



М И И Р И И И

Р. Экман
Е. Зильберинг
Э. Вестман-Бринкмальм
А. Край

**Масс-спектрометрия:
аппаратура, толкование
и приложения**

Перевод с английского П.С. Метальникова
под ред. А.Т. Лебедева

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2013



*Издание осуществлено при поддержке
ООО «Брукер»*

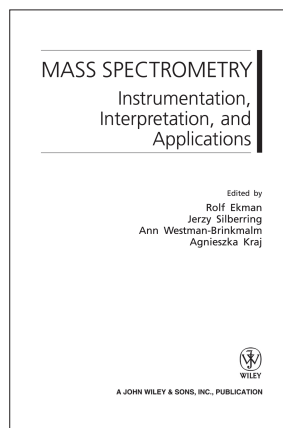
УДК 543.51
ББК 24.4
Э39

**Э39 Экман Р., Зильберинг Е., Вестман-Бринкмальм Э., Край А.
Масс-спектрометрия: аппаратура, толкование и приложения
Москва: Техносфера, 2013. – 368 с.+ 16 с. цв. вкл., ISBN 978-5-94836-364-6**

Написанная при участии видных экспертов из Европы и Северной Америки, книга служит форумом, который познакомит читателей с миром масс-спектрометрии, а также перспективами ее использования в различных областях науки. В книге представлена история метода, обсуждение приборов, теории и основных приложений. Особое внимание уделяется применению масс-спектрометрии в таких сферах, как органическая и неорганическая химия, судебная медицина, биотехнологии.

Книга призвана дать широкому кругу читателей фундаментальные знания в области масс-спектрометрии, ставшей важной частью академического образования в области аналитической химии.

**УДК 543.51
ББК 24.4**



© 2009 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Все права защищены. Авторизованный перевод с английского издания “Джон Вайли энд Санс Лимитид”. ЗАО РИЦ «Техносфера» несет полную ответственность за правильность перевода. «Джон Вайли энд Санс Лимитид» освобождается от этой ответственности. Ни одна часть книги не может быть произведена в какой-либо форме без письменного разрешения оригинального правообладателя авторского права «Джон Вайли энд Санс Лимитид».

© 2013, ЗАО «РИЦ «Техносфера», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление.

**ISBN 978-5-94836-364-6
ISBN 978-0-471-71395-1 (англ.)**

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	9
Часть I. Масс-спектрометры	11
Введение	11
Глава 1. Определения и пояснения	12
Аббревиатуры и единицы	19
Литература	20
Глава 2. Составные части масс-спектрометра	21
2.1. Источники ионов	21
2.1.1. Газовый разряд	24
2.1.2. Термоионизация	24
2.1.3. Искровой источник	25
2.1.4. Тлеющий разряд	26
2.1.5. Индуктивно-связанная плазма	27
2.1.6. Ионизация электронами	29
2.1.7. Химическая ионизация	30
2.1.8. Химическая ионизация при атмосферном давлении	31
2.1.9. Фотоионизация	31
2.1.10. Многофотонная ионизация	32
2.1.11. Фотоионизация при атмосферном давлении	32
2.1.12. Полевая ионизация	33
2.1.13. Полевая десорбция	33
2.1.14. Термоспрей	34
2.1.15. Электроспрей (электрораспыление)	34
2.1.16. Десорбционная электрораспылительная ионизация (ДЭРИ)	36
2.1.17. Прямой анализ в режиме реального времени	37
2.1.18. Вторично-ионная масс-спектрометрия	37
2.1.19. Бомбардировка быстрыми атомами	40
2.1.20. Плазменная десорбция	41
2.1.21. Лазерная десорбция / ионизация	41
2.1.22. Матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация	42
2.1.23. МАЛДИ при атмосферном давлении	45

2.2. Масс-анализаторы	45
2.2.1. Времяпролетные приборы	46
2.2.2. Магнитные/электростатические секторные масс-спектрометры	52
2.2.3. Квадрупольные масс-фильтры	56
2.2.4. Квадрупольные ионные ловушки	58
2.2.5. Орбитальная ловушка (орбитрэп)	62
2.2.6. Масс-спектрометры ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье	65
2.2.7. Ускорительная масс-спектрометрия	69
2.3. Детекторы	72
2.3.1. Фотопластины	72
2.3.2. Цилиндр Фарадея	73
2.3.3. Электронные умножители	74
2.3.4. Детекторы, расположенные в фокальной плоскости	76
2.3.5. Сцинтилляционные детекторы	76
2.3.6. Криогенные детекторы	76
2.3.7. Твердотельные детекторы	77
2.3.8. Детекторы, измеряющие наведенный ток	77
Литература	77
Глава 3. Тандемная масс-спектрометрия	95
3.1. Тандемные масс-анализаторы	97
3.1.1. Тандемные в пространстве масс-спектрометры	97
3.1.2. Тандемные во времени масс-спектрометры	101
3.1.3. Другие конфигурации тандемных масс-спектрометров	103
3.2. Методы активации ионов	103
3.2.1. Фрагментация в источнике	103
3.2.2. Фрагментация за пределами источника	104
3.2.3. Диссоциация, индуцированная/активированная столкновениями	104
3.2.4. Фотодиссоциация	106
3.2.5. Диссоциация инфракрасным излучением абсолютно черного тела (ДИИАЧТ)	107
3.2.6. Диссоциация при захвате электрона (ДЗЭ)	107
3.2.7. Диссоциация при передаче электрона (ДПЭ)	107
3.2.8. Диссоциация, индуцированная поверхностью (ДИП)	108
Литература	108
Глава 4. Методы разделения	110
4.1. Хроматография	110
4.1.1. Газовая хроматография (ГХ)	110
4.1.2. Жидкостная хроматография	112
4.1.3. Сверхкритическая флюидная хроматография	114
4.2. Методы разделения, управляемые электрическим полем	115
4.2.1. Спектрометрия подвижности ионов	115
4.2.2. Электрофорез	115
Литература	118

Часть II. Интерпретация	121
Глава 5. Введение в интерпретацию масс-спектров: органическая химия	122
5.1. Базовые положения	122
5.2. Системы ввода	123
5.2.1. Прямой ввод	123
5.2.2. Хроматография — масс-спектрометрия	124
5.3. Физические основы масс-спектрометрии	131
5.3.1. Электронная ионизация (ИЭ)	131
5.3.2. Основы масс-спектрометрических процессов фрагментации	133
5.3.3. Метастабильные ионы	138
5.4. Правила и подходы к интерпретации масс-спектров	140
5.4.1. Стабильность заряженных и нейтральных частиц	141
5.4.2. Концепция локализации заряда и неспаренного электрона	151
5.4.3. Фрагментация, удаленная от места локализации заряда	154
5.5. Практические подходы к интерпретации масс-спектров	155
5.5.1. Молекулярный ион	155
5.5.2. Масс-спектрометрия высокого разрешения	158
5.5.3. Определение элементного состава ионов по изотопным пикам	161
5.5.4. Азотное правило	167
5.5.5. Определение содержания изотопа ^{13}C в природных образцах	169
5.5.6. Расчет изотопной чистоты соединений	169
5.5.7. Фрагментные ионы	171
5.5.8. Библиотеки масс-спектров	176
5.5.9. Дополнительная масс-спектрометрическая информация	176
5.5.10. Схема фрагментации	178
Литература	180
Глава 6. Секвенирование пептидов и белков	182
6.1. Основные концепции	182
6.2. Тандемная масс-спектрометрия пептидов и белков	184
6.3. Номенклатура пептидных фрагментов	186
6.3.1. Номенклатура Ропсторфа	187
6.3.2. Номенклатура Бимана	187
6.3.3. Циклические пептиды	190
6.4. Технические аспекты и правила фрагментации	190
6.5. Зачем нужно секвенировать пептиды?	192
6.6. Секвенирование <i>de novo</i>	194
6.6.1. Регистрация спектра	195
6.6.2. Примеры секвенирования пептидов	196
6.6.3. Рекомендации и особые приемы	207
6.7. Дериватизация пептидов перед фрагментацией	209
6.7.1. Упрощение спектра	210



6.7.2. Маркировка стабильными изотопами	211
Литература	212
Онлайн-учебники	212
Глава 7. Оптимизация чувствительности и специфичности при масс-спектрометрическом протеомном анализе	213
7.1. Количественный анализ	213
7.2. Идентификация пептидов и белков	215
7.3. Доля истинных результатов и относительный динамический диапазон	219
7.4. Заключение	222
Литература	222
Часть III. Применения	225
Введение	225
Глава 8. Допинг-контроль	226
Литература	234
Глава 9. Океанография	235
Литература	242
Глава 10. Приложения «-омика»	243
10.1. Введение	243
10.2. Геномика и транскриптомика	244
10.3. Протеомика	247
10.4. Метаболомика	250
Глава 11. Наука о космосе	252
11.1. Введение	252
11.2. Исторический обзор	253
11.3. Динамика	255
11.4. Парадокс космической масс-спектрометрии	256
11.5. Краткая история космической масс-спектрометрии	259
11.5.1. Начало	259
11.5.2. Линейный ВПМС	260
11.5.3. Изохронные ВПМС	262
11.6. Заключение и перспективы	264
Литература	264
Глава 12. Биотерроризм	267
12.1. Что такое биотерроризм?	267
12.2. Некоторые исторические факты о биотерроризме	267
12.3. Женевский протокол 1925 года и Конвенция о биологическом оружии 1972 года	268
12.4. Категории биологически опасных компонентов	268
12.5. Проблемы, связанные с идентификацией случаев биотерроризма	269
12.6. Масс-спектрометрическая идентификация белков-биомаркеров	270

12.7. Разработка новых терапевтических средств и вакцин с помощью иммунопротеомики	271
Литература	272
Глава 13. Имиджинг небольших молекул	274
13.1. ВИМС-имиджинг	275
13.2. Биологические приложения (клетки, ткани и медикаменты)	277
13.3. Катализ	278
13.4. Криминалистика	279
13.5. Полупроводники	281
13.6. Перспективы	281
Литература	283
Глава 14. Использование масс-спектрометрии в клинической химии ...	284
14.1. Введение	284
14.2. Как масс-спектрометрия используется в клинических исследованиях?	285
14.3. Наиболее распространенные вещества, детектируемые масс-спектрометрией ..	285
14.4. Многокомпонентное детектирование клинических биомаркеров: история успеха	286
14.5. Количественный анализ	288
14.6. Пример использования масс-спектрометра в клинических исследованиях	289
14.7. Количественный анализ в клинической химии	291
14.7.1. Тандемная масс-спектрометрия и сортировка (карманной мелочи)	291
14.7.2. Изотопное разбавление и количественный анализ (эксперименты с конфетами из желе)	292
Глава 15. Полимеры	294
15.1. Введение	294
15.2. Приборы, пробоподготовка и матрицы	294
15.3. Анализ высокочистых полимерных образцов	296
15.4. Анализ полимерных образцов, в которых все цепи имеют одно и то же основное звено	296
15.5. Анализ полимерных смесей с разными основными звеньями	297
15.6. Определение средней молекулярной массы	298
Литература	301
Глава 16. Криминалистика	302
16.1. Введение	302
16.2. Анализируемые материалы и цели анализа	304
16.3. Пробоподготовка	305
16.4. Систематический токсикологический анализ	305
16.4.1. ГХ/МС-методы	307
16.4.2. ЖХ/МС-методы	308
16.5. Количественный анализ	310
16.6. Идентификация поджогов	312
Литература	312

Глава 17. Новые приложения в нейрехимии	313
17.1. Введение	313
17.2. Почему эта область так мало исследована?	314
17.3. Протеомика и нейрехимия	315
17.3.1. Синапс	315
17.3.2. Обучение и память	317
17.3.3. Мозг и иммунная система	317
17.3.4. Стресс и страх	319
17.3.5. Психиатрические заболевания и расстройства	320
17.3.6. Синдром хронической усталости	321
17.3.7. Зависимость	322
17.3.8. Боль	322
17.3.9. Нейродегенеративные заболевания	323
17.4. Заключение	324
Литература	325
Часть IV. Приложения	327
Руководства	327
Программное обеспечение	328
Базы данных	329
Протоколы	331
Журналы	332
Форумы	332
Масс-спектрометрические общества	332
Таблицы	334
Предметный указатель	338
Обзор продукции BRUKER	353

ПРЕДИСЛОВИЕ

За последние 20 лет масс-спектрометрия стала одним из основных методов аналитической химии. В особенности, это утверждение справедливо для области исследования биологических макромолекул. По своей важности масс-спектрометрия сравнима с более традиционными подходами, такими, как электрофорез и жидкостные методы разделения, причем масс-спектрометрия часто используется в качестве гибридного метода – например, как ЖХ-МС.

Развитие масс-спектрометрии было во многом мотивировано открытием новых способов генерации стабильных ионов и разработкой соответствующих ионных источников. Методы образования ионов должны отвечать двум основным требованиям. Во-первых, молекулы, изначально существующие в конденсированном состоянии, жидком или твердом, должны быть переведены в газовую фазу и, в конечном итоге, введены в вакуум анализатора. Во-вторых, первоначально нейтральные молекулы должны приобрести один или более зарядов для их разделения и регистрации масс-спектрометром. Ранее, осуществление этих двух шагов приводило к неизбежному возбуждению внутренних степеней свободы молекул с их последующей фрагментацией и, соответственно, потерей аналитической информации. Двумя новыми методами, доминирующими в настоящее время в масс-спектрометрии, являются электрораспыление (ЭРИ) и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ). Несмотря на то, что эти методы решают проблемы перевода молекул из конденсированной фазы в газовую и их ионизации различными способами, они были разработаны независимо друг от друга и появились одновременно в 1988 году. Такая параллельная разработка не была чистой случайностью. Основы строения макромолекул, функции биологических систем, роль ДНК и, в особенности, белков стали предметом исследований 30 годами ранее. Для некоторой части научного сообщества стало очевидно, что для разгадывания тайн биомолекулярных структур необходим скачок в разработке более чувствительных и специфичных аналитических методов. С этой точки зрения масс-спектрометрия выглядела многообещающе, хотя для большинства экспертов такой прогресс выглядел невероятным. Можно констатировать, что в науке, как и в других областях человеческой деятельности, справедливо изречение: «если есть проблема, то найдется и способ ее решения». В этом контексте важно понимать, что изобретение ЭРИ и МАЛДИ основывает-

ся на разработках предыдущих лет, таких, как полевая десорбция, десорбция пучками частиц и химическая ионизация в газовой фазе.

Новые механизмы ионизации вернули к жизни некоторые варианты анализаторов, такие, как времяпролетные приборы с аксиальной экстракцией ионов, отвергнутые ранее как несовершенные. В последние годы на рынке появилось множество новых высококачественных масс-спектрометров с ЭРИ и МАЛДИ ионизацией: времяпролетные с ортогональной экстракцией, приборы ионного циклотронного резонанса и орбитальные ловушки. Параллельная разработка средств быстрой обработки сигналов, анализа и аккумуляции данных также сыграла важную роль в развитии масс-спектрометрических технологий.

Между тем, масс-спектрометрия стала и важной частью академического образования в области аналитической химии. Это можно видеть из резюме многих студентов и аспирантов, специализирующихся в данной области. Поэтому, выход в свет данной книги является очень своевременным. Следует поблагодарить редакторов и авторов этого труда за их усилия.

Насколько подробно студент должен быть информирован о достижениях в данной области науки и насколько подробной должна быть книга? Этот вопрос не имеет ответа ввиду различий между студентами и разнообразия их потребностей в знаниях. Большинство студентов будет в итоге специализироваться в отдельных областях химии (биохимии), молекулярной или системной биологии, а также химии полимеров. Для них масс-спектрометрия не станет предметом углубленных исследований, а будет являться лишь одним из инструментов решения задач в области специализации. Насколько глубоко эти исследователи должны изучать основы масс-спектрометрии? Снова ответ зависит от решаемой проблемы. Для многих рутинных приложений достаточно ознакомления с руководствами производителей приборов. Однако если проблема не тривиальна, то и ее способ решения не будет простым. Масс-спектрометрия является и, скорее всего, будет оставаться комплексным методом. Для полного раскрытия потенциала масс-спектрометрии, и, в равной степени, избежания проблем, связанных с некоторыми его недостатками, необходимо углубленное изучение механизмов явлений и технологий метода. Надеюсь, что эта книга поможет заложить необходимый фундамент знаний, а позже, при необходимости, студенты обратятся к более специализированной литературе. В этом смысле книга будет полезной для многих читателей.

*Франц Хилленкамп
Мюнстер, Германия
2008*

ЧАСТЬ I

МАСС-СПЕКТРОМЕТРЫ

Введение

Первая часть этой книги посвящена обсуждению масс-спектрометрического оборудования. Сначала будут рассмотрены основные термины и определения (глава 1). В главе 2 будет рассмотрена конструкция масс-спектрометров и их основных узлов. В ней мы опишем в деталях наиболее распространенные источники ионов, масс-анализаторы и детекторы. Некоторые из этих приборов редко используются в настоящее время, но они внесли существенный вклад в историю масс-спектрометрии и упоминаются в масс-спектрометрической литературе. В главе 3 мы опишем различные методы фрагментации и несколько типичных тандемных анализаторов. Глава 4 отличается от других. Методы разделения — определенно слишком широкая область для 20 страниц. Однако, некоторые методы разделения смесей настолько тесно связаны с масс-спектрометрией, что всегда упоминаются как комбинированные аналитические методы, например ГХ-МС и ЖХ-МС. В действительности почти невозможно изучать масс-спектрометрию без рассмотрения хотя бы одного из методов разделения. Поэтому одна из главных целей главы 4 — облегчить знакомство читателя с масс-спектрометрической литературой при помощи короткого описания основных наиболее типичных методов разделения, используемых в сочетании с масс-спектрометрией.

ГЛАВА I

ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

Анн Вестман-Бринкмальм
и Гуннар Бринкмальм

Целью этой главы является введение определений и краткое объяснение основных масс-спектрометрических терминов. Как и во многих других областях науки, в масс-спектрометрическом сообществе идут дебаты (порой очень жаркие) о том, насколько корректны используемые термины и определения и что означает повседневная масс-спектрометрическая терминология. Возможно, это неизбежное явление для всякой междисциплинарной бурно развивающейся области науки. Однако в этой главе мы будем находиться в стороне от таких споров, давая читателю определения, предлагаемые текущим проектом IUPAC «Стандартные определения терминов, относящихся к масс-спектрометрии» [1]. Смотрите также «Страницу проекта масс-спектрометрических терминов и определений» [2]. Наш проект находится на конечной стадии и будет официально опубликован в ближайшее время. Тем не менее мы иногда не будем избегать некоторых оппозиционных мнений. Смотрите также главы 5 и 6 для более детального рассмотрения некоторых базовых концепций масс-спектрометрии. Изучая различные главы этой книги, читатель заметит, что авторы (включая авторов этой главы) не придерживаются строго списка рекомендуемых определений, который может быть найден в этой книге. Это реальное отражение состояния масс-спектрометрической литературы. Читатель не должен быть обескуражен такой ситуацией. Наше основное правило: «Находясь в Риме, веди себя как римлянин». Однако для помощи читателю авторы будут давать альтернативные или дополнительные термины в соответствии с IUPAC.

Атомная единица массы (*Atomic Mass Unit*): см. *унифицированная атомная единица массы*.

Бесполевое пространство (*Field Free Region*): любая область ионно-оптической системы масс-спектрометра, где ионы не подвергаются воздействию магнитного или электрического поля.

Воспроизводимость определения массы (*Mass precision*): среднеквадратическое отклонение для большого числа измерений массы [3].

Граничные массы (*Mass Limit*): предельные значения m/z , которые могут быть зарегистрированы.

Дальтон (Да) (*Dalton (Da)*): единица массы, не входящая в систему СИ, равная унифицированной атомной единице массы. Смотрите также близкие к теме термины: *средняя масса; дальтон; молярная масса; молярный вес; моноизотопная масса; номинальная масса; унифицированная атомная единица массы.*

Дефект массы (*Mass Defect*): разность между точной и номинальной массами.

Диапазон масс (*Mass Range*): интервал значений m/z , в котором масс-спектрометр может регистрировать ионы или записывать масс-спектр.

Димерный ион: ион, образующийся при ионизации димера или ассоциации иона с нейтральным аналогом ($[M_2]^{+*}$ или $[M-H-M]^+$).

Дочерний ион (*Daughter Ion*): см. *ион-продукт.*

Интенсивность пика (*Peak Intensity*): высота или площадь пика в масс-спектре.

Некоторые предупреждения от авторов: высота пика и площадь пика — не взаимозаменяемые понятия. Проанализируйте, например, как отношение высоты пика к площади пика зависит от разрешающей способности масс-анализатора или времени отклика детектора.

Ион-предшественник (*Precursor Ion*): ион, из которого в ходе реакции образуются определенные фрагменты. Реакция может быть мономолекулярной диссоциацией, ионно-молекулярной реакцией, изомеризацией или изменением зарядового состояния. Термин «родительский ион» более не используется¹.

Ион-продукт (*Product Ion*): ион, образовавшийся в реакции определенного иона-предшественника. Реакция может быть мономолекулярной диссоциацией, ионно-молекулярной реакцией или изменением зарядового состояния. Термины «фрагментные ионы» и «дочерние ионы» более не используются*.

Калибровка масс (во времяпролетной масс-спектрометрии) (*Mass Calibration (time-of-flight)*): определение значений m/z по времени пролета. Обычно это достигается использованием компьютерных систем регистрации и калибровкой спектра с известными значениями m/z .

m/z : символ используется для обозначения безразмерной величины, полученной при делении массы иона в атомных единицах массы на заряд иона (без учета знака заряда). Символ пишется прописными буквами курсивом и без пробелов. Замечание 1: термин «отношение массы к заряду» используется в качестве абсциссы при графическом представлении масс-спектра, хотя измеряемая величина не равна отношению массы иона к его заряду. Символ m/z рекомендуется использовать для обозначения безразмерной величины, являющейся независимой переменной шкалы масс. Замечание 2: предложенная единица томсон (*Th*) не нашла большого распространения.

Комментарий: здесь авторы считают нужным подчеркнуть, что масс-анализатор разделяет газофазные ионы согласно отношению их масс к заряду (m/q , смотрите формулы ниже), но ни масса, ни заряд не являются безразмерными величинами. Z — число элементарных зарядов — безразмерная величина, что приводит к тому, что m/z измеряется в а.е.м. или Да. Единица СИ для m/q —

¹ Хотя эти термины и не рекомендованы к употреблению, они по-прежнему часто используются масс-спектрометристами (Здесь и далее примечания редактора перевода.)

это килограмм/кулон (кг/Кл). Но эта величина неудобна, так как она подразумевает использование фактических значений. Альтернативой могли бы быть атомные единицы массы. Исторически использовались единицы а.е.м./ e , где e — элементарный электрический заряд. К сожалению, e — константа (величина заряда протона или электрона), а не единица измерения. В настоящее время нет общепринятой единицы заряда в атомной системе единиц. Поэтому была предложена единица измерений милликен (Ми). Была также предложена единица измерения для m/q : томсон (Th), где $Th = \text{а.е.м./Ми}$ или Да/Ми . Все эти единицы принадлежат атомной системе единиц. Все эти рассуждения выглядят как слишком большие придирки, но все-таки непрактично, что нет общепринятых единиц для измерения главной величины в масс-спектрометрии.

МС/МС (MS/MS): регистрация и изучение спектров электрически заряженных продуктов, или предшественников иона, или ионов с выбранным значением m/z , или предшественников ионов с заданной потерей нейтральной группы. МС/МС также называют тандемной масс-спектрометрией.

Комментарий. Существует два различных мнения о смысле аббревиатуры МС/МС. Один вариант — это масс-спектрометрия/масс-спектрометрия [1]; другой — масс-селекция/масс-сепарация.

Масса ($Mass$): см. термины: *точная масса; средняя масса; дальтон; молярная масса; молекулярный вес; моноизотопная масса; номинальная масса; атомная единица массы.*

Массовое число ($Mass Number$): число протонов и нейтронов в атоме, молекуле или ионе.

Масс-спектр ($Mass spectrum$): график зависимости интенсивностей ионов как функции их значений m/z . См. обсуждение m/z .

Масс-спектрометр ($Mass Spectrometer$): прибор, измеряющий значения m/z и относительные интенсивности ионов. См. также обсуждение термина m/z .

Масс-спектрометрия ($Mass Spectrometry$): научное направление, связанное со всеми аспектами масс-спектрометров и их использованием.

Масс-спектрометрия изотопного разбавления ($Isotope Dilution Mass Spectrometry$): масс-спектрометрический метод количественного анализа, в котором изотопно-меченый компонент используется как внутренний стандарт. См. главу 14 для более детального понимания.

Масс-спектрометрия изотопных отношений ($Isotope Ratio Mass spectrometry$ ($IRMS$)): измерение относительных количеств различных изотопов химического элемента в пробе с использованием масс-спектрометрии.

Метастабильный ион ($Metastable Ion$): ион, образовавшийся с внутренней энергией, превышающей порог диссоциации, но со временем жизни, достаточным для того, чтобы покинуть источник ионов. Метастабильный ион диссоциирует до детектирования.

Молярная масса ($Molar Mass$): масса моля химического соединения ($\approx 6 \cdot 10^{23}$ атомов или молекул). Замечание: использование термина «молекулярный вес» не совсем корректно, так как вес — это гравитационная сила, действующая на

тело. Она варьируется с географическим местоположением. Исторически этот термин используется для обозначения молярной массы, вычисленной при помощи усреднения по всем изотопам составляющих химических элементов.

Молекулярный ион (*Molecular Ion*): ион, образовавшийся при потере одного или нескольких электронов молекулой (положительный ион) или добавлением одного или нескольких электронов к молекуле (отрицательный ион).

Молекулярный вес (*Molecular Weight*): см. обсуждение термина «молярная масса».

Моноизотопная масса (*Monoisotopic mass*): точная масса иона, вычисленная с помощью масс наиболее распространенных изотопов каждого элемента [1]. Данная рекомендация происходит из несколько неудачного утверждения, сделанного Ергеем (Yergey и др., [5]) в опубликованной на эту тему статье. Он рассматривал только элементы, у которых наиболее легкие изотопы являются и наиболее распространенными. Практические проблемы возникают для элементов, для которых это утверждение не работает (например Fe или В). В этой главе авторы предпочитают определение «масса иона или молекулы, вычисленная с использованием масс легчайших изотопов каждого элемента». Для молекул, содержащих наиболее распространенные элементы (С, Н, N, O, S) эти два определения идентичны, так как самые легкие изотопы перечисленных элементов являются и самыми распространенными. Однако для других элементов (Fe, В и др.) определения не тождественны. Цитохром С содержит один атом железа. В случае если моноизотопным пиком является пик, содержащий наиболее распространенные изотопы, моноизотопным пиком будет один из изобаров второго изотопного пика. Второй изотопный пик также содержит изобары с одним ^2H , одним ^{13}C , одним ^{15}N , одним ^{17}O или одним ^{33}S . Всего существует 6 изобаров, и только один из них истинный моноизотопный. При использовании определения «легчайший изотоп» первый изотопный пик будет истинно моноизотопным. Этот пик не будет иметь изобаров, и, следовательно, его легко определить.

Мониторинг выбранных (заданных) ионов (*Selected Ion Monitoring (SIM)*): режим масс-спектрометра, в котором регистрируются интенсивности одного или нескольких ионов со специфическими значениями m/z , а не весь масс-спектр в широком массовом диапазоне¹.

Мониторинг выбранных реакций (*Selected Reaction Monitoring (SRM)*): регистрация определенных ионов-продуктов, образующихся из выбранных ионов-предшественников с определенными значениями m/z при помощи двух- или более стадийной масс-спектрометрии. Мониторинг выбранных реакций может быть осуществлен с помощью тандемной масс-спектрометрии во времени или в пространстве. Термин «мониторинг множественных реакций» не следует использовать² [1].

¹ В русскоязычной литературе часто используется термин «масс-фрагментография».

² Тем не менее этот термин часто используется.

Мониторинг нескольких реакций (Multiple Reaction Monitoring (MRM)): см. мониторинг выбранных реакций.

Многостадийная масс-спектрометрия (Multiple-Stage Mass Spectrometry (MSⁿ)): многостадийный отбор ионов-предшественников по m/z с последующим детектированием ионов-продуктов последовательных реакций диссоциации.

Нейтральные потери (Neutral Loss): потеря незаряженных групп ионом в ходе процесса перегруппировки или прямой диссоциации.

Номинальная масса (Nominal Mass): масса иона или молекулы, вычисленная с использованием масс наиболее распространенных изотопов каждого элемента и округленная до ближайшего целого числа. Она эквивалентна сумме массовых чисел всех составляющих атомов.

Пример. Номинальная масса иона вычисляется сложением целых масс легчайших изотопов всех элементов, входящих в эту молекулу. Номинальная масса для H_2O — это $(2 \cdot 1) + 16$ Да = 18 Да.

Комментарий. Та же проблема возникает для моноизотопной массы компонентов, содержащих элементы типа *Fe* или *B*. См. дискуссию о моноизотопной массе.

Отношение массы к заряду (Mass-to Charge Ratio): см. обсуждение m/z .

Пик (Peak): локализованная область ионного сигнала в масс-спектре. Хотя пики часто ассоциируются с определенными ионами, не следует смешивать понятия «пик» и «ион».

Полный ионный ток, ПИТ (Total Ion Current (TIC)): сумма отдельных ионных токов, обусловленных всеми ионами в масс-спектре.

Протонированная молекула (Protonated Molecule): ион, образовавшийся при присоединении протона к молекуле, представляемый символом $[M + H]^+$. Термин «протонированный молекулярный ион» более не используется. Такое название относится к частице с двумя зарядами. Термины «псевдомолекулярный ион» и «квазимолекулярный ион» более не используются. Следует использовать специфический термин «протонированная молекула» или химическое описание, такое, как $[M + Na]^+$, $[M + H]^+$ и др. [1].

Разрешающая способность (Mass Resolving Power ($m/\Delta m$)): масса пика в масс-спектре, деленная на разность масс между пиками, при которой соседние пики разделяются, то есть $m/\Delta m$. Следует указывать метод получения Δm и массу m .

Разрешение по массе (Mass Resolution): минимальная разность Δm (Δm в Да или в $\Delta m/m$, например ppm) между двумя пиками равной высоты, такая, что разделение между этими пиками происходит на определенной высоте, выраженной в процентах [3].

Разрешение на высоте в 10 % (Ten Percent Valley Definition): пусть два пика одинаковой высоты в масс-спектре имеют массы m и $m + \Delta m$ и разделены на высоте в 10 % от высоты пиков. Пусть разделение для похожих пиков с массой, превышающей m , происходит на высоте, большей, чем 10 %. Тогда разрешение на высоте 10 % равно $m/\Delta m$. Отношение $m/\Delta m$ должно задаваться для различных значений m [4].

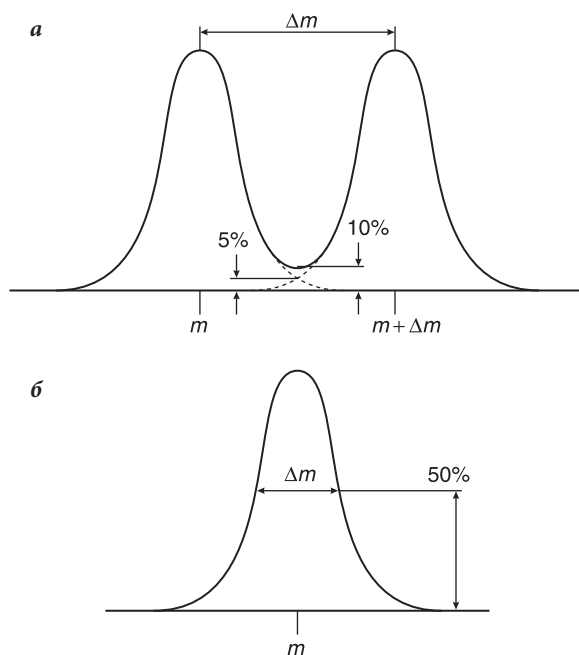


Рис. 1.1. Два различных метода определения разрешения по массе и разрешающей способности. *а)* Определение, основанное на разделении пиков на 10 %-м уровне их высоты. Разделение пиков Δm определяется как расстояние между центрами двух пиков одинаковой высоты, при котором пики разделяются друг от друга на высоте 10%. Если пики симметричные, то теоретически Δm равна ширине пика на уровне 5% его высоты. Данное определение наиболее точное, но непрактичное, так как обычно сложно найти пики одинаковой высоты, хорошо разделенные в масс-спектре. *б)* Определение, основанное на ширине пика на половине его высоты (полуширине) (*FWHM*). Такую ширину пика легко найти, так как требуется использовать только один пик, хорошо отделенный от других. Однако в этом случае разрешение не связано напрямую с separационными возможностями масс-спектрометра. Для гауссового пика определение с помощью *FWHM* дает разрешающую способность, приблизительно в два раза большую, чем основанная на разделении пиков на 10 %-м уровне их высоты

Комментарий: это типичный пример путаницы в определениях разрешения. В данном случае вместо термина разрешения правильней использовать фразу «разрешающая способность» (*mass resolving power*). Разрешающая способность — это единица, деленная на «разрешение».

Средняя масса (Average Mass): масса иона, атома или молекулы, вычисленная с помощью масс всех изотопов каждого элемента с учетом естественной распространенности изотопов. См. также близкие к теме термины: *точная масса*; *дальтон*; *молярная масса*; *моноизотопная масса*; *номинальная масса*; *унифицированная атомная единица массы*.

Тандемная масс-спектрометрия (Tandem Mass spectrometry): см. MS/MS.

Томсон (Thomson (Th)): см. обсуждение *m/z*.

Торр (Torr): единица давления вне системы СИ. 1 торр = 1 мм рт. ст. = 1,33322 мбар = 133,322 Па.

Точная масса (*Accurate Mass*): экспериментально определенная масса иона, которая используется в формулах элементного состава. Для ионов, содержащих C, H, N, O, P, S и галогены с массой менее 200 Да, измерения с погрешностью 5 ppm достаточно для однозначного определения элементного состава. См. также близкие к теме термины: *средняя масса*; *дальтон*; *молярная масса*; *моноизотопная масса*; *номинальная масса*; *унифицированная атомная единица массы*.

Точность измерения массы (*Mass Accuracy*): разность между измеренной и действительной массой [3]. Может быть выражена как в абсолютных, так и в относительных единицах.

Трансмиссия (*Transmission*): отношение числа ионов, покидающих некоторую область масс-спектрометра, к числу ионов, поступающих в эту область.

Унифицированная атомная единица массы (*Unified Atomic Mass Unit*): единица массы вне системы СИ. Определяется как 1/12 массы атома ^{12}C в его основном состоянии. Она равна $\approx 1,66 \cdot 10^{-27}$ кг. Термин «атомная единица массы» использовать не рекомендуется, так как он не является однозначным. Этот термин использовался для обозначения массы, измеренной относительно одного атома ^{16}O , или относительно массы атома кислорода, усредненной по изотопам, или относительно одного атома ^{12}C .

Фрагментный ион (*Fragment Ion*): см. термин «*ион-продукт*».

Фрагментные ионы (*Progeny Ions*): заряженные продукты серии последовательных реакций, включающие в себя ионы-продукты: первое поколение ионов-продуктов, второе поколение ионов-продуктов и т.д.

Ширина пика в масс-спектре ($\Delta m_{50\%}$) (*Mass peak Width*): полная ширина масс-спектрального пика на половине его высоты (полуширина) [3].

Хроматограмма по полному ионному току (*Total Ion Current Chromatogram*): хроматограмма, полученная построением зависимости полного иона тока серии масс-спектров от времени удерживания. См. также *экстрагированная ионная хроматограмма*.

Экстрагированная ионная хроматограмма¹ (*Extracted Ion Chromatogram*): хроматограмма, построенная как зависимость интенсивности сигнала для заданного m/z (или ряда значений m/z для серии масс-спектров) от времени удерживания. См. также близкий к теме термин «*хроматограмма по полному ионному току*».

Электрон-вольт (эВ) (*Electron Volt (eV)*): единица энергии, не входящая в систему СИ, определяемая как энергия, приобретаемая частицей, содержащей единичный заряд, при прохождении разности потенциалов в один вольт. $1 \text{ эВ} \approx 1,6 \cdot 10^{-19}$ Дж.

Эффективность ионизации (*Ionization Efficiency*): отношение числа образовавшихся ионов к числу атомов или молекул, введенных в источник.

Эффект пространственного заряда (*Space-Charge Effect*): результат взаимного отталкивания частиц с зарядами одинаковой полярности. Ведет к ограничению по току пучка заряженных частиц или пакета частиц, вызывает дополни-

¹ В литературе часто используется также термин «масс-хроматограмма».

тельное движение ионов помимо движения, обусловленного внешними полями.

Ширина пика (*Peak Width Definition*): для одиночного пика однозарядного иона с массой m разрешение может быть определено как $m/\Delta m$, где Δm — ширина пика на высоте, составляющей часть полной высоты пика. Рекомендуется использовать разрешение для 50 %, 5 % и 0,5 % от высоты пика. Заметьте, что для изолированного симметричного пика, зарегистрированного на масс-спектрометре, обеспечивающем линейность в диапазоне от 5 до 10 % высоты пика, разрешение в 5 % эквивалентно разрешению пиков на высоте 10 %. Общепринятое стандартное определение разрешения основано на Δm , взятой на полувысоте пика [4].

Комментарий: см. комментарий к разрешению пиков на высоте 10 %.

Аббревиатуры и единицы

2-ДГЭ (2-DGE)	— двумерный гель-электрофорез
a (a)	— атто, 10^{-18}
ПТ (AC)	— переменный ток
УМС (AMS)	— ускорительная масс-спектрометрия
ХИАД (APCI)	— химическая ионизация при атмосферном давлении
ИАД (API)	— ионизация при атмосферном давлении
МАЛДИ АД (AP-MALDI)	— матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация при атмосферном давлении
ФИАД (APPI)	— фотоионизация при атмосферном давлении
ТААД (ASAP)	— твердотельный анализ при атмосферном давлении
ДИАЧТ (BIRD)	— диссоциация излучением абсолютно черного тела
c (c)	— санти, 10^{-2}
ДАС (CAD) ¹	— диссоциация, активированная столкновениями (соударениями)
КЭ (CE)	— капиллярный электрофорез
НП (CF)	— непрерывный поток
ББАНП	— бомбардировка быстрыми атомами при постоянном потоке
ХИ (CI)	— химическая ионизация
ДИС (CID) ²	— диссоциация, индуцированная столкновениями (соударениями)
нв (cw)	— непрерывная волна
КЗЭ (CZE)	— капиллярный зонный электрофорез
Да (Da)	— дальтон

¹ Синоним ДИС.

² Синоним ДАС.

- ДХИАД (APDCI) — десорбционная химическая ионизация при атмосферном давлении
- ДАРТ (DART) — прямой анализ в режиме реального времени¹

Литература

1. IUPAC. *Standard Definitions of Terms Relating to Mass Spectrometry — Provisional Recommendations*. 2006.
Available at <http://www.iupac.org/web/ins/2003-056-2-500>.
2. IUPAC. Mass Spectrometry Terms and Definitions Project Page. 2007.
Available at http://www.msterms.com/wiki/index.php?title=Main_Page.
3. A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, and S. D. Shi. «Scaling MS Plateaus with High-Resolution FT-ICRMS». *Anal. Chem.*, 74(2002): 252A–259A.
4. J. Incze' dy, T. Lengyel, A. M. Urc, A. Gelencse' r, and A. Hulanicki. *Compendium of Analytical Nomenclature (The Orange Book)*. 1997.
Available at http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/.
5. J. Yergey, D. Heller, G. Hansen, R. J. Cotter and C. Fenselau. «Isotopic Distributions in Mass Spectra of Large Molecules». *Anal. Chem.*, 55(1983): 353–356.

¹ К сожалению, этот принятый термин ничего не говорит о реальной сути одного из наиболее популярных в настоящее время методов масс-спектрометрии без предварительной пробоподготовки.

ГЛАВА 2

СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРА

*Анн Вестман-Бринкмальм
и Гуннар Бринкмальм*

Масс-спектрометр состоит из трех основных частей: источника ионов, масс-анализатора и детектора. Так как масс-анализатор, детектор и большинство источников ионов требуют низкого давления, масс-спектрометр также должен быть оснащен вакуумной системой. Кроме того, необходимо наличие системы регистрации сигнала, поступающего с детектора. В самом начале развития масс-спектрометрии запись спектров производилась на фотопластинах. Однако сейчас почти все приборы имеют компьютерную систему регистрации. Компьютеры также используются для обработки данных, например для идентификации белков. Как правило, в сочетании с масс-спектрометром для предварительного разделения анализируемой смеси используются и другие приборы, например хроматографы, работающие в онлайн- или офлайн-режимах.

В этой главе мы не будем касаться вакуумной системы и систем регистрации, которые, тем не менее, являются жизненно важными элементами масс-спектрометров. Многие современные методы анализа были бы нереализуемы или их применение было бы серьезно ограничено без компьютеров. Возможно, наиболее яркий пример — это химический имиджинг¹.

2.1. Источники ионов

Роль источника ионов в масс-спектрометрии — получение газофазных ионов. Атомы, молекулы или кластеры исследуемых соединений переходят в газовую фазу и ионизируются или напрямую (как в электроспрее), или посредством каскада отдельных процессов (как, например, в тлеющем разряде). Выбор источника ионов зависит от задачи. Так называемые мягкие методы ионизации способны генерировать неразрушенные ионы больших хрупких молекул, таких как белки, нуклеиновые кислоты и даже нековалентно связанные комплексы. Другие источники ионов, например источники тлеющего разряда и индуктивно-связанной плазмы, атомизируют пробу. Они могут использоваться для очень точного количественного анализа и применяются, в частности, для измерения изотопных соотношений, определяющих географическое происхождение образца по незначи-

¹ См. А.Т. Лебедев «Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды» М.: Техносфера, 2013. - 624с.

тельным различиям в распределении изотопов. Число всевозможных источников ионов велико даже без рассмотрения их модификаций. Мы попытались рассмотреть главные типы источников ионов, хотя для некоторых из них описание будет довольно кратким. Некоторые из описываемых источников уже не используются, но представляют интерес с исторической точки зрения. Некоторые источники ионов весьма специализированны, тогда как другие весьма универсальны. Классификация источников ионов иногда затруднительна, так как существующие категории часто перекрываются. Однако основные типы могут быть выделены. Табл. 2.1 предоставляет обзор описываемых в этой главе методов ионизации. Читателю не следует расстраиваться из-за сложности данной темы. Ему следует выборочно читать части текста, представляющие в данный момент наибольший интерес.

Таблица 2.1. Обзор методов ионизации, описанных в главе 2

Метод	Сокращение	Природа ионизации	Тип ионов	Область приложения*
Газовый разряд	—	Разряд	Атомарные ионы	Первый метод ионизации в масс-спектрометрии
Термоионизация	ТИ	Ионизация нагреванием	Атомарные ионы	Измерение изотопных соотношений, элементный анализ следовых количеств, анализ твердых проб
Искровой источник ионов	ИИ	Разряд	Атомарные ионы	Элементный анализ следовых количеств в твердых пробах
Тлеющий разряд	ТР	Плазменный источник	Атомарные ионы	Элементный анализ следовых количеств
Индуктивно-связанная плазма	ИСП	Плазменный источник	Атомарные ионы	Измерение изотопных соотношений, элементный анализ следовых количеств
Ионизация электронами	ИЭ	Ионизация, индуцированная электронами	Молекулярные ионы летучих соединений	Небольшие молекулы, ГХ-МС, создание библиотек спектров
Химическая ионизация	ХИ	Ионизация, индуцированная электронами*	Молекулярные ионы летучих соединений	ГХ-МС
Химическая ионизация при атмосферном давлении	ХИАД	Ионизация, индуцированная электронами*	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Небольшие молекулы, ЖХ-МС
Фотоионизация	ФИ	Фотоионизация	Молекулярные ионы летучих соединений	Небольшие молекулы, ГХ-МС
Многофотонная ионизация	МФИ	Фотоионизация	Атомные и молекулярные ионы	Резонансная МФИ высокоселективна, используется для элементного анализа следовых количеств

Метод	Сокращение	Природа ионизации	Тип ионов	Область приложения*
Фотоионизация при атмосферном давлении	ФИАД	Фотоионизация	Молекулярные ионы нелетучих соединений	ЖХ-МС, неполярные соединения
Полевая ионизация	ПИ	Ионизация в сильном электрическом поле	Молекулярные ионы летучих соединений	Молекулярные соединения
Полевая десорбция	ПД	Десорбция / Ионизация в сильном электрическом поле	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Первый метод мягкой ионизации, большие молекулы
Термоспрей (термораспыление)	ТРИ	Распыление	Молекулярные ионы нелетучих соединений	ЖХ-МС
Электроспрей (электрораспыление)	ЭРИ	Распыление	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Мягкая ионизация, ЖХ-МС, большие молекулы
Десорбционное электрораспыление	ДЭРИ	Распыление	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Прямой анализ без пробоподготовки
Прямой анализ в режиме реального времени	ДАРТ	Разряд	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Прямой анализ без пробоподготовки
Вторично-ионная масс-спектрометрия	ВИМС	Десорбция / ионизация, индуцированная частицами	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Полупроводники, анализ поверхности, имиджинг
Бомбардировка быстрыми атомами	ББА	Десорбция / ионизация, индуцированная частицами	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Мягкая ионизация**, большие молекулы
Плазменная десорбция	ПД	Десорбция / ионизация, индуцированная частицами	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Мягкая ионизация, большие молекулы
Лазерная десорбция / ионизация	ЛДИ	Десорбция / ионизация, индуцированная фотонами	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Измерение изотопных соотношений, анализ следовых количеств
Матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация	МАЛДИ	Десорбция / ионизация, индуцированная фотонами	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Мягкая ионизация, большие молекулы
Матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация при атмосферном давлении	МАЛДИ АД	Десорбция / ионизация, индуцированная фотонами	Молекулярные ионы нелетучих соединений	Мягкая ионизация, большие молекулы

Столбец «Область приложения» не содержит все возможные применения.

* Все же следует подчеркнуть, что в этих методах ионизация аналитов осуществляется в результате взаимодействия молекул с ионизированными частицами в источнике ионов.

** Метод ББА, строго говоря, не может считаться мягким, поскольку помимо молекулярных ионов образуется широкий набор фрагментных ионов.

2.1.1. Газовый разряд

Первое упоминание о получении ионов относится к 1886 году, когда Голдштейн обнаружил, что в газоразрядных трубках с перфорированным катодом можно наблюдать свечение [1]. (Следует отметить, что природа этого явления так до конца и не понята.) Впоследствии Вин [2] и Томсон [3] продолжили исследование газового разряда, и Томсон сконструировал первый масс-спектрограф с источником ионов на основе газового разряда [4]. В то время газоразрядный источник ионов состоял из катода и анода, помещенных в заполненную газом с давлением не более 1 торр стеклянную трубку. При подаче разности потенциалов между электродами возникал разряд и появлялись ионы. Следовательно, образовывались пучки как ионов, так и электронов, которые могли быть детектированы при помощи соответствующего оборудования. Источники на основе тлеющего разряда (ТР) и индуктивно-связанной плазмы (ИСП) по сути происходят от источника ионов с газовым разрядом (см. разделы 2.1.4 и 2.1.5).

2.1.2. Термоионизация

В термоионизационной масс-спектрометрии (ТИМС, также известной как масс-спектрометрия с поверхностной ионизацией) ионы образуются при нагревании одного или нескольких катодов. ТИ — один из наиболее старых методов ионизации. Ее появление датировано 1906 годом, когда Герке и Райхенхайм получили ионы натрия при нагревании натриевых солей, нанесенных на анод разрядной трубки [5]. Демпстер первым использовал такую ионизацию для масс-спектрометрии в своем сканирующем магнитном секторном приборе в 1918 году [6]. В 1953 году Инграм и Чупка представили трехкатодный источник [7] с распространенной и ныне конструкцией (рис. 2.1). В ней образец, нанесенный на внешние катоды, нагревается и испаряется в направлении намного более горячего центрального катода. Молекулы ионизируются при соударении с этим нагретым катодом. В такой конструкции процессы испарения и ионизации изолированы, что позволяет лучше их контролировать. Эффективность ионизации может быть увеличена на несколько порядков по сравнению с вариантом с одним катодом. Поэтому

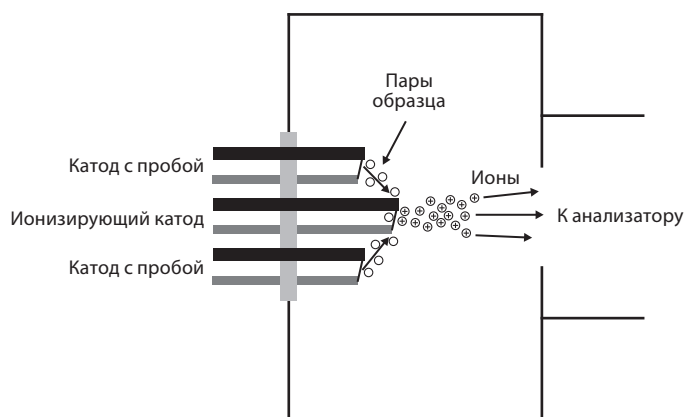


Рис. 2.1. Схема источника термоионизации (ТИ). Каждый катод состоит из двух контактов, соединенных проволокой

даже элементы с энергией ионизации, большей, чем работа выхода электрона с поверхности катода, могут быть эффективно ионизированы. Эффективность ионизации зависит только от химических и физических свойств поверхности катода. Поэтому минимизация загрязненности катода имеет большое значение. В зависимости от анализируемого соединения могут образовываться как положительные, так и отрицательные ионы.

ТИ — очень точный и воспроизводимый метод измерения соотношений стабильных изотопов и количественного анализа с помощью, например, масс-спектрометрии изотопного разбавления [8]. ТИ как непрерывный источник ионов предпочтителен для анализаторов, работающих с непрерывными пучками, в частности для секторных масс-спектрометров, обеспечивающих в сочетании с термоионизационными источниками высокую воспроизводимость и точность количественного анализа.

Примерно с 1990 года индуктивно-связанная плазма (ИСП) начала вытеснять ТИ в области количественного элементного анализа [9]. Хотя ТИ в некоторых случаях может обеспечивать лучшее качество анализа, ИСП — более универсальный метод ионизации, требующий к тому же меньших усилий при подготовке образцов. Кроме того, преимущество ТИ как более точного метода зачастую нивелируется свойствами самой пробы, например ее неомогенностью. Однако в некоторых областях (например при анализе изотопов и в геохронологии) термоионизация все еще используется достаточно широко.

2.1.3. Искровой источник

В 30-х годах Демпстер представил искровой источник (ИИ, также известный как искровая ионизация или искра в вакууме) для анализа изотопов металлов, т.е. аналитов, не ионизируемых ТИ [15, 16]. Ионы, образующиеся в искровом разряде, имеют широкое распределение по энергиям (несколько килоэлектронвольт), так что для получения достаточного разрешения требуется применение масс-спектрометров с двойной фокусировкой (см. раздел 2.2.2). Искра создает очень нестабильный ионный ток, делая ее использование проблематичным. Горман с коллегами [17] представили прибор с электрической регистрацией, содержащий коллектор для контроля ионного тока, расположенный перед входом в анализатор. В такой конструкции интенсивность сигнала после разделения по m/z может быть откалибрована, что делает возможным количественный анализ. Начало использованию искровых источников положил Ханней в 1954 году, когда он представил прибор для анализа полупроводников, содержащих примеси на уровне долей ppm [18–20].

Искровая ионизация эффективна при анализе твердых проб. В наиболее распространенной конфигурации искровой разряд в вакууме генерируется между двумя электродами при помощи подачи переменного напряжения радиочастотного диапазона амплитудой в несколько десятков киловольт. Концами электродов являются анализируемые образцы (рис. 2.2). Если образец порошкообразный, то он может быть спрессован до нужной формы. Процессы в плазменном разряде вызывают испарение, атомизацию и ионизацию материала пробы. Генерируются в основном однозарядные атомарные ионы. Ионы ускоряются полем высокой напряженности к выходной щели источника и поступают в анализатор.

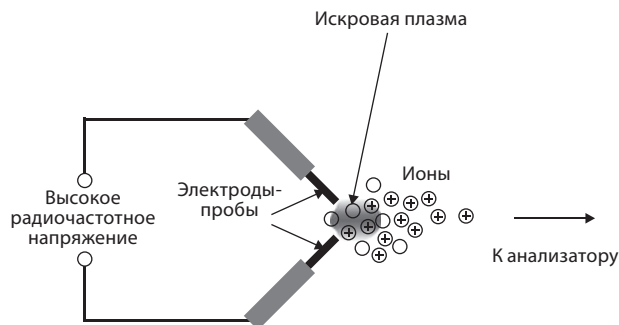


Рис. 2.2. Схема искрового источника ионов

Масс-спектрометрия искрового разряда используется для многоэлементного анализа примесей в проводниках, полупроводниках и изоляторах (например, в геологических образцах). Будучи востребованным в прошлом, искровой источник был впоследствии замещен методами плазменной ионизации (см. разделы 2.1.4 и 2.1.5). Для полного обзора искровых и других источников ионов, использующихся в масс-спектрометрии неорганических соединений, смотрите ссылку [21].

2.1.4. Тлеющий разряд

Масс-спектрометрия тлеющего разряда (МСТР) была введена Харрисоном и Маджи в 1974 году [22]. Источник ТР также используется и для других методов анализа: атомно-абсорбционного, атомно-эмиссионного и атомно-флуоресцентного. Источник ТР состоит из металлического катода, содержащего пробу и помещенного на подвижный зонд, и анода в виде цилиндра из нержавеющей стали, окружающего пробу (рис. 2.3). Разрядный газ (обычно аргон высокой чистоты) напускается в источник через игольчатый клапан, расположенный на аноде. В источнике поддерживается давление на уровне 1 мм рт. ст. Наиболее распространен источник ТР с постоянным напряжением. Когда напряжение между электродами достаточно велико, происходит разряд. При определенном давлении, напряжении и токе получается оптимальный разряд. При использовании аргона в разряде образуются ионы Ar^+ , которые ускоряются к катоду и распыляют его материал. Процесс распыления аналогичен процессам, используемым во вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС) и бомбардировке быстрыми атомами (ББА, см. разделы 2.1.18 и 2.1.19). Положительно заряженные частицы, эмитируемые с катода, немедленно возвращаются на него, тогда как отрицательно заряженные ускоряются к аноду. Следовательно, только нейтральные частицы проникают в зону тлеющего разряда, где они ионизируются в основном благодаря ионизации Пеннинга, но также и электронами с помощью перезарядки. Положительно заряженные ионы, образовавшиеся вблизи от выходной щели, покидают источник в потоке газа.

Во многих масс-спектрометрических методах атомизация и ионизация проходят в один этап (например при термоионизации (ТИ), лазерной десорбции / ионизации (ЛДИ) и ВИМС). Такое явление ведет к существенным матричным эффектам, ограничивающим получение количественной информации [24]. В ТР атомизация происходит на поверхности катода, а ионизация – в отрицательной

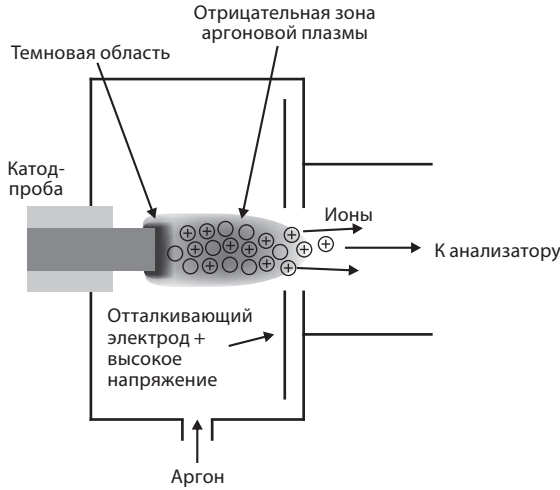


Рис. 2.3. Схема источника с тлеющим разрядом (ТР)

области разряда. Такое размежевание уменьшает матричные эффекты, а также помогает изучить состав поверхности катода (масс-спектрометрия вторичных нейтралей — другой метод, в котором процессы атомизации и ионизации разделены; см. раздел 2.1.18). Недостатком ТР является длительное время стабилизации разряда, то есть производительность анализа невысока. В результате распыления может также значительно загрязняться источник. Этот негативный момент требует тщательной чистки источника при анализе следовых количеств аналитов.

Тлеющий разряд генерирует непрерывный пучок ионов, поэтому он лучше всего сочетается с магнитными секторными и квадрупольными приборами, хотя использование ионных ловушек и времяпролетных анализаторов также возможно. Главное приложение ТР — многоэлементный анализ примесей в высокочистых проводниках и полупроводниках. Чувствительность прибора может достигать долей *ppb*. Изоляторы также могут анализироваться этим методом, однако для них существует проблема накопления заряда на поверхности изолятора в случае использования ТР с постоянным напряжением. Изоляторы могут быть смешаны с проводящими материалами (как в ВИМС). Другой вариант — использование ТР с переменным напряжением. Так как другие источники (например ИСП; см. раздел 2.1.5) менее сложны с точки зрения экспериментального использования, применение ТР ограничено. Смотрите более полные обзоры по ТР [23] и [25], а также [21], где ТР описывается вместе с другими источниками ионов, используемыми для анализа изоляторов.

2.1.5. Индуктивно-связанная плазма

Аналитическое применение индуктивно-связанной плазмы (ИСП) было представлено Хуком в 1978 году [26]. До этого события Грей в 1974 году показал, что масс-спектры могут быть получены с помощью плазмы, образующейся при использовании постоянного напряжения [27]. Как и ТР, ИСП первоначально была

использована в других методах анализа, в частности в атомно-эмиссионной спектроскопии. В настоящее время ИСП-МС — наиболее популярный метод анализа неорганических веществ, а его приложения включают в себя измерение изотопных соотношений и элементный анализ следовых количеств. Данный метод чувствителен и универсален. Пределы обнаружения лежат в диапазоне от 1 до 100 пг/л, и даже доли пикограмма могут детектироваться. Интерфейс ввода ионов при постоянном давлении позволяет сочетать ИСП с жидкостной хроматографией. Исключительная точность определения концентраций делает ИСП предпочтительным методом для количественного анализа.

Типичный источник ИСП состоит из горелки и индуктивной катушки, в которую впрыскивается анализируемый аэрозоль (рис. 2.4). Плазма поддерживается с помощью энергии электромагнитного радиочастотного поля, которая передается внешнему слою, имеющему тороидальную форму. Проба в потоке аргона подается вдоль оси тора в его центральную часть, которая нагревается от внешнего слоя. Разделение областей подачи пробы и нагрева плазмы означает, что проба минимально влияет на процесс поддержания плазмы. Кроме того, так как электроды не контактируют с плазмой, загрязнение от материалов конструкции минимально или отсутствует совсем. Сложность использования ИСП-МС заключается в необходимости транспортировки ионов из области атмосферного давления с температурой в 5000 К в вакуумную часть масс-анализатора. Проблема решается охлаждением экстрагирующего конуса, имеющего входное отверстие менее 1 мм, потоком воды. За первым конусом на расстоянии, оптимальном для максимального пропускания ионов во вторую вакуумную камеру, располагается другой электрод с небольшим отверстием. Давление во второй камере достаточно низкое, так что в ней могут быть использованы ионно-оптические линзы для оптимизации интенсивности сигнала.

Проба находится в плазме ~2 мс и эффективно атомизируется, а в большинстве случаев ионизируется. Эффективность ионизации для более чем 50 элементов составляет более 90 % [28]. В плазме образуются, как правило, однозарядные ионы, но некоторые элементы не ионизируются из-за более высоких по сравнению с аргоном энергий ионизации. Атомы некоторых элементов могут ионизироваться в двухзарядные ионы из-за низких вторых потенциалов ионизации. Так

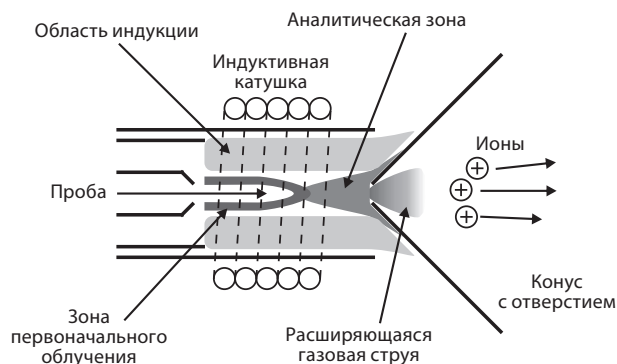


Рис. 2.4. Схема источника ионов с индуктивно-связанной плазмой

же следует отметить образование оксидов для некоторых элементов. Для обеспечения большей эффективности ионизации элементов с высокими энергиями ионизации (например галогенов) аргон можно заменить гелием [29]. Вследствие непрерывности ионного пучка, формирующегося в источниках ионов с ИСП, предпочтительно комбинировать ИСП с магнитными секторными и квадрупольными анализаторами. Существует несколько методов ввода образца в приборах с ИСП: распыление, электрохимическое испарение, газовая хроматография, генерация гидридов и лазерная абляция [30]. Лазерная абляция в сочетании с ИСП (ЛА-ИСП) — полезный метод анализа твердых проб. В этом случае перед источником располагается ячейка абляции. Поток аргона направляется через ячейку к источнику ионов. Проба облучается лазером, и десорбированный материал пробы направляется потоком аргона в плазму и ионизируется. Для более полного обзора ИСП и других источников ионов, применяемых для анализа неорганических проб, смотрите ссылку [21] и главу 9.

2.1.6. Ионизация электронами

Ионизация электронами (ИЭ) впервые была продемонстрирована Демпстером в 1921 году, который использовал ее для измерения изотопов лития и магния [31]. Современные источники на основе ионизации электронами, тем не менее, базируются на конструкциях, предложенных Бликни [32] и Ниром [33, 34], работавших в лаборатории профессора Дж. Т. Тэйта. В этом методе пучок электронов направляется на пары исследуемых молекул.

Источник ИЭ состоит из камеры с несколькими отверстиями (рис. 2.5). Исследуемые молекулы направляются в камеру. Электронный пучок формируется при нагревании катода, затем электроны пересекают камеру и собираются на

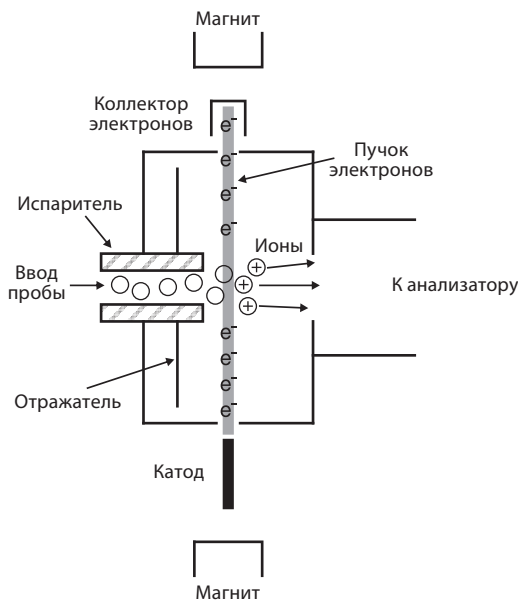


Рис. 2.5. Схема источника с ионизацией электронами

коллекторе. Магниты обеспечивают винтовые траектории электронов в целях увеличения их пути и, следовательно, вероятности взаимодействия электронов с анализируемыми молекулами. Так как масса электронов намного меньше массы ионов, ионы не подвергаются влиянию типичного для ИЭ магнитного поля. При взаимодействии электрона с молекулой один (или более) собственных электронов удаляется из молекулы. При этом, как правило, образуется молекулярный катион-радикал. Если исследуемые молекулы имеют высокое сродство к электрону, при присоединении электрона могут образовываться отрицательные ионы, однако использование отрицательных ионов в данном источнике имеет некоторые ограничения. В режиме положительных ионов энергия электронов обычно составляет 70 эВ, что соответствует максимуму сечения ионизации для большинства молекул [35]. Выход молекулярных ионов близок к максимуму, но в то же самое время образуется широкий круг интенсивных фрагментных ионов, которые могут быть использованы для определения структуры соединения.

Обычно ввод образца регулируется таким образом, чтобы свести к минимуму вероятность протекания ионно-молекулярных реакций. Даже принимая во внимание нежелательность интенсивной фрагментации, следует отметить, что масс-спектр ИЭ может использоваться как характеристика данной молекулы. Более того, так как спектры ИЭ относительно воспроизводимы и не зависят от прибора, были созданы представительные библиотеки таких спектров, использующиеся для идентификации соединений. Фрагментация может быть уменьшена понижением энергии электронов, но при этом значительно снижается и эффективность ионизации. Источник ИЭ генерирует непрерывный пучок ионов, так что он идеально совместим с квадрупольными и магнитными секторными приборами, однако и другие типы анализаторов могут использоваться. ИЭ, как правило, применяется для ГХ-МС-анализа органических молекул. Смотрите главу 5 для более подробного описания и главы 8 и 16, содержащие примеры других приложений ИЭ.

2.1.7. Химическая ионизация

В 1966 году Мансон и Филд представили метод химической ионизации (ХИ), связанный с использованием газа-реагента в источнике ионов с ИЭ [36–38]. Давление в источнике ХИ обычно составляет около 1 мм рт. ст., а электроны имеют энергию, большую, чем в источнике ИЭ: от 500 до 1000 эВ. В источнике ИЭ молекулы или атомы анализируемого вещества ионизируются непосредственно электронами, тогда как при химической ионизации процесс протекает в два этапа: сначала газ-реагент ионизируется электронами, а затем образовавшиеся ионы-реагенты передают заряд исследуемым молекулам. Изначально ХИ была адаптирована для генерирования положительных ионов, но в 1976 году Хант с коллегами применили ее для получения отрицательных ионов. Газ-реагент обычно инертен по своей природе, но способен экзотермически реагировать с анализируемым веществом. Выбор газа зависит от задачи (и режима анализа). Первоначально в качестве газа-реагента использовался метан, ионы которого взаимодействовали с молекулами пробы с образованием различных типов молекулярных или фрагментных ионов. Преимущество ХИ перед ИЭ заключается в большем выходе

молекулярных ионов. ХИ является более мягким методом ионизации¹. Несмотря на то, что большинство аналитов исследуется в режиме регистрации положительных ионов, образование отрицательных ионов — более селективный процесс, обеспечивающий более высокую чувствительность анализа. Он используется, например, при анализе сильных электрофоров методом ГХ-ХИ-МС в режиме регистрации отрицательных ионов. Недостаток ХИ заключается в необходимости более частой чистки источника. Для более подробного ознакомления с ХИ смотрите ссылку [40], а для изучения анализа отрицательных ионов — ссылку [41]. Предполагается, что ХИ также играет главную роль в шлейфе при образовании ионов в МАЛДИ (см. раздел 2.1.22). ХИ используется с теми же масс-анализаторами, что и источники ИЭ.

2.1.8. Химическая ионизация при атмосферном давлении

Химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД) была представлена Хорнингом с сотрудниками в 1973 году [38, 42, 43] в сочетании с газовой хроматографией. Эти труды также послужили началом разработки методов ионизации при атмосферном давлении. В 1974 году коронный разряд был впервые использован для получения ионов в сочетании с жидкостной хроматографией [44, 45]. При ХИАД пневматический распылитель вводит жидкую пробу в источник при атмосферном давлении. Капли спрея пролетают рядом с разрядным электродом, расположенным вблизи входного отверстия в масс-спектрометр. Как и другие источники, генерирующие непрерывный поток ионов, ХИАД удачно сочетается с магнитными секторными, квадрупольными и ортогональными времяпролетными анализаторами, а также с ионными ловушками. ХИАД в значительной степени вытеснил источники с химической ионизацией при низком давлении и часто используется на приборах с ЭРИ. При работе с менее полярными и небольшими молекулами ХИАД превосходит ЭРИ (см. раздел 2.1.15). Кроме того, ХИАД толерантнее ЭРИ к присутствию в пробах солей и буферов. Смотрите главу 8 для обзора приложений ХИАД.

2.1.9. Фотоионизация

Фотоионизация (ФИ) — термин, использующийся для фотоэффекта в газах. Фотоэффект был открыт Герцем [46] и интерпретирован Эйнштейном [47]. Это явление объясняет, например, природу полярного сияния. Источник фотоионизации — это, по существу, источник ионизации электронами, в котором пучок электронов замещен пучком фотонов.

Первые эксперименты по применению фотоионизации совместно с масс-спектрометрическим анализом были выполнены Дитчберном и Арнотом [48], которые ионизировали калий излучением железной дуги. При использовании монохроматора и разрядной лампы можно получить моноэнергетичный пучок фотонов в вакууме [49]. Таким образом, можно измерять выход ионизации в зависимости от энергии фотонов. Фотоионизация была предложена в качестве детектора для газовой хроматографии в середине 1970-х годов [50]. Она также использовалась в жидкостной хроматографии [51] и спектрометрии ионной подвижности [52]. Селективную ионизацию можно получить, если энергия ионизации анализируемых соеди-

¹ Подробнее см. А.Т. Лебедев «Масс-спектрометрия в органической химии», 2003.

нений ниже, чем у молекул газа-носителя, и используется лампа с энергией излучения в соответствующем диапазоне. Среди недавних приложений можно назвать использование синхротрона как перестраиваемого источника фотонов [53].

2.1.10. Многофотонная ионизация

При использовании для фотоионизации лазера (не путайте с лазерной десорбцией / ионизацией, где лазер облучает поверхность, см. раздел 2.1.21) можно повысить чувствительность и селективность. В 1970 году был выполнен первый масс-спектрометрический анализ молекул, фотоионизированных излучением лазера (а именно молекул H_2) [54]. Через два года была впервые получена селективная двухступенчатая ионизация рубидия [55]. Масс-спектрометрия с многофотонной ионизацией появилась в конце 1970-х [56–58]. Сочетание перестраиваемого лазера с масс-спектрометром оказалось очень полезным для изучения процессов возбуждения и диссоциации с получением масс-спектрометрических данных [59–62]. Вследствие импульсной природы источников многофотонной ионизации их предпочтительно соединять с времяпролетными анализаторами, хотя при использовании лазеров со свободной генерацией излучения возможна стыковка и с квадруполями [63]. Многофотонная ионизация осуществляется для газообразных молекул и атомов. Система ввода пробы определяется задачами. Например, проба может вводиться через ГХ-интерфейс путем испарения с поверхности, с помощью генерации вторичных нейтральных частиц, образующихся при ударе первичных частиц о поверхность (см. раздел 2.1.18), или как молекулярный пучок, вводимый через соответствующий интерфейс. Разнообразна и геометрия источников.

При резонансной многофотонной ионизации (РМФИ или РИ) используются фотоны ближнего ультрафиолета [60]. В ходе ионизации первый фотон, поглощаемый молекулой, переводит ее в промежуточное возбужденное состояние, а второй фотон вызывает ионизацию. Такой процесс не только повышает эффективность ионизации по сравнению с нерезонансной ионизацией, но он также и высокоселективен. Поэтому РИ применяется для спектроскопических исследований нейтральных частиц и кластеров. Для обзора РИ смотрите ссылки [63] и [64].

Один из методов изучения ионов выбранной энергии — пороговая ионизация, при которой образуются ионы с точно определенной энергией. Эти ионы могут использоваться для исследования мономолекулярной фрагментации, ионно-молекулярных реакций, ван-дер-ваальсовых кластеров и кластеров, связанных водородной связью [62].

2.1.11. Фотоионизация при атмосферном давлении

Первым фотоионизацию при атмосферном давлении исследовал И.А. Ревельский с коллегами [65, 66]¹. В целом как аналитический метод она была представлена Робом и его сотрудниками в 2000 году [67].

Эта работа также явилась первым примером сочетания фотоионизации с ЖХ-МС. ФИАД особенно полезна для ионизации неполярных соединений, которые практически невозможно ионизовать электроспреем или ХИАД. При

¹ За это изобретение И.А. Ревельский удостоен золотой медали Всероссийского масс-спектрометрического общества в 2011 году.

ФИАД образуются как положительные, так и отрицательные ионы. Применяются два подхода: прямая ионизация и ионизация посредством ионизирующегося допанта, такого как толуол или ацетон, которые добавляются в пробы в избыточном количестве [67, 69]¹. Ионизация молекул пробы при ЖХ-ФИАД-МС крайне неэффективна, так как молекулы растворителя поглощают эмитируемые фотоны. Ионизированный допант увеличивает эффективность посредством переноса заряда анализируемой молекуле. Этот эффект зависит от мощности лампы: при ее увеличении эффект допанта теряется. Источник ФИАД обычно является альтернативой для приборов, сконструированных для использования ЭРИ и ХИАД. Для обзора ФИАД смотрите ссылку [70].

2.1.12. Полевая ионизация

Полевая ионизация (ПИ) была открыта Мюллером, который наблюдал образование положительных ионов из газофазных атомов и молекул вблизи металлической поверхности, создающей сильное электростатическое поле. На основе этого эффекта Мюллер сконструировал полевой ионный микроскоп [71]. В 1954 году Инграм и Гомер соединили источник полевой ионизации с масс-спектрометром [72]. ПИ осуществляется воздействием на молекулы сильного электростатического поля напряженности $10^7 \dots 10^8$ В/см, что по крайней мере в 1000 раз больше напряженностей полей, существующих, в частности, в источниках ВИС или МАЛДИ. Такая напряженность достигается с помощью, например, тонкой вольфрамовой проволоки, активированной бензонитрилом [73, 74]². Активированная проволока покрыта острыми микроиглами, усиливающими напряженность поля вблизи проволоки. Обычно ПИ обеспечивает меньшую чувствительность, чем ИЭ, но ПИ генерирует практически исключительно молекулярные ионы, что классифицирует ее как мягкий метод ионизации. Следовательно, ПИ и ИЭ дополняют друг друга, и некоторые приборы разрабатываются под использование обоих методов. Дамико и Баррен [75], а также Бекки с коллегами соединили источник ПИ с ГХ. Так как ПИ — источник с непрерывным пучком ионов, он хорошо сочетается с квадрупольными и магнитными секторными приборами.

2.1.13. Полевая десорбция

Полевая десорбция (ПД) представлена Бекки в 1969 году [76]. ПД была первым мягким методом ионизации, позволяющим генерировать ионы нелетучих компонентов, таких как небольшие пептиды [77]. Разница между ПД и ПИ заключается в способе ввода пробы. В отличие от ПИ, где ионизируемые частицы находятся в газовой фазе, при ПД проба наносится на эмиттер и молекулы десорбируются с его поверхности. Пробу можно нанести на эмиттер путем смачивания его в растворе исследуемого вещества. Затем эмиттер помещают в источник ионов масс-спектрометра. Положение эмиттера, также как и его температура, критичны для анализа.

¹ В этом случае правильнее говорить о фотохимической ионизации при атмосферном давлении (ФХИАД).

² Правильнее говорить об использовании тонких углеродных игл, покрывающих эмиттер и образующихся при пиролизе бензонитрила. См. Дж. Чапмен «Практическая органическая масс-спектрометрия».

Следует отметить, что ПИ и ПД были вытеснены более эффективными методами ионизации, такими как МАЛДИ и ЭРИ. Для описания ПД (и ПИ) смотрите ссылку [78].

2.1.14. Термоспрей

Блэкли и Вестал представили термоспрей как средство соединения ЖХ с типичными потоками (~1 мл/мин) с масс-спектрометром [79]. В противоположность ранним ЖХ-МС-методам термоспрей успешно применялся для образования газофазных ионов нелетучих молекул. Жидкость распыляется из нагреваемого металлического капилляра и направляется в камеру низкого давления с нагретым газом.

Вследствие присутствия горячего газа небольшие капли в сформированной сверхзвуковой струе продолжают испаряться, в результате чего образуются газофазные ионы. В этом методе необходимо использовать заряженные и полярные соединения, а также летучие буферы. Температура испарителя критична и зависит от состава растворителя. Термоспрей как непрерывный источник ионов используется с квадрупольными и магнитно-секторными анализаторами. В настоящее время термоспрей вытеснен более стабильными и чувствительными методами, такими как ЭРИ и ХИАД. Детальный обзор метода и его приложений читатели могут найти в ссылках [80] и [81].

2.1.15. Электроспрей (электрораспыление)

Электрораспыление (ЭРИ) было впервые представлено Доулом и его коллегами в 1968 году [82], а в 1984 году Фенн и Ямашита соединили его с масс-спектрометром [83]¹. В ЭРИ проба растворяется в полярном и летучем буфере и вводится через иглу, находящуюся под высоким напряжением (положительным или отрицательным относительно входного отверстия масс-спектрометра) [83–85]. Высокое напряжение (1...4 кВ) приводит к формированию конуса Тэйлора, обогащенного положительными или отрицательными ионами. Поток заряженных частиц экстрагируется из конуса Тэйлора благодаря наличию электрического поля. Капли уменьшаются в размере вследствие процесса испарения, усиленного потоком теплого азота, сонаправленного потоку пробы (см. рис. 2.6). Ионы образуются при атмосферном давлении и поступают через канал конической формы в область промежуточного вакуума, а оттуда через небольшое отверстие — в область высокого вакуума масс-анализатора. ЭРИ может работать со всеми распространенными типами анализаторов. Точный механизм образования ионов из заряженных капель все еще не полностью раскрыт, и существуют различные теории этого процесса [82, 86, 87]. Пробоподготовка для ЭРИ требует только растворения образца до подходящей концентрации в смеси воды с органическими растворителями: как правило, метанолом, изопропанолом и ацетонитрилом. Небольшие концентрации муравьиной или уксусной кислот часто используются для усиления протонирования. В режиме регистрации отрицательных ионов, чтобы ини-

¹ Л.Н. Галль с сотрудниками опубликовали пионерскую работу по ЭРИ несколько раньше Фенна (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). За это изобретение Л.Н. Галль удостоена золотой медали Всероссийского масс-спектрометрического общества в 2009 году.

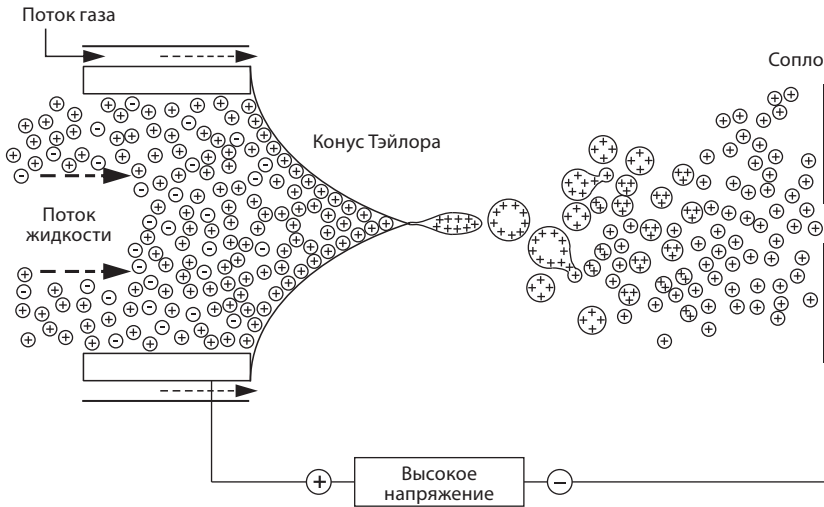


Рис. 2.6. Схема электрораспылительного источника (ЭРИ) ионов. Перепечатано из [288] с разрешения *John Wiley & Sons, Inc*

цировать депротонирование, принято добавлять растворы аммиака или летучих аминов.

Чувствительность ЭРИ очень высока — пределы обнаружения для многих пептидов составляют несколько фемтомолей или даже аттомоли. Однако чувствительность ЭРИ является функцией концентрации. Например, при потоках от 1 до 1000 мкл/мин обычные ЭРИ-источники потребляют очень много пробы. Поэтому преимущество имеют низкие потоки. Нано-ЭРИ (или наноспрей) — это версия с низкими скоростями потоков (20...200 нл/мин) [88, 89] соответственно, с низким расходом пробы и значительно более высокой чувствительностью. Наноэлектроспрей также оказался более устойчивым к присутствию солей, чем обычный электроспрей [88]. При соединении ЭРИ с капиллярным электрофорезом были детектированы доли аттомолей (см. раздел 2.2.6). ЭРИ-МС может быть использована для анализа полярных молекул в диапазоне от менее чем 100 Да до масс целого вируса (более 2 МДа) [90] и даже 100 МДа (одиночный ион ДНК) [91]. Важным свойством ЭРИ является способность генерировать распределение многозарядных ионов, что позволяет использовать масс-анализаторы с ограниченным диапазоном масс. Незначительные изменения условий анализа, такие как pH, состав растворителя, концентрация солей, частичная денатурация анализируемых молекул, могут изменить зарядовое распределение для больших молекул [92, 93]. Многолинейчатый спектр многозарядных ионов делает интерпретацию ЭРИ-спектров сложных смесей затруднительной. На практике для преобразования таких спектров в спектр единичных ионов с соответствующими молекулярными массами и нулевым зарядом используются компьютеры.

ЭРИ — чрезвычайно мягкий метод ионизации с очень незначительной фрагментацией образующихся молекулярных ионов. Вследствие этого слабые связи часто сохраняются, что позволяет изучать посттрансляционные модификации

пептидов и белков, а также нековалентно-связанные комплексы, например белково-лигандные [94–99]. Хотя ионы не фрагментируются в ходе ЭРИ, они очень удобны для диссоциации, индуцированной столкновениями (ДИС) (см. главу 3), так как ионы с высоким зарядом приобретают большую кинетическую энергию [100]. Подавление ионного сигнала из-за конкурентной ионизации является главной проблемой ЭРИ, препятствующей анализу сложных смесей без предварительного хроматографического разделения. Эта проблема, а также сильная зависимость сигнала от экспериментальных условий, таких, как pH, состав растворителя и концентрации солей, затрудняет использование ЭРИ для количественного анализа. Однако, как и в МАЛДИ-МС, количественный анализ может быть осуществлен в ограниченном диапазоне концентраций при использовании специально подобранного внутреннего стандарта известной концентрации и информации об анализируемых пептидах и белках [101]. Сочетание ионизации при атмосферном давлении с непрерывным потоком растворителя позволяет соединять ЭРИ с другими методами разделения: жидкостной хроматографией (ЖХ, глава 4) и капиллярным электрофорезом (КЭ, глава 4). Для обзора приложений смотрите также главы 8, 10 и 12.

2.1.16. Десорбционная электрораспылительная ионизация (ДЭРИ)

Десорбционная электрораспылительная ионизация (ДЭРИ) была представлена Такачем и его коллегами [102]. Само явление наблюдалось и ранее, но интерпретировалось как некий «артефакт» (например, оно объяснялось тем, что анализируемые ионы или ионы калибровочной смеси адсорбировались на стенках транспортного капилляра, что вело к появлению необъяснимых пиков в масс-спектрах). Идея использования электроспрея для десорбции как оригинальна, так и проста. Метод чувствителен, причем могут быть детектированы большие молекулы, например белки, а наблюдаемые ионы более-менее аналогичны образующимся в процессе обычного электрораспыления.

ДЭРИ-источник состоит из иглы для спрея и коаксиальной трубки для подачи газа-распылителя. На иглу, направленную на поверхность-мишень, подается высокое напряжение (рис. 2.7). Десорбированные с поверхности ионы пробы поступают во входное отверстие масс-спектрометра. Типичные расстояния между иглой, пробой и входным отверстием составляют от нескольких миллиметров до

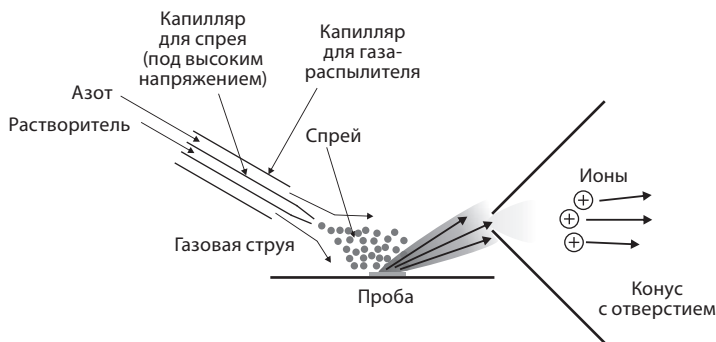


Рис. 2.7. Схема десорбционно-электрораспылительного источника (ДЭРИ) ионов

нескольких сантиметров. Оптимальная геометрия зависит от пробы и размера анализируемой области. Преимуществом ДЭРИ является тот факт, что мишенью в принципе может быть любая поверхность, а время анализа весьма небольшое — порядка нескольких секунд. Это означает, что экспресс-анализ может быть выполнен без специальной пробоподготовки. Образец, например банкнота, помидор или таблетка, могут быть помещены близко ко входу в масс-спектрометр, а спектр может быть получен через несколько секунд. Существует множество приложений метода, включая высокопроизводительный анализ, скрининг следовых концентраций наркотиков и обнаружение других загрязнений. ДЭРИ также обладает потенциалом для химического имиджинга [103]. Для более полного обзора ДЭРИ смотрите ссылки [104] и [105].

Существует несколько модификаций ДЭРИ. Если заменить электроспрейный эмиттер на металлическую иглу и направлять пары пробы в поток коаксиального газа, можно получить десорбционную химическую ионизацию при атмосферном давлении (ДХИАД) [106]. Другая версия ДЭРИ — анализ твердых проб при атмосферном давлении (АТПАД), когда нагретая струя газа десорбирует анализируемые молекулы, которые ионизируются в коронном разряде [107]. Существует также электроспрейно-ассистированная лазерная десорбция / ионизация (ЭАЛДИ), когда испаренные лазером нейтральные частицы ионизируются заряженными каплями электроспрея [108].

2.1.17. Прямой анализ в режиме реального времени

Прямой анализ в режиме реального времени (ДАРТ) был впервые представлен Коди и его коллегами в 2005 году [109]. Как и в ДЭРИ, пробы не нуждаются в предварительной подготовке перед анализом. Если с помощью ДЭРИ можно анализировать небольшие белки, то ДАРТ годится только для анализа небольших ионов с массой до 1 кДа или немного более. Однако, также как и в ВИМС, ДАРТ позволяет получить спектры фрагментации больших молекул, что дает полезную информацию об анализируемом веществе даже в отсутствие молекулярного иона.

При ДАРТ газ (гелий или азот) напускается в разрядную камеру. Разряд иницируется приложением высокого напряжения между электродами, в результате чего образуется плазма, содержащая заряженные и возбужденные частицы. Сгустком частиц можно управлять в целях, например, удаления нежелательных ионов. Его можно также нагревать. Из источника пучок ионов направляется во входное отверстие масс-спектрометра. Типичное расстояние от источника до входа в масс-спектрометр составляет от 5 до 25 мм, но ионы наблюдаются на расстоянии до 1 м, так что положение источника не столь критично. ПАРПВ удобно совмещать с теми же анализаторами, что и ЭРИ, — квадрупольными, магнитно-секторными, квадрупольно-времяпролетными анализаторами и ионными ловушками. Приложения более-менее те же, что и для ДЭРИ (см. раздел 2.1.16). Для сравнения ДАРТ с ДЭРИ и ДХИАД смотрите ссылку [110].

2.1.18. Вторично-ионная масс-спектрометрия

Вторично-ионная масс-спектрометрия имеет продолжительную историю, хотя термин ВИМС (*SIMS*) не употреблялся до 1970 года. Испускание поверхностью ионов и нейтральных частиц в результате бомбардировки ионами наблюдал еще

Дж. Дж. Томсон в 1910 году [111]. В 1979 году Херцог и Вибек сконструировали источник вторичных ионов для масс-спектрометра [112], тогда как первый опытный прибор был создан Хонигом в 1950-е [113–115]. В начале 1960-х Кастэйнг и Слодзьян изобрели вторично-ионный микроскоп [116]. Либль продолжил разработки в этой области и в 1967 году сконструировал ионный микроскоп [117]. В середине 70-х Бенингховен с коллегами получил первые вторично-ионные спектры аминокислот [118]. Совершенствование метода продолжалось путем разработки новых типов источников первичных ионов и улучшения других компонентов, что воплотилось в современный метод химического имиджинга, молекулярного анализа проб по глубине и анализа поверхности. Сейчас с помощью ВИМС возможен анализ частиц с массой до 10 кДа, хотя чувствительность для молекул с массой более 1 кДа не очень высока. Для большинства приложений диапазон масс ограничен 300 Да. Более крупные объекты могут быть, тем не менее, идентифицированы по характерным спектрам фрагментации, что, как правило, обеспечивает достаточную информацию.

Соударение первичного иона с поверхностью, по всей видимости, инициирует каскад столкновений с атомами поверхности, что ведет к испусканию нейтральных молекул и ионов посредством так называемого распыления (рис. 2.8) [119]. Приложения ВИМС можно разделить на две основные области: статическая ВИМС, когда объектом анализа является поверхность образца, и динамическая ВИМС, когда анализируется профиль пробы по глубине. При статической ВИМС облучение пробы невелико (полная доза — менее 10^{13} ионов/см²), поэтому повреждением поверхности можно пренебречь. Времяпролетный анализатор больше других подходит для статической ВИМС, особенно для имиджинга — метода, обладающего пространственным разрешением в доли микрона [120]. (См. также

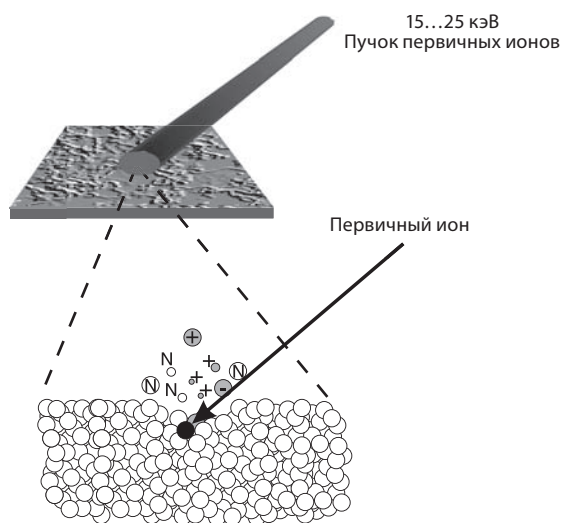


Рис. 2.8.

Схема распыления в ВИМС. С поверхности десорбируются главным образом нейтральные частицы, а также некоторое количество положительных и отрицательных ионов. Для образцов, содержащих низкомолекулярные соединения, можно получить целые молекулярные ионы. Тем не менее большая часть десорбированных частиц диссоциирует

главу 13.) Динамическая ВИМС, с другой стороны, использует тот факт, что материал десорбируется только с поверхности. В динамической ВИМС большая часть информации о молекулярных ионах теряется, но могут детектироваться атомы и небольшие молекулы. Так как динамическая ВИМС с непрерывным первичным ионным пучком намного быстрее, чем динамическая ВИМС с импульсной подачей первичных ионов, в этом случае используются квадрупольные и магнитные секторные анализаторы. В основном статическая ВИМС применяется в микроэлектронике, материаловедении, биотехнологии и медицине, а также для анализа полимеров. Динамическая ВИМС используется в металлургии, геохронологии, биологии и для анализа полупроводников. Подробный обзор ВИМС, включая ее приложения, можно найти в ссылках [121–123]. Технические аспекты ВИМС описаны в [114] и [115].

В ВИМС анализируемые ионы (то есть вторичные ионы) образуются при облучении поверхности непрерывным или импульсным пучком первичных ионов (рис. 2.8). Первичные ионы, как правило, однозарядные с кинетической энергией в несколько десятков килоэлектронвольт, однако существуют и источники с энергиями первичных ионов менее 1 кВ. Коммерческие приборы обычно комплектуются блоками питания, обеспечивающими энергию первичных ионов в 25...30 кВ, что определяет верхний предел их кинетической энергии. Как правило, выход вторичных ионов возрастает с увеличением массы первичных ионов, что ведет к увеличению чувствительности и сокращению времени анализа. При таком подходе возникают некоторые технические трудности, ведущие к снижению пространственного и массового разрешения. Времяпролетные и магнитные анализаторы обеспечивают разрешение как минимум 10000, что является достаточным для разделения многих изобарных соединений с массой менее 100 Да. Наилучшее пространственное разрешение составляет ~50 нм, но этот параметр сильно зависит от пробы. Обычно наилучшее пространственное разрешение получают для плоских проводников и полупроводников, тогда как для органических проб получить хорошее разрешение проблематично.

Существует большое разнообразие первичных ионных пучков, и их выбор зависит от задачи. В жидкометаллических ионных пушках обычно используются ионы Ga^+ и In^+ . Они не обеспечивают большого выхода вторичных ионов, однако могут быть сфокусированы в узкие пучки, что является желательным для химического имиджинга. Ионы Cs^+ дают лучший выход вторичных ионов (особенно для электроотрицательных компонентов) и обычно используются для очистки распылением и анализа электроотрицательных материалов по глубине. Ионы O_2^+ значительно усиливают выход вторичных ионов электроположительных компонентов, например металлов. Относительно недавно стали использоваться молекулярные и кластерные пучки. Первичные ионные пучки: SF_5^+ , Bi_n^+ , Au_n^+ и Co_{60}^+ — усиливают выход вторичных ионов по сравнению с молекулными ионными пучками, особенно выход ионов больших масс. Это обстоятельство важно при анализе биологических проб. Кроме того, повреждение анализируемой поверхности в этом случае невелико. Использование первичных ионных пучков Co_{60}^+ , например, является многообещающим подходом для молекулярного анализа проб по глубине [124].