

Лекция № 9

Масс-спектрометрические методы анализа (часть 2)

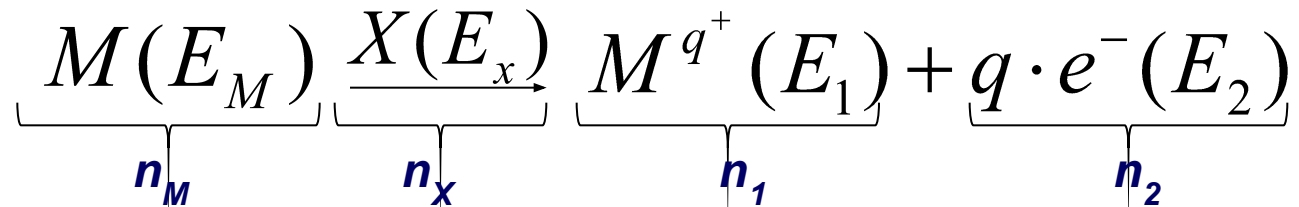
Способы ионизации

- Способы ионизации атомов и молекул зависят от конкретной цели анализа

Способ ионизации	Аналитическое использование
Электронный удар (электронная ионизация)	Изотопный анализ, молекулярный анализ неорганических ионов
Химическая ионизация	Анализ органических соединений
Электроспрей (электрораспыление)	Анализ крупных (до нескольких млн дальтон) молекул
Лазерное излучение	
Бомбардировка пучком ионов	

ИСТОЧНИКИ ИОНОВ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

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



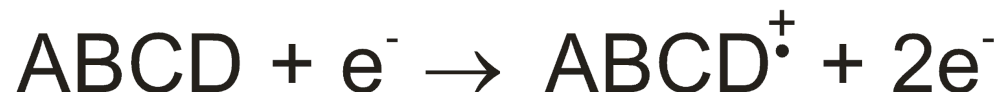
где n_M , n_X , n_1 и n_2 - число частиц в единице объема; E_M , E_x , E_1 , E_2 - энергии соответствующих частиц; q - степень ионизации в большинстве равная 1, поэтому $n_1 = n_2$.

Основные задачи источников ионов:

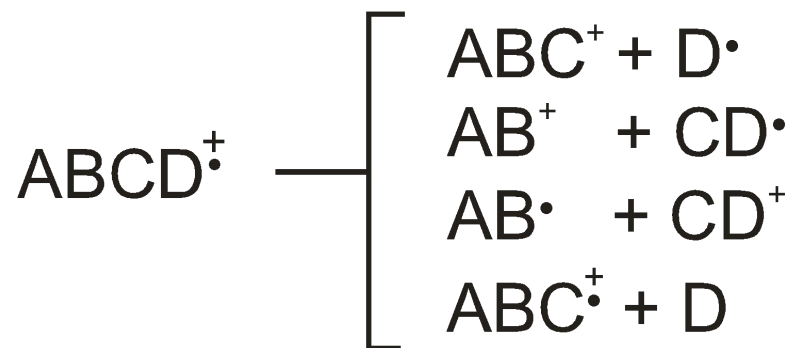
1. Ионизация анализируемого вещества;
2. Ускорение ионов;
3. Формирование ионного пучка

ИСТОЧНИКИ ИОНОВ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

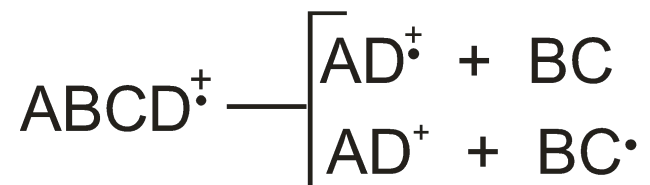
Например, процессы, происходящие при ионизации органических молекул. При бомбардировке молекулы органических соединений теряют один электрон с образованием катион-радикала (молекулярного иона)



С увеличением энергии электрона происходит распад молекулярного иона (его фрагментация):



и внутримолекулярные перегруппировки



ИСТОЧНИКИ ИОНОВ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Основные задачи источников ионов:

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

Механизмы ионизации

- 1. Захват электрона** - при захвате электрона, отрицательный заряд -1 сообщается молекуле при присоединении электрона. Этот механизм ионизации в первую очередь наблюдается для молекул с большим сродством к электрону, таких как галогенсодержащие соединения.
- 2. Отрыв электрона** - как видно из названия механизма, отрыв электрона придаёт молекуле $+1$ положительный заряд при выбивании электрона, так что при этом часто образуются катион-радикалы.

Механизмы ионизации (продолжение)

3. **Протонирование** – механизм ионизации, при котором к молекуле присоединяется протон, сообщая ей заряд $+1$ на каждый присоединённый протон.
4. **Депротонирование** – механизм ионизации, при котором отрицательный заряд -1 получается при отрыве протона от молекулы.
5. **Катионизация** – механизм ионизации, в котором заряженный комплекс образуется при координационном присоединении положительно заряженного иона к нейтральной молекуле. В принципе, протонирование тоже подпадает под это определение, поэтому катионизацией считается присоединение иона, отличного от протона, например щелочного металла или аммония.
6. **Прямой перенос заряженной молекулы в газовую фазу** - перенос соединений, уже заряженных в растворе, легко достигается при использовании десорбции или выбрасыванием заряженных частиц из конденсированной фазы в газовую.

ИСТОЧНИКИ ИОНОВ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Требования, предъявляемые к источникам ионов:

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

ИСТОЧНИКИ ИОНОВ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

**Все обычно применяемые источники ионов
разделяются на две основные группы:**

- 1. Когда образец необходимо переводить в газовую фазу перед ионизацией (источники с электронной ионизацией – EI и химической ионизацией – CI). Наиболее широко используются.**
- 2. В источниках второй группы можно работать со слаболетучими веществами с большой молекулярной массой**

Источники второй группы можно разделить ещё на две подгруппы:

- 2.1. Источники ионов, работающие с растворами образцов
 - ионизация электрораспылением – ESI
 - химическая ионизация при атмосферном давлении – APCI
 - фотоионизация при атмосферном давлении APPI

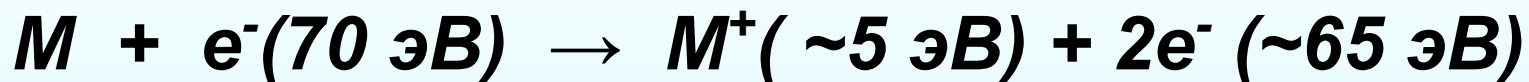
- 2.2. Источники, основанные на протекающих одновременно процессах десорбции и ионизации из твердого субстрата
 - лазерная десорбция-ионизация из матрицы - MALDI

Методы ионизации низкомолекулярных веществ

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

Электронная ионизация (EI)

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

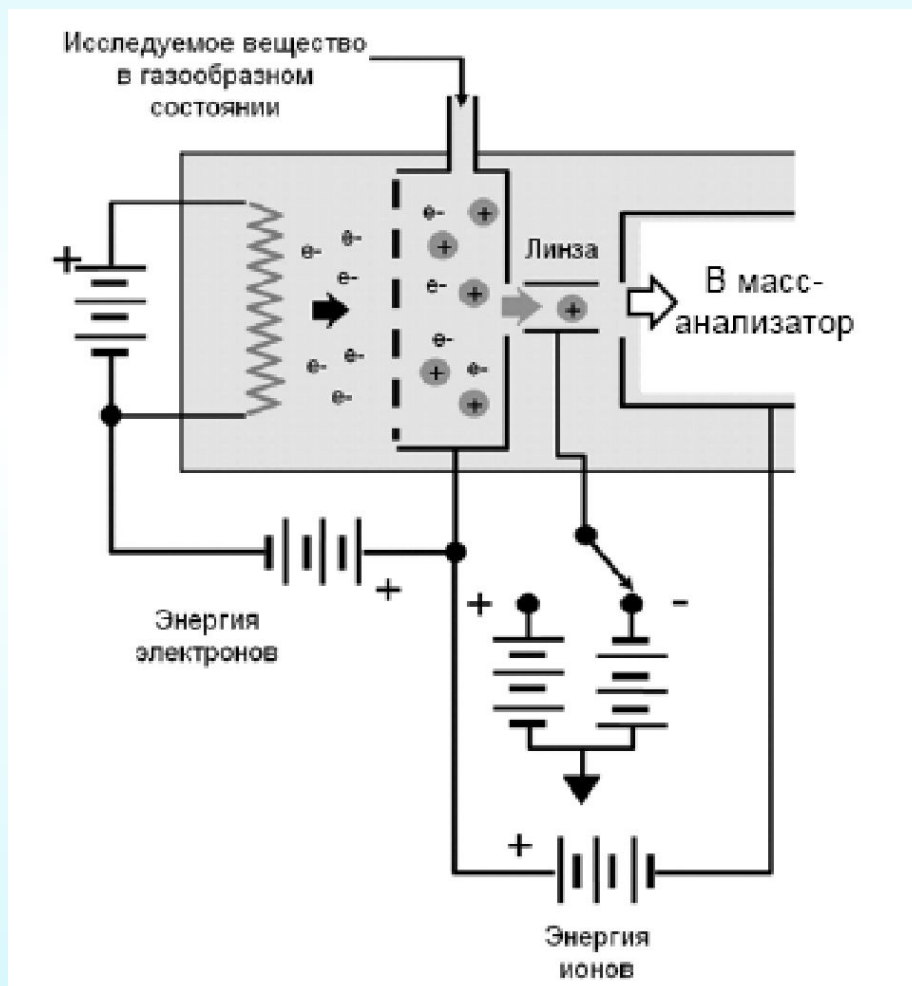


$M^+ \rightarrow$ молекулярные ионы + фрагментарные ионы + нейтральные фрагменты

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

Электронная ионизация (EI)

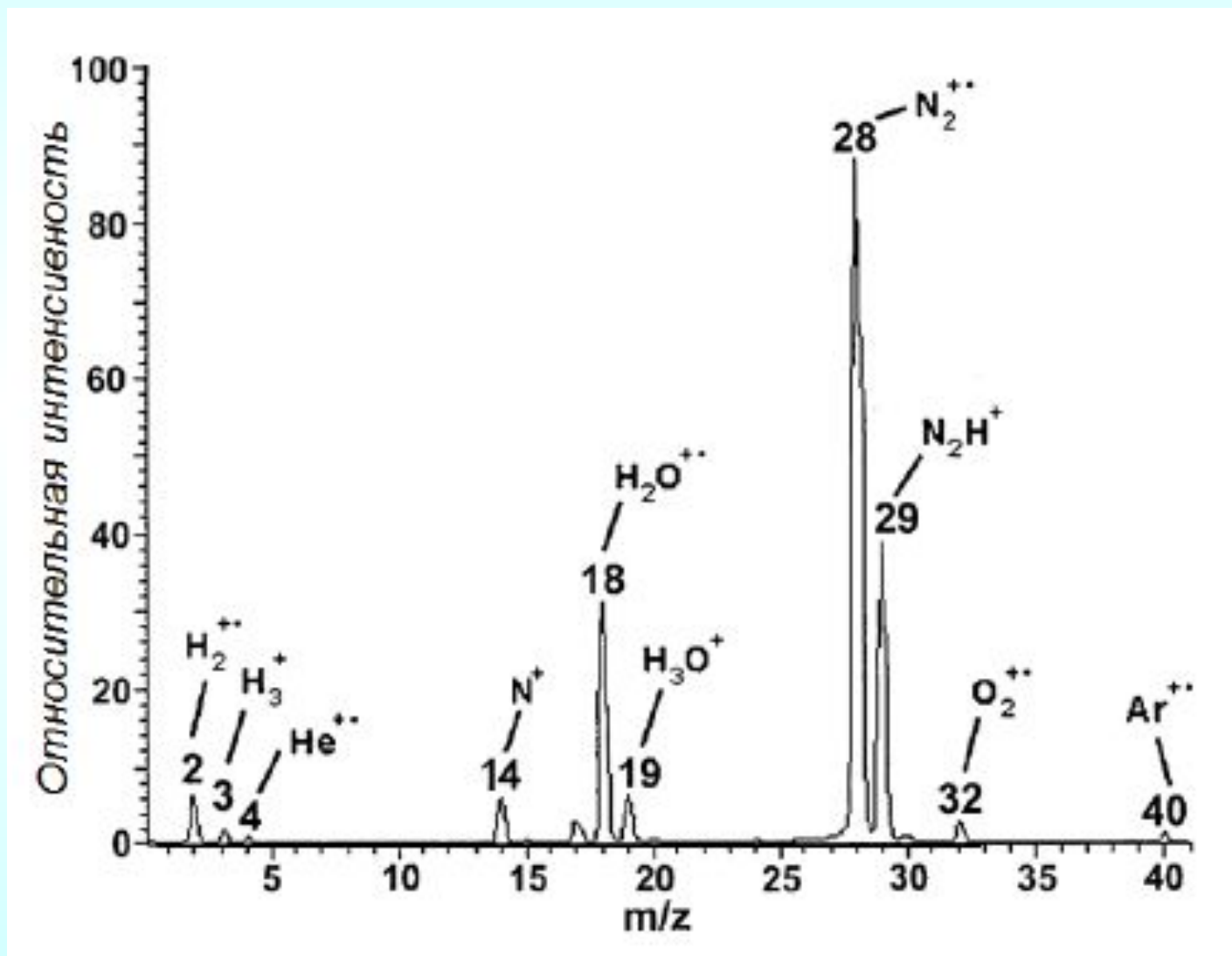
Принципиальная схема ионного источника с электронным ударом



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

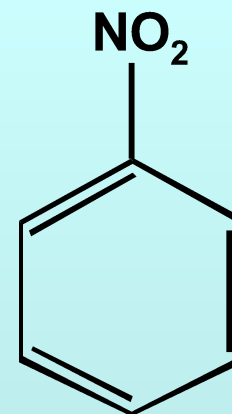
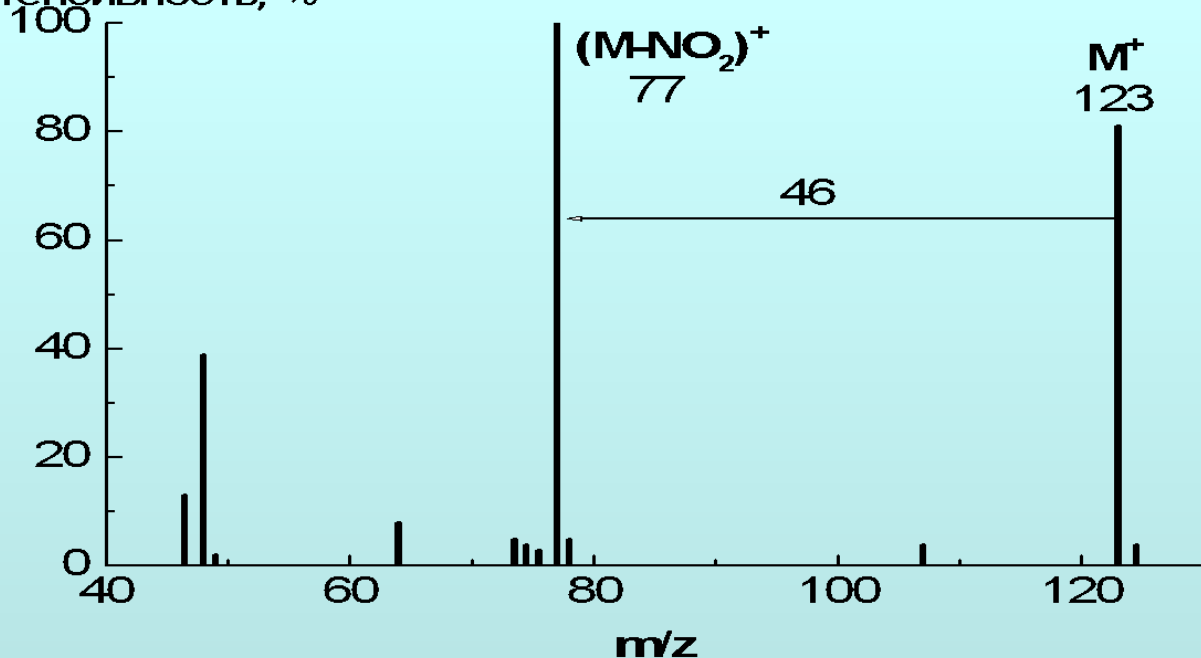


Ионизация электронным ударом. Масс-спектр смеси газов



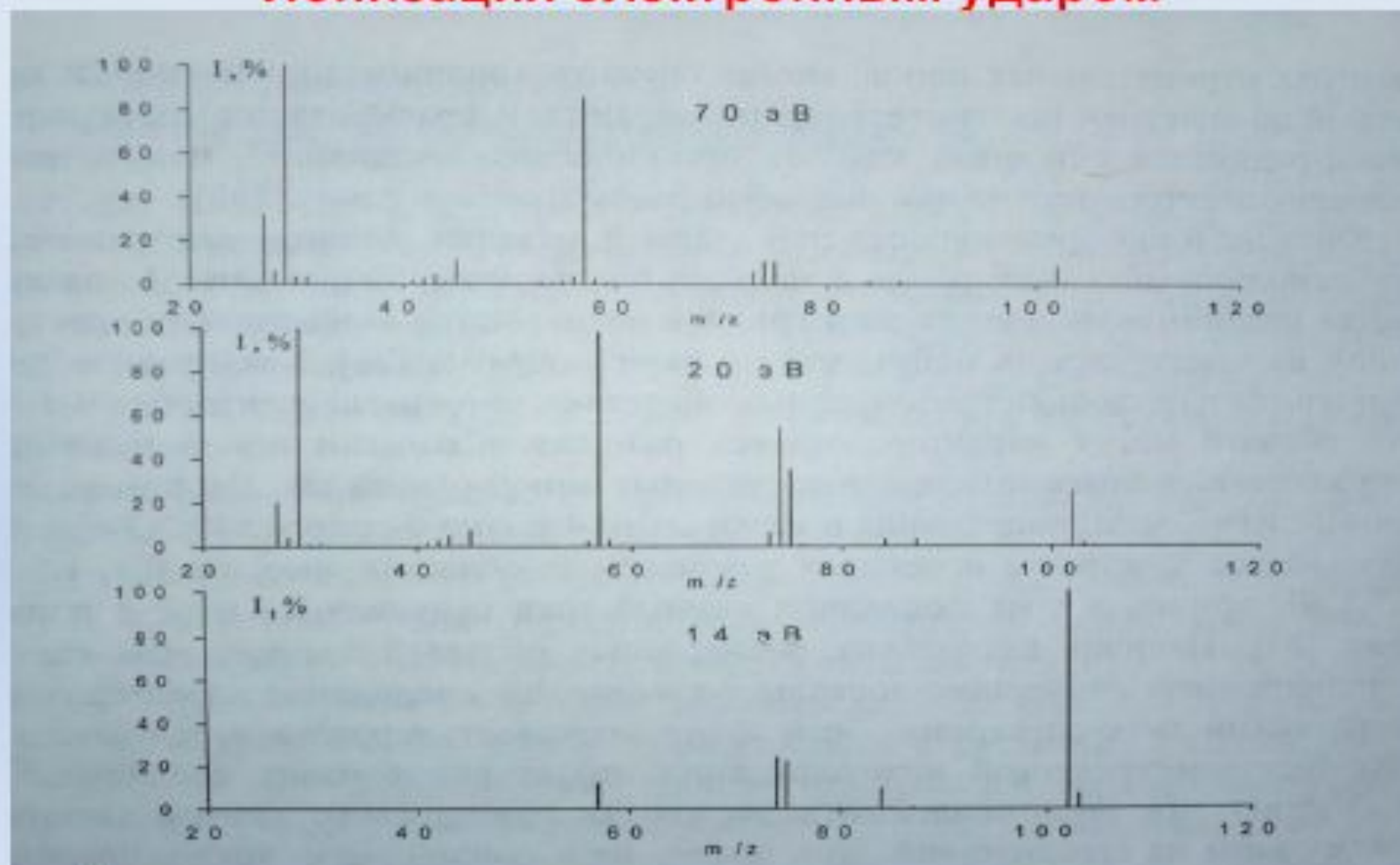
Ионизация электронным ударом - кинетической энергии электрона достаточно, для того чтобы резко увеличить потенциальную энергию образующегося иона – в первую очередь его колебательную и вращательную составляющие. В результате ион обычно претерпевает распад, фрагментацию. Образующиеся дочерние ионы, как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

Относительная
интенсивность, %

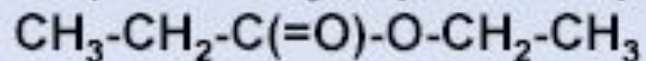


Масс-спектр нитробензола при ионизации электронным ударом

Ионизация электронным ударом



Масс-спектр электронного удара этилпропионата:



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

Электронная ионизация (EI)

Достоинства:

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

Недостатки:

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

Химическая ионизация (CI)

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

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

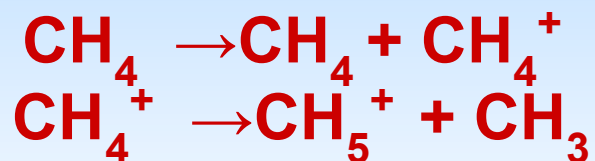
Газ-реагент ионизируют с помощью электронного удара, для того чтобы образовались положительно заряженные ионы. Избыток газа-реагента предохраняет молекулы пробы от ионизации.

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

Химическая ионизация (CI)

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

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



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



Достоинства:

1. Мягкий метод ионизации, молекуле образца передается около 5 эВ избыточной энергии, что препятствует процессам фрагментации и позволяет подвергать анализу нестойкие молекулы.
2. Интенсивный пик молекулярного иона.

Недостатки:

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

Химическая ионизация (CI)

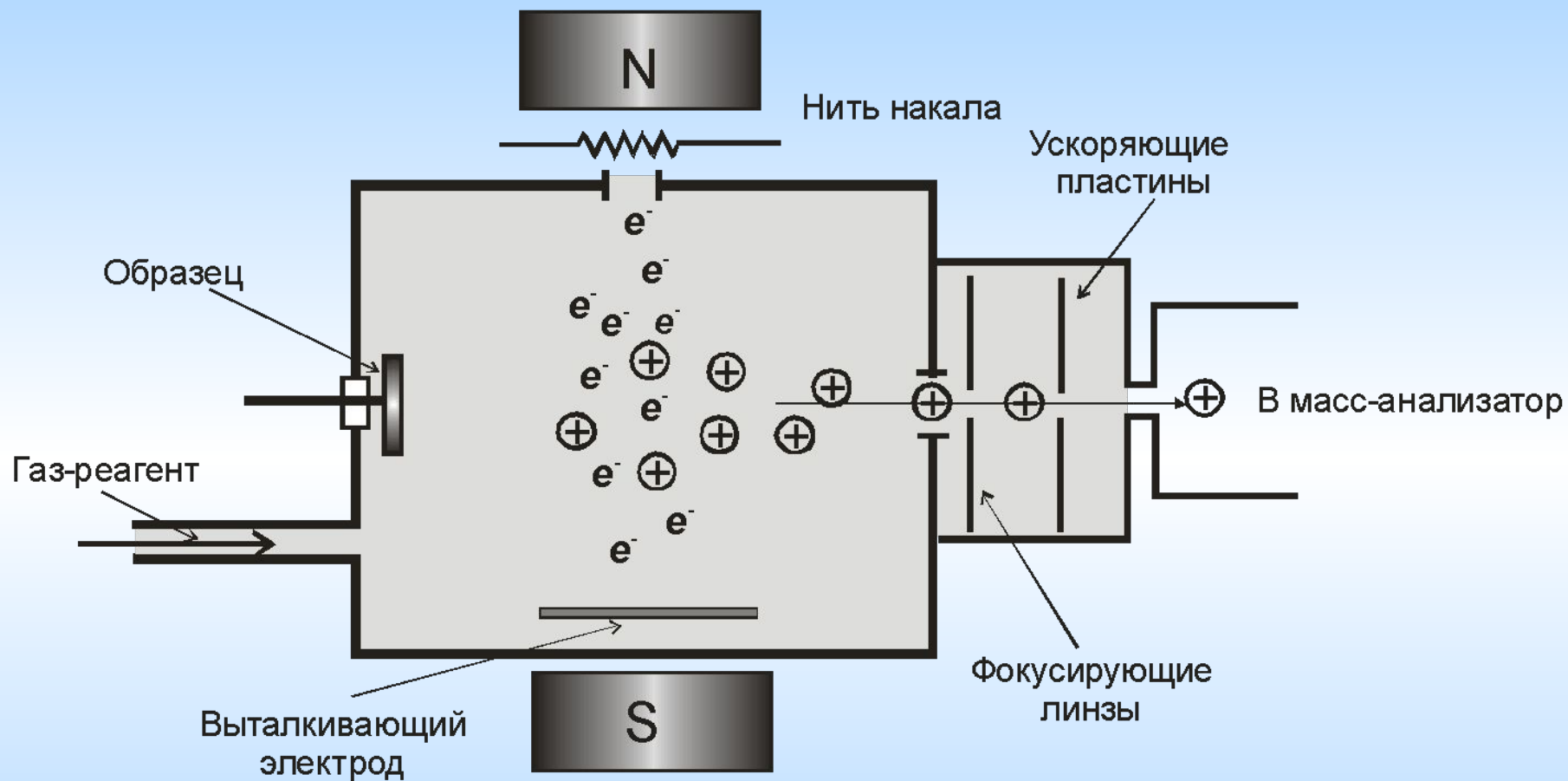
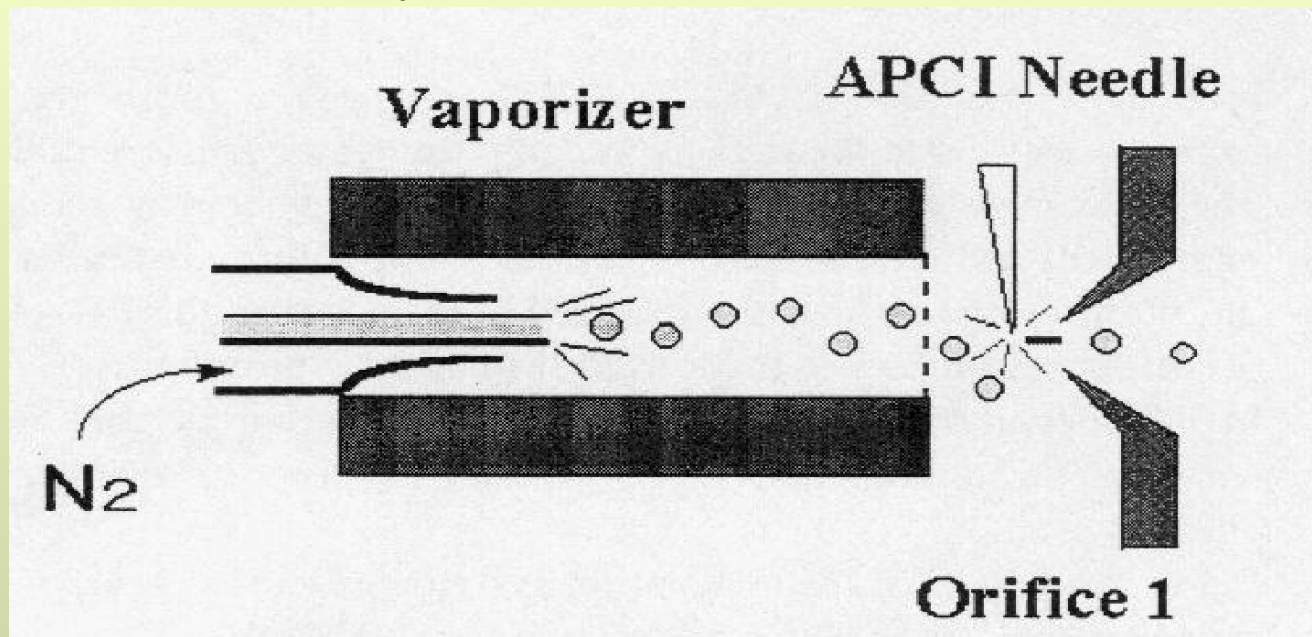


Схема источника ионов с CI.

Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)

В этом способе ионизации анализируемое вещество, растворенное в соответствующем растворителе, вводится в нагреваемый капилляр (350-400° С), который служит испарителем. Раствор испаряется и двигается к выходу из капилляра в область атмосферного давления, где происходит коронный разряд. Обычно соосно капилляру идет поток азота, способствующий процессу испарения. Преобладающие в растворе молекулы растворителя, взаимодействуют с потоком электронов от коронного разряда, образовавшиеся ионы взаимодействуют с другими молекулами растворителя, что приводит к их протонированию и они становятся реагентами для ионизации молекул образца.



Высокое напряжение
порядка ~2000 В.

Диаметр капилляра
 $d_k \sim 0.2$ мм.

Напряженность поля
 $\sim 6 \cdot 10^6$ В/см

Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)

Достоинства:

1. Работа ионного источника при атмосферном давлении.
2. Не обязательно использовать только полярные растворители для образца (как в случае электрораспыления).
3. Возможность работы с образцами, которые сложно перевести в газовую фазу обычными методами.

Недостатки:

1. Возможен анализ образцов с массой примерно до 1500 дальтон, что относительно немного.
2. Полученные масс-спектры малоинформативны и не позволяют использовать их для структурных исследований (мало линий).

Ионизация электрораспылением (ESI)

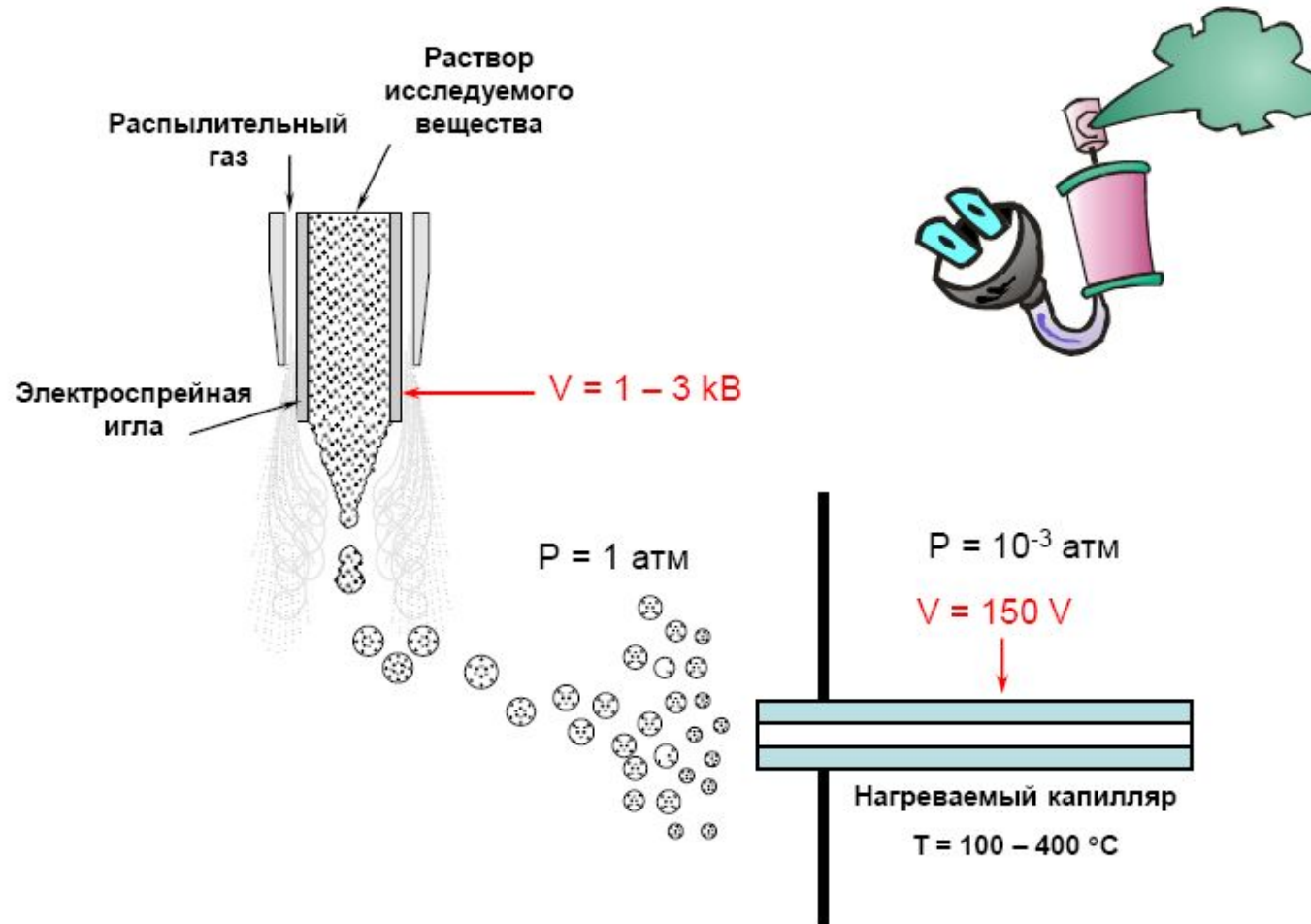
Электроспрей(электрораспыление) – это метод, в котором вещество на ионизацию поступает в растворе полярного растворителя (им может быть вода, ацетонитрил, метанол и т.д.), при этом в растворе присутствуют катионы водорода или щелочных металлов, натрия или калия.

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

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

Ионизация электрораспылением (ESI)

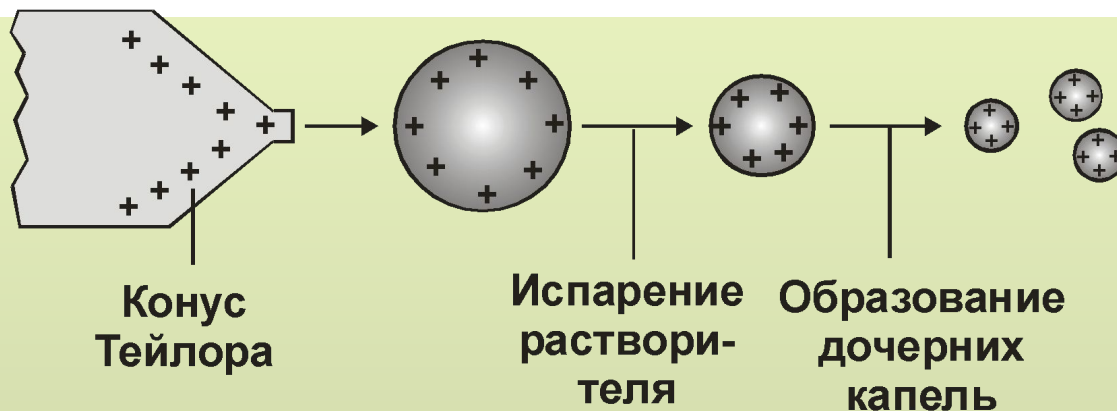
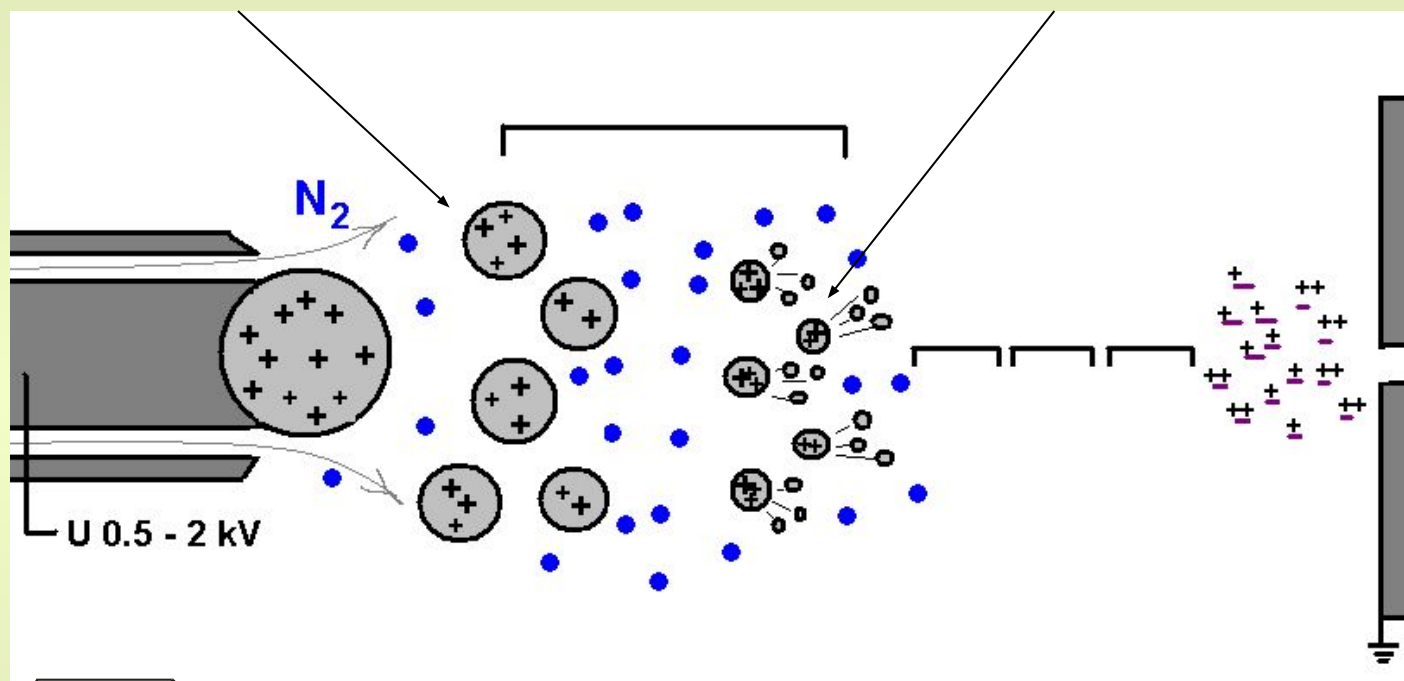
Ионизация электрораспылением (электроспрей)



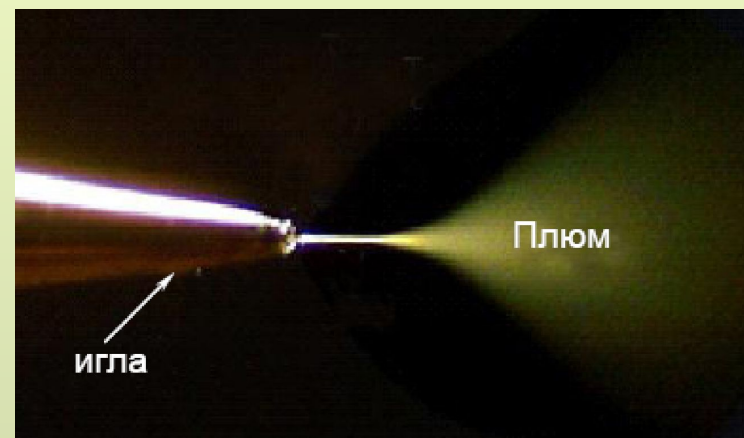
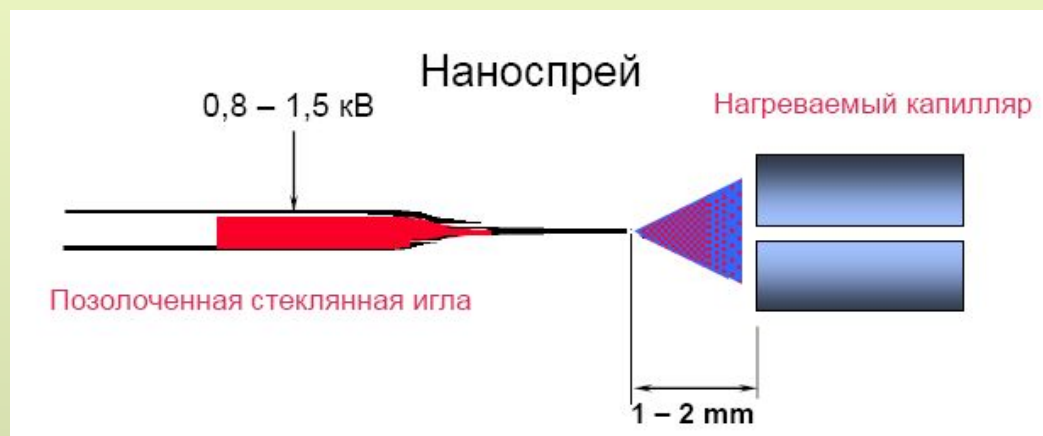
Ионизация электрораспылением (ESI)

Анализируемое вещество подается в растворе через капилляр с поданным на него напряжением. **Растворители:** вода, ацетонитрил, метанол

несколько последовательных «упариваний взрывов» микрокапель

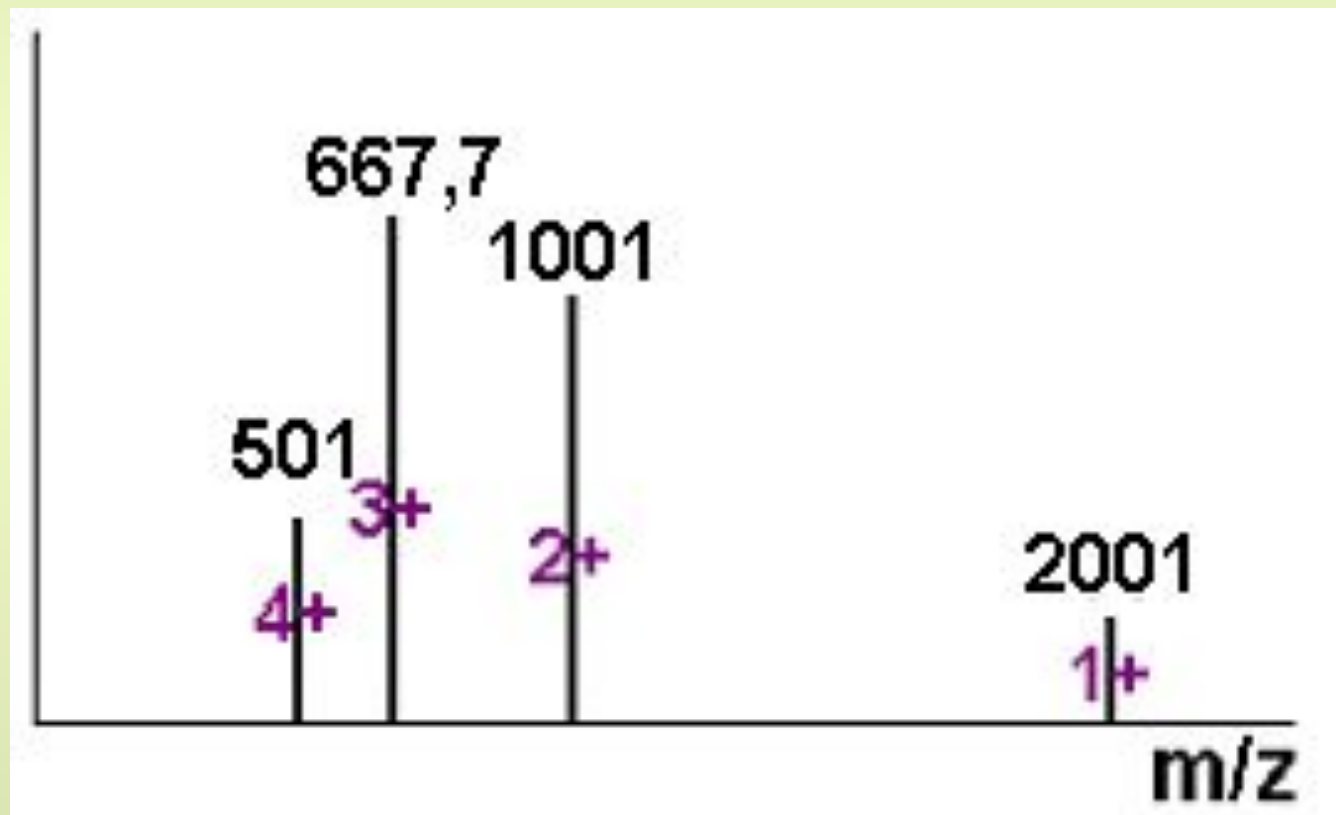


Ионизация электрораспылением (ESI)



Ионизация электрораспылением (ESI)

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



Фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)

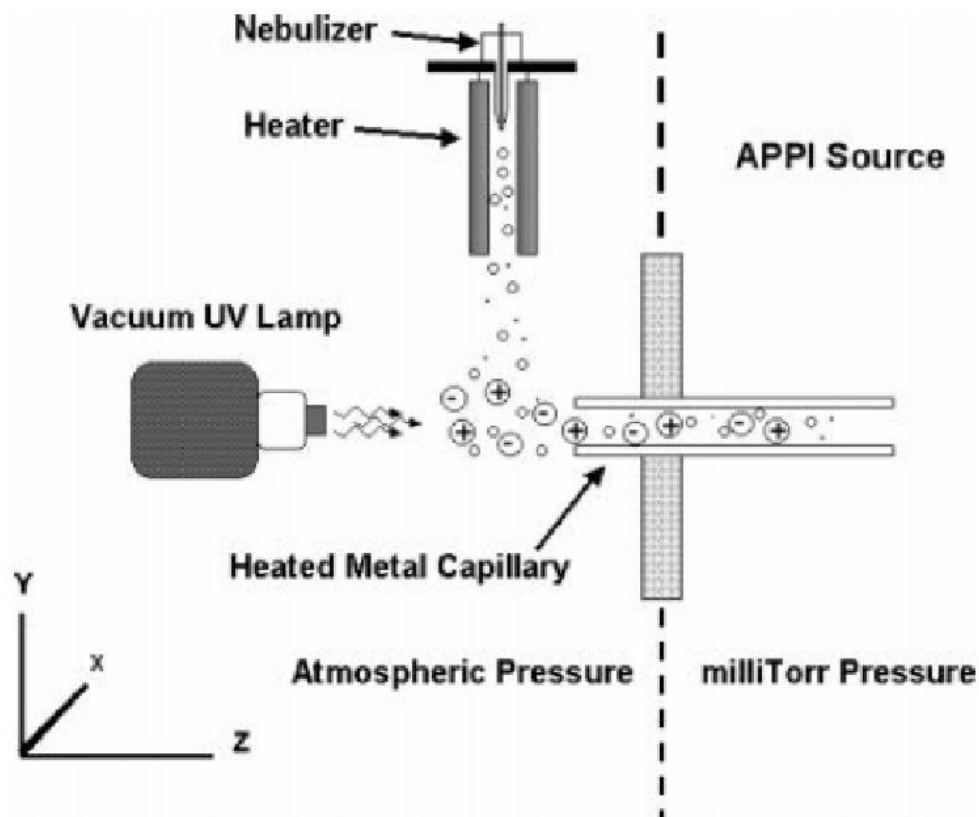
Фотоионизация— это *ионизация* монохроматическими пучками фотонов с разбросом по энергии 0.01-0.02 эВ. Пучки могут быть получены излучением молекул инертных газов в газоразрядных трубках либо при помощи лазеров. Энергии самих фотонов лежат в диапазоне 10-40 эВ, что позволяет ионизировать любые органические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

Фотоионизация



Фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)

Фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)



Long-lasting krypton lamp emits photons at 10.0 and 10.6 eV.

Toluene has a first IE of 8.3 eV

Фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)

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

Достоинства:

1. Полная передача энергии фотона молекуле вещества.
2. Удобен для установления энергетических характеристик молекул, радикалов, ионов.

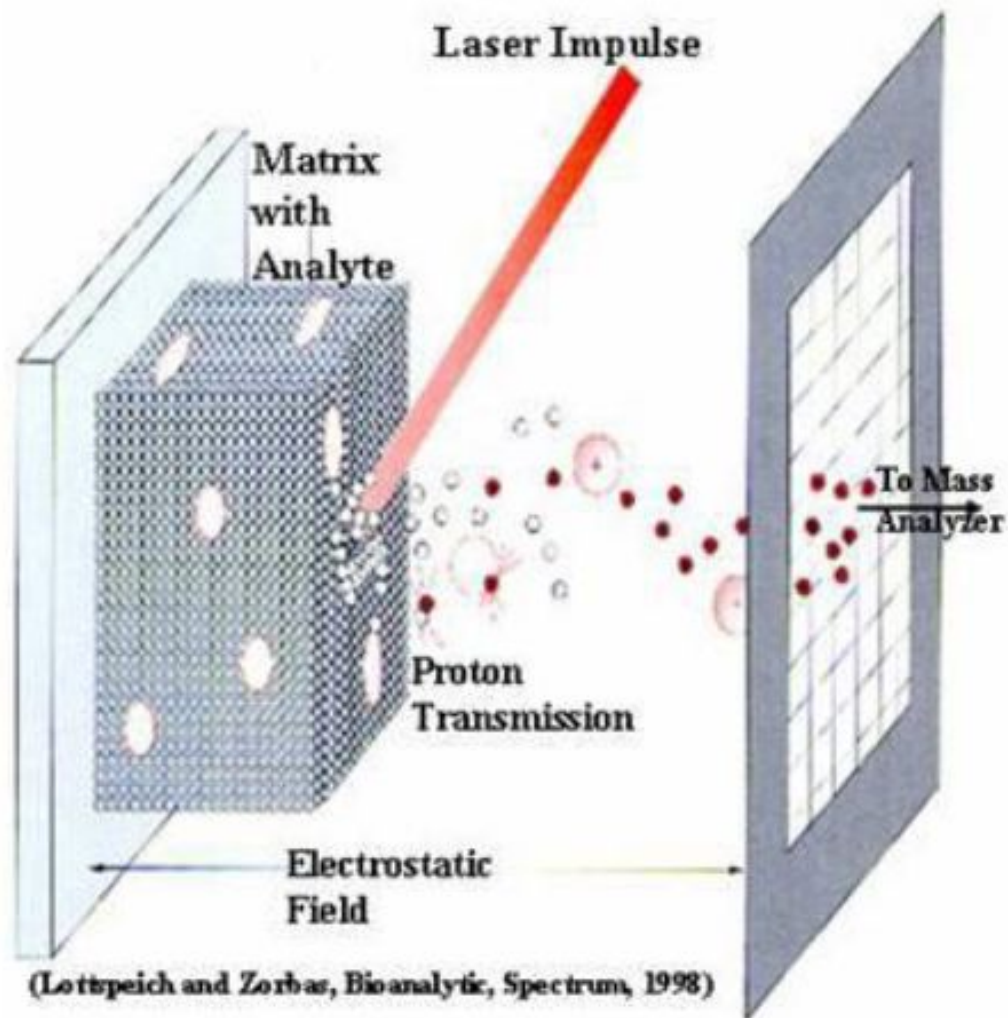
Недостатки:

1. Незначительная фрагментация молекулярных ионов.
2. Зависимость фрагментации от энергии фотонов.
3. Невозможность работы с образцами, которые нельзя перевести в газовую фазу.

Десорбционные методы ионизации – десорбция основана на том факте, что при высоких температурах константы скорости испарения выше, чем константы скорости разложения.

Метод		Воздействие	Матрица
ДХИ	Десорбционная химическая ионизация	Быстрый нагрев и химическая ионизация плазмой реагентного газа	Твердое вещество на проволоке
МСВИ	Масс-спектрометрия вторичных ионов	Поток ионов Xe^+ или Cs^+ с энергией порядка единиц кэВ	Твердые или жидкие образцы
ББА	Масс-спектрометрия с бомбардировкой быстрыми атомами	Поток атомов Ar, Xe или ионов Cs^+ с энергией порядка единиц кэВ	Образец в глицерине
ПД	Плазменная десорбция	Продукты деления изотопа ^{252}Cf (МэВ)	Образец на нитроцеллюлозе
МАЛДИ	Лазерная десорбция – ионизация с помощью матрицы	Фотоны	Образец в матрице (например синапиновой кислоте)
ДП	Полевая десорбция (десорбция полем)	Электрическое поле 10^9 В/м	Образец на активированном эмиттере

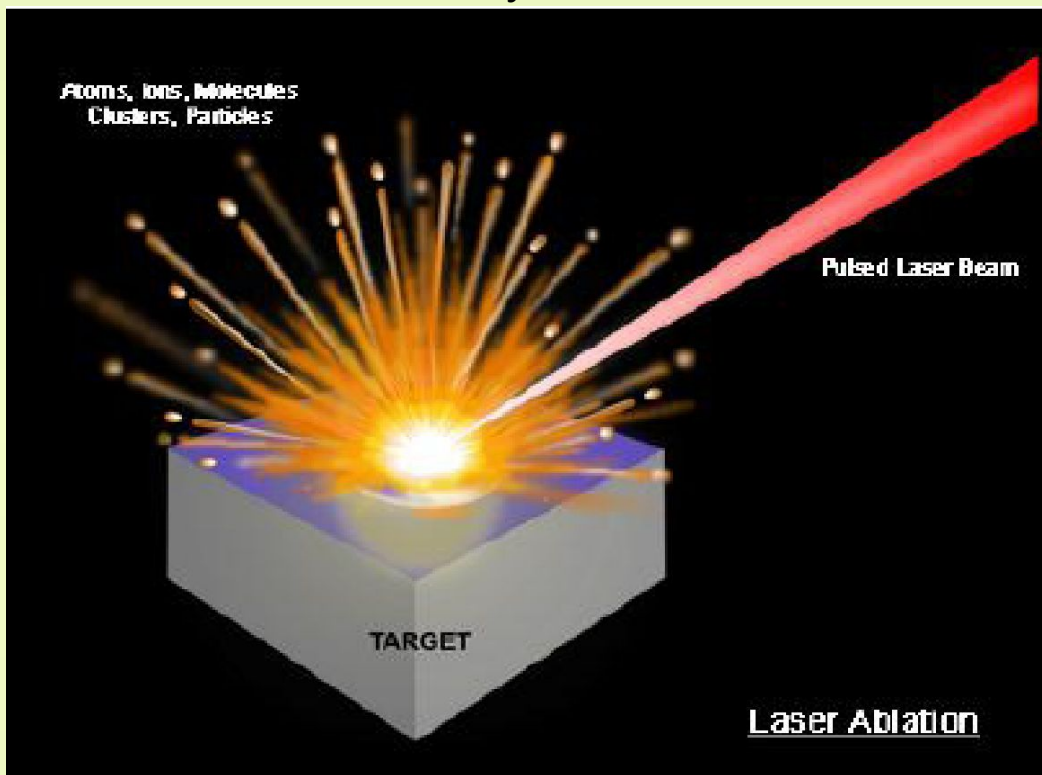
Лазерно-десорбционная ионизация



Лазерная абляция

Лазерная абляция (англ. laser ablation) — метод удаления вещества с поверхности лазерным импульсом.

Низкой мощности лазера - вещество испаряется или сублимируется в виде свободных молекул, атомов и ионов



Высокая мощность лазерного импульса ($>$ порога режима абляции) - происходит микро-взрыв с образованием кратера на поверхности образца и светящейся плазмы вместе с разлетающимися твёрдыми и жидкими частицами (аэрозоля).



Ионизация быстрыми атомами (FAB)

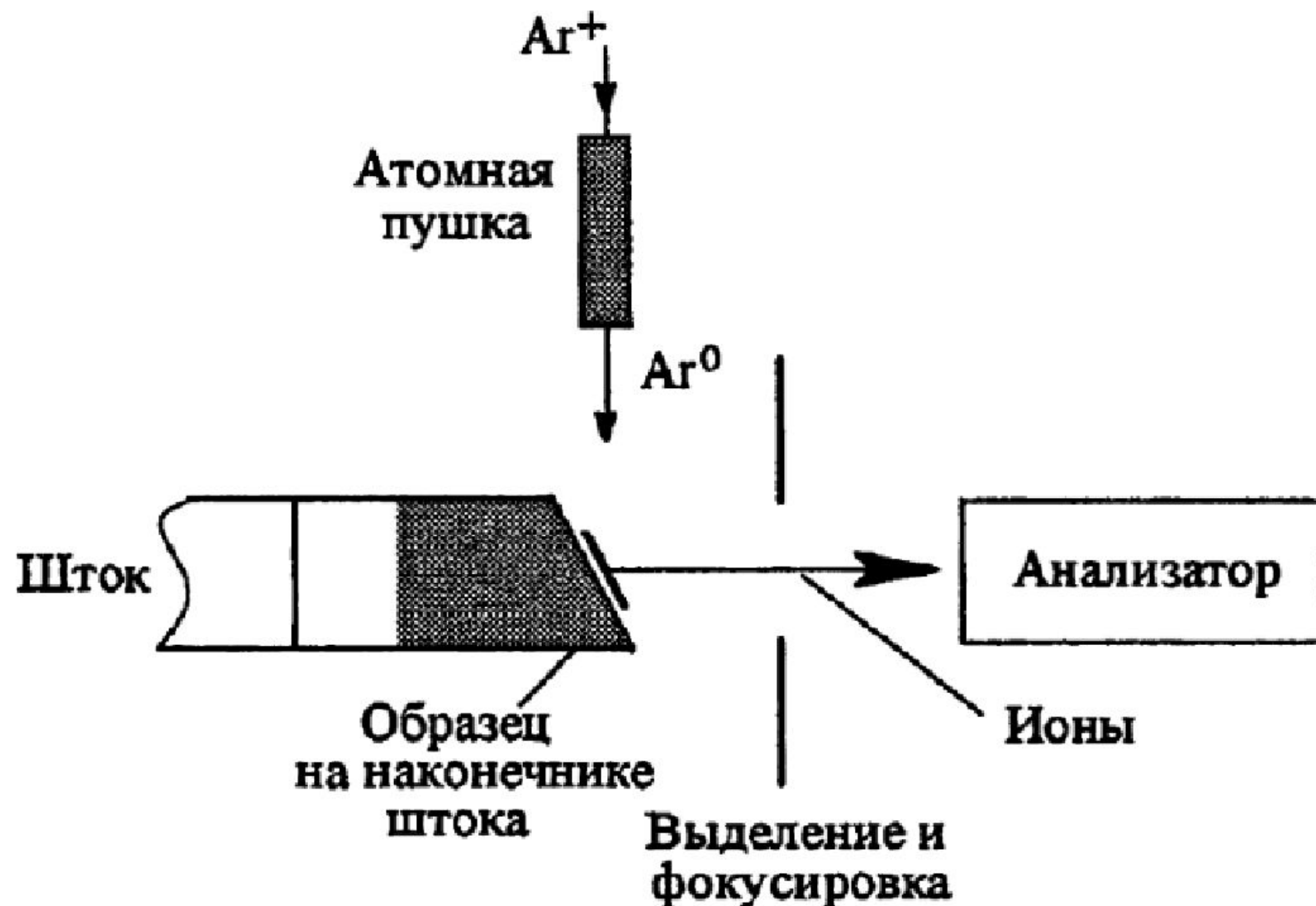
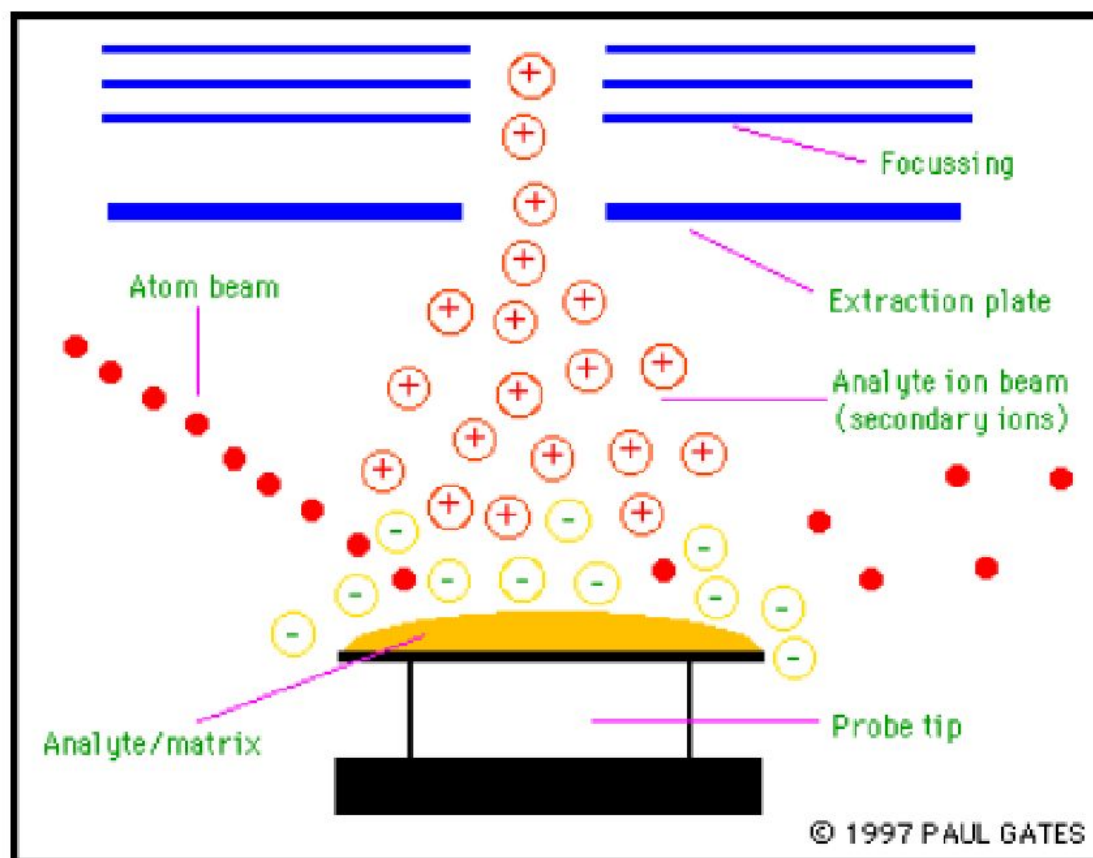


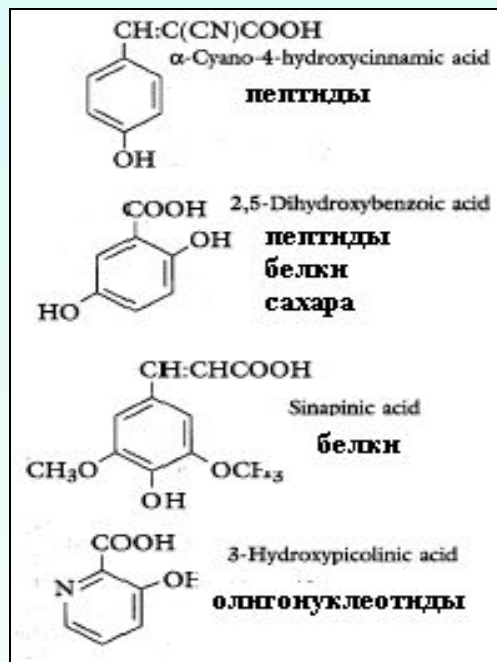
Схема источника с бомбардировкой быстрыми атомами (FAB)



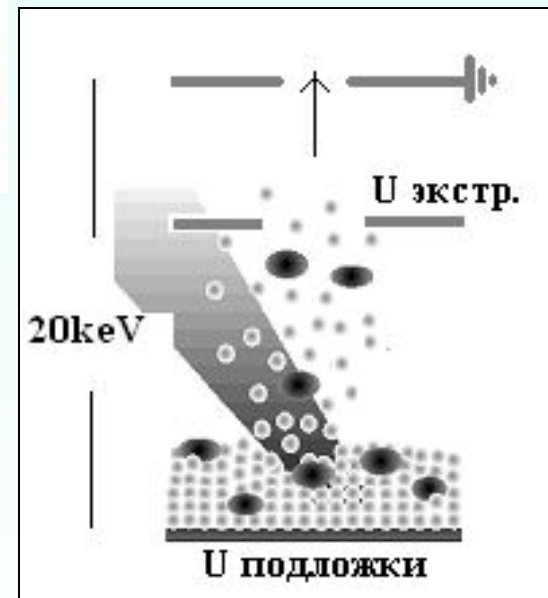
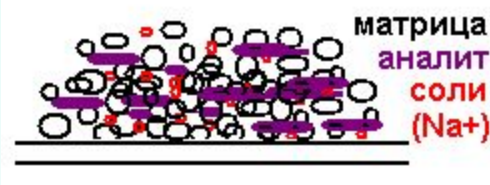
MALDI - matrix assisted laser desorption / ionization

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



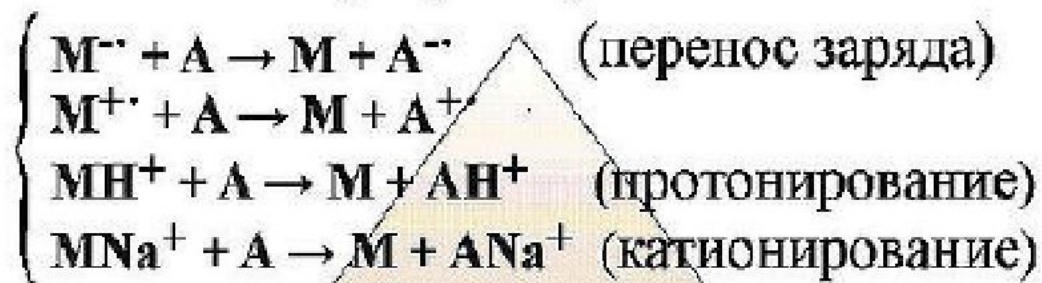
МАТРИЦА:

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

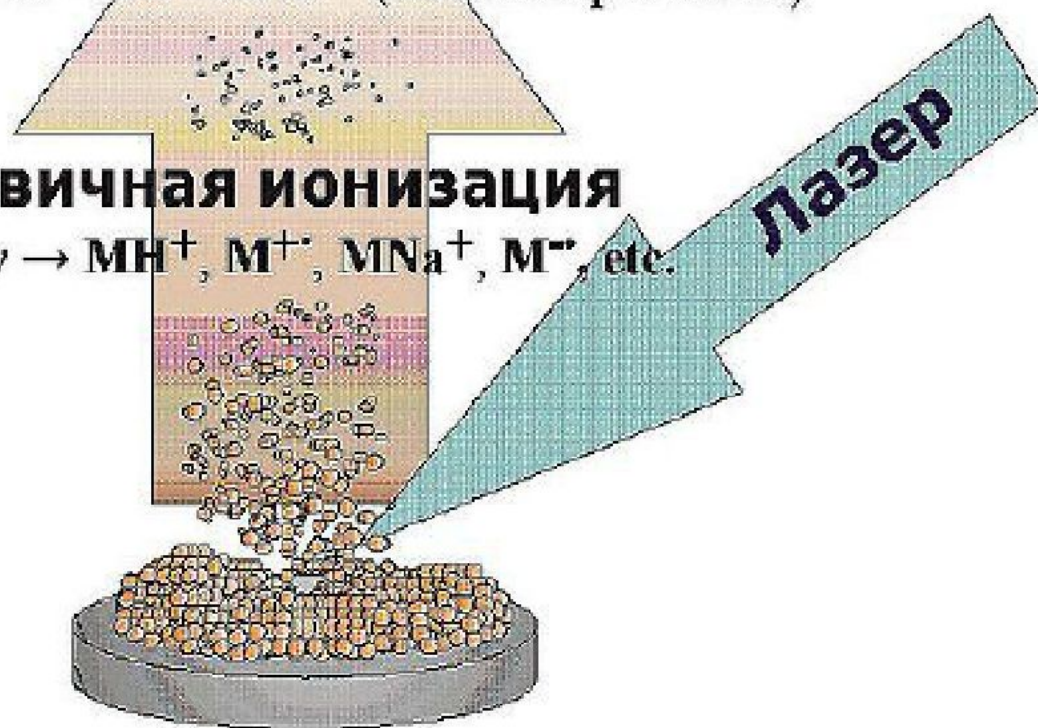
Лазер: 2нс, 50-300 мкДж/имп , 50мкм

Вторичная ионизация

Ион-молекулярные реакции:

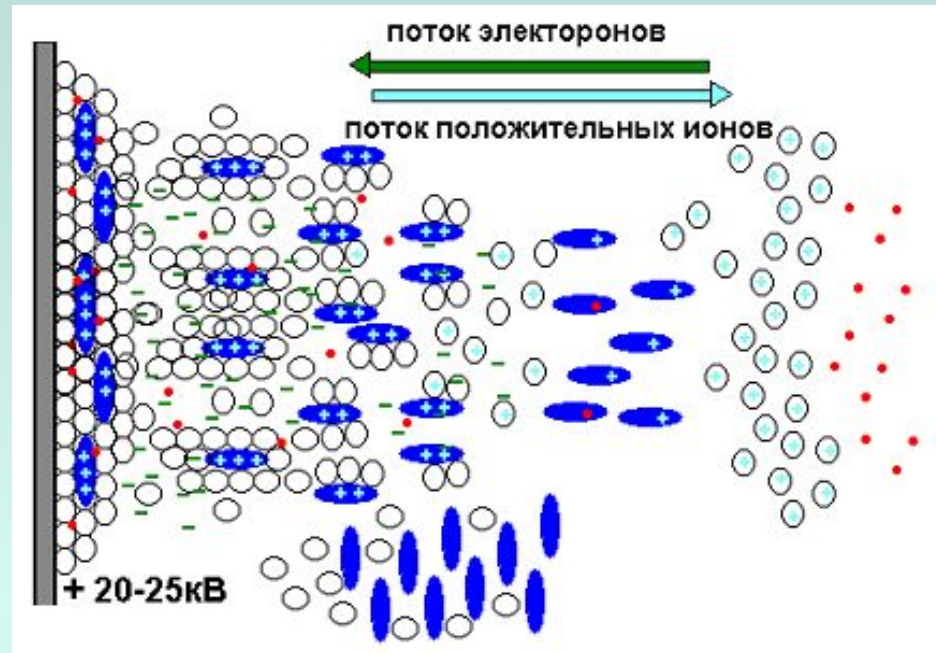
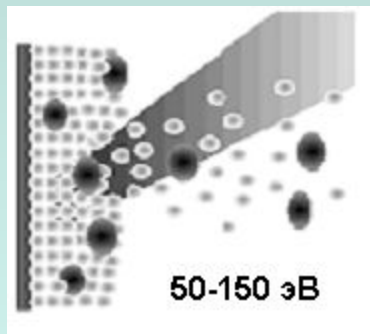


Первичная ионизация

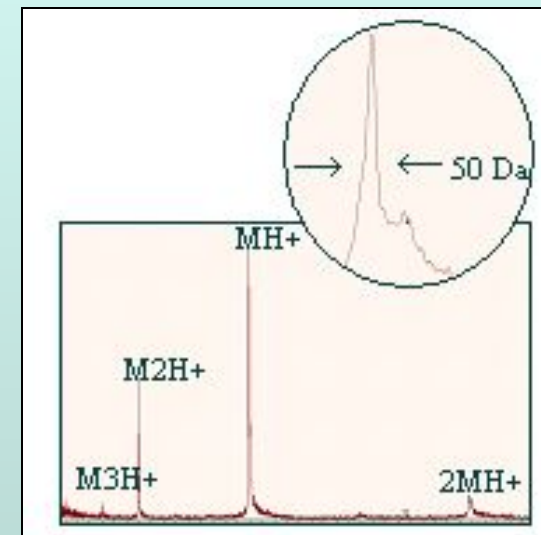
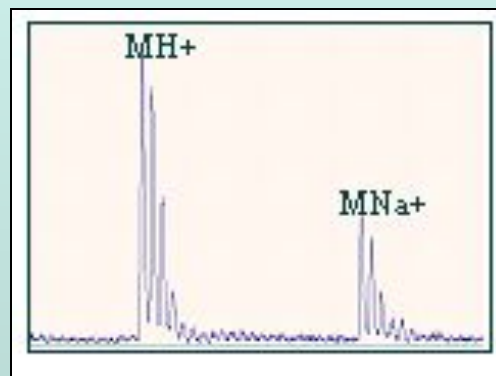


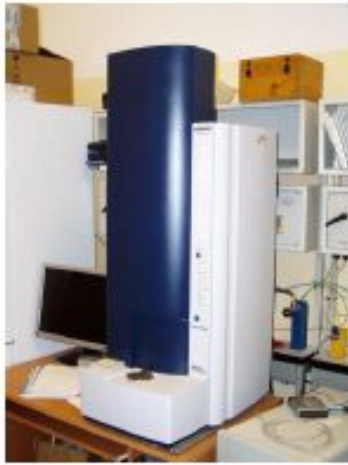
Образец

MALDI : типы положительных ионов и вид спектра

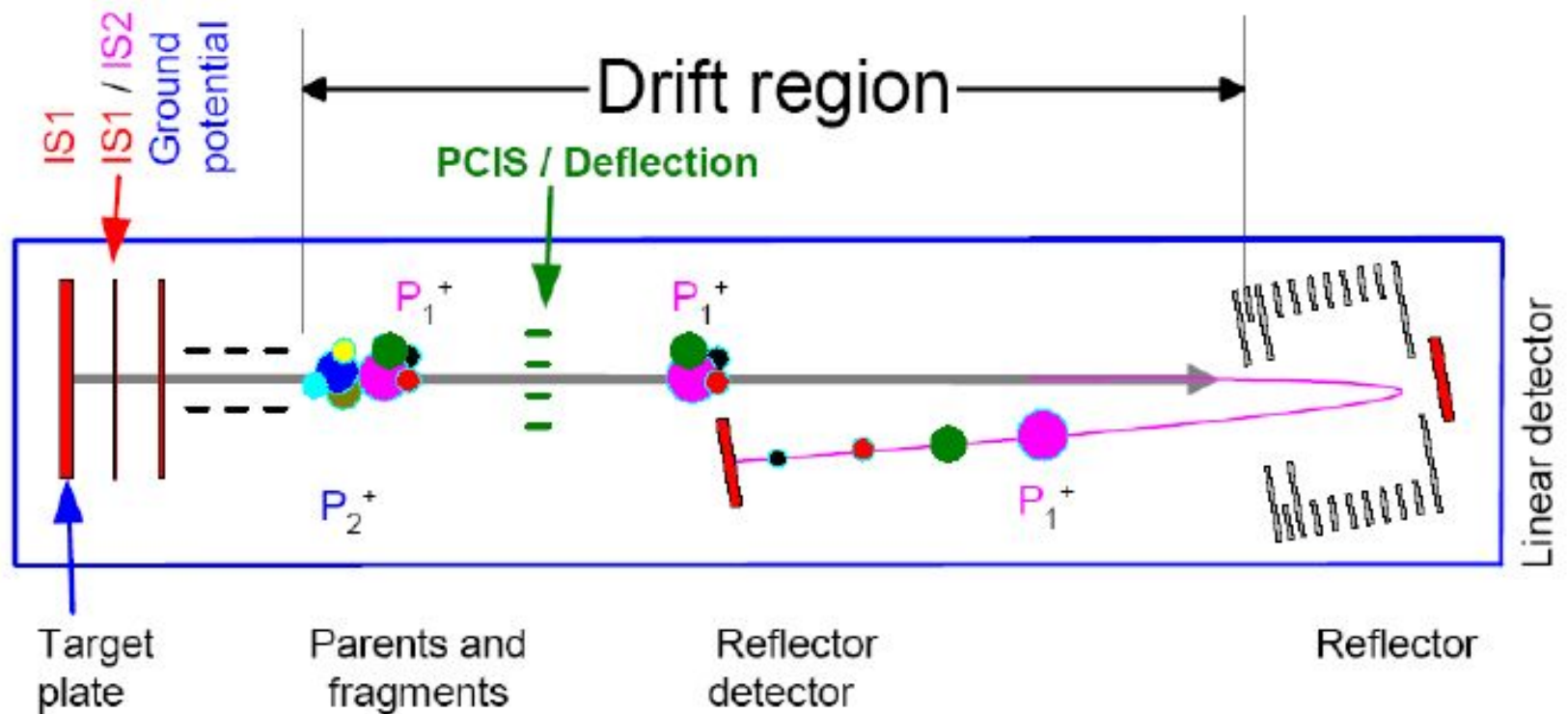


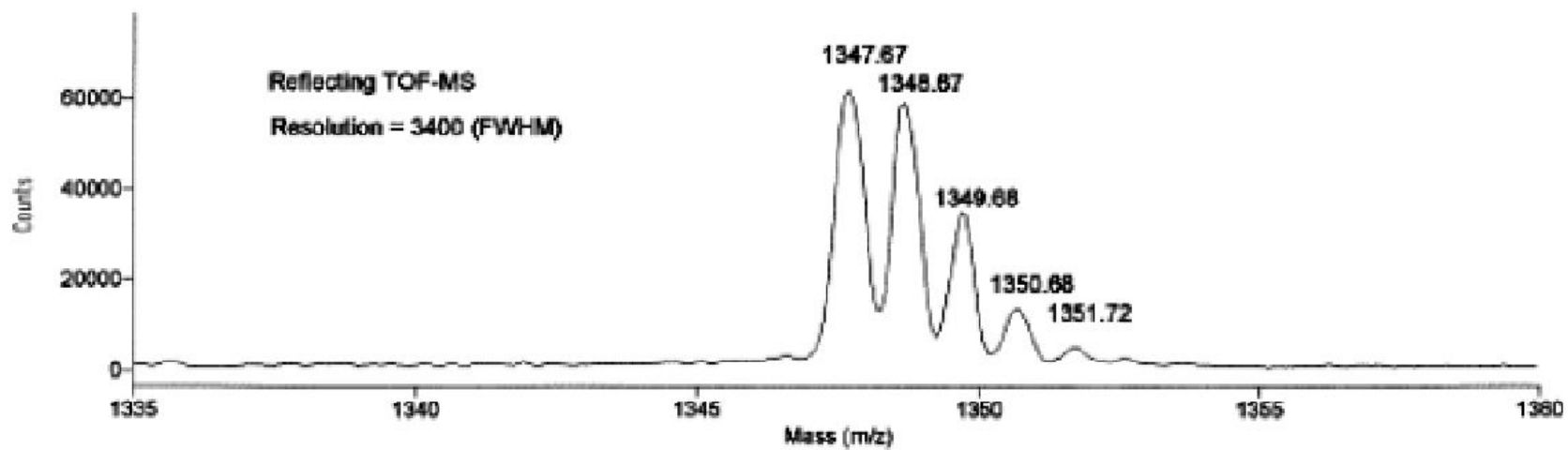
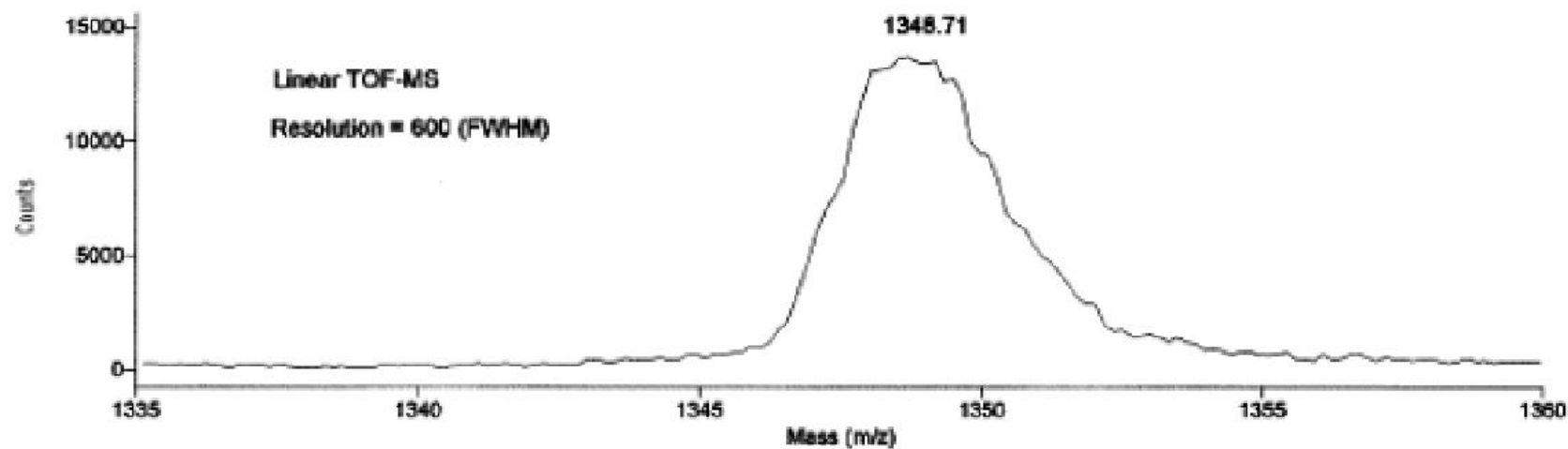
Точный механизм MALDI ионизации неизвестен, однако в результате образуются, как правило, однозарядные ионы, захватившие протон либо иной катион.



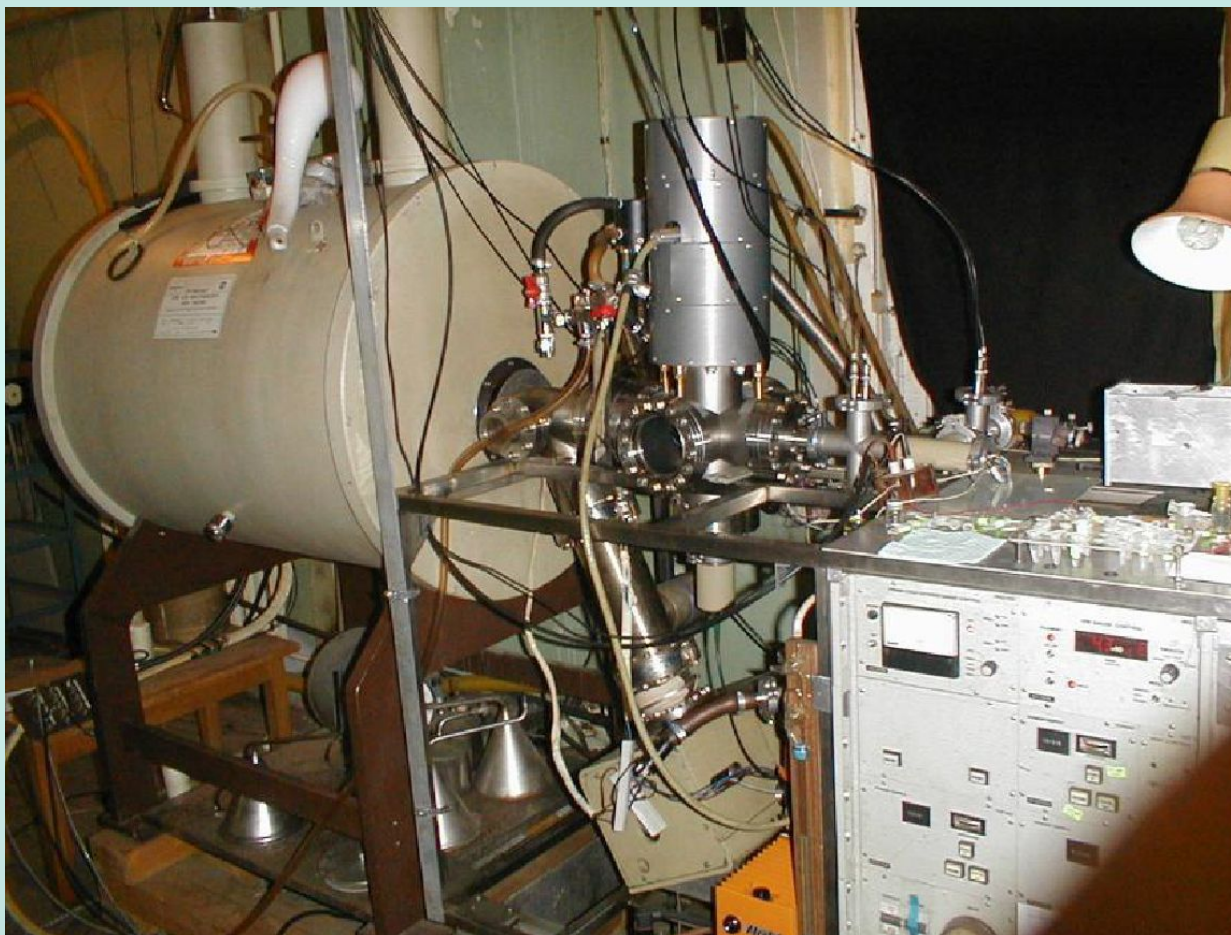


BRUKER Microflex MALDI TOF





Масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (1974 г). Самый точный метод масс-спектрометрии



Прибор в Москве –один из первых в мире (с 1983 г)

Принципы масс-спектрометрии

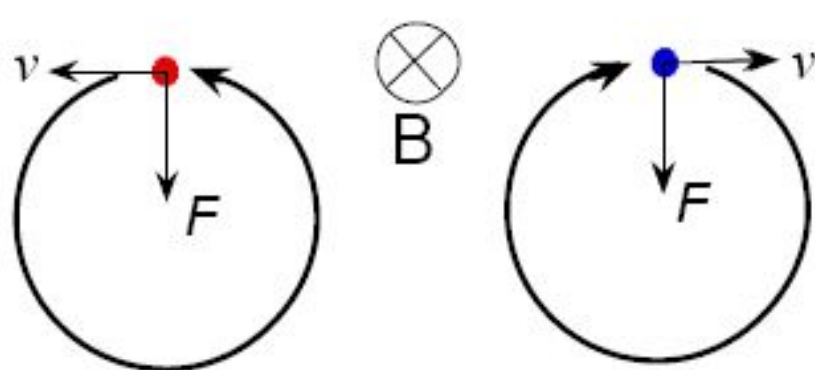
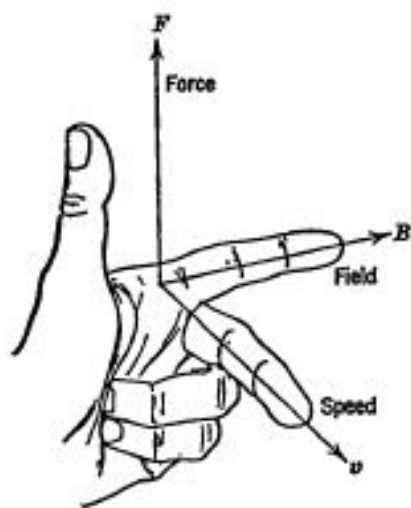
ИЦР

Магнитное поле

$$F = q(E + v \times B)$$

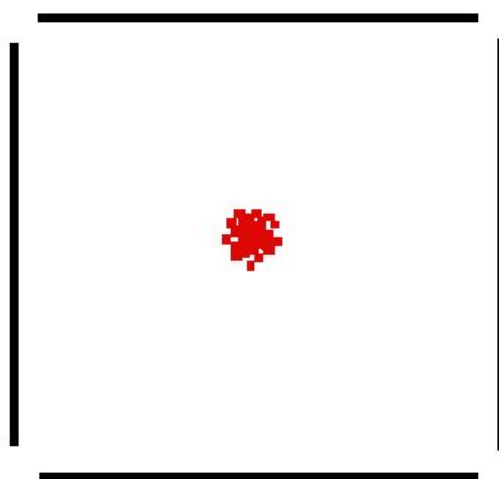
Сила Лоренца

$$F_m = q(v \times B)$$



Возбуждение циклотронного движения

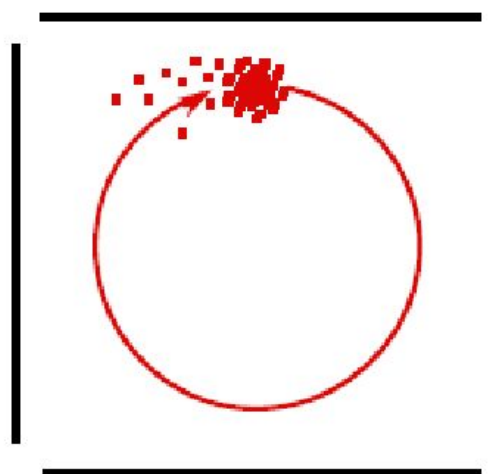
До возбуждения



Excitation



После
возбуждения



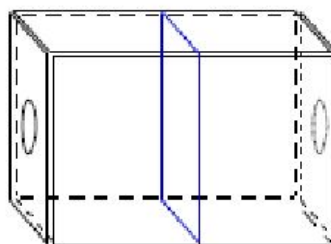
Excitation



Detection



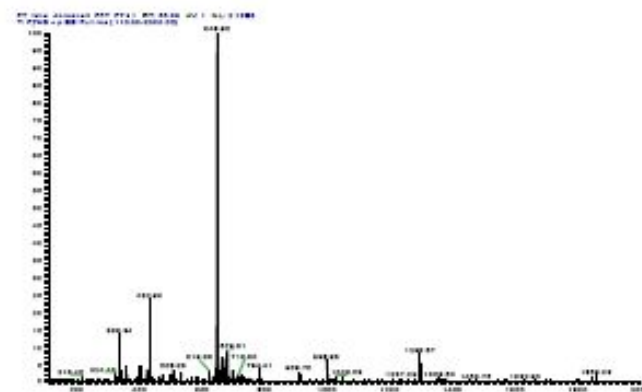
$\leftarrow B$



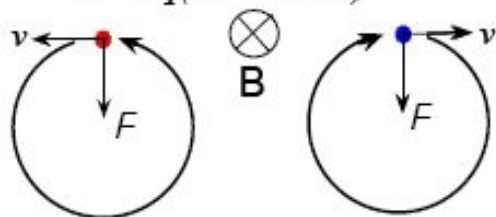
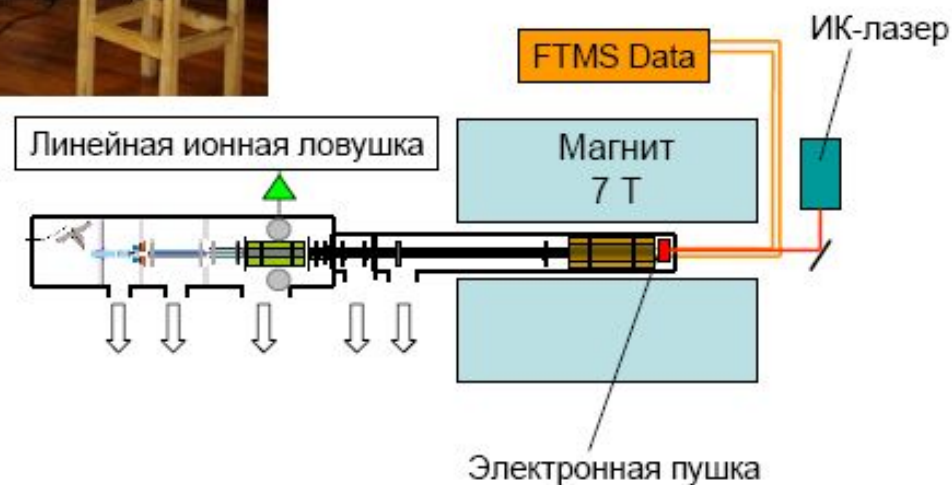
Масс-спектрометр ИЦР



Комбинированный масс-спектрометр ИЦР+ионная ловушка
Thermo Scientific LTQ-FT Ultra (2006 год, ИБХФ РАН)



$$\mathbf{F} = q(\mathbf{E} + \mathbf{v} \times \mathbf{B})$$

 $\omega = qB/m$ –циклотронная частота

Анализ сигнала в масс-спектрометрии с преобразованием Фурье (FTMS)

Преобразование
Фурье (FT)

Калибровка
по массам

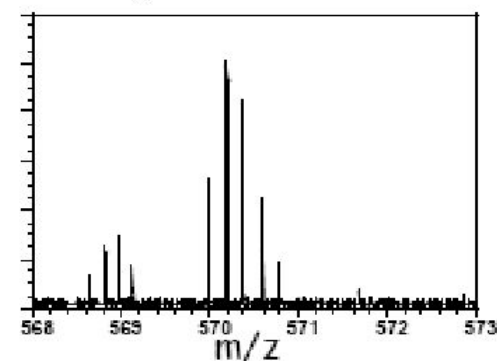
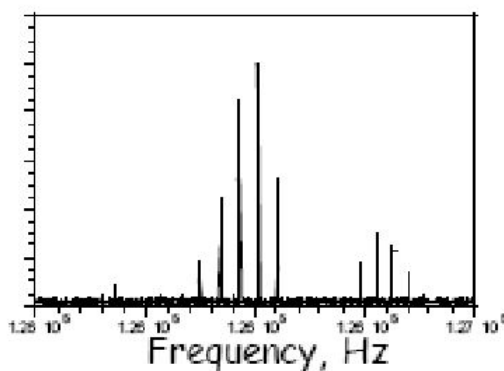
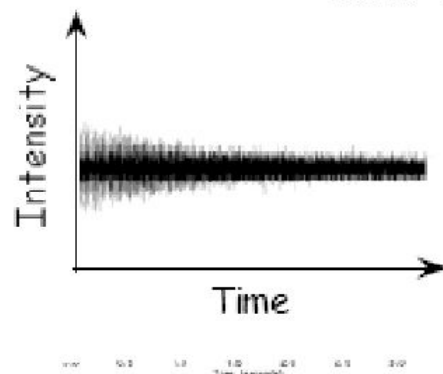
Временной
сигнал

Частотный спектр

Масс-спектр

(Pade
Transform,
linear regression...)

$$m/z = qB/(2\pi f_c) + \dots$$



Интерпретация масс-спектров

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

Аналитические задачи

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

Структурные задачи

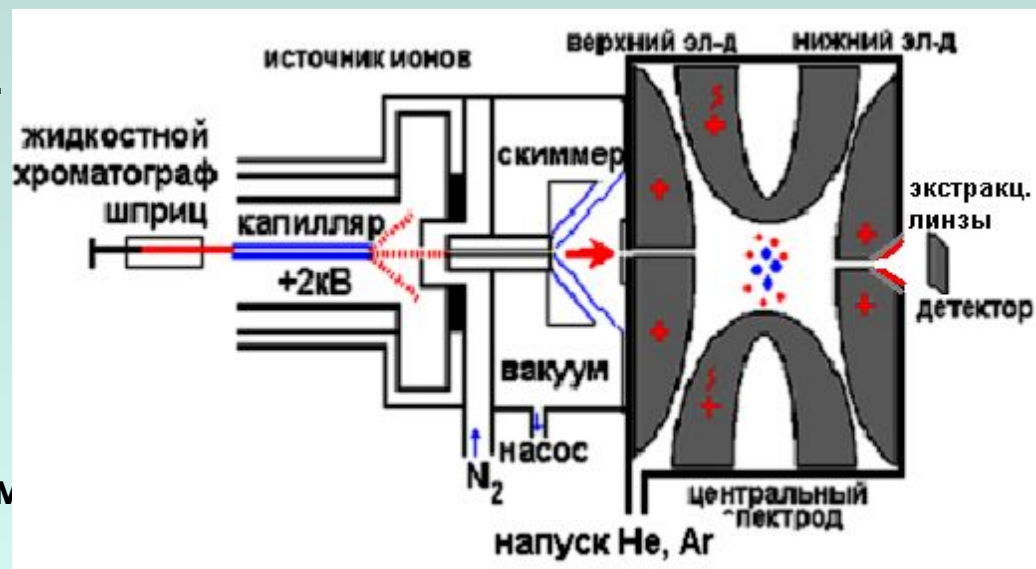
При определении структурной формулы молекулы используется три блока данных, представленных в масс-спектре:

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

ESI – ионная ловушка с MCP детектором

На верхний и нижний электроды подано постоянное положительное напряжение. На короткое время отталкивающее напряжение с верхнего электрода снимается, позволяя пакету ионов влететь в ловушку.

На центральном электроде - быстропеременное напряжение, которое заставляет ионы всех m/z двигаться со своими частотами по своим орбитам.



Затем, на экстрагирующие линзы подается осцилирующее напряжение, последовательно вытягивающее ионы согласно их m/z .

Ионные ловушки позволяют, варьируя напряжения, оставлять в ловушке определенные ионы и получать спектры их фрагментов.

При этом возможен ряд последовательных фрагментаций иона.

Характеристиками ловушки являются:

ёмкость (верхнее значение разделяемых m/z) до 4000,
разрешение до 0.2 Да по диапазону,
точность до 0.01% (=100ppm) для родительских ионов и фрагментов.

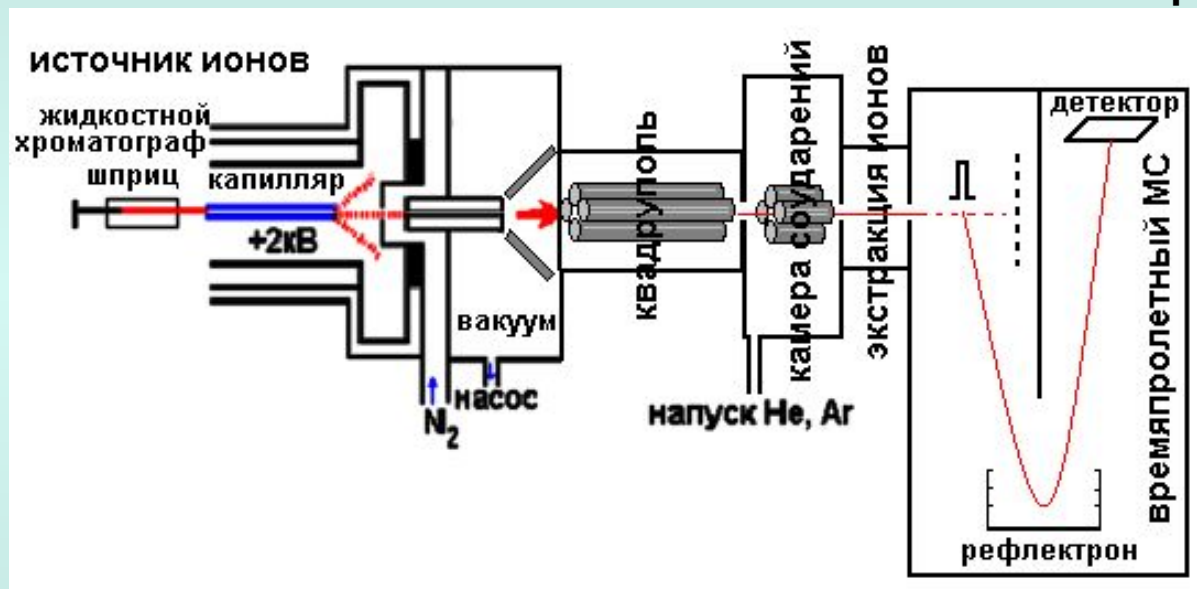
Ионная ловушка хорошо сочетается с жидкостным хроматографом.

«Гибридные» приборы:

ESI – квадруполь – ортогональный времяпролетный MS

На электроды квадруполь подается переменное напряжение, позволяющее пролетать только резонансным ионам.

Напуск инертного газа приводит к столкновительной фрагментации ионов.



Сочетает хорошее разрешение времяпролетного масс-спектрометра с возможностью хорошего выделения (включением квадруполь) определенных ионов для получения спектров фрагментации.

точность 0.01-0.03% для родительских ионов и фрагментов

**Масс-спектрометр высокого разрешения
Thermo Electron DFS
(Double Focusing System – Двойная система
фокусировки)**



**Масс-спектрометр высокого разрешения с
хроматографической приставкой Thermo Electron DFS**