МИР ХИМИИ

А.Т. Лебедев

Масс-спектрометрия в органической химии

Издание второе,
переработанное и дополненное

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2015

Издано при финансовой поддержке Федерального агентства по печати и массовым коммуникациям в рамках Федеральной целевой программы «Культура России (2012—2018 годы)»

УДК 543.51
ББК 24.4
Л33

Л33 Лебедев А.Т.
Масс-спектрометрия в органической химии
Издание второе, переработанное и дополненное
Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2015. – 704с., ISBN 978-5-94836-409-4

В учебном пособии рассматриваются основы современной масс-спектрометрии органических соединений: методы ионизации и разделения ионов, физико-химические аспекты процессов масс-спектрометрической фрагментации, наиболее важные направления фрагментации важнейших классов органических соединений, аналитические аспекты масс-спектрометрии, а также области применения масс-спектрометрии. Большой раздел посвящен масс-спектрометрии биоорганических соединений. Отдельная глава повествует о масс-спектрометрии без пробоподготовки. Основное внимание уделено подходам для установления структуры органических соединений по масс-спектрам. Этот материал подкреплен большим количеством задач, решение которых позволит получить практические навыки работы со спектрами.

Для студентов старших курсов химических, биохимических, химико-технологических, биомедицинских и экологических специальностей, а также аспирантов, преподавателей и научных сотрудников, работающих в перечисленных выше областях.

Благодарности

Автор выражает благодарность за помощь в работе над книгой
Вячеславу Борисовичу Артаеву, Дмитрию Михайловичу Мазуру, Алексею Александровичу Сысоеву.

УДК 543.51
ББК 24.4

ISBN 978-5-94836-409-4

Содержание

Вся информация вселенной заложена в массе.

Р.А. Зубарев

Предисловие ко второму изданию

В 2013 году научная общественность отметила 100-летие масс-спектрометрии, за дату рождения которой было решено принять выход в свет публикации Дж.Дж. Томсона «Rays of positive electricity». Это и много, и одновременно мало. Важно, что масс-спектрометрия в начале XXI века не превратилась в изученный вдоль и поперек рутинный метод анализа с известными непреодолимыми недостатками и ограничениями, а, напротив, развивается семимильными шагами.

Десять лет прошло с момента выхода в свет первого издания «Масс-спектрометрия в органической химии». Это очень большой период для современной науки. Для масс-спектрометрии – это огромный период. За это время масс-спектрометрия стала самым востребованным методом аналитической химии, с помощью которого выполняется наибольшее число анализов. В распоряжении исследователей появились не просто новые модели, а новые типы масс-спектрометров. Орбитальные ловушки, разработанные А.А. Макаровым, о которых фирма «Термо» впервые официально объявила в 2005 году, завоевали повсеместное признание исследователей и стали наиболее желанными приборами масс-спектрометристов во всем мире. Очень значительно выросла роль времяпролетных приборов. На базе сверхвысокого разрешения появились новые направления науки: гуминомика, петролеомика. Потрясающие успехи достигнуты в протеомике, метаболомике. В конце 2014 года осуществлена посадка космического аппарата «Розетта» на комету Чурюмова – Герасименко. Это выдающееся научное достижение. Среди оборудования «Розетты» важную роль играет ROSINA – прибор для анализа ионов и нейтральных частиц, который состоит из двух масс-спектрометров: двухфокусного магнитного секторного и рефлектронного времяпролетного. Этот факт демонстрирует важность масс-спектрометрии для современной науки, для получения наиболее надежных экспериментальных данных. Очень интересные результаты можно получать с помощью изотопной масс-спектрометрии. Метод масс-спектрометрической визуализации (имиджинга) позволяет изучать распределение искомых соединений по поверхности или всему объему изучаемого объекта. Масс-спектрометрические методы стали широко использоваться для диагностики самых разных заболеваний, для контроля хирургических операций.

За последние 10 лет изменилась терминология. Введено более сотни новых терминов, рекомендовано переименовать ряд существовавших названий. Даже классический метод ионизации «электронный удар» теперь следует называть «электронная ионизация». Возникло необычайно перспективное направление – масс-спектрометрия с ионизацией на открытом воздухе. Создано несколько десятков методов ионизации, которые позволяют работать с минимальной или вообще без пробоподготовки. Это устраняет последний практический недостаток масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия сегодня – это наиболее быстрый, чувствительный и информативный метод анализа химических и биологических

соединений любой сложности: от химических элементов до биополимеров (белки, сахара, нуклеиновые кислоты). Можно утверждать, что, **если для какого-нибудь соединений вы не можете найти масс-спектрометрическую методику его определения, это означает только то, что оно до сих пор не интересовало масс-спектрометристов**. Существенные успехи достигнуты в области миниатюризации. Созданы переносные масс-спектрометры весом в несколько килограммов. В результате появились предпосылки для создания в недалеком будущем бытовых масс-спектрометров для проверки качества пищевых продуктов, напитков, медикаментов и т.д.

Значительные перемены произошли и в российской масс-спектрометрии. В конце 2003 года создано Всероссийское масс-спектрометрическое общество (ВМСО), объединившее около 600 ученых более чем из 50 регионов страны, ближнего и дальнего зарубежья и ставшее полноправным членом международного масс-спектрометрического общества (International Mass Spectrometry Foundation, IMSF). ВМСО уже проведено шесть крупных масс-спектрометрических конференций с международным участием, ежегодно проводятся школы по разным аспектам масс-спектрометрии. С 2004 года в свет выходит журнал «Масс-спектрометрия», включенный в список ВАК и переводимый на английский язык в качестве ежегодного приложения к «Журналу аналитической химии». Журнал хорошо цитируется, а по импакт-фактору РИНЦ в 2013 году он оказался на втором месте среди всех российских журналов в области химии и на пятом в области физики. Золотые медали ВМСО за выдающиеся заслуги в масс-спектрометрии вручены российским ученым с мировыми именами: Б.А. Мамырину, А.А. Макарову, Л.Н. Галль, И.А. Ревельскому, Р.А. Зубареву. Престижные Международные премии получили наши соотечественники: В.Л. Тальрозе (премия Томсона), А.А. Макаров (премии Томсона, Брюне, Американского масс-спектрометрического общества), Р.А. Зубарев (премии Брюне и Бимана), Ю. Ласкин (премия Бимана, премия Rising Star Award from the Women Chemists Committee of the American Chemical Society). Золотыми медалями Питсбургской конференции в XXI веке награждены два масс-спектрометра: орбитальная ловушка фирмы «Термо», разработанная А.А. Макаровым, и времяпролетный масс-спектрометр высокого разрешения HRT фирмы ЛЕКО, разработанный А.Н. Веренчиковым и В.Б. Артаевым. За прошедшие 10 лет активизировался выпуск специализированной масс-спектрометрической литературы на русском языке. Вышедшие монографии российских авторов и переводы зарубежных изданий были посвящены разным направлениям масс-спектрометрии [1—7].

Таким образом, изменений и новшеств накопилось так много, что выпуск нового, существенно переработанного и дополненного учебного издания по органической масс-спектрометрии стал необходим. Изменения коснулись практически всех глав. Добавлены новые главы по ионизации на открытом воздухе, по родственным масс-спектрометрии методам анализа, по масс-спектрометрии биологических соединений. В тексте использована новая терминология в соответствии с рекомендациями ВМСО и IMSF. Большое количество иллюстративного материала позволит легче воспринимать материал. Добавлены новые задачи, необходимые при проведении обучающих семинаров.

Что такое «масса», благодаря чему она приобретает способность оказывать такое влияние на душевную жизнь индивида?

З. Фрейд. Психология масс и анализ человеческого «Я»

Теория становится материальной силой, как только она овладевает массами.

К. Маркс. К критике гегелевской философии права

Предисловие

К концу XX века инструментальные физико-химические методы анализа стали неотъемлемой частью экспериментальной работы исследователя, работающего в области естественных наук. Наиболее мощными и многоцелевыми среди них, безусловно, являются спектроскопия ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрия. Оба метода активно используются в химии, биологии, медицине, экологии, контроле технологических процессов, криминалистике и т.д. Характеризуя вновь синтезированное вещество, исследователь обязан получить и описать его ЯМР и масс-спектры.

Говоря о достоинствах масс-спектрометрии, следует прежде всего отметить ее чувствительность, экспрессность, информативность и надежность. Для получения достоверного масс-спектра индивидуального соединения даже на рутинном масс-спектрометре достаточно 10^{-9}–10^{-10} г вещества. При необходимости простого детектирования конкретного соединения в смеси порог обнаружения может быть легко снижен до 10^{-12}–10^{-14} г. Использование современного оборудования и современных методов ионизации позволяет в некоторых случаях увеличить чувствительность метода еще на несколько порядков. Таким образом, «традиционная неразрешимая» без волшебства русская задача о «поиске иголки в стоге сена» может быть легко решена масс-спектрометрически, а обычный масс-спектрометрический эксперимент сравним с поиском одной иголки в нескольких миллионах стогах сена.

Для получения обычного спектра электронной ионизации индивидуального соединения необходимо затратить 1–2 минуты, а время анализа сложной смеси органических соединений в режиме хроматомасс-спектрометрии определяется исключительно хроматографическим временем удерживания компонентов. При этом в памяти компьютера, являющегося неотъемлемой частью современного масс-спектрометра, остается информация о временах удерживания, площадях пиков, а также масс-спектры всех компонентов смеси, то есть, вводя в прибор один микролитр сложнейшей смеси органических соединений, на «выходе» можно получить информацию о ее качественном и количественном составе. Ни один другой метод не сочетает в себе такой экспрессности и информативности. Надежность масс-спектрометрического анализа также очень высока, поскольку масс-спектр является индивидуальной характеристикой конкретного вещества, отражающей его структурные особенности.

История масс-спектрометрии насчитывает около 100 лет. Годом рождения масс-спектрометрии можно считать 1901-й, когда немецкий физик В. Кауфман создал первый прототип параболического масс-спектрографа для изучения «катодных лучей», или 1913-й, когда сэр Дж. Томсон впервые спектрально увидел изотопы

неона, или 1918-й, когда А. Демпстер сконструировал первый магнитный масс-спектрометр с источником для электронной и термической ионизации. Тем не менее в течение первых 50 лет существования эта наука оставалась прерогативой исключительно физиков и физико-химиков. Используя простейшие соединения, масс-спектрометристы того времени успешно измеряли характеристики элементов, атомов, молекул (энергии ионизации, прочности связей, точные массы элементов и природную распространенность их изотопов).

Временем рождения органической масс-спектрометрии можно считать конец 40-х – начало 50-х годов прошлого века. Это было совсем недавно, поэтому даже сейчас, в начале XXI века, можно лично поговорить с классиками, стоявшими у истоков создания этой дисциплины. После Второй мировой войны возникло понимание, что метод можно использовать не только в качестве прецезионного физико-математического инструмента, но и в качестве удобного способа идентификации достаточно сложных соединений по набору характеристических для них фрагментных ионов. Знание классических химических реакций органических соединений и привлечение теорий устойчивости органических ионов позволяет приписать фрагментам конкретные структуры, делать обобщения по аналогиям фрагментации внутри классов органических соединений. Переход на такой уровень масс-спектрометрии резко увеличил число пользователей метода и привел к взрывному процессу развития приборного парка. Особенно важной оказалась применимость метода для решения нефтехимических проблем. Финансовые вложения нефтяных компаний значительно помогли быстрому инструментальному и теоретическому становлению нового научного направления. Отличное издание [8], содержащее огромный фактический материал по истории масс-спектрометрии и богато иллюстрированное фотографиями и рисунками, вышло в свет в 2002 году под редакцией М. Грейсона по случаю 50-летия масс-спектрометрического общества США.

Традиционно органическая масс-спектрометрия используется для решения двух основных проблем: идентификации и количественного определения веществ, а также изучения превращений ионизированных молекул органических соединений в газовой фазе в ионном источнике [9]. С появлением хроматомасс-спектрометрии, ионного циклотронного резонанса [10], систем протока после разряда [11] возможности классического метода значительно увеличились. Соединение масс-спектрометра с жидкостным хроматографом еще более расширило круг изучаемых объектов. Новые методы ионизации, в частности «электроспрей» [12] и МАЛДИ [13], появившиеся к концу XX века, позволили успешно работать со сложнейшими биоорганическими молекулами, такими как полипептиды, белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, молекулярные массы которых составляют миллионы дальтон [14]. На сегодняшний день можно проанализировать соединение практически любой сложности. В последние годы широко ведутся исследования по анализу микроорганизмов [15], по моделированию в газовой фазе химических реакций термолиза, фотолиза, превращений, катализируемых кислотами и основаниями [16], по изучению каталитических процессов [17]. По шутливому выражению одного из «отцов» органической масс-спектрометрии Фреда Мак-Лафферти, «если химическую задачу нельзя решить с помощью масс-спектрометрии, может быть,

она вообще не стоит того, чтобы на нее тратили время» [18]. Признанием важности масс-спектрометрии для развития современной науки стало присуждение в 2002 году Нобелевской премии масс-спектрометристам Джону Фенну и Коичи Танаке.

Наряду с очевидным использованием масс-спектрометрии в органической и биоорганической химии для установления структур соединений, хроматомасс-спектрометрия стала сегодня основным методом идентификации и количественного определения органических загрязнений в объектах окружающей среды. Современная химическая экология немыслима без этого метода. Изучение метаболизма лекарственных средств и пестицидов в окружающей среде и живых организмах также ведется с активным использованием масс-спектрометрии. Метод незаменим в криминалистических исследованиях и при проведении допинг-контроля на спортивных соревнованиях.

Масс-спектрометрия применяется для решения геохимических и космохимических проблем, задач комбинаторной химии, иммунологии, медицины, биологии и т.д. Масс-спектрометрия имеет явное преимущество перед другими физико-химическими методами, поскольку в этом случае речь идет о простейших характеристиках вещества: массе молекулы, ее основных фрагментов и отношении количеств этих фрагментов относительно друг друга. Это позволяет достаточно легко усвоить основы метода и научиться работать с масс-спектрами не только подготовленным студентам, но и школьникам старших классов, изучающим курс органической химии. Учитывая, что расшифровка масс-спектра может быть сродни решению головоломки типа puzzle, научиться владеть этим методом настолько же полезно, насколько просто и увлекательно.

Тем не менее, занимаясь масс-спектрометрией органических соединений уже более 30 лет, я постоянно сталкиваюсь с ситуацией, когда даже опытные химики-органики пасуют перед масс-спектром, предпочитая извлечь необходимую информацию о структуре с помощью других, более знакомых им методов. Объяснение этому я нахожу в отсутствии учебной литературы по интерпретации масс-спектров и спецкурсов по этой дисциплине в вузах России. Книги по масс-спектрометрии советских авторов, изданные в 70–80-е годы прошлого века, затрагивали отдельные аспекты органической масс-спектрометрии [19–39], причем в качестве учебной литературы можно было бы выделить лишь пособия [24–27]. Русскоязычный читатель не был знаком и с подавляющим большинством иностранных изданий. За исключением фундаментальной пионерской монографии Джона Бейнона [9], на русский язык были переведены лишь три книги [40–42], две из которых [40, 41] относятся к 60–70-м годам XX века. Даже замечательный учебник Мак-Лафферти [43], претерпевший уже четыре издания, так и не переведен на русский язык. В XXI веке ситуация несколько изменилась. Прежде всего это связано с созданием Всероссийского масс-спектрометрического общества. Его деятельность привела к написанию и переводу современных книг по масс-спектрометрии [1–7], а также первого издания этого учебного пособия [44].

Данное пособие направлено на решение двух основных задач: учебной и познавательной. Можно знакомиться с материалом последовательно, а можно выборочно читать конкретные главы или разделы. Большое внимание уделено именно работе с масс-спектром, подходам к его расшифровке с извлечением максимальной

структурной информации. Описание основных направлений фрагментации различных классов органических соединений (от алканов до белков и нуклеиновых кислот) сопровождается задачами, аналогичными тем, с которыми сталкивается любой исследователь, когда обращается к методу масс-спектрометрии в своих научных целях. Решая эти задачи, читатель сможет закрепить теоретический материал и успешно справляться с подобными проблемами в своей последующей научной работе. Большое число вариантов типовых задач позволяет использовать книгу не только для индивидуальной работы, но и для семинаров в студенческих группах.

Последнее десятилетие XX века ознаменовалось революционными новациями в органической масс-спектрометрии. В данной работе наряду с описанием классических методов ввода и ионизации образца, а также разделения и детектирования ионов значительное место уделено теоретическим и практическим аспектам современной масс-спектрометрии: электрораспылению и другим методам стыковки жидкостного хроматографа с масс-спектрометром, матрично активированной лазерной десорбции/ионизации (гл. 5), тандемной масс-спектрометрии (гл. 7), методам анализа, основанным или связанным с масс-спектрометрией (гл. 8), методам ионизации без пробоподготовки (на открытом воздухе, гл. 9).

Очень важно, чтобы масс-спектрометрией владели непосредственно химики, биологи, экологи, а не узкий круг профессиональных масс-спектрометристов. Никто не знает столь досконально свою задачу, как человек, непосредственно работающий с веществом. Если он сможет правильно поставить масс-спектрометрическую задачу и при этом владеет техникой интерпретации масс-спектров, эффективность его работы со спектрами будет существенно выше, чем у профессионального масс-спектрометриста, далекого от конкретной проблемы. Недостающим звеном для правильной расшифровки может оказаться информация о производителе исходного реактива, о побочных процессах изучаемой реакции, о примесях к реагентам или даже о реакции, которая ставилась в этой посуде за неделю до данного эксперимента.

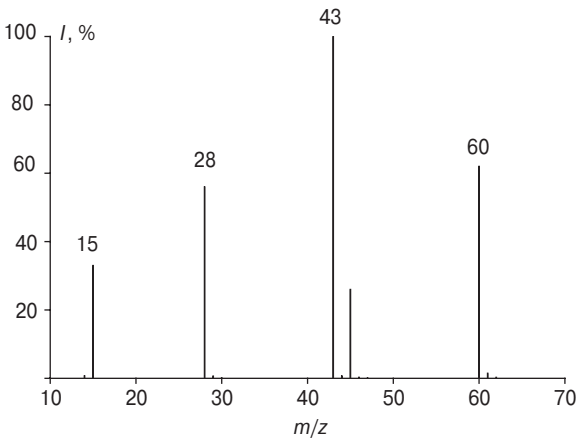
Мир масс-спектрометрии удивителен и красив. Каждый год приносит новые потрясающие открытия, появляются неординарные приложения этого метода. Я надеюсь, читатель сможет оценить это сам.

Введение

Масс-спектрометрия является физико-химическим методом анализа, заключающимся в переводе молекул образца в ионизированную форму с последующим разделением и регистрацией образующихся при этом положительных или отрицательных ионов. Масс-спектр позволяет сделать выводы о молекулярной массе соединения, его составе и структуре. Масса самого тяжелого иона в спектре, как правило, соответствует молекулярной массе анализируемого соединения. Принято представлять масс-спектр в виде графика или таблицы (рис. 1).

В случае графического изображения по оси абсцисс откладывается масса ионов (точнее, величина отношении массы иона к его заряду), а по оси ординат – их интенсивности, т.е. относительное количество ионов данного вида. Принято выражать интенсивность в процентах к полному ионному току (суммарной интенсивности всех ионов в спектре) или к интенсивности максимального иона (рис. 1). В качестве единицы размерности массы в масс-спектрометрии используются термины: углеродные единицы, атомные единицы массы, дальтоны [2]. Тем не менее, поскольку по шкале абсцисс в масс-спектрах откладывается величина отношения массы к заряду, для обозначения этой единицы измерений используется термин «томсон» (Thomson, Th), но чаще – просто m/z [45].

Задача 1. Установите, какому распространенному органическому соединению принадлежит масс-спектр, представленный на рис. 1. Масс-спектрометрия высокого разрешения показала, что точная молекулярная масса соединения 60,0211 дальтона, что соответствует составу $C_2H_4O_2$. Обращайте на данном этапе внимание только на наиболее интенсивные пики в спектре, обусловленные всей молекулой (m/z 60) и ее наиболее значимыми структурными фрагментами. В данном случае наиболее важными осколочными ионами являются фрагменты с m/z 45, 43, 28 и 15.



m/z	Интенсивность, %
15	33,0
28	56,0
29	0,65
43	100
44	2,2
45	26,0
46	0,31
47	0,10
60	62,0
61	1,48
62	0,26

Рис. 1. Масс-спектр соединения с брутто-формулой $C_2H_4O_2$ в графическом и табличном виде

Для получения масс-спектра прежде всего необходимо ввести образец в источник ионов (гл. 1), затем перевести его молекулы в заряженную форму (положительные или отрицательные ионы, гл. 2), разделить эти ионы по массам и зарегистрировать их массы и количество (гл. 6). В современных приборах управление всеми операциями, а также обработку результатов осуществляет компьютер, являющийся неотъемлемой частью масс-спектрометра. На выходе можно получить спектр в любом виде, провести вычитание или усреднение спектров, сравнение с библиотекой масс-спектров. Принципиальная блок-схема масс-спектрометра представлена на рис. 2.

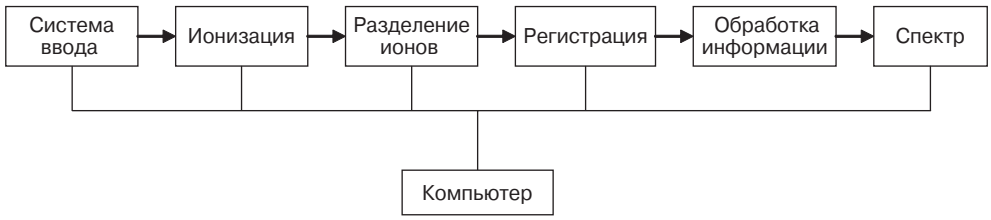


Рис. 2. Блок-схема масс-спектрометра

Для решения более сложных задач (например, анализ неразделенных смесей) схема процесса может быть значительно сложнее (гл. 7, тандемная масс-спектрометрия).

Фрагментация молекулярных ионов органических соединений в масс-спектрометре подчиняется определенным законам (гл. 2, 3), поэтому при отсутствии спектра анализируемого соединения в компьютерных библиотеках можно установить его молекулярную массу, состав, наличие функциональных групп, а иногда и точную структуру по характеру фрагментации (гл. 4). Поскольку во фрагментации родственных соединений есть много общего (гл. 10 и 11), существует возможность интерпретации спектров вручную, хотя это и требует определенной практики (см. задачи и их решение в гл. 13 и 14). Кроме того, масс-спектрометрия является наиболее чувствительным методом количественного анализа органических соединений (гл. 12).

ГЛАВА 1

СИСТЕМА ВВОДА ОБРАЗЦА

Для того чтобы избежать нежелательных химических реакций в результате взаимодействия молекул и ионов, в источнике большинства масс-спектрометров, как правило, поддерживается высокий (10^{-5}–10^{-6} мм рт.ст.), а иногда и сверхвысокий (10^{-10} мм рт.ст.) вакуум. Поэтому уже сам ввод образца является самостоятельной технической задачей.

1.1. Баллон напуска

Одной из первых систем ввода, практически не используемой в настоящее время, служил баллон напуска (рис. 1.1). Анализируемое вещество находилось в газообразном состоянии (давление около 10^{-2} мм рт.ст.) в баллоне, внутренняя поверхность которого объемом 50–2000 см^3 была остеклена для предотвращения нежелательных химических реакций на стенках сосуда. В поздних вариантах предусматривалась система нагрева пробы в баллоне. Этот резервуар соединялся с источником ионов отверстием очень небольшого диаметра, через которое осуществлялось молекулярное натекание образца в масс-спектрометр.

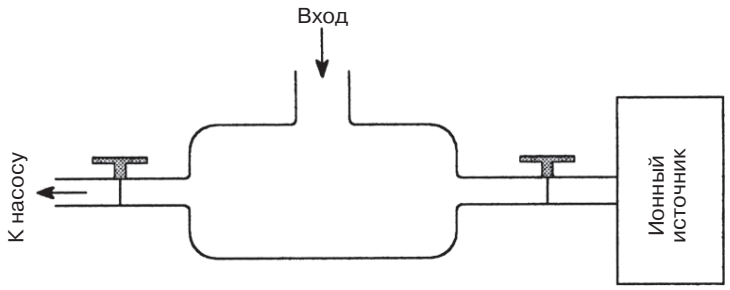


Рис. 1.1. Баллон напуска

Альтернативными вариантами такого отверстия служили капилляры или пористые диафрагмы. Такое устройство позволяло получить стабильную концентрацию вещества в источнике. Оно было необходимо на начальных стадиях развития органической масс-спектрометрии, когда применялись малоэффективные вакуумные системы, а скорость развертки масс-спектра составляла минуты. Очевидным недостатком данного ввода является необходимость переводить вещество в газовую фазу в условиях неглубокого вакуума, что для многих образцов весьма проблематично. Конструкции стыковки баллонов напуска с ионными источниками подробно описаны в фундаментальном труде Джона Бейнона [9].

1.2. Прямой ввод

Развитие техники позволило в 60-х годах перейти на более совершенную систему ввода, которая является общепринятой и широко распространенной в настоящее время, хотя в приборах XXI века эта система часто оказывается лишь опцией. Это – прямой ввод вещества в область ионизации. Твердый образец помещается в специальную микрокапсулу (стекло, кварц, керамика, металл), которая штоком вводится непосредственно в ионный источник, т.е. испарение осуществляется прямо в источнике ионов в условиях глубокого вакуума. При необходимости образец может быть нагрет с помощью программируемой печки до температуры 400–500 °С, а в некоторых случаях, как, например, в условиях десорбционной химической ионизации (разд. 5.3), – выше 1000 °С. Понятно, что в этих условиях (глубокий вакуум и высокая температура) число соединений, переходящих в газовую фазу и становящихся доступными для масс-спектрометрического анализа, значительно возрастает. Поскольку полное испарение введенного образца в источнике позволяет измерить количество соединения, прямой ввод дает возможность наряду с идентификацией проводить и количественное определение веществ (гл. 12).

Важно обращать внимание не только на температуру прямого ввода, но и на температуру источника ионов. Если вещество труднолетучее, а прямой ввод перегрет, оно может конденсироваться на стенках источника, что ведет к его быстрому загрязнению. Кроме того, последовательные процессы испарения и конденсации приводят к увеличению роли деструкции вещества и, соответственно, к искажению масс-спектра. Процессы деструкции имеют место и в случае слишком высокой температуры источника. Принципиальная схема прямого ввода представлена на рис. 1.2.

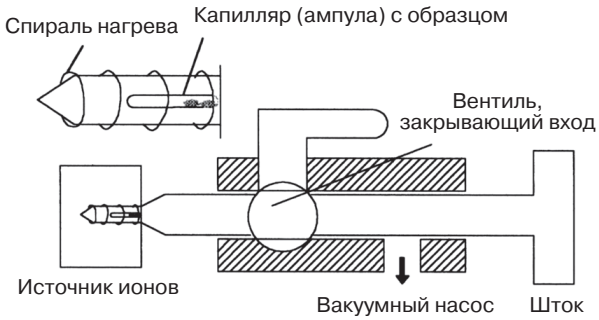


Рис. 1.2. Система прямого ввода

Программируемый нагрев образца в вакууме позволяет решить одновременно три задачи: во-первых, перевести в газовую фазу широкий круг органических соединений; во-вторых, подобрать оптимальную температуру съемки, когда воспроизводится масс-спектр высокого качества; в-третьих, анализировать смеси соединений с разной степенью летучести. Такое фракционное испарение позволяет в некоторых случаях провести достаточно быстрый качественный и количественный анализ смеси без ее предварительного разделения.

Поскольку чувствительность метода очень высока, а прямой ввод позволяет доставить образец в область ионизации без потерь, следует опасаться ввести слишком много вещества. Считается, что твердый образец в капилляре на конце штока должен быть едва различим глазом. Избыточное количество образца может привести к искажению масс-спектра из-за протекания ионно-молекулярных реакций и вызвать быстрое загрязнение источника ионов. Многие масс-спектрометристы предпочитают наносить вещество из раствора и вводят шток в источник после испарения растворителя.

Еще один важный параметр для наиболее распространенных спектров электронной ионизации связан с положением образца относительно пучка электронов. Если образец расположен достаточно далеко, его молекулы достигают пучка электронов только после ряда последовательных столкновений со стенками источника. При этом возрастает роль процессов термодеструкции. Однако, если поместить образец слишком близко к пучку электронов, наконечник штока может приобрести отрицательный заряд и начать отталкивать электроны, что приводит к расфокусировке пучка.

Система прямого ввода применяется в основном в сочетании с методами электронной и химической ионизации, хотя его модификации используются в случае бомбардировки быстрыми атомами (разд. 5.10) и в ряде других случаев.

1.3. Мембранный ввод (Membrane inlet mass spectrometry, MIMS)

Весьма полезным и перспективным является мембранный ввод (МВ) пробы. Метод был впервые описан более полувека назад [46], а с начала 1990-х годов [47, 48] стал применяется для проведения анализов в реальном времени. Непрерывное количественное определение с целью надежной оценки экологической ситуации, например экотоксикантов, с помощью МВ существенно предпочтительнее дискретных измерений классическими методами. Именно МВ позволяет установить динамику изменения концентраций целевых аналитов за адекватный промежуток времени.

Метод основан на использовании полупроницаемых мембран, которые селективно пропускают молекулы аналитов из газа или жидкости в вакуум масс-спектрометра. Поскольку МВ не требует отбора проб, их очистки и разделения, этот метод представляет собой хорошую альтернативу хроматомасс-спектрометрии. Уменьшается общее время анализа, а также расход органических растворителей. Мембрана изготавливается из органического материала и пропускает в источник масс-спектрометра соединения, растворимые или адсорбируемые ею и обладающие высоким коэффициентом диффузии в ней. Анализируемое соединение должно быть достаточно летучим, чтобы испаряться на вакуумированной стороне мембраны. В частности, соединения с давлением паров менее 1–3 Па с трудом десорбируются в поток газа-носителя даже при использования нагрева. В одном из приводимых ниже вариантов мембрана размещается вне источника ионов (рис. 1.3) [49], в другом – капиллярная мембрана вводится непосредственно в источник (рис. 1.4) [50].

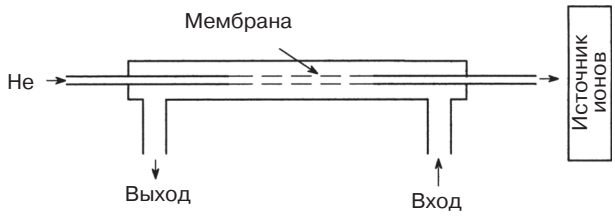


Рис. 1.3. Размещение мембраны вне источника ионов

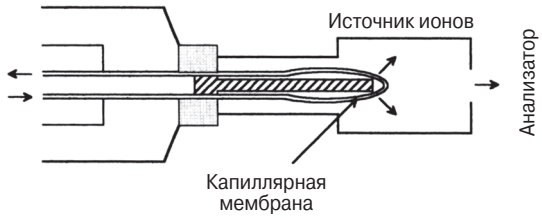


Рис. 1.4. Размещение мембраны внутри источника ионов

Достоинством такого ввода является селективность в пропускании веществ разной природы. Поскольку мембрана не пропускает воду, неорганические газы и соли, она может использоваться для эффективного мониторинга загрязнения воздуха или воды органическими соединениями, а также для контроля биохимических процессов. Например, предел обнаружения в воде для широкого круга органических соединений с молекулярной массой ниже 300 дальтон может достигать нанограммов в литре [51]. Возможности непрерывного мониторинга уровня органических соединений в воде описаны в работах [49, 52, 53], в воздухе – в работе [54], для целей биологии и медицины – в работах [55, 56].

В последнее время появились работы, демонстрирующие эффективное использование МВ с атмосферными методами ионизации, в частности электрораспылением (ИЭР, разд. 5.13). Новые материалы, методики с применением нагревания, использование жидких фаз для переноса десорбированных аналитов существенно расширили круг соединений, которые можно анализировать методом МВ. В частности, разработан мембранный интерфейс на базе капиллярных полых волокон для работы с метанолом в качестве жидкофазного носителя для доставки целевых аналитов в источник ИЭР [57]. В таком варианте при мониторинге в режиме реального времени полярных и заряженных молекул достижимы пределы обнаружения до ppt. Система может работать как в режиме постоянного потока, так и с его остановкой. В последнем варианте удается повысить чувствительность метода. Разработанный интерфейс был с успехом использован для детектирования лекарственных препаратов, фенолов и ряда других экотоксикантов в природной воде и искусственной моче. Авторам удалось также продемонстрировать проведение он-лайн контроля реакции хлорирования фенола в воде [57].

В обзоре [58] представлены основные тенденции развития этого метода за последнее десятилетие, включая новые материалы для изготовления мембран, конфигурации интерфейсов и приемлемые методы ионизации. В обзоре приведен также ряд успешных анализов методом МВ с использованием портативных масс-

спектрометров (разд. 9.8). Такие масс-спектрометры весьма перспективны для работы с объектами окружающей среды непосредственно в полевых условиях, а также в биомедицинских исследованиях [59–61].

1.4. Газовая хроматография/масс-спектрометрия

На сегодняшний день газовая хроматография/масс-спектрометрия (хроматомасс-спектрометрия, хромасс, ГХ/МС) является чрезвычайно широко используемым методом органической масс-спектрометрии, хотя начиная с 90-х годов XX века многочисленные варианты комбинированного метода жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (разд. 1.5) используются все шире и во многих областях исследований (особенно биомедицинских) заняли лидирующее положение.

Стыковка газового хроматографа и масс-спектрометра была абсолютно логичной, поскольку оба метода использовались для анализа смесей органических соединений в газовой фазе и обладали приблизительно равной чувствительностью. Единственной проблемой для объединения двух методов в едином приборе являлось рабочее давление. Газовый хроматограф работает при атмосферном давлении, а масс-спектрометр – в условиях глубокого вакуума. Основные принципы стыковки были сформулированы и претворены в жизнь в 1957 году [62]. Первоначальные проблемы, связанные с недостаточной мощностью вакуумных систем и набивными колонками с рабочими потоками газа-носителя 30 мл/мин, решались установкой сепараторов различного типа [9]. Эти устройства размещались между выходным концом колонки хроматографа и ионным источником масс-спектрометра и предназначались для обогащения пробы анализируемым веществом за счет избирательной откачки значительно более легкого газа-носителя (водород, гелий). Появление более мощных вакуумных систем и капиллярных колонок с меньшими потоками (0,5–2,0 мл/мин) значительно облегчило задачу, а замена металла или стекла, из которых изготавливались колонки, на плавленый кварц позволила ввести конец колонки непосредственно в ионный источник. Все это сделало метод ГХ/МС простым и эффективным.

Не стоит забывать, однако, что стыковка хроматографа и масс-спектрометра все-таки является компромиссом, поскольку давление в ионном источнике оказывается несколько выше идеального, а выходное отверстие хроматографической колонки функционирует в условиях вакуума, что несколько ухудшает хроматографическое разрешение. Подробнее об этом можно прочитать в книге Чепмена [42]. Метод прежде всего предназначен для анализа смесей органических соединений и заключается в их разделении на колонке хроматографа с последовательным выходом компонентов из колонки в ионный источник масс-спектрометра, где происходит их ионизация. Хроматографисты часто рассматривают в этом случае масс-спектрометр как детектор газового хроматографа.

1.4.1. Ввод пробы в систему ГХ/МС

Метод ГХ/МС позволяет эффективно работать с неполярными и слабополярными соединениями, обладающими при этом достаточной летучестью. Соединения

средней летучести (полулетучие) вводятся в инжектор хроматографа шприцем в растворе в органическом растворителе. Для более летучих соединений наиболее популярными системами ввода являются «выдувание – улавливание» (purge and trap) и парофазный анализ (headspace).

Условное разделение органических веществ на две группы (летучие и полулетучие) возникло в процессе разработки методов анализа органических экотоксикантов. К группе летучих органических соединений (ЛОС) отнесли малорастворимые в воде соединения, активно переходящие в газовую фазу при выдувании их из воды инертным газом при комнатной температуре. ЛОС содержат не более 8 атомов углерода в молекуле и, как правило, имеют молекулярную массу менее 200 дальтон и температуру кипения ниже 200 °С. К ЛОС относятся галогенсодержащие углеводороды, легкие ароматические соединения ряда бензола, кетоны, эфиры и сероуглерод. Если вводить эти соединения в прибор в органическом растворителе, они оказываются либо полностью скрыты пиком растворителя, либо выходят на его хвосте. Велики их потери и при пробоподготовке, например при концентрировании упариванием растворителя.

Метод парофазного анализа (рис. 1.5) заключается в выдерживании жидкой или твердой пробы, которая содержит целевые аналиты, в течение некоторого времени при определенной температуре в закрытой виале. За это время устанавливается равновесие и ЛОС распределяются в определенном соотношении между конденсированной и газовой фазой. Это распределение зависит от значений константы Генри и определяется простейшей формулой:

$$P = HC,$$

где P – давление паров ЛОС, C – концентрация ЛОС в жидкости, H – константа Генри.

Далее из газовой фазы шприцем отбирается проба (~1 мл) и вводится в инжектор хроматографа. Такой вариант называется статическим парофазным анализом. Альтернативно можно использовать шприц с иглой, покрытой адсорбирующим слоем.

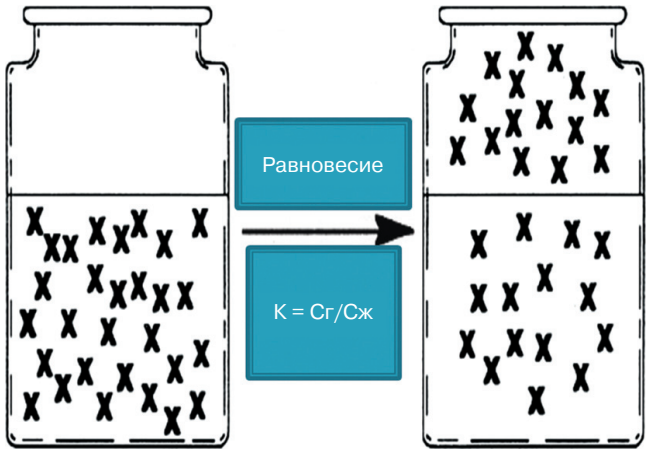


Рис. 1.5. Метод статического парофазного анализа для перевода в газовую фазу ЛОС

При внесении этого устройства в газовую фазу (можно и непосредственно в конденсированную) аналиты абсорбируются на нем. Последующее введение этой иглы в нагретый инжектор хроматографа вызывает десорбцию, а все вещества оказываются в колонке. Варьируя состав пленки адсорбирующей фазы, можно проводить избирательную сорбцию аналитов из анализируемого образца. Этот метод, называемый твердофазной микроэкстракцией (ТФМЭ, solid phase micro extraction, SPME), стал весьма популярным в настоящее время для анализа образцов объектов окружающей среды, пищевых продуктов и т.д. [63].

Для увеличения чувствительности метода можно усложнить прибор и продувать над конденсированной фазой, содержащей аналиты, поток инертного газа в течение заданного времени. Этот поток далее направляется в ловушку со специальным материалом, в которой происходит сорбция паров аналитов. В качестве адсорбентов наиболее часто используются силикагель, активированный уголь или Тенакс (полимерная смола на основе 2,6-дифенил-п-фениленоксида). В зависимости от природы целевых аналитов выбирается тот или иной адсорбент либо несколько адсорбентов используется послойно. Этот вариант метода называется динамическим парофазным анализом.

Далее резкий нагрев адсорбента, сопровождающийся подачей инертного газа, приводит к количественному переносу десорбированных соединений в колонку ГХ. Вариантом улавливания аналитов перед их попаданием в хроматографическую колонку является криофокусировка. В этом случае на пути потока инертного газа, несущего молекулы аналитов, устанавливается склянка, охлаждаемая жидким азотом. Большинство органических соединений конденсируется, и через некоторое время резкий нагрев приводит к единовременному переносу всего накопленного материала в хроматограф. Этот метод характеризуется лучшими показателями, но технически несколько сложнее.

Метод динамического парофазного анализа очень близок популярному для анализа водных проб методу «выдувание – улавливание». В этом варианте поток инертного газа барботируется непосредственно через водную фазу, унося из нее целевые аналиты (рис. 1.6). Далее вновь используется улавливание аналитов сорбентами или криофокусировка. Чувствительность метода «выдувание – улавливание», как правило, выше, чем парофазного анализа, поскольку из конденсированной фазы выдувается бóльшая часть растворенных летучих органических соединений. Если парофазный анализ одной и той же пробы можно проводить в нескольких повторностях, то вторичное использование пробы в методе «выдувание – улавливание» приведет к получению значительно меньших концентраций ЛОС.

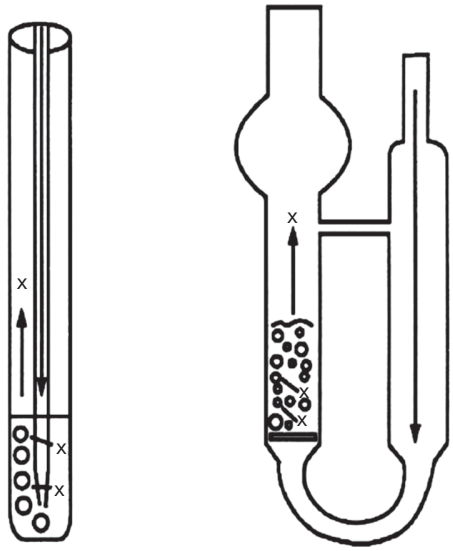


Рис. 1.6. Два варианта склянок для проведения анализа ЛОС методом «выдувание – улавливание»

1.4.2. Запись масс-спектров в режиме ГХ/МС

Если поток элюата из колонки хроматографа идет непрерывно, масс-спектрометр работает в дискретном режиме, поскольку должен просканировать весь намеченный диапазон масс и вернуться к начальной массе для проведения нового сканирования. Понятно, что запись спектра (сканирование) должна осуществляться с достаточной частотой, чтобы зарегистрировать масс-спектр каждого соединения несколько раз. В идеале считается, что каждый хроматографический пик должен быть охарактеризован 10–15 масс-спектрами. Это условие является очень важным, поскольку в условиях ГХ концентрация вещества изменяется очень быстро. В зависимости от того, на восходящей или нисходящей стороне хроматографического пика записан масс-спектр, будут дискриминированы или низкие, или высокие массы (рис. 1.7).

Безусловно, лучшим будет спектр, зарегистрированный на вершине хроматографического пика (рис. 1.7*в*), где максимальна концентрация вещества и минимальны ее изменения во времени. Спектры на рис. 1.7*а*, *б* значительно искажены, и библиотечный поиск для идентификации этого компонента может быть затруднен. Желательно получить не менее 10 спектров каждого компонента смеси, а для улучшения качества масс-спектра часто необходимо проводить усреднения и вычитания фона.

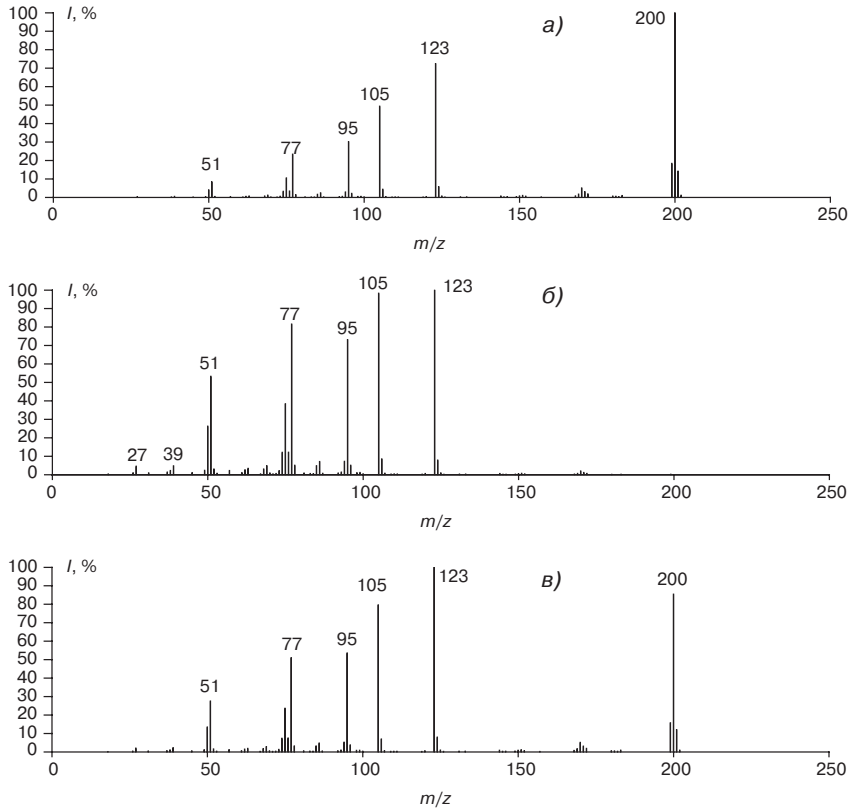


Рис. 1.7. Масс-спектры пара-фторбензофенона на восходящей стороне (*а*), на нисходящей стороне (*б*) и на вершине хроматографического пика (*в*)

Продемонстрировать эффект вычитания фона можно на примере, представленном на рис. 1.8. В данном случае спектр, снятый у подножия хроматографического пика, вычитается из спектра, снятого на вершине пика. Эту процедуру осуществляет компьютер. В некоторых программах (например, ChromaTOF, LECO) это происходит в автоматическом режиме во время компьютерной обработки результатов анализа. Однако в большинстве случаев оператор должен сам выбрать номера спектров на вершине и у подножия хроматографического пика и поручить компьютеру провести вычитание. Результирующий спектр очищен от наложения фона и позволяет значительно улучшить индекс сходимости с библиотечным спектром. Очень важна скорость сканирования и для количественного анализа. Недостаточное число сканирований приводит к значительному искажению площади хроматографического пика (рис. 1.9).

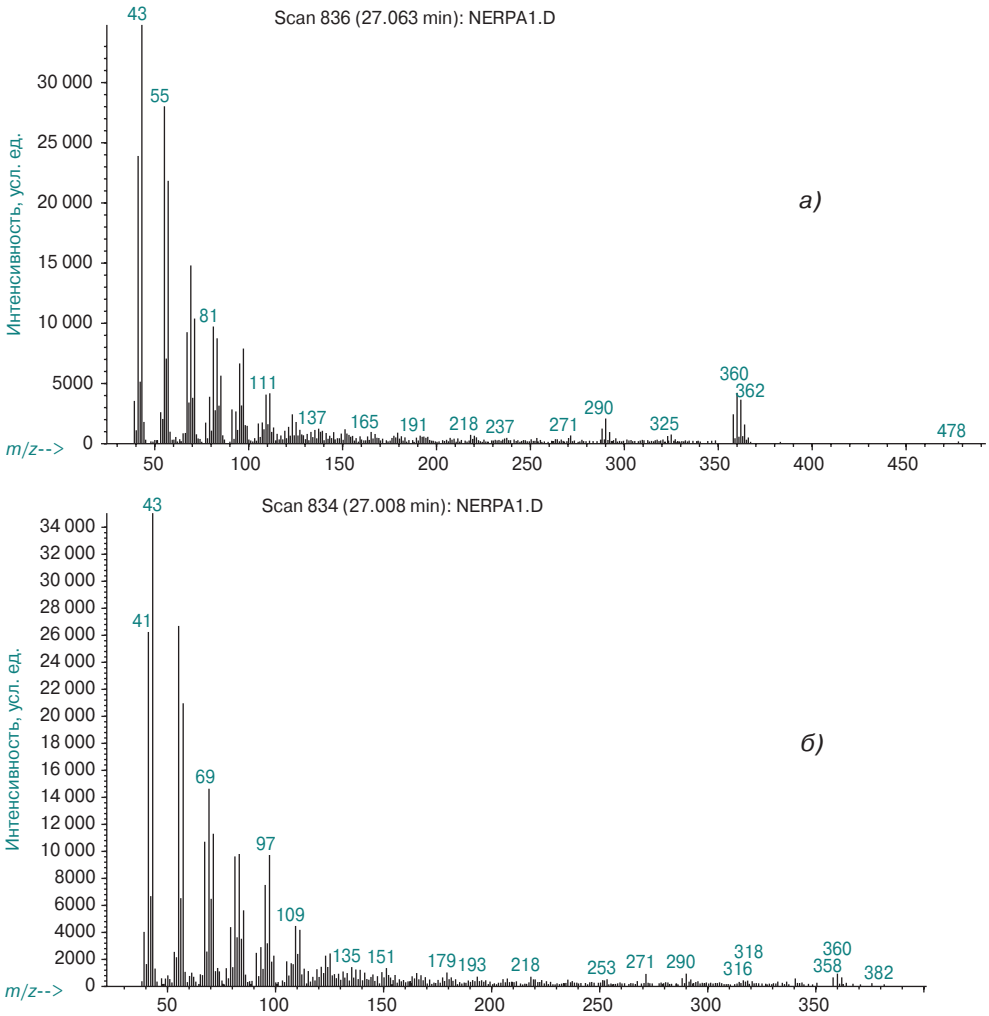


Рис. 1.8. Масс-спектр на вершине хроматографического пика (*а*); масс-спектр у подножия хроматографического пика (спектр фона) (*б*)

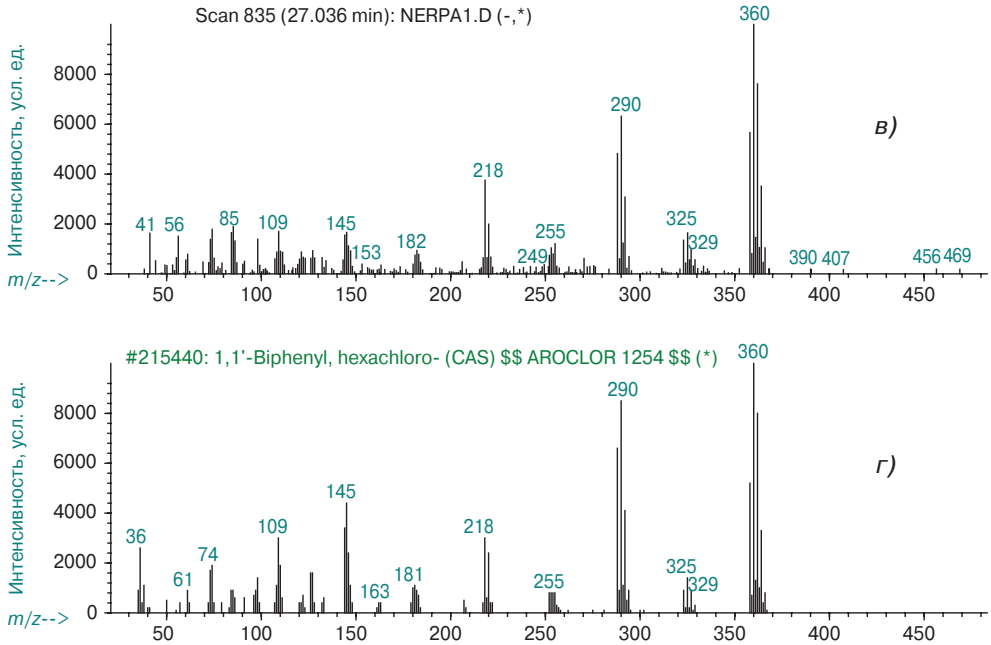


Рис. 1.8 *(окончание).* Спектр компонента смеси после вычитания фона (*в*); библиотечный спектр гексахлорбифенила (сходимость с экспериментальным спектром 99%) (*г*)

Современные приборы позволяют сканировать спектр за 0,01–0,5 сек, что удовлетворительно сочетается с шириной хроматогафического пика (как правило, несколько секунд). Если учесть, что средний хроматомасс-спектрометрический анализ длится 30 минут, при скорости сканирования 0,1 сек в памяти компьютера должно остаться 18 000 спектров. Этот факт наглядно демонстрирует невозможность получения качественных результатов без стыковки прибора с мощным компьютером. Кстати, времяпролетные спектрометры (разд. 6.7) позволяют регистрировать до 500 полных масс-спектров в секунду. Эта особенность привела к созданию быстрой хроматомасс-спектрометрии (Rapid GC-MS), позволившей сократить время анализа смесей в 5–10 раз [64].

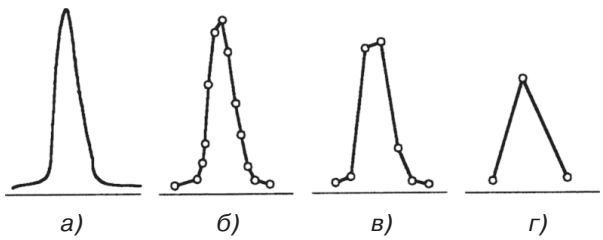


Рис. 1.9. Вид и площадь наблюдаемого сигнала хроматографического пика при регистрации полного ионного тока в зависимости от скорости сканирования. Аналоговый сигнал (*а*); за время выхода компонента зарегистрировано 13 масс-спектров (*б*); за время выхода компонента зарегистрировано 7 масс-спектров (*в*); за время выхода компонента зарегистрировано 3 масс-спектра (*г*)

На рис. 1.10 представлен пример хроматографического пика додекана в эксперименте методом сверхбыстрой хроматографии. В этих условиях ширина хроматографического пика составила всего 100 миллисекунд. При скорости сбора данных 250 спектров в секунду можно получить корректный сигнал додекана. Однако даже при достаточно высокой скорости сканирования в 10 спектров в секунду результат крайне искажен. Сравните площади пиков на рис. 1.10. Количественное определение в таком варианте становится абсолютно невозможным, но и идентификация соединения оказывается весьма проблематичной, поскольку интенсивности пиков в зависимости от величин m/z фрагментных ионов будут сильно искажены.

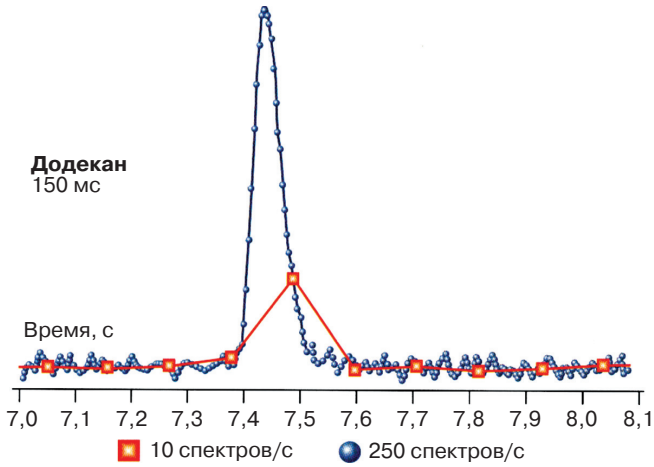


Рис. 1.10. Хроматографические пика додекана в эксперименте методом сверхбыстрой хроматографии при скорости сбора данных 250 спектров в секунду и 10 спектров в секунду

Хромасс добавляет к масс-спектрометрической информации еще один очень важный параметр – время удерживания. Именно благодаря этому параметру появляется возможность во многих случаях проводить качественный и количественный анализ изомеров, масс-спектры которых очень похожи. На рис. 1.11*б*, *в* представлены практически неразличимые спектры электронной ионизации изомерных флуорантена и пирена. Однако времена удерживания этих соединений различаются почти на 1 минуту (рис. 1.11*а*), что позволяет легко их идентифицировать.

Хромасс позволяет также детектировать ультрамикрокомпоненты на фоне высоких концентраций других соединений. Для этой цели используется мониторинг заданных ионов (разд. 12.2). Тем не менее следует отметить, что число соединений, которые можно проанализировать методом ГХ/МС, значительно меньше, чем при использовании масс-спектрометра с прямым вводом. Действительно, в последнем случае можно получить масс-спектр соединения, обладающего хотя бы слабой летучестью в условиях глубокого вакуума и температуре 300–400 °С, не говоря уже об альтернативных методах ионизации (гл. 5). В случае же ГХ/МС необходимо, чтобы вещество прошло через колонку газового хроматографа при атмосферном давлении и температуре 250–300 °С (в некоторых случаях до 400 °С).

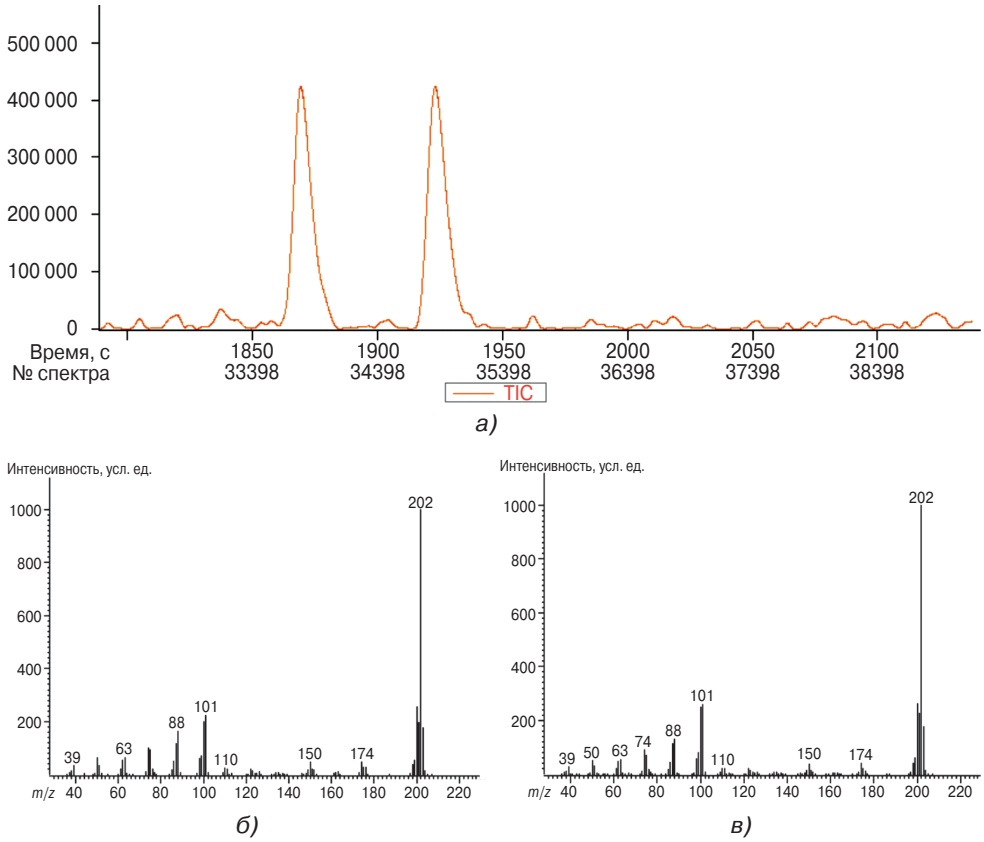


Рис. 1.11. Пики флуорантена и пирена на хроматограмме по полному ионному току (*а*). Масс-спектр ЭИ флуорантена (*б*). Масс-спектр ЭИ пирена (*в*)

Это приводит к невозможности анализа без предварительной дериватизации труднолетучих, высокополярных, термолабильных соединений. Некоторые примеры дериватизации для ГХ/МС анализа малолетучих соединений представлены в гл. 12.

1.4.3. ГХ×ГХ/МС

В случае очень сложных смесей органических соединений, например нефтепродуктов, или необходимости полного разделения соединений с близкими временами удерживания очень полезным оказывается метод тандемной газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ×ГХ/МС) [65]. В этом случае разделение осуществляется на двух последовательно соединенных колонках с разными свойствами (неполярная – полярная, ахиральная – хиральная и т.д.). Например, в варианте «неполярная – полярная» первая колонка разделяет компоненты по их температурам кипения, а вторая по полярности.

Между колонками находится криофокусировочное устройство. Первая колонка, как правило, длинная. Она разделяет компоненты, как и в обычном методе ГХ/МС. Однако на выходе эти компоненты попадают в охлаждаемую камеру, где собираются

в течение определенного времени (1–5 секунд). Далее резкий нагрев переводит собранные вещества во вторую короткую колонку другого типа, время удерживания аналитов в которой не превышает тех же самых 1–5 секунд. Пока вещества проходят вторую колонку, новая порция из первой колонки накапливается в криозатворе. В коммерческих приборах реализованы варианты с двух- и четырехступенчатыми модуляторами [65]. Каждый компонент помимо масс-спектра характеризуется двумя временами выхода по каждой из колонок.

ГХ×ГХ/МС хроматограммы представляют в трехмерном или двумерном (вид сверху) варианте (рис. 1.12–1.14). В первом случае каждый пик представляет конкретный компонент смеси, а объем пика пропорционален количеству данного компонента в смеси. Такое представление очень красиво и удобно для демонстраций, поскольку картинку можно поворачивать и демонстрировать под разным углом для получения оптимального вида. Работать с хроматограммой удобнее в двумерном варианте (рис. 1.14), поскольку пики не закрывают друг друга. Наглядно представлены все компоненты образца, хотя количественные характеристики выражены не столь ярко.

Благодаря улучшенному разделению масс-спектры компонентов оказываются чище, а библиотечный поиск – более эффективным и надежным. При этом за один ввод образца в прибор можно получить информацию по индивидуальному составу смесей, содержащих несколько тысяч компонентов. Вторым важным достоинством метода является возможность устанавливать класс соединения по его расположению на трехмерной хроматограмме. Так, на рис. 1.13 представлена масс-хроматограмма, построенная по ионам с m/z 55, характерным для спиртов и алкенов/нафтенов. Масс-спектры этих классов соединений могут быть очень похожими, поскольку молекулярные ионы спиртов, будучи нестабильными, легко теряют молекулу воды, превращаясь в соответствующие углеводороды (гл. 10). Поэтому возможны ошибки в идентификации.

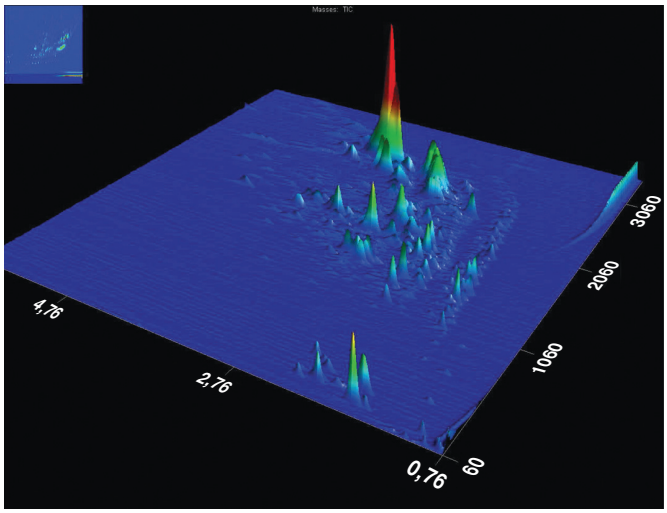


Рис. 1.12. Трехмерный вариант представления результатов ГХ×ГХ/МС эксперимента (полный ионный ток) для образца углеводородной фракции нефти из Сользаводска

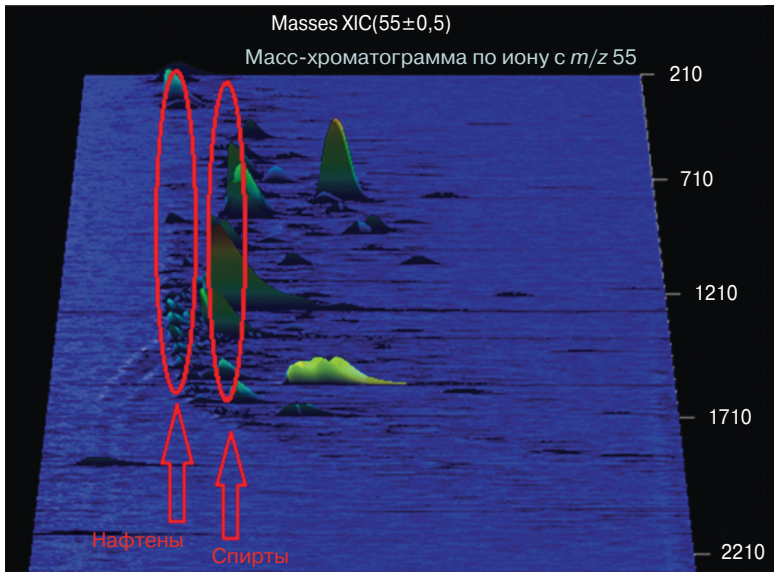


Рис. 1.13. Трехмерная масс-хроматограмма по ионам с *m/z* 55, характерным для спиртов и алкенов/нафтенов. Ряд спиртов располагается правее ряда нафтенов, поскольку они полярнее и выходят из короткой полярной колонки позже соответствующих углеводородов

Однако на рис. 1.13 видно, что спирты и нафтены выходят из второй (полярной) колонки с разным временем удерживания. По положению хроматографического пика можно сделать однозначный вывод о принадлежности компонента смеси.

Зачастую прикладную задачу с помощью ГХ×ГХ/МС можно решить без полной расшифровки масс-спектров всех компонентов. Например, на рис. 1.14*а*, *б* предствлены двумерные хроматограммы ГХ×ГХ/МС анализа дизельного топлива до и после проведения процесса десульфуризации. На рис. 1.14*а* в выделенных областях наблюдается большое количество пиков. Они обусловлены серусодержащими соединениями разного типа. После проведения процесса десульфуризации эти области оказываются пустыми, т.е. очистка прошла практически количественно (рис. 1.14*б*).

Дополнительную информацию о методе ГХ×ГХ/МС можно найти в книгах [65, 66].

В методе **реакционной хроматомасс-спектрометрии** перед колонкой хроматографа или между колонкой и масс-спектрометром устанавливается реакционная камера, в которой можно осуществлять заданные превращения анализируемых соединений. В таком варианте дериватизация, разделение и анализ компонентов пробы осуществляются в режиме on-line. Реакционная хроматомасс-спектрометрия может использоваться для улучшения разделения компонентов смеси или для проведения структурных анализов. Например, дейтерирование алкенов в реакционной камере позволяет установить положение двойной связи в молекуле [30].

Для дополнительной информации о ГХ/МС можно порекомендовать книги [7, 67].

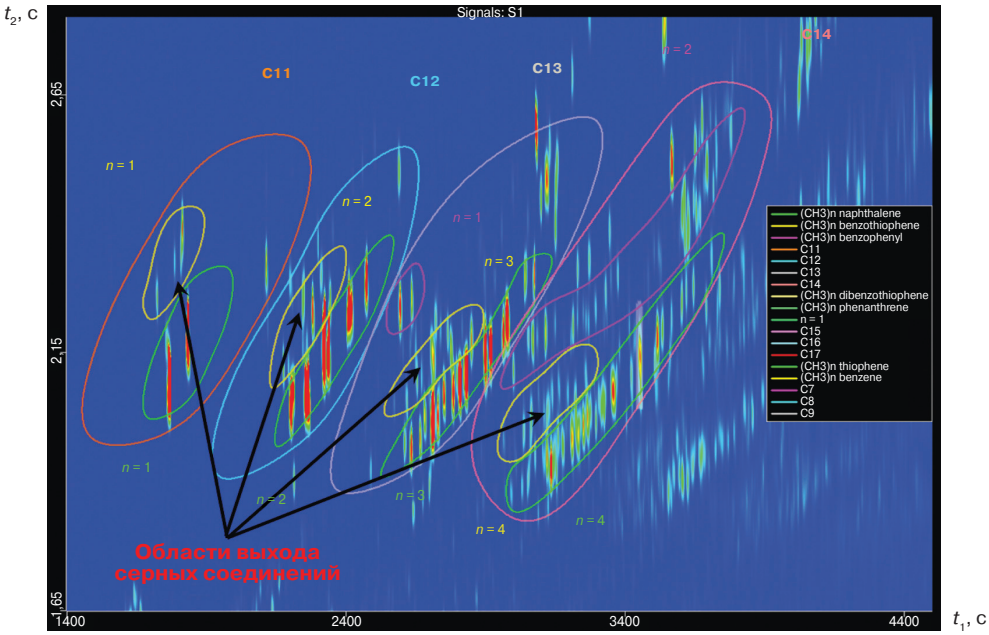


Рис. 1.14*а*. Хроматограмма дизельного топлива. В выделенных участках находятся серусодержащие соединения

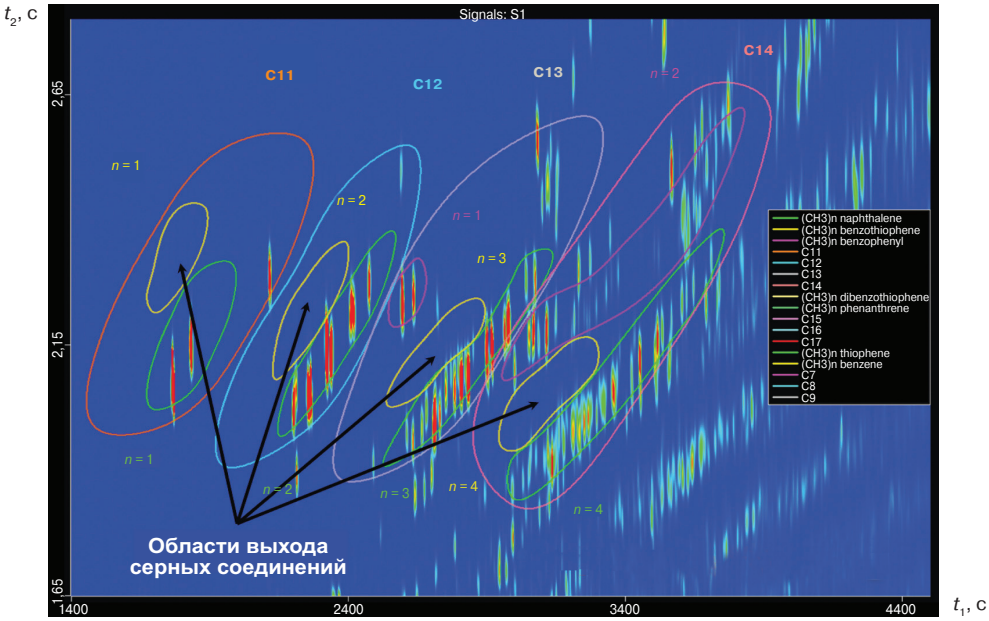


Рис. 1.14*б*. Хроматограмма дизельного топлива после его десульфуризации. В выделенных участках отсутствуют какие-либо пики

1.5. Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (ЖХ/МС, LC/MS)

Решить проблему анализа тяжелых, полярных и термолабильных соединений можно при замене газового хроматографа на жидкостный. При всей принципиальной очевидности такого решения создать эффективный метод ЖХ/МС оказалось не столь простой задачей [7, 68, 69]. Наиболее сложным моментом была стыковка жидкостного хроматографа с масс-спектрометром. Масс-спектрометр обычно работает в условиях глубокого вакуума (10^{-6} мм рт.ст.), а скорость потока через стандартную колонку жидкостного хроматографа составляет примерно 1 мл/мин. Две наиболее часто используемые в современной ЖХ/МС жидкие фазы – метанол и вода. Испаряясь в источнике ионов, 1 мл метанола образует 0,55 л пара, а 1 мл воды – 1,24 л пара. Учитывая, что вакуумная система масс-спектрометра может поддерживать требуемое для работы давление только в том случае, если приток паров в ионный источник не превышает 10 мл/мин, понятно, что соединительный узел (интерфейс) системы ЖХ/МС должен эффективно осуществлять обогащение анализируемым соединением примерно в 100 раз. При этом надо помнить, что проводящие жидкости могут быть причиной возникновения электрической дуги в магнитных секторных приборах, работающих в условиях высокой разности потенциалов, а нелетучие неорганические соли, используемые в качестве буфера в хроматографии, приводят к проводящим отложениям на линзах источника ионов, вызывая расфокусировку прибора.

Поскольку метод ЖХ/МС обычно используется для анализа полярных и малолетучих соединений, наиболее эффективно применение обратнофазной хроматографии с неполярной неподвижной фазой и полярным растворителем (вода, метанол, изопропанол, ацетонитрил). Тем не менее хороших результатов можно добиться и методом прямофазной ЖХ/МС с неполярной подвижной и полярной неподвижной фазами. Еще одним популярным вариантом для биологических проб является жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC), когда стационарной фазой служит полярный недириватизованный силикагель или силикагель модифицированный полярными аминопропильными или цианопропильными группами, а подвижная фаза состоит из воды со смешивающимися с ней растворителями: ацетонитрил, метанол [70]. Вода мобильной фазы образует иммобилизованный слой на поверхности стационарной фазы, в котором и происходит разделение полярных и заряженных молекул аналита. Этот метод устраняет недостатки и обратнофазной, и прямофазной ЖХ в ее стыковке с МС, поскольку позволяет разделять высокополярные аналиты и не использовать растворители, которые плохо стыкуются с МС в режиме атмосферных методов ионизации.

К настоящему времени существует значительное число интерфейсов ЖХ/МС. Часть из них уже практически не используется. Ниже представлены наиболее важные варианты. Самый популярный и эффективный метод стыковки жидкостного хроматографа с масс-спектрометром – электрораспылительная ионизация – подробно представлен в разд. 5.13.

1.5.1. Ленточный транспортер (moving belt)

Исторически первым интерфейсом ЖХ – МС можно считать ленточный транспортер [71], появившийся в 1976 году. Принципиальная схема устройства представлена на рис. 1.15.

Его основной конструкционной деталью является тонкая полиимидная кольцевая лента. Элюат из колонки хроматографа попадает на ленту, движущуюся по направлению к источнику ионов. На пути следования он проходит вдоль инфракрасных испарителей, которые переводят в газовую фазу значительную долю подвижной фазы. Далее лента проходит вакуумный замок, и в условиях вакуума остатки растворителя откачиваются насосами. В месте перегиба ленты, в ионном источнике, находится импульсный нагреватель, который переводит в газовую фазу молекулы образца, подвергающиеся электронной или химической ионизации. Двигаясь в обратном направлении, лента очищается от избытка нанесенного образца благодаря дополнительным испарителям, а иногда и растворителям и, теоретически, возвращается за новой порцией элюата в исходном чистом виде.

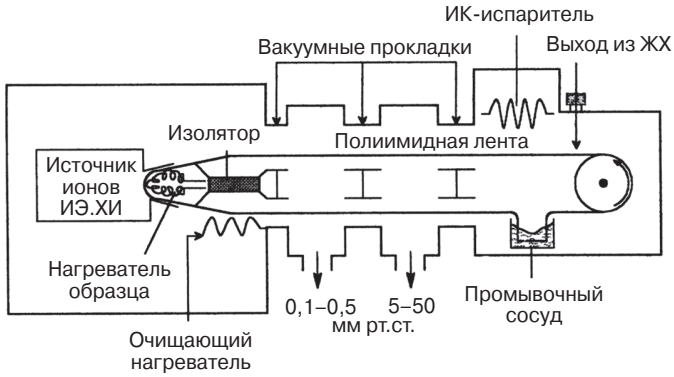


Рис. 1.15. Принципиальная схема ленточного транспортера

К достоинствам метода следует отнести:

1) возможность использования стандартных библиотек масс-спектров электронной ионизации для идентификации исследуемых веществ;
2) возможность работы со стандартными колонками для жидкостной хроматографии, поскольку метод использует скорости потока до 1,5 мл/мин. Такие потоки приемлемы при распылении элюата на ленту;
3) неорганические соли, используемые в качестве буфера при хроматографировании, не мешают анализу.

Тем не менее ленточные транспортеры не получили широкого признания, поскольку лишь незначительно расширяли круг органических соединений, доступных масс-спектрометрическому анализу. В ионном источнике все равно требовался термический перевод вещества в газовую фазу. Лента транспортера примерно через 10 прохождений оказывалась загрязненной, что приводило к наложению масс-спектров друг на друга и мешало надежной идентификации. Качество спектров и интенсивность характеристических ионов существенно зависели от количества

образца, т.е. воспроизводимость была плохой. В настоящее время ленточные транспортеры не используются, хотя в 70–80-х годах прошлого века этим методом было получено много интересных результатов.

1.5.2. Прямой ввод жидкости (direct liquid introduction, DLI)

Данный метод тоже следует рассматривать, скорее, как историю масс-спектрометрии. Он более или менее активно использовался в 80-х годах XX века, но уступил место более прогрессивным техникам, основанным на аналогичном принципе. Фактически все современные интерфейсы ЖХ/МС могли бы быть названы прямым вводом жидкости. Для его реализации на выходе из хроматографической колонки устанавливается диафрагма с отверстием 2–5 микрон (рис. 1.16). Возникающая струя мелких капель движется с большой скоростью к источнику ионов. На пути следования капли проходят через камеру испарения, где большая часть растворителя переходит в газовую фазу. Оказываясь в источнике масс-спектрометра, молекулы аналита подвергаются химической ионизации (разд. 5.2), тогда как молекулы растворителя играют роль газа-реагента. Основной недостаток метода – низкая скорость потока. Давление в источнике становится слишком высоким при потоках более 50 мкл/мин. Поэтому требуется либо разделять поток из стандартных хроматографических колонок, уменьшая тем самым чувствительность метода примерно в 20 раз, либо использовать узкие колонки. Кроме того, узкое отверстие постоянно забивается, а добавки неорганических солей к подвижной фазе приводят к быстрому ухудшению работы масс-спектрометра.

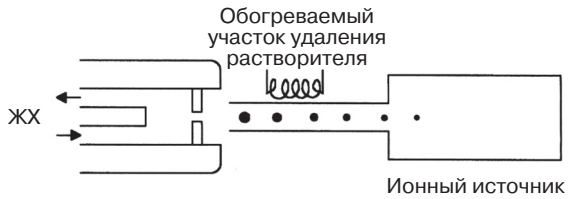


Рис. 1.16. Принципиальная схема метода прямого ввода жидкости

1.5.3. Поток частиц (particle beam)

В этом варианте интерфейса поток из колонки хроматографа направляется через капилляр в стеклянный распылитель, где элюат превращается в облако мелких капель, разорванных концентрическим потоком гелия. Это облако перемещается внутри стеклянной испарительной камеры, стенки которой подогреваются, а давление поддерживается на уровне чуть ниже атмосферного. При этом происходит частичное испарение растворителя, и размер капель уменьшается. Испарительная камера заканчивается узким отверстием, за которым следует сепаратор молекулярного пучка с вакуумной откачкой (рис. 1.17). Вылетая из испарительной камеры, частицы приобретают высокую скорость благодаря сужению потока. Поскольку более тяжелые молекулы анализируемого вещества менее подвержены диффузии, чем атомы гелия или молекулы растворителя, именно они и проходят в узкое входное отверстие сепаратора, а из него в масс-спектрометр.

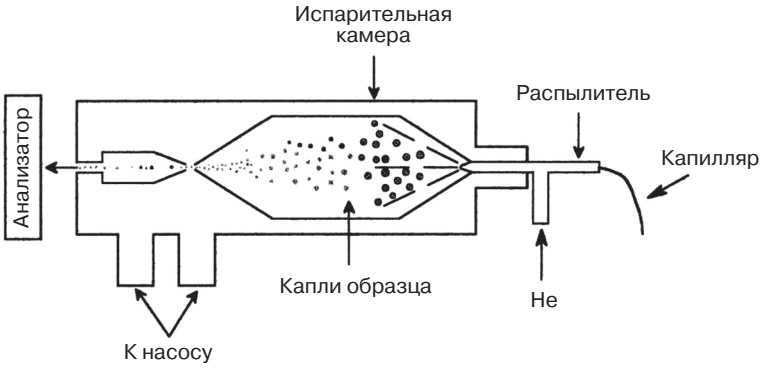


Рис. 1.17. Принципиальная схема интерфейса с потоком частиц

Частицы анализируемого вещества далее направляются в ионный источник, где подвергаются химической или электронной ионизации. Получение спектров электронной ионизации является преимуществом метода, поскольку позволяет использовать компьютерные библиотеки масс-спектров (разд. 4.5). Такой интерфейс может работать с потоками жидкости из хроматографа в диапазоне от 0,1 до 1,0 мл/мин. Чувствительность метода для получения полного масс-спектра лежит на уровне единиц нанограммов (10^{-9} г). Этот метод фактически заменил ленточный транспортер, хотя и не устранил недостатков, связанных с невозможностью работы с высокомолекулярными, нелетучими и термолабильными соединениями.

1.5.4. Термораспыление, термоспрей (thermospray, TSP), плазмораспыление, плазмаспрей (plasmaspray)

Принципиальная схема методов термораспыления и плазмараспыления представлена на рис. 1.18. В этом случае поток из колонки жидкостного хроматографа направляется в нагреваемый капилляр. Диаметр капилляра 0,1 мм, что значительно больше по сравнению с отверстием для метода прямого ввода жидкости. Это устраняет случаи закупорки – серьезный недостаток прямого ввода жидкости. Температура капилляра поддерживается на уровне температуры кипения растворителя. В результате из капилляра вырывается струя пара, которая попадает в ионизационную камеру.

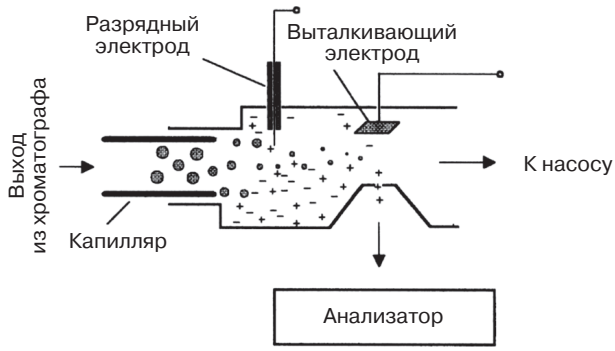


Рис. 1.18. Принципиальная схема термоспрея (плазмаспрея)

В случае плазмаспрея подача напряжения на разрядный электрод или просто пучок электронов создают условия химической ионизации (разд. 5.2), причем роль газа-реагента играют пары растворителя.

Работая в режиме плазмаспрея, исследователи замечали, что часто удается регистрировать ионы даже в случае выключенного электрода. Анализ этого эффекта привел к возникновению техники термораспыления. Дело в том, что некоторые анализируемые соединения уже в растворе находятся в виде положительных или отрицательных ионов. Добавки кислот и оснований в растворители жидкостной хроматографии, которыми в большинстве случаев являются вода и метанол, приводят к протонированию или депротонированию субстрата. Появлению заряда служат также добавки электролитов, например, ацетата аммония. Струя пара, выходящая из капилляра, представляет собой аэрозоль небольших заряженных капель. Нагретый источник ионов и работающие вакуумные насосы заставляют эти капли при движении уменьшаться в размере. В конечном итоге градиент поля на каплях может достигать критических значений, что приводит к устранению сольватной оболочки и появлению свободных ионов в газовой фазе. Выталкивающий потенциал направляет эти ионы в узкое отверстие, ведущее к анализатору, а избыток растворителя откачивается насосами (рис. 1.18).

Термоспрей и плазмаспрей применимы к потокам жидкости из хроматографа в диапазоне от 0,5 до 2,0 мл/мин, что позволяет работать с обычными аналитическими колонками. Следует отметить нежелательность использования в качестве буфера нелетучих неорганических солей из-за возможного образования отложений в источнике ионов. В качестве недостатка метода можно отметить его плохую воспроизводимость. Интенсивность спектра, а также наличие или отсутствие фрагментных ионов существенно зависят от состава раствора, наличия добавок, температуры капилляра и источника. В связи с этим очень важен выбор оптимальных условий регистрации спектра для каждого анализируемого вещества. Чувствительность метода лежит в очень широком диапазоне от единиц нанограммов до десятков микрограммов. Увеличение доли пиков фрагментных ионов в спектре достигается увеличением потенциала на выталкивающем электроде. Причиной тому становятся более эффективные столкновения разогнанных ионов с молекулами, так как в этой части ионного источника давление достаточно высоко.

Для ознакомления с другими существующими вариантами ЖХ/МС целесообразно предварительно усвоить основные методы ионизации веществ. Подробное описание проточного варианта бомбардировки быстрыми атомами, химической ионизации при атмосферном давлении, электрораспыления, акустического распыления представлено в гл. 5.

1.6. Сверхкритическая флюидная хроматография/масс-спектрометрия (СФХ/МС)

Помимо газа или жидкости, подвижной фазой для хроматографического разделения органических соединений может служить вещество, находящееся в сверхкритическом состоянии. Такой вид хроматографии был впервые предложен более полувека назад [72]. В сверхкритической флюидной хроматографии/масс-спектрометрии

(Supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, SFC/MS) используемое в качестве подвижной фазы вещество можно представить как очень плотный газ. Наиболее часто используемый диоксид углерода в таком состоянии имеет свойства, промежуточные между жидкостью и газом, т.е. это плотный газ с высокой сольватирующей способностью. Растворение образца в таком материале можно рассматривать как процесс, родственный переводу вещества в газовую фазу, но протекающий при достаточно низкой температуре.

Как уже отмечалось в разд. 1.5, основной проблемой стыковки жидкостного хроматографа и масс-спектрометра является большой объем вещества (растворителя), поступающего в ионный источник, что трудно совместимо с условиями высокого вакуума в нем. В СФХ поток подвижной фазы значительно меньше, т.е. комбинация СФХ/МС осуществима с меньшими сложностями по сравнению с ЖХ/МС. Мобильная фаза СФХ имеет меньшую вязкость и больший коэффициент диффузии по сравнению с фазами ЖХ. Фактически, метод является промежуточным между ЖХ/МС и ГХ/МС и в плане инструментальных требований, и в плане свойств анализируемых соединений. Важно, что метод позволяет анализировать более тяжелые и более термолабильные соединения по сравнению с ГХ/МС. Это же касается полярности аналитов. В случае СФХ/МС идеальные аналиты более полярны, чем те, для которых предпочтителен метод ГХ/МС, и менее полярны, чем те, для которых предпочтителен метод ЖХ/МС.

В 80-х годах XX века казалось, что метод может существенно потеснить ЖХ/МС благодаря большей разрешающей способности и уже существующим в то время эффективным интерфейсам. Однако изобретение электроспрея (разд. 5.13) и создание метода капиллярного электрофореза (разд. 1.7) отодвинули СФХ/МС на вторые позиции. Тем не менее метод по-прежнему широко используется для анализа липидов, пестицидов, силиконов, неионогенных ПАВ, природных соединений и т.д. Еще одним преимуществом СФХ/МС над ГХ/МС является тот факт, что в сверхкритическом состоянии вещество, используемое в качестве подвижной фазы, является отличным растворителем и очень эффективно экстрагирует органические соединения разных классов из образцов пищевых продуктов, полимерных материалов, биоты, объектов окружающей среды. Это существенно упрощает подготовку проб для последующего масс-спектрометрического анализа.

Существует огромное разнообразие интерфейсов для стыковки сверхкритического флюидного хроматографа с масс-спектрометром [73]. Для метода подходят практически все интерфейсы, используемые в ЖХ/МС, хотя они могут быть слегка модифицированы. Результаты часто улучшаются при увеличении полярности подвижной фазы, например при использовании в СФХ/МС электроспрея (разд. 5.13). Положительным образом сказывается добавление к подвижной фазе метанола или другого полярного органического растворителя [74]. Для улучшения разделения к жидкостям в суперкритическом состоянии могут добавляться в качестве добавок кислоты или основания. Это расширяет круг анализируемых соединений. В частности, использование трифторуксусной кислоты в качестве добавки к подвижной фазе CO_2/метанол для предотвращения диссоциации карбоксильных групп и протонирования аминогрупп позволило проводить надежный анализ самых разных по составу пептидов с длиной цепи до 40 аминокислотных остатков [75].

Помимо электроспрея, активно используется химическая ионизация при атмосферном давлении (разд. 5.11). Применение ленточного транспортера (разд. 1.5.1), потока частиц (разд. 1.5.3) или специальных капиллярных ограничителей позволяет работать в режимах электронной (разд. 2.1) и химической (разд. 5.2) ионизации. Следует подчеркнуть, что в случае химической ионизации газом-реагентом служит не CO_2, а метан, изобутан или аммиак. Последний часто оказывается предпочтительным, поскольку процесс ионизации аммиаком подвержен менее значительному влиянию изменений парциального давления CO_2 в процессе анализа. Это связано прежде всего с очень низким сродством к протону молекулы углекислого газа. Некоторое «раскрытие» ионизационной камеры, хотя и ухудшает чувствительность, позволяет получать классические спектры электронной ионизации, а ионизация осуществляется как напрямую, при взаимодействии молекул образца с электронами, так и в результате перезарядки при их взаимодействии с $CO_2^{+\bullet}$. Такие спектры перезарядки (разд. 5.2) оказываются практически аналогичными обычным спектрам ИЭ. Их даже можно использовать для поиска по компьютерным библиотекам масс-спектров [76].

Наибольшие успехи СФХ/МС последнего времени связаны с медициной, прежде всего с липидным анализом. Так, родственные простагландину изопростаны являются продуктами окисления полиненасыщенных жирных кислот и генерируются организмом в условиях оксидативного стресса, например в мозге людей с болезнью Альцгеймера. Метод СФХ/МС/МС с успехом используется для идентификации региоизомеров и энантиомеров этих соединений. Хиральная хроматография позволяет разделить изомеры, а тандемная масс-спектрометрия (мониторинг заданных реакций, разд. 12.3) провести их идентификацию и количественное определение [77]. Применение двумерного СФХ/СФХ/МС метода для разделения и анализа сложных смесей рацематов фармацевтических препаратов с многочисленными примесями продемонстрировало, что ахиральное и хиральное разделение могут быть успешно объединены в одном последовательном процессе как в аналитическом, так и в препаративном варианте [78]. Разработана автоматизированная программа для высокопроизводительного профилирования липидов в биологических жидкостях с использованием СФХ/МС и орбитальной ловушки [79]. Молекулы липидов подвергались разделению на обычной колонке С18 не только по длине алкильных радикалов, но и по природе головных групп. Полное профилирование осуществляется всего за 30 минут, что доказывает эффективность предложенного подхода. Универсальность метода продемонстрирована при создании методики одновременного детектирования и количественного определения 17 пестицидов, обладающих широким разбросом молекулярных масс (112–888) и полярности (log P_{ow} от –4,6 до 7,05). Время СФХ/МС/МС анализа всей группы пестицидов, для которых обычно используется комплекс и ГХ/МС, и ЖХ/МС, составило лишь 11 минут [80].

Обзоры последних лет посвящены общим вопросам СФХ/МС [81], ее использованию для исследования лекарственных препаратов [82, 83] и решения проблем липидомики [84]. Благодаря высокому хроматографическому разрешению и возможности разделять изомеры, включая оптические, СФХ/МС во многих случаях оказывается эффективнее альтернативных подходов.

1.7. Капиллярный электрофорез /масс-спектрометрия, КЭ/МС (Capillary Electrophoresis/Mass spectrometry, CE/MS)

Альтернативой хроматографическим методам разделения компонентов образца перед вводом в масс-спектрометр является капиллярный электрофорез [85]. Появление капиллярного варианта электрофореза существенно повысило разрешающую способность разделения компонентов смесей (до 10^7 теоретических тарелок) и, как следствие, эффективность анализа. Логичная стыковка электрофоретического капилляра с масс-спектрометром подняла этот метод на новый уровень [86, 87]. Метод основан на разделении заряженных компонентов смесей в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Наиболее распространенным вариантом метода КЭ в стыковке с масс-спектрометрией является капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ), основанный на различии в электрокинетических подвижностях заряженных частиц в электролитах. Эта подвижность определяется зарядом частиц и сопротивлением жидкости, которая зависит от размера и формы иона.

В данном случае можно с натяжкой говорить о принципиально другой системе ввода образца в масс-спектрометр, потому что в качестве интерфейса используются устройства ЖХ/МС. Наилучших результатов удалось достигнуть при использовании на выходе из колонки техники электрораспыления (разд. 5.13). Существуют интерфейсы с подачей дополнительной жидкости и без нее. Первый вариант характеризуется меньшей чувствительностью и хорошей воспроизводимостью, а второй – повышенной чувствительностью с ухудшенной воспроизводимостью [88, 89]. Возможно также [90–92] использование техники ультразвукового распыления (разд. 5.13). Есть большое число работ по стыковке КЭ с МАЛДИ [93, 94]. Кстати, именно фоновые электролиты создают основную сложность в интерфейсах КЭ/МС. Тем не менее капиллярный электрофорез/масс-спектрометрия по праву считается самостоятельным методом анализа прежде всего биологических молекул (белков, липидов, пептидов, аддуктов с ДНК и т.д.). Очень небольшой объем проб является преимуществом метода, когда речь идет о работе с биологическими образцами, доступными в ограниченных количествах. Одновременно этот аспект является и недостатком, поскольку иногда чувствительности оказывается недостаточно и требуется проводить концентрирование исходного образца [95]. Поскольку наряду с очень малым количеством пробы (менее 10^{-10} литра) капиллярный электрофорез позволяет проводить сверхбыстрое разделение компонентов смеси с шириной пика в несколько миллисекунд [96], необходимо осуществлять такое же быстрое сканирование спектра. В частности, впечатляющие результаты получены при использовании времяпролетного анализатора с ортогональным ускорением [97]. Однако следует отметить, что в качестве детектора к КЭ может быть использован масс-спектрометр любого типа, например прибор ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье [98]. Несколько сотен ссылок на различные аспекты и приложения метода КЭ/МС в биомедицинских исследованиях можно найти в обзорах [99–101].

1.8. Ионная хроматография/масс-спектрометрия (ИХ/МС)

Существенно реже для целей органической химии используется комбинация ионная хроматография/масс-спектрометрия (Ion chromatography/mass spectrometry, IC/MS). Тем не менее это весьма перспективное аналитическое направление, особенно для целей экологии, криминалистики и биомедицинских приложений [102, 103]. Метод наиболее полезен для неорганических и органических ионов с низкими величинами m/z, когда другие методы разделения оказываются не столь эффективными.

Первые публикации по этому направлению появились в середине 1990-х годов [104, 105]. Методами ионизации в большинстве случаев оказываются электрораспыление (разд. 5.13) или индуктивно связанная плазма [106]. В последнем случае ИХ разделяет конкретные формы элементов в образцах, тогда как масс-спектрометрический анализ без предварительного разделения позволяет установить лишь интегральные уровни химических элементов. В качестве примера можно привести количественное определение в образцах серусодержащих анионов S^{2-}, SO_3^{2-}, SO_4^{2-} и $S_2O_3^{2-}$ [107] или ряда галогенсодержащих анионов [108].

Помимо катионов металлов и неорганических анионов, ИХ/МС может с успехом применяться и для анализа органических ионов. В частности, пределы детектирования 100 нг/л при регистрации анионов галогенуксусных кислот получены методом ИХ/ИЭР/МС [109]. С этими побочными продуктами хлорирования питьевой воды не так просто работать классическими методами ГХ/МС и ЖХ/МС. Методика количественного определения восьми органических кислот методом ИХ/МС описана в работе [110].

Существует несколько вариантов ионной хроматографии. Их обсуждение выходит за рамки данного пособия. В частности, вариантом анализа ИХ/МС является формирование ионных ассоциатов, когда, например, из двухзарядного аниона получают устойчивый продукт с трехзарядным катионным реагентом. В результате образуется аналит с большей массой, который можно определять в режиме регистрации положительных ионов [111, 112].

Поскольку современная ионная хроматография позволяет за один ввод образца работать и с катионами, и с анионами, эффективно использование масс-спектрометров с чередующейся регистрацией положительных и отрицательных ионов [104, 105, 113]. Очень песпективен для ИХ/МС вариант капиллярной ионной хроматографии [114], устраняющий проблемы стыковки со стандартным источником ИЭР. Хотя на первый взгляд кажется, что масс-спектрометрия высокого разрешения не должна иметь значительных преимуществ для работы с низкомолекулярными соединениями, недавние исследования с использованием орбитальных ловушек продемонстрировали улучшенную чувствительность и надежность идентификации и количественного определения органических и неорганических анионов [115, 116].

1.9. Атмосферный ввод

Самой простой системой ввода является атмосферный (капиллярный) ввод. Если мы соединим источник ионов с атмосферой открытым капилляром, то благодаря вакууму внутри масс-спектрометра через этот капилляр будут поступать молекулы

и ионы самых разных соединений в газообразном или аэрозольном состоянии. Все современные методы ионизации на открытом воздухе (гл. 9) работают именно с атмосферным вводом, при этом открытый конец капилляра должен находиться в непосредственной близости от области образования ионов. Капилляр может изготавливаться из самых разных материалов, а его длина может достигать нескольких метров, что в некоторых случаях остро необходимо. Например, при масс-спектрометрическом контроле проведения хирургических операций открытый конец каппиляра закреплен на электроскальпеле хирурга, т.е. достаточно далеко от масс-спектрометра [117]. Если в работе используется обычный лабораторный масс-спектрометр, то современные насосы успешно справляются с откачкой. Несколько сложнее обстоит дело с портативными масс-спектрометрами, хотя и здесь есть эффективные решения [59].

ГЛАВА 2

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕССОВ МАСС–СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ

Поскольку масс-спектрометрия имеет дело с положительными или отрицательными ионами, после ввода вещества в прибор необходимо провести ионизацию молекул образца. На сегодняшний день существует более сотни методов ионизации. Часть из них используется очень активно, часть – только в единичных экспериментах. Популярность метода может достигать максимума в какой-то момент времени, а затем с появлением новых, более эффективных, сходить на нет.

2.1. Электронная ионизация (Electron Ionization, EI)

Среди различных методов ионизации особое положение занимает ионизация электронами (ИЭ). Исторически это первый метод ионизации органических соединений. Он же остается и наиболее распространенным на сегодняшний день. Основными достоинствами метода являются надежность и универсальность. Кроме того, в существующих компьютерных библиотеках масс-спектров (WILEY и NIST) используются именно спектры ИЭ. Теории масс-спектрометрической фрагментации и подходы к интерпретации спектров, о которых идет речь в этой главе и последующих (гл. 3, 4), также базируются в основном на первоначальном образовании молекулярного катион-радикала в результате электронной ионизации.

Старое название метода – электронный удар – несколько не соответствовало действительности. Реального удара электронов по молекуле не происходит. Электрон, пролетая вблизи молекулы, возбуждает ее электронную оболочку. Собственные электроны молекулы перемещаются на более высокие орбитали и могут покинуть молекулу. В связи с этим термин «электронный удар» недавно официально заменен на «электронную ионизацию» или «ионизацию электронами».

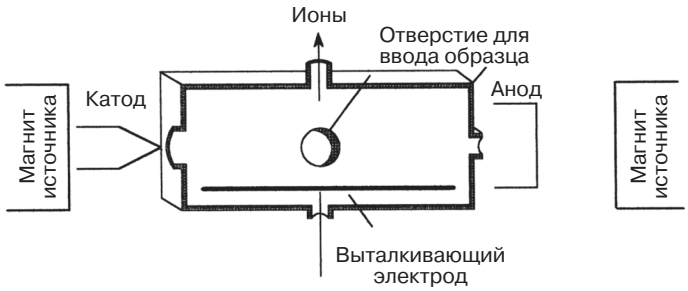


Рис. 2.1. Принципиальная схема источника ионизации электронами

Пучок электронов генерируется катодом (проволока или пластина из рения или вольфрама) и ускоряется потенциалом 12–70 В по направлению к аноду (рис. 2.1). Вещество в газовой фазе (давление 10^{-5}–10^{-6} мм рт.ст.) взаимодействует с электронами и ионизируется. Формально можно представить процесс ионизации уравнением (2.1):

$$M + \bar{e} = M^{+\cdot} + 2\bar{e} \qquad (2.1)$$

В результате образуется молекулярный ион ($M^{+\cdot}$). Это – нечетноэлектронный ион, т.е. катион-радикал. Эффективность ионизации очень низка. Ионизируется примерно одна из десяти тысяч молекул образца. Более 99,99% неионизованных молекул вещества откачивается из источника вакуумными насосами. Этот факт тем не менее позволяет еще раз подчеркнуть высочайшую чувствительность масс-спектрометрии, поскольку для получения спектра нужны пикограммовые (10^{-12}) количества вещества. Эффективность ионизации меняется от вещества к веществу. Эта характеристика соединения имеет количественный показатель, называемый **сечением ионизации**.

Важным параметром является энергия ионизирующих электронов. График зависимости ионного тока (количество образующихся ионов) от энергии ионизирующих электронов представлен на рис. 2.2. Ионный ток достигает максимума при энергиях электронов около 50 эВ. Именно такая энергия использовалась в советских приборах 1960–1970-х годов. Однако уже более 40 лет стандартные масс-спектры ИЭ во всем мире принято регистрировать, используя ионизирующие электроны с энергией около 70 эВ. Именно такая энергия, помимо высокой эффективности ионизации, дает возможность получать и наболее стабильные спектры. Пучок электронов не монохроматичен, причем разброс по энергиям, как правило, очень велик и может достигать 5 эВ. Это приводит к тому, что условия взаимодействия вещества с низкоэнергетическими электронами (крутая часть графика на рис. 2.2) нестабильны, а соответственно, не стабилен и масс-спектр. Чем меньше угол наклона кривой эффективности ионизации в какой-либо точке, тем выше стабильность масс-спектра, поэтому высокоэнергетическая часть кривой предпочтительна. Уменьшение энергии от 70 эВ приведет к меньшей стабильности спектра, а увеличение – к меньшей чувствительности. Следует также отметить, что все существующие библиотеки, включая последнюю версию наиболее популярной библиотеки NIST14, созданы на базе масс-спектров, полученных при энергиях ионизирующих электронов 70 эВ.

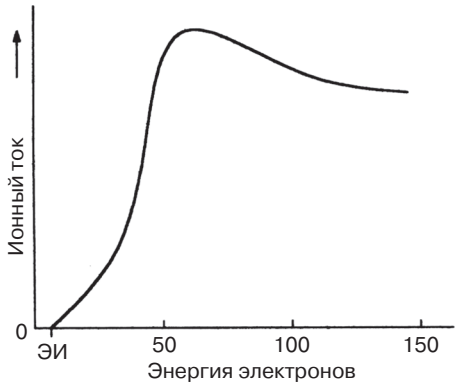


Рис. 2.2. Зависимость величины ионного тока от энергии ионизирующих электронов

Для того чтобы молекула образца потеряла свой электрон, необходима энергия ионизирующих частиц выше какого-то определенного критического значения. Эта энергия характеристична для каждого индивидуального соединения и называется **энергией ионизации (ЭИ)**. Поскольку каждая молекулярная или атомная орбиталь имеет

свою собственную энергию, молекула имеет несколько значений энергии ионизации (см. метод фотоэлектронной спектроскопии [118]). В масс-спектрометрии под энергией ионизации подразумевается минимальная энергия, требуемая для потери наиболее доступного электрона, т.е. энергия высшей занятой молекулярной орбитали. Величина ЭИ для большинства органических соединений лежит в диапазоне 6–12 эВ. Если энергия электронов, эмиттируемых катодом, ниже ЭИ, ионизация образца невозможна, и масс-спектра не будет.

В процессе ионизации молекулярный ион получает избыточную внутреннюю энергию в диапазоне 0–20 эВ. Эта избыточная энергия равномерно распределяется по всем связям, причем превышение энергии какой-либо связи ведет к ее разрыву с отщеплением нейтральной радикальной частицы и образованием четноэлектронного **осколочного** (фрагментного) иона. Вторым важнейшим процессом фрагментации являются перегруппировки с выбросом нейтральной молекулы и образованием нечетноэлектронного (катион-радикала) **перегруппировочного** иона. Минимальная энергия ионизирующих электронов, при которой в масс-спектре, помимо молекулярного, будет регистрироваться фрагментный ион, называется **энергией появления (ЭП)** данного иона. Чем выше энергия ионизирующих электронов, тем большее число направлений распада $M^{+\cdot}$ реализуется, причем, если внутренняя энергия осколочного иона остается высокой, могут идти вторичные процессы его распада. Принимая во внимание, что различия в ЭП осколочных ионов очень незначительны, небольшие изменения энергии ионизирующих электронов могут приводить к весьма существенным изменениям в масс-спектре. Если учесть отсутствие монохроматичности пучка ионизирующих электронов, понятно, что оптимальные условия получения спектра достигаются при энергиях электронов 50–70 эВ, когда максимален выход ионов, минимален наклон кривой эффективности ионного тока (рис. 2.2), а также задействованы все возможные направления распада $M^{+\cdot}$.

Наряду с однозарядными, образуются двух- и многозарядные ионы. Количество многозарядных ионов существенно меньше, чем однозарядных, и зависит прежде всего от структуры молекул образца, а также от условий эксперимента. Например, повышенным выходом многозарядных ионов характеризуются полициклические ароматические углеводороды (разд. 10.5).

В некоторых случаях, когда хотят увеличить интенсивность пика $M^{+\cdot}$, снимают спектр, используя ионизирующие электроны с энергией 12–20 эВ. Следует подчеркнуть, что в этом случае возрастает только относительная интенсивность пика $M^{+\cdot}$ и пиков перегруппировочных ионов по отношению к интенсивности пиков осколочных ионов, тогда как абсолютная интенсивность всех пиков в спектре падает. Кроме того, происходит потеря определенной информации, так как не все направления фрагментации реализуются в таких условиях. Это положение проиллюстрировано на рис. 2.3. Видно, что при уменьшении энергии ионизирующих электронов уменьшается число и интенсивность пиков в спектре, а относительная доля молекулярного иона возрастает. Хотя $M^{+\cdot}$ становится максимальным в спектре, растет именно относительное количество этих ионов, а абсолютное количество становится меньше, чем при 70 эВ, поскольку падение интенсивностей осколочных ионов идет значительно активнее. Нормирование спектра в результате осуществляется по $M^{+\cdot}$ и создается впечатление, что его интенсивность становится значительно выше.

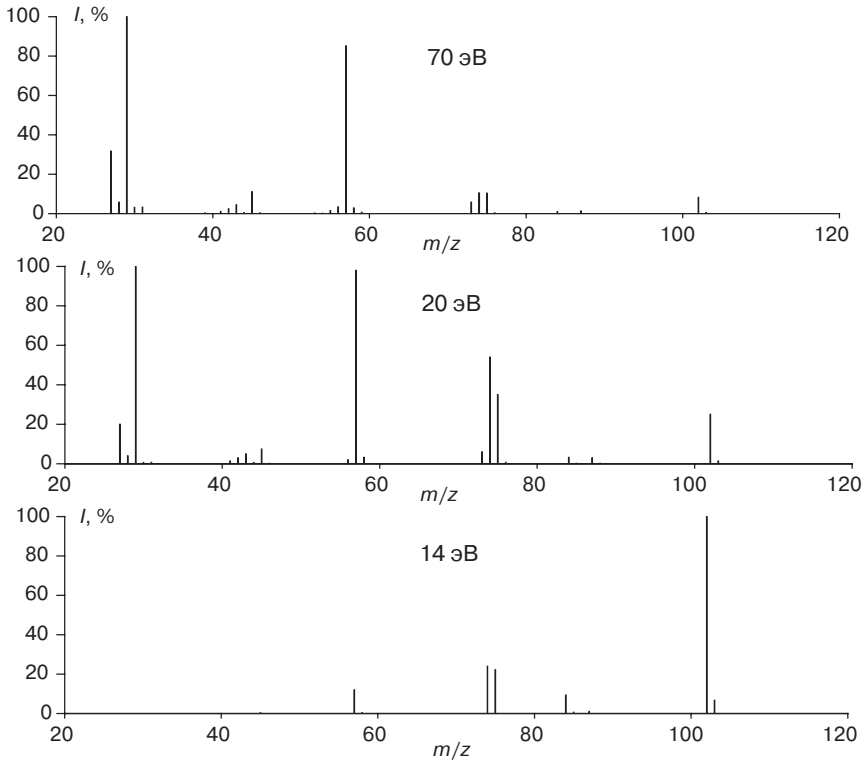


Рис. 2.3. Масс-спектр ионизации электронами этилпропионата (молекулярная масса 102 дальтона) при энергиях ионизирующих электронов 70, 20 и 14 эВ

Важный вывод, который следует помнить: **если пик молекулярного иона отсутствует в масс-спектре, полученном при энергии ионизирующих электронов 70 эВ, его не будет и при меньшей энергии электронов**. В этом случае можно говорить о нестабильности молекулярного иона данного соединения. Кстати, значительное число органических соединений характеризуется нестабильными молекулярными ионами в условиях ИЭ [119]. Это один из существенных недостатков данного метода ионизации.

Стоит отметить, что, если снизить внутреннюю энергию молекул образца до минимума, можно получать интенсивные пики молекулярных ионов даже при работе с алканами (при обычных условиях съемки они ничтожно малы либо вообще отсутствуют). Например, метод ГХ/МС с интерфейсом ультразвуковых молекулярных пучков [120] позволяет получать спектры алканов, в которых молекулярные ионы имеют 100% интенсивность (рис. 2.4). Это достигается направлением элюата, разбавленного струей гелия, из колонки в источник открытого типа с большой скоростью (до 100 мл/мин). При расширении в вакууме кинетическая энергия пучка возрастает, а внутренняя (колебательная) понижается в связи с «охлаждением» аналитов до температуры нескольких десятков градусов Кельвина. В отсутствие столкновений с горячими стенками источника большая часть образующихся молекулярных ионов имеет энергию, недостаточную для протекания фрагментации. Подробнее о методе ГХ/МС с интерфейсом ультразвуковых молекулярных пучков можно прочитать в обзоре [65].

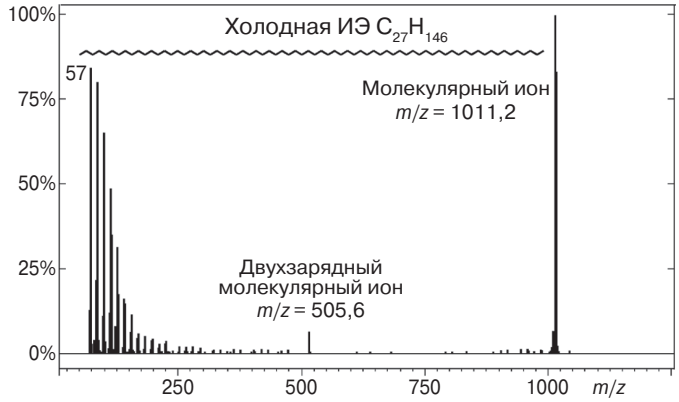


Рис. 2.4. Масс-спектр алкана $C_{72}H_{146}$, полученный методом ГХ/МС с интерфейсом ультразвуковых молекулярных пучков

В условиях ионизации электронами наряду с положительными образуются и отрицательные ионы (молекулярные анион-радикалы). К сожалению, качество спектров отрицательных ионов в этом случае оставляет желать лучшего. В частности, доминирующий пик в спектре зачастую обусловлен малоинформативным ионом (Cl^-, F^-, CN^-). Кроме того, выход отрицательных ионов значительно меньше, чем положительных. Тем не менее информация, заключенная в масс-спектрах отрицательных ионов, может служить хорошим дополнением к полученной с использованием положительных ионов. Детали фрагментации молекулярных анион-радикалов основных классов органических соединений, полученных в условиях ИЭ, подробно рассмотрены в работе [121].

Качество и информативность спектров отрицательных ионов можно повысить при использовании электронов с малыми (тепловыми) энергиями. Метод называется **резонансный захват электрона** и заключается в ассоциации электрона одной из молекулярных орбиталей молекулы образца [35]. Как правило, ионы образуются в нескольких резонансных областях с захватом электронов с энергиями 0–10 эВ. Эти области могут характеризоваться разными выходами ионов и разными направлениями фрагментации молекулярных анион-радикалов. Например, молекулы 4-циано-5-гидрокси-1,2,3-триазола и изомерного 2-диазо-2-цианоацетамида захватывают электроны в четырех резонансных областях энергий: 0,1; 1,5; 5,0 и 7,5 эВ, причем в трех последних ионные токи оказываются на 2–3 порядка ниже [122]. Наличие нескольких резонансных областей придает масс-спектру дополнительное измерение, поскольку каждое химическое соединение, фактически, характеризуется несколькими масс-спектрами. Этот факт открывает хорошие перспективы по масс-спектрометрической идентификации структурно близких соединений. К сожалению, эти потенциальные возможности резонансного захвата электрона реализованы на сегодняшний день далеко не в полной мере, хотя в последнее время метод электронного захвата все шире и эффективнее используется для анализа биологических молекул [123, 124]. Другим примером использования электронного захвата является метод селективного определения соединений, содержащих гетероатомы, в нефти. Он основан на разности энергий электронов, которые захватыва-

ются соединениями разных типов. Если большинство углеводородов нефти захватывают электроны только с энергиями более 10 эВ, то гетероатомные компоненты образуют анион-радикалы при взаимодействии с электронами, энергия которых приближается к нулю [125].

Возвращаясь к классическому варианту спектров ионизации электронами, можно отметить, что, поскольку давление в источнике ионов в условиях ИЭ 10^{-5}–10^{-6} мм рт.ст., а образец можно нагревать до нескольких сот градусов, в газовую фазу переходят многие органические соединения. Тем не менее у ионизации электронами есть существенные недостатки. Метод не пригоден для анализа термолабильных, высокомолекулярных, труднолетучих соединений. В спектрах ИЭ многих веществ пик $M^{+\cdot}$ имеет низкую интенсивность либо вообще отсутствует [119]. Широкий разброс по энергиям ионизирующих электронов не позволяет с достаточной точностью определять характеристики молекул и ионов (энергии появления и ионизации). Работа над устранением этих недостатков привела к созданию представительного ряда альтернативных методов ионизации (гл. 5).

2.2. Физические основы масс-спектрометрической фрагментации

Существует ряд более или менее строгих подходов к описанию процессов образования и фрагментации молекулярных ионов. К сожалению, на сегодняшний день ни один из них не может надежно предсказать массовые числа и интенсивности пиков всех ионов в спектре даже достаточно простых органических соединений. Во избежание чрезмерного углубления в физику и математику в данном разделе будут отражены лишь основные подходы, преимущества и недостатки существующих теорий.

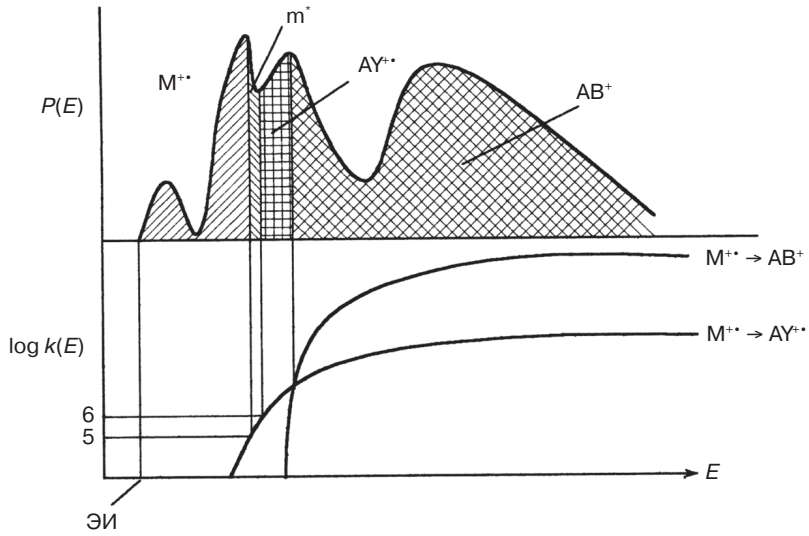


Рис. 2.5. Функции $P(E)$ и $k(E)$ молекулярного иона органического соединения АВХУ. Диаграмма Вархафтига

Практически любой процесс генерирования заряженной частицы сопряжен с передачей ей дополнительной внутренней энергии. В частности, в случае наиболее распространенного (и наиболее жесткого) метода ионизации, каким является ионизация электронами, образующиеся молекулярные ионы могут иметь избыточную энергию в диапазоне 0–20 эВ. Для химии растворов 20 эВ на частицу означало бы, что энергия системы составляет порядка 2000 кДж/моль, т.е. значительно выше энергии реакционных частиц, образуемых в растворах. Распределение образовавшихся молекулярных ионов по энергиям (верхняя часть рис. 2.5) можно представить в виде вероятностной функции $P(E)$. Эта кривая в определенной мере напоминает фотоэлектронный спектр данной молекулы. В растворах в результате столкновений происходит усреднение энергии частиц. В ионизационной камере масс-спектрометра все определяется процессом ионизации. В случае, например, химической ионизации (гл. 5) достаточно высокое давление в источнике приводит к многочисленным столкновениям ионов, радикалов и молекул, т.е. можно говорить об определенном усреднении их внутренней энергии. Напротив, условия высокого вакуума при использовании ионизации электронами препятствуют столкновениям частиц, и судьба образовавшегося иона зависит исключительно от той внутренней энергии, которую он приобрел в результате ионизации. Именно эта энергия определяет то, что одна часть ионов достигнет детектора без фрагментации, другая в виде каких-либо перегруппировочных ионов, третья – каких-либо осколочных ионов, четвертая – фрагментных ионов второго поколения и т.д. Следует подчеркнуть, что, поскольку речь идет о мономолекулярных реакциях изолированных частиц, живущих очень короткое время, набор и количество продуктов реакции определяются прежде всего кинетическими, а не термодинамическими факторами.

Здесь имеет смысл напомнить, что молекулярный ион образуется в результате ионизации молекулы (потеря электрона). Его величина m/z соответствует молекулярной массе соединения (за минусом массы электрона, что необходимо учитывать, используя масс-спектрометрию высокого разрешения). Фрагментные ионы образуются при распаде молекулярного. Осколочные ионы образуются в результате простых разрывов связей. Перегруппировочные ионы наряду с разрывами связей требуют образования новых связей между атомами (группами), не связанными напрямую в исходной молекуле.

2.2.1. Квазиравновесная теория

В 1952 году практически одновременно возникли две теории, направленные на интерпретацию мономолекулярных реакций в газовой фазе в условиях глубокого вакуума. Розенштоком [126] было предложено физическое описание процессов в источнике масс-спектрометра. Эта теория была названа квазиравновесной, поскольку постулировала, что за 10^{-12} секунды избыточная энергия равномерно распределяется по всем связям в молекуле, точнее, по всем энергетическим состояниям молекулярного иона, т.е. квазиравновесие между всеми этими состояниями достигается до того, как начнется фрагментация. **Вероятности путей фрагментации определяются только энергией и структурой каждого конкретного иона, а не методом**

ионизации, механизмом образования или структурой предшественника (для фрагментных ионов). Исключения связаны, как правило, с простейшими молекулами, случаями далеко отстоящих друг от друга возбужденных электронных состояний и быстрыми ($k > 10^{11}$) процессами распада. Близкая КРТ теория описывает процессы в нейтральных молекулах. Она была названа по фамилиям ее авторов Райса, Рампсберга, Касселя и Маркуса РРКМ [127].

Обе теории базируются на определенных допущениях.

1. Вращательные, колебательные, электронные и поступательные движения частиц независимы друг от друга.
2. Движения ядер могут быть описаны уравнениями классической механики, хотя и с учетом квантовохимических коррекций.
3. Все микросостояния частиц равновероятны, т.е. энергия равновероятно распределяется по всем степеням свободы иона.
4. Существует энергетическая граничная поверхность, разделяющая ионы-предшественники и ионы-продукты. Эта поверхность может пересекаться только в одном направлении, т.е. для любого иона-предшественника достижение этого переходного состояния означает необратимый распад с образованием продуктов.

Основная задача теорий – расчет скоростей фрагментации частиц с разрывом любой химической связи в зависимости от избытка внутренней энергии. Рассмотрим несколько подробнее ионизацию электронами. Сам процесс потери электрона нейтральной молекулой протекает за 10^{-16} секунды. По принципу Франка – Кондона [128] расстояния между ядрами при этом не изменяются. Колебания ядер могут начаться через 10^{-12}–10^{-13} секунды. После ионизации молекулярные ионы могут оказаться на любых уровнях всех возбужденных (вращательных, колебательных, электронных) состояний. Важно, что ион в возбужденном электронном состоянии живет не более 10^{-8} секунды. За это время в результате излучательных или безызлучательных процессов ион переходит в основное электронное состояние, либо фрагментирует. Поскольку время присутствия ионов в источнике ионизации электронами 10^{-6} секунды, около 99% времени ион находится там в основном электронном состоянии. Когда, представляя схему фрагментации, указывают заряд иона на конкретном атоме, это не означает, что в результате ионизации электрон удален именно из этого места. Речь идет об изображении иона в основном электронном состоянии.

Вероятность какой-либо трансформации (изомеризация, фрагментация) молекулярного иона зависит от его внутренней энергии (рис. 2.5 нижняя часть), т.е. от константы скорости $k(E)$ конкретной реакции. Та часть молекулярных ионов, энергия которых ниже критической энергии (E_0) для самой низкоэнергетической реакции фрагментации, регистрируется в виде $M^{+\cdot}$. Предположим, что молекулярный ион соединения ABXY может распадаться с разрывом центральной связи B–X, или претерпевать перегруппировку с образованием химической связи между ранее несвязанными A и Y (схема 2.1).

$$AY^{+\cdot} + B = X \longleftarrow ABXY^{+\cdot} \longrightarrow AB^{+} + XY^{\cdot}$$

Схема 2.1

Вернемся к рис. 2.5. Если $E(M^{+\cdot}) < E_0(AY^{+\cdot})$, ион стабилен и регистрируется как $M^{+\cdot}$. Обозначим как $E_{1/2}(AY^{+\cdot})$ такую энергию, при которой ровно половина $M^{+\cdot}$ фрагментирует с образованием $AY^{+\cdot}$, а половина остается в виде $M^{+\cdot}$. Аналогично $E_{1/2}(AB^{+})$ соответствует энергии, при которой половина $M^{+\cdot}$ фрагментирует с образованием $AY^{+\cdot}$, а половина – с образованием AB^{+}, т.е. для представленного на рис. 2.5 случая все молекулярные ионы с энергией выше $E_{1/2}(AB^{+})$ будут распадаться с образованием AB^{+}, так как в этой точке скорость образования AB^{+} становится выше скорости образования $AY^{+\cdot}$. Формально, площади под кривыми на рис. 2.5 с обозначениями $M^{+\cdot}$, $AY^{+\cdot}$, AB^{+} соответствуют долям тока этих ионов в полном ионном токе. Однако необходимо подчеркнуть, что эти доли являются начальными. Для вычисления реальной интенсивности соответствующих пиков в масс-спектре необходимо учитывать вторичные процессы фрагментации этих первичных ионов.

При изменении распределения внутренней энергии $M^{+\cdot}$ (функция $P(E)$) вид масс-спектра может существенно меняться. Некоторые реакции частично или полностью подавляются более выгодными для данной энергии ионов. Изменением распределения $P(E)$ объясняется, в частности, изменение спектра ИЭ при снижении энергии ионизирующих электронов (рис. 2.3).

Один из вариантов записи масс-спектрометрической информации в графическом виде представлен на рис. 2.6. Пусть молекулярный ион $ABXY^{+\cdot}$ фрагментирует (схема 2.1) в результате простого разрыва связи (ион AB^{+}) или с перегруппировкой (ион $AY^{+\cdot}$). Рисунок 2.6 демонстрирует изменение спектра с изменением внутренней энергии $M^{+\cdot}$. Вертикальное сечение позволяет получить масс-спектр при конкретном значении энергии $M^{+\cdot}$.

Как видно из рис. 2.5 и 2.6, реакция с низшей E_0 далеко не всегда приводит к наиболее интенсивному фрагментному иону. Для рассматриваемой молекулы ABXY реакция образования иона $AY^{+\cdot}$ имеет предпочтительную энтальпию, в то время как энтропийный фактор благоприятствует возникновению иона AB^{+}. Действительно, в первом случае рвутся две связи (AB и XY) и две связи (AY и BX) образуются, т.е. энергетические затраты невелики. Во втором случае происходит разрыв одной связи (BX), но новых связей не образуется. С другой стороны, стерические требования в первом случае значительно строже. Ион AB^{+} может образоваться, как только связь BX будет обладать достаточной для разрыва колебательной энергией, а для возникновения иона $AY^{+\cdot}$ необходим подход A к Y с искажением валентных углов на достаточное для образования новой связи расстояние, что реализуется лишь для небольшой части многочисленных конформаций $M^{+\cdot}$, имеющих достаточную для такого процесса энергию. Этот простой пример демонстрирует конкуренцию различных направлений фрагментации и объясняет сложность масс-спектров в случае многоатомных молекул.

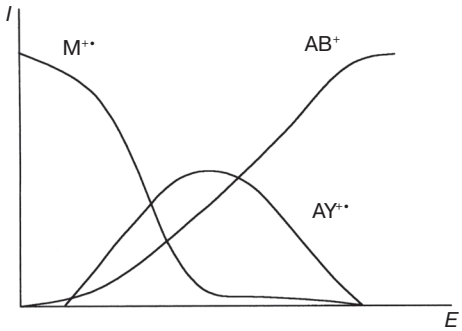


Рис. 2.6. Зависимость интенсивности пиков ионов в спектре от внутренней энергии $M^{+\cdot}$

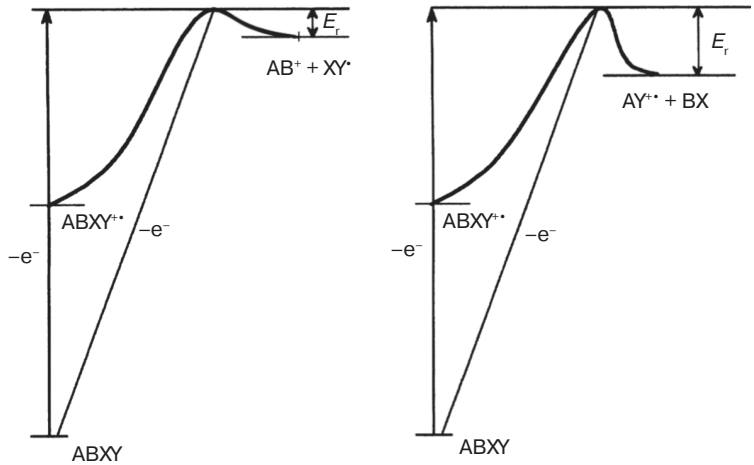


Рис. 2.7. Изменение потенциальной энергии вдоль координаты реакции для простого разрыва связи (левая часть) и перегруппировки (правая часть)

Изменение потенциальной энергии вдоль координаты реакции для простого разрыва связи и перегруппировки представлено на рис. 2.7. Для реакции простого разрыва связей (рис. 2.7, левая часть) обратный процесс протекает практически всегда без энергии или с минимальной энергией активации (E_r), а для перегруппировок (рис. 2.7, правая часть) обратный процесс может иметь значительную энергию активации.

Ранее были введены определения энергии ионизации (ЭИ) молекулы и энергии появления (ЭП) иона. Если для установления ЭП($AY^{+\bullet}$) фиксировать появление в спектре пика иона $AY^{+\bullet}$, будет измерена не $E_0(AY^{+\bullet})$, а $E_{1/2}(AY^{+\bullet})$. Величина $E_{1/2} - E_0$ называется **кинетическим сдвигом**. Обычно он невелик (0,01–0,1 эВ), но для органических молекул может достигать величин до 2 эВ. Для случая AB^+ измерение $E_0(AB^+)$ еще больше усложнено, поскольку дополнительно к кинетическому сдвигу возникает так называемый **конкурентный сдвиг**; при $E < E_{1/2}(AB^+)$ $M^{+\bullet}$ будет предпочтительно фрагментировать с образованием $AY^{+\bullet}$.

Для больших молекул ситуация несколько отличается, поскольку внутренняя тепловая энергия, распределенная по многочисленным степеням свободы, значительно больше. В частности, для белковой молекулы с молекулярной массой 8400 Да она составит примерно 30 эВ при 430 К [129]. Кинетические сдвиги для белковых молекул очень велики. Они могут превосходить E_0 на 5 эВ. Например, при поверхностно-индуцированной диссоциации пептидов (8-членные с массой около 1000) с E_0 около 1,3, чтобы увидеть фрагментный ион, внутренняя энергия должна была быть повышена на 8 эВ [130].

Тем не менее следует отметить, что масс-спектрометрическое измерение ЭИ, ЭП и сродства к электрону в сочетании с известными термохимическими характеристиками нейтральных частиц позволяет вычислять теплоты образования ионов и энергии связей. Масс-спектрометрически можно изучать нестабильные радикалы и получать информацию об энергиях химических связей, недостижимую при использовании других методов.

Измерение ЭП фрагментных ионов является важным методом установления их структур. Пусть необходимо установить структуру иона AB^+, образующегося при распаде $ABXY^{+\cdot}$. Если ионы такого же состава были изучены ранее (например, при их образовании из $ABCD^{+\cdot}$, $AB_2Y^{+\cdot}$ и т.д.) и для них были установлены структуры и теплоты образования, необходимо измерить ЭП иона AB^+, образующегося из $ABXY^{+\cdot}$, и рассчитать теплоту его образования по уравнению (2.2):

$$\Delta H(AB^+) = ЭП + \Delta H(ABXY) - \Delta H(XY) \qquad (2.2)$$

Совпадение полученной величины $\Delta H(AB^+)$ с аналогичной величиной для иона AB^+ известной структуры, полученного в результате другого процесса, является весомым свидетельством в пользу их единой структуры. Понятно, что, если величина $\Delta H(AB^+)$ значительно отличается от ΔH всех изученных ранее ионов AB^+, можно утверждать, что исследуемый ион обладает другой структурой. Развитие компьютерных расчетов с помощью эмпирических методов или *ab inicio* позволило проверять приписываемые ионам структуры при сравнении экспериментальных и расчетных величин теплот их образования.

2.2.2. Фотодиссоциация, разрешенная во времени

Метод фотодиссоциации, разрешенной во времени (Time-Resolved Photodissociation, TRPD), предложен Данбаром [131] для измерения кинетики медленных процессов диссоциации, инициированных фотонами, и расчетов соответствующих пороговых энергий на базе измеренных скоростей диссоциации [132]. Метод применяется к ион-радикалам, генерированным фотоионизацией из нейтральных молекул в газовой фазе. Перевод в газовую фазу обычно осуществляется лазерной десорбцией [133]. Фотодиссоциативный импульс прикладывается после термализации ионов-предшественников и удаления всех фрагментов, образовавшихся в процессе фотоионизации. Длина волны для фотодиссоциации выбирается таким образом, чтобы передать молекуле известное количество внутренней энергии для инициирования фрагментации по конкретному хромофору. Хорошо подобранная частота фотодиссоциативного импульса приводит к появлению единственного фрагмента. Общая внутренняя энергия диссоциирующего иона принимается равной $E^* = E_{photon} + E_{termal}$. Спектры записываются с различными временными задержками, а относительные интенсивности фрагментных ионов регистрируются относительно времени задержки. Таким образом строится кривая TRPD. Метод позволяет измерять константы скоростей в диапазоне от 1 до 10^6 $с^{-1}$.

Например, образование иммониевого иона лейцина из катион-радикалов исходных LeuTyr и LeuLeuTyr характеризуется константами скорости $4{,}8 \times 10^3$ $с^{-1}$ и $2{,}9 \times 10^2$ $с^{-1}$ соответственно. Существенно более низкая скорость для большего пептида объясняется внутримолекулярным перераспределением колебательной энергии, т.е. рандомизацией полученной энергии перед диссоциацией. Это согласуется с теорией PPKM, согласно которой рандомизация энергии предшествует фрагментации.

Термохимическая информация может быть извлечена из кривых TRPD при их моделировании с использованием расчетов PPKM в комбинации с квантово-

химической теорией [133]. В частности, для примера иммониевого иона лейцина достигнуто отличное совпадение между экспериментальной и рассчитанной на основании кривых TRPD величиной E_0 = 1,4 эВ и $\Delta S^{\ddagger}$ = 64–77 Дж/моль × К.

Возможности современных методов для определения величин энергий разрыва химических связей в катионах представлены в обзоре [134].

2.3. Метастабильные ионы

Кинетический сдвиг при определении ЭП обусловлен тем, что осколочный ион появляется в масс-спектре только из тех $M^{+\cdot}$, энергия которых достаточна для протекания соответствующей реакции с константой скорости не ниже 10^6. Однако существует возможность регистрировать процессы с константой скорости 10^5. Дело в том, что ион покидает источник ионизации электронами за 10^{-6} секунды, но достигает детектора за 10^{-5} секунды, т.е., обладая достаточной энергией, он может фрагментировать по пути следования.

Рассмотрим, как будет регистрироваться этот ион, называемый метастабильным, в магнитном секторном приборе. Пусть ион m_1^+ покидает ионный источник, ускоряется напряжением V и распадается с образованием иона m_2^+ и нейтральной частицы m_3^0 в бесполевом пространстве между источником и магнитным анализатором.

$$m_1^+ \rightarrow m_2^+ + m_3^0$$

Пусть v_n скорость иона с массой m_n. Тогда в бесполевом пространстве правомерны уравнения сохранения энергии и момента количества движения:

$$m_1 v_1^2 = m_2 v_2^2 + m_3 v_3^2 \tag{2.3}$$

$$m_1 v_1 = m_2 v_2 + m_3 v_3 \tag{2.4}$$

Так как $m_1 = m_2 + m_3$, оба уравнения могут быть справедливы только в случае $v_1 = v_2 = v_3$, т.е. в первом приближении можно считать, что продукты фрагментации движутся в том же направлении и с теми же скоростями, что и ион-предшественник. Магнитный сектор масс-спектрометра является анализатором моментов. Поэтому метастабильный ион с реальной массой m_2 и скоростью v_1 будет регистрироваться вместе со стабильным ионом m^*, обладающим скоростью v^*, при равенстве их моментов (уравнение (2.5)).

$$m^* v^* = m_2 v_1 \tag{2.5}$$

Уравнение (2.6) справедливо для любого стабильного иона.

$$\frac{m^* v^{*2}}{2} = \frac{m_1 v_1^2}{2} = eV. \tag{2.6}$$

Исходя из двух уравнений (2.5) и (2.6), получаем уравнение (2.7) для расчета регистрируемой массы метастабильного иона:

$$m^* = \frac{m_2^2}{m_1}. \qquad (2.7)$$

Таким образом, метастабильный ион, образующийся в первом бесполевом пространстве однофокусного магнитного масс-спектрометра, будет регистрироваться в спектре с кажущейся массой, рассчитываемой по уравнению (2.7). Метастабильные ионы проявляются в спектре в виде слабых уширенных пиков. Низкая интенсивность обусловлена незначительной долей молекулярных ионов, энергия которых благоприятствует их распаду вне источника. Даже наиболее низкоэнергетический процесс (перегруппировка с образованием иона $AY^{+\cdot}$, рис. 2.5) приводит к слабому пику метастабильного иона. Для более высокоэнергетических реакций образование стабильного иона в результате менее энергоемкого процесса выгоднее образования альтернативных метастабильных ионов. Пики последних могут вообще не наблюдаться в спектре. Уширение пика метастабильного иона связано с высвобождением части внутренней энергии при фрагментации. Эта энергия переходит в кинетическую, причем направление приращения может быть от полностью совпадающего до прямо противоположного относительно скорости движения распадающегося иона.

Регистрация в спектре метастабильного иона очень полезна, поскольку позволяет доказать протекание конкретной реакции, связывающей ион-продукт и ион-предшественник. Схемы масс-спектрометрической фрагментации считаются надежно доказанными, если они подтверждены пиками метастабильных ионов. С другой стороны, пики метастабильных ионов ухудшают разрешение в спектре. В зависимости от количества энергии, выделяющейся при фрагментации в бесполевом пространстве, форма пиков метатабильных ионов может быть разной (рис. 7.5). К сожалению, эти пики исчезают из спектра в результате его компьютерной обработки.

Так как электростатический анализатор пропускает ионы в зависимости от их энергии, метастабильные ионы, обладающие меньшей энергией по сравнению со стабильными, через него не проходят. Тем не менее пики метастабильных ионов проявляются в масс-спектре, полученном на двухфокусном приборе прямой геометрии (разд. 6.2), если фрагментация идет во втором бесполевом пространстве после прохождения электростатического анализатора.

Многие масс-спектрометры позволяют работать в режиме получения спектров исключительно метастабильных ионов с дефокусировкой стабильных. В данном случае речь идет о варианте тандемной масс-спектрометрии (гл. 7). Так можно получать все виды спектров (ионов-продуктов, ионов-предшественников, выбросов идентичных нейтральных частиц). Такие спектры позволяют устанавливать направления фрагментации, решать структурные задачи. Однако интенсивность сигналов и даже наличие или отсутствие пиков конкретных ионов в спектрах зависит от энергии ионов-предшественников. Поэтому в отличие от спектров активации соударением (разд. 7.1) различия в спектрах метастабильных ионов-продуктов двух ионов-предшественников не обязательно свидетельствуют об их разной структуре.

Примером использования метастабильных ионов может служить масс-спектрометрическое исследование N-фенил-4-циано-5-гидрокси-1,2,3-триазола [135].

Ионы $[M-N_2]^{+\cdot}$ триазолов обычно циклизуются в азирины [136] (схема 2.2). Однако спектр метастабильных ионов-продуктов свидетельствует о том, что одним из направлений фрагментации $[M-N_2]^{+\cdot}$ ионов N-фенил-4-циано-5-гидрокси-1,2,3-триазола является отщепление радикала $NCO^{\cdot}$. Такой процесс невозможен для азирина и заставляет предположить более сложную трансформацию первичного иона $[M-N_2]^{+\cdot}$, например образование оксиндола при взаимодействии радикального центра с бензольным ядром (схема 2.2).

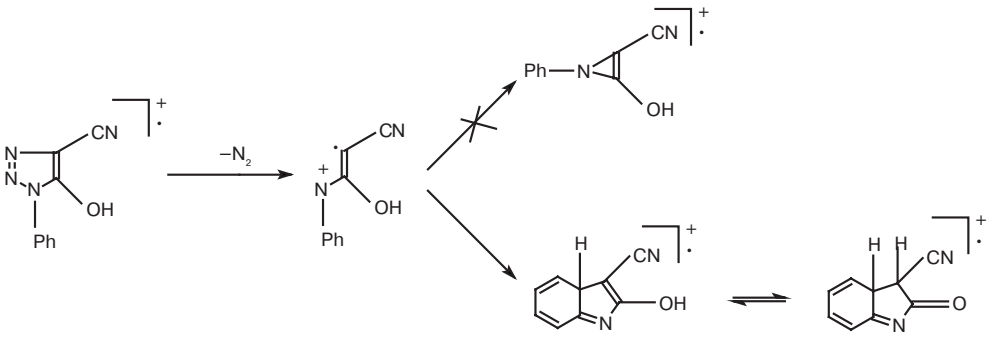


Схема 2.2

Метастабильные ионы позволяют также получать важную физико-химическую информацию. Например, Кукс [137] предложил метод определения основности молекул, базирующийся на спектрах метастабильных ионов. Он основан на сравнении скоростей конкурентных реакций фрагментации метастабильных ионов (схема 2.3).

$$B_1H^+ + B_2 \leftarrow B_1HB_2^+ \rightarrow B_2H^+ + B_1$$

Схема 2.3

Поскольку у таких реакций частотные факторы должны быть идентичными, их скорости определяются исключительно энергиями активации конкурентных процессов. Так как энергия активации обратных процессов (ион-молекулярная реакция без перегруппировки) ничтожно мала, разница в энергиях активации определяется исключительно разницей в сродстве к протону соответствующих оснований.

Если в источнике химической ионизации генерировать ионы $B_1HB_2^+$ и выделить их с помощью магнитного анализатора, можно исследовать их фрагментацию в бесполевом пространстве, регистрируя продукты метастабильного распада в электростатическом анализаторе (гл. 7). Различие в интенсивностях пиков B_1H^+ и B_2H^+ соответствует различию их величин сродства к протону, а следовательно, позволяет сравнивать основности молекул. Благодаря тому, что метастабильные ионы обладают минимальной энергией возбуждения, достаточной для фрагментации, метод обладает высочайшей чувствительностью, причем лучшие результаты получаются для наиболее близких по силе оснований, так как интенсивности соответствующих пиков в спектре оказываются близки по интенсивности.

2.4. Полуколичественная теория фрагментации

К сожалению, строгая математизированная теория (КРТ или РРКМ) не применима к реальным органическим соединениям. За исключением простейших молекул эти подходы требуют слишком большого времени даже для современной компьютерной базы. Кроме того, значительные ошибки могут быть вызваны незнанием реальных структур ни ионов-предшественников, ни ионов-продуктов, ни переходного состояния. Распределение энергии по связям также не очевидно. Максимальным успехом строгих физических теорий можно считать расчеты спектров легких алканов (пропан, бутан), т.е. простейших молекул с одним типом химических связей. Возможно, в будущем с созданием следующих поколений компьютеров эти проблемы удастся преодолеть.

Существует упрощенная полуколичественная КРТ теория описания процессов фрагментации более сложных молекул. Для расчета констант скоростей реакций распада используется уравнение (2.8):

$$k = v\left[\frac{(E - E_0)}{E}\right]^{N-1}, \qquad (2.8)$$

где k – константа скорости, v – частотный фактор, E – избыток внутренней энергии, E_0 – критическая энергии конкретной реакции, N – число осцилляторов.

Частотный фактор обратно пропорционален мере стерических затруднений в активированном комплексе (переходном состоянии) и фактически является численной характеристикой изменения энтропии в процессе. Для простого разрыва связи он принимается равным ее колебательной частоте (ИК-спектроскопия). Для перегруппировочного процесса требуется конкретное расположение атомов в пространстве, что приводит к уменьшению величины v. Число осцилляторов в молекуле, содержащей n атомов, рассчитывается по формуле: $N = 3n - 6$. Однако на практике оказывается, что не все осцилляторы равноценны, и величина k завышается. Поэтому число осцилляторов обычно уменьшают в три раза.

При использовании этой упрощенной теории для расчета интенсивностей фрагментных ионов в спектре нельзя забывать про вторичные процессы распада этих ионов при наличии у них достаточной внутренней энергии. Интенсивность пика иона в спектре зависит и от скорости его образования, и от скорости его распада.

ГЛАВА 3

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА И ПОДХОДЫ К ИНТЕРПРЕТАЦИИ МАСС–СПЕКТРОВ

Накопление достаточного эмпирического материала по направлениям фрагментации органических соединений позволило выявить определенные закономерности и создать качественные теории масс-спектрометрического распада. Допущения, сделанные в этих теориях, не искажают реального смысла и позволяют легко понять суть процессов, а также запомнить и использовать для расшифровки масс-спектров возможные механизмы фрагментации соединений в зависимости от их структуры. Используя материал по масс-спектрометрическому распаду органических соединений, К. Биман [138] еще в 1962 году предложил первую классификацию основных реакций фрагментации. За этим последовала классификация Бенца [139]. В России вопросам классификации масс-спектрометрических реакции посвящено несколько работ В.В. Тахистова [31, 32, 140].

Наиболее признанными среди качественных теорий масс-спектрометрической фрагментации являются концепция локализации заряда и неспаренного электрона, а также оценка стабильности ионов и нейтральных частиц. Несмотря на качественный характер, эти подходы оказываются весьма полезными для практической работы со спектрами. В обоих случаях используется принцип минимальных структурных изменений на каждой стадии распада, а структура молекулярного иона принимается идентичной структуре исходной молекулы, если, конечно, какие-либо процессы изомеризации $M^{+\cdot}$ до распада не доказываются особо.

Бессмысленно противопоставлять эти две качественные теории друг другу. Критикуя второй подход, можно утверждать, что электроны в молекуле обобществлены, и невозможно установить точное место локализации заряда и неспаренного электрона. Совсем необязательно предполагать, что для начала распада требуется какой-либо пусковой механизм, за исключением накопления достаточной энергии в конкретной химической связи. Однако еще раз следует подчеркнуть, что обе теории являются качественными, и использование их в комплексе помогает успешно интерпретировать спектры самых разнообразных соединений.

3.1. Стабильность ионов и нейтральных частиц

Рассмотрим вновь два первичных процесса фрагментации иона $ABXY^{+\cdot}$ (схема 2.1):

$$AY^{+\cdot} + B = X \leftarrow ABXY^{+\cdot} \rightarrow AB^{+} + XY^{\cdot}$$

Известно: с минимальными допущениями в подавляющем большинстве случаев можно считать, что энергия активации обратной реакции E_r отсутствует

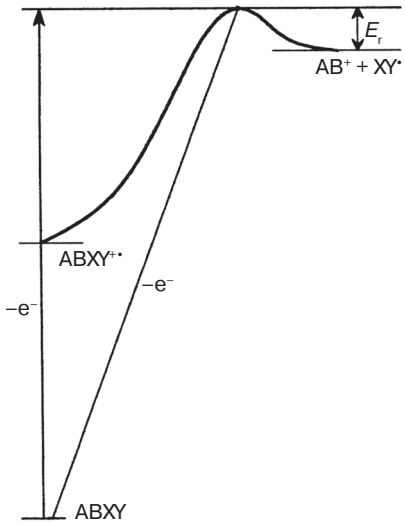


Рис. 3.1. Энергетическая диаграмма образования иона AB^+ из молекулы ABXY

или очень мала. Используя постулат Хэммонда [141], можно предположить, что для эндотермической фрагментации переходное состояние будет значительно ближе к продуктам реакции, чем к исходной частице (рис. 3.1). Следовательно, стабильность этих продуктов в значительной мере определяет эффективность процесса фрагментации, причем важно учитывать стабильность не только фрагментного иона, но и отщепляющейся нейтральной частицы.

При оценке стабильности можно использовать обычные критерии, известные из курса органической химии. Третичный алкильный карбокатион устойчивее вторичного, а вторичный – первичного. Для карбанионов этого типа порядок стабильности обратный. Бензильный и аллильный ионы устойчивы благодаря резонансной стабилизации, причем для бензильного катиона, помимо четырех резонансных форм, существует возможность энергетически выгодной в газовой фазе трансформации в катион тропилия, который имеет уже семь резонансных форм (схема 3.1).

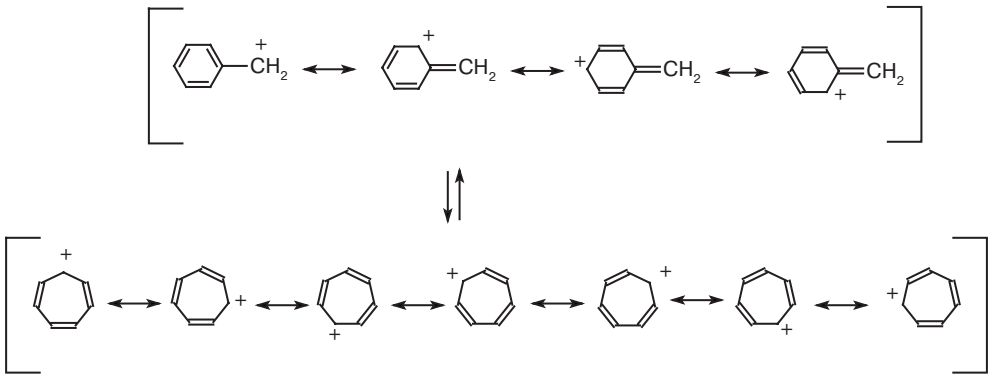


Схема 3.1

Напротив, sp^2-гибридизованные фенильный и винильный карбокатионы менее устойчивы по сравнению с их sp^3-гибридизованными аналогами. Резонансная стабилизация приводит к значительному увеличению стабильности в случае возможного участия *n* электронов гетероатомов (схема 3.2).

Схема 3.2

Распад может осуществляться по определенному направлению благодаря удобной делокализации электрона в нейтральном продукте фрагментации. В этом случае вновь «работают» классические правила органической химии. Делокализация электрона вследствие эффекта резонанса увеличивает стабильность аллильного или бензильного радикалов, участие α-CH связей приводит к повышенной стабильности третичных алкильных радикалов и т.д. Тем не менее следует помнить, что стабилизация заряда более существенна, чем стабилизация неспаренного электрона. Если *трет*-$C_4H_9^+$ стабильнее *н*-$C_4H_9^+$ на 1,5 эВ, то *трет*-$C_4H_9^{\cdot}$ стабильнее *н*-$C_4H_9^{\cdot}$ всего на 0,4 эВ.

Зачастую ионы распадаются с выбросом небольших нейтральных молекул: водород, метан, вода, моноксид и диоксид углерода, оксид азота, хлористый водород, сероводород, метанол и т.д. Большая отрицательная величина теплоты образования этих молекул создает значительные преимущества для реализации соответствующего направления распада. Альтернативные процессы, сопровождающиеся выбросами менее стабильных частиц, проигрывают конкуренцию, что может приводить к отсутствию соответствующих пиков в спектре. В результате, маскируется наличие в соединении каких-то важных функциональных групп.

3.1.1. Правило выброса максимального алкильного радикала

Важнейшим исключением, когда интенсивность пика ионов падает с увеличением их термодинамической стабильности, является предпочтительное отщепление большего алкильного радикала. Этот эффект называется **правилом выброса максимального алкильного радикала**. Правило работает всегда и часто помогает при интерпретации спектров. В качестве примера можно привести фрагментацию молекулярных ионов третичных аминов (схема 3.3). На первой стадии $M^{+\cdot}$ теряет один из трех углеводородных радикалов ($R^{1\cdot}$, $R^{2\cdot}$ или $R^{3\cdot}$). Среди трех альтернативных фрагментов интенсивность пика ионов, образующихся при выбросе максимального радикала, будет наивысшей, а при выбросе минимального радикала – низшей. Аналогично, среди первичных фрагментов, образующихся при распаде спиртов, максимальную интенсивность будет иметь пик иона $[M-R_i]^+$, возникающего при отщеплении максимального радикала (схема 3.4). Кстати, интенсивный пик иона $[M-H]^+$ означает, что атом углерода, от которого отщепляется атом водорода, не связан с алкильными радикалами.

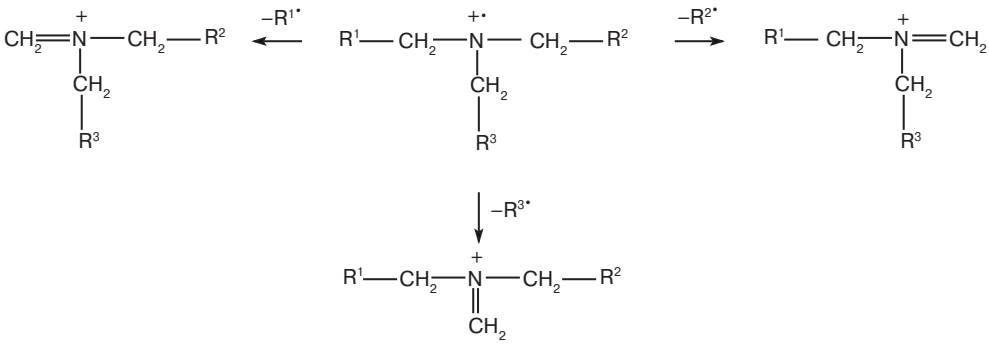


Схема 3.3

В некоторых случаях правило выброса максимального алкильного радикала имеет не только качественный, но и количественный аспект. Загорский [142], изучая фрагментацию аминов и спиртов, показал, что интенсивности пиков ионов, обусловленных выбросами алкильных радикалов из молекулярных ионов, могут быть рассчитаны, причем отношение интенсивностей пиков ионов $[M-R_i]^+$ обратно пропорционально массам этих ионов.

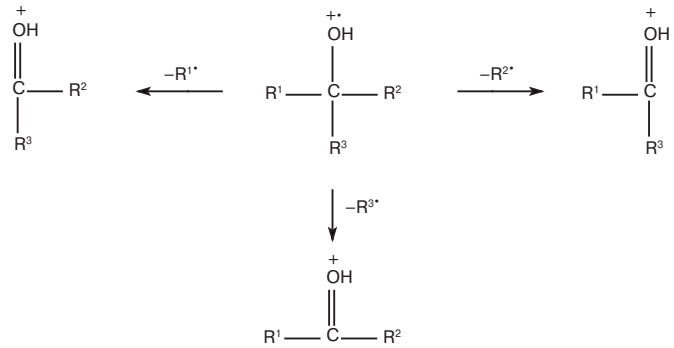


Схема 3.4

Это правило применимо к отщеплению радикалов не меньше этильного, а интенсивности пиков вторичных ионов должны суммироваться с интенсивностью пика соответствующего первичного иона. В частности, распад $M^{+\cdot}$ 4-этилоктанола-4 (схема 3.5) начинается с альтернативного отщепления трех алкильных радикалов (этильного, пропильного или бутильного). При энергии ионизирующих электронов 13 эВ, что позволяет минимизировать вторичные процессы распада, интенсивности пиков первичных фрагментных ионов с массами 129, 115 и 101 дальтон составляют 78%, 85% и 100% соответственно. Рассчитанные интенсивности должны составлять 101/129 = 0,78 и 101/115 = 0,88. Как видно, сходимость результатов достаточно хорошая. При количественной оценке отщепления метильной группы предложенный расчет дает интенсивность пика, завышенную в 2–3 раза.

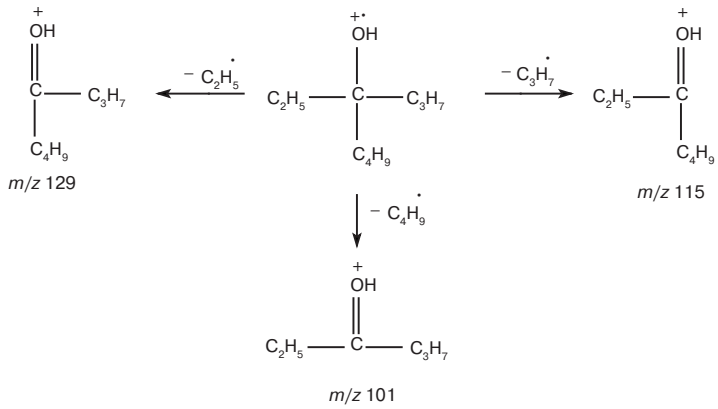


Схема 3.5

Задача 3.1. Оцените интенсивности первичных фрагментных ионов, образующихся при потере алкильных фрагментов молекулярным ионом перечисленных ниже соединений:

А) бутилпропилэтиламин;
Б) *втор*-пентилизобутилэтиламин;
В) *втор*-пентилизопропилпропиламин;
Г) *втор*-бутилтретбутилпропиламин;
Д) 3-метилгептанол-3;
Е) 3,4,5-триметилоктанол-4;
Ж) 4-этилдеканол-4;
З) этилпропилбутилкарбинол.

3.1.2. Правило Стивенсона (Стивенсона – Одье)

Разрыв простой связи в нечетноэлектронном ионе может привести к двум парам ионов и радикалов (схема 3.6):

$$AB^{+} + XY^{\cdot} \leftarrow ABXY^{+\cdot} \rightarrow AB^{\cdot} + XY^{+}$$

Схема 3.6

Вопрос о том, какой фрагмент будет заряженным, впервые рассмотрен Стивенсоном в 1951 году [143]. Исходная формулировка правила звучала следующим образом: если ЭИ(AB) < ЭИ(XY), то ЭП(AB^{+}) = ЭИ(AB) + D(AB – XY), но если ЭИ(AB) > ЭИ(XY), то ЭП(AB^{+}) > ЭИ(AB) + D(AB – XY), т.е. во втором случае образование иона AB^{+} требует избытка энергии.

Современная трактовка правила более конкретна. **Фрагмент с большей ЭИ имеет бóльшую склонность к удержанию неспаренного электрона. Следовательно, вероятность образования иона с меньшей энергией ионизации будет больше** [144]. Поскольку такой ион, как правило, и более стабилен, его пик в спектре будет интенсивнее, чем пик альтернативного иона. Результаты экспериментального подтверждения правила Стивенсона (табл. 3.1) опубликованы в работе [145].

Если разница в ЭИ альтернативных радикалов составляет более 0,3 эВ, пик иона с меньшей ЭИ доминирует в спектре. Если различия в ЭИ составляют менее 0,3 эВ, интенсивности пиков примерно равны.

Таблица 3.1. ЭИ фрагментов и интенсивности пиков комплементарных ионов

Соединение AB – XY	ЭИ (AB)	Интенсивность AB^{+}, % к макс.	ЭИ (XY)	Интенсивность XY^{+}, % к макс.
$HOCH_2 - CH_2NH_2$	~7,6	2,3	~6,2	100
$(CH_3)_2CH - CH_2OH$	7,55	100	~7,6	67
$(CH_3)_2CH - CH(OH)CH_3$	7,55	14,5	~6,9	100
$(CH_3)_3C - CH_2OH$	6,93	100	~7,6	7,4
$(CH_3)_3C - CH(OH)CH_3$	6,93	100	~6,9	79,2
$(CH_3)_3C - CH_2NH_2$	6,93	7,7	~6,2	100
$ClCH_2 - CH_2OH$	9,3	4,0	~7,6	100
$BrCH_2 - CH_2OH$	8,6	15,2	~7,6	100

Правило Стивенсона выполняется и для перегруппировочных процессов. В этом случае в результате реакции образуются нейтральная молекула и катион-радикал, т.е. за заряд конкурируют две молекулы. Катион-радикалом становится та молекула, энергия ионизации которой ниже (схема 3.7).

$$AY^{+\cdot} + BX \longleftarrow ABXY^{+\cdot} \longrightarrow AY + BX^{+\cdot}$$

Схема 3.7

Подтверждением этого постулата служат результаты, полученные при изучении перегруппировки Мак-Лафферти [146] в $M^{+\cdot}$ альдегидов (схема 3.8 [147]) и представленные в табл. 3.2. На первой стадии процесса (схема 3.8*а*) 1,5-сигматропный сдвиг атома водорода приводит к интермедиату с разделенными радикальным и катионным центрами. На второй стадии разрыв С–С связи обусловливает образование пары молекул (алкена и енола), одна из которых является нейтральной, а вторая – катион-радикалом. Иногда перегруппировку представляют как согласованный процесс 1,5-сигматропного сдвига и разрыва С–С связи (схема 3.8*б*), однако многочисленные исследования показали, что в большинстве случаев процесс протекает постадийно [148].

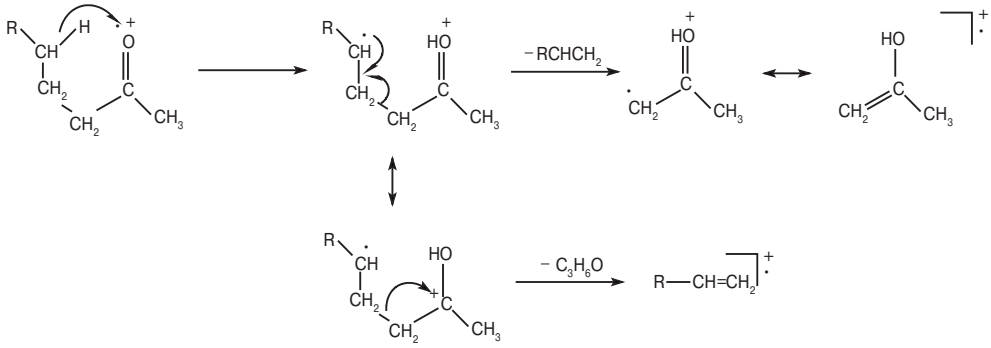


Схема 3.8*а*

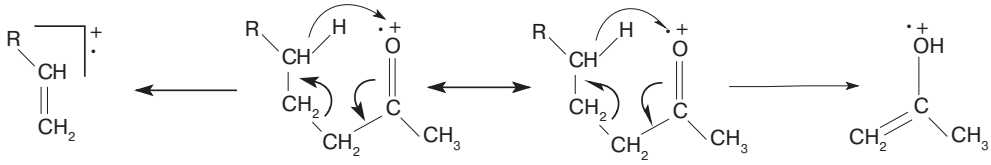


Схема 3.8*б*

Для бутаналя и пентаналя ЭИ енола ниже, чем ЭИ альтернативного алкена. Как следствие, интенсивности пика енольного фрагмента выше в 5–10 раз. Для последующих гомологов ЭИ образующихся терминальных олефинов лежат в диапазоне 9,4–9,6 эВ, т.е. примерно равны ЭИ енола. Как следствие, пики соответствующих ионов в спектрах примерно равны. Метильный заместитель в положении 2 понижает ЭИ енола, и интенсивность его пика становится на порядок выше, чем у

Таблица 3.2. ЭИ фрагментов и интенсивности их пиков в спектрах альдегидов [147]

Соединение	Фрагмент – ЭИ, эВ	Интенсивность, % к $\sum_{27}$	Фрагмент – ЭИ, эВ	Интенсивность, % к $\sum_{27}$
Бутаналь	C_2H_4 – 10,5	3,4	C_2H_4O – 9,5	16,5
Пентаналь	C_3H_6 – 9,8	2,4	C_2H_4O – 9,5	26,4
Гексаналь	C_4H8 – 9,6	16,1	C_2H_4O – 9,5	15,0
2-метилпентаналь	C_3H_6 – 9,8	1,7	C_3H_6O – 9,0	25,1
3-метилпентаналь	C_4H_8 – 9,3	27,0	C_2H_4O – 9,5	5,9

$\sum_{27}$ – полный ионный ток, т.е. сумма интенсивностей пиков всех ионов в спектре в диапазоне m/z 27–$M^{+\cdot}$.

альтернативного алкена. Напротив, заместитель в положении 3 приводит к образованию алкена с внутренней двойной связью и меньшей ЭИ (для бутена-2 – 9,3 эВ). В результате пик алкена становится в 4 раза интенсивнее пика енола.

Необходимо подчеркнуть, что правило Стивенсона описывает реакции с термодинамическим контролем. Реакции с кинетическим контролем могут привести к нарушению описанных закономерностей.

3.1.3. Правило четноэлектронных ионов

Правило, сформулированное в 1980 году Карни и Мандельбаумом [149], гласит, что четноэлектронные ионы распадаются в основном с выбросом молекул, а не радикалов, т.е. из катионов образуются прежде всего катионы, а не катион-радикалы. Это связано с тем, что процесс разрыва связи с образованием двух радикалов существенно более энергоемкий. Учитывая также, что стабильность радикальных частиц меньше, чем молекул или катионов, понятно, что такой процесс не может конкурировать с альтернативным отщеплением молекул. Заряд в результате фрагментации четноэлектронного иона может сохраняться на том же атоме, что и у предшественника, или мигрировать. Правило, однако, не означает, что эти реакции полностью запрещены. Они протекают, но образующиеся ионы, как правило, малоинтенсивны; хотя и здесь имеются исключения. В частности, можно привести в качестве примеров последовательное отщепление метильных групп триметилсилильными производными аминов, спиртов или кислот, а также последовательное отщепление атомов хлора или брома из соответствующих полигалогенпроизводных. Последовательная потеря радикалов характерна также и для металлоорганических соединений (разд. 10.14).

Аналогом правила Стивенсона для четноэлектронных ионов являются закономерности, отмеченные Филдом [150] и Бовеном [151]. Рассмотрим реакцию распада четноэлектронного иона (схема 3.9):

$$AB^+ \longrightarrow A^+ + B$$

Схема 3.9

Выгодность обратной реакции, идущей практически без энергии активации, зависит от сродства молекулы B к катиону A^+. Чем выше это сродство, тем активнее протекает реакция. Филд [150] сделал допущение, что сродство к катиону должно

изменяться параллельно сродству к протону, т.е. вероятность того, что разные катионы AB^+ будут распадаться с образованием идентичного иона A^+, будет обратно пропорциональна величинам сродства к протону для соответствующих молекул B. Подтверждением служит сравнение выгодности отщепления молекул аммиака, воды и хлористого водорода протонированными молекулами соответствующих аминов, спиртов и алкилхлоридов. Действительно, аммиак (СП = 9,1 эВ) практически не отщепляется из MH^+ аминов; пик, обусловленный выбросом молекулы воды (СП = 7,7 эВ) из MH^+ спиртов, весьма интенсивен в их спектрах ХИ; а отщепление HCl (СП = 6,4 эВ) из MH^+ алкилхлорида является доминирующим процессом.

Бовен [151] также использовал для установления направления распада четноэлектронного иона величины СП (схема 3.10):

$$A + B^+ \longleftarrow AB^+ \longrightarrow A^+ + B$$

Схема 3.10

Заряд будет сохраняться на фрагменте с большей величиной сродства к протону. В частности, в спектре метастабильных ионов катиона $C_2H_5\overset{+}{O}=CH_2$ пик иона $CH_2\overset{+}{O}H$ (*m/z* 31) является максимальным, а альтернативный пик иона $C_2H_5^+$ (*m/z* 29) отсутствует вовсе. Дело в том, что конкурентную борьбу за протон между молекулами этилена (СП = 7,3 эВ) и формальдегида (СП = 7,9) выигрывает формальдегид, обладающий бóльшим сродством к протону. Следует подчеркнуть, что с увеличением энергии предшественников закономерности, отмеченные Бовеном, прослеживаются не столь четко. Уже в спектре активации соударением иона $C_2H_5\overset{+}{O}=CH_2$ интенсивность пика иона $C_2H_5^+$ только в 6 раз меньше интенсивности пика иона $CH_2\overset{+}{O}H$, а в обычном масс-спектре, где задействованы самые разные механизмы образования ионов, интенсивности пиков соответствующих фрагментов могут быть прямо противоположными приведенному выше примеру. Как и правило Стивенсона, правила Филда и Бовена применимы лишь к реакциям ионов с термодинамическим контролем. Реакции с кинетическим контролем могут привести к нарушению описанных закономерностей.

3.1.4. Правило степеней свободы

Это правило сформулировано в 1975 году в работе Бенте и др. [152]. Правило названо эффектом степеней свободы и связывает интенсивность пика метастабильного иона для вторичного распада фрагментного иона с размером молекулярного иона. В работе [152] представлено сравнение результатов эксперимента и расчета для распада представительного ряда молекулярных ионов алкан-2-онов. В качестве первичного фрагмента рассматривали ион, образующийся в результате перегруппировки Мак-Лафферти (схема 3.8). Этот ион далее элиминировал метильный радикал (схема 3.11). Для гомологического ряда найдено, что десятичный логарифм отношения интенсивности пика метастабильного иона для последующего распада первичного фрагмента к интенсивности пика этого первичного фрагмента линейно связан обратно пропорциональной зависимостью с числом колебательных степеней свободы в исходном молекулярном ионе.

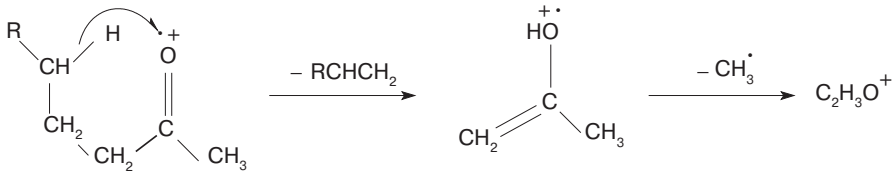


Схема 3.11

Суть эффекта заключается в том, что избыточная энергия молекулярного иона распределяется пропорционально числу колебательных степеней свободы в образующихся ионе и нейтральном фрагменте. Таким образом, чем больший нейтральный фрагмент отщепился, тем меньшим будет разброс избыточной энергии фрагментного иона. Именно эта энергия и обусловливает вторичные процессы распада.

3.1.5. Прочность химических связей

Энергия образования фрагментного иона из нейтральной молекулы может быть представлена в виде суммы энергии гомолитического разрыва конкретной связи в молекуле и энергии ионизации соответствующего образовавшегося радикала. Энергия связей атомов в органической молекуле лежит, как правило, в диапазоне 2–4 эВ, тогда как энергия ионизации – 6–12 эВ. Следовательно, ЭИ является значительно более важным фактором. Влияние ЭИ фрагментов на интенсивность пиков ионов в масс-спектрах регламентируется правилом Стивенсона (разд. 3.1.2). Однако в тех случаях, когда конкурирующие процессы приводят к ионам близкой стабильности, прочность связи становится решающим фактором.

Например, изучение меченных дейтерием по метиленовым группам бензиловых эфиров фенилуксусной кислоты [153] показало, что ионы $C_7H_7^+$ образуются в основном при разрыве связи C–O, которая обладает меньшей энергией по сравнению со связью C–C (схема 3.12).

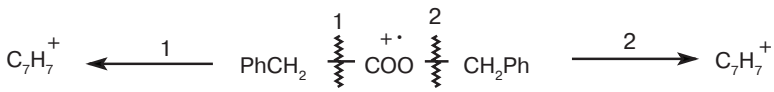


Схема 3.12

При фрагментации $M^{+\cdot}$ 1-хлор-3-бромпропана (рис. 3.2) процесс отщепления одного из атомов галогенов приводит к двум альтернативным ионам $Hal(CH_2)_3^+$. Энергии ионизации соответствующих радикалов должны быть крайне близки, но, поскольку связь C–Br менее прочна, чем C–Cl, пик иона $[M–Br]^+$ (m/z 77 и 79) в 8 раз интенсивнее суммы пиков ионов $[M–Cl]^+$ и $[M–HCl]^{+\cdot}$ (m/z 120–123). Аналогично, в спектрах α-бром-ω-иодалканов интенсивности пиков ионов $[M–I]^+$ всегда выше чем $[M–Br]^+$.

Возможности масс-спектрометрии позволяют устанавливать энергии связей в ионах с точностью до 1 см$^{-1}$ (0,000124 эВ) [134].

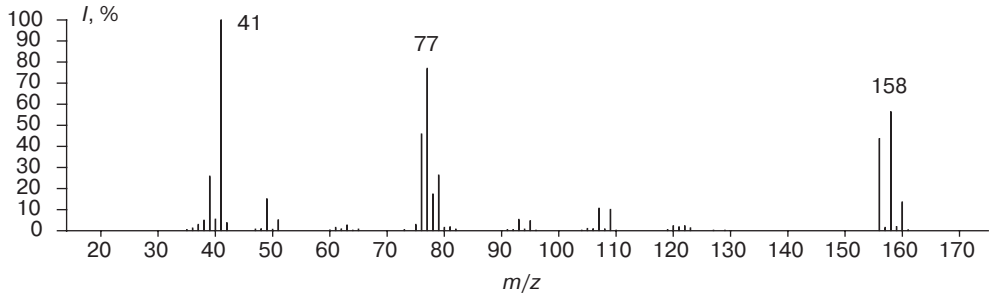


Рис. 3.2. Масс-спектр ионизации электронами 1-бром-3-хлорпропана

3.1.6. Структурные и стереохимические факторы

Принято считать, что высокие внутренние энергии ионов в масс-спектрометрии нивелируют различия, вызываемые пространственными характеристиками молекулы в классических реакциях органических соединений в растворах. Однако это справедливо лишь отчасти. Максимальное влияние стерические факторы оказывают на структуру активированного комплекса, а наиболее наглядно проявляются в перегруппировочных процессах. Поэтому конкурентоспособность таких реакций зачастую значительно ниже, чем это следует исходя из величины их критической энергии. В связи с этим увеличение внутренней энергии $M^{+\cdot}$ приводит к уменьшению количеств продуктов перегруппировок. Одним из следствий этого является тот факт, что многие интенсивные пики в спектрах метастабильных ионов очень малы в обычных масс-спектрах. Уменьшение внутренней энергии $M^{+\cdot}$ (например, при использовании ионизирующих электронов с энергией 12–20 эВ), напротив, приводит к возрастанию относительных интенсивностей пиков перегруппировочных ионов в ущерб пикам осколочных ионов. Сравнивая спектры соединения, полученные при стандартной и пониженной энергии ионизирующих электронов, можно легко понять, какие пики обусловлены осколочными, а какие – перегруппировочными ионами (рис. 2.3).

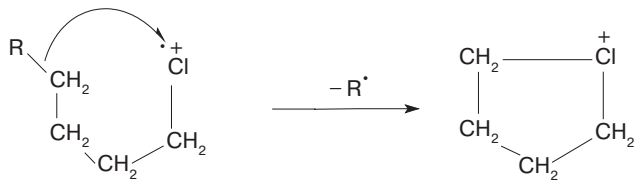


Схема 3.13

Хорошим примером влияния структурных факторов на интенсивность пиков ионов является фрагментация хлорзамещенных и бромзамещенных алканов. В отсутствие разветвлений в цепи аномально высокую интенсивность в гомологической серии фрагментных ионов $C_nH_{2n}Hal^+$ имеют пики ионов $C_4H_8Hal^+$, что объясняется протеканием реакции циклизации с образованием пятичленных структур (схема 3.13).

Любые разветвления в углеродной цепи резко снижают конкурентоспособность данного процесса.

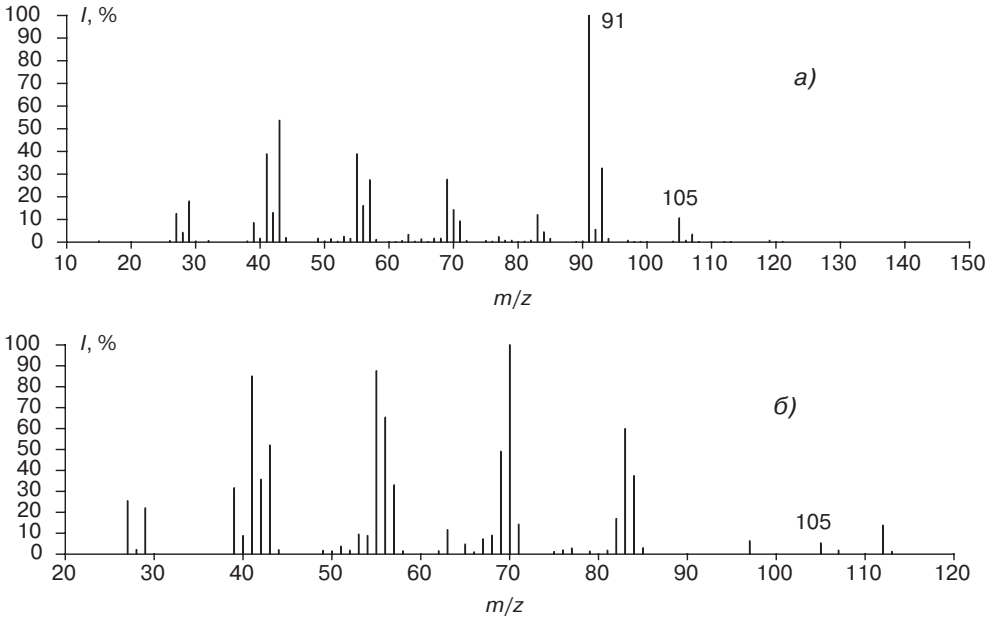


Рис. 3.3. Масс-спектр ИЭ 1-хлороктана (*а*), 2-хлороктана (*б*)

На рис. 3.3 представлены масс-спектры 1-хлороктана и 2-хлороктана. Видно, что максимальный пик (*m/z* 91) в спектре первого соединения полностью отсутствует в спектре второго. Интенсивности пика иона с *m/z* 105 (аналог циклического иона для 2-хлороктана) составляет уже не 100%, а лишь 6% (рис. 3.3*б*). Аналогичные процессы характерны для алкилмеркаптанов (образование пятичленных циклов) и аминов (образование шестичленных циклов).

Важную роль играет размер цикла в переходном состоянии при отщеплении из $M^{+\cdot}$ монофункциональных алкилпроизводных простейших молекул (HHal, H_2O, H_2S). Для элиминирования из $M^{+\cdot}$ алкилгалогенидов HCl и HBr предпочтительным является пятичленное переходное состояние (1,4-сигматропный сдвиг атома водорода). Для тиолов этот процесс обусловливает 40% элиминируемого сероводорода, тогда как основным (60%) является 1,4-элиминирование (1,5-сигматропный сдвиг). Для спиртов 1,4-элиминирование – доминирующий процесс [154].

В качестве еще одного примера пространственных эффектов можно назвать перегруппировку Мак-Лафферти, приводящую к образованию интенсивных пиков ионов в масс-спектрах алкилбензолов (схема 3.14). При наличии разветвлений в алкильной цепи или, если оба *орто*-положения заняты заместителями, этот процесс практически полностью подавляется.

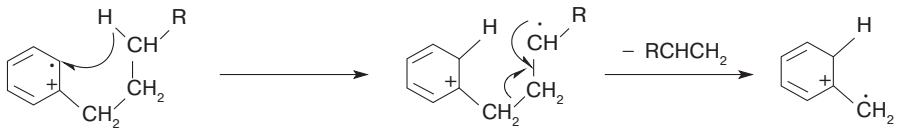


Схема 3.14

Большое число работ посвящено использованию масс-спектрометрии для решения стереохимических проблем. Масс-спектры ионизации электронами стереоизомеров, как правило, практически неразличимы. Однако использование низкоэнергетических методов ионизации (ХИ, ПИ и т.д.) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией позволяет делать надежные выводы о пространственной структуре молекул.

Иногда и спектры ИЭ оказываются информативными. Исследования фрагментации изотопномеченых соединений показали [155], что 1,4-элиминирование HCl и воды из $M^{+\cdot}$ хлорциклогексана и циклогексанола соответственно протекает стереоспецифично из конформации ванна, когда гетероатом и элиминируемый атом водорода оказываются на расстоянии 1,7 Å. Стереоспецифично протекает и 1,3-элиминирование HCl (диаксиальное расположение атомов хлора и водорода). Однако выбросы H_2O и HOD абсолютно равновероятны при элиминировании молекулы воды из $M^{+\cdot}$ циклогексанола, меченного дейтерием в положение 3. Минимальное расстояние между аксиальными заместителями в положениях 1 и 3 составляет 2,3 Å. Это расстояние оказывается непреодолимым в случае циклогексанола и $M^{+\cdot}$ до протекания элиминирования трансформируется с раскрытием цикла. Более длинная (на 0,4 Å) связь C—Cl позволяет реакции 1,3-элиминирования идти непосредствено в неизомеризованном $M^{+\cdot}$.

Соотношение интенсивностей пиков ионов $[M-Br]^+/M^{+\cdot}$ для *цис*-1,2-дибромциклогексана составляет 1,55, а для *транс*-изомера – 64,5. Очевидно, существует анхимерное влияние со стороны второго атома брома (схема 3.15) в диаксиальной конформации [156].

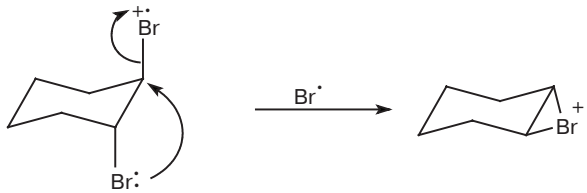


Схема 3.15

Важные стереохимические результаты можно получать при использовании химической ионизации с применением хиральных газов-реагентов. Например, энантиомерные α-аминокислоты можно различать химической ионизацией оптически чистым 2-метилбутанолом [157].

Следует подчеркнуть, что стереохимические аспекты масс-спектрометрии многогранны и не могут быть изложены в рамках общего учебного пособия. Интересующимся этим направлением можно порекомендовать обратиться к обзорам М. Грина [158], А.Мандельбаума [159,160] и сборнику [161].

3.1.7. Орто-эффект

Одним из наиболее очевидных проявлений структурных факторов является *орто*-эффект. Спектры подавляющего большинства *орто*-замещенных ароматических соединений существенно отличаются от их *мета*- и *пара*-изомеров. Это явление

хорошо известно и активно используется для синтетических целей в органической химии. В качестве примера масс-спектрометрического *орто*-эффекта обычно приводят фрагментацию молекулярных ионов алкилсалицилатов. В спектрах ИЭ этих соединений наблюдаются интенсивные пики ионов $[M-ROH]^{+\cdot}$, отсутствующие в спектрах их *мета*- и *пара*-изомеров (схема 3.16).

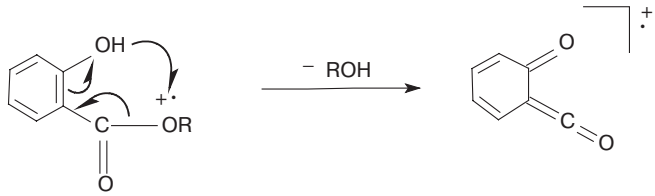


Схема 3.16

Несколько примеров *орто*-эффекта рассмотрены в гл. 10 при обсуждении основных процессов фрагментации различных классов органических соединений. В частности, на схеме 10.21 представлено элиминирование молекулы воды $M^{+\cdot}$ *орто*-метилбензилового спирта, на схеме 10.29 – аналогичный процесс для $M^{+\cdot}$ *орто*-крезола. В спектре *орто*-толуиловой кислоты пик иона $[M-H_2O]^{+\cdot}$, образующийся в результате *орто*-эффекта, является максимальным в спектре (рис. 10.93*а*). Характеристический ион с m/z 149, пик которого доминирует в спектрах диалкилфталатов, также обусловлен *орто*-эффектом (схема 10.75). Сложный перегруппировочный процесс, протекающий в *орто*-замещенных алкил и циклопропил-нитробензолах, представлен на схеме 10.94. Образование индолов в источнике масс-спектрометра по Фишеру (схема 10.96) тоже может считаться проявлением *орто*-эффекта. Задача 10.25 требует выявления процессов распада на основе *орто*-эффекта.

Масс-спектрометрическому наблюдению *орто*-эффекта посвящен представительный обзор Х. Щварца [162]. В нем дана классификация процессов, связанных с *орто*-эффектом, даны примеры необычных реакций элиминирования, реакций внутримолекулярной циклизации, обменных и восстановительных процессов.

Определенные аналогии в протекании реакций, обусловленных *орто*-эффектом, в растворах и в ионизационной камере масс-спектрометра позволяют делать прогнозы о возможном синтезе тех или иных соединений на основании изучения масс-спектра их предшественников. В частности, $M^{+\cdot}$ *орто*-карбокси- и *орто*-карбоксамидофенилциклопропаны [163] до распада изомеризуются в пяти- и шестичленные гетероциклы (схема 3.17).

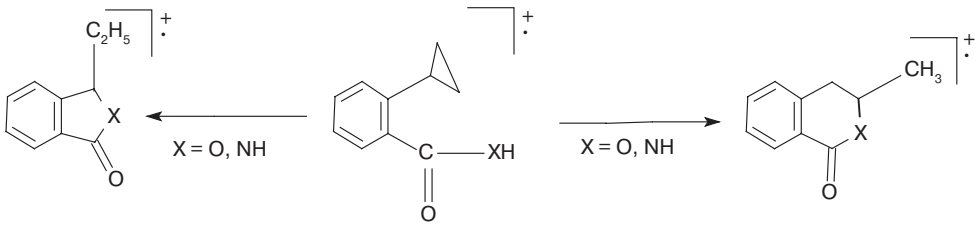


Схема 3.17

Аналогичная реакция протекает в серной кислоте, причем за 2–3 месяца устанавливается термодинамическое равновесие между пяти- и шестичленными гетероциклами. Однако соотношение этих продуктов легко предсказать за несколько минут, измерив соотношение интенсивностей пиков ионов $[M–CH_3]^+$ и $[M–C_2H_4]^{+\cdot}$ в масс-спектре ИЭ соответствующего исходного фенилциклопропана [163].

На основании данных тандемной масс-спектрометрии показано [164], что $M^{+\cdot}$ замещенных N-(*орто*-циклопропилфенил)бензамидов могут изомеризоваться до распада с образованием 3-арил-1-этил-1H-бензоксазинов и 5-этил-2-оксодибензоазепинов (схема 3.18). Метильная группа в N-[*орто*-(1-метилциклопропил)фенил]бензамидах препятствует последнему процессу, оставляя образование бензоксазинов единственно возможной реакцией циклизации. Химический эксперимент подтвердил прогнозы, сделанные на основании масс-спектров [164].

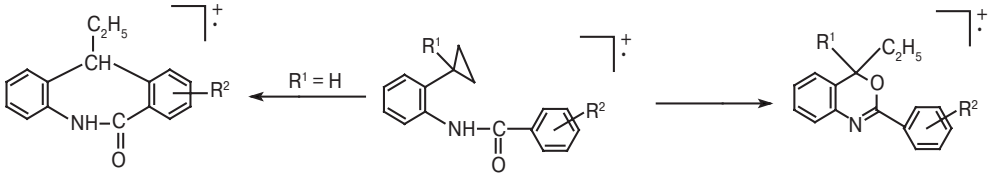


Схема 3.18

3.1.8. Масс-спектрометрия хиральных соединений

Масс-спектрометрия «слепа» в отношении оптических изомеров. Тем не менее есть методы, позволяющие работать и с такими соединениями. При этом существуют как прямые, так и непрямые подходы. Непрямые варианты связаны с предварительной дериватизацией аналитов оптически чистыми реагентами. Образующаяся пара диастереомерных комплексов с отличающимися физическими и химическими свойствами далее может быть исследована обычными хроматомасс-спектрометрическими методами.

Наиболее популярный вариант прямых хроматомасс-спектрометрических методов связан с использованием хиральных стационарных фаз или хиральных добавок в подвижную фазу в комбинированных методах ГХ/МС, ЖХ/МС, СФХ/МС [165]. Таблица типов хиральных неподвижных фаз и хиральных добавок представлена в обзоре [166]. Однако следует подчеркнуть, что подбор условий для успешного анализа остается пока, скорее, искусством, чем четко выверенной прописью. Существуют сотни хиральных фаз и хиральных добавок, и для каждого аналита необходимо найти оптимальную.

Для разделения изомеров перед вводом в масс-спектрометр вместо хроматографии можно использовать спектрометрию ионной подвижности. В частности, добавка хиральных реагентов (например, оптически чистого бутанола-2) в газ в область дрейфа позволяет успешно работать с сахарами, аминокислотами, лекарственными препаратами [167].

Существуют публикации и по использованию для анализа энантиомеров масс-спектрометрии без какого-либо хроматографирования. Такие методы раз-

деляют на три типа: ассоциаты «гость – хозяин», ионно-молекулярные реакции обмена «гостя» и хиральное распознавание по диссоциации промежуточного комплекса [168]. Все же следует отметить, что финансовые и временные затраты на проведение подобных экспериментов остаются пока очень высокими и препятствуют широкому внедрению этих методов в аналитическую практику. Дополнительную информацию о масс-спектрометрии хиральных молекул можно найти в обзоре [166].

3.2. Концепция локализации заряда и неспаренного электрона

Краеугольным камнем этого подхода к интерпретации процессов фрагментации в масс-спектрометрии, впервые предложенного К. Джерасси [154] и развитого Ф. Мак-Лафферти [43], служит постулат о том, что для сложных молекул фрагментация инициируется зарядом или неспаренным электроном, локализованными в наиболее благоприятном месте молекулы. Это, безусловно, приближение, но такой подход удобен для запоминания большого числа реакций самых разнообразных по структуре частиц.

Если речь идет о молекулярном ионе, фактически необходимо выделить для него основное (невозбужденное) электронное состояние, т.е. удалить электрон с высшей занятой молекулярной орбитали. Таким образом, наиболее благоприятные для неспаренного электрона и заряда места в молекулярном ионе будут связаны с потерей электрона с минимальной энергией ионизации. Энергетические требования в этом случае аналогичны тем, которые имеют место в УФ-спектроскопии для электронных переходов: $\sigma < \pi < n$.

При использовании для ионизации электронов с энергией 70 эВ собственный электрон образца может быть удален с любой молекулярной орбитали с энергией меньшей этого значения. Однако в результате излучательных и безызлучательных процессов исходный электронно возбужденный ион должен перейти в основное электронное состояние. Обычно время жизни возбужденных электронных состояний не превышает 10^{-8} секунды. Поскольку время пребывания ионов в источнике электронной ионизации 10^{-6} секунды, можно говорить о том, что подавляющую часть времени ион находится в источнике в невозбужденном состоянии. Концепция локализации заряда и электрона становится тем более справедливой, чем у́же разброс избыточной энергии в $M^{+\cdot}$ (функция $P(E)$). В этом случае увеличивается доля низкоэнергетических реакций с $\log k(E) < 8$.

Радикальный центр и центр, несущий заряд, могут располагаться как на одном атоме (например, удаление n-электрона), так и на разных атомах (например, удаление электрона π-связи). Во фрагментных ионах эти центры могут оказаться на значительном расстоянии друг от друга [169]. Например, выброс молекулы CO молекулярным ионом циклогексанона приводит к возникновению линейной цепочки из пяти метиленовых групп, причем неспаренный электрон и положительный заряд находятся на противоположных концах цепи (схема 3.19). Безусловно, такой ион далее может изомеризоваться в более стабильную структуру.

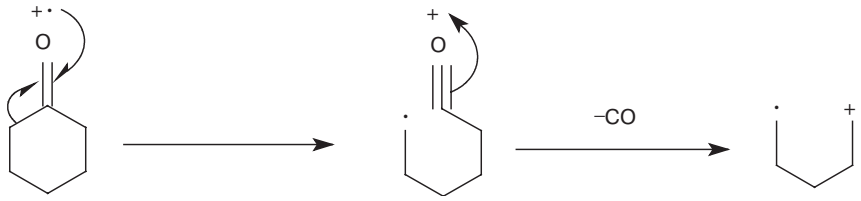


Схема 3.19

Иногда такие дистонические ионы (distonic ions) оказываются стабильнее своих изомеров с расположением заряда и неспаренного электрона на одном атоме. Например, ион $CH_3OH^{+\cdot}$ значительно менее стабилен, чем ион $^{\cdot}CH_2OH_2^{+}$, генерируемый при распаде этиленгликоля. Расчеты и эксперименты показали, что эти два иона находятся на дне колодцев потенциальной энергии, что не позволяет им изомеризоваться друг в друга [170].

Инициирование фрагментации радикальным центром (α-распад) вызвано тенденцией электрона к спариванию. Неспаренный электрон участвует в образовании новой связи с соседним атомом. При этом рвется другая связь этого α-атома (отсюда α-распад). Три представленных в общем виде варианта α-распада (схема 3.20) проиллюстрированы реальными примерами (в скобках).

Тенденция к инициированию фрагментации радикальным центром параллельна донорным свойствам этого центра. Наиболее активно эти процессы будут проходить, когда удаляется *n*-электрон атома азота. Напротив, галогены менее активны в этих реакциях. Эти утверждения наглядно демонстрируются характеристическими направлениями фрагментации основных классов органических соединений (гл. 10).

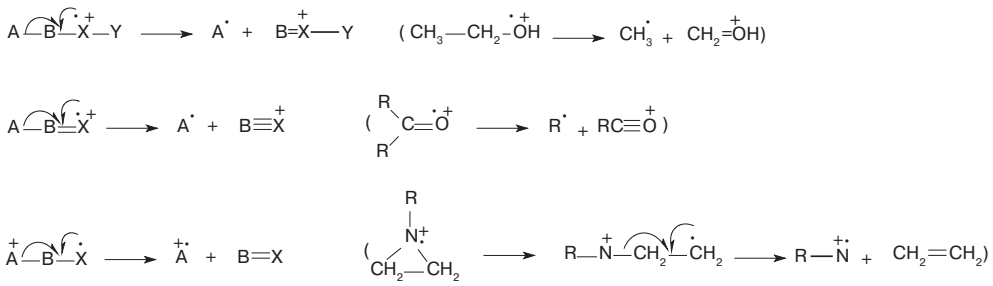


Схема 3.20

Движущей силой инициирования фрагментации центром, несущим заряд, является притяжение электронной пары. Тенденция к инициированию распада заряженным центром для гетероатомов противоположна отмеченной для радикального центра. Наиболее активны галогены, менее – сера и кислород, замыкает ряд азот. Можно говорить об увеличении выгодности этого процесса с увеличением электроотрицательности атома. Три представленных в общем виде варианта фрагментации (схема 3.21), инициированной центром, несущим заряд, проиллюстрированы реальными примерами (в скобках).

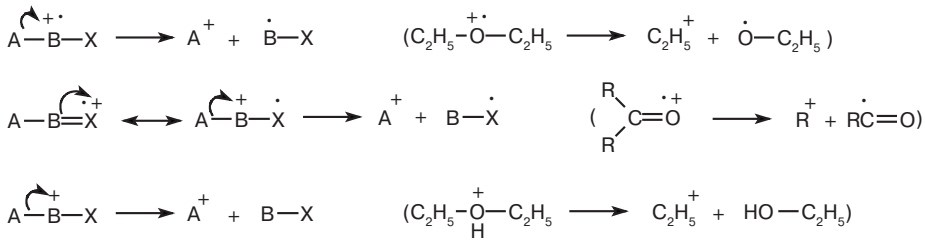


Схема 3.21

Вторые реакции на схемах 3.20 и 3.21 для фрагментации, инициируемой радикальным центром и центром, несущим заряд, связаны с одинаковым исходным ионом и одинаковыми продуктами. Разница заключается лишь в том, какой из двух комплементарных продуктов будет катионом, а какой радикалом. Для определения интенсивностей соответствующих пиков следует использовать правило Стивенсона (разд. 3.1.2). Для выявления механизма (в рамках концепции локализации) необходимо иметь в виду, что стабилизация заряда более существенна, чем стабилизация неспаренного электрона (см. выше). **Поскольку реакции, инициируемые заряженным центром, подразумевают миграцию заряда, они, как правило, менее благоприятны по сравнению с реакциями, инициируемыми неспаренным электроном.**

Задача 3.2. Какие реакции фрагментации, инициированные центрами, несущими заряд и неспаренный электрон, должны протекать при распаде следующих соединений:

А) диэтилсульфид (удален *n*-электрон атома S);
Б) метилэтилкетон (удален *n*-электрон атома O);
В) бутанол-2 (удален *n*-электрон атома O);
Г) гексен-3 (ионизирована π-связь);
Д) изобутилхлорид (удален *n*-электрон атома Cl);
Е) триэтиламин (удален *n*-электрон атома N);
Ж) бутилметиловый эфир (удален *n*-электрон атома O);
З) пропилизопропиловый эфир (удален *n*-электрон атома O).

Перегруппировочные процессы также могут быть разделены на два указанных типа. Наиболее типичным примером перегруппировки, инициируемой радикальным центром, является перегруппировка Мак-Лафферти (схема 3.22).

Атом водорода через шестичленное переходное состояние (1,5-сигматропный сдвиг) мигрирует к атому кислорода (тенденция к спариванию электронов). В образовавшемся интермедиате реакцию распада инициирует радикальный центр, расположенный на γ-атоме углерода.

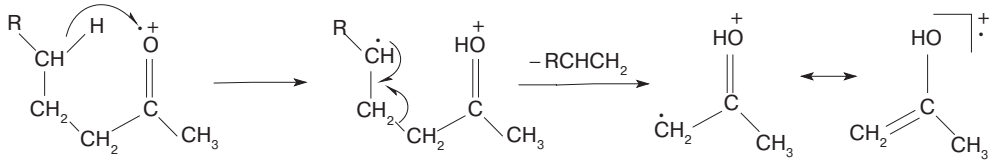


Схема 3.22

В качестве примера перегруппировки, инициируемой центром, несущим заряд, можно привести вторичный процесс фрагментации аминов, являющийся, по сути, 1,3-сигматропным сдвигом (схема 3.23):

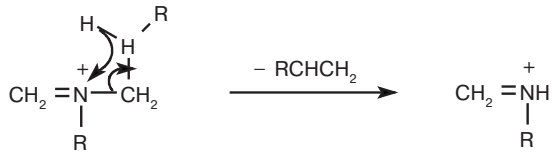


Схема 3.23

Если теория Вудворда – Гофмана предсказывает значительную критическую энергию для 1,3-сигматропных сдвигов, теоретические расчеты [171] и экспериментальные факты показывают, что этот постулат не распространяется на заряженные частицы. В данном случае гидрид-ион со своей парой электронов мигрирует через четырехчленное переходное состояние на атом азота с одновременным гетеролитическим разрывом связи C—N и отщеплением молекулы алкена. Заряд сохраняется на атоме азота. Образовавшийся ион аналогичен исходному и при соответствующем R и достаточной внутренней энергии может отщепить еще одну олефиновую молекулу по такому же механизму. Подобные процессы характеризуются низкой энергией активации, а для их протекания необходима длина углеводородной цепи не менее двух атомов. В связи с этим интенсивность вторичных и последующих процессов распада аминов, обусловленных такими перегруппировками, может быть очень высокой, а интенсивность пиков первичных фрагментных ионов, рассчитанная на основе функций $k(E)$ и $P(E)$ для $M^{+\cdot}$, существенно ниже.

Задача 3.3. Какие ионы образуются в результате перегруппировки Мак-Лафферти для перечисленных ниже соединений? Оцените с учетом правила Стивенсона интенсивности пиков олефинового и енольного ионов.

А) пентаналь;
Б) пентанон-2;
В) деканон-4;
Г) 3-метилпентанон-2;
Д) 3-пропилгексанон-2;
Е) 3-фенилбутаналь;
Ж) 5-фенилпентанон-2.

Задача 3.4. Почему перегруппировка Мак-Лафферти подавлена в случае перечисленных ниже соединений?

А) бутанон-2;
Б) 1-фенилпентанон-3;
В) гептен-5-он-2;
Г) гексен-4-он-2;
Д) октен-4-он-3;
Е) 1,3-диметил-2-бутилбензол;
Ж) 5,5-диметилоктанон-2;
З) 2,2-диметилбутаналь.