СӘТБАЕВ УНИВЕРСИТЕТІ



SATBAYEV UNIVERSITY

Қазіргі заманғы талдау әдістері: масс-спектрометрия, ЯМР, флуориметрия.

Дәріс оқытушысы:
PhD, қауымд. профессор
Оңалбек Дамира Дүйсембекқызы
damira.onalbek@gmail.com

Масс-спектрометрия (МС)

Масс-спектрометрия (МС)

МС әдісі – заттардың атомдары мен молекулаларын иондау және түзілген иондарды олардың массалық санына қарай, яғни **m/z (ион массасының зарядқа қатынасы)** бойынша электрлік немесе магниттік өрісте бөлуге негізделген зерттеу және талдау әдісі. Алғашқы масс-спектрлер 1910 ж. (Томсон) және 1919 ж. (Астон) алынған.

Артықшылықтары мен кемшіліктері

Артықшылығы: талдау үшін өте аз мөлшер жеткілікті.

Кемшілігі: әдіс разрушающий, яғни зерттелетін за емес, оның ыдырау өнімдері анықталады.

МС әдісі электромагниттік сәулемен өзара әрекеттесуге негізделмегендіктен, классикалық спектроскопияға жатпайды, бірақ иондар интенсивтілігінің m/z бойынша графикалық классификациясы «масс-спектр» деп аталады.



Джозеф Джон Томсон
(18.12.1856 – 30.08.1940)

Масс-спектрометр құрылғысы

Масс-спектрометр – вакуумда жұмыс істейтін, зарядталған бөлшектердің электр-магниттік өрістегі қозғалыс заңдылықтарына негізделген құрал.

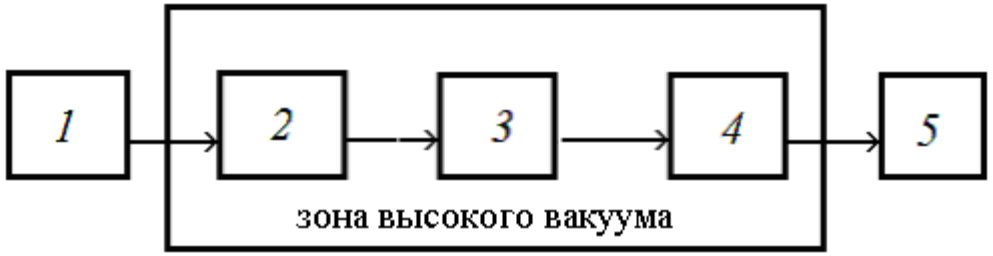
Блок-сызба:

1.Үлгі енгізу жүйесі
2.Иондау көзі және иондарды үдеткіш
3.Масс-анализатор
4.Детектор
5.Тіркеуші жүйе

Вакуум міндетті:

•ионизаторда: **10^{-3}–10^{-4} Па**
•масс-анализаторда: **10^{-3}–10^{-8} Па**

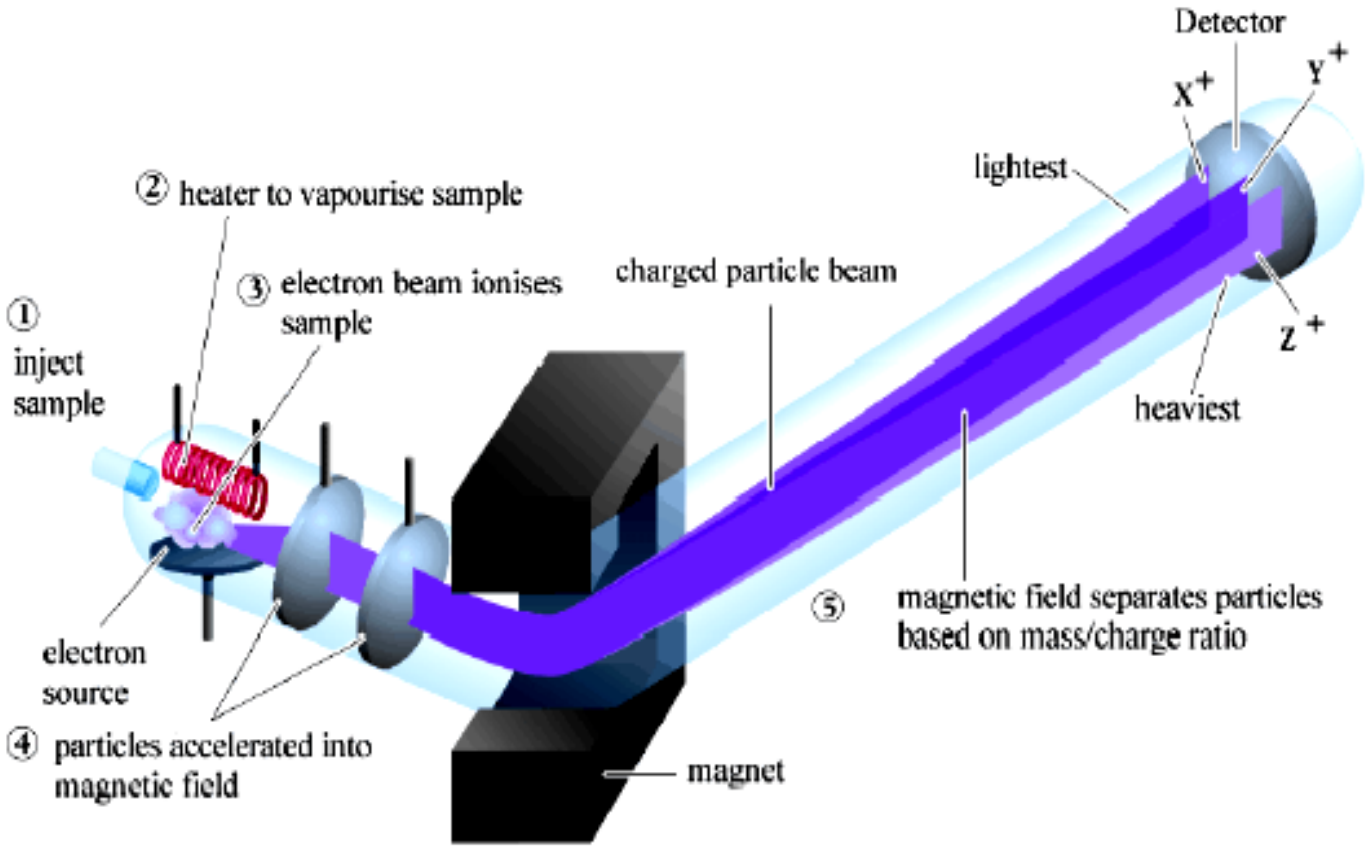




Масс-спектрометр блок-схемасы

Әдістің принципі

1.Үлгі иондау көзіне енгізіледі.
2.Молекулалар иондарға айналады.
3.Пайда болған оң иондар электр өрісімен үдетіліп, фокустанады.
4.Масс-анализаторға түсіп, масса бойынша бөлінеді.
5.Детектор ион ағынын электр сигналға айналдырып, тіркейді.



Масс-спектрометр схемасы

Үлгіні енгізу тәсілдері

1. Тікелей емес (газ фазасы арқылы)

•Қатты және сұйық заттар ~500 °C-та вакуумда буланып, газ ионизаторға түседі.

2. Тікелей енгізу (қатты/қиын ұшатын заттар)

•Үлгі шлюз камерасы арқылы тікелей ионизаторға беріледі.

•Массасы бірнеше нанограмм жеткілікті.

3. Хроматографиямен бірге енгізу (ГХ-МС, ЖХ-МС)

•On-line режимде кеңінен қолданылады.

Үлгіні иондау әдістері

Газ фазасы

•электрондық иондау (EI)
•химиялық иондау (CI)
•электрондық қармау (EC)
•электр өрісінде иондау (FI)

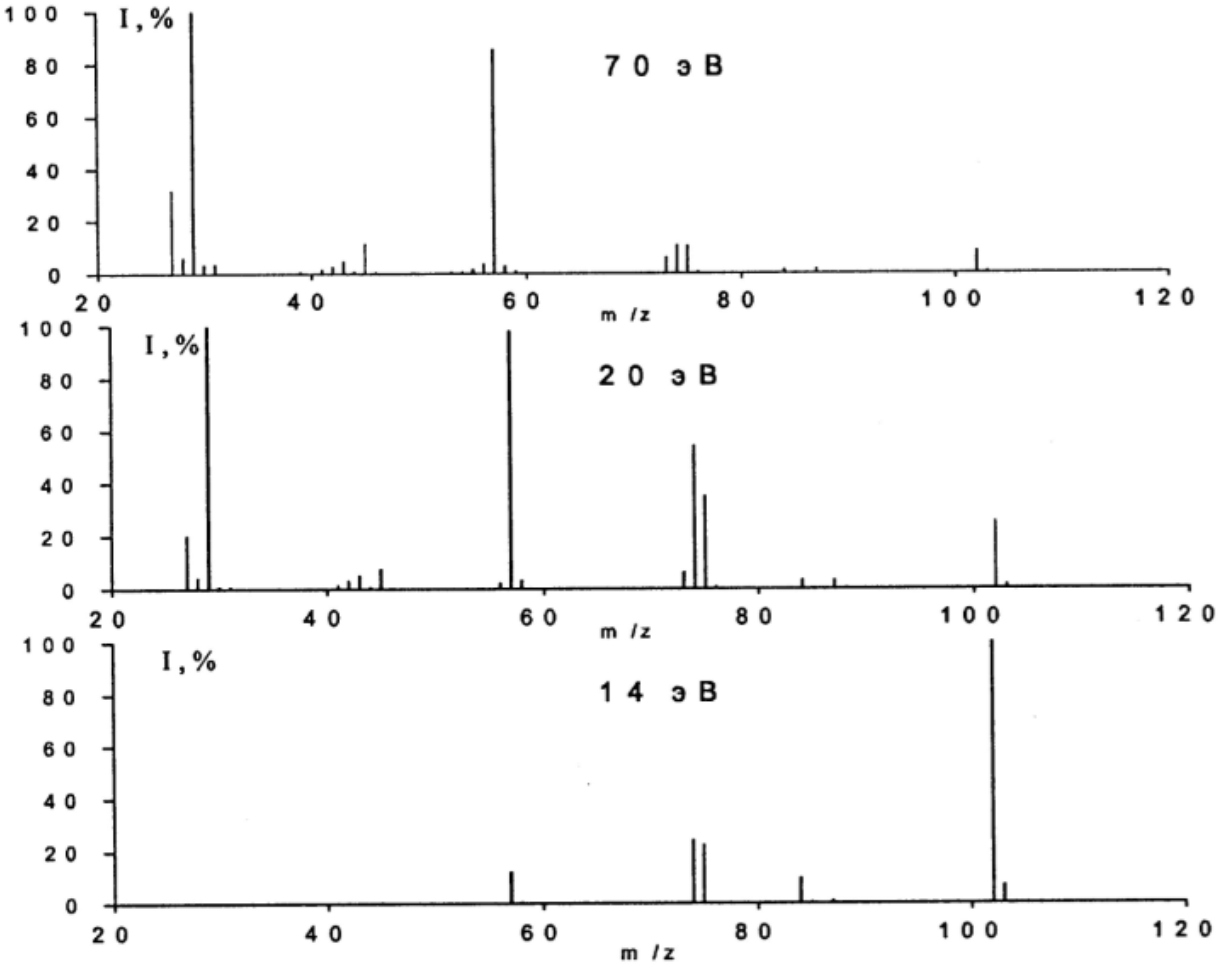
Сұйық фаза

•атмосфералық қысымдағы фотоиондау (APPI)
•электроспрей (APESI / ESI)
•термоспрей
•атмосфералық қысымдағы иондау (AP)
•атмосфералық қысымдағы химиялық иондау (APCI)

Қатты фаза

•тікелей лазерлік десорбция – масс-спектрометрия (LDMS)
•матрицамен активтендірілген лазерлік десорбция/иондау (MALDI)
•екіншілік иондар масс-спектрометриясы (SIMS)
•жылдам атомдармен бомбалау (FAB)
•электр өрісіндегі десорбция (FD)
•плазмалық десорбция (PD)
•индуктивті байланысқан плазмада иондау (ICP)
•термоиондау немесе беткі иондау
•тлеуші разрядта және ұшқындық разрядта иондау
•лазерлік абляция процесінде иондау

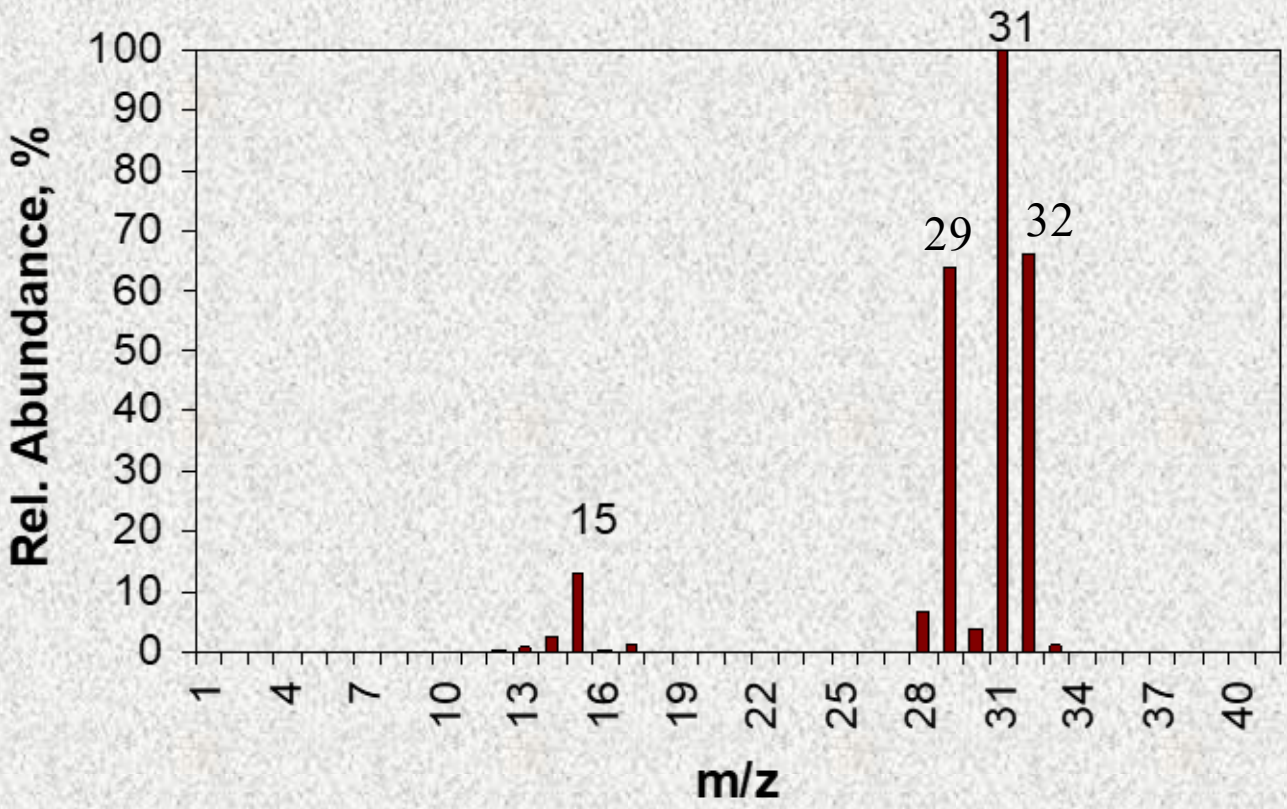
Электрондық соққы арқылы иондау – молекулалық ион пигінің интенсивтілігінің иондау энергиясының шамасына тәуелділігі:



Этилпропионаттың **$CH_3–CH_2–C(=O)–O–CH_2–CH_3$** (молекулалық массасы 102) электрондық соққы арқылы алынған масс-спектрі 70, 20 және 14 эВ энергияларда алынған.

Иондау энергиясы неғұрлым төмен болса, молекулалық ион пигі соғұрлым жоғары болады.

Метанолдың масс-спектрі (CH_3OH)



$CH_3OH + e^- \rightarrow CH_3OH^{+\bullet} + 2e^-$ 32 a.e.

$CH_3OH^{+\bullet} \rightarrow CH_2OH^+ + H^\bullet$ 31 a.e.

$CH_3OH^{+\bullet} \rightarrow CH_3^+ + HO^\bullet$ 15 a.e.

$CH_2OH^+ \rightarrow H_2 + CHO^+$ 29 a.e.

Масс-спектрдің берілуі

Графикте абсцисса (x) осіне ион массасының оның зарядына қатынасы — *m/z*, ал ордината (y) осіне берілген ион түрінің салыстырмалы мөлшерін сипаттайтын **интенсивтік** қойылады.

Интенсивтік толық иондық токқа (масс-спектрдегі барлық иондардың жиынтық интенсивтігіне) немесе масс-спектрдегі максималды иондық токтың интенсивтігіне қатысты пайызбен өрнектеледі.

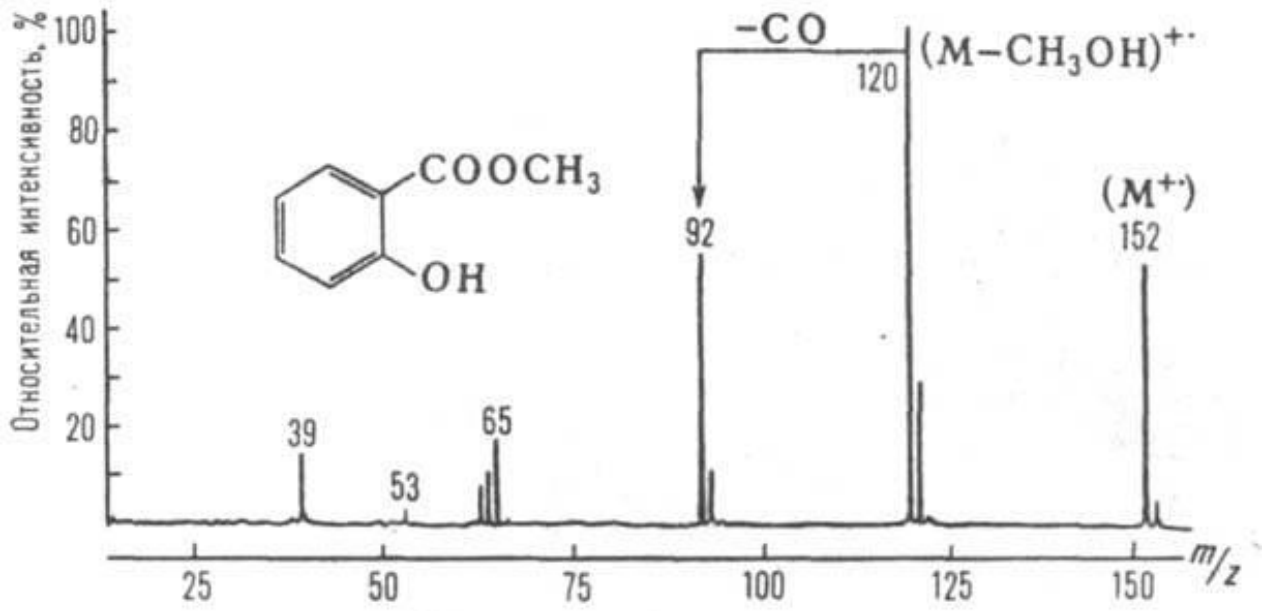


Рис. 1. Масс-спектр метилсалицилата.

Сапалық талдау

Ең **өкілді (сипаттамалық) иондар** және оларға сәйкес келетін **құрылымдар арнайы кестелерде** беріледі, және олар масс-спектрлерді интерпретациялау кезінде қолданылады.

Сонымен қатар, зерттелетін қосылыстың масс-спектрі **спектрлер каталогымен** (150 000-ға жуық түрлі қосылыстардың спектрлері) салыстырылады.

Идентификация кезінде мына қағидаға сүйенеді: **белгісіз заттың фрагментация сипаты** ұсынылып отырған құрылымды қосылыстың фрагментациясына **ұқсас болуы тиіс**, және спектрлер ұқсас эксперименттік жағдайларда алынуы керек. Алайда бұл талап әрқашан орындала бермейді (мысалы, **изомерлердің масс-спектрлері айырмашылықсыз болуы мүмкін**).

Қалай болғанда да, **бір заттың масс-спектрлерінің өзара сәйкес келу ықтималдығы**, әртүрлі заттардың масс-спектрлерінің сәйкес келу ықтималдығынан жоғары.

Сандық талдау

Заттық және элементтік талдау жүргізуге **мүмкіндік бар**. Органикалық қосылыстар қоспаларының сандық талдауы көбіне масс-спектрдің күрделілігімен шектеледі. Сондықтан масс-спектрометрия әдісін әртүрлі хроматография түрлерімен және капиллярлық зоналық электрофорезбен бірге қолданады.

1) Заттық талдау үшін газды хроматография (ГХ) қолданылады. Хроматография барысында белгілі бір массалық санға сәйкес келетін ион шығының қарқындылығы уақыт бойынша тіркеледі. Нәтижесінде хроматографиядағы сияқты детектор сигналының уақытқа тәуелділігі алынады.

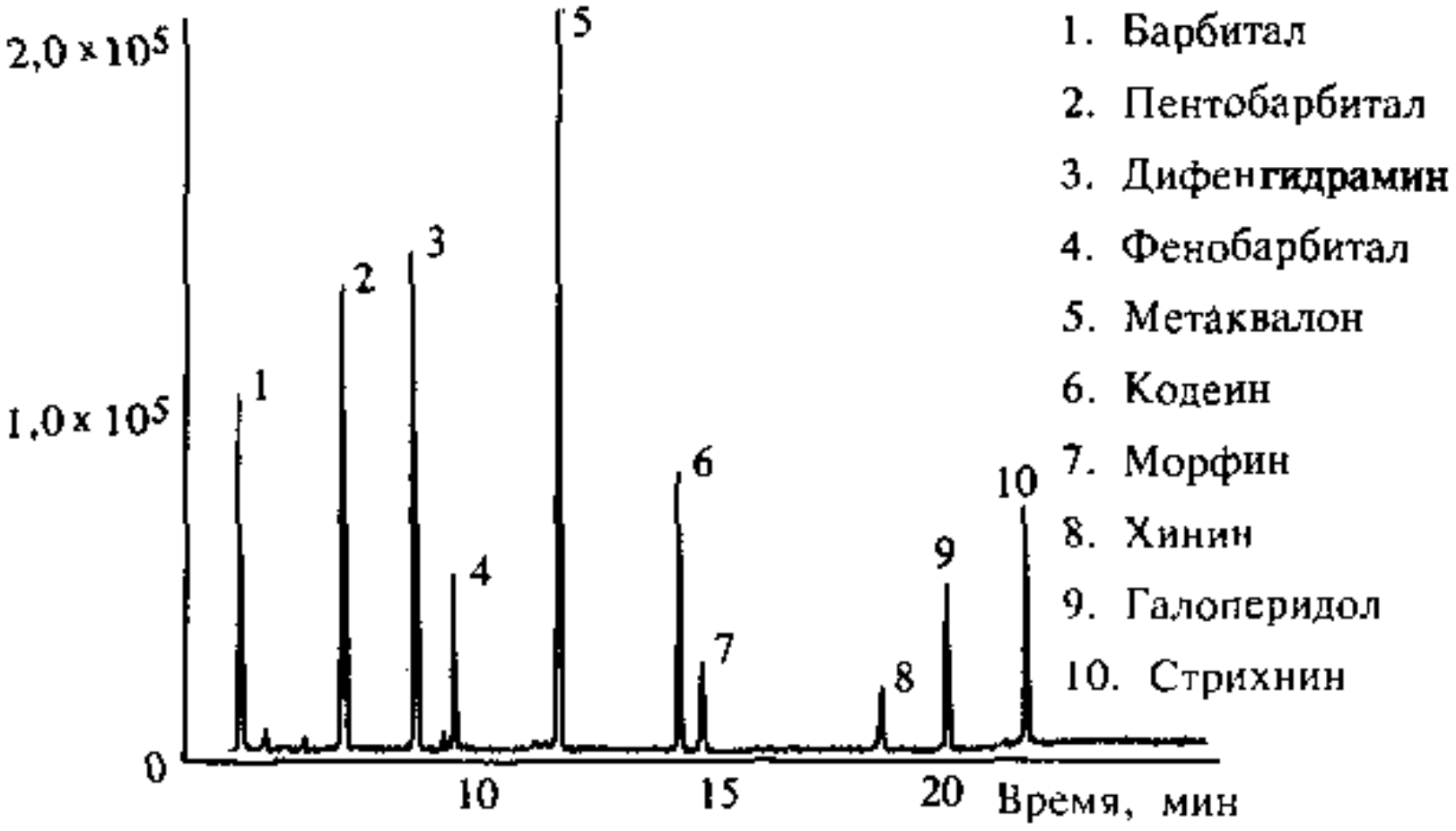
2) Бөлу әдісін МС-анықтаумен біріктіру тандемді МС түрінде іске асады.

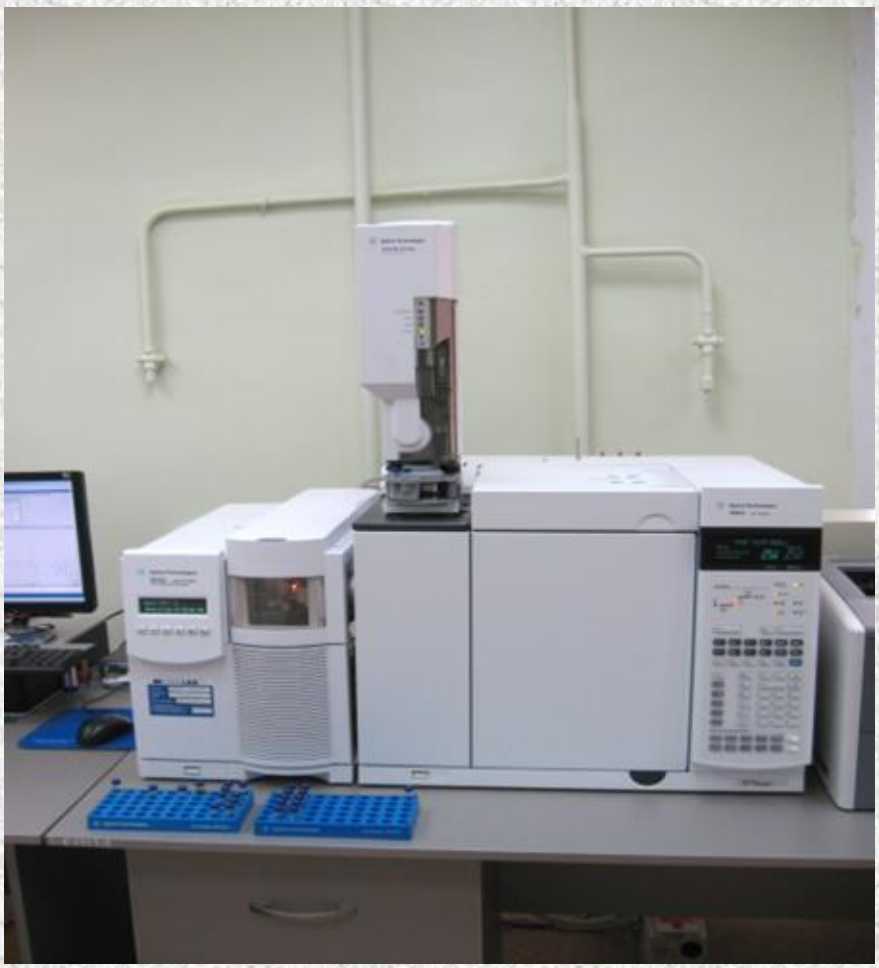
Бір масс-спектрометр қоспаның масс-спектріндегі жеке заттардың молекулалық пигін бөліп алу үшін қолданылады. Екіншісі – бөлінген заттарды фрагментациялау және оларды әрі қарай идентификациялау үшін пайдаланылады.

3) Масс-спектр бойынша тікелей талдау

Бұл үшін анықталатын компоненттің және ішкі стандарттың пигі интенсивтіліктері өлшенеді. Ішкі стандарт ретінде әдетте анықталатын заттың изотоппен таңбаланған түрі немесе оның гомологы қолданылады.

Масс-хроматограмма құру үшін әрбір жазылған масс-спектрден бірнеше ион пигінің интенсивтілігін алады да, осы интенсивтіліктердің уақыт бойынша ұстау уақытына сәйкес келетін масс-спектр нөміріне тәуелді графигін салады.

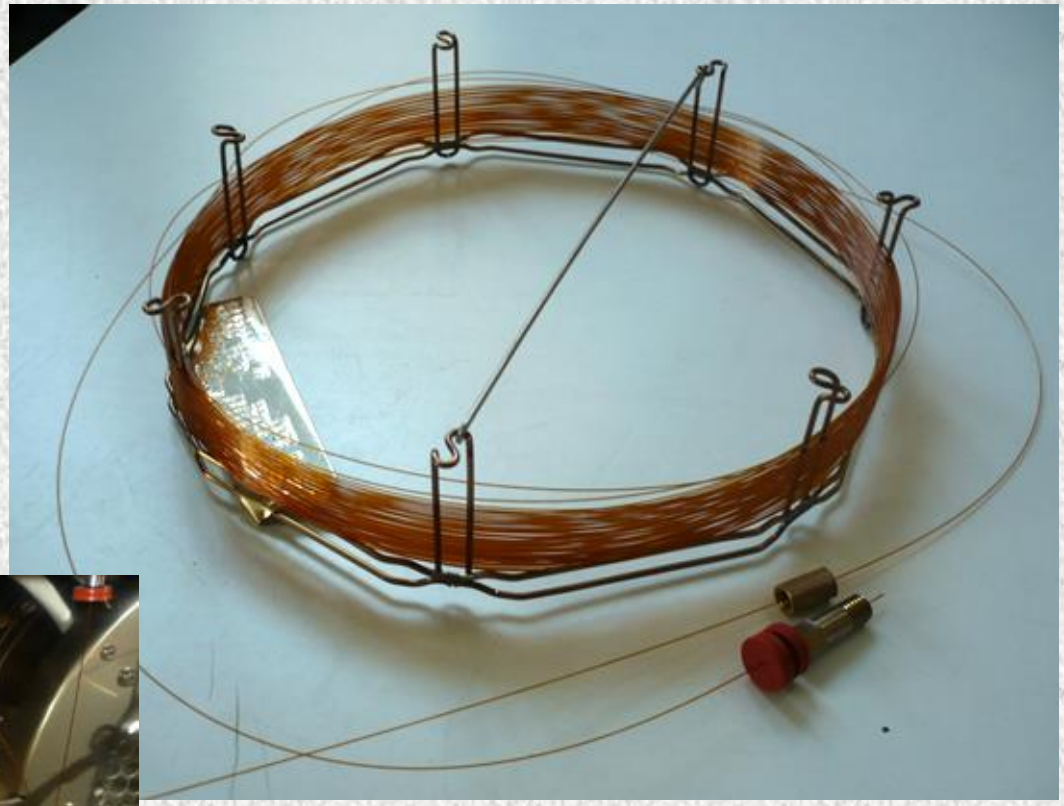


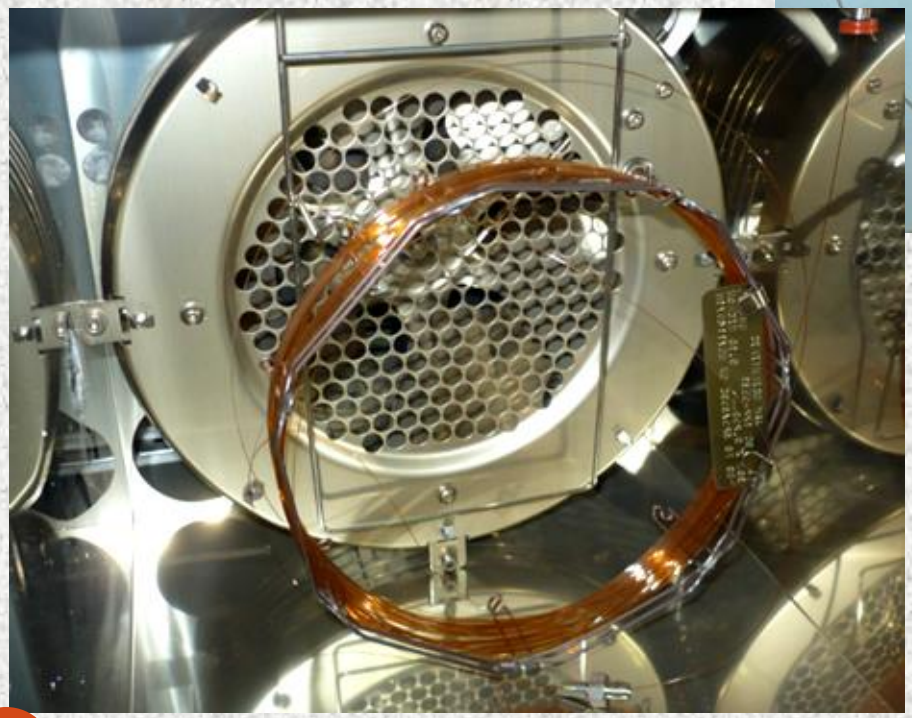




Газ хромато-масс-спектрометрлер

Жалпы мақсатқа арналған HP-5MS капиллярлық газдық хроматографиялық колонка: ұзындығы 30 м, ішкі диаметрі 0,25 мм, сыртқы диаметрі 0,30 мм.

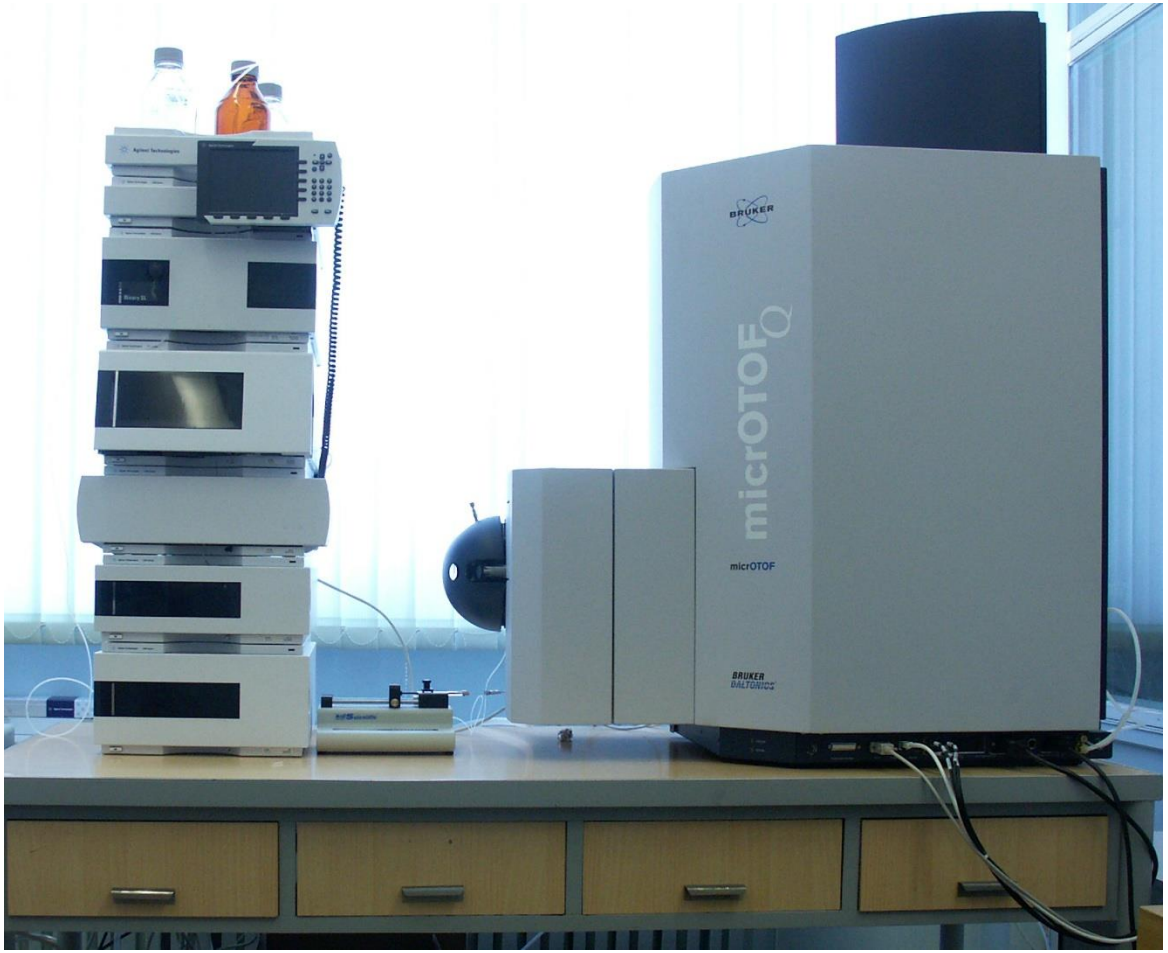




Хроматографқа орнатылған HP-5MS капиллярлық газдық хроматографиялық колонка.

Газ хромато-масс-спектрометр мүмкіндігі

1.Үлгінің автоматты түрде енгізілуі / серия үлгілерін автоматты енгізу.
2.Өлшенетін массалар диапазоны — 10–850 а.м.б.
3.Хроматографиялық колонканың температурасын бағдарламалап өзгерту
–50 °C-тан 400 °C-қа дейін.
4.Ерітіндідегі заттың мөлшерін талдау мүмкіндігі.
5.Жеңілқайнайтын үлгілерді талдау мүмкіндігі
(қайнау температурасы еріткіштің қайнау температурасынан төмен болатын заттар).
6.Арнайы міндеттерге арналған хроматографиялық колонканы таңдау мүмкіндігі:
мұнай өнімдерін талдау, дәрілік препараттар, оптикалық изомерлер және т.б.
7.Басқа модульдерді қосу мүмкіндігі
(мысалы, термоаналитикалық приставка).

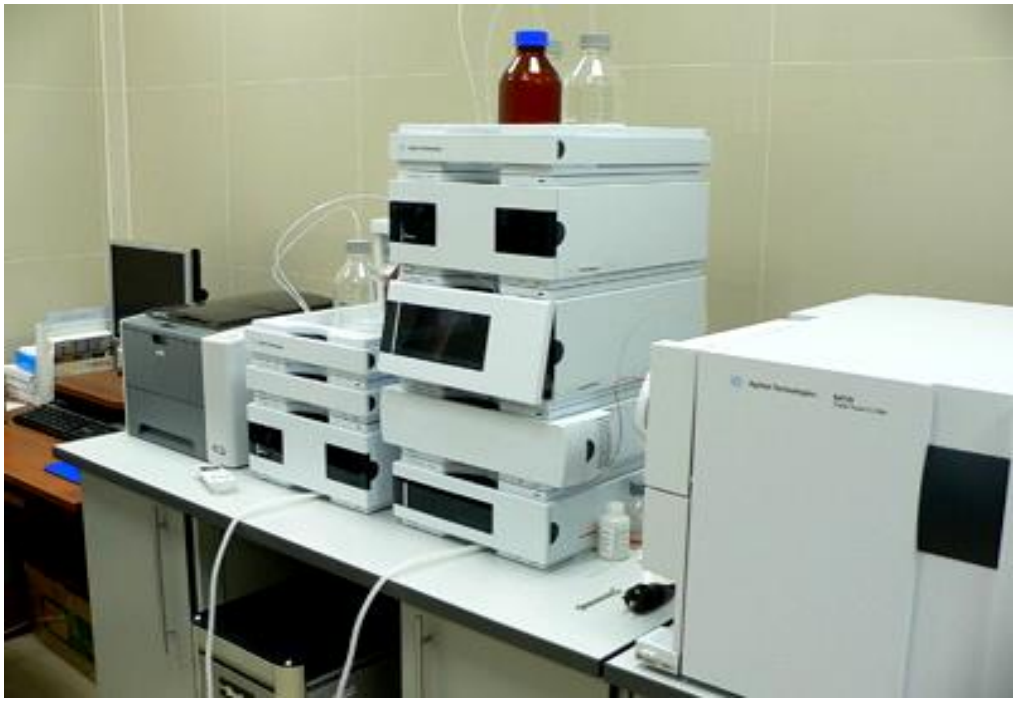


Agilent 1100 сұйықтықтық хроматографымен бірге қолданылатын жоғары айырымдылықтағы Bruker micrOTOFQ уақыт-ұшу масс-спектрометрі.

Сұйықтықты хромато-масс-спектрометрия

Хромато-масс-спектрометрияның тағы бір түрі – жоғары эффективті сұйықтықтық хроматографияны (ЖЭСХ) масс-спектрометриямен үйлестіру. Әдіс ұшқыштығы төмен, полярлы және газдық-хроматографиялық әдіспен талдауға келмейтін қоспаларды зерттеуге арналған.

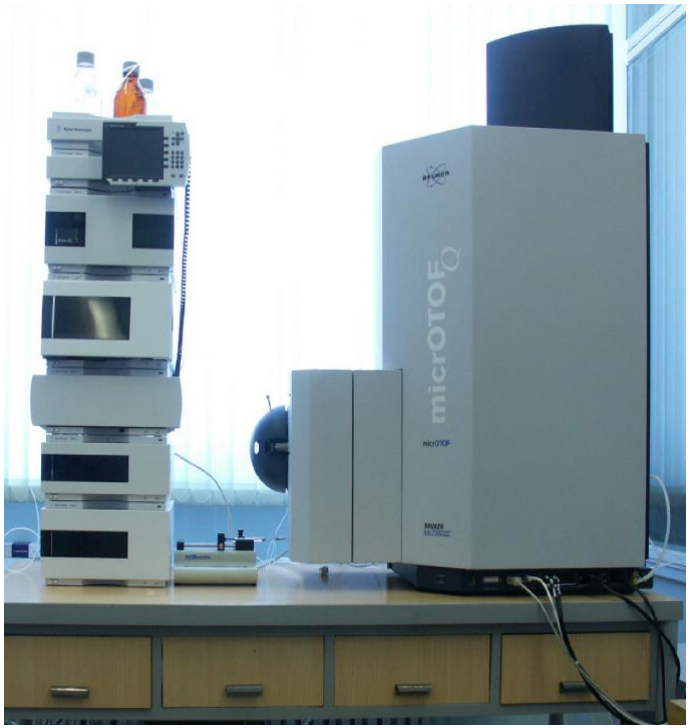
Бұл жағдайда сұйық ағынның бір бөлігі диаметрі бірнеше микрометр болатын капилляр арқылы өткізіледі, нәтижесінде өте майда тамшылар түзіледі. Одан әрі бұл тамшылар қыздырылатын аймаққа түсіп, мұнда еріткіштің көп бөлігі буланады. Қалған бөлігі талданатын затпен бірге ион көзіне жеткізіліп, сол жерде иондалады.



Сұйықтықты хромато-масс-спектрометрдің мүмкіндіктері

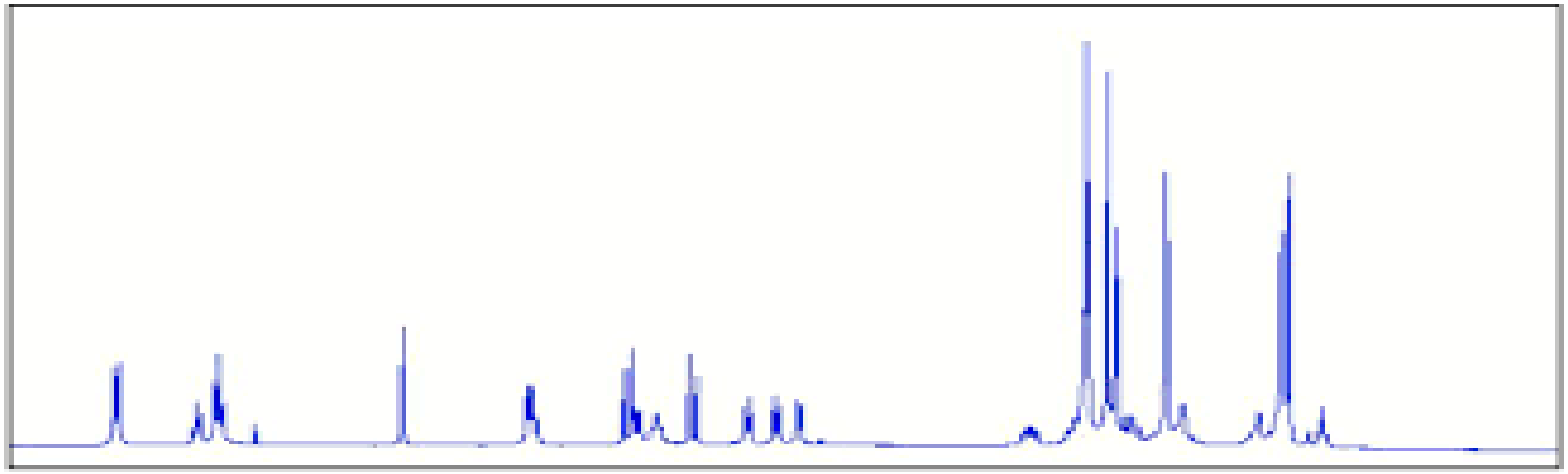
1.Анализаторға үлгіні автоматты және қолмен енгізу /
Үлгілер сериясын енгізу.
2.Өлшенетін массалар диапазоны 20-дан 20000 а.м.б-ке дейін және одан жоғары.
3.Хроматографиялық колонканың температурасын еріткіштің қайнау температурасына дейін (әдетте 25–100 °C) бағдарламалау мүмкіндігі.
4.Сұйық үлгілерді – ерітіндідегі заттарды талдау.

5.Полимерлерді, олигомерлерді, биологиялық объектілерді, полярлы қосылыстарды, көптеген ОН-топтары және басқа ионогенді топтары бар заттарды талдау мүмкіндігі.
Яғни газдық хроматограф колонкасынан өтпейтін заттарды анықтауға мүмкіндік береді.

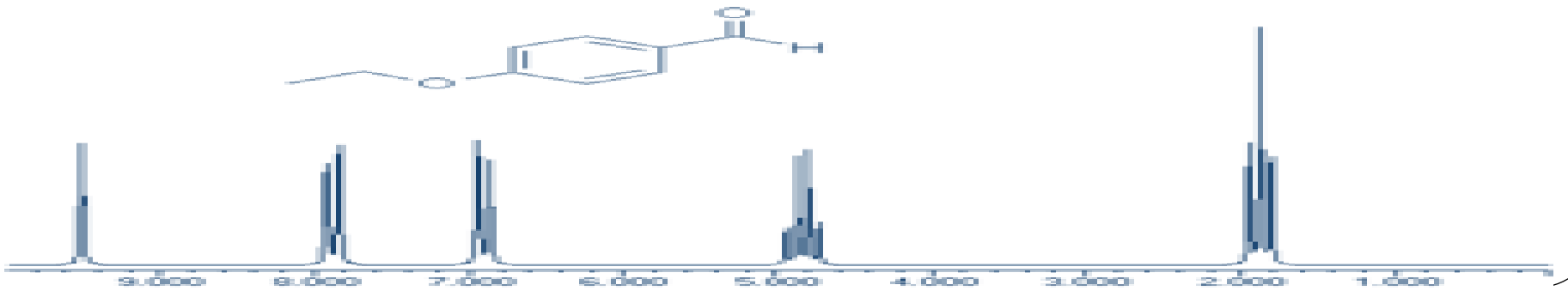


6.Тар мамандандырылған міндеттерге арналған хроматографиялық колонканы таңдау мүмкіндігі:
мұнай өнімдерін, ароматты қосылыстарды, полярлы заттарды,
дәрілік препараттарды және т.б. талдау.

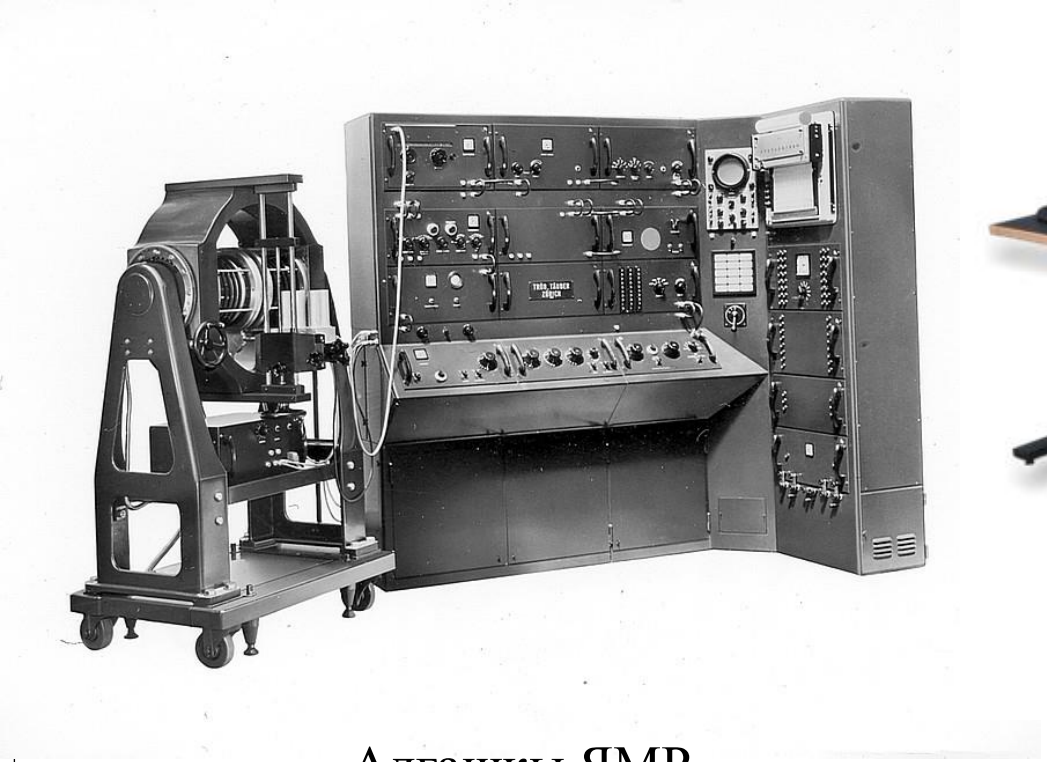
Ядролық магниттік резонанс (ЯМР) – қатты, сұйық және газ тәріздес денелерде радиожиілік диапазонындағы электрмагниттік энергияның резонанстық жұтылуы. Мұндай резонанстық жұтылу құбылысы сыртқы магнит өрісіне орналасқан зат ядроларының магнетизміне байланысты пайда болады. Бұл құбылыстың резонанстық сипаты қозғалыс мөлшерінің моменті мен магниттік моменті бар ядролардың қасиетіне сәйкес анықталады.



Мұндай ядроның сыртқы магнит өрісімен (H0) әсерлесуі меншікті, яғни пресцессия жиілігін (ω0) анықтайды: ω0=γH0, мұндай γ – гиромагниттік қатынас, яғни ядроның магниттік моментінің оның қозғалыс мөлшері моментіне қатынасы. Тәжірибеден негізінен осы меншікті жиіліктің мәні анықталады. Көптеген ядролар үшін бұл жиілік 1 – 10 МГц аралығында. Сыртқы магнит өрісі болмаған кезде ядролардың магниттелушілігі әлсіз (электрондық парамагнетизмнен 106 – 108 есе кем) болады. Резонанстық жиіліктегі радиожиіліктік өріс ядролардың айналуы бағытын өзгертеді, яғни ядролық магниттелушіліктің прецесс. қозғалысын тудырады. Бұл қозғалыс зерттелмекші затты қоршаған индуктивтілік орамада пайда болатын индукциялық ЭІК арқылы анықталады.



Сканерлі ЯМР-спектроскопиясы



Алғашқы ЯМР спектрометрлерінің бірі, Bruker фирмасы



Жаңа электромагнитті ЯМР спектрометр

Физико-химиялық комплекстер



ЯМР-спектрометрі мен сұйық хроматограф

Қазіргі заманғы приборлар. Орта класс.



Фурье–ЯМР-спектрометр Bruker Avance III 500

Қолданысқа түскен уақыт: **2009**



Қазіргі заманғы приборлар. Топ-моделдер.



Магнит спектрометра ЯМР на 1000 МГц

Bruker

Германия



Магнит спектрометра ЯМР на 900 МГц

Varian (Agilent)

США



Магнит спектрометра ЯМР на 930 МГц

Jeol

Япония

ЯМР қолдану саласы

- Органикалық және бейорганикалық қосылыстардың құрылысы мен қасиетін зерттеу.
- Молекулалардың динамикалық қасиеттерің зерттеу (таутомерия, изомерия).
- Процесстерді зерттеу (кинетика, термодинамика, титрлеу).
- Биомакромолукалардың құрылысын анықтауда:
  - Ақуыз-лигандті әрекеттесуін зерттеу (биологиялық активті қосылыстардың ЯМР-скринингі)
  - Биологиялық сұйықтардың құрылымының мониторингі (метабономика)
- Тірі және өлі табиғат обьектісін визуалдау (ЯМР-томография)
  - Тірі ағзада өтетін процесстердің мониторингі (in-vivo спектроскопиясы)
  - Мидің функционалды активтілігін зерттеу (f-MRI)

Флуориметрия

Флуориметрия – ультракүлгін немесе көрінетін жарықпен қоздырғанда молекулалардың сәуле шығару қабілетіне негізделген аналитикалық әдіс.
Бұл әдіс фармацевтикалық талдауда өте сезімтал, селективті және төмен концентрациялардағы заттарды анықтауға мүмкіндік береді (10^{-8}–10^{-12} М деңгейіне дейін).

Фармацевтикалық қосылыстардың көпшілігі (витаминдер, алкалоидтар, антибиотиктер, фенольдік қосылыстар, ароматтық аминдер) табиғи флуоресценцияға ие немесе химиялық туындыға айналдыру арқылы флуоресценция береді.

Молекулалық деңгейдегі механизм

Флуоресценция – молекула фотон жұтқаннан кейін жоғары энергиялы қозған күйге өтіп, өте қысқа уақыттан соң (10^{-8}–10^{-9} с) жарық шығарып қайта бастапқы күйге оралу процесі.

Процестің кезеңдері:

1.Сіңіру (absorption): молекула фотон энергиясын жұтады.

2.Қозған күй (S1, S2): электрон жоғары энергетикалық деңгейге өтеді.

3.Ішкі релаксация: энергияның бір бөлігі жылуға айналады.

4.Флуоресценция: молекула төменгі энергетикалық деңгейге түсе отырып, жарық шығарады.

Флуоресценцияның толқын ұзындығы әрқашан жұтылған жарықтан ұзын

Флуориметрдің жұмыс істеу принципі

Флуориметр негізгі төрт блоктан тұрады:

1.Қоздыру көзі: UV немесе көрінетін диапазондағы сәуле (ксенон шамы, лазер).

2.Монохроматор: таңдалған толқын ұзындығын бөледі.

3.Кювета: зерттелетін ерітінді орналасқан оптикалық ұяшық.

4.Детектор: шығарылған флуоресценцияны тіркейді (фотоқабылдағыш, ФЭУ).

Флуориметрия принципі:
– Зат жарықпен қоздырылғанда флуоресценция шығарады.
– Детектор бұл жарықтың интенсивтілігін өлшейді.
– Интенсивтілік концентрацияға тікелей пропорционалды.



Дәрілік заттарды талдауда флуориметрияны қолдану бағыттары

Сапалық талдау

Флуоресценция заттың табиғатына өте сезімтал, сондықтан:

– Құрамында ароматтық хромофорлар бар қосылыстарды анықтау;

– Дәрілік заттың идентификациясы;

– Зақымдану өнімдерін немесе қоспаларды бақылау.

Мысалы:

– Рибофлавин (B_2), хинин, тетрациклин дәрілері табиғи түрде флуоресценция береді.

– Прокаин, сульфаниламид, аминқышқылдар – туындыландырудан кейін флуоресценцияға ие болады.

Сандық талдау

Флуоресценция интенсивтілігі **концентрация–интенсивтік** тәуелділігіне сай есептеледі.

Салыстырмалы әдістер:

– Калибрлік график

– Ішкі стандарт әдісі

Артықшылықтары:

– UV/Vis спектрофотометриядан 100–1000 есе сезімтал

– Қоспалардың аз мөлшерін анықтай алады

– Комплекстообразующие реакциялар арқылы селективтілігін арттыру

Әдістің артықшылықтары мен шектеулері

Артықшылықтары:

– Өте жоғары сезімталдық
– Жылдам анализ
– Селективтілікті арттыруға болады
– Биологиялық үлгілерде іздік концентрацияларды анықтайды

Шектеулері:

– Барлық заттар флуоресценция бермейді
– Туынды жасау кейде күрделі
– Жарық әсерінен сөну:
– коллизионды сөну
– ішкі фильтр эффектісі
– температура мен pH әсері

НАЗАРЛАРЫҢЫЗҒА РАХМЕТ!