МАСС-СПЕКТРОМЕТРЫ ДЛЯ ОРГАНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

М.Рыжов, О.Прошенкина, ЗАО "МС-АНАЛИТИКА"
olga.proshenkina@textronica.com

Масс-спектрометрия нашла применение во всех сферах деятельности человека. В статье рассмотрены разные режимы работы масс-спектрометров для проведения анализа состава органических соединений или определения содержания каких-либо веществ в объекте. Большое внимание уделено преимуществам и перспективам применения тандемной и многомерной масс-спектрометрии. Обсуждены проблемы повышения чувствительности и избирательности приборов.

Объекты исследований масс-спектрометрии очень разнообразны: от экологии до криминалистики, от нефтяной промышленности до протеомики, от фармакологии до медицинских исследований, от сельского хозяйства до пищевой промышленности.

Для органического анализа применяют хромато-масс-спектрометры. В этих приборах масс-спектрометр соединен с газовым или жидкостным хроматографом, который обеспечивает предварительное деление вводимого образца. Предварительное деление образца необходимо, поскольку подавляющее большинство объектов исследований – сложные смеси. Более того, как правило, перед вводом образца в хроматограф требуется более или менее сложная пробоподготовка. В некоторых случаях возможен прямой ввод образца в масс-спектрометр. На рис.1 показан хромато-масс-спектрометр высокого разрешения DFS с двумя газовыми хроматографами, а на рис.2 – масс-спектрометр высокого разрешения Q Exactive для работы с жидкостным хроматографом.

КАК РАБОТАЕТ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТР

Анализируемый образец вводится в хроматографическую колонку газового или жидкостного хроматографа, подсоединенного к масс-спектрометру. Вещества, выходящие из колонки по очереди, попадают в источник ионов масс-спектрометра, ионизируются и направляются в масс-анализатор, который может работать в различных режимах.

Сегодня предложено много различных методов ионизации для масс-спектрометрии. Наиболее распространен метод электронного удара (ЭУ), при котором молекула ионизируется за счет столкновения с электронами, ускоренными до энергий в несколько десятков электронвольт. Стандартное значение для большинства приборов – 70 эВ. Однако источники электронного удара работают с молекулами, находящимися в газовой фазе, т.е. ионизируемое вещество должно быть летучим или переводиться в газовую фазу при

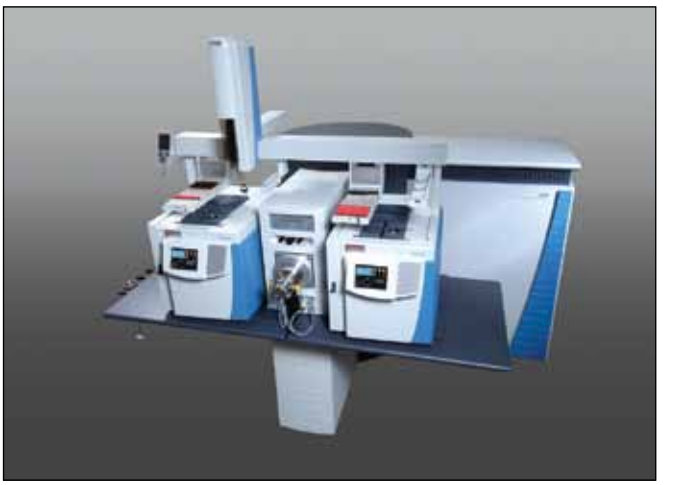

Рис.1. Хромато-масс-спектрометр высокого разрешения Thermo Scientic DFS, используемый для анализа диоксинов

Рис.2. Масс-спектрометр высокого разрешения Q Exactive компании Thermo Scientific с масс-анализатором типа орбитальная ловушка

нагреве. Для нелетучих и термолабильных соединений также существуют различные методы ионизации. Наиболее популярные – электроспрей (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении. Обзор существующих методов ионизации можно найти в [1].

В органическом анализе применяют разные типы масс-анализаторов: квадрупольный, ионная ловушка, магнитно-секторный, времяпролетный масс-анализатор, приборы с Фурье-преобразованием (орбитальные ловушки и приборы ионно-циклотронного резонанса). Бурно развивается так называемая тандемная или многомерная масс-спектрометрия, когда в одном приборе объединены два масс-анализатора: тройные квадруполи, сочетание ионной и орбитальной ловушки, системы Q-TOF – квадрупольный и времяпролетный масс анализаторы.

РЕЖИМЫ РАБОТЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРА

Вид получаемой хроматограммы полностью зависит от режима работы масс-спектрометра. В самом простом случае, так называемом режиме полного сканирования, масс-спектрометр непрерывно разворачивает масс-спектр в заданном диапазоне массовых чисел с определенной скоростью. Полученные спектры хранятся в памяти компьютера. Далее по запросу оператора компьютер суммирует интенсивности всех ионов в масс-спектре и строит график зависимости суммарной интенсивности от времени (полная хроматограмма) или выводит график временной зависимости интенсивностей отдельных ионов (масс-хроматограмма).

Естественно, что чем больше спектров сумеет снять масс-спектрометр за время выхода хроматографического пика, тем лучше будет описан сам хроматографический пик. Обычно считается, что скорость развертки должна быть такой, чтобы на каждый хроматографический пик приходилось не менее пяти масс-спектров. Поэтому для работы с хроматографом необходимы приборы, умеющие быстро разворачивать масс-спектр. Современные квадрупольные масс-спектрометры имеют скорость развертки 5–11 тыс. атомных единиц массовых чисел в секунду (а.е.м./с), что позволяет получать от 10 до 20 спектров в секунду (рис.3).

Надо иметь в виду, что используемое во многих современных программных обеспечениях обозначение TIC (total ion current) – полный ионный ток – на самом деле не является отражением суммы токов всех ионов, образовавшихся в ионном источнике, а представляет собой сумму интенсивностей ионов в выбранном диапазоне сканирования. Например, приведенная на рис.4 хроматограмма будет выглядеть совсем иначе, если диапазон сканирования задать не

Рис.3. Хромато-масс-спектрометр Thermo Scientific Trace ISQ. Скорость развертки 11000 а.е.м./с

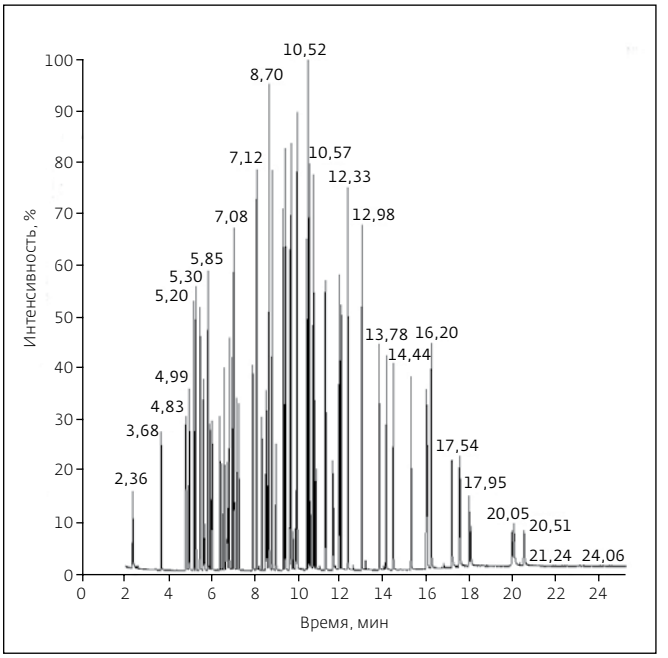

Рис.4. Хроматограмма по полному ионному току, полученная на масс-спектрометре в диапазоне сканирования 30–500 а.е.м.

30–500 а.е.м., а 300–500 (рис.5). Здесь стоит сделать небольшую оговорку. Когда мы говорим про массовые числа ионов, то нужно понимать, что мы говорим о величине отношений массы иона к его заряду. Однако поскольку в большинстве случаев, особенно при ионизации электронным ударом, образуются однозарядные ионы, то значение массы иона совпадает со значением отношения массы к заряду. В общем случае это не так, например, для белковых молекул характерно образование многозарядных ионов. Регистрируемая масса многозарядных ионов будет кратно меньше их действительной массы. На рис.6 приведен 47-зарядный ион с действительной массой 46642,6 а.е.м., зарегистрированный на массе 994. Для определения зарядовых состояний таких ионов требуется масс-спектрометр высокого разрешения. Этот ион зарегистрирован на приборе сверхвысокого разрешения Orbitrap Elite (Thermo Scientific).

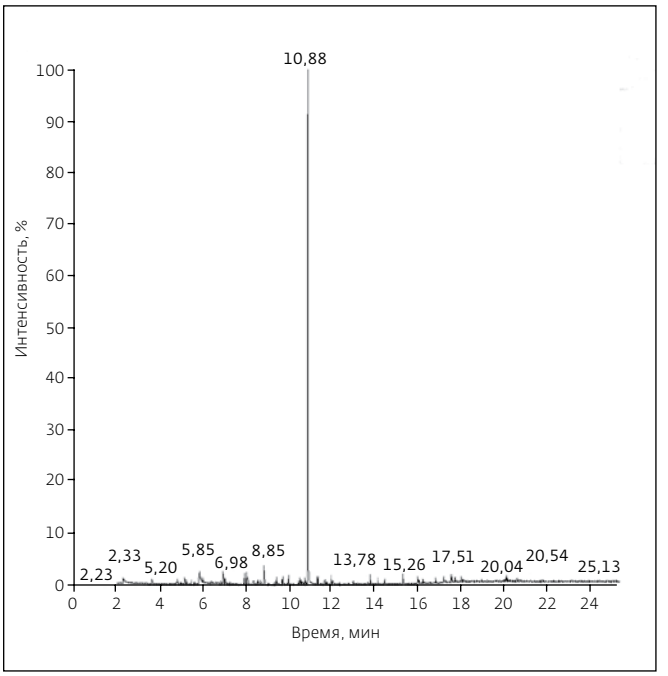

Рис.5. Хроматограмма, полученная в диапазоне сканирования 300–500 а.е.м.

Преимущество масс-спектрометра перед другими типами хроматографических детекторов заключается в том, что в каждой точке хроматограммы мы имеем соответствующий этой точке масс-спектр, что в принципе дает возможность идентифицировать все пики хроматограммы. Естественно, это относится только к режиму полного сканирования, который дает возможность использовать базы данных или библиотеки масс-спектров. В современных библиотеках насчитываются сотни тысяч масс-спектров индивидуальных веществ. Кроме того, масс-спектрометр – это наиболее чувствительный хроматографический детектор. Чувствительность современных масс-спектрометров достигает нескольких десятков фемтограмм вещества на микролитр растворителя (10^{-10} кг/м^3).

Другой вариант режима сканирования для одностадийных приборов – это так называемый режим SIM (Selected Ion Monitoring) – мониторинг выбранных ионов. Этот режим нужен, чтобы повысить чувствительность прибора по выбранным ионам в тех случаях, когда ведется целевой

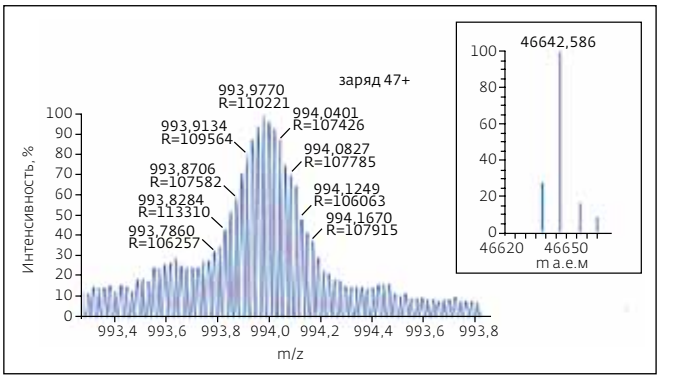

Рис.6. Масс-спектр многозарядного иона. При молекулярной массе вещества почти 47000 а.е.м. его 47-зарядный ион регистрируется на массе m/z 994

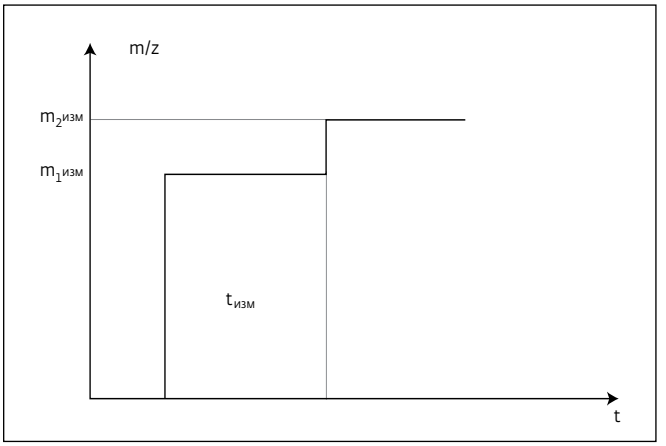

Рис.7. Режим сканирования SIM

анализ, т.е. в пробе ищут только определенные вещества.

Когда масс-спектрометр быстро разворачивает масс-спектр, то время измерений с определенной массой достаточно мало. Так, например, при скорости сканирования 5000 а.е.м./с время измерений диапазона массовых чисел в 1 а.е.м (1 ион) составляет 1/5000 = $2 \cdot 10^{-4}$ с. Если заставить масс-спектрометр сначала "стоять" на измеряемой массе, а затем "прыгать" на следующую измеряемую массу, как это показано на рис.7, то время измерений на выделенных массах можно увеличить на порядки, повысив таким образом чувствительность прибора. Программное обеспечение современных приборов позволяет проводить мониторинг десятков, а то и сотен выбранных ионов в одном эксперименте. Но следует помнить, что чем больше ионов включено в режим SIM, тем ближе этот режим к полному сканированию. Часто измеряемые ионы объединяют в группы, соответствующие ионам искомых веществ, а затем переключают режим работы масс-спектрометра по времени в соответствии с хроматограммой, полученной в режиме полного сканирования. Естественно, такой подход требует наличия стандартов искомых веществ и предварительной отработки хроматографической программы с целью оптимизации разделения смеси и определения времен выхода искомых веществ в режиме полного сканирования.

В современных аналитических лабораториях масс-спектрометр, соединенный с хроматографом, – это рутинный инструмент, на котором проводятся самые разнообразные исследования.

ТАНДЕМНАЯ ИЛИ МНОГОМЕРНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Сегодня наиболее бурно в области масс-спектрометрии развивается так называемая тандемная или многомерная масс-спектрометрия (MC^n, n=2–10) и масс-спектрометрия высокого разрешения, которая позволяет решать более сложные аналитические задачи.

Тандемный масс-спектрометр представляет собой два масс-спектрометра, стоящих друг за другом и разделенных камерой соударений, которая может заполняться газом (рис.8). Такой масс-спектрометр выделяет заданный ион, называемый обычно ионом-предшественником, при помощи первого масс-анализатора Q1. Далее этот ион подвергают соударениям с молекулами газа (обычно аргон), который заполняет ячейку соударений Q2. Можно варьировать энергию и частоту соударений за счет изменения давления газа в камере столкновений Образовавшиеся осколки, называемые ионами-продуктами, попадают во второй масс-анализатор Q3, с помощью которого устанавливают, из каких фрагментов состоит ион и определяют его структуру. Такая конструкция дает возможность резко повысить избирательность прибора и увеличить соотношение сигнал-шум, особенно в случае анализа сложных матриц

Другой вариант тандемной или многомерной масс-спектрометрии реализуется в масс-спектрометре с одним масс-анализатором, но процессы выделения иона, его разбиения и регистрации осколков разделены во времени. Это происходит в масс-анализаторах типа ионная ловушка. Ионная ловушка накапливает в себе ионы, затем выбрасывает все ионы кроме одного, оставшийся ион подвергают соударениям с газом, заполняющим ловушку. На конечном этапе про-

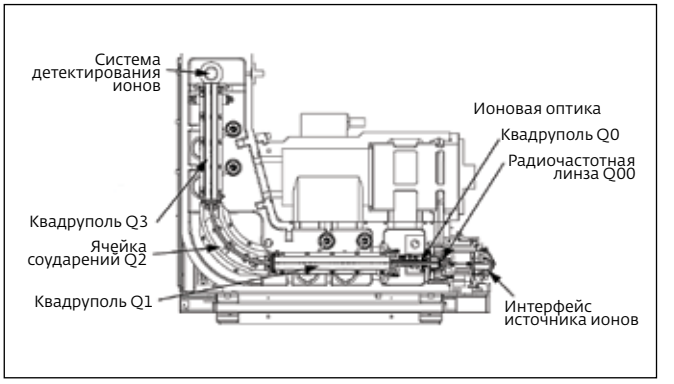

Рис.8. Схема тройного квадрупольного масс-спектрометра

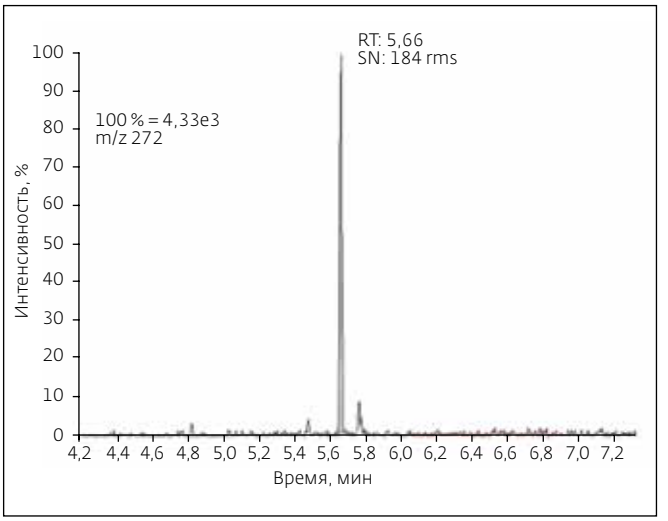

Рис.9. Масс-хроматограмма по m/z 272, полученная при введении в колонку 1 пг октофторнафталина

водят анализ осколков. Причем этот процесс может быть повторен и для осколков, т.е. из всех осколков выделяют один, его подвергают соударениям и т.д. Таким образом получается многомерная масс-спектрометрия MC^n.

ЗАЧЕМ ЖЕ НУЖНА ТАНДЕМНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ИЛИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ?

Среди различных фирм-производителей развернулась "гонка" формальных параметров чувствительности одиночных квадрупольных хромато-масс-спектрометров. Под чувствительностью, как правило, понимается соотношение сигнал-шум, полученное при вводе в колонку определенного количества вещества – стандарта. Как правило, все фирмы-производители используют в качестве стандарта 1 пг октофторнафталина. За 10 лет соотношение сигнал-шум для этого стандарта увеличилось примерно с 100:1 до 800:1. Попробуем показать, что увеличение этой формальной чувствительности не имеет смысла, а для детектирования действительно малых количеств вещества необходимо применять тандемную масс-спектрометрию или масс-спектрометрию высокого разрешения.

Проблема состоит в том, что в приборе всегда существует "химический шум", связанный с матрицей или прибором. Это могут быть

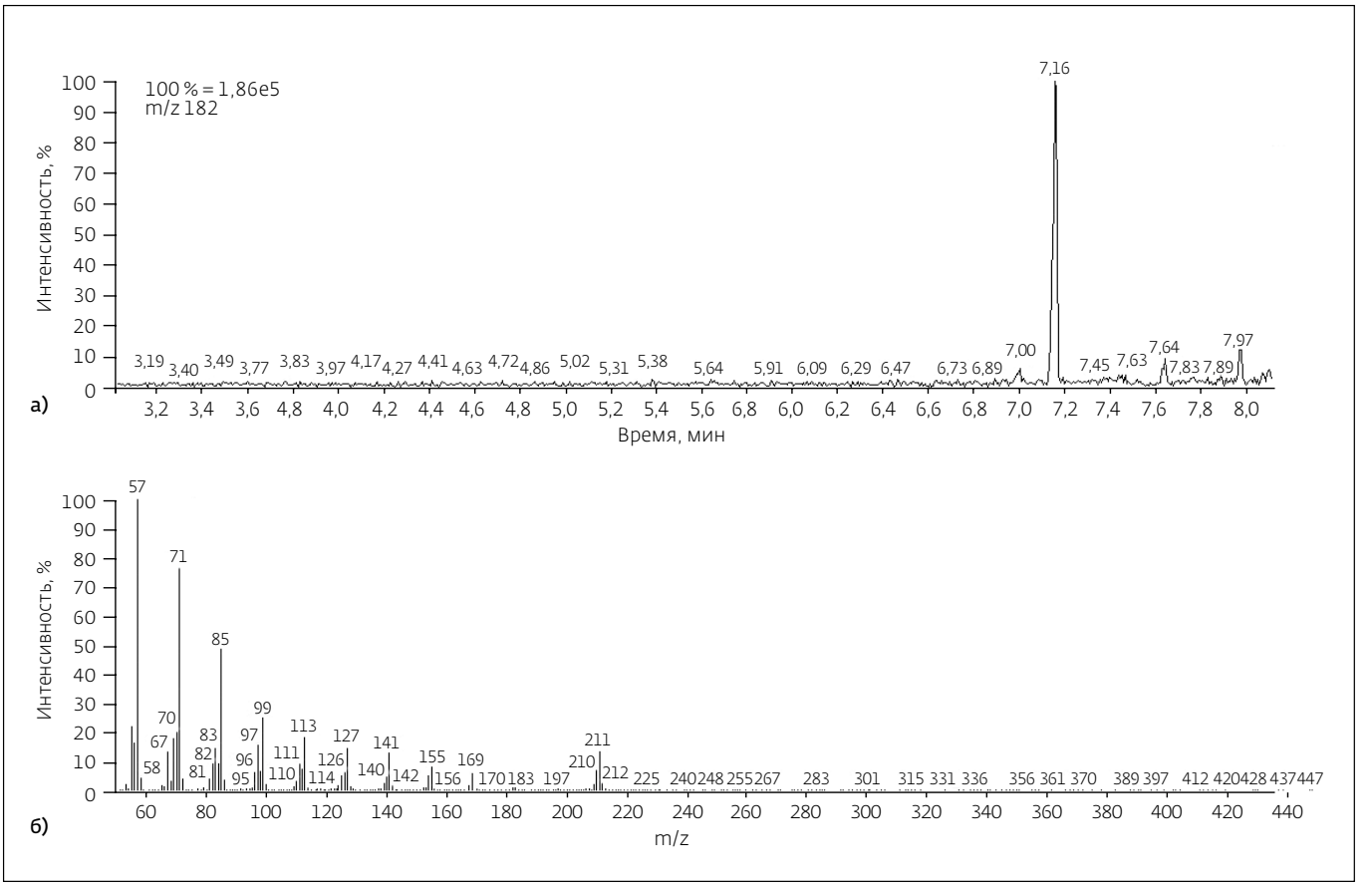

Рис.10. Масс-хроматограмма по м/z 182, полученная при введении в колонку 10 пг бензофенона:
а – хроматограмма; б – масс-спектр пика со временем удержания 7,16 мин

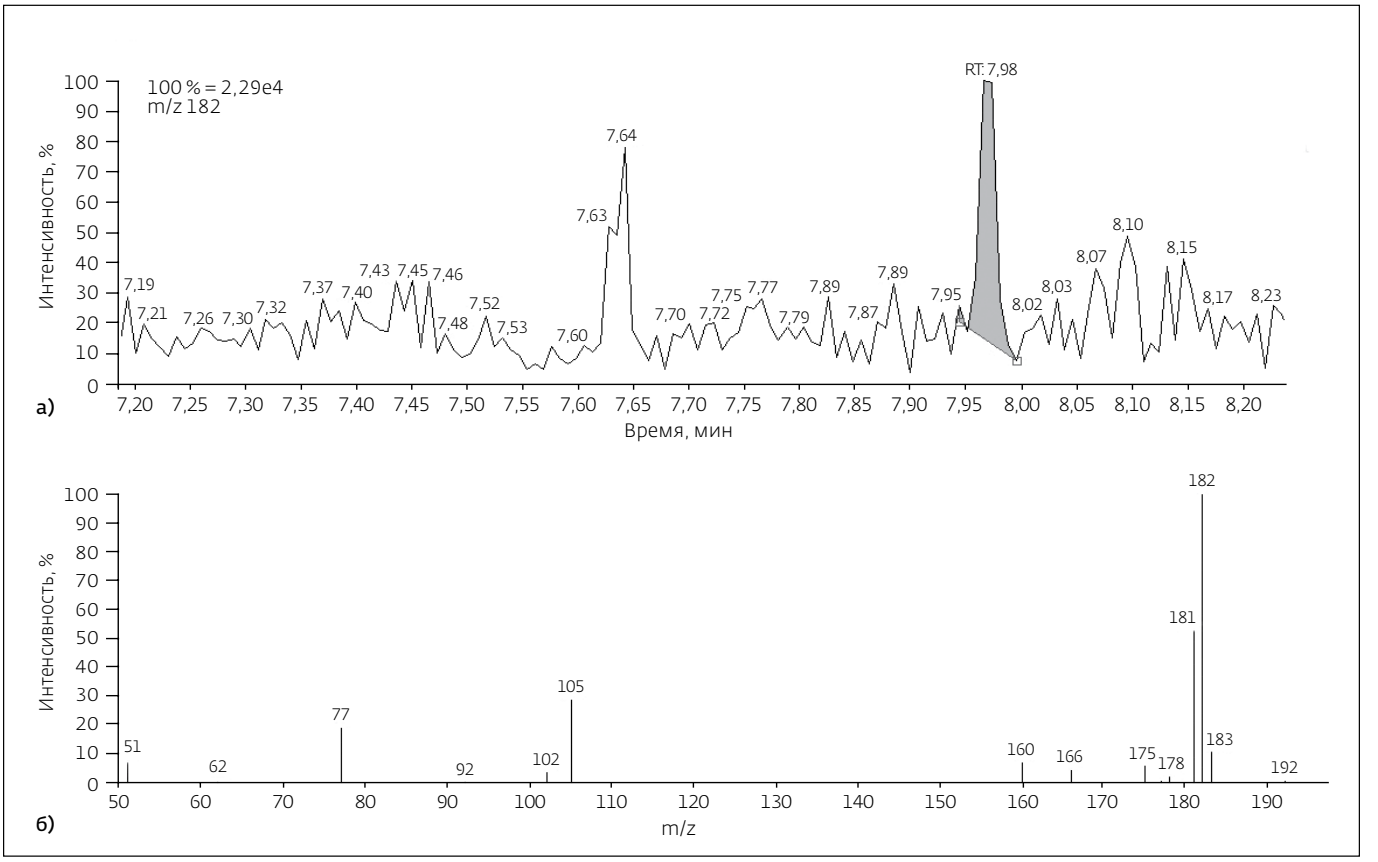

Рис.11. Хроматографический пик бензофенона на масс-хроматограмме с m/z 182

вещества, которые непрерывно элюируются из колонки, интенсивные, плохо разделенные хроматографические пики матрицы, ионы, образовавшиеся за счет ионизации паров веществ, попавших в масс-спектрометр в процессе предыдущих анализов и т.д. Попробуем проиллюстрировать влияние матрицы следующим примером.

Все эксперименты проводились на хромато-масс-спектрометре Polaris Q с масс-анализатором типа ионная ловушка и хроматографом Trace GC Ultra производства компании Thermo Electron (ныне Thermo Scientific).

На рис.9 приведена масс-хроматограмма m/z 272, полученная при вводе в хроматографическую колонку 1 пг чистого стандарта октофторнафталина. Октофторнафталин дает интенсивный пик на масс-хроматограмме, соотношение сигнал-шум при этом составляет порядка 200:1. Сам масс-анализатор работает в режиме полного сканирования в диапазоне 50–450 а.е.м. Теперь введем в хроматограф 10 пг вещества бензофенон, но для приготовления пробы воспользуемся достаточно концентрированным стандартом бензофенона (100 нг/мкл), разбавив его в 10000 раз гексаном марки Ч, который будет имитировать сложную матрицу. Основываясь на результатах, полученных в предыдущем эксперименте, можно ожидать, что бензофенон с молекулярной массой 182 и достаточно интенсивным (около 40%) пиком молекулярного иона будет легко обнаружен при построении масс-хроматограммы по m/z 182. Однако рассмотрение масс-хроматограммы, построенной по m/z 182, не дает однозначного ответа о наличии хроматографического пика бензофенона (рис.10а). Максимальный по интенсивности пик со временем выхода 7,16 мин не является, как свидетельствует его масс-спектр (рис.10б), пиком бензофенона. После очень тщательного и достаточно кропотливого рассмотрения масс-хроматограммы удалось найти пик бензофенона – это пик со временем выхода 7,97 мин (рис.11).

Интересно сравнить эти результаты с результатами, полученными при вводе в колонку 1 пг октофторнафталина. Абсолютная интенсивность сигнала увеличилась примерно в пять раз, что соответствует изменению концентрации. Следует учитывать, что доля молекулярного иона в масс-спектре октофторнафталина примерно в два раза больше, чем в спектре

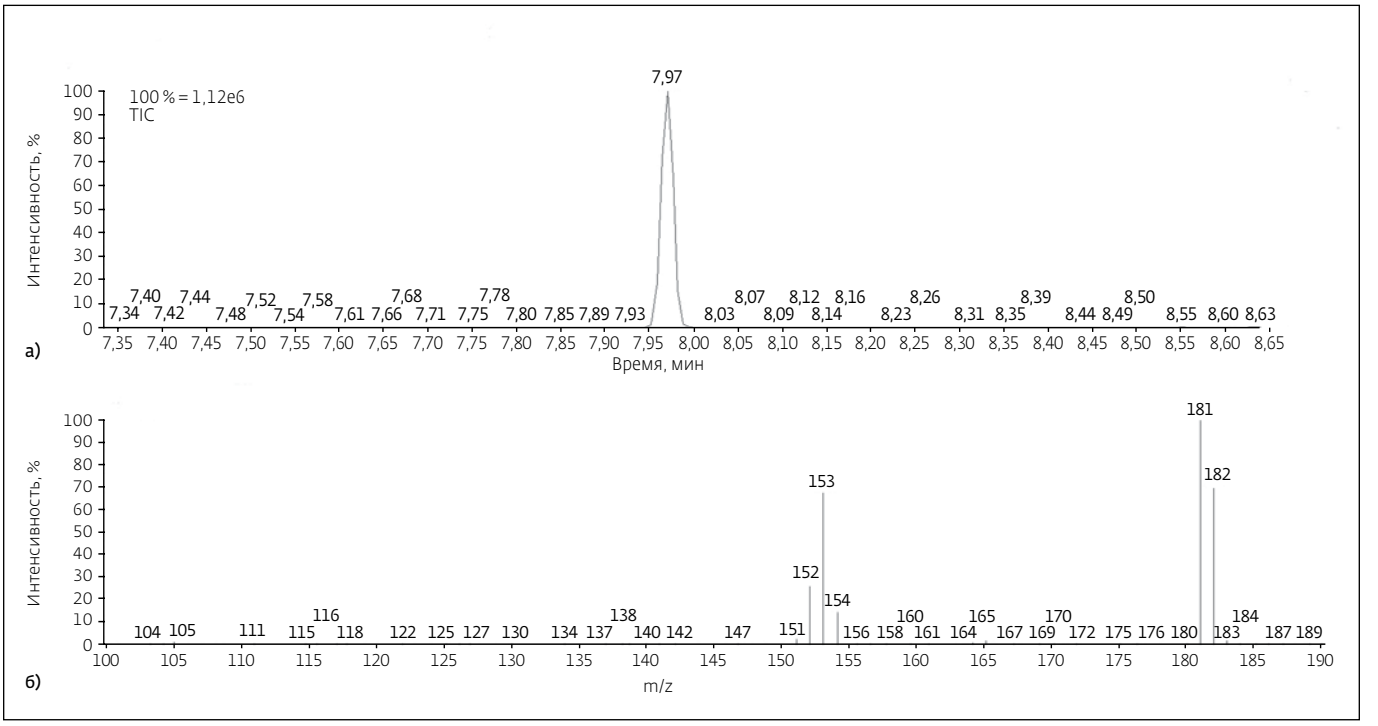

Рис.12. Хроматограмма (а) и масс-спектр (б) бензофенона, полученные в режиме МС/МС

бензофенона. Однако соотношение сигнал-шум упало примерно в 40 раз.

Из этого примера видно, что декларируемое ныне многими производителями увеличение абсолютной чувствительности прибора или формального соотношения сигнал-шум при вводе в хроматограф определенного количества сверхчистых стандартов не имеет смысла. В случае анализа более или менее сложной матрицы увеличение чувствительности приведет лишь к масштабированию по оси Y.

Итак, для повышения отношения сигнал-шум необходимо увеличение избирательности прибора. Один из таких способов состоит в применении метода тандемной масс-спектрометрии. Дело в том, что ионы, различающиеся по химическому составу, имеют различные ионы-продукты. Выделяя ион искомого вещества в первой стадии МС/МС, во второй стадии контролируют характерные для иона-предшественника ионы-продукты, которые достаточно специфичны. Здесь опять необходимы стандарты исследуемых веществ в достаточно высокой концентрации. Используя эти стандарты, мы можем определить времена выхода исследуемых веществ, выбрать ионы-продукты, по которым будет проводиться идентификация веществ, а также подобрать наилучшие условия (энергия соударений, давление в камере соударений) МС/МС-эксперимента. В некоторых приборах, например TSQ8000, эти процедуры могут быть выполнены без участия оператора (AutoSRM).

В качестве стандарта мы взяли раствор бензофенона в гексане с достаточно высокой концентрацией (1 нг/мкл) и провели подбор условий эксперимента (энергии соударений и выбор ионов-продуктов), используя эту концентрацию. На рис.12 приведена хроматограмма образца бензофенона с концентрацией 1 нг/мкл, полученная в режиме МС/МС с выделением в качестве иона-предшественника молекулярного иона бензофенона (m/z 182). сканирование ионов-продуктов проводилось в диапазоне 100–190 а.е.м. Как видно из рис.12, характерный ион – это ион-продукт с m/z 153. В экспериментах МС/МС также часто применяется режим сканирования, аналогичный режиму SIM, но только для ионов-продуктов. Режим работы, когда на первой стадии выделяется характерный ион искомого вещества, а затем контролируются только несколько тоже характерных продуктов распада, называется SRM (selected reaction monitoring) или MRM (multiple reaction monitoring). После выбора условий SRM-эксперимента введем в прибор 1 пг бензофенона. Полученная хроматограмма представлена на рис.13а. Интересно сравнить результаты, полученные в режимах SRM (см. рис.13а) и полного сканирования (рис.13б). Видно существенное увеличение отношения сигнал-шум в

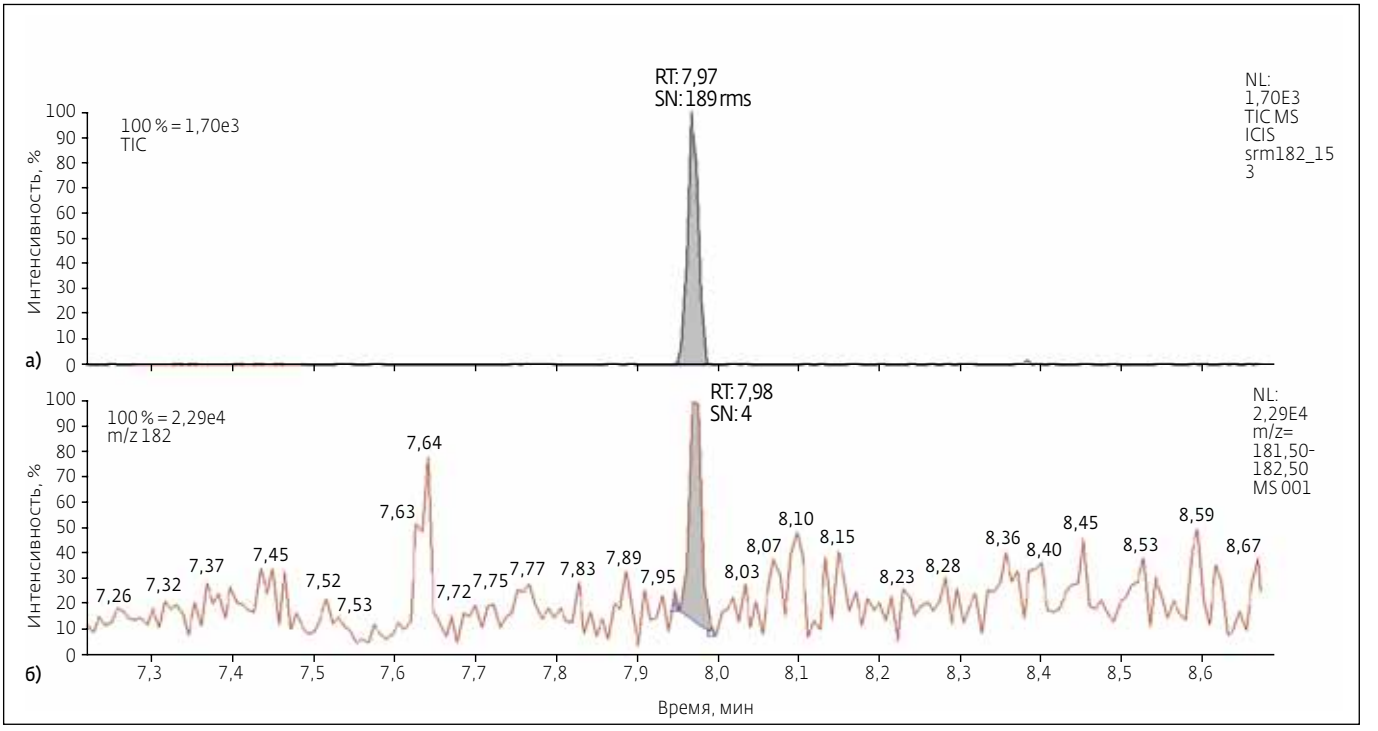

Рис.13. Хроматограмма, полученная при введении хроматографа 1 пг бензофенона в режиме сканирования SRM (а); масс-хроматограмма по m/z 182 в режиме полного сканирования, полученная при введении в хроматограф 10 пг бензофенона (б)

режиме SRM, хотя концентрация вещества была в 10 раз ниже (1 пг/мкл), чем в режиме полного сканирования.

Благодаря высокой скорости работы современных приборов легко очень быстро перейти от выделения одного иона к выделению другого и от регистрации одного набора ионов-продуктов к другому. Поэтому в одной хроматограмме можно определять несколько десятков, а то и сотен веществ. Например, в [2] продемонстрировано одновременное определение 20 кортикостероидов, а в [3] – одновременное определение 250 пестицидов в апельсиновом масле.

ВЫСОКОЕ РАЗРЕШЕНИЕ

Другой способ повысить избирательность прибора заключается в увеличении его разрешающей способности. Под разрешающей способностью понимается способность масс-спектрометра разделять ионы с близкими массами и определяется по формуле:

$$R=m/\Delta m.$$

Существует два способа определения разрешающей способности, отличающихся высотой, на которой проводится измерение ширины пика. Для магнитных приборов определение ширины пика проводится на высоте 5% от максимальной интенсивности пика (рис.14а), для квадрупольных масс-спектрометров – на полувысоте пика (рис.14б).

Подавляющее большинство приборов для органического анализа – это приборы низкого разрешения. Они могут разделять ионы с массами, отличающимися на 1 а.е.м. Если величина Δm составляет 1 а.е.м. во всем диапазоне масс, то говорят, что прибор обладает единичным разрешением. Легко рассчитать, что для массы 500 а.е.м. разрешающая способность составляет 500. Однако

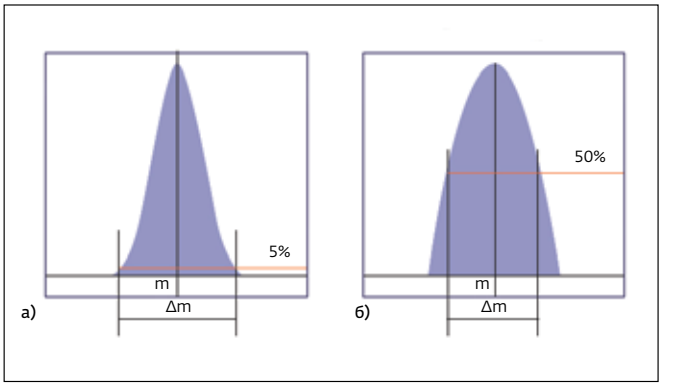

Рис.14. Определение разрешающей способности

для решения наиболее сложных задач применяются приборы высокого разрешения с разрешающей способностью в десятки тысяч.

ЗАЧЕМ НУЖНА ВЫСОКАЯ РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ?

Прежде всего, высокая разрешающая способность нужна для разделения ионов с близкими массами. Дело в том, что когда говорят о ионах (или молекулах) с какой-то массой, то, как правило, имеется в виду так называемая номинальная масса, которая представляет собой ближайшее целое число к точной массе молекулы. Из всех химических элементов только изотоп углерода с массой 12 а.е.м. имеет по определению массу 12,000. Все остальные изотопы элементов имеют точные массы, отличающиеся от целого числа. Поэтому точная масса иона, выраженная как сумма масс составляющих его изотопов элементов, всегда будет отличаться от целого числа и для ионов с различным химическим составом будет различной.

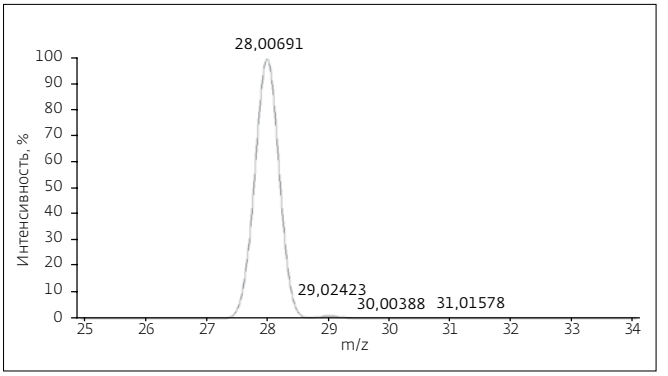

Рис.15. Пик с массой 28 в режиме низкого разрешения

Рассмотрим самый простой случай. Всегда в масс-спектре электронного удара присутствует пик с массой 28 а.е.м., который обычно приписывают иону N_2^+ . В случае единичного разрешения этот ион выглядит как единичный пик (рис.15). Однако при повышении разрешающей способности до 3500 этот пик распадается на триплет, показывающий, что на самом деле в газовой фазе присутствуют также CO^+ и $C_2H_4^+$ (рис.16).

Из приведенных рисунков видно, что возможны случаи, когда искомое вещество закрыто фоновым пиком или вследствие неразделенности пиков проведена неправильная интерпретация анализа. Проиллюстрируем это еще одним примером, касающимся анализа пестицидов [4].

В смеси пестицидов присутствуют два вещества: parathion ($C_{10}H_{14}NO_5PS$) и thiamethoxam

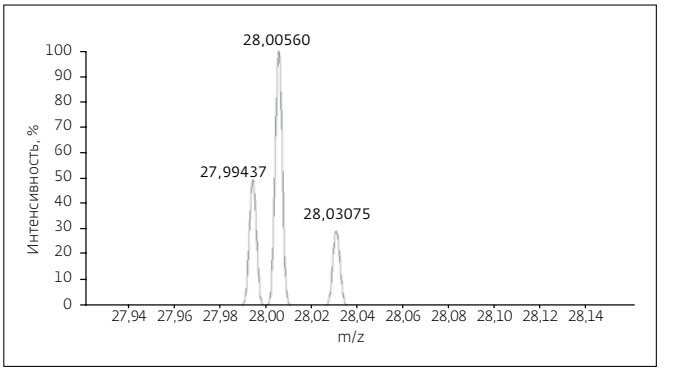

Рис.16. Пик с массой 28 при разрешающей способности 3500

($C_8H_{10}ClN_5O_3S$). Оба вещества имеют номинальную массу протонированного иона 292 а.е.м., но различные точные массы 292,04030 и 292,02653 а.е.м., соответственно. При низком разрешении в масс-спектре имеется один пик с массой 292 и разделить оба этих вещества невозможно (рис.17).

При увеличении разрешающей способности до 25000 уже видно, что в масс-спектральном пике с массой 292 присутствуют два вещества, однако разделить их еще невозможно (рис.18). И только при разрешающей способности свыше 50000 пики разделяются и можно отдельно анализировать каждое из веществ (рис.19).

Таким образом, применение высокого разрешения позволяет либо отсечь "химический шум", либо выделить искомое вещество в сложной хроматограмме. Благодаря прибору высокого разрешения обнаружено и проанализировано более 350 пестицидов в образцах меда [4].

К сожалению, приборы высокого разрешения или с применением тандемной масс-спектрометрии существенно дороже обычных приборов. Однако при решении сложных анали-

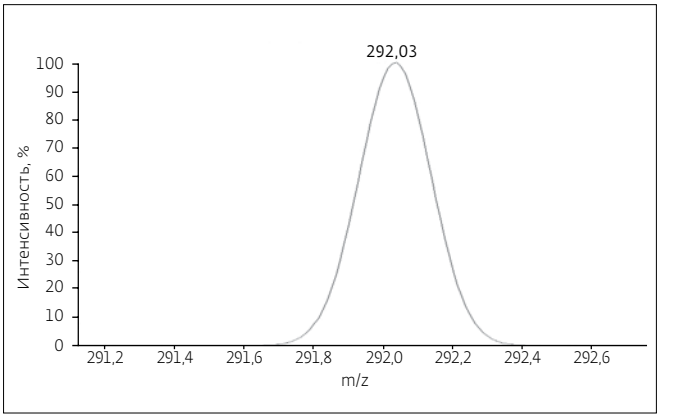

Рис.17. Масс-спектр низкого разрешения. Оба вещества слились в один пик

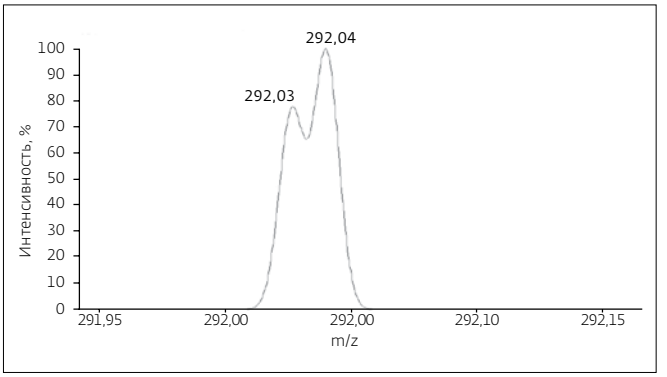

Рис.18. Масс-спектр при разрешающей способности 25000

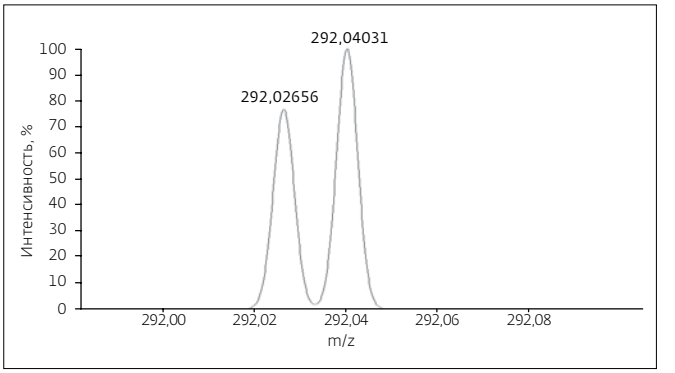

Рис.19. Масс-спектр при разрешении 55000

тических задач возрастают требования к чувствительности оборудования и достоверности анализа. Поэтому такие приборы востребованы на рынке, а доля их в общей массе масс-спектрометрического оборудования неуклонно растет.

В статье изложены только основные, да и то далеко не все, принципы работы масс-спектрометров для органического анализа. За пределами этой статьи остались принципы работы различных источников ионизации, преимущества и недостатки различных типов масс-анализаторов, работа с прямым вводом вещества в источник ионизации и т.д. Все это станет предметом дальнейших публикаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Лебедев А.** Масс-спектрометрия в органической химии. – М: Бином. Лаборатория знаний, 2003.
2. **Дикунец М., Апполонова С., Родченков Г.** Определение эндогенных и экзогенных глюкокортикостероидов методом ВЭЖХ-МС в моче человека. – Химико-фармацевтический журнал, 2010, т.44, №6, с.43–46.
3. Screening for 250 Pesticides in Orange Oil and Ginseng Extract by LC-MS/MS Using TraceFinder Software Charles T. Yang, Dipankar Ghosh, Jonathan Beck, Jamie K. Humphries, Kristi Akervik, Kevin J. McHale, Christine Gu Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA.
4. **Gómez-Pérez M., Plaza-Bolaños R., Romero-González R., Martínez-Vidal J., Garrido-Frenich A.** Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. – Journal of Chromatography A, 2012, v.1248, p.130–138.

НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА "ТЕХНОСФЕРА"

Цена: 1300 р.

ПРОСВЕЧИВАЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И ДИФРАКТОМЕТРИЯ МАТЕРИАЛОВ
Фульц Б., Хау Дж. М.
Москва: Техносфера, 2011. – 904 с. ISBN 978-5-94836-291-5

В третьем издании книги представлены новые достижения в области микроскопии и экспериментальных методов дифракции. Новое издание увеличилось на одну главу. Внесены существенные изменения в главы 1, 3, 7, 8 и 9.
Книга представляет интерес для ученых, инженеров и преподавателей высшей школы, аспирантов и студентов профильных вузов.

КАК ЗАКАЗАТЬ НАШИ КНИГИ?
✉ 125319 Москва, а/я 594; 🖷 (495) 956-3346, 234-0110; knigi@technosphera.ru, sales@technosphera.ru