

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное агентство по образованию

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования

«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

В. И. Сорокин, В. А. Озерянский

## **МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ**

### **МЕТОДЫ ИОНИЗАЦИИ И РАЗДЕЛЕНИЯ ИОНОВ**

Методическое пособие к спецкурсу  
«Спектральная идентификация органических соединений»

Ростов-на-Дону  
2007

Методическое пособие разработано старшим преподавателем кафедры органической химии, к.х.н. В.И. Сорокиным и доцентом кафедры органической химии, д.х.н. В.А. Озерянским.

УДК 543.51+547

Печатается по решению кафедры органической химии химического факультета ЮФУ (протокол №4-2006-2007 от 19.12.2006)

© 2007 Южный  
федеральный  
университет

# Содержание

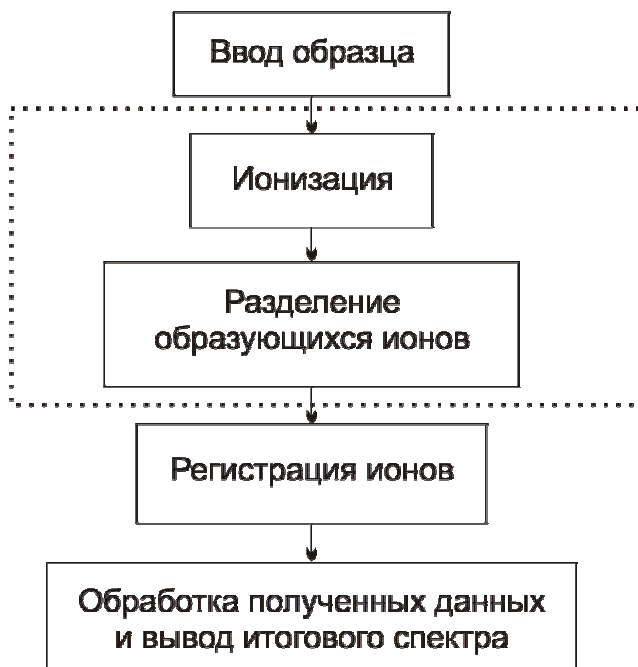
<b>Введение</b> .....	4
<b>1 Основные способы ионизации</b> .....	6
1.1 Электронная ионизация (electron ionization, EI) .....	6
1.2 Химическая ионизация (chemical ionization, CI) .....	12
1.3 Ионизация электрическим полем (field ionization, FI) .....	15
и полевая десорбция (field desorption, FD)	
1.4 Бомбардировка быстрыми атомами (fast atom bombardment, FAB) .....	17
и масс-спектрометрия вторичных ионов с ионизацией в жидкой фазе (liquid secondary ion mass spectrometry, LSIMS)	
1.5 Ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы .....	20
(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)	
1.6 Ионизация распылением в электрическом поле .....	23
(electrospray ionization, ESI)	
<b>2 Разделение ионов</b> .....	27
2.1 Магнитный секторный анализатор (magnetic sector) .....	29
2.2 Квадрупольный анализатор (quadrupole) .....	31
2.3 Ионная ловушка (ion trap) .....	32
2.4 Времяпролетный анализатор (time-of-flight, TOF) .....	34
2.5 Ионный циклотронный резонанс с Фурье преобразованием .....	36
(Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) или масс- спектрометрия с преобразованием Фурье (Fourier transform mass-spectrometry, FTMS)	
<b>Литература</b> .....	39

## Введение

**Масс-спектрометрия** – инструментальный метод установления строения соединений посредством перевода вещества в ионизированное состояние, разделения образующихся ионов по величинам отношения массы к заряду ( $m/z$ ) и регистрации ионов каждого вида.

Масс-спектрометрия является мощным инструментом исследования органических и элементарноорганических соединений. Как и в любом другом методе анализа, аппаратное оформление играет ключевую роль. В последние десятилетия масс-спектрометрия переживает второе рождение, связанное с разработкой новых методов ионизации и более точных способов разделения и регистрации ионов. Это позволило достичь небывалых до недавнего времени пределов регистрируемых масс и точности их определения. В результате, анализ сложных биологических молекул (белков, нуклеиновых кислот и т.д.) стал рутинной.

Прибор, используемый для получения масс-спектра, называется масс-спектрометром. На рисунке 1 приведена схема его работы.



**Рисунок 1** – Схема работы масс-спектрометра

Для начала анализируемое вещество необходимо ввести в рабочее пространство

прибора, затем образец подвергается ионизации. Образующиеся ионы переводятся далее в газовую фазу и разделяются по массам. При этом регистрируется не только их масса, но и количество ионов данного вида. Полученная информация обрабатывается и представляется в виде масс-спектра. В современных приборах всеми этапами работы масс-спектрометра управляет компьютер, роль оператора заключается в подготовке образца для анализа.

Системы ионизации и разделения ионов играют одну из важнейших ролей в работе масс-спектрометра. От вида ионизации зависит возможность анализа данного соединения, поскольку анализ невозможен, если вещество нельзя подвергнуть ионизации. От способа разделения ионов зависит насколько точно будет определена их масса, а также насколько эффективно будут разделены ионы, имеющие близкие массы. По этой причине в данном пособии как наиболее важные обсуждаются лишь методы ионизации и разделения. Желаящим познакомиться со способами введения образцов, регистрации ионов и обработки получаемой информации мы рекомендуем обратиться к литературе, приведенной в конце пособия.

Однако прежде чем ознакомиться с этими методами, следует разъяснить значения некоторых терминов, употребляемых в масс-спектрометрии.

*Единицами измерения массы* являются атомные единицы массы (а.е.м.) и Дальтоны (Да),  $1 \text{ а.е.м.} = 1 \text{ Да} \approx 1.6605402 \times 10^{-27} \text{ кг}$ .

*Номинальная молекулярная масса* – масса, рассчитанная суммированием целочисленных атомных масс наиболее распространенных изотопов элементов.

*Моноизотопная молекулярная масса* – масса, рассчитанная суммированием точных атомных масс наиболее распространенных изотопов элементов.

*Средняя молекулярная масса* – масса, рассчитанная суммированием усредненных атомных масс элементов.

# 1 Основные способы ионизации

## 1.1 Электронная ионизация (electron ionization, EI)

Является одним из наиболее известных способов ионизации. Несмотря на то, что это исторически первый метод ионизации органических соединений, предложенный еще в 1934 г., он не потерял актуальности до наших дней.

Для ионизации вещества используется поток электронов с высокой энергией. На рисунке 2 приведена схема типичной установки, применяемой для этих целей.

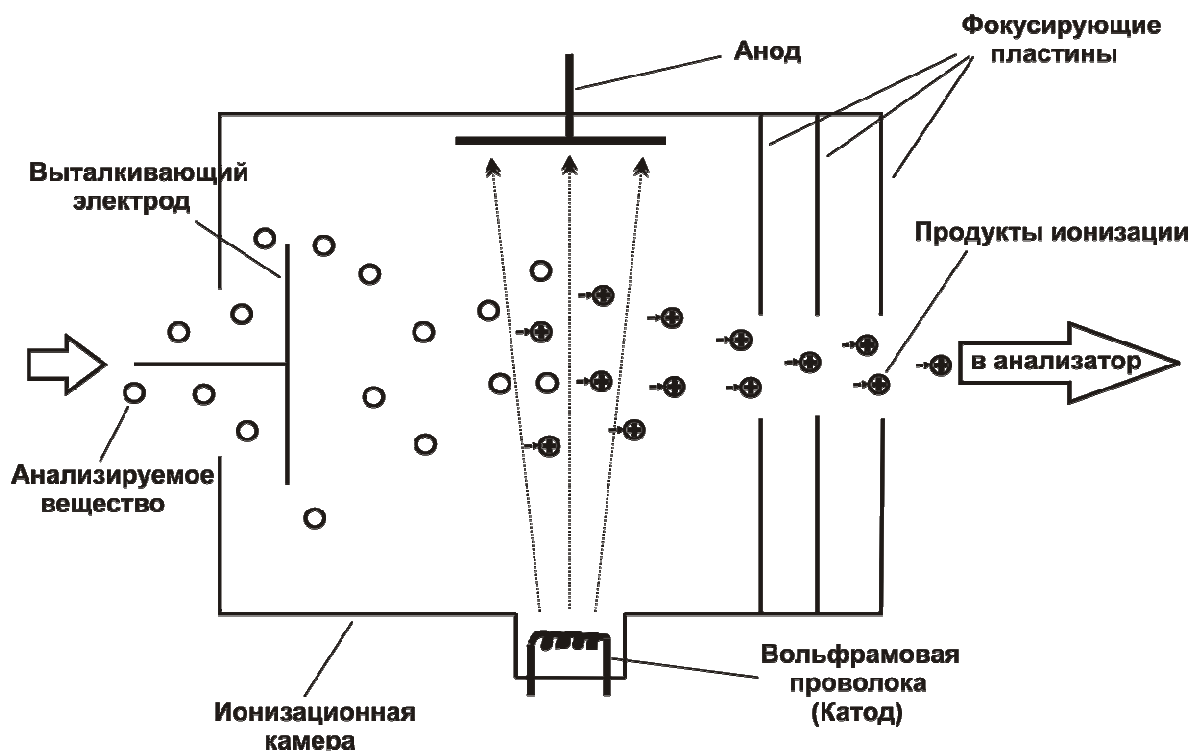
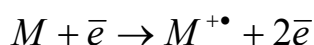


Рисунок 2 – Устройство прибора для электронной ионизации

Источником электронов является нагретая металлическая проволока (катод). Электроны, покидающие поверхность катода, разгоняются электрическим полем по направлению к аноду. Путь электронов проходит через объем, занятый анализируемым веществом, предварительно переведенным в газообразное состояние (в ионизационной камере поддерживается разрежение  $10^{-5} - 10^{-6}$  мм рт. ст.), с молекулами которого происходит взаимодействие, заключающееся в передаче энергии. Однако следует понимать, что реального соударения молекул и электронов не происходит. Электрон, пролетая вблизи молекулы, вызывает лишь воз-

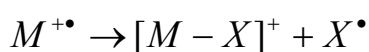
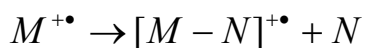
возбуждение ее электронной оболочки, поэтому термин «электронный удар» (electron impact), который часто используется как альтернативное название для этого метода, не соответствует действительности. Результатом такого возбуждения является перемещение собственных электронов молекулы на более высоколежащие орбитали. Начиная с определенных значений энергии (энергия ионизации), возбуждение заканчивается потерей электрона и превращением молекулы в соответствующий катион-радикал, называемый молекулярным ионом.



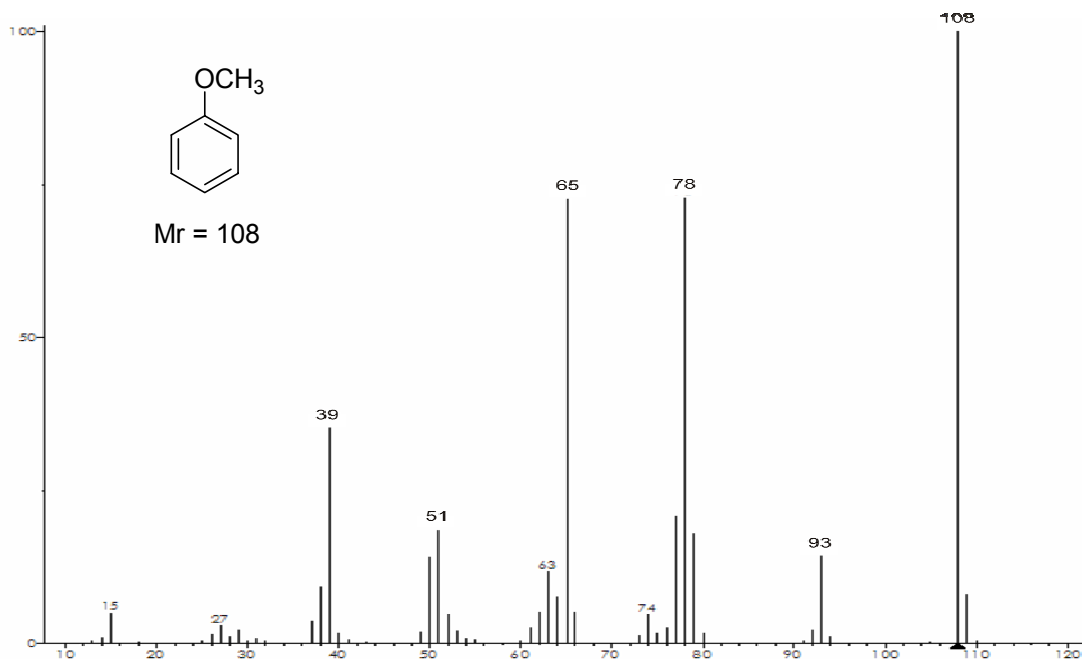
Образующиеся катион-радикалы выталкиваются специальным электродом из ионизационной камеры и после фокусировки в узкий пучок направляются в анализатор. Для достижения ионного детектора каждому иону требуется в среднем не более  $2 \times 10^{-5}$  с.

Важным параметром является энергия ионизирующих электронов. Стандартные масс-спектры EI принято снимать, используя электроны с энергией 70 эВ, что соответствует ускоряющему потенциалу между катодом и анодом в 70 В. Выбор такой энергии не случаен. Во-первых, при этом достигается максимальная эффективность ионизации и, во-вторых, только в этом случае получается воспроизводимый масс-спектр.

Энергии ионизации большинства органических соединений лежат в диапазоне 6–12 эВ. Это, в свою очередь, означает, что образующийся после взаимодействия молекулы с пучком электронов катион-радикал получает избыточную энергию, которая усиливает колебания связей и может стать причиной разрыва наиболее слабых из них (фрагментация). В результате фрагментации происходит распад молекулярного иона на две частицы, одна из которых – ион с меньшей массой (осколочный ион), вторая – радикал или нейтральный фрагмент. Незаряженные радикалы ( $X^\bullet$ ) и нейтральные частицы ( $N$ ) прибором не записываются.

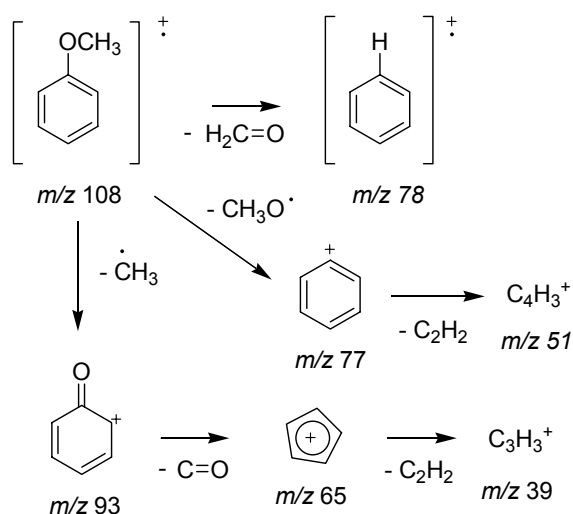


Если избыточная энергия осколочного иона остается высокой, он может распадаться дальше на еще более мелкие фрагменты. Типичный масс-спектр, получаемый в условиях электронной ионизации, представлен на рисунке 3. По оси абсцисс откладывается масса ионов (величина  $m/z$ ), а по оси ординат – их интенсивность (относительное количество).



**Рисунок 3** – Масс-спектр анизола

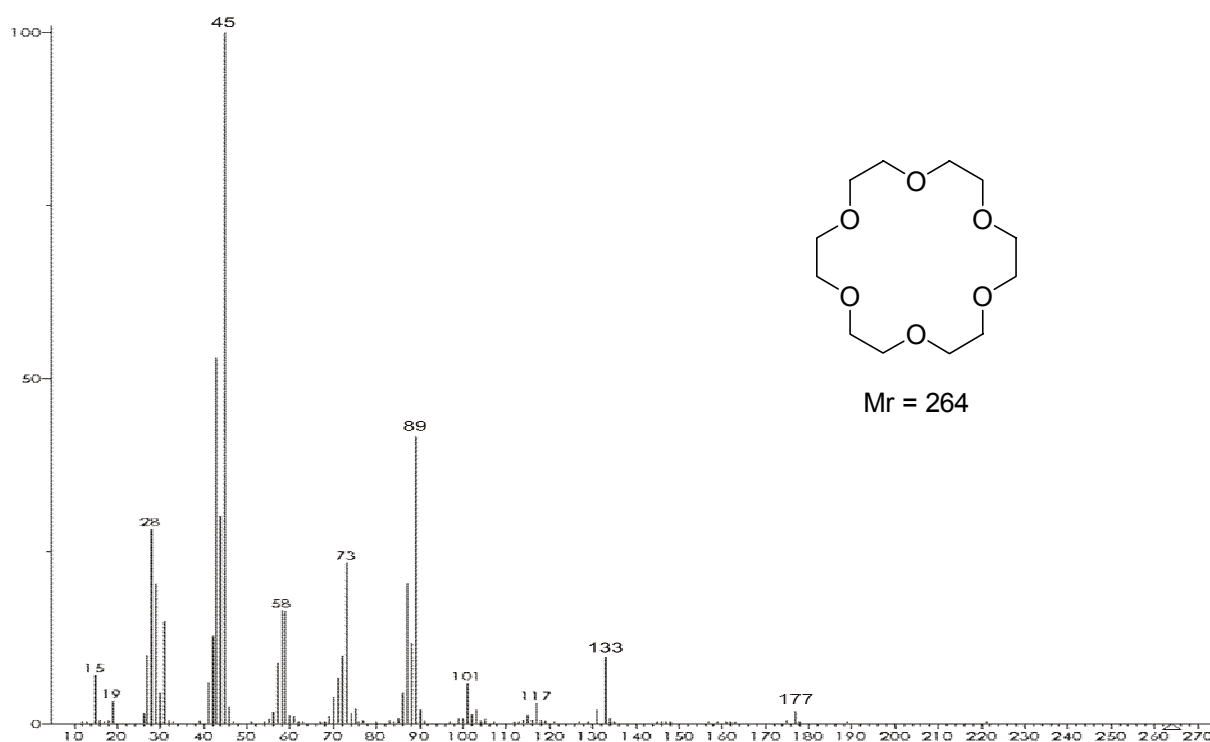
В выбранном примере основные направления фрагментации молекулы анизола выглядят так:



В данном случае пик молекулярного иона – молекулярный пик – является в спек-



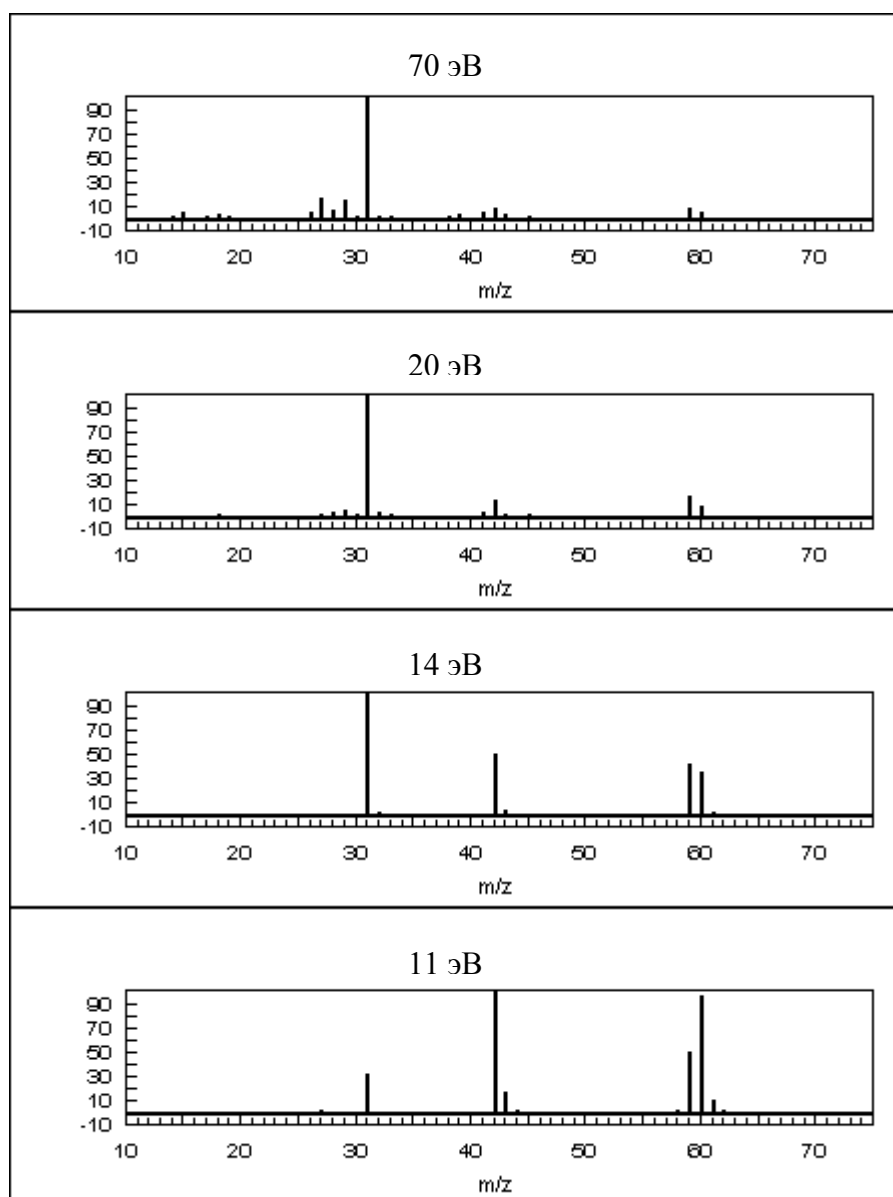
тре самым интенсивным, что свидетельствует о высокой устойчивости образующегося катион-радикала. По мере увеличения склонности молекулярного иона к фрагментации, его интенсивность в масс-спектре относительно осколочных ионов будет падать. Крайним случаем является полное отсутствие молекулярного пика в спектре, что существенно затрудняет идентификацию соединения. Примером является циклический эфир 18-краун-6 (рисунок 4), в спектре которого самым тяжелым ионом является частица с массой 177  $[(C_2H_4)_4O_4H]^+$ . Это может ввести в заблуждение относительно реальной молекулярной массы исследуемого соединения. Поэтому интерпретация спектров, полученных ионизацией электронным ударом, должна проводиться с большой осторожностью.



**Рисунок 4** – Масс-спектр 18-краун-6

Наиболее очевидным путем решения проблемы низкой интенсивности сигнала молекулярного иона является понижение энергии электронного пучка, используемого для ионизации. В этом случае молекулярный ион получает меньшую избыточную энергию и, соответственно, в меньшей степени претерпевает фрагментацию. На рисунке 5 приведены масс-спектры пропанола-1, записанные с изменением энергии ионизирующих электро- $\gamma$  электронов. Однако использование

данного подхода имеет и обратную сторону: электроны с низкой энергией ионизируют намного меньше молекул образца и для регистрации спектра необходимы более чувствительные детекторы.



**Рисунок 5** – Масс-спектры пропанола-1 ( $M_r = 60$ ), записанные при различных энергиях ионизирующих электронов

Не стоит думать, что ценность электронной ионизации заключается лишь в возможности определения молекулярной массы анализируемого соединения, тем более что это не всегда возможно. Весьма важная информация заключается в характере фрагментации. Соединения, принадлежащие к одному и тому же классу,

имеют сходную картину распада молекулярного иона. Например, в спектрах моноалкилбензолов присутствует осколочный ион с  $m/z = 91$ , соответствующий образованию катиона тропилия в результате бензильного разрыва, что может быть использовано при установлении структуры. Масс-спектр органического соединения, записанный в условиях электронной ионизации, обладает высокой индивидуальностью. Получается своего рода отпечаток пальца молекулы, с помощью которого проводят идентификацию. Для этого масс-спектр анализируемого образца сравнивают с масс-спектрами известных соединений, сопоставляя величины  $m/z$  и интенсивности всех сигналов. В настоящее время эту работу выполняет компьютер масс-спектрометра, сразу выдавая совпавшие структуры.

Как и любой другой метод ионизации, описанный здесь, электронная ионизация имеет свои преимущества и недостатки.

#### **Преимущества:**

- Наиболее изученный метод ионизации;
- Может использоваться для ионизации практически любых летучих соединений;
- Высокая воспроизводимость спектров;
- Фрагментация позволяет получить информацию о строении соединения;
- Возможность идентификации соединений сравнением полученного масс-спектра со спектрами из базы данных.

#### **Недостатки:**

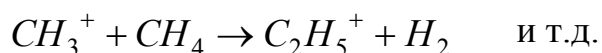
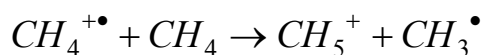
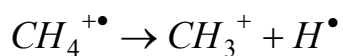
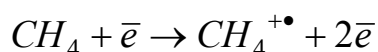
- Анализируемое вещество должно обладать достаточной летучестью и термической стабильностью;
- Отсутствие или низкая интенсивность в спектрах многих соединений сигнала молекулярного иона затрудняет идентификацию.

**Диапазон масс:** до 1000 Да.

## 1.2 Химическая ионизация (chemical ionization, CI)

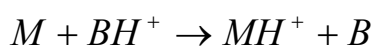
Несмотря на ряд достоинств, метод электронной ионизации во многих случаях не позволяет установить молекулярную массу соединения из-за отсутствия молекулярного пика в спектре и установить реальную структуру становится крайне затруднительно. Поиск альтернативных методов, которые позволили бы решить эту проблему, привел к разработке в 1966 г. Мансоном и Филдом новой техники получения масс-спектров, названной химической ионизацией. Это намного более «мягкий» метод ионизации, в ходе которого молекулярный ион получает небольшую порцию избыточной энергии и степень фрагментации оказывается весьма незначительной. Иногда спектр содержит только пик молекулярного иона. Как же это достигается?

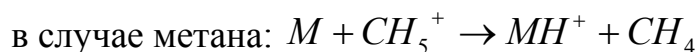
Если проводить взаимодействие пучка электронов с молекулами вещества в условиях высокого вакуума, как при ионизации электронным ударом, основным направлением реакции будет образование катион-радикалов. Если проводить аналогичное облучение вещества при более высоком давлении (до 1 мм рт. ст.), образующиеся ионы будут взаимодействовать с нейтральными молекулами, давая различные типы новых ионов. Например, при облучении метана электронами протекают следующие превращения:



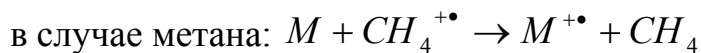
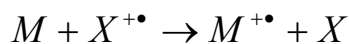
Если теперь полученные ионы ввести в ионизационную камеру с молекулами исследуемого вещества, предварительно переведенными в газообразное состояние, между ними могут протекать различные реакции:

а) протонирование:

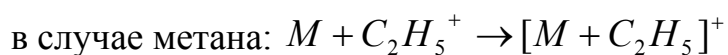
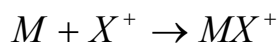




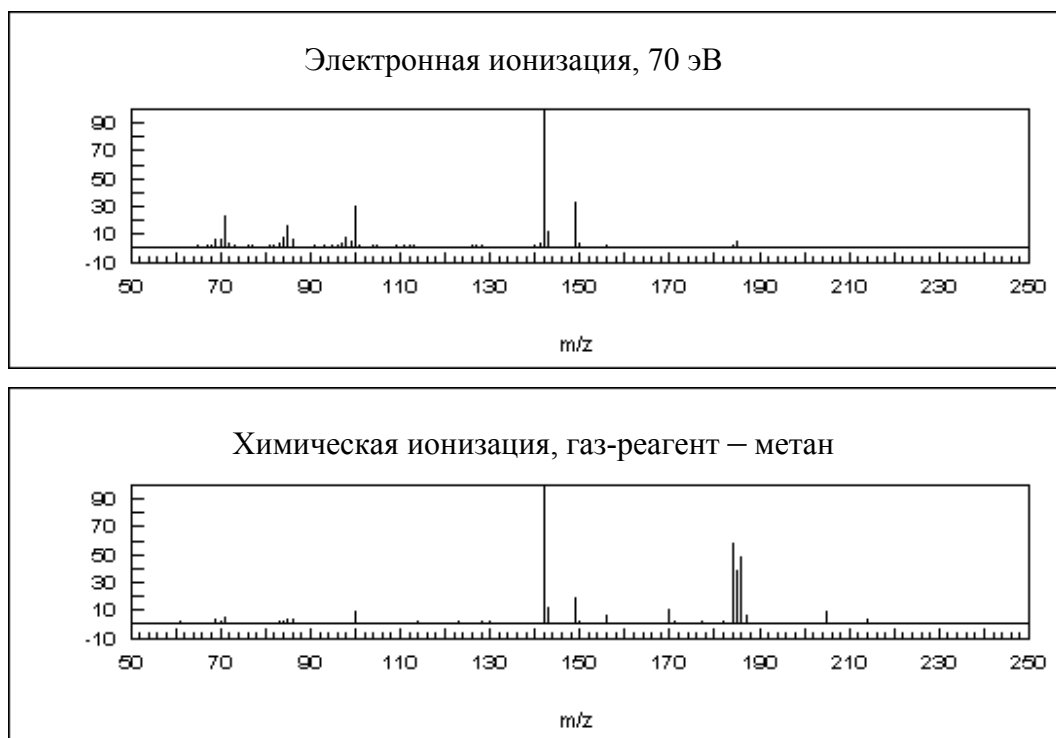
б) перезарядка:



в) электрофильное присоединение:



Как видно, все эти реакции приводят к генерированию из нейтральной молекулы заряженных ионов, преимущественно катионов, которые стабильнее катион-радикалов и имеют больше шансов достичь детектора. Данный процесс и называется химической ионизацией, а метан выступает в роли газа-реагента. На рисунке 6 приведены масс-спектры три-*n*-бутиламина, полученные в условиях электронной и химической ионизации и показывающие преимущества последнего метода для определения молекулярной массы.



**Рисунок 6** – Масс-спектры три-*n*-бутиламина ( $M_r = 185$ ), записанные в условиях электронной (вверху) и химической (внизу) ионизации

В качестве газа-реагента может быть использовано практически любое летучее вещество. Помимо метана часто применяют изобутан, аммиак и аргон. В случае аргона возможен только один путь взаимодействия с веществом – перезарядка, поэтому в таком масс-спектре отсутствуют протонированные ионы и продукты электрофильного присоединения. При использовании изобутана помимо молекулярного иона в спектре присутствуют интенсивные сигналы ионов  $[M + H]^+$  и  $[M + C_4H_9]^+$ , а если газ-реагент – аммиак, то наблюдаются ионы  $[M + H]^+$  и  $[M + NH_4]^+$ .

Информация, получаемая в условиях химической ионизации, дополняет данные электронной ионизации, и их комбинация является мощным инструментом в установлении структуры.

#### **Преимущества:**

- Позволяет получить информацию о молекулярной массе соединения;
- Масс-спектр намного проще, чем при ионизации электронами.

#### **Недостатки:**

- Как и в случае электронной ионизации, анализируемое вещество должно обладать достаточной летучестью и термической стабильностью;
- Поскольку осколочных ионов практически не образуется, метод в большинстве случаев не позволяет получить информацию о строении вещества;
- Результат сильно зависит от типа газа-реагента, его давления, времени взаимодействия с веществом, поэтому очень трудно добиться воспроизводимых результатов.

**Диапазон масс:** как и в случае электронной ионизации до 1000 Да.

### 1.3 Ионизация электрическим полем (field ionization, FI) и полевая десорбция (field desorption, FD)

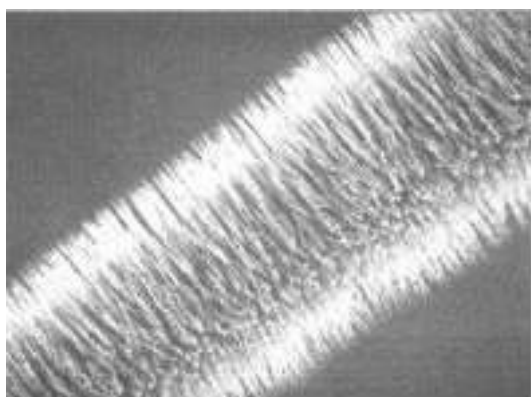


Рисунок 7 – Вид эмиттера под микроскопом

Оба метода относятся к «мягким» способам ионизации и имеют практически одинаковое аппаратное оформление и механизм воздействия на вещество. Ключевую роль играет проволочный эмиттер, поверхность которого покрыта микроиглами (рисунок 7). Между эмиттером и ускоряющим катодом поддерживается разность потенциалов 8–10 кВ. Благодаря малому радиусу кривизны на концах игл создается высокая напряженность электрического поля. Молекулярные орбитали вещества под действием поля искривляются, и происходит туннелирование электронов из молекулы на эмиттер. Энергия, переносимая в результате этого процесса, составляет доли электрон-вольт, причем избыточная энергия молекулярного иона оказывается даже ниже, чем в условиях химической ионизации, поэтому в большинстве случаев пик молекулярного иона является единственным сигналом в спектре (рисунок 8). Высокий положительный потенциал эмиттера выталкивает образовавшийся молекулярный ион по направлению к детектору.

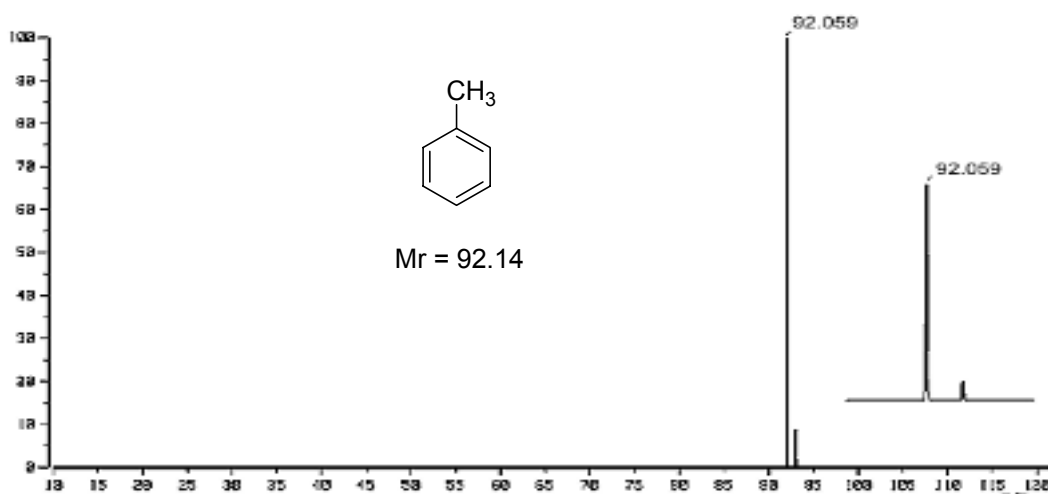
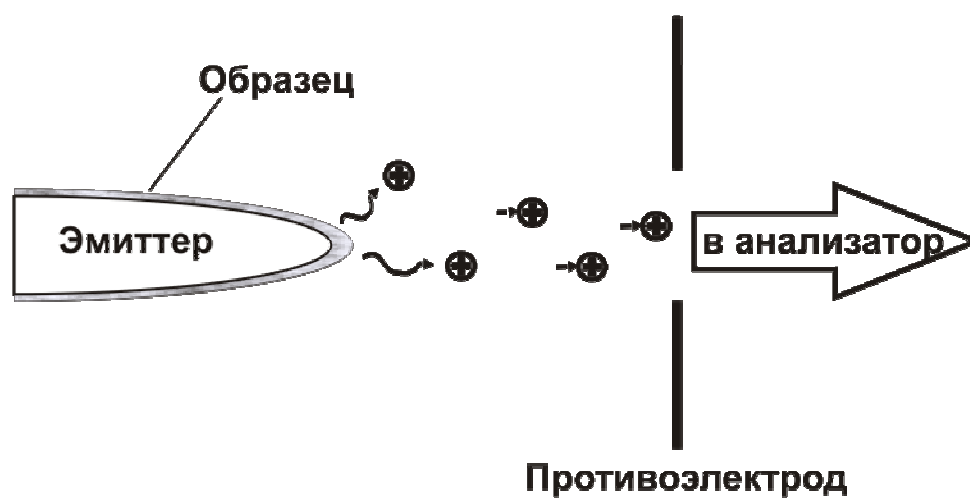


Рисунок 8 – Масс-спектр толуола, полученный при ионизации электрическим полем

Различие между ионизацией электрическим полем и полевой десорбцией заключается в агрегатном состоянии анализируемых объектов. Ионизация электрическим полем (FI) применяется для получения масс-спектров газообразных соединений, эмиттер находится в заполненной газом-веществом камере. При ионизации десорбцией электрическим полем (FD) вещество непосредственно наносится на эмиттер, что позволяет анализировать жидкости и твердые вещества. На рисунке 9 приведена схема такой установки.



**Рисунок 9** – Схема установки для ионизации полевой десорбцией (FD)

Большое значение в обоих случаях имеет качество эмиттера. Для его создания тонкую металлическую проволоку нагревают до высокой температуры (обычно выше 900 °С) в присутствии сильного электрического поля в атмосфере бензонитрила. В этих условиях на поверхности металла происходит разложение PhCN и формирование тонких углеродных игл. К сожалению, приготовление эмиттера является сложной технической задачей и получаемый образец крайне хрупок. Это, наряду с другими недостатками, привело к тому, что методы FI и FD получили пока ограниченное распространение.

#### **Преимущества:**

- Масс-спектр содержит зачастую только сигнал молекулярного иона;
- Дает хорошие результаты при анализе органических соединений, полиме-



ров с небольшой молекулярной массой и металлоорганических соединений.

#### Недостатки:

- Хрупкость эмиттера и трудности его изготовления;
- Для FI вещество должно обладать достаточной летучестью;
- Для FD из-за небольших размеров эмиттера необходимо строго контролировать количество наносимого вещества (не более  $10^{-5}$  г);
- Анализ требует продолжительного времени.

Диапазон масс: В случае FI до 1000, для FD до 2000–3000 Да.

### 1.4 Бомбардировка быстрыми атомами (fast atom bombardment, FAB) и масс-спектрометрия вторичных ионов с ионизацией в жидкой фазе (liquid secondary ion mass spectrometry, LSIMS)

Бомбардировка быстрыми атомами как способ ионизации была предложена в начале 1980-х годов, и ее внедрение позволило вывести масс-спектрометрию на новый уровень. Принципиальная схема такой ионизации приведена на рисунке 10.

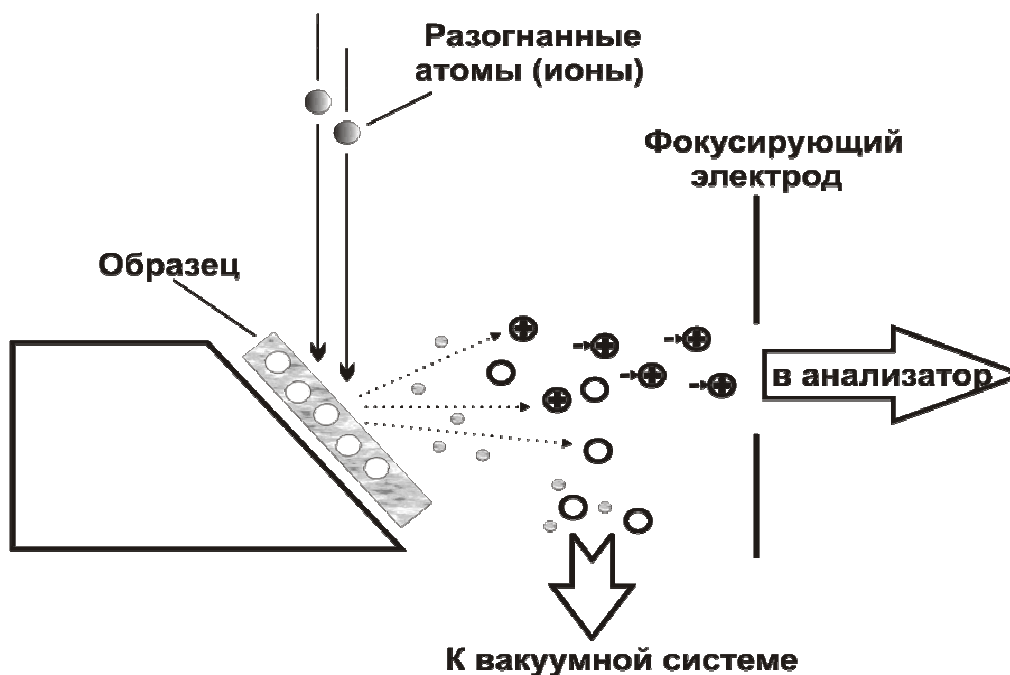


Рисунок 10 – Принципиальная схема ионизации бомбардировкой быстрыми атомами

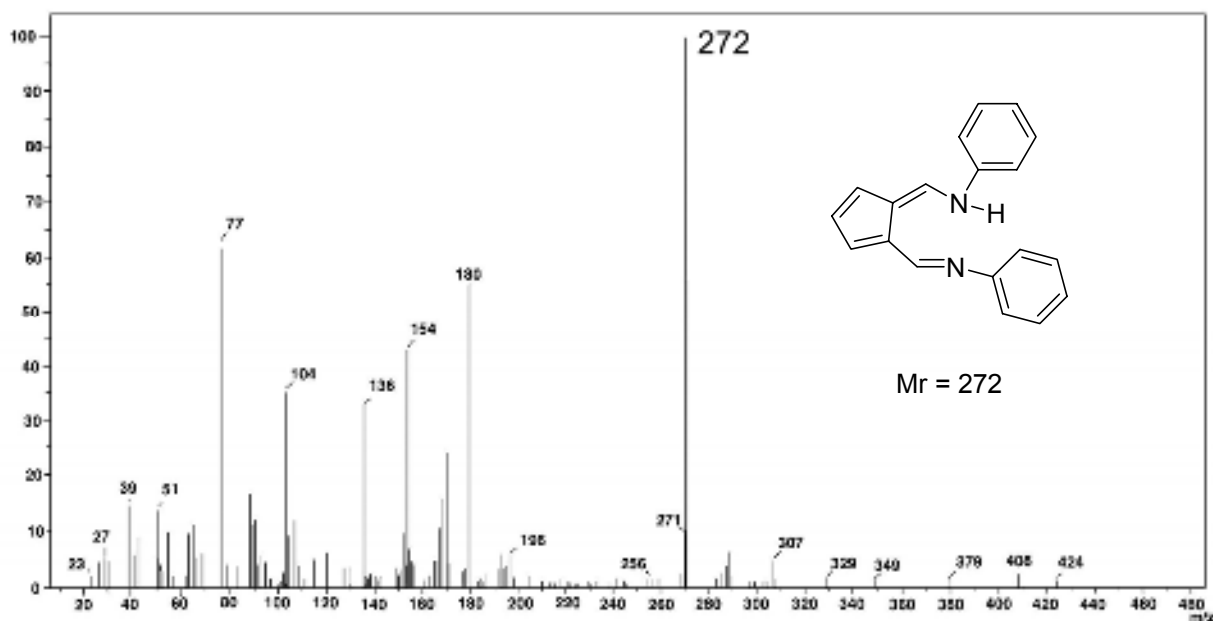
Пучок разогнанных атомов (чаще всего для этого используются атомы аргона и ксенона) направляется на раствор вещества, нанесенного на металлическую подложку. Взаимодействуя с раствором, атомы создают интенсивный локальный разогрев, молекулы, находящиеся на поверхности, испаряются, формируя над поверхностью образца область высокотемпературной плазмы, в которой протекает ионизация.

Для получения пучка атомов используют два подхода. В первом случае вначале генерируют ионы соответствующего газа, которые ускоряют потенциалом 6–8 кВ. Разогнанные ионы направляются далее в область с нейтральным газом, где, сталкиваясь с нейтральными частицами, передают им свою кинетическую энергию. Ускоренные таким образом атомы направляются на поверхность образца. В другом методе разогнанные ионы перед бомбардировкой образца проходят через пучок электронов, движущихся в перпендикулярном направлении. Захватывая электроны, ионы превращаются в атомы. Особенность масс-спектрометрии вторичных ионов с ионизацией в жидкой фазе заключается в том, что вместо атомов образец бомбардируется разогнанными ионами, чаще всего  $\text{Cs}^+$ .

Использование растворов вместо индивидуальных веществ неслучайно. Разогнанные атомы (ионы) не способны глубоко проникать в образец, поэтому для получения качественного спектра необходимо обеспечивать постоянную концентрацию вещества на поверхности, что достигается лишь в растворе, где скорость диффузии значительно выше. Соединение, используемое в качестве растворителя (матрицы), должно отвечать ряду условий: а) иметь низкую летучесть; б) обладать низкой вязкостью, чтобы не препятствовать диффузии к поверхности; в) быть химически инертным; г) хорошо растворять анализируемое вещество; г) должно способствовать ионизации. Наиболее популярными матрицами являются глицерин (glycerol) и 3-нитробензиловый спирт (NBA). Естественно, что при бомбардировке ионизации подвергается не только анализируемое вещество, но и матрица. Ионы матрицы фрагментируются и перегруппировываются, создавая силь-

ный фон в части спектра до 200 Да, поэтому данные способы ионизации не рекомендуется применять для веществ с низкими молекулярными массами.

Следует иметь в виду, что эти способы ионизации нельзя назвать «мягкими». Бомбардировка быстрыми атомами (ионами) приводит к передаче молекулам значительной энергии. В результате, наряду с пиками молекулярных ионов в спектрах некоторых соединений наблюдаются интенсивные пики осколочных ионов, что позволяет рассуждать об их структуре (рисунок 11).



**Рисунок 11** – FAB масс-спектр аминафульвенальдимина, матрица – NBA

#### **Преимущества:**

- Быстрое получение масс-спектра;
- Отсутствует необходимость в использовании высокой температуры, что позволяет анализировать термически лабильные соединения;
- Дает хорошие результаты для широкого спектра образцов, в частности, позволяет получать масс-спектры ионных соединений.

#### **Недостатки:**

- Аналит должен хорошо растворяться в матрице;

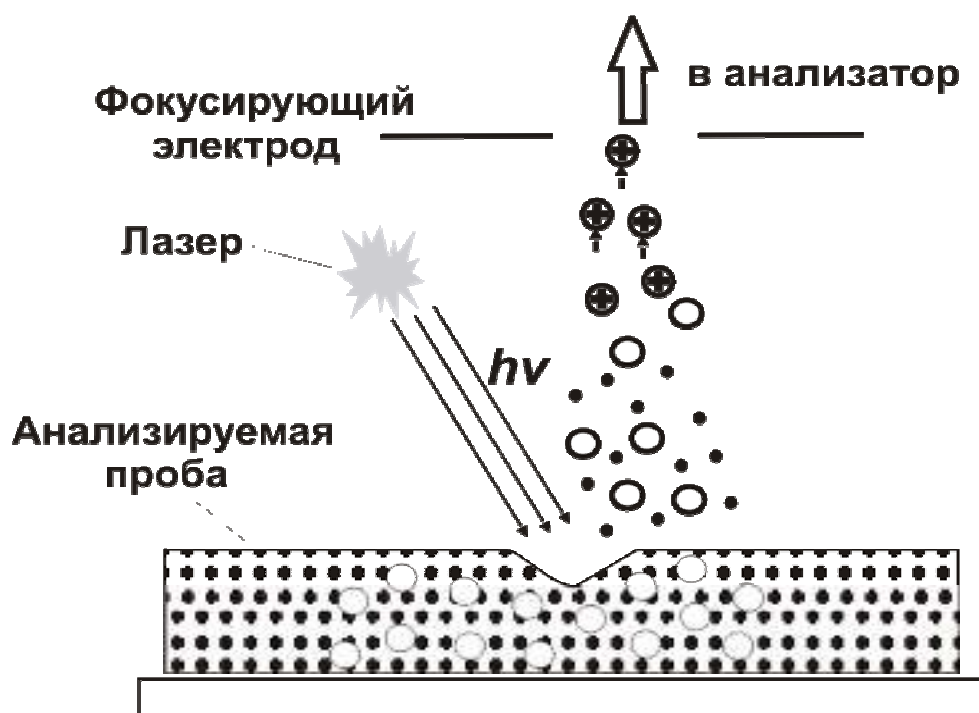
- Высокий уровень шумов, что требует введения больших количеств образца;
- В области низких масс доминируют ионы матрицы.

**Диапазон масс:** от 200 до 2000, в некоторых случаях до 5000 Да.

### 1.5 Ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)

Данный способ ионизации был предложен во второй половине 80-х годов XX века, и за его создание одному из первооткрывателей Коичи Танаке в 2002 г. была присуждена Нобелевская премия по химии, поскольку внедрение MALDI совершило прорыв в анализе сложных биоорганических молекул.

Метод заключается в облучении короткими лазерными импульсами образца, представляющего собой твердый раствор анализируемого соединения в органической матрице (рисунок 12).



**Рисунок 12** – Схема ионизации лазерной десорбцией при содействии матрицы

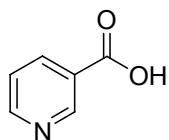
Матрица подбирается таким образом, чтобы она активно поглощала излучение лазера. В процессе облучения над поверхностью образца создается область высокотемпературной плазмы, в которой происходит ионизация. Образующиеся ионы с помощью фокусирующего электрода выводятся из зоны ионизации и направляются в анализатор.

Успех ионизации зависит от ряда факторов.

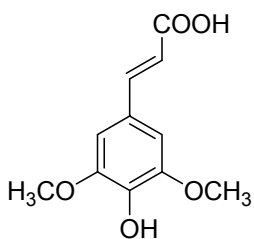
*Лазер.* Использование лазерных импульсов, а не постоянного облучения неслучайно: импульсный режим работы предотвращает сильный перегрев и разложение образца. Для ионизации применяют в основном два типа лазеров – азотный и неодимовый. Оба являются ультрафиолетовыми, азотный испускает импульсы с длиной волны 337 нм, неодимовый – 355 нм, продолжительность импульсов от 0.1 до нескольких наносекунд.

*Матрица.* Как и в методе FAB матрица, используемая в MALDI, должна отвечать ряду критериев: а) поглощать излучение, испускаемое лазером; б) способствовать ионизации анализируемого вещества; в) хорошо растворяться в тех же растворителях, в которых растворяется аналит; г) кристаллизоваться с включением в структуру молекул анализируемого вещества; д) быть инертным по отношению к анализируемому соединению. Наиболее распространенные матрицы приведены на рисунке 13. Поскольку многие матрицы являются кислотами, в масс-спектре зачастую присутствует интенсивный сигнал иона  $[M + H]^+$ .

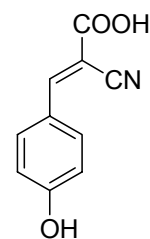
*Пробоподготовка.* Важный параметр, влияющий на качество спектров. Существует много различных методов подготовки образца к анализу, наиболее простой заключается в смешивании небольшого объема раствора анализируемого соединения с раствором матрицы. После получения гомогенного раствора, в котором молярное соотношение матрица–анализируемое вещество составляет от 100:1 до 50000:1, несколько микролитров его наносятся на подложку и высушивается. При этом происходит кристаллизация матрицы с включением анализируемого вещества в кристаллическую решетку.



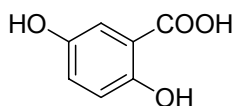
Никотиновая кислота, **NA**



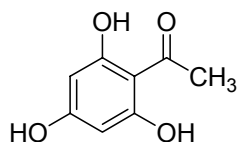
Синаповая  
(гидроксидиметоксикоричная)  
кислота, **SA**



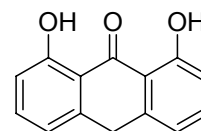
4-Гидрокси- $\alpha$ -цианокоричная  
кислота, **CCA**



2,5-Дигидроксибензойная  
кислота, **DHB**



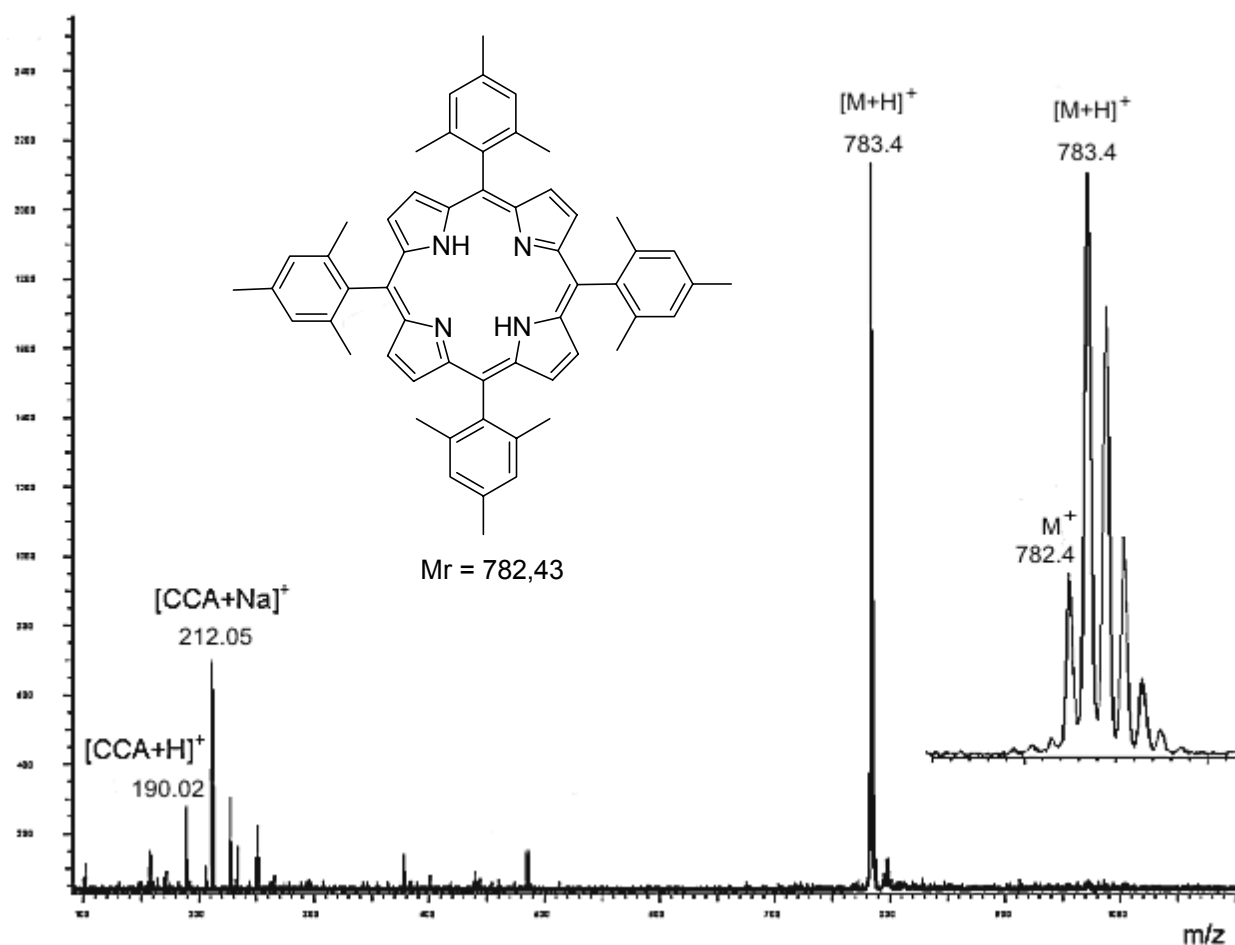
2,4,6-Тригидроксиацетофенон  
**THAP**



1,8-Дигидроксиантрон  
**dithranol**

**Рисунок 13** – Некоторые органические соединения, используемые в качестве матриц в методе MALDI. Жирным шрифтом указаны их общепринятые сокращения

На рисунке 14 приведен типичный MALDI масс-спектр.



**Рисунок 14** – MALDI спектр тетраметилпорфирина, матрица – CCA

Как отмечалось выше, огромная ценность метода MALDI заключается в возможности анализа сложных молекул, например, белков, полимеров, нуклеиновых кислот. Однако вид спектров тяжелых молекул (масса более 2000 Да) сильно отличается от классических спектров электронной или химической ионизации из-за наличия большого числа изотопных пиков. Анализ таких спектров требует специальных навыков.

#### **Преимущества:**

- Быстрое получение масс-спектра;
- «Мягкая» ионизация, фрагментация или отсутствует, или незначительна;
- Большой диапазон анализируемых масс, что позволяет анализировать сложные биомолекулы.

#### **Недостатки:**

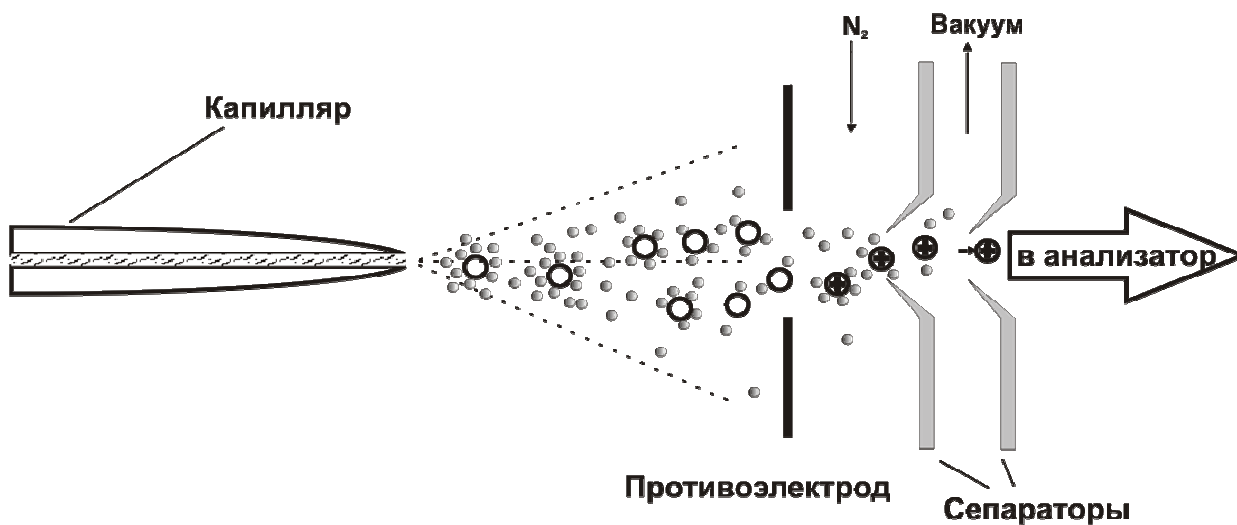
- Отсутствие фрагментации не позволяет судить о структуре;
- Требуется специальный анализатор, совместимый с импульсным режимом работы;
- Вид спектра чувствителен к типу используемой матрицы;
- В области низких масс доминируют ионы матрицы.

**Диапазон масс:** до 500 тыс. Да.

### **1.6 Ионизация распылением в электрическом поле (electrospray ionization, ESI)**

За разработку основ этого метода Джонн Фенн вместе с основоположником техники MALDI получил в 2002 г. Нобелевскую премию по химии. Оба ученых получили премию за тот вклад, которые внесли методы MALDI и ESI в изучение биологически значимых молекул.

Схема установки для ионизации распылением в электрическом поле приведена на рисунке 15.



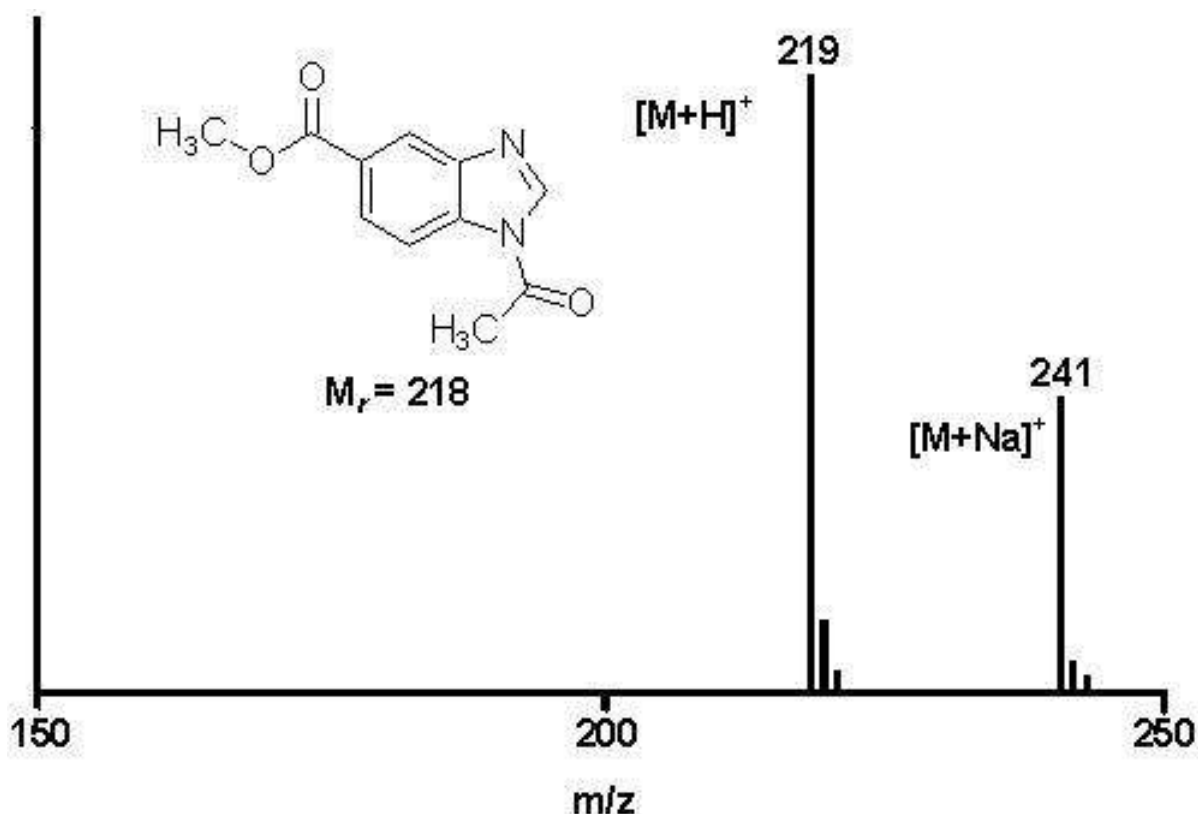
**Рисунок 15** – Ионизация распылением в электрическом поле

Раствор вещества в определенном растворителе поступает в тонкий капилляр (диаметр около 0.1 мм), на который подается высокое напряжение (2–5 кВ). Раствор выходит из капилляра в виде очень мелкого аэрозоля, состоящего из заряженных капель. Такой процесс называется распылением. Заряженные капли движутся в направлении анализатора к противозлектроду, по пути движения капли уменьшаются в размерах за счет испарения, которому способствует ток сухого азота в первом сепараторе и вакуум во втором. Достигая определенного критического размера, при котором силы поверхностного натяжения не способны противостоять силам кулоновского отталкивания, капли взрываются (кулоновский взрыв), распадаясь на более мелкие капли. Этот процесс продолжается снова и снова до тех пор, пока не заканчивается образованием иона анализируемого соединения. Это объяснение является одним из многих, и споры о механизме ионизации в условиях электрораспыления продолжаются до сих пор.

Поскольку ионизация формально протекает из раствора, присутствующие в нем частицы могут давать с молекулами анализируемого вещества различные аддукты. По этой причине в масс-спектре вместо молекулярного иона присутствуют ионы  $[M + H]^+$ , а если в растворитель добавлены соли щелочных металлов



или аммония (для повышения ионизирующей способности) то, например, ионы  $[M + Na]^+$  или  $[M + NH_4]^+$  (рисунок 16).



**Рисунок 16** – Масс-спектр производного бензимидазола, снятый в условиях ионизации распылением в электрическом поле, растворитель – ацетонитрил

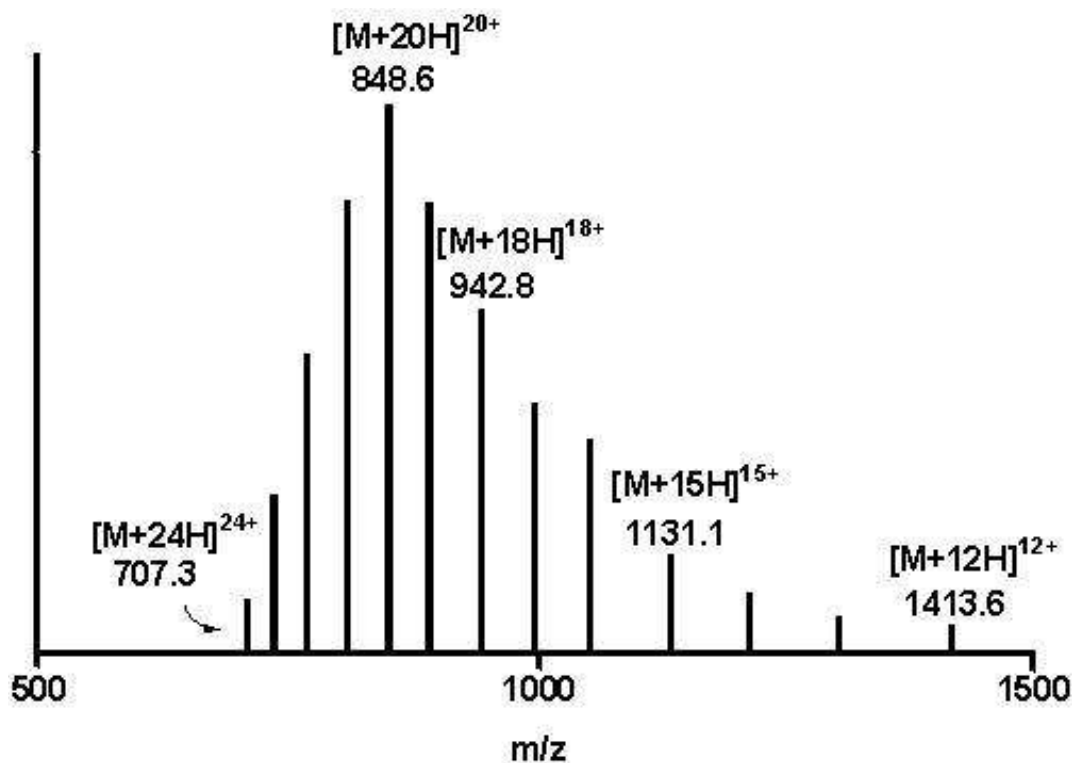
Если анализируемое вещество содержит несколько основных центров, в масс-спектре появляется серия ионов типа  $[M + nH]^{n+}$ . Данный факт крайне важен в анализе сложных молекул, например, белков. Дело в том, что анализатор масс-спектрометра разделяет ионы не по массам, а по отношению массы к заряду. В результате ион с массой 100 тыс. Да и зарядом в 100 будет регистрироваться при значении  $m/z = 1000$  (рисунок 17). Это позволяет расширить предел анализируемых масс до 200 тыс. Да, а зарегистрированный на сегодняшний день рекорд составляет 110 млн. Да.

Успех получения хорошего ESI-спектра зависит от ряда факторов.

*Растворитель.* По ряду причин при ионизации распылением в электрическом поле используются только полярные растворители, наиболее распространенные из которых вода, ацетонитрил, метанол, а также их смеси. Возможно применение

и других растворителей с высокой полярностью и невысокой температурой кипения.

*Приготовление образца.* Обычно заключается в растворении образца в выбранном растворителе или смеси растворителей. Концентрация раствора не должна превышать 1 мг/мл, поскольку при высоких концентрациях повышается вероятность выхода из строя капилляра в результате его засорения.



**Рисунок 17** – ESI-спектр миоглобина ( $M_r = 16951.5$  Да), растворитель – смесь ацетонитрил–вода, 1:1

*Напряжение на капилляре.* Важный параметр, от которого зависит, какие частицы будут наблюдаться в масс-спектре. При низком электрическом напряжении ионы могут вообще не образоваться, при высоком напряжении повышается вероятность фрагментаций.

Данный способ ионизации и метод MALDI дополняют друг друга, позволяя анализировать практически любые объекты.

### **Преимущества:**

- Прекрасно подходит для получения масс-спектров полярных и ионных соединений;
- «Мягкая» ионизация, фрагментация или отсутствует, или незначительна;
- Образование мультисарядных ионов расширяет диапазон детектируемых масс;
- Высокая чувствительность;
- Фрагментацией можно управлять, изменяя электрическое напряжение на капилляре.

### **Недостатки:**

- Не подходит для анализа неполярных или слабополярных соединений;
- Метод чувствителен к присутствию в растворе посторонних примесей;
- Достаточно сложное аппаратное оформление.

**Диапазон масс:** обычно до 200 тыс. Да.

## **2 Разделение ионов**

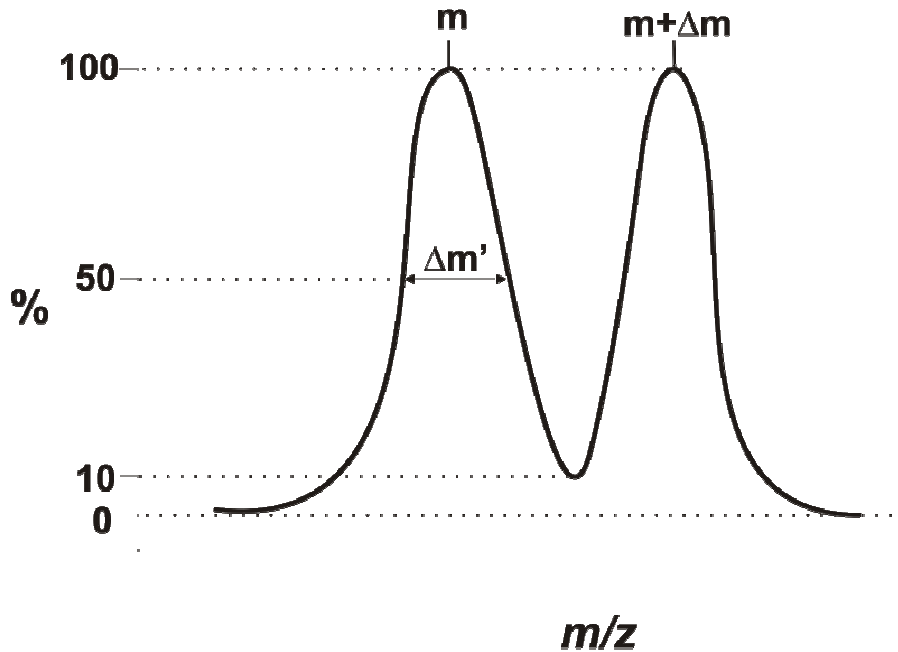
После того как анализируемое вещество переведено в ион или серию ионов возникает необходимость их разделения и регистрации. Для этой цели применяют несколько типов анализаторов.

Однако перед рассмотрением конкретных схем следует разобрать значение такого термина, как *разрешение*. Под разрешением масс-спектрометра подразумевается его способность разделять ионы с различными значениями  $m/z$ . При этом, чем выше разрешение прибора, тем больше его способность различить два пика с близкими массами. Рассчитать разрешение можно по одному из двух способов.

В первом случае разрешение определяют по формуле:

$$R = \frac{m}{\Delta m},$$

где  $R$  – разрешение,  $m$  – масса иона,  $\Delta m$  – расстояние до соседнего пика, который не перекрывается с данным вплоть до 10%-ной высоты (рисунок 18).



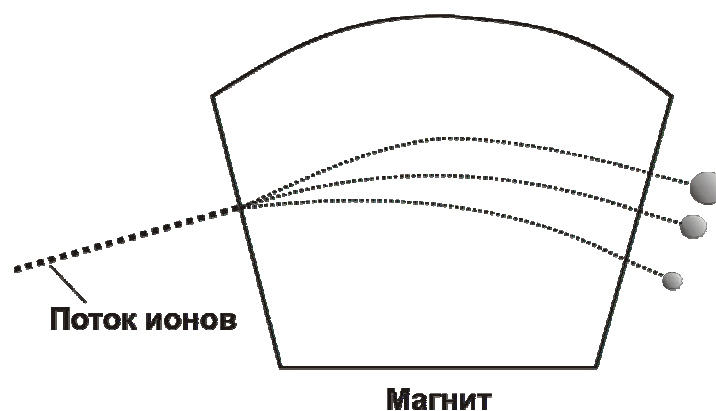
**Рисунок 18** – Сопоставление различных способов расчета разрешения масс-спектрометра

Иными словами, разрешение 1000 означает, что пики с массами 100.0 и 100.1 Да отделяются друг от друга, то есть не накладываются вплоть до 10% высоты. Это определение применимо для магнитных масс-анализаторов. Для других анализаторов, в которых сигналы ионов имеют тенденцию к уширению, подобное вычисление разрешения дает заниженное значение, поэтому более широким определением разрешающей способности является отношение массы данного пика к его ширине, взятой на половине высоты,  $\Delta m'$  (рисунок 18). Важно при сравнении различных анализаторов рассчитывать разрешение по одному и тому же способу. Мы будем пользоваться разрешением, рассчитанным по второму способу, используя ширину на половине высоты пика.

## 2.1 Магнитный секторный анализатор (magnetic sector)

Исторически первый из предложенных типов анализаторов.

Принцип его работы следующий. Вылетающие из источника ионов частицы попадают в магнитное поле анализатора, силовые линии которого направлены перпендикулярно движению. Под действием поля траектория движения частиц искривляется, и ион начинает двигаться по окружности, радиус которой пропорционален величине  $m/z$ . Ионы с меньшим значением  $m/z$  отклоняются сильнее, чем более тяжелые (рисунок 19).

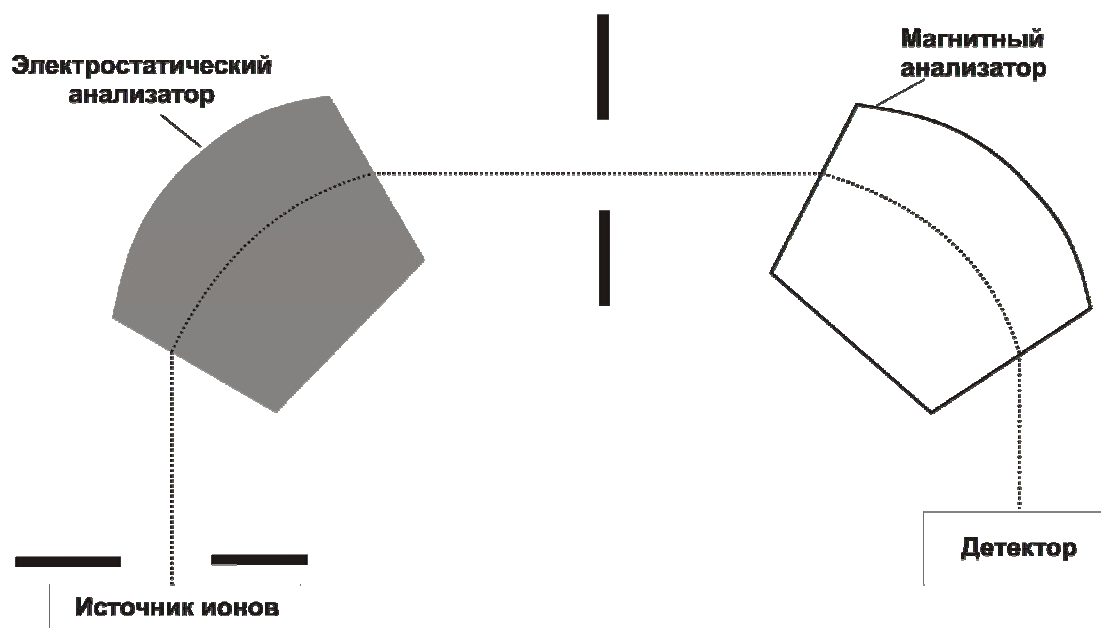


**Рисунок 19** – Действие магнитного поля на траекторию движения ионов

Магнитный секторный анализатор сам по себе используется достаточно редко. Причина состоит в том, что ионы, вылетающие из источника, имеют разную кинетическую энергию и, следовательно, скорость. Поэтому при прохождении анализатора ионы с одинаковым отношением  $m/z$ , но разной скоростью несколько отклоняются от средней траектории, что приводит к размытию сигнала и потере разрешающей способности. Для исправления этого недостатка используется система двойной фокусировки, где помимо магнитного анализатора на пути движения ионов помещают электростатический анализатор. В электрическом поле ионы также начинают двигаться по окружности, однако в этом случае траектория движения зависит от кинетической энергии частицы. Ионы с большей энергией отклоняются сильнее и проходят большее расстояние, с меньшей энергией – меньше. В результате достигается более точная фокусировка пучка и, как следствие, высо-

кое разрешение.

На рисунке 20 приведено устройство спектрометра с двойной фокусировкой. В данном случае электростатический анализатор расположен до магнитного, в такой ситуации говорят о прямой геометрии прибора. Если первым располагается магнитный анализатор, то говорят об обратной геометрии. Для большинства масс-спектрометрических задач расположение анализаторов не принципиально. В процессе работы внутри прибора поддерживается разрежение, что ограничивает диапазон методов ионизации, с которыми может работать такой детектор.



**Рисунок 20** – Устройство масс-спектрометра с двойной фокусировкой

Использование двойной фокусировки позволяет существенно повысить разрешение прибора, в результате становится доступной съемка масс-спектров высокого разрешения. При такой съемке масса иона определяется с точностью до 4–6 знаков после запятой, что позволяет определять его элементный и изотопный состав.

#### **Преимущества:**

- Высокое разрешение, чувствительность.

#### **Недостатки:**

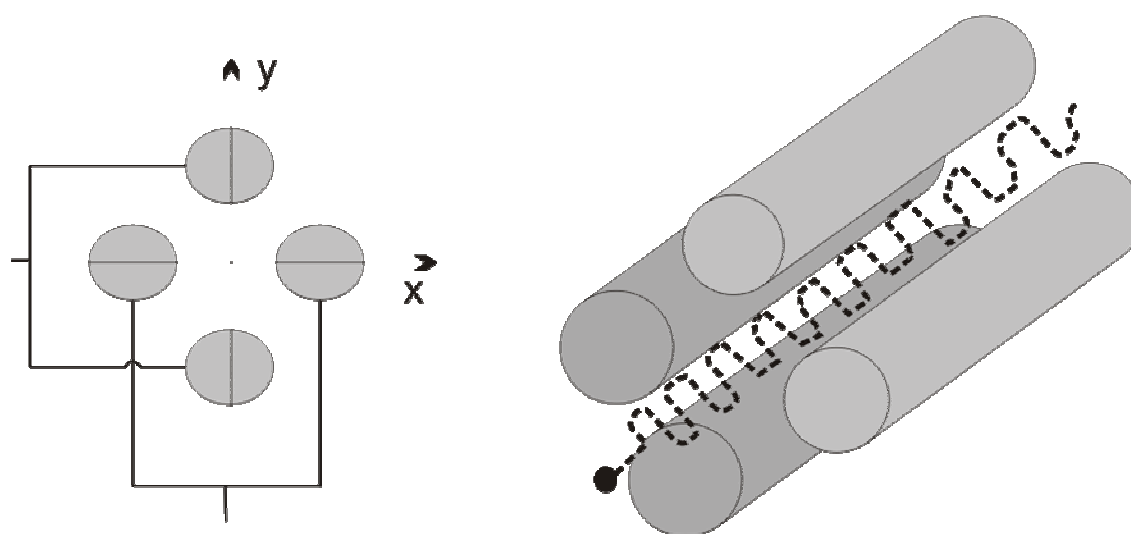
- Не подходит для импульсных ионизационных методов, например, MALDI;

- Сложности при соединении с источниками ионизации, которые работают при более высоком давлении, например, ESI;
- Большие размеры;
- Высокая цена.

**Диапазон масс и разрешение:** способен детектировать ионы с массами до 4000, типичное разрешение 25 тыс., максимально достижимое 100 тыс. Да.

## 2.2 Квадрупольный анализатор (quadrupole)

Предложен в 1953 г. Вольфгангом Паулем, впоследствии получившем Нобелевскую премию по физике. Квадрупольный анализатор состоит из четырех параллельных стержней круглого или гиперболического сечения, к которым попарно в противоположной полярности подается определенная комбинация постоянного и радиочастотного переменного напряжений (рисунок 21).



**Рисунок 21** – Устройство квадрупольного анализатора

Попав в анализатор, положительно заряженный ион будет двигаться к отрицательно заряженному стержню, однако, если до того как он достигнет стержень, полярность последнего изменится, ион изменит направление движения. В результате, под действием электрического поля ионы, вводимые в квадруполь, начинают

колебаться относительно осей  $x$  и  $y$ . Так как каждый ион имеет свою собственную частоту колебаний, зависящую от массы, через анализатор проходят лишь те из них, частота которых находится в *резонансе* с радиочастотой квадрупольного поля, остальные гибнут на поверхности стержней. Из-за этой особенности квадрупольного поля его еще называют *фильтром масс*. Прошедшие анализатор ионы регистрируются детектором. Поскольку величина  $m/z$  зависит от радиочастотной составляющей, ее постепенное изменение позволяет просканировать всю рабочую область  $m/z$  и получить масс-спектр.

#### **Преимущества:**

- Компактный, недорогой, простой в изготовлении;
- Быстрое сканирование (до 1000  $m/z$  в секунду);
- Хорошая воспроизводимость спектров.

#### **Недостатки:**

- Не подходит для импульсных ионизационных методов, например, MALDI;
- Низкое разрешение и диапазон анализируемых масс.

**Диапазон масс и разрешение:** способен детектировать ионы с массами до 2000, типичное разрешение 2500 Да.

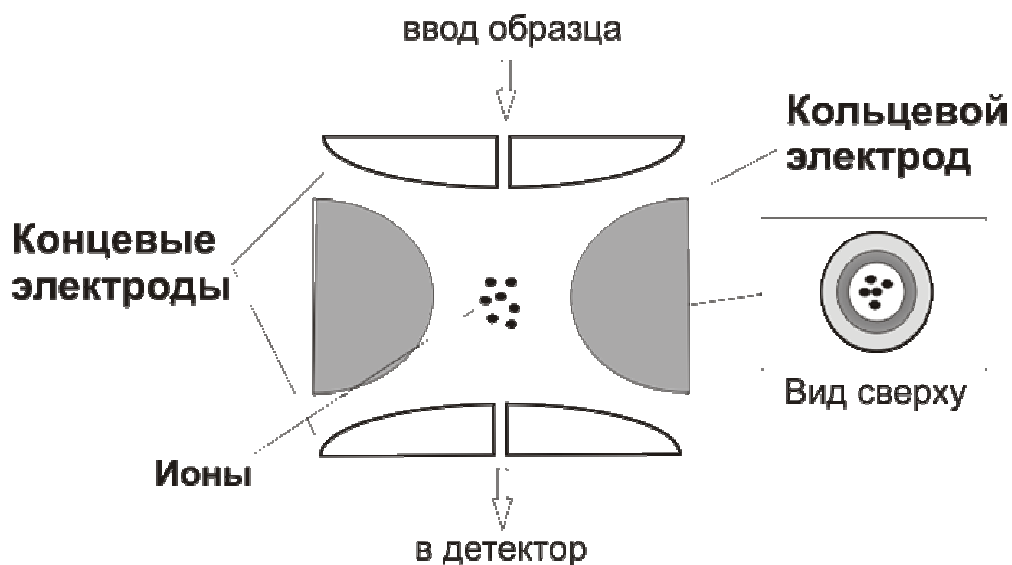
### **2.3 Ионная ловушка (ion trap)**

Ионная ловушка была описана одновременно с квадрупольным анализатором, и ее работа построена на практически тех же принципах. В основе конструкции лежит система из трех электродов (рисунок 22).

Два концевых электрода гиперболической формы имеют потенциал земли, между ними находится кольцевой электрод, на который подается радиочастотное напря-



жение. Пространство внутри ловушки заполнено инертным газом, чаще всего гелием.



**Рисунок 22** – Устройство ионной ловушки

Попадая в ловушку, ионы начинают двигаться по замкнутым орбитам внутри кольцевого электрода и теоретически могут удерживаться внутри бесконечно долго. В реальности, из-за столкновений между собой или молекулами инертного газа их время жизни ограничено. Инертный газ находится в ячейке для того, чтобы в результате столкновений с ионами принимать их избыточную энергию и не давать им распадаться дальше или взаимодействовать с другими ионами.

Как отмечалось, внутри ловушки ионы движутся по замкнутым орбитам, размеры которых зависят от ряда факторов, одним из которых является величина  $m/z$ . Если теперь подать дополнительный радиочастотный сигнал на концевые электроды, его поглощение будет повышать энергию ионов, увеличивая скорость и радиус их движения. Ионы, движение которых будет находиться в резонансе с внешним радиочастотным сигналом, получают максимальную энергию и смогут покинуть ловушку, попав в детектор. Поскольку условие резонанса зависит от величины  $m/z$ , постепенно изменяя частоту сигнала, из ловушки последовательно выводятся и регистрируются все ионы.

### Преимущества:

- Высокая чувствительность;
- Самый маленький и дешевый из всех применяемых анализаторов;
- В отличие от ранее описанных анализаторов позволяет работать с импульсными методами ионизации.

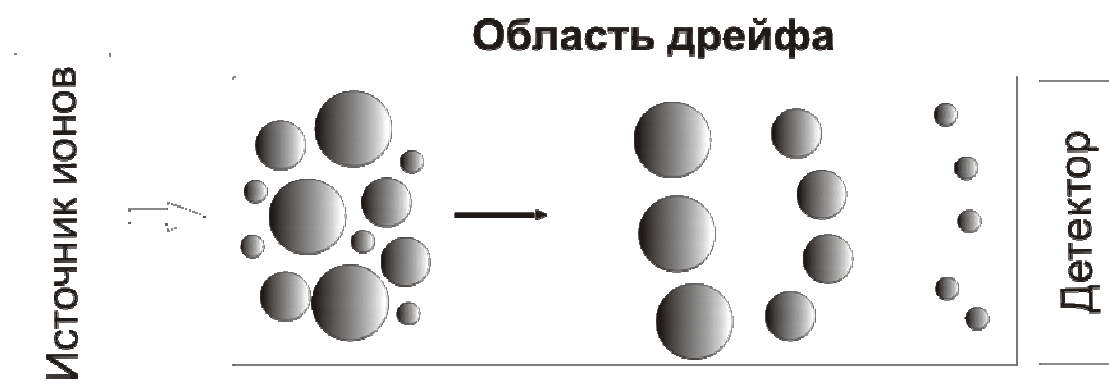
### Недостатки:

- Несмотря на предосторожности, в ионной ловушке все же протекают реакции между ионами, что приводит к искажению спектров и сложностям при компьютерной идентификации соединений по базам масс-спектров;
- Низкое разрешение и диапазон анализируемых масс.

**Диапазон масс и разрешение:** для коммерческих приборов до 2000, типичное разрешение 2500 Да.

## 2.4 Времяпролетный анализатор (time-of-flight, TOF)

Работа этого типа анализаторов построена на простейшем принципе: скорость движения разогнанных ионов пропорциональна их массе. Если ионы движутся в полой трубе, то детектора они достигнут в порядке увеличения массы (рисунок 23).



**Рисунок 23** – Принцип работы времяпролетного анализатора

Анализатор такого типа очень прост, а диапазон масс практически не лимитирован. Тем не менее, широкому внедрению времяпролетных анализаторов мешал ряд причин: низкая разрешающая способность и невозможность использования с непрерывными методами ионизации.

Проблема низкого разрешения возникает из-за того, что ионы с одной и той же массой могут иметь разную скорость или разное положение в пространстве, ионы выходящие из источника находятся не на одной линии, а занимают конкретный объем. Это приводит к тому, что одни ионы запаздывают, другие – наоборот, убегают, в результате детектируемый сигнал размывается и теряется разрешение. Невозможность стыковки с непрерывными методами ионизации (все, кроме MALDI) связано с тем, что ионы подаются в анализатор постоянно, то есть нельзя замерить время между вводом и достижением детектора, которое и позволяет определить отношение  $m/z$ . Тем не менее, для импульсных методов ионизации (MALDI) этот детектор практически незаменим: импульс лазера является сигналом для отсчета времени. Метод MALDI позволяет устранить и пространственный разброс ионов, поскольку они генерируются не из объема, а с поверхности. Для устранения разброса ионов по скоростям необходима модификация конструкции прибора и введение дополнительных деталей – рефлектронов (ионных зеркал) (рисунок 24).

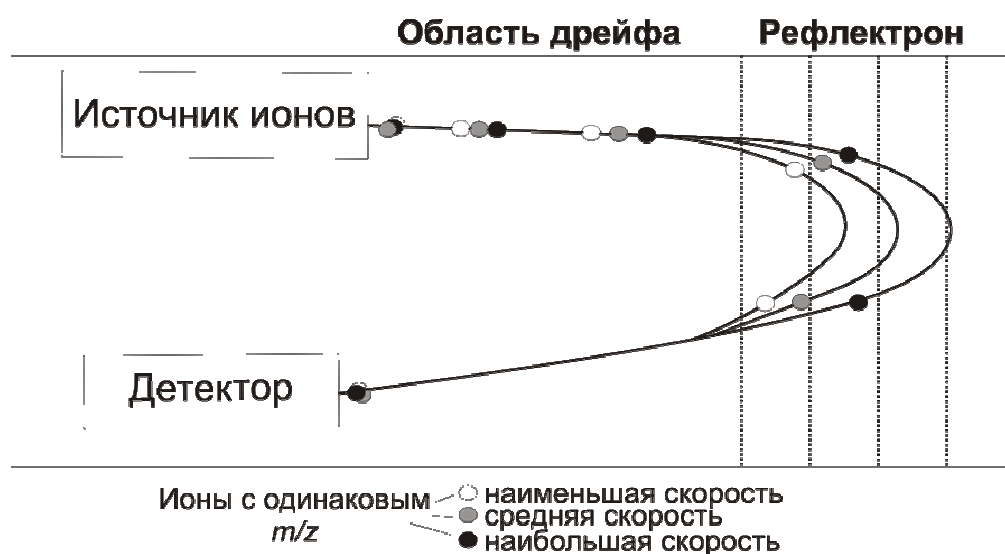


Рисунок 24 – Схема времяпролетного масс-спектрометра с рефлектроном

Принцип работы рефлектрона аналогичен принципу работы электростатического анализатора в магнитном секторном масс-спектрометре с двойной фокусировкой: ионы с большей скоростью проникают глубже внутрь рефлектрона. Первыми попадая внутрь, они последними покидают его и тем самым догоняют более медленные ионы. Использование такого принципа позволило существенно повысить разрешающую способность анализатора.

#### **Преимущества:**

- Простое устройство;
- Теоретически неограниченный предел регистрируемых масс;
- Высокая скорость записи спектров (может анализироваться до нескольких сотен спектров в секунду);
- Высокая чувствительность и разрешающая способность.

#### **Недостатки:**

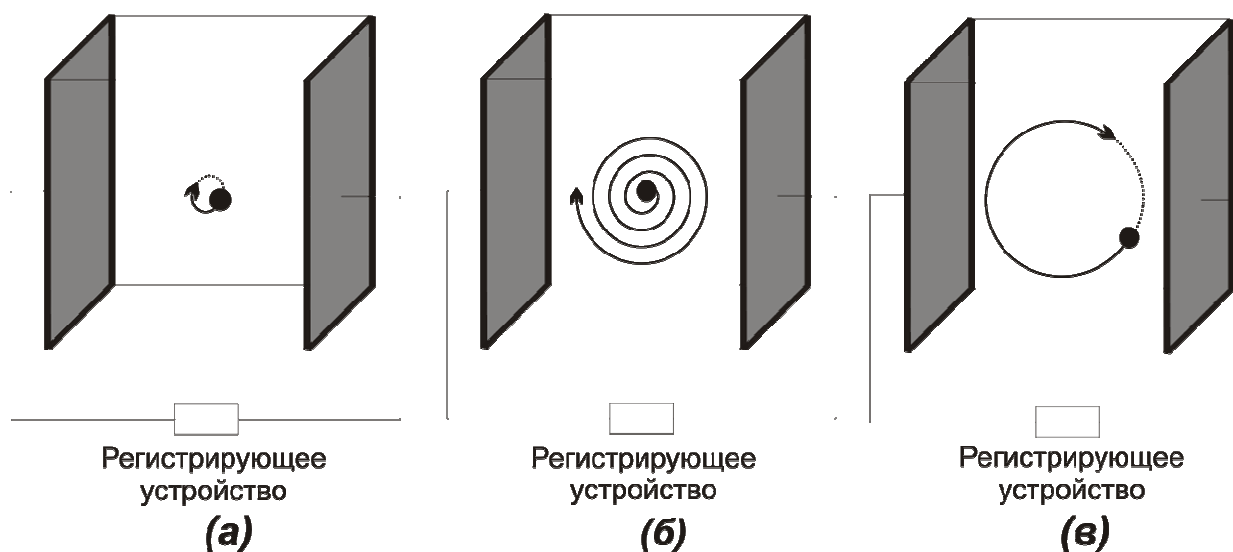
- Наиболее подходит для импульсных методов ионизации, работа с непрерывными методами ионизации требует использования более сложных схем;
- Внутри анализатора необходимо поддерживать очень высокий вакуум.

**Диапазон масс и разрешение:** обычно до 200 тыс., типичное разрешение 10 тыс., для приборов без рефлектрона – 1000 Да.

### **2.5 Ионный циклотронный резонанс с Фурье преобразованием (Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) или масс-спектрометрия с преобразованием Фурье (Fourier transform mass-spectrometry, FTMS)**

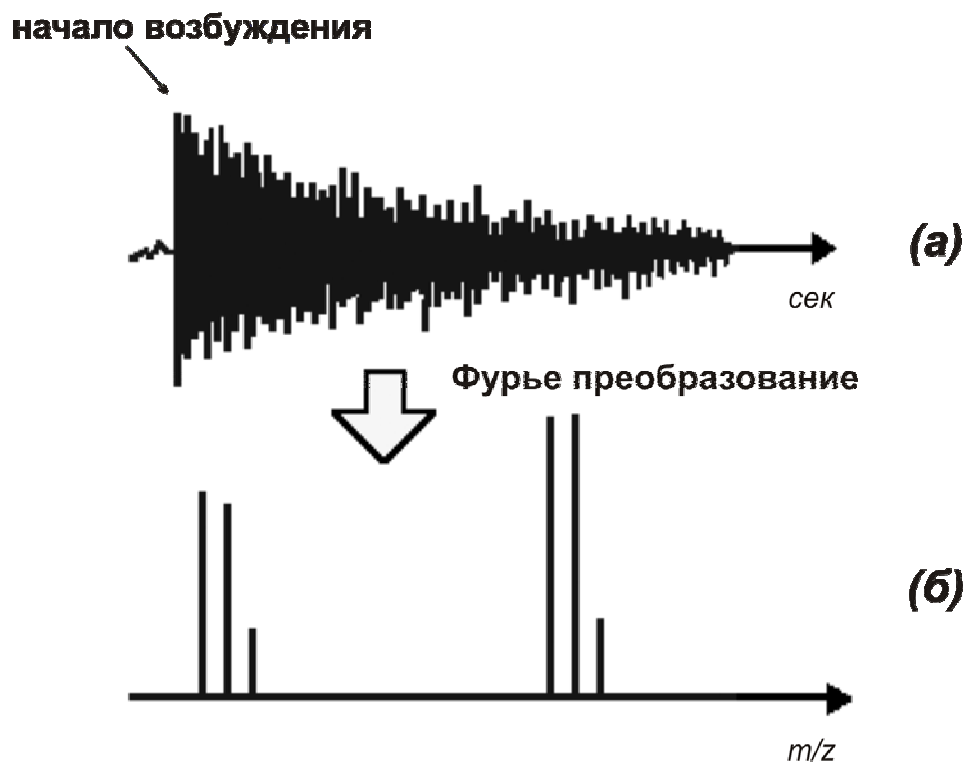
Физические основы данного метода были разработаны в 30-х годах XX века, а первый масс-спектрометр был построен в 1973 г.

Основным элементом анализатора является ячейка, размещенная в однородном магнитном поле. Ячейка может иметь разнообразные формы, простейшей является куб. Для создания магнитного поля используют сверхпроводящие магниты. Это связано с тем, что характеристики прибора зависят от напряженности поля, поэтому для получения наилучших результатов необходимо поле силой 3–9 Т. Ионы образца, генерированные любым из методов ионизации, направляются в ячейку анализатора перпендикулярно силовым линиям магнитного поля. В результате ион начинает двигаться в ячейке по круговой орбите (рисунок 25а), частота движения пропорциональна величине  $m/z$ . Для детектирования ионов их облучают приложением к ячейке радиочастотного поля. Когда частота движения иона оказывается в резонансе с частотой возбуждающего импульса, радиус его движения начинает увеличиваться по спирали (рисунок 25б). Ионы с другими массами не изменяют характера движения. Если возбуждение продолжается в течение длительного времени, ион может достигнуть стенок ячейки и погибнуть. Если же вовремя прекратить облучение, ионы будут продолжать движение по орбите с большим радиусом (рисунок 25в). Для предотвращения столкновений между ионами или с нейтральными частицами внутри прибора поддерживается глубокий вакуум ( $10^{-10}$  мм рт. ст.).



**Рисунок 25** – Схема работы масс-спектрометра с преобразованием Фурье

Для детектирования ионов в ячейке используется система из двух пластин, имеющих потенциал земли и соединенных между собой. Когда положительно заряженные ионы перемещаются от одной пластины к другой, их электрическое поле заставляет электроны перемещаться в том же направлении по внешней цепи между двумя электродами. Такое движение электронов называется наведенным током – это переменный ток с частотой, равной частоте движения ионов, а его амплитуда пропорциональна числу ионов данного вида в ячейке. Наведенный ток усиливается и регистрируется специальным устройством масс-спектрометра. В более раннем варианте линейно изменяли частоту внешнего радиочастотного поля, однако это требовало длительного времени и большого количества образца. Существенный прорыв был достигнут при внедрении масс-спектрометрии с преобразованием Фурье. В этом случае в ячейке возбуждаются сразу все ионы в результате приложения широкого радиочастотного импульса. Регистрируется комплексный сигнал, включающий в себя частоту и амплитуду наведенного тока каждого иона – временной сигнал (рисунок 26а).



**Рисунок 26** – Регистрируемый временной сигнал (а) и полученный после Фурье преобразования масс-спектр (б)

Математические операции, основанные на преобразованиях Фурье, позволяют перейти от временного сигнала к масс-спектру в обычном виде (рисунок 26б).

**Преимущества:**

- Обеспечивает наивысшее среди других анализаторов разрешение;
- Ионы внутри ячейки могут находиться достаточно продолжительное время.

**Недостатки:**

- Очень громоздкий и дорогой;
- Использование сверхпроводящих магнитов требует криогенного охлаждения.

**Диапазон масс и разрешение:** диапазон регистрируемых масс может быть очень большим, для большинства продаваемых приборов до 3000, типичное разрешение 100 тыс. Да.

**Литература**

- 1 Практическая органическая масс-спектрометрия / Дж. Чепмен – М.: Мир, 1988. – 218 с. – ISBN 5-0300-183-2.
- 2 Spectrometric identification of organic compounds / R.M. Silverstein, T.C. Morrill, C. Bassler – John Wiley & Sons, 1991. – 475 p. – ISBN 0-47154-193-1.
- 3 Основы масс-спектрометрии органических соединений / В.Г. Заикин, А.В. Варламов, А.И. Микая, Н.С. Простаков – М.: МАИК "Наука/Интерпериодика", 2001. – 286 с. – ISBN 5-7846-0100-8.
- 4 Масс-спектрометрия в органической химии / А.Т. Лебедев – М.: БИНОМ, 2003. – 493 с. – ISBN 5-94774-052-4.
- 5 Mass spectrometry basics / C.G. Herbert, R.A.W. Johnstone – CRC Press, 2003. – 474 p. – ISBN 0-84931-354-6.