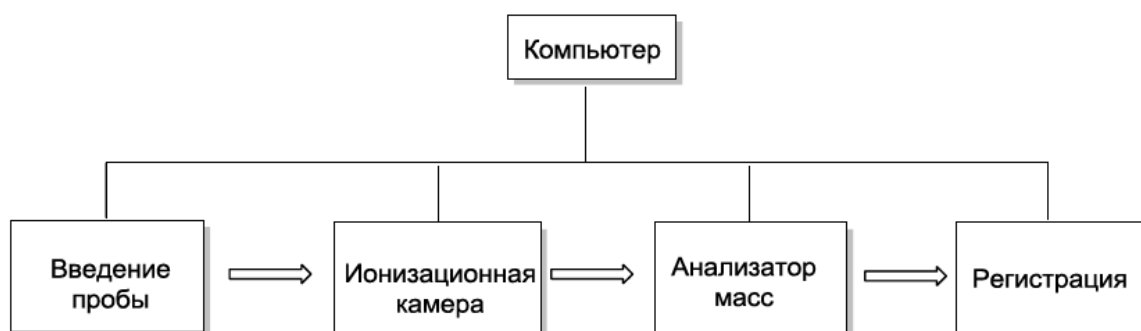


Метод масс-спектрометрии

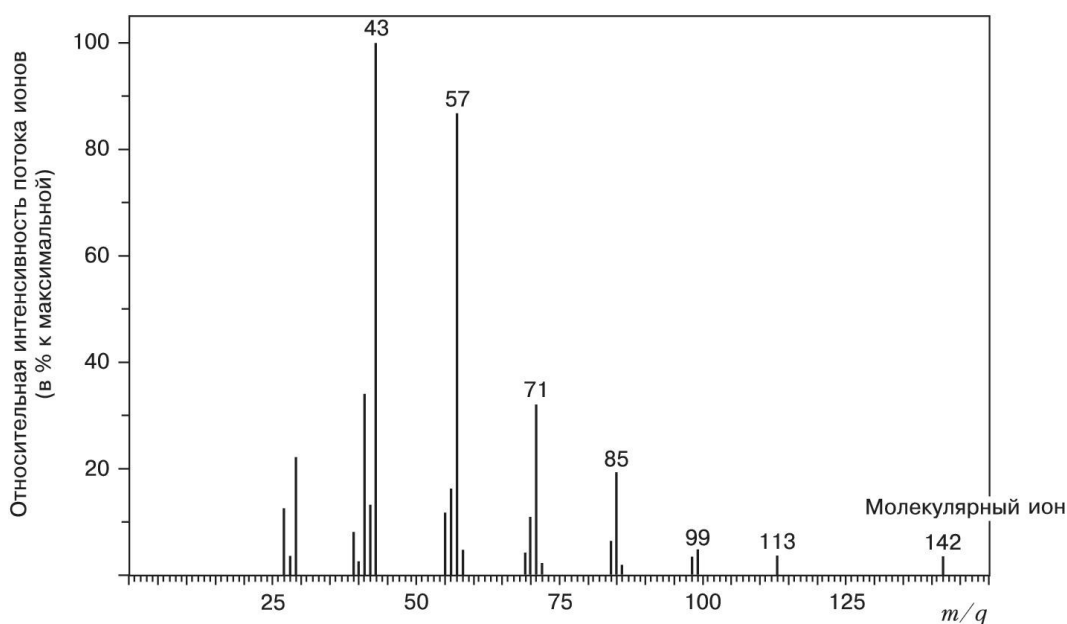
1. Основы метода. Данный метод принципиально отличается от рассмотренных выше спектроскопических методов. Структурная масс-спектрометрия основана на ионизации органической молекулы тем или иным способом. Образующиеся ионы сортируются по величинам их отношения масса/заряд (m/z), затем регистрируется число ионов для каждого значения этого отношения в виде спектра. На рисунке представлена общая схема типичного масс-спектрометра.



Таким образом, метод масс-спектрометрии основан на превращении определяемых компонентов в ионизированные частицы и их разделении в газовой фазе в соответствии с их массовыми числами – отношением массы (m) к заряду (z). В масс-спектрометрии объект исследования не молекула, а соответствующая заряженная частица (катион) и заряженные продукты его распада. К ионизации вещества в масс-спектрометрии прибегают потому, что существуют эффективные методы управления пучками заряженных частиц с помощью магнитных и электрических полей.

При использовании разных методов ионизации веществ в ионизационной камере создаются пучки ионов. Эти пучки, содержащие ионы разных масс, направляются далее в анализатор, где под влиянием полей разной природы происходит распределение заряженных частиц по массе. Регистрация этих ионов в коллекторе позволяет получить масс-спектр – зависимость интенсивности пика от массового числа. Современные масс-спектрометры укомплектованы специализированным программным обеспечением: компьютеры контролируют накопление, хранение и визуализацию данных. В

настоящее время стала обычной практика объединения масс-спектрометра с газовым (ГХ-МС) или жидкостным (ЖХ-МС) хроматографом. На рисунке для примера приведен масс-спектр декана ($C_{10}H_{22}$).



Теоретические и экспериментальные основы масс-спектрометрии были заложены Д.Д. Томсоном, который впервые в 1912 г. создал прибор для получения спектра масс положительных ионов. Его ученик Ф. Астон в 1918 г. существенно повысил разрешение за счет лучшей фокусировки ионного пучка и на своем масс-спектрографе впервые открыл изотопы элементов. Наряду со статическими полями для получения масс-спектров используют переменные электрические поля в динамических масс-спектрометрах. Это позволяет исключить из их конструкции громоздкие магниты.

Все масс-спектрометры подразделяются на два класса: приборы низкого (единичного) и высокого разрешения (R). Спектрометры низкого разрешения – приборы, на которых можно разделить целые массы до m/z 3000 ($R = 3000/(3000-2990) = 3000$). На таком приборе соединения $C_{16}H_{26}O_2$ и $C_{15}H_{24}NO_2$ неразличимы, поскольку прибор будет фиксировать и в первом, и во втором случае массу 250. Приборы высокого разрешения ($R = 20000$) смогут различить соединения $C_{16}H_{26}O_2$ (250.1933) и $C_{15}H_{24}NO_2$ (250.1807), в этом случае $R = 250.1933/(250.1933 - 250.1807) = 19857$. Приборы высокого разрешения могут

измерять массу иона с точностью, достаточной для определения атомного состава, т.е. определять молекулярную формулу исследуемого вещества.

Методы масс-спектрометрии используются для идентификации веществ, определения брутто-формулы веществ и их химического строения. Исключительное значение приобрели методы масс спектрометрии в изучении механизмов химических реакций.

2. Методы ионизации. В современной масс-спектрометрии используется широкий набор методов ионизации исследуемых соединений. Для ионизации используют потоки быстрых частиц – электронов, ионов, атомов, фотонов, а также тепловую и электрическую энергию.

2.1 Ионизация электронным ударом. Электронный удар (ЭУ, electron impact, EI) – наиболее распространенный метод ионизации в масс-спектрометрии в связи с простотой и доступностью источников электронов и их высокой эффективностью. Обычно используют электроны с энергией 50 - 100 эВ. Дополнительным преимуществом этого метода является возможность использования поисковых систем и баз данных (метод ЭУ был исторически первым методом ионизации, основные базы экспериментальных данных получены на приборах с ЭУ).

Молекула вещества пробы в газовой фазе подвергается бомбардировке электронов с высокой энергией (обычно 70 эВ) и выбрасывает электрон, образуя катион-радикал, называемый **молекулярным ионом**:

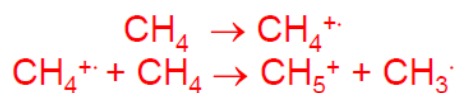


Газообразные и легколетучие вещества поступают в источник из системы напуска. Труднолетучие и термически неустойчивые вещества испаряют непосредственно в источнике и в виде молекулярного пучка направляют в ионизационную камеру. Положительные ионы, образовавшиеся в ионизационной камере, вытягиваются и ускоряются электрическим полем электродов, находящихся под напряжением 1-3 кВ. Давление в камере 10^{-3} Па.

Поскольку энергия ионизирующих электронов намного превышает энергию ионизации молекулы (~10 эВ), под действием электронного удара

протекают процессы распада молекулярного иона. В результате возникает целый набор заряженных частиц, имеющих различную массу, что и отражается в масс-спектре. Иногда такой набор не содержит молекулярного иона. В библиотеках масс-спектров, полученных ЭУ, лишь у 20% спектров есть молекулярные ионы.

2.2 Химическая ионизация. Этот вид ионизации осуществляется при столкновении иона газа-реагента с исследуемой молекулой. Ионизация молекул газа происходит при помощи электронной ионизации при 150-200эВ и дальнейшего химического превращения газа-ионизатора. В качестве газов-реагентов используют алканы (CH_4 , C_3H_8 , $(\text{CH}_3)_3\text{CH}$), NH_3 , CO , N_2 , инертные газы. Из метана получают реактивные ионы CH_5^+ и C_2H_5^+ , из пропана C_2H_5^+ и C_3H_7^+ , а из изобутана - C_3H_7^+ и C_4H_9^+ .



Эти ионы являются сильными кислотами Льюиса. В ион-молекулярных реакциях они либо присоединяют протон к молекуле с образованием иона $(\text{MH})^+$, либо отщепляют гидрид-ион с образованием иона $(\text{M-H})^+$. Преимущество метода химической ионизации состоит в понижении фрагментация молекулярного иона. Удобен для установления энергетических характеристик молекул, радикалов, ионов. *Недостатки:* незначительная фрагментация молекулярных ионов, невозможность работы с образцами, которые нельзя перевести в газовую фазу.

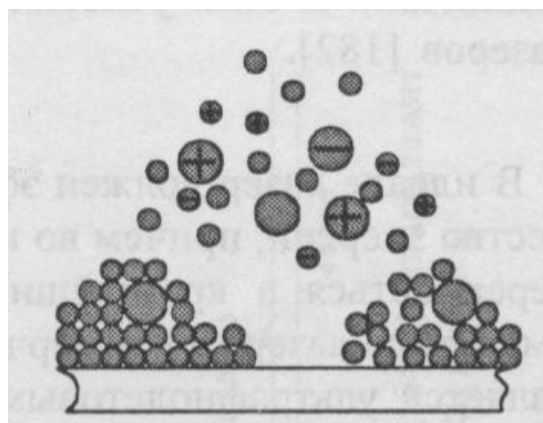
2.3 Фотоионизация. Энергия ионизирующего излучения составляет 7-15 эВ, длина волны 80 - 120 нм. Для получения монохроматического ионизирующего светового потока используют ультрафиолетовое излучение разряда в благородных газах. Фотоионизационные источники ионов обладают высокой монохроматичностью излучения и обеспечивают большую точность в оценке ПП по сравнению с методикой электронного удара. Масс-спектры с использованием фотоионизации имеют значительно меньшее число линий. Однако преимущества этого метода реализуются при преодолении больших

технических трудностей, поэтому фотоионизация не столь широко применяется, как ионизация электронным ударом.

2.4 Полевая ионизация. Она достигается на электродах в виде острия или тонкой проволоки при градиенте поля $\sim 10^7$ - 10^8 В/см. Под влиянием такого сильного неоднородного электрического поля происходит туннельный переход электрона от молекулы к аноду за 10^{-12} с и образуется положительный ион-радикал, который выталкивается этим полем. Обычно при ионизации электрическим полем не происходит значительной фрагментации, наблюдается, в основном, образование молекулярных ионов. Увеличение напряжения приводит к диссоциативной ионизации. Недостатками метода являются низкое значение ионного тока и плохая воспроизводимость масс-спектра.

2.5 Поверхностная ионизация. Ионный поток можно получить эмиссией положительных ионов с поверхности, нагретой до высоких температур. В качестве «рабочего» металла (материала для нагрева) обычно используют вольфрам или оксидированный вольфрам. Температурная зависимость ионных токов в этом методе позволяет определять потенциалы ионизации атомов, молекул и радикалов.

Близкий подход используют в **матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI)**. Широко используется для анализа труднолетучих соединений (биомолекул). *Матричная лазерная десорбция* – это метод, при



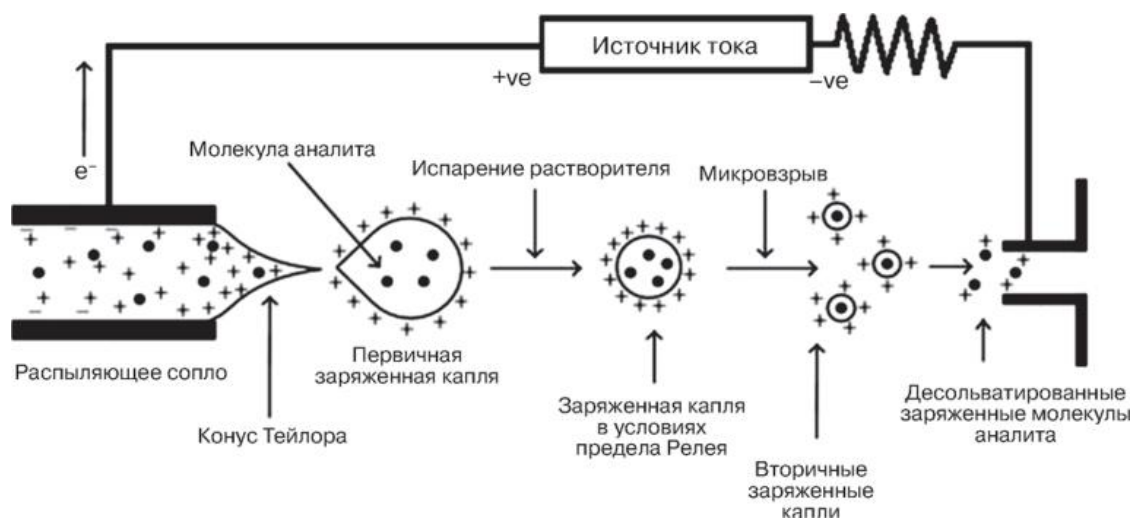
котором исследуемое вещество помещают в «матрицу»-перемешивают с веществом, имеющим меньший молекулярный вес и отличающимся высокой способностью поглощать лазерное излучение (например, коричневая кислота, 3-гидроксипиколиновая кислота, 6,7-гидроксикумарин и т.д.). Перемешивание происходит при помощи 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 (0.1нс...1мкс) лазерного излучения. 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.

Достоинства: возможность анализа крупных молекул (массой до 100000 дальтон и выше). Мягкая ионизация образца. Возможность анализа загрязненных примесями образцов. *Недостатки:* малоинформативный масс-спектр, присутствуют лишь пики молекулярного иона и его «мультимеров» - частиц, состоящих из нескольких молекул образца с зарядом +1. Долгая пробоподготовка и необходимость подбора условий под образец, подбор вещества для матрицы.

2.6 Ионизация электрораспылением. 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.

Достоинства: Возможность работать с веществами, которые нельзя перевести в газовую фазу. Метод практически идеально подходит для стыковки масс-спектрометра и жидкостного хроматографа. Возможность анализа крупных (до нескольких миллионов дальтон) молекул. Мягкое (низкоэнергетическое) ионизационное воздействие. *Недостатки:* Вещество должно быть растворимо в полярных растворителях. Масс-спектр малоинформативен, как правило, присутствуют лишь пики комплексов молекулярного иона с катионом (H^+ , Na^+ , K^+), а также многозарядных ионов таких комплексов.

2.7 Комбинированные методы ионизации. Для увеличения эффективности исследования разных молекулярных систем конструируют источники, сочетающие два вида ионизации: электронным ударом и электрическим полем или электронным ударом и химическую ионизацию. Спектры, полученные двумя разными методами, могут оказаться более информативными в структурных исследованиях.

3. Масс-анализаторы. Различают два класса масс-спектрометров: *статические и динамические*. В первом для разделения и фокусировки ионов

применяют статические электрические или магнитные поля, а во втором - переменные электрические.

Секторный магнитный анализатор. Первый магнитный масс-спектрометр был сконструирован в 1918 г. Домпстером. Схема его используется и в современных приборах. В магнитных масс-спектрометрах для разделения ионов в масс-анализаторах используют однородное магнитное поле. В этом случае процессы ускорения ионов в электрическом поле и разделения их в магнитном могут быть описаны количественно.

В источнике ионов под воздействием ускоряющего потенциала U_0 ионы приобретают кинетическую энергию $E = zU_0 = 1/2mv^2$, где z – заряд иона, m – масса иона, v – скорость иона. Отсюда $v = \sqrt{2U_0z/m}$. Таким образом, при постоянном ускоряющем напряжении скорость ионов определяется отношением их заряда к массе. Ускоренные ионы попадают в магнитное поле с напряженностью H , силовые линии которого ориентированы перпендикулярно направлению движения ионов. При этом траектории ионов искривляются и превращаются в круговые. На ион, движущийся по круговой траектории, действует центростремительная сила $F_{цс} = Hzv$ и центробежная сила $F_{цб} = mv^2/r$. Условием прохождения пучка ионов по траектории радиусом r является равенство центробежной и центростремительной сил: $Hzv = mv^2/r$. Отсюда

$$r = \frac{1}{H} \sqrt{2H_0 m / z}.$$

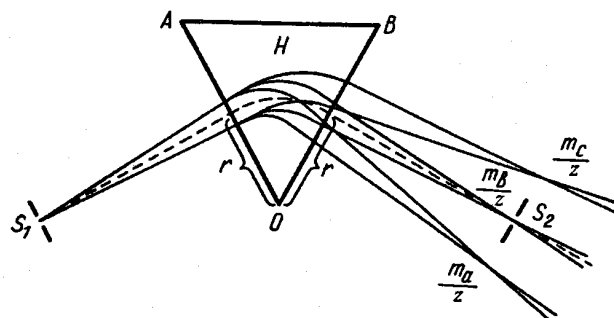


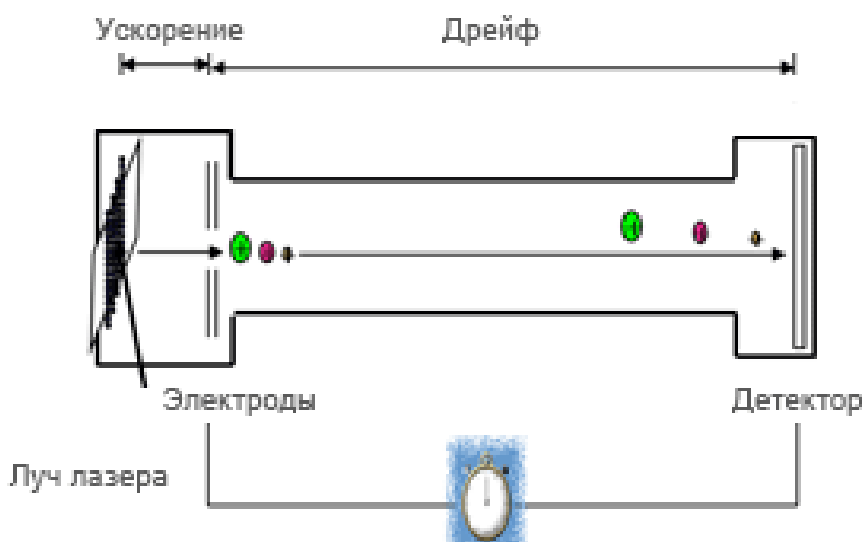
Схема масс-спектрометра с магнитным масс-анализатором.
(OAB – область однородного магнитного поля H)

Таким образом, при постоянной напряженности магнитного поля H и ускоряющего потенциала U траектории ионов с разными отношениями m/z

будут иметь разные радиусы кривизны, в то время как для ионов с одним и тем же отношением m/z радиус одинаков.

Магнитные масс-спектрометры широко применяются в разных областях науки и техники, однако они имеют и недостатки, в частности, относительно низкую скорость измерений, большие габариты и массу, ограничения по массе иона.

Времяпролетный масс-спектрометр. Времяпролетный анализатор масс основан на том, что скорость разогнанных ионов обратно пропорциональна их массам. Принципиальная схема прибора относительно проста. Ионный источник испускает короткие импульсы ионов, поскольку электронная пушка работает в импульсном режиме (несколько микросекунд). Если все ионы начали движение из источника в момент ускоряющего импульса 0,01 мкс, то все они приобрели одинаковую энергию eU . Из равенства $mv^2/2 = eU$ следует, что скорость иона $v = \sqrt{2eU/m}$. Тогда время движения через участок дрейфа L составит: $t = L/v = L \sqrt{m/2eU}$, т.е. ионы разной массы пролетают участок дрейфа за разное время. Место регистрации они достигают в порядке увеличения своей массы. Например, при разности потенциалов 3 кВ и длины трубы дрейфа 0.5 м ион с m/z 500 достигает детектора за 15 мкс, а ион m/z 50 – за 4.6 мкс.



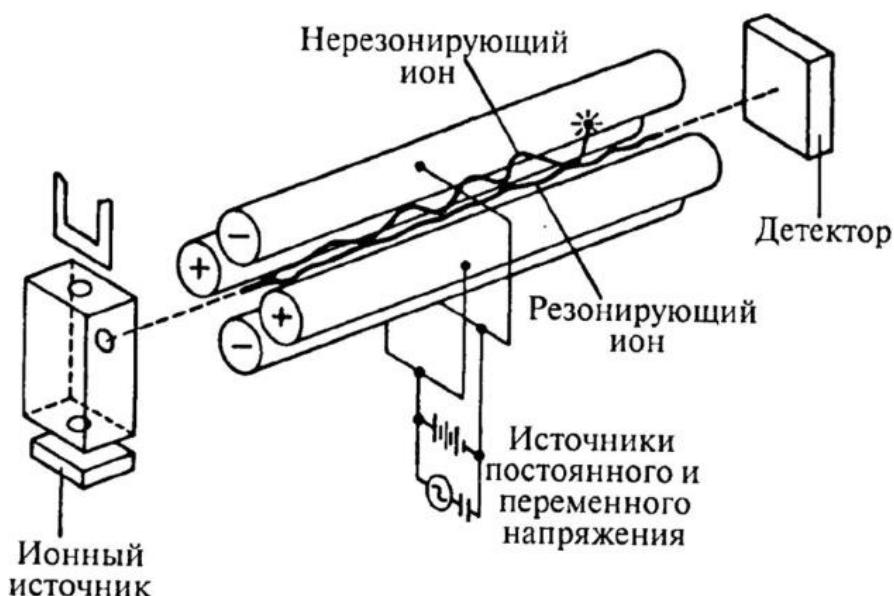
Детектор дает информацию о массе регистрируемых ионов. Период следования импульсов значительно превышает время пролета самых тяжелых

ионов, что позволяет избежать наложения спектра разных импульсов. Весь спектр можно получить за 10^{-3} с. Диапазон массовых чисел практически неограничен.

Квадрупольный масс-спектрометр. Ученые в течение долгого времени искали альтернативу магниту в качестве масс-анализатора. Первым успеха добился профессор Стэнфордского университета Роберт Финниган, построивший в 1967 году первый хромато-масс-спектрометр с квадрупольным анализатором. Квадруполь представляет собой четыре стержня, к которым попарно в противоположной полярности подается определенная комбинация постоянного и радиочастотного переменного напряжений. Противоположные стержни электрически соединены и находятся под напряжением, складывающимся из компоненты постоянного тока и радиочастотной компоненты. Вторая пара стержней имеет равную по величине, но противоположную по знаку компоненту постоянного тока, а фаза радиочастотной компоненты сдвинута на 180° .

Ионы, вводимые в анализатор небольшим ускоряющим напряжением (10 – 20 В), под действием электрического поля колеблются относительно осей x и y . Так как каждый ион имеет свою собственную частоту, зависящую от массы, через квадруполь пролетают только те частицы, частота которых находится в резонансе с частотой квадруполя.

Масс-спектр генерируется сканированием U и v_0 при сохранении постоянной величины U/v_0 . Регистрируемая масса пропорциональна v_0 .



Создание квадрупольных масс-анализаторов стало революцией в масс-спектрометрии. Магнитные масс-спектрометры требуют использования высоких напряжений (тысячи вольт), а квадрупольные нет, и это упрощает его конструкцию, меньшие размеры вакуумной части упрощают систему создания вакуума. Масс-спектрометры уменьшились в размерах, стали проще в эксплуатации и, что самое главное, намного дешевле, что открыло возможность использовать этот аналитический метод многим тысячам пользователей.

4. Детекторы ионов. Для преобразования ионного тока в измеряемый сигнал первоначально использовали фотопластинки. В настоящее время применяют электрический способ регистрации на основе вторичных электронных умножителей ФЭУ, диоды которых покрыты слоем Cu/Be .