

ЛЕКЦИЯ 11. Масс-спектрометрический метод анализа

1. Теоретические основы масс-спектрометрии
2. Схема устройства масс-спектрометра
3. Методика расшифровки спектров органических соединений. Качественный и количественный анализ. Области применения. Ионизация. Масс-анализаторы.

Масс-спектрометрические методы иногда позволяют получить полное представление о структуре молекул. Применение их в биохимии особенно ценно, поскольку для эксперимента требуется всего 10^{-9} – 10^{-6} г. вещества.

Масс-спектр – это набор пиков разной высоты, соответствующих ионам разной массы, поэтому он не похож ни на один из приведенных в этом разделе электромагнитных спектров. К сожалению, при масс-спектроскопическом анализе образец разрушается, но это не большой недостаток метода, поскольку, потребляется весьма незначительное количество вещества.

1. Теоретические основы масс-спектрометрии.

Принцип метода. Первым шагом в масс-спектрометрическом опыте является ионизация вещества; при ионизации наряду с *ионами исходного соединения* образуются *ионизованные «осколки»* меньшего молекулярного веса. Как правило, все ионы заряжены положительно, а разделяются они по величине *отношения массы к заряду (m/e)*. Большинство образующихся ионов *однозарядны*, т. е. молекулы всех соединений теряют по одному электрону, поэтому ионы различаются только по массе. *Степень фрагментации* молекул при бомбардировке их электронами определяется энергией электронов. Органические молекулы обычно ионизуют, бомбардируя их пучком электронов в вакууме (*электронная бомбардировка*). Можно ионизовать вещество, поместив его в сильное электрическое поле (*полевая ионизация*) или облучая ультрафиолетовым светом (*фотоионизация*). Способ, которым фрагментируется соединение, и, следовательно, его масс-спектр, является индивидуальной характеристикой каждого вещества (можно провести аналогию с характерными ИК- и ЯМР-спектрами – своеобразными «отпечатками пальцев»). С помощью масс-спектра можно затем установить структуру молекулы. Масс-спектры различных соединений собраны в виде каталога, который упрощает расшифровку масс-спектров неизвестных соединений. Для этого в настоящее время используются также вычислительные машины.

Масс-спектр представляет собой ряд пиков или линий, расположенных в соответствии с m/e получающихся осколочных ионов. Высота пика соответствует количеству данного вида ионов. Для *калибровки горизонтальной оси* по массам используется ион, m/e которого соответствует m/e исходного иона. Исходный ион на масс-спектре представлен пиком,

отвечающим наибольшей массе (основной пик); однако этот ион вовсе не является преобладающим. Интенсивность линий в масс-спектре обычно выражают в процентах по отношению к интенсивности основного пика.

2. Схема устройства масс-спектрометра.

Общая работа масс-спектрометра:

- создать газопазные создать газопазные ионы;
- разделить ионы в пространстве или времени на основе их отношения массы к заряду;
- измерить количество ионов каждого отношения массы к заряду.

Мощность разделения ионов в масс-спектрометре описывается разрешением, которое определяется как: $R = m / m'$, где m - масса иона, а m' - разница в массе между двумя разрешаемыми пиками в масс-спектре. Например, масс-спектрометр с разрешением 1000 может разрешить ион с m/e 100,0 от иона с m/e 100,1.

В общем, масс-спектрометр состоит из **источника ионов**, **масс-селективного анализатора** и **детектора ионов**. Поскольку масс-спектрометры создают ионы газовой фазы, то они работают в высоковакуумной системе.

На рис. 1 схематически представлено устройство масс-спектрометра с необходимой для высокого разрешения двойной фокусировкой. В приборах с одинарной фокусировкой изменяется только магнитное поле, а электростатическое остается постоянным.

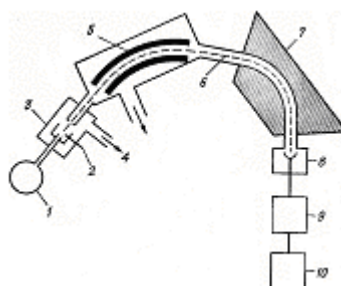


Рисунок 1 – Схема устройства масс-спектрометра: 1 – резервуар с парами образца; 2 – твердый образец; 3 – ионизационная камера; 4 – к вакуумному насосу; 5 – электростатическое поле; 6 – траектория иона; 7 – магнит; 8 – детектор; 9 – усилитель; 10 – самописец

Исследования необходимо проводить в высоком вакууме; это обеспечивает минимальное столкновение исследуемых ионов с молекулами газа, что уменьшает потери ионов и предотвращает образование побочных продуктов.

Очень важным фактором для масс-спектрометрического исследования соединения является давление его паров при температуре ионного источника. Если соединение при 100–200°C имеет давление паров около 1,3 Па, его можно поместить в резервуар, связанный с ионизационной камерой. Из-за

разности давлений между парами образца в резервуаре и ионизационной камере (в ней поддерживается вакуум 10^{-5} Па) молекулы образца через небольшую диафрагму поступают в ионизационную камеру.

Разделение ионов в анализаторе в соответствии с величинами их m/e происходит следующим образом. Сначала ионы ускоряются в вакууме с помощью ряда отрицательно заряженных пластин (рис. 6.5, 5), а затем попадают в магнитное поле (рис. 6.5, 7), где отклоняются от своей первоначальной траектории. Для ионов, имеющих одинаковый заряд, отклонение зависит только от массы, поэтому легкие ионы отклоняются сильнее.

Детектором (рис. 6.5, 8) обычно служит простой электрод (чаша Фарадея) или электронный умножитель. Ионный ток затем усиливается и регистрируется. Поскольку один масс-спектр содержит целый набор пиков сильно различающейся интенсивности, спектры регистрируют с разной чувствительностью, меняющейся обычно в 300 раз. Такой способ обеспечивает наиболее точную регистрацию всех пиков.

3. Методика расшифровки спектров органических соединений. Качественный и количественный анализ. Области применения. Ионизация. Масс-анализаторы.

Масс-спектр представляет собой график интенсивности ионов как функции отношения массы к заряду. Масс-спектры часто изображаются в виде простых гистограмм, как показано на рисунке 2. Эти записи ионов и их интенсивности служат для определения молекулярной массы и структуры анализируемого соединения. Например, на рис.2 показан масс-спектр простой молекулы диоксида углерода CO_2 .

В этом примере все ионы заряжены положительно. (Также возможно генерировать и обнаруживать отрицательные ионы.) Ионизированная молекула CO_2 (или молекулярный ион) появляется при $m/z = 44$. Поскольку процесс ионизации разбивается или фрагментирует некоторые молекулы CO_2 , появляется часть ионов в спектре при значениях m/z меньше значения m/z , соответствующего молекулярной массе CO_2 . Расщепление углерод-кислородной связи в молекулярном ионе с образованием ионизированного оксида углерода или ионизированного атомарного кислорода приводит к фрагментным ионам при m/z 28 и 16; потеря двух нейтральных атомов кислорода приводит к дополнительному фрагменту при m/z 12 для углерода. Молекулярный ион обозначен как M^+ или CO_2^+ , а фрагментные ионы обозначены как CO^+ , O^+ и C^+ .

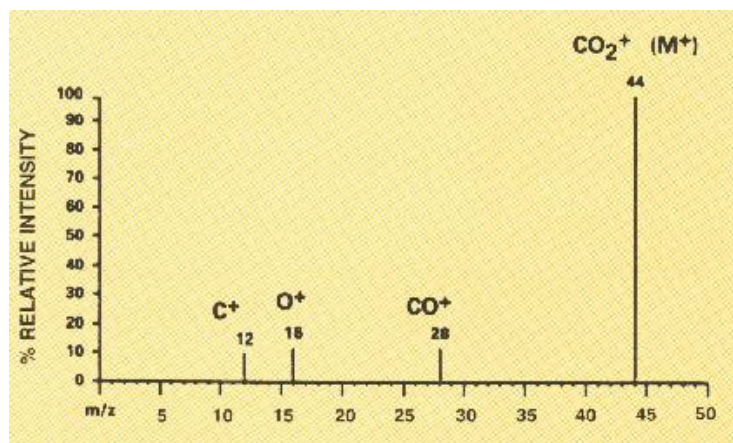


Рисунок 2 – Масс-спектр молекулы диоксида углерода CO₂. Ион является однозарядным, и «номинальная масса ионов» составляет 44 Дальтон: углерод = 12 и кислород = 16 (при расчете номинальной массы ионов атомные массы округляются до ближайшего целого числа).

Введение пробы в масс-спектрометр

Для достаточно чистых твердых частиц образец может быть помещен на кончик стержня, который вставлен в область вакуумированного источника через герметичное уплотнение. Затем образец испаряется или сублимируется в газовую фазу, обычно путем нагревания. Газы и жидкости могут вводиться через специально разработанные впускные отверстия с контролируемым потоком. Затем газообразные молекулы ионизируются (часто с сопровождающей фрагментацией), а ионы подвергаются массовому анализу. В некоторых специальных методах улетучивание и ионизация происходят одновременно.

Чтобы получить масс-спектр одного соединения в смеси, отдельные компоненты должны быть разделены перед анализом с помощью масс-спектрометрии. Разделение необходимо для однозначной идентификации, поскольку два соединения, присутствующие в исходной области, одновременно создают перекрывающийся или смешанный спектр, и даже простые соединения могут генерировать много фрагментированных ионов. С 1960-х годов газовая хроматография (ГХ) была связана с масс-спектрометрией. Это соединение позволяет соединениям, уже находящимся в паровой фазе, поступать в масс-спектрометр, разделенный по времени, чтобы компоненты смесей можно было детектировать и анализировать последовательно. В последнее время для разделения компонентов сложных смесей перед массовым анализом используются жидкостные хроматографы на сверхкритическом уровне и устройства для капиллярного электрофореза, подключенные к масс-спектрометрам.

Как молекулярные и фрагментные ионы образуются в источнике ионов?

В источнике ионизации электронов (ЭИ) (иногда называемом «электронным ударом») ионы генерируются путем бомбардировки молекул газообразного образца пучком энергичных электронов, как показано на рисунке 3. (Другие методы ионизация будут обсуждаться ниже.) В методике ЭИ генерируется смесь положительных и отрицательных ионов, а также нейтральных частиц. Энергия бомбардирующих электронов обычно намного больше, чем у связей, которые удерживают молекулу вместе. Таким образом, когда электроны высокой энергии взаимодействуют с молекулой, происходит не только ионизация, но и разрыв связи, и образуются фрагменты, в результате чего образуются ионы, отличные от интактного молекулярного иона, которые появляются в масс-спектре.

Хотя в источнике ионов одновременно генерируются как положительные, так и отрицательные ионы, одновременно регистрируется только одна полярность; следовательно, любой данный масс-спектр состоит из положительных или отрицательных ионов. Молекулы, которые не являются ионизированными, а нейтральные фрагменты откачиваются.

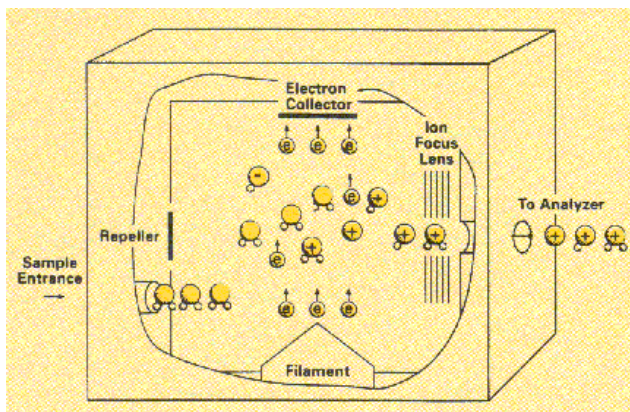


Рисунок 3 – Источник ионизации электронов (ЭИ): ионы генерируются путем бомбардировки молекул газообразного образца пучком энергичных электронов

Масс-спектры положительного иона регистрируют чаще, потому что с помощью этой конкретной методики ионизации образуется намного меньше отрицательных ионов, чем положительных. Положительные ионы продвигаются в анализатор, поддерживая источник ионов с положительным электрическим потенциалом по отношению к анализатору и фокусируясь с помощью напряжений, приложенных к системе линз, расположенной между источником и анализатором. Электрод помогает фокусировать ионы в анализаторе. Отрицательные ионы и электроны притягиваются к положительно заряженной электронной ловушке.

Анализатор использует дисперсию или фильтрацию для сортировки ионов в соответствии с их отношением массы к заряду или связанным с ним свойством. Наиболее широко используемыми анализаторами являются магнитные секторы, квадрупольные масс-фильтры, квадрупольные ионные

ловушки, спектрометры с ионным циклотронным резонансом с преобразованием Фурье и масс-анализаторы времени пролета.

Магнитные секторы изгибают траектории ионов в круговые траектории радиусов, которые зависят от отношения импульса к заряду ионов. Ионы с большим m/z следуют по траекториям большего радиуса, чем ионы с меньшими значениями m/z , поэтому ионы с различными значениями m/z рассеиваются в пространстве. Изменяя траектории ионов за счет изменения напряженности магнитного поля, ионы с различным номинальным отношением массы к заряду могут быть сфокусированы на детекторе.

Масс-спектрометры с двойной фокусировкой используют комбинацию магнитного и электрического полей для фокусировки и сортировки ионов. Распространенной конфигурацией для прибора является геометрия, показанная на рисунке 4 (также на рис.1), в которой магнитный «сектор» следует за электрическим «сектором». Щель действует как фильтр для выбора определенного значения m/z . Электрический сектор фокусирует ионы с учетом различий в кинетической энергии, которые они могут иметь при выходе из области источника. «Двойная фокусировка», эта комбинация «угловой» или «направленной» фокусировки и фокусировки энергии, обеспечивает массовое разрешение, достаточно высокое, чтобы разделить ионы с одинаковой номинальной массой, но разными химическими формулами, такими как C_2H_4 , N_2 и CO , при $m/z = 28$. Так называемые «точные массы», точнее, «высокоточные массы», для C_2H_4 , N_2 и CO составляют 28,0313, 28,0061 и 27,9949 Дальтон соответственно.

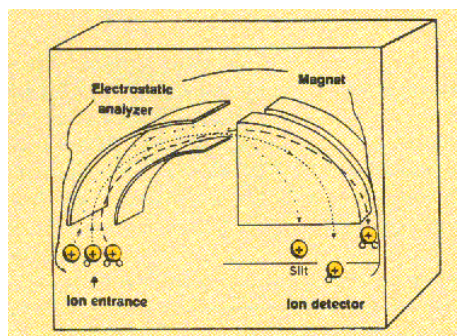


Рисунок 4 – Двойная фокусировка

Массовый анализатор другого типа, называемый **квадрупольным массовым фильтром**, состоит из четырех параллельных полюсов или стержней. В этом устройстве (рис. 5) массовая сортировка зависит от движения ионов, возникающего в результате одновременного применения постоянного (постоянного) и радиочастотного электрических (ВЧ) электрических полей. Сканирование осуществляется путем систематического изменения напряженности поля, тем самым изменяя значение m/z , которое передается через анализатор. Квадрупольные масс-спектрометры обеспечивают более низкое разрешение, чем приборы с двойной

фокусировкой, но, как правило, их легче подключать к различным входным системам и дешевле.

Масс-спектрометр с квадрупольной ионной ловушкой (рис. 6) работает по принципу, аналогичному квадрупольному масс-фильтру. Тем не менее, он не работает как фильтр. Скорее, ионная ловушка хранит ионы для последующих экспериментов и анализа. Он использует поля, генерируемые высокочастотным (и иногда постоянным) напряжением, приложенным к электродам, расположенным в виде сэндвич-геометрии: кольцевой электрод посередине с колпачковыми электродами на каждом конце. В пределах выбранного диапазона отношений массы к заряду, определяемого приложенными напряжениями, устройство захватывает ионы в пространстве, ограниченном электродами. Обычно масс-спектр получают путем сканирования приложенных высокочастотных напряжений для последовательного выброса ионов с увеличением отношения массы к заряду через отверстие в торцевой крышке.

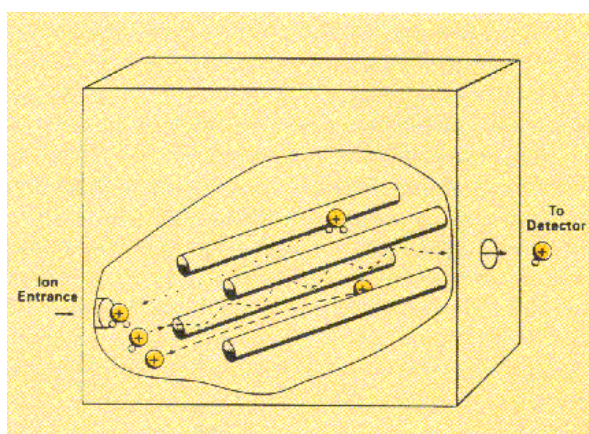


Рисунок 5 – Квадрупольный массовый анализатор

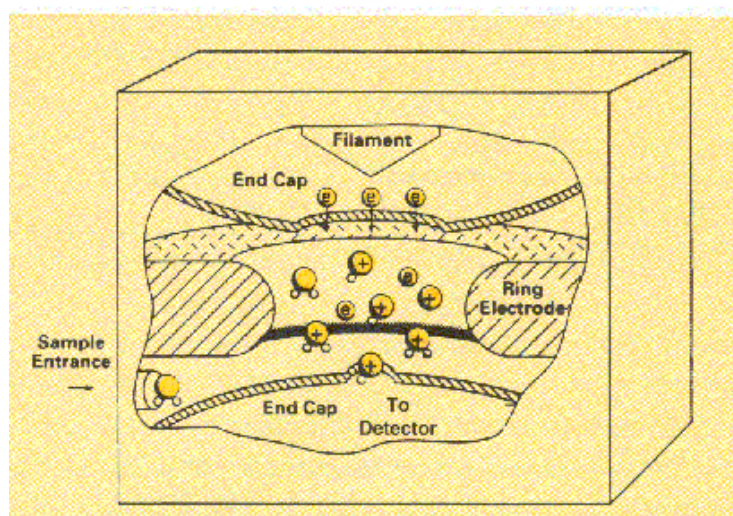


Рисунок 6 – Квадрупольная ионная ловушка

В настоящее время часто используются два других анализатора: спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT-ICR) и масс-спектрометр с пролётным временем (TOF). Уникальные возможности каждого из этих масс-анализаторов делают их особенно полезными, поскольку масс-спектрометрия выходит на новые сферы применения.

В спектрометре FT-ICR (рис. 7) ионы электростатически улавливаются внутри кубической ячейки в постоянном магнитном поле. Ковалентное орбитальное («циклотронное») движение индуцируется приложением радиочастотного импульса между возбуждающими пластинами. Орбитальные ионы генерируют слабый сигнал в детектирующих пластинах клетки. Частота сигнала от каждого иона равна его орбитальной частоте, которая, в свою очередь, обратно пропорциональна его значению m / z . Интенсивность сигнала каждой частоты пропорциональна количеству ионов, имеющих это значение m / z . Сигнал усиливается, и все частотные компоненты определяются, давая масс-спектр. Если давление в ячейке очень низкое, ионное орбитальное движение может поддерживаться в течение многих циклов, и частота может быть измерена с очень высокой точностью. Поэтому прибор FT-ICR можно использовать для генерации спектров с очень высоким разрешением.

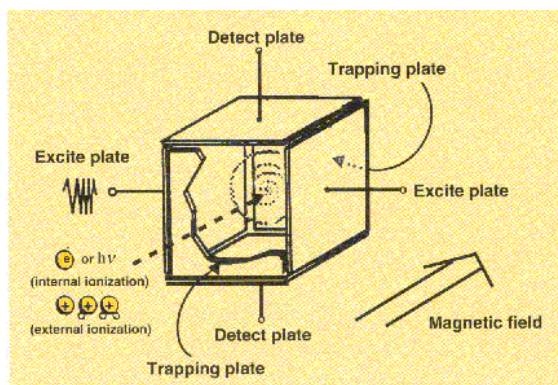


Рисунок 7 – Спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT-ICR): ионы электростатически улавливаются внутри кубической ячейки в постоянном магнитном поле

Масс-анализаторы времени пролета (рис. 8) разделяют ионы в зависимости от их разного времени пролета на известном расстоянии. Краткий выброс ионов происходит из источника. Эти ионы ускоряются, так что ионы с одинаковым зарядом имеют равную кинетическую энергию, затем они направляются в трубу полета. Поскольку кинетическая энергия равна $1/2 mv^2$, где m - масса иона, а v - скорость иона, чем меньше масса иона, тем больше скорость и меньше время его полета. Время прохождения от источника ионов через полетную трубку к детектору, измеренное в микросекундах, может быть преобразовано в значение m / z посредством

соотношений, описанных выше. Поскольку все массы ионов измеряются для каждого всплеска ионов, масс-спектрометры TOF обеспечивают высокую чувствительность и быстрое сканирование. Они могут предоставить массовые данные для биомолекул очень большой массы.

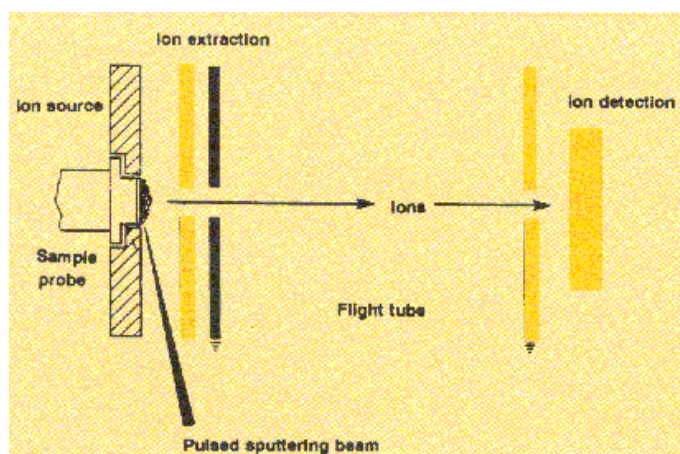


Рисунок 8 – Масс-анализаторы времени пролета (масс-спектрометр с пролётным временем (TOF))

Как работает детектор ионов?

Во всех масс-спектрометрах, кроме приборов FT-ICR, ионы обнаруживаются после массового анализа путем преобразования энергии столкновения ионов с поверхностью детектора в испускаемые ионы, электроны или фотоны, которые затем считываются различными детекторами света или заряда. В масс-спектрометрах FT-ICR осциллирующий сигнал, индуцированный орбитальными ионами в детектирующих пластинах, используется для обнаружения ионов.

Из-за большого количества информации, которая может быть сгенерирована, и большого количества параметров, которые необходимо изменить за короткий промежуток времени, компьютеры необходимы для управления масс-спектрометром, а также для сбора, хранения и представления спектра. Компьютерные системы данных также обычно включают в себя программное обеспечение для количественного анализа, спектральной интерпретации и идентификации соединений с использованием онлайн-спектральных библиотек.

Как масс-спектрометрические данные могут быть использованы для анализа структуры?

Мы уже видели масс-спектр простой молекулы углекислого газа. Более сложный пример - масс-спектр ацетона, C_3H_6O , на рисунке 9. Этот масс-спектр показывает много фрагментирующих ионов в дополнение к молекулярному иону при m/z 58. Ионы фрагментов используются масс-спектрометрами для определения молекулярных структур. (Иногда символы +[или + •, «плюс точка»] и - [или - •, «минус точка»] используются для

обозначения радикальных [нечетных электронов] ионов. Это важно для понимания закономерностей фрагментации ионов.) Например, потеря 15 Дальтон из молекулярного иона ацетона с образованием иона при m/z 43 указывает на присутствие метильной группы (CH_3-) в исходной молекуле. Последующая потеря 28 Дальтон с получением иона при m/z 15 предполагает присутствие CO . Рационализируя такие потери и рисуя разумные структуры для полученных ионов можно определить структуры исходных соединений. Некоторые обычно наблюдаемые потери составляют: 18 Дальтон для воды, H_2O ; 17 Дальтон для аммиака, NH_3 ; и 77 Дальтон для фенильной группы, C_6H_5 .

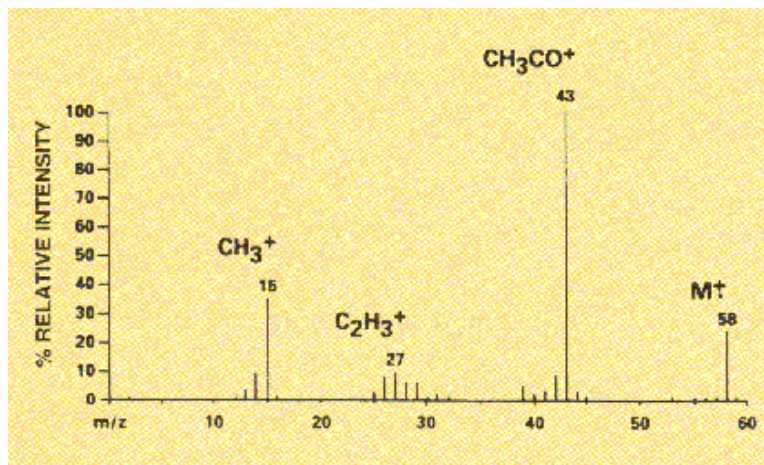


Рисунок 9 – масс-спектр ацетона $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$

Другим средством определения молекулярного состава является точное измерение массы. Каждый изотоп каждого элемента (кроме углерода, которому назначено ровно 12,00000 Дальтон) имеет уникальную нецелую массу. Таким образом, точное измерение массы позволяет определить химический состав. Как показано на рисунке 10, с высоким разрешением можно различить монооксид углерода (CO , m/z 27,995) и азот (N_2 , m/z 28,006) путем точного измерения массы. Спектр, показанный на рис.10, был записан с использованием прибора FT-ICR сверхвысокого разрешения. Обратите внимание, что, в отличие от простых гистограмм, изображающих спектры на рисунках 2 и 9, этот спектр показан в виде графика полученных данных.

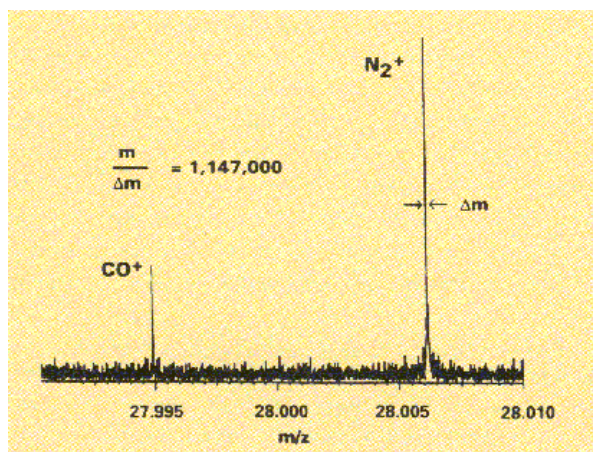


Рисунок 10 – Спектр монооксида углерода (CO, m/z 27,995) и азота (N₂, m/z 28,006) записан с использованием прибора FT-ICR сверхвысокого разрешения.

Для тех молекул, которые могут испаряться без разложения, EI часто используется для генерации ионов для массового анализа. Однако ионизация электронами, ускоренными через потенциал в 70 вольт, является высокоэнергетическим или «жестким» процессом и может привести к интенсивной фрагментации, которая оставляет очень мало или вообще не оставляет следа молекулярного иона. Поскольку молекулярную массу и структуру нелегко определить в отсутствие молекулярного иона, были разработаны методы более низкой энергии или «мягкой» ионизации, основанные *на химической и десорбционной ионизации*.

В отличие от ионизации электронами, большинство применений химической ионизации (ХИ) производят ионы посредством относительно мягкого процесса переноса протона. Молекулы образца подвергаются воздействию большого избытка ионизированного газа-реагента. Перенос протона в молекулу образца M из ионизированного газа-реагента, такого как метан в форме CH₅⁺, дает положительный ион [M + H]⁺. Например, масс-спектр эфедрина (верхний спектр на рис.11) не показывает молекулярного иона при m/z 165 в условиях электронной ионизации. Однако в условиях положительного ХИ (нижний спектр на рисунке 11) протонированная молекула с m/z 166 и ион фракционирования, соответствующий потере воды (18 Дальтон), имеют значительную интенсивность. В обоих спектрах интенсивный ион наблюдается при m/z 58. Но следует отметить, что закономерности фрагментации протонированных молекул [M + H]⁺ не обязательно совпадают с закономерностями фрагментации молекулярных ионов M⁺.

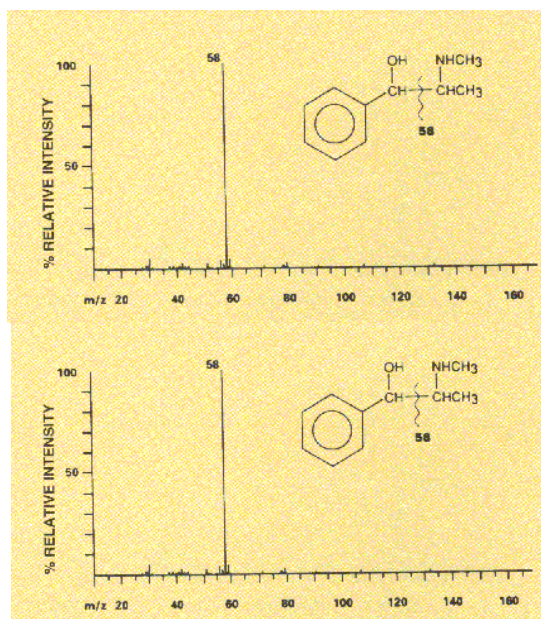


Рисунок 11 – Масс-спектры эфедрина

Отрицательные ионы также могут быть получены в условиях химической ионизации. Перенос протона из M в другие виды газа-реагента или ионов может оставить $[M-H]^-$ отрицательно заряженный ион образца. Добавление электрона к M , процесс, облегчаемый столкновительным уменьшением энергии электронов, генерируемых в источнике, может дать интенсивный M^- ион. Такие ионы, часто являющиеся единственными генерируемыми ионами, могут быть использованы для обнаружения видов с помощью масс-спектрометрии с большой чувствительностью.

Десорбционная ионизация - это термин, используемый масс-спектрометрами для описания процесса, при котором молекула испаряется с поверхности и ионизируется, хотя точный механизм может быть не понят. Для первых четырех методов десорбционной ионизации, перечисленных ниже, образцы десорбируются и ионизируются посредством процесса удара, который включает бомбардировку образца высокоскоростными атомами, ионами, осколками деления или фотонами относительно высокой энергии. Удар отдает энергию в образец непосредственно или через матрицу и приводит как к переносу молекулы образца в газовую фазу, так и к ионизации.

При полевой десорбции образец наносится в виде тонкой пленки на специальную нить, помещенную в электрическое поле очень высокой интенсивности. В этой среде ионы, создаваемые полевым удалением электрона из молекулы, извлекаются в масс-спектрометр.

Насколько большую молекулу можно проанализировать?

Методы десорбционной ионизации позволили широко применять масс-спектрометрию для крупных, нелетучих и хрупких молекул. Анализ больших молекул и кластерных ионов теперь возможен. Масс-спектрометры могут

регулярно обнаруживать соединения масс более 10000 Дальтон. Масс-спектр бычьего сывороточного альбумина (рис. 12) показывает кластер молекулярных ионов, соответствующий протонированному тримеру при m/z 199 290. Также видны ионы, представляющие протонированный димер, протонированную молекулу и дважды протонированную молекулу.

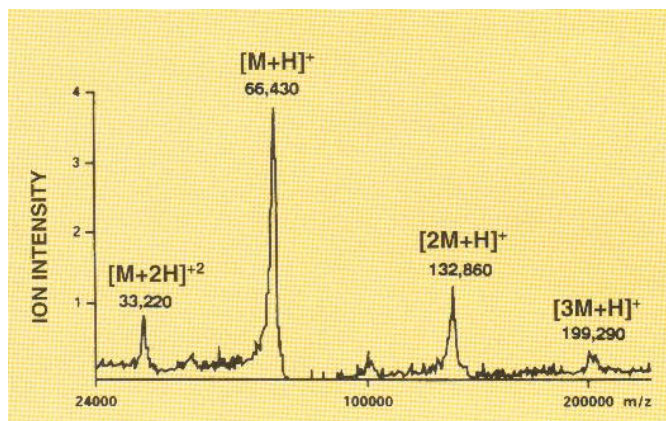


Рисунок 12 – Масс-спектр бычьего сывороточного альбумина

По мере разработки методов десорбционной ионизации возникла соответствующая потребность в масс-спектрометрах, способных анализировать ионы с повышением более высоких значений m/z . Так как электрораспылительная ионизация может наложить много зарядов (z), обычно в форме протонов, на поддающиеся воздействию большие молекулы, такие как белки. Электрораспыление позволяет масс-спектрометру с верхним m/z -диапазоном 2000-4000 анализировать соединения с очень высокой молекулярной массой. Спектр на рис.13 представляет собой белок с молекулярной массой около 29000 Дальтон. Этот спектр был получен с использованием квадрупольного масс-спектрометра с диапазоном m/z только 2000, благодаря тому, что процесс электрораспылительной ионизации добавлял к молекулам белка от 20 до 40 зарядов в виде протонов ($z =$ от 20 до 40). Все основные пики в этом спектре обусловлены белковыми молекулами одинаковой массы, но с различным количеством присоединенных протонов и, следовательно, с разными значениями m/z . Электрораспыление способно ионизировать биологические материалы с молекулярными массами от 10000 до более чем 1000000. Молекулярная масса часто может быть определена с точностью до порядка одной части на 10000 или выше. Поскольку электрораспыление особенно совместимо с методами разделения жидкостей, оно стало широко используемым методом в биологическом и фармацевтическом анализе.

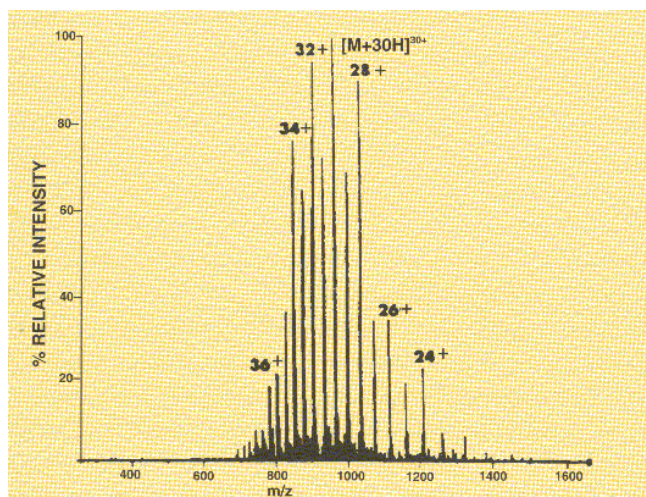


Рисунок 13 – Масс-спектр белка с молекулярной массой около 29000 Дальтон

Как масс-спектрометрия используется для количественного анализа?

Исследователи не всегда заинтересованы в получении полных масс-спектров, если соединения уже известны. Часто они хотят подтвердить присутствие определенных веществ или измерить, сколько их присутствует. Это обычно задача в работах по загрязнению окружающей среды и в фармакокинетических исследованиях, где целью является количественное определение при очень низких концентрациях в сложных смесях. Масс-спектрометр настроен на мониторинг только значений m/z ионов, представляющих интересующие молекулы, чтобы не тратить драгоценное время обнаружения. Во многих случаях форма ионизации выбирается так, чтобы способствовать выработке одного типа иона, тем самым максимизируя чувствительность, сохраняя ионный сигнал в одном значении m/z . На рис.14 только сигналы при m/z 158 и m/z 160 отслеживались во время газохроматографического прогона. Эта процедура известна как *мониторинг выбранных ионов* (SIM).

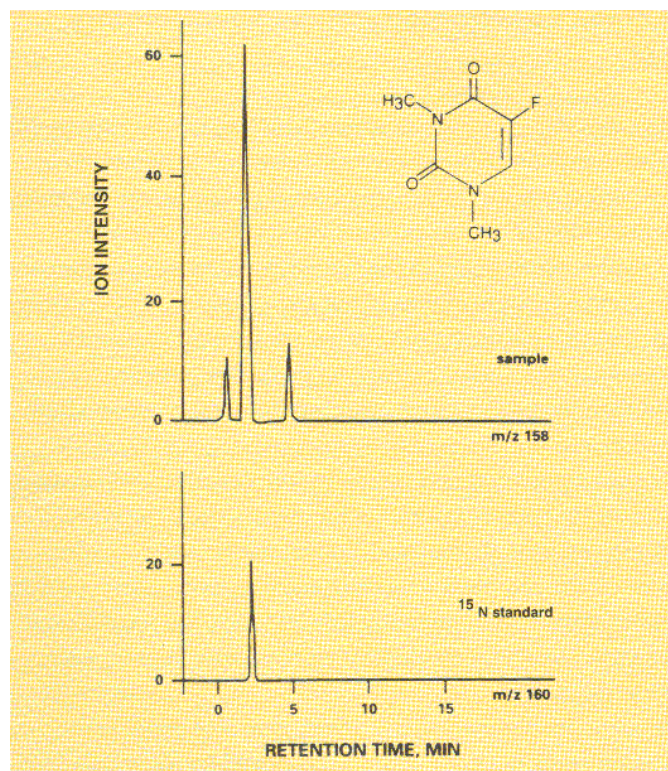


Рисунок 14 – Мониторинг ионов (SIM): отслеживались только сигналы при m/z 158 и m/z 160

Количественный масс-спектральный анализ диметилпроизводного 5-фторурацила в плазме крови проиллюстрирован на рисунке 14. Верхняя кривая показывает профиль SIM молекулярного иона при m/z 158. Соединение, представляющее интерес, производит центральный пик. Два незначительных пика возникают из других компонентов образца, которые также производят ионы при m/z 158. Нижний след - профиль SIM той же молекулы, имеющей ^{15}N , замещенный нормальным ^{14}N в обоих положениях азота. Поскольку оба азота замещены, сигнал от его молекулярного иона наблюдается при m/z 160, на 2 Дальтона выше. Хотя и образец, и стандарт имеют одинаковое время удерживания, они обнаруживаются отдельно по разным массам. Стандарты могут быть тесно связанным веществом или могут быть химически идентичными, но синтезироваться путем замены изотопа одного из элементов, как в этом примере.

Что такое масс-спектрометрия / масс-спектрометрия (МС / МС) ??

Соединение двух стадий массового анализа (МС / МС) может быть очень полезным при идентификации соединений в сложных смесях и при определении структур неизвестных веществ. В сканировании ионов продуктов, наиболее часто используемом режиме МС / МС, генерируются спектры ионов продуктов с любым выбранным значением m/z , представленным в обычном масс-спектре. Из смеси ионов в области источника или собранной в ионной ловушке ионы с конкретным значением m/z выбираются на первой стадии массового анализа. Эти «исходные» или

«исходные» ионы фрагментируются, и затем ионы продукта, полученные в результате фрагментации, анализируются на второй стадии массового анализа (рис. 15). Если образец представляет собой чистое соединение и используется образующая фрагменты ионизация, спектры продукта, полученные из фрагментированных ионов в нормальном масс-спектре, могут предоставить много дополнительной информации для структурного анализа. Если образец представляет собой смесь и мягкая ионизация используется для получения, например, ионов $[M + H]^+$, вторую стадию МС можно использовать для получения идентифицирующего масс-спектра для каждого компонента в смеси. Масс-спектрометрия / масс-спектрометрия также могут быть полезны для устранения помех в экспериментах на SIM-картах, когда ионный сигнал с интересующим m/z генерируется более чем одним соединением. Для секторных, квадрупольных приборов и приборов времени пролета каждая стадия массового анализа требует отдельного масс-анализатора. Для квадрупольных ионных ловушек или масс-спектрометров ICR эксперимент MS / MS может проводиться последовательно во времени в одном анализаторе массы.

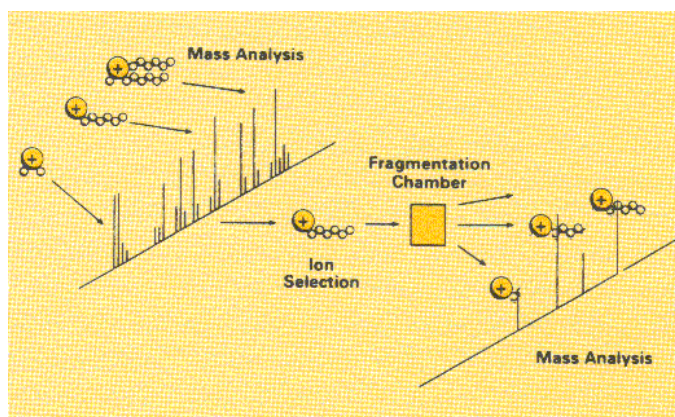


Рисунок 15 – Соединение двух стадий массового анализа (МС / МС)

Что такое элементная масс-спектрометрия?

В элементной масс-спектрометрии, методике, используемой в основном для неорганических материалов, определяется элементный состав образца, а не структурные особенности его химических составляющих. Элементная масс-спектрометрия дает количественную информацию о концентрациях этих элементов. Источником ионов, используемым в элементарной МС, обычно является разряд атмосферного давления, такой как индуктивно-связанная плазма (ICP), или устройство средней мощности, такое как источник тлеющего разряда. В любом случае разложение образца на составляющие его атомы и ионизация этих атомов происходит в специально разработанном источнике. Полученный атомно-ионный пучок затем разделяется или сортируется масс-спектрометром, а сигнал как функция m/z используется для определения состава образца. При использовании ICP в качестве источника ионов пределы обнаружения раствора вплоть до уровня

«часть на триллион» возможны в благоприятных случаях, в то время как с источником тлеющего разряда образцы твердого металла могут быть проанализированы напрямую, а их элементный состав определен более миллиона кратный диапазон концентраций. Изотопная информация легко доступна, и образцы могут быть проанализированы очень быстро.

Применение. Впервые масс-спектрометрия в биохимии была применена для изучения метаболических процессов. Вещества, меченные с помощью необычных изотопов, например ^{15}N или ^{18}O , вводили в рацион животных и затем исследовали конечные продукты их метаболизма. Сравнивая непосредственно интенсивности спектров самих метаболитов, содержащих обычный и необычный изотопы, или продуктов их деградации, определяли относительное содержание изотопа (отношение количества необычного изотопа к обычному) в различных продуктах метаболизма. В тех случаях, когда это возможно, метаболические процессы, однако, лучше исследовать более простым и дешевым способом – с помощью радиоактивных изотопов.

В биохимии, как и в физической химии, масс-спектрометрия применяется в основном для определения структуры молекул и, следовательно, идентификации веществ, т. е. для качественного анализа относительно сложных органических молекул. Зная точный молекулярный вес органической молекулы, можно определить ее элементарный состав, имея таблицы точных масс атомов. Для правильной интерпретации данных по масс-спектрометрии очень важно, чтобы исследуемое вещество было чистым, поэтому целесообразно объединять масс-спектрометр с газожидкостным хроматографом.

В настоящее время масс-спектрометры применяются для анализа последовательности аминокислот в олигопептидах, получающихся в результате гидролиза белков или другим путем. Пептидные связи легко расщепляются при бомбардировке их электронами.