

ПРИБОРЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Новые подходы в лазерной масс-спектрометрии органических объектов

С.С. Алимбиев, А.А. Гречников, С.М. Никифоров

Представлены три новых подхода к масс-спектрометрии органических объектов, основанные на мягкой ионизации органических и биоорганических молекул с использованием излучения импульсного лазера.

Ключевые слова: органические соединения, масс-спектрометрия, лазер

PACS numbers: 33.80. – b, 42.62. – b, 81.70. – q

DOI: 10.3367/UFNr.0185.201502f.0207

Содержание

1. Введение (207).
 2. Метод лазерной десорбции – ионизации, активируемой поверхностью (207).
 3. Метод лазерной десорбции – ионизации за счёт переноса электрона (209).
 4. Метод ионизации излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении (210).
 5. Заключение (211).
- Список литературы (212).

1. Введение

Эффективность научных и практических разработок, направленных на решение задач медицинской диагностики, фармакокинетики, молекулярной биологии и других дисциплин, в значительной степени определяется достоверностью и оперативностью их информационного обеспечения. Поэтому разработка новых физико-химических методов высокочувствительного определения и идентификации органических и биоорганических соединений представляется чрезвычайно актуальной. Основной тенденцией в этой области сегодня являются создание и активное использование новых инструментальных методов анализа.

Масс-спектрометрические методы относятся к числу наиболее информативных методов анализа, позволяющих идентифицировать несколько сотен тысяч соедине-

ний, принципиально различающихся по химическим и физическим свойствам. Однако стандартные, хорошо разработанные на сегодняшний день методы ионизации в ряде случаев оказываются малоэффективными для получения ионов и детектирования соединений различных химических классов. В настоящее время именно способ получения ионов становится одним из основных сдерживающих факторов дальнейшего развития масс-спектрометрии органических соединений. Проблема заключается как в недостаточно высокой эффективности ионизации, так и в сложной и трудоёмкой процедуре подготовки пробы. Эти обстоятельства стимулируют развитие новых подходов к масс-спектрометрическому анализу объектов сложного состава. Лазерные методы представляются исключительно перспективными в этом развитии благодаря сочетанию ряда необходимых свойств: большой вероятности ионизации, широкого динамического диапазона, высокого пространственного разрешения, возможности принципиально упростить процедуру подготовки пробы.

В настоящей статье рассматриваются новые подходы к использованию лазерной техники в масс-спектрометрии органических соединений.

2. Метод лазерной десорбции – ионизации, активируемой поверхностью

Первый вариант метода лазерной десорбции – ионизации, активируемой поверхностью (Surface Assisted Laser Desorption/Ionization — SALDI), который был предложен ещё в середине 1990-х годов, основан на использовании суспензий микро- и наночастиц графита в глицерине или воде в качестве средства для лазерной десорбции – ионизации [1, 2]. Воздействие лазерного излучения на такие суспензии, в которые предварительно вводят пептиды или белки, позволяет получать масс-спектры этих соединений. Ключевую роль в процессе ионизации играет развитая поверхность микрочастиц, поэтому метод и получил название SALDI.

С.С. Алимбиев, С.М. Никифоров. Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
ул. Вавилова 38, 119991 Москва, Российская Федерация
E-mail: alimpiev@kapella.gpi.ru

А.А. Гречников. Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН,
ул. Косыгина 19, 119334 Москва, Российская Федерация
E-mail: grechnikov@geokhi.ru

Статья поступила 23 мая 2014 г., после доработки 1 июля 2014 г.

На первом этапе метод SALDI рассматривался как альтернативный методу матрично активированной лазерной десорбции–ионизации (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization — MALDI), и основным импульсом его развития стала проблема высоких фоновых сигналов в методе MALDI. Средством для лазерной десорбции–ионизации соединений в методе MALDI служит матрица, обычно представляющая собой кристаллы органических кислот, хорошо поглощающих лазерное излучение [3]. Относительная концентрация молекул матрицы на несколько порядков величины превышает концентрацию аналита (химического соединения, определяемого при анализе), поэтому ионный сигнал от матрицы затрудняет, а во многих случаях делает недоступным анализ соединений в диапазоне низких масс (примерно до 500 атомных единиц массы (а.е.м.)).

Развитие метода SALDI привело к появлению другого варианта, в котором суспензия микрочастиц была заменена специально приготовленной поверхностью твердотельной подложки — эмиттера ионов. В качестве материала подложки с различным успехом применялись графит [4, 5], пористые оксиды титана и вольфрама [6], оксид цинка [7]. Однако наибольшее распространение нашли кремниевые материалы, среди достоинств которых следует выделить высокую эффективность ионизации, исключительную высокую степень чистоты материала и сравнительную лёгкость его обработки. Последнее особенно важно, поскольку эффективность лазерной десорбции–ионизации молекул на поверхности монокристаллических кремниевых подложек крайне мала [4] и для высокочувствительного анализа необходимо предварительно создать на поверхности активный слой. В ходе развития метода было предложено большое число SALDI-активных слоёв с различной морфологией и структурой, в частности пористый [8] и аморфный [9] кремний и кремниевые нанонити [10].

Сравнительный анализ различных кремниевых материалов в условиях газофазного ввода пробы позволил сделать вывод, что эффективность SALDI определяется химическими и электронными свойствами материала, в том числе плотностью его структурных дефектов и связанных с ними локализованных состояний [9]. На основе анализа основных факторов, определяющих эффективность SALDI, была предложена модель лазерной десорбции–ионизации на кремниевых поверхностях [9], согласно которой основными стадиями процесса SALDI являются следующие:

- лазерная очистка подложки, обеспечивающая десорбцию органических загрязнений с её поверхности;
- формирование поверхностных протонодонорных групп, например, посредством диссоциативной адсорбции молекул воды с образованием на поверхности силанольных SiOH-групп;
- адсорбция молекул определяемых химических соединений на поверхностных протонодонорных группах;
- фотогенерация неравновесных носителей заряда, их разделение в условиях высокой плотности структурных дефектов и локализация дырок вблизи поверхностных протонодонорных групп;
- протонирование адсорбированных молекул. Как показали квантово-химические расчёты, локализация положительного заряда снижает энергетический барьер реакции передачи протона от поверхностных SiOH-групп на величину порядка 4 эВ, обеспечивая тем самым эф-

фективный перенос протона к адсорбированным на них молекулам;

— десорбция ионов. Согласно результатам, полученным в работе [10], десорбция протекает по тепловому механизму и она обусловлена быстрым локальным нагревом поверхности под действием лазерного излучения.

Поскольку ионизация происходит в результате переноса протона к молекулам определяемого соединения, в процессе SALDI эффективно ионизируются только соединения с относительно высокой основностью, или энергией сродства к протону, в газовой фазе [11]. Этот факт, с одной стороны, ограничивает спектр определяемых соединений, но, с другой стороны, позволяет реализовать высокую селективность ионизации и низкий уровень фонового сигнала. Полученные в работах [10–13] результаты показывают, что метод SALDI в принципе может обеспечить детектирование высокоосновных соединений на уровне одного аттомоля (10^{-18} моль), что на несколько порядков величины ниже, чем при использовании традиционных методов — электронной ионизации, химической ионизации, электрораспыления, MALDI.

Один из важных структурно-химических "индикаторов" возможности эффективного детектирования соединения методом SALDI — наличие в молекуле восстановленного азота, в частности, в составе таких функционально-структурных групп, как пиридиновая, пиперидиновая, индольная, диазепиновая, имидазольная группы и аминогруппа. Указанные функциональные группы входят в состав многих известных лекарственных препаратов, а также широко используются в качестве структурных единиц при разработке новых лекарств. Поэтому метод SALDI представляется исключительно перспективным для решения таких важных проблем современной медицины, как разработка лекарственных препаратов, регистрация фармакокинетики, ранняя диагностика заболеваний и др. Решение такого рода задач требует не только высокой чувствительности, но и высокой воспроизводимости результатов анализа. Поскольку эффективность ионизации в методе SALDI критическим образом зависит от физико-химического состава активной поверхности, проблема воспроизводимости является одной из наиболее сложных в этом методе. Для её решения был предложен подход, основанный на сочетании нового метода формирования активного поверхностного слоя и нового способа ввода пробы в масс-спектрометр.

Метод формирования поверхностного слоя, который основывается на обработке лазерным излучением пластин монокристаллического кремния в вакуумной камере масс-спектрометра, включает в себя две последовательных стадии. На первой стадии подложка обрабатывается излучением с интенсивностью, большей порога плавления кремния. Затем обработанный материал подвергают повторному воздействию излучения с интенсивностью, меньшей порога плавления кремния, в присутствии паров воды (при давлении 10^{-6} мм рт. ст.). В результате формируется сильно разупорядоченный слой с высокой поверхностной плотностью протонодонорных групп. Важно отметить, что предложенный метод отличается от известных способов получения SALDI-активного слоя высокой воспроизводимостью и возможностью многократного использования одной и той же подложки. Этот факт иллюстрирует рис. 1, на котором показано, как изменяется ионный ток протонированных

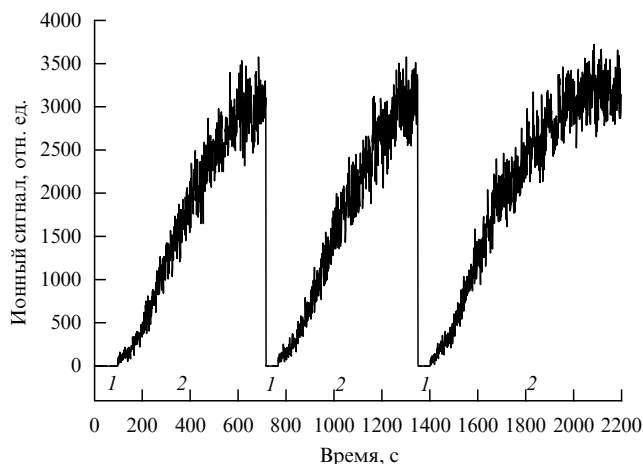


Рис. 1. Зависимости ионного сигнала бета-аланина в трёх последовательных процедурах формирования активного слоя на кремниевой подложке. Начальный участок зависимостей (1) соответствует первой стадии лазерной обработки, последующий участок (2) — второй стадии. Поток молекул бета-аланина на поверхность, который создавался с использованием эффузионной ячейки, оставался постоянным во всём интервале времени.

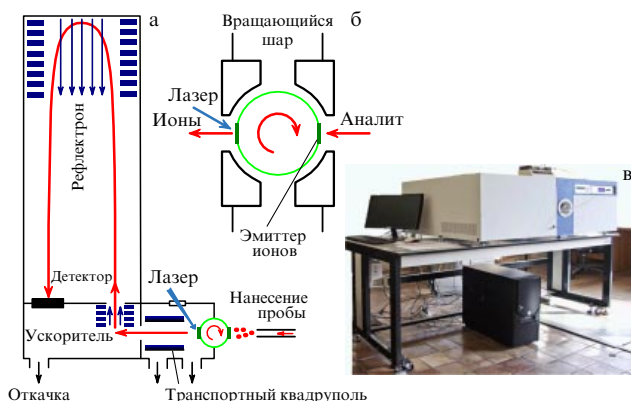


Рис. 2. Схема лазерного масс-спектрометра САЛДИКС с ионизацией методом SALDI (а), схема ввода пробы (б) и внешний вид опытного образца прибора (в).

молекул бета-аланина в трёх последовательных процедурах формирования активного слоя.

Способ ввода пробы в масс-спектрометр схематично представлен на рис. 2б. Основной элемент узла ввода — вращающийся в вакуумных уплотнениях шар из нержавеющей стали, в углублениях которого симметрично установлены SALDI-активные подложки. На одну из подложек наносится анализируемая проба, в то время как противоположная ей подложка, находящаяся в ионном источнике, подвергается лазерному облучению, а образующиеся ионы детектируются в масс-анализаторе. После десорбции всего нанесённого вещества и активации поверхности (при необходимости) шар поворачивается и процесс повторяется. Для нанесения пробы могут быть использованы различные способы, например электрораспыление растворов [14] или термодесорбция [15].

На основе предложенного подхода при участии Общества с ограниченной ответственностью "Новые энергетические технологии" и Института аналитического приборостроения РАН создан опытный образец

лазерного масс-спектрометра для проведения высокочувствительного количественного экспресс-анализа жидких биологических проб в области медицинских анализов и фармакокинетики (рис. 2а, в). Прибор под названием САЛДИКС получил регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения.

3. Метод лазерной десорбции – ионизации за счёт переноса электрона

Одно из наиболее существенных ограничений метода SALDI — это зависимость степени ионизации от величины основности (или энергии сродства к протону) определяемых соединений. Поэтому этот метод остаётся малоэффективным при анализе проб, содержащих нелетучие химические соединения с низкой величиной основности. Спектр таких соединений широк, он включает в себя, в частности, комплексные соединения металлов, углеводороды, сахара и ряд других классов химических соединений. Традиционные масс-спектрометрические методы определения нелетучих соединений — MALDI и электроспрей-ионизация, — также основанные преимущественно на ионизации посредством протонирования, успешно используются только для масс-спектрометрического детектирования ионных, полярных и высокоосновных соединений. Поэтому разработка новых методов, позволяющих реализовать "мягкую", неразрушающую ионизацию нелетучих неполярных аналитов с низкой величиной основности, остаётся сложной и важной задачей современной органической масс-спектрометрии.

Для решения этой задачи предложен новый подход к ионизации (рис. 3а), который позволяет совместить достоинства метода SALDI и метода многофотонной лазерной ионизации [16] (рис. 3б). Как и в методе SALDI, анализируемая проба наносится на поверхность твердотельной подложки, после чего на поверхность воздействуют излучением импульсного лазера. Однако параметры лазерного излучения выбираются из условия его поглощения не только материалом подложки, но и молекулами определяемых соединений. При поглощении кванта излучения молекула аналита, адсорбированная на поверхности, переходит из основного состояния в возбуждённое. Если энергетический уровень возбуждён-

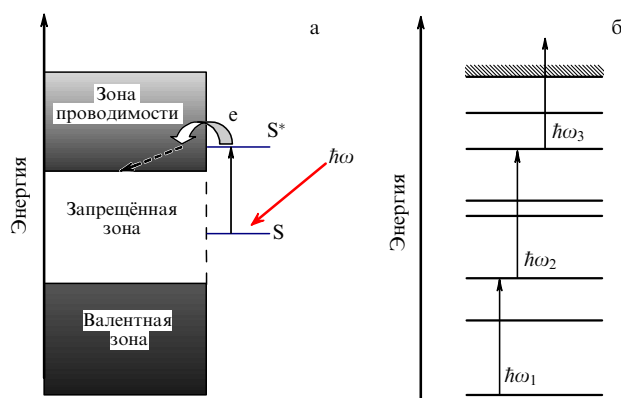


Рис. 3. Принципиальные схемы ионизации химических соединений методом LETDI (а) и методом многофотонной резонансной лазерной ионизации [16] (б).

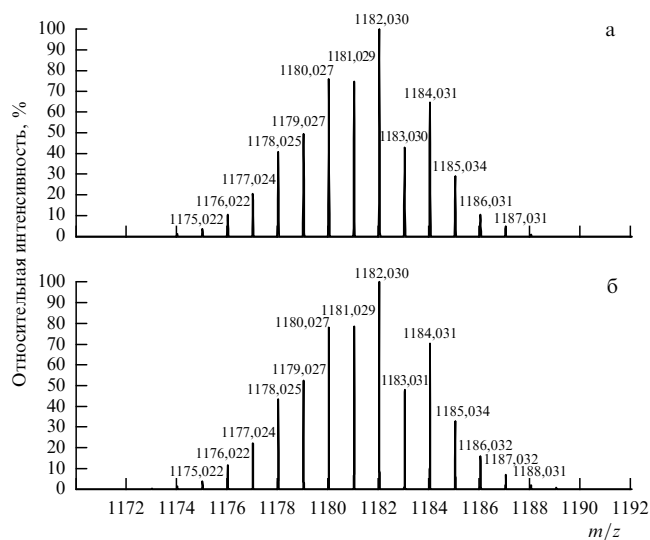


Рис. 4. Масс-спектры комплексного соединения осмия состава $\text{OsC}_{27}\text{N}_5\text{S}_3\text{H}_{18}$: полученный методом LETDI и зарегистрированный в масс-анализаторе высокого разрешения Orbitrap (а); рассчитанный теоретически (б).

ного состояния лежит выше дна зоны проводимости полупроводника, то возможен эффективный перенос электрона от адсорбированной молекулы в полупроводниковый материал. Этот эффект, в частности, широко используется для сенсibilизации широкозонных полупроводников [17]. В результате переноса электрона на поверхности образуются молекулярные ионы. Если, кроме того, реализуется условие поглощения лазерного излучения материалом подложки, то лазерное воздействие приводит к быстрому нагреву её поверхности и последующей десорбции образовавшихся ионов. В отличие от методов, основанных на ионизации путём переноса протона, новый подход использует инициированную лазерным излучением ионизацию путём переноса электрона, и поэтому получил название Laser-induced Electron Transfer Desorption-Ionization (LETDI). Эффективность ионизации в методе LETDI не зависит от величины основности определяемых соединений, что открывает перспективы для значительного расширения круга соединений, определяемых с использованием лазерной масс-спектрометрии.

Метод LETDI апробирован для высокочувствительного определения и идентификации комплексных соединений металлов, являющихся химическими моделями противоопухолевых препаратов для химиотерапевтического лечения онкологических заболеваний [18, 19].

В качестве примера на рис. 4а приведен масс-спектр, полученный при определении комплексов Os с 8-меркаптохинолином с использованием TiO_2 в качестве эмиттера ионов. Измеренные значения отношений массы к заряду m/z , а также наблюдаемое характерное соотношение изотопных пиков позволяют легко идентифицировать пики на рис. 4а как соответствующие молекулярным ионам комплекса состава $(\text{Os}_2\text{L}_5)^+$, где L — 8-меркаптохинолин-Н. Для сравнения на рис. 4б приведено рассчитанное изотопное распределение для соединения Os_2L_5 ($\text{Os}_2\text{C}_{45}\text{N}_5\text{S}_5\text{H}_{30}$). Видно, что наблюдаемое изотопное распределение с высокой точностью совпадает с расчётным. Совпадение расчётного и экспериментального

масс-спектров показывает, что поток десорбированных ионов не содержит протонированных молекул, поэтому основной и единственный канал ионизации комплексных соединений осмия в LETDI обусловлен процессом переноса электрона с определяемой молекулы в подложку. Сравнение методов LETDI и MALDI при использовании одного и того же масс-спектрометра показало, что при определении комплексных соединений металлов эффективность LETDI может на два порядка величины превосходить эффективность MALDI [19].

4. Метод ионизации излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении

Рассмотренные в разделах 2, 3 лазерные методы создания ионов сложных органических соединений применимы в основном к анализу летучих соединений или растворов. В последнее время исключительно активно развивается направление анализа биологических образцов (срезов тканей или биологических жидкостей), находящихся при атмосферном давлении в состоянии "как они есть" — без пробоподготовки и введения в высоковакуумную камеру масс-спектрометра. Такие методы крайне актуальны в биологии, фармакологии и медицине, поскольку они позволяют получать информацию о биологических объектах, не подвергавшихся процедурам подготовки пробы, а значит, сохраняющих максимальную информацию об исходном составе и структуре объекта.

Для анализа твёрдых или жидких образцов при нормальных условиях проба должна быть переведена в газовую фазу и затем ионизована. Для перевода в газовую фазу биологических проб наиболее часто используется лазерная абляция, которая при правильном выборе лазерного источника обеспечивает высокое пространственное разрешение в плоскости и по глубине образца.

Для последующей ионизации продуктов абляции разработано несколько методов. В первую очередь, это методы, основанные на столкновении нейтрального потока продуктов абляции с потоком заряженных или метастабильных частиц, полученных в специальном внешнем источнике. Общим в этих методах является то, что ионизация химических соединений происходит в результате последовательных химических процессов, приводящих в конечном счёте к образованию протонированных молекул аналитов. Это обстоятельство накладывает ограничения на эффективность ионизации, которая определяется величиной сродства к протону исследуемого соединения. Вторая группа методов основана на фотоионизации жёстким ультрафиолетовым (УФ) излучением. Для этой цели обычно используются криптоновые лампы, однако в данном случае энергия излучаемых фотонов ограничена величиной 10,6 эВ.

Для расширения спектра определяемых соединений и увеличения чувствительности анализа предложен новый подход, основанный на сочетании лазерной абляции образца с ионизацией продуктов излучением лазерной плазмы, создаваемой вблизи поверхности специальной металлической мишени [20]. Подход получил название Atmospheric Pressure Laser Plasma Ionization (APLPI). Спектр излучения лазерной плазмы простирается до области мягкого рентгеновского излучения, что позволяет использовать в качестве источника протона в

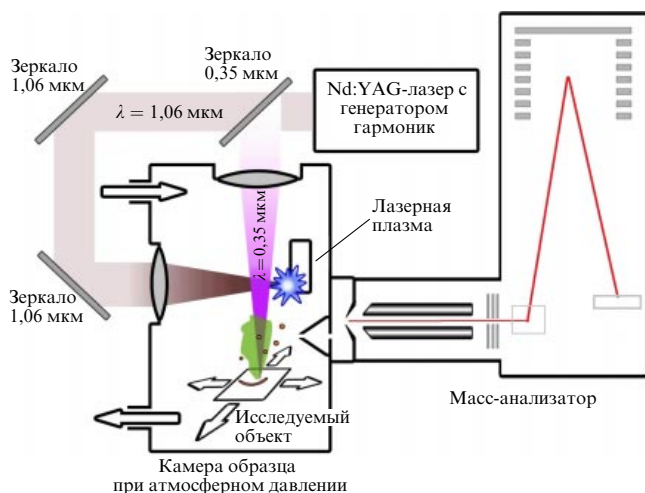


Рис. 5. Схема лазерного масс-спектрометра для анализа твёрдых образцов методом APLPI.

реакциях протонного обмена ионизованную молекулу воды (потенциал ионизации 12,6 эВ), которая всегда присутствует в атмосферном воздухе и продуктах абляции биологических тканей. При использовании жёсткого УФ-излучения можно реализовать также прямую фотоионизацию аналитов, в том числе имеющих низкую энергию сродства к протону.

Коэффициент преобразования энергии лазерного излучения в энергию излучения плазмы может составлять несколько десятков процентов, что позволяет создать мощный источник излучения непосредственно в камере ионизации при использовании (так же как и в двух предыдущих подходах) компактных импульсных Nd:YAG-лазеров с диодной накачкой.

На рисунке 5 приведена схема приборной реализации метода APLPI для анализа твёрдых образцов [20]. Исследуемый образец, установленный на двухкоординатном столике с минимальным шагом перемещения 2 мкм, помещён в герметичную камеру при атмосферном давлении. Камера может продуваться чистыми газами. В ряде случаев это необходимо для уменьшения фоновых сигналов, связанных с ионизацией следовых количеств органических соединений в атмосферном воздухе (никотин, амины, спирты и др). Пороги обнаружения этих при-

месей в атмосферном воздухе находятся на уровне относительных концентраций 10^{-10} (100 ppt) [20] (что позволяет применять метод APLPI также для высокочувствительного онлайн-анализа атмосферы). Для испарения образца используется третья гармоника излучения Nd:YAG-лазера (355 нм), а для создания плазмы на специальной металлической мишени, установленной вблизи зоны испарения, используется основная частота лазера (1064 нм). Образующиеся ионы вводятся в масс-анализатор с помощью газодинамического интерфейса.

Одно из наиболее перспективных применений метода APLPI — построение масс-спектрометрических изображений распределения химических соединений в биологических материалах. В качестве примера на рис. 6 приведён масс-спектр отпечатка пальца на металлической подложке и масс-спектрометрическое изображение отпечатка для диапазона масс 500–600 а.е.м. (соответствующих в основном соединениям группы липидов). Изображение может быть построено по любому выбранному участку масс-спектра или единичному характерному пику в масс-спектре состава образца с пространственным разрешением на уровне 100 мкм и ниже.

Метод APLPI был также успешно применён для анализа состава и пространственного распределения различных компонентов в реальных срезах биологических тканей. Кроме того, этот метод весьма перспективен при создании так называемого умного скальпеля, в котором лазерное излучение используется в качестве хирургического инструмента, а продукты испарения анализируются масс-спектрометром.

5. Заключение

Представлено три новых подхода к масс-спектрометрии органических объектов, основанных на мягкой, не разрушающей сложные органические и биоорганические молекулы, ионизации с использованием излучения импульсного лазера.

Предлагаемые подходы позволяют значительно расширить аналитические возможности масс-спектрометрического анализа твёрдых, жидких и газообразных образцов, и они могут быть использованы для решения различных проблем современной медицины, биологии и аналитической химии.

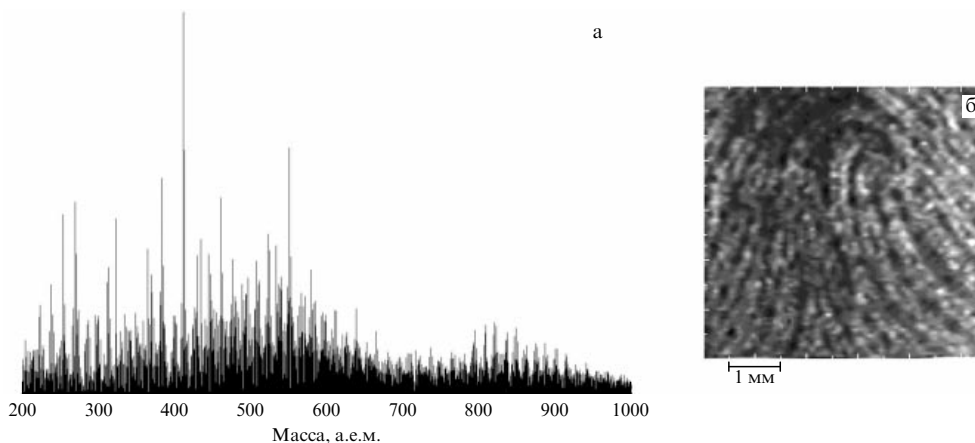


Рис. 6. (а) Масс-спектр, полученный методом APLPI при лазерной абляции отпечатка пальца на нержавеющей стали. (б) Масс-спектрометрическое изображение папиллярного рисунка для диапазона масс 500–600 а.е.м.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерством образования и науки РФ (контракты 02.522.12.2012, 16.512.11.2007, соглашение 14.579.21.0020, идентификатор REMEF157914X0020) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант 14-03-00853).

Список литературы

1. Sunner J, Dratz E, Chen Y-C *Anal. Chem.* **67** 4335 (1995)
2. Kraft P et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9** 912 (1998)
3. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F *Anal. Chem.* **57** 2935 (1985)
4. Kim H-J et al. *Anal. Chem.* **72** 5673 (2000)
5. Alimpiev S et al. *J. Chem. Phys.* **115** 1891 (2001)
6. Yuan M et al. *Microporous Mesoporous Mater.* **78** 37 (2005)
7. Grechnikov A A et al. *J. Phys. Conf. Ser.* **223** 012038 (2010)
8. Wei J, Buriak J M, Siuzdak G *Nature* **399** 243 (1999)
9. Alimpiev S et al. *J. Chem. Phys.* **128** 014711 (2008)
10. Жабин С Н и др. *Квантовая электроника* **41** 835 (2011); Zhabin S N et al. *Quantum Electron.* **41** 835 (2011)
11. Гречников А А и др. *Журн. аналит. химии* **68** 22 (2013); Grechnikov A A et al. *J. Anal. Chem.* **68** 19 (2013)
12. Alimpiev S et al. *Anal. Chem.* **81** 1255 (2009)
13. Гречников А А и др. *Масс-спектрометрия* **7** (1) 53 (2010); Grechnikov A A et al. *J. Anal. Chem.* **65** 1504 (2010)
14. Alimpiev S S et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25** 140 (2011)
15. Grechnikov A A et al. *J. Phys. Conf. Ser.* **398** 012033 (2012)
16. Летохов В С *Лазерная фотоионизационная спектроскопия* (М.: Наука, 1987); Letokhov V S *Laser Photoionization Spectroscopy* (Orlando: Academic Press, 1987)
17. Grätzel M J. *Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **4** 145 (2003)
18. Макаров А А и др. *Масс-спектрометрия* **10** (2) 77 (2013); Makarov A A et al. *J. Anal. Chem.* **68** 1165 (2013)
19. Grechnikov A A et al. *Anal. Bioanal. Chem.* **406** 3019 (2014)
20. Пенто А В и др. *Квантовая электроника* **43** 55 (2013); Pento A V et al. *Quantum Electron.* **43** 55 (2013)

New approaches to the laser mass spectrometry of organic samples

S.S. Alimpiev, S.M. Nikiforov

*Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 38, 119991 Moscow, Russian Federation*

E-mail: alimpiev@kapella.gpi.ru

A.A. Grechnikov

*V.I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 19, 119334 Moscow, Russian Federation*

E-mail: grechnikov@geokhi.ru

Three new approaches to laser mass spectrometry of organic samples are presented that are based on the soft ionization of organic and bioorganic molecules and on the use of pulsed laser radiation.

Keywords: organic compounds, mass spectrometry, laser

PACS numbers: **33.80. – b**, **42.62. – b**, **81.70. – q**

DOI: 10.3367/UFNR.0185.201502f.0207

Bibliography — 20 references

Received 23 May 2014, revised 1 July 2014

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **185** (2) 207–212 (2015)

Physics – Uspekhi **58** (2) (2015)