**Лекція 8. Фізико-хімічні методи в біології**

Мас-спектрометрія та хромато-мас-спектрометрія.

*Мас-спектрометрія (mass spectrometry) – метод дослідження* речовин, який заснований на іонізації атомів і молекул, що входять до складу проби речовини і реєстрації спектру мас утворених іонів.

Мас-спектроскопія є одним з високоефективних методів експрес-аналізу і встановлення будови як індивідуальних сполук (природних і синтетичних), так і їх сумішей. Завдяки високій чутливості (для аналізу необхідно всього 10-9–10-6 г досліджуваної речовини, навіть тоді, коли її частка становить 10-6 %), можливості використовувати в комбінації з газовою і рідинною високоефективною хроматографією цей метод набув широкого застосування.

Метод принципово відрізняється від інших спектрометричних методів, оскільки структурна мас-спектрометрія заснована на руйнуванні органічної молекули в результаті іонізації тим чи іншим способом. Оптичні, рентгенівські та деякі інші методи аналізують випромінювання або поглинання енергії молекулами чи атомами, а мас-спектрометрія - безпосередньо самі частинки речовини.

**Теоретичні основи методу мас-спектрометрії**

Метод мас-спектроскопії базується на явищі іонізації (грецьк. ion – той, що іде) – перетворенні нейтральних атомів або молекул в іони, яке протікає за час 10-15–10-17 с, і викликається дією іонізуючого випромінювання, високих температур, під впливом хімічних реакцій, електричного поля та ін.

Для того, щоб одержати мас-спектр, досліджувана речовина іонізується (переводиться у газоподібний стан), тобто нейтральні молекули і атоми, що входять до складу будь-якої органічної або неорганічної речовини перетворюють у заряджені частки – іони. ***ю.*** Іонізація здійснюється при бомбардуванні електронами молекул в газоподібному стані. Зв'язки в молекулах розриваються і утворюються іони. Вид і кількість фрагментів, що утворилися, характерні для даної молекули. Іонізація здійснюється по різному для органічних і неорганічних речовин. Процес відбувається у вакуумі, інакше електрони швидко зарядять молекули, що входять до складу повітря і іони знову перетворяться в нейтральні молекули.

Іонізація поділяється:

- м'яка іонізація відбувається при низькій енергії іонізуючих електронів, коли від молекул речовини відривається один електрон і утворюється молекулярний іони (M+ ). У цьому випадку в спектрі присутній один пік. Визначити молекулярну масу аналізованої речовини нескладно.

- тверда іонізація відбувається, якщо енергія іонізації підвищується і молекулярний іон розпадається на більш дрібні осколки іону. Вибір методу іонізації залежить від властивостей досліджуваної речовини, та заданого ступеня іонізації.

1 спосіб. Іонізація електронним ударом (тверда іонізація). Потік електронів бомбардує молекули досліджуваної речовини в газоподібному станіи, у результаті утворюється безліч осколкових іонів. Мас-спектри у цьому випадку досить складні і для їх інтерпретації використовують спеціальні каталоги спектрів.

2 спосіб. Найпоширеніший метод м'якої іонізації летких речовин - хімічна іонізація. У цьому методі в іонізаційній камері підтримують високу концентрацію метану, який іонізується при бомбардуванні електронами в першу чергу. Потім іони метану зустрічаються з молекулами досліджуваної речовини і в результаті іон-молекулярних реакцій утворюються іони.

3 спосіб. Для м'якої іонізації зразків в рідкій фазі використовують бомбардування швидкими атомами. Потік швидких атомів ксенону або аргону бомбардує розчин зразка в гліцерині, у результаті цього утворюється велика кількість молекулярних іонів.

4 спосіб. Метод м'якої іонізації - польова десорбція. У цьому випадку іони утворюються під дією сильного електричного поля. Метод часто використовують для іонізації неполярних, термічно нестабільних речовин, а також сполук з великою молекулярною масою (полімерів), тобто в тих випадках, коли не можна застосовувати бомбардування швидкими атомами.

5 спосіб. Широко поширена іонізація розпиленням (електророзпилення, терморозпилення і т.д.).

Іони, які утворюються при іонізації молекул, називаються молекулярними іонами з масовими числами М+. Вони мають «час життя» біля 10-5 с. Масове число (m/e) таких однозарядних іонів дорівнює молекулярній масі молекули речовини, що досліджується. Утворені молекулярні іони мають відношення маси до заряду m/e, яке відповідає масі молекул речовини. Низька енергія електронів, що викликають іонізацію молекул, зменшує вірогідність іонізації певної частини молекул, потенціал іонізації яких за різних причин може бути вищим. Частіше досліджуються позитивні іони, тому що наявні методи іонізації дозволяють одержувати їх більш простими шляхами й у більших кількостях, ніж негативні.

Розділяють іони, що утворилися в просторі, за допомогою електричного або магнітного поля, частіше у вакуумі. Результатом іонізації молекул, поділу іонів і детектування іонів є спектр, за яким можна визначити молекулярну масу і навіть отримати деяку інформацію про будову речовини.

Мас-спектр – це набір піків відсортованих за величиною відношення маси заряджених фрагментів молекул до їх заряду. Висота піка це інтенсивність сигналу, що залежить від величини відношення маси часток, що утворилися при іонізації молекул, до їх заряду (m/z). Сукупність значень m/z і величин струмів цих іонів, представлена у вигляді графіка, називається мас-спектром речовини. Система координат - по абсцис відкладають значення m/e, які калібровані відносно значення m/e іона вихідної речовини (у мас-спектрі пік, що відповідає найбільший масі, основний пік), а по вісі ординат – значення у відсотках амплітуди інтенсивності піків відносно амплітуди основного піка. На рис. 1 представлено вигляд мас-спектру бензену.

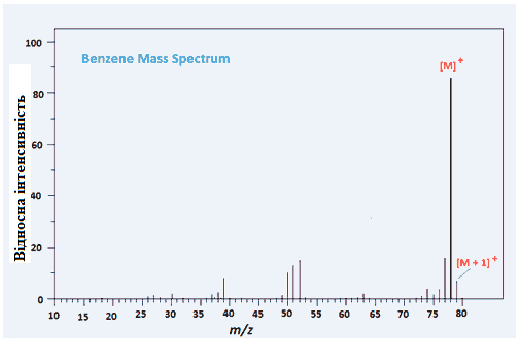


Рис. 1- *Мас-спектру бензену*

Крім наданої вище графічної форми, мас-спектри можуть бути представлені алгебраїчно у вигляді m/z (І), наприклад, спектр метилсаліцилату: 153(3), 152(60), 121(31), 120(98), 93(12), 92(59), 65(18), 64(12), 63(9), 53(2), 33339(14). Перше із значень у спектрі характеризує відношення m/z частинки, а інше (у лапках) – відносний вміст частинок, які характеризуються даним відношенням. Для рішення багатьох задач достатньо скороченої форми мас-спектру, на якому представлені найбільш інтенсивні сигнали (5-10), розташовані за зменшенням інтенсивності.

При кількісному визначенні проводять відповідні перерахунки на результати дослідів з еталонами.

Здатність мас-спектрометра розділяти іони залежить від конструкції і описується величиною **R**, яка називається *роздільною здатністю*, вона визначається як: **R = M/ΔМ**, де **M** – максимальна маса, для якої перекриття піків менше, ніж за 10%, а **ΔМ** – одна атомна одиниця маси. Ця величина визначає максимальну масу іонів, які відрізняються на одну атомну одиницю, для яких прилад розділяє піки не менш, ніж на 90%. Ділянка значень **R** зазвичай знаходиться в інтервалі між 100 і 500 000. Роздільна здатність є важливою характеристикою мас-спектрів. У залежності від роздільної здатності розрізняють спектрометри низької (R≈5000/1) і високої (10 000/1 – 100 000/1) роздільної здатності.

*Чутливістю* в мас-спектроскопії є величина, що показує, яку кількість речовини потрібно ввести в мас-спектрометр для того, щоб її можна було із високою мірою достовірності виявити.

***Апаратура і особливості досліджень методом мас-спектрометрії***

Кожен мас-спектрометр незалежно від деталей конструкції складається з наступних основних елементів:

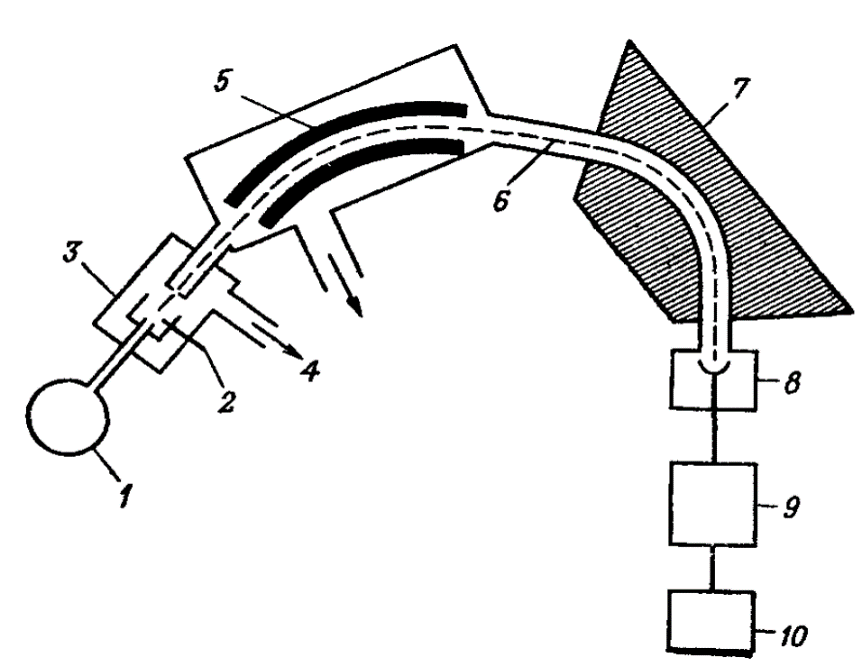
1) системи введення речовини в прилад;

2) джерела іонів, призначеного для отримання іонів з аналізованих речовин;

3) мас-аналізатора, призначеного для поділу іонів за масами (вірніше, по відношенню маси до заряду – т/z);

4) детектора і пристрою реєстрації кількості іонів різної маси.

Існують мас-спектрометри з одинарним і подвійним фокусуванням. Останні більш чутливі, їх схема (основні пристрої) наведена на рис. 2.

Рис. 2. *Схема будови мас-спектрометра:*

1 – резервуар з парою зразка; 2 – твердий зразок; 3 – іонізаційна камера; 4 – вакуумний насос; 5 – електростатичне поле; 6 – траєкторія іонів; 7 – магніт; 8 – детектор (приймач); 9 – помножувач; 10 – реєструвальний пристрій (самописець, комп’ютер); 11 – ЕОМ, яка містить банк мас-спектрів та програми їх автоматичної інтерпретації.

Для того, щоб іони досліджуваної речовини не взаємодіяли з молекулами повітря і не утворювали внаслідок цього побічні продукти, дослідження проводять у високому вакуумі (тиск не більш 10-5 Па). Зразки малолетких речовин вміщують безпосередньо в іонізаційну камеру і там їх випаровують електроспіральним методом.

Після іонізації іони, що виникли прискорюють електричним полем, а потім подають в магнітне поле, де вони відхиляються від своєї першопочаткової орбіти. При зміні напруженості магнітного поля і прискорюючого електричного поля змінюється траєкторія іонів і на щілину детектора (приймача) потрапляють іони з певним значенням m/e. При скануванні потоку іонів у поперечній його площині отримують весь спектр іонів.

Роздільна здатність мас-спектрометрів, крім способів приготування зразків для дослідження, умов в іонізаційний камері, напруженості магнітного поля і прискорюючого електричного поля, способів фокусування іонів на щілину детектора тощо, залежить також від розміру цієї щілини – чим вона менша, тим ця здатність більша. Але при зменшенні ширини щілини детектора знижується чутливість приладу, оскільки зменшується кількість іонів, які потрапляють у детектор. Тому, необхідно з урахуванням мети і поставлених завдань обирати оптимальні розміри щілини детектора. Детекторами мас-спектрометрів є спеціальні електронні помножувачі. Електричний струм після детектора підсилюється і реєструється самописцем, а також дані вводяться в комп’ютер де, як вже відмічалося, проводиться аналіз (порівняння з банком мас-спектрів) цілого ряду речовин. Сучасні мас-спектрометри наділені мікропроцесорами комп’ютерів, які керують роботою спектрометра та проводять обробку спектрів. Ідентифікація речовини методом мас-спектроскопії проводиться порівняням отриманого спектра з банком спектрів, що введені в пам’ять комп’ютера. Даний спосіб не придатний для встановлення будови нових сполук, які синтезовані або виділені з природних джерел. Для правильної інтерпретації мас-спектрів важливо, щоб речовини, які досліджуються, були чистими. Для цього мас-спектрометри, як правило, поєднують з газорідинними хроматографами.

***Хромато-мас-спектрометрія*** (chromato-mass-spectrometry) – гібридний метод аналізу сумішей головним чином органічних речовин та визначення слідових кількостей речовини в об'ємі рідини, заснований на комбінації двох самостійних методів – *хроматографії* та *мас-спектрометрії.* Спочатку сполуки розділяються на колонці хроматографа з послідовним виходом компонентів з колонки в іонне джерело мас-спектрометра, де відбувається їх іонізація (рис. 3).Процеси розділення та аналізу тут протікають абсолютно незалежно один від одного. Відомо 2 варіанти хромато-мас-спектрометрії, що представляють собою комбінацію мас-спектрометрії з газовою [хроматографією](http://ua-referat.com/%D0%A5%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D1%96%D1%8F) (gas chromatography-mass spectrometry), або з високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ, high-performance liquid chromatography, HPLC).



Рис. 3 –Будова газового **хромато-мас-спектрометра**

Хроматографічні детектори забезпечують отримання інформації про аналізовані речовини за часом утримування, амплітудою та площі піків.   
Мас-спектрометричний детектор розширює можливості аналізу за рахунок отримання додаткової спектральної інформації про хроматографічні піки.

Метод хромато-мас-спектрометрії використовують при структурно-аналітичних дослідженнях в органічній хімії, нафтохімії, біохімії, медицині, фармакології, для охорони навколишнього середовища та ін.

*Письмово в лекційному зошиті дати відповіді на наступні запитання:*

1. *Описати можливості застосування мас-спектрометрії та хромато-мас-спектрометрії*
2. *Знайти в інтернет-джерелах відео практичного виконання мас-спектрометрії та хромато-мас-спектрометрії та скласти алгоритм дослідження (навести та пояснити кожен етап).*
3. *Визначити переваги та недоліки кожного з наведених методів.*

**Література:**

1. Луцик, В.И. Физико-химические методы анализа: учебн. пос. /В.И. Луцик, А.Е. Соболев, Ю.В. Чурсанов. 1-е изд. Тверь: ТГТУ, 2008. – 208 с.
2. Отто М. Современные методы аналитической химии. – М.: Техносфера, 2008.- 543 с.
3. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии. – М.: Мир, ООО «Издательство АСТ», 2003. – 683 с., ил. – (Методы в химии).
4. Торосян В.Ф. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа. Практическое руководство: учебно-методическое пособие/В.Ф. Торосян – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010. – 195 с.
5. Иванова М.А., Белоглазкина М.Б. Аналитическая химия и физико- химические методы анализа. – М.: РИОР, 2006. – 315 с.
6. Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн. 1. Общие вопросы. Методы разделения: Учебн. для вузов / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова и др. Под ред. Ю.А. Золотова. − М.: Высш. шк., 2000. – 351 с.