

УДК 543.51

ДЕРИВАТИЗАЦИЯ ИОНОВ В УСЛОВИЯХ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИИ/ИОНИЗАЦИИ, АКТИВИРУЕМОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ

© 2019 г. А. А. Гречников¹, *, А. С. Бородков¹, С. М. Никифоров²

¹Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук
119991 Россия, Москва, ул. Косыгина, 19

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук
119991 Россия, Москва, ул. Вавилова, 38

*E-mail: grechnikov@geokhi.ru

Поступила в редакцию 19.03.2017 г.

После доработки 20.09.2018 г.

Принята к публикации 20.09.2018 г.

Предложен способ химической модификации (derivatизации) ионов, полученных методом лазерной десорбции/ионизации, активируемой поверхностью (SALDI). Дериватизация основана на взаимодействии десорбированных ионов с молекулами спиртов. Способ отличается простотой, не влияет на продолжительность анализа и позволяет улучшить аналитические характеристики метода SALDI при проведении анализа в условиях интерференции пиков и при сильной фрагментации ионов аналита. Эффективность способа продемонстрирована при определении кофеина, пирролидина и дифенилгидрамина в условиях нанесения пробы при атмосферном давлении.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, лазерная десорбция/ионизация, активируемая поверхность, модификация ионов, определение органических соединений.

DOI: 10.1134/S0044450219030058

Метод лазерной десорбции/ионизации, активируемой поверхностью, (метод SALDI) основан на использовании наночастиц или специально приготовленных подложек, хорошо поглощающих лазерное излучение, в качестве средства для ионизации органических соединений [1]. В рамках метода анализируемую пробу наносят на поверхность подложки. Затем на подложку фокусируют излучение импульсного лазера, воздействие которого инициирует процессы ионизации и десорбции ионов в газовую фазу. Образующиеся ионы детектируются в масс-анализаторе. В качестве подложек широкое применение находят нанокристаллические кремниевые материалы, которые могут быть получены различными методами, в частности, химическим и электрохимическим травлением [2–4], плазмохимическим осаждением из газовой фазы [5], электронно-лучевым испарением [6], радиочастотным распылением [2], лазерной обработкой [7, 8]. Ионизация в SALDI основана на протонировании молекул аналита на поверхности подложки, поэтому этот метод успешно применяют для определения основных соединений. В частности, на кремниевых подложках эффективно ионизируются только соединения с величинами основности в газовой фазе, превышающими 820 кДж/моль [9].

Важная особенность SALDI, которая отличает этот метод от таких традиционных методов, как электронная или химическая ионизация, заключается в том, что в условиях лазерной десорбции/ионизации молекулы аналита сорбируются на активной поверхности подложки и в случае соединений, имеющих значительную энергию связи с поверхностью, могут находиться на ней длительное время. Это позволяет разделить процессы сорбции и лазерной десорбции/ионизации в пространстве и наносить аналиты на подложку из раствора или из газовой фазы при атмосферном давлении. Вместе с тем, активированная лазерным излучением поверхность нанокристаллического кремния является эффективным сорбентом, поэтому масс-спектры, зарегистрированные в условиях нанесения пробы на воздухе, характеризуются высокими значениями фоновых сигналов, которые создаются ионами присутствующих в атмосфере воздуха органических соединений. При использовании масс-анализатора с относительно низкой разрешающей способностью такая ситуация часто приводит к проблеме однозначной идентификации определяемых соединений вследствие интерференции пиков целевого и мешающих компонентов пробы. В ряде случаев идентификацию затрудняет также сильная фраг-

ментация ионов аналитов и соответственно низкая интенсивность ионов протонированных молекул, характеризующих массу соединения. Для увеличения термостабильности в масс-спектрометрии достаточно давно и широко используют химическую модификацию (дериватизацию) определяемого соединения на стадии пробоподготовки [10], однако это заметно усложняет анализ и увеличивает его продолжительность.

В данной работе предложен простой способ, позволяющий увеличить надежность и достоверность идентификации химических соединений при их определении методом SALDI. Способ основан на взаимодействии десорбированных лазерным излучением ионов с молекулами спиртов, введенных в ионный источник масс-анализатора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Схема масс-спектрометрической установки детально описана в работе [11]. Установка включает в себя времяпролетный масс-спектрометр, систему транспортировки подложек из области атмосферного давления в вакуумную камеру масс-спектрометра, оптическую систему и систему регистрации и обработки масс-спектрометрических данных. Времяпролетный масс-спектрометр собран по линейной бессеточной схеме с длиной свободного пролета 0.6 м. Для ускорения и фокусировки ионов использовали систему линз и лайнер, что обеспечивало близкий к 100% коэффициент пропускания масс-спектрометра. В качестве детектора ионов применяли вторично-электронный умножитель (ETP Pty Ltd., Австралия, модель 14882) с временным разрешением 2 нс. Установка оборудована системой регулируемой подачи паров жидкостей, включающей прогреваемый капилляр, регулятор потока газа и источник паров, расположенный вне прибора.

Система транспортировки SALDI подложек из области атмосферного давления в масс-анализатор выполнена в виде вакуумно плотного металлического шара с симметрично установленными в его углублениях подложками. Одна из подложек находится вне масс-спектрометра, и на нее наносят пробу. В это же время противоположная ей подложка находится в ионном источнике, облучается лазерным излучением, а десорбированные ионы детектируются. После завершения анализа шар поворачивается на 180°, и процесс повторяется.

Для лазерной десорбции/ионизации использовали излучение третьей гармоники (длина волны 355 нм) Nd:YAG лазера с диодной накачкой (РЛ-02.355 производства ЭЛС-94, Москва), работающего с частотой повторения 300 Гц при длительности импульса 0.35 нс и максимальной

энергией в импульсе 35 мкДж. Энергию лазерного излучения на поверхности регулировали в широком диапазоне с помощью аттенюатора. Для увеличения площади облучаемой поверхности использовали двужеркальное электромеханическое устройство сканирования лазерного луча (УСЛ-03, ИМКЭС СО РАН, Томск), разворачивающее луч в кадр размером 2×1 мм².

Подложки. Для воспроизводимого получения подложек для лазерной десорбции/ионизации использовали способ, основанный на обработке лазерным излучением пластин монокристаллического кремния в вакуумной камере масс-спектрометра [7]. Способ включает две последовательных стадии. На первой стадии подложка обрабатывается излучением с интенсивностью, превышающей порог плавления кремния, в течение 20 с (примерно 20 лазерных импульсов в одну и ту же область поверхности). Затем обработанный материал подвергают повторному воздействию излучением с интенсивностью, меньшей порога плавления кремния, в присутствии паров воды (при давлении 10^{-6} мм. рт. ст.) в течение 300 с. В результате формируется сильно разупорядоченный нанокристаллический слой с высокой поверхностной плотностью протонодонорных групп.

Реактивы. Дифенгидрамин выделяли из лекарственного препарата (таблетки “Димедрол” производства Дальхимфарм) по следующей методике. Таблетки измельчали и растворяли в дистиллированной воде. Раствор подщелачивали NaOH до сильнощелочной реакции среды, после чего проводили трехкратную экстракцию эфиром (диэтилкетон). После расслоения из растворов отбирали верхний эфирный слой с экстрагированным аналитом. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя. Оставшийся после упаривания осадок растворяли в смеси метанол–вода (1 : 1).

Остальные соединения получали коммерчески и использовали без дальнейшей очистки. Метанол и этанол х. ч. вводили в ионный источник масс-спектрометра с использованием систем регулируемой подачи паров жидкостей. Определяемые соединения наносили на кремниевую подложку при атмосферном давлении путем электро-распыления растворов аналита [11] или создавая поток воздуха, содержащего пары аналита известной концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты предварительных исследований показали, что ввод в ионный источник паров растворителей или других органических соединений в процессе лазерной десорбции/ионизации приводит к изменению масс-спектров аналитов, обу-

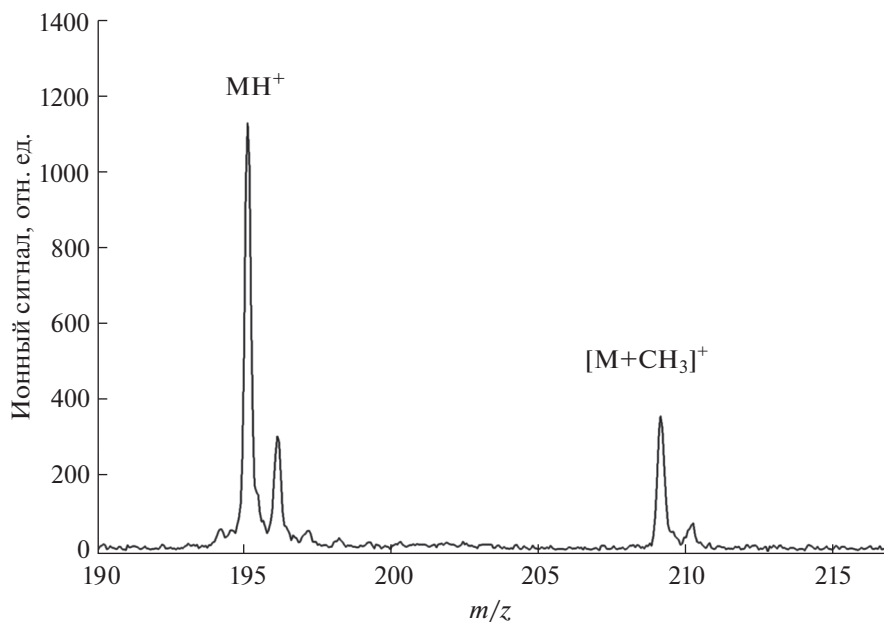
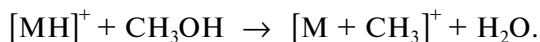


Рис. 1. Масс-спектр кофеина, зарегистрированный после подачи метанола в ионный источник лазерной десорбции/ионизации. Давление паров метанола 10^{-5} мм. рт. ст.

словленному взаимодействию десорбированных ионов с молекулами введенного в прибор соединения. В результате реакции в масс-анализатор попадают ионы, характеризующие аналит, но имеющие другую массу. В качестве примера на рис. 1 приведен масс-спектр кофеина, зарегистрированный при вводе в прибор паров метанола. На кремниевых материалах в условиях SALDI кофеин ионизуется с образованием протонированных молекул с отношением массы к заряду m/z 195 [12]. Из рис. 1 видно, что при подаче в ионный источник CH_3OH в масс-спектре появляется новый пик относительно высокой интенсивности с m/z 209, который может быть идентифицирован как соответствующий ионам соединения $[\text{M} + \text{CH}_3]^+$. Подтверждением этому может служить тот факт, что замена CH_3OH на дейтерированный метанол CD_3OD приводит к смещению пика с m/z 209 до m/z 212 с образованием ионов состава $[\text{M} + \text{CD}_3]^+$. Взаимодействие протонированных молекул аналита $(\text{MH})^+$ с молекулами метанола можно описать реакцией метилирования:



Для химической модификации ионов могут быть использованы и другие реакции и реагенты. Например, метилирование ряда соединений происходит также при вводе в прибор паров ацетонитрила. В данной статье рассмотрено применение для дериватизации ионов аналита спиртов.

С целью выбора оптимальных условий анализа на предварительном этапе изучали влияние дав-

ления паров спиртов. Реакция метилирования протекает, по-видимому, в начальный момент десорбции в облаке десорбированных частиц, которое имеет высокую плотность [12]. Очевидно, что увеличение потока реагента в ионный источник увеличивает вероятность его взаимодействия с десорбированными ионами вследствие увеличения числа столкновений в единицу времени и, следовательно, увеличивает выход реакции. С другой стороны, рост давления ухудшает качество масс-спектров. Для использованной в работе экспериментальной установки лучшие результаты получены при давлении спиртов в ионном источнике порядка 10^{-5} мм. рт. ст. В ходе анализа поток реагента поддерживали постоянным.

В результате взаимодействия десорбированных лазерным излучением с подложки ионов с введенными в прибор молекулами реагента образуются ионы, имеющие другое значение отношения m/z по сравнению с протонированными молекулами аналита и обладающие иными химическими свойствами. Этот эффект может быть использован для улучшения аналитических характеристик метода SALDI при проведении анализа в условиях интерференции характеристических пиков и при сильной фрагментации ионов аналита.

Рис. 2 иллюстрирует детектирование паров пиролитина в лабораторном воздухе с использованием реакции метилирования. Кремниевую подложку, полученную лазерной обработкой, выводили из вакуумной камеры при помощи шарового устройства и помещали в лабораторный воз-

дух на 5 с. После этого подложку снова перемещали в вакуумную камеру масс-спектрометра и проводили анализ методом SALDI. Зарегистрированный в контрольном опыте масс-спектр приведен на рис. 2а. Видно, что в масс-спектре присутствует ряд пиков, которые могут мешать определению и идентификации аналитов. В частности, в масс-спектре регистрируется пик со значением m/z 72, таким же, как и для протонированных молекул пирролидина, который интерферирует с пиком аналита при использовании масс-анализатора с недостаточно высоким разрешением. Интенсивность пика в контрольном опыте зависит от состояния атмосферы и может меняться во времени, искажая результаты анализа. Из данных рис. 2а также следует, что в области масс-спектра, соответствующей пикам метилированного пирролидина $[M + CH_3]^+$ с m/z 86, отсутствуют пики мешающих компонентов. Как показали дополнительные исследования, большинство пиков на рис. 2а принадлежит фрагментным ионам более тяжелых соединений, в частности, компонентов вакуумного масла. Подача в ионный источник метанола и этанола не приводит к изменению масс-спектра на рис. 2а в области m/z ионов метилированного и этилированного пирролидина, что позволяет использовать пары спиртов для дериватизации ионов этого соединения.

После проведения контрольного опыта подложку вновь выводили из вакуумной камеры и воздействовали в течение 5 с потоком лабораторного воздуха, содержащего пары пирролидина. Затем подложку перемещали в вакуумную камеру и проводили анализ методом SALDI. Для лазерной десорбции/ионизации использовали те же параметры, что и в контрольном опыте, но дополнительно вводили в ионный источник метанол и этанол. Давление, создаваемое парами спиртов, составляло 10^{-5} мм. рт. ст., метанол и этанол брали в равных концентрациях. Полученный масс-спектр приведен на рис. 2б. Видно, что интенсивность пика с m/z 72 возрастает вследствие вклада в ионный сигнал протонированных молекул пирролидина. Кроме того, в масс-спектре регистрируются дополнительно два новых пика, соответствующих метилированным $[M + CH_3]^+$ и этилированным $[M + C_2H_5]^+$ ионам пирролидина. Как отмечено выше, пик $[M + CH_3]^+$ с m/z 86 находится в области масс-спектра, свободной от интерференции. Исследования показали, что при постоянном давлении реагента в вакуумной камере масс-спектрометра выход модифицированных ионов аналита линейно зависит от концентрации введенного в прибор соединения, что позволяет проводить количественный анализ, используя пики этих ионов. Следует также отметить, что величина основности спиртов в газовой фазе существенно ниже 820 кДж/моль [13], поэтому, даже

взятые в избытке, они не дают вклада в фоновый ионный сигнал.

Из данных рис. 2б следует, что для дериватизации ионов может быть использован не только метанол, но и этанол. Варьируя спирт, а также используя изотопно обогащенные реагенты, можно выбирать для детектирования аналита участок в масс-спектре, свободный от интерференционных наложений. Однако, как показали эксперименты, вероятность образования ионов $[M + C_nH_{2n+1}]^+$ при взаимодействии протонированных молекул аналита с молекулами спиртов $C_nH_{2n+1}OH$ быстро уменьшается с ростом n , что ограничивает ряд спиртов, подходящих для дериватизации. На практике целесообразно использовать спирты с $n \leq 4$.

Другим фактором, затрудняющим идентификацию определяемых соединений, является сильная фрагментация молекулярных ионов. Присутствие в масс-спектре пика, характеризующего молекулярную массу химического соединения, важно для правильной идентификации соединения, поскольку позволяет установить его брутто-формулу. В целом сильная фрагментация нетипична для SALDI, однако ряд соединений дают масс-спектры, в которых практически отсутствует пик протонированных молекул. Примером такого соединения служит дифенгидрамин — действующее вещество лекарственного препарата “Димедрол”. Масс-спектр дифенгидрамина приведен на вставке к рис. 3а. Видно, что протонированный дифенгидрамин является нестабильным ионом со степенью фрагментации, превышающей 95%. Использование реакции метилирования позволяет увеличить стабильность ионов, характеризующих молекулярную массу соединения. На рис. 3а, б представлены масс-спектры дифенгидрамина в области протонированных молекул, зарегистрированные до и после подачи в ионный источник метанола. Давление паров метанола составляло 10^{-5} мм. рт. ст. Спектры сняты при одинаковой плотности энергии лазерного излучения и при равных количествах нанесенного на подложку аналита. Масс-спектр на рис. 3а содержит единственный пик с m/z 256, соответствующий протонированным молекулам дифенгидрамина. Интенсивность пика мала и близка к фоновому сигналу, а при меньших концентрациях аналита в пробе пик не регистрируется. Ввод в ионный источник паров метанола приводит к появлению в масс-спектре нового пика с m/z 270, который соответствует ионам метилированного дифенгидрамина и однозначно характеризует молекулярную массу аналита. Интенсивность этого пика превышает фоновый сигнал в 20 раз. Таким образом, применение предложенного способа дериватизации ионов позволяет снизить на порядок величины концентрацию дифенгидрамина,

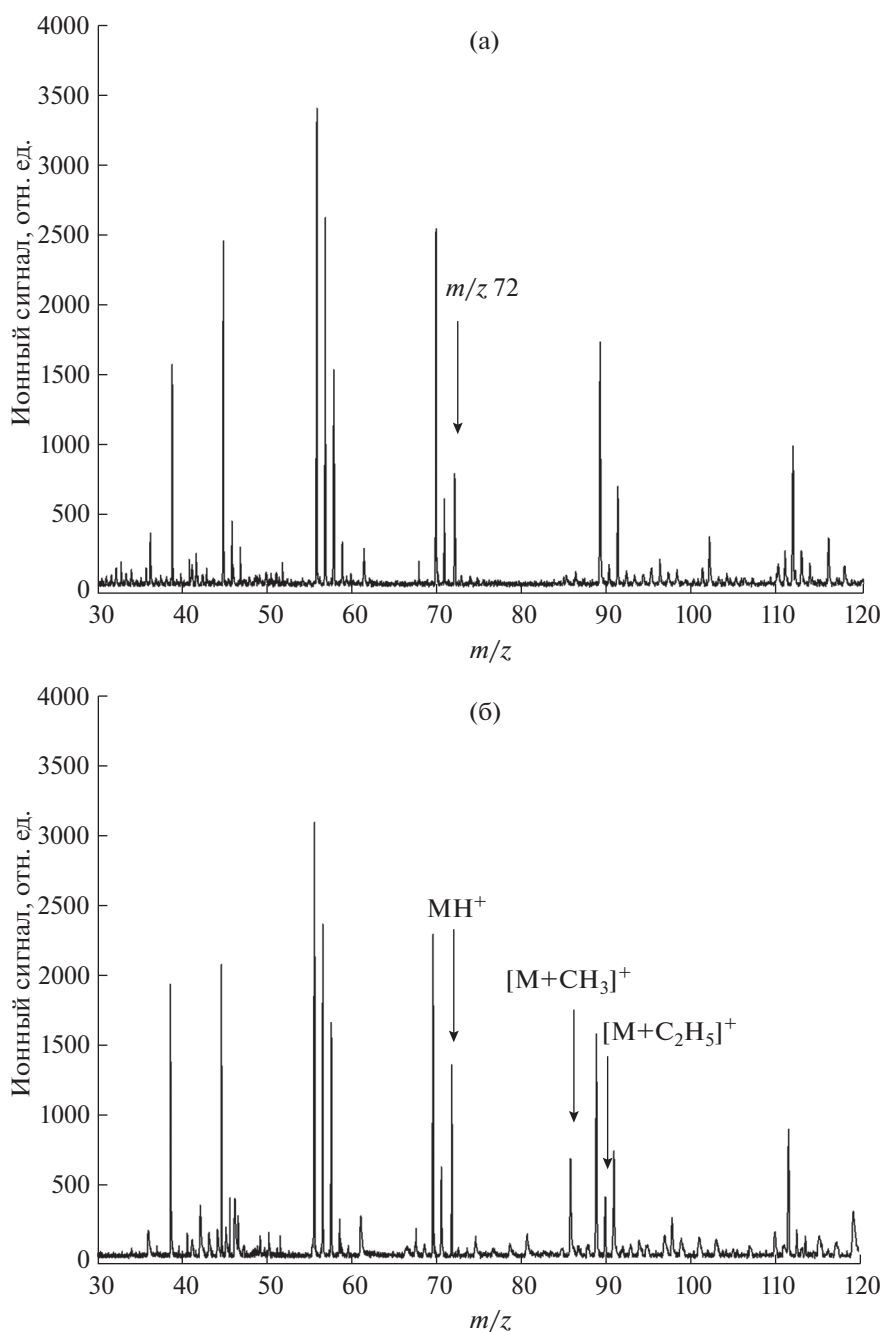


Рис. 2. (а) — Масс-спектр атмосферного воздуха, зарегистрированный в контрольном опыте. (б) — Масс-спектр атмосферного воздуха, содержащего пары пиrolлидина, зарегистрированный при подаче в ионный источник паров метанола и этанола.

при которой еще возможна его надежная идентификация.

Для того чтобы лучше понять причины сильной фрагментации протонированного дифенгидрамина, выполнили квантово-химическое моделирование процесса образования фрагментного иона. В расчетах использовали программный пакет Firefly [14]. Квантово-химические расчеты проводили методом Хартри–Фока с использова-

нием базисного набора 6-311+G**. Согласно полученным результатам, структура дифенгидрамина после присоединения протона стабилизируется путем частичного переноса протона к электроотрицательному атому кислорода (структура иона приведена на рис. 3а). Расстояние между атомами кислорода и водорода в ионе составляет 0.22 нм. Перенос заряда приводит к ослаблению связи C–O и значительному понижению энергии ее диссоци-

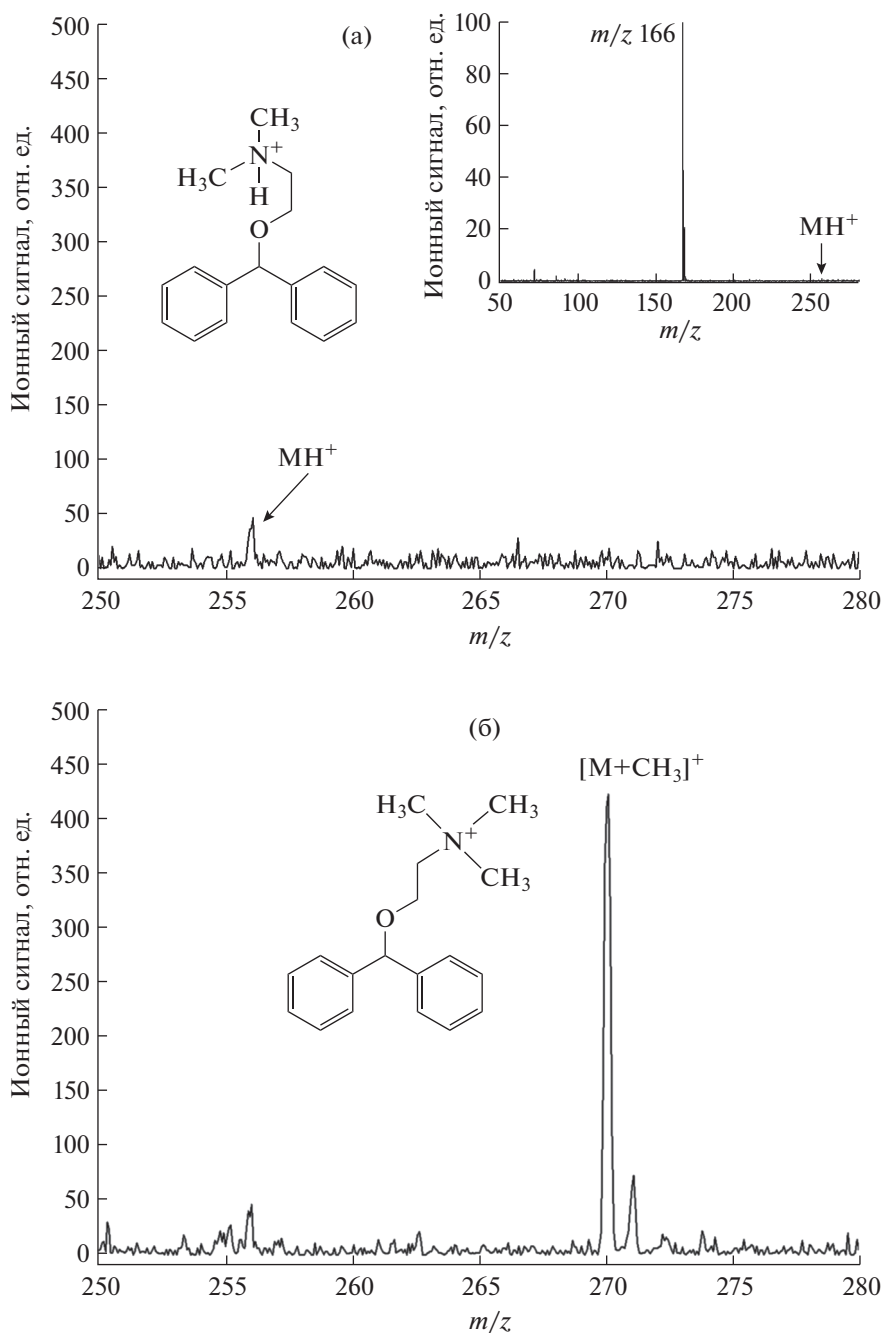


Рис. 3. Масс-спектр дифенгидрамина в области протонированных молекул, зарегистрированный до подачи в ионный источник паров метанола (а); после подачи паров метанола (б). На вставке приведен полный масс-спектр дифенгидрамина.

ации что, в свою очередь, приводит к интенсивной фрагментации с образованием иона с m/z 166. Причиной фрагментации в условиях SALDI является быстрый нагрев поверхности подложки лазерным излучением, который обеспечивает передачу тепловой энергии десорбированным ионам [12, 15].

Ион метилированного дифенгидрамина, образующийся в результате взаимодействия с метано-

лом, является устойчивым соединением. Очевидно, что при замещении атома водорода в протонированной аминогруппе на метильную группу образуется ион, в котором внутримолекулярный перенос водорода уже невозможен (структура иона приведена на рис. 3б). В связи с этим метилирование ионов дифенгидрамина и аналогичных ему соединений обеспечивает их устойчивость.

* * *

Добавление в ионный источник SALDI паров спиртов при давлении 10^{-5} мм. рт. ст. приводит к химической модификации ионов определяемых соединений. В результате в масс-анализатор попадают ионы, характеризующие аналит, но с иной молекулярной массой по сравнению с протонированными молекулами аналита и другими химическими свойствами. Этот эффект использован для улучшения аналитических характеристик метода SALDI в условиях интерференции характеристических пиков и при сильной фрагментации ионов аналита. На примере определения пирролидина и дифенгидрамина показано, что анализ в присутствии паров метанола позволяет избежать наложения пиков аналита и мешающих компонентов, а также уменьшить степень фрагментации неустойчивых ионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray K.K., Boyd R.K., Eberlin M.N., Langley G.J., Li L., Naito Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013) // *Pure Appl. Chem.* 2013. V. 85. № 7. P. 1515.
2. Alimpiev S.S., Grechnikov A.A., Sunner J., Karavanskii V.A., Zhabin S.N., Simanovsky Ya.O., Nikiforov S.M. On the role of defects and surface chemistry for surface-assisted laser desorption/ionization from silicon // *J. Chem. Phys.* 2008. V. 128. № 1. P. 014711.
3. Piret G., Drobecq H., Coffinier Y., Melnyk O., Boukherroub R. Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry on silicon nanowire arrays prepared by chemical etching of crystalline silicon // *Langmuir*. 2009. V. 26. № 2. P. 1354.
4. Tuomikoski S., Huikko K., Grigoros K., Ostman P., Kostianen R., Baumann M., Abian J., Kotiaho T., Franssila S. Preparation of porous n-type silicon sample plates for desorption/ionization on silicon mass spectrometry (DIOS-MS) // *Lab. Chip*. 2002. V. 2. P. 247.
5. Cuiffi J.D., Hayes D.J., Fonash S.J., Brown K.N., Jones A.D. Desorption-ionization mass spectrometry using deposited nanostructured silicon films // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. № 6. P. 1292.
6. Singh R., Bezuidenhout L.W., Jemere A., Wang Z., Brett M., Harrison D.J. Engineering matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry using glancing angle deposition films // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2017. V. 31. № 7. P. 631.
7. Алимпиев С.С., Гречников А.А., Никифоров С.М. Новые подходы в лазерной масс-спектрометрии органических объектов // *Успехи физ. наук*. 2015. Т. 185. С. 207. (Alimpiev S.S., Grechnikov A.A., Nikiforov S.M. New approaches to the laser mass spectrometry of organic samples // *Physics—Uspekhi*. 2015. V. 58. № 2. P. 191.)
8. Chen Y., Vertes A. Adjustable fragmentation in laser desorption/ionization from laser-induced silicon microcolumn arrays // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. № 16. P. 5835.
9. Гречников А.А., Бородавков А.С., Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Симановский Я.О. Основность в газовой фазе — параметр, определяющий эффективность лазерной десорбции-ионизации с кремниевых поверхностей // *Журн. аналит. химии*. 2013. Т. 68. № 1. С. 22. (Grechnikov A.A., Borodkov A.S., Alimpiev S.S., Nikiforov S.M., Simanovsky Ya.O. Gas-phase basicity: Parameter determining the efficiency of laser desorption/ionization from silicon surfaces // *J. Analyt. Chem.* 2013. V. 68. № 1. P. 19.)
10. Anderegg R.J. Derivatization in mass spectrometry: Strategies for controlling fragmentation // *Mass Spectrom. Rev.* 1988. V. 7. № 4. P. 395.
11. Alimpiev S., Grechnikov A., Sunner J., Karavanskii V., Simanovsky Ya., Nikiforov S. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with a rotating ball interface // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011. V. 25. P. 140.
12. Жабин С.Н., Пенто А.В., Гречников А.А., Бородавков А.С., Сартаков С.Б., Никифоров С.М., Алимпиев С.С. Роли лазерного излучения в процессах лазерной десорбции-ионизации с кремниевых поверхностей // *Квантовая электроника*. 2011. Т. 41. № 9. С. 835. (Zhabin S.N., Pento A.V., Grechnikov A.A., Borodkov A.S., Sartakov B.G., Simanovskii Ya.O., Nikiforov S.M., Alimpiev S.S. On the role of laser irradiation in the processes of laser desorption/ionisation from silicon surfaces // *Quantum Electron.* 2011. V. 41. № 9. P. 835.)
13. Hunter E.P., Lias S.G. Proton Affinity Evaluation, NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database / Eds. Linstrom P.J., Mallard W.G. (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 2005). <http://webbook.nist.gov>. (Дата обращения 18.02.018 г.)
14. Granovsky A.A. Firefly version 7.1.G, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>. (Дата обращения 15.01.012 г.)
15. Гречников А.А., Бородавков А.С., Жабин С.Н., Алимпиев С.С. О механизме десорбции ионов в условиях лазерной десорбции/ионизации с кремниевых поверхностей // *Масс-спектрометрия*. 2014. Т. 11. № 2. С. 71. (Grechnikov A.A., Borodkov A.S., Zhabin S.N., Alimpiev S.S. On the mechanism of ion desorption in the process of laser desorption/ionization from silicon surfaces // *J. Analyt. Chem.* 2014. V. 69. № 14. P. 1361.)