



М И Р Х И М И И

А.Т. Лебедев

**Масс-спектрометрия
для анализа объектов
окружающей среды**

Перевод с английского
под общей редакцией А.Т. Лебедева

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2013

УДК 543.51
ББК 24.4
Л33

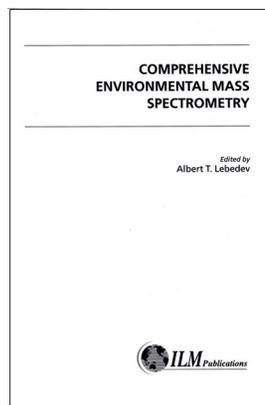
Л33 Лебедев А.Т.

Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды
Москва: Техносфера, 2013. – 632с., ISBN 978-5-94836-363-9

Современная масс-спектрометрия является наиболее чувствительным, информативным и надежным методом идентификации и количественного определения экотоксикантов любого типа в образцах объектов окружающей среды любой сложности. Хотя диапазон возможностей современной масс-спектрометрии необычайно широк, многие из них остаются неизвестными непрофессионалам. Основная цель книги – продемонстрировать, что самые разные научные задачи, стоящие перед учеными разных специальностей, могут быть решены масс-спектрометрически.

Книга предназначена, в первую очередь, для людей, работающих в смежных дисциплинах (экология, геология, биология, гидрология, медицина и т.д.), а также будет полезна студентам и аспирантам химических, физико-химических, биологических и медицинских специальностей.

УДК 543.51
ББК 24.4



Переводчики:

К.А. Артеменко, Е.С. Бродский, С.А. Ильченко, А.И. Константинов, А.Т. Лебедев, А.Ю. Лейкин, В.В. Лободин, П.В. Метальников, Е.В. Московец, А.С. Самохин, Е.А. Чернецова

Обложка: автор идеи Маркос Эберлин (Университет Кампинус, Бразилия)

© 2013, Лебедев А.Т.

© 2013, ЗАО «РИЦ «Техносфера», оригинал-макет, оформление

ISBN 978-5-94836-363-9

ISBN 978-1-906799-12-0 (англ.)

Содержание

Список авторов	18
Список переводчиков	21
Предисловие к русскому изданию	22
Введение	23
Литература.....	28
Глава 1. Основные принципы масс-спектрометрии	29
1.1. Базовые аспекты.....	29
1.2. Ввод образца.....	32
1.3. Ионизация.....	33
1.3.1. Электронная ионизация.....	34
1.3.2. Химическая ионизация.....	35
1.3.3. Полевая ионизация.....	36
1.3.4. Ионизация электрораспылением.....	38
1.3.5. Химическая ионизация и фотоионизация при атмосферном давлении.....	39
1.3.6. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация.....	40
1.4. Масс-анализаторы.....	40
1.4.1. Секторные приборы.....	40
1.4.2. Квадрупольные приборы.....	44
1.4.3. Ионные ловушки.....	46
1.4.4. Времяпролетные масс-спектрометры.....	46
1.4.5. Масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье.....	47
1.4.6. Орбитальные ловушки.....	48
1.5. Детектирование ионов.....	49
Литература.....	49
Глава 2. Газовая хроматография/масс-спектрометрия — «рабочая лошадка» для анализа объектов окружающей среды	52
2.1. Общие вопросы.....	52
2.2. Типы хроматограмм с регистрацией ионного тока.....	53
2.3. Скорость сбора данных.....	63
2.4. Какие соединения можно анализировать методом ГХ/МС.....	65
2.5. Количественный анализ.....	69
2.6. Выводы.....	73
Литература.....	73
Глава 3. Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия — оптимальный метод качественного и количественного анализа загрязнений окружающей среды	74
3.1. Введение.....	74
3.2. Методы и оборудование для мониторинга окружающей среды.....	75
3.2.1. Почему для мониторинга окружающей среды используется жидкостная хроматография?.....	75

3.2.2. Почему ЖХ/МС (жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором) используется для мониторинга окружающей среды ?	76
3.3. Соединение ЖХ с масс-спектрометром: проблемы и их решение	77
3.4. Ионизация при атмосферном давлении	79
3.5. Типы масс-спектрометров и их возможности для анализа образцов из объектов окружающей среды	82
3.5.1. Приборы с низким разрешением	82
3.5.2. Приборы с высоким разрешением	85
3.6. Анализ образцов	86
3.7. Наиболее распространенные приложения	87
3.8. Подтверждающий анализ	87
3.9. Целевые подходы с использованием тандемной квадрупольной масс-спектрометрии	89
3.10. Скрининговые и исследовательские методы с использованием масс-спектрометров типа QTOF	95
3.11. Почему приборы типа QTOF используются для экологического контроля?	95
3.12. Исследовательская работа по изучению продуктов трансформации	99
3.13. Ближайшие и долгосрочные перспективы	100
Литература	101

Глава 4. Применение тандемной масс-спектрометрии для анализа загрязнений окружающей среды	103
4.1. Введение	103
4.2. Тандемные масс-спектрометры	104
4.2.1. Масс-спектрометрия высокого разрешения	104
4.2.2. Тройные квадрупольные	105
4.2.3. Ионные ловушки	106
4.2.4. Времяпролетная масс-спектрометрия (ВПМС)	108
4.2.5. Линейные ионные ловушки	108
4.2.6. Орбитрэп	110
4.3. Приложения МС/МС к экологическому мониторингу	110
4.3.1. Новые загрязняющие вещества	113
4.3.2. Лекарственные препараты	115
4.3.3. Пестициды и гербициды	115
4.3.4. Аддукты ДНК и маркеры оксидативного стресса	118
4.3.5. Поверхностно-активные вещества и красители	120
4.3.6. Озон	120
4.4. Заключение	121
4.5. Замечание	122
Литература	122

Глава 5. Использование специализированного программного обеспечения и библиотек масс-спектров в анализе объектов окружающей среды	128
5.1. Введение	128
5.2. Базы данных масс-спектров и программы библиотечного поиска	132
5.3. Развитие баз данных масс-спектров	133
5.4. Базы данных масс-спектров	135

5.5. Другие базы данных масс-спектров.....	137
5.6. Выбор диапазона сканирования в случае проведения поиска по базам данных масс-спектров.....	139
5.7. Программное обеспечение, используемое для проведения поиска по базам данных масс-спектров.....	140
5.8. Пример проведения правильной идентификации с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation.....	142
5.9. Пример проведения правильной идентификации с помощью программного обеспечения NIST MS Search.....	148
5.10. Какой алгоритм библиотечного поиска является наилучшим?.....	152
5.11. Интерпретатор масс-спектров NIST.....	152
5.12. Использование базы данных масс-спектров ИЭ NIST при проведении анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / масс-спектрометрии.....	153
5.13. База данных индексов удерживания NIST.....	156
5.14. Программа для автоматического поиска компонентов и выделения чистых масс-спектров AMDIS.....	158
5.15. Определение точных значений m/z	162
5.16. Дополнительное программное обеспечение, представляющее интерес для масс-спектрометристов, работающих в области анализа объектов окружающей среды.....	164
5.17. Заключение.....	168
Литература.....	168
Глава 6. Передовые методы на основе ГХ/МС.....	170
6.1. Режим быстрой ГХ/МС.....	170
6.1.1. Оптимизация газохроматографической составляющей в условиях быстрой ГХ/МС.....	171
6.1.2. Вклад масс-спектрометрической составляющей при использовании техники быстрой ГХ/МС.....	176
6.2. ГХ/МС с интерфейсом ультразвуковых молекулярных пучков.....	179
6.3. Двумерная газовая хроматография — масс-спектрометрия ГХ×ГХ/МС.....	188
6.3.1. Принцип метода.....	188
6.3.2. Преимущества метода ГХ×ГХ/МС.....	191
6.4. Заключение.....	196
Литература.....	196
Глава 7. Масс-спектрометрия в нормальных условиях (Ambient Mass Spectrometry) — анализ объектов окружающей среды без пробоподготовки.....	198
7.1. Введение.....	198
7.2. Наиболее часто используемые методы масс-спектрометрии в нормальных условиях.....	200
7.2.1. Десорбционная электрораспылительная ионизация (ДЭРИ, DESI) и ионизация спреем с бумаги (paper spray ionization, PSI).....	200
7.2.2. Прямой анализ в режиме реального времени (ПАРВ, DART).....	202
7.2.3. Атмосферный зонд для анализа твердых образцов (ASAP).....	203
7.2.4. Экстракционная электрораспылительная ионизация (ЭЭРИ, EESI).....	204

7.2.5. Низкотемпературная плазма (LTP).....	205
7.2.6. Ионизация акустическим распылением в нормальных условиях — easy ambient sonic-spray ionization (EASI) и ионизация акустическим распылением в нормальных условиях с использованием эффекта Вентури (Venturi easy ambient sonic-spray ionization, V-EASI).....	206
7.3. Применения в анализе объектов окружающей среды.....	208
7.4. Заключение.....	215
Литература.....	216
Глава 8. Масс-спектрометрия десорбционной электрораспылительной ионизации.....	223
8.1. Введение.....	223
8.2. Экспериментальные установки и условия.....	224
8.3. Реакционная десорбция.....	227
8.4. Масс-спектрометрическое изображение поверхности с помощью ДЭРИ.....	229
8.5. Количественные измерения.....	230
8.6. Анализ воды.....	232
8.7. Анализ аэрозолей.....	234
8.8. Прямой анализ.....	238
Литература.....	239
Глава 9. Миниатюрные масс-спектрометры для анализа объектов окружающей среды.....	242
9.1. Введение.....	242
9.2. Основы конструкции приборов.....	244
9.2.1. Методы ввода проб.....	244
9.2.2. Методы ионизации.....	249
9.2.3. Масс-анализаторы.....	254
9.2.4. Вакуумные системы.....	260
9.2.5. Детекторы.....	261
9.3. Экологические приложения для миниатюрных масс-спектрометров.....	262
9.3.1. Подводная масс-спектрометрия для регистрации летучих органических соединений (ЛОС) и растворенных в воде газов.....	263
9.3.2. Мониторинг вулканических выбросов для контроля вулканической активности.....	267
9.3.3. Детектирование перфторированных соединений.....	270
9.3.4. Анализ углеводов.....	271
9.3.5. Детектирование пестицидов.....	273
9.3.6. Анализ полициклических ароматических углеводов.....	275
9.3.7. Детектирование примесей в продуктах питания.....	277
9.4. Заключение.....	278
Литература.....	279
Глава 10. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой в экологическом анализе.....	288
10.1. Введение.....	288
10.2. Основы метода.....	289
10.3. Преимущества и недостатки.....	290
10.3.1. Спектральные интерференции.....	291

10.3.2. Неспектральные интерференции (матричные эффекты).....	292
10.4. Практическое применение.....	293
10.4.1. Анализ воздуха.....	293
10.4.2. Анализ воды.....	293
10.4.3. Анализ твердых образцов.....	295
10.4.4. Установление формы нахождения элементов.....	296
10.4.5. Определение изотопного состава.....	297
10.4.6. Лазерный пробоотбор в ИСП-МС.....	299
10.4.7. Стандартные образцы.....	299
Литература.....	300
Глава 11. Роль масс-спектрометрии в исследовании летучих органических соединений	306
11.1. Летучие органические загрязняющие вещества.....	306
11.1.1. Происхождение летучих органических веществ и их влияние на окружающую среду.....	306
11.1.2. Воздействие ЛОС на здоровье человека.....	307
11.1.3. Экономический эффект биогенного загрязнения.....	308
11.2. Масс-спектрометрия летучих загрязняющих веществ.....	309
11.2.1. Протоколы пробоподготовки.....	310
11.2.2. Реакция переноса протона.....	312
11.2.3. Прямой анализ в режиме реального времени.....	314
11.3. Мониторинг летучих загрязняющих веществ в обычных условиях и при пожарах.....	315
11.3.1. Определение антропогенных загрязняющих веществ.....	315
11.3.2. Определение биогенных загрязняющих веществ в окружающей среде.....	317
11.3.3. Влияние температуры на определение биогенных соединений.....	320
11.3.4. Анализ загрязняющих веществ, выделяемых при пиролизе различных частей растений.....	323
11.4. Заключение и будущее направление работы.....	327
Благодарность.....	328
Литература.....	328
Глава 12. Идентификация и количественное определение токсикологически значимых побочных продуктов дезинфекции воды методами масс-спектрометрии	333
12.1. Введение.....	333
12.2. Аналитические методы идентификации и количественного определения ППД.....	339
12.2.1. Методы экстракции/концентрирования.....	339
12.2.2. Масс-спектрометрические методы детектирования.....	343
12.2.3. Методы дериватизации.....	349
12.3. Что нас ждет в будущем?.....	352
Благодарность.....	353
Литература.....	353
Глава 13. Новые типы приоритетных загрязняющих веществ в окружающей среде	360
13.1. Введение.....	360
13.2. Масс-спектрометрия и НПЗВ.....	363

13.2.1. Газовая хроматография/масс-спектрометрия.....	364
13.2.2. Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия.....	364
13.3. Выводы.....	376
Литература.....	378
Глава 14. Анализ пестицидов в образцах объектов окружающей среды современными методами хроматомасс-спектрометрии.....	386
14.1. Введение.....	386
14.2. Анализ остаточных количеств пестицидов.....	388
14.3. ГХ/МС.....	391
14.4. ЖХ/МС.....	395
14.5. Тенденции.....	400
Благодарность.....	405
Литература.....	405
Глава 15. Определение стойких галогенсодержащих соединений:	
хлорированные дибензо-п-диоксины и дибензофураны.....	409
15.1. Введение.....	409
15.1.1. Хлорированные диоксины в окружающей среде.....	409
15.1.2. Стадии ультраследового анализа объектов окружающей среды.....	411
15.1.2. Почему нужна масс-спектрометрия?.....	412
15.2. Подготовка проб для определения ХДД/ХДФ на следовом уровне.....	413
15.2.1. Методы экстракции.....	413
15.2.2. Очистка экстрактов.....	414
15.2.3. Замечания по контролю качества.....	414
15.3. Количественный анализ и метод изотопного разбавления.....	417
15.3.1. Внутренняя и внешняя градуировка.....	417
15.3.2. Особенности масс-спектрометрии с изотопным разбавлением.....	418
15.3.3. Стандартные образцы и другие средства оценки эффективности.....	419
15.3.4. Воспроизводимость, точность и неопределенность.....	420
15.4. Газохроматографические методы.....	420
15.4.1. Основные положения газовой хроматографии.....	420
15.4.2. Колонки, используемые для определения ХДД/ХДФ.....	421
15.5. Масс-спектрометрические методы.....	422
15.5.1. Масс-спектрометрия и интегрированные ГХ/МС-системы.....	422
15.5.2. Магнитные секторные приборы.....	424
15.5.3. Тандемный масс-спектрометр.....	426
15.5.4. Масс-спектрометр сверхвысокого разрешения.....	427
15.5.5. Методы ионизации для определения ХДД/ХДФ.....	427
15.5.6. Мониторинг заданных ионов (МЗИ) и мониторинг заданных реакций (МЗР).....	428
15.6. Полный набор аналитических методов для определения ХДД/ХДФ и других стойких галогенированных соединений.....	428
15.7. Будущее многокомпонентных методов.....	430
15.7.1. Времяпролетный масс-спектрометр высокого разрешения.....	430
15.7.2. Автоматизация методов.....	431
15.7.3. Ограничения анализа.....	433

Литература.....	434
Глава 16. Масс-спектрометрия атмосферных аэрозолей.....	438
16.1. Введение.....	438
16.2. Свойства аэрозолей и их воздействие на окружающую среду.....	438
16.3. Приборы и их применение.....	443
16.3.1. Анализ атмосферных газов.....	444
16.3.2. Основные режимы работы приборов при анализе атмосферных частиц.....	447
16.3.3. Времяпролетные приборы для анализа частиц, работающие в режиме онлайн.....	449
16.3.4. Применение масс-спектрометров для анализа одиночных частиц в исследованиях аэрозолей.....	452
16.3.5. Многоцелевые времяпролетные приборы для анализа частиц.....	460
16.3.6. Использование ионных ловушек для анализа одиночных частиц.....	463
16.3.7. Масс-спектрометры для анализа ансамблей частиц.....	466
16.4. Итоги и перспективы.....	470
Литература.....	471
Глава 17. Использование масс-спектрометрии для изучения взаимодействия ДНК с экотоксикантами.....	478
17.1. Введение.....	478
17.2. Источники ДНК для анализа ДНК-аддуктов.....	480
17.3. Подготовка образцов.....	481
17.4. Приборы для ВЭЖХ-ЭРИ/МС/МС-анализа ДНК-аддуктов.....	482
17.4.1. Валидация масс-спектрометрического метода.....	490
17.5. Примеры использования ВЭЖХ/МС/МС для анализа ДНК-аддуктов.....	491
17.5.1. Аддукты, образующиеся при воздействии ароматических аминов.....	491
17.5.2. Аддукты с нитрозаминами.....	492
17.5.3. Экзоциклические аддукты ДНК.....	494
17.5.4. Этанол/ацетальдегидные аддукты.....	494
17.5.5. Аддукты с полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ).....	495
17.5.6. ДНК-аддукты с эпоксидами.....	497
17.6. Новые подходы к повышению чувствительности аналитических методов при анализе ДНК-аддуктов.....	498
17.6.1. Капиллярная ВЭЖХ/наноэлектроспрейная МС.....	499
17.6.2. МС-анализ с использованием ВЭЖХ-наноколонок и ионизацией наноэлектроспреем.....	500
17.6.3. Очистка образцов в режиме онлайн.....	501
17.6.4. ЖХ/МС на микрочипах.....	504
17.7. Выводы.....	506
Благодарность.....	506
Литература.....	506
Глава 18. ИЦРФП-анализ сложных органических смесей. Петролеомика.....	515
18.1. Введение.....	515
18.2. МС-ИЦРФП.....	517

18.3. Разрешение по массе, разрешающая способность и точное измерение массы.....	521
18.4. Точная масса и дефект массы.....	524
18.5. Степень ненасыщенности (DBE) и Z-число.....	527
18.6. Масса в шкале Кендрика и дефект масс Кендрика.....	528
18.7. Визуализация данных: график масс Кендрика, диаграммы ван Кревелена, распределение гетероатомных классов соединений, график зависимости DBE от числа атомов углерода.....	530
18.7.1. График масс Кендрика.....	530
18.7.2. Диаграммы ван Кревелена.....	532
18.7.3. График распределения гетероатомных классов.....	533
18.7.4. График зависимости DBE от числа атомов углерода.....	534
18.8. Методы ионизации для МС-ИЦРФП-анализа сложных смесей.....	536
18.9. Применение МС-ИЦРФП для решения экологических задач.....	537
Литература.....	541
Глава 19. Применение масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения с масс-анализатором ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье для анализа природного органического вещества в объектах окружающей среды.....	547
19.1. Введение.....	547
19.1.1. Значение природного органического вещества и способы его анализа.....	547
19.1.2. Характеристики масс-спектров ПОВ и композиционное пространство.....	549
19.1.3. Визуализация данных сложных масс-спектров.....	551
19.1.4. Примеры анализа масс ПОВ.....	552
19.2. Материалы и методы.....	553
19.2.1. Масс-спектрометры ИЦР ПФ.....	553
19.2.2. Расчет масс для молекул, содержащих С, Н, N, O, S.....	553
19.3. Результаты и обсуждение.....	553
19.4. Заключение.....	563
Литература.....	563
Глава 20. Метод масс-спектрометрической визуализации (имиджинг).....	568
20.1. Введение.....	568
20.2. Микронзондирование и молекулярная визуализация.....	568
20.3. Визуализация пространственного распределения молекулярного состава.....	570
20.4. Влияние матрицы.....	573
20.5. Применение масс-спектрометрии вторичных ионов (МСВИ) в биоанализе.....	575
20.6. Качество изображения и аналитический предел обнаружения.....	576
20.7. МС-визуализация как метод качественного анализа.....	577
20.8. МС-визуализация как точный аналитический метод.....	578
20.9. Идентификация и характеристика.....	580
20.10. МС-имиджинг в исследованиях объектов окружающей среды.....	581
20.11. Перспективы.....	584
Литература.....	585
Глава 21. Масс-спектрометрия изотопных соотношений.....	587
21.1. Введение.....	587

21.2. Величина δ	588
21.3. Причины вариаций распределения стабильных изотопов в природе.....	588
21.4. Масс-спектрометрия изотопных отношений в газах.....	590
21.4.1. Ионизация.....	591
21.4.2. Разделение по массам.....	592
21.4.3. Регистрация нескольких ионов.....	592
21.4.4. ^{17}O - и HD-коррекция.....	593
21.5. Оборудование для подготовки проб и интерфейсы.....	593
21.5.1. Изотопный масс-спектрометр непрерывного потока.....	593
21.5.2. Элементный анализатор (сжигание и высокотемпературная конверсия) — изотопный масс-спектрометр.....	595
21.5.3. ГХ/МСИО.....	595
21.5.4. ЖХ/МСИО.....	596
21.5.5. МСИО с многократными инъекциями через петлю.....	597
21.6. Некоторые приложения.....	597
21.6.1. Науки о Земле.....	597
21.6.2. Биология и экология.....	599
21.6.3. Археология и миграция людей.....	599
21.6.4. Контроль лекарств и наркотиков.....	601
21.6.5. Контроль допинга.....	601
21.6.6. Аутентичность продуктов питания и напитков.....	602
Литература.....	603

Дополнение 1. Основы и достижения масс-спектрометрии на основе орбитальной ловушки ионов. Краткий обзор.....	605
Как устроена Орбитальная ловушка ионов.....	605
Семейство серийных масс-спектрометров Orbitrap.....	608
Современные тенденции практического использования Orbitrap.....	609
Пищевая безопасность и объекты окружающей среды.....	610
Заключение.....	611

Дополнение 2. Высокпроизводительные хроматомасс-спектрометры Shimadzu UFMS: применение для анализа объектов окружающей среды, питьевой воды, пищевой и сельскохозяйственной продукции.....	613
Список литературы.....	630

Список авторов

Rosana M. Alberici

ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory
Institute of Chemistry
University of Campinas — UNICAMP
Campinas, São Paulo, Brazil

Aviv Amirav

School of Chemistry
Tel Aviv University
Tel Aviv, Israel

Konstantin A. Artemenko

Department of Physical and Analytical
Chemistry
Uppsala University
Uppsala, Sweden

Don Betowski

US Environmental Protection Agency
National Exposure Research Laboratory
Environmental Sciences Division
Las Vegas, Nevada, USA

Gérard Bondoux

Waters
Guyancourt, France

Ray Clement

Ontario Ministry of the Environment
Laboratory Services Branch
Toronto, Ontario, Canada

R. Graham Cooks

Department of Chemistry
Purdue University
West Lafayette, Indiana, USA

Marcos N. Eberlin

ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory
Institute of Chemistry
University of Campinas — UNICAMP
Campinas, São Paulo, Brazil

Alexander B. Fialkov

School of Chemistry
Tel Aviv University
Tel Aviv, Israel

Z. Gabelica

Universit  de Haute Alsace
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de
Mulhouse
Laboratoire Propre Int gr  — Groupe
S curit  et Ecologie Chimiques
Mulhouse, France

Melissa Goggin

Department of Medicinal Chemistry and
the Masonic Cancer Center
University of Minnesota
Minneapolis, Minnesota, USA

Alexander Gordin

School of Chemistry
Tel Aviv University
Tel Aviv, Israel

M. Harir

Department of BioGeoChemistry and
Analytics
German Research Center for
Environmental Health
Helmholtz Zentrum München
Neuherberg, Germany

F. Hernández

Research Institute for Pesticides and
Water
University Jaume I
Castellon, Spain

N. Hertkorn

Department of BioGeoChemistry and
Analytics
German Research Center for
Environmental Health

Helmholtz Zentrum München
Neuherberg, Germany

Andreas Hilkert

Thermo Fisher Scientific
Bremen, Germany

Klaus-Peter Hinz

Institute of Inorganic and Analytical
Chemistry
University of Giessen
Giessen, Germany

M. Ibáñez

Research Institute for Pesticides and
Water
University Jaume I
Castellon, Spain

Tammy L. Jones-Lepp

US Environmental Protection Agency
Las Vegas, Nevada, USA

Jean-Marc Joumier

Waters
Guyancourt, France

Alexey Leykin

Intertech Corporation
Moscow Office
Moscow, Russia

Vladislav V. Lobodin

National High Magnetic Field Laboratory
Florida State University
Tallahassee, Florida, USA

Simin D. Maleknia

School of Biological, Earth and
Environmental Sciences
University of New South Wales
Sydney, New South Wales, Australia

Alan G. Marshall

National High Magnetic Field Laboratory

Florida State University
Tallahassee, Florida, USA

Simon Nelms

Thermo Fisher Scientific
Hemel Hempstead, UK

Robert J. Noll

Department of Chemistry
Purdue University
West Lafayette, Indiana, USA

Zheng Ouyang

Weldon School of Biomedical
Engineering
Purdue University
West Lafayette, Indiana, USA

T. Portolés

Research Institute for Pesticides and
Water
University Jaume I
Castellon, Spain

Eric J. Reiner

Ontario Ministry of the Environment
Laboratory Services Branch
Toronto, Ontario, Canada

Susan D. Richardson

US Environmental Protection Agency
National Exposure Research Laboratory
Athens, Georgia, USA

Ryan P. Rodgers

National High Magnetic Field Laboratory
Florida State University
Tallahassee, Florida, USA

Ph. Schmitt-Kopplin

Department of BioGeoChemistry and
Analytics
German Research Center for
Environmental Health
Helmholtz Zentrum München

Neuherberg, Germany
and
Department for Chemical–Technical
Analysis Research
Technische Universität München
Freising-Weihenstephan, Germany

Gautam Sharma

Department of Chemistry and School of
Electrical and Computer Engineering
Purdue University
West Lafayette, Indiana, USA

Rosineide C. Simas

ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory
Institute of Chemistry
University of Campinas – UNICAMP
Campinas, São Paulo, Brazil

O. David Sparkman

Department of Chemistry
Mass Spectrometry Facility
University of the Pacific
Stockton, California, USA

Bernhard Spengler

Institute of Inorganic and Analytical
Chemistry
Justus Liebig University of Giessen
Giessen, Germany

Zoltán Takáts

Institute of Inorganic and Analytical
Chemistry
Justus Liebig University
Giessen, Germany

Anzhelika Talibova

Textronica AG/MS-ANALYTICA
Russia, Moscow

Michael Tokarev

Textronica AG/MS-ANALYTICA
Russia, Moscow

Natalia Tretyakova

Department of Medicinal Chemistry and
the Masonic Cancer Center
University of Minnesota
Minneapolis, Minnesota, USA

D. Tziotis

Department of BioGeoChemistry and
Analytics
German Research Center for
Environmental Health
Helmholtz Zentrum München
Neuherberg, Germany

Список переводчиков

- Глава 1 — авторский перевод А. Т. Лебедева
Глава 2 — авторский перевод А. Т. Лебедева
Глава 3 — перевод П. В. Метальникова
Глава 4 — перевод П. В. Метальникова
Глава 5 — перевод А. С. Самохина
Глава 6 — авторский перевод А. Т. Лебедева и К. А. Артеменко
Глава 7 — перевод Е. А. Чернецовой
Глава 8 — перевод С. А. Ильченко
Глава 9 — перевод П. В. Метальникова
Глава 10 — авторский перевод А. Ю. Лейкина
Глава 11 — перевод Е. В. Московца
Глава 12 — перевод А. Т. Лебедева
Глава 13 — перевод А. Т. Лебедева
Глава 14 — перевод А. Т. Лебедева
Глава 15 — перевод Е. С. Бродского
Глава 16 — перевод Е. В. Московца
Глава 17 — перевод Е. В. Московца
Глава 18 — авторский перевод В. В. Лободина
Глава 19 — перевод А. И. Константинова
Глава 20 — перевод Е. В. Московца
Глава 21 — перевод П. В. Метальникова

Редактирование — А. Т. Лебедев

Предисловие к русскому изданию

Современная масс-спектрометрия является наиболее чувствительным, информативным и надежным методом идентификации и количественного определения экотоксикантов любого типа в образцах объектов окружающей среды любой сложности. Возможности работать с самыми разными аналитами (от химических элементов до сложнейших биомолекул) в сложнейших матрицах без предварительного разделения, действительно, ставят масс-спектрометрию в приоритетное положение по сравнению с любыми другими методами анализа. Еще одним преимуществом масс-спектрометрии является возможность получения информации о сотнях и тысячах аналитов в процессе единичного анализа одной пробы. При этом результаты масс-спектрометрических исследований позволяют делать выводы, которые подготавливают административные решения, влияющие на здоровье населения и экосистем в целом.

Бурное развитие метода в начале XXI века привело к созданию новых приборов, новых методов ионизации образцов. Появилась возможность работать с минимальной пробоподготовкой или вовсе без пробоподготовки. Популярным направлением стала масс-спектрометрия в нормальных условиях, активные работы ведутся по миниатюризации масс-спектрометров. Появление простых и чувствительных портативных масс-спектрометров, работающих при нормальных условиях, станет прорывом в аналитической химии. При снижении стоимости таких масс-спектрометров они могут стать бытовыми приборами.

Данная книга предназначена, в первую очередь, для людей, работающих в смежных дисциплинах (экология, геология, биология, гидрология, медицина и т. д.). Она состоит из 21 главы, написанной ведущими масс-спектрометристами из 12 стран мира, которые постарались в простой форме рассказать о достижениях и потенциальных возможностях метода для решения самых разнообразных экологических проблем. Хотя диапазон возможностей современной масс-спектрометрии необычайно широк, многие из них остаются неизвестными непрофессионалам. Поэтому основная цель — продемонстрировать, что самые разные научные задачи, стоящие перед учеными разных специальностей, могут быть решены масс-спектрометрически.

Оригинальное издание вышло на английском языке. Русскоязычное издание, на мой взгляд, еще более актуально, поскольку в России и в странах бывшего СССР пропаганда возможностей масс-спектрометрии крайне необходима. Хотя Всероссийское масс-спектрометрическое общество (www.vmsso.ru) проводит регулярные конференции, школы, издает журнал, выпустило несколько книг, дополнительная литература, особенно учебно-научная, очень нужна русскоязычному научному сообществу.

Я надеюсь, читатели (студенты, аспиранты, научные сотрудники) найдут в этом издании много интересной и полезной информации, а масс-спектрометрия станет для них неотъемлемым методом исследований.

А. Т. Лебедев

*Если проблему нельзя решить с помощью масс-спектрометрии,
возможно, ее и не надо решать.*

Фред МакЛафферти

Красота спасет мир.

Федор Достоевский

Введение

Делая в последнее время доклады по разным аспектам масс-спектрометрии на конференциях химиков, биологов, токсикологов, экологов, медиков в самых разных странах, я обнаружил, что большинство исследователей не представляют уникальных возможностей этого метода даже в плане решения своих научных задач. Читая лекции аспирантам МГУ имени М. В. Ломоносова, я также обратил внимание, что молодые ученые относятся к масс-спектрометрии как к весьма сложному аналитическому методу, предпочитая использовать для решения задач альтернативные подходы: ЯМР, ИК-, УФ-спектроскопию. Так родилась идея написания этой книги, поскольку эффективность, надежность, простота и широта применимости современной масс-спектрометрии поистине впечатляющи. Помимо классических наук (физика, химия, биология) масс-спектрометрия чрезвычайно успешно используется в медицине, космических исследованиях, археологии, антропологии, антитеррористической деятельности, экспертизе предметов искусства, экологии, допинг-контроле, метрологии, ядерной физике и т. д. Благодаря масс-спектрометрии недавно родились новые дисциплины: петролеомика, гуминомика, метабономика, протеомика. Фактически трудно назвать раздел науки, в которой нельзя было бы эффективно применить масс-спектрометрию.

Современная масс-спектрометрия — наиболее чувствительный, быстрый и информативный аналитический метод. Ей доступны любые аналиты: от химических элементов до сложнейших биологических молекул (белки, сахара, нуклеиновые кислоты). Качественный и количественный анализ индивидуальных компонентов сверхсложных смесей, состоящих из многих тысяч ингредиентов, может осуществляться быстро и без какого-либо предварительного разделения. Вы можете отобрать пробу воды из реки, лужи, бутылки и в течение пары часов проверить наличие в ней сотен индивидуальных веществ. Любое значимое с точки зрения экологии соединение может быть надежно определено масс-спектрометрически. Если вы не нашли соответствующей готовой методики в литературе, это означает лишь то, что это соединение до этих пор не интересовало масс-спектрометристов.

Масс-спектрометрия обладает непревзойденной чувствительностью. Метод оперирует фемто-, зепто- (10^{-15} — 10^{-21}) молярными уровнями аналитов в образце. Если принять во внимание число Авогадро ($6,022 \cdot 10^{23}$), становится понятно, что масс-спектрометрия приближается к абсолютному теоретическому пределу анализа. Классические, не разгадываемые без волшебства задачи уровня нахождения ржаного зернышка в мешке пшеницы или иголки в стоге сена могут быть легко решены с помощью

масс-спектрометрии. На самом деле, когда речь идет о возможности детектирования соединения на уровне 10^{-18} , это значительно «круче», чем обнаружение одной-единственной иголки в миллионе стогов сена.

Разнообразие типов масс-спектрометров очень велико. Различные задачи реализуются с помощью разных детекторов, источников ионов и методов ионизации. В частности, различие в размерах может быть прекрасно проиллюстрировано рис. 1а,б. Масс-спектрометр Mini 11.5 — хороший представитель переносных приборов (рис. 1б), а KATRIN (рис. 1а) — самый большой на сегодняшний день прибор, созданный для проведения сверхтонких измерений масс, например измерения массы нейтрино (Kluge, 2010).



Рис. 1. а — Транспортирование масс-спектрометра через деревню Леопольдсхафен в исследовательский центр Карлсруэ (с разрешения EJMS); б — Грэм Кукс выполняет измерения с помощью портативного масс-спектрометра Mini 11.5. (Фото Jon Dagleish)



Теория метода достаточно проста, также как и его основные применения. Фактически уже выпускник школы может регистрировать спектры и работать с ними, особенно когда речь идет о серийных образцах или поиске целевых аналитов.

Основная идея данной книги — рассказать о возможностях масс-спектрометрии в решении экологических и родственных задач с демонстрацией того, как элегантно могут быть разрешены весьма сложные вопросы. Книга дает ключ к возможному решению проблем, стоящих перед биологом, геологом, врачом, экологом, химиком, нефтехимиком, криминалистом и т.д. Студенты, как, впрочем, и профессиональные масс-спектрометристы, также найдут в ней достаточно много весьма полезных сведений, которые расширят их горизонты в этой области, поскольку целый ряд современных методов (петролеомика, имиджинг, изотопная и атмосферная масс-спектрометрия) описаны простыми словами в форме лекции для начинающих. Широкий круг реальных примеров решенных задач красиво подкрепляет теорию различных методов исследования.

Зачастую результат эксперимента может быть удивительным и неочевидным для непосвященных. Например, измерив соотношение природных изотопов углерода, кислорода и азота в образце, можно установить район производства наркотиков, виновника разлива нефти, подлинность напитка или даже различить по остаткам костей древних европейцев и американцев.

Помимо указанных превосходных технических характеристик масс-спектрометрия — это очень красивый метод. Я надеюсь, читатели смогут разделить со мной это чувство, ознакомившись с богатым иллюстративным материалом книги, демонстрирующим результаты реальных исследований. Именно поэтому я использовал цитату из «Идиота» Ф. М. Достоевского в качестве одного из эпиграфов к книге. Второй эпиграф — высказывание «отца-основателя» органической масс-спектрометрии Фреда МакЛафферти. Безусловно, будучи шутивным, оно, тем не менее, прекрасно отражает возможности метода и диапазон его применимости.

Каждая из 21 главы повествует об отдельном направлении масс-спектрометрии объектов окружающей среды. Главы 1—5 посвящены основам масс-спектрометрии. Они раскрывают наиболее распространенные общие приемы. Материал этих глав позволит легче схватывать идеи последующих разделов книги.

Основные принципы масс-спектрометрии коротко изложены в главе 1. Это форма представления масс-спектров, системы ввода, анализаторы масс и методы ионизации, играющие основную роль в экологической масс-спектрометрии.

Газовая хроматография/масс-спектрометрия (ГХ/МС) остается на сегодняшний день наиболее эффективным методом качественного и количественного определения наиболее распространенных загрязняющих веществ: фенолов, полициклических ароматических углеводородов, полихлорированных бифенилов, дибензодиоксинов и дибензофуранов и т. д. Важнейшие аспекты этого комбинированного метода представлены в главе 2.

С момента успешной стыковки масс-спектрометра с жидкостным хроматографом метод ЖХ/МС становится все более и более востребованным, поскольку огромное число полярных и термолабильных соединений вошли в рабочий диапазон масс-спектрометрии. Глава 3 повествует об основных деталях, особенностях и преимуществах метода ЖХ/МС.

Курс на повышение чувствительности и надежности анализов привел ко все более частому приложению тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) к проблемам окружающей среды. Ранее этот метод использовался в основном в фундаментальных исследованиях. Экологические приложения тандемной масс-спектрометрии рассмотрены в главе 4. Этот метод надежнее, чем обычная масс-спектрометрия. Кроме того, он позволяет создавать различные автоматизированные программы для эффективного качественного и количественного определения сотен экотоксикантов и(или) биомаркеров за один ввод пробы. Метод МС/МС незаменим, когда речь идет об установлении структуры соединений в нецелевых анализах.

Поскольку за регистрацией всегда следует какая-либо процедура обработки масс-спектра, эта часть эксперимента имеет особое значение. Сейчас в большинстве случаев работы с экотоксикантами нет необходимости проводить установление структуры аналита вручную. Представительные базы данных и постоянно совершенствующееся программное обеспечение — неотъемлемая часть современных масс-спектрометров. Именно таким базам данных и компьютерным программам посвящена глава 5.

Следующий блок (главы 6—9) представляет инновации XXI века. Усовершенствованные ГХ/МС-методы: ГХ/ГХ/МС и быстрая ГХ/МС (глава 6) расширили возможности метода. Первый из них делает возможным получение информации о тысячах индивидуальных компонентов сложнейших смесей за однократный ввод пробы, второй позволяет сократить время анализа в 5—10 раз. Недавно внедренный интерфейс сверхзвуковых молекулярных пучков продемонстрировал новые впечатляющие возможности классического метода электронной ионизации и позволил расширить круг соединений, которые можно эффективно анализировать ГХ/МС.

Долгие годы основным недостатком масс-спектрометрии считалась необходимость пробоподготовки, зачастую весьма трудоемкой. Начало XXI века ознаменовалось революционными подвижками в преодолении этой трудности. Сегодня предложены более 40 масс-спектрометрических методов с ионизацией в нормальных (природных) условиях с применением плазмы или распыления. Глава 7 посвящена наиболее эффективным среди них: ДЭРИ, ПАРВ, EASY, ЭЭРИ и т. д. Во многих случаях процедура пробоподготовки может быть полностью устранена.

Исторически первый метод ионизации в нормальных условиях был назван десорбционной электрораспылительной ионизацией (ДЭРИ, DESI). Он уникален по скорости, кругу анализируемых молекул и области применения, включая, например, онлайн-детектирование биомаркеров во время хирургических операций. Глава 8 посвящена возможностям этой замечательной техники.

Другим недостатком масс-спектрометрии прошлых лет был размер приборов. Сейчас производится много мощных и надежных настольных масс-спектрометров. Тем не менее борьба за сокращение размеров не прекращается. Например, размер играет едва ли не ключевую роль в создании приборов для размещения на космических кораблях. В последние годы созданы портативные приборы (до нескольких килограммов), способные решать весьма сложные задачи. Один из авторов главы 9, посвященной миниатюризации, Грэм Кукс отметил в своей лекции на недавней международной масс-спектрометрической конференции в Бремене (Cooks *et al.*, 2010), что будет правильно, если в недалеком будущем обычный человек сможет использовать масс-спектрометр



для замеров на «кухне», например для проверки качества пищевых продуктов, простых экологических тестов или контроля здоровья.

С главы 10 начинается блок, посвященный наиболее значимым типам загрязнений окружающей среды. Метод индуктивно связанной плазмы с масс-спектрометрическим детектированием (ИСП МС) является наиболее быстрым и информативным для качественного и количественного определения химических элементов в пробах. Менее минуты достаточно для того, чтобы получить надежную информацию о наличии и уровнях большинства химических элементов таблицы Д. И. Менделеева. Поскольку диапазон линейности метода достигает 12 порядков, за один ввод пробы можно получить информацию и о макроэлементах, и об элементах, присутствующих в ультраследовых количествах. Этому замечательному методу посвящена глава 10.

Достаточно большая группа химических соединений в объектах окружающей среды объединяется термином «летучие». Это связано исключительно с низкой величиной давления их паров. В эту группу входят самые разнообразные органические вещества. Опасность соединений этой группы для человека и экосистемы в целом лежит в широком диапазоне, а их присутствие должно контролироваться в атмосфере, воде, других образцах и продуктах. Масс-спектрометрическому анализу таких соединений, которые можно разделить на антропогенные и биогенные, посвящена глава 11.

Побочные продукты дезинфекции, возникающие при подготовке питьевой воды, а также при эксплуатации плавательных бассейнов и утилизации отходов, представляют собой серьезную экологическую проблему, нанося существенный вред здоровью человека. Не существует лучшего метода качественного и количественного определения этих соединений, чем масс-спектрометрия. Об этом повествуется в главе 12.

Глава 13 посвящена опасным современным экотоксикантам: фармацевтическим препаратам, наночастицам, металлоорганическим соединениям. Набор этих ксенобиотиков неуклонно возрастает год от года с появлением новых продуктов, часто не самых экологичных. И вновь следует сказать, что для их детектирования не существует более эффективного метода, чем масс-спектрометрия.

Пестициды всегда считались приоритетными загрязняющими веществами. Различные варианты ГХ/МС или ЖХ/МС показали свою эффективность в определении этих экотоксикантов в объектах окружающей среды. Тем не менее в связи с широчайшим разнообразием структур и наличием очень жестких требований по чувствительности и надежности определение пестицидов продвинутыми хроматомасс-спектрометрическими методами представлено в главе 14.

Масс-спектрометрия является единственным аналитическим методом, способным надежно определять суперэкотоксиканты: полихлорированные дибензодиоксины и дибензофураны. Благодаря своей высочайшей токсичности и стабильности эти ксенобиотики должны контролироваться на постоянной основе. Более 30 лет им уделяется особое внимание. Ежегодный представительный научный форум посвящен исключительно этим соединениям. Детали масс-спектрометрического определения этих веществ представлены в главе 15.

Загрязнение атмосферы является важным аспектом химии окружающей среды. Глава 16 названа «Масс-спектрометрия атмосферных аэрозолей». Уникальные результаты, включая анализ единичных частиц, наглядно демонстрируют преимущество масс-спектрометрии перед другими аналитическими методами в подобных анализах.

Что происходит, когда загрязняющее вещество попадает в организм человека? Возможность масс-спектрометрического изучения взаимодействия экотоксикантов с ДНК является предметом главы 17. Чрезвычайная сложность задачи требует высочайшей чувствительности метода и возможности работать как с целевыми, так и нецелевыми аддуктами ксенобиотиков с биомолекулами.

В четырех последних главах рассматриваются масс-спектрометрические подходы, которые привели к созданию новых направлений научных исследований. В частности, появилась возможность прямого анализа состава самых сложных смесей природных соединений. Сверхвысокая разрешающая способность масс-спектрометрии с преобразованием Фурье позволяет идентифицировать и оценить уровни тысяч индивидуальных родственных природных соединений без какого-либо предварительного разделения. Главы 18 и 19 знакомят читателя с новейшими дисциплинами: петролеомикой и гуминомикой.

Масс-спектрометрия изображений (имиджинг) — еще одно уникальное научное направление, возникшее в самом конце XX века. Этот удивительный метод позволяет детектировать и картировать распределение тысяч самых разнообразных соединений в органах и тканях животных и растений, в минералах, овощах и фруктах, произведениях искусства. Стало возможным устанавливать распределение экотоксиканта, лекарственного препарата или его метаболитов в целом организме лабораторного животного или определять, какие белки и где конкретно генерируются организмом в качестве отклика на проникновение чужеродного вещества в организм. Эти аспекты рассматриваются в главе 20.

Глава 21 посвящена изотопной масс-спектрометрии — красивому методу, базирующемуся на существовании природных изотопов химических элементов. Соотношение этих изотопов зависит от происхождения образца. Измерив отношения D/H или $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, можно делать выводы о подлинности произведений искусства, определять, на каком заводе синтезировано данное вещество, устанавливать, природным или синтетическим является полезный ингредиент (аскорбиновая или лимонная кислота) в соках и напитках. Этот мощный метод полезен в криминалистике (анализ наркотиков) и в допинг-контроле (различие между эндогенными и синтетическими стероидами).

Таким образом, я надеюсь, что читатель не только обнаружит в этой книге много полезной для своей будущей работы информации, но и просто получит удовольствие, знакомясь с фантастическими возможностями современной экологической масс-спектрометрии.

Литература

- [1]. Cooks R. G., Ifa D. R., Sharma G., Tadjimukhamedov F. Kh., Ouyang Zh. (2010). «Perspectives and retrospectives in mass spectrometry: one view». *European Journal of Mass Spectrometry*, 16, 3: 283—300.
- [2]. Kluge H.-Jurgen (2010). «High accuracy mass spectrometry for fundamental studies». *European Journal of Mass Spectrometry*, 16, 3: 269—282

ГЛАВА I

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Альберт Лебедев

I.1. Базовые аспекты

Для того чтобы получить масс-спектр, необходимо ввести образец в ионный источник масс-спектрометра, ионизировать молекулы (получить положительные или отрицательные ионы), разделить эти ионы по величинам m/z (отношение их массы к заряду) и установить число ионов с каждым m/z . Компьютер управляет всеми процессами и проводит обработку данных. Принципиальная схема масс-спектрометра представлена на рис. 1.1. Дополнительные узлы могут добавляться для решения более сложных задач.

Таким образом, масс-спектрометрия является аналитическим методом, оперирующим заряженными атомами и молекулами химических соединений. Принципиальным моментом является ионизация молекул образца или перевод ионов, уже имеющих в растворе или в твердой матрице, в газовую фазу. Отношение массы к заряду (m/z) ионов может быть точно измерено, что позволяет установить молекулярные массы ингредиентов образца. Можно также инициировать фрагментацию исходных молекулярных ионов с получением набора фрагментных ионов. Эти ионы представляют собой наиболее стабильные фрагменты исходной молекулы и позволяют делать выводы о ее структуре. Интенсивности и величины m/z молекулярного и фрагментных ионов на графике по осям y и x соответственно называются масс-спектром. Обычно график нормализуется на 100% по наиболее интенсивному пику в спектре. Масс-спектр — уникальная характеристика химического вещества. Для работы с масс-спектром необходимы только атомные массы химических элементов, точнее природных изотопов этих элементов. Поскольку атомные и молекулярные массы — простые и широко используемые характеристики, масс-спектры значительно проще для интерпретации, чем ЯМР, ИК, УФ, ЭПР и другие типы спектров.



Рис. 1.1. Принципиальная схема масс-спектрометра

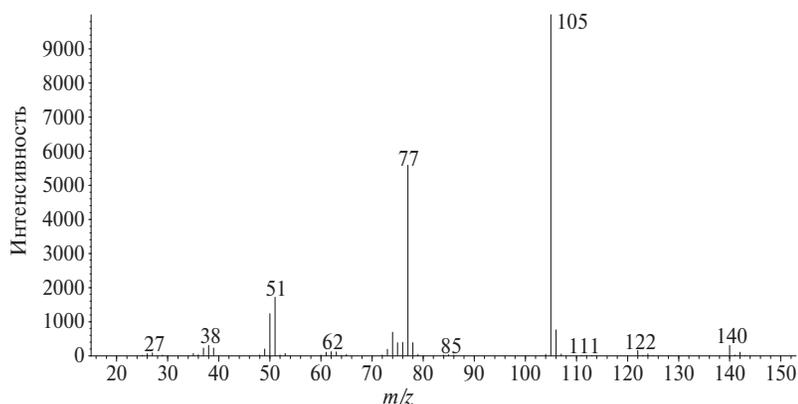


Рис. 1.2. Спектр электронной ионизации бензоилхлорида (NIST 27422)

Существуют определенные правила, определяющие направления фрагментации химических соединений в масс-спектрометре. Поэтому на основе масс-спектра можно установить молекулярную массу, элементный состав, присутствие определенных функциональных групп, а зачастую и полную структуру аналита. Во многих случаях уже новичок может успешно решать задачи даже без использования спектральных баз данных и специального программного обеспечения.

Спектр электронной ионизации бензоилхлорида в классической графической форме представлен на рис. 1.2. Абсцисса соответствует массам ионов (точнее величинам m/z), а ордината — относительным интенсивностям пиков этих ионов. Для новичка проще принимать во внимание только наиболее интенсивные пики в спектре. Менее интенсивные пики, следующие сразу за интенсивными, обусловлены наличием в составе молекул образца природных стабильных изотопов. Они играют важную роль при установлении структуры и далее будут обсуждаться подробнее.

Пик иона с самой большой массой соответствует молекулярному иону аналита. В спектре на рис. 1.2 — это 140. Следует также обратить внимание на ион с m/z 142, интенсивность пика которого составляет 1/3 от интенсивности пика иона с m/z 140. Эти два пика обусловлены существованием двух природных изотопов хлора: ^{35}Cl и ^{37}Cl . Их природное соотношение $\sim 3:1$. Первичный фрагментный ион с m/z 105 образуется при потере 35 единиц массы из молекулярного иона с m/z 140 или 37 единиц мас-

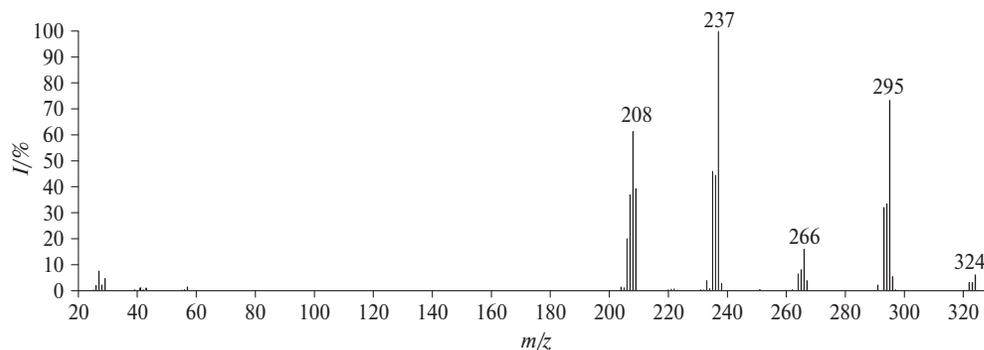


Рис. 1.3. Спектр электронной ионизации тетраэтилсвинца (NIST 45993)

сы из изотопного иона с m/z 142. Оба выброса обусловлены атомами хлора (^{35}Cl и ^{37}Cl). Первичный ион с m/z 105 теряет молекулу CO с образованием вторичного фрагментного иона (m/z 77), который, однако, может образоваться и напрямую из молекулярного иона при разрыве связи $\text{C}-\text{C}$. Даже человек с минимальным опытом работы по расшифровке масс-спектров знает, что ион с m/z 77 может считаться визитной карточкой фенильной группы (C_6H_5^+). Это стабильный в газовой фазе ион, который указывает на ароматическую природу аналита. Продукт следующей стадии фрагментации, ион с m/z 51, образуется при отщеплении из фенил-катиона молекулы ацетилена (C_2H_2). Измерение точной массы (см. ниже) может надежно подтвердить сделанные выводы, поскольку дает возможность установить элементный состав всех упомянутых выше ионов.

Существование природных изотопов химических элементов облегчает установление структуры и позволяет определить элементный состав анализируемого соединения по его масс-спектру. На рис. 1.3 представлен хороший пример простоты и информативности масс-спектра, демонстрирующий важность учета изотопных пиков. Три основных природных изотопа свинца имеют атомные массы 206, 207 и 208 единиц с распространенностью 25,15 %, 21,11 % и 52,38 % (грубо 1 : 1 : 2) соответственно. Тетраэтилсвинец — топливная добавка. Будучи хорошо известным экотоксикантом, он запрещен в на-

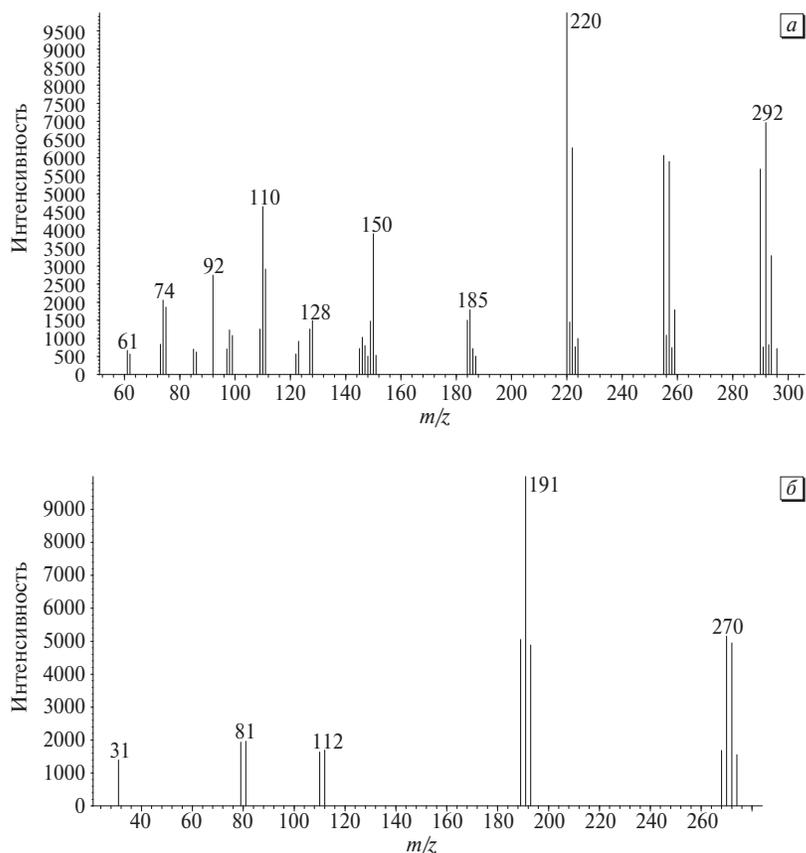


Рис. 1.4. Масс-спектры электронной ионизации тетраэтилсвинца NIST 169679 (верх) и триэтилфосфина NIST 150824 (низ)

стоящее время в подавляющем большинстве стран. В области высоких масс, начиная с m/z 324, в спектре отчетливо видны 5 триплетов (иногда искаженные) с соотношением интенсивностей 1:1:2 и отстоящих друг от друга на 29 единиц массы. Эти группы ионов обусловлены последовательными выбросами четырех этильных групп из молекулярного иона $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$. Детали работы с изотопными пиками представлены в (Lebedev, 2009; Лебедев, 2003).

Хлор и бром часто присутствуют в молекулах приоритетных загрязняющих веществ (пестициды, фармацевтические препараты, побочные продукты дезинфекции, антипирены). Благодаря уникальному соотношению природных изотопов ($^{35}\text{Cl}:^{37}\text{Cl} \sim 3:1$; $^{79}\text{Br}:^{81}\text{Br} \sim 1:1$) присутствие этих элементов в анализируемых образцах может быть моментально установлено по масс-спектру. Для этого надо обращать внимание на мультиплеты, пики в которых отстоят друг от друга на две единицы массы. Число атомов этих элементов в молекуле также однозначно определяется по изотопной картинке. Так, два атома хлора в молекуле дадут изотопный кластер (триплет) с относительными интенсивностями $(3:1)^2 = 9:6:1$; три атома — $(3:1)^3 = 27:27:9:1$ и т.д. Вид мультиплетов ионов в зависимости от числа атомов хлора и брома в молекуле представлен на рис. 12.9 в главе 12. Примеры масс-спектров экологически важных тетрахлорбифенила и трибромфосфина представлены на рис. 1.4. Последовательные выбросы атомов хлора и брома с образованием характеристических изотопных кластеров ионов позволяют легко идентифицировать эти токсиканты. Спектр трибромфосфина особенно прост, поскольку последовательное элиминирование трех атомов брома приводит к иону атомарного фосфора с m/z 31. При этом дублет с m/z 79 и 81 определяется двумя стабильными изотопами брома.

1.2. Ввод образца

Любой масс-спектрометрический эксперимент начинается с ввода образца в прибор. На этой стадии наиболее серьезная проблема связана с тем, что большинство приборов функционирует в условиях глубокого вакуума (10^{-5} – 10^{-6} торр). Существует несколько подходов: прямой ввод, ввод через полупроницаемую мембрану, интерфейсы с многочисленными хроматографами (ГХ, ВЭЖХ, СКФХ, КЭ) и даже самостоятельное натекание молекул или ионов из атмосферы в прибор, работающий в условиях пониженного давления. Последний вариант будет детально рассматриваться в последующих главах, посвященных миниатюризации и современным методам анализа без пробоподготовки (главы 7–9).

В случае прямого ввода жидкий или твердый образец направляется в ионный источник через вакуумный шлюз. Поскольку обычное давление в источнике 10^{-5} – 10^{-6} мм рт. ст., а образец может быть нагрет до 400°C и более, значительное число органических соединений может быть переведено в газовую фазу и проанализировано. Однако, если образец представляет собой смесь соединений с близкими летучестями, зарегистрированный масс-спектр будет представлять собой суперпозицию спектров компонентов. Этот факт может существенно усложнить процесс идентификации, причем как компьютеризованный, так и производимый вручную.

Полупроницаемые мембраны могут с успехом применяться в экологическом мониторинге. Например, пусть вода протекает по трубке из полимерного материала.

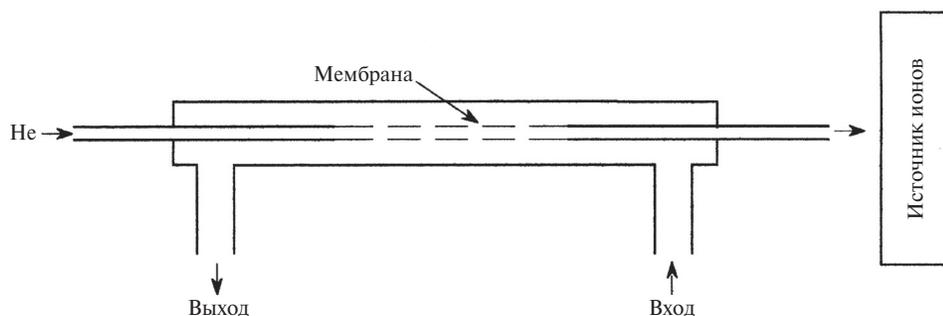


Рис. 1.5. Вариант мембранного ввода с положением мембраны вне источника ионов

При этом липофильные соединения могут адсорбироваться на поверхности такого материала, просачиваясь через тонкие стенки. С наружной стороны они попадают в поток инертного газа, доставляющего их непосредственно в ионный источник, где и происходит их детектирование. Подобные устройства успешно используются в онлайн-режиме для определения конкретных соединений в реках, промышленных сбросах и т. д. (глава 9). Аналогичные системы используются для детектирования целевых соединений в биологических жидкостях. К сожалению, метод не универсален и должен несколько модифицироваться для каждого нового анализата. Вариант мембранного ввода представлен на рис. 1.5.

Наиболее популярными являются системы ввода в виде различных интерфейсов между блоком разделения (хроматографы) и масс-спектрометром. Несколько глав (2, 3, 6) посвящены подробному изложению вариантов такого комбинированного метода — хроматомасс-спектрометрии.

1.3. Ионизация

Масс-спектрометрия регистрирует исключительно заряженные частицы. Ни молекулы, ни радикалы не могут быть исследованы в своей исходной нейтральной форме. Следовательно, молекулы образца должны быть ионизированы. Альтернативно ионы целевого вещества, уже существующие в конденсированной фазе, могут быть каким-либо образом переведены в газовую фазу. За столетнюю историю масс-спектрометрии описано несколько десятков методов ионизации, причем следует отметить, что значительное число новых атмосферных методов были предложены совсем недавно, уже в XXI веке. Частота использования того или иного метода с годами изменяется. Одни из них продолжают играть важную роль в современных исследованиях, другие уже прошли свой «золотой период» и заменены более эффективными.

Все существующие методы могут быть грубо разделены на две группы: «мягкие» и «жесткие». Это разделение основано на величине избытка внутренней энергии в образующемся молекулярном ионе. Если эта величина мала, фрагментация незначительна и ион регистрируется как молекулярный. Такой процесс называется «мягкой ионизацией». Определенный избыток внутренней энергии запускает процесс разрыва конкретных химических связей в исходном молекулярном ионе, приводя к появлению различных фрагментных ионов. Иногда молекулярный ион вообще не удается зареги-

стрировать. Подобный процесс называется «жесткой» ионизацией. Оба варианта полезны. Первый дает информацию о молекулярной массе соединения и его элементном составе (масс-спектрометрия высокого разрешения), второй позволяет получить структурную информацию благодаря массам фрагментных ионов.

В этой главе будут рассмотрены только наиболее значимые для экологической масс-спектрометрии методы ионизации. Несколько новых методов описаны в главах 7 и 8. Для дополнительной информации может быть рекомендована книга (*Westman-Brinkmalm and Brinkmalm, 2009*) и литература, процитированная в ней.

1.3.1. Электронная ионизация

Электронная ионизация (традиционно называвшаяся «электронным ударом»), предложенная Демпстером еще в 1921 году (*Dempster, 1921*), исторически была первым и до сих пор остается одним из наиболее востребованных методов ионизации. Она особенно важна для масс-спектрометрии образцов объектов окружающей среды. В процессе электронной ионизации (ИЭ) газообразные молекулы образца должны оказаться в ионном источнике, функционирующем в условиях высокого вакуума (10^{-5} – 10^{-6} мм рт. ст.). Испускаемые катодом электроны, пролетая через ионный источник к противоэлектроду, взаимодействуют с этими молекулами. В результате собственные электроны молекул переходят на более высокие орбитали или совсем покидают молекулу с образованием ионов. Процесс может быть представлен следующим уравнением:



Теряя электрон, молекула превращается в катион-радикал. Более 95% образующихся ионов однозарядные, хотя образуются двух- и даже многозарядные ионы. Их количество зависит от природы молекул образца. Стандартная энергия ионизирующих электронов — 70 эВ, что близко к максимуму сечения ионизации для большинства органических молекул. Внутренняя энергия образующихся молекулярных ионов лежит в диапазоне от 0 до 20 эВ, приводя к интенсивной фрагментации. В условиях высокого вакуума отсутствуют ионно-молекулярные взаимодействия, т.е. перераспределение энергии между частицами за счет их столкновений отсутствует. В результате образовавшиеся молекулярные ионы ведут себя далее исключительно в зависимости от приобретенной в процессе ионизации внутренней энергии. Определенный избыток этой энергии запускает соответствующий процесс фрагментации. Поскольку статистически в результате ионизации образуются миллиарды и триллионы молекулярных ионов с очень широким диапазоном внутренней энергии, активируются все возможные пути фрагментации. Поэтому спектры электронной ионизации предоставляют богатую структурную информацию и характеризуются высокой воспроизводимостью независимо от типа масс-спектрометра. Последняя особенность позволила создать и эффективно использовать библиотеки масс-спектров (глава 5).

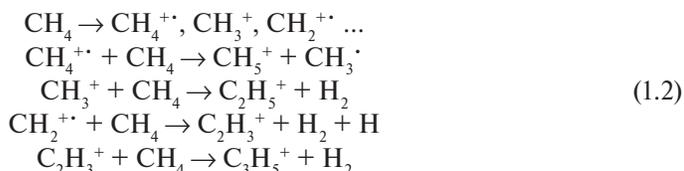
Электронная ионизация — это универсальный метод, позволяющий исследовать разные классы химических соединений. Однако у него есть существенный недостаток, связанный с необходимостью перевода молекул образца в газовую фазу. Именно поэтому метод непригоден для полярных, термолабильных и тяжелых молекул. Тем не менее электронная ионизация прекрасно справляется с анализом подавляющего большинства экологически значимых соединений в самых разных матрицах.

Хотя в процессе ионизации электронами образуются и отрицательные ионы, их выходы существенно ниже, что лимитирует использование этого режима на практике.

1.3.2. Химическая ионизация

В 1966 г. Мансон и Филд описали «мягкий» метод ионизации (*Munson and Field, 1966*), названный химической ионизацией (ХИ, chemical ionization, CI). Поскольку внутренняя энергия образующихся в результате ХИ ионов обычно ниже 5 эВ, фрагментация практически отсутствует. Иногда в спектре наблюдается исключительно пик молекулярного иона. Наиболее полное описание процессов ХИ можно найти в книге А. Гаррисона (*Harrison, 1992*).

Основное различие между ИЭ и ХИ связано со значительно более высоким давлением в источнике (~1 мм рт. ст.) во втором случае. Это давление достигается введением так называемого газа-реагента, в качестве которого можно использовать практически любое вещество (воду, аммиак, метан, бензол, гелий, этилендиамин и т. д.). Взаимодействие молекул газа-реагента с электронами высокой энергии (200—500 эВ) приводит к ионизации. Благодаря высокому давлению образующиеся молекулярные ионы взаимодействуют с нейтральными молекулами. В результате самых разнообразных ионно-молекулярных реакций создается газовая плазма, существующая в динамическом равновесии. Наиболее распространенные и реакционноспособные ионы в этой плазме называются ионами-реагентами. Это могут быть молекулярные, фрагментные ионы или ионы — продукты реакций исходных молекул газа-реагента. Уравнения (1.2) дают представление о некоторых основных процессах в случае химической ионизации метаном. Два иона (CH_5^+ — 44% и C_2H_5^+ — 30%) являются доминирующими ионами-реагентами в образующейся плазме.



Когда молекула образца вводится в ионный источник, она взаимодействует с ионами-реагентами. Возможны несколько типов реакций. Наиболее значимым является протонирование (перенос протона). Если сродство к протону у аналита М выше, чем у газа-реагента В (например метана в случае CH_5^+), протекает следующая реакция:



Необходимо подчеркнуть два момента. Во-первых, протонирование приводит к возникновению четноэлектронных катионов (протонированных молекул), которые значительно стабильнее катион-радикалов, образующихся в условиях ионизации электронами. Во-вторых, избыток внутренней энергии МН^+ может быть легко вычислен по уравнению

$$\text{E} = \text{СП}(\text{M}) - \text{СП}(\text{B}),
 \tag{1.4},$$

где СП — сродство к протону М и В соответственно.

Таким образом могут быть генерированы протонированные молекулы аналита с известной внутренней энергией.

Помимо протонирования возможны три других важных процесса ионизации.

Перенос заряда. Если молекула газа-реагента не имеет водородных атомов (например He), образуются катион-радикалы $M^{+\cdot}$ аналита.



В отличие от ИЭ их внутренняя энергия может быть легко рассчитана на основе значений энергии ионизации (ЭИ) аналита и энергии рекомбинации (ЭР) газа-реагента.

$$E = \text{ЭР}(X^{\cdot+}) - \text{ЭИ}(M) \quad (1.6)$$

Электрофильное присоединение. Если сродство к протону молекулы аналита недостаточно велико, она может сформировать с ионом-реагентом стабильный комплекс.



Например, пики ионов $[M + \text{NH}_4]^+$ и $[M + \text{NO}]^+$ весьма интенсивны в условиях ХИ аммиаком и окисью азота соответственно.

Отрыв аниона. Такой процесс протекает при взаимодействии ионов-реагентов переноса протона с аналитами с низким СП.



Наиболее распространенный пример — это образование ионов $[M - \text{H}]^+$ в условиях химической ионизации алифатических углеводов метаном.

В отличие от ИЭ в условиях ХИ образование отрицательных ионов может быть весьма выраженным. Четыре основных процесса образования отрицательных ионов аналита во многом напоминают процессы образования положительных ионов: перенос протона (депротонирование), перенос заряда, нуклеофильное присоединение и нуклеофильное замещение (*Лебедев, 2003*).

Химическая ионизация отрицательных ионов (ХИОИ, negative ion chemical ionization, NICI) — это эффективный метод анализа соединений с высоким сродством к электрону. В этом случае выигрыш в чувствительности по сравнению с режимом положительных ионов может быть весьма существенным. Хорошим примером использования ХИОИ в экологических исследованиях является качественный и количественный анализ полихлорированных соединений (глава 15).

Недостатками химической ионизации являются необходимость перевода образца в газовую фазу, слабо выраженная фрагментация и быстрое загрязнение источника ионов. Тем не менее комбинация ХИ и ИЭ может быть очень успешной, поскольку первая дает возможность зарегистрировать молекулярный ион, а вторая предоставляет исчерпывающую структурную информацию.

1.3.3. Полевая ионизация

Еще одним популярным «мягким» методом является полевая ионизация (ПИ, field ionization, FI). Само явление было открыто Е. Мюллером в 1951 году. Он создал полевой ионный микроскоп, наблюдая за появлением катионов вблизи металлической поверхности в сильном электростатическом поле (*Muller, 1951*). Через несколько лет источ-

ник ПИ был использован в масс-спектрометре (*Inghram and Gomer, 1954*). Тем не менее успешное внедрение ПИ в систему ГХ/МС произошло только 20 лет спустя (*Beckey, 1969; Damico and Barron, 1971*). Метод основан на эффекте туннелирования электрона. Ионизация происходит, когда молекула образца в газовой фазе оказывается вблизи эмиттера, к которому приложен очень высокий потенциал (8–10 кВ). В качестве эмиттера обычно используются острые металлические поверхности (лезвие бритвы, острие иглы) или острые иголки, образующиеся при пиролизе бензонитрила. Кривизна поверхности приводит к очень высоким значениям плотности электрического поля (~1 В/А). В результате электрон молекулы аналита туннелирует с образованием катион-радикала практически без избытка внутренней энергии. Помимо того, этот катион не может долго находиться рядом с положительно заряженным эмиттером (8–10 кВ) и выталкивается из источника за 10^{-12} с, т. е. в 10^6 раз быстрее, чем в случае ЭИ. Фрагментация оказывается практически невозможной, а масс-спектр очень часто состоит исключительно из пика молекулярного иона.

Если образец наносится непосредственно на поверхность эмиттера при атмосферном давлении, а затем эмиттер вводится в ионный источник и на него подается напряжение, протекает аналогичный процесс ионизации, а метод называется полевой десорбцией (ПД, field desorption, FD). Этот метод был весьма популярен в 1970–1980-е гг., поскольку позволил впервые получить масс-спектры целого ряда нелетучих соединений. Механизм в этом случае связан с туннелированием электрона из твердофазного образца с последующей десорбцией с эмиттера образовавшегося иона.

Некоторое время назад казалось, что ПИ утратила свое значение, но недавно появившиеся приборы, способные попеременно снимать масс-спектры ЭИ и ПИ, вдохнули новую жизнь в этот метод. Самые разнообразные экотоксиканты могут быть надеж-

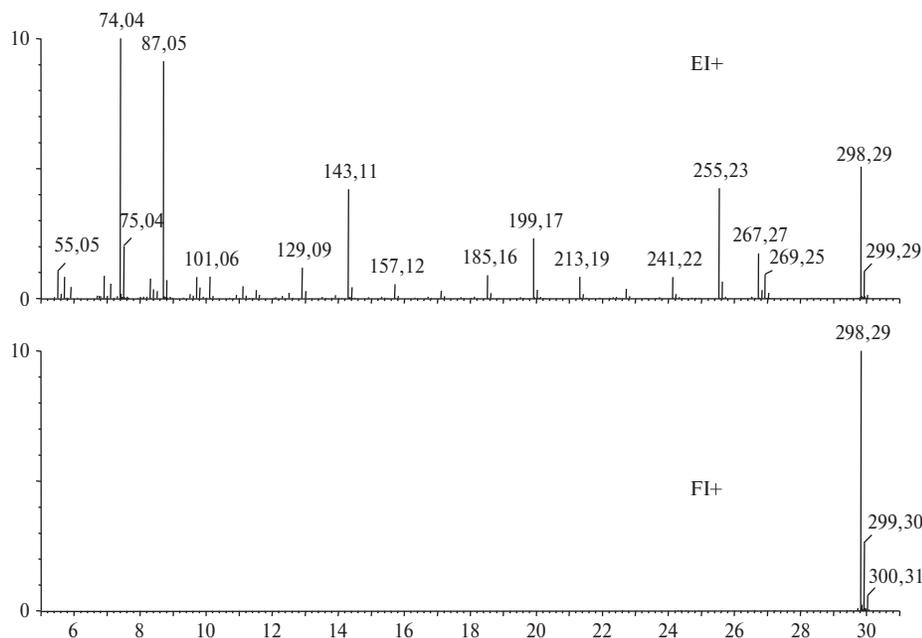


Рис. 1.6. Масс-спектры электронной ионизации (верх) и полевой ионизации (низ) метил-стеарата (с разрешения Waters Corp.)

но идентифицированы, когда их молекулярные ионы зарегистрированы в режиме ПИ, а структурная информация получена в режиме ЭИ (рис. 1.6).

Еще три метода ионизации могут быть отмечены как наиболее приемлемые для экологических исследований, связанных с определением полярных, термолабильных и тяжелых молекул, т. е. таких, для которых предпочтительным методом разделения является ЖХ (глава 3).

1.3.4. Ионизация электрораспылением

Ионизация электрораспылением, или электроспрей (ЭРИ, electrospray ionization, ESI), позволила совершить научный прорыв в область масс-спектрометрических исследований нелетучих, нестабильных молекул, высокомолекулярных соединений, включая природные полимеры (белки, сахара, нуклеиновые кислоты и т. д.). Основу для создания метода заложили теоретические работы Доула (*Dole et al., 1968*). За пионерской работой группы Л. Н. Галль (*Александров и др., 1984*) последовала публикация Дж. Фенна (*Yamashita and Fenn, 1984*), который в 2002 году получил за создание электрораспыления Нобелевскую премию.

Часто ионы аналита присутствуют уже в растворе, а если исходное полярное соединение нейтрально, оно может быть легко переведено в ионную форму добавкой к его раствору кислоты или основания. Для того чтобы использовать масс-спектрометрию для регистрации этих ионов, надо всего лишь избавиться от молекул растворителя. Для этой цели раствор аналита распыляется при атмосферном давлении в ионный источник прибора через тонкий капилляр (рис. 3.4 в главе 3), на который подается высокое напряжение (3–7 кВ). Ионы одинаковой полярности в образующихся капельках спрея стараются отойти друг от друга как можно дальше, распределяясь по поверхности сферической капли. Нагрев и поток инертного газа вызывают испарение растворителя непосредственно из капелек спрея. В какой-то момент силы поверхностного натяжения больше не могут компенсировать силы кулоновского расталкивания, вызывая микровзрыв с образованием таких же капелек меньшего размера. Этот процесс может повторяться многократно, приводя каждый раз к образованию капель меньшего размера. Предложено два основных механизма высвобождения ионов аналита. Первый (*Mora et al., 2000*) базируется на том, что свободные ионы аналита образуются исключительно благодаря последовательным микровзрывам, в результате которых исходные заряженные частицы мало-помалу теряют свою сольватную оболочку. Второй ставит во главу угла ионное испарение за счет кулоновских взаимодействий (*Iribarne and Thomson, 1976*). Серьезным аргументом в пользу ионного испарения служит недавнее исследование, проведенное группой Р. Зеноби методом ионной спектроскопии (*Chingin et al., 2010*).

Существует несколько вариантов стыковки электрораспыления с жидкостным хроматографом. Для улучшения процесса испарения могут использоваться несколько дополнительных газовых потоков. Скорость потока элюента через колонку может составлять от нескольких миллилитров до нескольких нанолитров. В частности, режим наноспрея с потоком 20–200 нЛ/мин. завоевал широкую популярность для анализа биополимеров. В таком варианте достигаются сразу две цели: чувствительность значительно улучшается, а расход образца значительно уменьшается.

Важной особенностью ионизации электрораспылением является преимущественное образование многозарядных ионов. Поскольку анализаторы масс разделяют ионы по их значениям m/z , спектры очень сложных соединений могут быть получены на достаточно простых приборах. Например, ион с массой 100 000 дальтон и зарядом +100 будет зарегистрирован прибором в том же месте спектра, что и однозарядный ион с массой 1000. По этой причине электрораспыление успешно используется для исследования соединений с молекулярными массами от сотен до миллионов дальтон. Рекордная зарегистрированная молекулярная масса составляет 110 миллионов дальтон (*Chen et al., 1995*). Авторам удалось детектировать молекулярные ионы ДНК бактериофага Т4 с зарядами от 28000 до 35000.

Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением обладает превосходной чувствительностью, достигая аттомолярных (10^{-18}) и даже зептомолярных (10^{-21}) уровней. С источником электрораспыления, помимо жидкостной хроматографии, успешно сочетается и капиллярный электрофорез. Возможен и прямой ввод раствора образца. Перечисленные преимущества сделали ионизацию электрораспылением одним из наиболее эффективных и востребованных методов сегодняшнего дня.

1.3.5. Химическая ионизация и фотоионизация при атмосферном давлении

Впервые о химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД, atmospheric pressure chemical ionization, APCI) заявил Хорниг в 1973 году (*Horning et al., 1973*), а в 1974 она уже была успешно использована в сочетании с ЖХ (*Horning et al., 1974*). Метод основан на подаче растворенного образца в источник ионов, работающий при атмосферном давлении. Высокое напряжение, приложенное к электроду в виде острой иглы, создает коронный разряд, который и генерирует ионную плазму (рис. 3.5 в главе 3). Большинство этих ионов обусловлено молекулами растворителя и атмосферных газов: азота и кислорода. В таких условиях самые разнообразные ионно-молекулярные реакции неизбежны. Так, реакция первичных ионов с молекулой воды может привести к образованию катиона H_3O^+ и аниона OH^- . Реакции этих ионов-реагентов с молекулами аналита ведут к появлению протонированных MH^+ - и депротонированных $[\text{M} - \text{H}]^-$ -молекул, которые вытягиваются в анализатор. ХИАД демонстрирует лучшие результаты по сравнению с электрораспылением, когда речь идет об умеренно полярных или легких органических соединениях. ХИАД превосходит электроспрей и в том, что касается толерантности по отношению к солям и компонентам буферных растворов, часто используемых в жидкостной хроматографии.

Если необходимо проанализировать сложную смесь неполярных соединений (например нефть, см. главу 18 — «Петролеомика»), эффективным может быть метод фотоионизации при атмосферном давлении (ФИАД, atmospheric pressure photoionization, APPI). Фотоионизация традиционно использовалась в основном для установления физико-химических характеристик молекул. Первый коммерческий прибор был создан в 1956 году (*Lossing and Tanaka, 1956*). Однако вариант метода при атмосферном давлении был предложен только в 1986 году, когда И.А. Ревельский (*Revelskii, 1985, 1986*) продемонстрировал его успешное использование для решения проблем анализа объектов окружающей среды. Дополнительные преимущества ФИАД для ЖХ/МС были представлены Роббом в 2000 году (*Robb et al., 2000*). ФИАД требует распыления раствора аналита в ионный ис-

точный (рис. 3.6 в главе 3), где УФ-излучение вызывает ионизацию молекул аналита в результате прямого или вторичных процессов. Образуются одновременно как положительные, так и отрицательные ионы. ФИАД особенно полезна при работе с неполярными соединениями, когда альтернативные электрораспыление и ХИАД не столь эффективны. Процесс ионизации можно модифицировать, введя в систему избыток специального реагента (допанта). Тoluол, ацетон, некоторые другие простые молекулы легко ионизируются в условиях ФИАД, а затем передают заряд молекуле аналита. В таком варианте правильнее называть процесс фотохимической ионизацией при атмосферном давлении.

1.3.6. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

Еще один эффективный метод ионизации, созданный в 1980-х, был назван матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ, matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI). Его важность для науки была подтверждена присуждением за его создание (в тандеме с электрораспылением) Нобелевской премии в 2002 году. Пока он не столь популярен в масс-спектрометрии окружающей среды, но в будущем может оказаться весьма полезным. Метод основан на предварительной сокристаллизации молекул образца и матрицы. Облучение такого образца короткими лазерными импульсами приводит к поглощению энергии лазера молекулами матрицы с практически взрывным переносом этих молекул вместе с молекулами аналита в газовую фазу. Последующие реакции в образовавшейся плазме приводят к образованию ионов аналита. Метод позволяет работать с очень сложными молекулами, включая природные и синтетические полимеры. МАЛДИ также является одним из наиболее эффективных методов для масс-спектрометрического имиджинга (глава 20).

1.4. Масс-анализаторы

После того как ионы образца получены, необходимо их разделить. Для этой цели используются масс-анализаторы. Существует несколько типов анализаторов. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Поэтому, покупая масс-спектрометр, очень важно представлять диапазон задач, которые вы собираетесь решать с его помощью.

1.4.1. Секторные приборы

Исторически магнитные секторные приборы были первыми масс-спектрометрами. Эти приборы могут иметь один магнитный анализатор или несколько магнитных и электростатических анализаторов. Чем больше анализаторов имеет масс-спектрометр, тем более сложные исследования могут осуществляться с его помощью. Схема секторного масс-спектрометра прямой геометрии с двойной фокусировкой (магнитный анализатор следует за электростатическим) представлена на рис. 1.7. Покидая источник, ионы ускоряются по направлению к анализаторам.

Формула 1.9 — уравнение разделения ионов в магнитном секторе:

$$m/z e = B^2 R^2 / 2V, \quad (1.9)$$

где m — масса иона, e — элементарный заряд, z — число зарядов, B — напряженность магнитного поля, R — радиус магнита, V — ускоряющее напряжение (обычно несколько кВ). Таким образом, магнитный анализатор может разделять ионы по их значениям m/z при изменении напряженности поля, радиуса или ускоряющего напряжения, причем предпочтительно изменять именно напряженность поля. Электростатический сектор называется анализатором «энергий», поскольку пропускает только ионы с определенной кинетической энергией (в обычном режиме напряжение электростатического поля равно ускоряющему напряжению).

Объединение в приборе двух и более анализаторов позволяет проводить тандемные масс-спектрометрические эксперименты (глава 4). Помимо этого, электростатический анализатор (рис. 1.7) привносит дополнительную особенность — высокую разрешающую способность (разрешение по массе).

Разрешение по массе (R) означает способность масс-спектрометра разделять два иона с массами m и $(m + \Delta m)$. Формально для двух соседних пиков однозарядных ионов равной интенсивности (рис. 1.8) разрешающая способность определяется как $R = m/\Delta m$. Другой часто используемый термин «разрешение по массе» определяется как Δm . Если $\Delta m = 1$, то R — теоретический предел измеряемой массы на приборе (когда еще возможно увидеть два разделенных сигнала от соседних ионов целочисленной массы). Единичное разрешение означает, что масс-спектрометр позволяет разделять ионы с точностью до целочисленных масс. Например, разрешающей способности 1000 достаточно для разделения ионов с m/z 999 и m/z 1000. Рис. 1.8 иллюстрирует определение разрешающей способности (10%-я ложбина). Следует отметить, что для разрешающей способности других анализаторов обычно пользуются 50%-й ложбиной.

Возникает вопрос, зачем необходима высокая разрешающая способность (сотни тысяч и даже миллионы), когда речь идет о молекулах с молекулярными массами в пределах нескольких сотен единиц? Ответ заключается в том, что любой изотоп любого химического элемента имеет свой уникальный дефект массы. Поскольку в качестве стандарта был выбран основной изотоп углерода ^{12}C (12,000000...), массы всех остальных

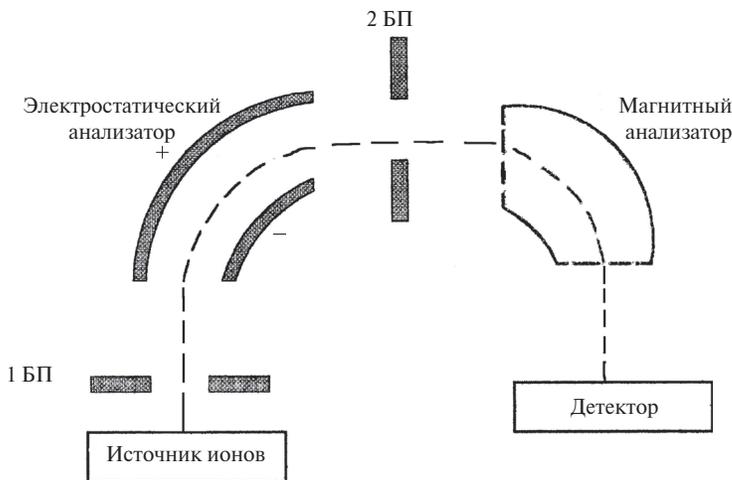


Рис. 1.7. Принципиальная схема двухфокусного масс-спектрометра (прямая геометрия). БП — бесполеное пространство

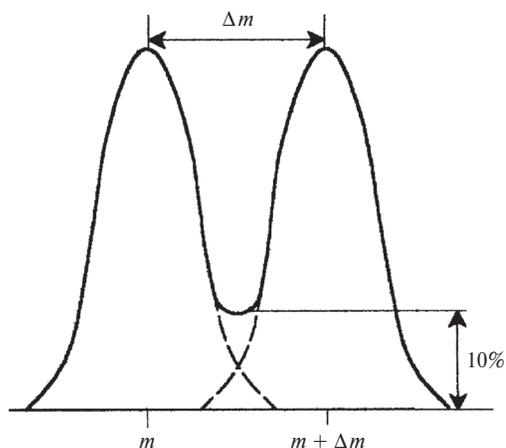


Рис. 1.8. Определение разрешающей способности масс-спектрометра

ных изотопов нецелочисленны. Например, $^1\text{H} - 1,00782506\dots$; $^{14}\text{N} - 14,00307407\dots$; $^{16}\text{O} - 15,99491475\dots$. Измерив точную массу иона, можно установить его элементный состав, поскольку не существует ионов с одинаковой массой и разным составом. Эти аспекты будут детально рассмотрены в главе 18 при обсуждении петролеомики.

Важность высокого разрешения можно продемонстрировать на простейшем примере разделения мультиплета с целочисленной массой 28 дальтон. Три соединения с такой молекулярной массой всегда присутствуют в фоне масс-спектрометра. Это азот, окись углерода и этилен. Если разрешающая способность прибора ниже 500, молекулярные ионы всех трех соединений регистрируются как один пик (рис. 1.9а). Постепенное увеличение разрешающей способности существенно меняет картину, приводя сначала к дублету, а в конечном счете — к триплету (рис. 1.9б, в, г).

Чтобы разделить пики ионов составов CO и C_2H_4 с точными массами 27,994915 и 28,03300 соответственно, необходима разрешающая способность $R = 28/(28,03300 - 27,994915) = 770$, а для разделения пиков CO и N_2 (масса молекулы азота 28,006148 единиц) — 2500.

Установление элементного состава соединения, содержащего любые химические элементы, за пару минут — важное преимущество масс-спектрометрии над трудоемким определением состава с помощью классического элементного анализа. Тем не ме-

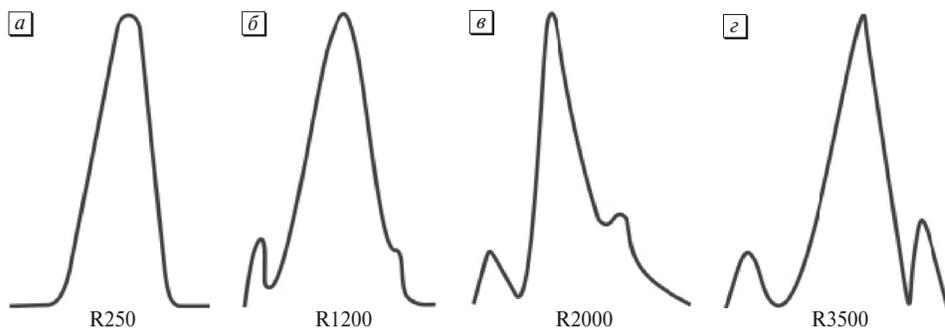


Рис. 1.9. Форма пика фоновых ионов с m/z 28 при разной разрешающей способности прибора

нее следует отметить, что элементный анализ дает информацию о составе всего образца (включая примеси), тогда как масс-спектрометрия устанавливает элементный состав индивидуальных соединений (отдельно всех компонентов и примесей образца).

Принимая во внимание, что число возможных элементных составов резко возрастает с увеличением массы иона, масс-спектрометрия высокого разрешения становится крайне важной при использовании во время работы с биомолекулами методов электро-распыления и МАЛДИ. В этих случаях для надежного определения точных масс необходимы очень высокая разрешающая способность и точность измерения.

Кстати, разрешение по массе не является синонимом точности измерения массы. Первый из этих параметров определяет способность масс-спектрометра получить отдельные изображения (пики) ионов с близкими массами, а второй — установить точное и правильное значение m/z иона, обычно для последующего определения его элементного состава. Не стоит думать, что увеличение разрешения всегда ведет к автоматическому улучшению точности измерения масс. Как только разрешение оказывается достаточным для разделения пиков измеряемых ионов, бессмысленно увеличивать его далее, поскольку интенсивность сигналов будет уменьшаться с неизбежным уменьшением точности измерений масс.

Рис. 1.10 иллюстрирует важность применения масс-спектрометрии высокого разрешения для экологических исследований. Наблюдение широкого пика со временем

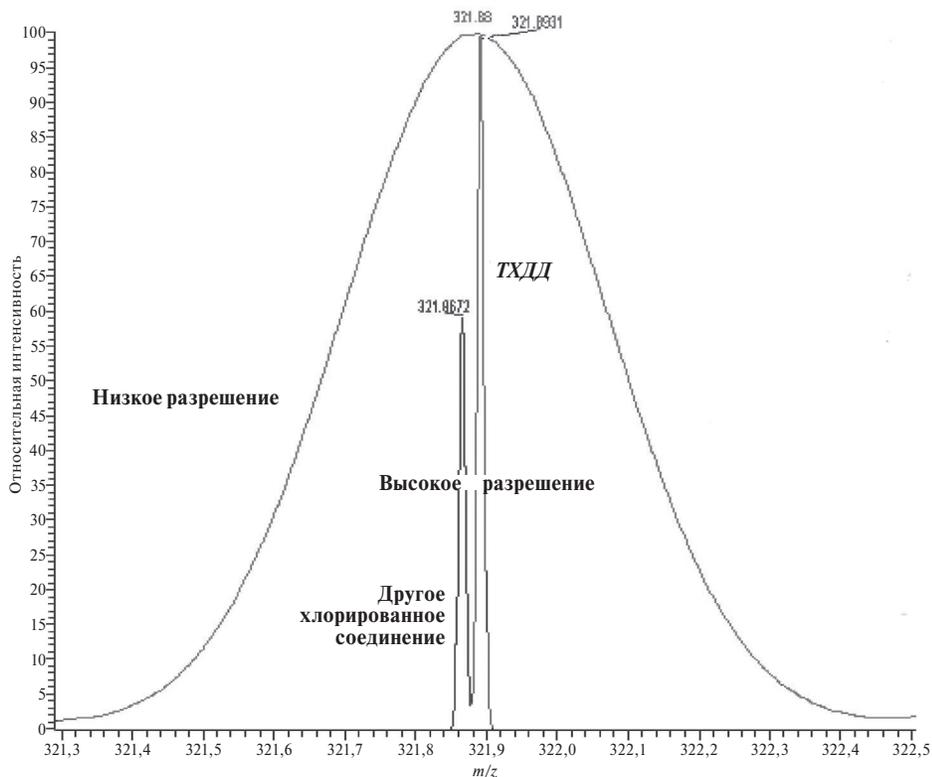


Рис. 1.10. Форма хроматографического пика в режиме SIM (см. главу 2) при использовании разрешающей способности 3000 (широкий пик) и 10000 (два узких пика) (с разрешения Thermo)

выхода 2,3,7,8-тетрахлордibenзодиоксина на масс-хроматограмме (глава 2) по току ионов с m/z 321,9 может привести к выводу о присутствии в образце значительных количеств этого суперэкоотоксиканта. Тем не менее более точные измерения массы (4 десятичных знака) наглядно демонстрируют, что этот широкий пик обусловлен суперпозицией двух пиков ионов с m/z 321,8936 и 321,8678. Первый из них действительно обусловлен 2,3,7,8-тетрахлордibenзодиоксином, однако второй принадлежит значительно менее токсичному гептахлорбифенилу; т. е., возможно, экологическая ситуация не настолько плоха, как могло показаться исходя из результатов анализа с недостаточным разрешением.

Измеряя массы с очень высоким разрешением, фактически можно измерять энергии. Работает знаменитое уравнение Эйнштейна $E = mc^2$. В частности, энергия связи, складывающаяся из сильных, слабых и электромагнитных взаимодействий, может быть определена при измерении масс всей молекулы и ее составляющих.

Возвращаясь к секторным масс-спектрометрам, следует отметить следующие аспекты. Современные приборы этого типа обладают великолепным разрешением по массе, точностью измерения масс, чувствительностью, а также надежностью количественного определения. Их динамический диапазон остается непревзойденным, а диапазон измеряемых масс уступает только времяпролетным приборам. К недостаткам этих анализаторов можно отнести небольшую скорость сканирования и достаточно большие размеры.

1.4.2. Квадрупольные приборы

Прорыв масс-спектрометрии в область экологии произошел в 1970-х с внедрением квадрупольных приборов в широкую практику. Это устройство часто называют фильтром масс. Оно состоит из четырех параллельных стержней (рис. 1.11), к которым приложено переменное и постоянное напряжения, создающие квадрупольное поле, способное фокусировать, удерживать и анализировать ионы. Низкая стоимость, небольшие размеры, высокая скорость сбора данных, превосходный динамический диапазон, хорошая вос-

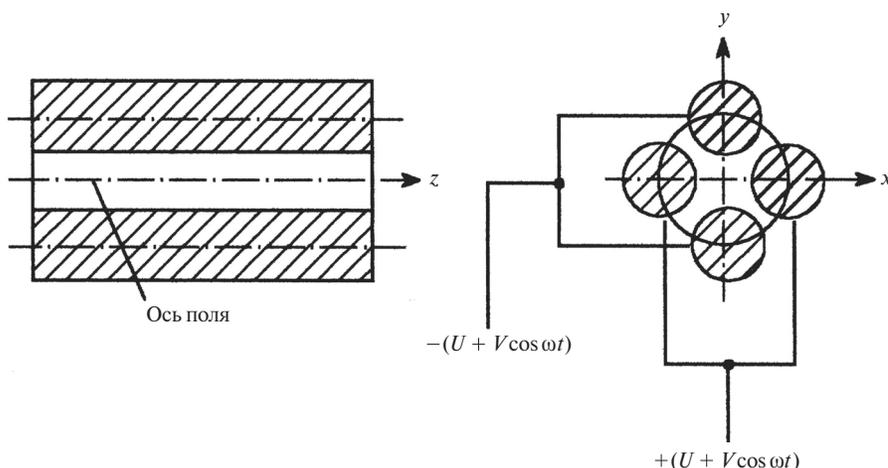


Рис. 1.11. Принципиальная схема квадрупольного анализатора

производительность и пониженные требования к вакуумной системе являются основными достоинствами квадрупольных масс-спектрометров.

Благодаря этим характеристикам даже невысокое разрешение по массе не остановило активного продвижения квадрупольных масс-спектрометров на приборный рынок. Поскольку молекулярные массы подавляющего большинства приоритетных загрязняющих веществ редко превосходят 500 Дальтон, квадрупольные масс-спектрометры с разрешающей способностью 1000 оказались идеальным инструментом для качественного и количественного определения этих соединений в самых разнообразных образцах. Неплохая чувствительность квадрупольных масс-спектрометров в режиме сканирования может быть увеличена примерно в 100 раз при работе в режиме масс-фрагментографии (мониторинга заданных ионов, см. главу 2).

Комбинация трех квадрупольных масс-спектрометров (QqQ) позволяет использовать несколько режимов tandemной масс-спектрометрии (МС/МС, глава 4). Этот подход активно применяется в настоящее время для надежной идентификации и количественного определения загрязняющих веществ и природных соединений, включая пептиды и белки.

Предположим, у нас имеется смесь нескольких соединений. Можно ли установить масс-спектрометрически их структуры без предварительного разделения (хроматографии), а введя непосредственно в ионный источник всю смесь? Действительно, магнитные секторные и тройные квадрупольные приборы, ионные ловушки, приборы ионного циклотронного резонанса, орбитальные ловушки (см. ниже) могут справиться с этой задачей.

Использование «мягкого» метода ионизации (ХИ, ПИ, МАЛДИ, электрораспыление) дает возможность получить молекулярные ионы компонентов смеси. Молекулярные ионы каждого типа (рис. 1.12, белые, розовые или зеленые шарики) по очереди проходят через первый квадруполь и направляются к следующему анализатору (Q3). На пути следования они попадают в специальную ячейку (Q2), в которой их внутренняя энергия повышается каким-либо образом для того, чтобы инициировать их фрагментацию. Существует достаточно много реакций активации, хотя соударение с атомами инертного газа остается наиболее популярным процессом. Фрагментные ионы (рис. 1.12, синие, красные и черные шарики) исходного молекулярного иона (рис. 1.12, зеленые шарики) достигают второго анализатора, в котором они разделяются по m/z , т.е. происходит регистрация масс-спектра первого компонента образца. Далее про-

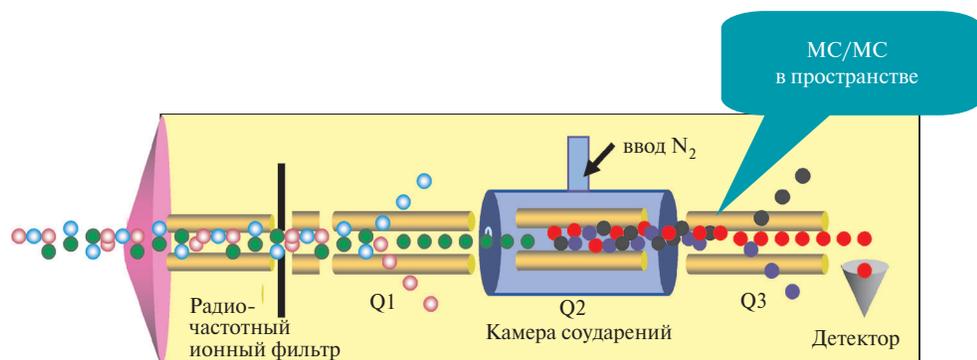


Рис. 1.12. Схема эксперимента МС/МС в пространстве. В качестве примера использован тройной квадруполь (с разрешения Applied Biosystems)

цедура повторяется со вторым молекулярным ионом (например, розовые шарики на рис. 1.12) и так далее. Когда будет осуществлена фрагментация всех молекулярных ионов, анализ образца без его предварительного разделения будет завершен. Обычно такой режим занимает значительно меньше времени, чем, например, ГХ/МС или ЖХ/МС. Очевидным недостатком является невозможность анализировать изомеры. Кстати, при наличии соответствующих конструкционных характеристик каждый из фрагментных ионов может быть выделен аналогично молекулярному и после процедуры активации фрагментации мы получим его масс-спектр. Этот метод называется МС³. Ионные ловушки способны зарегистрировать спектры до 10 поколений фрагментных ионов. Этот метод называется МСⁿ. Детали тандемной масс-спектрометрии будут рассмотрены в главе 4.

1.4.3. Ионные ловушки

Впервые ионная ловушка в качестве устройства для удерживания ионов была предложена Паулем (*Paul, Steinwedel, 1953*) в 1953 году. Существует много разных ионных ловушек: квадрупольные, цилиндрические, линейные и т. д. (подробнее см. главу 9). Принцип работы наиболее популярной цилиндрической ловушки мало отличается от такового для квадруполя. Разница заключается в геометрии. Обычно ловушки состоят из двух торцевых и одного кольцевого электрода, которые создают рабочий объем для экспериментов с ионами. Ловушки оказались еще дешевле и меньше по размеру, чем квадруполи. Более того, сложные тандемные эксперименты (МСⁿ) могут осуществляться в любой ионной ловушке, а при использовании низкой скорости сканирования разрешающая способность этих приборов может достигать 10⁷ (*March, 1998*). Кстати, МС/МС-эксперименты в ионных ловушках называются МС/МС во времени в противоположность МС/МС в пространстве в тройных квадрупольных и магнитных секторных приборах. Эти особенности сделали ионные ловушки вполне конкурентоспособными квадруполям, несмотря на меньший динамический диапазон и ухудшенные характеристики количественного анализа. В любом случае ионные ловушки позволяют работать с разнообразными экотоксикантами в требуемых диапазонах концентраций. В экологических исследованиях для повышения чувствительности и скорости сбора данных они обычно стыкуются с газовым или жидкостным хроматографом и функционируют с разрешением в 1 единицу массы. Линейная квадрупольная ионная ловушка — еще один вариант анализаторов этого типа. Она отлично зарекомендовала себя в качестве устройства для инициирования фрагментации в режиме МС/МС.

1.4.4. Времяпролетные масс-спектрометры

Пусть у нас есть полая труба, а ионы с разными значениями m/z находятся на стартовой линии около входа в эту трубу. Если, приложив потенциал (V), мы ускорим одновременно все эти ионы, они полетят по трубе, причем их кинетическая энергия будет одинаковой (см. также главу 9).

$$eV = mv^2/2 \quad \text{или} \quad m = 2eV/v^2 \quad (1.10)$$

Это означает, что более тяжелые ионы достигнут конца трубы позже, чем более легкие. Это основной принцип времяпролетной масс-спектрометрии (time-of-flight, TOF).

Хотя теоретические основы этого метода были заложены в середине XX века (*Wolff and Stephens, 1953*), использование этих приборов для изучения самых разнообразных органических соединений началось только через 40 лет. Проблемы были связаны с разбросом по времени старта, энергии и в пространстве, а также с необходимостью иметь очень быстрые детекторы, поскольку ионы с разной величиной m/z достигают детектора с очень небольшой разницей по времени (если, конечно, труба имеет реальную длину). Однако теперь при наличии современной электроники и после изобретения рефлектрона (*Mamyrin, 1973*), применения фокусировки с временной задержкой (*Wiley and McLaren, 1955*) и техники ортогонального ускорения (*Dodonov et al., 1994, Dawson and Guilhaus, 1989*) времяпролетные приборы стали наиболее популярными, а их перспективы — самыми радужными. Разрешающая способность современных времяпролетных масс-спектрометров достигает сотен тысяч, они обладают высокой точностью измерения масс, теоретически неограниченным диапазоном масс. Их чувствительность достаточно высока, а скорость сбора данных непревзойденная. Например, прибор LECO Regasus IVD может регистрировать до 500 спектров в секунду. Эта особенность привела к созданию быстрой хроматографии (глава 6). Кроме того, благодаря единовременному старту ионов со всеми значениями m/z к детектору масс-спектры оказываются идентичными вне зависимости от того, в какой части хроматографического пика они были зарегистрированы (рис. 2.6, глава 2). Это важное преимущество времяпролетных анализаторов по сравнению с другими масс-спектрометрами.

Времяпролетные анализаторы лучше других подходят для работы с импульсными методами ионизации типа МАЛДИ, однако техника ортогонального ускорения позволяет эффективно использовать их и в комбинации с непрерывными источниками ионов. Времяпролетные приборы могут применяться и для МС/МС-экспериментов. При этом они являются идеальным анализатором ионов-продуктов в различных гибридных приборах типа QTOF, IT-TOF.

1.4.5. Масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье

История наиболее мощных анализаторов (масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье, ИЦР ПФ, Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) связана с тремя датами. Принцип ионного циклотронного резонанса был предложен Лоуренсом в 1930-м году (*Lawrence and Edelfsen, 1930*), первый прибор был создан Соммером в 1950 (*Hipple et al., 1949*), а в 1974 Маршалл и Комисаров впервые применили преобразования Фурье (*Comisarow and Marshall, 1974*). В противоположность ранее описанным анализаторам в масс-спектрометрах ионного циклотронного резонанса ионы удерживаются в ячейке прибора благодаря приложенным перпендикулярным магнитным и электростатическим полям. При этом ионы движутся по круговым траекториям, перпендикулярным магнитному полю. Частоты движущихся в ячейке ионов зависят от их значений m/z . Можно провести возбуждение ионов радиочастотным импульсом и перевести их на резонансные орбиты. Движение ионов в ячейке генерирует во внешних пластинах детектора наведенный ток, причем его частота точно соответствует значению m/z ионов в ячейке. Затухание этих наведенных токов регистрируется как временной сигнал, который может быть конвертирован в классическую форму масс-спектра

приложением преобразований Фурье. Поскольку ионы не покидают ячейку, процесс возбуждения и детектирования может повторяться многократно. Подробнее этот метод изложен в главе 18.

Метод ИЦР ПФ дает возможность инициировать каким-либо образом фрагментацию интересующих исследователя ионов и осуществить эксперимент тандемной масс-спектрометрии. Кроме того, можно изучать реакции целевых ионов с разными нейтральными или заряженными частицами. В этом случае речь идет об ионно-молекулярных и ионно-ионных реакциях в газовой фазе.

Основным достоинством метода ионного циклотронного резонанса является его сверхвысокая разрешающая способность. Именно благодаря ей элементный состав ионов может быть установлен с высокой надежностью. Метод эффективен для решения фундаментальных научных проблем, а на его базе были созданы новые прикладные дисциплины, занимающиеся сверхсложными смесями природных соединений типа нефтей и нефтепродуктов (глава 18) или гуминовых веществ (глава 19).

Основным недостатком масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса является очень высокая стоимость оборудования и его эксплуатации. Этот момент существенно сдерживает распространение этого фантастического метода.

1.4.6. Орбитальные ловушки

К концу XX века казалось, что будущее масс-спектрометрии будет связано исключительно с совершенствованием известных типов анализаторов. Это мнение базировалось на факте, что за несколько прошедших десятилетий не было предложено никаких новых систем. Поэтому, когда Александр Макаров объявил о создании орбитальной ловушки (рис. 1.13), это было воспринято в качестве революционного события (*Makarov, 1999, 2000*). Избегая технических деталей, не являющихся необходимыми для целей данной книги, следует лишь отметить, что в орбитальных ловушках, как и в приборах ИЦР, для измерения масс используются преобразования Фурье. Однако дорогостоящие супермагниты в этом случае не нужны. Обладая высокой разрешающей способностью

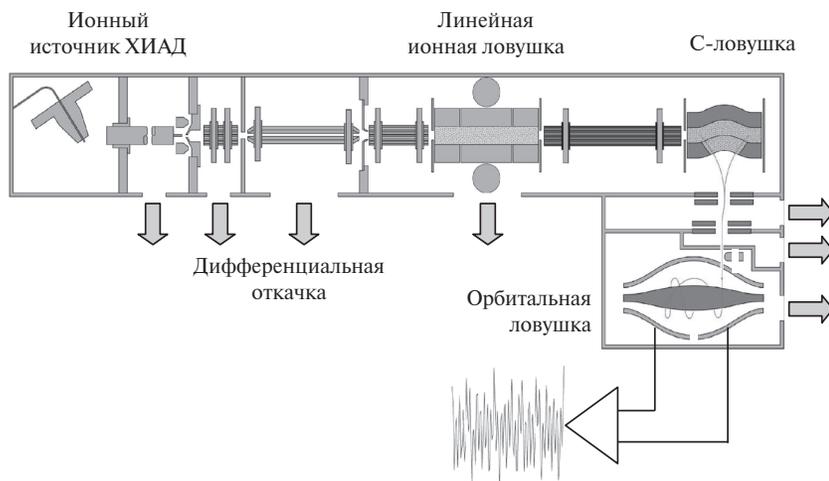


Рис. 1.13. Принципиальная схема орбитальной ловушки (с разрешения А. Макарова)

и высокой точностью измерения масс, орбитальные ловушки за 5 лет стали самыми востребованными приборами на масс-спектрометрическом рынке.

1.5. Детектирование ионов

Конечный блок масс-спектрометра отвечает за детектирование ионов. В первых классических приборах использовалась фотопластинка. Ионы с одинаковым значением m/z попадали на конкретный участок фотопластинки, а уровень засвечивания позволял проводить количественные измерения.

Токи ионов с одной величиной m/z в конкретном эксперименте очень малы (10^{-9} — 10^{-17} А) для прямого измерения. Поэтому детектированию предшествует процедура усиления сигнала. Умножители генерируют вторичные токи, более мощные в 10^4 — 10^8 раз. Когда ион проходит анализатор и попадает в детектор, он инициирует эмиссию вторичных частиц, например фотонов или электронов. Детекторы конвертируют энергию входящих частиц в ток, который измеряется соответствующими устройствами.

Электронные умножители могут быть разделены на две основные группы: с дискретным динодом (несколько отдельных динодов) и непрерывным динодом (непрерывная эмиссионная поверхность с высокой способностью ко вторичной эмиссии, например мультicanaльная пластина). Несколько эффективных конструкций детекторов описаны в (*Westman-Brinkmalm and Brinkmalm, 2009*). Для регистрации отрицательных ионов на первой стадии регистрирующей системы находится конверсионный динод. Отрицательный ион, попадая на этот динод, генерирует разные частицы, включая положительные ионы, которые регистрируются далее обычным образом. В случае приборов ионного циклотронного резонанса и орбитальных ловушек процесс регистрации ионов неструктивен и основан на измерении наведенных токов. Важнейшими характеристиками детекторов являются линейность, коэффициент умножения, время восстановления и уровень шума. Дополнительная полезная информация о детекторах представлена в главе 9.

Литература

- [1]. Aleksandrov M. L., Gall L. N., Krasnov V. N., Nikolaev V. I., Pavlenko V. A., Shkurov V. A. (1984). «Ion extraction from solutions at atmospheric pressures: a mass spectrometric method of analysis of bioorganic compounds». *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 277, 2: 379—383.
- [2]. Beckey H. D., Hilt E., Maas A., Migahed M. D., and Ochterbeck E. (1969). «A method for strong activation of field ion emitters». *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*. 3, 1—2: 161—165.
- [3]. Chingin K., Frankevich V., Balabin R. M., Barylyuk K., Chen H., Wang R., and Zenobi R. (2010). «Direct access to isolated biomolecules under ambient conditions». *Angewandte Chemie. International Edition*., 49, 13: 2358—2361.
- [4]. Chen R., Cheng X., Mitchell D. W., Hofstadler S. A., Wu Q., Rockwood A. L., Sherman M. G., and Smith R. D. (1995). «Trapping, Detection, and Mass Determination of Coliphage T4 DNA Ions by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry». *Analytical Chemistry*. 67, 7: 1159—1164.

- [5]. Comisarow M. B., and Marshall A. G. (1974). «Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy». *Chemical Physics Letters*. 25, 2: 282—283.
- [6]. Damico J. H., and Barron R. P. (1971). «Application of field ionization to gas-liquid chromatography-mass spectrometry (GLC-MS) studies». *Analytical Chemistry*. 43, 1: 17—21.
- [7]. Dawson J. H. J., and Guilhaus M. (1989). «Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer». *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 3, 5: 155—159
- [8]. Dempster A. J. (1921). «Positive ray analysis of lithium and magnesium». *Physical Reviews*. 18, 6: 415—422.
- [9]. Dodonov A. F., Chernushevich I. V., and Laiko V. V. (1994). *Electrospray Ionization on a Reflecting Time-of-Flight Mass Spectrometer*. In: Cotter R. J. Time-of-Flight Mass Spectrometry. ACS Symposium Series 549, Washington, DC, 108—123.
- [10]. Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Mobley R. C., Ferguson L. D., and Alica M. B. (1968). «Molecular beams of macroions». *Journal of Chemical Physics*. 49, 5: 2240—2249
- [11]. Harrison A. G. (1992). *Chemical Ionization Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- [12]. Hipple J. A., Sommer H., and Thomas H. A. (1949). «A precise method of determining the Faraday by magnetic resonance». *Physical Reviews*. 76, 12: 1877—1878
- [13]. Horning E. C., Horning M. G., Carroll D. I., Dzidic I., and Stillwell R. N. (1973). «New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure». *Analytical Chemistry*. 45, 6: 936—943
- [14]. Horning E. C., Carroll D. I., Dzidic I., Haegele K. D., Horning M. G., and Stillwell R. N. (1974). «Liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical systems: a continuous-flow system based on atmospheric pressure ionization mass spectrometry». *Journal Chromatography A*. 99, 13—21.
- [15]. Inghram M. G., and Gomer R. (1954). «Mass spectrometric analysis of ions from the field microscope». *Journal of Chemical Physics*. 22, 7: 1279—1280.
- [16]. Iribarne J. V., and Thomson B. A. (1976). «On the evaporation of small ions from charged droplets». *Journal of Chemical Physics*. 64, 6: 2287—2294.
- [17]. Lawrence E. O., and Edelfsen N. E. (1930). «On the production of high speed protons». *Science*. 72, 376—377
- [18]. Lebedev A. T. (2009). *Introduction to mass spectra interpretation: Organic chemistry*. In: Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A. M., and Kraj A. (Ed.), Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation and applications. John Wiley @ Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- [19]. Lossing F. P., Tanaka I. J. (1956). «Photoionization as a source of ions for mass spectrometry». *Journal of Chemical Physics*. 25, 5: 1031—1034.
- [20]. Makarov A. A., *Mass Spectrometer*. US Pat. 5,886,346, 1999.
- [21]. Makarov A. (2000). «Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis». *Analytical Chemistry*. 72, 6: 1156—1162.
- [22]. Mamyrin B. A., Karataev V. I., Shmikk D. V., and Zagulin V. A. (1973). «The mass reflectron, a new non-magnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution». *Zurnal Experimentalnoi y Teoreticheskoi Fiziki*. 64, 1: 82—90
- [23]. March R. E. (1998). «Quadrupole ion trap mass spectrometry: Theory, Simulation, Recent Developments and Applications». *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 12, 21: 1543—1554

- [24]. Mora J. F., Van Berkel G. J., Enke C. G., Cole R. B., Martinez-Sanchez M., and Fenn J. B. (2000). «Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry». *Journal of Mass Spectrometry*. 35, 8: 939—952.
- [25]. Muller E. W. (1951). «Das Feldionenmikroskop». *Zeitschrift fur Physik*. A131, 1: 136—142.
- [26]. Munson M. S. B., Field F. H. (1966). «Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction». *Journal American Chemical Society*. 88, 12: 2621—2630.
- [27]. Paul W., and Steinwedel H. (1953). *Ein neues Massenspektromter ohne Magnetfeld*. *Z. Naturforsch*, A8: 448—450
- [28]. Revelskii I. A. (1985). *The method of mass spectrometric analysis of the gas mixtures*. USSR Patent 1159412, Bulletin 47.
- [29]. Revelskii I. A., Yashin Yu. S., Voznesenskii V. N., Kurochkin V. K., Kostyanovskii R. G. (1986). *Mass spectrometry with phjtjionization of n-Alkanes, Alkohols, Ketones, Esters and Amines at atmospheric pressure*. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimiya*, 9: 1887—1892.
- [30]. Robb D. R., Covey T. R., and Bruins A. P. (2000). «Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry». *Analytical Chemistry*. 72, 15: 3653—3659
- [31]. Westman-Brinkmalm A. M., and Brinkmalm G. (2009). *A mass spectrometer's building blocks*. In: Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A. M., and Kraj A. (Ed.), *Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation and applications*. John Wiley @ Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- [32]. Wiley W. C., and McLaren I. H. (1955). «Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution». *The review of Scientific Instruments*. 26, 12: 1150—1157
- [33]. Wolff M. M., and Stephens W. E. (1953). «A pulsed mass spectrometer with time dispersion». *The review of Scientific Instruments*. 24, 8: 616—617.
- [34]. Yamashita M., and Fenn J. B. (1984). «Electrospray ion source: another variation on the free-jet theme». *The Journal of Physical Chemistry*. 88, 20: 4451—4459.
- [35]. А. Т. Лебедев. *Масс-спектрометрия в органической химии*. Бином, 2003

ГЛАВА 2

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ / МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ — «РАБОЧАЯ ЛОШАДКА» ДЛЯ АНАЛИЗА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

А. Т. Лебедев

2.1. Общие вопросы

Соединение газового хроматографа и масс-спектрометра было абсолютно логично, поскольку оба метода обладали примерно равной чувствительностью и успешно использовались для анализа органических соединений. Газовый хроматограф разделяет компоненты образца, а масс-спектрометр отвечает за их детектирование и идентификацию. Однако благодаря синергетическому эффекту эта комбинация стала одним из наиболее мощных аналитических методов современной науки. Основные принципы стыковки были выдвинуты и реализованы в 1957 году. Единственной технической сложностью объединения этих методов было рабочее давление. Если газовая хроматография работает в условиях атмосферного давления, то масс-спектрометрия требует условий высокого вакуума. Разница достигает 8 порядков. В первых приборах вслед за набивной хроматографической колонкой устанавливались специальные сепараторы, которые снижали поток газа-носителя (30 мл/мин). Появление капиллярных колонок и более мощных насосов устранило эту проблему. Теперь конец гибкой колонки из плавленого кварца вводится непосредственно в ионный источник масс-спектрометра.

Более 20 лет потребовалось для того, чтобы состыковать масс-спектрометр с жидкостным хроматографом. Подробнее о приборах и применении метода «жидкостная хроматография/масс-спектрометрия» повествует Глава 3.

Безусловно, круг соединений, которые можно исследовать методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС) значительно уже, чем тот, который можно исследовать методом масс-спектрометрии индивидуально. По счастью, для подавляющего большинства антропогенных загрязняющих веществ газовая хроматография применима. Поэтому ГХ/МС является чрезвычайно эффективным аналитическим методом в экологических исследованиях.

Говоря о методах ионизации в ГХ/МС, следует отметить, что более 90 % проводимых анализов основано на электронной ионизации (ИЭ, глава 1), которая обеспечивает интенсивную фрагментацию и позволяет эффективно применять компьютерные би-

библиотеки масс-спектров (глава 5). Существенно реже, но весьма успешно применяются химическая ионизация (ХИ) и полевая ионизация (ПИ). Основная цель этих методов — регистрация пика молекулярного иона, поскольку он зачастую отсутствует в спектрах электронной ионизации. В этом случае эти методы являются отличным дополнением к ИЭ. Поочередная регистрация ИЭ- и ХИ- (ПИ-) спектров во время ГХ/МС-анализа дает информацию и о молекулярном ионе, и о наиболее значимых фрагментных ионах (рис. 1.6 в главе 1). Кроме того, поскольку в спектрах ХИ и ПИ часто присутствует лишь один пик молекулярного иона, они могут характеризоваться лучшими пределами обнаружения при количественном определении аналитов.

Хроматография привносит в комбинированный метод ГХ/МС (ЖХ/МС) очень важный параметр — время выхода (удерживания). Благодаря этому параметру появляется возможность различать изомеры, даже в тех случаях, когда их масс-спектры очень близки друг другу. Это особо значимо для экологических исследований, поскольку токсичности изомеров могут отличаться в миллионы и миллиарды раз (например, бенз[а]пирен и бенз[е]пирен; 2,3,7,8-тетрахлордibenзодиоксин и его многочисленные изомеры). Таким образом, время удерживания может играть ключевую роль в установлении (подтверждении) структуры аналита.

2.2. Типы хроматограмм с регистрацией ионного тока

Покидая колонку, элюат попадает в источник ионов масс-спектрометра, где осуществляется ионизация. Образующиеся молекулярный и фрагментные ионы аналитов разделяются в масс-анализаторе, причем осуществляется постоянная запись масс-спектров в заданном диапазоне масс. Результирующая хроматограмма (рис. 2.1a) демонстрирует последовательность пиков, обусловленных индивидуальными соединениями — компонентами анализируемого образца. Каждый пик, как правило, охарактеризован несколькими масс-спектрами. По абсциссе откладывается время выхода ингредиентов, а по ординате — величина полного ионного тока (ПИТ), зарегистрированная в данный момент времени. Другими словами, ПИТ — это абсолютное количество всех ионов, образующихся в данный момент времени и регистрирующихся за одно сканирование спектра во всем заданном диапазоне масс. Чем больше ионный ток, тем выше положение сигнала данного скана на оси ординат. Количественное определение достаточно очевидно, так как площадь хроматографического пика пропорциональна количеству данного компонента в образце.

Хроматограмма такого типа называется хроматограммой по полному ионному току или ПИТ (рис. 2.1a). Компьютер обычно автоматически перестраивает ПИТ-хроматограмму, чтобы устранить фоновые пики, дрейф нулевой линии, остаточные сигналы растворителя, артефакты и т. д., создавая реконструированную хроматограмму по полному ионному току (РПИТ). Рис. 2.1 демонстрирует различия между ПИТ- и РПИТ-хроматограммами. Почти все пики на РПИТ-хроматограмме разрешены до нулевой линии, что улучшает возможности как идентификации, так и количественного определения. Таким образом, ГХ/МС позволяет проводить качественный и количественный анализ, оперируя с очень сложными смесями соединений без их предварительного разделения.

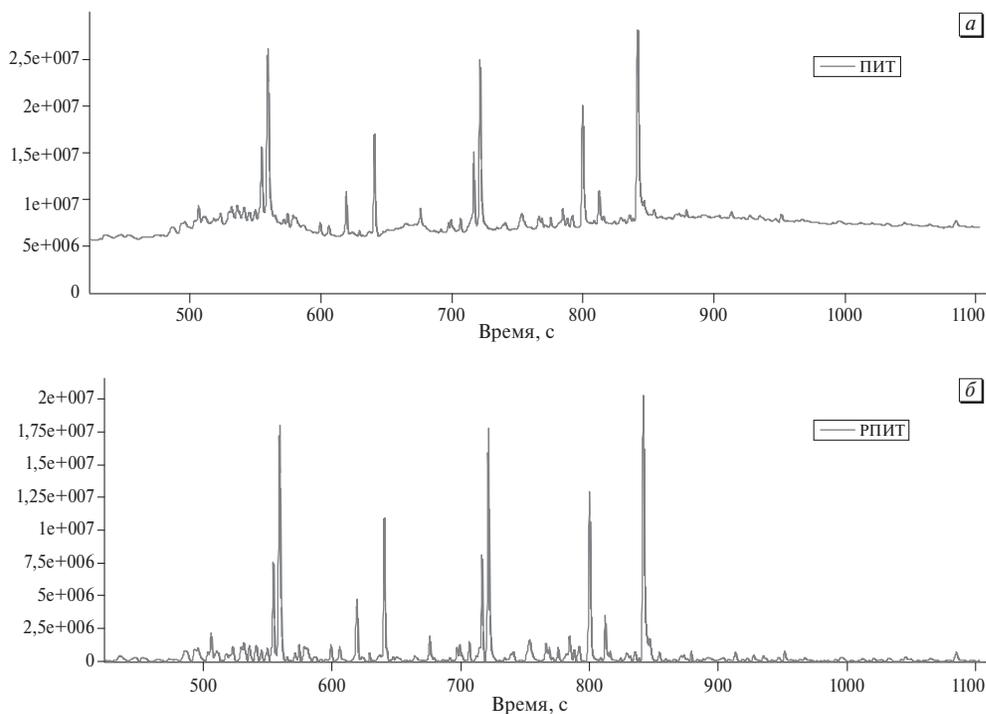


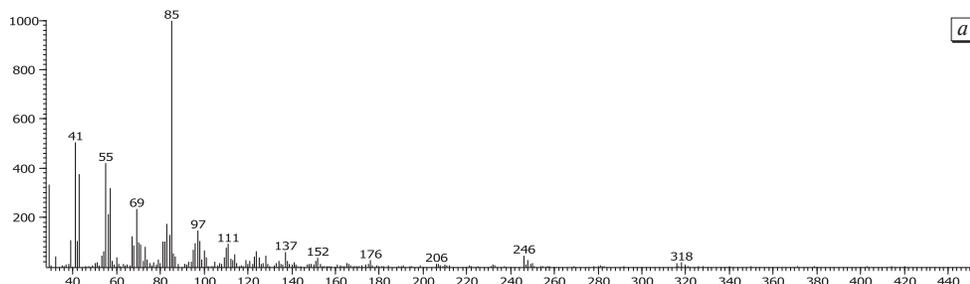
Рис. 2.1. ГХ/МС-анализ. Органические загрязняющие вещества в образце природной воды. (а) Хроматограмма по полному ионному току (ПИТ); (б) реконструированная хроматограмма по полному ионному току (РПИТ)

Компьютерная обработка может существенно улучшить качество масс-спектров. Наиболее распространенными вариантами являются усреднение спектров и вычитание фона. В первом случае интенсивность пиков ионов с конкретной величиной m/z в масс-спектрах по всему профилю хроматографического пика суммируется и делится на число спектров. В частности, усреднение минимизирует искажение спектров (см. ниже). На рис. 2.2 представлена процедура вычитания фона. Она позволяет детектировать, например, следовые количества аналита на фоне значительного матричного фона в сложных образцах. Хотя два основных кластера пиков ДДЕ (m/z 246 и 318) едва различимы в масс-спектре, зарегистрированном на вершине хроматографического пика (рис. 2.2а), после процедуры вычитания сходимость очищенного спектра со стандартным (библиотечным) составила 88 % (рис. 2.2в).

Фоновый спектр необходимо выбрать на расстоянии нескольких сканирований справа или слева от пика аналита, в точке, в которой интенсивность пиков ионов аналита близка к нулю. Сигналы ионов каждого значения m/z в фоновом спектре должны быть вычтены из аналогичных сигналов (с тем же значением m/z) в спектре, зарегистрированном на вершине хроматографического пика. Результирующий пик практически не содержит фоновых сигналов. В этом случае идентификация по спектральным базам данных становится значительно надежнее и эффективнее. Иногда таким образом можно расчистить сигналы аналитов, присутствующих в пробе в следовых количествах.

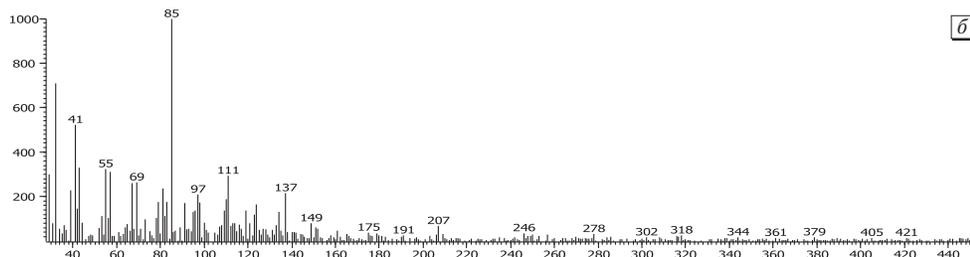
Чтобы улучшить качество спектра, полезно также перед вычитанием фона провести усреднение фоновых спектров. В этом варианте интенсивности ионов с каждым значе-

Caliper - sample "Zr2:1", 1434.78 s to 1434.78 s - (300.103 s to 300.103 s + 300.103 s to 300.103 s)



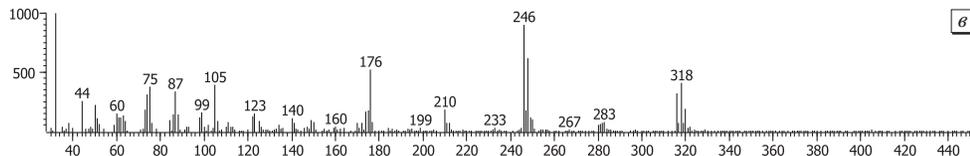
a

Caliper - sample "Zr2:1", 1436.61 s to 1436.61 s - (300.103 s to 300.103 s + 300.103 s to 300.103 s)



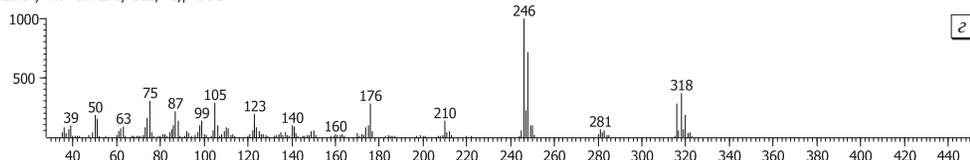
б

Peak True - sample "Zr2:1", peak 351, at 1434.09 s



в

Library Hit - similarity 882, "o,p'-DDE"



г

Рис. 2.2. (а) Масс-спектр, зарегистрированный на вершине хроматографического пика; (б) масс-спектр фона; (в) масс-спектр аналита после вычитания фона (степень идентичности 88 %); (г) библиотечный (NIST) масс-спектр ДДЕ

нием m/z суммируются по двум спектрам, зарегистрированным справа и слева у подножия хроматографического пика, а полученные величины делятся на два. Усредненный спектр вычитается из спектра аналита, как уже описано выше.

Существует две основные стратегии использования ГХ/МС. Первая связана с детектированием целевых соединений. В этом случае задача обычно заключается в количественном определении заранее выбранных аналитов. При этом все остальные компоненты образца, как правило, игнорируются. Вторая стратегия называется скринингом, нецелевым анализом или анализом полного спектра. Эта существенно более сложная задача включает идентификацию всех компонентов образца с последующим выбором среди них наиболее значимых исходя из целей анализа. Точное количественное опре-

деление в режиме скрининга, как правило, невозможно. Однако по результатам можно сделать более или менее точные количественные оценки. Наиболее полезные варианты ГХ/МС-анализа в рамках этих двух стратегий описаны далее.

Существует еще один крайне полезный момент, невозможный в обычной газовой хроматографии. Он особенно хорош для целевого анализа и заключается в перестроении хроматограмм с использованием тока только заданных ионов, например, m/z 141 и 156 на рис. 2.3б. Будучи очень эффективен для детектирования в образце целевых соединений, такой вариант представления называется масс-хроматограммой, реконструированной ионной хроматограммой (reconstructed ion chromatogram, RIC), селективной ионной хроматограммой (selected ion chromatogram, SIC) или хроматограммой по току выбранных ионов (extracted ion current, EIC).

Например, ионы с m/z 141 и 156 характерны для алкилнафталинов. Поскольку уровни этих соединений в проанализированном образце природной воды были низки, их

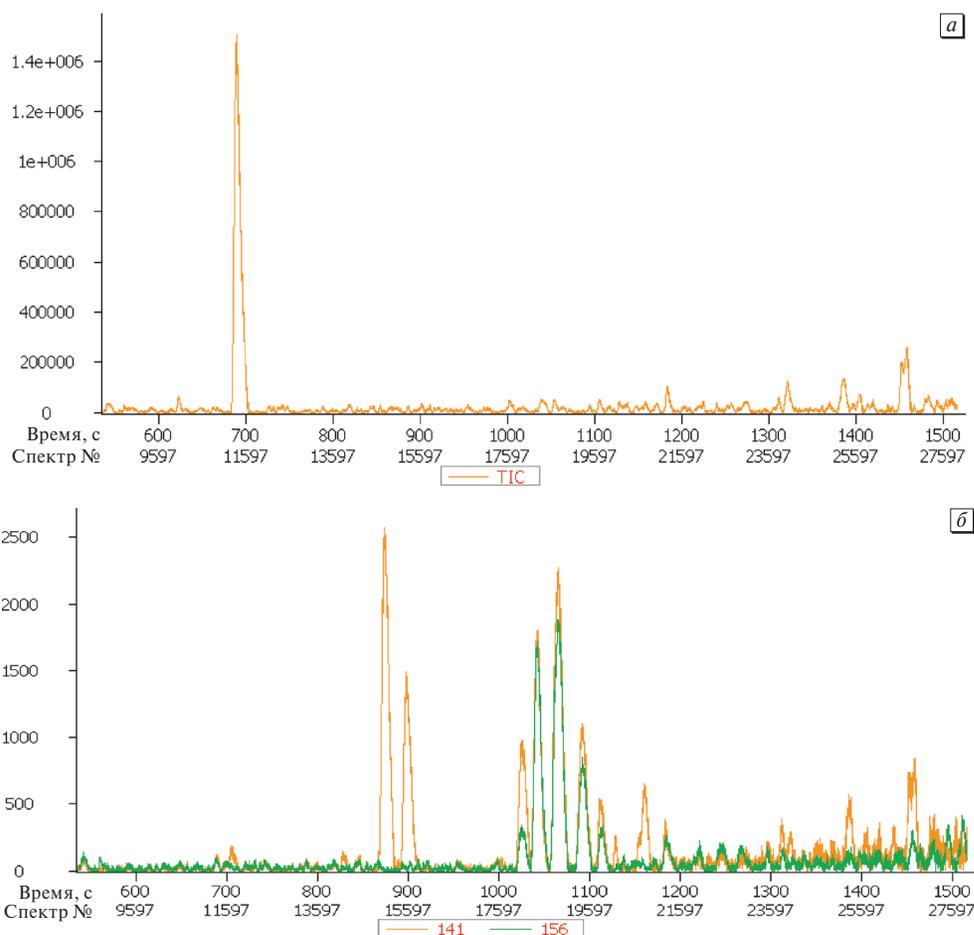


Рис. 2.3. ГХ/МС-анализ. Хроматограммы образца природной воды с пиками органических загрязняющих веществ. (а) Хроматограмма по полному ионному току; (б) масс-хроматограмма по току ионов с m/z 141 (рыжий) и m/z 156 (зеленый), характерных для метилнафталинов и диметилнафталинов соответственно

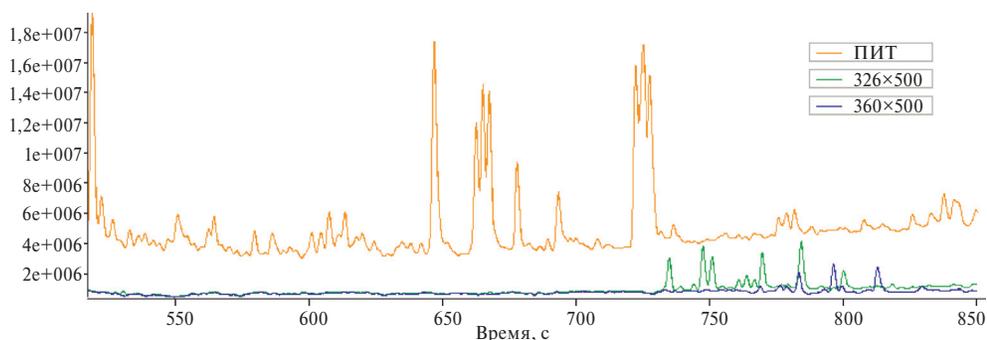


Рис. 2.4. Фрагмент ПИТ-хроматограммы (оранжевый) образца жира серого кита и масс-хроматограммы по току ионов с m/z 326 (зеленый), характерных для тетрахлорбифенилов, и m/z 360 (голубой), характерных для пентахлорбифенилов

пики отсутствуют на ПИТ-хроматограмме (рис. 2.3а). Напротив, пики изомерных метил- и диметилнафталинов доминируют на масс-хроматограмме (рис. 2.3б). Становится возможным не просто детектирование, но и надежное количественное определение этих соединений. Принимая во внимание, что построение масс-хроматограммы основано на перестроении исходной хроматограммы ПИТ и занимает лишь несколько секунд компьютерного времени, эффективность такого подхода очевидна.

Хотя формально масс-хроматография не повышает чувствительности метода, она позволяет наглядно выпятить информацию о целевых аналитах, скрытую на ПИТ-хроматограмме пиками фона и мажорных компонентов. Масс-хроматограммы всегда менее сложны и более селективны, что делает этот подход очень полезным, когда речь идет о многокомпонентных образцах. Очень часто целевой аналит выходит из колонки одновременно с мажорным компонентом. Результирующий масс-спектр оказывается мало пригодным для надежной идентификации, а пик на ПИТ-хроматограмме — неприемлемым для количественного определения. Пример такого случая представлен на рис. 2.4. Образец жира серого кита был подвергнут экстракции дихлорметаном с последующей простенькой очисткой. Жирные кислоты, продукты окисления жиров и холестеринные производные составляют около 90% компонентов экстракта, проходящих через хроматографическую колонку. Их пики доминируют на хроматограмме по полному ионному току, закрывая значительно меньшие пики целевых ксенобиотиков. Обработка ПИТ-хроматограммы с построением масс-хроматограмм по току характеристических ионов позволяет выявить пики целевых соединений, например экологически значимых полихлорированных бифенилов. На рис. 2.4 видно, что никаких проблем с измерением площадей соответствующих пиков и установлением уровней этих соединений нет.

Рис. 2.5 позволяет понять, насколько элегантно ГХ/МС преодолевает еще один недостаток ГХ, связанный с количественным определением соединений с близкими временами удерживания. Эта проблема возникает и при целевом, и при скрининговом анализе. В качестве примера можно привести результат анализа образца нефтепродуктов. На рис. 2.5а представлен небольшой фрагмент ПИТ-хроматограммы с основным пиком с временем выхода 555,262 секунд, а на рис. 2.5б — масс-спектр, зарегистрированный на его вершине. Пики с m/z 43, 57, 71... обусловлены характеристическими ионами алкильной серии. Однако ион с m/z 154 определенно принадлежит другому соединению. Следовательно, данный спектр — суперпозиция масс-спектров двух соединений.

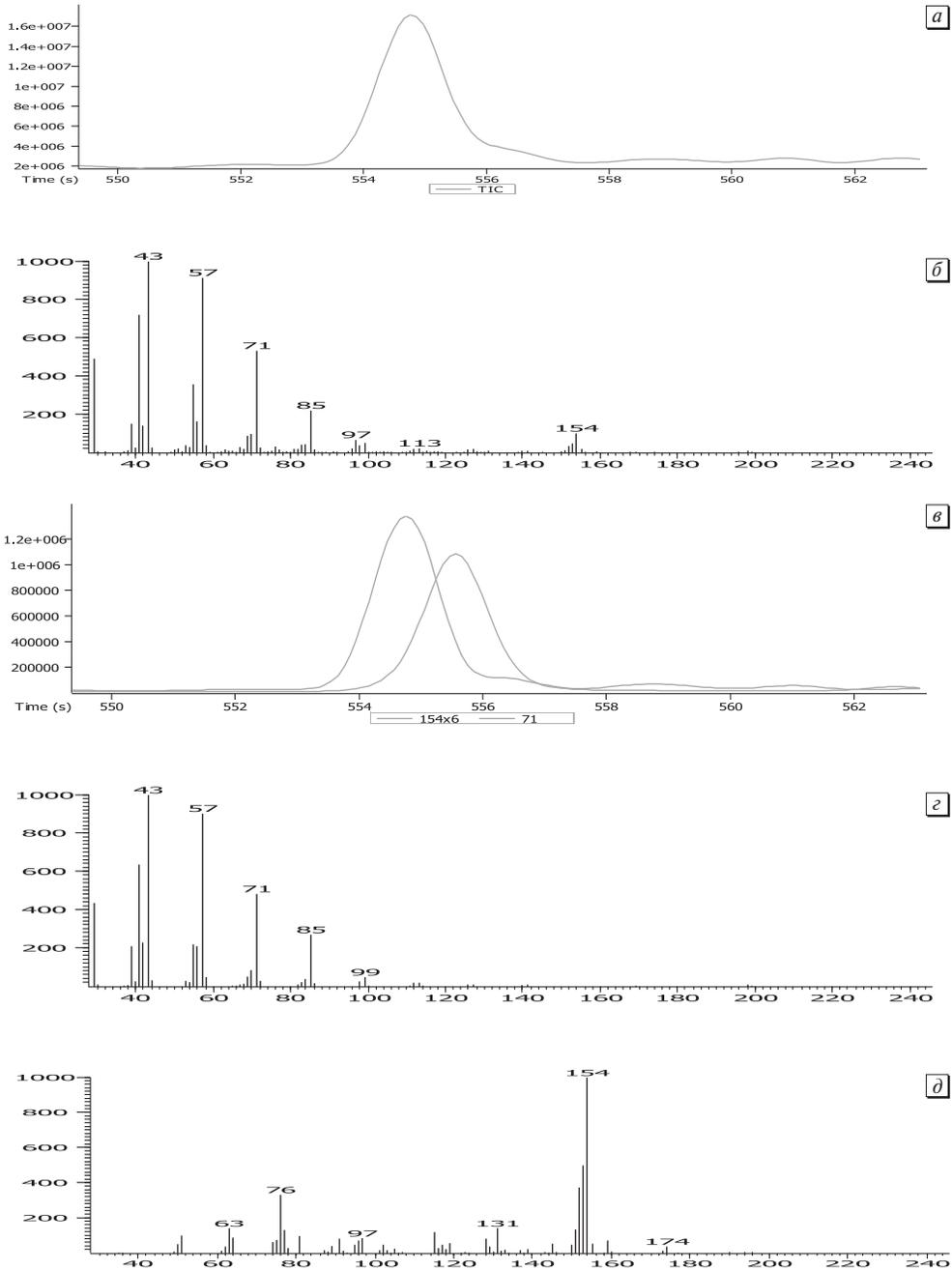


Рис. 2.5. ГХ/МС-анализ образца нефтепродуктов. (а) 14-секундный фрагмент ПИТ-хроматограммы; (б) масс-спектр на вершине хроматографического пика (RT 555,262 с); (в) масс-хроматограммы по току ионов с m/z 154 и m/z 71; (г) масс-спектр первого компонента (тетрадекан, молекулярный ион с m/z 198 едва заметен) с временем выхода 554,719 с; (д) масс-спектр второго компонента (бифенил) с временем выхода 555,562 с

Масс-хроматограммы, построенные по току ионов с m/z 154 и 71 (рис. 2.5в), позволяют увидеть, что времена выхода этих двух соединений очень близки и отличаются менее чем на секунду (554,719 с и 555,562 с соответственно). Масс-спектры, зарегистрированные на вершине каждого из этих пиков после вычета фона с обеих сторон, позволяют идентифицировать эти ингредиенты смеси как тетрадекан и бифенил, причем с высокой степенью сходимости с библиотечными спектрами этих соединений. Площади пиков на масс-хроматограммах дают возможность установить количество каждого из этих компонентов в образце.

Масс-хроматограммы эффективны для подобных целей, если вершины двух пиков отстоят не менее чем на 2 сканирования полного спектра. Таким образом, чем выше скорость сканирования (сбора данных) масс-спектрометра, тем выше эффективность разрешения накладывающихся хроматографических пиков.

Существует вариант ГХ/МС-анализа, когда записи полного масс-спектра не требуется. В этом случае масс-спектрометр настраивается на регистрацию только одного или нескольких ионов с заранее выбранными значениями m/z . Этот метод называется «мониторинг заданных (выбранных) ионов» (МЗИ, SIM) или «масс-фрагментография» и используется для детектирования и количественного определения целевых аналитов в сложных образцах (наиболее простой вариант целевого анализа). В этом случае информация о всех других компонентах образца теряется. Тем не менее, поскольку детектор прибора в этом режиме постоянно измеряет лишь ток заданных ионов, а не сканирует несколько сотен различных величин m/z , интегральная чувствительность анализа может быть повышена примерно на 2 порядка. Масс-фрагментография часто используется в экологических, криминалистических исследованиях, допинг-контроле, т.е. в тех случаях, когда необходимо детектировать целевые соединения в ультра-следовых количествах. Наличие пика заданного характеристического иона с известным временем выхода на масс-фрагментограмме свидетельствует о присутствии данного соединения

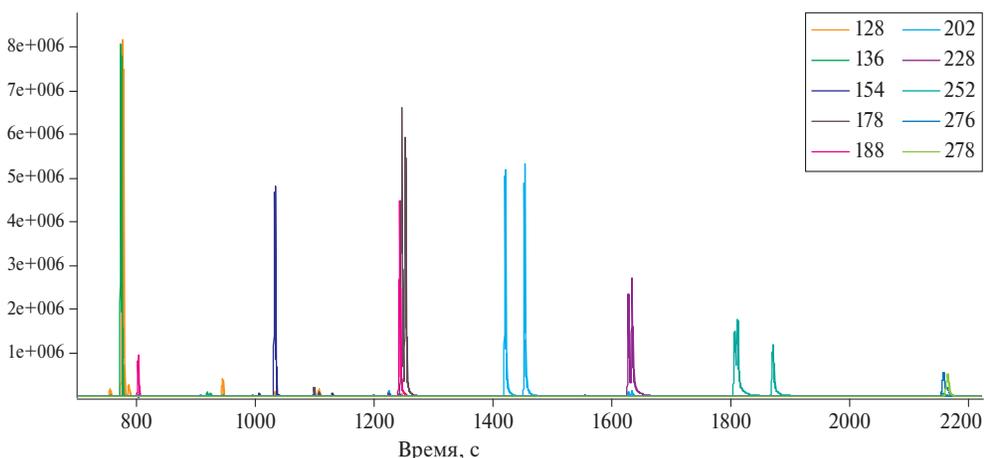


Рис. 2.6. SIM-анализ ПАУ в образце почвы (нафталин — m/z 128; аценафтен — m/z 154; фенантрен и антрацен — m/z 178; флуорантен и пирен — m/z 202; бенз[а]антрацен и хризен — m/z 228; бенз[в]флуорантен, бенз[к]флуорантен и бенз[а]пирен — m/z 252; бенз[ghi]перилен и индено[1,2,3-сd]пирен — m/z 276; дибенз[а,h]антрацен — m/z 278; пердейтеронафталин — m/z 136 и пердейтерофенантрен — m/z 188 использованы в качестве внутренних стандартов)

в образце, а площадь пика позволяет провести его количественное определение. Однако, поскольку вероятность присутствия в сложном образце веществ с близкими временами выхода и имеющими в спектрах ионы с одинаковыми значениями m/z достаточно высока, результаты SIM не столь надежны, как результаты, полученные в режиме полного сканирования спектра. Для повышения надежности используется одновременная регистрация нескольких характеристических ионов. Например, стандартные методы Агентства по охране окружающей среды США требуют регистрации трех характеристических ионов каждого целевого аналита. Аналогичный европейский документ (2002/657/EC) еще жестче. Он требует четырех идентификационных точек (глава 3). Аналит считается детектированным, если зарегистрированы все характеристические ионы, причем соотношения их пиков соответствуют этим соотношениям в стандартном масс-спектре данного соединения.

Поскольку время выхода целевых компонентов всегда известно заранее, детектор масс может переключаться для регистрации ионов с другими величинами m/z , как только аналит был зарегистрирован (вышел из колонки). Такой подход позволяет создавать автоматизированные программы для детектирования методом МЗИ серии аналитов

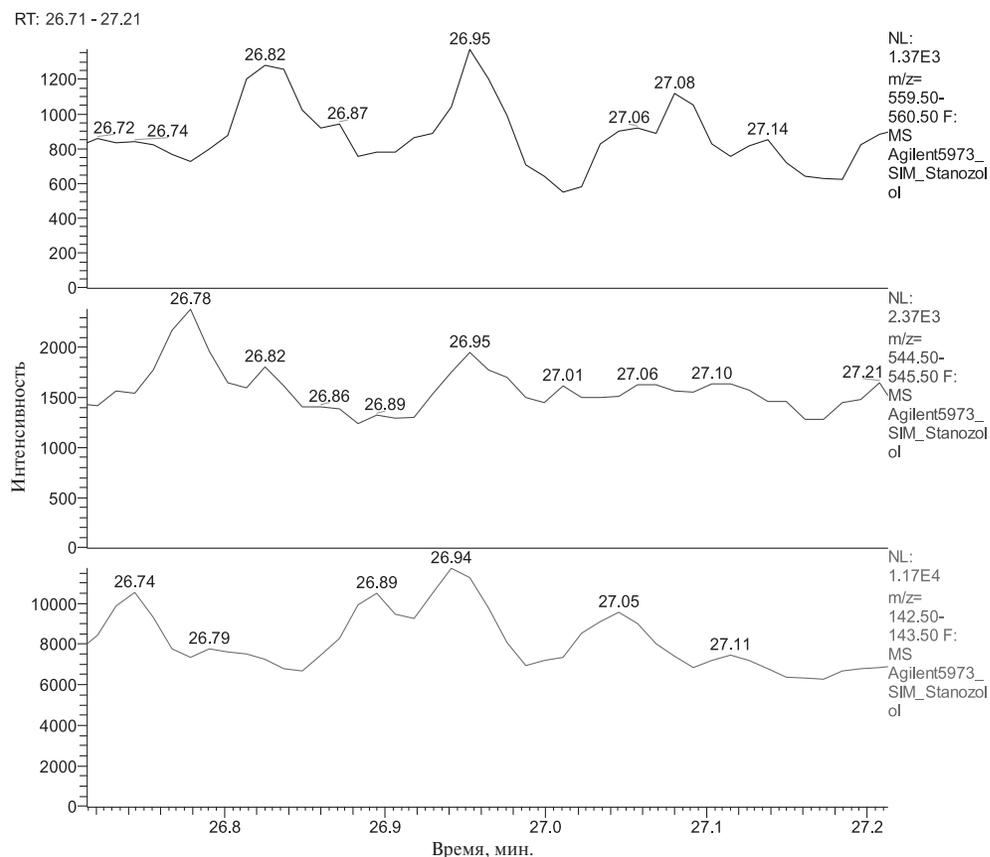


Рис. 2.7. SIM по току характеристических для станоколола ионов с m/z 560, 545 и 143 (образец мочи) с низким разрешением $R = 500$ на приборе Agilent 5973 (с разрешения Э. Вирюса)

за один ввод пробы в прибор. На рис. 2.6 представлены результаты количественного масс-фрагментографического определения 14 полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в образце почвы. Хотя на рис. 2.6 видны пики, обусловленные некоторыми другими компонентами образца, проблемы с идентификацией и количественным определением ПАУ нет, поскольку их времена выхода точно известны. Количество целевых соединений в аналогичных автоматизированных программах анализа может достигать сотен. Если одни и те же целевые аналиты должны быть определены во многих аналогичных образцах, очень полезным становится применение автосамплера. В этом случае система ГХ/МС будет проводить последовательные анализы без участия оператора.

Для улучшения пределов обнаружения и надежности определения используется масс-фрагментография высокого разрешения. На рис. 2.7 видно, что масс-

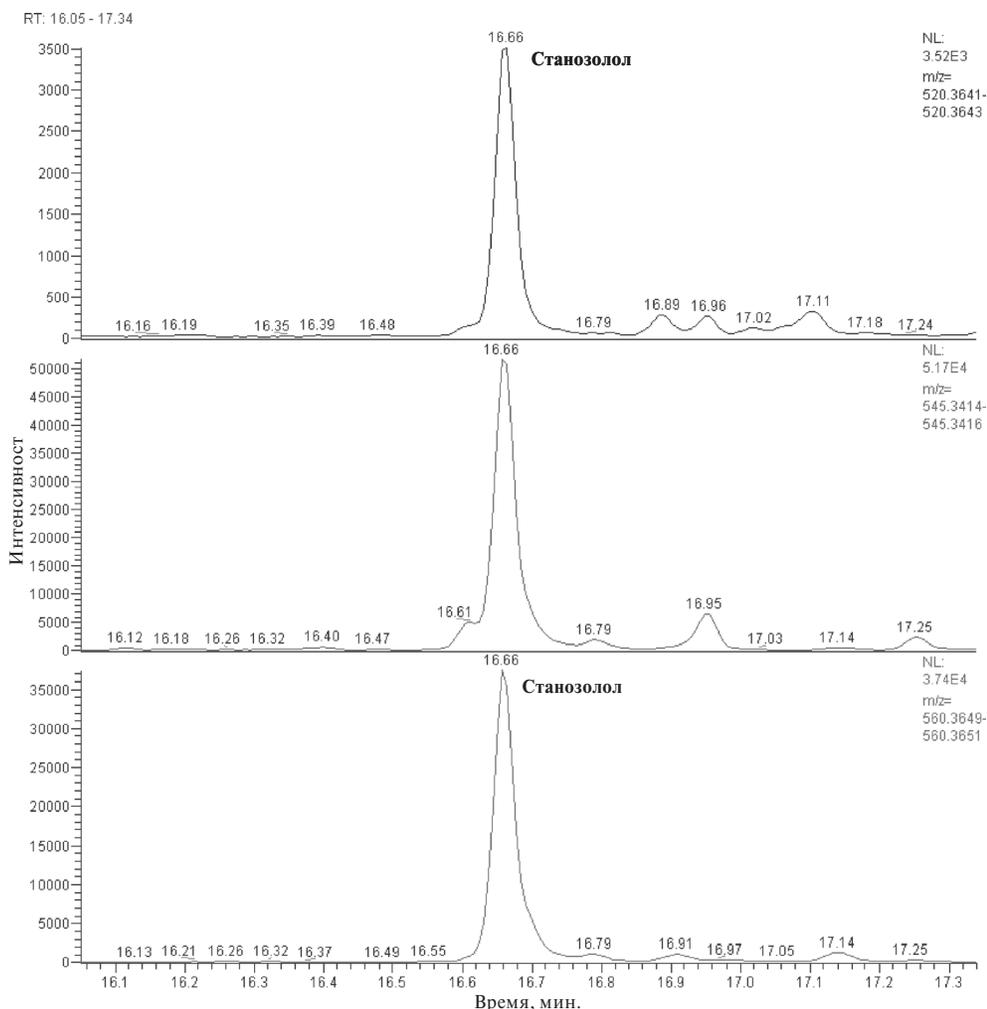


Рис. 2.8. SIM по току характеристических для станоизола ионов с m/z 560,3650; 545,3415 и 520,3642 (образец мочи) с высоким разрешением $R = 10000$ на приборе DSF компании Thermo Scientific (с разрешения Э. Вирюса)

хроматограммы по току ионов с m/z 560, 545 и 143, характерных для станозолола (спортивный допинг, запрещенный WADA), едва ли предоставляют какое-либо доказательство наличия данного соединения в пробе мочи (время выхода 26,95 мин.).

Улучшение качества сигнала в режиме высокого разрешения как для детектирования, так и для количественного определения, очевидно (рис. 2.8) Это обусловлено тем, что запись масс-фрагментограммы по току ионов с величиной m/z , измеренной с несколькими десятичными знаками, фактически позволяет детектировать только ионы с определенным элементным составом. Эта особенность дает возможность существенно сократить число мешающих ионов. Чтобы избежать проблем, связанных с небольшими флуктуациями в работе прибора, ионы регистрируются в очень узком массовом диапазоне, например m/z 560,3649—560,3651 (рис. 2.8).

Еще один красивый пример эффективности данного подхода представлен на рис. 1.10 (глава 1). Он демонстрирует корректное установление уровня 2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксина в анализируемом образце. МЗИ с высоким разрешением особенно полезен при анализе очень сложных матриц, когда требуется обнаружить ультраследовые уровни экотоксикантов.

Еще одним усовершенствованием метода масс-фрагментографии для детектирования целевых аналитов является использование тандемной масс-спектрометрии с реги-

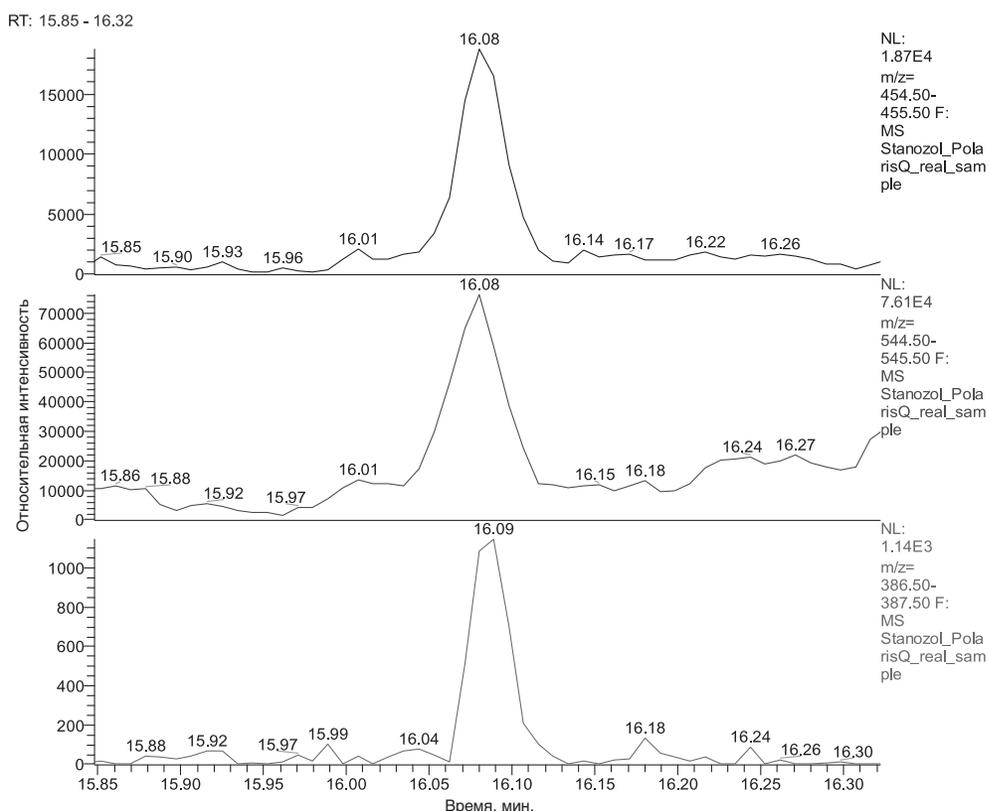


Рис. 2.9. Мониторинг заданных реакций (МЗР) на примере характеристических процессов фрагментации станозолола ($560 \rightarrow 455$, $560 \rightarrow 545$ и $560 \rightarrow 387$) (образец мочи) на приборе Polaris Q (Thermo Scientific) (с разрешения Э. Вирюса)

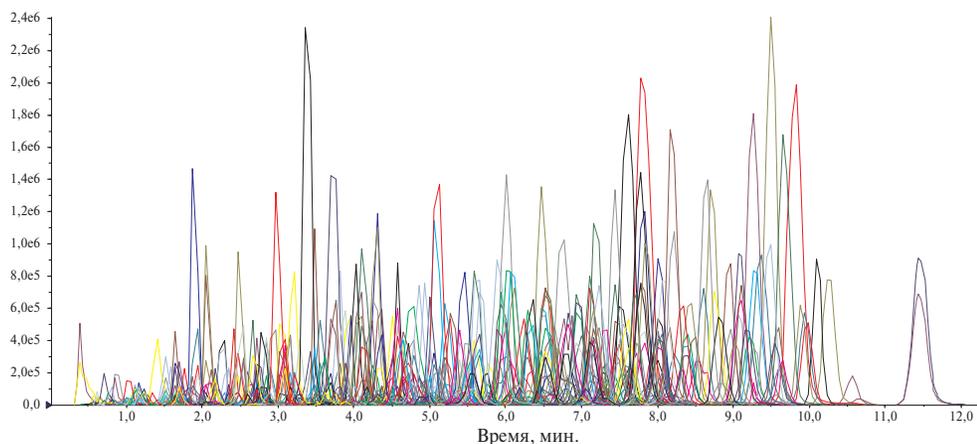


Рис. 2.10. МЗИ для определения 700 пестицидов за один ввод пробы (с разрешения Applied Biosystems)

страцией выбранных процессов фрагментации. Этот метод называется мониторингом заданных реакций (МЗР, selected reaction monitoring, SRM или multiple reactions monitoring, MRM). Он заключается в регистрации распада выбранного иона-предшественника (зачастую молекулярного иона) с образованием известного иона-продукта. Подобные процессы очень селективны и с учетом времени выхода аналита позволяют получить надежные результаты качественного и количественного анализа даже при работе с самыми сложными матрицами. В данном случае используется тандемная масс-спектрометрия или МС/МС, которая будет подробно рассмотрена в главе 4. Рис. 2.9 демонстрирует эффективность метода МС/МС на примере определения станозолола в том же образце (сравн. рис. 2.7 и 2.8). В этом случае регистрируются три реакции фрагментации молекулярного иона (m/z 560) с образованием фрагментных ионов с m/z 455, 545 и 387.

Как и МЗИ, МЗР позволяет детектировать большое число соединений за один ввод образца в прибор. Это достигается последовательным изменением условий регистрации для определения все новых и новых аналитов и дает возможность создавать автоматизированные программы. Так, на рис. 2.10 представлена обобщенная картина результата определения 700 пестицидов в одном вводе образца в прибор. Результат получен с помощью прибора ЖХ/МС, но сам принцип в этом случае остается тем же.

2.3. Скорость сбора данных

Скорость сканирования спектров (сбора данных) — еще один очень важный параметр масс-спектрометра, уже упоминавшийся ранее. В идеале для получения надежных качественных и количественных результатов каждый хроматографический пик должен быть охарактеризован 10—15 полными масс-спектрами. На рис. 2.11 представлен любопытный пример катастрофического различия полученной формы хроматографического пика аналита в зависимости от скорости записи масс-спектра. Поскольку количественное определение аналита осуществляется при измерении площади хроматографического пика, понятно, что измеренное с низкой скоростью сбора данных количество додекана в анализируемом образце будет абсолютно неправильным (рис. 2.11, красный).

В случае очень узких хроматографических пиков есть возможность совсем пропустить важный для анализа ингредиент образца. Напротив, при регистрации 250 спектров в секунду (рис. 2.11) форма пика практически идеальна и приближается к таковой для аналогового сигнала.

Рис. 2.11 позволяет обсудить еще один аспект, связанный с качеством масс-спектров. Низкие скорости сбора данных могут привести не только к неправильному количественному определению, но и создать проблемы для правильной идентификации соединения. В частности, при низкой скорости анализ (додекан) характеризуется только двумя масс-спектрами (рис. 2.11). Если анализ проводится на сканирующем приборе, например популярных в экологических исследованиях квадруполях, детектор регистрирует ионы один за другим по возрастанию или убыванию их величин m/z . Если в это время происходит изменение количества аналита, что справедливо для процесса хроматографического элюирования, число образовавшихся ионов будет больше либо для ионов с низким, либо высоким m/z , в зависимости от работы с нисходящей или восходящей частью хроматографического пика. Самые качественные спектры регистрируются на вершине пика. Этот эффект может привести к проблемам поиска в спектральных базах данных и, как следствие, ошибкам в идентификации аналита. Для случая, изображенного на рис. 2.11, для скана, стартовавшего в 7,4 с, будет наблюдаться определенная дискриминация фрагментных ионов с низкой и высокой массой в пользу ионов средней массы. Скан, стартовавший в 7,5 с, позволит зарегистрировать лишь несколько ионов с низкой массой при полном отсутствии каких-либо ионов средней и большой массы, так как вещества уже не будет в источнике ионов. Это — искажение масс-спектра (spectral skewing).

Следует подчеркнуть, что проблема искажения масс-спектра подобного типа характерна только для сканирующих приборов. Напротив, времяпролетные анализаторы, в которых происходит одновременный отбор всех ионов в заданном диапазоне m/z , обе-

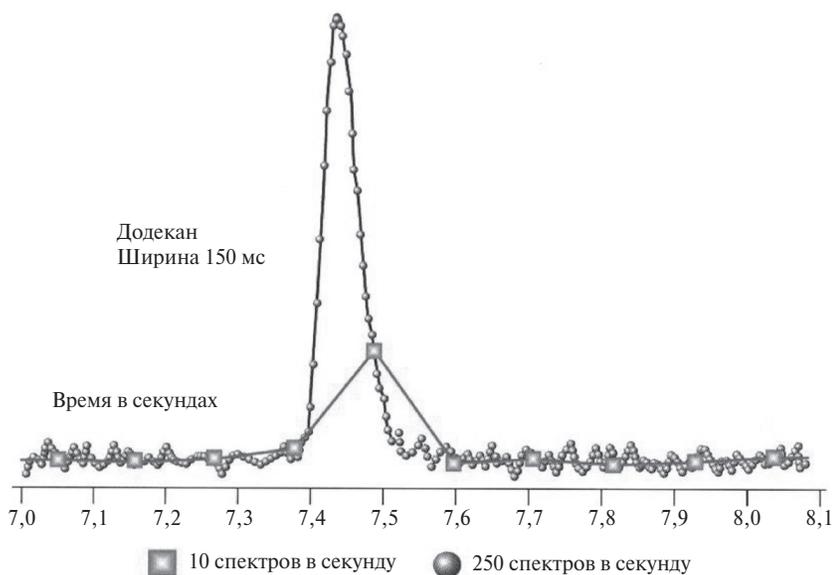


Рис. 2.11. Форма хроматографического пика додекана шириной 150 мс при скорости сбора данных 10 и 250 спектров в секунду (с разрешения LECO Corp.)

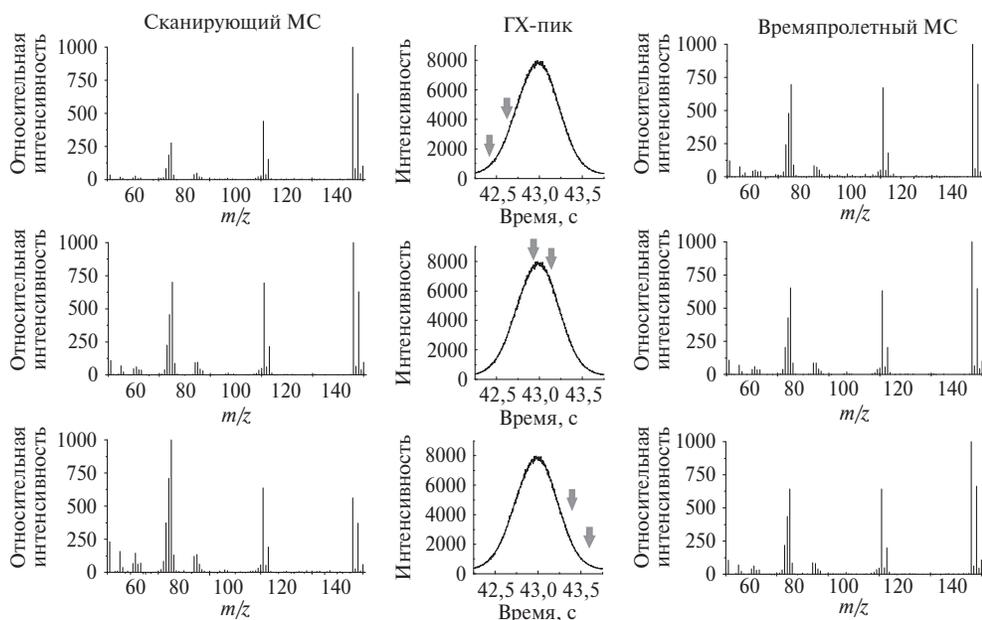


Рис. 2.12. Масс-спектр дихлорбензола, зарегистрированный в разных местах хромотографического пика времяпролетным и сканирующим масс-спектрометрами (с разрешения LECO Corp.)

спечивают практически идентичные масс-спектры вдоль всего хромотографического пика. Рис. 2.12 иллюстрирует это утверждение на примере дихлорбензола.

Очень высокая скорость сбора данных во времяпролетных приборах позволяет регистрировать несколько сот спектров в секунду, обуславливая высокую точность количественных определений. Кроме того, все спектры оказываются идентичными и неискаженными. Это очень важное преимущество таких анализаторов, благодаря которому появился метод быстрой хромотографии. Его подробности рассмотрены в главе 6.

2.4. Какие соединения можно анализировать методом ГХ/МС

Можно назвать три группы соединений, подвластных ГХ/МС: летучие, полуметучие, а также нелетучие и термолабильные. Для прохождения хромотографической колонки последним требуется предварительная дериватизация. Последующие примеры демонстрируют эффективность ГХ/МС для решения аналитических задач, связанных с этими тремя группами. Во всех случаях анализ был нецелевым, т.е. заранее было неизвестно, какие соединения присутствуют в образцах, а в задачу входила идентификация максимального их числа.

Коренные жители Чукотки ежегодно потребляют около 100 килограммов китового жира на душу населения. Однако в последнее время участились жалобы на сильный и неприятный запах, который не позволяет использовать в пищу некоторых добытых животных. Масс-спектрометрический анализ образцов тканей таких «вонючих китов»