


Тема 7

МАС- ТА ХРОМАТО-МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ. ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЯ

Мета: розглянути основні принципи мас-спектрометрії, хромато-мас-спектрометрії, ЯМР-спектроскопії, навчитися використовувати дані методи та розшифровувати спектри.

 **Основні терміни та поняття:** мас-спектр, електронний удар, ізотопи, резонанс, ЯМР-спектр, ПМР-спектр, хімічний зсув, дейтеровані розчинники.

План

1. Мас-спектрометрія.
2. Хромато-мас-спектрометрія.
3. ЯМР-спектроскопія

1. Мас-спектрометрія

Мас-спектрометрія – метод дослідження речовин шляхом визначення відносини маси до заряду (якості) і кількості заряджених частинок, що утворюються при тому чи іншому процесі впливу на речовину. Історія мас-спектрометрії ведеться з основоположних дослідів Джона Томсона на початку ХХ ст. Закінчення "метрею" термін отримав після повсюдного переходу від детектування заряджених частинок за допомогою фотопластинок до електричним вимірюванням іонних струмів.

Істотна відмінність мас-спектрометрії від інших аналітичних фізико-хімічних методів полягає в тому, що оптичні, рентгенівські і деякі інші методи детектують випромінювання або поглинання енергії молекулами або атомами, а мас-спектрометрія безпосередньо детектує самі частинки речовини.

Мас-спектрометрія у широкому сенсі – це наука отримання та інтерпретації мас-спектрів, які, у свою чергу, виходять за допомогою мас-спектрометрів.

Мас-спектрометр - це вакуумний прилад, що використовує фізичні закони руху заряджених частинок у магнітних і електричних полях, необхідний для отримання мас-спектра.

Мас-спектр, як і будь-який спектр, у вузькому сенсі – це залежність інтенсивності іонного струму (кількості) від ставлення маси до заряду (якості). Зважаючи квантування маси і заряду типовий мас-спектр є дискретним. Зазвичай (в рутинних аналізах) так воно і є, але не завжди. Природа аналізованого речовини, особливості методу іонізації, і вторинні процеси в мас-спектрометрії можуть залишати свій слід в мас-спектрі. Так, іони з однаковими відносинами маси до заряду можуть виявитися в різних частинах

спектра і навіть зробити частину його безперервним. Тому мас-спектр у широкому сенсі це щось більше, несучий специфічну інформацію і робить процес його інтерпретації більш складним і захоплюючим. Іони бувають однозарядні і багатозарядні, як органічні, так і неорганічні. Більшість невеликих молекул при іонізації набуває тільки один позитивний або негативний заряд. Атоми здатні набувати більше одного позитивного заряду і тільки один негативний. Білки, нуклеїнові кислоти і інші полімери здатні набувати множинні позитивні і негативні заряди. Атоми хімічних елементів мають специфічну масу. Таким чином, точне визначення маси аналізованої молекули дозволяє встановити її елементний склад. Мас-спектрометрія також дозволяє отримати важливу інформацію про ізотопний склад аналізованих молекул. В органічних речовинах молекули являють собою певні структури, утворені атомами. Природа і людина створили справді незліченна різноманіття органічних сполук. Сучасні мас-спектрометри здатні фрагментувати йони та визначати масу отриманих фрагментів. Таким чином можна отримувати дані про структуру речовини.

Принцип роботи мас-спектрометра.

Прилади, які використовуються в мас-спектрометрії, називаються мас-спектрометри або мас-спектрометричні детектори. Ці прилади працюють з матеріальним речовиною, яка складається з найдрібніших частинок – молекул і атомів. Мас-спектрометри встановлюють, що це за молекули (тобто які атоми їх складають, яка їхня молекулярна маса, яка структура їх розташування) і що це за атоми (тобто їх ізотопний складу). Істотна відмінність мас-спектрометрії від інших аналітичних фізико-хімічних методів полягає в тому, що оптичні, рентгенівські і деякі інші методи детектують випромінювання або поглинання енергії молекулами або атомами, а мас-спектрометрія має справу з самими частинками речовини. Мас-спектрометрія вимірює їх маси, вірніше, співвідношення маси до заряду. Для цього використовуються закони руху заряджених частинок матерії в магнітному або електричному полі. Мас-спектр – це сортування заряджених частинок відповідно до їхніх мас (відноsinам маси до заряду).

По-перше, для того щоб отримати мас-спектр, необхідно перетворити нейтральні молекули й атоми, складові будь-якої органічної або неорганічної речовини, в заряджені частинки – іони. Цей процес називається іонізацією і по-різному здійснюється для органічних і неорганічних речовин. В органічних речовинах молекули являють собою певні структури, утворені атомами.

По-друге, необхідно перевести іони в газову фазу у вакуумній частині мас-спектрометра. Глибокий вакуум забезпечує безперешкодний рух іонів всередині мас-спектрометра, а при його відсутності іони розсіюються і рекомбінують (перетворюються назад в незаряджені частки).

Умовно способи іонізації органічних речовин можна класифікувати по фазах, в яких знаходяться речовини перед іонізацією.

Газова фаза:

- електронна іонізація (EI, EI – Electron ionization);

- хімічна іонізація (ХІ, СІ – Chemical Ionization);
- електронне захоплення (ЕЗ, ЄС – Electron capture);
- іонізація в електричному полі (ПІ, ФІ – Field ionization).

Рідкафаза:

- термоспрей;
- іонізація при атмосферному тиску (АДІ, АР – Atmospheric Pressure Ionization);
- електроспрей (ЕС, ЕСІ - Electrospray ionization);
- хімічна іонізація при атмосферному тиску (ХІАД, АРСІ – Atmospheric pressure chemical ionization);
- Фотоіонізація при атмосферному тиску (ФІАД, АРПІ – Atmospheric pressure photoionization).

Твердафаза:

- пряма лазерна десорбція – мас-спектрометрія (ПЛДМС, LDMS – Direct Laser Desorption – Mass Spectrometry);
- матрично-активованалазернадесорбція (іонізація) (Малда, MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption (Ionization));
- мас-спектрометрія вторинних іонів (МСБІ, СИМС – Secondary-Ion Mass Spectrometry);
- бомбардування швидкими атомами (ББА, ФАВ – Fast Atom Bombardment);
- десорбція в електричному полі (ПД, ФД – Field Desorption);
- плазмова десорбція (ПД, РД – Plasma desorption).

У неорганічній хімії для аналізу елементного складу застосовуються жорсткі методи іонізації, так як енергії зв'язку атомів у твердому тілі на багато більше, значить, і значно більш жорсткі методи необхідно використовувати для того, щоб розірвати ці зв'язки і отримати іони:

- іонізація в індуктивно-зв'язаній плазмі (ІСП, ІС – Pinductively coupled plasma);
- термо іонізація або поверхнева іонізація;
- іонізація в тліючому розряді і іскрова іонізація;
- іонізація в процесі лазерної абляції.

Історично першими методи іонізації були розроблені для газової фази. На жаль, дуже багато органічних речовин неможливо випаровувати, тобто перевести в газову фазу, без розкладання. Тому їх не можна йонізувати електронним ударом. Але серед таких речовин майже все, що становить живу тканину (білки, ДНК тощо), фізіологічно активні речовини, полімери, тобто все те, що сьогодні представляє особливий інтерес. Мас-спектрометрія не стояла на місці і в останні роки були розроблені спеціальні методи іонізації таких органічних сполук. Сьогодні використовуються в основному два з них – іонізація при атмосферному тиску і її підвиди – електроспрей (ЕС), хімічна іонізація при атмосферному тиску і фотоіонізація при атмосферному тиску, а також іонізація лазерною десорбцією за сприяння матриці (Малда).

Отримані при іонізації іони за допомогою електричного поля переносяться в мас-аналізатор. Там починається другий етап мас-

спектрометричного аналізу – сортування іонів по масах (точніше, по відношенню маси до заряду).

Існують наступні типи мас-аналізаторів.

1. *Безперервні мас-аналізатори:*

- магнітний і електростатичний секторний мас-аналізатор;
- квадрупольний мас-аналізатор.

2. *Імпульсні мас-аналізатори:*

- часопролітний мас-аналізатор;
- іонна пастка;
- квадрупольна лінійна пастка;
- мас-аналізатор іонно-циклотронного резонансу з Фур'є-перетворенням;
- орбітреп.

Різниця між *безперервними і імпульсними мас-аналізаторами* полягає в тому, що в перші іони надходять безперервним потоком, а в другі – порціями, через певні інтервали часу.

Мас-спектрометр може мати два мас-аналізатора. Такий мас-спектрометр називають *тандемним*. Тандемні мас-спектрометри застосовуються, як правило, разом з "м'якими" методами іонізації, при яких не відбувається фрагментації іонів аналізованих молекул (молекулярних іонів). Таким чином перший мас-аналізатор аналізує молекулярні іони. Залишаючи перший мас-аналізатор, молекулярні іони фрагментуються під дією зіткнень з молекулами інертного газу або випромінювання лазера, після чого їх фрагменти аналізуються в другому мас-аналізаторі. Найбільш поширеними конфігураціями тандемних мас-спектрометрів є квадруполь-квадрупольний і квадруполь-часопролітний.

Останнім елементом описуваного нами спрощеного мас-спектрометра є детектор заряджених частинок. Перші мас-спектрометри використовували як детектор фотопластинку. Зараз використовуються діодні вторинно електронні помножувачі, в яких іон, потрапляючи на перший диод, вибиває з нього пучок електронів, які, у свою чергу, потрапляючи на наступний диод, вибивають з нього ще більшу кількість електронів і т.д. Інший варіант - фотопомножувачі, реєструючі світіння, що виникає при бомбардуванні іонами люмінофора.

Найбільш широке поширення отримав мас-аналізатор, що дозволяє найбільш точно поміряти масу іона, і володіє дуже високою роздільною здатністю. Висока роздільна здатність дозволяє працювати з поліпротонованими іонами, що утворюються при іонізації білків і пептидів в електроспрей, а висока точність визначення маси дозволяє отримувати бруто-формулу іонів, роблячи можливим визначати структуру послідовностей амінокислотних залишків у пептидах і білках, а також детектувати після трансляції модифікацію білків. Це зробило можливим секвенування білків без їх попереднього гідролізу на пептиди. Такий спосіб отримав назву "Top-down" протеоміки. Отримання унікальної інформації стало можливо завдяки застосуванню мас-аналізатора іонно-циклотронного

резонансу з Фур'є-перетворенням. У цьому аналізаторі йони влітають в сильне магнітне поле і обертаються там по циклічним орбітах (як в циклотроні, прискорювачі елементарних частинок). Такий мас-аналізатор володіє певними перевагами: має дуже високий дозвіл, діапазон вимірюваних мас досить широкий, може аналізувати йони, які одержуються всіма способами. Однак для своєї роботи він вимагає сильного магнітного нуля, а значить, і використання сильного магніту зі зверхпровідним соленоїдом, підтримуваним при дуже низькій температурі (рідкого гелію, приблизно 270°С).

Найважливішими технічними характеристиками мас-спектрометрів є чутливість, динамічний діапазон, дозвіл, швидкість сканування.

Найважливіша характеристика при аналізі органічних сполук – це чутливість. Для того щоб досягти якомога більшої чутливості при поліпшенні відношення сигналу до шуму, вдаються до детектування по окремих обраним іонам. Виграш у чутливості і селективності при цьому колосальний, але при використанні приладів низького дозволу доводиться приносити в жертву інший важливий параметр – достовірність. Використання високого дозволу на приладах з подвійною фокусуванням дозволяє домагатися високого рівня достовірності, не жертвуючи при цьому чутливістю.

Для досягнення високої чутливості ще можна використовувати тандемну мас-спектрометрію, коли кожен пік, відповідний одиночному іону, можна підтвердити мас-спектром дочірніх іонів. Абсолютним рекордсменом по чутливості є органічний хромато-мас-спектрометр високої роздільної здатності з подвійним фокусуванням.

За характеристикою поєднання чутливості з достовірністю визначення компонентів слідом за приладами високого дозволу йдуть іонні пастки. Класичні квадрупольні прилади нового покоління мають покращені характеристики завдяки ряду інновацій, застосованих в них, наприклад використанню з метою зниження шуму викривленого квадрупольного префільтр, запобігає попаданню нейтральних частинок на детектор.

Мас-спектроскопія – метод дослідження речовини шляхом визначення мас іонів цієї речовини (частіше відношення мас іонів до їхніх зарядів) і їхніх кількостей. Сукупність значень мас й їхніх відносних вмістів (концентрацій) називається мас-спектром (рис. 7.1).

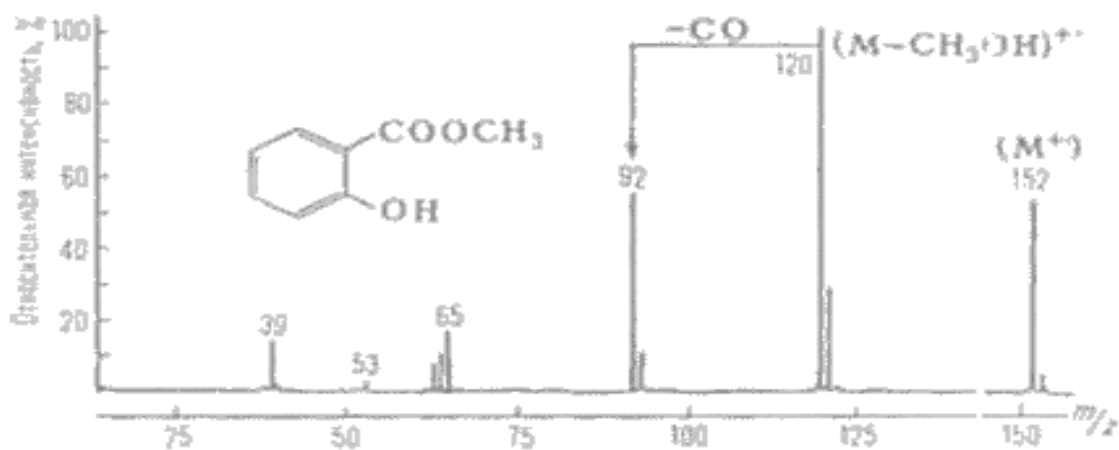


Рисунок 7.1 – Мас-спектр метилсаліцилату

Мас-спектрометричний аналіз речовин полягає у наступному. Невелика кількість речовини у виді пари у вакуумі, звичайно під дією пучка електронів, переводиться в іони чи іонізовані фрагменти молекул; потім позитивно заряджені частки прискорюються і направляються в магнітне поле Н. Ці частки (іони) рухаються по колу, радіус якого залежить від відношення маси частки, що рухається, до її заряду.

Змінюючи напруженість магнітного поля, іонізовані частки (чи іони) фокусують на детектор, що входить у вимірювальну систему. Сигнали детектора записують у виді мас-спектра; по отриманому мас-спектрі ідентифікують речовини, визначають їхні маси і будову. По інтенсивності іонних струмів визначають кількості речовини. Розподіл і розпізнавання іонів у мас-спектрометрах засновано на залежності їхнього руху в електричному та магнітному полях від власної маси і швидкості.

Можливість використання мас-спектрометрії для визначення структури органічних молекул заснована на наступних особливостях мас-спектра.

1. У мас-спектрах багатьох молекул (але не усіх) маються піки молекулярних іонів M^+ , маси яких дорівнюють масам вихідних молекул. Точний вимір маси молекулярного іона (до 10^{-6} а.о.м.) дозволяє визначити елементний склад молекули (чи значно звужити коло можливих його варіантів).

2. Відповідно до ізотопного складу іона йому відповідають різні піки у мас-спектрі, які відрізняються набором ізотопів атомів, що входять в іон. Характерні розподіли інтенсивностей піків різних ізотопних наборів атомів, що входять у даний іон, дозволяють визначити наявність тих чи інших атомів (наприклад сірки, галогенів і ін.) чи оцінити ступінь штучного збагачення тими чи іншими ізотопами.

3. Розпад молекулярного іона, часто супровідна іонізація, призводить до утворення осколкових іонів, що утворюються як при простому розриві зв'язків, так і з протіканням процесів перегрупування атомів.

Маси цих іонів, як правило, відповідають визначеним структурним фрагментам молекули. Таким чином, за мас-спектром можна визначити

молекулярну масу, елементний склад, функціональні групи і структурні фрагменти молекули, а за їхньої сукупності – структуру молекули.

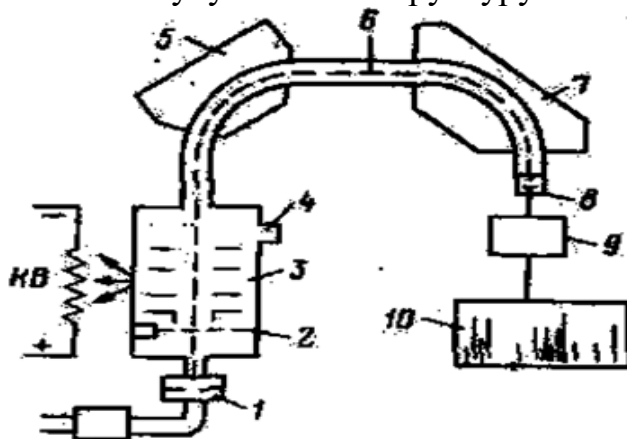


Рисунок 7.2 – Блок-схема мас-спектрометра. 1 – Діафрагма з отвором; 2 – іонізаційна камера; 3 – іонно-оптична система; 4 – відвід до вакуумного насоса; 5 – електростатичний аналізатор; 6 – пучок іонів; 7 – магнітний аналізатор; 8 – колектор; 9 – підсилювач; 10 – реєструючий пристрій.

Для аналізу неорганічних об'єктів складного складу перспективні методи іскрової, лазерної і мас-спектрометрії вторинних іонів. Аналітичні характеристики цих методів унікальна: універсальність (визначення до 40 елементів); низькі абсолютні (10^{-10} - 10^{-14} г, у деяких випадках до 10^{-20} г) і відносні (до 10^{-7} % (ат.)) межі виявлення; малопомітний вплив основи; простота пробопідготовки.

Обробка одержуваного набору даних пов'язана з проведенням великого числа обчислювальних операцій і тому має потребу в автоматизації. Однак автоматизація обробки первинної інформації зумовлена не тільки прагненням до скорочення трудомісткої обчислювальної роботи, але і необхідністю виміру вихідних сигналів на малих рівнях і при високих швидкостях розгорнення мас-спектра, коли графічна реєстрація стає неможливою, тому що не забезпечує достатню точність. Першим етапом автоматизації стало об'єднання спектрометра з ЕОМ для одержання мас-спектрів у реальному масштабі часу. Наступний етап передбачає включення проміжної ланки – запам'ятовуючого пристрою (магнітна стрічка, магнітний диск) і обробку мас-спектра після завершення зйомки. Важливим етапом в удосконалюванні систем мас-спектрометр – ЕОМ з'явилося застосування електронних схем для відображення інформації, що забезпечують діалог «людина-ЕОМ», у якому оператор-дослідник, за необхідністю, може підбирати найбільш придатні для аналізу програми, змінювати їхні параметри. Використання режиму діалогу забезпечує оперативну зміну схеми наступного аналізу. Успішному аналізу сприяє можливість звертання до банку мас-спектрів індивідуальних хімічних сполук.

Останнім часом розвивається новий напрям – двовимірна (тандемна) мас-спектрометрія (МС – МС, мас-спектрометр – мас-спектрометр). Метод включає іонізацію молекул і розподіл за масами іонів, що утворюють мас-спектр, вибір з цього спектру визначеного іона-попередника й одержання

мас-спектра продуктів його фрагментації в результаті мономолекулярного розкладання метастабільних іонів з малим часом життя чи в результаті подальшого порушення іона-попередника зіткненнями з інертним газом. Одержувані спектри можуть використовуватися і для вирішення аналітичних задач, і для ідентифікації окремих сполук у складних матрицях. У порівнянні зі сполученням газової і рідинної хроматографії з мас-спектрометрією МС-МС має перевагу в селективності, чутливості і швидкості аналізу. Найбільша перевага мас-спектрометричного поділу компонентів суміші - менш строгі вимоги до летючості зразків.

2. Хромато-мас-спектрометрія

Мас-спектрометри використовуються для аналізу органічних і неорганічних сполук. Органічні речовини в більшості випадків являють собою багатокомпонентні суміші індивідуальних компонентів. Наприклад, показано, що запах смаженої курки становлять 400 компонентів (тобто 400 індивідуальних органічних сполук). Завдання аналітики полягає в тому, щоб визначити, скільки компонентів складають органічну речовину, дізнатися, які це компоненти (ідентифікувати їх) і скільки кожного з'єднання міститься в суміші. Для цього ідеальним є поєднання хроматографії з мас-спектрометрією. Газова хроматографія якнайкраще підходить для поєднання з іонним джерелом мас-спектрометра з іонізацією електронним ударом або хімічної іонізацією, оскільки в колонці хроматографа з'єднання вже знаходяться в газовій фазі. Прилади, в яких мас-спектрометричний детектор скомбінований з газовим хроматографом, називаються хромато-мас-спектрометрами ("Хромасс").

Багато органічних сполук неможливо розділити на компоненти за допомогою газової хроматографії, але можна розділити за допомогою рідинної хроматографії. Для поєднання рідинної хроматографії з мас-спектрометрією сьогодні використовують джерела іонізації в електроспрес та хімічної іонізації при атмосферному тиску, а комбінацію рідинних хроматографів із мас-спектрометрами називають ЖХ/МС. Найпотужніші системи для органічного аналізу, затребувані сучасної протеомікою, будуються на основі надпровідного магніту і працюють за принципом іонно-циклотронного резонансу.

Хромато-мас-спектрометрія (ХМС) є одним із сучасних гібридних методів, який поєднує можливості хроматографічного і мас-спектрометричного аналізів. Мас-спектрометрія дає найкращі результати, коли проба містить одну речовину, а хроматографія стикається з великими труднощами при ідентифікації компонентів складних сумішей, передусім сумішей органічних і неорганічних сполук, однак є найефективнішим методом розділення. Поєднання можливостей мас-спектрометрії і хроматографії у рамках єдиного хромато-мас-спектрометричного методу дає змогу як детектувати, так і ідентифікувати невеликі концентрації органічних

сполук у комплексних сумішах, притаманних, зокрема, різним забруднювачам навколишнього середовища.

Практична реалізація ідеї гібриду хроматографії з мас-спектрометрією вимагала конструктивного і технологічного об'єднання хроматографа і мас-спектрометра у єдину установку, а також створення єдиної системи отримання та обробки потоків інформації від різних вузлів цієї установки. Вирішення інформаційних проблем, наприклад, розшифровки даних аналізу, здійснено завдяки залученню засобів електронно-обчислювальної техніки. Як вирішувались проблеми об'єднання інструментальних засобів, розглянемо на прикладі тандему газовий хроматограф – мас-спектрометр (ГХ/МС).

Із різних задач, які виникають при створенні тандему ГХ/МС, візьмемо одну із найважливіших: естафету проби від хроматографа у мас-спектрометр.

Потік газу, який виходить із газового хроматографа, має тиск близько 10^5 Па; тиск газу, який входить у йонне джерело мас-спектрометра, не повинен перевищувати при різних методах йонізації 10^{-3} – 10 Па. Оскільки компоненти проби у газі є незначної концентрації, просте зменшення тиску неможливе, необхідне відокремлення газу-носія. Здійснюють це за допомогою сепаратора. Газову суміш (газ-носіє і проба) пропускають через пористу трубку (рис. 7.3), у якій газ-носіє (зазвичай водень або гелій), із незначною молекулярною масою, дифундує через шпори трубки і відсмоктується насосом, а дещо важчі молекули взірця надходять у мас-спектрометр.

Тандем ГХ/МС може діяти у двох режимах. Вимірний блок МС настроюють на певне масове число, яке відповідає у шуканій сполуці йонам одного типу. У цьому випадку ідентифікують пік на хроматограмі, яка відповідає цій сполуці. Можливо здійснити ідентифікацію і декількох речовин, якщо запрограмувати дії вимірного блоку на послідовну реєстрацію декількох специфічних масових чисел.

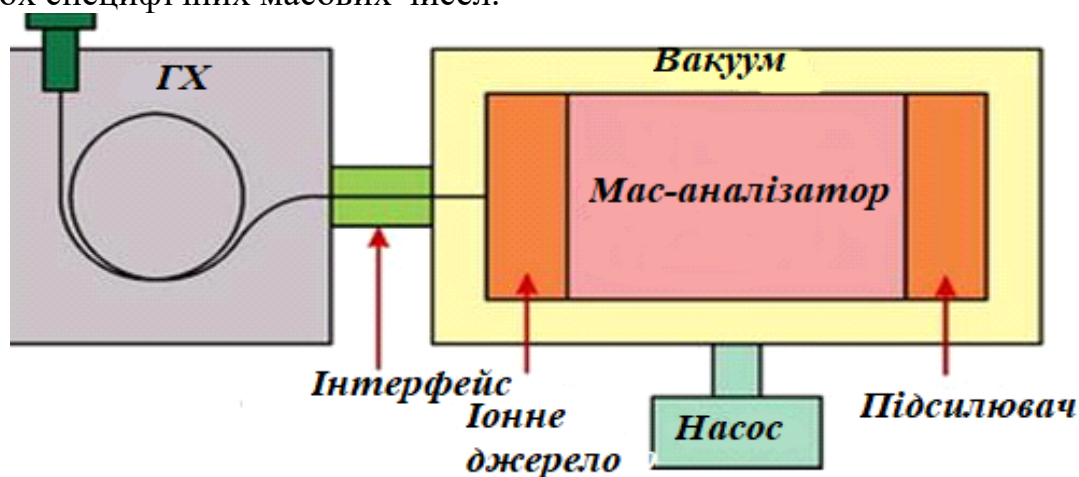


Рисунок 7.3 – Тандем ГХ/МС

В іншому варіанті режиму записують повний мас-спектр для кожного компонента проби і розташовують у пам'яті комп'ютера для подальшої обробки.

Можливості хромато-мас-спектрометрії ілюструє такий випадок: дослідження цим методом слідів органічних сполук у виносках із міських печей для спалювання сміття дало змогу виявити 99 різних сполук.

3. ЯМР-спектроскопія

ЯМР-спектроскопія (Ядерна магнітно-резонансна спектроскопія; англ. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*) – метод ідентифікації та вивчення речовин, що базується на ядерному магнітному резонансі (ЯМР). Найчастіше застосовується для органічних сполук. На сьогодні ЯМР-спектроскопія дозволяє ідентифікувати сполуку маючи менше 1 мг речовини. Зразок розчиняють в непротонному (часто дейтерованому) розчиннику, ампулу вміщують в ЯМР-спектрометр, після нетривалого (для простих сполук порядку 30 сек) накопичення сигналу отримують спектр, де по положенню піків (частоті поля збудження) окремих протонів (для ПМР – протонного магнітного резонансу) характеризують сполуку. Широкому використанню заважає тільки висока ціна пристроїв (від 1 мільйона гривень та вище). Для методу доступні всі ядра, що мають нецілий спин, зокрема ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P .

Застосування ЯМР спектроскопії в біохімії.

1. ЯМР малих молекул.

Віднесення всіх резонансних ліній і необхідний дозвіл в спектрах досягається досить просто:

- хімічний аналіз;
- визначення невідомих хімічних структур;
- неінвазивне визначення концентрацій;
- дослідження шляхів протікання реакцій і продуктів реакцій;
- визначення констант зв'язку;
- конформації субстата на активному центрі.

2. ЯМР макромолекул.

Віднесення резонансних ліній і досягнення необхідного дозволу:

- достатньо складне завдання;
- зміна конформації молекул під впливом зовнішніх дій (рН, температура, іонна сила, тиск тощо);
- конформаційні зміни при утворенні зв'язку з субстратом;
- структура активного центру ферментів, просторове розташування бічних ланцюгів щодо субстрату, іонізація функціональних груп;
- визначення тимчасових характеристик (часу кореляції) і характеру руху при локальних і глобальних конформаційних змінах;
- взаємодія між молекулами фермент-субстрат, протеїн-протеїн, протеїн-нуклеїнова кислота;
- визначення вторинної структури в розчині;
- визначення третинної структури в розчині.

Перевагою методу ЯМР, що особливо істотно в медичних застосуваннях, є низька енергія використовуваних квантів РЧ. Навіть при максимальних значеннях магнітних полів, вживаних в даний час, енергія цих

квантів близько $4 \cdot 10^{-25}$ Дж, що набагато менше енергії, необхідної для руйнування ковалентних хімічних зв'язків; типове значення енергії хімічних зв'язків по порядку рівного 10^{-17} Дж. На відміну від методів, в яких використовується іонізуюче випромінювання, ЯМР є неруйнівним методом.

ЯМР як аналітичний метод

На різноманітних прикладах показано, яким чином ЯМР може бути використано як аналітичний метод.

Застосування методу ЯМР як аналітичного можна продемонструвати на прикладі простої молекули – молекули етанолу, оскільки, протонам 3-х функціональних груп в етанолі (метильна, метиленова і гідроксильна) відповідають три різні резонансні лінії, що спостерігаються у спектрі. Особливість методу ЯМР перш за все полягає в тому, що по положенню резонансних ліній в спектрах можна судити про взаємне розташування окремих атомів або груп атомів у молекулах, причому це вдається виявити навіть для еквівалентних атомів. ЯМР за інформативністю вигідно відрізняється від багатьох інших аналітичних методів, що конкурують з ним.

У той же час ЯМР є досить малочутливим методом, не дивлячись на те що в сучасних спектрометрах значення максимально досяжного магнітного поля складає 14 Тл, що відповідає робочій частоті для Н 600 МГц. Мінімальна кількість речовини, яка може бути зареєстрована за допомогою методу ЯМР ^1H , варіює у широких межах залежно від умов експерименту. Для малих молекул типове значення, що визначає межу чутливості, складає 10 нмоль, тобто ту кількість речовини, яку може бути проаналізовано простими біохімічними методами, наприклад, за допомогою ТШХ. При використанні інших, досить широко використовуваних методів, таких, як газова хроматографія або радіоімунометрія, стають доступними принципово інші з погляду чутливості області такі, як фемто- і атоммолярна. Таким чином, якщо мова йде тільки про реєстрацію спектрів речовин відомої структури, то ці методи за чутливістю перевершують ЯМР. Перевага ЯМР стає очевидним лише тоді, коли виникає необхідність в отриманні додаткової інформації, яку може надати тільки цей метод. Це стосується тих випадків, коли структура досліджуваної речовини ще не відома. Тоді з аналізу спектру ЯМР можна побудувати ряд можливих структур і вибрати серед них правильну. Слід зазначити також ще одну особливість методу ЯМР: у спектрах ЯМР можуть бути присутні сигнали молекул-домішок, ідентифікація яких можлива тільки у разі застосування спеціальних методів.

Ідентифікація відомих і невідомих речовин.

Використання методу ЯМР як аналітичного в простому випадку полягає у порівнянні положень ліній спектрів зразка невідомої структури та стандартного зразка відомої структури: збіг спектрів стандартної речовини і досліджуваної дозволяє провести ідентифікацію останньої. На підставі такого роду зіставлень можна дати навіть кількісну оцінку концентрації речовин, що містяться в зразку. Ця оцінка в простому вигляді може бути сформульована таким чином: речовина А міститься в зразку в концентрації, достатній для його реєстрації. Правда, такий спосіб оцінки справедливий

лише тоді, коли обидва порівнювані спектри отримано за ідентичних умов. Реальний спектр, відповідний певній речовині, істотно залежить від умов його реєстрації. Вид спектру визначається не тільки зовнішніми чинниками (температурою в датчику ЯМР, напруженістю поля і використовуваною імпульсною послідовністю), тобто тими параметрами, які експериментатор може контролювати самостійно, але й розчинником, який використовується. Не дивлячись на це, все ж таки вдається провести ідентифікацію невідомої речовини, оскільки завжди можна обмежитися певним абстрактним рівнем і порівняти характерні особливості спектрів.

Розглянемо ще раз фрагмент спектру ЯМР етанолу, знятого на сучасному ЯМР-спектрометрі з високим значенням постійного магнітного поля (рис. 7.4).

Параметри, що повністю характеризують спектр: положення спектральних ліній, структура мультиплетів і відносні інтенсивності резонансних ліній. Положення ліній визначається значенням хімічного зрушення, а розщеплювання ліній – скалярною спін-спіною взаємодією. Площа під резонансним сигналом, яка може бути отримана чисельною інтеграцією, пропорційна числу спінів, що відповідає даній групі в молекулі.

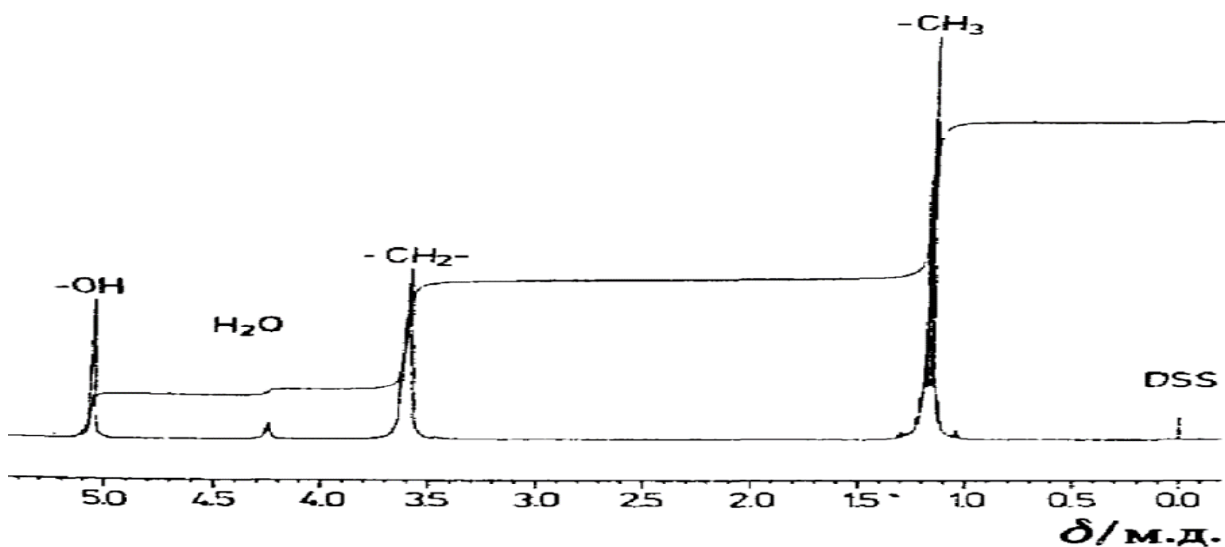


Рисунок 7.4 – Спектр ^1H 500 МГц 95%-відсоткового етанолу. Сигнал при 0 м.д. відповідає метильній групі стандарту DSS відносно якого приводяться значення хімічних зсувів в шкалі δ .

Хімічне зрушення можна розуміти як посилення або послаблення зовнішнього магнітного поля в точці простору, в якій розташоване досліджуване ядро. Основний внесок у величину цієї локальної зміни поля дають електронні оболонки даних молекул, тому можна стверджувати, що хімічне зрушення відображає структуру молекул. Якщо оцінювати вплив заступників на величину хімічного зрушення, то із зростанням числа зв'язків між даним атомом і замісником цей вплив зменшується. Проте характер

електронного розподілу, а значить, і вид спектру ЯМР, залежить і від просторової структури молекул, і від взаємодії з іншими молекулами в розчині, тобто від тих чинників, які вже не представляються такими очевидними.

Для ЯМР ^1H область значень хімічних зрушень невелика, а ефекти, пов'язані з просторовою структурою і викликані взаємодією з іншими молекулами, бувають настільки великі, що часто із спостереження спектрів ЯМР вельми скрутно зробити однозначний вивід про хімічну структуру речовини.

Для більшості молекул в розчині конформація їх при кімнатній температурі не є жорсткою, вони можуть існувати у вигляді декількох різних конформацій. Встановлювана конформаційна рівновага залежить від складу розчинника, температури і тиску. Крім того, досліджувані молекули можуть взаємодіяти між собою або з іншими молекулами і утворювати при цьому більш менш стабільні комплекси. Вірогідність виявлення цих взаємодій залежить від концентрації всіх компонентів, присутніх у розчині.

На відміну від спектрів ЯМР ^1H діапазон значень хімічних зсувів у спектрах ^{13}C істотно більше (див. табл. 7.1), так що положення резонансних ліній у спектрах ^{13}C визначається в основному хімічною будовою. Значення хімічних зсувів характеристичні за умови, що вплив замісників враховується у вигляді аддитивної поправки до величини хімічного зсуву.

Таблиця 7.1. Хімічні зсуви в спектрах ^1H і ^{13}C ЯМР

Група	Область значень хімічних зсувів, м.ч. відносно ТМС	
	^1H ЯМР	^{13}C ЯМР
-C-CH ₃ (звичайний метил)	0,1-1,8	5-35
-S-CH ₃ (тіометил)	1,5-3,8	10-20
-O-CH ₃ (метокси)	2,6-4,2	45-60
-C-CH ₂ -C (метиленовий)	0,3-3,9	15-55
-S-CH ₂ -C (метиленовий)	1,6-4,8	25-45
-O-CH ₂ -C (метиленовий)	3,2-4,8	40-70
-C ₂ -CH-C (метиновий)	0,8-2,6	30-60
-C ₃ -C-C (третинний вуглець)	-	25-50
-CH=CH-C (алкеновий вуглець)	5,0-7,0	105-145
-CH=CH-C- (ароматичний)	5,0-10,0	115-145
-C-CH=N- (гетероциклічний)	5,0-10,0	145-155
-C≡C-C- (алкиновий)	—	75-95
-C-CHO (альдегідний)	9,4-11,0	185-210
-C-COOH (кислотний)	4,6-14,0	170-185
-C-CO-NH (пептидний зв'язок)	6,5-11,0	170-185

Спектроскопія ЕПР – метод дослідження парамагнітних частинок і

центрів, кінетики і механізмів процесів, що відбуваються з їх участю.

? Контрольні питання та завдання:

1. У чому сутність методу ЯМР-спектроскопії?
2. У чому полягає явище ядерного магнітного резонансу?
3. Дайте визначення поняття «хімічний зсув». Які фактори впливають на величину хімічного зсуву?
4. Чим характеризують положення сигналу в спектрах ЯМР?
5. Що таке мас-спектроскопія? Наскільки точним і чутливим є метод?
6. На чому засновані якісний та кількісний мас-спектральний аналіз сумішей?
7. Яка межа виявлення (чутливість) мас-спектрометрії?
8. Опишіть спектроскопію протонного магнітного резонансу та ПМР-спектр.
9. Які речовини-еталони в спектроскопії ЯМР, яким вимогам вони повинні відповідати?
10. Для яких досліджень використовують ЯМР-спектроскопію?

Тестові завдання:

1. Хімічний зсув вимірюється в
а) см б) кг в) м.д. г) м
2. Яке з наведених тверджень вірне?
а) Метод ЯМР заснований на магнітних властивостях атомних ядер.
б) Метод ЯМР заснований на електричних властивостях атомних ядер.
3. Метод ядерного магнітного резонансу (ЯМР) заснований на ...
а) часі релаксації ядерного магнітного резонансу, розподілі швидкостей потоку рідини, дифузії молекул і на біохімічних процесах обміну речовин у живих тканинах.
б) взаємодії зовнішнього магнітного поля з ядрами, що мають магнітний момент, тобто для ядер з ненульовим спіном.
в) хімічному зсуві щодо еталонного сигналу.
8. У спектроскопії ЯМР високої роздільної здатності – такі головні джерела інформації про будову й динаміку молекул:
а) хімічний зсув; константи спін-спінової взаємодії.
б) фізичний зсув; константи спін-спінової взаємодії.
в) біологічний зсув; константи спін-спінової взаємодії.
9. Мас-спектроскопія – це ...
а) метод дослідження речовини шляхом визначення мас-іонів цієї речовини і їхньої кількості.

б) фізико-хімічний метод дослідження розчинів і твердих тіл, заснований на випромінюванні спектрів поглинання.

в) метод, заснований на вимірюванні поглинання монохроматичного випромінювання атомами елемента, який визначається в газовій фазі після атомізації в полум'ї або графітовій печі з використанням монохроматичного джерела світла.

г) метод, заснований на вимірюванні розсіяння світла часточками світла дисперсної системи.

10. Мас-спектрометр – це

а) прилад для вимірювання кута обертання площини поляризації монохроматичного світла в оптично активних речовинах.

б) прилад для випромінювання показника заломлення речовин.

в) оптичний прилад для отримання і одночасної реєстрації спектру випромінювання.

г) прилад для розділу і онізованих частинок речовини за їхніми масами.

11. Чутливість у мас-спектрометрії – це....

а) величина, що показує відношення абсолютної похибки до дійсного значення вимірюваної величини

б) величина, що приймається за дійсне значення

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

г) це межа, яка визначає значущі та незначущі відмінності.