

Spektrometria mas
(Mass Spectrometry – MS)

MS to technika analityczna zaliczana do **metod spektroskopowych**.

Jest to technika instrumentalna, używana do **identyfikacji i badania struktury związków organicznych**. Jej wyniki są uzupełnieniem metod techniki **spektrofotometrycznej**: IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR opartych na absorpcji promieniowania elektromagnetycznego. Badane mogą być związki o małych (np. 50 g/mol) oraz dużych (powyżej 1 000 g/mol) masach molowych. W zależności od wielkości cząsteczek analitu i podatności na fragmentację, stosowany jest odpowiedni rodzaj jonizacji.

MS współpracuje z aparaturą innych technik analitycznych, co pozwala na badanie próbek nanogramowych (**metody łączone** np. GC/MS, LC/MS), czy MS/MS – tandemowa spektrometria mas i jej połączenia z innymi metodami.

ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII MAS

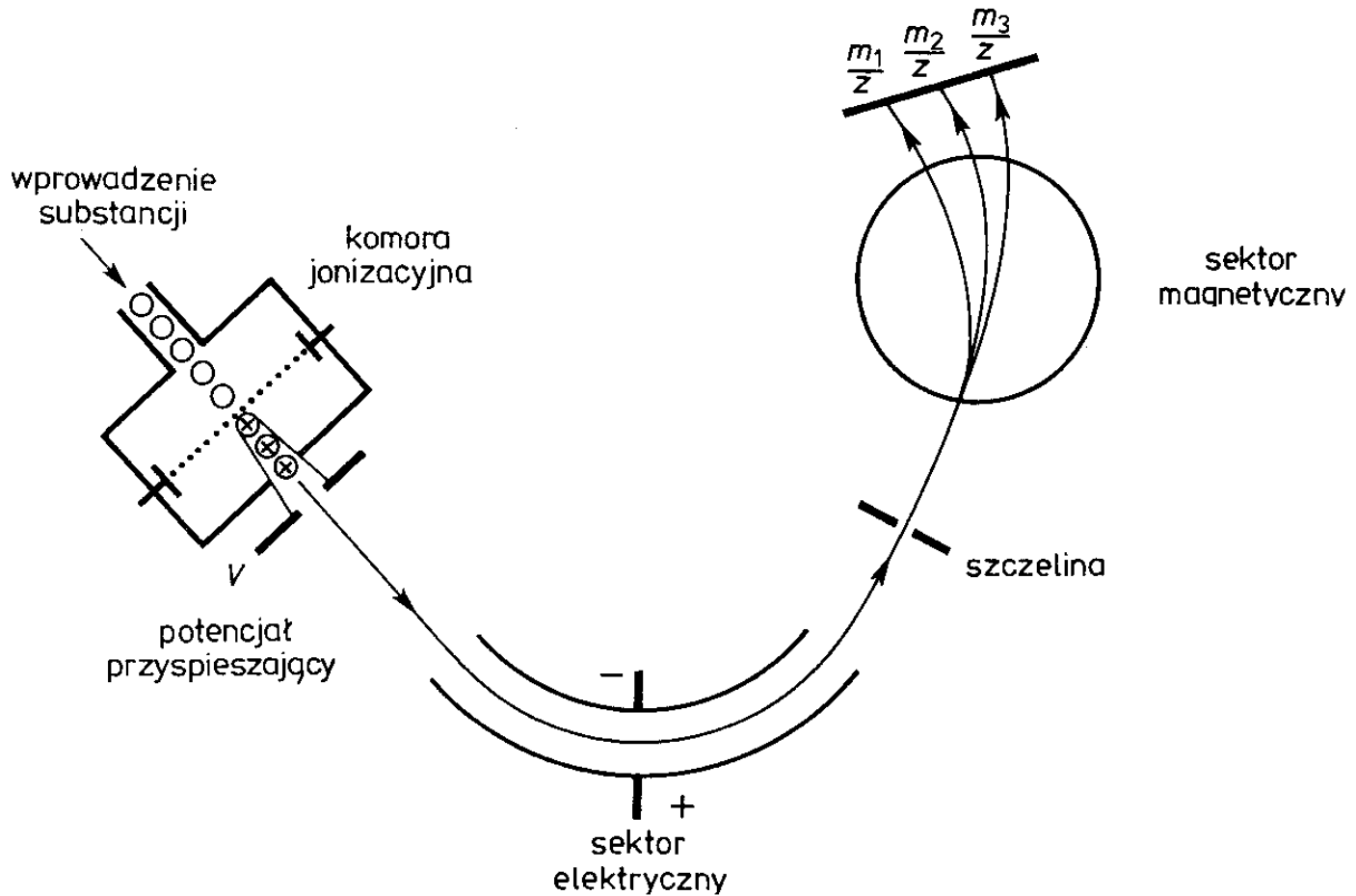
1. Identyfikacja związków chemicznych i ich mieszanin – pik molekularny: M ;
2. Ustalanie struktury związków chemicznych – przebieg fragmentacji;
3. Ustalanie ich składu pierwiastkowego – piki izotopowe: $M+1$, $M+2$ – wzór sumaryczny analitu;
4. Ustalanie składu izotopowego analizowanych substancji, co między innymi umożliwia określenie ich źródła pochodzenia, wiek próbki;
5. Precyzyjne ustalania składu złożonych mieszanin związków o dużych masach molowych.

Podstawą techniki MS jest **zjawisko tworzenia się jonów** z obojętnej substancji próbki, będącej w fazie gazowej (M). Każdy powstający jon charakteryzowany jest wyznaczonym **stosunkiem masy do jego ładunku (m/z)**. Powstaje wykres liczebności poszczególnych jonów w funkcji (m/z) zwany **WIDMEM MASOWYM**.

SPEKTROMETR MASOWY zawiera następujące elementy:

1. Układ wprowadzania próbki;
2. Komora jonizacyjna;
3. Układ przyspieszania jonów;
4. Analizator jonów;
5. Detektor jonów;
6. Układ rejestrujący widmo.

SCHEMAT SPEKTROMETRU MASOWEGO



Schemat spektrometru z podwójnym ogniskowaniem w sektorach elektrycznym i magnetycznym.

ETAPY TWORZENIA I REJESTRACJI WIDMA MS

1. Obojętna substancja próbki przeprowadzana jest w stan gazowy. Próbka musi być przeprowadzona w stan pary, prężność par nie może być mniejsza niż 10^{-7} Tr), to jest ograniczeniem tej metody;
2. Jonizacja obojętnych cząsteczek w fazie gazowej.
Powstawanie cząstek naładowanych – jonów próbki.
Stosowane są różne metody jonizacji;
3. Rozpad jonów próbki na mniejsze fragmenty o różnej masie;
4. Rozdzielenie i analizowanie charakterystyki grup fragmentów, pod względem wartości m/z i liczebności
 - a. Przyspieszanie i rozdzielanie naładowanych fragmentów w polu elektrycznym;
 - b. Rozdzielanie strumienia jonów według miary m/z , w polu magnetycznym;
 - c. Pomiar **nateżenia prądu jonowego** dla poszczególnych fragmentów – wydajność powstania jonów;
5. Rejestracja widma masowego.

METODY JONIZACJI

Metody oparte na technice MS są bardzo zróżnicowane, szczególnie pod względem **sposobu jonizacji**. Stosowana jest też różna aparatura – spektrometry mas.

Powstające w analizie cząstki różnią się stosunkiem masy do ładunku elektrycznego jonu – m/z .

1. **Wartości m/z stanowią o rozmieszczeniu pików na widmie masowym.**
2. **Intensywność pików – to liczba jonów o tej wartości m/z , powstałych w przebiegu analizy.**
3. **Liczba pików na widmie zależy od fragmentacji.**

Ustalenie dokładnej masy analizowanego związku nie jest oczywiste nawet z użyciem technik jonizacji nieprowadzących do fragmentacji.

Metody jonizacji dzielą się na:

1. **Wysokoenergetyczne** – prowadzą do fragmentacji analitu w źródle,
2. **Niskoenergetyczne** – cząsteczki podczas jonizacji uzyskują małe energie – utworzone jony nie ulegają fragmentacji lub ulegają jej w niewielkim stopniu.

JONIZACJA WIĄZKĄ ELEKTRONÓW

(Electron Impact Ionization – EI)

Jest to **jonizacja wysokoenergetyczna**. Może być stosowana do substancji w postaci gazowej, nieulegającej łatwo fragmentacji na jony.

Jonizacja następuje w komorze jonizacyjnej pod wpływem **wiązki elektronów**. **Włókno wolframowe** (źródło o temperaturze 2000°C) emituje strumień elektronów o znacznej energii (70 eV) i jonizuje próbkę.

Ta metoda jonizacji **nie może być stosowana** do analizy:

1. Związków polarnych,
2. Związków o dużych masach cząsteczkowych,
3. Związków nietrwałych termicznie.

JONIZACJA CHEMICZNA (Chemical Ionization – CI)

Jonizacja niskoenergetyczna. Zachodzi w dwóch etapach:

1. Analit wprowadzany jest do komory jonizacyjnej w postaci mieszaniny z **gazem reagującym** (w dużym nadmiarze – 1:300). Strumień elektronów jonizuje w pierwszej kolejności cząsteczki gazu, które tworzą **kation rodnikowy** (np. $[\text{CH}_4]^{+\bullet}$) reagujący z inną cząsteczką gazu i powstaje **jon pierwotny** (np. $[\text{CH}_5]^+$).
2. Jon pierwotny reaguje z obojętną cząsteczką analitu przekazując jej proton i powstaje **jon pierwotny analitu** ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

W tej metodzie powstaje **pozorny jon molekularny o masie $M+1$** .

Fragmentacja jonu molekularnego analitu następuje rzadko, co ułatwia identyfikację.

Gazem reagującym może być: **metan, woda, amoniak, izobutan.**

W zależności od zastosowanej metody jonizacji, próbka przekształcana jest w:

- **jony molekularne (cząsteczkowe, masowe, macierzyste)** – najczęściej są to **kationy rodnikowe**, które powstają przez usunięcie elektronów z badanego związku (M^{+*})



Są to jony o masie równej masie cząsteczkowej związku z dokładnością do masy elektronu. Wprowadzanie elektronów do próbki w celu uzyskania jonów (M^{-*}) jest stosowane sporadycznie i tylko w przypadku próbek elektroujemnych.

- **jony pseudomolekularne** lub **pozorne jony molekularne**, Jony pseudomolekularne są zwykle większe od masy cząsteczkowej analitu, mogą być dodatnie lub ujemne i powstają poprzez dodanie jonów (np. H^+ – powstaje jon $[M + H]^+$; Na^+ – jon $[M + Na]^+$) lub odłączenie jonu z badanej cząsteczki (H^+ - jon $[M - H]^-$).

Metody jonizacji „miękkiej” – **niskoenergetycznej** generują głównie jony **molekularne** lub **pseudomolekularne** podczas gdy metody jonizacji „twardej” – **wysokoenergetycznej** tworzą również jony **fragmentacyjne**.

- **jony fragmentacyjne**. Jon molekularny może ulegać dalszym rozpadom dając **obojętne cząsteczki, rodniki** oraz **dodatnio naładowane jony fragmentacyjne**.

Jony fragmentacyjne powstają zarówno przez **rozpad wiązań**, jak i poprzez różnego rodzaju **przegrupowania**, związane z tworzeniem nowych wiązań lub przeniesieniem atomu wodoru w obrębie cząsteczki.

Ten sam związek może ulegać fragmentacjom na różnych niezależnych od siebie drogach.

Intensywność piku jonu fragmentacyjnego zależy od szybkości tworzenia tego jonu i szybkości jego dalszego rozpadu w reakcjach następczych (fragmentacja wieloetapowa).

ZASADY FRAGMENTACJI ZWIĄZKÓW

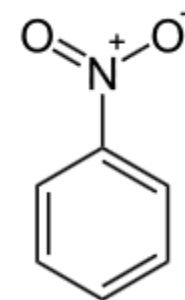
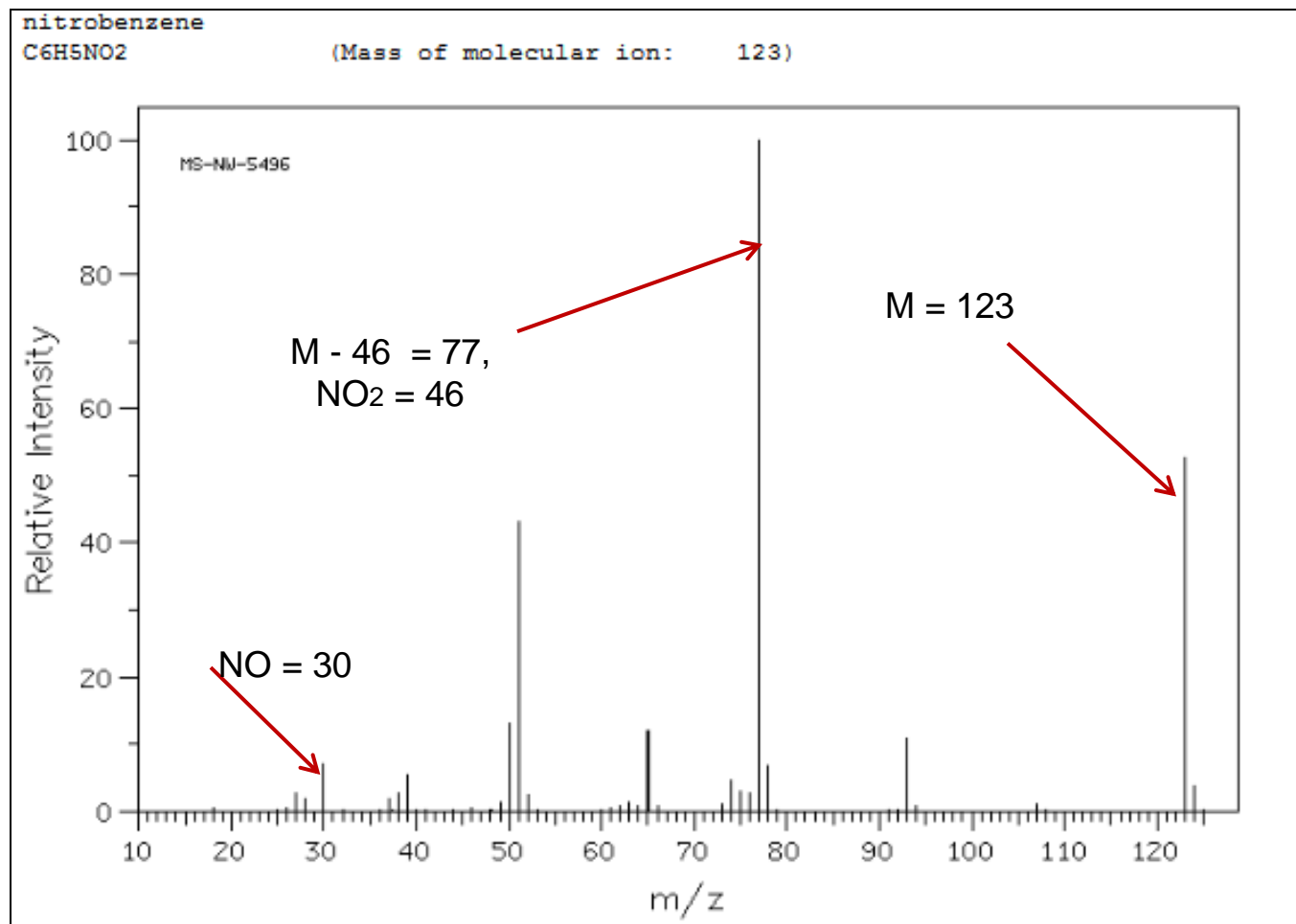
W związkach organicznych rozpadowi ulegają przede wszystkim **wiązania słabe o niskiej energii**, natomiast rozpad **wiązań o dużej energii** jest mało prawdopodobne.

Wiązania wielokrotne ($C=C$, $C=O$, $C\equiv N$) rzadko ulegają bezpośredniemu rozpadowi. Niektóre **wiązania pojedyncze** ($C-F$, $C-H$, $O-H$) są również trwałe.

Intensywność pików pochodzących od jonów fragmentacyjnych opiera się między innymi na:

1. **Trwałości karbokationów** związanej ze wzrostem ich rzędowości ($CH_3^+ > RCH_2^+ > R_2CH^+ > R_3C^+$). Pik molekularny jest najtrwalszy w związkach o prostych łańcuchach;
2. Trwałości jonów molekularnych jest **stabilizowana** przez wiązania podwójne, pierścienie aromatyczne i układy cykliczne;
3. Związki aromatyczne z podstawnikami alkilowymi odszczepiają grupę alkilową mniejszą o $-CH_2-$;
4. W procesie fragmentacji istnieje możliwość **wydzielania stabilnych cząsteczek obojętnych**, takich jak C_2H_2 , C_2H_4 , CO , CO_2 , H_2O , HCN , HCl , NH_3 , H_2S .

WYKRES MS NITROBENZENU ($M_m=123$) WIDMO MASOWE



METODY RADIOMETRYCZNE

To metody wykorzystujące przemiany nuklidów.

Przemiany polegają na **miarze radiacji – promieniowania jądrowego**, głównie **promieniowania α , β , γ** . Promieniowanie to emitują izotopy promieniotwórcze naturalne (**promieniowanie samoistne**) lub sztuczne (**promieniowanie wymuszone**) powstałe przez **napromieniowanie strumieniem neutronów**.

Służą do wykrywania, identyfikacji i oznaczania składników.

NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANE METODY RADIOMETRYCZNE

1. Metody oparte na **absorpcji i odbiciu promieniowania jądrowego**.
2. Metody oparte na **pomiarze aktywności naturalnych pierwiastków promieniotwórczych**.
3. Metody **aktywacji**.
4. Metody polegające na **wzbudzeniu atomów przez naświetlanie promieniowaniem γ ze źródeł izotopowych**.
5. Metody **wskaźników promieniotwórczych**.

ANALIZA TERMICZNA

Jest to grupa metod badania przemian chemicznych i/lub fizycznych analitu pod wpływem działania temperatury i innych parametrów środowiska.

Istnieje około 20 metod analizy termicznej. Różne odmiany tej analizy związane są dodatkowo (poza **zmianą temperatury**) ze **zmianą środowiska badanej próbki**:

- **ciśnienie**;
- dodatkowe działanie różnych czynników chemicznych – skład chemiczny atmosfery – **chemicznie aktywna atmosfera**;
- dodatkowe działanie czynników fizycznych (np. **czynniki mechaniczne, pole elektryczne lub magnetyczne**).

W analizie termicznej istnieją duże możliwości w zakresie wzajemnego łączenia różnych metod.

Metody analizy termicznej umożliwiają więc określanie zmian stanu badanej substancji wraz ze zmianą temperatury w różnych warunkach pomiarowych. Badany jest zakres termiczny następowania zmian.

Zastosowanie metod analizy termicznej

1. Do badania **reakcji chemicznych i przemian fazowych** zachodzących w czasie ogrzewania lub chłodzenia próbki;
2. Pozwalają wyznaczyć **parametry termodynamiczne i kinetyczne reakcji**;
3. Są przydatne do jakościowego i ilościowego **określenia składu substancji** (fazowego i chemicznego);
4. Mogą służyć do określania **czystości surowców**;
5. Do badania **reakcji wysokotemperaturowych** związanych z wytwarzaniem tworzyw;
6. Pozwalają wyznaczyć **trwałość termiczną** badanych materiałów.

Zastosowanie metod termicznych w farmacji

1. Badanie hydratacji i krystalizacji składników leków;
2. Oznaczanie trwałości substancji czynnych w preparatach farmaceutycznych;
3. Analiza składu preparatów farmaceutycznych;
4. Badanie czystości surowców do produkcji leków;
5. Badanie polimorfizmu substancji czynnej;
6. Optymalizacja procesów przemysłowych.

Wyniki badań metodami termicznymi przedstawia się w postaci **krzywych**. Powstałe wykresy obrazują zależność mierzonej właściwości od temperatury.

Niekiedy rejestruje się ich pierwsze pochodne – **krzywe różniczkowe**, które określają **szybkość zmian mierzonego parametru**, ułatwiające odróżnienie nakładających się na siebie efektów termicznych oraz dokładne wyznaczenie temperatury punktów ekstremalnych na krzywych termicznych.

PODSTAWOWE METODY TERMICZNE

Termiczna analiza różnicowa - DTA

Jest to instrumentalna metoda analityczna oparta na rejestracji różnicy temperatur (ΔT) między substancją badaną (T_s) i substancją odniesienia (T_R) względem czasu lub temperatury. Badane są równocześnie dwie próbki, znajdujące się w identycznych warunkach. Środowisko próbek jest ogrzewane lub chłodzone w sposób kontrolowany. Różnicowa analiza termiczna znalazła zastosowanie w chemii polimerów, metalurgii, mineralogii oraz w przemyśle ceramicznym.

Różnicowa kalorymetria skaningowa - DSC

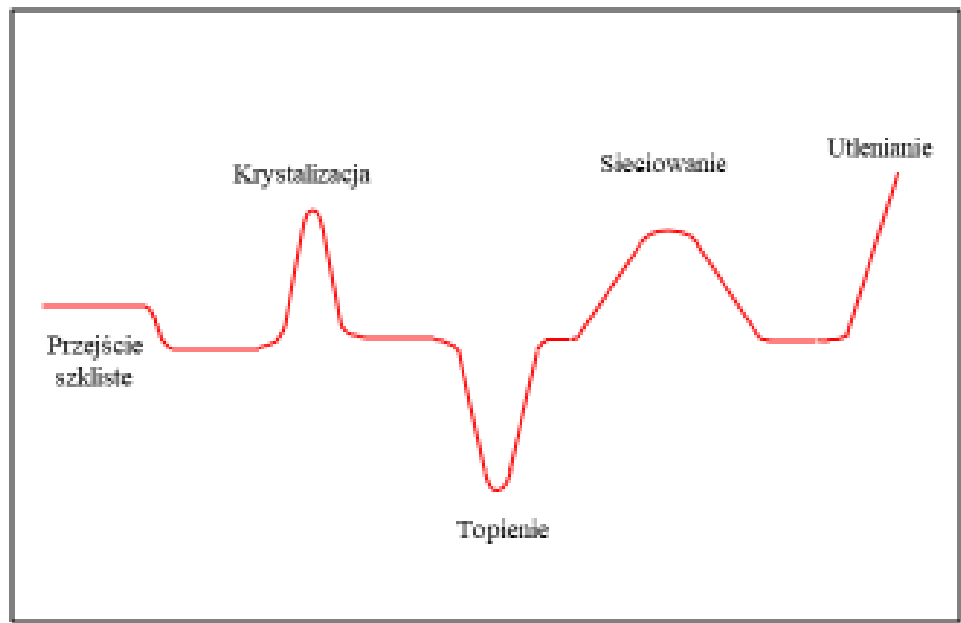
Jest to instrumentalna metoda analityczna, polegająca na rejestrowaniu różnicy w przepływie strumienia ciepła pomiędzy substancją badaną a układem grzejnym i substancją odniesienia a układem grzejnym w funkcji temperatury.

Wynikiem pomiaru jest wykres DSC, który przedstawia **ilość ciepła wymienionego przez próbkę z otoczeniem w jednostce czasu** w funkcji czasu lub temperatury.

Zastosowanie DSC

1. Badanie efektów cieplnych związanych z przemianami analizowanych substancji;
2. Badanie ciepła reakcji lub przemiany fazowej;
3. Badanie pojemności cieplnej materiałów;
4. Identyfikacja i badanie związków chemicznych;
5. Badanie właściwości polimerów, które związane są z temperaturą;
6. Badanie kinetyki rozpadu oraz polimorfizmu leków;
7. Badania czystości leków

> egzotermiczny - Przepływ ciepła



Temperatura

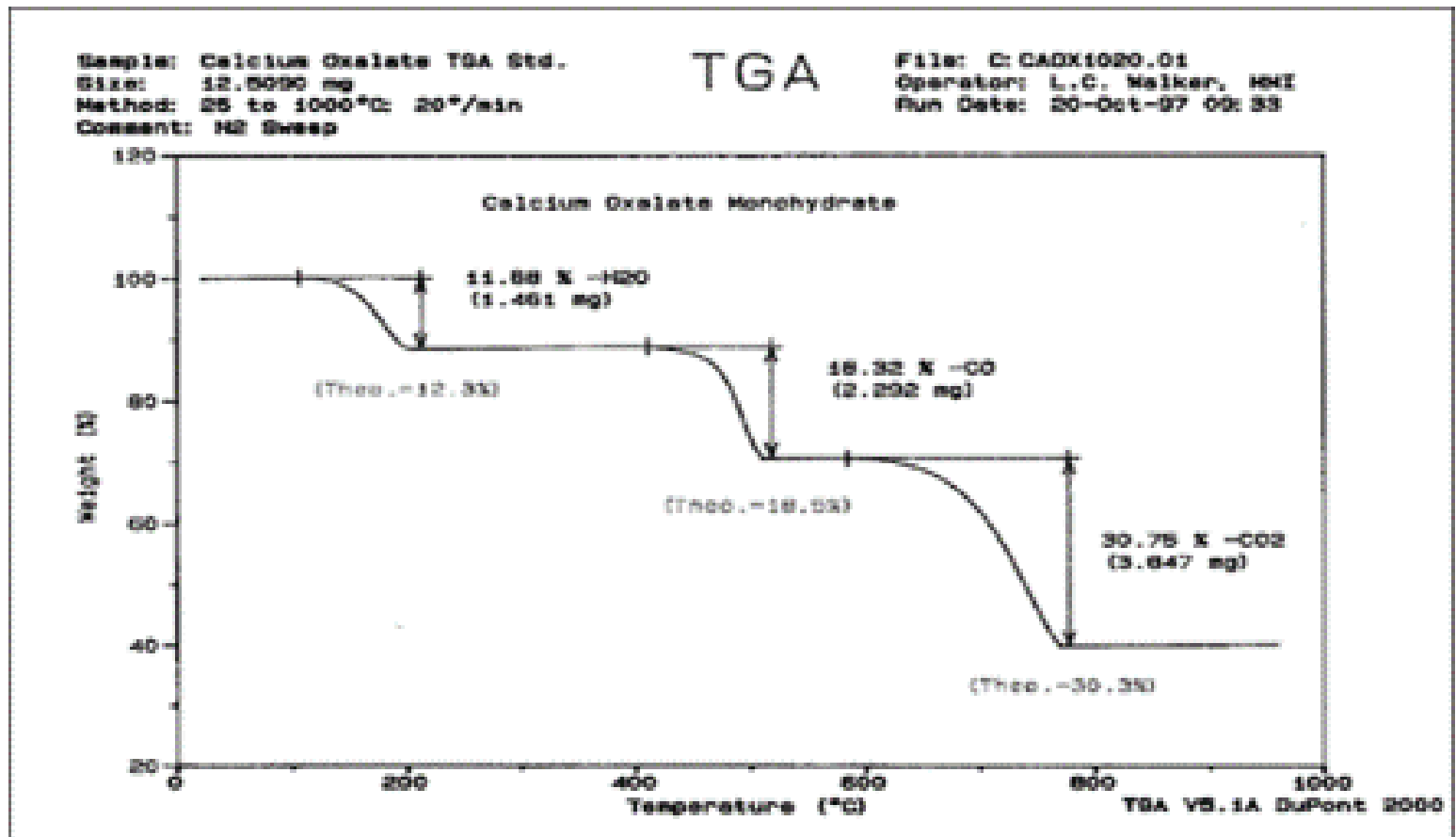
Termograwimetria - TG

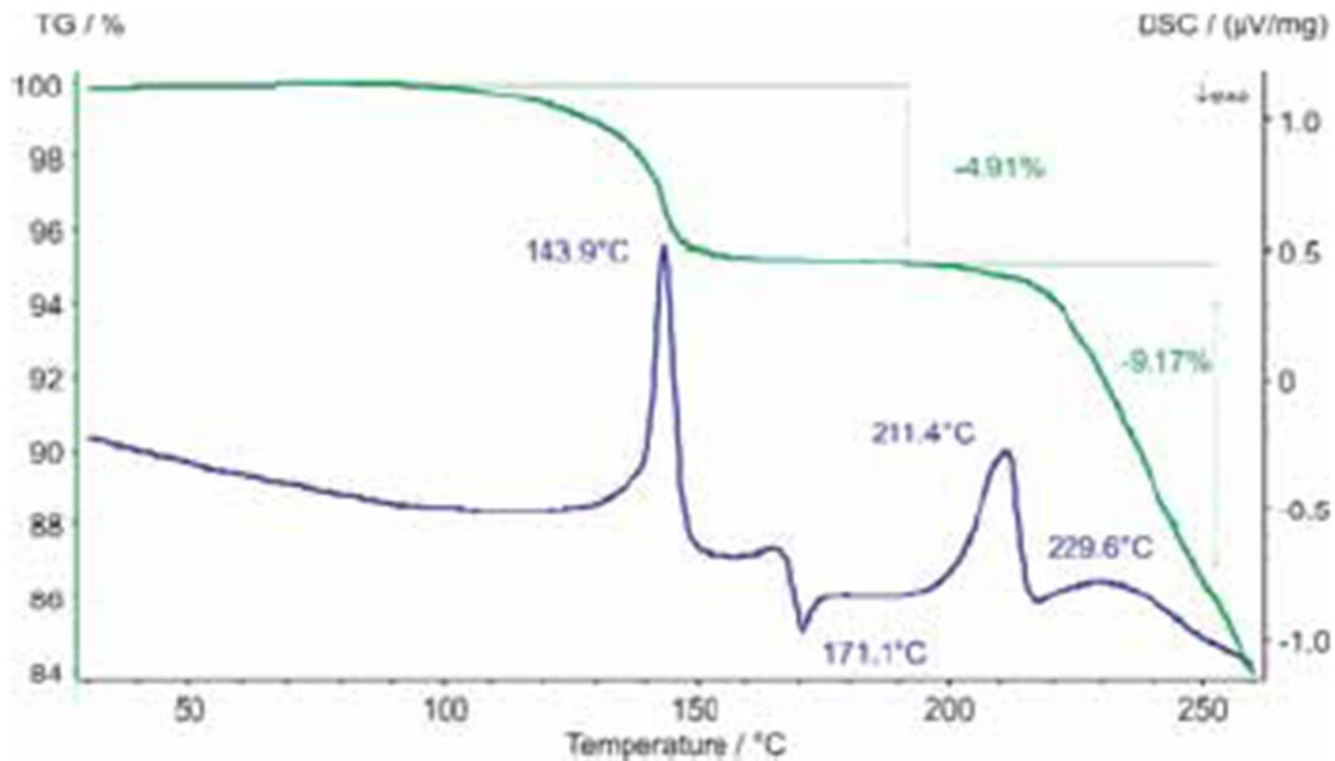
To instrumentalna metoda analityczna, której podstawą jest badanie **zmian masy próbki analitu przy wzroście lub obniżaniu temperatury**. Temperatura kontrolowana jest wg określonego programu. Zmiany przedstawia graficznie **termogram**.

Zastosowanie termogravimetrii - TG

1. Badanie czystości substancji;
2. Wyznaczanie stabilności termicznej substancji;
3. Badanie rozkładu związków chemicznych;
4. Analiza składu mieszanin;
5. Badanie procesów pirolizy różnych materiałów;
6. Badanie stabilności oksydacyjno-redukcyjnej;
7. Analiza wilgotności substancji;
8. Oznaczanie ilości składników lotnych;
9. Określanie kinetyki procesów chemicznych i fizycznych;
10. Badanie solwatacji, sorpcji, sublimacji, itp.;
11. Analiza właściwości termicznych polimerów.

TG – analiza szczawianu wapnia





Jednoczesne rejestrowanie krzywych TG i DSC w jednym pomiarze monohydratu laktozy. W 144 °C następuje utrata 4.91% masy (TG) i pojawia się sygnał endotermiczny (DSC), towarzyszące dehydratacji do bezwodnej laktozy. Efekty energetyczne w 165 i 171 °C nie są związane ze zmianą masy – są to przejścia fazowe. W temperaturze, odpowiadającej początkowi topnienia zaczyna się jednocześnie rozkład.

W analizie termicznej stosowane są trzy typy **połączonych technik pomiarowych**.

1. **Techniki jednoczesne** – badanie próbki w tym samym czasie, dwiema lub większą liczbą technik pomiarowych – równoczesna analiza DTA-TG, DSC-TG;

2. **Jednoczesne techniki sprzężone** – badanie próbki za pomocą dwóch lub większej liczby technik instrumentalnych działających niezależnie. Aparaty połączone są ze sobą DSC-TG-MS, DSC-TG-FTIR;

3. **Techniki jednoczesne współdziałające nieciągłe** – badanie próbki za pomocą dwu lub więcej sprzężonych technik pomiarowych.

Pobieranie substancji do badań dla drugiej z technik lub sam pomiar odbywają się w sposób nieciągły. Przykładem jest połączenie DTA i GC. Analizowane są chromatograficznie lotne produkty analizy DTA.