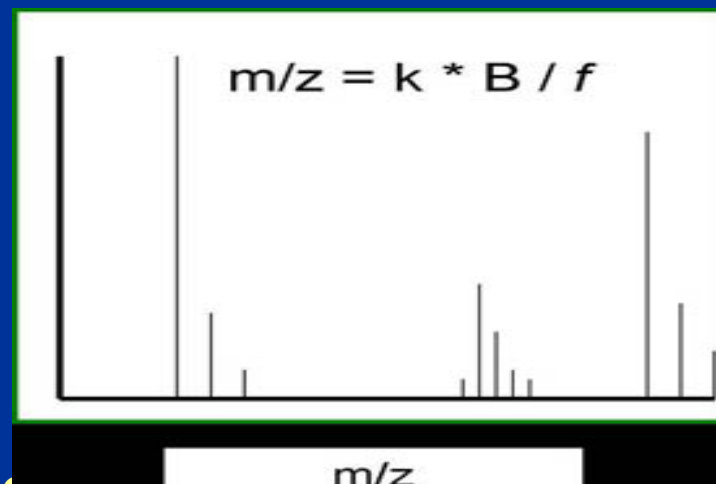
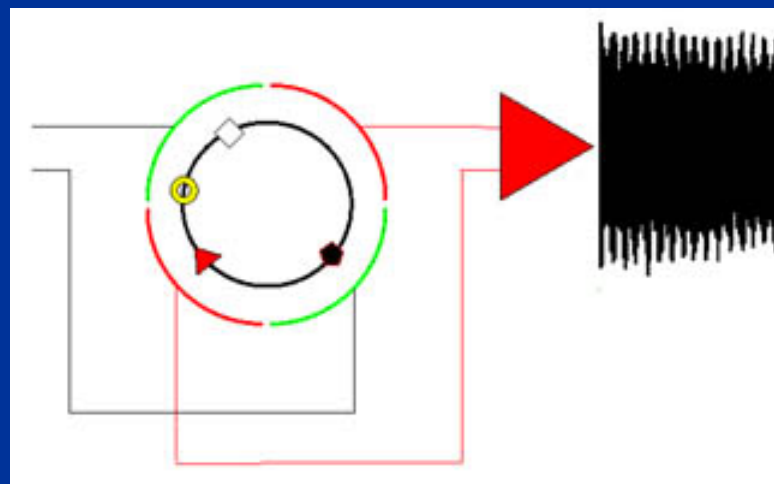


«Сердце» FTICR-
цилиндрическая ячейка

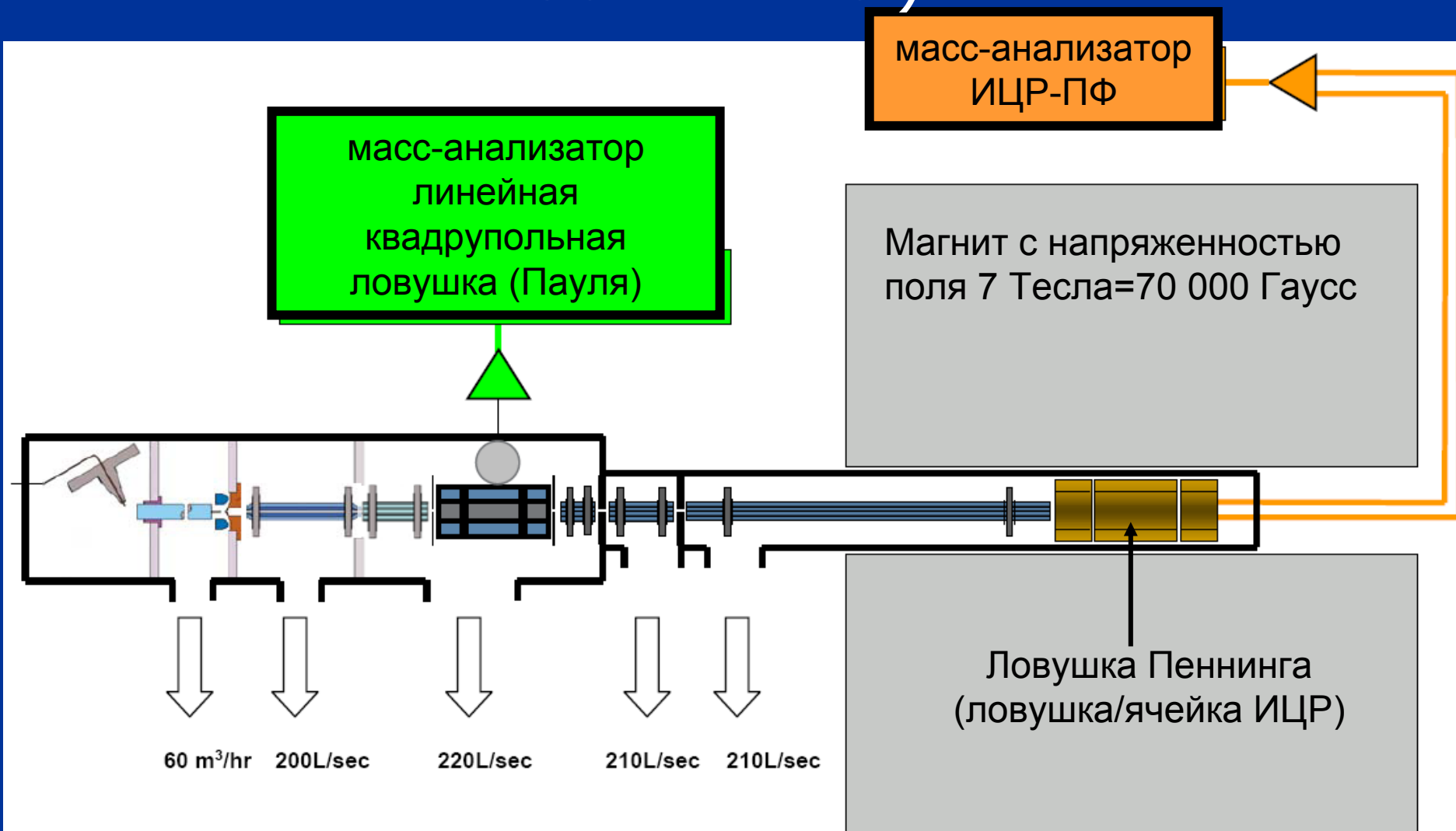
Возбуждающие электроды
(радиочастотное
напряжение)

Ионы индуцируют на детектирующих
электродах частотный «образ тока»

Фурье-преобразование



УСТРОЙСТВО МАСС-СПЕКТРОМЕТРА ИЦР ПФ (FINNIGAN LTQ-FT THERMO FISHER SCIENTIFIC)



ДОСТОИНСТВА FTICR

**Детектирование ионов по наведенному току не деструктивное.
Ион может быть проанализирован за любое разумное время.
Частота может быть измерена с огромной точностью.**



**Высокая разрешающая способность $m/\Delta m 50\% \approx 100,000$
Детектирует ~ 500 однозарядных ионов в диапазоне 90-300 Da
Определение точной массы
Широкий динамический диапазон**

НЕДОСТАТКИ FTICR

Ionic suppression – подавление ионизации трудно ионизируемых ионов легко ионизируемыми
Дефрагментация многозарядных ионов в ячейке
Принципиальная неколичественность – непропорциональность интенсивности сигнала количеству ионов

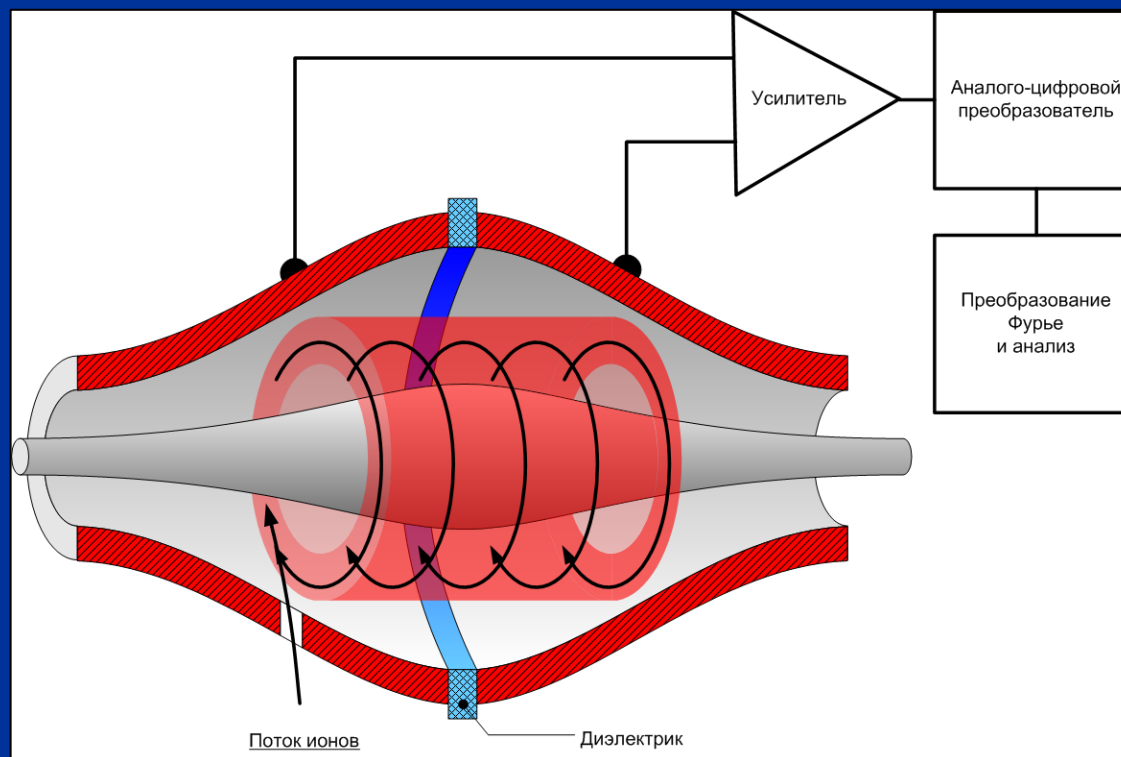


ОРБИТАЛЬНАЯ ЛОВУШКА ИОНОВ

ORBITRAP, 2005 г.



Отличие от других видов ионных ловушек заключается в наличии центрального электрода специальной формы, к которому приложен отрицательный потенциал, а также отсутствие магнитных полей и радиочастот. В основе метода лежит симметричное статическое электрическое поле между внешним и внутренним электродами

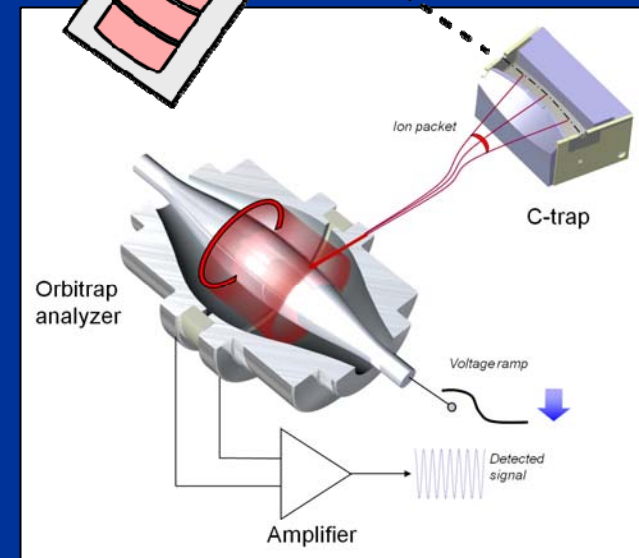
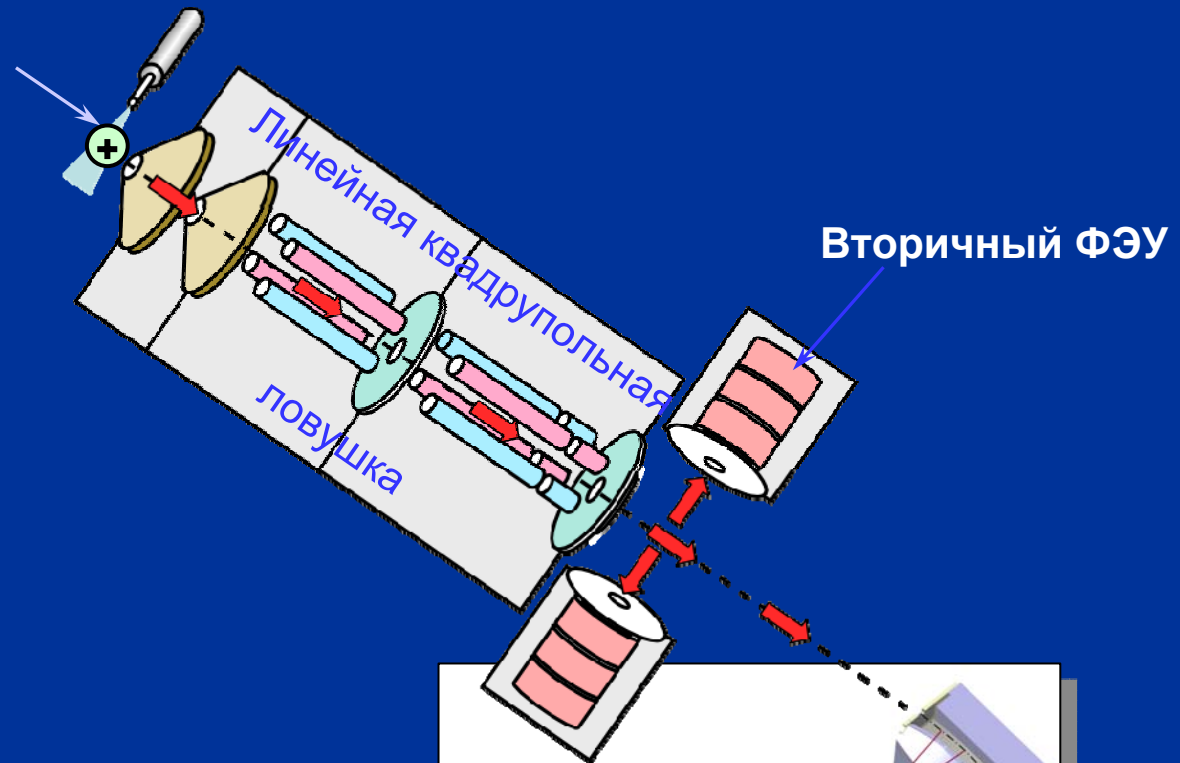
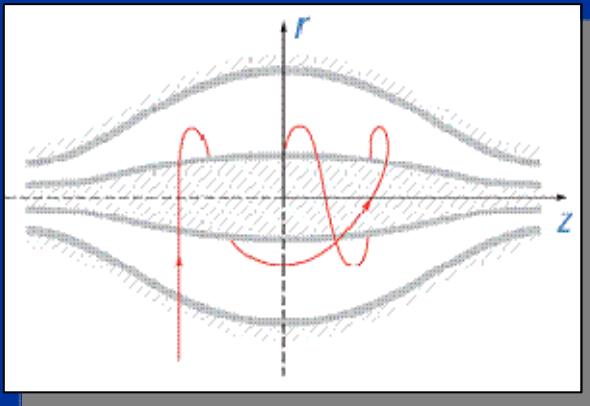


Тип ионизации:

- электроспрей (ESI),
- химической ионизации при атмосферном давлении (APCI),
- атмосферной фотоионизации (APPI)
- MALDI.

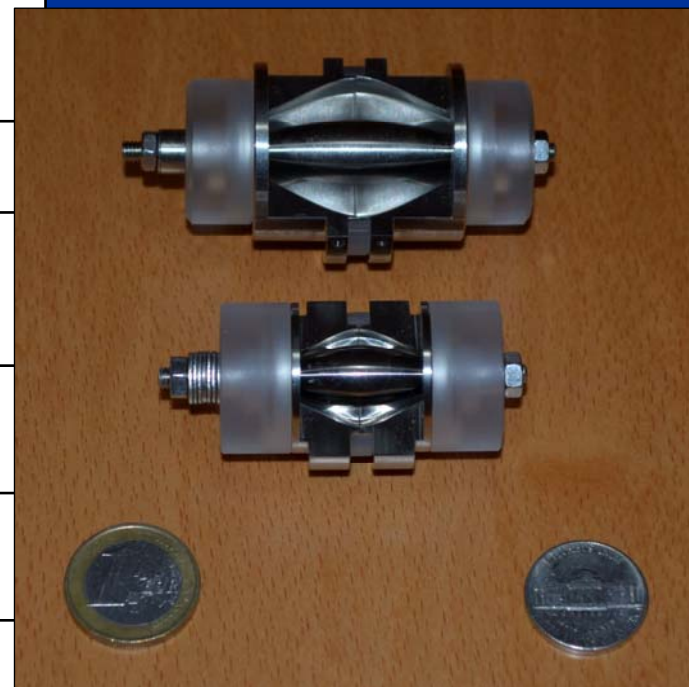
ПРИНЦИП РАБОТЫ ORBITRAP

Электроспрей



АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ LTQ ORBITRAP

Диапазон масс	50 - 2 000 а.е.м. 200 - 4 000 а.е.м.
Разрешение	60 000 @ m/z 400 а.е.м. @ 1 скан/сек
Максимальное разрешение	> 100 000
Точность определения массы	< 5 ppm (внешняя калибровка)
Точность определения массы	< 2 ppm (внутренняя калибровка)
Чувствительность	суб-фемтомоль образца на колонку



Применение:

- Идентификации малых биологических молекул на основе анализа **точных масс** в режимах MS и MSⁿ при недостижимой на других приборах скорости и чувствительности.
- Автоматический анализ точных масс в режиме MSⁿ, зависящий от данных, отлично комбинируется с быстрым LC/MS анализом.

ОРБИТАЛЬНАЯ ЛОВУШКА ИОНОВ

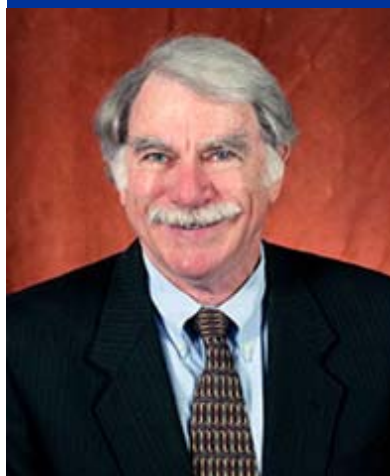
Преимущества:

- высокое разрешение — до 200 000
- совместимость с непрерывными методами разделения
- Диапазон определяемых масс до 50 000
- Высокая точность : 1-2 ppm
- Недеструктивное определение ионов
- Возможность **тандемной** масс-спектрометрии
- Высокая емкость ионов => больше точность измерения, шире динамический диапазон и диапазон m/z

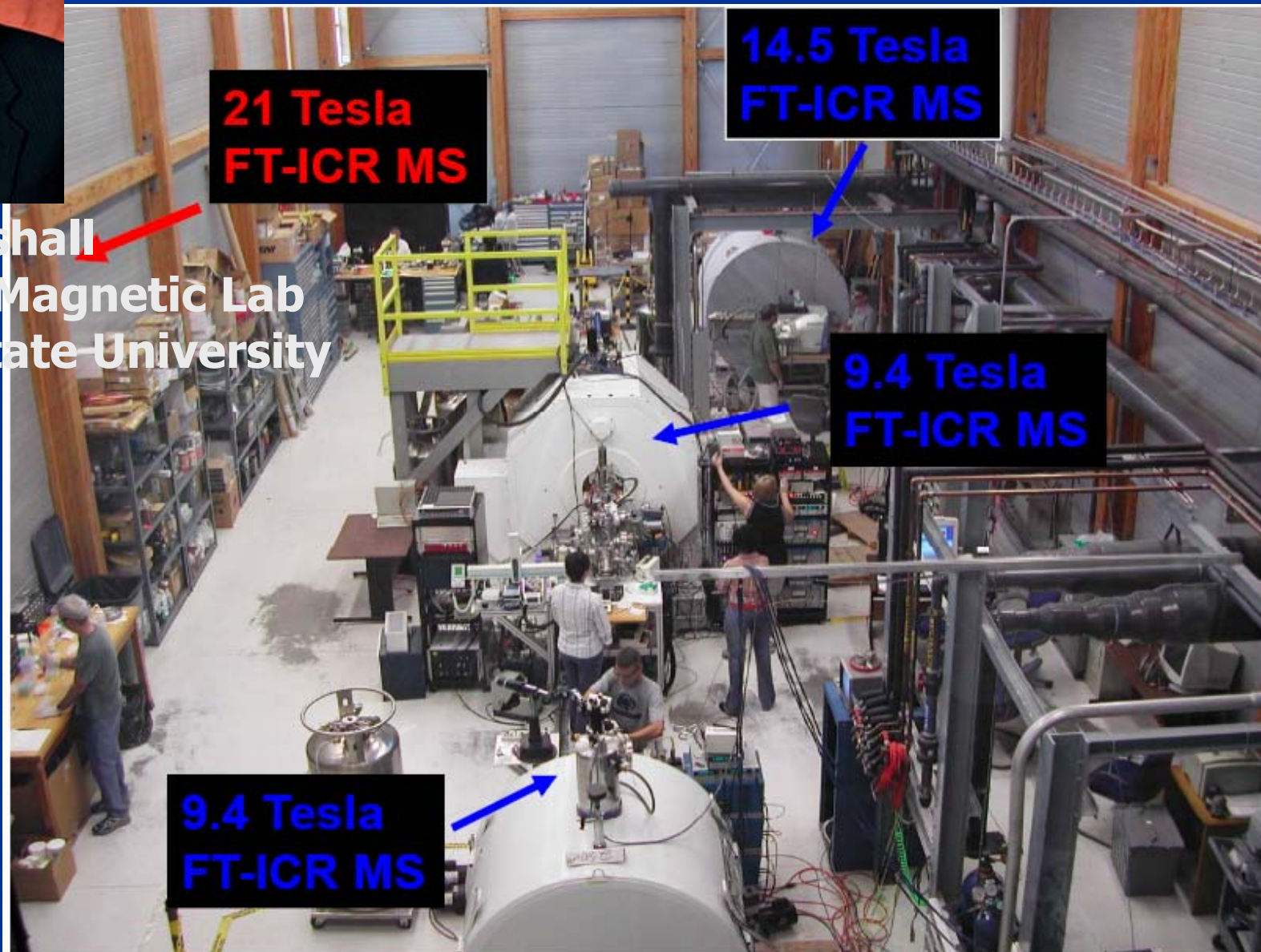
Недостатки:

- Необходимость поддержания очень низкого давления 10^{-10} Торр
- Максимально стабильное электропитание

ВМЕСТО ВЫВОДОВ: ВПЕРЕД, ЗА НОБЕЛЕВКОЙ!



Alan Marshall
National Magnetic Lab
Florida State University

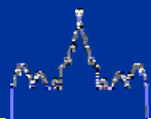


РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. А. Т. Лебедев "МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ" МОСКВА БИНОМ *Лаборатория знаний* 2003
2. Р. Джонстон "Руководство по масс-спектрометрии для химиков-органиков" Перевод с английского Издательство «Мир» Москва 1975
3. Ельцов И.В., Нефёдов А.А., "Физические методы установления строения органических соединений" (презентация), кафедра органической химии факультета естественных наук Новосибирского государственного университета (<http://fen.nsu.ru/posob/organic/physmethods/lec/Theme1.%20Lec1.ppt>)
4. С.В.Абрамов "Масс-спектрометрия: краткая история, общие принципы и современная аппаратура" МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, лекции 1-2 (<http://nano.msu.ru/education/materials/courses/V/special>)
5. М. Токарев "Что такое масс-спектрометрия и зачем она нужна" (<http://www.chromatec.ru/>)
6. Р.С.Борисов, В.Г.Заикин, А.В.Варламов, Л.Н.Куликова «Методы ионизации в масс-спектрометрии» <http://web-local.rudn.ru>

СПАСИБО ВСЕМ!

Особая благодарность
А.С. Кононихину и Г.В. Владимирову за
предоставленные слайды по
МС ИЦР ПФ и Орбитрэп и всей группе
профессора Е.Н. Николаева за введение в мир
большой масс-спектрометрии ☺



Следующая лекция:

Масс спектрометрия сверхвысокого разрешения природного органического вещества: способы интерпретации данных

