

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Масс-спектрометрия в органической химии



М и и и и

А.Т. Лебедев

Масс-спектрометрия в органической химии

Издание второе,
переработанное и дополненное

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2015

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

УДК 543.51

ББК 24.4

Л33

Л33 Лебедев А.Т.

Масс-спектрометрия в органической химии

Издание второе, переработанное и дополненное

Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2015. – 704с., ISBN 978-5-94836-409-4

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

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

Благодарности

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

УДК 543.51

ББК 24.4

© 2015, Лебедев А.Т.

© 2015, ЗАО «РИЦ «ТЕХНОСФЕРА», оригинал-макет, оформление

ISBN 978-5-94836-409-4

Содержание

Предисловие ко второму изданию	11
Предисловие.....	13
Введение.....	17
Глава 1. Система ввода образца	19
1.1. Баллон напуска	19
1.2. Прямой ввод	20
1.3. Мембранный ввод (Membrane inlet mass spectrometry, MIMS)	21
1.4. Газовая хроматография/масс-спектрометрия	23
1.4.1. Ввод пробы в систему ГХ/МС	23
1.4.2. Запись масс-спектров в режиме ГХ/МС	26
1.4.3. ГХ×ГХ/МС	30
1.5. Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (ЖХ/МС, LC/MS)	34
1.5.1. Ленточный транспортер (moving belt)	35
1.5.2. Прямой ввод жидкости (direct liquid introduction, DLI)	36
1.5.3. Поток частиц (particle beam)	36
1.5.4. Термораспыление, термоспрей (thermospray, TSP), плазмораспыление, плазмаспрей (plasma spray).....	37
1.6. Сверхкритическая флюидная хроматография/масс-спектрометрия (СФХ/МС)	38
1.7. Капиллярный электрофорез /масс-спектрометрия, КЭ/МС (Capillary Electrophoresis/Mass spectrometry, CE/MS).....	41
1.8. Ионная хроматография/масс-спектрометрия (ИХ/МС)	42
1.9. Атмосферный ввод	42
Глава 2. Физические основы процессов масс-спектрометрической фрагментации	44
2.1. Электронная ионизация (Electron Ionization, EI)	44
2.2. Физические основы масс-спектрометрической фрагментации.....	49
2.2.1. Квазиравновесная теория	50
2.2.2. Фотодиссоциация, разрешенная во времени.....	54
2.3. Метастабильные ионы	55
2.4. Полуколичественная теория фрагментации	58
Глава 3. Основные правила и подходы к интерпретации масс-спектров	59
3.1. Стабильность ионов и нейтральных частиц.....	59
3.1.1. Правило выброса максимального алкильного радикала	61
3.1.2. Правило Стивенсона (Стивенсона – Одье)	63
3.1.3. Правило четноэлектронных ионов.....	65
3.1.4. Правило степеней свободы	66
3.1.5. Прочность химических связей.....	67
3.1.6. Структурные и стереохимические факторы	68
3.1.7. Орто-эффект.....	70
3.1.8. Масс-спектрометрия хиральных соединений.....	72

3.2. Концепция локализации заряда и неспаренного электрона	73
3.2.1. Фрагментация, удаленная от места локализации заряда.....	77
Глава 4. Практические основы интерпретации масс-спектров.....	79
4.1. Молекулярный ион	79
4.2. Определение элементного состава ионов на основании изотопных пиков	82
4.2.1. Азотное правило	90
4.2.2. Определение содержания изотопа ^{13}C в природных образцах.....	93
4.2.3. Расчет изотопной чистоты соединений	94
4.3. Область молекулярных ионов высокомолекулярных соединений	96
4.4. Фрагментные ионы	99
4.4.1. Гомологические серии ионов.....	99
4.4.2. Выбросы простейших нейтральных частиц	102
4.4.3. Наиболее интенсивные пики в спектре	102
4.5. Библиотеки масс-спектров	103
4.6. Использование для интерпретации дополнительной масс-спектральной информации	108
4.7. Схема фрагментации.....	112
Глава 5. Альтернативные методы ионизации образца	115
5.1. Ионизация фотонами (Photoionization)	115
5.2. Химическая ионизация (Chemical Ionization, CI).....	116
5.3. Химическая ионизация отрицательных ионов (Negative ion chemical ionization, NICI)	119
5.4. Пульсирующая химическая ионизация (Pulsed positive, negative ion chemical ionization mass spectrometry)	121
5.5. Десорбционная (прямая) химическая ионизация, ДХИ (Direct (Desorption) Chemical Ionization, DCI)	121
5.6. Полевая ионизация (Field Ionization, FI)	122
5.7. Полевая десорбция (Field Desorption, FD).....	123
5.8. Тлеющий разряд (Glow discharge)	124
5.9. Плазменная десорбционная масс-спектрометрия (Plasma desorption mass spectrometry, PDMS)	125
5.10. Бомбардировка быстрыми атомами, БА (Fast Atom Bombardment, FAB); вторичноионная масс-спектрометрия, ВИМС (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS).....	125
5.10.1. Проточный (динамический) вариант бомбардировки быстрыми атомами (Continuous Flow or Dinamic Fast Atom Bombardment)	128
5.11. Химическая ионизация при атмосферном давлении (Atmospheric pressure Chemical Ionization, APCI)	129
5.12. Фотоионизация при атмосферном давлении (ФИАД) и фотохимическая ионизация при атмосферном давлении (ФХИАД), Atmospheric pressure photoionization (APPI), Atmospheric pressure photochemical ionization (APPCI)	131

5.13. Ионизация электрораспылением, электроспрей (ИЭР)	134
5.14. Ионизация акустическим распылением.....	140
5.15. Матрично активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ)	141
5.16. Лазерная десорбционная масс-спектрометрия (Laser desorption mass spectrometry, LDMS)	151
Глава 6. Разделение и регистрация ионов	154
6.1. Магнитный секторный масс-спектрометр.....	154
6.2. Электростатический анализатор. Двухфокусный секторный масс-спектрометр	155
6.3. Масс-спектрометрия высокого разрешения.....	156
6.4. Масс-спектрометрия с преобразованием Фурье (МС ПФ).....	159
6.5. Квадрупольный анализатор	164
6.6. Ионная ловушка	165
6.7. Времяпролетный анализатор	167
6.8. Орбитальная ловушка (Orbitrap).....	173
6.9. Детектирование ионов	176
Глава 7. Tandemная масс-спектрометрия, МС/МС.....	181
7.1. Активация ионов	182
7.1.1. Активация соударением или диссоциация, индуцированная (активированная) столкновениями	182
7.1.2. Диссоциация, индуцированная столкновением с поверхностью	186
7.1.3. Другие методы инициирования фрагментации	188
7.1.3.1. Диссоциация, активированная электронами	188
7.1.3.2. Фотодиссоциация (Photodissociation).....	189
7.1.4. Последовательная tandemная масс-спектрометрия, МС ⁿ	191
7.2. Анализаторы ионов в tandemной масс-спектрометрии	193
7.2.1. Система трех квадруполей	193
7.2.2. Магнитные секторные приборы.....	196
7.2.2.1. Спектр кинетических энергий ионов, проанализированных по массе (MIKES)	196
7.2.2.2. Высвобождение кинетической энергии при фрагментации	198
7.2.2.3. Связанные сканирования.....	199
7.2.3. Ионная ловушка.....	206
7.2.4. Масс-спектрометрия с преобразованиями Фурье	207
7.2.5. Tandemная масс-спектрометрия на приборах МАЛДИ	208
7.2.6. Приборы продленной геометрии	210
7.2.7. Приборы гибридной геометрии.....	212
7.2.8. Орбитальные ловушки	214
7.3. Автоматизированные методы записи tandemных спектров	215
7.4. Инверсия заряда	216
7.5. Нейтрализация-реионизация	218

Глава 8. Методы на основе масс-спектрометрии и родственные

масс-спектрометрии	221
8.1. Пиролитическая масс-спектрометрия	221
8.2. Реакция переноса протона.....	224
8.3. Масс-спектрометрия выбранных ионов в потоке.....	228
8.4. Спектрометрия ионной подвижности.....	230
8.4.1. Дрейфовая спектрометрия ионной подвижности	231
8.4.2. Спектрометрия приращения ионной подвижности	234
8.4.3. Спектрометр ионной подвижности на основе бегущей волны	235
8.4.4. Улавливающий спектрометр ионной подвижности.....	236
8.4.5. Спектрометр ионной подвижности на основе поперечной модуляции	236
8.4.6. Варианты комплексных методов с использованием ионной подвижности	237

Глава 9. Масс-спектрометрия с ионизацией на воздухе

(Ambient Ionization Mass Spectrometry)	240
9.1. Методы на основе спрея	242
9.1.1. Десорбционная электрораспылительная ионизация	242
9.1.2. Нано-ДЭРИ	245
9.1.3. Ионизация акустическим распылением на воздухе	247
9.1.4. Экстракционная электрораспылительная ионизация.....	249
9.1.5. Спрей с бумаги	251
9.1.6. Спрей с листа.....	253
9.2. Плазменные методы	256
9.2.1. Прямой анализ в реальном времени	257
9.2.2. Низкотемпературная плазма.....	259
9.2.3. Десорбционная химическая ионизация при атмосферном давлении	261
9.2.4. Масс-спектрометрия с ионизацией быстрым испарением на воздухе	262
9.3. Лазерные методы	265
9.3.1. Электрораспылительная лазерная десорбция/ионизация	266
9.3.2. Лазерная абляция с электрораспылительной ионизацией.....	267
9.3.3. Другие лазерные методы	268
9.4. Методы ионизации в системе ввода	269
9.5. Количественные аспекты ионизации на воздухе.....	271
9.6. Проведение химических реакций методами масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе	272
9.7. Мягкое напыление на воздухе	275
9.8. Использование портативных масс-спектрометров.....	276
9.9. Методы масс-спектрометрической (молекулярной) визуализации (Imaging mass spectrometry).....	280
9.10. Он-лайн контроль хирургических операций методами масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе	287
9.11. Будущее масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе.....	290

Глава 10. Основные направления фрагментации некоторых классов органических соединений	291
10.1. Алканы	291
10.2. Алкены и диены	296
10.3. Алкины	300
10.4. Алициклические углеводороды	302
10.4.1. Циклоалкены	305
10.5. Ароматические углеводороды	306
10.6. Спирты, фенолы, тиолы	314
10.6.1. Спирты	314
10.6.2. Фенолы	323
10.6.3. Тиолы	324
10.7. Простые эфиры и сульфиды	331
10.8. Амины и фосфины	341
10.9. Алкилгалогениды, арилгалогениды	350
10.10. Карбонильные соединения	360
10.11. Карбоновые кислоты и их производные	375
10.12. Нитрилы, изонитрилы, нитросоединения, гидразины, оксимы и диазосоединения	399
10.13. Сульфоксиды, сульфоны, сульфокислоты	415
10.14. Элементоорганические соединения	421
Глава 11. Биополимеры	430
11.1. Аминокислоты, пептиды, белки	430
11.1.1. Масс-спектрометрия аминокислот	430
11.1.2. Масс-спектрометрия пептидов	432
11.1.2.1. Установление последовательности аминокислотных звеньев	434
11.1.3. Масс-спектрометрия белков	446
11.1.3.1. Метод идентификации белков «снизу вверх»	447
11.1.3.2. Метод идентификации белков «сверху вниз»	450
11.1.4. Протеомика	451
11.2. Масс-спектрометрия липидов	453
11.2.1. Триацилглицериды	456
11.2.2. Глицерофосфолипиды и сфинголипиды	459
11.2.3. Установление положения двойных связей в алифатических цепях	460
11.3. Масс-спектрометрия сахаров (углеводов)	462
11.3.1. Номенклатура фрагментных ионов сахаров	464
11.3.2. Современные методы масс-спектрометрического анализа сахаров	467
11.4. Масс-спектрометрия нуклеиновых кислот	469
11.4.1. Масс-спектрометрия нуклеиновых оснований, нуклеотидов и нуклеозидов	469
11.4.2. Масс-спектрометрия олигонуклеотидов	470

11.4.3. Масс-спектрометрическое секвенирование олигонуклеотидов	472
11.4.4. Программное обеспечение для секвенирования олигонуклеотидов	475
11.4.5. Прикладные аспекты масс-спектрометрии нуклеиновых кислот	475
11.5. Метабомика (метабономика)	476
11.5.1. Инструментальные аспекты метабомики	477
11.5.2. Варианты метаболомных исследований	480
11.5.3. Программное обеспечение метабомики	482
11.6. Масс-спектрометрический анализ микроорганизмов	483
Глава 12. Количественный масс-спектрометрический анализ	488
12.1. Масс-хроматография	491
12.2. Масс-фрагментография, мониторинг заданных ионов	502
12.3. Мониторинг заданных реакций	504
12.4. Дериватизация аналитов	506
12.5. Установление количества соединения в образце по площади хроматографического пика	507
12.6. Метод внешнего стандарта	508
12.7. Метод внутреннего стандарта	509
12.8. Метод изотопного разбавления	511
12.9. Метод добавок	512
Глава 13. Обобщенные задачи	513
Глава 14. Решения задач	553
Приложение	617
Литература	638
Список принятых и предлагаемых сокращений, русских и английских терминов, относящихся к масс-спектрометрии	682
Приложение 1. Инновационные подходы и аналитические решения на основе масс-спектрометрии	705
Приложение 2. Критерии подбора оптимальной конфигурации ГХ/МС оборудования в зависимости от аналитической задачи	721

Вся информация вселенной заложена в массе.

Р.А. Зубарев

Предисловие ко второму изданию

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

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

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

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

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

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

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

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

Теория становится материальной силой, как только она овладевает массами.

К. Маркс. К критике гегелевской философии права

Предисловие

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Введение

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

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

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

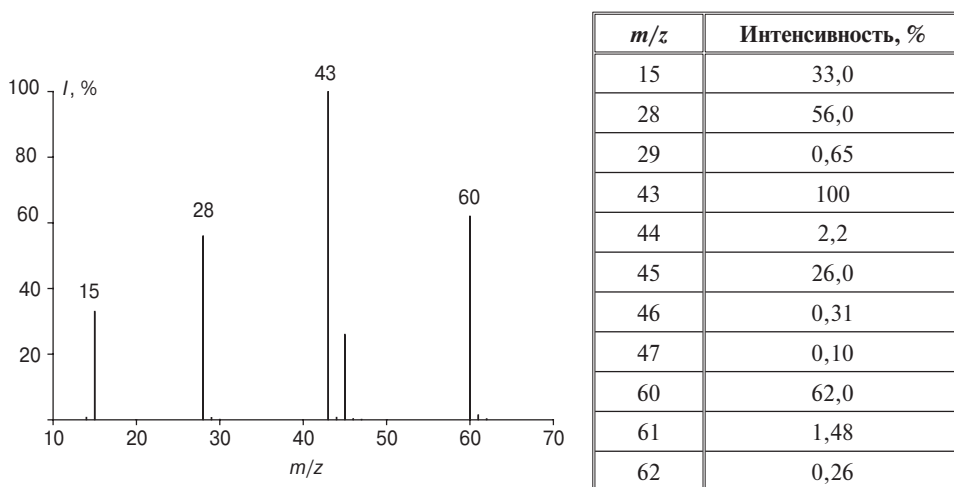


Рис. 1. Масс-спектр соединения с брутто-формулой $C_2H_4O_2$ в графическом и табличном виде

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

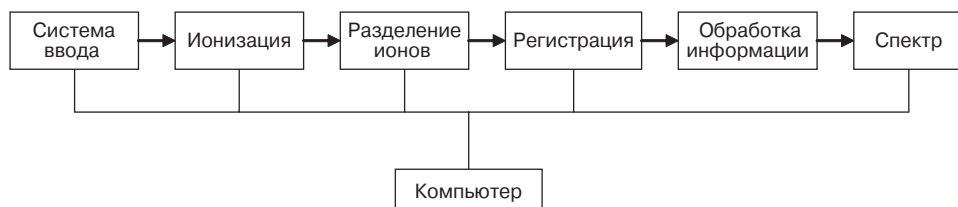


Рис. 2. Блок-схема масс-спектрометра

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

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

ГЛАВА I

СИСТЕМА ВВОДА ОБРАЗЦА

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

1.1. Баллон напуска

Одной из первых систем ввода, практически не используемой в настоящее время, служил баллон напуска (рис. 1.1). Анализируемое вещество находилось в газообразном состоянии (давление около 10^{-2} мм рт.ст.) в баллоне, внутренняя поверхность которого объемом 50–2000 см³ была остеклена для предотвращения нежелательных химических реакций на стенках сосуда. В поздних вариантах предусматривалась система нагрева пробы в баллоне. Этот резервуар соединялся с источником ионов отверстием очень небольшого диаметра, через которое осуществлялось молекулярное натекание образца в масс-спектрометр.

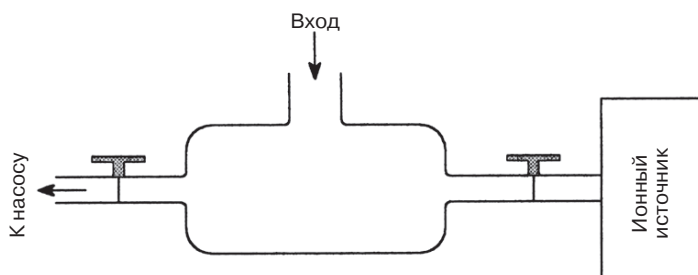


Рис. 1.1. Баллон напуска

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

1.2. Прямой ввод

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

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

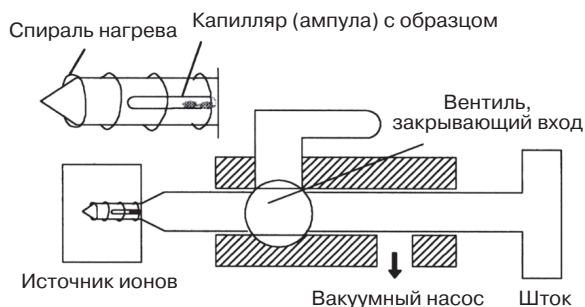


Рис. 1.2. Система прямого ввода

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

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

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

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

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

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

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

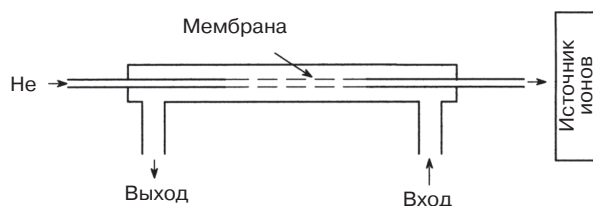


Рис. 1.3. Размещение мембраны вне источника ионов

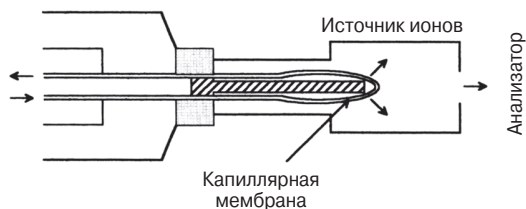


Рис. 1.4. Размещение мембраны внутри источника ионов

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

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

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

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

1.4. Газовая хроматография/масс-спектрометрия

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

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

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

1.4.1. Ввод пробы в систему ГХ/МС

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

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

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

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

$$P = HC,$$

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

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

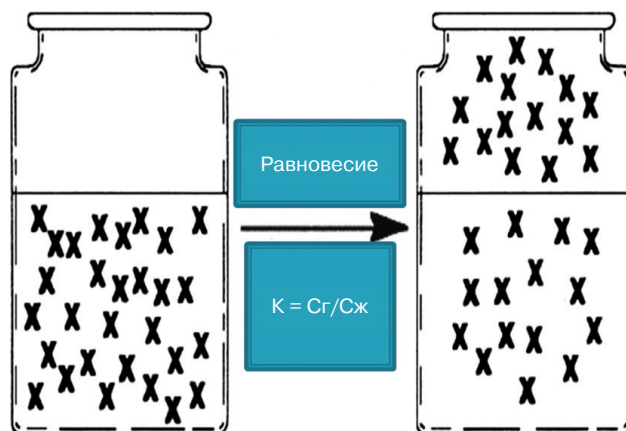


Рис. 1.5. Метод статического парофазного анализа для перевода в газовую фазу ЛОС

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

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

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

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

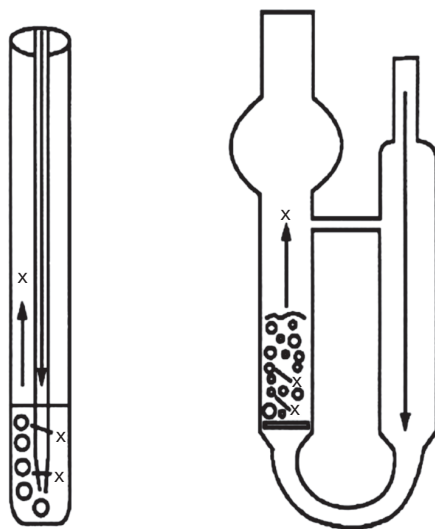


Рис. 1.6. Два варианта склянок для проведения анализа ЛОС методом «выдувание — улавливание»

1.4.2. Запись масс-спектров в режиме ГХ/МС

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

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

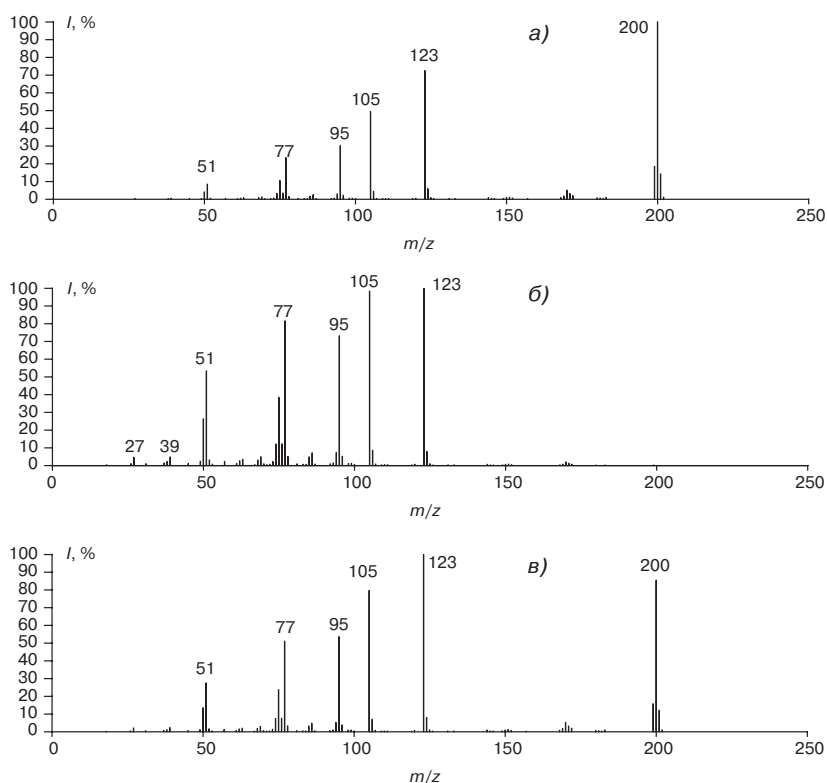


Рис. 1.7. Масс-спектры пара-фторбензофенона на восходящей стороне (а), на нисходящей стороне (б) и на вершине хроматографического пика (в)

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

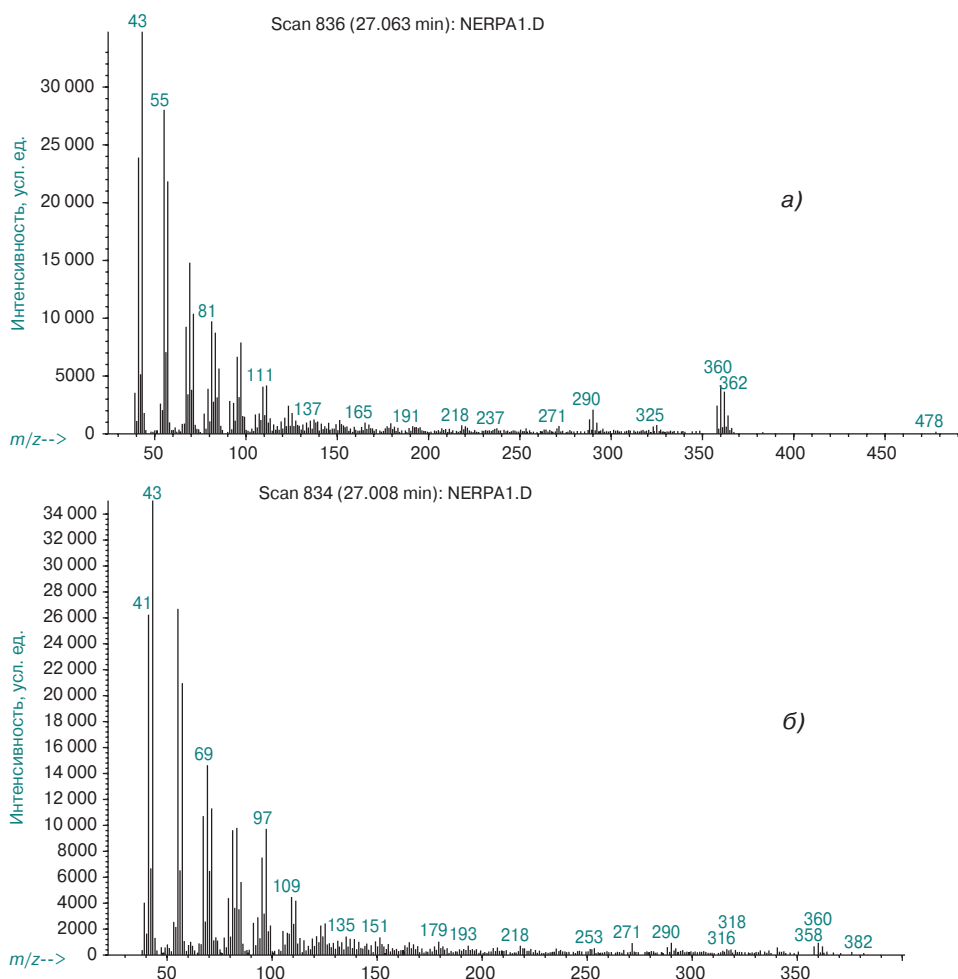


Рис. 1.8. Масс-спектр на вершине хроматографического пика (а); масс-спектр у подножия хроматографического пика (спектр фона) (б)

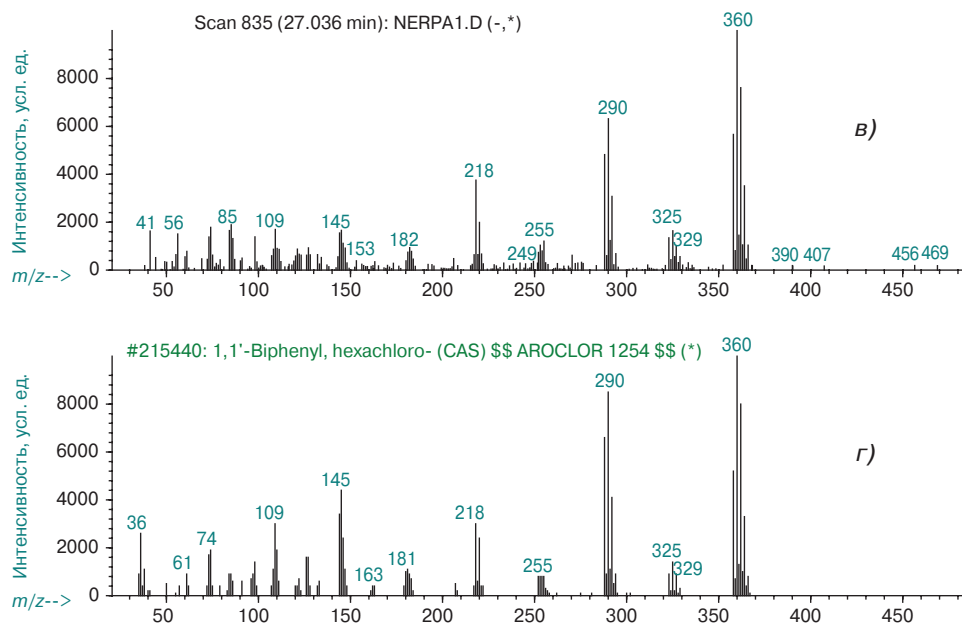


Рис. 1.8 (окончание). Спектр компонента смеси после вычитания фона (б); библиотечный спектр гексахлорбифенила (сходимость с экспериментальным спектром 99%) (г)

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

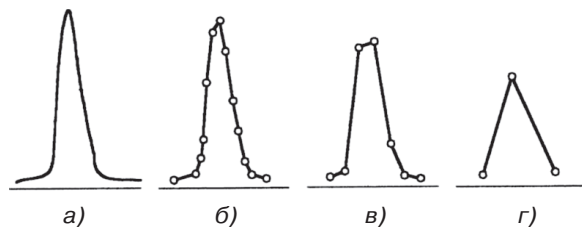


Рис. 1.9. Вид и площадь наблюдаемого сигнала хроматографического пика при регистрации полного ионного тока в зависимости от скорости сканирования. Аналоговый сигнал (а); за время выхода компонента зарегистрировано 13 масс-спектров (б); за время выхода компонента зарегистрировано 7 масс-спектров (в);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

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

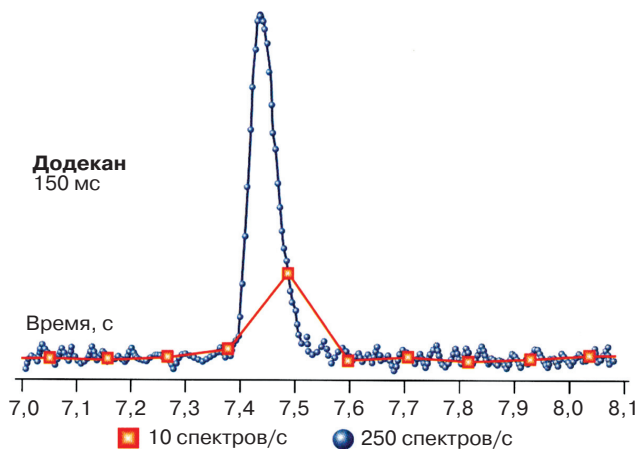


Рис. 1.10. Хроматографические пика додекана в эксперименте методом сверхбыстрой хроматографии при скорости сбора данных 250 спектров в секунду и 10 спектров в секунду

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

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

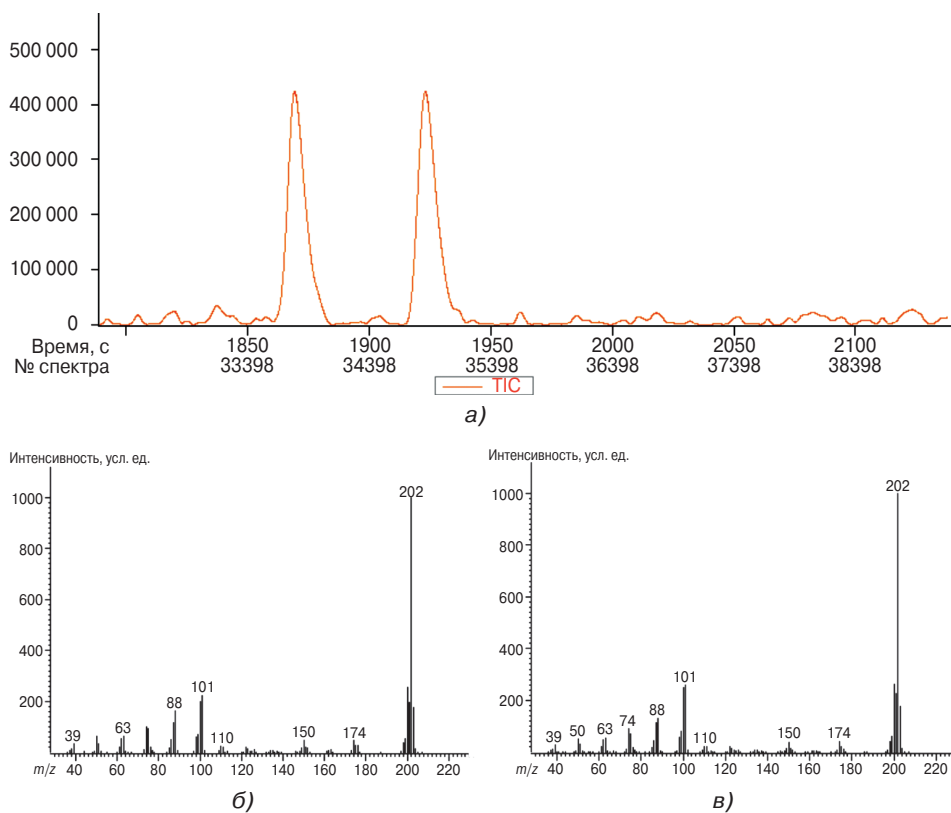


Рис. 1.11. Пики флуорантена и пирена на хроматограмме по полному ионному току (а). Масс-спектр ЭИ флуорантена (б). Масс-спектр ЭИ пирена (в)

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

1.4.3. ГХ×ГХ/МС

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

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

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

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

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

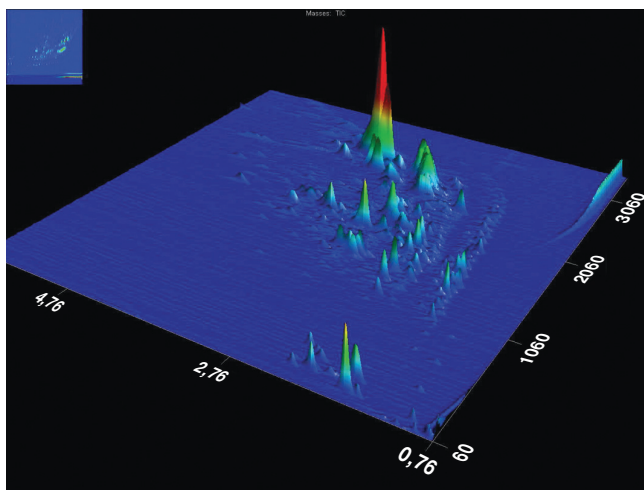


Рис. 1.12. Трехмерный вариант представления результатов ГХ×ГХ/МС эксперимента (полный ионный ток) для образца углеводородной фракции нефти из Сользаводска

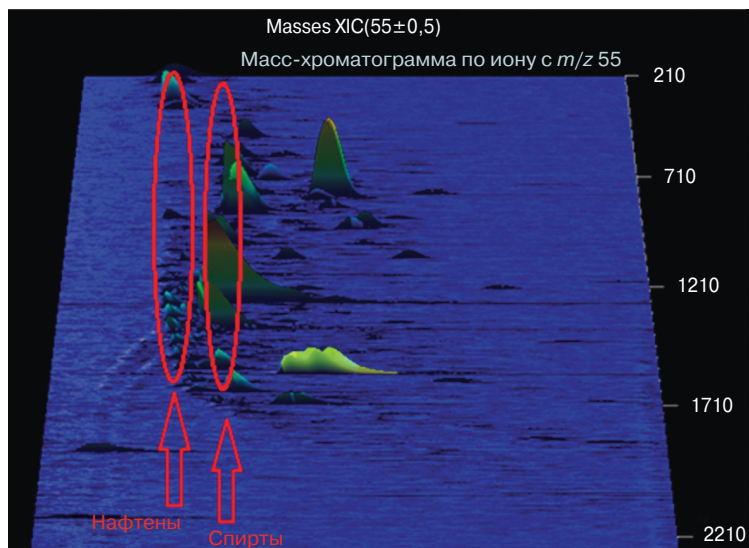


Рис. 1.13. Трехмерная масс-хроматограмма по ионам с m/z 55, характерным для спиртов и алкенов/нафтяных. Ряд спиртов располагается правее ряда нафтяных, поскольку они полярнее и выходят из короткой полярной колонки позже соответствующих углеводородов

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

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

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

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

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

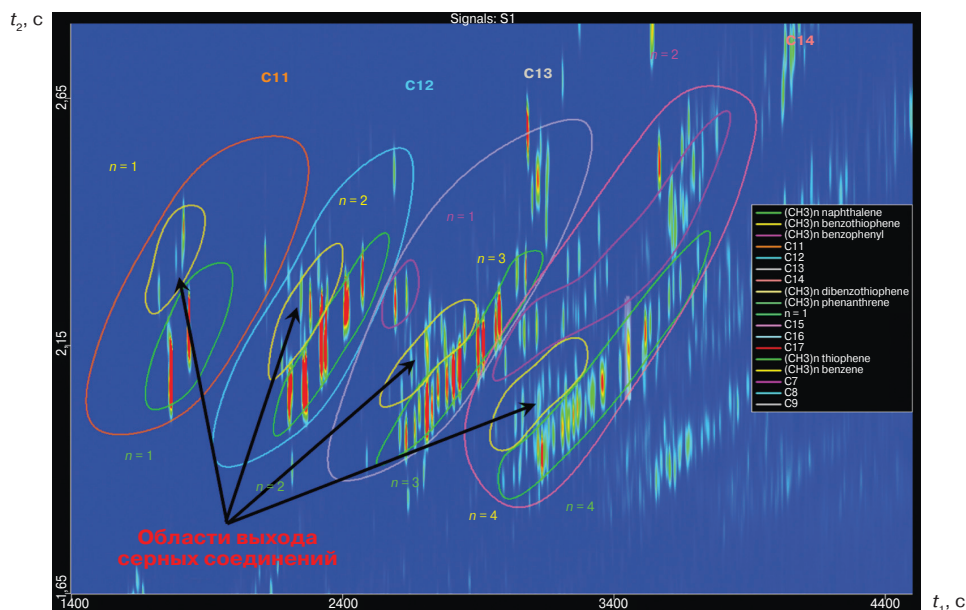


Рис. 1.14а. Хроматограмма дизельного топлива. В выделенных участках находятся серусодержащие соединения

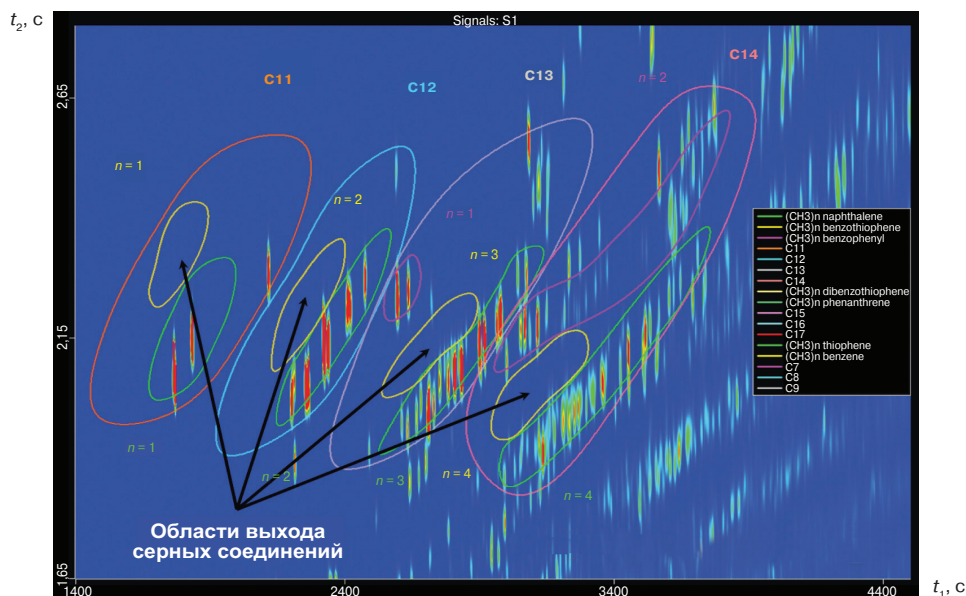


Рис. 1.14б. Хроматограмма дизельного топлива после его десульфуризации. В выделенных участках отсутствуют какие-либо пики

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

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

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

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

1.5.1. Ленточный транспортер (moving belt)

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

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

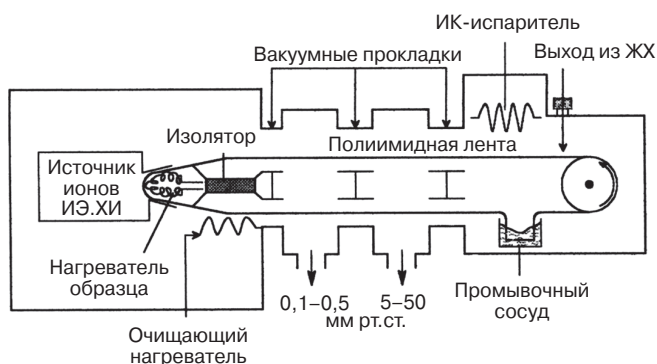


Рис. 1.15. Принципиальная схема ленточного транспортера

К достоинствам метода следует отнести:

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

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

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

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

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

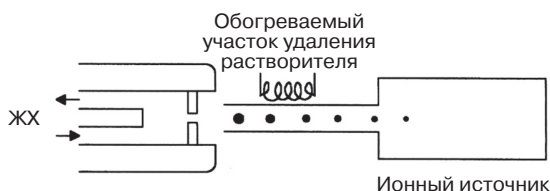


Рис. 1.16. Принципиальная схема метода прямого ввода жидкости

1.5.3. Поток частиц (*particle beam*)

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

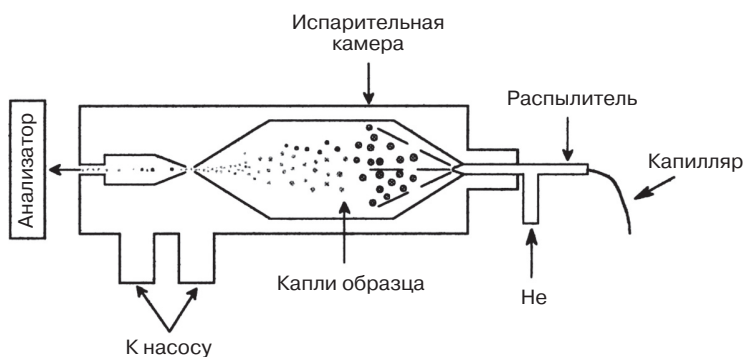


Рис. 1.17. Принципиальная схема интерфейса с потоком частиц

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

1.5.4. Термораспыление, термоспрей (*thermospray, TSP*), плазмораспыление, плазмаспрей (*plasma spray*)

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

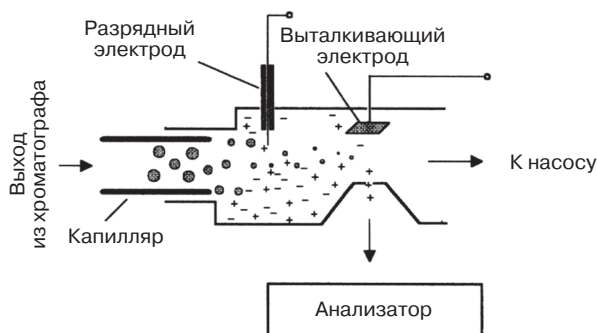


Рис. 1.18. Принципиальная схема термоспрея (плазмаспрея)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Наибольшие успехи СФХ/МС последнего времени связаны с медициной, прежде всего с липидным анализом. Так, родственные простагландину изопростаны являются продуктами окисления полиненасыщенных жирных кислот и генерируются организмом в условиях оксидативного стресса, например в мозге людей с болезнью Альцгеймера. Метод СФХ/МС/МС с успехом используется для идентификации региоизомеров и энантиомеров этих соединений. Хиральная хроматография позволяет разделить изомеры, а тандемная масс-спектрометрия (мониторинг заданных реакций, разд. 12.3) провести их идентификацию и количественное определение [77]. Применение двумерного СФХ/СФХ/МС метода для разделения и анализа сложных смесей рацематов фармацевтических препаратов с многочисленными примесями продемонстрировало, что ахиральное и хиральное разделение могут быть успешно объединены в одном последовательном процессе как в аналитическом, так и в препаративном варианте [78]. Разработана автоматизированная программа для высокопроизводительного профилирования липидов в биологических жидкостях с использованием СФХ/МС и орбитальной ловушки [79]. Молекулы липидов подвергались разделению на обычной колонке C18 не только по длине алкильных радикалов, но и по природе головных групп. Полное профилирование осуществляется всего за 30 минут, что доказывает эффективность предложенного подхода. Универсальность метода продемонстрирована при создании методики одновременного детектирования и количественного определения 17 пестицидов, обладающих широким разбросом молекулярных масс (112–888) и полярности ($\log P_{ow}$ от $-4,6$ до $7,05$). Время СФХ/МС/МС анализа всей группы пестицидов, для которых обычно используется комплекс и ГХ/МС, и ЖХ/МС, составило лишь 11 минут [80].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.9. Атмосферный ввод

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

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

ГЛАВА 2

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕССОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ

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

2.1. Электронная ионизация (Electron Ionization, EI)

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

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

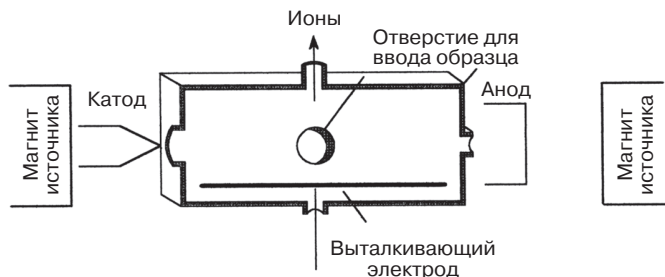
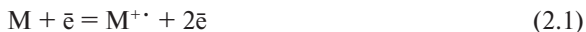


Рис. 2.1. Принципиальная схема источника ионизации электронами

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



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

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

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

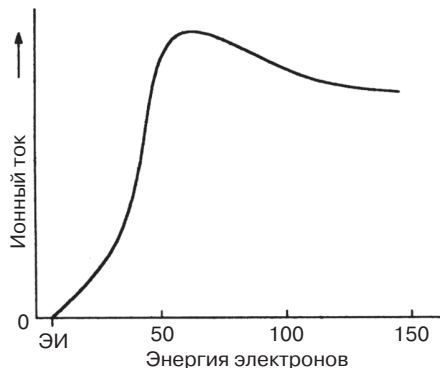


Рис. 2.2. Зависимость величины ионного тока от энергии ионизирующих электронов

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

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

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

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

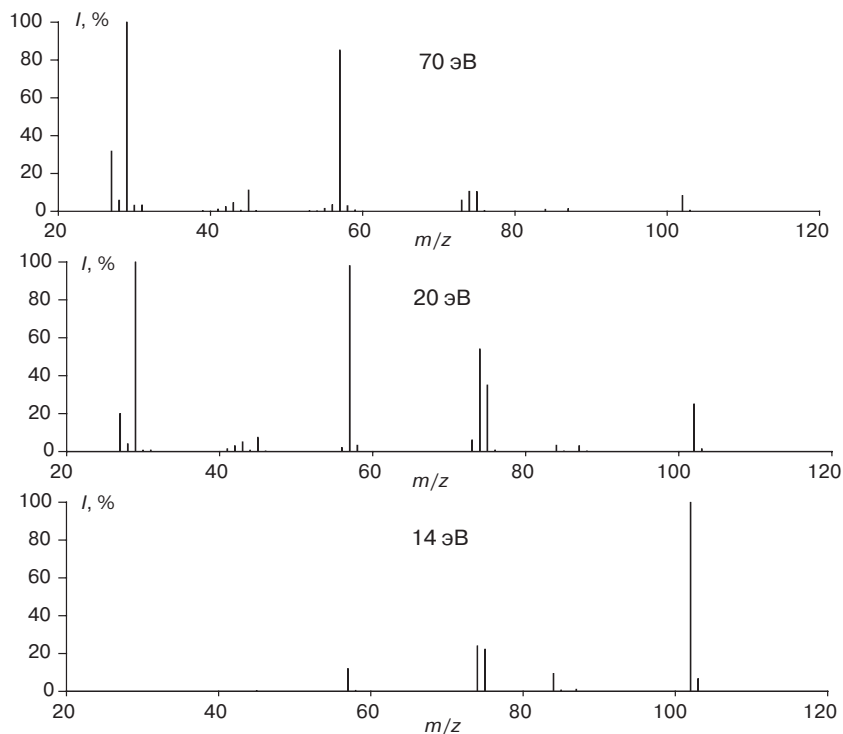


Рис. 2.3. Масс-спектр ионизации электронами этилпропионата (молекулярная масса 102 дальтона) при энергиях ионизирующих электронов 70, 20 и 14 эВ

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

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

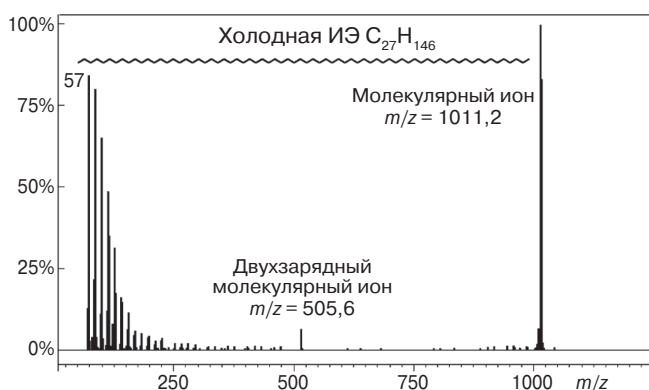


Рис. 2.4. Масс-спектр алкана $C_{72}H_{146}$, полученный методом ГХ/МС с интерфейсом ультразвуковых молекулярных пучков

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

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

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

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

2.2. Физические основы масс-спектрометрической фрагментации

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

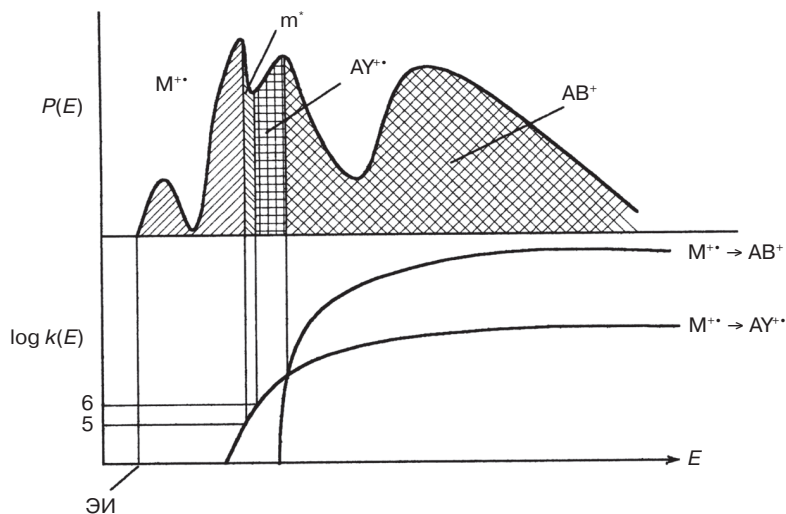


Рис. 2.5. Функции $P(E)$ и $k(E)$ молекулярного иона органического соединения $ABXU$. Диаграмма Вархафтига

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

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

2.2.1. Квазиравновесная теория

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

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

Обе теории базируются на определенных допущениях.

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

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

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



Схема 2.1

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

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

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

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

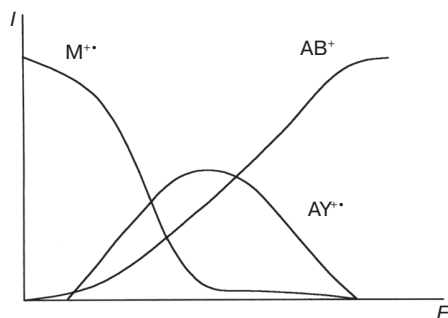


Рис. 2.6. Зависимость интенсивности пиков ионов в спектре от внутренней энергии $M^{+\cdot}$

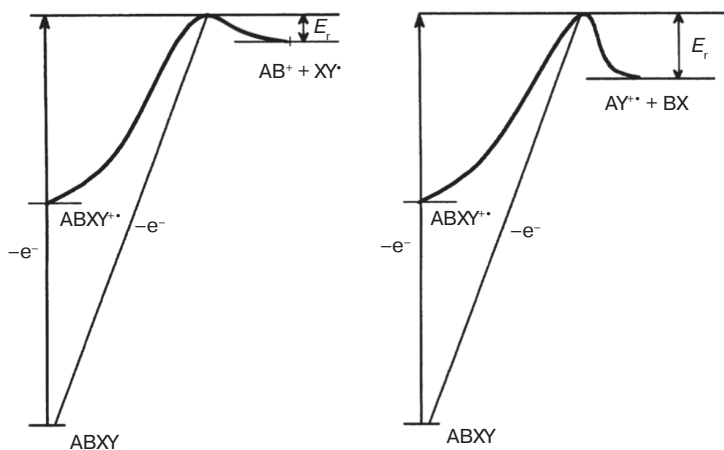


Рис. 2.7. Изменение потенциальной энергии вдоль координаты реакции для простого разрыва связи (левая часть) и перегруппировки (правая часть)

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

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

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

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

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

$$\Delta H(AB^+) = \text{ЭП} + \Delta H(ABXY) - \Delta H(XY) \quad (2.2)$$

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

2.2.2. Фотодиссоциация, разрешенная во времени

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

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

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

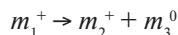
химической теорией [133]. В частности, для примера иммониевого иона лейцина достигнуто отличное совпадение между экспериментальной и рассчитанной на основании кривых TRPD величиной $E_0 = 1,4$ эВ и $\Delta S^\ddagger = 64\text{--}77$ Дж/моль \times К.

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

2.3. Метастабильные ионы

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

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



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

$$m_1 v_1^2 = m_2 v_2^2 + m_3 v_3^2 \quad (2.3)$$

$$m_1 v_1 = m_2 v_2 + m_3 v_3 \quad (2.4)$$

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

$$m^* v^* = m_2 v_1 \quad (2.5)$$

Уравнение (2.6) справедливо для любого стабильного иона.

$$\frac{m^* v^{*2}}{2} - \frac{m_1 v_1^2}{2} = eV. \quad (2.6)$$

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

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

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

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

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

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

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

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

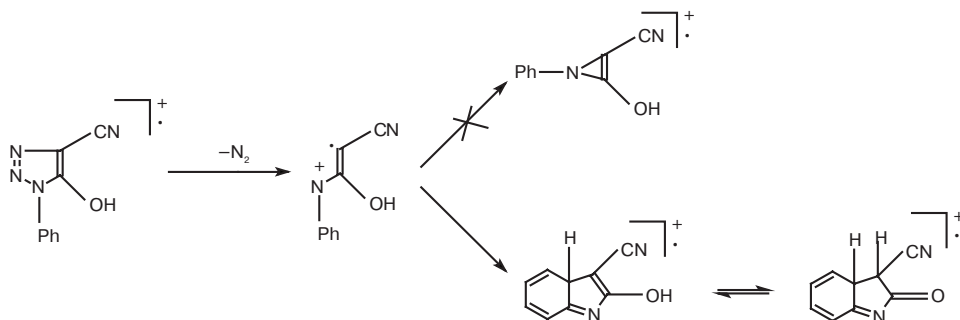


Схема 2.2

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

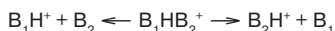


Схема 2.3

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

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

2.4. Полуколичественная теория фрагментации

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

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

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

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

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

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

ГЛАВА 3

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА И ПОДХОДЫ К ИНТЕРПРЕТАЦИИ МАСС-СПЕКТРОВ

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

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

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

3.1. Стабильность ионов и нейтральных частиц

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



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

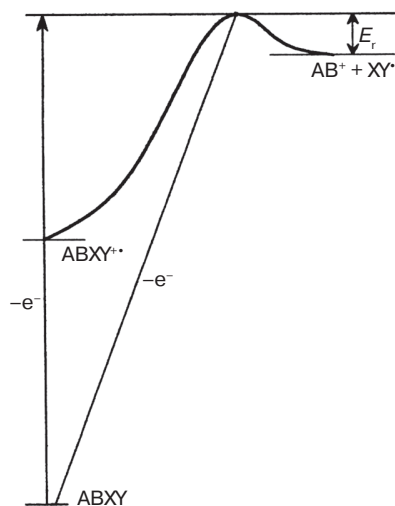


Рис. 3.1. Энергетическая диаграмма образования иона AB^+ из молекулы $ABXY$

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

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

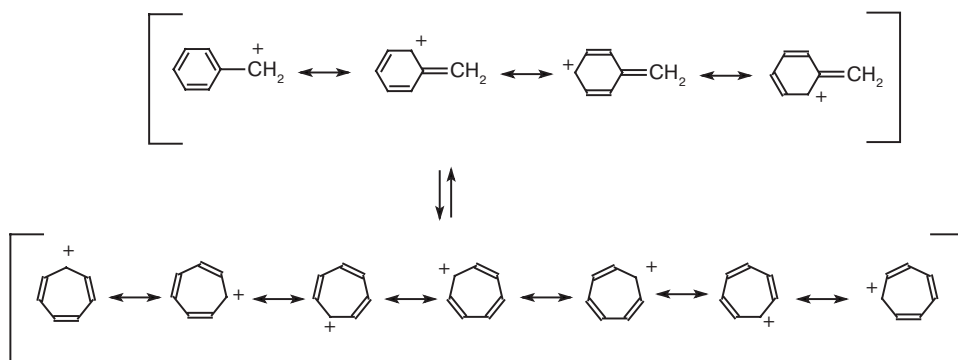


Схема 3.1

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



Схема 3.2

Распад может осуществляться по определенному направлению благодаря удобной делокализации электрона в нейтральном продукте фрагментации. В этом случае вновь «работают» классические правила органической химии. Делокализация электрона вследствие эффекта резонанса увеличивает стабильность аллильного или бензильного радикалов, участие α -СН связей приводит к повышенной стабильности третичных алкильных радикалов и т.д. Тем не менее следует помнить, что стабилизация заряда более существенна, чем стабилизация неспаренного электрона. Если $\text{трет-С}_4\text{H}_9^+$ стабильнее $n\text{-С}_4\text{H}_9^+$ на 1,5 эВ, то $\text{трет-С}_4\text{H}_9^\cdot$ стабильнее $n\text{-С}_4\text{H}_9^\cdot$ всего на 0,4 эВ.

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

3.1.1. Правило выброса максимального алкильного радикала

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

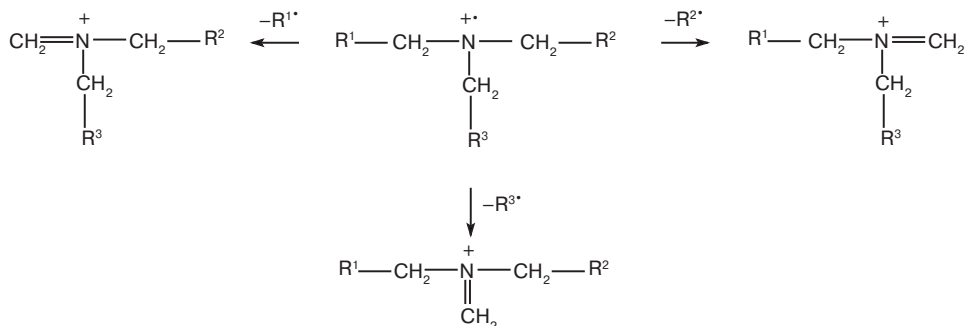


Схема 3.3

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

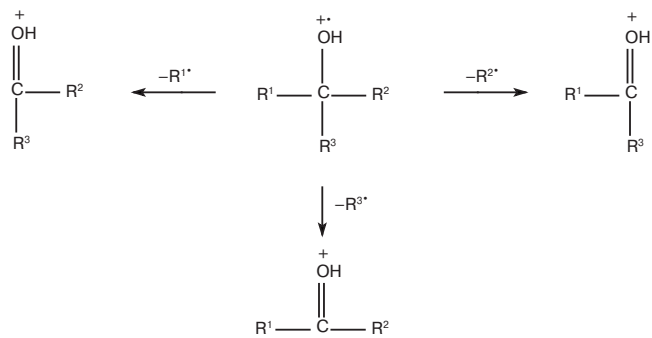


Схема 3.4

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

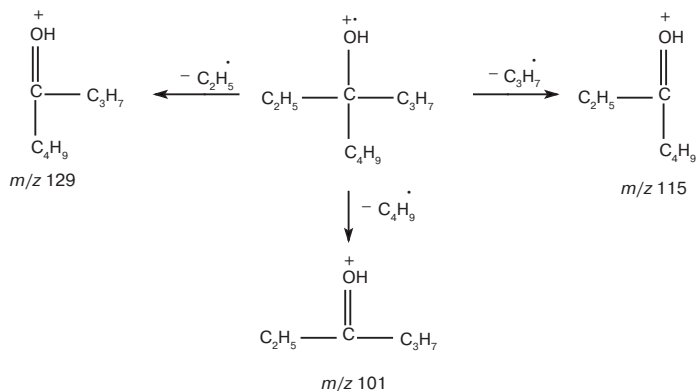


Схема 3.5

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

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

3.1.2. Правило Стивенсона (Стивенсона – Ожье)

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



Схема 3.6

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

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

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

Таблица 3.1. ЭИ фрагментов и интенсивности пиков комплементарных ионов

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

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



Схема 3.7

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

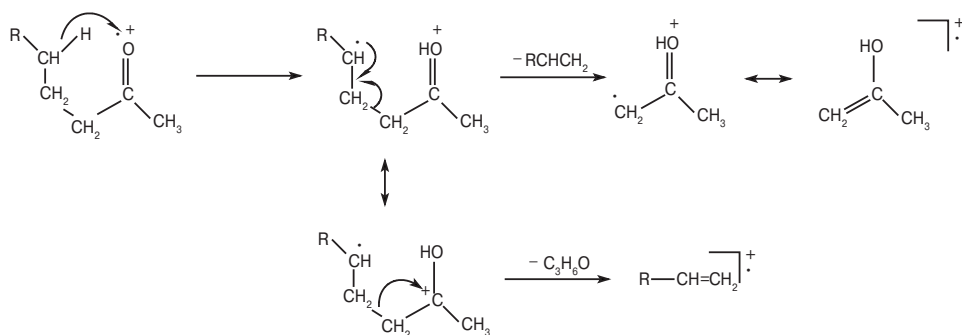


Схема 3.8a

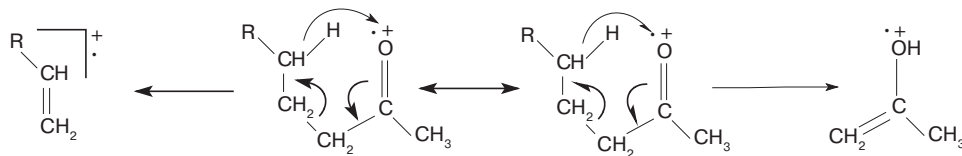


Схема 3.8б

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

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

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

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

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

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

3.1.3. Правило четноэлектронных ионов

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

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



Схема 3.9

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

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

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



Схема 3.10

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

3.1.4. Правило степеней свободы

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

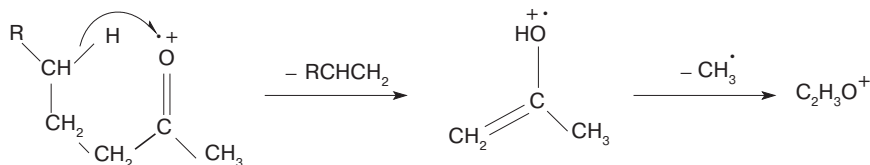


Схема 3.11

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

3.1.5. Прочность химических связей

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

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

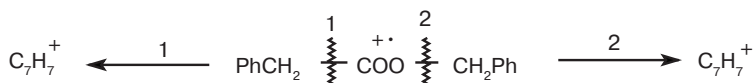


Схема 3.12

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

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

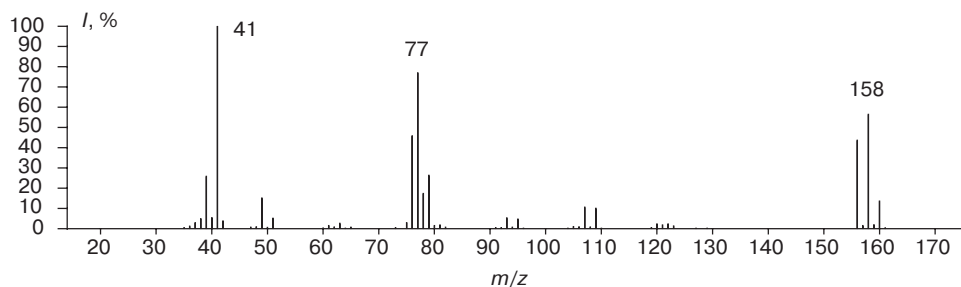


Рис. 3.2. Масс-спектр ионизации электронами 1-бром-3-хлорпропана

3.1.6. Структурные и стереохимические факторы

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

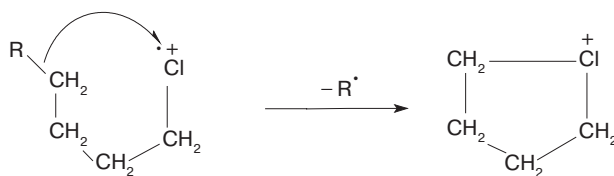


Схема 3.13

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

Любые разветвления в углеродной цепи резко снижают конкурентоспособность данного процесса.

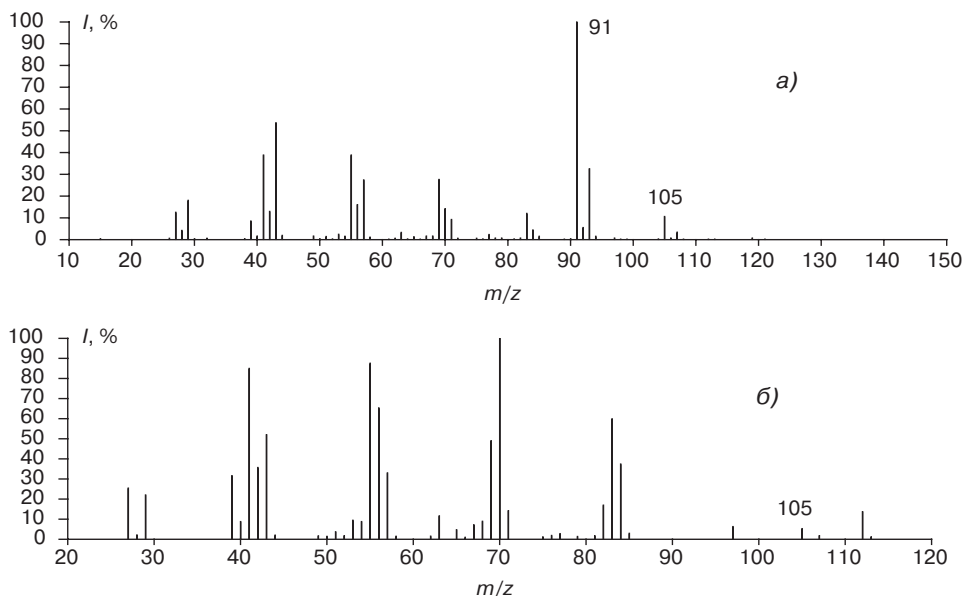


Рис. 3.3. Масс-спектр ИЭ 1-хлороктана (а), 2-хлороктана (б)

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

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

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

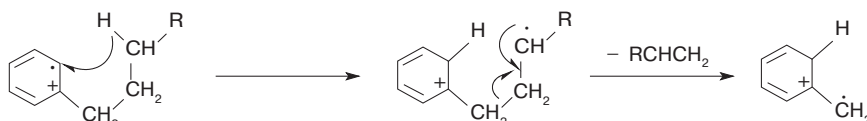


Схема 3.14

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

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

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

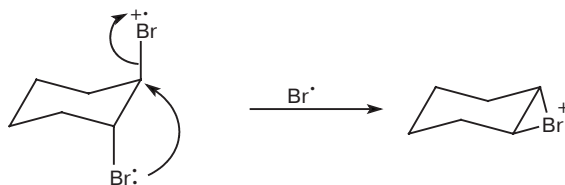


Схема 3.15

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

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

3.1.7. Орто-эффект

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

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

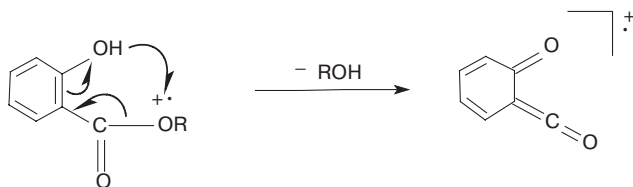


Схема 3.16

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

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

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

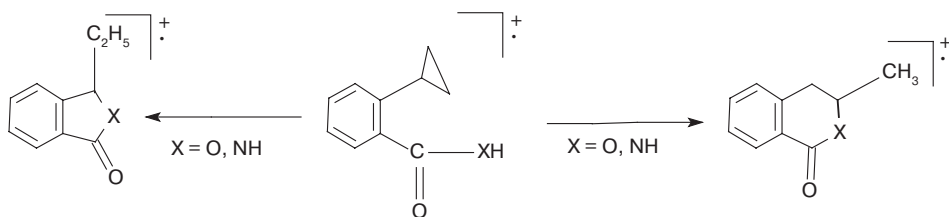


Схема 3.17

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

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

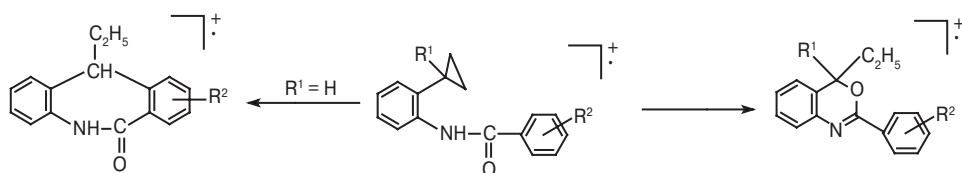


Схема 3.18

3.1.8. Масс-спектрометрия хиральных соединений

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

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

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

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

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

3.2. Концепция локализации заряда и неспаренного электрона

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

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

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

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

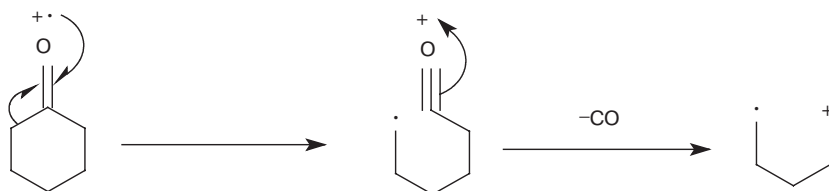


Схема 3.19

Иногда такие дистонические ионы (dystonic ions) оказываются стабильнее своих изомеров с расположением заряда и неспаренного электрона на одном атоме. Например, ион CH_3OH^+ значительно менее стабилен, чем ион $^+\text{CH}_2\text{OH}_2^+$, генерируемый при распаде этиленгликоля. Расчеты и эксперименты показали, что эти два иона находятся на дне колодцев потенциальной энергии, что не позволяет им изомеризоваться друг в друга [170].

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

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

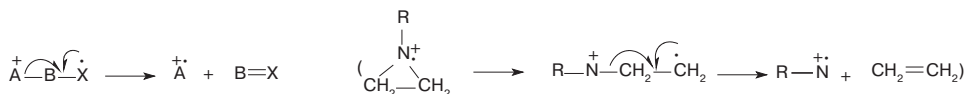
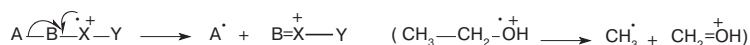


Схема 3.20

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

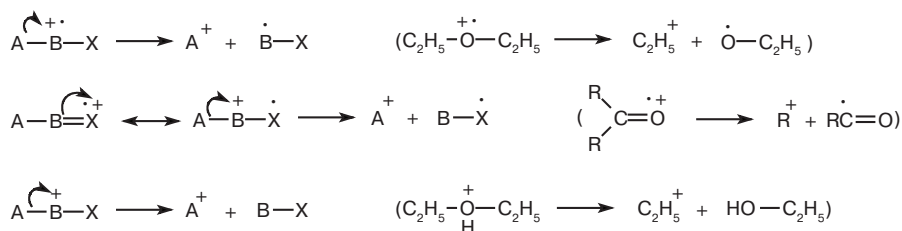


Схема 3.21

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

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

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

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

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

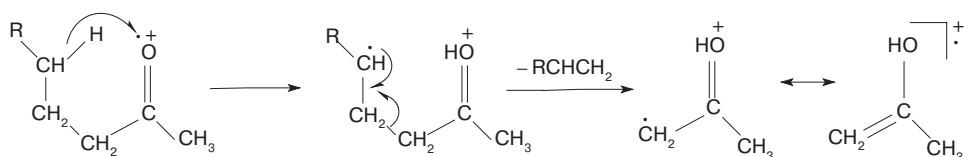


Схема 3.22

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



Схема 3.23

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

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

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

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

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

3.2.1. Фрагментация, удаленная от места локализации заряда

Отмечены случаи, когда определенные процессы распада идут без видимого участия со стороны центра, несущего заряд [172–177]. Это явление получило название фрагментации, удаленной от места локализации заряда (charge remote fragmentation). Хорошим примером является фрагментация анионов жирных кислот (схема 3.24).

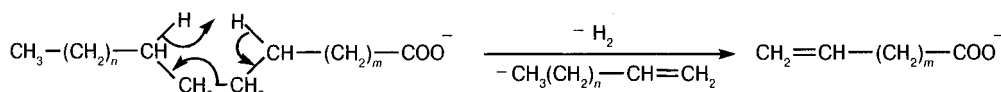


Схема 3.24

Реакция идет именно по указанному на схеме механизму [174], что было доказано спектрами дейтерированных аналогов, а также регистрацией нейтральных частиц методом нейтрализации-реионизации (разд. 7.5). Отщепляются именно молекулы водорода и алкена. Эксперимент с холестериновым производным показал, что скручивание молекулы с приближением в пространстве разрывающихся связей к заряженному центру в данном случае роли не играет, т.е. идет именно удаленная от места локализации заряда фрагментация. Для протекания такого процесса необходима цепочка из не менее чем четырех атомов углерода, причем интенсивность процессов возрастает с увеличением длины алкильной цепи.

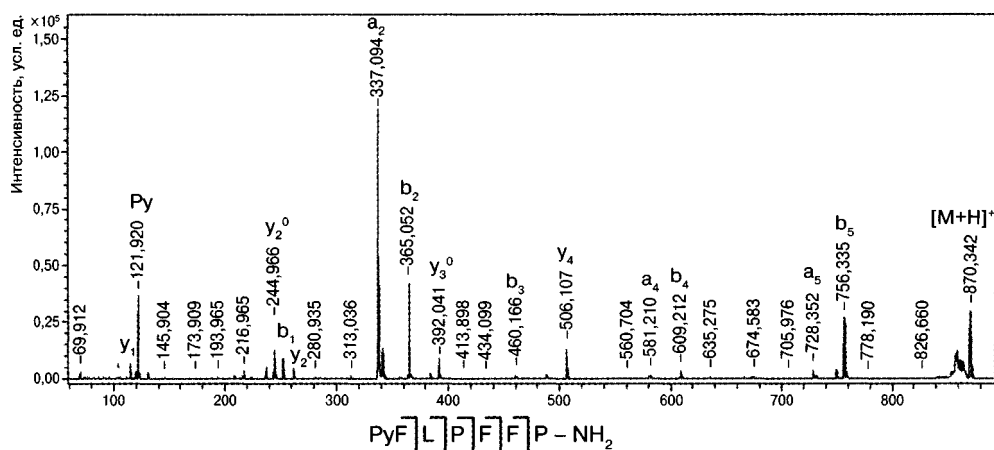


Рис. 3.4. Масс-спектр МАЛДИ-ВП/ВП пирилевого производного пептида FLPFFP-NH₂ с фиксированным зарядом на N-конце

Аналогичные процессы зарегистрированы при распаде анионов алкилсульфатов, алкилсульфонатов, N-ацилированных аминокислот, при активации соударением четвертичных алкиламмониевых и алкилфосфониевых ионов, протонированных молекул алкиламинов [174].

Впервые явление удаленной фрагментации было обнаружено при проведении исследований на магнитном масс-спектрометре с тремя секторами [172], который в дальнейшем был использован для изучения удаленной фрагментации в случае

различных субстратов. Ключевым моментом в этих экспериментах было использование высокоэнергетических соударений для инициирования фрагментации.

Фрагментация, удаленная от места локализации заряда, очень характерна для пептидов и других биологических молекул в экспериментах МАЛДИ, особенно в случае производных с фиксированным зарядом. На рис. 3.4 представлен спектр МАЛДИ-ВП/ВП пептида FLPPFP-NH₂, модифицированного по N-концу введением пирилеевой группы с фиксированным положительным зарядом (разд. 11.1). Образовавшаяся монопротонированная молекула (m/z 870,342) имеет четко локализованный заряд, однако интенсивная фрагментация, удаленная от места заряда, позволяет прочесть всю последовательность аминокислотных звеньев в молекуле [178].

Процессы удаленной фрагментации можно активировать при использовании тандемной ВП/ВП масс-спектрометрии, которая имеет много общего с масс-спектрометрией на секторных магнитных приборах. Это касается и фокусировки ионов по энергиям, и высокой энергии соударений, поскольку, выходя из источника, ионы ускоряются высоким потенциалом [179]. С помощью этого подхода можно делать важные структурные выводы, включая установление положения двойной связи, мест сочленения циклов, мест разветвления скелета, наличия функциональных групп для жирных кислот [180], триглицеридов [181], углеводов [182], пептидов [183]. В работе [184] продемонстрирована возможность расшифровки структуры для сульфатов стероидов.

ГЛАВА 4

ПРАКТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИНТЕРПРЕТАЦИИ МАСС-СПЕКТРОВ

Итак, вы держите в руках масс-спектр органического соединения. С чего начинать процесс расшифровки? К этому времени желательно иметь исчерпывающую информацию об истории появления данного образца. Здесь важны любые данные (метод синтеза и выделения, природа исходных реагентов и растворителей, наличие примесей и т.д.). Первым делом имеет смысл свериться с компьютерными библиотеками спектров (разд. 4.4). В идеале задача будет решена на этой стадии. В любом случае полученная при сравнении нового спектра со спектрами известных соединений информация может помочь отнести образец к конкретному классу соединений, сделать выводы о наличии каких-либо функциональных групп.

Далее следует оценить общий вид спектра: отметить параметры съемки, обратить внимание на наиболее интенсивные пики, на характерные группы пиков. Если, например, спектр характеризуется большим количеством фрагментов, пики которых имеют все большую интенсивность при движении вниз по шкале масс, скорее всего, образец является алифатическим соединением. Напротив, редкие интенсивные пики характерны для ароматических структур. Однако начинать основную работу со спектром следует с установления пика молекулярного иона.

4.1. Молекулярный ион

Информация, которую можно извлечь, анализируя область молекулярного иона, поистине огромна. Масса M^{+} — это молекулярная масса анализируемого соединения. Соотношение изотопных пиков (см. ниже) позволяет установить примерный элементный состав, а измерение точной массы M^{+} с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения — точный элементный состав соединения. Относительная интенсивность пика M^{+} позволяет сделать определенные предположения о его структуре, принадлежности анализируемого соединения к тому или иному классу. Например, для углеводородов относительная интенсивность M^{+} в полном ионном токе увеличивается по мере увеличения степени ненасыщенности соединения. Доказательством этого положения может служить ряд интенсивностей (в полном ионном токе) пиков молекулярных ионов углеводородов с десятью атомами углерода в молекуле: декан — 1,0%, децен-1 — 1,1%, бутилциклогексан — 4,2%, декадиен — 4,6–4,7%, 2,6-диметилоктатриен — 2,4,6–7,5%, бутилбензол — 10,2%, 1-фенилбутен-2 — 11,0%, 1-метил-1Н-инден — 19,9%, нафталин — 58,7%.

К сожалению, в масс-спектрах многих соединений в условиях ИЭ пик молекулярного иона отсутствует, он нестабилен [119]. В связи с этим необходимо научиться правильно устанавливать пик M^{+} в спектре. Существует четыре необ-

ходимых, но недостаточных условия для того, чтобы считать пик молекулярным. Ион должен:

- 1) иметь самую большую массу в спектре (разд. 4.2);
- 2) быть нечетноэлектронным;
- 3) быть способным образовать важнейшие ионы с большой массой за счет выброса реальных нейтральных частиц;
- 4) включать все элементы, наличие которых в образце можно увидеть по фрагментным ионам.

Если хотя бы одно из условий не выполняется, ион не молекулярный. Если выполняются все четыре условия, ион может быть молекулярным.

Рассмотрим подробнее эти условия. Первое положение очевидно, поскольку масса целой молекулы заведомо больше массы любого ее фрагмента.

Количество электронов в ионе (четно-нечетноэлектронность) можно проверить с помощью формулы расчета степени его ненасыщенности (уравнение (4.1)):

$$R = x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1, \quad (4.1)$$

где R — степень ненасыщенности (число кратных связей и циклов в ионе); x, y и z — индексы в брутто-формуле иона $C_xH_yN_zO_n$. Понятно, что степень ненасыщенности можно определить только после установления элементного состава иона. Если в состав входят другие элементы, индексы x, y, n, z будут суммами атомов соответствующих валентностей (C и $Si - 4 - x$, N и $P - 3 - z$, O и $S - 2 - n$, H и $Hal - 1 - y$).

Необходимо отметить, что если перечисленные элементы присутствуют в других степенях окисления, формула может привести к неправильному результату. Например, используя стандартные значения для серы и фосфора (2 и 3 соответственно) в группах SO_2 или PO_4^{3-} , вычисления по стандартной формуле приведут к неправильному результату. Для примера можно взять тетрагидротиофен, а также его моно- и диоксид. Хотя очевидно, что степень ненасыщенности этих соединений 1, 2 и 3 соответственно, расчет по формуле (4.1) всегда дает 1. Причина в том, что валентность серы во втором случае 4, а в третьем — 6. Еще более интересный пример — SF_6 . Расчет по формуле (4.1) дает отрицательную величину степени ненасыщенности (–2).

$$R = 1 + 1/2 \sum n_v (v - 2). \quad (4.2)$$

Если валентность элемента в составе соединения известна, степень ненасыщенности можно рассчитать правильно по формуле (4.2), где n_v — число атомов элементов с валентностью v [185]. В частности, для всех приведенных выше соединений расчет по формуле (4.2) даст правильные результаты: 1, 2, 3 и 0 соответственно. Кстати, в природных смесях углеводородов степень ненасыщенности не может быть выше 90% от числа атомов углерода в молекуле. Варианты формул для максимальной степени ненасыщенности разных соединений можно найти в работе [186].

Определив R , мы устанавливаем не только степень ненасыщенности иона, но и количество электронов в нем. Если R — целое число, ион нечетноэлектронный и, следовательно, может быть молекулярным; если R — дробное, ион четноэлектронный и молекулярным быть не может.

В качестве примера вычислим степень ненасыщенности ионов состава $C_5H_9N_3O_2ClBr$ и $C_{12}SiH_{11}PSBr_3$. В первом случае $x = 5$, $y = 9 + 1 + 1 = 11$, $z = 3$, $n = 2$. Тогда $R = 5 - 11/2 + 3/2 + 1 = 2$, т.е. ион содержит две двойные связи, или одну тройную связь, или два цикла, или цикл и двойную связь. Кроме того, поскольку R – целое число, такой ион, будучи нечетноэлектронным, может быть молекулярным.

Во втором случае $x = 12 + 1 = 13$, $y = 11 + 3 = 14$, $z = 1$, $n = 1$, т.е. $R = 13 - 7 + 1/2 + 1 = 7,5$. Следовательно, степень ненасыщенности иона 7, а дробная величина указывает на то, что ион является четноэлектронным и не может быть молекулярным.

Альтернативным вариантом расчета степени ненасыщенности может служить способ замены гетероатомов углеводородными фрагментами. Все одновалентные элементы (за исключением водорода) заменяются группами CH_3 , двухвалентные – CH_2 , трехвалентные – CH , четырехвалентные (за исключением самого углерода) – C . Полученная формула сравнивается с формулой алкана с таким же содержанием атомов углерода. Разность между количеством атомов водорода в алкане ($2n + 2$) и в образце, деленная на два, дает величину R . Для разобранных выше примеров получаем:

$C_5H_9N_3O_2ClBr = C_5H_9 + 3CH + 2CH_2 + 2CH_3 = C_{12}H_{22}$. Брутто-формула соответствующего алкана (додекана) $C_{12}H_{26}$. Значит, $R = (26 - 22)/2 = 2$.

$C_{12}SiH_{11}PSBr_3 = C_{12}H_{11} + C + CH + CH_2 + 3CH_3 = C_{18}H_{23}$. Брутто-формула соответствующего алкана (октадекана) $C_{18}H_{38}$. Следовательно, $R = (38 - 23)/2 = 7,5$.

Третье необходимое условие позволяет проверить правильность выбора $M^{+\cdot}$ на основании первичных фрагментных ионов. Обычно $M^{+\cdot}$ легко отщепляет простейшие молекулы: CO , CO_2 , H_2O , C_2H_4 , $HHal$; радикалы $Alk\cdot$, $H\cdot$, $Hal\cdot$, $OH\cdot$ и т.д. Следует помнить, что **потери из $M^{+\cdot}$ от 5 до 14 или от 21 до 25 атомных единиц массы, приводящие к возникновению интенсивных пиков ионов, крайне маловероятны**. Если в спектре такие пики все же присутствуют, пик $M^{+\cdot}$, по-видимому, выбран неверно; или в образце имеются примеси. Например, если в масс-спектре чистого соединения самый тяжелый ион имеет массу 120, а следующий за ним – 112, ион 120 – не молекулярный, а фрагментный, т.е. в данном случае $M^{+\cdot}$ нестабилен и не регистрируется в спектре. Другим объяснением может быть наличие в образце соединения с массой 120 примеси, в спектре которой присутствует пик иона с массой 112.

Весьма подозрительны также выбросы из $M^{+\cdot}$ частиц с массой 37 и 38 дальтон. Если известен элементный состав соединения, возникают дополнительные возможности. Так, выброс частицы с массой 33 дальтона возможен только в случае элиминирования радикала $SH\cdot$. Аналогично, присутствие в молекуле образца атома хлора делает возможным выброс из $M^{+\cdot}$ 35 единиц массы, что крайне маловероятно при отсутствии хлора в образце.

Четвертое условие также достаточно очевидно. Проиллюстрировать его можно следующим примером. Если где-нибудь в средней части спектра чистого соединения (например, в области m/z 100–200) отчетливо проявляются пики с изотопным соотношением, характерным для брома, хлора и т.д. (разд. 4.2), а кандидат в $M^{+\cdot}$ в области m/z 300–400 явно не содержит таких атомов, это не молекулярный ион.

Эти четыре условия хорошо работают для органических соединений с молекулярными массами до ~500 дальтон. При расширении диапазона масс необходимо

использовать более сложные правила. В частности, в работе [187] предложены семь «золотых» правил, по которым можно устанавливать молекулярные ионы соединений на основе информации об их точной молекулярной массе.

Задача 4.1. Может ли ион с максимальной массой быть молекулярным и обусловить образование последующей серии фрагментов?

- А) 130, 129, 115, 113, 102, 101, 97 ...;
- Б) 128, 127, 120, 113, 100 ...;
- В) 100, 82, 78, 77, 66, 65, 57 ...;
- Г) 162, 161, 147, 134, 115, 105...;
- Д) 178, 177, 176, 152, 151 ...;
- Е) 154, 153, 152, 151, 150, 127, 126 ...;
- Ж) 143, 142, 128, 125, 119, 115 ...;
- З) 124, 123, 111, 109, 107, 106, 96, 95 ...;
- И) 220, 219, 218, 217, 201, 205, 185, 163 ...;
- К) 179, 178, 161, 150, 136 ...;
- Л) 100, 85, 71, 70, 69, 57 ...;
- М) 58, 57, 43, 29, 28, 27, 15 ...;
- Н) 100, 99, 85, 81, 57 ...

Задача 4.2. Может ли ион с максимальной массой быть молекулярным и обусловить образование последующей серии фрагментов?

- А) $C_{10}H_{14}$, $C_{10}H_{13}$, $C_{10}H_{11}$, C_9H_{11} , C_9H_9 , C_8H_9 , C_7H_7 ...;
- Б) $C_{12}H_{15}O_2$, $C_{10}H_{10}O$, $C_9H_{12}O_2$, $C_8H_{10}O$, $C_{10}H_{13}$...;
- В) C_8H_{12} , C_8H_{11} , C_7H_9 , C_6H_{12} , C_6H_7 ...;
- Г) $C_{13}H_{15}NO_2$, $C_{13}H_{14}NO_2$, $C_{12}H_{12}NO_2$, $C_9H_6NO_2$, $C_{13}H_{15}NO$, $C_{13}H_{15}O$, $C_{12}H_{15}$...;
- Д) $C_{10}H_8$, $C_{10}H_7$, $C_{10}H_6$, $C_{10}H_5$, C_8H_6 , C_8H_5 ...;
- Е) $C_{10}H_{10}O_4$, $C_9H_8O_3$, $C_9H_7O_3$, $C_8H_7O_2$...;
- Ж) $C_{10}H_{12}N$, $C_{10}H_{11}N$, C_9H_9N , C_8H_7N , C_9H_{11} ...;
- З) C_7H_7ClO , C_7H_6ClO , C_6H_6Cl , C_7H_7O , C_7H_6O ...;
- И) $C_{10}H_7Cl$, $C_{10}H_6Cl$, $C_{10}H_5Cl$, $C_{10}H_7$, $C_{10}H_6$, C_9H_7 ...;
- К) C_4H_8 , C_4H_6 , C_3H_5 , C_3H_4 , C_2H_5 , C_2H_4 ...;
- Л) $C_8H_{13}N_3O_2$, $C_8H_{12}N_3O_2$, $C_7H_{10}N_3O_2$, $C_8H_{13}N_2O$, $C_7H_{10}NO_3$, $C_7H_{13}N_2$...;
- М) $C_{10}H_{12}N_2OCl_2$, $C_{10}H_{12}N_2O$, $C_9H_9N_2OCl_2$, $C_9H_{11}NOCl_2$, $C_8H_{12}N_2OCl_2$;
- Н) $C_{10}H_{15}N_3OClBr$, $C_9H_{12}N_3OClBr$, $C_{10}H_{13}N_3ClBr$, $C_{10}H_{14}N_3OCl$.

4.2. Определение элементного состава ионов на основании изотопных пиков

Как уже отмечалось выше, масс-спектрометрия высокого разрешения способна определить точный элементный состав ионов. Однако благодаря тому, что большинство химических элементов имеет несколько стабильных изотопов, элементный состав ионов можно с определенной степенью надежности установить по обычным (низкого разрешения) спектрам. Присутствие изотопов можно наглядно продемонстрировать масс-спектрами ИЭ сероуглерода (рис. 4.1а), этилхлорида (рис. 4.1б) и этилбромиды (рис. 4.1в).

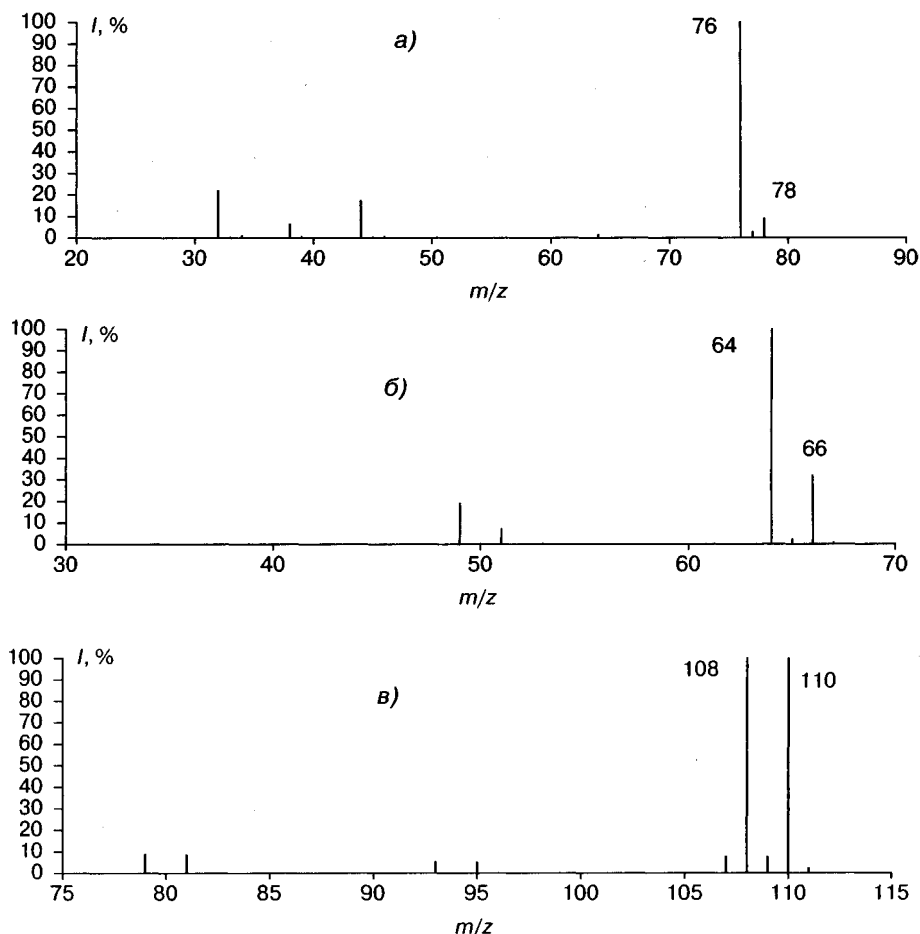


Рис. 4.1. Масс-спектры ИЭ сероуглерода (а), этилхлорида (б), этилбромид (в)

Вывод о том, что ионы с массами 76 (рис. 4.1а), 64 (рис. 4.1б) и 108 (рис. 4.1в) связаны с потерей двух атомов водорода из молекулярного иона, неверен. На самом деле именно эти три иона являются молекулярными, а более тяжелые на 2 дальтона ионы обусловлены тяжелыми природными изотопами атомов серы (^{34}S), хлора (^{37}Cl) и брома (^{81}Br) соответственно.

Информация, которую предоставляют изотопные пики, имеет первостепенную важность. Например, Фьен [187, 188] показал, что даже при наличии гипотетического прибора, способного измерять массу с точностью 0,1 ppm, невозможно приписать иону единственный элементный состав, если он содержит атомы C, N, H, S, O и P, а его масса выше 185,9760 дальтона.

В табл. 4.1 представлены данные по природной распространенности изотопов важнейших (для органических соединений) элементов. Эта таблица является небольшим фрагментом сводной табл. 1 (см. Приложение). В дальнейшем мы будем называть элементы А, А+1, А+2 в зависимости от того, какой изотоп они имеют, помимо основного.

Таблица 4.1. Природная распространенность изотопов химических элементов

Элемент	Изотоп	Тип изотопа	Интенсивность к Σ изотопов, %	Интенсивность к максимальному изотопу, %	Тип элемента
Водород	^1H	A	99,985	100,00	A*
	^2D	A+1	0,015	0,02	
Углерод	^{12}C	A	98,89	100,00	A+1
	^{13}C	A+1	1,11	1,12	
Азот	^{14}N	A	99,64	100,00	A+1
	^{15}N	A+1	0,36	0,37	
Кислород	^{16}O	A	99,76	100,00	A+2
	^{17}O	A+1	0,04	0,04	
	^{18}O	A+2	0,20	0,20	
Фтор	^{19}F	A	100,00	100,00	A
Кремний	^{28}Si	A	92,18	100,00	A+2
	^{29}Si	A+1	4,71	5,11	
	^{30}Si	A+2	3,12	3,38	
Фосфор	^{31}P	A	100,00	100,00	A
Сера	^{32}S	A	95,02	100,00	A+2*
	^{33}S	A+1	0,75	0,79	
	^{34}S	A+2	4,21	4,44	
	^{36}S	A+4	0,11	0,11	
Хлор	^{35}Cl	A	75,40	100,00	A+2
	^{37}Cl	A+2	24,60	32,63	
Бром	^{79}Br	A	50,57	100,00	A+2
	^{81}Br	A+2	49,43	97,75	
Иод	^{127}I	A	100,00	100,00	A

* Несмотря на присутствие изотопов A+1 у водорода и A+4 у серы, эти элементы считаются A и A+2 соответственно, так как распространенность указанных изотопов очень низка и может проявляться только при наличии очень большого числа атомов H или S в молекуле образца (разд. 4.3).

Определение элементного состава соединения следует начинать с пика M+2. Необходимо учитывать, что в случае присутствия в молекуле нескольких атомов A+2 элементов в спектре могут появиться интенсивные пики M+4, M+6 и т.д. Существует простое правило для проверки наличия в составе органического соединения основных A+2 элементов. **Если интенсивность пика M+2 составляет менее 3% от интенсивности пика M, соединение не содержит атомов хлора, брома, серы и кремния.** Правило применимо и для фрагментных ионов, а его справедливость подтверждается данными табл. 4.1. Хлор, бром, сера и кремний легко детектируются масс-спектрометрически благодаря характерной для каждого элемента мультиплетности сигнала. На рис. 4.1б и 4.1в представлены спектры соединений с одним атомом хлора и брома соответственно. Приблизительно можно считать, что в случае хлора отношение интенсивностей пиков A и A+2 составляет 3 : 1, а в случае брома – 1 : 1. Для одного атома серы это соотношение приблизительно равно 25 : 1. Наличие двух и более атомов A+2 элемента в составе иона вновь дает

уникальное соотношение изотопных пиков в мультиплете, благодаря которому природа и количество $A+2$ элементов могут быть легко установлены. Например, в спектре сероуглерода (рис. 4.1а) соотношение интенсивностей пиков M и $M+2$ составляет $\sim 11 : 1$.

Ион, содержащий n атомов $A+2$ элемента будет характеризоваться $n+1$ пиками, отстоящими друг от друга на 2 атомных единицы массы. Интенсивность этих пиков можно рассчитать по формуле биномиального распределения (уравнение (4.3)), где a и b – природное соотношение изотопов соответствующего элемента (для $Cl - 1$ и $0,325$; для $Br - 1$ и $0,98$; для $S - 1$ и $0,044$), а n – число таких атомов в ионе. Например, если ион содержит 4 атома хлора, интенсивность пика $A+4$ (третьего в мультиплете) по отношению к A составит $4 \times 3 \times 1^2 \times 0,35^2/2 = 0,635$, т.е. 63,5%.

$$(a+b)^n = a^n + na^{n-1}b + \frac{n(n-1)a^{n-2}b^2}{2!} + \frac{n(n-1)(n-2)a^{n-3}b^3}{3!} + \frac{n(n-1)(n-2)(n-3)a^{n-4}b^4}{4!} + \dots \quad (4.3)$$

Для упрощения вычислений удобно пользоваться округленными значениями распространенности изотопов в природе ($Cl - 3:1$, $Br - 1:1$, $S - 25:1$). Например, для соединения с тремя атомами хлора будут наблюдаться 4 пика ионов M , $M+2$, $M+4$ и $M+6$ с относительными интенсивностями $(3+1)^3 = 27 + 27 + 9 + 1$.

На рис. 4.2 представлены частичные масс-спектры ИЭ (область высоких значений m/z) тетрахлорбифенила и тетрабромбифенила. На спектрах отчетливо видны кластеры изотопных ионов с содержанием 4, 3 и 2 атомов хлора (брома) в молекуле.

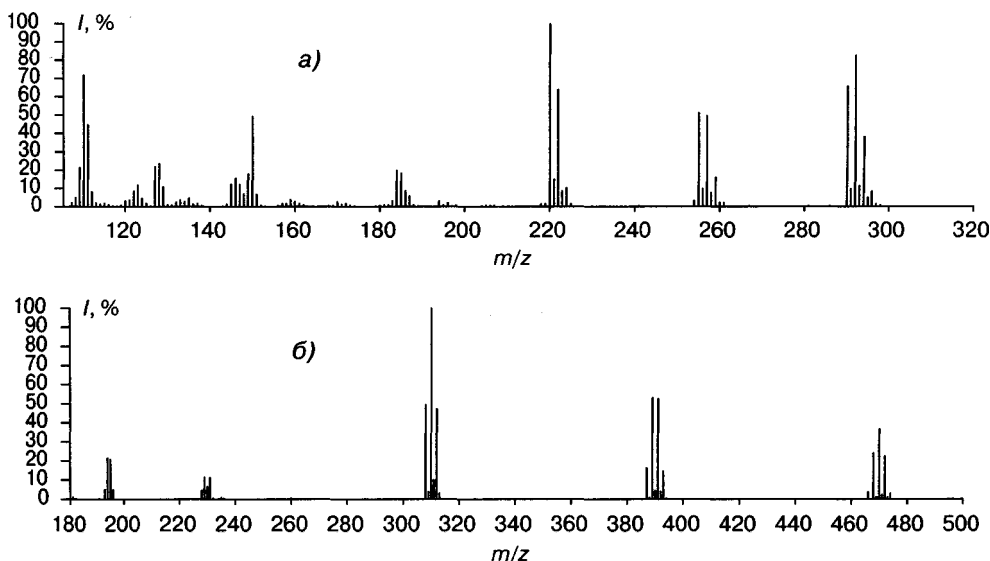


Рис. 4.2. Частичный масс-спектр ИЭ (область высоких значений m/z): тетрахлорбифенила (а), тетрабромбифенила (б)

Если в ионе имеется два разных A+2 элемента, расчет интенсивностей сигналов в мультиплете осуществляется с помощью матричного перемножения. Например, для дибромдихлорбензола $C_6H_2Br_2Cl_2$ в мультиплете (без учета изотопов углерода) будет 5 сигналов, отстоящих друг от друга на две единицы массы. Расчет интенсивностей внутри этого мультиплета можно провести следующим образом:

два атома хлора $(3+1)^2$ дадут триплет с соотношением 9 : 6 : 1;

два атома брома $(1+1)^2$ дадут триплет с соотношением 1 : 2 : 1.

Перемножая матрично одно на другое, получаем:

$$\begin{array}{r}
 (9 : 6 : 1) \times (1 : 2 : 1) = 9 : 6 : 1 \\
 18 : 12 : 2 \\
 9 : 6 : 1 \\
 \hline
 9 : 24 : 22 : 8 : 1
 \end{array}$$

Таким образом, относительные интенсивности пиков в мультиплете будут 9 : 24 : 22 : 8 : 1, или, нормируя на 100%, – 37,5 : 100 : 92 : 33 : 4. Как видно из данного примера, интенсивность пика М может оказаться меньше интенсивностей изотопных пиков.

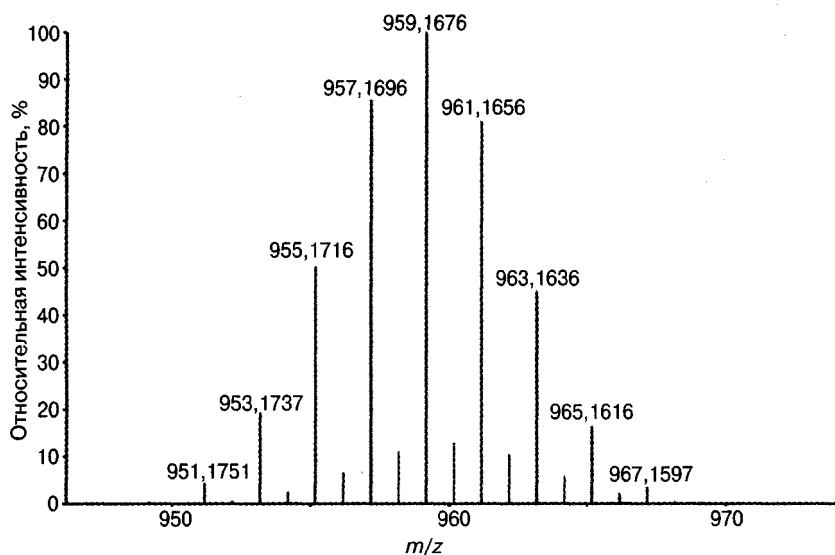


Рис. 4.3. Масс-спектр электронной ионизации декабромдифенилового эфира. Обратите внимание на нечетную массу основных изотопов в кластере молекулярного иона

При работе с полигалогенированными соединениями (Cl, Br, I) следует учитывать еще одну интересную особенность. Изотопы этих элементов имеют значительный отрицательный дефект масс (разд. 6.3). Например, присутствие в молекуле каждого нового атома брома (изотоп ^{79}Br) приводит к уменьшению точной массы соединения на 0,0817 атомных единиц массы (табл. 2 Приложения). Поэтому точная масса таких соединений будет ниже значения, полученного простым сум-

мированием целочисленных масс элементов. Наличие в молекуле 7 атомов брома приведет к тому, что точная масса соединения (молекулярного иона) будет меньше целочисленной более чем на 0,5 Да. Это означает, что прибор низкого разрешения будет регистрировать все пики изотопного кластера с массой на 1 единицу меньше. Например, в масс-спектре известного ксенобиотика декабромдифенилового эфира (рис. 4.3) все пики кластера молекулярного иона имеют нечетную массу. Это может заставить неопытного пользователя предположить наличие в молекуле атома азота (разд. 4.2.1). Наличие в молекуле 6 атомов брома приводит к тому, что точная масса молекулы оказывается почти на 0,5 Да ниже целочисленного значения. При небольших флуктуациях в измерении массы в каждом сканировании прибор может приписывать значение то N , то $N+1$. Это приведет к искажению изотопной картинки.

Задача 4.3. Определите интенсивность пика $M+8$ по отношению к M в спектре соединения, содержащего:

- А) 5 атомов хлора;
- Б) 6 атомов брома;
- В) 5 атомов серы (без учета вклада ^{33}S и ^{36}S);
- Г) 4 атома хлора.

Задача 4.4. Определите интенсивность пика $M+6$ по отношению к M в спектре соединения, содержащего:

- А) 4 атома хлора;
- Б) 7 атомов брома;
- В) 6 атомов серы (без учета вклада ^{33}S и ^{36}S);
- Г) 2 атома хлора и 3 атома брома;
- Д) 3 атома брома и 2 атома хлора;
- Е) 4 атома брома и 2 атома серы (без учета вклада ^{33}S и ^{36}S);
- Ж) 3 атома хлора и 3 атома серы (без учета вклада ^{33}S и ^{36}S);
- З) 3 атома хлора и 3 атома брома;
- И) 2 атома хлора и 4 атома брома.

Кислород формально также считается $A+2$ элементом, однако природная распространенность изотопа ^{18}O составляет всего 0,2% от основного изотопа ^{16}O . В связи с этим надежно определить точное число атомов кислорода по интенсивности изотопных пиков в реальном спектре практически невозможно. Тем не менее делать определенные предположения о числе атомов кислорода в молекуле вполне правомерно. Например, если интенсивность пика иона $M+2$ в спектре образца с небольшим числом атомов углерода в молекуле больше 0,5% от интенсивности M^+ , можно предположить, что в состав соединения входит один или более атом кислорода.

После того как удалось установить присутствие в анализируемом образце $A+2$ элементов, необходимо перейти к определению $A+1$ элементов. Для этого следует рассмотреть интенсивность пика $M+1$ ($F+1$ для фрагментных ионов). $A+1$ элементы — углерод, водород и азот, причем на практике водород можно исключить, так как природное содержание дейтерия незначительно и начинает проявляться только в спектрах соединений с очень высоким содержанием этого элемента. В случае фрагментных ионов необходимо учесть, что ион $F+1$ может быть составным. Помимо изотопного иона, такую же величину m/z может иметь фрагмент с другим элементным составом.

Углерод является важнейшим элементом органических соединений. В зависимости от происхождения анализируемого образца содержание изотопа ^{13}C может колебаться в диапазоне 1,08–1,12% от ^{12}C . Хотя существуют специальные масс-спектрометрические подходы для определения точного содержания ^{13}C в образце (масс-спектрометрия изотопных отношений [189]) и, как следствие, определения происхождения данного образца (разд. 4.2.2), для целей интерпретации масс-спектров органических соединений обычно используется величина отношения ^{13}C к ^{12}C 1,1%. Именно эту величину следует использовать и при решении всех задач, представленных в данном учебном пособии.

Таблица 4.2. Вклад изотопов углерода в интенсивности пиков изотопных ионов. Интенсивность основного пика (A) принята за 100%

Число атомов углерода в молекуле	A+1	A+2	A+3	A+4	A+5
1	1,1	0	0	0	0
2	2,2	0,01	0	0	0
3	3,3	0,03	<0,01	0	0
4	4,4	0,07	<0,01	<0,01	0
5	5,5	0,12	<0,01	<0,01	<0,01
6	6,6	0,18	<0,01	<0,01	<0,01
7	7,7	0,25	<0,01	<0,01	<0,01
8	8,8	0,34	<0,01	<0,01	<0,01
9	9,9	0,44	0,01	<0,01	<0,01
10	11,0	0,54	0,02	<0,01	<0,01
11	12,1	0,67	0,02	<0,01	<0,01
12	13,2	0,80	0,03	<0,01	<0,01
13	14,3	0,94	0,04	<0,01	<0,01
14	15,4	1,10	0,05	<0,01	<0,01
15	16,5	1,27	0,06	<0,01	<0,01
16	17,6	1,45	0,07	<0,01	<0,01
17	18,7	1,65	0,09	<0,01	<0,01
18	19,8	1,86	0,11	<0,01	<0,01
19	20,9	2,07	0,13	<0,01	<0,01
20	22,0	2,30	0,15	<0,01	<0,01
30	33,0	5,26	0,54	0,04	<0,01
40	44,0	9,44	1,32	0,13	0,01
50	55,0	14,8	2,54	0,32	0,03
60	66,0	21,4	4,55	0,71	0,09
70	77,0	29,2	7,29	1,34	0,19
80	88,0	38,2	10,9	2,32	0,39
90	99,0	48,5	15,6	3,74	0,68
100	110	59,9	21,5	5,74	1,21

Наличие одного атома углерода в молекуле метана приводит к появлению наряду с пиком M^{+} с m/z 16 пика иона с m/z 17 и интенсивностью 1,1% от M^{+} за счет молекул $^{13}\text{CH}_4$, количество которых в природе составляет 11 на каждые 1000 молекул $^{12}\text{CH}_4$. Увеличение числа атомов углерода в молекуле приводит к увеличению интенсивности пика ионов $\text{M}+1$ до величины 1,1 n %, где n – число атомов

углерода в молекуле. Для определения числа атомов углерода в молекуле по масс-спектру необходимо разделить интенсивность пика $M+1$ в процентах от M на 1,1. Полученное частное означает максимально возможное число атомов углерода в молекуле. Надо помнить, что расчет может оказаться сложнее (см. ниже) при наличии интенсивного пика иона $[M-H]^+$.

Большое число атомов углерода приводит к увеличению вероятности одновременного присутствия в молекуле двух и большего числа атомов ^{13}C , что вызывает рост интенсивностей пиков изотопных ионов $[M+2]$, $[M+3]$ и т.д. (табл. 4.2). Для каждого атома другого элемента, присутствующего в ионе, необходимо увеличить интенсивность пика $A+1$ на 0,37% (для азота), на 0,04% (для кислорода), на 5,1% (для кремния), на 0,8% (для серы); а пика $A+2$ — на 0,2% (для кислорода), на 3,4% (для кремния), на 4,4% (для серы), на 32,5% (для хлора), на 98,0% (для брома). Другие элементы периодической системы также характеризуются уникальным изотопным составом, что позволяет детектировать их по изотопным пикам в масс-спектре.

Величину изотопного пика за счет присутствия в молекуле нескольких изотопов углерода ^{13}C легко рассчитать самостоятельно. Интенсивность пика $A+2$ (в % к пику A) для соединения содержащего n атомов углерода определяется по формуле:

$$I(\%) = 100C_n^2 (0,011)^2. \quad (4.4)$$

Интенсивность пика $A+3$ (в % к пику A) для соединения, содержащего n атомов углерода, определяется по формуле:

$$I(\%) = 100C_n^3 (0,011)^3. \quad (4.5)$$

Интенсивность пика $A+4$ (в % к пику A) для соединения, содержащего n атомов углерода, определяется по формуле:

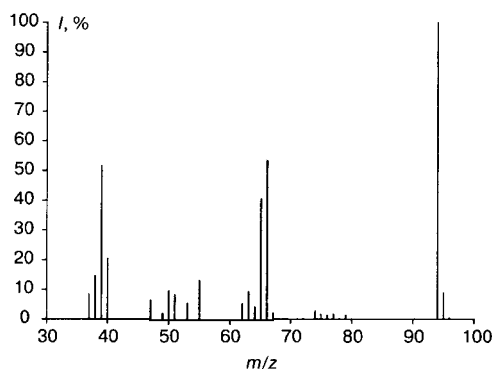
$$I(\%) = 100C_n^4 (0,011)^4. \quad (4.6)$$

В общем виде интенсивность пика $A+m$ (в % к пику A) для соединения, содержащего n атомов углерода, определяется по формуле:

$$I(\%) = 100C_n^m (0,011)^m. \quad (4.7)$$

На этой стадии расшифровки спектра можно не учитывать вклад атомов азота в сигнале $M+1$, поскольку соответствующие коррективы будут внесены в дальнейшем. После подсчета числа атомов углерода по пику $M+1$ необходимо внести коррективы в интенсивность пика $M+2$, в частности точнее оценить число атомов кислорода.

В качестве примера рассмотрим масс-спектр соединения в графическом и табличном виде, представленный на рис. 4.4. Молекулярный ион (m/z 94) имеет максимальную интенсивность в спектре. Относительная интенсивность пика иона $M+2$ (m/z 96) составляет 0,4% от M^{+} . Следовательно, вещество не содержит в составе хлора, брома, серы и кремния, а число атомов кислорода может составлять от 0 до 2. Относительная интенсивность пика $M+1$ (6,6%) позволяет сделать вывод о наличии шести атомов углерода в молекуле ($6,6/1,1 = 6$). По табл. 4.2 устанавливаем вклад изотопов ^{13}C в суммарную интенсивность пика $M+2$.



<i>m/z</i>	Интенс., %	<i>m/z</i>	Интенс., %
37	8,3	64	4,4
38	14,6	65	40,5
39	51,6	66	53,3
40	20,3	67	2,35
47	6,5	74	2,8
49	2,1	75	1,5
50	9,7	76	1,2
51	8,3	77	1,6
53	5,5	79	1,2
55	13,2	94	100
62	5,4	95	6,6
63	9,4	96	0,4

Рис. 4.4. Масс-спектр ИЭ соединения с молекулярной массой 94 дальтона

Для шести атомов С этот вклад составляет 0,18%. Таким образом, можно сделать вывод, что в молекуле может быть не более одного атома кислорода ($0,4 - 0,18 = 0,22$). Шесть атомов углерода весят 72 дальтона. Один атом кислорода – 16 дальтон. Суммарно – 88. Оставшиеся 6 единиц массы ($94 - 88 = 6$) могут быть обусловлены только атомами водорода. Следовательно, состав соединения: C_6H_6O . Другие варианты химически реальных составов (с атомами фтора или азота) не проходят либо по массе, либо по интенсивности изотопных пиков. На рис. 4.4 представлен масс-спектр фенола.

Всегда полезно после установления элементного состава рассчитать теоретический кластер изотопных пиков для такого состава. Это можно сделать вручную, но на многих современных коммерческих приборах программное обеспечение включает встроенные калькуляторы изотопного распределения. Соотношение изотопных пиков очень важно для правильного установления элементного состава иона даже при работе со спектрами высокого разрешения. Несколько вариантов предложенных компьютером элементных составов могут отличаться очень незначительно. В этом случае привлечение информации об изотопных пиках будет иметь решающее значение для выбора правильного варианта [187, 188].

4.2.1. Азотное правило

Для большинства элементов, входящих в состав органических соединений, имеется случайное, но очень удобное для масс-спектрометристов соответствие между валентностью и массой наиболее распространенного изотопа: оба числа либо четные, либо нечетные. Важнейшим исключением является азот. Так появилось азотное правило, кажущееся на первый взгляд весьма странным: **если соединение содержит четное число атомов азота или азота в составе нет, его молекулярная масса четная, если число атомов азота нечетное, молекулярная масса тоже нечетная**. Правило применимо не только к молекуле и молекулярному иону, но и к фрагментным ионам. В этом случае оно формулируется следующим образом: **нечетноэлектронный ион обладает четной массой, если содержит четное число атомов азота; четноэлектронный ион обладает четной массой, если содержит нечетное число атомов азота**.

Азот является A+1 элементом, причем природная распространенность изотопа ^{15}N составляет примерно 0,4% от ^{14}N . Поскольку помимо азота только углерод вносит значимый вклад в интенсивность пика A+1, пользуясь различиями в интенсивностях изотопов ^{13}C и ^{15}N и азотным правилом, можно оценить число атомов азота в молекуле.

Для расчета интенсивностей изотопных пиков за счет присутствия в молекуле атомов азота можно использовать формулы, аналогичные представленным для случая углерода. В общем виде интенсивность пика A+m (в % к пику A) для соединения, содержащего n атомов азота, определяется по формуле (4.8):

$$I(\%) = 100C_n^m (0,0037)^m. \quad (4.8)$$

Когда установлена природа и количество A+2 и A+1 элементов в молекуле, несложно сделать аналогичные заключения и о моноизотопных элементах. Эти элементы имеют специфические массы (табл. 4.1), поэтому их определение обычно не вызывает затруднений.

Следует помнить, что установление элементного состава по изотопным пикам может оказаться проблематичным, если, например, в образце были примеси с массами в области кластера молекулярного иона исследуемого соединения. Для веществ с основными функциями (например, аминов) даже в спектрах ИЭ зачастую присутствует пик иона $[\text{M}+\text{H}]^+$, искажающий изотопную картину. Необходимо также учитывать, что интенсивности пиков в реальных условиях подвержены незначительным колебаниям от спектра к спектру. Для установления точного соотношения изотопных пиков лучше всего записать несколько спектров и усреднить результаты.

Следует предостеречь, что правило перестает работать для соединений с молекулярными массами более 500 дальтон. Это связано с тем, что дефект массы для водорода, углерода и азота имеет положительное значение, и точная масса иона возрастает с увеличением числа этих элементов в молекуле. В определенный момент суммарный дефект масс оказывается более 0,5, и прибор низкого разрешения сделает ошибочный вывод о целочисленной массе молекулярного иона. Например, для соединения $\text{C}_{40}\text{H}_{71}\text{N}$ точная масса составит 565,558649 дальтона, а целочисленная масса будет определена прибором низкого разрешения как 566, т.е. четная; хотя это соединение содержит один атом азота.

Задача 4.5. Установите примерное число атомов углерода в соединениях по изотопным пикам M^{++} . В большинстве случаев спектр представлен в форме: m/z (интенсивность к максимальному пику в спектре в %). Пик молекулярного иона первый в ряду.

- А) $\text{M}^{++} - 100\%$, $\text{M}+1 - 7,8\%$, $\text{M}+2 - 0,2\%$.
- Б) $\text{M}^{++} - 100\%$, $\text{M}+1 - 0\%$, $\text{M}+2 - 0\%$.
- В) $\text{M}^{++} (m/z\ 128) - 100\%$, $\text{M}+1 (m/z\ 129) - 11,2\%$, $\text{M}+2 (m/z\ 130) - 0,5\%$.
- Г) 134 (100), 135 (6,6), 136 (33), 137 (2,1).
- Д) 133 (100), 134 (9,3), 135 (0,3).
- Е) 156 (100), 157 (2,3), 158 (0).
- Ж) 120 (100), 121 (8,6), 122 (4,7).
- З) 180 (100), 181 (4,6), 182 (98), 183 (4,5).

- И) 159 (100), 160 (10,4), 161 (33), 162 (3,4).
К) 77 (100), 78 (2,6), 79 (0).
Л) 184 (50), 185 (1,1), 186 (100), 187 (2,2), 188 (50), 189 (1,1).
М) 107 (33), 108 (2,7), 109 (0,08).

Задача 4.6. Определите элементный состав молекулярных ионов по интенсивности изотопных пиков. В большинстве случаев спектр представлен в форме: величина m/z (интенсивность к максимальному пику в спектре в %). Пик молекулярного иона первый в ряду.

- А) $M^{+•}$ (m/z 108) – 100%, $M+1$ (m/z 109) – 7,7%, $M+2$ (m/z 110) – 0,4%.
Б) 79 (100), 80 (5,9), 81 (0,1).
В) 128 (100), 129 (11,0), 130 (0,5).
Г) 98 (100), 99 (6,3), 100 (4,5).
Д) 98 (100), 99 (2,2), 100 (66,0), 101 (1,4), 102 (11,0), 103 (0,2).
Е) 208 (80), 209 (12,4), 201 (1,2).
Ж) 204 (100), 205 (7,7), 206 (0,2).
З) 85 (75), 86 (3,4), 87 (3,3).
И) 158 (100), 159 (7,4), 160 (5,2), 161 (0,2).
К) 206 (80), 207 (8,8), 208 (79), 209 (8,8), 210 (0,4).
Л) 170 (100), 171 (3,4), 172 (0,04).

Задача 4.7. Идентифицируйте соединения по изотопным пикам молекулярного иона. Спектр представлен в форме: величина m/z (интенсивность к максимальному пику в спектре в %). Пик молекулярного иона первый в ряду.

- А) 94 (100), 95 (1,1), 96 (98), 97 (1,1).
Б) 64 (100), 65 (2,2), 66 (33), 67 (0,7).
В) 64 (100), 65 (0,9), 66 (4,8).
Г) 67 (100), 68 (4,8), 69 (0,1).
Д) 142 (80), 143 (8,8), 144 (0,4).
Е) 46 (50), 47 (1,1), 48 (0,1).
Ж) 84 (75), 85 (3,9), 86 (3,3).
З) 88 (100), 89 (1,1), 90 (0).
И) 59 (50), 60 (1,3), 61 (0,1).
К) 156 (50), 157 (1,1), 158 (0).

Задача 4.8. Рассчитайте интенсивности изотопных пиков молекулярного иона для перечисленных ниже соединений:

- А) дибромметан;
Б) хлороформ;
В) четыреххлористый углерод;
Г) сероуглерод;
Д) дихлорэтан;
Е) тетрабромбензол;
Ж) бромхлорметан;
З) бромформ;
И) дибромдихлорметан.

Задача 4.9. Установите молекулярный ион и определите его элементный состав в следующих сериях. Спектр представлен в форме: величина m/z (интенсивность к максимальному пику в спектре в %).

- А) 94 (1,9), 95 (7,1), 96 (100), 97 (6,5), 98 (0,2).
- Б) 160 (0,8), 161 (1,0), 162 (100), 163 (10,8), 164 (32,9), 165 (3,6), 166 (0,2).
- В) 93 (1,1), 94 (100), 95 (3,8), 96 (8,8), 97 (0,26).
- Г) 134 (2,1), 135 (0,4), 136 (26,0), 137 (2,6), 138 (0,16).
- Д) 126 (6,0), 127 (9,8), 128 (100), 129 (11,0), 130 (0,5).
- Е) 260 (1,3), 261 (12,2), 262 (100), 263 (19,5), 264 (1,9).
- Ж) 127 (1,8), 128 (16,0), 129 (100), 130 (10,0), 131 (0,5).
- З) 121 (89,0), 122 (100), 123 (7,9), 124 (0,7).
- И) 328 (33,0), 329 (2,2), 330 (100), 331 (6,6), 332 (100), 333 (6,6), 334 (33,0), 335 (2,2).

4.2.2. Определение содержания изотопа ^{13}C в природных образцах

Круговорот углерода в природе осуществляется с участием углеродсодержащих соединений атмосферы, гидросферы, литосферы и биосферы. Определенная разница в содержании изотопа углерода ^{13}C существует между соединениями этих групп. Для оценки отклонения содержания изотопа ^{13}C от среднего значения используется шкала δ (‰). Отклонение рассчитывается по уравнению (4.9):

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_o}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_s} - 1 \right] \times 1000, \quad (4.9)$$

где индексы o и s означают соотношение изотопов углерода в образце и в стандарте. В качестве нулевой точки был выбран карбонатный материал литосферы. Наиболее близкую к этому значению величину (1,95‰) имеет стандартный образец NBS-19. Существует ряд других стандартных образцов. Например, NBS-22 нефть – (–29,74‰), NBS-18 карбонат кальция – (–5,01‰). Обычно величины $\delta^{13}\text{C}$ для растений лежат в диапазоне (–15‰)–(–30‰), для нефти – (–20‰)–(–36‰). Наиболее обеднен изотопом ^{13}C атмосферный метан. Его величина $\delta^{13}\text{C}$ составляет –47‰.

На обычных масс-спектрометрах для работы с органическими соединениями точно измерить отношение изотопов невозможно. Такие измерения являются предметом **масс-спектрометрии изотопных отношений** (Isotope ratio mass spectrometry). Для точного определения $\delta^{13}\text{C}$ образец сжигают до CO_2 и измеряют интенсивности пиков ионов с m/z 44, 45, 46. После чего проводят корректировку для устранения вклада изотопа ^{17}O . При использовании магнитного анализатора и трех детекторов для каждой массы (44, 45, 46) можно получить результаты с относительным стандартным отклонением до 0,001% [189]. Точность измерения и использование шкалы $\delta^{13}\text{C}$ позволяют получать достаточно интересные результаты, важные для решения самых разнообразных задач биологии, экологии, истории, криминалистики и т.д. В частности, анализ останков дает возможность отличить древних европейцев от американцев. Дело в том, что в Европе основной пищей была пшеница, а в Америке – кукуруза. Отличие в изотопном составе этих растений составляет несколько

единиц по шкале $\delta^{13}\text{C}$ [170]. Очень надежно определяется регион производства наркотиков, а также любых других химических соединений, подлинность предметов искусства, пищевых продуктов, напитков. Например, при анализе сока можно не просто установить наличие лимонной или аскорбиновой кислоты, но и сделать вывод, из какого фрукта эта кислота, или же она синтетическая. Ряд интересных приложений, а также подробное рассмотрение ключевых аспектов масс-спектрометрии изотопных соотношений можно найти в работах [8, 189–191].

4.2.3. Расчет изотопной чистоты соединений

Масс-спектрометрия предоставляет отличную возможность оценить число тяжелых изотопов в молекуле. Химик-органик сталкивается с такой задачей довольно часто, например, изучая механизмы реакций. Обычно синтезируют образцы, обогащенные изотопами ^2H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , хотя используют изотопы и других элементов.

Определять содержание меченых молекул в образце лучше всего по спектрам ионизации электронами, поскольку в этом случае не идут ионно-молекулярные реакции. Для расчетов можно использовать наиболее интенсивные пики в спектре, обусловленные ионами с максимальными величинами m/z . Оптимальным кандидатом является молекулярный ион. Однако, если в спектре немеченного соединения присутствуют значимые пики ионов $[\text{M}+\text{H}]^+$ или $[\text{M}-\text{H}]^+$, расчет будет затруднен. Иногда можно обойти это препятствие. Для устранения пиков ионов $[\text{M}+\text{H}]^+$ необходимо постараться записать спектр с минимально возможным напуском образца. Для учета вклада ионов $[\text{M}-\text{H}]^+$ необходимо знать, из какого положения молекулы отщепляется атом водорода, может ли в этом положении оказаться атом дейтерия. Если ответить на этот вопрос проблематично, можно попытаться поработать с ионом точно известного состава, например $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, $[\text{M}-\text{CO}]^+$, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$. Важно, чтобы рядом с выбранным ионом не было иона другого состава с массой на 1–2 дальтона легче или тяжелее.

Рассчитаем интенсивность кластера молекулярного иона образца ацетофенона, молекулы которого на 60% содержат три атома дейтерия, на 20% – два атома дейтерия, на 10% – один атом дейтерия, а 10% молекул изотопно незамещены. Составим таблицу (табл. 4.3), учитывая, что кластер молекулярного иона чистого немеченного ацетофенона имеет следующий вид: 120 (100%), 121 (8,8%), 122 (0,54%).

Таблица 4.3. Расчет интенсивностей изотопных пиков в масс-спектре дейтерированного ацетофенона

Изотопмер	m/z 120	m/z 121	m/z 122	m/z 123	m/z 124	m/z 125
d_0	100	8,8	0,54	—	—	—
d_1	—	100	8,8	0,54	—	—
d_2	—	—	100	8,8	0,54	—
d_3	—	—	—	100	8,8	0,54
10% d_0	10,0	0,88	0,05	—	—	—
10% d_1	—	10,0	0,88	0,05	—	—
20% d_2	—	—	20,0	1,76	0,11	—
60% d_3	—	—	—	60,0	5,28	0,32
$\sum d_0-d_3$	10,0	10,88	20,93	61,81	5,39	0,32
Нормализованная $\sum d_0-d_3$, %	16,2	17,6	33,9	100	8,7	0,5

Обычно приходится решать обратную задачу, когда по спектральной картине необходимо рассчитать процентное содержание соединений с разным количеством тяжелых изотопов в молекуле. Пусть для образца меченого ацетофенона получен следующий масс-спектр: 120 (20,0%), 121 (42,0%), 122 (100%), 123 (14,0%), 124 (1,0%), 125 (< 0,03%). Решать задачу лучше всего с помощью таблицы (табл. 4.4).

Ион с m/z 120 может быть обусловлен только немеченным ацетофеноном. Поскольку интенсивность пика этого иона 20%, будем считать, что в смеси 20 частей немеченого соединения. Исходя из этого, рассчитаем интенсивности пиков ионов с m/z 121 и 122, обусловленных изотопными ионами немеченого соединения. Если 100 частей этого соединения дают спектр 120 (100%), 121 (8,8%), 122 (0,54%), то 20 частей дадут – 120 (20,0%), 121 (1,76%), 122 (0,11%). Именно эти цифры представлены во втором ряду таблицы 4.4. В третьем ряду (Остаток 1) представлен спектр образца после вычета вклада немеченого соединения. Следующим шагом необходимо оценить долю монодейтерированного ацетофенона. Интенсивность 40,24 пика с m/z 121 обусловлена M^{+} этого соединения. Рассчитаем интенсивности изотопных пиков для такой доли этого продукта. Получим следующий ряд: 121 (40,24%), 122 (3,54%), 123 (0,2%). Вновь проводим вычитание этих интенсивностей из спектра (Остаток 1) и получаем Остаток 2, т.е. спектр, обусловленный только соединениями с двумя и тремя атомами дейтерия в молекуле. Повторяем эту процедуру еще дважды и получаем Остаток 4. Здесь присутствует только пик иона 124 с интенсивностью 0,03%, т.е. на уровне ошибки измерения. Таким образом, мы получили следующий ряд: d_0 – 20 частей, d_1 – 40,24 части, d_2 – 96,36 части, d_3 – 5,3 части. Принимая сумму изотопомеров за 100%, получаем доли каждого: d_0 – 12,3%, d_1 – 24,9%, d_2 – 59,5%, d_3 – 3,3%.

Таблица 4.4. Расчет доли молекул ацетофенона с различным содержанием атомов дейтерия

Изотопномер	m/z 120	m/z 121	m/z 122	m/z 123	m/z 124	m/z 125
Спектр	20,0	42,0	100	14,0	1,0	0,02
d_0	20,0	1,76	0,11	—	—	—
Остаток 1	—	40,24	99,89	14,0	1,0	0,02
d_1	—	40,24	3,54	0,2	—	—
Остаток 2	—	—	96,35	13,8	1,0	0,02
d_2	—	—	96,35	8,5	0,5	—
Остаток 3	—	—	—	5,3	0,5	0,02
d_3	—	—	—	5,3	0,47	0,02
Остаток 4	—	—	—	—	<0,03	—

Задача 4.10. Рассчитайте процентное содержание изотопомеров в спектре образца ацетофенона, характеризующегося следующим масс-спектром:

- А) 120 (15,0%), 121 (32,0%), 122 (50,0%), 123 (100%), 124 (8,7%), 125 (0,5%).
 Б) 120 (40,0%), 121 (40,0%), 122 (100%), 123 (50%), 124 (3,5%), 125 (0,25%).

Задача 4.11. Рассчитайте процентное содержание изотопомеров в спектре образца пара-метоксифенола, характеризующегося следующим масс-спектром:

- А) 123 (0,21%), 124 (30,0%), 125 (60,0%), 126 (80,0%), 127 (100%), 128 (7,7%), 129 (0,6%).
 Б) 124 (0,2%), 125 (1,2%), 126 (100%), 127 (28,0%), 128 (1,8%), 129 (0,05%).

Задача 4.12. Рассчитайте процентное содержание изотопомеров в спектре образца 4-фтор-2-метоксианизола, характеризующегося следующим масс-спектром:

- А) 155 (0,12%), 156 (20,0%), 157 (100%), 158 (12,0%), 159 (0,8%), 160 (0,02%).
Б) 155 (0,06%), 156 (10,0%), 157 (23,0%), 158 (42,0%), 159 (56,0%), 160 (100%), 167 (59,2%), 168 (3,7%), 169 (0,37%).

Задача 4.13. Рассчитайте вид спектра в области молекулярного иона для образца, содержащего 10% немеченных, 20% d_1 , 30% d_2 и 40% d_3 меченых молекул 4,7-дифторнафтилметилкетона.

4.3. Область молекулярных ионов высокомолекулярных соединений

Вид спектра тяжелых молекул (рис. 4.5) значительно отличается от классического вида спектра ИЭ. Когда речь идет о молекуле массой в несколько сот тысяч дальтон, разрешающей способности любого масс-спектрометра оказывается недостаточно для разрешения всей изотопной картины в области молекулярного иона. Обычные правила работы со спектром ИЭ, описанные выше, неприемлемы уже для соединений с молекулярной массой более 2000 дальтон. Прежде всего, это касается извлечения информации на основе интенсивностей изотопных пиков (разд. 4.2). Например, наличие в молекуле 100 атомов углерода приведет к интенсивности пика $M+1$ за счет присутствия одного атома ^{13}C , 110% от интенсивности пика M^{+} , обусловленного только атомами ^{12}C . Пики $M+2$ и $M+3$, обусловленные двумя и тремя атомами ^{13}C в молекуле, будут иметь интенсивности 60% и 22% соответственно. Даже водород, который учитывается при расшифровке спектра ИЭ как А элемент (разд. 4.2), поскольку природное содержание дейтерия составляет 0,015% от содержания протия, приведет к появлению значимого изотопного пика $M+1$, если число атомов водорода в молекуле более 100. Другие элементы, практически всегда присутствующие в составе биологических молекул (N, O, S), усложняют изотопную картину еще значительно. В результате огромное число изотопных пиков проявляется в масс-спектре в виде широкого сигнала, ширина которого может составлять тысячи дальтон.

Кроме того, для высокомолекулярных соединений кумулятивный эффект дефектов масс атомов (разд. 6.3) становится значительным и ведет к существенным отклонениям номинальной массы, рассчитанной на основе целочисленных атомных масс элементов, от регистрируемой массы (рис. 4.3). В связи с этим для спектров тяжелых соединений приходится вводить еще несколько определений молекулярной массы (рис. 4.5).

Номинальная масса — масса, рассчитанная суммированием целочисленных атомных масс наиболее распространенных (легких) изотопов элементов.

Моноизотопная масса — масса, рассчитанная суммированием точных атомных масс (с учетом дефекта массы) наиболее распространенных (легких) изотопов элементов.

Наиболее распространенная масса — масса иона, пик которого наиболее интенсивен в кластере молекулярного иона.

Средняя масса — масса, рассчитанная суммированием усредненных атомных масс элементов.

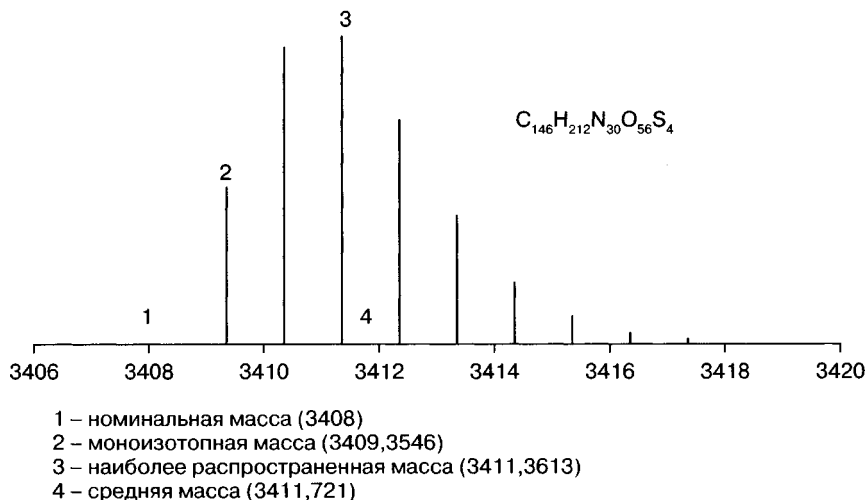


Рис. 4.5. Область молекулярного иона соединения $C_{146}H_{212}N_{30}O_{56}S_4$

На рис. 4.5 отчетливо видно различие между этими вариантами величин молекулярной массы соединения. Пик молекулярного иона с номинальной массой 3408 дальтон в спектре отсутствует, поскольку суммарный дефект массы оказывается больше 1 дальтона. Минимальную массу в спектре имеет пик с моноизотопной массой. Ее величина 3409,3546 дальтон. Интенсивность этого пика уступает интенсивности последующих трех пиков в связи с высокой вероятностью присутствия в молекуле 1–3 более тяжелых изотопов. В частности, следующий за пиком с моноизотопной массой пик $M+1$ состоит из пяти индивидуальных неразрешенных пиков, обусловленных присутствием изотопов 2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{33}S . Рассчитаем массы и относительные интенсивности этих пиков. Присутствие одного атома дейтерия в молекуле приведет к появлению пика иона с массой 3410,3580 дальтон и относительной интенсивностью (в сумме интенсивностей этих пяти пиков) 1,7%. Присутствие одного атома ^{13}C в молекуле приведет к появлению пика с массой 3410,3609 дальтон и относительной интенсивностью 89,2%. Присутствие одного атома ^{15}N в молекуле приведет к появлению пика с массой 3410,3517 дальтон и относительной интенсивностью 6,2%. Присутствие одного атома ^{17}O в молекуле приведет к появлению пика с массой 3410,3588 дальтон и относительной интенсивностью 1,2%. Наконец, присутствие одного атома ^{33}S в молекуле приведет к появлению пика с массой 3410,3540 дальтон и относительной интенсивностью 1,7%. Чтобы увидеть эти пять пиков раздельно, нужен прибор с разрешающей способностью (разд. 6.3) более 4000 000. На рис. 4.6 представлен вид изотопного пика $M+1$ в спектре соединения состава $C_{63}H_{98}N_{18}O_{13}S$ с молекулярной массой 1346,728146 в зависимости от разрешения. Полная изотопная картина с пятью изотопами от каждого элемента, присутствующего в составе соединения, становится видимой при разрешающей способности в миллионы. Основной вклад в интенсивность при этом вносит изотоп углерода ^{13}C [192].

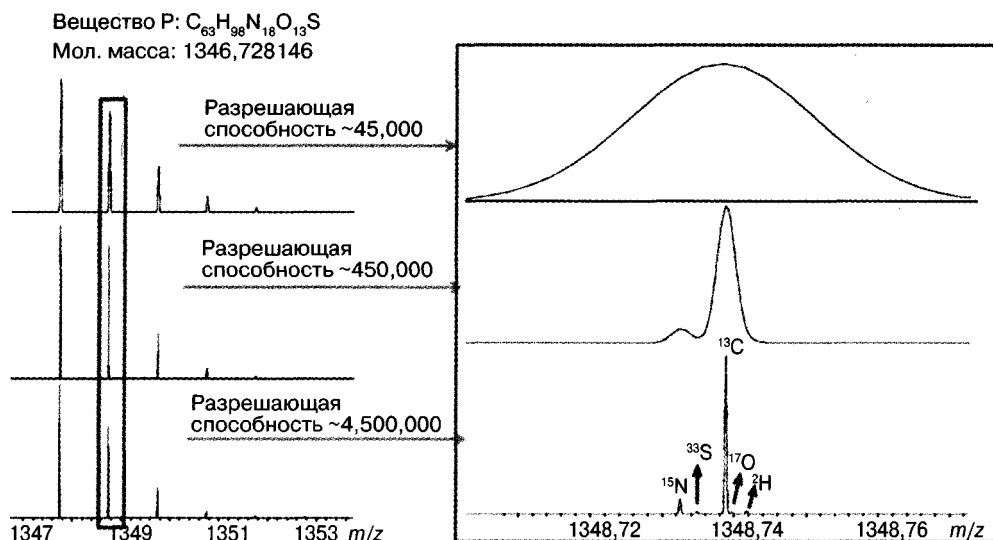


Рис. 4.6. Вид изотопного пика $M+1$ в спектре соединения состава $C_{63}H_{98}N_{18}O_{13}S$ с молекулярной массой 134,728146 в зависимости от разрешающей способности масс-спектрометра. (Рисунок предоставлен П. О'Коннором)

Следующий пик на рис. 4.5 с целочисленной массой 3411, который представляет собой наиболее распространенную массу (3), состоит из 19 индивидуальных пиков, обусловленных одновременным присутствием в молекуле двух изотопов $A+1$ или одного изотопа $A+2$ (^{18}O или ^{34}S). Поскольку основной вклад, как и в предыдущем случае, вносит изотоп ^{13}C , центр масс этого составного пика будет находиться около 3411,3613 дальтон. Кстати, средняя молекулярная масса, рассчитанная исходя из усредненных величин атомной массы элементов (4), находится рядом с этим пиком и составляет 3411,7210 дальтон. Как видно из рисунка, пик с такой массой в спектре отсутствует, однако при получении спектров еще более тяжелых соединений, с массами в десятки тысяч дальтон, разрешающей способности любого прибора оказывается недостаточно для получения разрешенного кластера молекулярного иона. Пики ионов представляют собой огибающую шириной в сотни и тысячи дальтон, причем вершина этой кривой соответствует средней молекулярной массе соединения. Для установления молекулярной массы больших молекул с достаточной степенью точности необходимо иметь масс-спектрометр сверхвысокого разрешения (прибор ионного циклотронного резонанса или орбитальную ловушку). Если удастся получить изотопную картину, можно установить заряд иона и далее его массу. Например, для денатурированных белков с массами до 148 кДа на указанных приборах получены изотопные кластеры, разрешенные до нулевой линии [193, 194]. Основные же проблемы с определением молекулярной массы сверхтяжелых соединений связаны с неполной десольватацией и многочисленными аддуктами с самыми разными катионами. В результате изотопная картина исчезает, и определить заряд становится невозможно. Вопросам границ разрешающей способности современных приборов для целей нативной масс-спектрометрии посвящена работа [195].

4.4. Фрагментные ионы

Когда получена исчерпывающая информация о молекулярном ионе, следует перейти к рассмотрению фрагментных ионов. Как уже отмечалось выше, фрагментные ионы можно разделять на перегруппировочные и осколочные, однако для интерпретации масс-спектра, помимо этой, полезно пользоваться несколько другой классификацией. Все важнейшие фрагментные ионы можно разделить на три типа.

1. Наиболее тяжелые ионы, образующиеся из M^{+} в результате выброса простейших частиц, т.е. без существенной перестройки структуры исходной молекулы.
2. Ионы, характеризующиеся наиболее интенсивными пиками в спектре.
3. Характерные серии ионов, различающихся на гомологическую разность, т.е. на 14 единиц массы.

Необходимо учитывать, что интенсивности пиков фрагментных ионов первого и третьего типа могут быть незначительными. Очень важно научиться не пропускать их.

4.4.1. Гомологические серии ионов

Если индивидуальные пики ионов с большими массами важны для установления начальных характеристических путей фрагментации или присутствия лабильных групп, то гомологические серии ионов с низкой массой несут информацию о наличии гетероатомов, степени ненасыщенности и в конечном итоге принадлежности соединения к тому или иному классу. Для таких ионов, как правило четноэлектронных, значительно проще установить элементный состав, чем для более тяжелых, для которых могут существовать сотни изобарных составов. В табл. 4.5 представлены гомологические серии ионов, характерные для наиболее распространенных классов органических соединений.

Таблица 4.5. Гомологические серии ионов ряда классов органических соединений

Класс соединения	Формула	Значения m/z
Алканы	$C_nH_{2n+1}^+$	15, 29, 43, 57, 71, 85...
Алкены, нафены	$C_nH_{2n-1}^+$	27, 41, 55, 69, 83...
Алкины, диены	$C_nH_{2n-3}^+$	25, 39, 53, 67, 81...
Спирты, простые эфиры	$C_nH_{2n+1}O^+$	31, 45, 59, 73, 87...
Альдегиды, кетоны	$C_nH_{2n-1}O^+$	29, 43, 57, 71, 85...
Кислоты, сложные эфиры	$C_nH_{2n-1}O_2^+$	45, 59, 73, 87, 101...
Тиолы, сульфиды	$C_nH_{2n+1}S^+$	47, 61, 75, 89, 103... (по ^{32}S)
Амины	$C_nH_{2n+2}N^+$	30, 44, 58, 72, 86, 100...
Алкилхлориды	$C_nH_{2n}Cl^+$	35, 49, 63, 77, 91, 105... (по ^{35}Cl)
Алкилфториды	$C_nH_{2n}F^+$	19, 33, 47, 61, 75...
Алкилбромиды	$C_nH_{2n}Br^+$	79, 93, 107, 121... (по ^{79}Br)
Алкилиодиды	$C_nH_{2n}I^+$	127, 141, 155, 169...
Нитрилы	$C_nH_{2n-2}N^+$	40, 54, 68, 82, 96...
Алкилбензолы		38, 39, 50–52, 63–65, 75–78, 91, 105, 119...

Следует подчеркнуть, что в спектре, например, алифатического спирта будут наблюдаться и алкановая (29, 43, 57...), и алкеновая (27, 41, 55), и спиртовая (31, 45, 59...) серии. Алкановая серия присутствует в масс-спектре любого соединения, содержащего алкильную группу. В случае изобарных серий (например, алканы и кетоны) следует обращать внимание на интенсивность изотопных пиков. Так, для изобарных ионов с массой 43 (составы CH_3CO и C_3H_7) интенсивность изотопного пика с массой 44 будет 2,2% и 3,3% соответственно. Еще проще обстоит дело с $A+2$ элементами. В этом случае в спектре проявляются две серии характеристических ионов за счет изотопов A и $A+2$.

Если степень ненасыщенности молекулы или количество функциональных групп в ней велико, значимые серии ионов с низкой массой, отстоящих друг от друга на CH_2 -группу, в спектре отсутствуют. Хорошим примером могут служить алкилбензолы. В области низких масс гомологическая серия отсутствует, хотя характеристические ионы все же имеются. Ароматическая серия наблюдается, хотя она сдвинута в область более высоких масс (табл. 4.5) и начинается с m/z 77 для монозамещенных бензолов. Такие же серии можно увидеть и в спектрах алкильных производных полициклических ароматических углеводородов. Если алкильная группа связана с заместителем с высокой ЭИ, в спектре возникает, иногда достаточно интенсивная, серия нечетноэлектронных ионов общей формулы $\text{C}_n\text{H}_{2n}^+$.

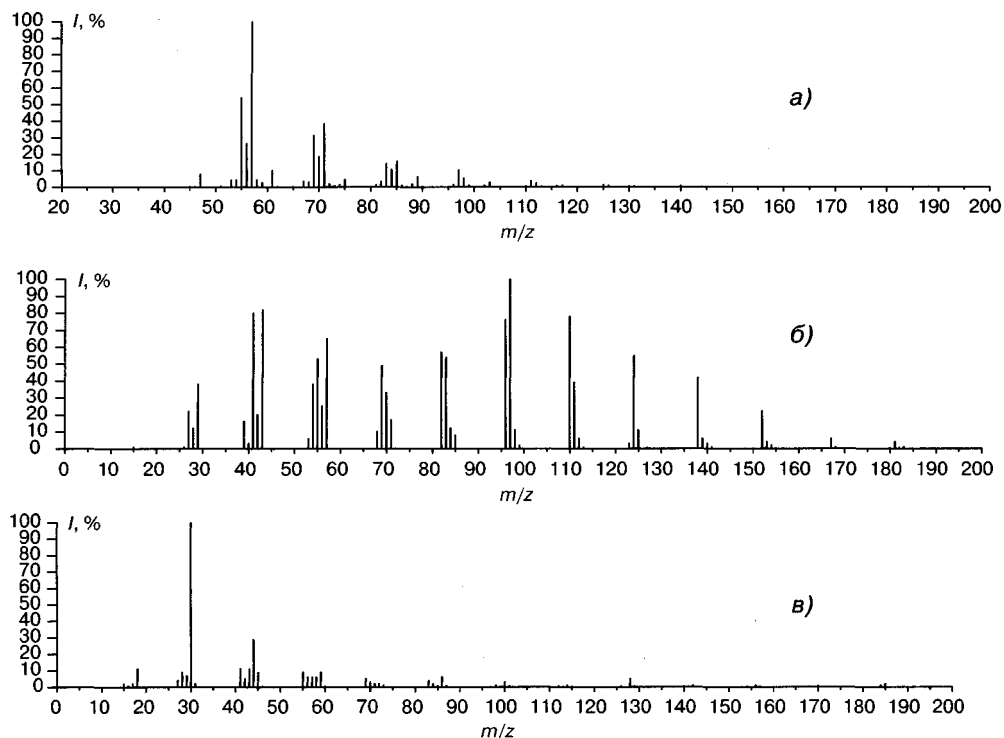


Рис. 4.7. Масс-спектры монофункциональных алифатических соединений трех разных классов

Безусловно, анализ гомологических серий имеет свои ограничения. Низкие интенсивности пиков в некоторых сериях требуют внимания и опыта исследователя, чтобы не пропустить их. Зачастую в спектрах самых разнообразных соединений доминируют пики алкановой серии. Распад с участием одной функциональной группы может полностью подавить или существенно замаскировать другие направления фрагментации полифункциональных соединений. В последнем случае полезно бывает использовать в интерпретации масс-спектра данные ИК-спектроскопии. В целом, если есть возможность использовать для интерпретации масс-спектров любую другую информацию, этим следует воспользоваться. Избыточной информации не бывает. В самом худшем случае вы получите подтверждение своих выводов.

Задача 4.14. К какому классу принадлежат монофункциональные соединения, спектры которых представлены на рис. 4.7а–в? Учтите, что интенсивности пиков в некоторых сериях могут быть низкими.

Задача 4.15. На рис. 4.8а–в представлены масс-спектры ионизации электронами трех соединений, характеризующихся близким набором фрагментных ионов. Пики молекулярных ионов в двух случаях отсутствуют. Постарайтесь определить класс соединений на основании гомологических серий ионов. Учтите, что интенсивности пиков в некоторых сериях могут быть низкими.

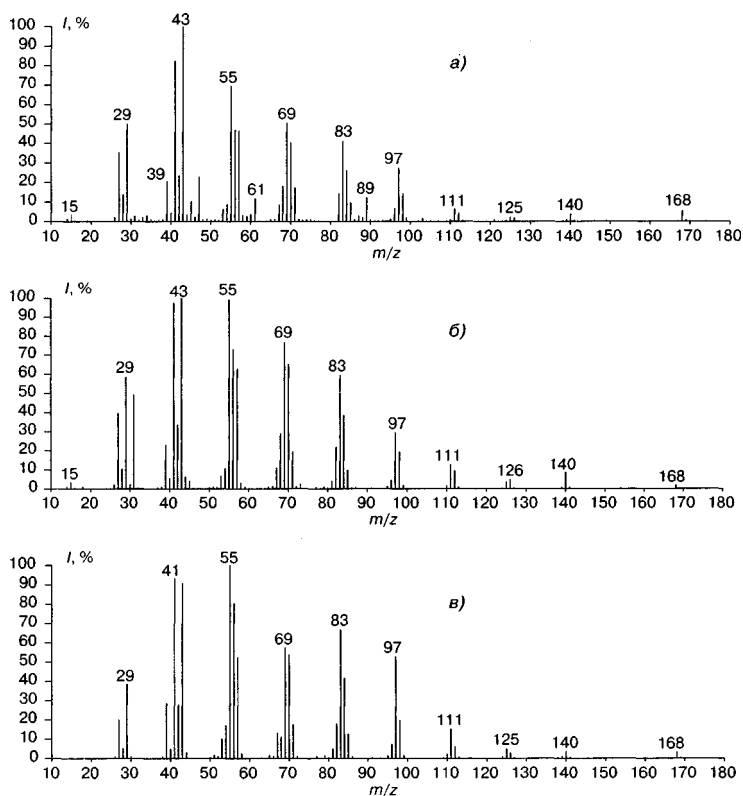


Рис. 4.8. Масс-спектры ИЭ монофункциональных соединений, принадлежащих к трем разным классам

4.4.2. Выбросы простейших нейтральных частиц

Самые простые, но важные заключения можно сделать на основании выбросов нейтральных фрагментов из $M^{+\bullet}$. В результате этих процессов возникают ионы с большой массой: $[M-1]^+$, $[M-15]^+$, $[M-18]^+$, $[M-20]^+$ и т.д. Например, интенсивный сигнал иона $[M-H]^+$ означает не только наличие лабильного атома водорода, но и отсутствие других лабильных групп в этом положении (правило выброса максимального алкила, разд. 3.1.1). В области высоких масс важны практически все пики, даже если их интенсивность ниже 1%. Эти ионы очень важны и для подтверждения правильного определения молекулярного иона (разд. 4.1).

4.4.3. Наиболее интенсивные пики в спектре

Извлечение информации из наиболее интенсивных в спектре пиков иногда оказывается достаточно сложным. В отличие от других физико-химических методов (ЯМР, ИК, УФ) регистрация пика иона с конкретной целочисленной величиной m/z не дает однозначного определения его состава. Даже использование масс-спектрометрии высокого разрешения (разд. 6.3) для определения элементного состава иона не является методом установления его структуры, поскольку он может образоваться прямо из $M^{+\bullet}$ с минимальным искажением исходной структуры или в результате ряда перегруппировочных процессов. Например, интенсивный пик иона с m/z 30 не дает права однозначно приписать вещество к первичным аминам, так как этот ион легко образуется и из вторичных, и из третичных аминов при достаточной длине их алкильных радикалов (разд. 10.7).

Однако, если незначительные по интенсивности пики можно проигнорировать без особого ущерба для результата процесса интерпретации, состав ионов, характеризующихся максимальными пиками, желательно установить однозначно. Они, как правило, приводятся в схеме фрагментации, отражающей основные направления распада анализируемого соединения. Эти ионы могут характеризоваться большой массой и теоретически иметь много возможных изобарных составов. Поэтому для установления их состава и структуры может понадобиться масс-спектрометрия высокого разрешения, а также получение спектров ионов-продуктов и ионов-предшественников (гл. 7). Если исследователь работает долгое время с определенным классом соединений, состав и структура основных ионов, как правило, уже известны, и он легко проводит отнесение фрагментных пиков в новых спектрах. Задача оказывается более сложной, если речь идет о неизвестных образцах.

Не следует слепо использовать таблицы, приводимые в масс-спектрометрической литературе, связывающие величину m/z регистрируемого пика со структурным фрагментом молекулы (табл. 3 Приложения). Такие таблицы могут быть полезными, но пользоваться ими надо с осторожностью. Например, регистрация иона $C_2H_3O^+$ часто интерпретируется в таблицах как ацетильный фрагмент (CH_3CO), а вещество относится к метилкетонам. Однако фрагментный ион CH_3CO^+ возникает в процессе фрагментации (перегруппировка Мак-Лафферти) многих кетонов с достаточной длиной алкильной цепи. Он наблюдается и в спектрах альдегидов.

Тем не менее некоторые специфические ионы, характеризующиеся интенсивными пиками в спектрах, сразу наводят на мысль об определенной структуре:

m/z 77 – C_6H_5 – фенил, m/z 91 – C_6H_5 – тропий (бензил), m/z 30 – CH_2NH_2 – аминогруппа или молекула NO, m/z 105 – бензоил – PhCO. Доминирующий в спектре пик иона с m/z 149 практически наверняка означает принадлежность исследуемого соединения к диалкилфталатам. Кстати, эти соединения, широко используемые во всем мире в качестве пластификаторов при производстве пластмасс, оказались достаточно стабильными и в настоящее время являются приоритетными загрязняющими веществами в окружающей среде. Фталаты очень часто оказываются примесями, порой весьма неожиданными, в самых различных образцах.

Работая в режиме ГХ/МС, оператор часто сталкивается с хроматографическими пиками, характеризруемыми спектрами, в которых доминируют пики ионов с массами 73, 147, 207, 281, 355 и т.д. Этот набор обусловлен выбросами фрагментов наиболее распространенных полидиметилсиликоновых фаз хроматографической колонки в источник масс-спектрометра. В табл. 3 Приложения представлены наиболее распространенные варианты элементных составов ионов с целочисленными массами.

После извлечения всей возможной информации из масс-спектра надо попытаться скомпоновать наиболее вероятную структуру. Если есть основания заранее предполагать какую-либо структуру, необходимо попытаться нарисовать теоретические возможные пути ее фрагментации и сопоставить с полученным спектром.

4.5. Библиотеки масс-спектров

Компьютерную обработку результатов хроматомасс-спектрометрического эксперимента можно назвать дополнительным ортогональным параметром анализа (вслед за хроматографией и масс-спектрометрией). Компьютерные программы позволяют выделять «чистые» масс-спектры не полностью разделенных компонентов, осуществлять библиотечный поиск, отображать структурные формулы, устанавливать молекулярные массы многозарядных ионов, предоставлять информацию по индексам удерживания и т.д. Программы библиотечного поиска предназначены для проведения автоматического сопоставления экспериментального масс-спектра со спектрами, представленными в базе данных. Для каждого соединения в компьютерной базе данных (библиотеке), помимо масс-спектра, представлена также дополнительная информация, например название, молекулярная масса, структурная формула, индекс удерживания и т.д. На сегодняшний день существуют две основные универсальные библиотеки масс-спектров: NIST/EPA/NIH (NIST14, <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>) Национального института стандартов США и Wiley [196], которая в настоящее время поддерживается и редактируется в Германии компанией VCH Data Group (John Wiley and Sons). В библиотеках Wiley все масс-спектры, включая повторы, находятся в одном файле, причем в базе присутствуют даже заведомо искаженные экспериментальные спектры. По мнению авторов, если такой спектр получен в каком-то конкретном эксперименте, он может быть получен и в будущем. В библиотеках NIST повторные масс-спектры находятся в отдельном файле (replib), хотя некоторые производители масс-спектрометров (Agilent, Shimadzu, Waters) при использовании их собственного программного обес-

печения объединяют файлы, содержащие основные и дополнительные спектры, в один. База данных NIST14 (выпущенная в 2014 году) содержит 276 248 масс-спектров 242 466 соединений. В последней версии базы данных Wiley (девятое издание) содержится 669 092 масс-спектра более чем 592 000 соединений. Полезно использовать в работе обе библиотеки, особенно если поиск по одной из них не дает надежного результата. Это особенно касается нецелевого анализа, когда в задачу входит идентификация как можно большего числа заранее не заданных соединений.

Существуют и другие библиотеки масс-спектров: пестицидов, экотоксикантов и т.д. Полезно при работе с однотипными пробами создавать свои собственные внутрилабораторные базы данных. Именно такие базы очень удобны для поиска целевых соединений в дальнейшей работе.

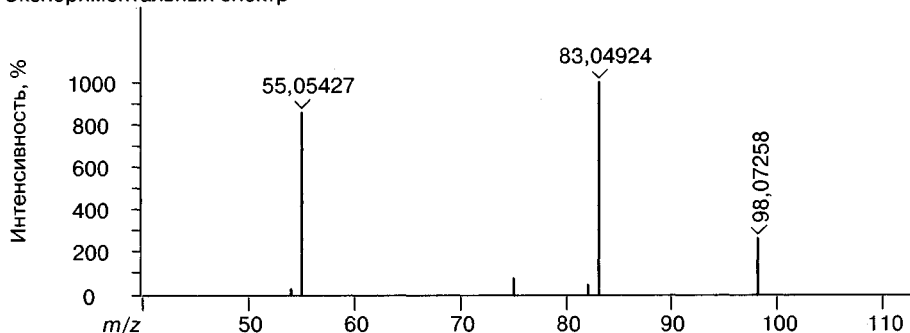
Библиотеки содержат в основном именно спектры ИЭ, поскольку максимальное число органических соединений анализировалось и анализируется в настоящее время именно этим методом. Интенсивная фрагментация позволяет проводить более надежное сравнение спектров, тогда как спектры химической ионизации или полевой ионизации характеризуются всего лишь несколькими пиками. Еще одним достоинством ИЭ являются стандартные условия регистрации спектра. Благодаря этому спектры одних и тех же соединений, полученные на разных приборах, оказываются похожими и доступны сравнению. Программное обеспечение этих библиотек позволяет проводить не только рутинное сравнение спектра нового образца с библиотечными, но и делать выборки с учетом элементного состава, интенсивности конкретных пиков, молекулярной массы и т.д. Работая с этими выборками, оператор может проявить свои знания, использовать дополнительную информацию, проигнорировать пики, про которые известно, что они обусловлены примесями. В этом случае надежность правильной идентификации соединения значительно повышается. Подробная информация об истории и современном состоянии библиотек масс-спектров и алгоритмов работы с ними представлена в обзоре [197].

Прежде чем проводить сравнение полученного спектра с библиотечными, имеет смысл оценить его качество и сделать возможные процедуры его улучшения. В частности, в разд. 1.4 описан метод устранения фона в режиме ГХ/МС. Обработанный спектр (рис. 1.8) отлично сходится с библиотечным, хотя для исходного спектра компьютер не предлагал этого варианта структуры. В гл. 12 описана процедура компьютерной обработки хроматографического пика, обусловленного двумя соединениями с близкими временами выхода.

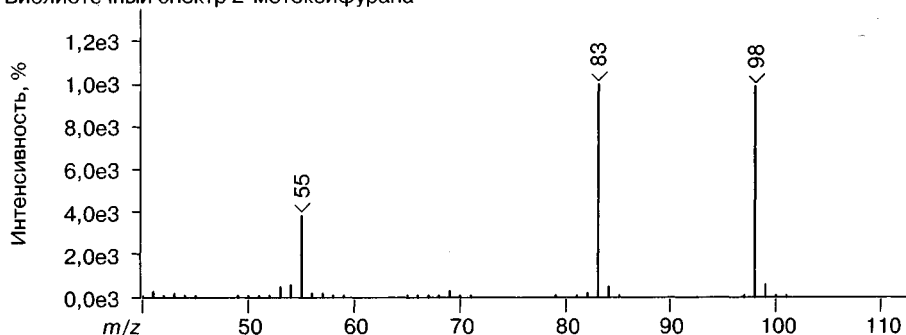
Использование компьютерных библиотек, безусловно, существенно облегчает процесс идентификации соединения по его масс-спектру, но в целом машина не может пока полностью заменить квалифицированного специалиста. Даже если спектр соединения имеется в библиотеке, не всегда очевидно, что компьютер его правильно определит, точнее, поставит на первое место среди выбранных им вариантов. На этой стадии последующее «ручное» сравнение предложенных вариантов со спектром образца очень полезно. В сложных образцах, когда хроматографические пики оказываются неразрешенными, зачастую приходится использовать искаженные масс-спектры, полученные в результате применения процессов деконволюции. Интенсивность некоторых пиков может измениться, некоторые пики могут отсут-

ствовать вовсе, а в спектре могут присутствовать пики, обусловленные компонентами с близкими временами удерживания. В этом случае имеет смысл посмотреть не на первые три лучших варианта структур, предложенные библиотекой спектров, а глубже. Правильная структура может оказаться на месте в третьем-четвертом десятке, а то и ниже [198]. Если спектр анализируемого вещества отсутствует в библиотеке, компьютер все равно предложит наиболее подходящие с его точки зрения варианты. Эта информация наверняка облегчит задачу оператора, поскольку может дать необходимый толчок для отнесения вещества к тому или иному классу соединений.

Экспериментальный спектр



Библиотечный спектр 2-метоксифурана



Библиотечный спектр 4-метил-пентен-3-она-2

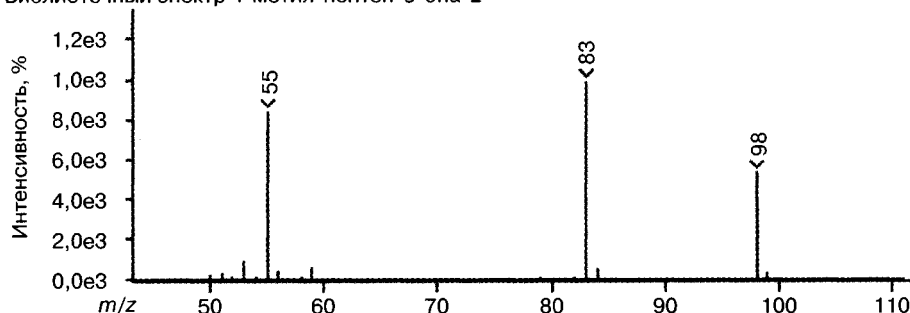


Рис. 4.9. Масс-спектры ИЭ неизвестного соединения (верх), лучший вариант библиотечного поиска (середина) и спектр № 21 из библиотечного списка с правильным элементарным составом

Не следует всецело полагаться на индекс сходимости (score) библиотечного и экспериментального спектров. Его высокое значение отнюдь не означает, что вы имеете дело именно с этим соединением. Спектры многих соединений, включая принадлежащие совершенно различным классам, могут быть очень похожи. На рис. 4.9 представлен подобный случай, когда спектры алкоксифуранов и ненасыщенных кетонов оказываются крайне близкими. Одновременно не стоит отчаиваться при виде низкого индекса сходимости. В случае сложных матриц и плохого хроматографического разрешения в итоговом экспериментальном спектре в результате математической деконволюции могут отсутствовать характеристические пики и, напротив, присутствовать лишние пики. Посмотрите, от какой массы проведено сканирование. В хороших библиотечных спектрах представлены полные масс-спектры, начиная от m/z 15, тогда как в экспериментальных минимальной массой часто оказывается m/z 35, m/z 50 и выше. Это практикуется для исключения из спектра фоновых пиков воды, кислорода, азота, углекислого газа и т.д. Если в библиотечном спектре присутствуют интенсивные пики с массой ниже этой величины, индекс сходимости окажется существенно ниже, чем следует. Например, в спектрах алифатических аминов или нитросоединений максимальным по интенсивности может быть ион с m/z 30, а в спектрах алифатических спиртов характеристический пик имеет массу 31. Следовательно, корректность результата идентификации, предложенного программой библиотечного поиска, должна быть тщательно проверена.

На сегодняшний день существует несколько алгоритмов поиска. Алгоритм «вероятностного» сопоставления спектров (probability-based matching, PBM) предложен Мак-Лафферти и используется в программном обеспечении компаний Agilent и Shimadzu. Алгоритм, в основе которого лежит модифицированный метод скалярного произведения, используется в программном обеспечении NIST MS Search. Алгоритм на базе еще одной модификации метода скалярного произведения используется компанией Waters и реализован в программном обеспечении MassLynx. Имеет смысл подчеркнуть, что идеального алгоритма библиотечного поиска не существует, и в конкретных случаях один из них может сработать лучше другого, а в других — наоборот.

Библиотечный поиск дает возможность получить три величины для определения степени совпадения масс-спектров: Match, Reverse Match и Probability. Величина Match (индекс сходимости) изменяется в диапазоне от 0 до 999 и показывает, насколько экспериментальный масс-спектр похож на библиотечный. При этом учитывается совпадение как значений m/z , так и интенсивностей масс-спектральных пиков, причем во внимание принимаются пики, присутствующие в обоих масс-спектрах. Пики, характеризующиеся большими значениями m/z , имеют больший вес. При расчете величины Reverse Match (обратный индекс сходимости) во внимание принимаются только пики, присутствующие в библиотечном масс-спектре, а значения m/z , присутствующие в экспериментальном и отсутствующие в библиотечном масс-спектре, не учитываются. Это может оказаться полезным, если экспериментальный масс-спектр представляет собой суперпозицию спектров нескольких соединений в результате неполного хроматографического разделения. Величина Probability (вероятность), которая изменяется в диапазоне от 0 до 99,9%, рассчитывается, исходя из «уникальности» библиотечного масс-спектра по отноше-

нию к другим спектрам, представленным в списке возможных кандидатов. Так, при работе со спектром бензола величина Probability составляет около 85%, поскольку масс-спектр бензола достаточно уникален. Однако для спектра *мета*-диметилбензола величина Probability составляет около 30%, что объясняется присутствием в базе данных масс-спектров изомеров диметилбензола.

Программное обеспечение AMDIS было разработано сотрудниками Национального Института стандартов и технологий США. Оно используется для обработки ГХ/МС и ВЭЖХ/МС данных, позволяя исключить посторонние пики из экспериментальных масс-спектров, внести поправку на искажение интенсивностей пиков (гл. 2), а также выделить масс-спектры высокого качества, пригодные для проведения библиотечного поиска или ручной интерпретации. AMDIS позволяет осуществлять идентификацию соединений по спектральным базам данных и проводить количественный анализ. Ряд производителей масс-спектрального оборудования использует AMDIS напрямую или интегрирует его в их собственное программное обеспечение. AMDIS производит автоматическую обработку данных, когда профили пиков на масс-хроматограммах по всем регистрируемым значениям m/z сопоставляются друг с другом. Если интенсивность сигнала возрастает и уменьшается одновременно на нескольких масс-хроматограммах, то делается вывод, что соответствующие значения m/z относятся к одному и тому же соединению. Так осуществляется математическая деконволюция результатов эксперимента.

Сложность смесей не всегда позволяет полностью разделить компоненты хроматографически. Тогда эти компоненты оказываются в источнике ионов с незначительным разделением (коэлюция), а иногда и одновременно. Поэтому желательно, чтобы программа обработки данных позволяла распознавать такие случаи и проводить автоматически процесс деконволюции, т.е. «виртуального» или математического разделения компонент и выделения из смеси масс-спектров, спектров индивидуальных соединений. Впервые в коммерческой системе автоматическая деконволюция была применена в программном обеспечении под названием ChromaTOF-GC американской компанией LECO Corporation. Прибор ГХ/МС на основе времяпролетного масс-спектрометра (Pegasus GC-TOFMS) позволяет без потерь данных регистрировать и записывать на жесткий диск компьютера масс-спектры с полным массовым диапазоном со скоростью 500 полных спектров в секунду. Такая высокая скорость записи спектров позволила полностью реализовать все достоинства времяпролетных масс-спектрометров как идеальных детекторов для хроматографии. Считалось, что для количественной характеристики хроматографических пиков достаточно иметь 3–5 масс-спектров, полученных во время выхода пика, но для качественного анализа и идентификации налагающихся пиков компонентов пяти спектров уже не достаточно, и в зависимости от ситуации необходимо регистрировать до 20–30 масс-спектров за время выхода пика. В высокоскоростной хроматографии и в двумерной хроматографии ширина пиков на 50% высоты может достигать 50 мс, что делает просто необходимым использование времяпролетных масс-спектрометров с высокой скоростью регистрации и автоматической программой деконволюции. Для деконволюции ChromaTOF использует уникальное свойство времяпролетных масс-спектрометров. Поскольку все ионы из источника выходят практически одновременно и детектируются практически

одновременно, каждый масс-спектр отражает полную и аккуратную картину химического состава компонентов, находящихся в данный момент в источнике. Все отношения интенсивностей фрагментов масс-спектра, относящегося к конкретному компоненту смеси, постоянны в каждой точке хроматографического пика, и если эти соотношения нарушаются, то только из-за вклада других компонентов, выходящих в это же время. Этот принцип был положен в основу алгоритма деконволюции программы ChromaTOF-GC, что дало возможность создать устройство для анализа очень сложных смесей, в состав которых входят компоненты, сильно различающиеся как по концентрациям, так и по химическим свойствам. При этом в используемом алгоритме не требуется никакого предварительного знания о числе налагающихся компонентов, предполагаемой форме и ширине пиков. Масс-спектры, полученные в результате деконволюции, могут быть использованы для идентификации компонентов по библиотекам NIST, Wiley или специальным библиотекам, созданным самими пользователями. Процесс деконволюции помогает также улучшить количественный анализ, если ионы, используемые для количественных измерений, входят и в состав масс-спектров налагающихся компонент.

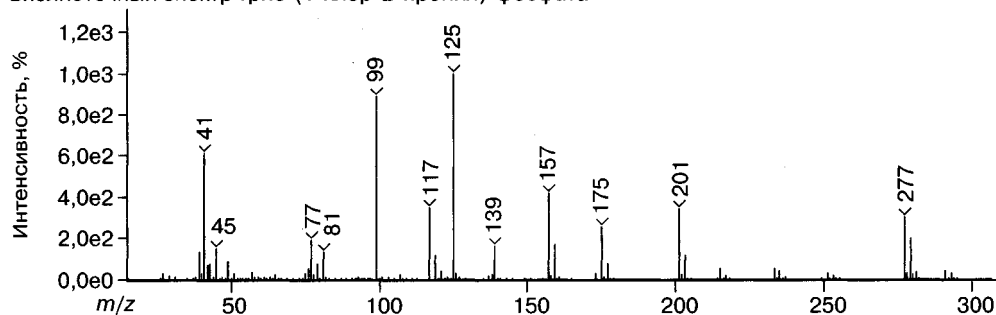
С улучшением разрешающей способности и точности измерения масс времяпролетных масс-спектрометров процесс деконволюции может быть улучшен. В новых моделях ГХ/МС приборов компании LECO, Pegasus-HRT, разрешающая способность до 50 000 и точность измерения масс 1 ppm и лучше открывают новые возможности для идентификации разделенных деконволюцией компонентов. Точная масса почти всегда позволяет проверить совпадение предложенного по результатам поисков по стандартным библиотекам химического вещества и химической формулы, полученной на основе точного измерения масс молекулярного иона (если таковой имеется) и фрагментов. Таким образом, программы математической деконволюции являются, по сути, еще одним ортогональным измерением в дополнение к хроматографии и масс-спектрометрии, а метод ГХ/МС приобретает дополнительную размерность и становится еще более эффективным средством интерпретации результатов анализа сложных смесей.

В настоящее время создаются алгоритмы для элементов машинной расшифровки масс-спектров. Эти программы требуют творческого подхода высококвалифицированного оператора и позволяют получать впечатляющие результаты, например предложить наиболее вероятную структуру соединения, спектр которого отсутствует в библиотеке.

4.6. Использование для интерпретации дополнительной масс-спектральной информации

Зачастую оказывается, что обычного спектра ионизации электронами недостаточно для установления структуры вещества. В этом случае необходимо использовать другие возможности масс-спектрометрии. Например, отсутствие пика молекулярного иона в спектре ИЭ может потребовать получение спектра каким-либо «мягким» методом (химическая ионизация, полевая ионизация). На рис. 4.10 представлен результат библиотечного поиска одного из компонентов в пробе снега.

Библиотечный спектр трис-(1-хлор-2-пропил)-фосфата



Экспериментальный спектр

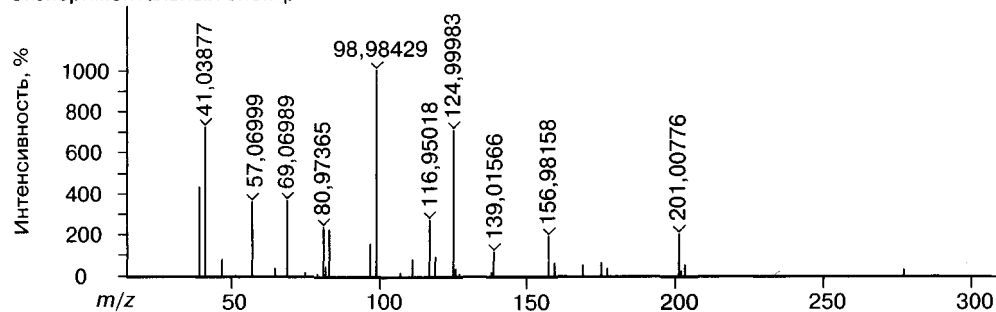


Рис. 4.10. Спектр ИЭ трис-(хлоризопропил)фосфата в качестве наиболее вероятного кандидата (вверху) и экспериментальный спектр ИЭ соединения, обнаруженного в пробе снега (внизу)

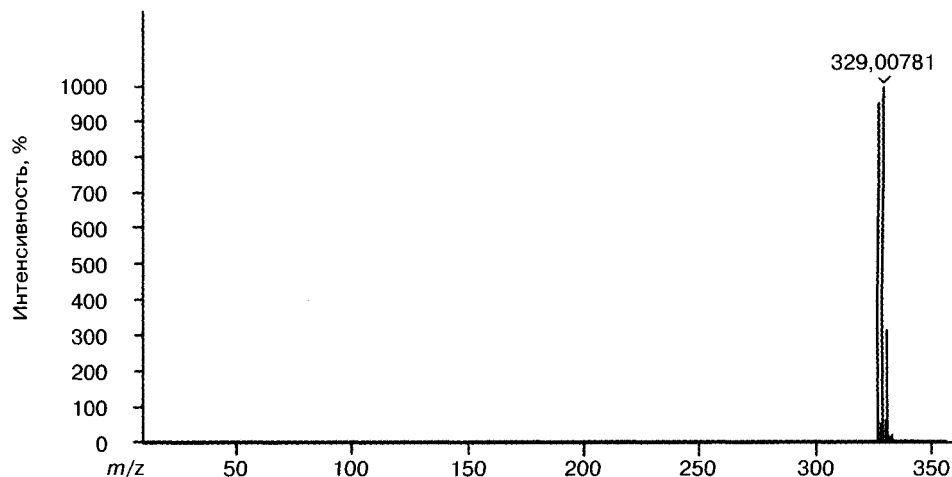


Рис. 4.11. Экспериментальный спектр тлеющего разряда того же соединения (рис. 4.10), обнаруженного в пробе снега

В качестве наиболее приемлемого кандидата библиотечный поиск выдвинул трис-(хлоризопропил)фосфат. Однако отсутствие молекулярного иона и низкий индекс сходимости (583) снижали надежность этой идентификации. Повторный

ГХ/МС анализ с использованием в качестве ионизации мягкого метода (тлеющий разряд) однозначно подтвердил полученный результат, поскольку в спектре этого соединения присутствовал лишь кластер протонированной молекулы трис-(хлор-изопропил)фосфата (рис. 4.11).

Проблема пиков примесей в спектре соединения, снятого с помощью прямого ввода, может быть преодолена с помощью хроматомасс-спектрометрии. В этом случае очень полезной характеристикой оказывается время удерживания (индекс удерживания). Этот параметр для 82868 соединений приводится в библиотеке NIST14. Это особенно ценно, когда в спектре отсутствует пик молекулярного иона, а библиотечный поиск приводит к набору гомологов. Индекс удерживания позволяет выбрать правильный результат. Да и для многих других соединений этот параметр позволяет подтвердить выбор или отбросить предложенный компьютером результат.

Достаточно очевидна важность масс-спектрометрии высокого разрешения (разд. 6.3), поскольку информация о точном элементном составе молекулярного и фрагментных ионов имеет первостепенное значение. На рис. 4.9 представлен экспериментальный масс-спектр ИЭ неизвестного соединения (образец снега) после деконволюции (верх) и лучший библиотечный спектр 2-метоксифурана со степенью совпадения 786 (середина). Было весьма разумно согласиться с этим предложением, поскольку в образце было надежно идентифицировано еще 15 замещенных фуранов. Однако, когда данный образец был проанализирован на приборе высокого разрешения (Pegasus GC-HRT, LECO, USA), выяснилось, что точная масса молекулярного иона неизвестного соединения 98,0726, тогда как для метоксифурана ($C_5H_6O_2$) она должна быть 98,0362. Следовательно, вариант с максимальной сходимостью спектра, предложенный библиотекой, неверен. Первым приемлемым вариантом оказался кандидат № 21 в списке. Это был 4-метил-3-пентенон-2 ($C_6H_{10}O$, m/z 98,0726) со степенью сходимости 673 (рис. 4.9 низ). Нельзя однозначно сказать, что это абсолютно достоверная идентификация. Может быть, этого вещества вообще нет в библиотеке спектров, но масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет утверждать, что брутто-формула вещества $C_6H_{10}O$, а степень ненасыщенности 2. Кроме того, есть возможность избежать ошибки с ложной идентификацией метоксифурана [198].

В настоящее время благодаря программному обеспечению MassWorks, разработанному компанией Cerno Bioscience, измерение точного значения m/z доступно и для квадрупольных масс-спектрометров, работающих в режиме регистрации 10–20 точек на масс-спектральный пик [199]. Для калибровки шкалы масс используются экспериментальные спектры перфторированных соединений, а сама калибровка осуществляется путем определения формы масс-спектральных пиков, имеющих различные значения m/z . Одним из существенных недостатков данного подхода является значительное увеличение размера файлов.

Менее ясна, на первый взгляд, необходимость использования tandemных спектров. Эта техника позволяет прежде всего получить чистый спектр вещества, лишенный накладок со стороны различных примесей. Кроме того, есть возможность точно установить направления фрагментации, связывая конкретные ионы-предшественники и ионы-продукты. Эти спектры могут предоставить определенную информацию и о структуре ионов.



Например, тот факт, что при фрагментации сульфонов (схема 4.1) ионы с массами $[90+R]^+$ и $[104+R]^+$ образуются непосредственно из молекулярного иона, однозначно свидетельствует о его трансформации до распада с образованием новой C—C связи между атомами углерода малого цикла и второго ароматического ядра [200]. В этом случае циклопропановая группа, обладающая наименьшей ЭИ и, следовательно, несущая в электронно невозбужденном состоянии заряд и неспаренный электрон, атакует по нуклеофильному или радикальному механизму второе ароматическое ядро.

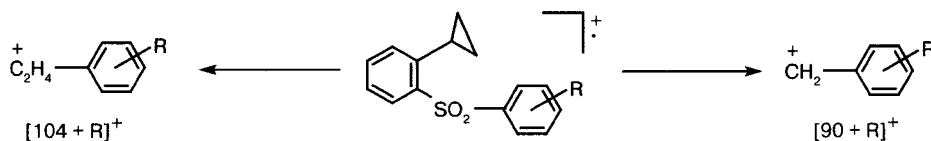
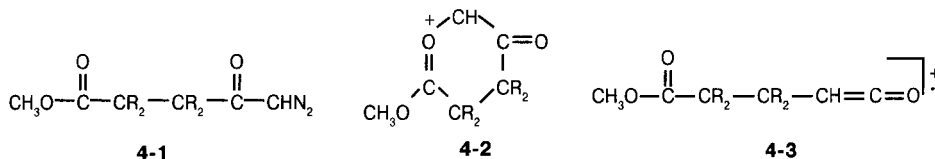


Схема 4.1

Иногда никакие варианты съемки масс-спектра не позволяют однозначно установить структуру интересующего иона. В этом случае реальную помощь могут принести масс-спектры изотопных аналогов анализируемого соединения. Этот подход успешно используется и в других физико-химических методах, а также в классической органической химии. В учебнике по масс-спектрометрии [27] синтезу этих соединений для масс-спектрометрических целей посвящен достаточно большой раздел.



В качестве примера использования изотопных аналогов для решения масс-спектрометрических вопросов можно привести следующий эксперимент [201]. Ионы $[M-N_2]^+$ диазокетонов **4-1** распадаются по ряду направлений, которые требуют их предварительной изомеризации в другие структуры, например пирановую **4-2** или кетеновую **4-3**. Для выбора одной из двух альтернативных структур пришлось синтезировать дейтерированный аналог (три атома водорода метильного радикала сложноэфирной группы были заменены на атомы дейтерия). Дело в том, что одним из путей фрагментации иона $[M-N_2]^+$ является выброс метильной группы. Поскольку в составе диазокетонов **4-1** радикалы R также представляли собой метильные группы, необходимо было установить, какая именно группа отщепляется из $[M-N_2]^+$. Спектр дейтерированного аналога показал, что элиминируется именно метильная группа сложноэфирной функции. На этом основании предпочтение было отдано пирановой структуре **4-2**. Алкильная группа не может отщепиться из этого положения в кетеновой структуре **4-3**, тогда как для гетероциклической структуры **4-2** такой процесс, напротив, весьма благоприятен (схема 4.2).

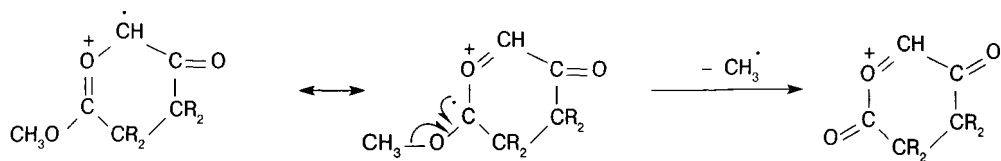


Схема 4.2

Возможность проведения эксперимента в режиме ГХ×ГХ/МС также позволяет повысить надежность идентификации (разд. 1.4.3). Благодаря тому, что конкретные группы веществ занимают на двумерной хроматограмме определенные участки, в случае похожих масс-спектров можно делать вывод о принадлежности вещества по положению его пика на хроматограмме (рис. 1.13 и описание к нему).

4.7. Схема фрагментации

Заканчивается процедура работы со спектрами составлением схемы фрагментации. Эта схема должна отражать основные характеристические направления распада молекулярного иона, а также состав фрагментных ионов, по возможности их структуру, взаимосвязь этих ионов друг с другом, а иногда интенсивности их пиков (схемы 4.3 и 4.4).

Невозможно разместить на схеме все ионы, пики которых наблюдаются в спектре. Многие из них не несут никакой принципиальной химической информации, а в многообразии представленных реакций можно потерять действительно важные для характеристики данного соединения. Нет смысла приводить также тривиальные фрагменты. Например, в спектре любого сложного ароматического соединения будут присутствовать пики с m/z 77 или 76, обусловленные бензольным ядром. Пики этих ионов могут иметь высокую интенсивность, однако они (ионы) не раскрывают своеобразие исходной молекулы и могут образоваться практически из любого фрагмента с большей массой. Поэтому их можно опустить. Необходимо включать в схему важные для групповой или индивидуальной характеристики фрагментные ионы. Очень важно не забыть ионы, пики которых наиболее интенсивны в спектре, однако существенную информацию могут нести первичные осколочные и перегруппировочные ионы, пики которых имеют низкую интенсивность.

Для того чтобы схема была достоверной, элементные составы всех представленных ионов должны быть однозначно доказаны измерением точных масс, а все направления фрагментации подтверждены тандемными спектрами. Иногда это отмечается непосредственно на схеме звездочкой над стрелкой, связывающей два иона (схемы 4.3 и 4.4).

Изображение на схеме структур ионов в большинстве случаев не совсем корректно. Обычно пользуются принципом наименьших структурных изменений и стараются, насколько это возможно, сохранить структуру исходной молекулы, последовательно отрывая от нее конкретные фрагменты. Однако корректнее ограничиться брутто-формулой. Иногда авторы в своем исследовании пытаются установить именно структуры ионов, которые, кстати, могут существенно отличаться от

структуры исходной молекулы. В этом случае приведенные структуры обсуждаются в тексте особо, приводятся аргументы и, возможно, результаты дополнительных экспериментов, на основании которых сделан выбор в пользу приводимой структуры.

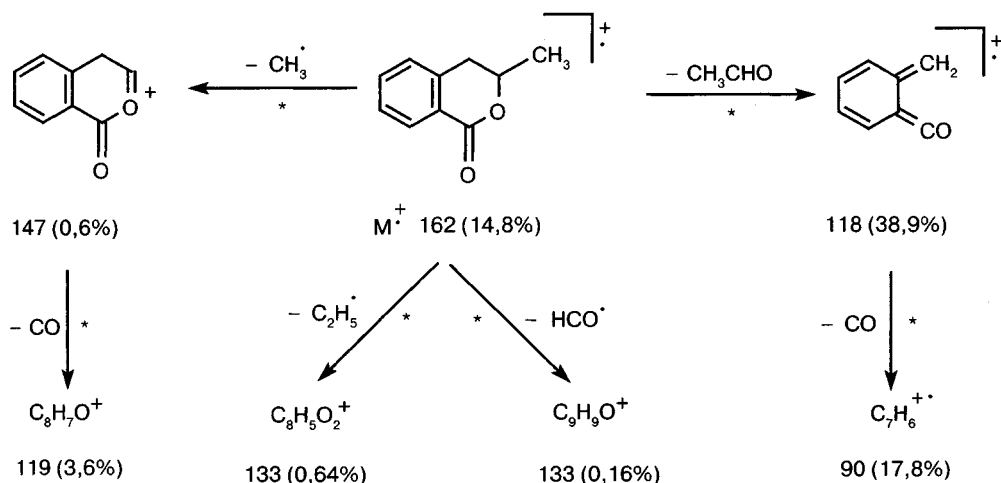


Схема 4.3

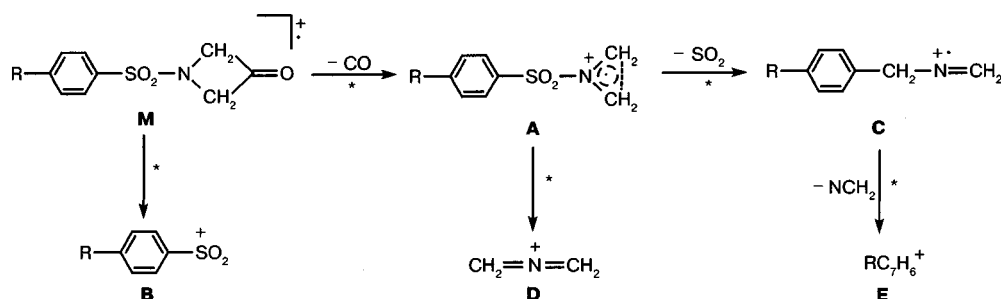


Схема 4.4

Таблица 4.6. Относительные интенсивности характеристических фрагментных ионов в масс-спектрах ИЭ N-арилсульфонилазетидин-3-онов

R	Интенсивности пиков ионов в % к полному ионному току					
	M	A	B	C	D	E
H	—	0,5	0,3	0,1	75,0	1,1
CH ₃	—	0,4	0,2	0,1	77,5	0,7
OCH ₃	0,3	0,6	0,9	0,8	73,7	0,7
Cl	—	0,5	0,4	—	77,7	0,2
NO ₂	—	0,1	0,1	0,1	65,7	0,5

Если речь идет о схеме фрагментации индивидуального соединения, удобно прямо на схеме, рядом со значением m/z привести интенсивность пика иона в процентах от максимального пика в спектре или от полного ионного тока (схема 4.3). Однако часто схема фрагментации отражает характерные направления распада

для группы родственных соединений. В этом случае оптимальным вариантом является буквенная маркировка на схеме непосредственно под брутто-формулой или структурой иона, а количественные результаты (относительные интенсивности характеристических фрагментных ионов) приводятся в таблице, которая сопровождает схему (схема 4.4, табл. 4.6). Для обозначения фрагментных ионов используют заглавные (A, B, C...) или строчные (a, b, c...) латинские буквы. Можно встретить также обозначения F_1, F_2, F_3, \dots , а в русскоязычной литературе $\Phi_1, \Phi_2, \Phi_3, \dots$ (от слова «фрагмент», fragment).

Если вы держите в руках новое вещество, которое вы синтезировали самостоятельно и охарактеризовали альтернативными методами, полезно максимально подробно разобрать масс-спектр. Вы знаете его структуру, и ваши выводы будут очень полезны в дальнейшем другим исследователям при идентификации. Если же речь идет об идентификации вещества в неизвестной смеси, то говорить об однозначном решении можно, только сняв масс-спектр стандарта в тех же условиях. Выводы о структуре соединения, сделанные исключительно по масс-спектру, носят вероятностный характер.

Для обобщения материала главы можно привести последовательность действий по интерпретации масс-спектра, предложенную Мак-Лафферти [43].

1. Изучить всю имеющуюся информацию о веществе (спектральную, химическую, историю появления данного образца). Отметить все параметры съемки масс-спектра. Проверить значения m/z .
2. Используя изотопные пики, вывести элементный состав всех фрагментов, для которых это возможно; подсчитать их степень ненасыщенности.
3. Провести тест на молекулярный ион (максимальное значение m/z , нечетно-электронность, выбросы нейтральных частиц).
4. Отметить все важнейшие нечетноэлектронные ионы, обусловленные перегруппировочными процессами.
5. Изучить общий вид спектра (стабильность молекулярного иона, лабильность связей и т.д.).
6. Приписать возможные структуры сериям ионов с низкой массой, важнейшим первичным, а также вторичным (тандемные спектры) ионам, важнейшим характеристическим ионам.
7. Постулировать структуру молекулы (тест по реальному спектру идентифицированного вещества, по спектрам близким структур, по спектру, предсказанному теоретически).

ГЛАВА 5

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ИОНИЗАЦИИ ОБРАЗЦА

Помимо ионизации электронами (разд. 2.1), для проведения масс-спектрометрических экспериментов применяется несколько десятков других методов ионизации, описанных на сегодняшний день. Часть из них используется очень активно, часть — только в единичных экспериментах. Популярность метода может достигать максимума в какой-то момент времени, а затем с появлением новых, более эффективных, сходиться на нет. Все большее значение приобретают методы масс-спектрометрии с ионизацией на открытом воздухе, в которых процедуры пробоподготовки или сведены к минимуму, или полностью устранены (гл. 9).

5.1. Ионизация фотонами (Photoionization)

Устранить разброс ионизирующих частиц по энергиям позволяет метод фотоионизации. Получить монохроматический пучок фотонов значительно проще, чем пучок электронов. Энергия фотонов обратно пропорциональна длине их волны. Энергии 1 эВ соответствует длина волны 12 395 Å. В коммерческих приборах, первый из которых был построен в 50-х годах [202], используются монохроматические пучки фотонов с разбросом энергий 0,01–0,02 эВ. Инертные газы являются основными источниками фотонов для масс-спектральных исследований. Газоразрядная трубка располагается вне источника ионов, куда фотоны проникают через окошко из фтористого лития. Энергии фотонов, излучаемых инертными газами в условиях тлеющего разряда, лежат в диапазоне 10–40 эВ, что позволяет ионизировать любые органические соединения. Например,



Другим достоинством ионизации фотонами является полная передача энергии при взаимодействии излучения с молекулой вещества, т.е. исследователь точно знает избыточную энергию, сообщенную в результате ионизации образующемуся молекулярному иону. Метод чрезвычайно полезен для установления энергетических характеристик (энергии ионизации и появления) молекул, радикалов, ионов. Самостоятельный физико-химический метод — ультрафиолетовая фотоэлектронная спектроскопия [118] — основан на ионизации вещества фотонами.

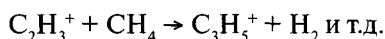
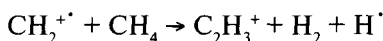
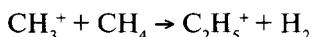
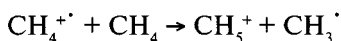
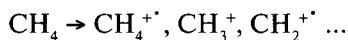
В настоящее время доля работ с использованием классической фотоионизации (за исключением процессов с применением лазера) невелика. Это связано с экс-

периментальными сложностями, незначительной фрагментацией молекулярных ионов, зависимостью фрагментации от энергии фотонов, а также необходимостью переводить анализируемый образец в газовую фазу, как и в случае ИЭ.

5.2. Химическая ионизация (Chemical Ionization, CI)

В 1966 году Мансон и Филд [203] описали новую технику получения масс-спектра — химическую ионизацию (ХИ). Это был «мягкий» метод ионизации. Избыточная энергия генерируемых заряженных частиц в этом случае не превышает 5 эВ. Как следствие, фрагментация оказывается весьма незначительной. Иногда спектр представляет собой только пик молекулярного иона (протонированной молекулы), а регулируя давление в источнике ионов, можно активизировать или подавлять фрагментацию. Главное достоинство метода заключается в его способности предоставлять информацию о молекулярной массе анализируемых соединений в тех случаях, когда ИЭ не в состоянии этого сделать. Наиболее полным изданием, посвященным ХИ, является монография А. Гаррисона [204].

Процесс ионизации осуществляется в основном в результате ионно-молекулярных реакций. Главным отличием ХИ от ИЭ является существенно более высокое давление в источнике ионов (до 1 мм рт.ст.). Это давление создается за счет газа-реагента. Таким газом может служить практически любое летучее вещество: гелий, вода, метан, аммиак, сероуглерод, бензол, этилендиамин, изобутан и т.д. Желательно, но не строго обязательно, чтобы это вещество образовывало один или несколько (2–3) высоко реакционноспособных ионов при взаимодействии с электронами или в результате ионно-молекулярных реакций. Само анализируемое соединение вносится, как и в случае ИЭ, в микроколичествах с парциальным давлением на уровне 10^{-5} мм рт.ст. Необходимые для ионизации образца ионы газа-реагента образуются при взаимодействии его молекул с электронами с энергиями 200–500 эВ, аналогично тому, как это происходит в ИЭ. Однако, если в условиях ИЭ образующиеся ионы не претерпевают столкновений с молекулами образца благодаря высокому вакууму в источнике, в случае ХИ такие столкновения неизбежны. В результате в источнике создается плазма с преобладанием каких-либо ионов, которые называются ионами-реагентами. Например, в случае метана в ионном источнике протекают следующие основные реакции:



В образовавшейся ионной плазме максимальную концентрацию имеют метоний катион CH_5^+ (44%) и этил катион C_2H_5^+ (30%). Именно эти частицы и являются ос-



новными ионами-реагентами химической ионизации метаном. Кстати, образование иона CH_3^+ в масс-спектрометре было впервые зафиксировано В.Л. Тальрозе еще в 1952 году [205]. Для изобутана ионом-реагентом является третбутилкатион, образующийся при отщеплении атома водорода из молекулярного иона. Среди других газов-реагентов можно выделить часто используемые воду и аммиак. В первом случае ионом-реагентом является H_3O^+ , а во втором – NH_4^+ . Достаточно часто в качестве газа-реагента используется водород, причем образование иона-реагента H_3^+ было впервые описано Демпстером еще в 1916 году [206].

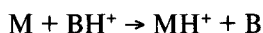
В представительном обзоре Дж. Бродбелт [207] описаны альтернативные газы-реагенты. В частности, хорошие результаты получены при использовании диметилового эфира [208]. Основным ионом-реагентом является катион $\text{CH}_3\text{OCH}_2^+$, при взаимодействии которого с молекулой анализируемого вещества идет образование трех продуктов: $[\text{M} + \text{CH}_3\text{OCH}_2]^+$, $[\text{M} + \text{CH}_3\text{OCH}_2 - \text{CH}_3\text{OH}]^+$ и $[\text{M} + \text{CH}_3\text{OCH}_2 - \text{CH}_2\text{O}]^+$. Интенсивности пиков этих ионов зависят от структуры соединений, включая тонкие стереохимические различия. Химическая ионизация диметилowym эфиром позволяет различать дизамещенные изомерные бензолы [209] и определять длину цепочки полиэтиленгликолей [210].

Триметилборат в качестве газа-реагента приводит к возникновению реакционноспособного иона-реагента $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{B}^+$ [211], с помощью которого удается различать изомерные диолы и полиолы, получать структурную информацию об амидах [212].

Хорошие результаты получены при работе с нуклеозидными антибиотиками с использованием ион-реагента $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2^+$ из 2-метоксиэтанола [213]. Ионом-реагентом при использовании ацетофенона или его замещенных аналогов служит ароил-катион. Его можно с успехом использовать для анализа гидроксил содержащих соединений [214].

Реакции между ионами-реагентами и молекулами образца можно разделить на четыре типа.

1. Протонирование



Способность или неспособность иона реагента BH^+ протонировать молекулу образца легко установить при сравнении величин сродства к протону (СП) соединений В и М. Если СП (М) > СП (В), идет реакция протонирования М. Чем больше разность величин СП (М) и СП (В), тем большей избыточной энергией будет обладать протонированная молекула MH^+ (уравнение (5.1)). Значения СП наиболее часто используемых газов-реагентов лежат в диапазоне от 423 кДж/моль для водорода до 936 кДж/моль для этилендиамина.

$$E = \text{СП}(\text{M}) - \text{СП}(\text{B}). \quad (5.1)$$

Понятно, что при использовании водорода уровень фрагментации будет максимальным, а при использовании этилендиамина – минимальным [215, 216]. Следует подчеркнуть, что в результате реакций этого типа образуются четноэлектронные ионы.

2. Перезарядка



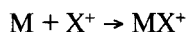
Для газов-реагентов, не содержащих доступных атомов водорода, важнейшей альтернативой переносу протона становится перенос электрона, т.е. процесс перезарядки. Избыточная внутренняя энергия образующегося молекулярного иона рассчитывается по уравнению (5.2):

$$E = \text{ЭР}(X^{+\cdot}) - \text{ЭИ}(M), \quad (5.2)$$

где ЭР – энергия рекомбинации, а ЭИ – энергия ионизации.

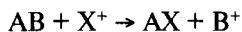
Вновь, как и в случае протонирования, чем меньше разность между двумя величинами, тем меньшей избыточной энергией будет обладать молекулярный ион. Учитывая, что энергии ионизации большинства органических молекул лежат в диапазоне 6–12 эВ, а энергии рекомбинации типичных газов-реагентов – в диапазоне от 9,2 эВ (бензол) до 24,6 эВ (гелий), можно подбирать газ-реагент таким образом, чтобы образующийся молекулярный ион обладал необходимой для каждого конкретного случая энергией. Таким образом, перезарядка позволяет получать нечетноэлектронные молекулярные ионы, аналогичные образующимся в ИЭ, но с заданной внутренней энергией [217–219].

3. Электрофильное присоединение



Наиболее наглядный пример этой реакции – образование интенсивных пиков ионов $[M + \text{NH}_4]^+$ широким кругом органических соединений при использовании в качестве газа-реагента аммиака. Если молекула имеет достаточно высокую величину сродства к протону, она протонируется ионом аммония, если же она является слабым основанием с низким СП, в результате присоединения иона аммония возникает стабильный комплекс, причем электроны для его образования предоставляются гетероатомами или центрами ненасыщенности в молекуле. Аналогичные аддукты образуются и при использовании других газов-реагентов [216, 219, 220]: для ионизации метаном характерны ионы $[M + \text{C}_2\text{H}_5]^+$ и $[M + \text{C}_3\text{H}_5]^+$, для ионизации окисью азота – ионы $[M + \text{NO}]^+$.

4. Отрыв аниона



Этот процесс характерен для взаимодействия молекул, обладающих низкой величиной СП, с протонирующими реагентами или для реагентов перезарядки с образцами, для которых перенос заряда является эндотермическим процессом. Примером является образование ионов $[M - \text{H}]^+$ при ионизации метаном [221] алифатических углеводов (разд. 10.1).

Большинство ионов реагентов способно участвовать более чем в одной из указанных реакций. Выше уже упоминался ион аммония. Аналогично, ион NO^+ может

вести себя и как реагент перезарядки [219], и как реагент отрыва аниона [222], и как электрофильная частица [219].

Иногда желаемый эффект достигается при использовании смеси газов-реагентов. Так, применение влажного аргона приводит к образованию ионов реагентов Ar^{+} и H_3O^+ . Первый вызывает перезарядку с последующей интенсивной фрагментацией, а второй действует как мягкий протонирующий агент, генерируя стабильные ионы MH^+ [223].

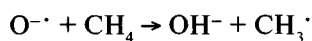
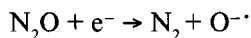
Химическая ионизация обычно используется для получения интенсивных пиков молекулярных ионов, протонированных или катионированных молекул. Для получения структурной информации в условиях химической ионизации очень удобно использовать tandemную масс-спектрометрию (гл. 7). Недостатком метода является, как и в случае ионизации электронами, необходимость перевода образца в газовую фазу, что не позволяет анализировать малолетучие и термолабильные соединения.

Еще одним направлением использования химической ионизации является изучение H/D обмена [224]. Метод дает возможность подсчитать число активных атомов водорода в молекулах анализируемых образцов. В качестве газов-реагентов используются CH_3OD , D_2O , ND_3 . Помимо подсчета активных атомов водорода, ХИ иногда позволяет различать изомеры, а также генерировать в газовой фазе изотопные аналоги, меченые по определенным положениям.

Очень эффективными ионами-реагентами оказались катионы металлов. Впервые об использовании для масс-спектрометрического анализа катионов щелочных металлов было заявлено в 1976 году [225]. Можно упомянуть использование ионов железа Fe^+ для установления положения кратных связей в алкенах, алкинах и кислотах [226], а также катионов меди Cu^+ для анализа карбонилсодержащих соединений [227].

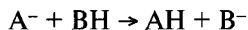
5.3. Химическая ионизация отрицательных ионов (Negative ion chemical ionization, NICI)

В стандартных условиях химической ионизации в ионизационной камере присутствуют низкоэнергетичные тепловые электроны, а из молекулы газа-реагента, помимо положительных ионов, образуются отрицательные ионы. Важно получить ионы, которые являются основаниями Бренстеда. Можно использовать в качестве газов-реагентов воду или аммиак. В этих случаях ионами-реагентами будут OH^- и NH_2^- соответственно. Очень популярна смесь закиси азота с метаном. В этом варианте в источнике идут две реакции с конечным образованием гидроксил-аниона:



Молекулы образца могут захватывать электроны с образованием анион-радикалов (резонансный захват электронов, разд. 2.1) или вступать во взаимодействие с ионами-реагентами. В последнем случае протекают ионно-молекулярные реакции нескольких типов.

1. Депротонирование



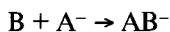
Этот процесс, как и в случае положительных ионов, контролируется величинами сродства к протону. Если величина СП иона реагента A^- выше, чем иона B^- , реакция оказывается экзотермичной, и процесс идет. Величины СП наиболее часто используемых ионов-реагентов лежат в диапазоне от 1689 кДж/моль для NH_2^- до 1395 кДж/моль для Cl^- . Понятно, что сильное основание NH_2^- будет депротонировать практически любое органическое соединение [228], тогда как мягкий ион Cl^- будет реагировать с весьма ограниченным кругом субстратов [229].

2. Перезарядка



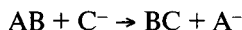
Если величина сродства к электрону анализируемой молекулы выше, чем молекулы газа-реагента, может идти процесс перезарядки. Например, молекула кислорода характеризуется низкой величиной сродства к электрону. Реагируя с органическими субстратами, ион $O_2^{\cdot-}$ приводит к образованию в результате перезарядки молекулярных анион-радикалов. Перезарядка может вести и к потере характеристических ионов. В частности, если в ионном источнике в результате какого-либо процесса образуются атомы фтора, обладающие очень высоким сродством к электрону, они могут, реагируя с анион-радикалами образца, превращать последние в нейтральные частицы [230].

3. Нуклеофильное присоединение



Анионы-реагенты с низкой величиной СП могут реагировать с молекулами субстрата с образованием стабильных аддуктов. Одним из наиболее активных в этом отношении ионов-реагентов является Cl^- . В результате нуклеофильного присоединения он образует комплексы с широким кругом органических молекул [231].

4. Нуклеофильное замещение



Любое основание является одновременно нуклеофилом, т.е. наряду с атакой на атом водорода возможна атака на атом углерода. Наиболее активно вступают в реакцию нуклеофильного замещения ионы OH^- и $O_2^{\cdot-}$ [42]. Последний является столь активным нуклеофилом, что может вытеснять атом водорода из ароматических соединений.

Метод химической ионизации отрицательных ионов активно используется в настоящее время и в фундаментальной масс-спектрометрии, и в прикладных исследованиях. В обзорах Дж. Бови [228, 232] рассмотрена фрагментация депротонированных молекул различных классов органических соединений. В обзоре [233] представлены результаты использования данного метода в экологических исследованиях.

5.4. Пульсирующая химическая ионизация (Pulsed positive, negative ion chemical ionization mass spectrometry)

Этот метод, предложенный Хантом [234], позволяет одновременно получать масс-спектры химической ионизации положительных и отрицательных ионов. Два вида спектров удачно дополняют друг друга, что важно и для целей структурного анализа, и для количественных расчетов, поскольку пределы обнаружения для разных соединений зависят от заряда ионов. Метод успешно используется на квадрупольных приборах (разд. 6.5), поскольку анализатор этого типа легко пропускает и катионы, и анионы.

В данном режиме полярность вытягивающего потенциала переключается со скоростью примерно 10 000 раз в секунду, поэтому ионы сгруппированы в «пакеты» с чередованием положительных и отрицательных. После прохождения анализатора положительные ионы направляются на один детектор, а отрицательные — на другой. Происходит регистрация сразу двух типов спектров. Важным моментом является природа газа-реактанта, который должен «работать» в обоих режимах. Например, хорошим вариантом является смесь метана с закисью азота, в которой роль основных ионов реагентов выполняют CH_5^+ и OH^- .

5.5. Десорбционная (прямая) химическая ионизация, ДХИ (Direct (Desorption) Chemical Ionization, DCI)

Скорости испарения и деструкции органических веществ имеют разные температурные зависимости. При низких температурах предпочтительна деструкция, а при высоких — испарение (рис. 5.1). Испарение труднолетучего вещества можно осуществить при его быстром нагреве до температуры, при которой испарение наиболее эффективно. Метод, использующий этот эффект в источнике химической ионизации, был впервые описан в работе Балдвина и Мак-Лафферти [235]. Следует отметить, что аналогичный подход был использован и для получения спектров ИЭ [236]. Этот метод называется ионизацией электронами в пучке. Название обусловлено тем, что образец на штоке прямого ввода помещается как можно ближе к пучку электронов, что уменьшает вероятность термодеструкции на внутренней поверхности источника.

Для прямой химической ионизации используют обогреваемые электрические эмиттеры. Очень хорошо зарекомендовали себя эмиттеры полевой десорбции (разд. 5.7), но, поскольку они сложны в изготовлении, обычно используется вольфрамовая, ренийевая или платиновая проволока диаметром 50–200 мкм. Для увеличения выхода молекулярных ионов проволока

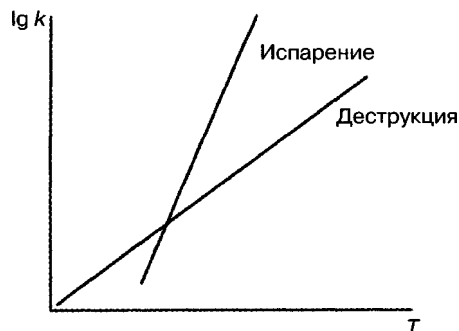


Рис. 5.1. Зависимость скоростей деструкции и испарения от температуры образца

покрывается нанесенным с помощью электрофореза полиимидным слоем. После снятия спектра для повторного использования эмиттера желательна его прожарка. Как правило, эмиттеры с полиимидным слоем годятся не более чем для 10 образцов.

Метод применим для анализа термолабильных и нелетучих соединений: сахаров, пептидов, солей, кислот. Спектр представляет собой интенсивный пик молекулярного иона и ряд пиков фрагментных ионов, часть из которых может быть обусловлена не фрагментацией молекулярного иона, а термодеструкцией исходной молекулы. Зачастую ДХИ используют для увеличения выхода молекулярных ионов. В этом случае полезно несколько повысить давление в ионизационной камере за счет газа-реагента. Некоторое снижение абсолютной чувствительности компенсируется определенным подавлением фрагментации. Очень важную роль играет газ-реагент. Так, фрагментация аскорбиновой кислоты при использовании метана интенсивнее, чем при использовании аммиака (ионы $[M+NH_4]^+$). Еще лучше проявляют себя ионы Cl^- . В этом случае спектр представлен исключительно пиками ионов $[M+Cl]^-$. Таким образом, для снижения фрагментации предпочтительно использовать «мягкие» ионы-реагенты (NH_4^+ , Cl^- , OH^-).

Для каждого вещества существует оптимальная температура съемки спектра. Анализируя неизвестное соединение, его нагревают по 10 градусов в минуту и находят оптимум. При повторной съемке резко нагревают вещество до этой температуры. Существенным недостатком метода является быстрое ухудшение качества спектра во времени. Это связано с процессами термодеструкции, которые все-таки идут с заметной скоростью. Некоторого улучшения можно добиться при быстрой развертке спектра [237].

Следует подчеркнуть, что в последнее время метод используется крайне редко, поскольку ряд современных методов, прежде всего электрораспылительная ионизация (разд. 5.13) и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (разд. 5.15), существенно эффективнее для всех групп соединений, для которых была актуальна десорбционная химическая ионизация.

5.6. Полевая ионизация (Field Ionization, FI)

Еще одним методом получения интенсивного пика молекулярного иона является полевая ионизация (ПИ). Родоначальником данного подхода к анализу органических молекул является Беккей [238]. Ключевую роль играет проволочный эмиттер, поверхность которого покрыта микроиглами. В простейшем случае эмиттером может служить острие иглы или лезвие бритвы. На эмиттер подается высокое напряжение (8–10 кВ). Благодаря малому радиусу кривизны на концах игл создается высокая напряженность электрического поля (до 1 В/Å). Молекула образца в газовой фазе, оказываясь в непосредственной близости от эмиттера, подвергается воздействию этого поля. Основным механизмом ионизации является туннелирование электрона из молекулы органического соединения на эмиттер. Энергия, переносимая в результате такого процесса, составляет доли электронвольта, т.е. избыточная энергия молекулярного иона (M^{++}) значительно ниже, чем даже в условиях ХИ. Кроме того, другие электроны ионизирующейся молекулы не возбуждаются, и

M^{++} оказывается в основном (невозбужденном) электронном состоянии. Высокий положительный потенциал эмиттера резко выталкивает образовавшийся катион из источника. Среднее время присутствия M^{++} в источнике полевой ионизации составляет 10^{-12} секунды, тогда как в случае ИЭ — 10^{-6} секунды. В результате даже возможные низкоэнергетические процессы фрагментации не успевают реализоваться в полной мере, и спектр зачастую представляет собой единственный пик, принадлежащий молекулярному иону [239].

Полевая ионизация, являясь наиболее мягким методом, в то же время не устраняет недостатка ХИ и ИЭ, связанного с необходимостью перевода образца в газовую фазу. Для его преодоления была предложена модификация метода, получившая в свое время широкое признание и названная полевой десорбцией.

5.7. Полевая десорбция (Field Desorption, FD)

Аппаратурное оформление, а также механизм полевой десорбции не отличаются от описанных выше для полевой ионизации. Единственным, но принципиальным отличием является нанесение образца непосредственно на эмиттер. После испарения растворителя эмиттер помещается в источник ионов. При подаче на него высокого напряжения в результате туннелирования электрона из молекулы образца ион образуется непосредственно в конденсированной фазе. Поскольку энергия десорбции иона с поверхности одноименно заряженного эмиттера значительно ниже, чем энергия десорбции исходной нейтральной молекулы, ион переходит в газовую фазу. В отличие от полевой ионизации образуются в основном четноэлектронные протонированные молекулы MH^+ . Добавка к анализируемому образцу кислот или неорганических солей облегчает процесс ионизации с образованием ионов MH^+ и $[M+\text{катион}]^+$. В этом случае, поскольку ионы присутствуют уже в конденсированной фазе, для их извлечения требуется меньший потенциал (около 10^{-2} В/Å). Метод хорошо зарекомендовал себя для анализа сахаров, пептидов, нуклеотидов, солей, кислот. Отличные результаты получены также при анализе синтетических неполярных полимеров [240].

Определенные проблемы полевой десорбции (как и полевой ионизации) связаны с изготовлением эмиттеров и нанесением на них образца. Тонкие углеродные иглы обычно наносят на эмиттер пиролизом бензонитрила в специальной камере. Длинные иглы требуют тщательного изготовления, а короткие затрудняют нанесение образца. Спектры часто получаются неинтенсивными. Для преодоления этого недостатка используется многократное сканирование внутри узкого интервала масс с последующим интегрированием. В результате устраняется нестабильность спектра и улучшается отношение сигнал/шум.

Как и ДХИ, методы полевой десорбции и полевой ионизации применяются в настоящее время очень редко, поскольку возможности современных методов, прежде всего электрораспылительной ионизации и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации, существенно выше, причем последние лишены недостатков ПИ/ПД. Тем не менее уже в XXI веке фирма Waters создала прибор, который способен за один ввод пробы попеременно регистрировать спектры ЭИ и ПИ. Первый дает информацию о структуре, а второй — о молекулярной массе.

5.8. Тлеющий разряд (Glow discharge)

Первое сообщение о масс-спектрометрии с тлеющим разрядом появилось в 1974 году [241]. Метод основан на образовании в условиях тлеющего разряда ионов Ar^{+} , которые ускоряются к катоду, бомбардируют его и ионизируют его материал. Образец наносится на катод или непосредственно сам является катодом. Метод применяется в основном в неорганической химии для установления элементного состава проводников, полупроводников и даже изоляторов [242, 243].

Предложенный в 2014 году способ ионизации органических соединений в кондиционированном тлеющем разряде (КТР) в газовой фазе (например, после выхода из колонки ГХ) основан на пеннинговской ионизации молекул метастабильными атомами аргона при давлении газа на уровне форвакуумного [244]. Метод позволяет генерировать исключительно молекулярные катион-радикалы $\text{M}^{+\cdot}$ (без примеси протонированных молекул, как в ХИ), которые претерпевают лишь ограниченную фрагментацию даже в случае алканов, фталатов и нитросоединений (рис. 5.2).

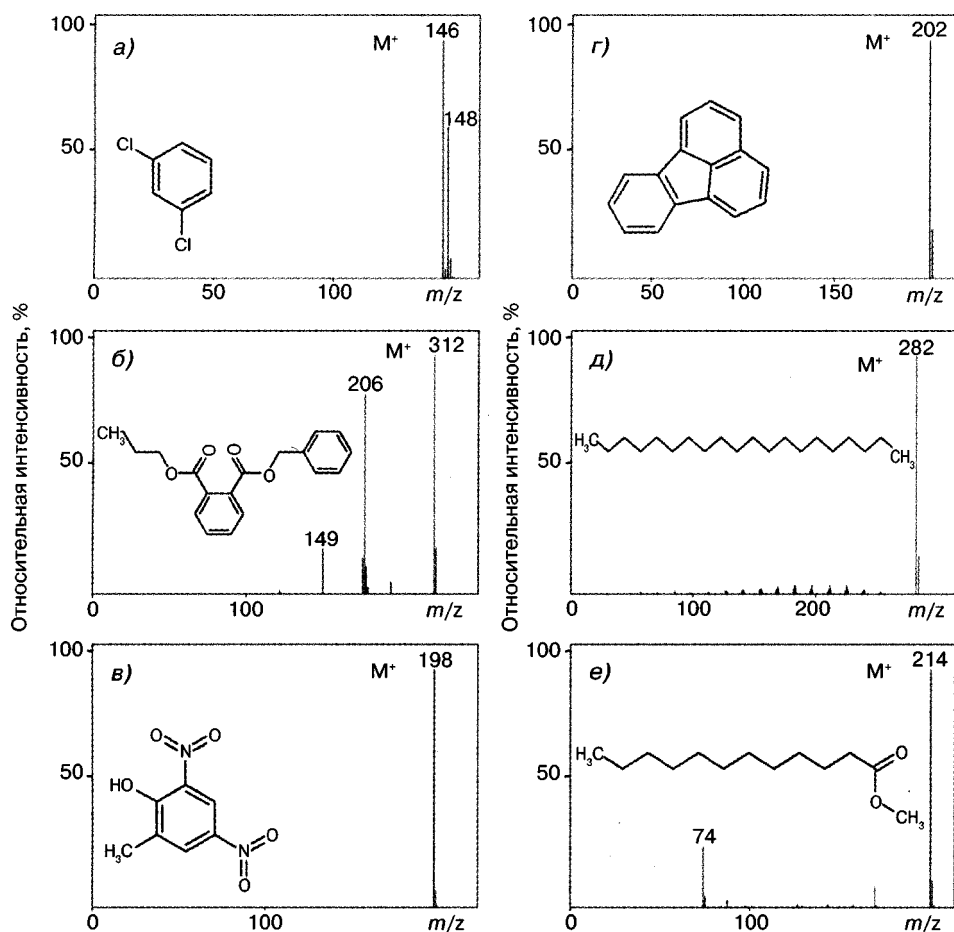


Рис. 5.2. Спектры кондиционированного тлеющего разряда ряда соединений

Тем не менее при использовании индуцированной фрагментации в источнике регистрируются масс-спектры, близкие спектрам ионизации электронами. Линейная зависимость интенсивности сигнала от концентрации в пределах четырех порядков динамического диапазона, независимость от присутствия химической матрицы и чувствительность, практически одинаковая для широкого круга разнообразных соединений, включая алканы и жирные кислоты, являются дополнительными достоинствами КТР. Описанный метод, одновременно включающий мягкую ионизацию, возможность инициировать фрагментацию молекулярных ионов и потенциал для количественного анализа, открывает новые возможности в аналитической химии. Фактически он преодолевает недостатки ИЭ, связанные с нестабильностью молекулярного иона, при сохранении характеристической для ИЭ фрагментации.

5.9. Плазменная десорбционная масс-спектрометрия (Plasma desorption mass spectrometry, PDMS)

Первое сообщение об использовании продуктов распада ^{252}Cf для ионизации органических веществ опубликовано в 1976 году Макфарлейном [245]. Многочисленные продукты деления изотопа ^{252}Cf обладают энергиями в сотни МэВ. Когда они проходят через металлическую фольгу, на которую нанесен анализируемый образец, создается быстрый локальный разогрев (до 10 000 К). В результате наблюдается процесс, аналогичный десорбционной химической ионизации (разд. 5.5), при котором скорость десорбции (испарения) органических молекул оказывается выше скорости их разложения. Метод характеризуется очень высокой чувствительностью и позволяет получать спектры полярных соединений [246]. Диапазон масс достигает десятков тысяч дальтон [247]. Однако в связи с низкими ионными токами он может использоваться только с времяпролетным анализатором в импульсном режиме. Еще одним недостатком является необходимость работы с радиоактивными продуктами распада. Эти ограничения не позволили плазменной десорбции успешно конкурировать с другими методами анализа подобных соединений.

5.10. Бомбардировка быстрыми атомами, БА (Fast Atom Bombardment, FAB); вторичноионная масс-спектрометрия, ВИМС (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS)

Метод ионизации, позволивший в начале 80-х годов вывести масс-спектрометрию на новый качественный уровень, также использует принцип бомбардировки образца энергетическими частицами. Принципиальная схема ионизации бомбардировкой быстрыми атомами [248] представлена на рис. 5.3.

Пучок ускоренных атомов (обычно инертные газы) направляется на раствор вещества, нанесенный на металлическую подложку, расположенную на конце штока прямого ввода. Взаимодействуя с веществом, атомы создают интенсивный локальный разогрев, в результате которого молекулы поверхностных слоев отрываются в

виде плотного газа, содержащего положительные и отрицательные ионы, а также нейтральные частицы, которые также могут ионизироваться непосредственно над поверхностью образца.

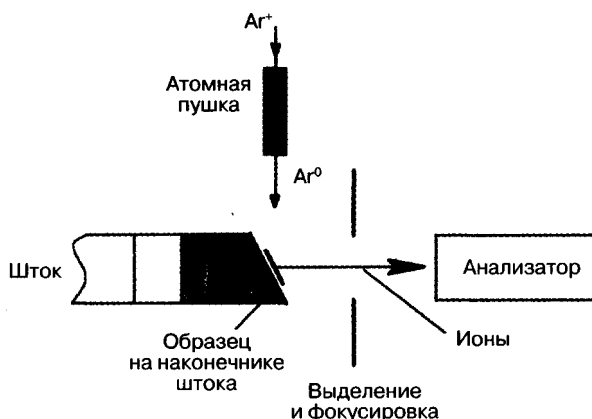


Рис. 5.3. Принципиальная схема ионизации бомбардировкой быстрыми атомами

Для получения пучка атомов используется атомная пушка. Сначала получают ионы инертного газа, которые далее ускоряются потенциалом 6–8 кВ. Разогнанные ионы взаимодействуют с атомами газа путем переноса заряда. Этот процесс протекает без заметного изменения кинетической энергии. Непрореагировавшие ионы отклоняются специальной линзой, а образовавшиеся в результате перезарядки ускоренные атомы с энергией 6–8 кэВ направляются под углом 60–70° на поверхность образца. Реакция рекомбинации используется в альтернативном варианте атомной пушки. В этом случае пучок ионов ускоряется по направлению к образцу и пересекает пучок электронов, движущихся в перпендикулярном направлении. Захватывая электроны, ионы превращаются в атомы. При этом ни энергия, ни направление движения разогнанных частиц не меняются. На выход ионов анализируемого образца существенно влияет масса разогнанных частиц первичного пучка. Например, пучок атомов Хе эффективнее, чем Ag и тем более Ne.

Если на шток нанесено сухое вещество, то через короткий промежуток времени наблюдается резкое падение интенсивности пучка генерируемых ионов, так как разрушается поверхностный слой кристаллической решетки вещества. Поэтому используют растворенный образец. Диффузия в жидкой матрице протекает достаточно быстро для того, чтобы обеспечить постоянную концентрацию молекул образца на поверхности. В этом случае пучки ионов образца достаточной интенсивности могут генерироваться в течение длительного времени (20 и более минут). В качестве растворителя (матрицы) может использоваться широкий круг нелетучих соединений, включая, например, ДМСО, краунэфиры, жидкие парафины. Однако вещество матрицы должно удовлетворять нескольким требованиям: быть низкотлетучим, чтобы препятствовать быстрому испарению в условиях вакуума, и химически инертным; оно не должно быть слишком вязким, чтобы не затруднять диффузию молекул аналита к поверхности, и должно хорошо растворять анализируемое со-

единение. Наиболее распространен глицерин. Температурный диапазон работы с глицерином составляет от -20 до $+40$ °С при оптимальной температуре 25 °С. Вторым соединением по частоте использования в качестве матрицы является *метанитробензиловый спирт*. Важно, чтобы образец был именно растворен в матрице. Если равномерного растворения нет, качество спектров значительно ухудшается. Помочь может добавление солюбилизаторов. Учитывая важность растворимости вещества, не удивительно, что количественный анализ смесей с помощью ББА приводит к непредсказуемым результатам в связи с большими различиями в чувствительности к разным компонентам.

Метод ББА – модификация **вторичноионной масс-спектрометрии (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS)**, которая давно используется в неорганической масс-спектрометрии [249] и заключается в бомбардировке образца разогнанными ионами, например Cs^+ . Однако попытки анализировать органические соединения [251, 252], хотя и позволили получить спектры ряда труднолетучих веществ, не привели к серьезным успехам. Причина заключалась в том, что исследователи анализировали сухое вещество, а быстрое деформирование поверхности его кристаллической решетки приводило к получению некачественных масс-спектров. Когда после успешного применения ББА провели эксперименты по бомбардировке растворенного образца ионами, спектры оказались не хуже, чем при бомбардировке атомами. В частности, ионы Cs^+ с энергией 6 кэВ и атомы Хе с энергией 8 кэВ позволяют получать идентичные спектры. Кстати, Беннингховена считают основоположником метода именно благодаря работе [250], опубликованной в 1976 году. Тем не менее Г.Д. Танцырев опубликовал свои результаты исследований с применением ВИМС в 1971 году [252], а с использованием ББА – в 1973 году [253].

Хотя важнейшим достоинством ББА является возможность получать масс-спектры соединений с массами в несколько тысяч дальтон, это не мягкий метод ионизации, типа полевой десорбции. Бомбардировка образца быстрыми атомами обеспечивает передачу молекулам энергии в широком диапазоне. В результате наряду с пиками молекулярных ионов в спектре наблюдаются интенсивные пики осколочных ионов, что позволяет в ряде случаев не прибегать к тандемной масс-спектрометрии (гл. 7) для изучения фрагментации и структуры анализируемых молекул.

Следует отметить принципиальное сходство спектров ББА и ХИ. Оба вида характеризуются четноэлектронными ионами типа MH^+ и $[\text{M}-\text{H}]^-$, но не M^{++} и M^{--} . Отчасти это является результатом ионно-молекулярных реакций, протекающих в плазме над поверхностью образца, отчасти перенос протона идет еще в жидкой матрице. Молекулярные ионы (M^{++}) все же могут образовываться в условиях ББА в случае неполярных аналитов или в качестве минорных пиков. Использование в качестве растворителя материалов с большей основностью приводит к образованию ионов $[\text{M}+\text{матрица}]^+$. Качество спектров можно повышать добавками, вызывающими образование ионов непосредственно в жидкой фазе. Добавки кислот приводят к увеличению интенсивности пиков в спектрах положительных ионов соединений с центрами основности, а добавки щелочей используются для увеличения выхода отрицательных ионов в спектрах соединений с кислотными группами. В частности, полипептиды с избытком основных аминокислот [254] характеризуются спектрами положительных ионов с интенсивными пиками MH^+ . В спектрах полипептидов с

избытком кислотных групп интенсивность этого пика мала, тогда как пики депротонированных молекул, напротив, весьма интенсивны. Иногда полезно добавлять к образцу неорганические соли. Например, добавка NaCl к образцам олигосахаридов или полипептидов в глицериновой матрице [248] приводит к образованию интенсивных пиков ионов $[M+Na]^+$.

Бомбардировка быстрыми атомами эффективна для анализа самых разнообразных соединений: сахаров, нуклеотидов, витаминов, солей, антибиотиков, маталлоорганических соединений, простагландинов, стероидов, порфиринов и т.д. [42, 255, 256]. К сожалению, неудовлетворительные результаты получаются при анализе неполярных полимеров (например, полистирола). Не столь эффективна также работа с низкомолекулярными соединениями с массой менее 300 Да. В этом случае мешают многочисленные матричные пики. Наиболее впечатляющих успехов, однако, удалось достичь в анализе пептидов. Наличие интенсивных пиков молекулярных и фрагментных ионов в сочетании с диапазоном регистрируемых масс более 10 000 дальтон позволили секвенировать пептиды (разд. 11.1). Тем не менее в настоящее время метод практически вычеркнут из активной практики, уступив пальму первенства более эффективным электрораспылительной ионизации и матрично активированной лазерной десорбции/ионизации.

Модификацией БАА является метод **бомбардировки тяжелыми кластерами (Massive cluster impact, MCI)**. В этом случае в качестве энергетических частиц используются кластеры ионов аммония с глицерином. В результате их взаимодействия с образцом образуются многозарядные ионы, т.е. появляется возможность получать спектры более тяжелых, чем в случае классической БАА, биополимеров. Использование кластеров увеличивает также чувствительность анализа [255].

Метод ВИМС в последние годы обрел второе дыхание благодаря его высокой эффективности в масс-спектрометрической визуализации (разд. 9.9). В качестве бомбардирующих частиц используются самые разнообразные ионы, например C_{60}^+ , Bi_3^+ , Au_3^+ , Ga^+ и т.д. [257–259]. Для установления распределения молекул в биологических тканях, в геологических породах или, например, метеоритах ВИМС зачастую превосходит альтернативные методы (МАЛДИ, ДЭРИ) благодаря возможности работать с низкомолекулярными соединениями (< 1000 Да) и высокому пространственному разрешению [260]. Например, при использовании заряженных пучков фуллерена достигнуто разрешение 100 нм [259]. Определенным недостатком ВИМС для целей масс-спектрометрической визуализации является уменьшение чувствительности при работе с молекулами тяжелее 500 дальтон и повышенная фрагментация.

5.10.1. Проточный (динамический) вариант бомбардировки быстрыми атомами (*Continuous Flow or Dinamic Fast Atom Bombardment*)

Принципиальная схема метода бомбардировки быстрыми атомами (ББА) в проточном варианте [261] представлена на рис. 5.4. Поток из колонки хроматографа направляется в капилляр штока ввода в источник. Капилляр заканчивается сеткой или медной пластинкой, используемой в качестве подложки в статическом варианте метода, в которой высверливается отверстие для поступления образца.

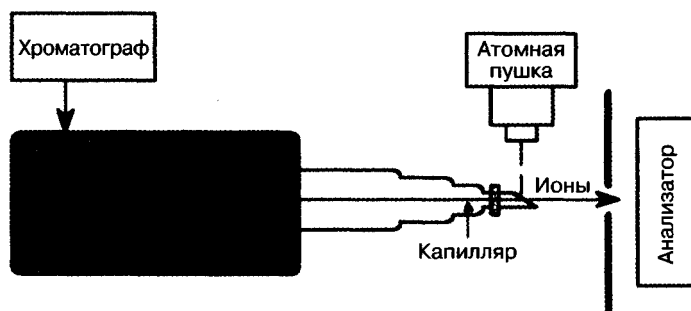


Рис. 5.4. Принципиальная схема метода бомбардировки быстрыми атомами в проточном варианте

Раствор подается в источник со скоростью не более 10 мкл/мин. Температура подложки поддерживается на уровне 40–60 °С, что позволяет избежать замораживания образца в результате активного испарения растворителя в условиях высокого вакуума. Низкие приемлемые скорости потока заставляют проводить его деление на выходе из колонки хроматографа, что, безусловно, ухудшает чувствительность метода, которая тем не менее в благоприятных случаях может достигать уровня пикомолей [262].

Еще одной конструктивной особенностью метода является подача в поток глицерина в количестве 1–5%. Глицерин необходим для эффективной ионизации (разд. 5.10), служа матрицей. Его можно добавлять непосредственно в жидкую фазу перед хроматографированием. Однако в этом случае может ухудшаться разделение компонентов. Поэтому чаще врезают подвод глицерина на выходе из колонки хроматографа [262].

5.11. Химическая ионизация при атмосферном давлении (*Atmospheric pressure Chemical Ionization, APCI*)

Простейшая теоретическая стыковка жидкостного хроматографа с масс-спектрометром может осуществляться при атмосферном давлении в источнике ионов. Такой вариант прибора достаточно широко используется начиная с 70-х годов XX века [263, 264].

Принципиальная схема прибора представлена на рис. 5.5. Поток из обычной колонки жидкостного хроматографа направляется в распылитель, где он превращается в мелкодисперсный аэрозоль, смешиваясь с большим количеством нагретого газа (обычно азот или воздух). Капельки аэрозоля в окружении газового потока перемещаются в область испарения, где в газовую фазу переходит большая часть молекул растворителя. Далее на пути потока следует область ионизации. Так как в источнике поддерживается атмосферное давление, ионизация осуществляется либо за счет коронного разряда, либо при взаимодействии молекул с электронами, эмиттируемыми β -излучателями (например, фольга из ^{63}Ni). Основные первичные ионы обусловлены ионизированными молекулами атмосферных газов, прежде всего азота.

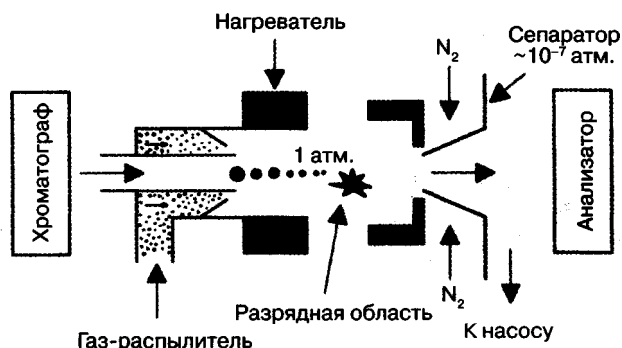


Рис. 5.5. Принципиальная схема источника ионов, работающего при атмосферном давлении

В условиях атмосферного давления эти первичные ионы взаимодействуют с самыми разнообразными частицами, создавая газовую плазму. Молекулы аналитов ионизируются по механизмам, рассмотренным выше для химической ионизации. Наиболее активными ионами-реакентами оказываются катион гидроксония H_3O^+ и гидроксил-анион OH^- . Первый приводит к образованию протонированных, а второй – депротонированных молекул. На выходе из источника ионов расположен ряд последовательных сепараторов с узкими входными отверстиями. Здесь происходит откачка легких молекул для снижения избыточного давления. В результате в анализатор, работающий в условиях глубокого вакуума, поступают в основном ионы анализируемого вещества. Метод может использоваться в сочетании и с газовой, и с жидкостной хроматографией. Он пригоден для пестицидов, стероидов, лекарственных препаратов и их метаболитов. Метод ХИАД особенно эффективен для соединений меньшей полярности (по сравнению с электрораспылением) и большей полярности (по сравнению с фотоионизацией при атмосферном давлении). Он также оказался удобнее других методов ионизации для анализа небольших полярных органических молекул. Еще одной особенностью ХИАД является ее толерантность по отношению к буферным смесям. Это упрощает использование метода в сочетании с жидкостной хроматографией по сравнению с ИЭР. ХИАД можно использовать в варианте прямого ввода образца, когда компоненты твердой пробы переходят в газовую фазу при размещении капилляра с пробой в потоке горячего инертного газа [265]. Этот подход, называемый **анализом твердых образцов при атмосферном давлении** (atmospheric-pressure solid analysis probe, ASAP), в определенной мере аналогичен прямому вводу с ионизацией электронами (разд. 9.2.3).

Для полярных аналитов, растворенных в воде, вместо коронного разряда в источнике ХИАД можно использовать металлическую пластинку, на которую подается напряжение в несколько сот вольт. Эта пластина инициирует протонирование нейтральных молекул в спрее хроматографа и направляет образовавшиеся ионы, а также уже имеющиеся газофазные ионы в анализатор масс-спектрометра [266–268]. Метод получил название **химическая ионизация, активированная поверхностью** (surface-activated chemical ionization, SACI).

5.12. Фотоионизация при атмосферном давлении (ФИАД) и фотохимическая ионизация при атмосферном давлении (ФХИАД), Atmospheric pressure photoionization (APPI), Atmospheric pressure photochemical ionization (APPCI)

Если исследователя интересуют менее полярные соединения, например стероиды, более эффективным методом по сравнению с электрораспылением или ХИАД становится фотоионизация при атмосферном давлении (ФИАД). Фотоионизация еще в середине XX века успешно использовалась для установления физико-химических характеристик молекул (разд. 5.1). Первый коммерческий прибор был создан в 1956 году [202]. В 1970-х годах фотоионизационный детектор (ФИД) стал использоваться в газовой хроматографии [269], а несколько позже и в жидкостной [270]. Тем не менее фотоионизацию при атмосферном давлении в масс-спектрометре первым осуществил И.А. Ревельский [271].

Источник ионов ФИАД похож на источник ХИАД, однако вместо коронного разряда используется газоразрядная трубка, генерирующая поток фотонов. Взаимодействие фотонов с молекулами приводит к возбуждению последних:



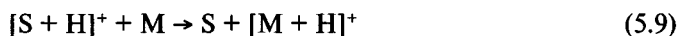
Если энергия фотона превышает энергию ионизации молекулы, образуется соответствующий молекулярный ион:



Процесс фотоионизации может протекать как в газовой, так и в конденсированной фазе. Тем не менее следует учитывать, что энергия ионизации (ЭИ) молекул в жидкости существенно ниже, чем в газе [272]. Это объясняется стабилизацией продуктов ионизации в результате их сольватации. Например, ЭИ воды в газовой фазе 12,62 эВ, что выше этой величины для большинства органических соединений. Однако в жидкой фазе ЭИ воды — 6,05 эВ. Этот факт делает воду в виде жидкости непригодной для использования в качестве растворителя в условиях фотоионизации, поскольку большинство анализируемых соединений имеет близкие величины ЭИ. Следовательно, испарение растворителя должно предшествовать фотоионизации, которая осуществляется при распылении раствора аналита в ионный источник, где УФ-излучение вызывает ионизацию молекул аналита в результате прямого или вторичных процессов.

В качестве источников фотонов используют газоразрядные лампы, заполненные инертным газом. Если для высоковакуумных методов масс-спектрометрии популярны гелиевые лампы с высокой энергией фотонов (разд. 5.1), в условиях атмосферного давления важно ионизировать только молекулы целевых соединений, оставив нейтральными молекулы растворителя и атмосферных газов (N_2 , O_2 , CO_2 ...). В связи с этим наиболее эффективным для ФИАД оказался криптон с энергией фотонов 10 эВ.

Тем не менее прямая ионизация молекул целевых соединений в растворах протекает малоэффективно, поскольку подавляющая часть фотонов захватывается молекулами растворителя (уравнение (5.3)). Хорошим выходом из этого положения оказалась добавка подходящего соединения в количестве на несколько порядков выше, чем анализируемое соединение [273, 274]. Это вещество, называемое допантом, служит медиатором между фотонами и молекулами образца. ЭИ допанта должна быть ниже, чем энергия фотонов, а образующиеся ионы допанта (уравнение (5.5)) должны обладать высокой энергией рекомбинации или низким сродством к протону. В первом случае ионы допанта будут вступать с молекулами целевых веществ в реакцию перезарядки (уравнение (5.6)), а во втором – протонирования (уравнение (5.7)). Последний процесс может идти в две стадии с участием молекул растворителя S (уравнения (5.8) и (5.9)).



Хотя, как и с другими методами ионизации, в большинстве исследований используется режим регистрации положительных ионов, метод ФИАД пригоден и для работы с отрицательными ионами. В этом варианте основной реакцией иона допанта является депротонирование молекулы аналита. Сами же ионы допанта возникают в результате захвата свободных электронов, которые присутствуют в системе в качестве продуктов фотоионизации нейтральных молекул.

Следует подчеркнуть, что в таком варианте правильнее называть метод фотохимической ионизацией при атмосферном давлении (ФХИАД). Тем не менее во многих публикациях используется термин ФИАД, что создает определенную путаницу. Хотя теоретически в качестве допанта можно применять самые разнообразные вещества, подавляющее большинство исследователей до сегодняшнего дня пользуются в основном толуолом или ацетоном.

Для того чтобы реакция (5.8) протекала, необходимо, чтобы величина СП молекулы растворителя была больше, чем у сопряженного радикала допанта (например, в случае использования толуола, бензильного радикала $C_7H_7^{\bullet}$). Однако зачастую она протекает и с растворителями с меньшей величиной СП. Дело в том, что молекулы растворителя могут группироваться в кластеры, СП которых становится выше. Так, метанол образует кластер из трех молекул спирта и молекулярного иона толуола (допанта). В случае ацетонитрила в таком кластере участвуют две молекулы растворителя. В кластеры могут объединяться и разные молекулы, например метанол и вода. Могут наблюдаться и другие побочные процессы. В частности, фотоионизация фурукумаринов при работе с ацетонитрильными растворами не требует допанта. Поскольку ЭИ ацетонитрила 12,2 эВ, что существенно выше энергии фотонов криптона (10 эВ), предложен вариант изомеризации УФ-возбужденных молекул

ацетонитрила с образованием структур с меньшей энергией ионизации [275]. Механизмы ионизации в условиях ФИАД, и ФХИАД продолжают изучаться, поскольку строгой теории по выбору условий эксперимента пока нет, и для каждого нового вещества необходимо подбирать оптимальные условия [276].

ФИАД (ФХИАД) эффективна в работе с ароматическими углеводородами, стероидами, фармацевтическими продуктами и их метаболитами, пестицидами, флавоноидами, небольшими молекулами-биомаркерами в биомедицинских исследованиях. Благодаря высокой монохроматичности фотонов ФИАД используется для измерения физико-химических параметров молекул, например их энергий ионизации [277].

Метод существенно расширил круг анализируемых соединений в петролеомике. На рис. 5.6 представлен рекордный масс-спектр ИЦР ПФ (разд. 6.4) образца сырой нефти без асфальтенов, в котором в диапазоне от 500 до 2000 дальтон зарегистрировано 105 817 пиков ионов с разным элементным составом [278]. Хотя этот спектр получен методом ИЭР, при работе с асфальтенами ФИАД позволяет получить в 5 раз больше пиков, чем ИЭР [278].

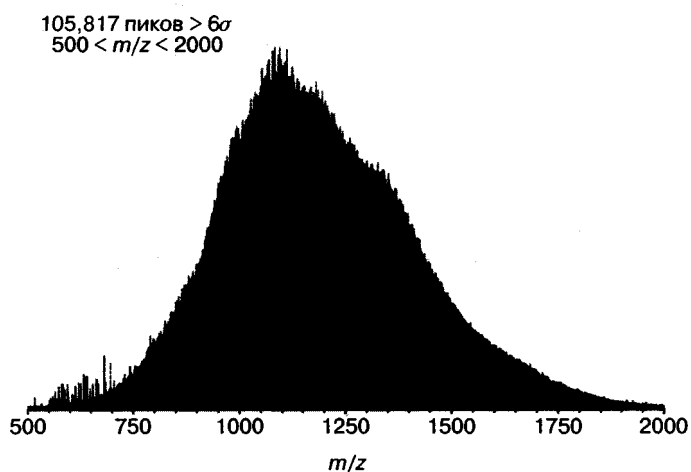


Рис. 5.6. Масс-спектр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье сырой нефти без асфальтенов [278]

Дополнительным достоинством ФИАД является возможность применения метода в условиях не только обратнофазной, но и прямофазной ЖХ. Тем не менее следует подчеркнуть, что результаты применения ФИАД (ФХИАД) зависят от большого числа переменных (природа и концентрация целевого вещества, растворителя и допанта, температура распылителя, наличие примесей и т.д.). Это лишает метод универсальности и требует тщательно отрабатывать технику эксперимента с каждым новым анализом. С точки зрения аналитической химии важным недостатком является неоднозначность в процессах образования ключевых ионов. Не всегда очевидно, будут ли образовываться молекулярные катион-радикалы или протонированные молекулы. Это создает проблемы и для качественного, и для количественного анализа. Подробнее о ФИАД см. в обзоре [279].

5.13. Ионизация электрораспылением, электроспрей (ИЭР)

Электрораспылительная ионизация (Electrospray Ionisation, ESI) произвела революцию в масс-спектрометрии, выведя ее в 90-х годах прошлого века на новый уровень. Метод позволил говорить не только об органической масс-спектрометрии, но и о биоорганической и даже биологической масс-спектрометрии.

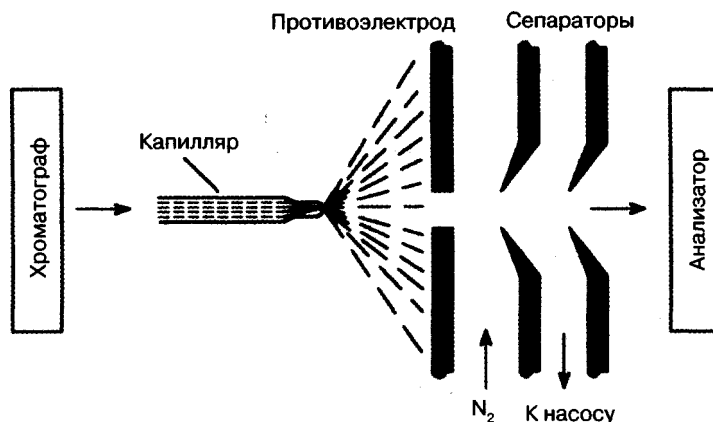


Рис. 5.7. Принципиальная схема метода электрораспыления

Определенный вклад в теорию и создание метода электрораспыления был сделан Доулем [280]. В 1979 году первые эксперименты по ИЭР были начаты под руководством Лидии Николаевны Галль в Ленинграде. Созданный метод был назван ЭРИАД — **экстракция и распыление ионов при атмосферном давлении**. Метод был реализован на статическом секторном приборе с двойной фокусировкой и в 1981 году были получены первые спектры брадикинина, многозарядных ионов инсулина, нелетучих солей. Было показано, что подача высокого напряжения (~1000 В) между выходным концом электрораспылительного капилляра и скиммером позволяет инициировать фрагментацию протонированных молекул без использования активации соударением. Результаты докладывались на многочисленных форумах в СССР в начале 1980-х годов. К сожалению, закрытость советской науки не позволила Л.Н. Галль опубликовать полученные результаты в рейтинговых международных журналах. Да и на русском языке они были опубликованы с большим опозданием в апреле 1984 года [281], поскольку большинство лидеров отечественной масс-спектрометрии настороженно относились к разработанному методу. Результаты заинтересовали Джона Фенна, который приезжал в СССР в 1983 году. Судьба исследований Фенна оказалась существенно более удачной. И хотя его первая работа вышла в свет лишь в сентябре 1984 года [282], т.е. позже пионерской работы Л.Н. Галль, ему удалось раскрыть потенциал электрораспыления для мирового научного сообщества, опубликовав позднее многочисленные результаты собственных экспериментов [283–285]. За развитие ИЭР в 2002 году Фенну присуждена Нобелевская премия.

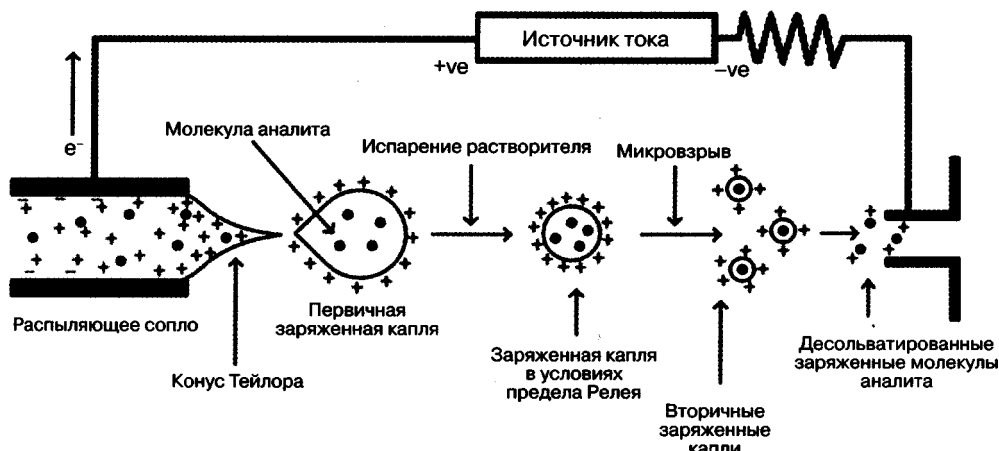


Рис. 5.8. Последовательная потеря ионами анализируемого соединения сольватной оболочки в механизме электрораспыления, предложенном Мора

Принципиальная схема ИЭР представлена на рис. 5.7. Поток из жидкостного хроматографа или из капилляра с помощью шприцевого насоса направляется в иглу диаметром 0,1 мм, на которую подается высокое напряжение порядка нескольких киловольт. На выходе из иглы в источнике ионов образуется аэрозоль из заряженных капель с высоким поверхностным зарядом (рис. 5.8). Эти капли движутся к противоэлектроду с потенциалом Земли. В этом же направлении уменьшается и давление, хотя в целом в этой части ионного источника (до противоэлектроды) давление поддерживается на уровне атмосферного. По мере движения к входному отверстию (или капилляру) первого сепаратора капли уменьшаются в размере за счет испарения растворителя. Достигая критического размера, при котором силы поверхностного натяжения далее не могут противостоять силам кулоновского отталкивания (предел Релея), капля «взрывается» с образованием более мелких капелек. Этот процесс повторяется. В итоге возникают микрокапли, содержащие всего одну заряженную частицу, которая может оказаться в газовой фазе после испарения остаточных молекул растворителя [286]. Этот механизм получил название «**модель остаточного заряда**» (charged residue model, CRM). Для окончательной десольватации может использоваться нагрев или столкновения с молекулами атмосферного фона. Альтернативный механизм **ионного испарения** [287] предусматривает выброс заряженной молекулы с поверхности одноименно заряженной капли. В обоих случаях в газовой фазе оказываются несольватированные протонированные (депротонированные) молекулы анализируемого вещества, которые проходят через сепаратор и оказываются в анализаторе. Трудносольтватруемые ионы легче испаряются с поверхности капель, а их пики оказываются в спектрах более интенсивными. Весомый аргумент в пользу второго механизма приведен группой Ренато Зеноби [288]. На рис. 5.9б представлен спектр флуоресценции, индуцированной лазером, перемещающимся вдоль шлейфа электрораспыления родамина. Видно, что в спектре присутствуют два пика, причем по мере удаления от капилляра длинноволновый пик сходит на нет, а интенсивность коротковолнового, наоборот, достигает максимума.

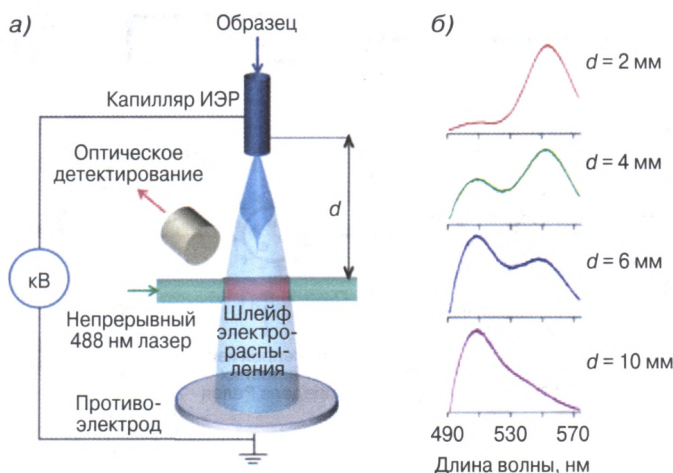


Рис. 5.9. Схема эксперимента с электрораспылением раствора родамина (а) и спектр его флуоресценции, индуцированной лазером, в зависимости от расстояния от конца капилляра (б) [288]

Длинноволновый пик авторы связали с сольватированными ионами родамина, а коротковолновый — со свободными. Отсутствие промежуточных максимумов в спектре интерпретировано как доказательство протекания ионного испарения из заряженных капель сольватированного родамина.

Изучение спектров ИЭР катионизированных белков [289] позволило сделать заключение, что белки третичной структуры преимущественно оказываются в газовой фазе по механизму заряженного остатка, а развернутые белки — по механизму ионного испарения. Реализация обоих механизмов для длинных цепей полиэтиленгликоля доказана также методом tandemной спектроскопии ионной подвижности [290]. Для коротких цепей ионное испарение оказывается предпочтительным. Механизмы ионизации остаются предметом серьезного изучения [291–299].

Поток газа (как правило, азота), подаваемый между противоэлектродом и первым сепаратором, а также коаксиально капилляру (газ-распылитель), приводит к улучшению распыления потока жидкости и лучшим условиям для десольватирования ионов. Такая модификация метода часто называется ионспреем. Этот вариант позволяет также увеличивать скорость потока жидкости в прибор до 200 мкл/мин, тогда как в обычном варианте скорость потока составляет 1–40 мкл/мин. Дополнительные модификации интерфейса [300] позволяют работать с потоками из обычных хроматографических колонок (до 2 мл/мин).

Наряду с попытками увеличения потока велись работы по уменьшению потока жидкости. В результате был создан метод, названный наноспреем [301]. Эта модификация электроспрея оперирует потоками со скоростями в несколько нл/мин и позволяет повысить эффективность образования ионов анализируемого вещества почти на два порядка. Этот вариант завоевал особую популярность в протеомных исследованиях, когда исследователь оперирует очень малыми пробами анализируемых веществ [302, 303]. Дополнительным преимуществом наноИЭР является устойчивость к повышенному содержанию солей в образце [302].

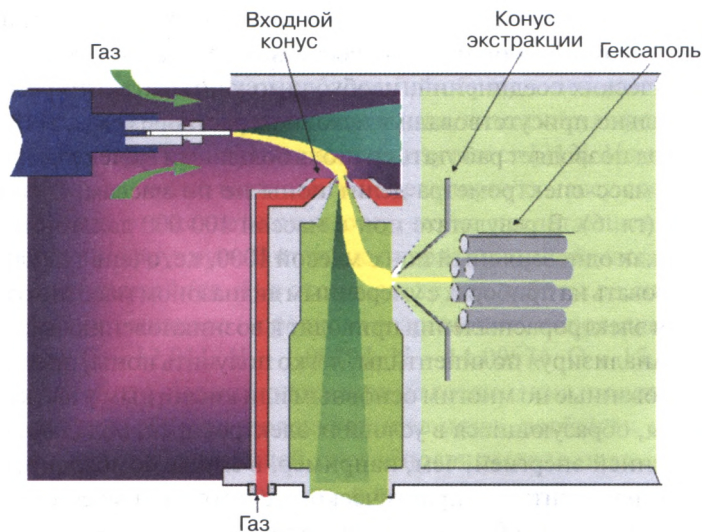


Рис. 5.10. Z-форма прибора для реализации метода электрораспыления

Качественный масс-спектр ИЭР можно получить при вводе в прибор менее 1 аттомоля (10^{-18} М) вещества. В ряде работ сообщается и об успешных экспериментах с зептомолярными (10^{-21} М) количествами аналитов.

В модификациях коммерческих масс-спектрометров может использоваться z-форма движения пучка ионов (рис. 5.10). Такой вариант благодаря дополнительным линзам позволил направить в анализатор лишь заряженные частицы, а не весь поток раствора образца. Это улучшило качество спектров и значительно снизило загрязнение приборов. Еще лучше очистка от нейтральных частиц осуществляется при использовании w-геометрии, когда направление движения ионов изменяется трижды.

Помимо высочайшей чувствительности и возможности работы с термолабильными и нелетучими соединениями, электроспрей предоставил исследователям возможность анализировать высокомолекулярные соединения с молекулярными массами до миллиона дальтон и выше [304]. Зарегистрированный рекорд составляет 110 000 000 дальтон [14], когда в масс-спектрометре с преобразованиями Фурье удалось измерить молекулярную массу ДНК бактериофага Т4, зарегистрировав молекулярные ионы с зарядом 28–35 тысяч. Особенных успехов удалось достичь при использовании электроспрея для установления структур полипептидов, белков, нуклеиновых кислот [5, 255], а также макромолекулярных комплексов, как, например, рибосомы [305] или даже целые вирусы [306, 307]. Интересно, что некоторые виды бактерий (например, *B. subtilis*) выживают, побывав в масс-спектрометре, и сохраняют жизнеспособность после процессов электрораспыления, деагломерации и десольватирования. Фактически они существуют некоторое время в вакууме, неся энное количество положительных или отрицательных зарядов [308]. В последних случаях принято говорить о **естественной** (native) электрораспылительной ионизации, когда эксперимент проводят с водным раствором аналита при физиологическом значении pH с добавкой летучего буфера и в мягких условиях десольватации.

Следует, однако, помнить, что в условиях ИЭР могут протекать электрохимические процессы. Для легко окисляющихся или восстанавливающихся веществ, например элементоорганических соединений, необходимо учитывать, что регистрируемые ионы не обязательно присутствовали в исходном растворе (разд. 10.14).

Почему метод позволяет работать со столь большими молекулами? Дело в том, что анализатор масс-спектрометра делит ионы не по массам, а по отношению массы к заряду (гл. 6). В результате ион с массой 100 000 дальтон и зарядом 100 регистрируется как однозарядный ион с массой 1000, т.е. очень тяжелые молекулы можно анализировать на приборах с умеренным диапазоном масс (по однозарядным ионам). Условия электрораспыления приводят к возникновению именно многозарядных ионов. Анализируя полипептиды, легко получить ионы, протонированные или депротонированные по многим основным или кислотным участкам молекулы. Поскольку ионы, образующиеся в условиях электроспрея, обладают значительно меньшей внутренней энергией, чем, например, в случае бомбардировки быстрыми атомами, их фрагментация практически отсутствует, а масс-спектр зачастую представляет набор пиков, обусловленных полипротонированными молекулами с различным числом протонов $[M+nH]^n+$. Для водных растворов глобулярных белков предложена даже формула расчета наиболее вероятного заряда: $Z = 0,078M^{1/2}$ [309]. Для инициирования фрагментации этих ионов необходимо использовать метод тандемной масс-спектрометрии (гл. 7). Типичный спектр полипептида представлен на рис. 5.11.

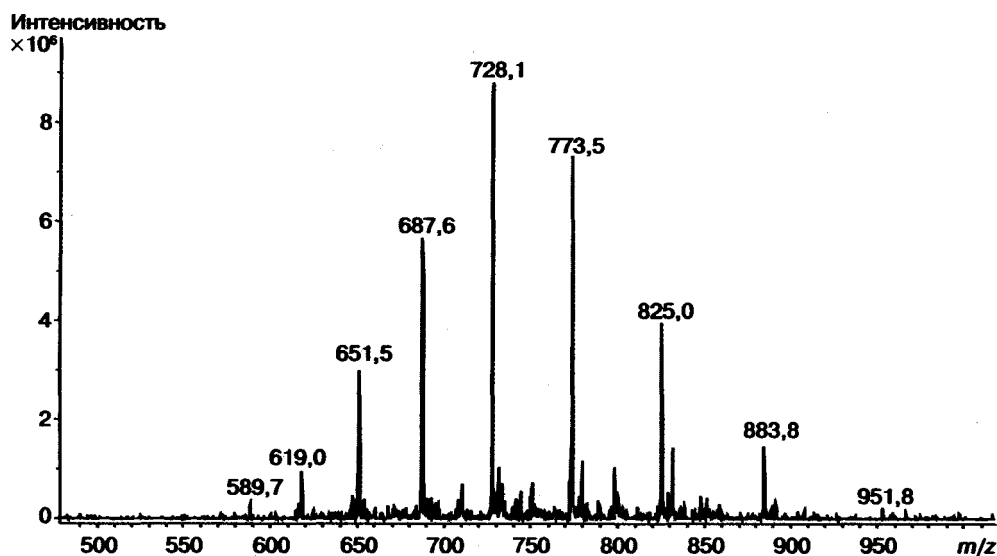


Рис. 5.11. Спектр ИЭР полипептида

Образование многозарядных ионов дает возможность работать с очень тяжелыми молекулами даже на приборах с небольшим диапазоном масс. Поэтому иногда полезно получить в эксперименте ионы с максимально возможным зарядом. В случае белков это можно сделать, денатурировав молекулу за счет повышения

температуры и варьируя pH. В результате увеличивается число мест возможного протонирования белковой цепи. Зарядность образующихся в эксперименте ионов можно дополнительно увеличивать добавками в образец низколетучих суперзаряжающих реагентов, например диметилацетамида, диметилсульфоксида [310, 311]. Механизм этого явления сейчас интенсивно изучается [312]. Измерив массу этих многозарядных ионов, легко вычислить молекулярную массу соединения. В современных приборах это делает компьютер, но не представляет труда провести подобные вычисления вручную. В отличие от традиционной масс-спектрометрии органических соединений (гл. 4) в этом методе для работы со спектрами, полученными на приборах низкого и среднего разрешения, используют усредненные массы элементов: C – 12,011, H – 1,00794, N – 14,00674, O – 15,994, S – 32,066. Это объясняется тем, что высокомолекулярные соединения имеют очень сложную изотопную картину в области молекулярного иона, особенно многозарядного молекулярного иона. Разрешающей способности метода оказывается недостаточно, и пики получаются широкими, с неразрешенной изотопной картиной. Максимум такого пика определяется именно усредненной массой элементов. С использованием приборов высокого разрешения порог, когда происходит слияние изотопных пиков, безусловно, сдвигается в область более высоких масс, но он все равно существует. Дополнительную информацию об использовании электрораспылительной ионизации для работы с пептидами и белками можно найти в учебном пособии [5].

Пусть M – масса молекулы, H – масса протона, m_1 и m_2 – массы двух соседних пиков в масс-спектре с зарядами $n + 1$ и n соответственно. Поскольку масс-спектрометр измеряет отношение массы к заряду, индивидуальные пики в масс-спектре (рис. 5.11) регистрируются на шкале масс со значением, которое определяется по уравнению (5.10):

$$m = \frac{M + nH}{n}. \quad (5.10)$$

Следовательно, масса молекулы может быть вычислена по уравнению (5.11):

$$M = n(m - H). \quad (5.11)$$

Неизвестную величину n можно легко определить на основе регистрируемых масс двух соседних пиков, обусловленных ионами, отличающимися на один заряд. В этом случае можно исходить из двух уравнений типа (5.10):

$$m_2 = \frac{M + nH}{n} \text{ и } m_1 = \frac{M + (n+1)H}{n+1}.$$

Решая эту систему уравнений относительно n , получаем:

$$n = \frac{m_1 - H}{m_2 - m_1}. \quad (5.12)$$

Полученное значение необходимо округлить до ближайшего целого числа. Таким образом, можно рассчитать молекулярную массу по каждой паре соседних пиков и усреднить полученное значение.

В ИЭР, помимо протонированных молекул, часто образуются катионированные молекулы. Чаще всего образуются аддукты с Na^+ , но нередко также аддукты с K^+ и NH_4^+ . В случае многозарядных ионов могут возникать аддукты с участием катионов нескольких типов. Если в образце присутствуют неорганические соли (например, NaI), в спектре будут наблюдаться также аддукты типа $[\text{M}\text{H}_n^{n+} + m\text{NaI}]$. Дополнительные пики существенно усложняют масс-спектр. Для их удаления эффективной добавкой к образцу оказался ацетат аммония. Катионы аммония и ацетат-анионы, оказываясь в избытке, препятствуют образованию аддуктов аналита с катионами металлов и анионами галогенов. Образующиеся же аддукты с ацетатом аммония легко разрушаются при использовании активации соударением с отщеплением молекул аммиака и уксусной кислоты. Такие добавки оказались полезными при работе и в режиме регистрации положительных ионов [313], и в режиме отрицательных ионов, например для нивелирования негативного влияния трифторацетата [314]. На эффективность ИЭР, безусловно, влияет и природа растворителей, используемых в качестве мобильной фазы [299].

Электроспрей успешно используется для анализа соединений с молекулярной массой до $\sim 150\,000$ дальтон. В случае более тяжелых молекул спектры становятся сложными для расшифровки, так как очень большое число пиков многозарядных ионов располагается в сравнительно небольшом диапазоне (от $m/z\,500$ до $m/z\,3000$). Тем не менее с увеличением разрешающей способности и чувствительности приборов появилось большое число публикаций, в которых объектами анализа являются значительно более тяжелые молекулы, а протеомный метод «сверху – вниз» (разд. 11.1.3.2) демонстрирует великолепные результаты с рекордным секвенированием белка с молекулярной массой 669 кДа [315].

Задача 5.1. Рассчитайте молекулярную массу полипептида, спектр которого представлен на рис. 5.11.

5.14. Ионизация акустическим распылением

Ионизация акустическим распылением (sonic spray ionization, SSI) была предложена группой Хирабаяши [90, 91, 316]. Этот метод позволяет получить спектры нелетучих термолабильных полярных молекул при стыковке масс-спектрометра с жидкостным хроматографом или системой для капиллярного электрофореза. В этом случае капилляр, соединяющий хроматографическую систему с источником масс-спектрометра, не обогревается и на него не подается высокий электрический потенциал. Ключевую роль играет поток инертного газа, который подается в систему с очень высокой скоростью коаксиально капилляру с пробой (рис. 5.12).

Начиная с определенной скорости потока, прибор регистрирует ионы. Именно скорость потока имеет первостепенную важность. Заряд обеих полярностей возникает за счет статистически несбалансированного распределения катионов и анионов при образовании микрокапель. Для десольватации не требуется нагревание, по-

скольку газообразные ионы аналитов $[M+H]^+$ и $[M-H]^-$ образуются из заряженных капель (в зависимости от природы аналита) при комнатной температуре в результате ионного испарения. Таким образом, ионы в SSI можно получить только с помощью сжатого азота (или даже воздуха). Метод хорошо зарекомендовал себя для анализа лекарственных препаратов и их метаболитов. Его чувствительность иногда на 2 порядка превосходит чувствительность традиционно используемой для этих целей химической ионизации при атмосферном давлении [92]. На этом принципе основан также один из эффективных методов ионизации на открытом воздухе (разд. 9.1.3).

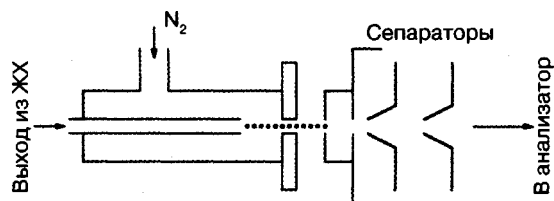


Рис. 5.12. Принципиальная схема метода акустического распыления

5.15. Матрично активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ)

Метод матрично активированной лазерной десорбции/ионизации (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) впервые описан во второй половине 1980-х годов [317–319]. В 1988 году были опубликованы результаты анализа белков с массами до 70 000 дальтон [320], а в 1990 году – уже до 116 000 дальтон [321]. Рекордные для масс-спектрометрии массы однозарядных ионов в несколько миллионов дальтон [322] были зарегистрированы именно с помощью МАЛДИ. Одному из первооткрывателей метода, Коичи Танаке, в 2002 году присуждена Нобелевская премия в области химии.

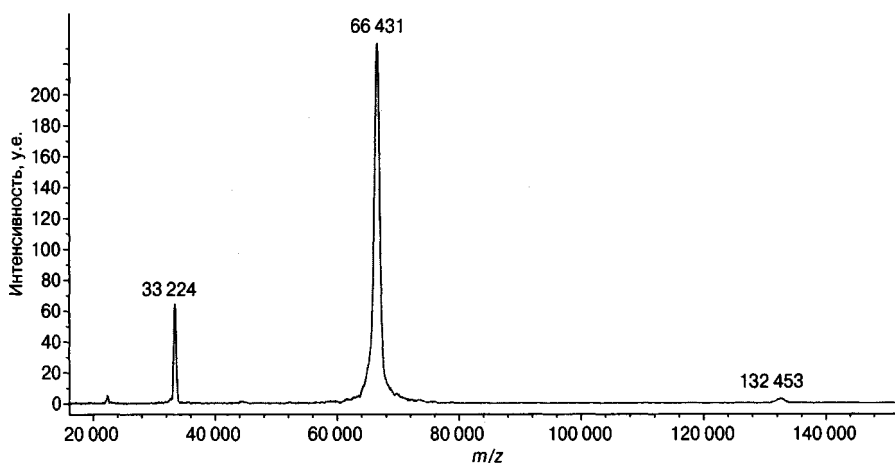


Рис. 5.13. Спектр МАЛДИ мономера (m/z 66 431) и димера (m/z 132 453) белка бычьей сыворотки

Метод заключается в облучении короткими лазерными импульсами образца, представляющего собой твердый раствор анализируемого соединения в органической матрице. Матрица выбирается таким образом, чтобы ее молекулы активно поглощали фотоны, эмиттируемые УФ- или ИК-лазером. Над поверхностью образца создается плотная высокотемпературная плазма (область шлейфа), расширяющаяся со скоростью 100–1000 м/сек, в которой наряду с молекулами и ионами матрицы оказываются и молекулы анализируемого соединения. Ионизация последних, путем поглощения энергии фотонов или в результате ионно-молекулярных реакций, приводит к образованию положительных и отрицательных ионов, которые вытягиваются высоким потенциалом из области ионизации и направляются в анализатор. Метод характеризуется интенсивными пиками молекулярных ионов разного типа и низкой фрагментацией. Наиболее термолабильные, труднолетучие, высокомолекулярные соединения стали доступны масс-спектрометрическому анализу. К настоящему времени методом МАЛДИ успешно анализируются полипептиды, белки, нуклеотиды, полисахариды, синтетические полимеры, гуминовые кислоты, фуллерены, органические комплексные соединения и т.д. (рис. 5.13).

Метод МАЛДИ на сегодняшний день можно назвать самым чувствительным. По нескольким независимым оценкам для регистрации сигнала необходимо, чтобы лазерный импульс перевел в газовую фазу 1 аттомоль (10^{-18}) аналита [323]. Методами, родственными МАЛДИ (разд. 5.16), удается регистрировать количества аналитов в сотни йоктомолей (10^{-24}) [324, 325]. Если вспомнить число Авогадро ($6,022 \times 10^{23}$), становится понятно, что масс-спектрометрия подошла к абсолютному теоретическому пределу чувствительности любого аналитического метода.

Количество переменных в МАЛДИ значительно больше, чем в других методах, поэтому анализ нового соединения является самостоятельной задачей, причем выбор условий эксперимента может привести как к успеху, так и к полному провалу. Важнейшими параметрами метода являются природа матрицы, количественное соотношение матрица: анализируемое соединение, длина волны, долгота импульса и мощность лазерного излучения, способ пробоподготовки, морфология образца, а также динамика распространения шлейфа (исходная скорость, внутренние энергии, газофазная динамика) и многое другое [326].

Матрица. Как и в методе бомбардировки быстрыми атомами, важнейшую роль играет матрица, однако ее роль в этом случае значительно отличается. Правильный выбор материала является ключом к успешной регистрации масс-спектра. Количество самых разнообразных органических и неорганических соединений, использованных в качестве матрицы, очень велико. Основные требования к материалу матрицы заключаются в его высокой способности поглощать лазерное излучение; кристаллизоваться с включением в структуру молекул анализируемого вещества; инертности по отношению к анализируемому веществу; хорошей растворимости в растворителях, используемых для пробоподготовки; низкой летучести в условиях вакуума. Теоретически наиболее эффективной должна быть матрица, в ИК- или УФ-спектрах которой максимум близок к длине волны используемого лазера. В этом случае передача энергии будет максимальной. Наиболее широкое применение в качестве матриц нашли коричная кислота, 3-амино-4-гидроксibenзойная кислота, никотиновая кислота, α -циано-4-гидроксикоричная кислота, 2,5-дигидроксiben-

зойная кислота, 2-(4-гидроксифенилазо)бензойная кислота, 3-гидроксипиколоновая кислота, 6,7-дигидроксикумарин, 2,4,6-тригидроксиацетофенон и многие другие. Для получения спектров легких соединений с молекулярной массой до 1000 Да особенно эффективна и популярна 2,5-дигидроксибензойная кислота, характеризующаяся незначительными фоновыми пиками в области низких масс. Для низкомолекулярных соединений хороших результатов можно добиться при использовании в качестве матрицы фуллеренов. В их спектрах фоновые пики с m/z менее 720 малоинтенсивны и не мешают работе со спектром аналита. В частности, фуллерены были использованы в качестве матрицы для экспериментов с диуретиками [327]. В липидном анализе хорошо зарекомендовали себя ионные жидкости и 9-аминоакридин. Они позволили улучшить однородность нанесения образца на мишень и повысить интенсивность пиков молекулярных ионов за счет ингибирования процессов распада [328–330]. 9-аминоакридин, помимо этого, показал отличные результаты при регистрации как положительных, так и отрицательных ионов [331, 332].

Обычно раствор матрицы в подходящем растворителе (концентрация ~ 10 мг/мл) готовится ежедневно, поскольку он светочувствителен и подвержен фоторазложению. В качестве растворителей наиболее часто используются вода, этанол, ацетон, ацетонитрил, тетрагидрофуран, хлороформ и т.д. Источники МАЛДИ с повышенным давлением позволяют использовать в качестве матрицы воду и ряд других соединений. В этих условиях эффективность работы ИК-лазеров, возбуждающих колебания ОН-связей молекул воды, выше, чем УФ-лазеров.

Когда необходимо регистрировать аналиты (например, пептиды) в аттомолярных уровнях, следует учитывать чистоту используемых матриц. В частности, α -циано-4-гидроксикоричная кислота часто оказывается загрязнена N,N-диметилбутиламином, который мешает получению качественных спектров [333].

В последнее время появилось много публикаций по использованию в МАЛДИ жидких матриц на основе ионных жидкостей, жидкостей с наночастицами, суспензий с добавками УФ-поглощающих соединений [334–336]. Основная цель применения жидких матриц — достижение однородности спектров МАЛДИ вне зависимости от «сладких точек».

Лазеры. В идеале лазер должен эффективно передавать образцу контролируемое количество энергии, причем во избежание термического распада эта энергия должна переноситься в кратчайший период времени. Импульс более длинный, чем это необходимо, может привести к деструкции образца до его десорбции. Два наиболее активно используемых типа лазера в коммерческих приборах — азотный и углекислотный. Первый является ультрафиолетовым и характеризуется длиной волны 337 нм с энергией фотонов 3,68 эВ. Долгота его импульса составляет обычно от 0,1 до нескольких наносекунд. Возбуждение затрагивает электронные уровни молекул матрицы, тогда как большинство аналитов не поглощает в этой области, т.е. прямого фотовозбуждения их молекул не происходит. Дополнительным преимуществом УФ-лазеров является пониженное образование фотохимических продуктов, например аддуктов аналит-матрица. Кстати, доля таких продуктов возрастает при использовании более коротких волн (например, эксимерные лазеры с длиной волны 308 и 266 нм).

Второй тип лазера — инфракрасный. Углекислотный лазер характеризуется длиной волны 10,6 мкм с энергией фотонов 0,12 эВ. Долгота его импульса составляет от 100 наносекунд до 1 микросекунды. В этом случае энергия лазера возбуждает O—H деформационные и C—H валентные колебания молекул. Наряду с углекислотными хорошо зарекомендовали себя эрбиевые твердофазные лазеры с длиной волны 2,94 и 2,79 мкм. В этом случае возбуждаются O—H и N—H валентные колебания.

Помимо этих лазеров, используются неодимовые и эксимерные (XeCl, ArF, KrF), а также лазеры на свободных электронах с пикосекундными импульсами. Последние оперируют длинами волн не только около 3 мкм, но также 5,5 и 6,5 мкм, что дает возможность возбуждать валентные колебания карбонильных групп [337].

Пробоподготовка. Существует много вариантов подготовки образца для МАЛДИ. Это очень важная часть всего анализа, которая может оказаться критичной для получения результата. Определенную роль играет природа материала мишени, поскольку структура ее поверхности влияет на выход ионов аналита. Наиболее распространены мишени из нержавеющей стали, хотя можно использовать и другие металлы, если они инертны по отношению к наносимому образцу. Используются и неметаллические мишени, включая тефлоновые, нейлоновые, парафиновые и т.д.

Наиболее популярным вариантом нанесения пробы является метод сухой капли. Раствор анализируемого вещества в растворителе, который хорошо смешивается с растворителем матрицы, концентрации 5–10 мг/мл добавляется к рабочему раствору матрицы. Молярное соотношение матрица/анализируемое вещество может лежать в широчайшем диапазоне от 10^2 до 10^9 и оптимизироваться для каждого нового образца. Слишком большое количество аналита приводит к ухудшению качества спектра. Полученный однородный раствор (0,5–2 мкл) наносится на мишень и высушивается сначала при атмосферном давлении на воздухе, а затем при нагревании струей теплого воздуха в слабом вакууме. Во время высушивания происходит кристаллизация матрицы с включением молекул анализируемого вещества в кристаллическую решетку или молекулы образца размещаются по поверхности быстро образующихся кристаллов матрицы. Формирование и размер кристаллов в значительной мере зависят от природы матрицы и растворителя и в меньшей степени от природы образца, поскольку количество последнего значительно меньше. Зависимость сигнала от сформированной кристаллической структуры образца очень существенна. Именно этот аспект делает количественный анализ методом МАЛДИ несколько проблематичным.

В альтернативном распространенном варианте нанесения образца раствор матрицы в легколетучем растворителе (например, ацетон) наносится на мишень. Быстрое испарение растворителя приводит к формированию микрокристаллической пленки. Микроколичество раствора анализируемого соединения далее добавляется на поверхность такой пленки. Аналит при этом может быть растворен в другом растворителе, даже если в нем плохо растворяется матрица. Тогда только верхние несколько слоев пленки будут задействованы в процесс сокристаллизации с молекулами аналита. Поток раствора матрицы и аналита может наноситься на мишень из микроколоники [338]. В этом варианте образуются особенно мелкодисперсные кристаллы, а сам метод можно применять при стыковке МАЛДИ с жидкостной хроматографией или капиллярным электрофорезом.

Используются и другие методы нанесения образца на плашку. Равномерного нанесения можно достичь электрораспылением [339]. Если анализируемое соединение не растворимо в растворителях матрицы, можно попробовать применить сухой вариант нанесения образца, спрессовав таблетку из порошков матрицы и аналита, аналогично тому, как это делается для анализа методом ИК-спектроскопии [340, 341]. Можно получать спектры и непосредственно из порошкообразного образца [342].

Помимо соотношения матрица/анализируемое вещество, на качество спектра существенно влияет наличие примесей и добавок. При работе с биологическими соединениями часто используются буферные растворы, соли, поверхностно активные вещества. Эти соединения оказываются в растворе анализируемого образца и могут повлиять на качество спектров. Важным преимуществом МАЛДИ по сравнению с электрораспылением является толерантность метода по отношению к примесям и добавкам, хотя в некоторых случаях эти побочные соединения могут приводить к уменьшению интенсивности основного сигнала по самым разным причинам. Качество спектров, как правило, не ухудшается, а иногда чувствительность может возрасти за счет образования ионов $[M+\text{катион}]^+$. Поэтому, если количество мешающих примесей не является чрезмерным, образцы можно анализировать без предварительной очистки, даже если речь идет о столь сложных субстратах, как микроорганизмы [323]. Тем не менее существует целый ряд подходов для очистки проб перед анализом [343].

Проведение анализа. Ионизация. Короткий световой импульс лазера поглощается молекулами матрицы и разрушает ее кристаллическую структуру. Часть молекул отрывается от поверхности и образует высокотемпературный суперплотный газ (зона шлейфа), в котором, помимо молекул, ионов и ассоциатов матрицы, присутствуют молекулы анализируемого соединения (рис. 5.14). По некоторым оценкам соотношение ионы/нейтральные частицы в зоне шлейфа составляет примерно 10^{-5} – 10^{-3} [323]. Поскольку энергия лазера поглощается матрицей, молекулы образца оказываются в зоне шлейфа, в газовой фазе, практически без приращения внутренней энергии, т.е. с сохранением исходной структуры. На этой стадии очень важным моментом является динамика развития шлейфа, в частности начальные скорости ионов и нейтральных частиц в результате взрывного перехода твердой матрицы в газообразное состояние в вакууме источника ионов.

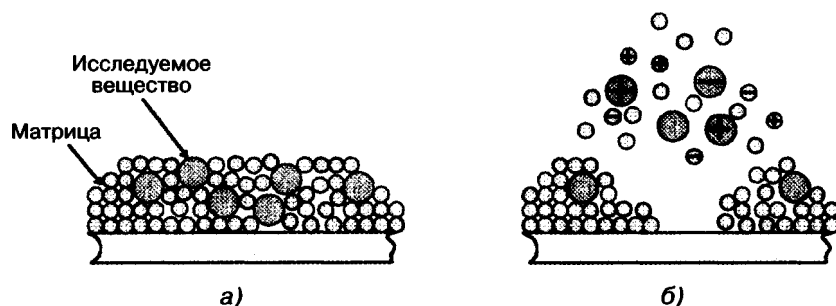


Рис. 5.14. Взаимодействие лазерного импульса с образцом МАЛДИ: до лазерного импульса (а), после лазерного импульса (б)

Механизмы ионизации образца в условиях МАЛДИ продолжают изучаться [323, 326, 344–348]. Спектры образцов оказываются очень похожими даже при использовании столь разных лазеров, как УФ и ИК. Этот факт указывает на общность механизмов ионизации для обоих вариантов. Все же следует подчеркнуть, что вопросов с тонкостями механизма МАЛДИ остается много. Даже зависимость скорости ионов от их массы остается не до конца понятной. Исследования, проведенные на времяпролетном приборе [347] и на приборе ионного циклотронного резонанса [348], продемонстрировали уменьшение скорости ионов в шлейфе с увеличением их массы. Однако это падение не столь значительное, и кинетическая энергия ионов, напротив, увеличивается с увеличением их массы.

В масс-спектрах МАЛДИ наблюдаются в основном пики однозарядных молекулярных ионов, причем катионы и анионы могут регистрироваться при простой смене полярности выталкивающего электрода. Помимо них, часто наблюдаются пики однозарядных мультимеров (типа $M_n H^+$). Образование практически исключительно однозарядных ионов часто рассматривают как недостаток метода, поскольку диапазон регистрируемых масс большинства коммерчески доступных приборов оказывается недостаточным для работы с высокомолекулярными соединениями. Тем не менее следует отметить, что с увеличением молекулярной массы образца до 10^5 – 10^6 Да в спектрах МАЛДИ наблюдаются и многозарядные ионы [349]. Образованию многозарядных ионов способствует также использование неметаллических подложек [350] или источников МАЛДИ с высоким давлением [351].

Процессы ионизации обычно разделяют на первичные и вторичные. Первичная ионизация обусловлена возникновением заряда у молекулы образца в момент ее перехода из конденсированной в газовую фазу, а вторичная — взаимодействием молекул образца с ионами матрицы в газовой фазе. Поскольку доля образца по сравнению с долей матрицы очень мала, взаимодействия молекул и ионов образца друг с другом маловероятны и не имеют большой значимости, не считая образования протонированных димеров.

Среди предложенных механизмов первичной ионизации можно выделить взаимодействие молекулы образца А с кластером молекул возбужденной матрицы M_n^* и протонирование молекулы образца возбужденной молекулой матрицы:



Одновременно с переходом молекулы образца в газовую фазу может осуществляться ее взаимодействие с катионом соли, присутствующей в пробе случайно или добавленной намеренно. В этом случае возникают ионы $[A + \text{катион}]^+$. Значительно больше процессов ионизации предложено для молекул самой матрицы. Помимо указанных, для молекул образца можно упомянуть двух- и полифотонную ионизацию, термическую ионизацию и диспропорционирование.

В зоне шлейфа образуется газовая плазма и протекают процессы вторичной ионизации. Механизмы этих реакций аналогичны описанным в разд. 5.2 и включают протонирование и депротонирование, перезарядку и присоединение аниона

или катиона. Образовавшиеся молекулярные катионы и анионы образца разных типов (M^{++} , MH^+ , $[M-H]^-$, $[M+\text{катион}]^+$ и т.д.) обладают невысокой внутренней энергией, т.е. их фрагментация незначительна.

Процессы фрагментации все же часто наблюдаются в условиях МАЛДИ. Их интенсивность зависит от многих параметров, важнейшим из которых является природа анализируемых молекул. Например, олигонуклеотиды фрагментируют значительно активнее, чем пептиды. Обычно разделяют такие процессы на быстрые и медленные. К первым относятся процессы в источнике (in source decay, ISD), а ко вторым — процессы за пределами источника (post source decay, PSD). Первые, как правило, обусловлены ионно-молекулярными реакциями, а вторые являются мономолекулярными и обусловлены повышенной внутренней энергией ионов. Они возможны в любой момент до регистрации ионов на детекторе. Использование этих вариантов фрагментации для структурных исследований описано в разд. 7.2.5. Интенсивность фрагментации зависит и от природы матрицы. Например, α -циано-3-гидроксibenзойная кислота считается «горячей», а 2,5-дигидроксibenзойная кислота — «холодной» [323].

Расширение образовавшейся газовой плазмы за область шлейфа приводит к последующим взаимодействиям молекул и ионов образца с молекулами и ионами плазмы. Возникают новые ионы, а внутренняя энергия ионов образца усредняется и уменьшается в результате многочисленных столкновений с молекулами матрицы и быстрым расширением в область высокого вакуума.

Интересные предположения о механизме ионизации сделаны Карасом и др. [345]. Авторы приводят достаточно убедительные доводы в пользу того, что исходные ионы образца (например, пептиды, осажденные из раствора при $pH = 2$) являются многозарядными, а в источнике протекает их последовательная нейтрализация. Для положительных ионов уменьшение заряда обусловлено захватом тепловых электронов, образующихся в процессе фотоионизации молекул матрицы и присутствующих в достаточном количестве в области шлейфа. Для отрицательных ионов ключевую роль играют взаимодействия с протонированными молекулами матрицы. Результатом этих процессов является нейтрализация первичных ионов. Единичные однозарядные ионы, однако, успевают покинуть реакционную зону и достичь детектора.

Нейтральные молекулы и частицы плазмы откачиваются насосами, а образовавшиеся ионы вытягиваются и ускоряются высоким потенциалом (~ 25 кВ) по направлению к анализатору. Практически во всех коммерческих приборах используется времяпролетный анализатор, поскольку он характеризуется неограниченным диапазоном масс (разд. 6.7), а основной задачей МАЛДИ является как раз получение информации о молекулярной массе высокомолекулярных соединений. Кроме того, именно времяпролетные приборы лучше других работают с импульсными методами ионизации и обладают высочайшей чувствительностью, так как все образовавшиеся в результате ионизации ионы достигают детектора. После того как детектора достигнет наиболее тяжелый ион, можно производить новый лазерный импульс, и весь процесс ионизации и регистрации ионов повторяется. Спектры после каждого лазерного импульса могут суммироваться для получения качественной информации о молекулярной массе соединения.

Обычно для приемлемого результата оказывается достаточно 30–50 лазерных импульсов.

Важным моментом является возможность направлять каждый последующий лазерный импульс в новую точку образца. В случае равномерного распределения анализируемого соединения в твердом растворе матрицы спектры будут идентичными. Однако поскольку идеальной равномерности достичь практически невозможно, концентрация молекул образца в каждом месте может несколько отличаться, и перемещением луча можно найти оптимальный участок поверхности. Такие точки принято называть «сладкими» или «горячими» (sweet и hot spots). Нахождение таких точек является непростой и весьма трудоемкой задачей, особенно когда анализ ведется в автоматическом режиме.

Для калибровки шкалы масс используются самые разнообразные соединения с точно известной массой. Среди наиболее широко известных можно назвать грамицидин-С (m/z 1141,5), бычий инсулин (m/z 5733,5), сыворотку бычьего альбумина (m/z 66 430). Используют варианты как внешней, так и внутренней калибровки. В первом случае калибровочный стандарт помещают на отдельной мишени, во втором — вместе с анализируемым соединением. Последний вариант приводит к увеличению точности определения массы примерно на порядок. Очень часто используют калибровку по двум точкам, когда в качестве реперов выбираются пик протонированного (депротонированного) стандарта и пик его димера или двухзарядного иона. Используется также смесь двух стандартов. Важно, чтобы пик стандарта с известной массой располагался достаточно близко к пику молекулярного иона исследуемого соединения, но не накладывался на него. Даже если разрешающая способность используемого времяпролетного анализатора не превышает 10 000, точность измерения масс достаточно высока и достигает 0,01%.

Метод оказался очень полезным для исследований полимерных материалов. Поскольку индивидуальные молекулы в составе полимерного образца имеют одинаковую природу, но разное количество мономерных звеньев в составе, они ионизируются практически одинаково, без подавления сигнала (рис. 5.15).

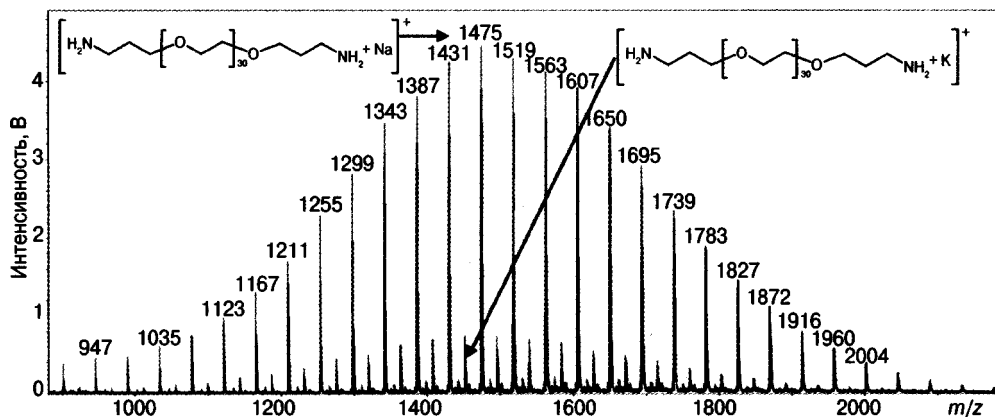


Рис. 5.15. Масс-спектр МАЛДИ образца полиэтиленгликоля с аминопропильными концевыми группами. (С разрешения Р.С. Борисова)

По такому спектру очень удобно устанавливать столь важные параметры, как средневесовая и среднечисловая молекулярная масса, изучать однородность полимера, устанавливать природу концевых групп и т.д. [3]. На рис. 5.15 представлен спектр полиэтиленгликоля с аминопропильными концевыми группами. Две основные серии ионов обусловлены аддуктами молекул полимера с катионами натрия и калия.

В 2000 году появилась первая публикация, в которой плашка с нанесенным образцом была помещена вне вакуумной области прибора [352]. Принципиальная схема метода МАЛДИ при атмосферном давлении (МАЛДИ АД) представлена на рис. 5.16. Эффективность метода зависит от геометрии мундштука мишени, его положения относительно ввода в масс-спектрометр, плотности пучка лазерного излучения, приложенного напряжения, скорости потока азота и положения газовой форсунки.

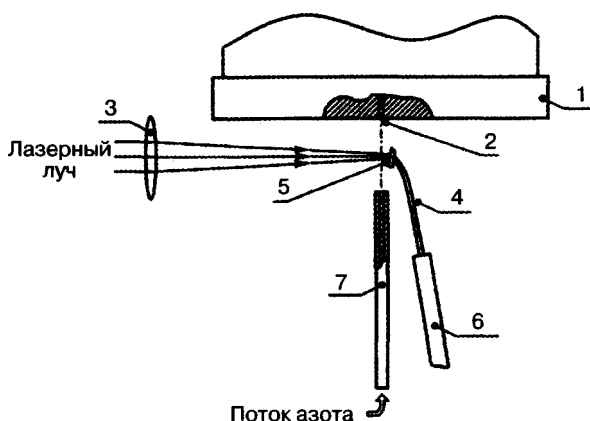


Рис. 5.16. Схематическое изображение источника МАЛДИ АД: 1 – интерфейс атмосферного давления, 2 – входное отверстие атмосферного ввода в масс-спектрометр, 3 – кварцевая линза, 4 – заменяемый наконечник мишени, 5 – мишень для образца из нержавеющей стали, 6 – держатель мишени, 7 – капиллярный газовый патрубок из нержавеющей стали

Базовые процессы поглощения лазерного излучения молекулами матрицы и образования шлейфа при атмосферном давлении идентичны протекающим в вакууме. Однако в условиях МАЛДИ АД идут также процессы «охлаждения» возбужденных ионов и многочисленные ионно-ионные и ионно-молекулярные реакции. Процесс регистрации спектра занимает около 2 минут, а образец полностью расходуется. Это необходимо, поскольку только незначительная часть образовавшихся ионов аналита достигает атмосферного ввода в масс-спектрометр. Такая особенность является наиболее значимым отличием МАЛДИ АД от классического варианта МАЛДИ. С одной стороны, это не дает возможности повторно проанализировать образец, но, с другой стороны, регистрируемый спектр усредняет все неоднородности нанесения образца и позволяет получить масс-спектр всей пробы, без необходимости поиска «сладких» точек. Метод МАЛДИ АД является мягким, как классический МАЛДИ или ИЭР. Фрагментация пептидов в условиях МАЛДИ АД отсутствует, а полисахариды, помимо молекулярных ионов, демонстрируют в спектре ряд характеристических фрагментных ионов. Стоит также отметить, что

метод МАЛДИ при атмосферном давлении [352] стал прототипом будущих методов масс-спектрометрии на воздухе (гл. 9).

Вариантом МАЛДИ является **поверхностно усиленная лазерная десорбция/ионизация (ПУЛДИ, Surface enhanced laser desorption ionization, SELDI)**, впервые описанная Хатченсом [353, 354]. Метод позволяет резко повысить селективность анализа пептидов и белков благодаря модификации матрицы. К обычному материалу матрицы для МАЛДИ добавляется соединение, которое может образовать химические связи с конкретным участком сложной молекулы. Если на этот подготовленный микрочип нанести раствор смеси биомолекул, то только те из них, которые имеют в своей структуре подходящие места связывания, образуют химические связи с молекулами модифицированной матрицы. Последующая промывка микрочипа удаляет все несвязанные молекулы. После высушивания образец подвергается МАЛДИ анализу [355].

Метод ПУЛДИ показал превосходные результаты в решении биохимических и медицинских проблем: установление структур белков, идентификация биомаркеров, установление мест связывания антигенов, клинические исследования по выявлению заболеваний (туберкулез, диабет, рак, панкреатит, болезнь Альцгеймера и т.д.) и т.д. [356–358].

Метод МАИВ – **матрично активированная ионизация в вакууме (MAIV – matrix assisted ionization vacuum)** – представляет собой нечто среднее между ИЭР и МАЛДИ [359]. В этом случае проба готовится, как в МАЛДИ. В качестве матрицы используется несколько более летучие соединения, чем обычно (нитроцианобензолы, нитробензальдегид, кумарин). При внесении в источник вакуумированного МАЛДИ идет испарение матрицы с захватом молекул (ионов) аналита. При этом не используется ни нагрев, ни лазер. В спектрах наблюдаются в основном пики многозарядных ионов, что роднит этот метод с ИЭР. Поскольку весь процесс происходит в вакууме, доля ионно-молекулярных реакций, а также потерь ионов аналита существенно ниже. Кроме того, ионы генерируются не в импульсном, а в непрерывном режиме. Этим методом можно работать и с достаточно низкомолекулярными соединениями типа жирных кислот, лекарственных препаратов, и с высокомолекулярными: полимерами, пептидами, сахарами.

Несмотря на то что МАЛДИ стал одним из самых востребованных методов, он не лишен недостатков. Прежде всего, аналит и матрица должны сокристаллизоваться. Зачастую это приводит к перебору самых разнообразных матриц методом проб и ошибок. Нанесенный образец, как правило, неоднороден, и в задачу оператора входит нахождение «сладких» точек для получения спектра с максимальным качеством. Наконец, МАЛДИ редко используется для анализа низкомолекулярных соединений, поскольку в области низких m/z всегда присутствуют интенсивные матричные пики.

Последняя проблема может быть преодолена рядом способов [360]. Достаточно эффективно можно использовать тандемную масс-спектрометрию, выделяя в первом анализаторе молекулярные ионы аналита. Можно использовать неорганические матрицы (например, серу) или полимерные матрицы с молекулярными массами больше, чем у аналита. Все существующие на сегодняшний день подходы для анализа малых молекул методом МАЛДИ представлены в обзорах [361, 362].

5.16. Лазерная десорбционная масс-спектрометрия (*Laser desorption mass spectrometry, LDMS*)

Метод лазерной десорбции/ионизации (без матрицы) был предложен до изобретения МАЛДИ [363]. Он заключается в переводе молекул образца в газовую фазу при его облучении лазером. Механизм ионизации во многом сродни десорбционной химической ионизации и плазменной десорбции и связан с испарением и ионизацией вещества в результате быстрого локального нагрева, когда скорость десорбции превосходит скорость деструкции. Метод ЛДИ периодически использовался многими исследователями с более или менее приемлемыми результатами [364] для веществ с молекулярными массами до 2000 дальтон, однако при этом часто наблюдается интенсивная фрагментация (и масс-спектрометрическая, и термическая) в связи с необходимой более высокой энергией лазера.

Вариантов совершенствования метода ЛДИ достаточно много. Наиболее эффективным подходом является обработка поверхности, на которую наносится проба, таким образом, чтобы появлялась возможность передавать достаточное количество энергии от поверхности к образцу, вызывая десорбцию и ионизацию аналита.

Очень часто в литературе используется термин SALDI — Surface Assisted Laser Desorption/Ionization, или в русскоязычном варианте — **поверхностно активированная лазерная десорбция/ионизация (ПАЛДИ)**, предложенный в работе [365]. ИЮПАК характеризует ПАЛДИ как «тип безматричных способов лазерной десорбции/ионизации биологических макромолекул» [366]. Это определение не раскрывает всей полноты метода ПАЛДИ. В эту категорию попадают многочисленные вариации метода на базе суспензий микрочастиц графита в воде и глицерине [365]. Твердотельную подложку на базе углерода или кремния [367] можно с успехом использовать и для анализа низкомолекулярных соединений, например выходящих из колонки газового хроматографа [368, 369]. При этом эффективность ионизации оказывается весьма высокой. В частности, показано, что ионизируется одна из 1000 молекул аналита, выходящих из хроматографа [368]. Это на порядок лучше, чем в случае классической электронной ионизации (разд. 2.1).

Наиболее распространенным в последнее время вариантом безматричных методов лазерной ионизации является **десорбция/ионизация на пористой поверхности кремния** (*desorption/ionization on silicon, DIOS*) [370]. Пористый кремний — фотолюминисцентный полупроводниковый материал с большой площадью поверхности. Его получают элетрохимически из кристаллического кремния. Альтернативно можно использовать наноструктурированные кремниевые пленки. Поверхность такого кремниевого материала хорошо связывается с молекулами аналитов самого разного типа и одновременно эффективно поглощает УФ-излучение лазера, а также эмитирует фотоны благодаря фотолюминисценции, электролюминисценции и хемилюминисценции, способствуя процессам десорбции и ионизации. Ионизация происходит мягко, а фрагментация практически не наблюдается [371]. Важным преимуществом метода является возможность работать с небольшими молекулами, поскольку матричный фон в этом случае отсутствует. Масс-спектры DIOS также менее восприимчивы к изменению длины волны лазера [372]. Это объясняется тем, что в данном случае пористый кремний должен поглощать фотон с энергией,

превышающей 1,1 эВ. Поверхность кремния можно дополнительно активировать низкоинтенсивным лазерным облучением в присутствии паров воды. В этом случае на поверхности доминируют группы Si–ОН, а эффективность ионизации увеличивается в 10–100 раз [373]

Метод DIOS при атмосферном давлении появился в 2002 году [374]. Кремниевое покрытие делает ионизацию более мягкой по сравнению с вариантом при использовании поверхностей другой природы. Метод очень эффективен для органических соединений с массами до 500 дальтон. Результаты анализа смесей триптических пептидов показали, что метод превосходит МАЛДИ при атмосферном давлении при работе с соединениями с массами менее 1100 дальтон. Однако для более тяжелых аналитов присутствие матрицы оказалось предпочтительным.

Как и в случае МАЛДИ, вопрос равномерности нанесения образца на плашку остается важным для методов ЛДИ. Вариант преодоления этой трудности для анализа методом DIOS предложен в работе [375], в которой образец наносили на плашку электрораспылением раствора.

Развитием DIOS стало создание метода **масс-спектрометрии с наноструктурированным инициатором (МСНИ, Nanostructure-initiator mass spectrometry, NIMS)**. В этом случае протравленная поверхность пористого кремния покрывается наноструктурированным инициатором, в качестве которого обычно выступают разнообразные перфторированные соединения, например бис(гептадекафтор-1,1,2,2-тетрагидродецил)-тетраметилдисилоксан или 1,3-бис(гидроксibuтил)тетраметилдисилоксан [325, 376]. Такая поверхность стабильна на воздухе, позволяет проводить прямой анализ жидких (биологические жидкости, клеточные лизаты, экстракты метаболитов) и твердых проб, включая молекулярную визуализацию (разд. 9.9), практически без пробоподготовки. В отличие от матриц МАЛДИ инициаторы МСНИ не поглощают УФ-излучение, не ионизируются и не требуют сокристаллизации с молекулами образца. Энергия лазера поглощается кремниевой основой, вызывая разогрев поверхности и испарение инициатора вместе с образцом. В газовой фазе происходит десорбция и ионизация аналитов без какой-либо их фрагментации. Поскольку никаких посторонних органических соединений в системе нет, а молекулы инициатора не ионизируются в условиях эксперимента, в спектре отсутствует фон даже в диапазоне низких масс. В отсутствие шума в спектре можно увидеть сигналы исключительно малого количества вещества. Йоктомолярная чувствительность (несколько сот молекул пропафенона) представлена на рис. 5.17.

При необходимости поверхность образца может быть смочена раствором неорганической соли, например NaCl или AgNO₃. В этом случае можно получать в спектре сигналы катионированных молекул, например, стероидов или углеводов. Для получения результатов методом МСНИ необходимо ультрамалое количество образца. В работе [376] представлены варианты нанесения проб на плашки методами z-касания и *in situ* экстракции.

Обычно работают с положительными ионами, но при замене протравливающего реагента или инициатора можно регистрировать и спектры отрицательных ионов. Например, 3-аминопропилдиметилэтоксисилан успешно применен для регистрации отрицательных ионов нуклеотидов в спектре образца клеточного экстракта дрожжей [377]. Указанные достоинства МСНИ сделали этот метод очень удобным

для целей метаболомики, когда необходимо детектировать следовые количества небольших молекул, и молекулярной визуализации, поскольку его пространственное разрешение и диапазон масс (нет матрицы) лучше, чем у МАЛДИ, а отсутствие фрагментации, характерной для ВИМС, улучшает чувствительность, достигающей величин сотен йоктомолей [325, 376].

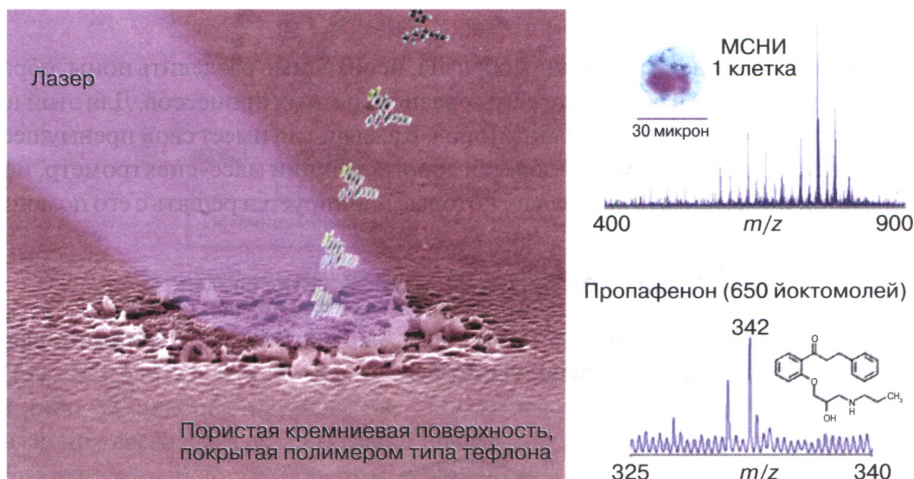


Рис. 5.17. Иллюстрация метода МСНИ после одного лазерного импульса, наложенная на снимок поверхности сканирующим электронным микроскопом. В правой части продемонстрирована работа с единичной клеткой и сигнал 650 йоктомолей пропафенона [325]

Вместо матрицы для лазерной десорбции/ионизации можно использовать золь-гели. Наиболее распространены кремниевые золь-гели. Как показала практика, для их эффективного применения в масс-спектрометрии необходимо внедрять в их структуру молекулы соединений, поглощающих УФ-излучение [378]. Как правило, это соединения, используемые в качестве матриц МАЛДИ, а лучшие результаты продемонстрированы при введении 2,5-дигидробензойной кислоты [379]. Необходимость инкорпорирования органических молекул отпадает при замене кремниевых золь-гелей на титановые, которые сами поглощают энергию в УФ-диапазоне [380].

Использование в ЛДИ наноструктурированных подложек и полимеров на основе углерода достаточно подробно изложено в обзоре [381]. Кстати, вариант ЛДИ с использованием плашек с наноструктурированной поверхностью называется **наноструктурно активированной лазерной десорбцией/ионизацией** (НАЛДИ, NALDI). В качестве материала поверхности можно использовать наночастицы окиси магния [382], нановолокна углерода и полимерных материалов [383], наночастицы серебра [384], оксидов железа [385] и титана [386], графенизированный пористый кремний [387].

Методы масс-спектрометрии с ЛДИ нашли широкое применение в криминалистике, анализе лекарственных препаратов и наркотических веществ, анализе белков, полимеров и многих других соединений. Дополнительную информацию по современным возможностям метода ЛДИ без органической матрицы для анализа самых разнообразных соединений можно найти в обзорах [362, 388–391].

ГЛАВА 6

РАЗДЕЛЕНИЕ И РЕГИСТРАЦИЯ ИОНОВ

После того как проведена ионизация образца, необходимо разделить ионы, образовавшиеся в источнике в результате самых разнообразных процессов. Для этой цели используется несколько типов анализаторов. Каждый тип имеет свои преимущества и недостатки. В связи с этим, приобретая дорогостоящий масс-спектрометр, необходимо четко представлять круг задач, которые планируется решать с его помощью.

6.1. Магнитный секторный масс-спектрометр

Хронологически первым анализатором масс был магнитный. Принципиальная схема его устройства представлена на рис. 6.1.

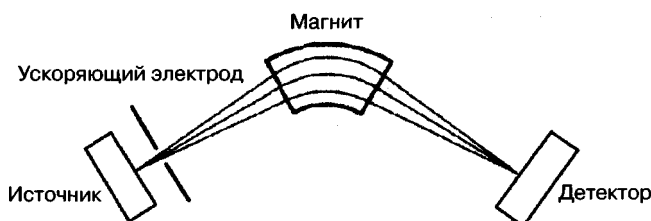


Рис. 6.1. Принципиальная схема масс-спектрометра с магнитным анализатором

Ион, образовавшийся в источнике, выводится оттуда благодаря системе электродов и ускоряется потенциалом V (2–8 кВ) по направлению к анализатору. Пусть m — масса иона, e — единичный заряд, z — число таких зарядов у иона, v — скорость иона. Тогда кинетическая энергия иона на входе в магнитный анализатор выражается следующим уравнением:

$$zeV = mv^2/2. \quad (6.1)$$

Попадая в магнитное поле напряженностью B перпендикулярно магнитным силовым линиям, этот ион будет двигаться по окружности R , причем сила Лоренца будет уравниваться центробежной силой:

$$Bzev = mv^2/R. \quad (6.2)$$

Уравнение (6.2) может быть представлено в форме $BzeR = mv$, которая демонстрирует, что магнит является анализатором именно моментов, а не масс. Комбинация уравнений (6.1) и (6.2) приводит к основному уравнению разделения ионов в магнитном анализаторе:

$$m/ze = B^2 R^2 / 2V. \quad (6.3)$$

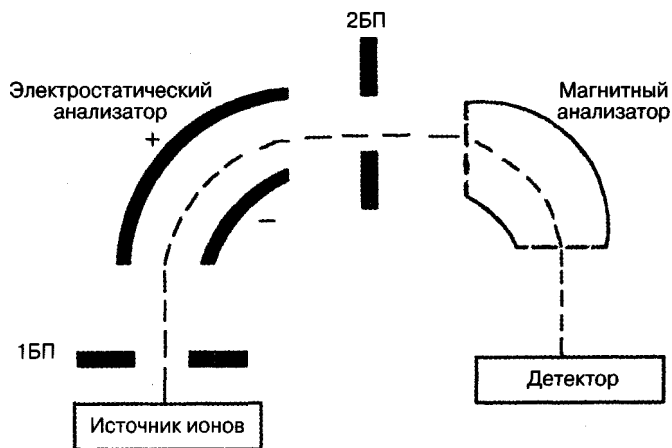


Рис. 6.2. Принципиальная схема магнитного секторного прибора двойной фокусировки прямой геометрии. БП – бесполое пространство

Для получения масс-спектра можно сканировать напряженность магнитного поля либо ускоряющее напряжение. Однако изменение величины ускоряющего напряжения всего в два раза вызывает некоторую дефокусировку ионного пучка и потерю чувствительности. При этом изменяется и разрешающая способность (см. ниже). Поэтому масс-спектры принято получать сканированием напряженности магнитного поля.

Поскольку секторный магнит является анализатором моментов, а не масс, ионы с одной массой, но различной кинетической энергией не собираются в точечном фокусе однофокусного магнитного прибора. Разброс кинетической энергии ионов лимитирует достижимое разрешение. Для преодоления этого недостатка на пути следования ионов ставят дополнительный электростатический сектор (рис. 6.2).

В масс-спектрографах осуществляется разделение ионов по радиусам их траекторий в постоянном магнитном поле. В этом случае все ионы одновременно достигают фотопластинки, расположенной в фокальной плоскости, и засвечивают ее. Исходя из расположения сигналов на пластинке и интенсивности засветки, можно устанавливать массы ионов и их количество, т.е. получать масс-спектр.

6.2. Электростатический анализатор. Двухфокусный секторный масс-спектрометр

Электростатический анализатор может располагаться до или после магнитного. В первом случае принято говорить о прямой геометрии прибора, во втором – об обратной. Для большинства масс-спектрометрических задач расположение анализаторов не принципиально, однако при работе в некоторых режимах тандемной масс-спектрометрии (MIKES, разд. 7.2.2.1) необходим прибор обратной геометрии.

Попадая в электростатический сектор, ион движется по круговой орбите с радиусом R таким образом, что сила электрического поля уравнивается центробежной силой:

$$mv^2/R = eE. \quad (6.4)$$

Учитывая кинетическую энергию ионов ($eV = mv^2/2$), можно получить следующее выражение:

$$R = 2V/E. \quad (6.5)$$

Следовательно, через анализатор пройдут ионы с одинаковой энергией вне зависимости от их массы.

Следует подчеркнуть, что секторные приборы характеризуются диапазоном величин m/z до 10 000, наивысшей точностью измерения масс (< 5 м.д.) и непревзойденным динамическим диапазоном (10^7). Давление в анализаторе секторного прибора не должно превышать 10^{-6} мм рт.ст.

6.3. Масс-спектрометрия высокого разрешения

Приборы с двойной фокусировкой характеризуются также большей величиной столь важного параметра, каким является разрешающая способность. Под разрешением (R) понимается способность получать на данном приборе раздельное изображение двух ионов (рис. 6.3) с массами m и $(m + \Delta m)$. Величина R формально соответствует отношению m к Δm .

Идеальная форма пиков ионов — прямоугольная, реальная — Гауссова. В зависимости от глубины ложбины между двумя соседними пиками принято говорить о разрешении на уровне 10% от высоты пиков для магнитных приборов и 50% — для квадрупольных, времяпролетных и ионных ловушек (см. далее). Если $\Delta m = 1$, то R теоретически является максимальной массой, регистрируемой прибором, когда пики остаются разделенными. Тем не менее разрешение 80 000 для секторного прибора не означает, что на приборе можно получить разрешенный пик однозарядных ионов с такой массой. Регистрируемая масса пропорциональна B^2/V , но безграничное увеличение B сопряжено с техническими сложностями и нецелесообразно, а

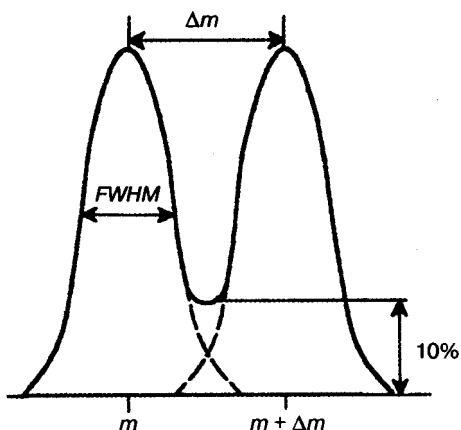


Рис. 6.3. Определение разрешающей способности прибора

уменьшение V понижает и разрешающую способность.

Для расчета разрешающей способности часто используют один пик. В этом случае речь идет о полуширине пика (его ширине на половине высоты максимума), т.е. в качестве Δm используется полуширина пика с массой m (рис. 6.3). В англоязычной литературе используют термин FWHM (full width at half maximum). Этот вариант определения стал основным для времяпролетных приборов и ионных ловушек всех типов.

Что же означают тогда величины разрешающей способности масс-спектрометров

в десятки и сотни тысяч? Дело в том, что каждый изотоп любого элемента имеет уникальный характеристический дефект массы. Поскольку за стандарт принят основной изотоп углерода ^{12}C (12,000000), массы всех остальных изотопов элементов не целые числа. Так, масса основного изотопа водорода ^1H — 1,00782506, азота ^{14}N — 14,00307407, кислорода ^{16}O — 15,99491475 и т.д. Точные массы всех изотопов представлены в табл. 2 Приложения.

Измерение точной массы иона (n знаков после запятой) однозначно определяет его элементный и изотопный состав. Проведение измерений с такой точностью называется **масс-спектрометрией высокого разрешения**. Если разрешение прибора составляет $\sim 100\text{rrb}$ (приборы ионного циклотронного резонанса), этого достаточно для установления точного элементного состава соединений, содержащих атомы C, H, N, O, S, P, с молекулярной массой до 1000 дальтон (разрешающая способность $\sim 10\,000\,000$) [392], а в ИЦР с корректировкой фазы ионы с массами до 1000 Да, различающиеся менее чем на массу электрона ($\sim 0,5$ мДа), могут быть разрешены в широкополосном спектре, даже если они находятся в сложнейшей смеси (нефть, биотопливо) и, помимо указанных элементов, содержат еще атомы металлов [393].

На современных приборах высокого разрешения измерение точных масс с высокой скоростью идет в момент сканирования спектра в автоматическом режиме. Ранее измерения проводились вручную при совмещении положения пика неизвестного иона на шкале масс с ближайшим пиком иона известного состава. В качестве реперов масс можно использовать любое соединение, характеризующееся интенсивным пиком с величиной m/z , близкой измеряемой. Наиболее распространенными для этой цели являются перфторкеросин, перфтортрибутиламин, другие полностью фторированные соединения. Использование перфторированных соединений объясняется их летучестью, а также тем, что фтор является моноизотопным элементом. В спектрах таких соединений регистрируются интенсивные сигналы фрагментных ионов, равномерно перекрывающие весь диапазон от m/z 19 до M^{+} . Перфторированные соединения используются и в современных приборах для точной калибровки шкалы масс.

Простейшим примером использования масс-спектрометрии высокого разрешения может служить разделение мультиплета с целочисленной массой 28 дальтон. Три соединения с такой массой практически всегда присутствуют на уровне фона при съемке масс-спектров. Это — азот, окись углерода и этилен. На приборе с разрешением 250 молекулярные ионы всех трех соединений проявятся в виде единого пика (рис. 6.4а). Повышение разрешения меняет картину (рис. 6.4б, в, г).

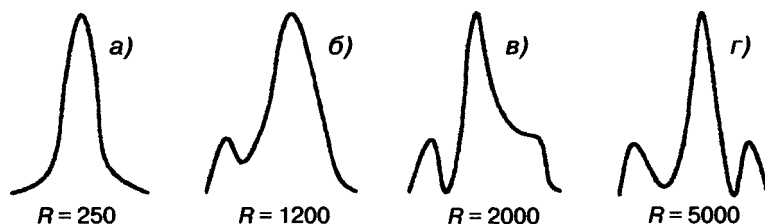


Рис. 6.4. Зависимость формы пика фоновых ионов с целочисленной массой 28 дальтон от разрешающей способности масс-спектрометра

Действительно, для разделения пиков ионов CO и C₂H₄ с массами 27,994915 и 28,03300 дальтон необходимо разрешение $R = 28 / (28,03300 - 27,994915) = 770$, тогда как для разделения пиков ионов CO и N₂ с массой 28,006148 дальтон — уже 2500.

Если учесть, что число ионов с одинаковой целочисленной массой резко возрастает с увеличением массы, то важность масс-спектрометрии высокого разрешения и, естественно, увеличения разрешающей способности приборов становится очевидной. Решение задачи установления элементного состава соединения, включающего самые разные элементы, за несколько секунд выгодно отличается от трудоемкого последовательного определения с помощью классического элементного анализа. Следует, правда, отметить, что элементный анализ дает информацию об образце в целом (с учетом примесей), а масс-спектрометр «видит» компоненты образца, причем в зависимости от метода ионизации набор этих компонентов может различаться. Так что для точного установления состава целевого соединения лучше использовать масс-спектрометрию, а для проверки его чистоты — элементный анализ.

Современные секторные приборы обладают разрешающей способностью 60 000–80 000, в некоторых случаях до 150 000. Сверхвысокое разрешение достигается при использовании масс-спектрометрии с преобразованиями Фурье (ионный циклотронный резонанс, разд. 6.4) и орбитальных ловушек (разд. 6.8). Ежегодно увеличивается и разрешающая способность коммерческих времяпролетных приборов (разд. 6.7).

Не стоит путать разрешающую способность с точностью измерения массы. Разрешающая способность определяет лишь возможность получить отдельные изображения пиков с близкой массой. Точность измерения, по определению, означает разность между экспериментальной и теоретически рассчитанной массой иона ($\Delta m = m_{\text{теор}} - m_{\text{эксп}}$). Неправильно считать, что увеличение разрешающей способности однозначно ведет к увеличению точности измерения массы. Как только разрешение оказывается достаточным для получения индивидуальных пиков, бессмысленно повышать разрешение далее, поскольку при этом падают и точность измерения, и чувствительность анализа. Можно точно измерить массу на приборе с умеренным разрешением и получить неверный результат на плохо откалиброванном приборе высокого разрешения. Точность измерения массы часто выражается в миллионных долях (ppm):

$$\text{Точность измерения массы (ppm)} = 10^6 \times \Delta m / m_{\text{эксп}}. \quad (6.6)$$

На рис. 6.5 представлена форма вершины ионного пика в зависимости от разрешающей способности прибора. Чем шире пик (меньше разрешение прибора), тем труднее точно установить положение его вершины, т.е. измерить точную массу. Тем не менее существуют программы, позволяющие вычислить точную массу иона без использования высокого разрешения [394]. Стоит, однако, подчеркнуть, что такой пик должен принадлежать индивидуальному иону. Если пик обусловлен двумя или несколькими изобарными ионами (с одной целочисленной массой), результат измерения массы окажется неправильным. Очень эффективной проверкой правильности установления элементного состава иона по его массе служит изотопное распределение. Очень часто оно позволяет однозначно отбросить варианты составов с очень близкой точной массой.

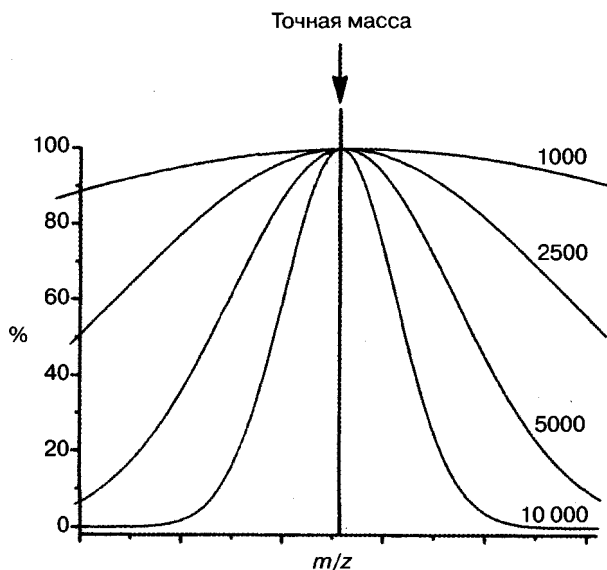


Рис. 6.5. Форма вершины ионного пика в зависимости от разрешающей способности прибора

Результаты определения точной массы часто приводятся в виде таблицы, в которой отмечается измеренная масса иона, а также элементный состав и рассчитанная масса иона. В таблице могут быть представлены ионы с разными составами, рассчитанная масса которых наиболее близка измеренной экспериментально. В табл. 6.1 представлен пример установления элементного состава иона с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения. Наиболее близкие массы к измеренной имеют пять ионов. Поскольку известно, что молекула исследуемого соединения не содержит атомов хлора и водорода, состав определяемого иона $C_6N_2S_2$.

Таблица 6.1. Результаты измерения точной массы иона методом МСВР

Измеренная масса иона ($M_{изм}$)	Вычисленная масса иона ($M_{выч}$)	Разность (м.д.) $M_{изм} - M_{выч}$	Элементный состав иона
163,9497	163,9503	0,6	$C_6N_2S_2$
	163,9488	-0,9	C_8HSCl
	163,9521	2,4	$C_5H_5S_2Cl$
	163,9537	4,0	$C_3H_4N_2S_3$
	163,9447	-5,0	$C_3HN_2O_2SCl$

6.4. Масс-спектрометрия с преобразованием Фурье (МС ПФ)

Масс-спектрометрия с преобразованиями Фурье (Fourier Transform Mass Spectrometry, FT-MS) впервые была использована в приборах ионного циклотронного резонанса (ИЦР). Физические основы этого метода были разработаны Лоуренсом [395] в 30-х годах, а первый масс-спектрометр этого типа построен в 50-х годах Соммером [396]. Приложение преобразований Фурье к ИЦР впервые было осуществлено

Комисаровым и Маршалом в 1978 году. Сейчас метод применяется и в орбитальных ловушках, будучи одним из наиболее популярных в масс-спектрометрии [397].

Основным элементом прибора является ячейка, размещенная в однородном магнитном поле. Ячейка может иметь самые разнообразные формы, простейшей из которых является кубическая. Для создания магнитного поля применяют постоянные магниты, электромагниты. Однако, поскольку характеристики прибора улучшаются при увеличении напряженности поля, наилучших результатов удалось достичь при использовании суперпроводящих магнитов силой 3–12 Т. Самый мощный прибор с магнитом 21 Т установлен в 2014 году в Национальной лаборатории высоких магнитных полей в США.

Ионы образца, генерированные любым известным методом, направляются в ячейку, в которой протекают процессы активации и детектирования ионов. Входное отверстие в ячейку расположено на пластине, перпендикулярной силовым линиям магнитного поля. Можно генерировать ионы и непосредственно в ячейке. Оказываясь в ячейке, ион, обладающий определенной скоростью теплового движения, испытывает на себе силу Лоренца. Эта сила перпендикулярна направлению магнитного поля и скорости иона. Она уравнивается центробежной силой. При большой величине напряженности магнитного поля ион описывает окружность (рис. 6.6):

$$F = ma = mv^2/r = ze v B, \quad (6.7)$$

где m — масса иона, v — компонента скорости иона в направлении, перпендикулярном магнитному полю, r — радиус траектории кругового движения иона, e — единичный заряд, z — число единичных зарядов у иона, B — напряженность магнитного поля.

Если ω_c угловая (циклотронная) частота ионов в радианах в секунду, то уравнение (6.7) можно представить следующим образом:

$$mv/r = m\omega_c = zeB \text{ или } \omega_c = zeB/m. \quad (6.8)$$

Обычно используется выражение для циклотронной частоты иона в герцах:

$$\nu_c = \omega_c/2\pi = zeB/2\pi m \text{ или } m/ze = B/2\pi\nu_c. \quad (6.9)$$

В частности, циклотронная частота иона N_2^+ в магнитном поле напряженностью 1,0 Т:

$$\frac{1,6 \cdot 10^{-19} \text{ Кл} \cdot 1,0 \text{ Т}}{6,28 \cdot 28 \text{ дальтон} \cdot 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ кг/дальтон}} = 570 \text{ кГц, т.е. } 5,7 \times 10^5 \text{ циклов в секунду.}$$

Магнитное поле в масс-спектрометрах с преобразованиями Фурье, как правило, не изменяется, а масса иона определяется при измерении его циклотронной частоты. Следует подчеркнуть, что циклотронная частота не зависит от скорости, а следовательно, кинетической энергии иона. Поэтому появляется возможность достигать сверхвысокого разрешения (до сотен миллионов [398]), недостижимого при работе на магнитных приборах. Однако разрешающая способность уменьшается с увеличением массы иона, и для достаточно тяжелых ионов она становится не столь впечатляющей.

Удержание иона в ячейке осуществляется при подаче на задерживающие пластины, перпендикулярные силовым линиям магнитного поля, небольшого равного напряжения. Например, если исследуются положительные ионы, на пластины подается напряжение (+3 В), если отрицательные – (–3 В). В результате, ионы в ячейке претерпевают гармонические колебания между задерживающими пластинами. Комбинация магнитного и электрического полей создает трехмерную ловушку, в которой ионы могут существовать теоретически сколь угодно долго. Столь длительное время жизни ионов существенно отличает ИЦР от других масс-спектрометрических методов, когда ионы живут милли- и микросекунды. Здесь, правда, следует отметить, что масс-спектрометрия с преобразованием Фурье имеет значительно более строгие вакуумные ограничения. Для нормальной работы прибора в условиях высокого разрешения требуется давление на уровне 10^{-9} – 10^{-10} мм рт.ст.

Суперпозиция циклотронного движения и колебаний между задерживающими пластинами, формально независимых друг от друга, приводит к возникновению магнетронного движения ионов. Магнетронная частота зависит от формы ячейки, расстояния между пластинами, напряженностей магнитного и электрического полей и не зависит от массы ионов. Эта частота имеет величину порядка 1–100 герц, т.е. существенно ниже частоты циклотронного движения, которая лежит в кило- и мегагерцевом диапазоне. Магнетронный радиус иона определяется также начальным положением иона относительно основной оси ячейки. Для достижения максимального разрешения и максимальной точности определения массы магнетронный радиус должен быть минимизирован. Это достигается генерированием или вводом ионов в ячейку вдоль основной оси параллельно магнитным силовым линиям.

Простейшая последовательность событий для получения масс-спектра может быть представлена следующим образом: **очистка ячейки – ионизация – возбуждение ионов – детектирование ионов.**

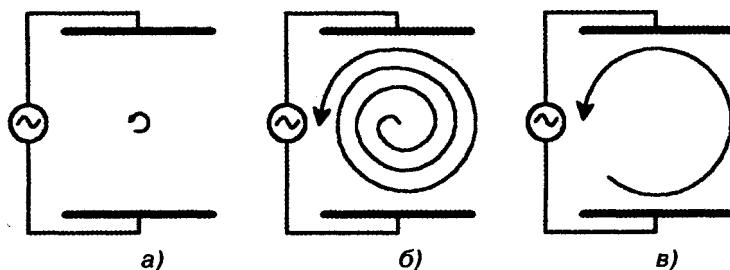


Рис. 6.6. Циклотронное движение ионов до возбуждения (а); возбуждение ионов резонансным радиочастотным импульсом (б); циклотронное движение ионов после возбуждения (в)

Для очистки ячейки от ионов к задерживающим пластинам прикладывается асимметричное напряжение (например, +10 В и –10 В). В результате все ионы, находившиеся в ячейке, покидают ее за несколько миллисекунд. Процесс ионизации может включать образование ионов непосредственно в ячейке (электронная ионизация), рядом с ячейкой в условиях глубокого вакуума (МАЛДИ), вне магнитного поля. В последних случаях образовавшиеся ионы направляются в ячейку с помо-

щью системы электродов. Для возбуждения и детектирования ионов используют радиочастотное поле, приложенное к паре противоположащих пластин, расположенных параллельно линиям магнитного поля. Когда собственная частота иона оказывается в резонансе с частотой возбуждающего импульса, радиус траектории иона увеличивается по спирали (рис. 6.6б). Поскольку скорость и радиус движения иона увеличиваются синхронно, угловая частота не изменяется и ион остается в резонансе. Ионы с другими массами продолжают при этом двигаться по своим нерезонансным орбитам. Если возбуждение продолжается в течение длительного времени, ускоренные ионы достигают боковых пластин и гибнут. Этот эффект, кстати, можно использовать для удаления ионов определенной массы из ячейки, например, работая в режиме тандемной масс-спектрометрии (разд. 7.2.4). Если же вовремя прекратить подачу радиочастотной энергии, ионы будут продолжать вращаться по орбите с большим радиусом (рис. 6.6в). В идеальных вакуумных условиях при отсутствии столкновений ионы теоретически должны оставаться на этих орбитах неограниченное время.

Процесс детектирования ионов представлен на рис. 6.7. Циклотронное когерентное движение пучка разогнанных положительных ионов между детектирующими пластинами, имеющими потенциал Земли и соединенными друг с другом через сопротивление, обуславливает следующее. Когда положительные ионы движутся от левой к правой пластине, их электрическое поле заставляет электроны перемещаться в том же направлении по внешней цепи через сопротивление. Во второй части циклотронного движения ионов электроны перемещаются в обратном направлении. Это движение электронов называют наведенным током. Это переменный ток с частотой, равной разности частот циклотронного и магнетронного движения, а его амплитуда пропорциональна числу ионов данной массы в ячейке. Наведенный ток создает небольшое переменное напряжение на сопротивлении, которое может быть усилено и измерено. Таким образом, можно регистрировать ионы, не удаляя их из ячейки.

В классическом варианте ионного циклотронного резонанса для получения спектра необходимо было линейно сканировать частоту или напряженность магнитного поля. Это требовало значительного времени и большого количества образца. Сущность масс-спектрометрии с преобразованием Фурье заключается в возбуждении сразу всех ионов в результате приложения широкого радиочастотного импульса. Существующие синтезаторы частот способны активировать ионы с собственными частотами от 10 кГц до 1 МГц за 1 миллисекунду. Регистрируемый наведенный ток

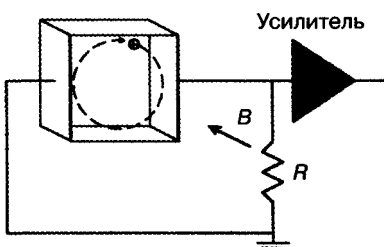


Рис. 6.7. Детектирование резонансно ускоренных ионов

является комплексом синусоид с различной частотой и амплитудой. Пример такого временного сигнала представлен на рис. 6.8а. Математические операции, основанные на преобразованиях Фурье, позволяют перейти от временного сигнала к масс-спектру в обычном виде (рис. 6.8б).

Хотя вся необходимая информация о массовых числах ионов содержится в любом коротком сегменте временного сигнала, полезно записать сигнал полностью. Дело в том, что разрешающая

способность прямо пропорциональна продолжительности зарегистрированного временного сигнала. Если обозначить это время T , то разрешение в спектре можно рассчитать по уравнению (6.10):

$$R = Tv/2. \quad (6.10)$$

К сожалению, T имеет ограничения. Амплитуда временного сигнала уменьшается во времени, поскольку когерентность ионного пучка нарушается в результате столкновений ионов с нейтральными частицами. Понятно, что использование более глубокого вакуума будет способствовать увеличению разрешающей способности. В частности, временной сигнал до 60 секунд получают в вакууме 10^{-10} мм рт.ст.

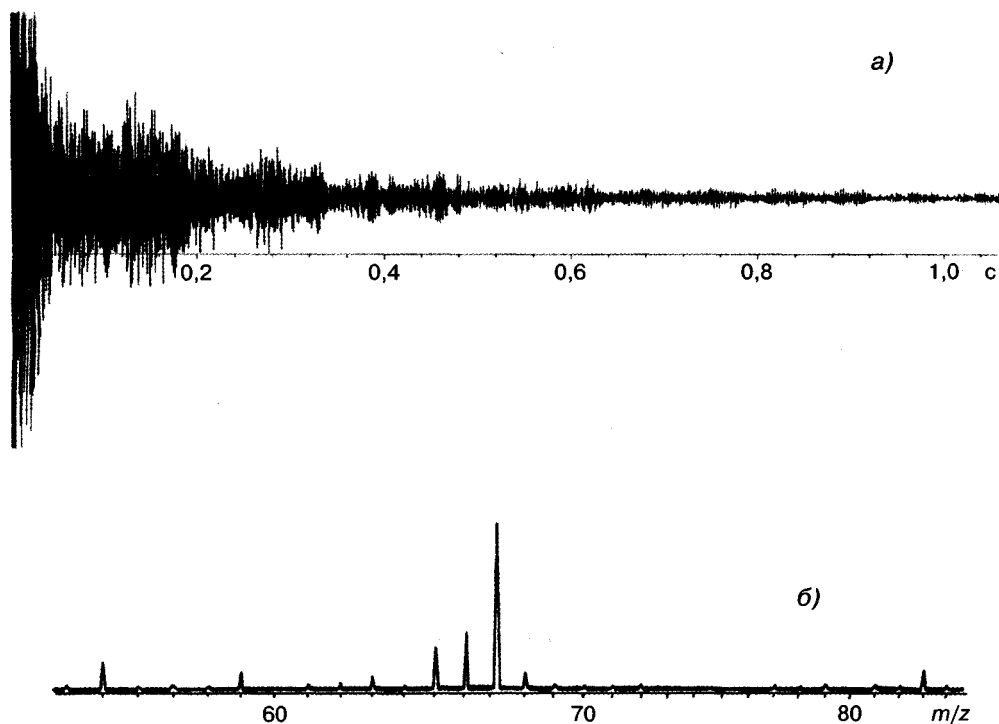


Рис. 6.8. Временной сигнал (а) и соответствующий ему масс-спектр (б)

Впечатляющие результаты получены при использовании масс-спектрометрии с преобразованием Фурье для анализа соединений большой массы, для установления направления газофазных ионных и фотохимических реакций. Особенно ценно сверхвысокое разрешение метода, позволяющее устанавливать точные массы соединений. Очень эффективна работа в режиме тандемной масс-спектрометрии (гл. 7). Причем для целей тандемной масс-спектрометрии не требуется никаких дополнительных конструктивных добавлений, существенно удорожающих соответствующие приборы с магнитными, квадрупольными или времяпролетными анализаторами. Благодаря сверхвысокому разрешению появилась возможность работать со сложнейшими смесями природных соединений без какого-либо пред-

варительного разделения. В результате появились новые научные направления: петролеомика [399] и гуминомика [400].

В начале 80-х годов казалось, что масс-спектрометрия с преобразованиями Фурье позволит анализировать ионы любой массы, однако существуют не только практические, но и теоретические пределы. Прежде всего, следует отметить, что, начиная с определенной массы, сила радиального электрического поля начинает превосходить силу Лоренца. Кроме того, радиус циклотронной орбиты ионов, движущихся со скоростями теплового движения, увеличивается с увеличением их массы, т.е. теоретический предел масс для каждой ячейки определяется ее размерами. Первый фактор является более важным, чем второй. В ячейке размером 2,5 см с задерживающим напряжением 1 В в магнитном поле 3 Т радиальное электрическое поле не позволяет анализировать однозарядные ионы тяжелее 40 000 дальтон. Термический радиус анализируемого иона играет значительно меньшую роль. Для указанных параметров анализа предел по этому показателю составит 10 000 000 дальтон [401].

Методу масс-спектрометрии с преобразованиями Фурье посвящен ряд представительных обзоров [402–409].

6.5. Квадрупольный анализатор

Квадрупольный анализатор, часто называемый квадрупольным фильтром масс, состоит из четырех параллельных стержней круглого или гиперболического сечения (рис. 6.9). Квадруполь могут иметь разную длину и даже могут быть искривлены. Противоположные стержни электрически соединены и находятся под напряжением, складывающимся из компоненты постоянного тока U и радиочастотной компоненты $V_0 \cos \omega t$. Вторая пара стержней имеет равную по величине, но противоположную по знаку компоненту постоянного тока, а фаза радиочастотной компоненты сдвинута на 180° . Ионы, вводимые в анализатор небольшим ускоряющим напряжением (10–20 В), под действием электрического поля колеблются относительно осей x и y . Так как каждый ион имеет свою собственную частоту, зависящую от массы, через квадруполь пролетают лишь те частицы, частота которых находится в резонансе с радиочастотой квадруполь. Масс-спектр генерируется сканированием U и V_0 при сохранении постоянной величины U/V_0 . Регистрируемая масса m пропорциональна V_0 , т.е. линейное изменение V_0 предоставляет калибруемую линейную шкалу масс [410].

Квадруполь легко управляется компьютером, имеет хороший динамический диапазон (10^5), стыкуется со всеми системами ввода, способен без модифицирования разделять и положительные, и отрицательные ионы. Его достоинствами являются также быстрота сканирования, небольшие размеры, дешевизна и возможность работы при повышенном (до 5×10^{-5} мм рт.ст.) давлении. Эти факторы обусловили широчайшее распространение квадрупольных приборов начиная с 70-х годов XX века, особенно для серийных стандартных анализов, съемки рутинных спектров электронной или химической ионизации. Еще один импульс для использования приборов этого типа связан с созданием метода электрораспыления (разд. 5.12).

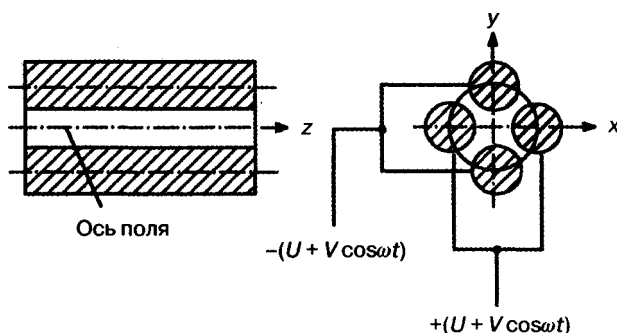


Рис. 6.9. Квадрупольный анализатор

Современные квадрупольные анализаторы работают в диапазоне величин m/z до 3000–4000, что делает их чрезвычайно удобными для анализа белков, пептидов, других биомолекул с применением электрораспыления, когда образование многозарядных ионов происходит в условиях атмосферного давления. Квадрупольные анализаторы отлично зарекомендовали себя также в приборах гибридной геометрии для tandemной масс-спектрометрии (гл. 7). Для этих же целей широко используются системы из трех квадрупольных анализаторов. Тройные квадрупольные анализаторы в настоящее время считаются наиболее эффективными масс-спектрометрами для проведения количественных измерений.

К недостаткам анализаторов этого типа можно отнести не самый широкий диапазон масс (до m/z 3000–4000), низкую разрешающую способность и плохие результаты при работе в режиме МАЛДИ.

6.6. Ионная ловушка

Ионная ловушка была впервые описана одновременно с квадрупольным анализатором, однако первый коммерческий прибор появился на рынке только в 1983 году [411]. Тем не менее к настоящему времени ионная ловушка превратилась из простого детектора к газовому хроматографу в высокочувствительный хромато-масс-спектрометр с диапазоном регистрируемых масс в десятки тысяч дальтон, разрешающей способностью в десятки тысяч, возможностью работы в режиме tandemной масс-спектрометрии с регистрацией до 10 поколений фрагментных ионов и высочайшей чувствительностью.

Основой прибора являются три электрода (рис. 6.10): два концевых (полюсных) гиперболической формы, обычно имеющие потенциал Земли, и один кольцевой электрод между ними, на который подается радиочастотное напряжение, обычно мегагерцового диапазона. Эта система электродов создает некое подобие ячейки, используемой в методе ионного циклотронного резонанса (разд. 6.4). Ловушка может удерживать ионы достаточно долгое время. Для ионизации образца используют любые методы, применяемые в комбинациях ГХ/МС и ЖХ/МС. Работа ведется в импульсном режиме. Например, импульсная подача электронов в ловушку (0,1–10 мсек) вызывает ионизацию необходимого числа молекул образца. Образовавшиеся ионы какое-то время удерживаются полем центрального электрода.

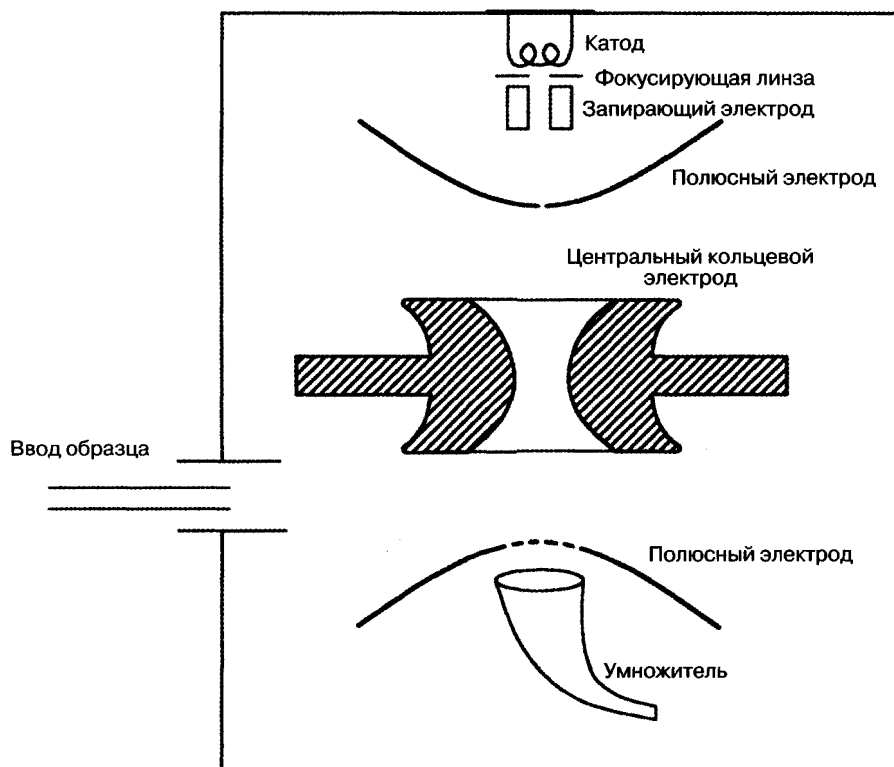


Рис. 6.10. Принципиальная схема ионной ловушки

В классическом варианте нестабильного масс-селективного сканирования импульсное изменение амплитуды радиочастотного напряжения, приложенного к кольцевому электроду, заставляет ионы с определенным значением m/z переходить на нестабильные траектории и покидать ловушку, попадая на электронный умножитель. В результате генерируется масс-спектр.

Вариантом этого метода является резонансное извлечение. В обычных условиях работы ионы в зависимости от величины m/z имеют характеристические частоты движения. Эти частоты зависят от многих параметров, включая амплитуду радиочастотного напряжения. Можно создать условия резонанса для конкретных ионов благодаря дополнительному радиочастотному сигналу, приложенному к концевым электродам. В условиях резонанса ионы поглощают достаточную энергию для того, чтобы покинуть ловушку, после чего они регистрируются внешним детектором. В этом случае ионы можно извлечь из ловушки, приложив более низкое напряжение, чем в классическом варианте. Основным результатом является возможность расширения диапазона регистрируемых масс. Например, прибор с верхним диапазоном масс 650 дальтон при работе в обычном режиме может регистрировать соединения с массой до 70 000 дальтон в режиме резонансного извлечения ионов.

Возможность удаления мешающих ионов на разных стадиях ускорения и замедления движения ионов, индуцирование фрагментации ионов при их столкновениях с атомами гелия позволяют успешно использовать ионные ловушки для работы в

режиме тандемной масс-спектрометрии, причем можно получить информацию о нескольких последовательных поколениях фрагментных ионов. Такая техника обозначается в литературе (MS)ⁿ. Показана также возможность достижения разрешающей способности 25 000 [411].

Сегодня созданы коммерческие приборы с самыми разными формами ловушек. Помимо классического варианта, представленного на рис. 6.10, существуют тороидальные, линейные, цилиндрические, прямоугольные и т.д. ионные ловушки [59]. К их достоинствам следует добавить также небольшие размеры и самую низкую среди масс-спектрометров стоимость прибора. Они оказались весьма перспективными для создания портативных масс-спектрометров (разд. 9.8). К недостаткам можно отнести протекание в ловушке ионно-молекулярных реакций, что приводит к искажениям стандартного масс-спектра. В результате использование стандартных компьютерных библиотек NIST и WILEY для идентификации соединений по масс-спектрам оказывается менее эффективным, чем в случае магнитных или квадрупольных анализаторов.

6.7. Времяпролетный анализатор

Времяпролетная масс-спектрометрия в XXI веке стала одним из самых бурно развивающихся направлений аналитической химии. Эти приборы очень активно используются в протеомных исследованиях (разд. 11.1.4), в масс-спектрометрической визуализации (разд. 9.9). Приборы именно этого типа конструируются для экспрессного детектирования и идентификации микроорганизмов, включая патогенные (разд. 11.6). Относительная простота, высокая скорость получения спектра, практически одновременный анализ всех ионов, выходящих из источника, а также теоретически не лимитированный диапазон масс являются основными преимуществами времяпролетных анализаторов.

Прообразом современных времяпролетных масс-спектрометров можно считать конструкции, предложенные в середине XX века [412, 413]. Однако низкая разрешающая способность этих устройств с трудом позволяла различать даже компоненты воздуха. Этот тип анализатора масс [414] основан на простейшем физическом принципе: скорость ионов, движущихся в постоянном электрическом поле, обратно пропорциональна квадратному корню их массы (уравнение (6.11)). Измерив время пролета ионов в дрейфовом пространстве, можно определить их массу:

$$eV = mv^2/2 \text{ или } m = 2eV/v^2, \quad (6.11)$$

где V — ускоряющее напряжение, m — масса иона, v — скорость иона, e — элементарный заряд.

Если группа ионов разной массы стартует одновременно и движется в прямой трубе в вакууме с постоянной кинетической энергией, то места регистрации они достигают в порядке увеличения своей массы. Анализатор такого типа называется прямопролетным или линейным. Однако такие прямопролетные анализаторы используются для весьма узкого круга задач (МАЛДИ, исследование быстрых химических процессов) из-за сравнительно низкой разрешающей способности и ограничений в случае применения с непрерывными методами ионизации.

Время достижения ионом детектора можно рассчитать по формуле (6.12):

$$t = d \sqrt{\frac{m}{2zV}}, \quad (6.12)$$

где t — время достижения ионом детектора, m — масса иона, d — длина области дрейфа, z — число элементарных зарядов у иона, V — ускоряющее напряжение.

Однозарядные ионы с m/z 50 и 500, ускоренные разностью потенциалов 3 кВ и пролетевшие в дрейфовом пространстве 0,5 м, достигнут детектора за 4,6 и 15 микросекунд соответственно. Понятно, что время пролета можно увеличивать, уменьшая разность потенциалов или увеличивая длину дрейфа.

Разрешающая способность времяпролетных масс-анализаторов определяется простой формулой (6.13):

$$R = T/2dt, \quad (6.13)$$

где T — время полета иона, а dt — ширина пика иона в масс-спектре на определенном уровне его высоты, как правило, на 50% высоты (полуширина). Так, если время пролета иона 50 мкс, а полуширина пика 5 нс, разрешающая способность 5000. На рис. 6.11 представлена схема прямопролетного анализатора, предложенная в пионерской работе МакЛарена и Уайли [414]. Ионы, образовавшиеся в пространстве между выталкивающим электродом источника и заземленной сеткой, ускоряются разностью потенциалов, когда к выталкивающему электроду прикладывается электрический импульс. В области дрейфа происходит разделение ионов по скоростям (следовательно, по массам). Детектор регистрирует интенсивность пучков изобарных ионов. В результате генерируется масс-спектр. Следует отметить: на детектор поступают все ионы, что существенно улучшает чувствительность метода по сравнению со сканирующими анализаторами, в которых детектора достигает фактически менее 1% ионов.

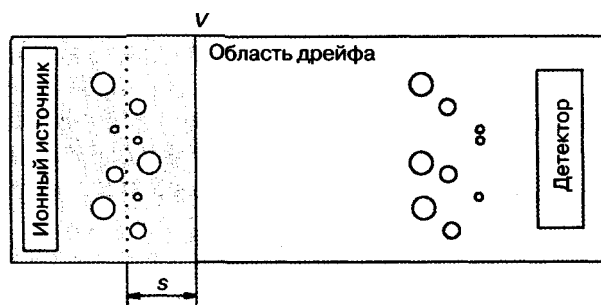


Рис. 6.11. Схема линейного времяпролетного масс-спектрометра

Основные факторы, увеличивающие ширину пиков и ограничивающие разрешающую способность времяпролетных анализаторов, — это разброс ионов по скорости (начальной энергии) и в пространстве (начальному положению ионов в момент их старта по направлению к детектору). Разброс по энергиям связан с тем, что ионы уже изначально (до ускорения) имеют различную кинетическую энергию ΔU . В результате полная энергия движения ионов в области дрейфа будет $(eV + \Delta U)$.

Пространственный разброс связан с тем, что ионы в источнике находятся не на одной линии старта, а занимают конкретный объем. Ионы, находящиеся в момент ускорения ближе к выталкивающему электроду (стартующие с более высокого потенциала), получают энергию большую, чем ионы, находящиеся ближе к сетке, т.е. их скорость оказывается несколько выше. Происходит уширение сигнала и, соответственно, потеря разрешения. Однако ионы, стартующие с позиций, расположенных ближе к сетке, должны пролететь более короткую дистанцию. Путем правильного подбора длины дрейфового пространства, длины ускоряющего промежутка и величины выталкивающего электрического импульса можно создать условия для того, чтобы ионы с одинаковой массой, но разными начальными параметрами по энергии и координатам долетели до детектора с минимальным временным разбросом. Так можно увеличить разрешающую способность анализаторов до нескольких сотен.

Прибор, представленный на рис. 6.11, не приспособлен для работы в сочетании с классическими непрерывными методами ионизации органических молекул (ИЭ, ХИ, ИЭР), поскольку в этом случае разброс во времени появления ионов бесконечен, что означает нулевую разрешающую способность. Тем не менее использование импульсных методов генерирования ионов (МАЛДИ, ВИМС и др.) позволяет достаточно эффективно работать на линейных времяпролетных приборах. В этом случае время генерирования ионного пучка ограничивается временем импульса, т.е. разброс ионов по времени появления имеет конечное значение, причем чем короче импульс, тем меньше разброс. Указанные методы ионизации связаны с генерированием ионов с поверхности. В результате, помимо разброса по времени образования, одновременно устраняется и пространственный разброс, наблюдаемый при использовании методов ионизации молекул в газовой фазе. Для устранения разброса по энергиям и повышения разрешающей способности линейных анализаторов было предложено использование двух сеток, а также метод задержки извлечения ионов из источника импульсной подачей напряжения [414].

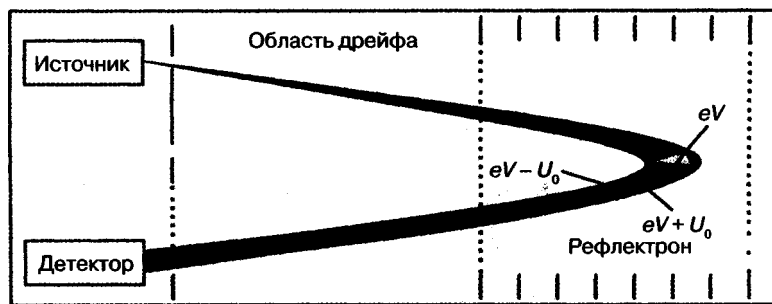


Рис. 6.12. Схема времяпролетного масс-спектрометра с рефлектроном

Революционным решением задачи увеличения разрешения стало использование схемы с электростатическим отражателем (рефлектор, ионное зеркало), предложенное в 1973 году группой, возглавляемой Б.А. Мамыриным [415]. Схема времяпролетного масс-спектрометра с рефлектроном представлена на рис. 6.12. Масс-анализатор включает дрейфовое пространство и собственно рефлектор. Ионы одной массы, но с некоторым разбросом по кинетической энергии, движутся

в дрейфовом пространстве в соответствии с формулой (6.12). Ионы с повышенной энергией пролетают это пространство быстрее, чем ионы с меньшей энергией. Попадая в рефлектрон, в котором создано однородное тормозящее электрическое поле, ионы начинают замедляться, и, когда их энергия сравнивается с потенциалом электрического поля в рефлектроне, они останавливаются и начинают ускоряться в обратном направлении. Выйдя из рефлектрона, они попадают во вторую часть пространства дрейфа, где продолжают свое движение с постоянной скоростью в соответствии с формулой (6.11). Главное свойство рефлектрона заключается в том, что ионы с большей кинетической энергией проникают глубже внутрь отражающего поля рефлектрона, тем самым затрачивая больше времени на замедление и последующее ускорение. Хотя они первыми достигают ионного зеркала, они последними покидают его и догоняют более медленные ионы в фокальной плоскости, в которой располагается детектор. Правильным выбором геометрических и электрических параметров, определяемых расчетами, можно добиться условий, в которых ионы с разной энергией, но одной массой будут преодолевать путь от источника до детектора одновременно. Масс-анализаторы с рефлектроном являются самым распространенным типом времяпролетных масс-спектрометров и позволяют достигать разрешающей способности до 30 000, а при увеличении размеров анализатора — до 80 000.

Следующей ступенью на пути повышения разрешающей способности времяпролетных приборов стала разработка многоотражательных систем с планарными бессточными ионными зеркалами и набором периодических фокусирующих линз, предложенная в 2003 году группой под руководством А.Н. Веренчикова [416]. Для увеличения разрешения было предложено существенно увеличить время пролета ионов, направив их по зигзагообразной траектории с многократным отражением от двух параллельно установленных планарных ионных зеркал (рис. 6.13).

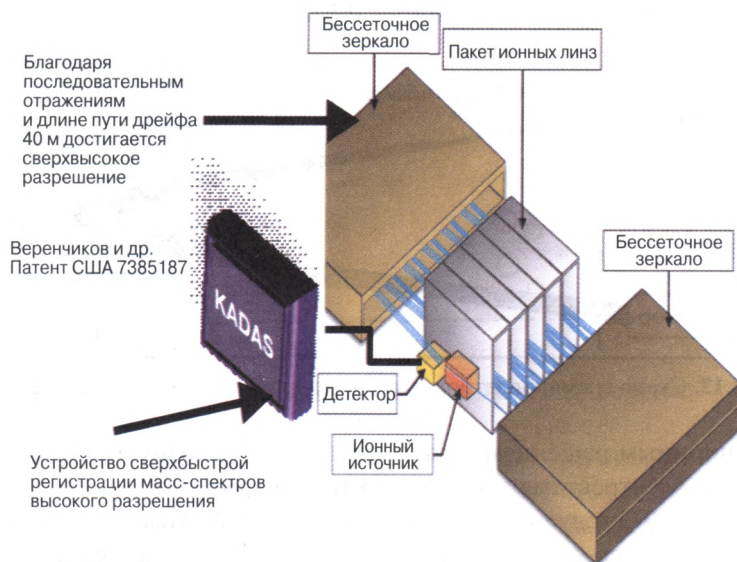


Рис. 6.13. Мультиотражательный вариант времяпролетного прибора, реализованный при создании прибора HRT компании «Леко»

Ожидаемые в многоотражательных системах потери ионов (за счет расфокусировки и потери на сетках) были минимизированы при использовании бессеточных зеркал, периодической пространственной фокусировкой в неоднородных полях зеркал и электростатических линз, установленных в дрейфовом пространстве. Для уменьшения разброса времени достижения ионами детектора ионная оптика предложенной системы обеспечивала минимизацию временных aberrаций за счет системы с высоким порядком фокусировки.

Такая схема позволяет достигать разрешающей способности до 200 000 при сравнительно компактных (до 1 м) размерах анализатора и дает возможность надежного установления элементного состава ионов путем измерения их точной массы. На рис. 6.14 представлена тонкая изотопная структура иона $M+1$ соединения состава $C_{12}H_{19}N_3O_6F_{12}P_3$ с разрешенными изотопными пиками (C^{13} и N^{15}).

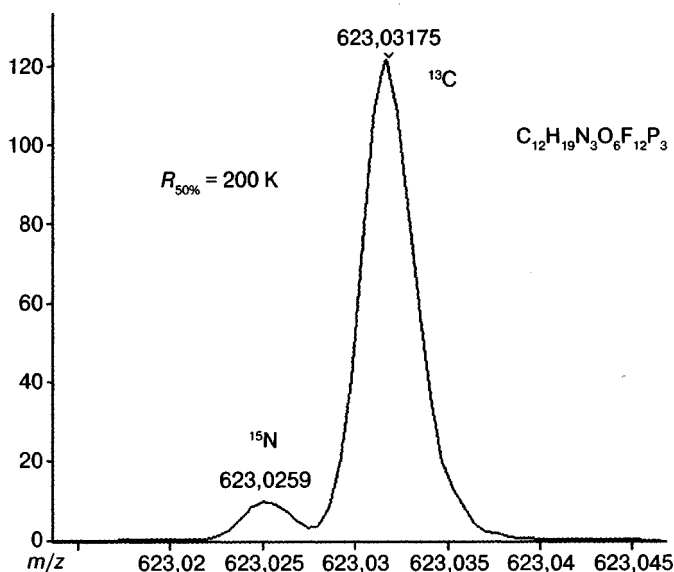


Рис. 6.14. Тонкая изотопная картина изотопа $M+1$ соединения состава $C_{12}H_{19}N_3O_6F_{12}P_3$ с разрешением 200 000 ($\Delta = 6,38$ мДа)

Еще одним замечательным нововведением в масс-спектрометрию было использование принципа ортогонального ускорения (рис. 6.15). Благодаря этому методу удалось состыковать времяпролетный анализатор с непрерывными источниками ионов. Фактически одновременно А.Ф. Додоновым в России [417, 418] и М. Гилхаусом в Австралии [419] были сконструированы масс-спектрометры с ортогональным ускорением в сочетании с электроспреем и электронной ионизацией соответственно. В приборах этого типа импульсное приложение потенциала к линзе, расположенной параллельно движению ионов от источника к детектору, ускоряет сегмент сфокусированного пучка ионов в направлении, перпендикулярном их движению. В итоге ионы достигают второго детектора согласно их массам. В этом случае разброс в скоростях в ортогональном направлении отсутствует, а пространственный разброс невелик и определяется только шириной пучка сфокусированных ионов.

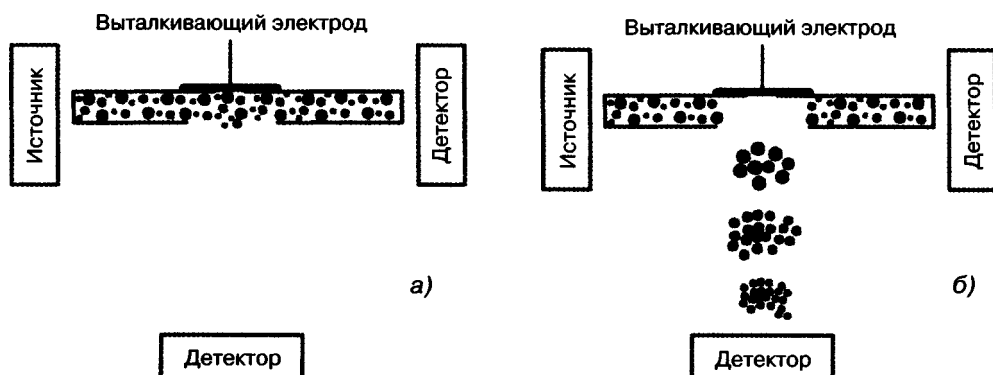


Рис. 6.15. Принципиальная схема метода ортогонального ускорения: выталкивающий электрод выключен (а), выталкивающий электрод включен (б)

Важным достоинством времяпролетного анализатора является значительно более высокая чувствительность по сравнению со сканирующими приборами. Все ионы, образовавшиеся в результате импульса ионизации или оказавшиеся в зоне действия импульса ортогонального ускорения, достигают детектора. Следующий импульс можно осуществить, как только самый тяжелый ион достигнет детектора. В реальной ситуации, например в экспериментах с ортогональным ускорением, детектируется один из семи ионов каждой массы, образовавшихся в источнике.

Для сканирующих приборов, напротив, характерно одномоментное пропускание только ионов с конкретной массой. Например, если за 1 секунду сканируется диапазон масс от 10 до 1000 дальтон, то ионы с конкретной величиной m/z достигают детектора лишь в течение 0,001 секунды, т.е. детектируется 0,1% образовавшихся в источнике ионов. Таким образом, выигрыш в чувствительности при переходе от сканирующего к времяпролетному анализатору составляет примерно 2 порядка (гл. 12).

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить следующие достоинства масс-спектрометра с времяпролетным анализатором:

- более высокая чувствительность в полном диапазоне регистрируемых масс по сравнению со сканирующими приборами;
- очень высокая скорость записи спектра (до нескольких сот спектров в секунду);
- теоретически неограниченный диапазон регистрируемых масс, лимитируемый на практике только необходимым разрешением и способностью детектора регистрировать тяжелые ионы;
- разрешающая способность до 200 000;
- работает с самыми разнообразными источниками ионов;
- идеальный второй анализатор для работы в режиме тандемной масс-спектрометрии (разд. 7.6);
- сравнительно небольшие размеры и удобство в получении и хранении результатов.

6.8. Орбитальная ловушка (Orbitrap)

На рубеже веков вышли в свет две работы Александра Алексеевича Макарова [420, 421], в которых было заявлено о создании принципиально нового типа масс-спектрометров. В 2005 году фирма «Термо» представила первый коммерческий вариант орбитальной ловушки [422]. С тех пор практически ежегодно появляется новая версия прибора, обладающая улучшенными характеристиками. На рис. 6.16 представлена принципиальная схема первой орбитальной ловушки.

Предшественником орбित्रапа считают ловушку Кингдона [423], который поместил проволочный электрод в замкнутую цилиндрическую металлическую камеру. Ионы, образующиеся при разряде внутри камеры, притягивались к электроду, но не гибли на нем, если имели достаточную тангенциальную компоненту скорости. В результате возникало орбитальное вращение ионов вокруг электрода. Многочисленные эксперименты с ловушкой Кингдона доказали эффективность электростатического удерживания, но не привели к идеям, как использовать это устройство в качестве анализатора масс [424]. Не привели к успеху и некоторые более поздние разработки, основанные на этом принципе [424, 425].

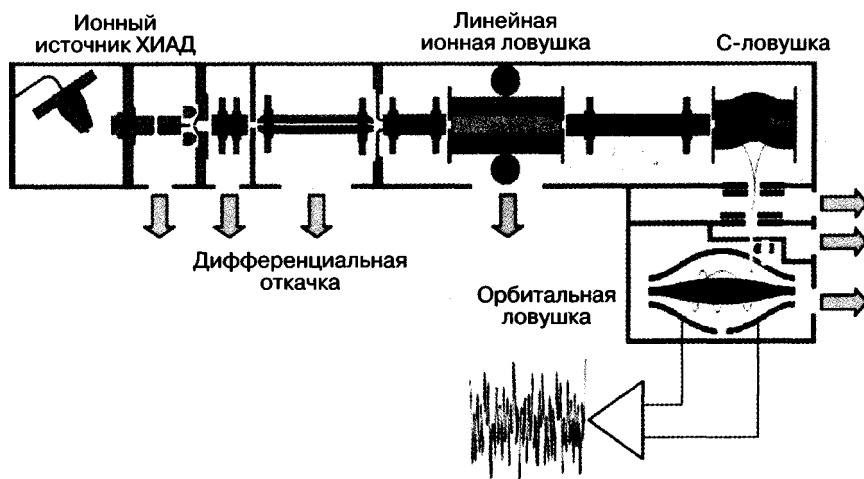


Рис. 6.16. Принципиальная схема орбитальной ловушки. (С разрешения А.А. Макарова)

А.А. Макарову удалось решить все проблемы, казавшиеся до тех пор непреодолимыми. Сердцем орбитальной ловушки являются три электрода (рис. 6.17). Два внешних электрода, смотрящие друг на друга, имеют форму чаши и разделены тонким центральным кольцом из диэлектрика. Осовой (центральный) электрод представляет собой не проволоку, как в ловушке Кингдона, а цельнометаллический электрод, изготовленный с точностью, максимальной для современных технологий. Если между внешними и внутренним электродами приложить разность потенциалов, возникающее электрическое поле строго линейно вдоль оси, а колебания вдоль этой оси оказываются гармоническими. Ионы в ловушке следуют по устойчивым траекториям, которые образуются при суперпозиции трех видов

циклических движений: вращательное движение вокруг внутреннего электрода с частотой вращения ω_ϕ ; радиальное движение с частотой ω_r между электродами; осевые колебания вдоль внутреннего электрода с частотой ω . Поскольку вращательные и колебательные частоты зависят от энергии ионов, углов и начального положения ионов в ловушке, каждый пакет ионов распределяется по угловым и радиальным координатам, образуя тонкое вращающееся кольцо. Важно подчеркнуть, что осевое движение не зависит от вращательного. Оно также не зависит от начальных скоростей и координат ионов (уравнение (6.14)).

$$\omega = \sqrt{k \cdot \frac{e}{m/z}}. \quad (6.14)$$

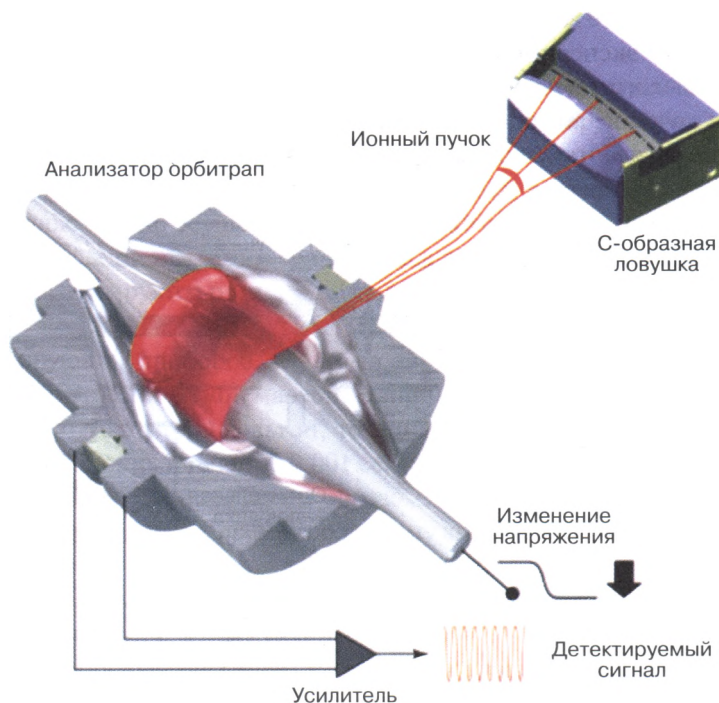


Рис. 6.17. Схема сечения орбитальной ловушки и С-ловушки

Поэтому именно осевая частота используется для определения величины m/z . Измеряют наведенный аксиальными колебаниями ток на внешних электродах ловушки (рис. 6.17), аналогично тому, как это осуществляется в методе ИЦР ПФ (разд. 6.4). Разница в наведенных токах между электродами детектируется дифференциальным усилителем, а широкополосный частотный сигнал оцифровывается и конвертируется в результате преобразования Фурье в классический вариант масс-спектра, когда по оси абсцисс откладывается величина m/z . Важным моментом является тот факт, что в ИЦР разрешение обратно пропорционально величине m/z , а в орбитрапе – корню квадратному величине m/z . Таким образом, благодаря природе электрического поля падение разрешающей способности с увеличением

величины m/z идет значительно медленнее и, начиная с определенного значения m/z , разрешающая способность орбитальных ловушек оказывается выше, чем приборов ИЦР. Например, для высокопольной компактной орбитальной ловушки [426] и 15Т прибора ИЦР ПФ такая точка находится в области m/z 300 [425]. На рис. 6.18 представлены кривые изменения разрешающей способности орбитальных ловушек и приборов ИЦР в зависимости от массы ионов.

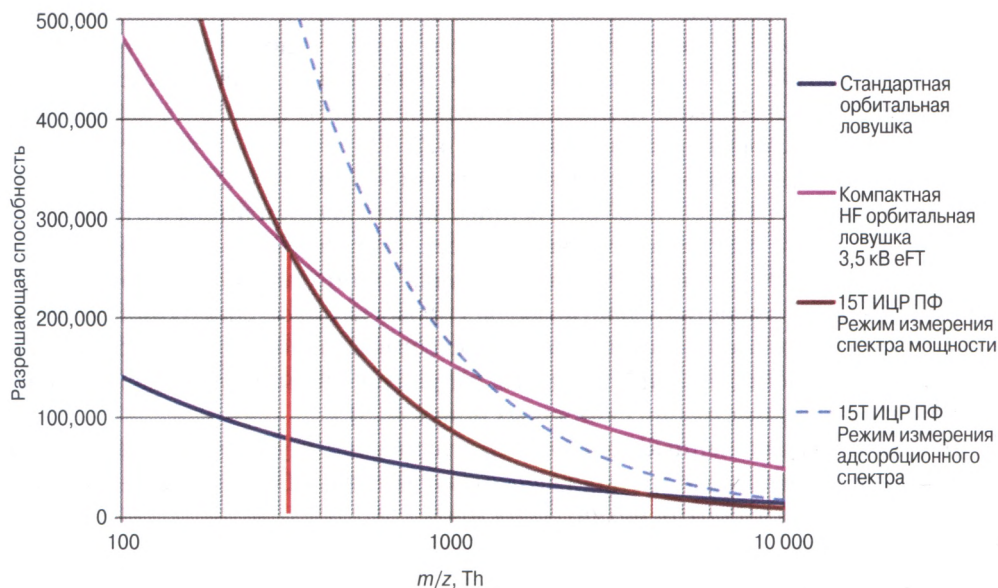


Рис. 6.18. Изменение разрешающей способности приборов ИЦР и орбитальных ловушек в зависимости от массы иона [425]

Для регистрации наведенных токов все ионы с одинаковой величиной m/z должны быть собраны в компактные пакеты. Кроме того, ионы должны вводиться в орбитальную ловушку в импульсном режиме, даже если используются источники ионов непрерывного типа. Для ввода ионов используется дополнительное устройство (С-ловушка, рис. 6.17). Ионы с конкретными величинами m/z инжeksiруются из нее в орбитальную ловушку в виде плотных пакетов через неосевое входное отверстие и начинают когерентные аксиальные осцилляции. Вновь, как и в случае ИЦР, ионы теоретически могут двигаться по своим траекториям в орбитальной ловушке неограниченное время, однако в результате столкновений с остаточными молекулами они рассеиваются в течение нескольких секунд. Тем не менее этого времени оказывается достаточно для разрешения изотопных пакетов молекул с массами в десятки тысяч дальтон. Еще одним фактором, лимитирующим разрешение в ловушке, является объемный заряд. Хотя предложен целый ряд теоретических вариантов проведения фрагментации ионов внутри орбитальной ловушки [424], в коммерческих приборах она используется исключительно для измерения точных масс ионов-предшественников или ионов-продуктов, образовавшихся во внешних устройствах масс-спектрометра.

Разрешающая способность большинства орбитальных ловушек, которые работают сейчас в многочисленных лабораториях по всему миру, составляет порядка 100 000–200 000 при времени детектирования около 1 секунды. Однако недавние усовершенствования, связанные с разработкой компактного высокопольного анализатора [426] и совершенствованием программного обеспечения, например пакета преобразований Фурье [427], ускоряют процесс сбора данных в 3,6 раза и позволяют достигать разрешающей способности более 1 000 000 при времени детектирования 3 секунды. Высокая ионная емкость орбитальных ловушек обуславливает широкий динамический диапазон измерений, достигающий четырех и более порядков [428]. Помимо сверхвысокого разрешения, орбитальные ловушки характеризуются и высокой точностью измерения массы (разд. 6.3), которая при благоприятных условиях достигает 0,2 ppm [422, 428].

Пределы детектирования при использовании орбитапа заслуживают особого упоминания. Они определяются внутренним шумом предусилителя и в настоящее время требуют 2–4 элементарных зарядов за 1 секунду регистрации. Это означает, что для ионов с зарядом 5 и более для детектирования достаточно всего одного иона. Орбитальная ловушка действительно позволяет проводить масс-спектрометрический анализ белков и их межмолекулярных комплексов в нативном виде с молекулярной массой до миллиона дальтон, сверхвысоким разрешением и чувствительностью, достаточной для регистрации единичных ионов [429].

Учитывая великолепные рабочие характеристики и умеренные расходы на содержание, орбитальные ловушки являются сегодня наиболее желанными масс-спектрометрами в лабораториях по всему миру.

6.9. Детектирование ионов¹

Последним звеном получения масс-спектра является процесс детектирования ионов. Токи, создаваемые незначительным количеством ионов с одним значением m/z , слишком малы (10^{-9} – 10^{-17} А) для прямого измерения. Для регистрации таких низких токов применяют два типа детектирующих устройств: ионные коллекторы, подключенные к электрометрическому усилителю, и электронные умножители. Есть еще и индукционные методы детектирования ионов, применяемые в приборах, использующих принципы преобразования Фурье (ИЦР, орбитап). Об этом подробно рассказано в разд. 6.4.

Ионные коллекторы используются в виде так называемого цилиндра Фарадея. В таком довольно простом устройстве положительные ионы, сталкиваясь с металлической поверхностью цилиндра Фарадея, нейтрализуются электронным током, поступающим от заземленного электрода. Между цилиндром Фарадея и землей установлен резистор с очень большим сопротивлением. Падение напряжения на этом резисторе уже достаточно большое для измерения обычными методами с помощью усилителей постоянного тока. Измеренный ток прямо пропорционален количеству ионов и их заряду, попавшему на коллектор. При этом сигнал с коллектора не зависит от массы ионов, их энергии или химической структуры, что является очень важным достоинством коллекторных детекторов. Коллекторный метод детектирования ионов

¹ Раздел подготовлен совместно с В.Б. Артаевым.

довольно прост и надежен. Эти устройства сравнительно недорогие и обеспечивают очень точные, высокочувствительные измерения ионных токов. Но основным недостатком коллекторного метода является наличие большой временной константы измерений из-за наличия высокоомного резистора в измерительной цепи.

Поэтому коллекторные методы используются в таких масс-спектрометрах, где ионные токи меняются очень медленно, например в магнитных секторных масс-спектрометрах. Применяются также и многоколлекторные системы для измерения изотопных отношений с очень высокой точностью, с использованием магнитных секторных масс-спектрометров [430], где коллекторы установлены в точке прибытия ионов определенных изотопов, и детектирование ионов всех интересующих изотопов происходит одновременно (рис. 6.19). Это существенно улучшает точность измерений из-за уменьшения влияния различных дискриминирующих эффектов в источнике и системе ввода пробы.

В масс-спектрометрах с высокой скоростью сканирования (временнóлетные, квадрупольные, ионные ловушки) детектирование ионов с помощью коллекторов с электрометрическими усилителями невозможно из-за большой временной константы. Поэтому в таких приборах применяются детекторы, в основе работы которых лежит принцип вторично-электронного умножителя (ВЭУ). В масс-спектрометрии используются ВЭУ двух типов: с дискретными и непрерывными динодами.

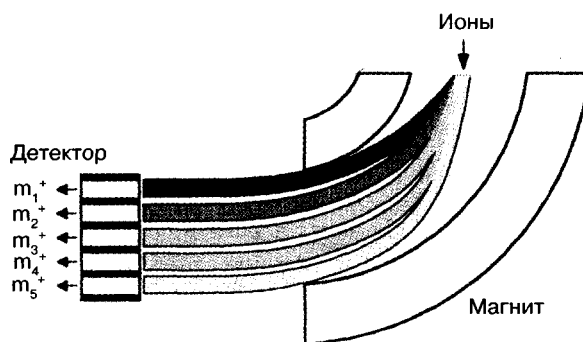


Рис. 6.19. Схема многоколлекторного детектора

ВЭУ с дискретными динодами представляет собой систему металлических динодов, причем потенциал каждого последующего несколько выше, чем предыдущего (рис. 6.20). Ионы, попадая на первый динод (этот динод называют конверсионным, поскольку он служит для преобразования ионов в электроны), выбивают с его поверхности электроны (этот эффект называется ионно-электронной эмиссией). Эти электроны ускоряются под воздействием электрического поля и сталкиваются со следующим динодом с энергией достаточной, чтобы выбить с его поверхности больше чем один электрон (этот эффект называется вторично-электронной эмиссией). Далее новое поколение вторичных электронов ускоряется до столкновения со следующим динодом. Это процесс неоднократно повторяется, и, таким образом, количество электронов возрастает лавинообразно, а на последнем диноде может быть зарегистрирован ток, в миллионы раз превышающий начальный ток ионов, пришедший на вход ВЭУ.

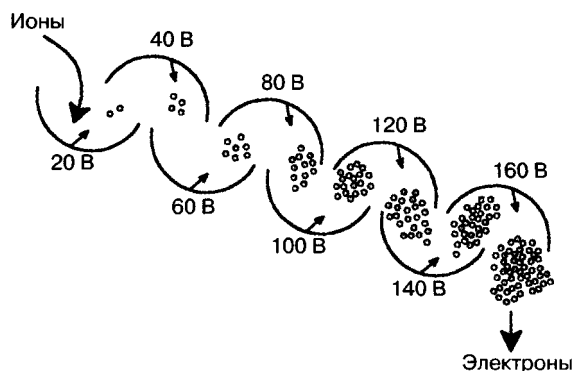


Рис. 6.20. Принципиальная схема вторичного электронного умножителя с дискретными динодами

ВЭУ с дискретными динодами также используют для детектирования ионов во времяпролетных масс-спектрометрах, правда, при этом им нужна особая модификация конверсионного динода и наличие соответствующих электрических, а иногда и магнитных полей для минимизации временного разброса при детектировании ионов, одновременно достигающих детектора.

ВЭУ с непрерывным динодом работают по такому же принципу, что и ВЭУ с дискретными динодами. Отличием является лишь то, что динод изготавливается в виде трубки (канала) из стекла с добавкой свинца. Такой материал, являясь слабопроводящим, может быть использован для создания градиента электрического поля внутри канала, если приложить соответствующие электрические потенциалы к входу и выходу канала. Вылетевшие из анализатора ионы, столкнувшись со стенкой канала, выбивают вторичные электроны, которые, в свою очередь, ускоряются в градиенте электрического поля вдоль оси канала и сталкиваются опять же со стенкой канала, выбивая при этом следующую порцию вторичных электронов и создавая лавинообразный эффект умножения. Трубки в ВЭУ с непрерывным динодом делают искривленными для увеличения количества столкновений электронов со стенками и уменьшения вероятности пролета ионов или электронов без столкновений со стенками, т.е. без умножительного эффекта.

Для уменьшения временного разброса прибытия ионов на детектор (очень важный фактор для времяпролетных масс-спектрометров) применяют микроканальные пластины (МКП), которые являются разновидностью ВЭУ с непрерывным динодом. МКП представляют собой тонкие (~1 мм) стеклянные (с добавкой свинца) пластины, которые пронизаны большим количеством каналов диаметром 2–10 мк и отстоящих друг от друга примерно на таком же расстоянии. Таким образом, общее количество каналов на типичной МКП диаметром 20 мм может достигать миллиона. Каналы расположены под небольшим углом к поверхности пластины (для минимизации разброса прихода ионов), а входная и выходная поверхности металлизированы и к ним приложены соответствующие электрические потенциалы, создающие ускоряющий градиент для вторичных электронов внутри каналов вдоль их оси. Одна МКП может обеспечить усиление сигнала в 100–10 000 раз. Для увеличения коэффициента усиления ставят две и даже три МКП подряд, достигая при

этом усиления 10^6 – 10^9 . Очень важно правильно согласовать ориентацию каналов. Например, при использовании двух МКП каналы пластин ориентируют как латинская буква V (так называемая шевронная сборка). МКП широко используются во времяпролетных масс-спектрометрах, обеспечивая при этом ширину импульсного пика от одиночного иона (на 50% высоты) до 0,5 нс и даже меньше.

ВЭУ с дискретными и непрерывными динодами широко применяются в современных масс-спектрометрах благодаря малой временной константе (детекторы быстро реагируют на изменения сигнала при быстром сканировании масс-спектра) и высокой чувствительности (коэффициент умножения от 10^5 до 10^7). Их недостатком можно считать ограниченный срок жизни (1–2 года), который зависит от применения ВЭУ и состояния вакуума системы, воздействующей на конвертирующую поверхность динодов. Следует также отметить чувствительность к уровню вакуума и фона в районе расположения детектора и относительно высокую стоимость. ВЭУ также обладают ограниченным динамическим диапазоном из-за эффектов объемного заряда, который при высоких входных сигналах ограничивает прохождение тока на последних динодах.

Для уменьшения влияния внешних факторов (вакуум, фон) и увеличения динамического диапазона используют гибридные схемы детекторов. В таких схемах задействованы разные типы детектирования, соединенные в одном устройстве для того, чтобы с максимальным преимуществом использовать их достоинства. Так, например, к гибридным относят схему с одиночной МКП (для преобразования ионов в электроны с минимальным временным разбросом и с небольшим коэффициентом усиления), за которой установлен сцинтиллятор (для преобразования электронов в фотоны) и далее фотоэлектронный умножитель (ФЭУ). Принцип действия ФЭУ аналогичен ВЭУ, с той лишь разницей, что конверсионный динод специально сделан для эффективного преобразования фотонов в электроны. Обладая таким же коэффициентом усиления, как и ВЭУ, ФЭУ имеет срок службы несколько лет, так как фотоны, в отличие от ионов и электронов, проходят сквозь стеклянное окно, т.е. умножитель может функционировать в герметичном корпусе в условиях глубокого вакуума и не подвергаться внешним воздействиям.

По похожей, но более простой схеме работает другой гибридный детектор – детектор Дали (рис. 6.21). В такой схеме ионы бомбардируют поверхность металлического динода, затем образующиеся вторичные электроны ускоряются и бомбардируют сцинтиллятор, а образованные в сцинтилляторе фотоны регистрируются ФЭУ.

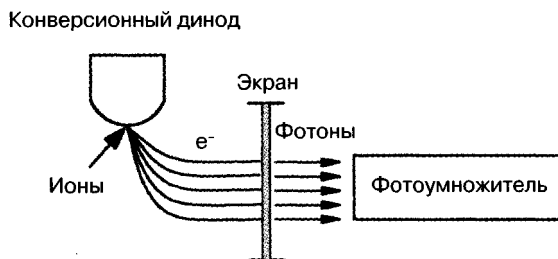


Рис. 6.21. Принципиальная схема детектора Дали

Одной из отрицательных характеристик ВЭУ является зависимость сигнала от энергии ионов, их массы и химической структуры. Для уменьшения этих эффектов ионы могут быть доускорены, перед тем как произойдет их первое столкновение с поверхностью детектора. Это существенно улучшает эффективность детектирования легких и средних по массе (до нескольких десятков кДа) ионов. Для детектирования более тяжелых ионов (сотни кДа и больше) предложены более сложные и дорогие системы, заимствованные из арсенала физики высоких энергий, где происходит преобразование кинетической энергии ионов в возбуждение низкоэнергетических уровней атомной структуры твердого тела детектора. Детекторы такого типа работают при очень низких температурах и называются криогенными.

ГЛАВА 7

ТАНДЕМНАЯ МАСС–СПЕКТРОМЕТРИЯ, МС/МС

Сорокалетняя история tandemной масс-спектрометрии свидетельствует о возрастающем значении этого метода и связанных с ним комплексных методов (ГХ/МС/МС, ЖХ/МС/МС, спектрометрия ионной подвижности/МС) в научных исследованиях. Эффективные структурные исследования сложных молекул (пептиды, белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты) не могут быть реализованы без tandemной масс-спектрометрии (гл. 11). Преимущества метода для анализа смесей, структурных исследований, фундаментальной науки, для устранения проблем, связанных с искажением спектра за счет термических и ионно-молекулярных процессов, а также наличием примесей в образце, очевидны. Фактически только высокая стоимость приборов препятствует повсеместному переходу от обычной к tandemной масс-спектрометрии.

Одним из недостатков прямого ввода образца в источник является искажение спектра вещества за счет примесей, присутствующих в образце. Возникают лишние пики. Они могут быть весьма интенсивными, особенно если летучесть примеси больше, чем летучесть основного компонента. Недостатками хроматомасс-спектрометрии являются длительное время анализа и невозможность прохождения через колонку некоторых компонентов. Мягкие методы ионизации (ХИ, ПИ, МАЛДИ, ИЭР) характеризуются интенсивными пиками молекулярных ионов, однако отсутствие фрагментации затрудняет установление структуры соединений. Одним из вариантов решения всех этих проблем стало использование tandemной масс-спектрометрии (МС/МС или МСⁿ). В настоящее время эта техника применяется со всеми описанными выше анализаторами и используется для анализа самых разных классов соединений. Tandemной масс-спектрометрии посвящено большое количество обзоров и монографий [7, 431–434].

Современный масс-спектрометр может работать по алгоритму классической химической аналитической лаборато-

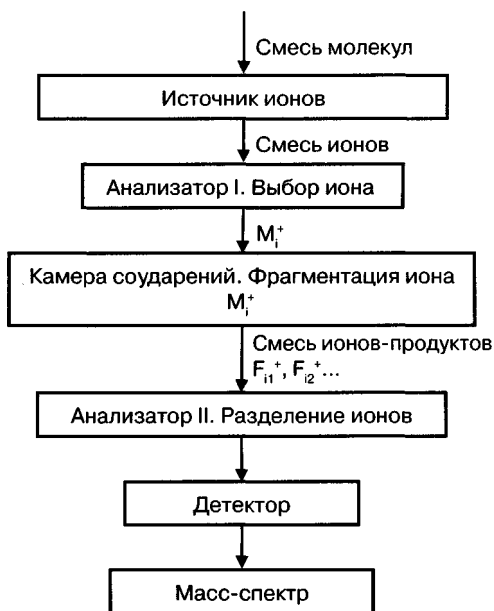


Рис. 7.1. Принципиальная схема метода tandemной масс-спектрометрии

рии, когда смесь химических соединений сначала разделяется на компоненты, а затем устанавливаются структуры этих компонентов (рис. 7.1). Смесь ионизируется мягким методом. Образовавшиеся молекулярные ионы по очереди проходят через первый анализатор. В бесполом пространстве их внутреннюю энергию повышают определенным образом, вызывая фрагментацию. Вторым анализатором, регистрируя образовавшиеся фрагментные ионы, позволяет получить масс-спектр индивидуального соединения. Практически все стадии этой процедуры очевидны. Исключение составляет инициирование процесса фрагментации.

7.1. Активация ионов

Тот факт, что не все ионы, покинувшие источник, достигают детектора, известен давно. Речь не идет о неизбежной гибели части ионов на стенках прибора по пути следования. Дело в том, что внутренняя энергия некоторых ионов оказывается недостаточной для того, чтобы распасться в источнике, но достаточной, чтобы начать фрагментировать во время движения от источника к детектору. Такие ионы называются **метастабильными**. Они были подробно рассмотрены в разд. 2.3. Кроме того, внутренняя энергия иона может увеличиться в результате столкновения с атомами атмосферных газов, обуславливающих остаточное давление в приборе, или с металлическими поверхностями. Пики таких ионов были зарегистрированы Астоном еще в 1919 году [435]. Долгое время эти пики рассматривались исключительно как помеха. Они искажали реальный спектр и ухудшали разрешение. Именно поэтому столь большое значение придавалось поддержанию высокого вакуума в масс-спектрометре. Первые спектры активации соударением были зарегистрированы случайно при попадании воздуха в прибор в 1968 году [436, 437]. Лишь в 1973 году Мак-Лафферти [438] было показано, что пики метастабильных ионов, а также пики, обусловленные ионами, образовавшимися вне источника ионов в результате активации их предшественников соударением, могут успешно использоваться для проведения структурных исследований, а активация соударением может рассматриваться как самостоятельный и весьма эффективный масс-спектрометрический подход.

Первой задачей тандемной масс-спектрометрии является изолирование иона-предшественника нужной массы. Она легко решается с помощью любого анализатора. На следующем этапе требуется осуществление повышения внутренней энергии выбранных ионов. Для этой цели используется широкий круг разнообразных техник.

7.1.1. Активация соударением или диссоциация, индуцированная (активированная) столкновениями

Активация соударением, диссоциация, активированная соударением (ДАС), или диссоциация, индуцированная соударением (ДИС) – Collisional activation (CA), collision-induced dissociation (CID), впервые целенаправленно осуществленная на секторных магнитных приборах, основана на том, что разогнанные ускоряющим напряжением ионы имеют высокую кинетическую энергию (6–8 кэВ). В результате их столкновений с атомами (молекулами) инертного газа в специальной камере соударений, помещенной во избежание потерь в фокальной плоскости в беспо-

левом пространстве, небольшая часть кинетической энергии ионов переходит во внутреннюю. Время столкновения длится всего 10^{-14} – 10^{-16} секунды. Приобретенной ионом внутренней энергии может быть достаточно для его фрагментации по одному или нескольким направлениям, причем в большинстве случаев считается, что сообщенная соударением энергия успевает равномерно распределиться по всем степеням свободы иона (КРТ, гл. 2). Масс-спектр ДИС — это результат конкуренции между статистически возможными направлениями фрагментации иона-предшественника. Такой спектр может быть теоретически рассчитан с использованием КРТ или РРKM, аналогично спектру ионизации электронами. При этом неважно, каким образом ион приобрел эту энергию. Важно ее количество и его структура.

Число возможных процессов, инициируемых соударениями, весьма велико. На схеме 7.1 представлено несколько наиболее вероятных из них.

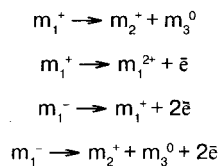


Схема 7.1

Все эти процессы, а также ряд других действительно протекают в камере соударений. Вероятность того или иного процесса зависит от многих параметров, включая кинетическую энергию ионов m_1^+ , природу газа и давление в камере, сечение реакции. Наиболее распространенной является первая из представленных реакций. Ее сечение значительно выше, чем сечение других процессов.

В подавляющем большинстве работ использованы ионы с высокой энергией (6–8 кэВ) на секторных приборах или с низкой энергией (10–100 эВ) на квадрупольных приборах, разнообразных ловушках. Значительно реже используются ионы с промежуточными величинами энергий.

Необходимо понимать, что, когда говорят об энергии соударений, например, 5 кэВ, использованной в лабораторном эксперименте, речь идет о том, что ионы-предшественники перед столкновением ускоряются разностью потенциалов 5 кВ. Уравнение (7.1) связывает величину реальной энергии соударения иона и атома инертного газа (в системе координат центра масс сталкивающихся частиц) с известной лабораторной энергией:

$$E_{\text{соуд}} = E_{\text{лаб}} \frac{M_{\text{газ}}}{M_{\text{ион}} + M_{\text{газ}}}, \quad (7.1)$$

где $E_{\text{соуд}}$ — энергия соударения в системе координат центра масс сталкивающихся частиц, $E_{\text{лаб}}$ — лабораторная энергия поступательного движения иона перед соударением, $M_{\text{газ}}$ — молекулярная масса газа, используемого в камере соударений, $M_{\text{ион}}$ — масса иона.

Как видно из уравнения, реальная энергия соударения будет всегда меньше, чем лабораторная. Еще один важный вывод, который можно сделать из уравнения (7.1), связан с тем, что результат соударения зависит от массы иона и газа для соударений.

Например, если мы изучаем фрагментацию молекулярного иона метанола (m/z 32), разгоняя его разностью потенциалов 4,5 кВ, с использованием камеры соударений, заполненной гелием, энергия соударения ($E_{\text{соуд}}$) составит 500 эВ. Если в этих же условиях изучать фрагментацию пептида с молекулярной массой 2000, $E_{\text{соуд}}$ будет лишь 2,25 эВ, что, безусловно, крайне мало для инициирования фрагментации.

Лишь часть $E_{\text{соуд}}$ может трансформироваться во внутреннюю энергию в результате соударений. Например, в случае небольших пептидов эта величина составляет всего 3–8% [439]. Спектры одного и того же предшественника с разными энергиями могут существенно отличаться. Как и в случае уменьшения энергии ионизирующих электронов (разд. 2.1), уменьшение энергии предшественника в экспериментах МС/МС приводит к тому, что ряд возможных направлений фрагментации не реализуется. Доминируют же в спектре пики, обусловленные наиболее энергетически выгодными процессами. Таким образом, спектры высоких и низких энергий могут дополнять друг друга при выполнении структурных исследований.

Следует отметить, что эффективность соударений в разных масс-спектрометрах может существенно различаться. Например, в случае системы трех квадруполей с $E_{\text{лаб}} < 100$ эВ она оказывается значительно выше, чем это можно было ожидать, исходя из уравнения (7.1). Это связано с высокой фокусирующей способностью квадруполя, работающего в радиочастотном режиме, по сравнению с камерой соударений в секторных приборах, а также большей длиной квадруполя, приводящей не только к единичным, но и к многократным столкновениям.

Природа газа для соударений также существенно влияет на процесс фрагментации (уравнение (7.1)). Использование более тяжелого газа приводит к увеличению эффективной энергии столкновений, т.е. чем тяжелее газ, тем большую структурную информацию можно получить [440]. Это особенно важно для квадрупольных приборов и при исследовании органических молекул с массой более 1000 дальтон.

Хотя выше шла речь о полном перераспределении приобретенной внутренней энергии по всем степеням свободы иона, можно изучать вклад конкретных состояний на процессы ДИС, например, генерируя ионы в соответствующих колебательных состояниях. Возбуждая конкретные колебания, можно способствовать или препятствовать определенным направлениям фрагментации [441].

Спектры ДИС могут быть полезными для получения газофазных термодинамических характеристик [442], например, достаточно точного определения величин сродства к протону, к гидрид-иону и газофазной кислотности методом конкурентных реакций (разд. 2.3), когда проводят эксперимент с активацией соударением выбранного димерного иона [137]. Помимо определения основности (схема 2.3), при работе с отрицательными ионами можно исследовать кислотность соединений (схема 7.2). Важно лишь не допускать протекания вторичных процессов фрагментации. Тогда относительные интенсивности первичных фрагментных ионов будут отражать относительные величины сродства к протону соответствующих оснований. Метод очень чувствителен, но все же уступает варианту с более «холодными» метастабильными ионами (разд. 2.3).

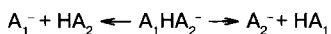


Схема 7.2

В ионных ловушках и приборах ИЦР для инициирования диссоциации используются многократные столкновения с очень низкими энергиями. Процесс повышения энергии иона в этом случае можно сравнить с его медленным нагреванием, приводящим в итоге к фрагментации. Такой режим дает обратную картину, когда в одинаковых условиях более тяжелые ионы (пептиды, полимеры) фрагментируют более эффективно, чем их аналоги с меньшей массой. Это свидетельствует о большей эффективности перехода энергии движения во внутреннюю для таких ионов [443, 444].

Значительное влияние на процессы активации соударением оказывает давление в камере. Обычно используется давление около 10^{-2} мм рт.ст., но возможны любые другие значения в зависимости от задачи эксперимента. Понятно, что увеличение давления ведет к увеличению доли фрагментных ионов в результате увеличения вероятности хотя бы одного столкновения иона-предшественника с молекулой (атомом) газа. Кроме того, увеличивается вероятность двух и более столкновений. Классическая камера соударений в секторных приборах имеет длину около 1 см, причем выходными отверстиями для газа служат отверстия для входа и выхода ионов. Такая конструкция, хотя и решает основную задачу, делает область соударений размытой и затрудняет однозначное определение параметров столкновений. В двух модификациях [445, 446] использован поток инертного газа в перпендикулярном направлении к пути следования ионов. Такой подход привел к улучшению результатов эксперимента.

Различия в природе соударений (упругие и неупругие), время соударения и многие другие важные физико-химические аспекты ДИС представлены в обзоре [434]. В 2007 году вышла в свет книга о ДИС [432]. Некоторые аспекты теории и практики ДИС в приложении к пептидам и белкам изложены в книге [5].

В отличие от спектров метастабильных ионов (разд. 2.3), когда незначительная избыточная внутренняя энергия приводит к реализации лишь наиболее энергетически выгодных процессов фрагментации, в спектрах ДИС энергия ионов выше, а следовательно, задействовано большее число направлений распада, и спектры ДИС оказываются богаче. Их можно использовать в качестве отпечатков пальцев для сравнения идентичности ионов. Сходство спектров ДИС двух ионов-предшественников с хорошей вероятностью означает идентичность структур этих ионов [447].

В 2006 году на орбитальных ловушках фирмы «Термо» появилась опция ДАС при повышенной энергии (ДАСПЭ, higher-energy C-trap dissociation, HCD) с использованием С-ловушки или дополнительной октапольной камеры соударений, заполненной инертным газом (давление ~ 5 мбар). Энергия, передаваемая иону, в этом случае зависит от его массы и заряда, а также от природы газа для соударений. Этот вариант инициирования фрагментации позволил одновременно решить две задачи [448]. Во-первых, была решена проблема потери информации в области низких масс, характерная для ионных ловушек (разд. 7.2.3). Во-вторых, увеличивается степень фрагментации и количество регистрируемых ионов-продуктов, что важно для целей структурного анализа. Кроме того, спектры ДАС и ДАСПЭ являются комплементарными и могут успешно дополнять друг друга.

7.1.2. Диссоциация, индуцированная столкновением с поверхностью

Хотя метод диссоциации, индуцированной столкновением с поверхностью (ДИП) – Surface-induced dissociation (SID) – существенно отличается (и в теории, и инструментально) от ДАС, процессы фрагментации в этом случае весьма похожи, а в целом его можно условно рассматривать как столкновение разогнанного иона-предшественника с очень «тяжелым» атомом. Это не масса бесконечной величины, а скорее, кажущаяся масса, обусловленная концевыми группами поверхности [449]. Преимуществами метода являются отсутствие дифференцированной откачки газа и инструментальных сложностей, связанных с использованием активации фотонами или электронами. Помимо этого, при работе с большими молекулами увеличения внутренней энергии в результате одного соударения с атомом инертного газа недостаточно для инициирования фрагментации, поскольку приращение энергии невелико (формула (7.1)), а кинетические сдвиги, наоборот, значительны. Для запуска фрагментации необходимы многочисленные соударения с передачей иону-предшественнику значительной энергии, которая перераспределяется далее по всем степеням свободы.

Поэтому метод инициирования фрагментации за счет перехода кинетической энергии разогнанных ионов во внутреннюю при соударении с поверхностью оказался весьма привлекательным. Метод диссоциации ионов при их столкновении с поверхностью предложен Грэмом Куксом еще в 1975 году [450]. Процесс достаточно прост. Разогнанные ионы направляются под определенным углом на твердую поверхность, при столкновении с которой контролируемая часть кинетической энергии ионов переходит во внутреннюю, иницируя фрагментацию (рис. 7.2). В этих условиях, например для небольших молекул, во внутреннюю переходит значительная доля кинетической энергии: от 12 до 35% [451]. Переход кинетической энергии во внутреннюю происходит за несколько пикосекунд. Поскольку использование ДИП на масс-спектрометрах ИЦР ПФ характеризуется временем реакции распада в диапазоне от миллисекунд до секунд, существует возможность изучать наиболее низкоэнергетические каналы диссоциации больших молекул.

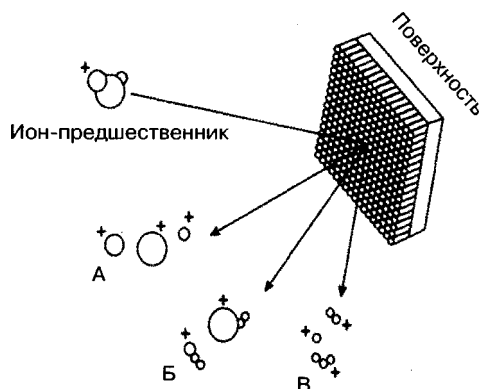


Рис. 7.2. Схема трех основных процессов, протекающих при низкоэнергетических столкновениях разогнанных ионов с поверхностью: А – фрагментация ионов; Б – реакции разогнанных ионов с материалом поверхности; В – ионы материала поверхности, образующиеся в результате перезарядки

Масс-спектрометрический анализ отраженных поверхностью частиц позволяет зарегистрировать фрагментные ионы и провести структурный анализ иона-предшественника. Поверхность может быть металлической, кремниевой, графитированной, алмазной или самоорганизованной монослойной со специально подобранными соединениями, например перфторированными углеводородами или алкилтиольными группами, пришитыми к атомам золота, и т.д. Важно, что в зависимости от задач эксперимента поверхность можно модифицировать соответствующим образом. Побочные реакции нейтрализации, десорбции разнообразных частиц с поверхности, взаимодействия с молекулами поверхности (рис. 7.2) могут также протекать в условиях эксперимента. На тип и энергетику процессов влияют природа ионов и материала поверхности, энергия ионов и угол падения ионного пучка. Все эти параметры довольно легко контролируются, что позволяет получать прирост внутренней энергии ионов-предшественников в узком диапазоне и контролировать протекание нежелательных побочных реакций [452]. При соударении с поверхностью внутренняя энергия органических молекул имеет Больцмановское распределение, причем средняя энергия увеличивается практически линейно с увеличением энергии соударений [453, 454]. Поскольку в ДАС эта функция нелинейна, различия в результатах ДАС и ДИП увеличиваются с ростом энергии соударений (рис. 7.3).

Важной особенностью ДИП является крайне короткое время взаимодействия иона с поверхностью. Это обуславливает протекание ряда реакций без статистического перераспределения энергии по всем степеням свободы иона (неэргодический процесс). Такие реакции получили название «разрушительные» (shattering). Показано [455], что доля таких реакций может быть очень высока. Например, при столкновении протонированного глицина с алмазной поверхностью 55% направлений фрагментации имеют разрушительный характер, тогда как в условиях ДАС с аргоном их доля ничтожна. Аналогичные результаты получены Дж. Ласкин при изучении ДИП пептидов на самоорганизованных поверхностях [456, 457]. Эффект жесткости поверхности изучался в работе [458]. Диссоциация $\text{Cr}(\text{CO})_6^+$ протекала статистически при столкновении иона с мягкой самоорганизованной поверхностью и по механизму разрушения при столкновении с алмазной поверхностью.

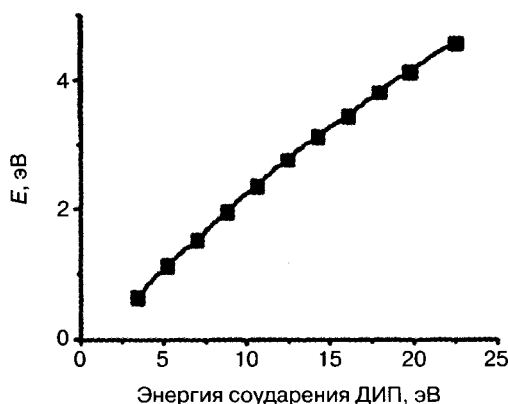


Рис. 7.3. Зависимость внутренней энергии иона от энергии соударения с поверхностью [454]

Изучению кинетики и энергетики ДИП для небольших пептидов посвящен целый ряд работ Дж. Ласкин [454, 459, 460], а также несколько глав сборника [6]. Подробнее о теории и практике метода ДИП можно также прочитать в обзорах [130, 461–463].

7.1.3. Другие методы инициирования фрагментации

Хотя при работе с органическими соединениями индуцирование фрагментации ионов соударениями по-прежнему является наиболее востребованным, в последние годы возникло несколько весьма эффективных методов, которые нашли широкое применение прежде всего в экспериментах с биомолекулами [5, 6].

7.1.3.1. Диссоциация, активированная электронами

Весьма эффективными оказались методы инициирования фрагментации с использованием электронов. Среди группы этих подходов стоит особо выделить фрагментацию мультизарядных ионов в результате захвата [464] или переноса электрона [465]. В первом случае (диссоциация при захвате электрона, ДЗЭ) речь идет именно о захвате низкоэнергетического электрона (< 1 эВ) полипротонированной молекулой. Рекомбинация электрона и положительного заряда приводит к возникновению катион-радикала с меньшим зарядом (схема 7.3):

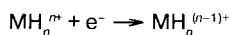


Схема 7.3

Катион-радикал получает прирост внутренней энергии за счет энергии рекомбинации. Кроме того, будучи нечетноэлектронными частицами, катион-радикалы обладают меньшей стабильностью и легко фрагментируют по механизму инициирования распада радикальным центром (гл. 3). В результате активируются новые направления фрагментации, которые остаются нереализованными при использовании методов соударения, а спектры ДЗЭ оказываются комплементарны спектрам ДИС. В качестве примера можно привести масс-спектры ДАС и ДЗЭ природного пептида лягушек эскулентина-2Ra GILSLVKGAALLGKGLAKEG-GKVGLEFIACKVTNQC—ОН с 37 аминокислотами в цепи и внутримолекулярной С-концевой дисульфидной связью, образованной боковыми цепями двух цистеиновых остатков. В его спектре ДАС присутствуют разрывы 17 пептидных связей, что позволяет установить 45,9% всей последовательности. Столько же связей (17) разрывается и в условиях ДЗЭ. Однако это другие связи. Комбинируя комплементарные спектры ДАС и ДЗЭ, можно получить информацию практически о полной первичной структуре пептида [466]. Недостатком метода является его использование исключительно на масс-спектрометрах ионного циклотронного резонанса.

В варианте диссоциации при переносе электрона (ДПЭ) процесс начинается с переноса электрона в результате ионно-ионной реакции от аниона (например, антрацена) к катиону (схема 7.4). В результате вновь образуется катион-радикал с повышенной внутренней энергией. Спектры ДПЭ очень похожи на спектры ДЗЭ, но не идентичны им.

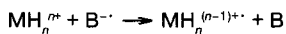


Схема 7.4

Поскольку и в ДЗЭ, и в ДПЭ заряд катиона уменьшается на единицу, однозарядные ионы-предшественники становятся нейтральными частицами и не регистрируются масс-спектрометрами. Классические же органические соединения с молекулярными массами до 500–600 дальтон крайне редко образуют многозарядные ионы. Поэтому детальное описание этих методов в данном пособии отсутствует. Теоретические аспекты и приложение ДЗЭ и ДПЭ для пептидов и белков подробно изложены в пособии [5].

Процессы взаимодействия ионов с электронами могут проходить также по другим механизмам. Например, взаимодействуя с высокоэнергетическими электронами (> 10 эВ), монопротонированная молекула теряет собственный электрон с образованием нечетноэлектронного катион-радикала [467, 468], который фрагментирует по механизму, подобному УФ-фотодиссоциации или классической электронной ионизации [469], что объясняется возбуждением как электронных, так и колебательных уровней молекулы [470]. Метод назван **диссоциацией при ионизации электронами** (ДИЭ, Electron Ionization Dissociation, EID). Поскольку этот метод может быть эффективно использован для индуцирования фрагментации однозарядных ионов, он особо полезен при работе на приборах МАЛДИ, когда генерируются в основном именно однозарядные ионы.

Фрагментация может быть инициирована электронами и без потери собственного электрона ионом-предшественником. Метод назван **диссоциацией, индуцированной электронами** [471]. Обратите внимание, что метод имеет идентичную аббревиатуру (ДИЭ), что и описанный выше метод диссоциации при ионизации электронами. Это же наблюдается и в англоязычной литературе (EID, Electron Induced Dissociation). Взаимодействующие электроны переводят ионы на возбужденные электронные, колебательные, вращательные состояния. Хотя ион и не теряет дополнительный электрон, он может фрагментировать из этих возбужденных состояний. Регистрируемый спектр, хотя и напоминает спектр ДАС, несколько отличается от него, что позволяет получать дополнительную информацию.

Этот метод можно с успехом использовать и для работы с отрицательными ионами [472, 473], причем в процессе активации могут образовываться как четноэлектронные, так и нечетноэлектронные ионы. В обоих случаях масс-спектры предоставляют дополнительную структурную информацию.

7.1.3.2. Фотодиссоциация (Photodissociation)

Фотоны — удобные частицы для повышения внутренней энергии иона и инициирования его фрагментации [474]. Преимуществами фотодиссоциации над активацией соударением являются простота варьирования энергии фотонов при использовании источников с разной длиной волны и полная передача энергии фотона иону. В отличие от активации соударением оптические методы позволяют также генерировать ионы в значительно более узком диапазоне внутренних энергий. Это дает возможность, по крайней мере теоретически, задействовать селективные направления фрагментации. Кроме того, можно использовать двухфотонное и мультифотонное взаимодействие.

Следует учитывать, что сечения реакций взаимодействия ионов с фотонами на 2–4 порядка ниже, чем при столкновениях ионов с молекулами газа. Поэтому для эффективного применения этого метода необходимо либо использовать мощные потоки излучения (лазеры), либо увеличивать время взаимодействия (масс-спектрометрия с преобразованиями Фурье, ионная ловушка). В случае квадрупольных или магнитных приборов техническое обеспечение взаимодействия ионов с фотонами приводит к определенным инструментальным сложностям.

Для фотоактивации используются длины волн в диапазоне от инфракрасного до ультрафиолетового излучения. **Инфракрасная мультифотонная диссоциация** (ИКМФД, Infra Red Multi Photon Dissociation, IRMPD) осуществляется за счет поглощения ионами ИК-излучения с энергией фотонов порядка 0,1 эВ [475]. Ионы, удерживаемые в ионной ловушке или ячейке прибора ионного циклотронного резонанса, активируются постоянным излучением маломощного (< 100 Вт) CO₂-лазера (10,6 мкм) в течение выбранного времени (обычно десятки–сотни миллисекунд) [476]. Поскольку для инициирования фрагментации в этом случае необходимо несколько десятков таких фотонов, метод называется инфракрасной мультифотонной диссоциацией. С поглощением каждого нового фотона происходит медленное увеличение внутренней энергии иона. Такой вариант возбуждения в чем-то аналогичен медленному нагреванию иона в низкоэнергетической ДАС [477]. Важным преимуществом метода ИКМФД является отсутствие эффекта «срезания» области низких масс при работе с ионными ловушками [476], что наблюдается при работе в режиме ДАС (разд. 7.2.3).

Усиление фрагментации по сравнению с классическими вариантами ИКМФД и ДАС наблюдается при использовании комбинированного метода **инфракрасной активации с активацией соударением** (CIRCA – Combination of Infrared and Collisional Activation). Например, в случае пептидов отмечается увеличение числа разрывов связей с одновременным повышением качества спектра [478, 479].

Еще одним методом активации фрагментации в ячейке прибора ионного циклотронного резонанса является диссоциация, протекающая в результате **поглощения инфракрасного излучения абсолютно черного тела** (ДИИАЧТ, Blackbody Infrared Radiative Dissociation, BIRD). При нагревании ячейки Пеннинга удерживаемые в ней ионы поглощают инфракрасное излучение ее стенок. Повышение их внутренней энергии приводит к фотодиссоциации, аналогичной ИКМФД. К сожалению, этот метод имеет значительные ограничения: высокая стоимость прибора ИЦР, невозможность нагрева ячейки Пеннинга выше 200 °С, а также длительное время уравновешивания ячейки при требуемой температуре (до нескольких часов). ДИИАЧТ используется для расчетов кинетических параметров диссоциации больших молекул, в том числе белков [480] и олигонуклеотидов [481]. История, основы и приложения метода ДИИАЧТ для анализа различных биомолекул представлены в обзоре [482].

УФ-фотоны значительно более энергетичны. Коммерчески доступные лазеры позволяют работать с фотонами с длиной волны 193 нм (эксимерный лазер ArF) и 157 нм (лазер F₂). Энергии таких фотонов – 6,4 и 7,9 эВ соответственно. Например, диссоциация протонированной молекулы пептида может произойти при захвате всего лишь одного такого фотона. Поэтому в отличие от ИКМФД такой тип возбуждения ближе ДИП, ДЗЭ или ДПЭ. Существует два основных варианта исполь-

зования ультрафиолетового света. Первый заключается в возбуждении конкретного хромофора в составе молекулы, второй – в неселективном возбуждении. Например, для инициирования фрагментации пептидов удобно использовать возбуждение ароматических фрагментов аминокислот фотонами с длиной волны около 266 нм и энергией 4,6 эВ [483, 484]. В качестве примера неселективного возбуждения можно привести метод УФ-фотоактивации диссоциации пептидной цепи [485]. Он был назван **ультрафиолетовой фотодиссоциацией с длиной волны $\lambda = 157$ нм** (УФФД, UV Photodissociation at $\lambda = 157$ nm), поскольку первоначально использовался в ячейке столкновений, в которой вместо соударений с атомами инертного газа применялось УФ-излучение фторного лазера с рабочей длиной волны 157 нм. В большинстве случаев фрагментация при облучении фотонами с длиной волны 157 нм оказывается интенсивнее, чем фотонами с длиной волны 193 нм. Это может объясняться как большей энергией первых, так и возбуждением других орбиталей [486].

Метод ФСИДИЛ – **фемтосекундная ионизация/диссоциация, индуцированная лазером** (Femtosecond Laser-Induced Ionization/Dissociation, fs-LID), позволяет получить нечетноэлектронные ионы при отщеплении электрона из протонированных молекул [487]. Для активации процесса используются ультракороткие лазерные пучки (< 35 фс). Считается, что в этом случае энергия не успевает перераспределиться по всем степеням свободы иона, т.е. протекает неэргодическая диссоциация. Метод перспективен для инициирования фрагментации многозарядных ионов больших молекул, когда ДЗЭ и ДПЭ оказываются неприменимыми или неэффективными.

7.1.4. Последовательная тандемная масс-спектрометрия, МСⁿ

Современные масс-спектрометры позволяют не останавливаться на записи спектра ионов-продуктов, а идти дальше, выбирая среди этих фрагментных ионов новые ионы-предшественники, и записывать спектр ионов третьего поколения. С полученным спектром можно работать точно так же и записать спектры ионов-продуктов последующих поколений. Такой метод МСⁿ позволяет устанавливать структуры самых разных молекул, включая биополимеры. В частности, он является основой протеомики «сверху-вниз» (разд. 11.1.3.2). Именно методом МСⁿ можно решить проблему отсекаания низких масс, работая на ионных ловушках (разд. 7.2.3). Поскольку эти приборы не регистрируют фрагментные ионы с массой менее ~30% от массы иона-предшественника, выбирая ион-продукт первого поколения с массой в два раза меньше, чем у протонированной молекулы, можно получить спектр (МС³), в котором не будет ионов лишь с массами менее 15% от исходного. Эта закрытая область будет уменьшаться в спектрах каждого следующего поколения.

На рис. 7.4а представлен ДИС спектр (МС²) протонированной молекулы природного пептида амфибий (IPFW-NH₂) с молекулярной массой 707,38 Да. В спектре отсутствуют ионы с m/z ниже 200. Спектр ДИС (МС³) первичного фрагментного иона u_3 (m/z 448,23), представленный на рис. 7.4б, позволяет зарегистрировать процессы фрагментации вплоть до m/z 132. Регистрируя ионы 3-го и 4-го поколений, методами последовательной тандемной масс-спектрометрии удалось установить всю последовательность аминокислотных остатков, т.е. расшифровать первичную структуру пептида [488].

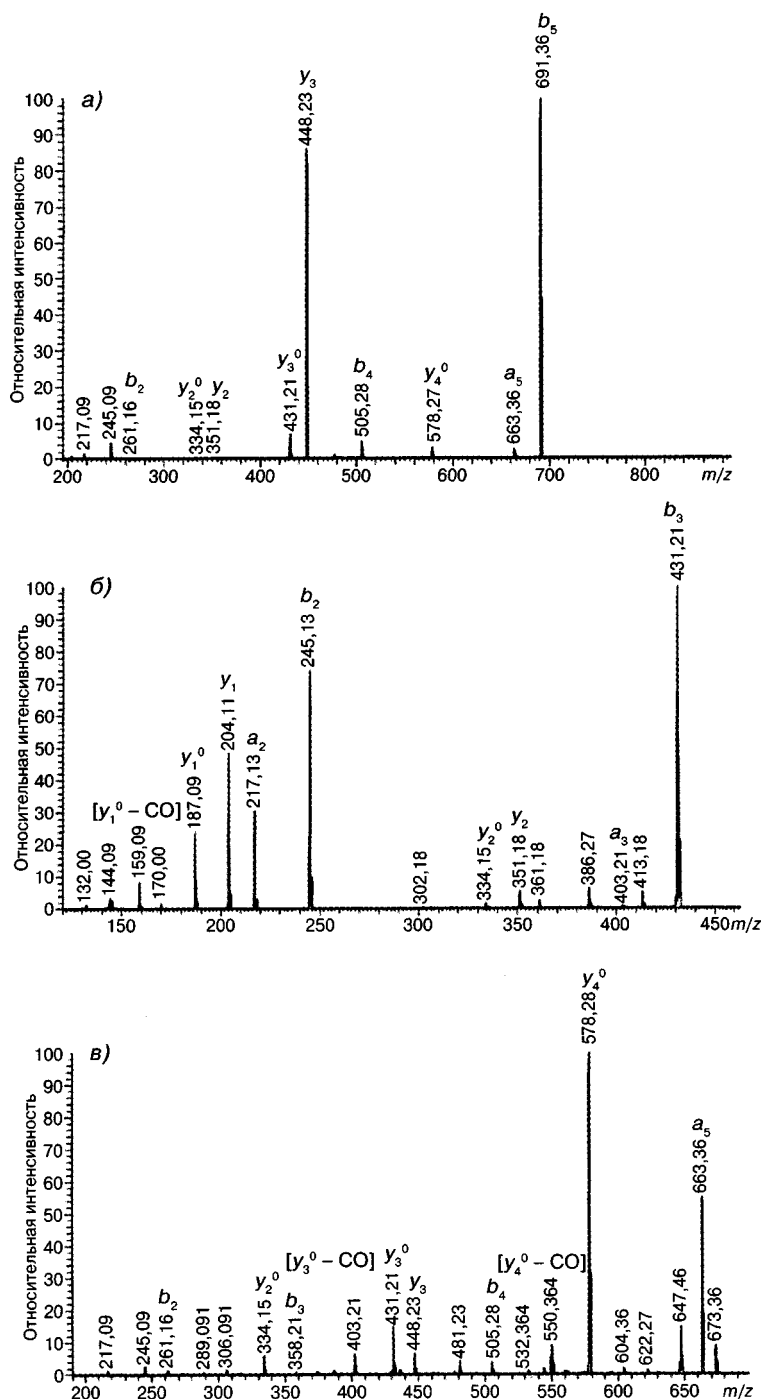


Рис. 7.4. Иллюстрация метода МСⁿ: спектр ДИС (МС²) протонированного пептида IFPFW-NH₂ с молекулярной массой 707,38 Да (a); спектр ДИС (МС³) первичного фрагментного иона y_3 (m/z 448,23) (б); спектр ДИС (МС³) первичного фрагментного иона b_3 (m/z 691) (в)

AxION iQT GC/MS/MS от PerkinElmer

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

НОВЕЙШИЕ ТЕХНОЛОГИИ

- Результаты количественного анализа лучше, чем у традиционных квадрупольных масс-спектрометров

- Установление структуры и уверенная идентификация компонентов **методом QTOF** в сочетании с инновационной технологией Cold EI Source

- **Cold EI (холодная электронная ионизация)** генерирует истинные молекулярные ионы для точной идентификации соединений, особенно тяжелых и разветвленных молекул.

- Измерения масс-спектров со скоростью в 50 раз быстрее, чем на любом другом ГХ/МС на рынке



СХЕМА МАСС-СПЕКТРОМЕТРА AxION iQT



Authorized Distributor


PerkinElmer
For the Better

SchelTec
Total Laboratory

Авторизованный дистрибьютор
ПеркинЭлмер в странах СНГ
www.scheltec.ru

119334, Москва, ул.Косыгина, 19
тел.: (495) 935-88-88
факс: (495) 564-87-87
info@scheltec.ru

При работе в режиме МСⁿ можно проводить последовательные стадии фрагментации, используя не только один и тот же, но и разные методы активации. Последовательность вариантов активации определяется целями эксперимента и возможностями конкретного прибора. В частности, в разд. 11.1.2.1.4 приведен пример эффективного использования последовательности ДПЭ-ДАСПЭ на трибридной орбитальной ловушке Fusion («Термо») для дифференцирования изомерных остатков лейцина и изолейцина при секвенировании пептидов [489].

7.2. Анализаторы ионов в tandemной масс-спектрометрии

Практически все виды анализаторов, описанные в гл. 6, используются для экспериментов tandemной масс-спектрометрии.

7.2.1. Система трех квадруполов

Наиболее наглядно продемонстрировать возможности МС/МС можно на примере прибора с системой трех квадруполов. Принципиальная схема такого масс-спектрометра представлена на рис. 7.5а, а варианты работы на нем — на рис. 7.5б–д. Предположим, что в ионный источник этого прибора посредством прямого ввода ввели смесь нескольких соединений с разными молекулярными массами и ионизировали их каким-либо мягким методом, например электрораспылением. В результате в ионном источнике образуются устойчивые ионы M_1H^+ . Если сканировать напряжение на одном из квадруполов, а другие использовать в режиме пропускания всех ионов, получится классический масс-спектр, в котором присутствуют только пики ионов M_1H^+ .

Настроим первый квадруполь на пропускание ионов с массой M_1H . Все ионы с другими массами погибают на стенках этого квадруполя. Второй квадруполь будем использовать в качестве камеры соударений (разд. 7.1.1). Этот квадруполь настроен на пропускание всех ионов. Прошедшие через первый квадруполь ионы M_1H^+ сталкиваются во втором с молекулами инертного газа и за счет перехода части кинетической энергии приобретают дополнительную внутреннюю энергию. Этой энергии может оказаться достаточно для инициирования процессов фрагментации, в результате которой из второго квадруполя, помимо исходных ионов, выходят и ионы-продукты, образовавшиеся при распаде части исходных ионов M_1H^+ . Обычное сканирование третьего квадруполя позволяет получить спектр первого соединения, точнее спектр его протонированной молекулы, содержащий информацию и о молекулярной массе, и о массе основных структурных фрагментов. Далее через первый квадруполь пропускают протонированные молекулы второго компонента (M_2H^+) и получают на выходе из третьего квадруполя его спектр. Эта процедура повторяется с молекулами каждого соединения смеси. Этот тип спектра (рис. 7.4б) называется спектром ионов-продуктов. В литературе можно встретить также старое название — спектр дочерних ионов.

Теперь рассмотрим аналогичную смесь органических соединений, но несколько видоизменим задачу. Предположим, что среди сотен соединений анализируемой

смеси необходимо определить только фталаты. Наиболее интенсивный пик в спектрах электронной ионизации этих соединений обусловлен ионом с m/z 149. Пусть первый квадруполь работает в обычном режиме сканирования, второй по-прежнему выступает в качестве камеры соударений, а третий пропускает только ионы с m/z 149. Когда соударениям подвергается молекулярный ион соединения, не образующего при фрагментации ион 149, на выходе из третьего квадрупольного сигнала нет. Если же в конкретный момент времени через первый квадруполь проходит M^{+} фталата, в камере соударений образуется ион 149 и на выходе из третьего квадрупольного появляется сигнал. Так можно селективно зарегистрировать массы молекулярных ионов всех фталатов, присутствующих в исходном образце. Этот тип спектра (рис. 7.5б) называется спектром ионов-предшественников (старое название – спектр родительских ионов). Спектры ионов-предшественников очень полезны также при проведении структурных исследований, когда необходимо установить пути образования конкретного фрагментного иона.

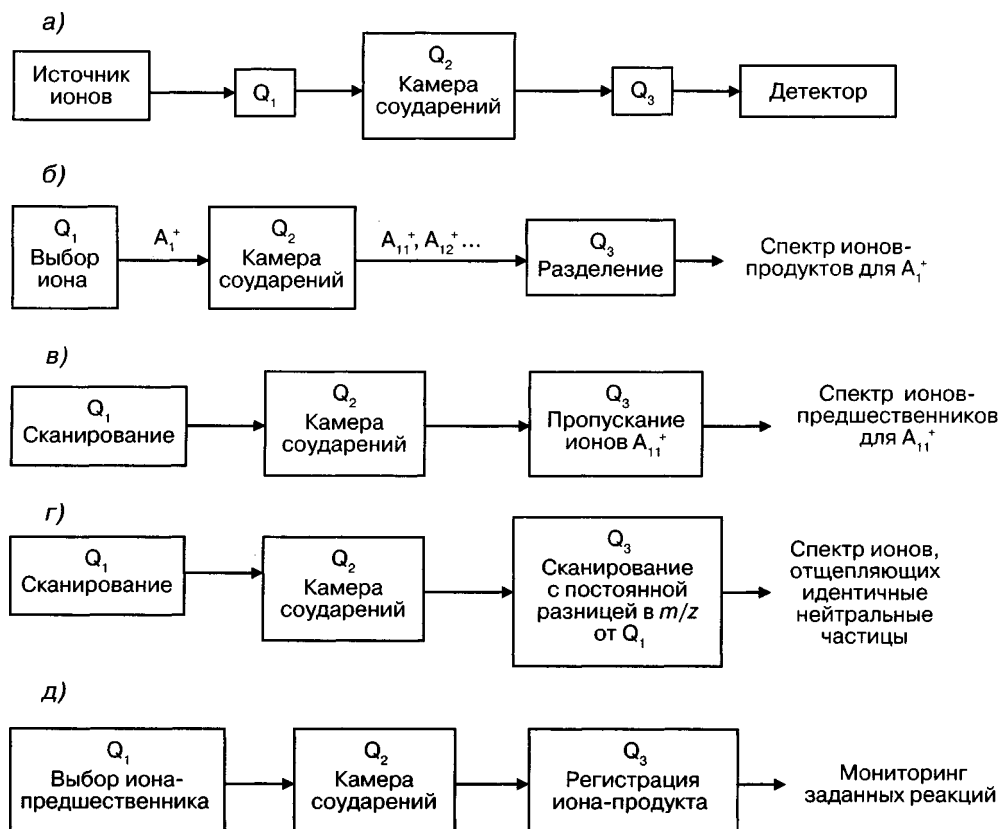


Рис. 7.5. Принципиальная схема тройного квадрупольного масс-спектрометра (а), схема эксперимента для получения спектра ионов-продуктов (б), схема эксперимента для получения спектра ионов-предшественников (в), схема эксперимента для получения спектра ионов, распадающихся с выбросом идентичных нейтральных частиц (г), схема эксперимента для проведения мониторинга заданных реакций (д)

Третий вид спектров (рис. 7.5г) связан с потерями нейтральных частиц с одинаковыми массами. Предположим, необходимо детектировать карбоновые кислоты в смеси органических соединений. Используя химическую ионизацию отрицательных ионов, получают депротонированные молекулы компонентов смеси. Второй квадруполь работает в качестве камеры соударений, а первый и третий действуют в сканирующем режиме, причем в момент, когда первый пропускает ион с массой A , третий пропускает ион с массой $[A-44]$. Сигналы в спектре дадут только те ионы, которые распадаются в камере соударений с выбросом 44 атомных единиц массы. В случае эксперимента с кислотами 44 единицы массы соответствуют потере молекулы CO_2 . Этот процесс характерен для фрагментации анионов карбоновых кислот и маловероятен для других распространенных классов соединений. Спектры ионов, отщепляющих идентичные нейтральные частицы, также используются в структурных исследованиях.

Наконец, четвертый тип связан с детектированием и количественным определением целевых соединений (рис. 7.5д). В этом случае сначала изучается фрагментация такого соединений в условиях МС/МС и выбираются ионы для последующего эксперимента. Как правило, в качестве иона-предшественника выбирают молекулярный ион аналита, а в качестве ионов-продуктов — наиболее интенсивные фрагментные ионы. Для повышения надежности желательно выбрать 2–3 фрагментных иона. Наиболее интенсивный из них используется для количественного определения, а другие — для подтверждения правильности идентификации. В этом варианте первый квадруполь пропускает исключительно ион-предшественник, во втором идет фрагментация, а третий пропускает только заданные ионы-продукты. Информация о других компонентах образца в таком режиме теряется. Метод аналогичен мониторингу заданных ионов (гл. 12), но является более надежным, поскольку позволяет зарегистрировать 2–3 иона, принадлежащие целевому соединению, регистрируя реакцию фрагментации предшественника в продукты. Метод называется **мониторингом выбранных (заданных) реакций** (МЗР). В англоязычной литературе используются два термина: selected reaction monitoring (SRM) и multiple reaction monitoring (MRM). По сути, это один метод. Считается, что в первом случае отслеживается одна реакция, а во втором — несколько. В настоящее время МЗР на тройных квадруполях — наиболее популярный метод количественного определения целевых соединений (разд. 12.3).

Безусловно, наиболее распространенным вариантом является запись спектра ионов-продуктов, поскольку в этом случае речь идет о получении чистого спектра аналита без наложения каких-либо примесей, которые почти неизбежно ухудшают качество обычного масс-спектра. Помимо очевидного анализа смесей, такие спектры широко используются в структурных исследованиях. Дело в том, что совпадение таких спектров для исследуемого иона и иона известной структуры является наиболее убедительным, хотя и не абсолютным доказательством идентичности структур этих ионов.

В XXI веке тройные квадрупольные превратились в наиболее востребованный инструмент для проведения надежной идентификации и количественного определения целевых соединений в сложных образцах. Это объясняется характеристиками прибора (быстрота сканирования, чувствительность, линейный диапазон, пониженные требования к вакууму, высокий коэффициент пропускания ионов).

Следует еще раз подчеркнуть, что ускоряющее напряжение в квадрупольных приборах составляет несколько десятков вольт, т.е. кинетические энергии ионов-предшественников невелики, соударения являются низкоэнергетическими и не все возможные механизмы фрагментации могут быть задействованы.

7.2.2. Магнитные секторные приборы

Для работы в режиме МС/МС на секторном масс-спектрометре необходимо иметь прибор по крайней мере с двумя анализаторами: одним магнитным и одним электростатическим.

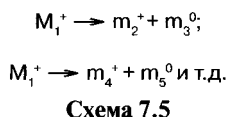
7.2.2.1. Спектр кинетических энергий ионов, проанализированных по массе (MIKES)

Наиболее популярным вариантом тандемных экспериментов на секторных приборах является техника съемки спектров ионов-продуктов **MIKES** — **mass analyzed ion kinetic energy spectrum**, т.е. спектр кинетических энергий иона, проанализированного по массе. Для работы необходим прибор обратной геометрии. Рассмотрим снова случай смеси органических соединений, помещенной в ионный источник и подвергнутой ионизации (рис. 7.6). Магнитный анализатор последовательно настраивается на пропускание молекулярных ионов M_i^+ . Пусть через магнитный анализатор проходят ионы с массой M_1 . При столкновении с атомами газа в камере соударений во втором бесполовом пространстве между магнитным и электростатическим анализатором разогнанные потенциалом в 7–8 кВ ионы M_1^+ теряют небольшую часть своей кинетической энергии за счет ее перехода во внутреннюю. Этот процесс инициирует распад ионов по всем возможным направлениям. Чем выше давление в камере, тем большее число исходных ионов M_i^+ распадается. Обычно давление составляет $\sim 10^{-2}$ мм рт.ст. В этом случае ток пучка выбранных ионов-предшественников уменьшается на 10–20%, а пики фрагментных ионов достаточно интенсивны для получения качественного спектра. Покидая камеру соударений, ионы M_1^+ , а также образовавшиеся фрагментные ионы попадают в электростатический анализатор. Как отмечалось выше, электростатический анализатор является анализатором энергий. При получении обычного масс-спектра напряжение на нем жестко связано с ускоряющим напряжением $V = E_0$. Такой режим позволяет пропускать через анализатор только ионы с кинетической энергией eV . Ионы с меньшей или большей энергией в стандартных условиях через электростатический анализатор не проходят.

Кинетическая энергия ионов M_1^+ , покинувших источник, составляет:

$$eV = (M_1)v_1^2/2. \quad (7.2)$$

В результате соударений идут процессы фрагментации (схема 7.5):



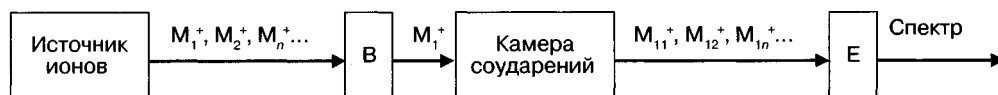


Рис. 7.6. Принципиальная схема работы секторного прибора В-Е в режиме MIKES

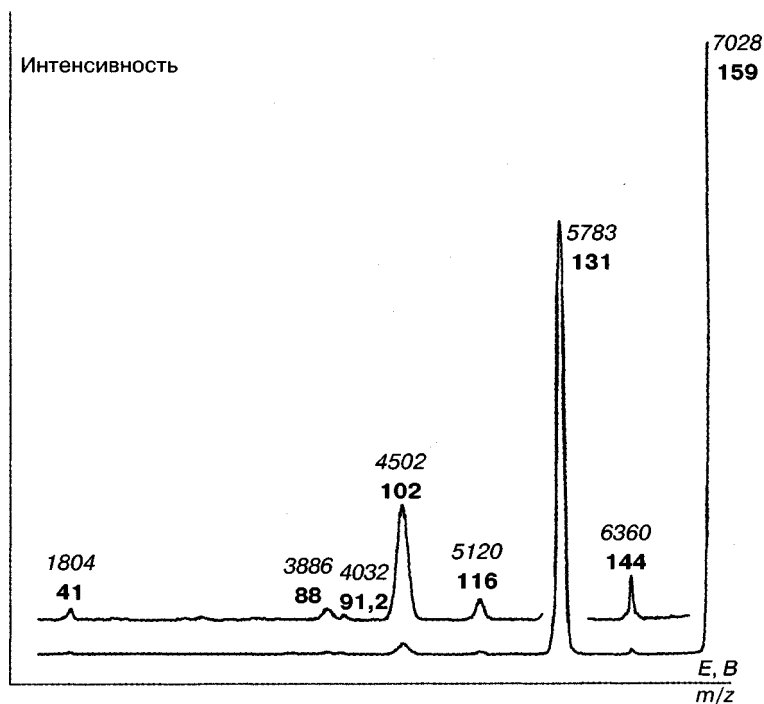


Рис. 7.7. Спектр MIKE депротонированной молекулы α -диазо-*n*-метилацетофенона. Число, выделенное курсивом, означает величину напряженности электростатического поля в вольтах при пропускании данного иона, а число, выделенное жирным шрифтом, означает массу данного иона (точнее, величину m/z). Двухканальный самописец позволяет видеть и наиболее интенсивные, и минорные пики в спектре

Образующиеся фрагментные ионы m_2^+ , m_4^+ и др. в первом приближении движутся в том же направлении и с той же скоростью, что и исходный ион M_1^+ . Кинетическая энергия этих фрагментных ионов будет равна $m_2 v_1^2/2$, $m_4 v_1^2/2$ и т.д. В стандартных условиях съемки эти ионы не пройдут через электростатический анализатор. Поскольку $R = 2V/E_0$, для регистрации этих ионов необходимо, чтобы напряжение на этом анализаторе было адекватно их кинетической энергии. Поэтому напряжение на анализаторе сканируется от исходного значения E_0 , равного ускоряющему напряжению V , до нуля. Когда напряжение уменьшается до величины $m_2 E_0/(M_1)$, через анализатор пройдут ионы m_2^+ , образовавшиеся в камере соударений. При напряжении $m_4 E_0/(M_1)$ будут регистрироваться ионы m_4^+ . Так записывается полный спектр MIKE. По оси абсцисс (рис. 7.7) откладывается напряжение на электростатическом анализаторе. Поскольку $M_1/E_0 = m_2/E_2 = m_4/E_4 = m_i/E_i$, зная величины M_1 , E_0 и E_i , можно легко вычислить значения m_2 , m_4 и т.д. Разрешение

в спектре не превышает 500, поскольку ширина пиков достаточно велика. Выше говорилось о том, что скорость ионов-продуктов равна скорости иона-предшественника. На самом деле фрагментные ионы получают при образовании определенное приращение скорости, что приводит к уширению пиков (разд. 7.2.2.2). Разрешение невелико не только по ионам-продуктам, но и по ионам-предшественникам, так как для выделения предшественника используется один магнитный анализатор. Это положение можно исправить при использовании приборов продленной или гибридной геометрии (разд. 7.2.6 и 7.2.7). Понятно, что на приборе прямой геометрии, когда магнитный анализатор расположен за электростатическим, MIKES невозможен. Тем не менее существует метод записи спектров ионов-продуктов и на таком приборе (разд. 7.2.2.3 — связанные сканирования).

7.2.2.2. Высвобождение кинетической энергии при фрагментации

Хотя в использованном математическом описании процесса MIKES было сделано допущение, что скорости поступательного движения иона-предшественника, иона-продукта и нейтрального продукта равны исходной скорости иона-предшественника, это лишь приближение. Это положение справедливо только в том случае, когда обратная ионно-молекулярная реакция протекает без энергии активации.

Обычно в момент фрагментации часть внутренней энергии иона-предшественника переходит в кинетическую, причем вектор приращения может быть направлен в любую сторону, от совпадающей с направлением скорости поступательного движения распадающегося иона до полностью противоположной. В результате форма пиков оказывается различной (рис. 7.8) и зависимой от высвобождающейся энергии. Чем больше энергии выделяется, тем шире пик в спектре.

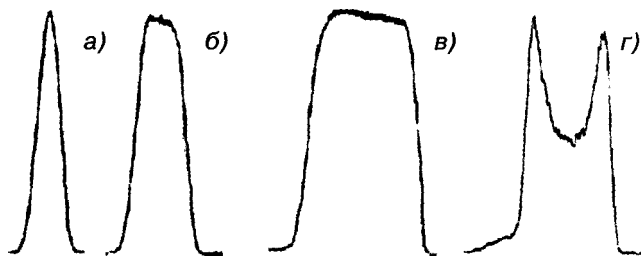


Рис. 7.8. Формы пиков в зависимости от количества высвобождающейся при фрагментации энергии. Количество энергии изменяется в ряду $a < б < в < г$

Для реакции



по спектрам MIKES можно вычислить количество высвобождающейся энергии:

$$K = \frac{eVm_f s^2}{16m_N}, \quad (7.3)$$

где s — полуширина пика в спектре. Измерить полуширину пика весьма просто даже вручную. Достаточно несколько раз записать его в узком диапазоне и усреднить измеренные значения (рис. 7.9). Точность измерения очень высока.

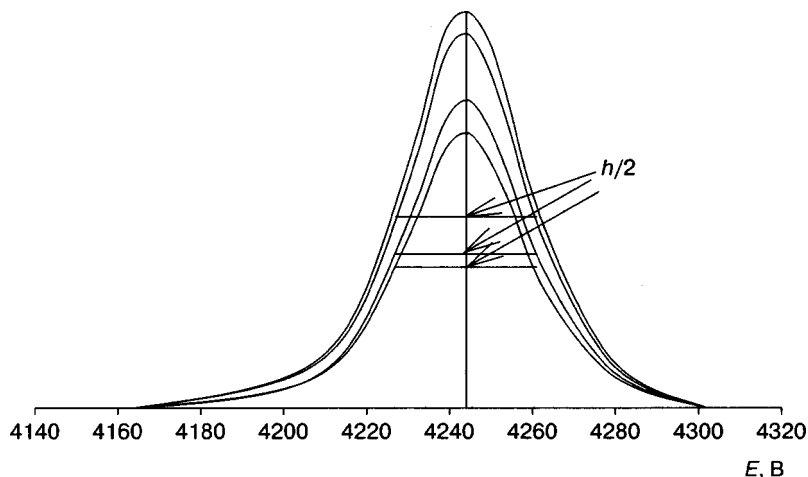


Рис. 7.9. Форма регистрации пика для расчета высвобождения кинетической энергии при отщеплении HN_3 депротонированной молекулой 2-диазо-2-цианоацетамида [447]

Величина K (уравнение (7.3)) важна не только в качестве самостоятельного параметра для установления внутренней энергии иона и параметров реакции. Она может эффективно использоваться в структурных исследованиях. Например, спектры ИЭ изомерных *орто*-, *мета*-, *пара*-бромтолуолов и бензилбромид практически неразличимы. Однако полуширина пика, обусловленного потерей атома брома молекулярным ионом этих соединений, в спектре метастабильных ионов составляет 73, 271, 162 и 1,7 мэВ соответственно, т.е. различить эти изомеры не составляет труда [490].

Если два иона с одной брутто-формулой элиминируют идентичную частицу, причем полуширина пика, соответствующего этому процессу, одна и та же, ионы-предшественники, по-видимому, имеют идентичные структуры. В частности, идентичная ширина пика, соответствующая образованию иона с m/z 66 из депротонированных молекул 4-циано-5-гидрокси-1,2,3-триазола и 2-диазо-2-цианоацетамида, послужила дополнительным доказательством изомеризации депротонированной молекулы диазоамида в триазол [447].

7.2.2.3. Связанные сканирования

Техника связанных сканирований включает одновременное изменение двух из трех основных параметров секторного прибора: напряженности магнитного поля B , напряженности электростатического поля E и ускоряющего напряжения V [431]. Тем не менее, поскольку с изменением ускоряющего напряжения V изменяется и разрешение, наиболее популярными являются три метода, аналогичные описанным выше для случая тройного квадруполя и основанные на одновременном изменении B и E , связанных определенной зависимостью.

Рассмотрим варианты записи tandemных масс-спектров с использованием техники связанных сканирований. Камера соударений, в которой протекают процессы фрагментации исследуемого иона, расположена в этом случае в первом бесполовом пространстве, т.е. между источником и первым анализатором. Порядок расположения анализаторов может быть любым. Этот вид tandemной масс-спектрометрии, помимо структурных исследований, очень широко используется в сочетании с хроматомасс-спектрометрией для получения селективной информации о компонентах смесей. Дефокусировка прибора относительно стабильных ионов дает возможность увидеть на хроматограмме только пики интересующих исследователя соединений. Такой вариант эксперимента очень полезен при необходимости установить присутствие конкретных соединений (даже в виде микропримесей) в сложнейших смесях.

7.2.2.3.1. Спектры ионов-продуктов. Предположим, что необходимо записать спектр ионов-продуктов иона m_1^+ . При столкновении разогнанных ионов m_1^+ с атомами инертного газа в камере соударений будут идти процессы его фрагментации (схема 7.6):

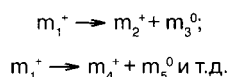


Схема 7.6

Настроим прибор на пропускание стабильных ионов m_1^+ . В этот момент электростатический анализатор пропускает все ионы, обладающие полной кинетической энергией eV , а магнитный анализатор ионы m_1^+ , определяемые уравнением (7.4):

$$m_1 = B^2 R^2 / 2V. \quad (7.4)$$

Теперь будем уменьшать одновременно B и E таким образом, чтобы $B/E = \text{const}$. Как только величины B и E будут отличаться от исходных значений B_0 и E_0 , электростатический анализатор перестанет пропускать любые стабильные ионы, образовавшиеся в источнике и ускоренные полным напряжением V . Какие ионы (m_x) будет пропускать магнитный анализатор (уравнение (7.5)), когда эти величины уменьшатся в m_2/m_1 раза? Это будут m_2^+ , образовавшиеся в камере соударений из m_1^+ . Действительно, на основании закона сохранения энергии кинетическая энергия фрагментных ионов m_2^+ составляет em_2V/m_1 , что равносильно тому, если бы эти ионы образовались в источнике и были ускорены напряжением Vm_2/m_1 . В этом случае правомерно уменьшить знаменатель дроби уравнения (7.5) в m_2/m_1 раза.

$$m_x = \frac{\frac{m_2^2}{m_1^2} B^2 R^2}{2 \frac{m_2}{m_1} V} = \frac{\frac{m_2}{m_1} B^2 R^2}{2V}. \quad (7.5)$$

Разделив уравнение (7.4) на (7.5), получим равенство (7.6):

$$m_1/m_2 = m_1/m_x. \quad (7.6)$$

Таким образом $m_x = m_2$, т.е. при изменении B в m_2/m_1 раза через магнитный анализатор пройдут именно ионы m_2^+ , образовавшиеся в камере соударений из m_1^+ . Эти же ионы m_2^+ в этот момент времени проходят и через электростатический анализатор, так как их энергия eVm_2/m_1 , а E изменилось синхронно с B в m_2/m_1 раза.

$$R = \frac{2V}{E} = \frac{2 \frac{m_2}{m_1} V}{\frac{m_2}{m_1} E}. \quad (7.7)$$

В результате фрагментные ионы m_2^+ будут регистрироваться прибором. В этот момент через магнитный анализатор могут пройти и стабильные ионы с массой m_2^2/m_1 , если они образуются в источнике. Однако они не пройдут через электростатический анализатор, поскольку их энергия не будет соответствовать величине E в этот момент времени. При уменьшении B и E в m_4/m_1 раза будут регистрироваться ионы m_4^+ , образовавшиеся из m_1^+ в камере соударений. Просканировав, таким образом, B и E от исходных значений E_0 и B_0 до 0, можно получить полный спектр ионов-продуктов, образовавшихся в камере соударений из m_1^+ . На рис. 7.10 представлен пример спектра ионов-продуктов, полученный методом связанных сканирований. Видно, что, как и в случае MIKES, разрешение невелико.

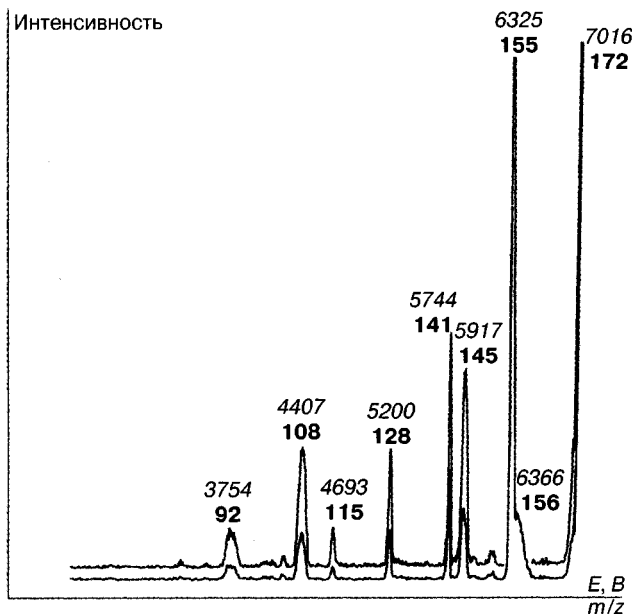
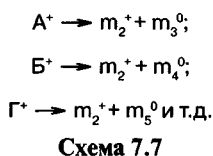


Рис. 7.10. Связанные сканирования. Спектр ионов-продуктов ($B/E = \text{const}$) молекулярного иона фениламиносульфонамида $\text{PhNH}_2\text{SO}_2\text{NH}_2$. Число, выделенное курсивом, означает величину напряженности электростатического поля в вольтах при пропускании данного иона, а число, выделенное жирным шрифтом, означает массу данного иона (точнее величину m/z). Двухканальный самописец с разной чувствительностью регистрирует и наиболее интенсивные, и минорные пики

7.2.2.3.2. Спектры ионов-предшественников. Для записи спектра ионов-предшественников с помощью метода связанных сканирований необходимо изменять одновременно B и E , при условии $B^2/E = \text{const}$. Пусть требуется установить все ионы-предшественники, при фрагментации которых в камере соударений в первом бесполовом пространстве образуются ионы m_2^+ , т.е. зарегистрировать все реакции фрагментации, представленные на схеме 7.7:



Исходно прибор настраивается на пропускание стабильных ионов m_2^+ , образовавшихся в источнике и ускоренных полным напряжением V . Далее величины B и E , жестко связанные зависимостью $B^2/E = \text{const}$, синхронно уменьшаются до 0. Как только величины B и E будут отличаться от исходных значений B_0 и E_0 , прибор перестанет пропускать любые стабильные ионы, образовавшиеся в источнике и ускоренные полным напряжением V . Когда величины B^2 и E изменятся в m_2/A раз, магнитный анализатор будет пропускать ионы m_x , с кинетической энергией eVm_2/A , аналогичные ионам из источника, ускоренным напряжением Vm_2/A .

$$m_x = \frac{\frac{m_2}{A} B_0^2 R^2}{2 \frac{m_2}{A} V} = m_2^*. \quad (7.8)$$

Как видно из уравнения (7.8), это будут вновь ионы с массой m_2 , но уже образовавшиеся в камере соударений. Эти же ионы m_2^* в этот момент времени проходят и через электростатический анализатор (уравнение (7.9)), так как их энергия eVm_2/A , а E изменилось синхронно с B^2 в m_2/A раза.

$$R = \frac{2V}{E} = \frac{2 \frac{m_2}{A} V}{\frac{m_2}{A} E}. \quad (7.9)$$

Таким образом, ион m_2^* , образовавшийся в камере соударений из A , будет зарегистрирован прибором. При изменении B^2 и E в m_2/B раза будет зарегистрирован ион m_2^* , образовавшийся в камере соударений из своего предшественника B . Просканировав B и E от исходных значений E_0 и B_0 до 0, можно получить полный спектр ионов-предшественников, образующих в камере соударений ионы m_2 . Масс-спектрометр все время регистрирует ионы m_2 , но образовавшиеся из разных предшественников, а следовательно, имеющие разные кинетические энергии.

На рис. 7.11 представлен пример спектра ионов-предшественников, полученный методом связанных сканирований. Разрешение в спектре не превышает

нескольких сотен. Следует, кроме того, отметить, что в спектре часто присутствуют ложные пики (артефакты). Для большей надежности при установлении протекания конкретной реакции распада $A^+ \rightarrow m_2^+ + m_3^0$ желательно зарегистрировать соответствующие пики и в спектре ионов-продуктов, и в спектре ионов-предшественников.

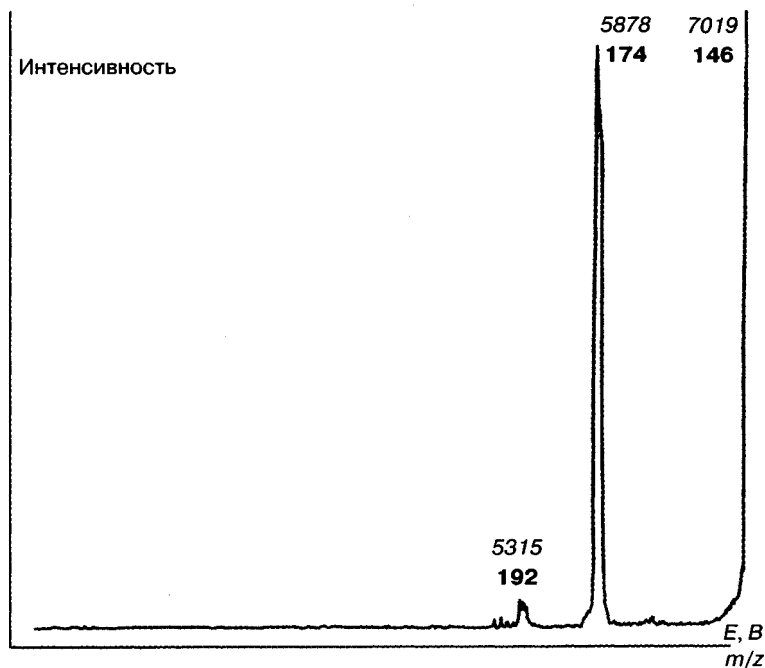


Рис. 7.11. Связанные сканирования. Спектр ионов-предшественников ($B^2/E = \text{const}$) иона $\text{Ph}-\text{NH}-\text{N}=\text{C}=\text{C}=\text{O}^+$ (m/z 146), образующегося при распаде N-фениламиносульфонилкарбэтоксидиазоацетамида $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-\text{CO}-\text{CN}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{NHPh}$. Число, выделенное курсивом, означает величину напряженности электростатического поля в вольтах при пропускании данного иона, а число, выделенное жирным шрифтом, означает массу данного иона (точнее величину m/z)

7.2.2.3.3. Спектры выбросов идентичных нейтральных частиц. Спектры ионов, отщепляющих идентичные нейтральные частицы, используются значительно реже. Предположим, необходимо установить ионы, которые распадаются в камере соударений с выбросом одинаковых частиц. Это может быть эксперимент по изучению процессов фрагментации молекулярного иона конкретного вещества. Например, можно установить все фрагментные ионы, способные элиминировать молекулу CO. Это может быть эксперимент в режиме ГХ-МС, когда в сложной смеси соединений необходимо установить присутствие веществ определенного типа. Например, по выбросам 44 дальтон в спектрах химической ионизации отрицательных ионов можно зарегистрировать среди многих компонентов смеси только карбоновые кислоты. По выбросам 35 и 70 дальтон в спектрах электронной ионизации можно селективно установить присутствие полихлорированных соединений, а по выбросам 18 дальтон — спирты.

Рассмотрим реакцию распада молекулярного иона M^+ с выбросом нейтральной частицы N и образованием фрагментного иона F^+ в первом бесполом пространстве.



Электростатический анализатор должен пропускать фрагментные ионы. Учитывая, что в первом приближении $v_M = v_F$, получаем, что для пропускания иона F^+ напряжение на анализаторе должно понизиться до величины E_F (уравнения (7.10) и (7.11)).

$$eE_0 = \frac{m_M v_M^2}{R}. \quad (7.10)$$

$$eE = eE_F = \frac{m_F v_F^2}{R} = \frac{m_F v_M^2}{R}. \quad (7.11)$$

$$\text{Тогда } \frac{E}{E_0} = \frac{E_F}{E_0} = \frac{m_M}{m_F} = 1 - \frac{m_N}{m_M} \text{ или } m_M = \frac{m_N}{1 - E/E_0}. \quad (7.12)$$

Магнитный анализатор должен пропускать ионы-продукты m^* с кажущейся массой (см. метастабильные ионы, разд. 2.3), которую можно вычислить по уравнению (7.13).

$$m^* = \frac{m_F^2}{m_M} = m_F \frac{E}{E_0} = \frac{E}{E_0} (m_M - m_N). \quad (7.13)$$

Подставляя для m_M величину из уравнения (7.12), получаем:

$$m^* = \frac{E}{E_0} \left(\frac{m_N}{1 - E/E_0} - m_N \right) = \frac{E}{E_0} \left[\frac{m_N - (1 - E/E_0)m_N}{1 - E/E_0} \right] = \frac{E^2 m_N}{E_0^2 (1 - E/E_0)}. \quad (7.14)$$

Подставляя величину кажущейся массы в основное уравнение пропускания ионов магнитным анализатором (разд. 6.1), получаем:

$$\frac{m^*}{z} = \frac{B^2 R^2}{2V} = \frac{E^2 m_N}{E_0^2 z (1 - E/E_0)}. \quad (7.15)$$

Переместив все постоянные величины в правую часть уравнения, получаем:

$$\frac{B^2 (1 - E/E_0)}{E^2} = \frac{2V m_N}{E_0^2 z R^2} = \text{const}. \quad (7.16)$$

Осуществляя одновременное сканирование B и E от B_0 и E_0 до 0 в такой зависимости, можно регистрировать только те ионы, которые тяжелее своего фрагмента на массу N .

Часто [431] используют другое математическое выражение для сканирования этого типа:

$$\frac{B}{\left[E^{-2} - (E_0 E)^{-1}\right]^{\frac{1}{2}}} = \text{const.} \quad (7.17)$$

7.2.2.3.4. Получение карты метастабильных переходов. Этот вид масс-спектрометрического эксперимента используется еще реже. Исследователя, как правило, интересует доказательство протекания конкретной реакции фрагментации или установление присутствия в смеси определенного соединения. Метод метастабильного картирования подразумевает получение информации о всех реакциях протекающих при масс-спектрометрической фрагментации соединения. Карта представляется в координатах $E - m/z$ и строится сканированием напряженности магнитного анализатора от величины B_0 до 0 для каждого дискретного значения E . Часто ее представляют в трехмерном формате. Соответствующим сечением по карте можно получить спектр любого иона-предшественника, иона-продукта или выбросов любых идентичных нейтральных частиц.

Понятно, что метастабильное картирование является весьма трудоемким занятием, а получаемая информация в большинстве случаев оказывается избыточной.

7.2.2.3.5. Сканирование ускоряющего напряжения. Метод дефокусировки. Этот вариант масс-спектрометрического эксперимента для получения спектров ионов-предшественников возник одним из первых, однако в настоящее время он практически не используется, поскольку уступает по эффективности описанным выше методам. Для регистрации спектра сканируется величина ускоряющего напряжения. Электростатический анализатор при этом имеет все время постоянную напряженность, равную исходному ускоряющему напряжению: $E_0 = V_0$.

Если фрагментация происходит вне источника, кинетическая энергия фрагмента оказывается ниже стандартного значения, и он не проходит через электростатический анализатор. Однако, если повысить ускоряющее напряжение, энергии иона-предшественника и иона-продукта, образующегося в первом бесполовом пространстве, будут возрастать, и в определенный момент заряженный фрагмент пройдет через электростатический анализатор. Рассмотрим реакцию, протекающую в бесполовом пространстве:



Кинетическая энергия любого стабильного иона, образовавшегося в источнике, равна:

$$E = eV_0 = \frac{m_M v_M^2}{2} = \frac{m_F v_F^2}{2}. \quad (7.18)$$

Для того чтобы зарегистрировать ион F^+ , образовавшийся в бесполом пространстве, можно, не изменяя напряженность электростатического сектора, увеличить величину ускоряющего напряжения, т.е. повысить энергию предшественника. Необходимо, чтобы его (предшественника) скорость выросла до величины v_F согласно уравнению:

$$eV = \frac{m_M v_F^2}{2}. \quad (7.19)$$

При делении уравнения (7.18) на уравнение (7.19) получаем:

$$\frac{V}{V_0} = \frac{m_M}{m_F} \text{ или } m_M = \frac{m_F V}{V_0}. \quad (7.20)$$

Для получения спектра ионов-предшественников фрагментного иона F^+ прибор предварительно настраивается на пропускание стабильных ионов F^+ , образовавшихся в источнике. Далее увеличивают величину ускоряющего напряжения. Как только V будет отличаться от V_0 , произойдет дефокусировка стабильных ионов. Любые стабильные ионы, в том числе F^+ , не будут проходить через электростатический анализатор. Сигнал на детекторе исчезнет и появится вновь, когда величина V будет соответствовать требуемой по уравнению (7.18) для образования иона-продукта F^+ с необходимой энергией. К сожалению, в отличие от других техник тандемной масс-спектрометрии, описанных выше, требуется не понижать разность потенциалов от исходной величины до нуля, а увеличивать ее. Этот процесс имеет ограничения. Поэтому полного спектра при очень большой разнице в массах ионов M^+ и F^+ записать нельзя. Кроме того, с изменением V изменяется и разрешение.

7.2.3. Ионная ловушка

Этот вид анализатора позволяет переходить от обычной масс-спектрометрии к тандемной без использования дополнительных инструментальных усложнений. Для получения спектра ионов-продуктов необходимо провести три последовательные операции: выделение иона-предшественника, инициирование его фрагментации и регистрацию ионов-продуктов. Первая стадия легко выполнима методом масс-селективной стабильности, когда приложением суммы постоянного и радиочастотного поля из ловушки удаляются все ионы с массами больше и меньше, чем у выбранного для анализа иона. Для этой цели можно использовать и метод резонансного удаления. После того как в ловушке остались только ионы с необходимой величиной m/z , необходимо повысить их внутреннюю энергию, индуцировав, тем самым, фрагментацию. Кинетическая энергия ионов повышается благодаря резонансному возбуждению, которое осуществляется приложением небольшого (до 5 В) переменного напряжения к концевым электродам. Частота напряжения должна соответствовать собственной частоте ионов. При этом амплитуда колебаний ионов поддерживается на незначительном уровне, чтобы избежать их резонансного удаления. Как и в обычной камере соударений, внутренняя энергия иона повышается в результате перехода части его кинетической энергии во внутреннюю в результате столкновений. Это достигается при столкновении иона во время его движения внутри ловушки с атомами гелия, который подается туда намеренно во всех режимах работы. Эффективность трансформации исходного иона может достигать 100%. Образовавшиеся фрагментные ионы детектируются обычным образом в режиме масс-селективной нестабильности. Следует отметить, что ионная ловушка позволяет изучать только низкоэнергетические столкновения.



Достоинством ионной ловушки является возможность проводить не только МС/МС эксперименты, но и многостадийные исследования. В этом случае после генерирования фрагментных ионов один из них выбирается для дальнейшего изучения, а остальные выводятся из ловушки. С этим ионом проводятся те же операции по ускорению, инициированию столкновений и записи спектра теперь уже внучатых (третье поколение) ионов изначального предшественника. Эта последовательность выделения иона и его фрагментации может проводиться многократно. Такая техника называется (МС)ⁿ. Опубликованы результаты регистрации масс-спектров фрагментов до десятого поколения исходного родительского иона [411]. Следует, однако, отметить, что чувствительность анализа уменьшается при переходе к каждому следующему поколению ионов, поскольку из всего набора фрагментов выбирается лишь один.

Здесь уместно упомянуть об одной особенности использования ДАС в ионной ловушке в качестве tandemного анализатора. Из теории работы ионной ловушки в условиях ДАС вытекает неизбежная потеря данных о фрагментных ионах в области низких масс. Диапазон этой области составляет от 0 до $\sim 0,3M$, где M – масса иона-предшественника. При анализе тяжелых молекул это приводит к ощутимой потере важной структурной информации. Выходом из этой ситуации может служить использование техники МС³, а в общем виде МСⁿ (разд. 7.1.4 и рис. 7.4). Следует также подчеркнуть, что запись спектров ионов-предшественников в ионных ловушках невозможна.

7.2.4. Масс-спектрометрия с преобразованиями Фурье

Аналогично ионной ловушке метод масс-спектрометрии с преобразованиями Фурье позволяет работать в режиме tandemной масс-спектрометрии не за счет модификации самого прибора, а лишь при изменении последовательности действий. Выше было описано, что последовательность событий для получения обычного масс-спектра включает очистку ячейки, ионизацию, возбуждение и детектирование ионов. Для случая tandemной масс-спектрометрии с активацией соударением возможная последовательность получения спектра ионов-продуктов будет следующей: **очистка ячейки – ионизация – отбор иона-предшественника (удаление ионов с другими значениями m/z) – увеличение кинетической энергии выбранного иона – активация соударением – возбуждение и детектирование фрагментных ионов.**

Первые два процесса аналогичны используемым для получения обычного масс-спектра. Чтобы оставить в ячейке только заданный ион-предшественник, необходимо приложить к возбуждающим пластинам радиочастотные импульсы с определенной частотой и амплитудой для удаления из ячейки всех ионов с большими и меньшими массами. Существует много вариантов осуществления такого процесса. В частности, широко используется метод сохраненной формы волны с обратными преобразованиями Фурье (**SWIFT, stored waveform inverse Fourier transform**), предложенный в середине 80-х годов Маршаллом [491]. В этом случае параметры возбуждающих импульсов рассчитываются с помощью обратных преобразований Фурье. В результате приложения таких импульсов все ионы с более высокими и более низкими собственными частотами удаляются из ячейки, а ионы с заданной массой получают приращение кинетической энергии и переходят на большую циклотронную орбиту, т.е. оказываются подготовленными для следующей

процедуры — фрагментации, активированной соударением. Таким образом, две стадии последовательности выполняются одновременно.

Следующим этапом является инициирование столкновений разогнанных ионов-предшественников с молекулами инертного газа. Газ подается в нужный момент времени в ячейку импульсным краном. Количество газа должно быть оптимальным для осуществления достаточного числа столкновений, но не привести к потере родительских ионов в результате радиальной диффузии, которая заключается в нарушении направления циклотронного движения и может вызвать гибель ионов, направив их на боковые пластины.

Возбуждение и детектирование фрагментных ионов осуществляется обычным образом. Определенным недостатком описанного эксперимента является образование ионов-продуктов не в центре ячейки, что ухудшает разрешение в спектре. Для его преодоления используют различные приемы. Например, хорошие результаты получены методом поддерживающего офф-резонансного возбуждения (**SORI, sustained off-resonance excitation**). В этом случае [492] возбуждающая частота находится то в резонансе, то не в резонансе с собственной частотой иона-предшественника, т.е. циклотронная орбита иона то расширяется, то сужается. При этом амплитуда возбуждающего импульса невысока, и ион удаляется от центра ячейки на незначительное расстояние. Напуск в ячейку инертного газа приводит к большому числу низкоэнергетических столкновений, в результате которых внутренняя энергия иона повышается, пока не достигает предела, за которым начинается его распад. Фрагментные ионы образуются практически в центре ячейки, что повышает эффективность их последующей регистрации.

Техника выделения иона-предшественника, его активации и записи спектра ионов-продуктов с использованием диссоциации при захвате электрона (разд. 7.1.3.1) или ИКМФД (разд. 7.1.3.2) основана на тех же правилах, поскольку ДИС, ДЗЭ и ИКМФД дают возможность получить комплементарные спектры при установлении структур сложных биоорганических соединений [5].

Как и ионная ловушка, масс-спектрометр с преобразованиями Фурье позволяет получать спектры многих поколений ионов. Следует, однако, помнить, что чувствительность метода для каждого следующего поколения ионов оказывается более низкой, так как на каждой стадии фрагментации происходит удаление подавляющего числа образовавшихся частиц. Кроме того, удается изучать только низкоэнергетические столкновения. Необходимо подчеркнуть, что запись спектров ионов-предшественников этим методом невозможна. Следует также отметить, что в последнее время ловушка ИЦР все чаще используется исключительно в качестве устройства для измерения точной массы, а процессы фрагментации с получением ионов-продуктов осуществляются во внешних блоках прибора (например, в ионных ловушках).

7.2.5. Тандемная масс-спектрометрия на приборах МАЛДИ

Метод МАЛДИ характеризуется преимущественным образованием монопротонированных молекул, а в качестве анализатора используется времяпролетный. Это приводит к определенным модификациям в проведении МС/МС экспериментов. Простейшим вариантом является метод **задержанной экстракции ионов** [493]. В этом случае вытягивающее напряжение для извлечения ионов, образовавшихся после ла-

зерного импульса, прикладывается с задержкой, обычно не превышающей 500 нсек (5×10^{-7} сек). Из-за высокой избыточной внутренней энергии образовавшихся молекулярных ионов часть их успевает фрагментировать по нескольким направлениям. Фрагментные ионы, наряду с молекулярным, вытягиваются из источника и анализируются на времяпролетном анализаторе. Основным недостатком метода задержанной экстракции является невозможность предварительной селекции молекулярных ионов. Этот метод часто называется **распадом в источнике** (РВИ, in-source decay, ISD). Формально он не может считаться tandemным. Скорее, он сродни классическому варианту ИЭ, когда высокая энергия молекулярного иона приводит к его самопроизвольной фрагментации. Правда, в случае МАЛДИ в зоне шлейфа могут протекать и столкновения ионов-предшественников с нейтральными частицами, приводящими к фрагментации в чем-то аналогичной ДИС. Учитывая, что в экспериментах с пептидами в спектре задержанной экстракции наблюдаются серии ионов s и z , нельзя исключить, что имеет место и диссоциация при захвате электрона [350], и перенос атомов водорода на ион аналита из матрицы [494]. Образующиеся катион-радикалы распадаются далее по механизму, инициируемому радикальным центром. Наиболее активными донорами атомов водорода служат карбоксильные группы молекул матриц. Именно поэтому наиболее интенсивная фрагментация по механизму РВИ наблюдается при использовании 2,5-дигидроксibenзойной или синапиновой кислот [494]. Не исключено также участие в качестве доноров протона фенольных групп [495].

Более эффективен в условиях МАЛДИ метод **распада за пределами источника**, РПИ (post source decay, PSD). Протонированные молекулы, обладающие в случае МАЛДИ достаточно высокой избыточной внутренней энергией, фрагментируют не только в источнике, но и по ходу движения внутри прибора, в частности в начальной бесполовой области времяпролетного анализатора в течение 10–50 микросекунд [496, 497]. Интенсивность фрагментации зависит от структуры молекул аналита и матрицы, а также интенсивности лазерного пучка; причем вычислить сообщенную ионам внутреннюю энергию *a priori* не так просто. Фактически, речь идет о метастабильных ионах (разд. 2.3). Так как в бесполом пространстве скорости иона-предшественника и ионов-продуктов одинаковы, их анализ в линейном времяпролетном анализаторе становится невозможен: ионы достигают детектора одновременно, хотя кинетические энергии их различны, поскольку различаются массы ($E_k = mv^2/2$). Рефлектрон, благодаря наличию внутреннего потенциала, задерживает высокоэнергетические частицы дольше, чем низкоэнергетические, тем самым, изменяя время достижения ионами детектора, т.е. работает в качестве анализатора ионов [497]. Если ион регистрируется в рефлектронном режиме, но не в линейном, он образовался в результате фрагментации в бесполом пространстве. К сожалению, конструкция рефлектрона дает возможность использовать только ограниченный диапазон потенциальных полей, регистрируя с приемлемым разрешением ионы в пределах от m_{\max} до $0,7m_{\max}$ (где m_{\max} — максимальная масса иона при конкретных установленных параметрах рефлектрона). Для получения полного tandemного масс-спектра используют пошаговую регистрацию диапазонов масс: от m_{\max} до $0,7m_{\max}$, затем от $0,7m_{\max}$ до $(0,7)^2m_{\max}$ и т.д. Понятно, что для регистрации спектра, например, в диапазоне от m/z 50 до m/z 2000 требуется $n = \lg(50/2000)/\lg 0,7 = 11$ шагов, что существенно замедляет

анализ. Тем не менее осуществление режима МС/МС с помощью времяпролетного масс-спектрометра МАЛДИ весьма эффективно [498].

Недостатки РПИ можно преодолеть с помощью метода МАЛДИ на приборе с тандемным времяпролетным анализатором, МАЛДИ/ВП/ВП (MALDI-TOF/TOF). Суть подхода заключается в сужении разброса кинетических энергий иона-предшественника и ионов-продуктов так, чтобы весь спектр записывался сразу, в одном диапазоне эквипотенциальных поверхностей, создаваемых в рефлектроне. Для этого необходимо разместить камеру соударений в бесполовом пространстве между двумя времяпролетными анализаторами, причем первый из них может быть линейным, а второй обязательно рефлектронным. Коммерческие приборы МАЛДИ этого типа, как правило, снабжены камерой соударений, заполненной инертным газом. Давление газа в них существенно ниже, чем в ячейках ДАС на других типах приборов, поскольку работа времяпролетного анализатора ухудшается в связи с тем, что стандартная кинетическая энергия ионов, покидающих ионный источник МАЛДИ, достаточно велика (порядка 20 кВ), а траектории и скорости разогнанных ионов искажаются при взаимодействии с атомами (молекулами) газа. Дополнительный узел, например запатентованный компанией Bruker «LIFT», — позволяет скомпенсировать энергии ионов и тем самым записать масс-спектр по всему диапазону значений m/z сразу, а не за несколько шагов, как в классическом РПИ. Таким образом не только достигается выигрыш в скорости, но и увеличивается разрешение. Выигрыш в разрешении достигается также в результате устранения продуктов метастабильных рападов и использования исключительно фрагментных ионов, образующихся в условиях ДАС. Для эффективной работы ячейки можно замедлять ионы, поступающие из источника, и/или ускорять образовавшиеся ионы-продукты [499, 500].

В конструкции, предложенной Р. Коттером, роль анализатора ионов-продуктов выполняет рефлектрон с искривленным полем [501]. В последнем варианте реализуется самая высокая лабораторная энергия соударений (20 кэВ), что дает возможность использовать наиболее высокоэнергетические столкновения [179]. Это приводит к увеличению структурной информации благодаря возрастанию числа и интенсивности ионов в области низких масс. Богатство спектральной информации при использовании этого подхода позволяет предположить несколько механизмов процесса РПИ. Наряду с классическим механизмом перераспределения внутренней энергии по всем связям иона, вероятно, имеет место и неэргодический процесс с преимущественным образованием ионов вблизи места соударения [456, 499].

7.2.6. Приборы продленной геометрии

Иногда возникает необходимость зарегистрировать не только ионы-продукты определенного предшественника, но и ионы последующих поколений (разд. 7.1.4). Такие задачи возникают, например, при доказательстве структур ионов, при составлении схем фрагментации органических соединений. Эти схемы оказываются полезными для последующей идентификации структурно близких соединений или их метаболитов. Как было показано выше, эта задача легко выполнима при использовании ионных ловушек или масс-спектрометров с преобразованиями Фурье (разд. 7.2.3 и 7.2.4). Однако подобные задачи можно решить на модифицированных секторных или квадрупольных приборах.

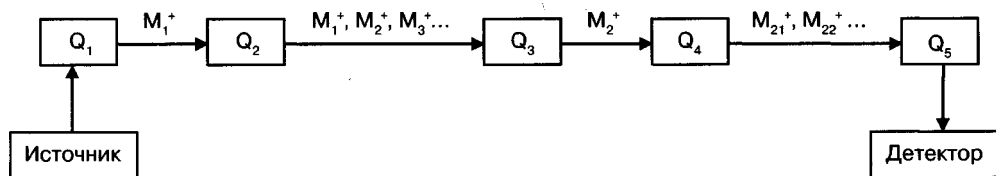
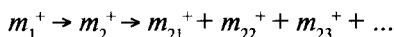


Рис. 7.12. Запись спектра ионов-продуктов второго поколения выбранных предшественников (MS^3) на приборе с системой пяти квадрупольных анализаторов

Примером прибора продленной геометрии может служить масс-спектрометр с пятью квадрупольными анализаторами (рис. 7.12). Первый квадруполь настраивается на пропускание выбранного иона с массой m_1 . Второй квадруполь работает в качестве камеры соударений, где происходит образование фрагментных ионов первого поколения. Третий квадруполь пропускает только тот фрагментный ион, дальнейший распад которого необходимо изучить, например m_2^+ . Четвертый квадруполь вновь выполняет функции камеры соударений, где происходит образование фрагментных ионов второго поколения, образующихся исключительно из m_2^+ . Работающий в обычном сканирующем режиме пятый анализатор позволяет записать полный спектр фрагментных ионов, образовавшихся из m_2^+ . Такой режим позволяет изучить последовательность превращений:



Увеличение числа секторов в магнитных масс-спектрометрах тоже позволяет проводить более сложные эксперименты. Уже добавление электростатического анализатора к обычному двухфокусному прибору (система ВЕЕ или ЕВЕ, рис. 7.13) позволяет, помимо записи спектров внучатых ионов, как в случае системы пяти квадрупольных, проводить селекцию ионов-предшественников для записи спектров ионов-продуктов в режимах MIKES или связанных сканирований с высоким разрешением.

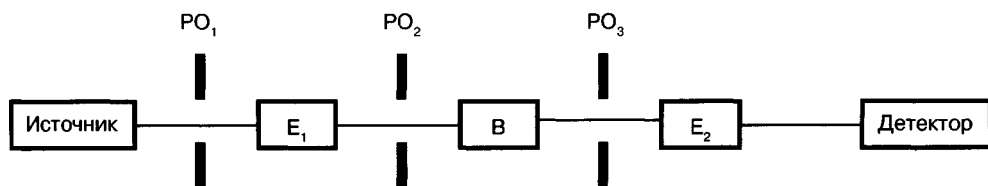


Рис. 7.13. Принципиальная схема прибора в конфигурации ЕВЕ. PO_n — реакционные области (камеры соударений)

В этом случае используется третья камера соударений (третья реакционная область, PO_3). Высокое разрешение по ионам-предшественникам весьма полезно, когда в источнике образуется большое число ионов, в том числе с одинаковой целочисленной массой.

Безусловно, наиболее мощным секторным прибором с тремя анализаторами является масс-спектрометр с конфигурацией ВЕВ (рис. 7.14). Используя третью камеру соударений (PO_3), как и в случае описанных выше конфигураций, ЕВЕ или ВЕЕ, можно выделять ион-предшественник с высоким разрешением, а ис-

пользуя вторую камеру соударений (PO_2), можно достигать высокого разрешения по ионам-продуктам.

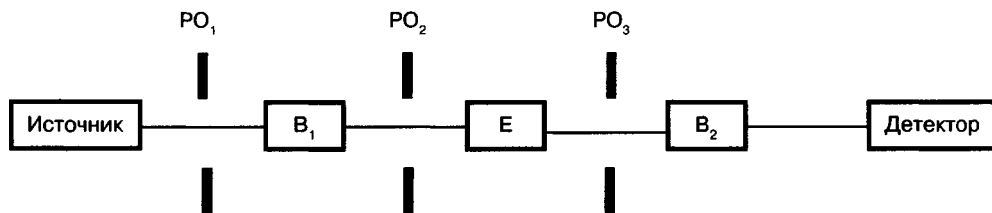


Рис. 7.14. Принципиальная схема прибора в конфигурации ВЕВ. PO_n – реакционные области (камеры соударений)

Существующие коммерческие приборы с четырьмя анализаторами (конфигурации ЕВЕВ или ВЕЕВ) позволяют получать спектры третьего поколения фрагментных ионов, а также иметь высокое разрешение и для ионов-предшественников, и для ионов-продуктов в случае МС/МС. Теоретически можно наращивать число секторов неограниченно, но необходимо отметить, что добавление каждого нового анализатора увеличивает размеры прибора и заметно его удорожает. Кроме того, чувствительность анализа уменьшается с каждой дополнительной стадией, поскольку каждый последующий магнитный анализатор пропускает только один из всех фрагментных ионов, а каждый последующий электростатический анализатор пропускает только ионы в узком диапазоне кинетических энергий. Поскольку разброс энергий у фрагментных ионов, образовавшихся в камере соударений, довольно велик, только часть их проходит через электростатический анализатор с жестко заданной величиной напряженности поля.

Прибором продленной геометрии можно считать и вариант тандема ВП/ВП. О его достоинствах рассказано в разд. 7.2.5.

7.2.7. Приборы гибридной геометрии

Как уже отмечалось выше, в экспериментах с активацией соударениями обычно используется два диапазона кинетических энергий ионов. Секторные приборы работают в диапазоне 6–8 кВ, а квадрупольные приборы – 50–100 В. Возможность изучать и высокоэнергетические, и низкоэнергетические столкновения, а также снизить стоимость приборов реализуется при использовании масс-спектрометров гибридной геометрии. Простейшим представителем этого класса является прибор, в котором за магнитным анализатором следует квадруполь (рис. 7.15).

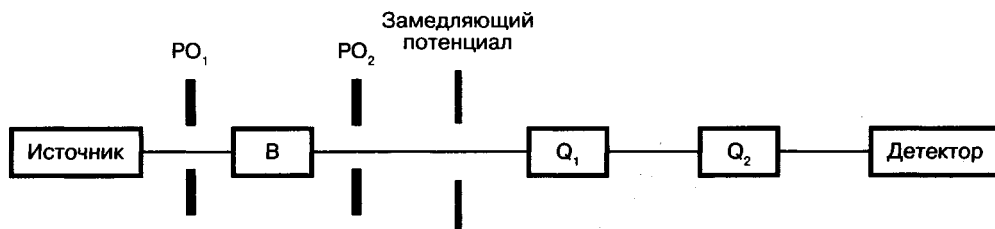


Рис. 7.15. Принципиальная схема гибридного масс-спектрометра ВQQ. PO_n – реакционные области (камеры соударений)

Использование магнита позволяет получать разрешение до 5000 по ионам-предшественникам, а использование замедляющего потенциала дает возможность изучать низкоэнергетические или высокоэнергетические реакции фрагментации в зависимости от того, где происходит активация. Если задействована реакционная область 1 или 2, изучаются высокоэнергетические столкновения, а если роль камеры соударений выполняет первый квадруполь (реакционная область 3), изучаются низкоэнергетические процессы. Для записи спектров ионов-предшественников настраивают второй квадруполь на пропускание выбранных ионов-продуктов и сканируют напряженность магнитного поля, используя для активации соударением третью реакционную область. Для записи спектров ионов, выбрасывающих идентичные нейтральные частицы, одновременно сканируют B и Q , при условии $B^2/Q = \text{const}$.

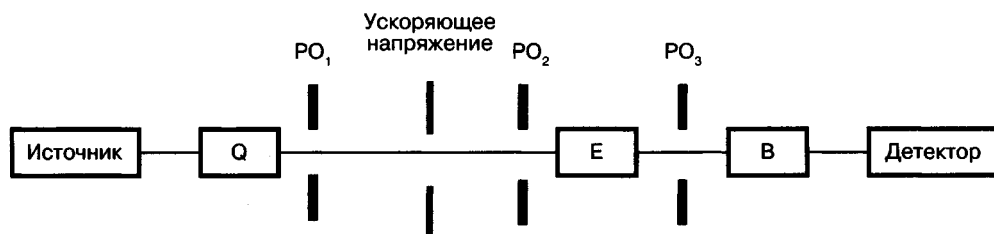


Рис. 7.16. Принципиальная схема гибридного масс-спектрометра QEB

Достаточно интересна конфигурация гибридного прибора QEB (рис. 7.16). Первым анализатором является квадруполь, т.е. существует возможность изучать и высокоэнергетические, и низкоэнергетические процессы (реакционные области 1 и 2), а также получать высокое разрешение по ионам-продуктам. Прибор может работать и в режиме MS/MS/MS.

Задача 7.1. Какие варианты спектров можно получить на приборе BEQQ, принципиальная схема которого представлена на рис. 7.17?

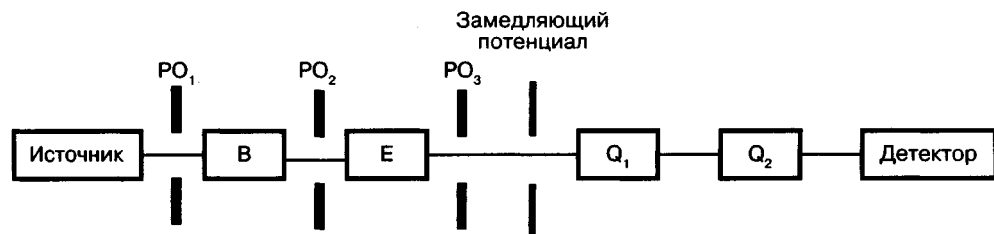


Рис. 7.17. Принципиальная схема гибридного масс-спектрометра BEQQ. PO_n – реакционные области (камеры соударений)

Отличные результаты получены при стыковке квадрупольных или секторных приборов с времяпролетным анализатором. Варианты конфигурации QTOF, VTOF, EBTOf, EBETOf (TOF – time of flight, времяпролетный анализатор) позволяют устанавливать точные массы фрагментных ионов благодаря высокому разрешению времяпролетного анализатора и существенно увеличить чувствительность метода

для регистрации ионов-продуктов. Эффект увеличения чувствительности на времяпролетных приборах по сравнению со сканирующими обсуждался выше (разд. 6.7). Принципиально ничего не меняется и в режиме тандемной масс-спектрометрии. Камера соударений располагается в этом случае перед времяпролетным анализатором, который может быть укомплектован системой ортогонального ускорения и рефлектроном.

Конфигурация QTOF стала особенно популярной в последнее время для анализа как органических, так и биоорганических соединений [502]. Квадруполь является идеальным первым анализатором для селекции иона предшественника с высоким коэффициентом пропускания, а высокая разрешающая способность времяпролетных анализаторов позволяет получать структурную информацию о ранее неизвестных соединениях (*de novo* секвенирование) и проводить надежное количественное определение целевых аналитов. Для проведения количественного определения на приборах QTOF необходимо соблюдать осторожность, поскольку перенос ионов из квадруполя во времяпролетный анализатор осуществляется в импульсном режиме [502, 503]. Возможности приборов QTOF резко возрастают при помещении между этими двумя анализаторами узла ионной подвижности. Такой прибор Q/TWIMS/TOFMS, использующий спектрометрию подвижности ионов на «бегущей волне» [504], входит в линейку масс-спектрометров фирмы Waters (см. подробнее разд. 8.4).

Ионные ловушки и приборы ионного циклотронного резонанса (масс-спектрометры с преобразованием Фурье) могут работать в режиме тандемной масс-спектрометрии с регистрацией нескольких поколений ионов без дополнительных инструментальных усложнений. Однако они могут составлять и часть большого гибридного масс-спектрометра.

7.2.8. Орбитальные ловушки

Поскольку во всех типах коммерческих орбитапов инициирование фрагментации осуществляется вне орбитальной ловушки, а во внешних системах масс-спектрометра (разд. 6.8), они тоже, по сути, являются гибридными приборами. Последняя модель Orbitrap Fusion официально называется трибридом и объединяет орбитальную ловушку с квадрупольным анализатором и двухкамерной квадрупольной линейной ионной ловушкой (рис. 7.18).

Трибридная система является настоящей лабораторией, в которой с ионами можно проводить самые разнообразные эксперименты. Наряду с ДИС прибор позволяет использовать метод ДАСПЭ [448], который, предоставляя комплементарную информацию, одновременно устраняет недостаток ионных ловушек с потерей информации в области низких величин m/z (разд. 7.2.3). Возможно и применение диссоциации при переносе электрона (ДПЭ, разд. 7.1.3.1). Пока орбитальная ловушка занята проведением высокоточных измерений масс ионов, в других частях масс-спектрометра можно инициировать любой тип фрагментации или накопить ионы в квадрупольной или С-ловушке. Именно на накопление ионов можно затратить до 95% времени цикла, благодаря чему возрастает чувствительность без потери в качестве спектров или скорости анализа.

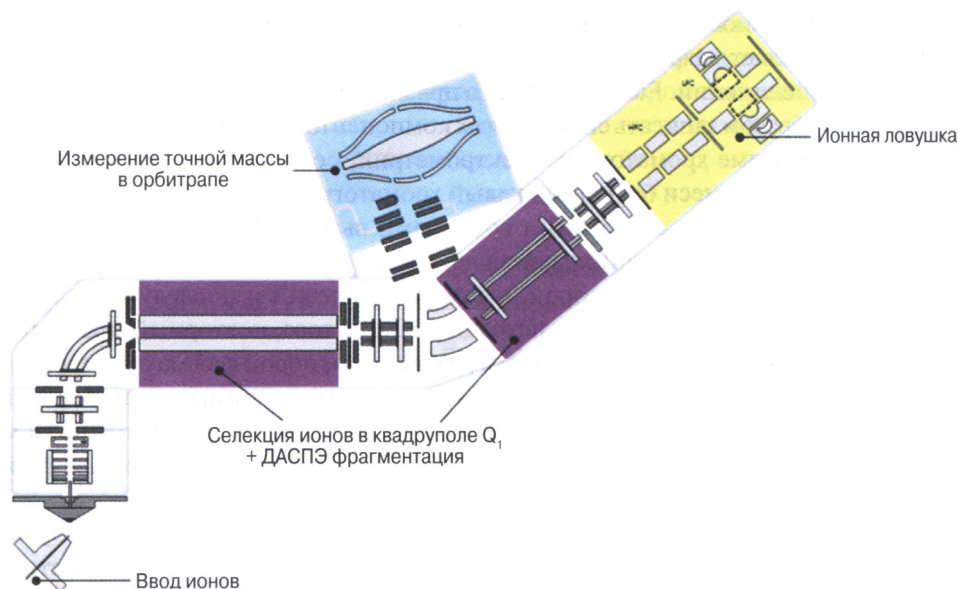


Рис. 7.18. Схема трибридного масс-спектрометра. (С разрешения «Термо»)

Пример возможностей трибридной системы приведен в разд. 11.1.2.1.4. На рис. 11.10 и 11.11 представлены MS^3 спектры ДПЭ-ДАСПЭ, позволяющие однозначно дифференцировать изомерные лейцин и изолейцин при секвенировании пептидов [489]. Методы tandemной масс-спектрометрии на орбитальных ловушках активно применяются в анализе пищи [505], но, безусловно, наиболее значимые фундаментальные и прикладные результаты получены в области протеомики (разд. 11.1.3 и 11.1.4) и метаболомики (разд. 11.5).

7.3. Автоматизированные методы записи tandemных спектров

Современные высокопроизводительные методы ЖХ/МС/МС анализа в протеомике, липидомике, метаболомике и т.д. базируются на автоматизированном сборе данных. На сегодняшний день существуют три основных подхода: зависимые сканирования (Data Dependent Acquisition, DDA), множественные сканирования (Multiplexed Data Acquisition, MDA) и независимые сканирования (Data Independent Acquisition, DIA) [506].

В случае зависимых сканирований после прохождения колонки и образования ионов регистрируется обычный масс-спектр. Компьютер выбирает наиболее интенсивный пик в спектре и инициирует его фрагментацию одним (чаще всего ДАС) или несколькими (например, последовательно ДАС, ДЗЭ, ИКМФД) методами. После записи этих tandemных спектров вновь регистрируется обычный масс-спектр и наиболее интенсивный пик выбирается для нового МС/МС анализа. Если максимальным оказывается тот же ион, спектр которого уже снят, выбирается второй по интенсивности. Потом идет работа с третьим по интенсивности пиком и т.д. до

наименее интенсивного сигнала, превосходящего заданный порог. Метод абсолютно логичен и позволяет эффективно проводить анализ смесей как известных, так и неизвестных соединений. Если речь идет о прямом вводе смеси в источник ионов, можно таким образом записать спектры всех компонентов смеси. Ситуация не столь однозначна в режиме хроматомасс-спектрометрии, особенно когда речь идет об анализе дайджестов смеси белков и каждый хроматографический пик обусловлен несколькими пептидами с близкими временами выхода. Поскольку в условиях ЖХ/МС состав смеси в источнике ионов постоянно изменяется, пока идет запись спектра одного компонента, второй, а тем более третий и последующие могут пройти всю систему прибора без регистрации. Кроме того, повторный анализ того же образца часто приводит к измененным результатам, порой весьма существенно.

Этот аспект является главным недостатком метода зависимых сканирований: минорные компоненты смеси не удастся охарактеризовать [507]. Именно поэтому очень важна скорость сбора данных, и в качестве второго анализатора для регистрации тандемных спектров лидируют времяпролетные (разд. 6.7).

В вариантах множественных и независимых сканирований индуцируется фрагментация всех ионов в определенном интервале величин m/z вне зависимости от интенсивности пиков, с той лишь разницей, что в случае DIA обычный масс-спектр не регистрируется вовсе [508]. Кстати, частным случаем независимых сканирований можно считать метод МЗР (разд. 12.3), когда прибор настроен на детектирование и количественное определение заранее выбранного целевого компонента образца с известной величиной m/z . Когда выбирается некий протяженный интервал величин m/z , могут реализовываться два варианта. Если в этом интервале присутствует один явно доминирующий пик, оператор получает его тандемные спектры. Если же интервал представлен несколькими пиками, то результирующий тандемный масс-спектр будет представлять суперпозицию спектров этих компонентов и для работы с ними потребуются процесс деконволюции. Первая работа по скорострельному анализу смеси пептидов этим методом с записью спектров ДИС появилась в 2003 году [509]. На базе этого подхода фирмой Waters был создан стандартный метод MS^E на платформе прибора QTOF [510, 511]. Метод основан на чередующихся записях обычного масс-спектра и тандемного масс-спектра внутри определенного диапазона масс. Далее программное обеспечение относит фрагментные ионы к конкретным ионам-предшественникам с учетом хроматографического времени удерживания на основе масс-хроматографического подхода (разд. 12.1). Похожий метод (All Ion Fragmentation, AIF) используется и на орбитальных ловушках фирмы «Термо» [512]. Метод становится еще мощнее при добавлении узла ионной подвижности [513]. В таком варианте образовавшиеся ионы разделяются еще и на основе своей пространственной формы (разд. 8.4). Модификации и улучшения трех представленных подходов появляются ежегодно [506, 514].

7.4. Инверсия заряда

Еще один процесс, имеющий место при проведении экспериментов в режиме тандемной масс-спектрометрии, связан с потерей в результате активации соударением двух электронов и превращением отрицательных ионов в положительные

(схема 7.8). Первое сообщение о наблюдении такого процесса появилось в 1975 году [515], когда удалось зарегистрировать появление положительных ионов в результате активации соударением анион-радикалов ряда ароматических соединений.



Схема 7.8

Энергия, необходимая для процесса, изображенного на схеме 7.8, равна сумме энергий сродства к электрону и ионизации молекулы:

$$E = \text{СЭ}(\text{АБХУ}) + \text{ЭИ}(\text{АБХУ}). \quad (7.21)$$

В зависимости от приобретенной в результате соударения внутренней энергии образовавшиеся положительные ионы могут достичь детектора без распада или фрагментировать. Спектры инверсии заряда во многом напоминают спектры активации соударением соответствующих ионов, полученных в результате электронной ионизации.

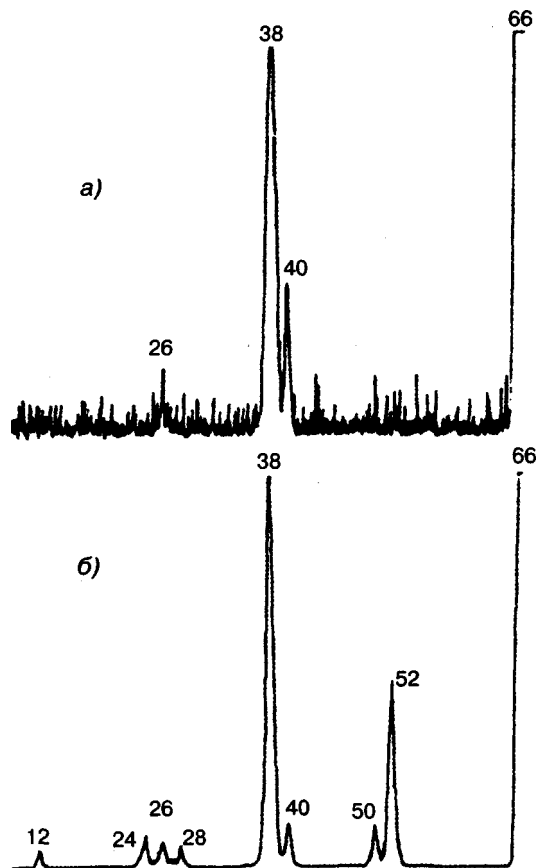


Рис. 7.19. Спектры активации соударением (а) и инверсии заряда (б) отрицательных ионов с m/z 66, образовавшихся из депротонированных молекул 2-диазо-2-цианоацетамида [447]

Существенным отличием является значительное уменьшение роли перегруппировочных процессов. Это связано с крайне коротким временем жизни таких инвертированных ионов ($\sim 10^{-15}$ сек). В этих условиях константы скоростей реакций простого разрыва связей существенно превосходят константы скоростей перегруппировочных процессов.

Метод инверсии заряда используется для решения трех задач.

1. Интенсификация процессов фрагментации для получения структурной информации. В качестве примера на рис. 7.19 представлены спектры активации соударением и инверсии заряда отрицательных ионов с m/z 66, образовавшихся из депротонированной молекулы 2-диазо-2-цианоацетамида. Очевидно, что во втором случае спектр значительно информативнее [447].
2. Генерирование катионов с необычными структурами. Например, инверсия заряда енолят-аниона ацетальдегида приводит к соответствующему катиону, который в обычных условиях нестабилен и перегруппировывается без энергии активации в ацетил-катион [516].
3. Генерирование и установление структур нейтральных частиц, образующихся в результате потери анионом первого электрона. Фактически речь идет о нейтрализации-реионизации (разд. 7.5), однако нейтрализуется отрицательный ион, а в результате реионизации образуется положительный ион [517].

7.5. Нейтрализация-реионизация

Методом изучения нестабильных нейтральных частиц является нейтрализация — реионизация (Neutralization-reionization). Если на пути следования пучка ускоренных ионов поместить камеру соударений, помимо процессов фрагментации, протекают и процессы перезарядки (см. выше). В частности, положительные ионы можно превратить в нейтральные частицы. Для активации такого процесса в камере соударений применяются атомы ксенона или металлы (Na, Hg) в парообразном состоянии. Использование металлов с очень низкой энергией ионизации увеличивает выход нейтральных частиц, однако их внутренняя энергия оказывается слишком высокой и вызывает фрагментацию. Кроме того, металлы в парообразном состоянии быстро загрязняют прибор. В настоящее время для осуществления нейтрализации используют самые разнообразные вещества. Чем ближе энергия ионизации этого вещества к энергии ионизации образующейся частицы, тем выше вероятность того, что эта частица «выживет» в течение эксперимента. Хороших результатов удалось добиться при использовании диметилдисульфида, аминов, окиси азота. Для нейтрализации отрицательных ионов чаще всего используется кислород [518].

В результате нейтрализации в камере образуются нейтральные молекулы и радикалы. Считается, что нейтрализация является вертикальным по Франку — Кондону процессом, т.е. образующиеся нейтральные частицы сохраняют структуры исходных ионов. На выходе непрореагировавшие ионы отклоняются специальным электродом, а нейтральные частицы продолжают следовать по начальной траектории и оказываются во второй камере соударений (рис. 7.20), где при столкновении с молекулами газа (например, смесь He/O₂) вновь происходит их ионизация путем перезарядки. В результате этого процесса наряду с ионизацией

происходит и фрагментация. Образующиеся ионы анализируются обычным образом. Этим методом генерируются и исследуются нейтральные частицы, живущие определенный промежуток времени [519–524]. Надо отметить, что зачастую они находятся в возбужденных состояниях. Обычно время между процессами перезарядки составляет около 10^{-6} сек. Благодаря тому, что многие ионы в газовой фазе имеют нетривиальные структуры, можно получать нейтральные частицы с такими же структурами. Если нестабильная в других экспериментальных условиях или неизвестная ранее частица получена в масс-спектрометре, она может образовываться (быть интермедиатом) и в других условиях: при протекании межзвездных процессов и реакций в конденсированной фазе (каталитические процессы).

Метод нейтрализации-реионизации обычно осуществляется на секторных приборах в условиях высокоэнергетических столкновений. В случае квадрупольных приборов исходные ионы должны дополнительно ускоряться, а конечные ионы — замедляться перед их разделением. Первичный пучок ионов должен быть достаточно мощным, поскольку общий выход процесса в целом составляет менее 0,1%.

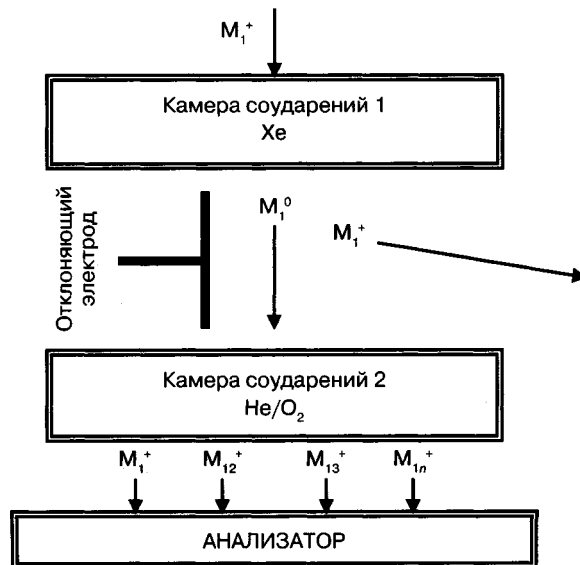


Рис. 7.20. Принципиальная схема эксперимента нейтрализации-реионизации

Спектры нейтрализации-реионизации оказываются сложнее спектров активации соударением. Это вызвано тем, что фрагментируют и нейтральная частица, и образовавшийся в результате реионизации ион. Для дифференцирования этих процессов приходится использовать специальные приемы. В частности, метод **различий в распаде нейтральной частицы и иона (NIDD — neutral and ion decomposition difference)** был предложен для экспериментов по генерированию нейтральных частиц из отрицательных ионов [525]. В этом варианте последовательно в идентичных условиях снимают спектры нейтрализации-реионизации и инверсии заряда. Во втором случае отрицательный ион в условиях эксперимента теряет два электрона и превращается в положительный, минуя стадию нейтрального фрагмента. Вычитая

второй спектр из первого, получают спектр продуктов диссоциации нейтральной частицы.

Ключевым моментом эксперимента является доказательство того, что нейтральная частица сохранила структуру исходного иона. Для этой цели сравнивают спектры активации соударением исходных ионов и ионов с той же массой, образовавшихся после реионизации. Идентичность этих спектров означает, что нейтральная частица сохраняет структуру своего предшественника.

Метод можно использовать и для анализа нейтральных частиц, образующихся при фрагментации ионов в камерах соударений. В таком варианте метод называется «диссоциативная ионизация, индуцированная столкновениями (*collision induced dissociative ionization, CIDI*)» [526] или «реионизация нейтрального фрагмента (*neutral fragment reionization, N_FR*)» [527]. В первом случае камера соударений не заполняется газом (реакции распада метастабильных ионов, разд. 2.3), во втором в качестве газа для активации соударением в первой камере, как правило, используют гелий, который не вызывает нейтрализации ионов. Это важное преимущество метода нейтрализации-реионизации по сравнению с обычной активацией соударением. В отличие от классического варианта МС/МС здесь можно установить структуру не только заряженного, но и нейтрального продукта реакции фрагментации. Надо только отклонить все заряженные продукты распада и направить нейтральные частицы во вторую камеру соударений, где происходит их ионизация. Благодаря такой технике удалось доказать, что потеря 27 единиц массы из молекулярного иона анилина обусловлена отщеплением не HCN, а HNC [528], что метилацетат на 80% отщепляет CH₃O, а на 20% — CH₂OH [529]. Были генерированы в газовой фазе нейтральные молекулы, не существующие в растворах: Y—CC—X (где X и Y—ОН или NH₂) и т.д. [530]. Зарегистрированы металлоорганические соединения с незаполненными лигандами валентностями [531], гипервалентные частицы H₃⁺ [532], D₃O⁺ [533] и др., Ван-дер-ваальсовы комплексы He₂ [534]. Метод с успехом использован для изучения полиатомных радикалов, соответствующих интермедиатам в процессах радиационных и химических повреждений ДНК [535]. Важных результатов удалось добиться в области металлоорганической и координационной химии [518, 536, 537].

ГЛАВА 8

МЕТОДЫ НА ОСНОВЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ И РОДСТВЕННЫЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

В этой главе речь пойдет о большой группе методов, связанных с использованием масс-спектрометра в качестве детектора, или методов, родственных масс-спектрометрии. Таких методов становится все больше, а их популярность основана на информативности, чувствительности и скорости получения информации.

8.1. Пиролитическая масс-спектрометрия

В классической масс-спектрометрии большое внимание уделяется сохранению исходной структуры анализируемого соединения. Поэтому спектры термолабильных образцов снимают при минимально возможной температуре или с помощью другого метода ионизации. Например, вместо ГХ/МС используют ЖХ/МС. Напротив, основной задачей пиролитической масс-спектрометрии (Pyrolysis/Mass spectrometry, Py/MS) является быстрое и эффективное термическое разложение веществ на более простые, которые подвергаются последующему анализу. При этом очень важно не перегреть образец, остановившись на образовании структурно значимых фрагментов исходного материала. В противном случае образуются небольшие молекулы, которые не позволяют сделать надежные выводы об исходной химической структуре анализируемой пробы. Сейчас, когда методы электрораспыления или МАЛДИ позволяют получать масс-спектры соединений с молекулярной массой в сотни тысяч и миллионы дальтон, метод пиролитической масс-спектрометрии используется в основном для анализа неразделимых смесей соединений: горючие сланцы, синтетические полимеры, гуминовые кислоты, микроорганизмы, другие биологические и геологические материалы. Пиролитическая масс-спектрометрия – это также один из основных методов анализа органического вещества в метеоритах, прежде всего в углеродистых хондритах [538]. Разнообразие молекулярного и изотопного состава вещества метеоритов затрудняет проведение анализа другими методами. Основы метода и его применение для анализа высокомолекулярных полимерных соединений представлены в монографии [539].

Пиролиз можно осуществить в самостоятельном приборе, а пиролизат затем перенести (например, в ловушке, охлаждаемой жидким азотом) в масс-спектрометр. Можно проводить пиролиз перед колонкой хроматографа или даже непосредственно в ионном источнике масс-спектрометра. В последнем случае получается только интегральный спектр, являющийся суперпозицией спектров всех соединений, образовавшихся в результате температурного разложения об-

разца. Во избежание появления продуктов окисления, маскирующих реальную картину, пиролиз принято вести в среде инертного газа или в вакууме. В качестве метода ионизации наиболее часто используют ИЭ, ХИ, полевую ионизацию, ионизацию лазером. Пиролитическая масс-спектрометрия, как правило, направлена на решение одной из двух задач:

- 1) установление структурных фрагментов очень сложных соединений;
- 2) сравнение образцов друг с другом (доказательство идентичности).

В первом случае желательно использовать комплексный метод типа ГХ/МС или ЖХ/МС, а во втором – предпочтительнее получать интегральный спектр. Такой подход отлично зарекомендовал себя, в частности, для сравнения микроорганизмов (разд. 11.6). В этом случае фактически структуры отдельных продуктов распада неважны, тогда как интегральный спектр можно рассматривать как «отпечатки пальцев» данного вида бактерий, вирусов, грибов и т.д. Идентичность двух образцов микроорганизмов друг другу устанавливают, таким образом, очень быстро и эффективно. Важно лишь во избежание ошибок строго контролировать условия проведения эксперимента. Они должны быть абсолютно идентичны по скорости нагрева, типу разогрева образца и температуре пиролиза. Для целей детального сравнения интегральных масс-спектров предложен ряд математических подходов [540, 541].

Использование масс-спектрометра как термогравиметрического детектора позволяет надежно доказать, какое именно соединение выделяется образцом в каждом из зарегистрированных по уменьшению массы процессов. Температуру в этом случае медленно поднимают до нескольких сот градусов.

Несколько большими скоростями нагрева характеризуется метод катодного разогрева (с помощью сопротивления). Для проведения такого анализа образец наносится непосредственно на проволоку из благородного металла. Проволока с образцом электрически программируемо нагревается до нужной температуры с нужной скоростью. Иногда для увеличения объема пробы ее помещают не непосредственно на проволоку, а в нагреваемую от нее кварцевую трубку. Такой подход хорошо зарекомендовал себя для анализа полимерных материалов.

Для получения спектров типа «отпечатков пальцев» наилучшие результаты получены при использовании индуктивного нагрева в точке Кюри (Curie-point inductive heating). Как уже отмечалось выше, для такого анализа первостепенное значение имеет воспроизводимость условий эксперимента. Точкой Кюри называется температура, при которой ферромагнетики теряют свои магнитные свойства. Например, для железа это происходит при температуре 770 °С, для никеля – 358 °С, для кобальта – 1120 °С. Когда проволока (фольга), изготовленная из ферромагнитного материала, помещается в радиочастотное электромагнитное поле, происходит ее быстрый разогрев со скоростью до 10^4 К/сек. Точка Кюри достигается за доли секунды. В этот момент материал теряет свои магнитные свойства, и нагрев прекращается. Однако, как только температура упадет на долю градуса, нагрев возобновляется. Если на проволоку (фольгу) нанести образец анализируемого материала, его пиролиз будет проходить при точно известной температуре.

Несколько пиролитических техник основано на лазерном нагреве образца [542]. Использование постоянного лазера, работающего в инфракрасном или видимом

диапазоне, позволяет проводить нагрев со скоростями, аналогичными достигаемым пиролизом в точке Кюри. Пятно лазера обычно имеет диаметр 150–200 микрон, а перемещая лазерный луч по поверхности образца, можно определять неоднородности его состава.

Максимальными скоростями нагрева характеризуется метод лазерной абляции, которую можно рассматривать как взрывной пиролиз. Пятно импульсного ультрафиолетового лазера диаметром 10–25 микрон вызывает локальный разогрев образца со скоростью до 10^6 К/сек. Образующаяся над поверхностью плазма состоит не только из молекул. В ней присутствуют радикалы, положительные и отрицательные ионы. Фактически, можно получить масс-спектр без дополнительной ионизации. Тем не менее в пиролитической масс-спектрометрии для получения полной картины используют дополнительный метод ионизации.

Поскольку в результате абляции молекулы поверхностного слоя образца переходят в газовую фазу, повторный импульс лазера, направленный в то же место, захватит молекулы второго слоя, затем третьего и т.д. Таким образом, можно получить информацию об изменениях состава образца от поверхности в глубину. Два этих подхода (поверхностное и глубинное сканирование) широко используются для решения криминалистических задач.

Метод успешно применяется для доказательства подлинности картин или для правильного проведения реставрационных работ [543]. Поскольку добавки к краскам хранились живописцами средних веков в глубокой тайне, установление присутствия на холсте тех или других соединений позволяет выявить принадлежность полотна к той или иной школе. Например, венецианские художники эпохи Возрождения использовали в качестве матрицы для красок белок яиц, белое вино и чесночный сок. При исследовании соскобов с их картин можно найти соответствующие полисахариды, глицериды, белки. Фламандские живописцы первыми стали использовать льняное масло. Соответственно, в спектре наблюдаются жирные кислоты. Характерные спектры дают добавки казеина, смол, восков и т.д. Проведение масс-спектрометрического эксперимента позволяет не только установить, какие добавки использовались живописцем, но и оценить результат эффектов старения.

И индуктивный нагрев в точке Кюри, и лазерные методы имеют свои преимущества и недостатки. Выбор метода определяется научной задачей и природой образца. Например, успех лазерных методов может быть ограничен типом поверхности образца или даже его цветом. Так, при анализе органических ископаемых лазерные методы имеют преимущество при работе с термически зрелыми образцами с большим количеством межмолекулярных сшивок. Напротив, менее зрелые образцы с большим количеством алифатических групп лучше анализировать индуктивным нагревом в точке Кюри, когда температура точно контролируется. Перегрев в этом случае ведет к излишней деструкции вещества и создает проблемы для структурных исследований [544].

Пиролиз может эффективно использоваться в сочетании с ГХ/МС для идентификации и количественного определения экотоксикантов (например, ПАУ) в сложных геолого-биологических матрицах (почвы, горючие сланцы, гумус и т.д.). Извлечение этих соединений из таких матриц растворителями весьма не-

эффективно, а разрушение макромолекул в условиях пиролиза позволяет высвободить связанные молекулы загрязняющих веществ [545]. Пиролитическая масс-спектрометрия эффективна и для решения экологических задач. Например, образование характеристических структурных фрагментов позволяет идентифицировать и количественно определять полиакриламиды, поливинилпирролидоны, карбоксиметил- и гидроксиэтилцеллюлозу, активно используемые современной промышленностью [546–548].

8.2. Реакция переноса протона

Реакция переноса протона (РПП, Proton Transfer Reaction, PTR) – это мощный масс-спектрометрический метод детектирования летучих органических соединений в следовых количествах в режиме реального времени. Пределы обнаружения метода для соединений в воздухе находятся на уровне пг/л, а время определения – 100 мс. Многочисленные области применения метода, включая анализы объектов окружающей среды, пищевых продуктов, исследования атмосферы, растений и т.д., представлены в работах [549–551]. Определенных успехов удалось добиться в биологических и медицинских исследованиях [552–554]. Метод РПП не требует предварительного концентрирования пробы, а его диапазон линейности составляет несколько порядков.

Метод был разработан в середине 1990-х годов [555]. Принципиальная схема масс-спектрометра для осуществления РПП представлена на рис. 8.1. Разряд в полом катоде в атмосфере паров воды генерирует ионы-реагенты H_3O^+ . Другие ионы (возможные нежелательные примеси), возникающие в условиях разряда (O^+ , OH^+ , N^+ , N_2^{++} , H^+ , H_2^{++} , H_2O^{++}), реагируют с молекулами воды с образованием тех же самых ионов H_3O^+ . Эти процессы протекают непосредственно в источнике и продолжаются в небольшом дрейфовом пространстве на выходе из источника. Важным отличием РПП масс-спектрометрии от аналогичных методов, например SIFT (разд. 8.3), является отсутствие необходимости установки ионного фильтра масс между источником и областью дрейфа. Это связано с конструкцией источника, который генерирует ионы-реагенты одного типа с высокой чистотой [549]. Например, доля ионов H_3O^+ составляет 99,5% [555]. Небольшое количество примесных ионов O_2^{++} и NO^+ в ионном потоке неизбежно в результате ионизации воздуха, проникающего в ионный источник.

В связи с тем, что ионный источник заполнен парами воды, протекает ионно-молекулярная реакция с образованием кластерных ионов $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}_3\text{O}^+$. Этот же процесс протекает в области дрейфа в связи с наличием паров воды в анализируемом воздухе. Определенная проблема заключается в том, что величина сродства к протону (СП) у кластеров воды существенно выше. Так, значение СП для молекулы воды 691 кДж/моль [556], а для димера воды – уже 808 ± 6 кДж/моль [557]. Последующее увеличение размера водного кластера приводит к дальнейшему росту СП, хотя инкремент уменьшается с каждой новой добавленной молекулой H_2O . Образование кластерных ионов ведет к неоднозначности реакции протонирования аналитов.

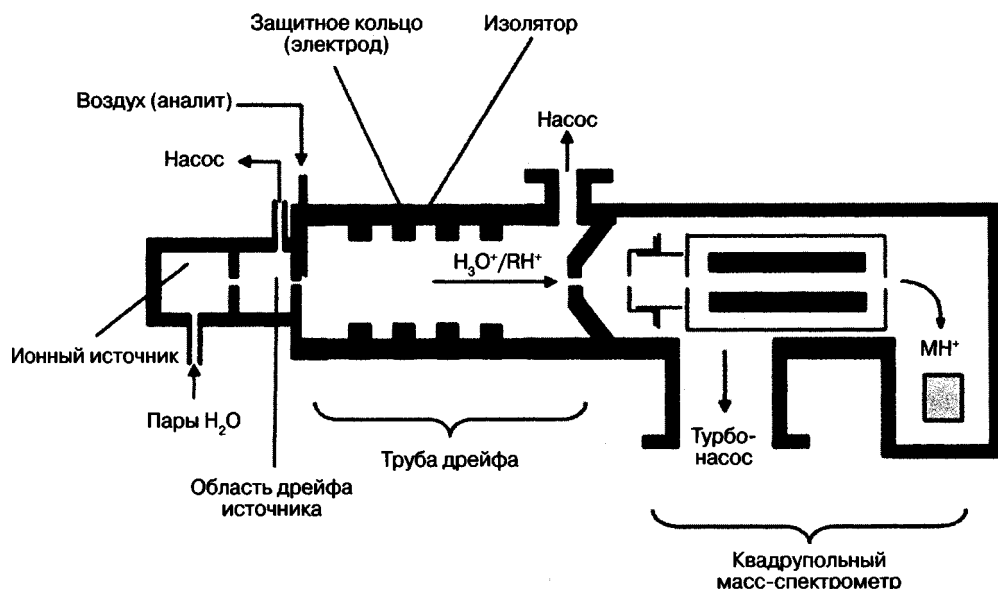
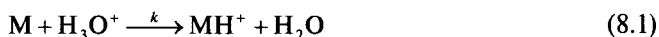


Рис. 8.1. Принципиальная схема масс-спектрометра для осуществления реакции переноса протона

В результате приложения электрического поля ионы из источника направляются в область дрейфа, в начало которой также вводится поток воздуха с веществами, предназначенными для анализа. Обычно эта область представляет собой последовательность нескольких металлических колец, разделенных тефлоновыми прокладками для поддержания требуемого давления и электроизоляции. Кольца связаны с цепью сопротивлений для разделения общего напряжения дрейфа на участки с равномерно повышающимся напряжением и созданием однородного электрического поля. Это поле заставляет ионы двигаться вдоль трубки, взаимодействуя с соответствующими компонентами газовой смеси. Ускорение ионов за счет поля тормозится столкновениями с молекулами газа. В результате ионы в области дрейфа приобретают стационарную скорость движения. Эта скорость определяется соотношением двух параметров: E/N , где E – напряженность электрического поля, N – плотность газа (в частицах на см^{-3}). Увеличение этого отношения приводит к разрушению кластеров $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}_3\text{O}^+$, что является положительным моментом, поскольку несольватированный ион H_3O^+ может протонировать большее число соединений. Однако одновременно возрастает и степень фрагментации образующихся ионов аналита, что приводит к усложнению спектров. В связи с этим обычно величина E/N лежит в диапазоне 100–140 таунсенд (1 таунсенд = $10^{-17} \text{ см}^2/\text{В}$). Анализ ионов осуществляется на квадрупольном или времяпролетном анализаторе [558]. Методы масс-спектрометрии высокого разрешения и тандемной масс-спектрометрии, безусловно, позволяют получать более надежные результаты. Замыкает систему электронный умножитель.

Реакция иона гидроксония с молекулой аналита приводит к его протонированию по реакции (8.1).



Концентрация ионов H_3O^+ после прохождения области дрейфа может быть выражена уравнением (8.2):

$$[H_3O^+] = [H_3O^+]_0 \exp(-k[M]t), \quad (8.2)$$

где $[H_3O^+]_0$ – количество ионов H_3O^+ в отсутствие M , а t – время реакции. Концентрация ионов MH^+ , образующихся по реакции (8.1), может быть выражена уравнением (8.3):

$$[MH^+] = [H_3O^+]_0 [1 - \exp(-k[M]t)] \approx [H_3O^+]_0 [M]kt. \quad (8.3)$$

Приближенная форма уравнения (8.3) справедлива лишь в том случае, если незначительная часть исходных ионов H_3O^+ реагирует в области дрейфа. Следовательно, для проведения количественного определения необходим большой избыток ионов H_3O^+ , причем концентрация ионов MH^+ в этом случае будет линейно расти с концентрацией M в анализируемом воздухе.

Интенсивность зарегистрированных сигналов ионов H_3O^+ и MH^+ пропорциональна концентрации этих частиц. Отсюда может быть получена абсолютная концентрация аналита M в пробе (уравнение (8.4)). Масс-спектрометр дает информацию об интенсивностях пиков ионов H_3O^+ и MH^+ , t – время, за которое ионы H_3O^+ пролетают область дрейфа, а k – константа скорости реакции H_3O^+ с аналитом:

$$[M] = [MH^+]/[H_3O^+]kt. \quad (8.4)$$

Широкому распространению масс-спектрометрии на базе реакции переноса протона мешает ограниченный набор классов соединений, который можно изучать этим методом. Поскольку ионом реагентом является H_3O^+ , ионизируются лишь молекулы с величиной сродства к протону больше, чем у воды. Этот факт является преимуществом для проведения анализов органических загрязнений воздуха, поскольку все основные соединения этого типа ионизируются, а все неорганические газы атмосферы нет. В результате атмосферный воздух может служить буферным газом, что существенно упрощает анализ. В качестве проблемных аспектов РПП можно отметить негативное влияние влажности воздуха [559] и высокого содержания двуокиси углерода [560].

Использование источника с возможностью переключения газов (вода/аммиак) позволяет делать определенные выводы по качественному и количественному составу воздушных проб благодаря разности в величинах СП этих соединений. Ион H_3O^+ протонирует молекулы с величиной СП больше 691 кДж/моль, а ион NH_4^+ – только молекулы с величиной СП больше 854 кДж/моль. Во втором случае селективность ионизации возрастает, а избыточная энергия протонированных молекул аналитов уменьшается, т.е. усложняющая спектры РПП фрагментация подавляется. Описано также использование других реагентов химической ионизации (NO^+ и O_2^{++}). Метод был назван **масс-спектрометрия с реагентами химической ионизации** (chemical ionization reagent mass spectrometry, CIR-MS) [561].

Возможность быстрого переключения по ходу анализа между ионами-реагентами H_3O^+ и NO^+ и O_2^{+} привела к расширению набора анализируемых молекул за счет перезарядки и ряда других ионно-молекулярных реакций [562]. Такая модификация метода РПП была названа **переключением ионов-реагентов** (Switchable Reagent Ions, SRI). Так, используя в качестве газа-реагента вместо воды чистый кислород (ион-реагент O_2^{+}), можно расширить круг анализируемых соединений за счет реакции перезарядки. Энергия ионизации O_2^{+} 12,07 эВ дает возможность ионизировать, например, этилен и ацетилен (ЭИ 10,5 и 11,4 эВ соответственно). Выбор в качестве газа-реагента вещества с еще большей ЭИ долгое время казался неприемлемым, поскольку в этом случае все генерируемые ионы-реагенты будут взаимодействовать с кислородом воздуха с образованием все тех же ионов O_2^{+} . Поскольку процентная доля кислорода в воздухе около 20%, для ионизации молекул аналитов исходных ионов практически не останется. Выходом из этой ситуации является разбавление воздушного образца газом-носителем с высокой ЭИ. Хорошим вариантом оказался криптон [563] с ЭИ 14,00 эВ. Метод с воздушно-криптоновой смесью дает возможность использовать для ионизации как перенос протона, так и перенос заряда. Детектируемыми становятся и ряд неорганических газов, например CO , NO_x , CO_2 . Чувствительность метода с криптоном для ароматических субстратов в 2–3 раза лучше, чем с водой. Важно подчеркнуть, что, если в случае реакции протонирования ионом H_3O^+ выходы ионных продуктов примерно одинаковы для всех соединений, ионные выходы для реакции перезарядки с Kr^{+} могут отличаться более чем на порядок в зависимости от природы аналитов. В качестве недостатка можно отметить, что при ионизации Kr^{+} заметными становятся побочные реакции. В частности, даже в случае бензола ион с m/z 77 оказывается интенсивнее, чем с m/z 78, а в случае метана ион с m/z 15 существенно интенсивнее, чем с m/z 16.

Альтернативным вариантом является использование для соединений с низкой величиной сродства к протону реакции с гидроксид-ионом OH^- . Эти ионы могут генерироваться в обычном для РПП источнике ионов, заполненном парами воды. Безусловно, как и в случае ионов гидроксония, они взаимодействуют с молекулами воды, образуя ионные кластеры $(\text{H}_2\text{O})_n\text{OH}^-$. За счет простой смены полярности в источнике, трубке дрейфа и масс-спектрометре можно детектировать отрицательные ионы аналитов, образующиеся в результате взаимодействия их молекул с ионами $(\text{H}_2\text{O})_n\text{OH}^-$. Авторы [564] назвали эту модификацию метода РПП **масс-спектрометрией с реакцией экстракции протона** (proton-extraction-reaction mass spectrometry, PER-MS). Регулируя отношение напряженности электрического поля (E) и плотности газа (N) в области дрейфа, можно создавать условия для образования исключительно депротонированных молекул (низкие величины E/N) или для инициирования фрагментации (высокие величины E/N). Несколько усложняют картину возможные побочные реакции. Например, в спектре пропаналя регистрируются пики ионов $[\text{M} - \text{H} + \text{O}]^+$. В любом случае, комбинирование информации, получаемой в условиях РПП в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов и не требующей какой-либо перестройки прибора, дает возможность расширить круг соединений и повысить надежность определения.

Хотя основным применением РПП является анализ летучих соединений, описаны эксперименты, демонстрирующие применимость этого подхода и для нелетучих соединений [565]. В этом случае РПП подвергаются нейтральные молекулы десорбируемые с поверхности образца лазерным излучением. Метод назван **лазерной десорбцией — реакцией переноса протона** (ЛД-РПП). Показана его применимость для анализа небольших сахаров и пептидов [565].

8.3. Масс-спектрометрия выбранных ионов в потоке

Метод масс-спектрометрии выбранных ионов в потоке, МСВИП (Selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS), впервые описан в 1976 году [566], став стандартным методом изучения ионно-молекулярных реакций в газовой фазе. Это метод количественного определения летучих органических соединений, основанный на реакции предварительно выделенного иона-предшественника (как правило, H_3O^+ , NO^+ , O_2^+) с молекулами аналитов в следовых количествах в строго определенный промежуток времени в потоке гелия в трубе дрейфа. Метод работает в режиме реального времени, т.е. ответ об уровнях летучих соединений в газовой фазе может быть получен в течение нескольких секунд. Возможность очень быстрого переключения с одного иона-реагента на другой дает возможность получать комплементарные спектры и, таким образом, расширять круг анализируемых соединений и различать изомеры. Он во многом схож с реакцией переноса протона (разд. 8.2), но между источником и областью дрейфа располагается квадруполь, который позволяет пропустить в реакционную область только ионы определенного состава. Это дает возможность проводить чистые эксперименты, однако чувствительность метода оказывается несколько хуже. Первые десятилетия метод эффективно использовался для изучения кинетики процессов в межзвездном пространстве и атмосфере Земли [567, 568], в результате чего была создана представительная база данных по фундаментальным параметрам ионно-молекулярных реакций. Очень важно, что приборы МСВИП производятся не только в лабораторном, но и в переносном варианте, что позволяет проводить замеры в полевых условиях [569].

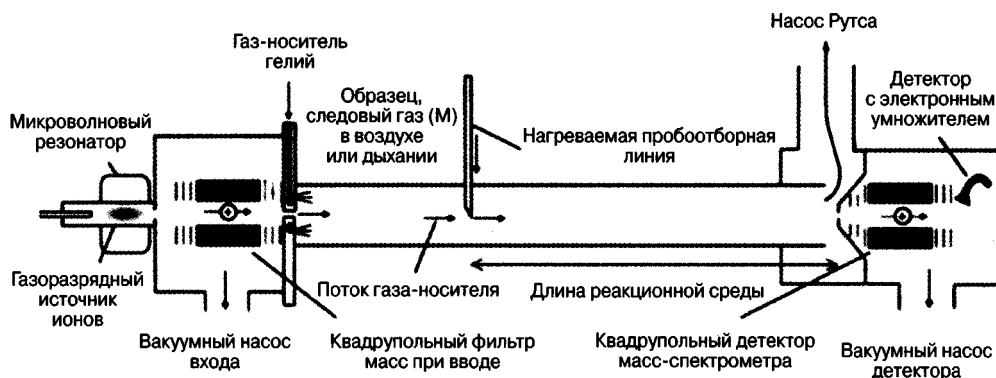


Рис. 8.2. Принципиальная схема метода масс-спектрометрии выбранных ионов в потоке

Принципиальная схема метода представлена на рис. 8.2. Ионы, образовавшиеся в источнике, направляются в квадруполь, через который пропускаются исключительно ионы с конкретной величиной m/z , выбранные для осуществления последующих реакций. Эти ионы оказываются в потоке газа-носителя (обычно гелий давлением 1 мм рт.ст.), которым переносятся вдоль трубы дрейфа (30–100 см) при температуре 300 К (если нет специальной задачи). Через отверстие диаметром 0,3 мм ионы попадают в масс-спектрометр, а далее на детектор. Газ-реагент (в данном случае это аналит) поступает в трубу дрейфа через пробоотборную линию, снабженную высокоточным измерителем потока. Его молекулы реагируют с известными из кинетических измерений скоростями с ионами, генерированными в источнике, с образованием характеристичных ионов-продуктов. Интенсивности пиков первичных выбранных ионов из источника и ионов-продуктов регистрируются масс-спектрометрически с учетом потока аналита (плотности газа в частицах на см^{-3}). Коэффициенты скорости реакции рассчитываются по уравнению (8.5). Не сложно учесть также и ситуации, когда образуется несколько ионов-продуктов [570]. Следует подчеркнуть, что уравнение (8.5) справедливо, когда речь идет о незначительных уровнях аналита в анализируемой воздушной смеси, и расход первичных ионов практически незаметен.

$$[\text{MH}^+]_t = k[\text{H}_3\text{O}^+][\text{M}]tD_e \quad (8.5)$$

t – время реакции, D_e – коэффициент диффузии.

Коэффициент диффузии достаточно легко вычислить, причем эта величина равна 1, если диффузионные потери ионов-предшественников и ионов-продуктов идентичны. Этот коэффициент тем больше отличается от единицы, чем больше масса иона-продукта по сравнению с массой иона-предшественника. Таким образом, согласно уравнению (8.5), интенсивность иона-продукта прямо пропорциональна числу молекул газа-реагента (аналита). Следует еще раз подчеркнуть, что аналит должен быть в следовых количествах. В противном случае метод не может использоваться для анализа мультикомпонентных систем (например, анализ выдыхаемого воздуха), когда не ясно, каким именно компонентом смеси обусловлена потеря первичных ионов-реагентов и какие вторичные процессы возможны. Воспроизводимость результатов весьма высока, а их разброс (для следовых анализов) не превышает нескольких процентов [571].

Безусловно, точный расчет концентрации аналита должен производиться с учетом дискриминации по массе квадрупольного анализатора, образования кластерных ионов гидроксония $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}_3\text{O}^+$, возможности образования нескольких ионов при взаимодействии иона-реагента с молекулой аналита и ряда других аналитических аспектов. Далеко не во всех случаях реакция с H_3O^+ в трубе дрейфа приводит к образованию протонированных молекул. Иногда они оказываются нестабильными и фрагментируют с образованием одного или нескольких ионов. В частности, как и в случае химической ионизации (разд. 5.2), взаимодействие иона H_3O^+ с молекулой третичного спирта приводит к элиминированию молекулы воды и образованию углеводородного фрагментного иона [572]. Вероятность образования нескольких ионов из одной молекулы достаточно высока и определяется ее структурой. Для

количественного определения необходимо установить вклад каждого возможного образующегося первичного (вторичного) иона в полный ионный ток, генерируемый исследуемой молекулой. Важным преимуществом метода над альтернативными является отсутствие необходимости ежедневной калибровки или использования стандартов. Это связано с тем, что МСВИП базируется на кинетике известных ионно-молекулярных процессов с установленными константами скорости. В качестве недостатка следует отметить, что, поскольку метод основан на реакциях ионов-реактивов (H_3O^+ , NO^+ , O_2^{++}) с молекулами летучих соединений в длинной реакционной трубке, в спектре часто наблюдаются интенсивные пики неустановленных ионов.

Пределы обнаружения органических соединений методом МСВИП достигают единиц ppt. Эксперименты можно проводить, как и в классических вариантах масс-спектрометрии, в режиме нецелевого (скрининг всех соединений в воздушной пробе) или целевого анализа, когда заранее известны интересующие исследователя аналиты и прибор регистрирует только заданные значения m/z (мониторинг заданных ионов). В последнем случае чувствительность метода существенно повышается (гл. 12).

Основные приложения метода масс-спектрометрии выбранных ионов в потоке связаны с мониторингом летучих органических соединений в воздухе, в автомобильных выхлопах, с неинвазивной диагностикой заболеваний путем анализа выдыхаемого воздуха или анализом паровой фазы над конденсированной пробой (headspace). Поэтому метод активно применяется в экологических, биологических, медицинских исследованиях. Он полезен для сельского хозяйства и пищевой промышленности [573–576]. Метод МСВИП очень удобен и для фундаментальных исследований, например в области катализа. Осуществление в трубке дрейфа газофазных ионно-молекулярных процессов и исследование каталитических циклов обсуждается в обзоре [577].

Подробнее о методе SIFT можно прочитать в представительных обзорах [569, 575, 578].

8.4. Спектрометрия ионной подвижности¹

Метод спектрометрии ионной подвижности (Ion mobility Spectrometry), ранее часто называемый плазменной хроматографией, был впервые описан Коэном и Карасеком [579] в 1970 году, хотя, несколько раньше эксперименты с трубкой дрейфа и внешним источником ионов были проведены в группе Хастеда [580]. Если в конце системы расположен один из классических анализаторов масс, метод можно рассматривать в качестве тандемного, хотя на первой стадии разделение ионов идет не по их массам, а по их структурам (формам), т.е. метод ионной подвижности может работать и самостоятельно, и как первая ступень разделения сложной смеси для масс-спектрометрического анализа. Метод позволил получить интересные результаты при изучении электронных состояний ионов, геометрии и структуры металлических и углеродных кластеров, ионов органических молекул, включая биомолекулы и т.д. Информативность спектрометрии ионной подвижности уступает

¹ Раздел подготовлен при участии Алексея Александровича Сысоева.

современным масс-спектрометрическим методам, однако результаты могут быть весьма полезными как сами по себе, так и в сочетании с полученными другими методами. В настоящее время существует несколько видов метода [581].

8.4.1. Дрейфовая спектрометрия ионной подвижности

Метод дрейфовой спектрометрии ионной подвижности основан на разделении ионов при их движении под действием электрического поля через буферный газ при атмосферном и пониженном давлении. Скорость дрейфа ионов индивидуальна и определяется сечением столкновения этих ионов с молекулами дрейфового газа. Она зависит от напряженности электрического поля и внешних условий (температура, давление). Электрическое поле ускоряет ион, а столкновения с молекулами газа замедляют его движение. В результате этих двух процессов создаются условия для равномерного поступательного движения иона, которое характеризуется величиной скорости дрейфа v_d . Подвижность иона — это отношение скорости дрейфа к напряженности приложенного электрического поля (уравнение (8.6)):

$$K = v_d/E. \quad (8.6)$$

Параметром, определяющим скорость иона в трубе дрейфа, является отношение напряженности электрического поля к плотности буферного газа (E/N). При малых значениях E/N , когда скорость дрейфа невелика по сравнению со скоростью теплового движения ионов, их подвижность не зависит от напряженности поля. Это приближение справедливо для случая слабого поля (low field limit). Если скорость дрейфа значительно превышает скорость теплового движения (случай сильного поля, high-field limit), подвижность зависит от величины E/N , и ионы могут в определенной степени выравниваться в трубе дрейфа. Так как измерение подвижности ионов преследует цель получить о них определенную структурную информацию, эксперименты обычно проводят в слабопольном режиме. В качестве буферного газа используют гелий, азот, воздух и т.д. Разрешающая способность метода определяется минимальными различиями в подвижности, необходимыми для разрешения пиков соединений смеси. Метод очень быстрый. Характерные времена разделения по времени дрейфа составляют десятки микросекунд.

Принципиальное устройство прибора для измерения ионной подвижности включает источник ионов, область дрейфа, анализатор и детектор (рис. 8.3). Источник ионов может быть как внешним, так и внутренним. Описаны эксперименты с использованием практически всех известных методов ионизации. Например, российско-финский дрейфовый спектрометр ионной подвижности высокого разрешения с детектором на основе коллектора ионов [582] при длине области дрейфа 13,5 см обеспечил разрешающую способность по подвижности до 100 и простое переключение между различными режимами ионизации (ИЭР, ХИАД, ФИАД и радиоактивная ионизация). Для измерения времени дрейфа важно, чтобы ионы вводились в трубу узкими группами. Поэтому хорошие результаты получаются, например, при использовании МАЛДИ (разд. 5.15), когда ионы образуются под действием короткого лазерного импульса.

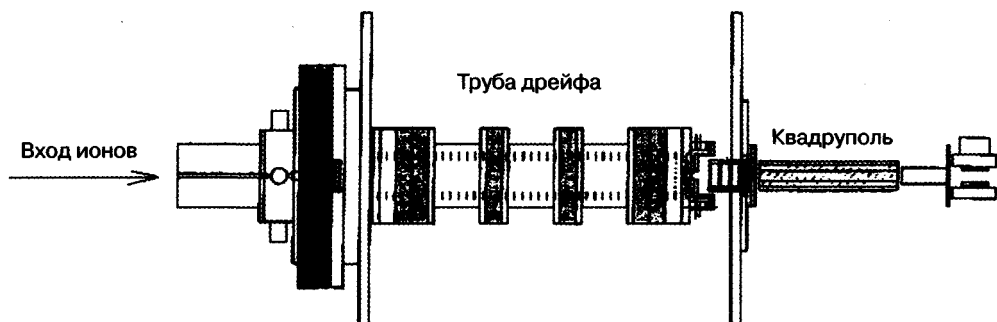


Рис. 8.3. Принципиальная схема прибора для измерения ионной подвижности

В варианте низкого разрешения (10–20) используют низкое давление буферного газа (< 10 мм рт.ст.) и напряженность электрического поля ~ 10 В/см. Длина трубы дрейфа в этом случае составляет несколько десятков сантиметров. При пониженном давлении (несколько торр) можно получить и более высокое разрешение. Например на 2-метровой трубе было получено разрешение 100 [583]. Следует отметить, что приборы с пониженным давлением используют только с масс-спектрометрами в гибридных приборах.

В варианте высокого разрешения (200–400) используют давление буферного газа ~ 500 мм рт.ст., напряженность электрического поля ~ 500 В/см и трубы дрейфа длиной до нескольких метров. Разрешающая способность ограничена за счет диффузии ионного пучка при его движении по трубе дрейфа. Уравнение для определения разрешения метода было предложено в 1975 году [584]:

$$R = \frac{t}{\Delta t} = \sqrt{\frac{LEze}{16K_B T \ln 2}}, \quad (8.7)$$

где L – длина трубы дрейфа, E – напряженность электрического поля, ze – заряд иона, T – температура, K_B – константа Больцмана.

Для повышения разрешающей способности можно увеличивать длину трубы и напряженность поля или уменьшать температуру проведения эксперимента. Уменьшение температуры действительно приводит к улучшению разрешения, но эффективность этого подхода невелика. Например, понижение температуры с 298 до 77 °К приводит к повышению разрешения всего в два раза. Удлинение трубы также имеет ограничения, поскольку при движении ионный пучок расширяется в результате диффузии. При определенной длине дрейфа ионы начинают гибнуть на стенках. Не является панацеей и напряженность поля. Для того чтобы работать в режиме слабополевого предела, необходимо одновременно с увеличением напряженности увеличивать и давление буферного газа. Высокое давление заставляет использовать высокий потенциал для ввода ионов в трубу дрейфа. Соударения ионов, обладающих высокой кинетической энергией, с атомами газа ведут к переходу части энергии движения во внутреннюю, в результате чего инициируется фрагментация.

Эффект активации соударением может сыграть и положительную роль. Поскольку «горячие ионы» образуются на входе в область дрейфа, именно здесь

возможны процессы их изомеризации или распада. При дальнейшем движении по трубе избыточная энергия быстро уменьшается в результате новых многочисленных столкновений с молекулами газа. Поэтому длина всей трубы может быть использована для разделения изомеризованных и фрагментных ионов. Варьирование потенциала ввода позволяет получать информацию об энергии активации процессов изомеризации и диссоциации. Аналогичные энергетические параметры можно получить и при варьировании температуры эксперимента.

Поскольку время движения иона в трубе дрейфа определяется усредненным значением сечения ионно-молекулярных взаимодействий, важнейшим параметром оказывается геометрия иона. Чем сильнее скручен ион, тем быстрее он достигает детектора. Именно на этом принципе основано изучение структуры и геометрии ионов. Например, четыре пика в спектре иона C_{36}^+ [585] свидетельствуют об образовании в источнике четырех типов этих ионов, которым можно приписать структуры фуллерена, графитовой плоскости, моноциклического и бициклического колец. Увеличение потенциала ввода, увеличивая внутреннюю энергию ионов, ведет к изменению в соотношении форм ионов C_{36}^+ . В частности, бициклическая структура изомеризуется в моноциклическую благодаря меньшему напряжению последней. Однако для изомеризации в фуллерен повышения потенциала ввода оказывается недостаточно. Для реализации такого процесса необходимы более тяжелые кластеры, например C_{60}^+ [586], или металлофуллерены [585]. Кстати, практически идентичные времена дрейфа для C_{36}^+ и LaC_{36}^+ означают, что металл расположен внутри сферы.

Изучение геометрии ионов белков в газовой фазе позволяет изучать внутримолекулярные взаимодействия [587]. Например, исследование геометрии ионов цитохрома С, полученных методом термораспыления (разд. 1.5.4), в зависимости от величины заряда, температуры и потенциала ввода показали следующее. Для ионов с небольшим зарядом (от +4 до -7) при комнатной температуре и малой величине потенциала ввода характерна более свернутая форма по сравнению с существующей в водных растворах. Это объясняется тем, что растворитель препятствует плотной упаковке глобулярных белков, так как полярные боковые цепи направлены в растворитель для увеличения взаимодействия, а молекулы воды могут проникать в полости глобул. В отсутствие растворителя боковые цепи располагаются на поверхности глобул, и белок существует в более плотной форме. С увеличением заряда иона (от +4 до +20) происходит увеличение его размера, т.е. его форма становится все менее компактной, ион раскрывается. В этом случае кулоновское отталкивание успешно конкурирует с внутримолекулярными взаимодействиями. Аналогичные процессы раскрытия глобул происходят при увеличении температуры эксперимента или потенциала ввода.

Спектрометрия ионной подвижности позволяет также изучать реакции ионов при добавлении к буферному газу реакционноспособных частиц. Например, ввод в трубу дрейфа паров D_2O позволяет изучать эффективность Н-Д обмена для ионов белков и пептидов конкретной геометрии.

В 2012 году в НИЯУ МИФИ впервые был создан гибридный прибор на основе комбинации дрейфового спектрометра ионной подвижности с секторным время-пролетным масс-анализатором с ортогональным ускорением [588]. Такой подход

позволил обеспечить, например, для ионла достижение абсолютного порога обнаружения $7 \cdot 10^{-15}$ моль за 100 сек, т.е. рекордной величины при оперативном анализе.

Важным преимуществом дрейфовой спектрометрии ионной подвижности является возможность прямого определения подвижности ионов, из которой можно вывести среднее значение сечения столкновений, характеризующее размер иона. Так, метод прецизионного определения приведенной подвижности ионов основан на применении галогенидов тетраалкиламмония в качестве эталона [588]. Метод позволяет улучшить точность определения приведенной подвижности до величины 0,3–0,6% по сравнению с 1–2%.

Дрейфовые спектрометры ионной подвижности широко используются для детектирования взрывчатых веществ и наркотиков в аэропортах, обнаружения химического оружия, мониторинга загрязнения воздуха в промышленности и даже в атмосфере системы жизнеобеспечения на международной космической станции. Представительный список опубликованных результатов прикладных и фундаментальных исследований методами спектрометрии ионной подвижности приводится в обзоре [589]. Продемонстрированы возможности метода для детектирования взрывчатых веществ, лекарственных препаратов, компонентов химического оружия, органических загрязнений окружающей среды [590, 591]. Например, он может использоваться для разделения ионов изомерных полициклических ароматических углеводородов [592], которые характеризуются очень близкими масс-спектрами. В качестве примера применения спектрометрии ионной подвижности/масс-спектрометрии с секторным электростатическим времяпролетным анализатором можно привести анализ новых синтетических наркотиков [593]. Ряд соединений этой группы легко идентифицируются методами ИЭР и ХИАД за 100 секунд. Пороги обнаружения составили 10^{-12} – 10^{-9} .

8.4.2. Спектрометрия приращения ионной подвижности

В последние годы проведено много исследований с использованием спектрометрии приращения ионной подвижности [594]. Прибор спектрометрии приращения ионной подвижности (СПИП) представляет собой ионный фильтр, использующий для разделения ионов суперпозицию постоянного и несимметричного по полярности переменного электрического поля. В СПИП ионы вводят в камеру разделения между двумя проводящими электродами в потоке сухого газа-носителя (воздуха). Под действием переменного поля ионы мигрируют в направлении одного из электродов с определенной скоростью. Постоянное электрическое поле компенсирует дрейф, позволяя только определенным ионам пройти через камеру разделения к коллектору. Спектр ионного тока, называемый ионограммой, определяется зависимостью ионного тока коллектора от величины электростатического поля. Подобно квадрупольному масс-спектрометру прибор СПИП в каждый момент времени пропускает только ионы, которые характеризуются близкой разностью подвижностей в сильных и слабых полях. Такой прибор не нуждается в формировании ионных пакетов, что повышает ионный ток в режиме непрерывного детектирования.

Разрешающая способность в СПИП обычно определяется по пику аналитического сигнала:

$$R = V/\delta V, \quad (8.8)$$

где V – компенсационное напряжение, δV – диапазон компенсационного напряжения, соответствующий ширине пика на полувысоте. Используемые электроды могут иметь форму пластин (планарная геометрия или FAIMS – High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry) или коаксиальных цилиндров (цилиндрическая геометрия или DMS – Differential mobility spectrometry). СПИП с планарной геометрией (FAIMS) характеризуется более высокой разрешающей способностью (более 300 [595]), но меньшей чувствительностью, чем СПИП с цилиндрической геометрией (DMS) [596]. Недостатком метода спектрометрии приращения ионной подвижности является невозможность получения информации о сечении столкновения ионов изучаемых соединений с молекулами дрейфового газа. Спектрометры приращения ионной подвижности работают при атмосферном давлении и благодаря этому нашли широкое самостоятельное применение.

8.4.3. Спектрометр ионной подвижности на основе бегущей волны

В этом варианте прибора [597, 598] ионы разделяются на группу ионных сгустков по подвижности в ячейке с радиочастотным многокольцевым ионопроводом «бегущей волны» (рис. 8.4).

Движение ионов основано на наложении постоянного потенциала на радиочастотный потенциал соответствующего электрода с последующим его переключением через заданное время на соседний электрод, и так далее на протяжении всего ионопровода. Таким образом создается смещаемое электрическое поле или «бегущая волна», с помощью которой ионы могут перемещаться к детектору. Достоинством метода является его чувствительность, а недостатками – низкая разрешающая способность (около 40) и меньшая точность определения сечения столкновения ионов пробы с молекулами дрейфового газа. Спектрометры на основе «бегущей волны» работают при пониженном давлении и применяются только в комбинации с масс-спектрометром.

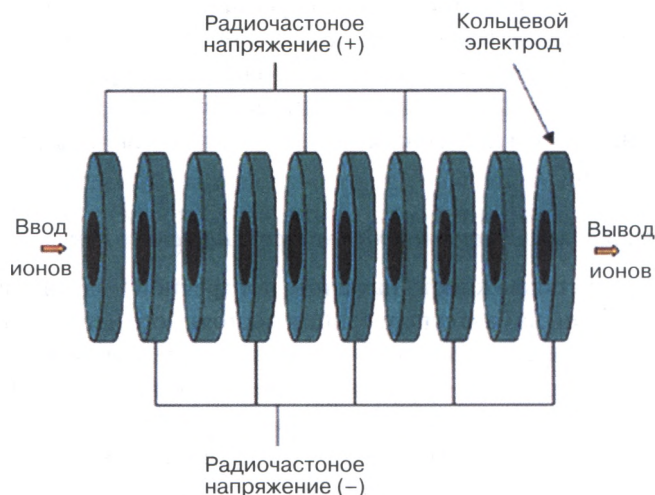


Рис. 8.4. Схема спектрометра ионной подвижности «бегущей волны»

8.4.4. Улавливающий спектрометр ионной подвижности

В улавливающем спектрометре ионной подвижности [599, 600] ионы удерживаются на месте электрическим полем в стационарном газовом потоке. В поперечном направлении ионы фокусируются в направлении оси радиочастотным полем, подобно ионной воронке. Такая схема (рис. 8.5) позволяет удерживать ионы в пространстве с координатами, соответствующими их подвижностям, и последовательно извлекать для детектирования.

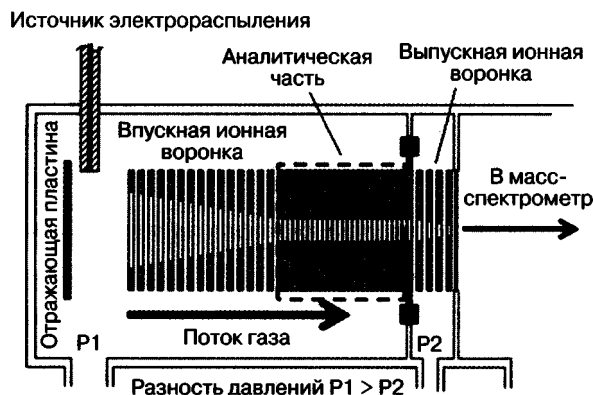


Рис. 8.5. Схема улавливающего спектрометра ионной подвижности

Достоинствами улавливающего спектрометра ионной подвижности являются возможность определения сечения столкновений для ионов исследуемого вещества с молекулами газа и достаточно высокая разрешающая способность (100–250), определяемая уравнением (8.9):

$$R = K/\Delta K = (V_{out} - V_{elut})/\Delta V_{elut} \quad (8.9)$$

где V_{elut} — напряжение на входе в аналитическую часть, V_{out} — напряжение на выходе из аналитической части во время извлечения ионов рассматриваемого диапазона подвижностей, ΔV_{elut} — ширина пика на полувысоте [600]. Как и спектрометры на основе «бегущей волны», улавливающий спектрометр ионной подвижности работает при пониженном давлении и может применяться только в комбинации с масс-спектрометром.

8.4.5. Спектрометр ионной подвижности на основе поперечной модуляции

Спектрометр ионной подвижности на основе поперечной модуляции работает при атмосферном давлении на базе суперпозиции постоянного и переменного электрических полей, пропуская постоянный пучок ионов определенной подвижности [601]. Важным достоинством метода является разделение ионов в соответствии с их истинной подвижностью, а не нелинейными эффектами, как, например, в СПИП.

Ионы движутся в продольном направлении под воздействием продольного поля со скоростью, пропорциональной их подвижности, и проходят анализатор. Если время пребывания в анализаторе находится в резонансе с периодом переменного

поперечного электрического поля, траектории выделенных по подвижности ионов первую половину цикла удаляются от плоскости симметрии системы, а вторую половину цикла приближаются к ней, и в результате сходятся в области выходной щели. Ионы с другой подвижностью при этом не фокусируются (рис. 8.6).

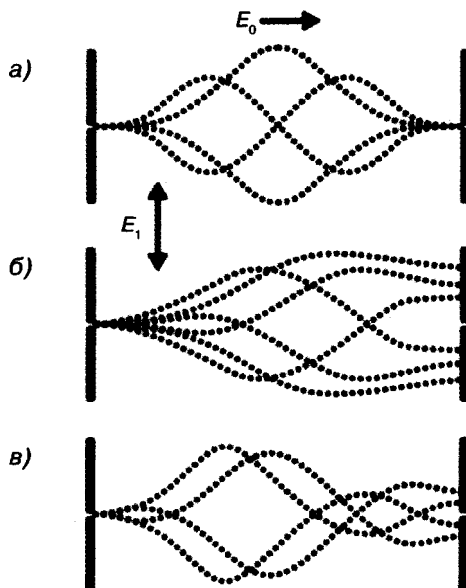


Рис. 8.6. Траектории ионов различной подвижности: ионы выбранной подвижности (а), ионы более высокой подвижности (б), отстающие ионы (в)

Разрешение одноступенчатой схемы устройства — 55 [601], а ее недостатком является возможность наложения сигнала от соединений с большей подвижностью (рис. 8.10), что приводит к резонансным пикам для одного и того же соединения. Этот эффект устраняется в варианте двухступенчатой схемы спектрометра [602]. Во вторую ступень напускается газ с модифицирующей добавкой, в разной степени изменяющей подвижность компонентов смеси, который отклоняет значения подвижности мешающих соединений от резонансных значений.

Метод обладает недостаточно высокой разрешающей способностью, но позволяет напрямую определять сечения столкновений для ионов исследуемого вещества с молекулами газа. Спектрометр на основе поперечной модуляции работает при атмосферном давлении и может применяться как самостоятельное устройство, так и в связке с масс-спектрометром.

8.4.6. Варианты комплексных методов с использованием ионной подвижности

Существуют и более сложные конструкции приборов для измерения ионной подвижности. Можно привести в качестве примера ионно-циклотронный спектрометр подвижности с разрешающей способностью до 400 [603]. Предложен вариант комбина спектрометра приращения ионной подвижности с дрейфовым спектрометром

ионной подвижности и времяпролетным масс-спектрометром [604]. Такой прибор делает возможным трехмерное разделение.

Среди многочисленных комбинированных приборов, сочетающих спектрометрию ионной подвижности и масс-спектрометрию, наиболее популярным на сегодняшний день, пожалуй, является Synapt (Waters) с конфигурацией Q/TWIMS/TOFMS, использующий спектрометрию подвижности ионов на «бегущей волне» [504]. Ионы направляются из внешнего источника в квадрупольный фильтр масс, в котором происходит их селекция и направление в ячейку, где они разделяются на сгустки в соответствии с их подвижностью. В этот момент происходит разделение ионов с одной массой по их геометрии (форме). Каждый из сгустков далее фокусируется в ортогональном ускорителе времяпролетного масс-спектрометра для двумерного анализа.

Несмотря на ограниченную разрешающую способность спектрометра ионной подвижности, построенного по принципу «бегущей волны», наличие масс-спектрометров на входе и выходе ячейки подвижности, а также возможность накопления ионов перед инъекцией в ячейку делают рассматриваемый прибор очень эффективным. Дополнительным преимуществом рассматриваемой схемы является возможность использования ячейки подвижности (узел TWIMS) для инициирования фрагментации методами ДАС или ДПЭ (гл. 7), с последующим анализом ионов-продуктов с высоким разрешением во времяпролетном анализаторе. Прибор позволяет проводить анализы и в режиме MS^3 , когда первое поколение ионов-продуктов, полученное в ловушке («Ловушка» на рис. 8.7), разделяются по подвижностям и по очереди подвергаются дальнейшей фрагментации в третьей части узла TWIMS («Перенос» на рис. 8.7).

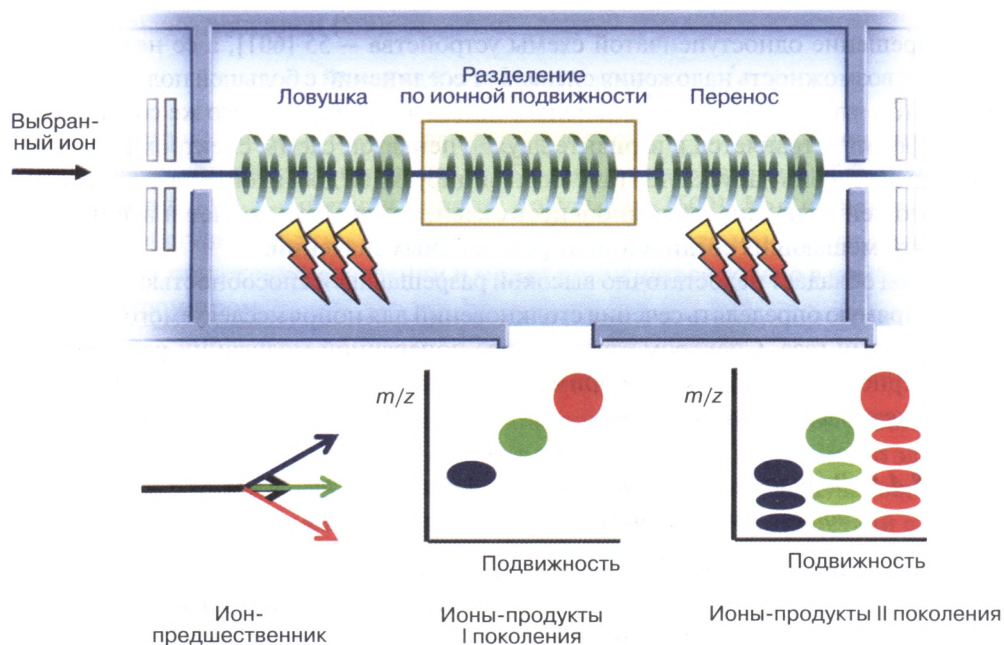


Рис. 8.7. Схема работы узла TWIMS для работы в режиме MS^2 и MS^3



В заключение следует подчеркнуть, что роль спектрометрии ионной подвижности как самостоятельного метода и как устройства для предварительной селекции компонентов смесей с последующим масс-спектрометрическим анализом ежегодно возрастает. Можно ожидать, что в ближайшее время, особенно при увеличении разрешающей способности приборов ионной подвижности, они станут очень востребованными для самых разных фундаментальных и прикладных исследований [589].

ГЛАВА 9

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ С ИОНИЗАЦИЕЙ НА ВОЗДУХЕ (AMBIENT IONIZATION MASS SPECTROMETRY)

Разрешающая способность приборов, скорость регистрации спектров, диапазон регистрируемых масс – важнейшие характеристики масс-спектрометров. Благодаря улучшению этих параметров масс-спектрометрия проникла в мир сложнейших природных биополимеров, способна работать со сверхсложными смесями (нефти, гуминовые вещества). Однако существует и второе направление развития масс-спектрометрии. Оно связано с уменьшением времени анализа и упрощением его проведения. При адекватном разрешении и диапазоне масс предпочтение, безусловно, будет отдаваться простым, быстродействующим, небольшим по размеру приборам. Методы масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе стали важнейшим шагом в этом направлении.

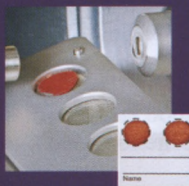
Среди многочисленных достоинств масс-спектрометрии до последнего времени у нее оставался один определенный недостаток. Зачастую быстрому, чувствительному и информативному анализу предшествовала долгая и трудоемкая процедура подготовки пробы. Так, классические методики Агентства по охране окружающей среды США (US EPA), например, 8270 для количественного определения полувolatile экотоксикантов, требуют доставки пробы в лабораторию, трехчасовой процедуры подготовки пробы и часового анализа с помощью ГХ/МС. На стадии подготовки пробы возможны самые серьезные аналитические ошибки. Поэтому упрощение процедур подготовки образцов, а желательно и полное их устранение, стало на стыке веков крайне актуальной задачей. В начале XXI века произошел решительный прорыв в этом направлении. В 2004 году было заявлено [605] о создании первого метода масс-спектрометрического анализа без пробоподготовки – десорбционной электрораспылительной ионизации (ДЭРИ, desorption electrospray ionization, DESI), 2005 год ознаменовался открытием первого плазменного метода без пробоподготовки – прямого анализа в реальном времени (Direct analysis in real time, DART) [606], а далее создание новых методов приняло лавинообразный характер, и в 2011 году Г. Кукс в своем обзоре [607] привел таблицу, в которую включено уже 42 метода масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе. Каждый последующий год вносит в копилку все новые методы.

Оказалось, что для получения ионов совсем не обязательно использовать ионный источник. Они могут быть получены прямо на открытом воздухе в комнатных или полевых условиях рядом с масс-спектрометром, используя образцы в их натуральном (нативном) виде. При этом время получения окончательного результата составляет от 1 секунды до 1 минуты. Кстати, предшественником масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе называют метод МАЛДИ при атмосферном

ВРЕМЯПРОЛЕТНЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТР AxION 2 TOF от PerkinElmer

AxION 2 TOF — это надежная идентификация вещества и количественный анализ во всем диапазоне масс, независимо от сложности матрицы. Использование целого ряда запатентованных технологий обеспечивает точность измерения массы, широкий динамический диапазон, быстрое действие и чувствительность

AxION DSA — уникальная система прямого ввода твердых, жидких и газообразных образцов непосредственно в масс-анализатор и получение полных масс-спектров за секунды, без хроматографирования и пробоподготовки!



**Т О Ч Н Ы Й
КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ
А Н А Л И З
ДОСТОВЕРНЫЕ
РЕЗУЛЬТАТЫ**

SchelTec
Total Laboratory

Авторизованный дистрибьютор
ПеркинЭлмер в странах СНГ

119334, Москва, ул. Косыгина, 19
тел.: (495) 935-88-88
факс: (495) 564-87-87
info@scheltec.ru
www.scheltec.ru

давлении [352], хотя в этом случае требуется определенная пробоподготовка и отсутствует беспрепятственный доступ к образцу во время анализа [608].

Методы масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе сохраняют все достоинства классической масс-спектрометрии: селективность, чувствительность, информативность, скорость, возможность работать со смесями (МС/МС), добавляя к ним способность проводить прямые эксперименты без пробоподготовки, т.е. анализировать компоненты образцов в их естественном (нативном) состоянии. Следует также подчеркнуть, что в большинстве методов масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе образуются молекулярные ионы анализируемых соединений, а фрагментация весьма незначительна, т.е. это мягкие методы ионизации. Небольшая избыточная энергия молекулярных ионов обусловлена эффективным охлаждением в результате многочисленных столкновений с молекулами компонентов воздуха. Именно поэтому сразу после возникновения эти методы стали востребованы в столь важных для современного общества повседневных задачах, как детектирование следов взрывчатых веществ в багаже, метаболитов лекарств и наркотиков в моче, липидов в биологических тканях, действующих веществ в медикаментах.

Детектирование целевого аналита занимает, как правило, не более 1 секунды. Если матрица простая, достаточно зарегистрировать характеристический ион любого типа: MH^+ , $[M + Cl]^-$, $[M + Na]^+$ и т.д. Для более надежного результата можно использовать масс-спектрометрию высокого разрешения, т.е. подтвердить элементный состав аналита. Если же матрица очень сложна и обычный масс-спектр оставляет сомнения, можно использовать тандемную масс-спектрометрию (гл. 7). Хорошим примером является детектирование L-аспартил-4-фосфата в высушенном на бумаге пятне 2 мкл мочи без какой-либо ее предварительной обработки [608]. На рис. 9.1 представлен масс-спектр ДЭРИ этого пятна и спектр ДАС одного из минорных компонентов смеси с m/z 214. Спектр позволяет надежно идентифицировать этот компонент как L-аспартил-4-фосфат.

Совсем необязательно, чтобы образец размещался непосредственно у ввода в масс-спектрометр. Разработаны условия для транспортировки ионов по пластиковым шлангам на расстояние более метра [609–611] и даже 4 метра [612]. Аналогичный подход используется и при масс-спектрометрическом он-лайн контроле хирургических операций методом масс-спектрометрии с быстрым испарением [613].

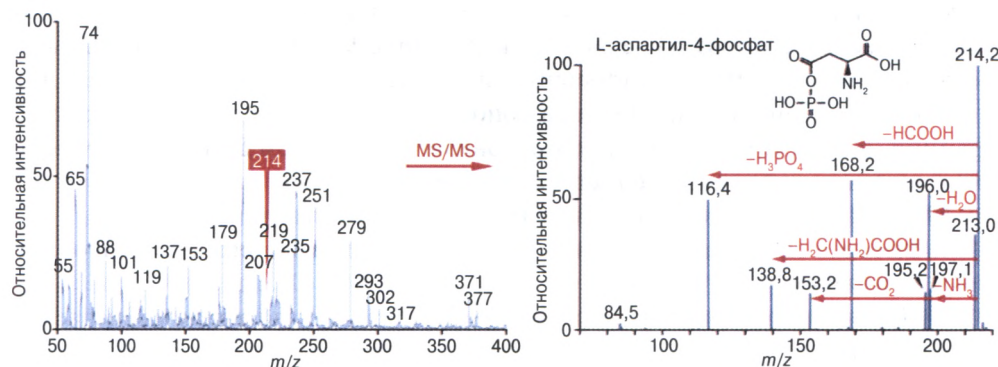


Рис. 9.1. Масс-спектр ДЭРИ высушенного пятна образца мочи на бумаге (слева) и спектр ДАС одного из минорных компонентов смеси с m/z 214 [608]

Таким образом, термин «масс-спектрометрия с ионизацией на воздухе» относится к методам, которые «работают» на открытом воздухе (нормальные атмосферные условия), связаны с генерированием ионов вне масс-спектрометра, легко могут быть состыкованы с любыми типами масс-спектрометров без их существенной перестройки, должны быть «мягкими» и позволять быстро получать результаты в режиме реального времени с минимальной или без всякой пробоподготовки [614]. В последние годы вышли несколько обзоров и учебных материалов по масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе [608, 615–629].

Методы масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе по механизму образования ионов можно разделить на три большие группы: распылительные, плазменные и лазерные. При этом процессы десорбции и ионизации могут протекать одновременно или последовательно. Существуют и альтернативные классификации. В частности, Харрис разделил существующие на 2011 год методы на семь более детализированных категорий [627].

9.1. Методы на основе спрея

Важными достоинствами методов на основе распыления являются их скорость, высокая производительность, возможность относить интенсивность целевого сигнала к определенной точке анализируемой поверхности (масс-спектрометрическая визуализация, разд. 9.9) и возможность осуществлять химические реакции непосредственно в каплях спрея (разд. 9.6).

9.1.1. Десорбционная электрораспылительная ионизация

Метод десорбционной электрораспылительной ионизации (ДЭРИ) [605] можно назвать самым химическим методом масс-спектрометрии. Он включает экстракцию молекул анализируемых веществ растворителем, дериватизацию этих молекул в растворе и масс-спектрометрический анализ образовавшихся характеристических ионов [607]. Метод основан на бомбардировке поверхности анализируемой пробы электрораспыленными заряженными микрокаплями растворителя, которые экстрагируют молекулы аналита, ионизируют их и доставляют в масс-спектрометр внутри вторичных микрокапель, образующихся при разбрызгивании во время удара о поверхность образца первичных капель (рис. 9.2). В определенном смысле метод является родственным вторичноионной масс-спектрометрии (разд. 5.10), электрораспылению (разд. 5.13) и лазерной десорбции/ионизации на пористом кремнии (разд. 5.16). Обычно аналиты ионизируют методом ДЭРИ напрямую из их естественных матриц или со вспомогательных подложек.

Метод ДЭРИ обладает многочисленными достоинствами.

1. Высокая скорость (1–5 секунд на весь анализ) делает его высокопроизводительным.
2. Небольшая избыточная энергия ионов (2 ± 1 эВ), аналогичная наблюдаемой в ИЭР.
3. Возможность получения структурной информации (МС/МС).
4. Возможность регистрации и положительных, и отрицательных ионов.

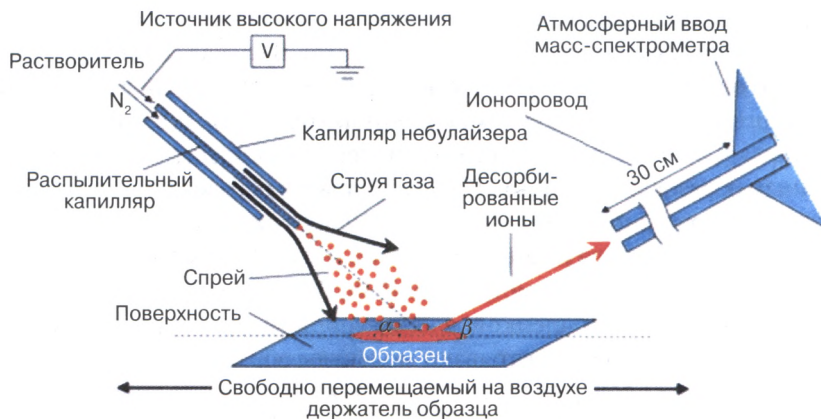


Рис. 9.2. Схематическое изображение метода ДЭРИ

5. Высокая чувствительность (пикограммовые уровни).
6. Небольшая зависимость от матричных эффектов.
7. Применимость для широчайшего круга соединений (от углеводородов до биополимеров).
8. Возможность проведения количественного определения.
9. Образование многозарядных ионов больших молекул.

При использовании метода можно варьировать состав растворителя, напряжение для создания спрея, угол распыления, расстояние от конца распыляющей иглы до образца и от образца до отверстия атмосферного ввода в масс-спектрометр. Природа поверхности при этом практически не влияет на качество спектров. Идентичные результаты получаются при размещении образцов на пластике, бумаге, стекле и т.д.

Важную роль в получении качественных спектров играет природа растворителя [630, 631]. Наиболее часто используется смесь метанол/вода, причем добавки кислот способствуют образованию катионов, а интенсивность сигнала существенно зависит от растворимости аналита в используемом для спрея растворителе. Например, спреи на основе воды и смесей с водой дают возможность ионизировать самые разнообразные субстраты, независимо от их молекулярных масс: от ионов металлов до сложнейших молекул биополимеров. Наоборот, смеси хлороформа, тетрагидрофурана и ацетонитрила оказались значительно эффективнее водных для анализа гидрофобных соединений, а смеси диметилформамида с водой или метанолом увеличивают сигналы низкомолекулярных соединений [632]. Спектры ДЭРИ нерастворимых в воде соединений удалось получить только в неводных смесях. Полезным параметром для определения предпочтительного растворителя оказался коэффициент распределения октанол/вода [631]. Положительный эффект может быть получен при использовании солибилизаторов [633], как это наблюдается и в случае ББА (разд. 5.10), или добавок солей, когда молекула аналита выступает в качестве основания Льюиса, а электроны высшей занятой орбитали взаимодействуют с низшей свободной орбиталью катиона металла с образованием соответствующего комплекса. Например, присутствие олефинов в образце при добавлении в систему AgNO_3 можно легко детектировать по образованию аддуктов с Ag^+ [634].

Угол распыления растворителя оказывается не менее важным параметром. В настоящее время предложено два основных варианта. В случае ДЭРИ с независимой геометрией угол падения и угол отражения фиксированы и близки к 90° . Альтернативная геометрия названа трансмиссионной (рис. 9.2). В этом варианте углы α и β можно варьировать, а максимальная интенсивность достигается при $\alpha = 52^\circ$.

Механизм образования ионов в ДЭРИ обусловлен образованием тонкой пленки растворителя на поверхности образца при попадании первых микрокапель электро-распыленного растворителя на анализируемую поверхность. Скорость первичных капель около 120 м/сек, а их диаметр 5 мкм [635]. Молекулы анализируемых соединений экстрагируются этой пленкой, а новые порции заряженных капель растворителя при соударении с ней захватывают молекулы образца. Возникающие брызги (вторичные капли) уже содержат ионы аналита, которые далее переходят в газовую фазу по механизмам принятым для ИЭР (разд. 5.13). Размер вторичных капель 0,8–3,3 мкм, а их скорость зависит от многих параметров. Следует подчеркнуть, что каждая первичная капля рождает несколько десятков вторичных. Наиболее характерные ионы, образующиеся в условиях ДЭРИ с регистрацией положительных ионов, — $[M+H]^+$ и/или $[M+Na(K)]^+$, а в режиме регистрации отрицательных ионов — $[M-H]^-$. Роль переносчика протона играет растворитель. В случае присутствия неорганических анионов наблюдается образование ионов типа $[M+Cl]^-$.

К настоящему времени ДЭРИ хорошо зарекомендовал себя в метаболомике, протеомике, криминалистике, анализе топлива, липидомике и т.д. [615–629]. Это отличный метод для масс-спектрометрической визуализации (разд. 9.9). В отличие от наиболее распространенных для этой цели МАЛДИ и ВИМС образец в этом случае находится непосредственно под руками у экспериментатора, что позволяет проводить любые манипуляции во время анализа. Благодаря достаточно высокому пространственному разрешению с помощью ДЭРИ можно дифференцировать больные и здоровые биологические ткани, устанавливать края, тип и стадии опухолей [636]. Основными параметрами масс-спектрометрической (молекулярной) визуализации являются размер пятна, скорость сбора данных и скорость сканирования поверхности. В случае ДЭРИ размер пятна зависит от многих переменных, включая угол падения спрея, расстояние от конца распыляющего капилляра до поверхности образца, диаметр капилляра, состав растворителя и т.д. Обычно достигаемое пространственное разрешение составляет 150–250 микрон, хотя в некоторых случаях удалось достигать разрешения в 40 и даже 35 микрон [637].

Если приложить высокое напряжение к игле шприца и направить поток заряженных капель внутрь конуса (пластиковый наконечник пипетки), в узком конце которого размещена порошкообразная проба, можно получать результаты аналогичные методу УЭЖХ-ИЭР-МС/МС [638]. Этот метод назван **электро-распылительной ионизацией в наконечнике пипетки** (pipette-tip ESI). Добавление в систему коронного разряда приводит к дополнительным возможностям ионизации [639]. Такой вариант был назван десорбционной химической ионизацией при атмосферном давлении.

Хотя исходно методы масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе были альтернативой хроматомасс-спектрометрии, в последнее время появились публикации, посвященные результатам экспериментов по их использованию в качестве

хроматографического детектора. Стыковка ДЭРИ с жидкостной хроматографией представлена в работах [640, 641]. Интересный вариант связан с использованием микроотверстия диаметром ~ 100 мкм в полимерном пластиковом капилляре РЕЕК, соединенном с выходом из колонки жидкостного препаративного хроматографа [642, 643]. Отверстие находится на расстоянии ~ 1 см от конца капилляра и не приводит к возникновению сколько-нибудь значимого мертвого объема (~ 4 нл), т.е. не вызывает уширения пиков. ДЭРИ в непрерывном режиме с задержкой не более 0,01 секунды позволяет следить за появлением на выходе из колонки очередного компонента и эффективно фракционировать исходную смесь. Важное преимущество метода — возможность работать с соединениями, прозрачными для обычного УФ-детектора (например, сахарами).

Метод обладает и другими достоинствами. Продемонстрировано увеличение заряда ионов белков при добавлении соответствующих реагентов в растворитель ДЭРИ [643]. При необходимости можно использовать реакционную ДЭРИ (разд. 9.6). Метод позволяет работать и в условиях сверхбыстрого разделения. Наличие в пробе неорганических солей не мешает проведению анализа, как в случае ИЭР. При этом, поскольку соли выходят из колонки первыми, будучи самыми полярными, последующие собранные фракции органических компонентов могут далее использоваться для проведения любых физико-химических измерений.

9.1.2. Нано-ДЭРИ

Определенным недостатком ДЭРИ является разбрызгивание аналита по поверхности образца при контакте потока газа и капель растворителя с поверхностью. Вариант устранения этого недостатка предложен в работах Дж. Ласкин. Метод был назван нано-ДЭРИ [644].

Десорбция аналита с поверхности осуществляется в месте соприкосновения двух капилляров, заполненных жидкостью, с поверхностью (рис. 9.3). По первому растворитель доставляется на поверхность образца, а по второму экстракт переносится для последующего масс-спектрометрического анализа. Разность потенциалов между первым капилляром и вводом в масс-спектрометр 3–5 кВ, а расстояние от нанораспылительного капилляра до ввода в масс-спектрометр около 0,5 мм.



Рис. 9.3. Принципиальная схема нано-ДЭРИ

В данном случае отбор пробы в «мостике растворителя» и процесс ионизации несколько разделены во времени. Размер «мостика» можно контролировать диаметром капилляров и скоростью подачи растворителя. Наиболее эффективной оказалась скорость потока 600 нл/мин. Поскольку весь процесс не связан с передачей момента количества движения, нет необходимости использовать распыляющий поток газа, а кроме того, отсутствует разбрызгивание и нежелательное перемещение аналитов по поверхности. Возникающий ионный ток стабилен и легко контролируется варьированием нескольких параметров.

Капилляр наноспрея должен быть заполнен жидкостью до момента приложения напряжения. В противном случае процесс не пойдет. Негативно влияют на процесс также пузырьки воздуха в капилляре. Их необходимо удалить нагреванием или просто заменить капилляр. Анализируемая поверхность может быть практически любой природы: металл, бумага, искусственный полимер, стекло, биологические ткани.

Метод позволяет работать с самыми разными аналитами и их смесями. Среди полезных приложений можно выделить масс-спектрометрическую визуализацию биологических тканей, включая злокачественные опухоли, с пространственным разрешением 12 микрон без какой-либо предварительной пробоподготовки [645] и количественное определение классов соединений с одинаковыми функциональными группами методом реакционной нано-ДЭРИ [646]. Комбинация электрохимии с масс-спектрометрией получила благодаря нано-ДЭРИ новый импульс. Такой комбинированный метод позволяет изучать реакции окисления, восстановления и дериватизации на поверхности электрода [647].

Эта же техника оказалась очень полезной для решения задач петролеомики [648]. При использовании смеси ацетонитрил/толуол в качестве растворителя для анализа образцов сырой нефти нано-ДЭРИ генерирует масс-спектры, аналогичные получаемым в условиях ИЭР или ФХИАД. Однако при использовании смесей полярных растворителей (ацетонитрил/вода или метанол/вода) в спектре доминируют пики ионов соединений классов O_x и O_xS_y . Взаимодополняемые спектры получаются также при регистрации положительных и отрицательных ионов. Поскольку соединения указанных классов водорастворимы, возможность их регистрации в сырой нефти без предварительной пробоподготовки является важным преимуществом нано-ДЭРИ, особенно принимая во внимание, что их детектирование методом ИЭР проблематично.

Похожий на нано-ДЭРИ метод использует для получения микрокапель капиллярную силу. Если поместить тонкий короткий капилляр в микрорезервуар с анализируемым раствором, то начнется движение жидкости к его заостренному концу, направленному вверх. Покидающие капилляр микрокапли при движении к атмосферному вводу в масс-спектрометр теряют молекулы растворителя с образованием ионов аналита [649]. Метод назван **безконтактной ионизацией при атмосферном давлении** (*contactless atmospheric pressure ionization*). Он позволяет работать с разнообразными соединениями и их смесями, причем хорошие спектры сложных молекул могут быть зарегистрированы с высокой чувствительностью. Например, в случае брадикинина предел обнаружения составил ~ 5 аМ (5×10^{-18}).

9.1.3. Ионизация акустическим распылением на воздухе

Ионизация акустическим распылением на воздухе (ИАРВ, *easy ambient sonic-spray ionization*, EASI), разработанная группой М. Эберлина, является одним из самых простых в исполнении методов масс-спектрометрического анализа [650, 651]. В этом случае поток очень маленьких биполярно (\pm) заряженных капель, образующийся за счет акустического распыления смесей растворителей с преобладанием метанола, эффективно десорбирует и ионизирует аналиты с поверхности на открытом воздухе. Капли такого спрея глубоко проникают в матрицу твердых образцов, обеспечивая высокую гомогенность пробоотбора и длительность регистрации устойчивых сигналов. При этом не требуется ни подачи электрического напряжения, ни источника фотонов, ни даже нагревания [652].

Метод можно назвать ультрамягким, поскольку он дает возможность анализировать лабильные молекулы и сложные смеси, регистрируя лишь один ион, определяющий молекулярную массу, что крайне удобно для проведения и качественного, и количественного анализа. Регистрируются положительные ионы $[M+H]^+$ и/или $[M+Na(K)]^+$, а в режиме регистрации отрицательных ионов — $[M-H]^-$, но никогда M^{++} или M^{-} . Определенным недостатком метода можно считать возможность сдувания мелких частичек порошкообразных образцов струей спрея.

Метод успешно применяется для анализа самых разных образцов, включая топливо, лекарственные препараты, ПАВы, древесину и т.д. [626]. Например, ИАРВ в сочетании с протейшим хроматографическим методом — тонкослойной хроматографией, оказалась очень эффективной для анализа топлива, биотоплива и их смесей с растительными маслами. Метод позволяет быстро и надежно дифференцировать образцы по биомаркерам, которыми являются жирные кислоты, триглицериды и алкилпиридины [653].

Интересным вариантом применения ИАРВ является анализ липидов в образцах пищевых продуктов со сложными матрицами методом термоотпечатков [654, 655]. Тонкий срез мяса, жира и т.д. прикладывается к бумаге. Три-четыре капли растворителя (обычно смесь $MeOH/CHCl_3$) наносят на поверхность, после чего освещают образец в течение 1–2 минут 150 Вт лампой. Далее бумагу с липидным отпечатком анализируют методом акустического распыления с ионизацией на воздухе, используя метанол и азот. Анализ можно повторять с тем же бумажным отпечатком несколько раз. Показано, что профиль жиров практически не изменяется на поверхности бумаги в течение недели. Такой образец удобно пересылать в другие лаборатории для сравнительного анализа [654].

Ионизация акустическим распылением на воздухе с использованием эффекта Вентури (В-ИАРВ, *Venturi easy ambient sonic-spray ionization*, V-EASI) является дальнейшим упрощением метода, позволяющим при этом эффективно анализировать и твердые, и жидкие образцы. В качестве примера можно привести быстрое и надежное установление пород древесины родственных видов деревьев [656]. Вариант этого метода с источником «Spartan» [657] представляет собой очень простой способ ионизации молекул разных типов (рис. 9.4).

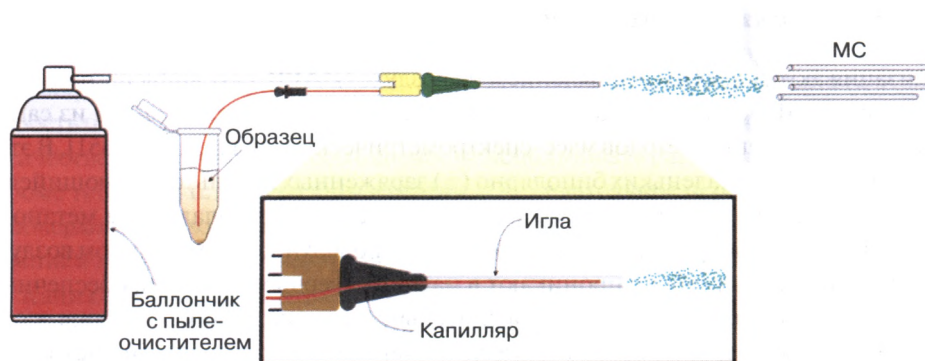


Рис. 9.4. Вариант «Spartan» метода В-ИАРВ

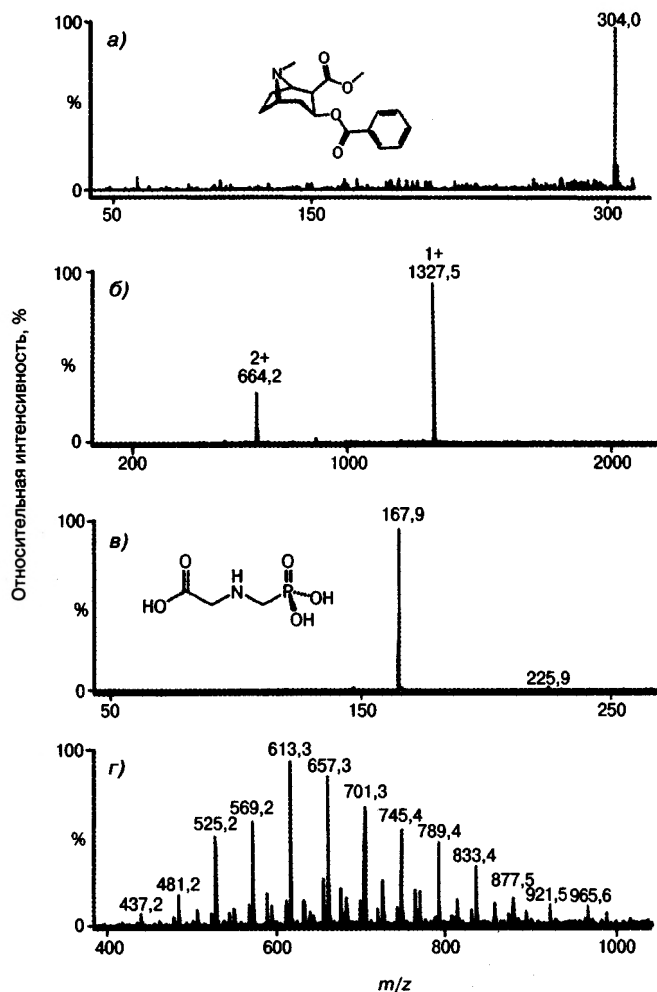


Рис. 9.5. В-ИАРВ масс-спектры 25 нг/мл раствора кокаина (а); подкисленного 150 нг/мл раствора пептида SIS[pT]RK[pY]SPE (б); 50 нг/мл раствора глифосата (в); 50 нг/мл раствора полиэтиленгликоля (г)

Источник ионов состоит из простых легко доступных частей: хирургического катетера, баллончика со сжатым газом (например, пылеочиститель), небольшого капилляра из плавленного кварца и иглы шприца. Такой ионный источник может легко собрать обычный человек без профессиональной подготовки. Несмотря на простоту, ионизация протекает очень эффективно. Использование коммерчески доступного баллончика, содержащего сжатый воздух и фреоны, не создает проблем с качеством спектров в режиме регистрации и положительных, и отрицательных ионов. Нажатие на кнопку создает постоянный поток газа в течение 2 минут со скоростью 4,0 л/мин, что абсолютно достаточно для проведения целевых анализов. При работе с жидкими образцами конец капилляра помещается в раствор, а при работе с твердыми образцами поток из шприца направляется непосредственно на пробу, расположенную вблизи от атмосферного ввода в масс-спектрометр. Продemonстрировано успешное использование «Spartan» для получения спектров самых разных соединений: наркотиков, пестицидов, пептидов, полимерных материалов (рис. 9.5) с крайне высокой величиной сигнал/шум [657]. Безусловно, стыковка такого источника с подходящим портативным масс-спектрометром должна быть крайне перспективной.

9.1.4. Экстракционная электрораспылительная ионизация

Для анализа летучих соединений, когда ДЭРИ оказывается не столь эффективна, полезной может быть **экстракционная электрораспылительная ионизация** (ЭЭРИ, extractive electrospray ionization, EESI) [658]. На рис. 9.6 представлена принципиальная схема ЭЭРИ.

ЭЭРИ оперирует двумя спреями. Первый используется для распыления раствора анализируемого образца, а второй — для получения заряженных микрокапель растворителя, как в методе ДЭРИ. Напряжение 3–5 кВ используется для режима регистрации и положительных, и отрицательных ионов. Спреи пересекаются на небольшом расстоянии от атмосферного ввода в масс-спектрометр. Молекулы аналитов попадают в капли ИЭР и ионизируются по механизму, подобному ИЭР.

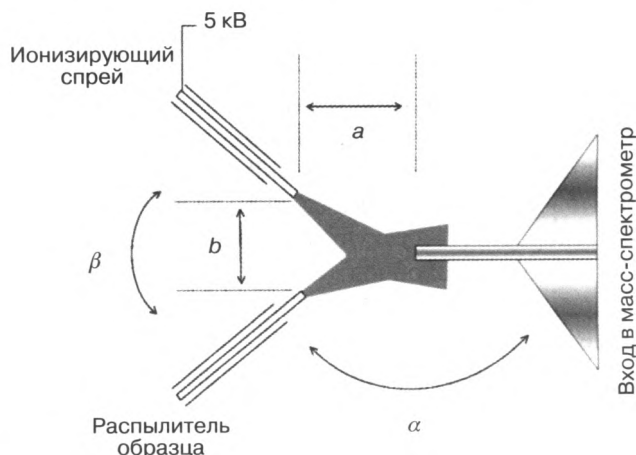


Рис. 9.6. Принципиальная схема экстракционной электрораспылительной ионизации [658]

Углы между потоками и атмосферным вводом могут варьироваться в широком диапазоне. Например, увеличение угла α способствует повышению чувствительности, а для продолжительной воспроизводимой работы лучше работать, когда $\alpha = \beta = 90^\circ$. Метод дает возможность эффективно работать с очень сложными жидкими образцами (например, моча) без их предварительной обработки в течение нескольких часов, тогда как загрязнение прибора в условиях ИЭР или ХИАД при работе с подобными образцами происходит на первых же минутах.

Метод может успешно применяться для диагностики заболеваний в выдыхаемом воздухе в он-лайн режиме [659]. При этом фиксируются самые различные летучие и нелетучие компоненты пробы. Для выявления соединений конкретных групп можно использовать модификации состава электрораспыляемого растворителя. В частности, добавка в воду небольшого количества AgNO_3 приводит к резкому увеличению сигналов молекул с высоким сродством к иону Ag^+ . Например, в случае анализа выдыхаемого воздуха в таком варианте в спектре остаются исключительно пики, обусловленные серосодержащими соединениями [659]. Кстати, следует подчеркнуть, что чувствительность ЭЭРИ, как и других методов на основе электрораспыления, зависит от структуры аналита.

Метод может активно использоваться в аналитической химии, биологии и медицине. Химикам-органикам он позволяет изучать протекание реакций, включая образование интермедиатов, при постоянном распылении реакционной смеси.

Экстракционная электрораспылительная ионизация с десорбцией нейтральных молекул (ЭЭРИ-НД) является разновидностью метода и осуществляется за счет изначальной десорбции молекул образца в любом агрегатном состоянии в нейтральный поток газа, который смешивается со спреем ИЭР, что приводит к масс-спектрам, похожим на спектры ИЭР [660]. В качестве десорбирующего газа, как правило, используют азот, обычно применяемый для десольватации в ИЭР. Главным достоинством метода является возможность анализа образцов в очень сложных матрицах благодаря разделению процессов пробоотбора и ионизации в пространстве и во времени. Эффективно ионизируются практически любые соединения с молекулярными массами до 1000 дальтон. ЭЭРИ-НД использовали, например, для быстрого анализа свежести мяса и рыбы, установления бактериального загрязнения листьев шпината, получения информации о соединениях, присутствующих на коже в *in vivo* экспериментах [660], быстрого скрининга компонентов лекарственных форм [661], определения зрелости фруктов [662].

Чувствительность метода весьма высока. В частности, пределы обнаружения целевых компонентов при анализе мяса были на уровне 10^{-14} – 10^{-12} /см² [660], что, учитывая высокую скорость (1–2 секунды для получения спектра), позволяет использовать ЭЭРИ-НД для высокопроизводительных автоматизированных анализов. Другой полезной особенностью ЭЭРИ-НД является существенное изменение спектра при замене десорбирующего газа. В частности, добавка паров ацетона в азот приводит к существенному изменению спектра соединений, десорбируемых с кожи человека по сравнению с чистым азотом.

Методы масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе оказались весьма эффективны для непрерывного контроля протекания химических реакций. Получая информацию о количестве исходного и целевого продукта в течение всего хода

реакции, можно одновременно следить за побочными продуктами, устанавливать структуры интермедиатов, включая образующихся в следовых количествах, а также короткоживущих. В качестве примера можно привести успешное применение ЭЭРИ для контроля протекания одностадийной реакции Михаэля между фенолэтиламином и акрилонитрилом в этаноле, а также многостадийной реакции ацетилирования бензилового спирта уксусным ангидридом в дихлорметане с 4-диметиламинопиридином в качестве катализатора [663]. Схема использованной установки представлена на рис. 9.7. Реакции протекали в трехгорлой колбе, в одно из горл которой с определенными интервалами подавался поток азота со скоростью 50 л/час. Выносимые азотом компоненты реакционной смеси ионизировались потоком электрораспыляемого растворителя и поступали в атмосферный ввод масс-спектрометра. Время отклика составляло менее 1 секунды. В реакции ацетилирования удалось зарегистрировать ряд побочных продуктов и интермедиаты с участием 4-диметиламинопиридина. Чувствительность метода повышается при создании аэрозоля реакционной смеси [663]. Этот же подход дает возможность работать и с менее летучими соединениями [662].

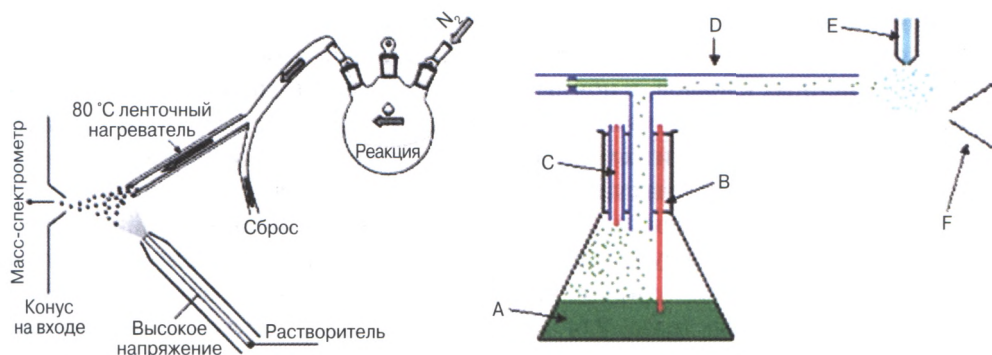


Рис. 9.7. Схематическое изображение экспериментальных установок он-лайн контроля протекания химических реакций в работах [663] (слева) и [664] (справа). А — реакционная смесь, В — капилляр для забора смеси перистальтическим насосом, С — капилляр для распыления реакционной смеси после деления потока из первого капилляра, D — засасывание аэрозоля за счет эффекта Вентури, Е — распылитель растворителя методом ИЭР, F — конусообразный вход ионизированных молекул в масс-спектрометр

Вариант ЭЭРИ для контроля протекания химических реакций в установке с регулярным пробоотбором с помощью эффекта Вентури [664] (рис. 9.7) продемонстрировал его эффективность при контроле гидролиза этилсалицилата в метаноле. Недостаток этого подхода связан с динамическим диапазоном в 3,5 порядка, который не дает возможность работать со следовыми количествами интермедиатов и побочных продуктов.

9.1.5. Спрей с бумаги

Чрезвычайно простой и универсальный метод ионизации на воздухе был предложен Куксом в 2010 году [665]. Метод назван спреем с бумаги (Paper spray). В качестве

подложки для образца используется бумажный треугольник или другой пористый материал треугольной формы. Движение ионов к острому концу начинается при приложении высокого напряжения к увлажненному материалу, а ионы аналита в газовой фазе образуются по механизму электрораспыления. Схема эксперимента представлена на рис. 9.8.



Рис. 9.8. Схематическое изображение спрея с бумаги

Метод распыления с бумаги позволяет работать как с небольшими органическими молекулами, так и с биополимерами. Образец готовят либо нанесением на бумажный треугольник нескольких микролитров раствора, либо протирающим таким треугольником исследуемой поверхности. Поскольку распыление микрокапель осуществляется через многочисленные микроканалы бумаги, спрей с бумаги эквивалентен целой группе эмиттеров наноспрея. При этом не происходит закупоривания ионных каналов, а ионные токи весьма интенсивны. Основные приложения метода связаны с биомедицинскими задачами, например мониторингом лекарственных препаратов и их метаболитов в биологических жидкостях [666–668]. Диапазон линейности метода существенно превосходит терапевтический диапазон концентраций этих соединений. Метод сухой капли крови оказался крайне эффективным, причем образцы бумаги с нанесенными каплями могут долго храниться и пересылаться на дальние расстояния для повторных анализов. Как и в случае реакций в микрокаплях (разд. 9.6), дериватизация может легко осуществляться непосредственно в образцах, нанесенных на бумагу.

Важным условием является подбор растворителя. Желательно, чтобы целевые соединения растворялись в используемых растворителях. Чаще всего применяют водно-метанольную смесь (1 : 1). Для такой смеси оптимально напряжение 2–4,5 кВ, а распыление капель с острого конца можно даже увидеть глазом при хорошем освещении. Однако используются и другие растворители, причем столь полярные соединения, как фосфолипиды и пептиды, могут анализироваться с применением неполярных растворителей, например гексана [669]. Десольватация в спрее идет по обычным механизмам ИЭР, причем реализуются два типа спрея [670]. При больших потоках растворителя в непосредственной близости от острого конца треугольника образуется несколько струй. Наиболее конкурентоспособными в этом случае оказываются реакции переноса протона, а размер капель варьируется от 0,5 до 1,9 мкм. Во втором варианте, который реализуется при недостатке растворителя, образуется лишь один конус Тейлора, а ток возрастает в несколько раз, достигая величины 0,8 мкА. Капли при этом монодисперсны, а их размер не превышает 1 мкм. Помимо переноса протона, эффективен и перенос электрона с образованием нечетно-электронных ионов. Этот вариант, когда единственный конус электрораспыления сочетается с коронным разрядом, назван усиленным полем электроспреем [670].

В этих условиях эффективнее ионизируются менее полярные молекулы, включая ароматические углеводороды и фуллерены. В режиме регистрации отрицательных ионов основными являются пики депротонированных молекул, хотя образуются и анион-радикалы.

Для изучения механизма распространения раствора образца по бумаге были созданы условия для реализации трех возможных режимов передвижения мобильной фазы: капиллярные силы (смачивание), электрофорез и движение всей жидкой фазы в качестве поверхностной тонкой пленки [671]. Именно третий механизм оказался доминирующим для спрея с бумаги, а электрофорез, напротив, практически не реализуется.

Эффективность анализа зависит от многих параметров [671]. В частности, для каждого размера бумажного треугольника существует оптимальное количество анализа. Большую роль играет угол острого конца, с которого идет ионное распыление. Наиболее мощный спрей характерен для 30° угла, становясь менее интенсивным и широким с увеличением угла. При 150° спрей не наблюдается. С другой стороны, уменьшение ширины спрея приводит к увеличению доли ионов, попадающих в масс-спектрометр. Поэтому оптимальный размер острого конца, с которого ионы переходят в газовую фазу, составляет от 60° до 90° . Оптимизация геометрии и условий эксперимента позволила создать одноразовые картриджи для проведения клинических анализов [671].

Если образец с сухим пятном поместить в капилляр для электрораспыления и направить туда поток растворителя, он будет растворять компоненты пробы и генерировать классический электроспрей. Такой вариант был назван **экстракционным спреем**, а его чувствительность может превышать чувствительность спрея с бумаги [672].

Хотя в настоящее время доминируют именно биомедицинские приложения спрея с бумаги [671], метод очень полезен для экспресс-детектирования пестицидов, гормонов, красителей, пластификаторов в образцах пищевых продуктов, на различных поверхностях, на упаковке и т.д. [673]. Поскольку для реализации спрея с бумаги не нужны насосы, с ним можно работать на месте, вне лаборатории. При наличии портативного прибора анализ может быть проведен в полевых условиях, без транспортировки образца [674].

9.1.6. Спрей с листа

Вслед за спреем с бумаги появился спрей с листа (leaf spray, LS) [675]. Схема эксперимента представлена на рис. 9.9. Если у листа есть острый конец, то его можно использовать целиком. В противном случае необходимо вырезать треугольный кусочек. Кстати, образцом может быть любая растительная ткань: цветы, корни, мякоть фруктов, семена и т.д. Наиболее приемлемый размер треугольного образца толщиной около 3 мм, к которому прикладывается напряжение, составляет в основании ~ 5 мм, по высоте ~ 10 мм. При подаче высокого напряжения ($\sim 4,5$ кВ) нужной полярности к вырезанному образцу треугольной формы начинается движение ионов и их переход в газовую фазу с острого конца (рис. 9.9). Так можно зарегистрировать присутствие в образце самых разнообразных эндогенных и экзогенных соединений: аминокислот, углеводов, жирных кислот, алкалоидов, липидов, пестицидов.

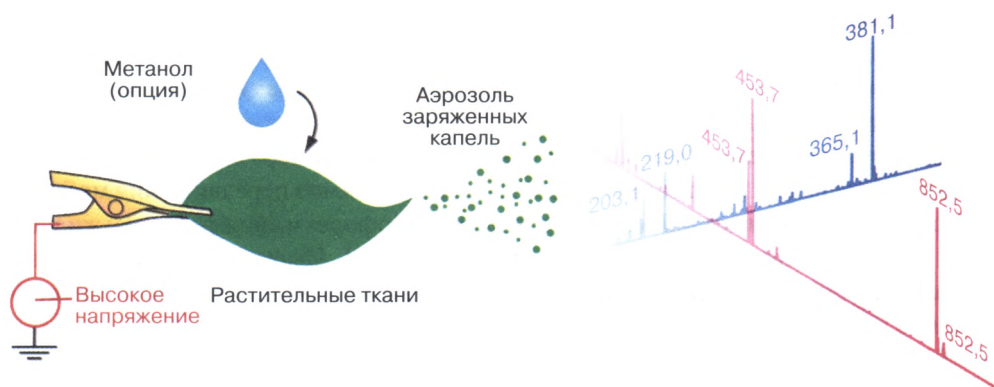


Рис. 9.9. Схема эксперимента со спреем с листа

В спектрах, как правило, доминируют протонированные и катионированные (Na^+ , K^+) молекулы. При регистрации отрицательных ионов образуются депротонированные молекулы, а иногда улучшения результатов можно достичь, добавив в образец хлорид-ионы и получив интенсивные сигналы $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ [676, 677]. В процессе эксперимента образец визуально не изменяется даже после нескольких минут записи спектров.

Наиболее универсальным растворителем оказался метанол, причем вид спектра не существенно изменялся при варьировании объема метанола (10–50 мкл) и длительности приложения напряжения (от 1 секунды до нескольких минут). Добавление капли растворителя не является необходимым. Если фрукт сочный, то собственной жидкости оказывается достаточно для реализации спрея и получения качественных спектров. Однако растворитель может быть очень полезен для проведения целевого анализа. Рисисунок 9.10 иллюстрирует кардинальное изменение масс-спектра при изменении природы растворителя. Каждый растворитель «вымывает» лучше или хуже те или иные соединения [675]. В зависимости от задачи эксперимента можно подобрать оптимальный растворитель для максимальной селективности и чувствительности целевого анализа.

Спрей с листа чрезвычайно удобен для прямого обнаружения пестицидов в овощах и фруктах. При этом пределы обнаружения достаточны для работы на уровне предельно допустимых концентраций [678]. МС/МС анализы занимают не более 100 секунд и требуют минимального количества растворителя. Пределы обнаружения для разных матриц составляют 5–50 нг/г, а диапазон линейности 5–15 000 нг/г (для картофельной шелухи).

В комбинации с мощным масс-спектрометром спрей с листа может предоставить важную структурную информацию по сложным органическим соединениям. В качестве примера можно привести идентификацию гликозидов в свежих листьях *Stevia rebaudiana* или аллергенов из листьев растений семейства *Toxicodendron* [676, 677]. Сравнение результатов ДЭРИ, спрея с листа, спрея с бумаги и низкотемпературной плазмы (см. ниже) оказалось явно в пользу спрея с листа.

Метод спрея с листа может осуществляться и в лаборатории, и на месте с использованием портативных приборов (разд. 9.8). Он позволяет исключительно

быстро получить результаты, важные для фармацевтической промышленности, для изучения первичных и вторичных процессов метаболизма, для контроля зрелости фруктов и овощей, для проверки наличия пестицидов и т.д.

Кстати, для проведения успешных экспериментов по типу спрея с бумаги или листа подходят любые остроконечные заготовки, включая самые неожиданные, например металлические иглы в методе **зондовой электрораспылительной ионизации** (ЗЭРИ, probe electrospray ionization, PESI)), протыкающие пробу, а затем ионизирующие адсорбированный материал при подаче напряжения и потока растворителя [679, 680], или даже деревянные зубочистки [681]. Практика показала, что для работы можно использовать и не самые острые предметы. Комплекс методов ионизации на воздухе с использованием одного и того же предмета для пробоотбора и ионизации получил название **спрея при касании** (touch spray). Такой подход, безусловно, очень эффективен для проведения быстрого анализа образцов в любом агрегатном состоянии без пробоподготовки. С его помощью можно исследовать биологические ткани, идентифицировать микроорганизмы или проводить количественное определение лекарственных препаратов [682]. Например, медицинские тампоны могут с успехом использоваться для неинвазивного пробоотбора с последующей ионизацией и детектированием лекарственных препаратов и наркотиков в слюне испытуемых [683]. Спрей с такого тампона может использоваться не только для детектирования, но и для количественного определения маркерных соединений.

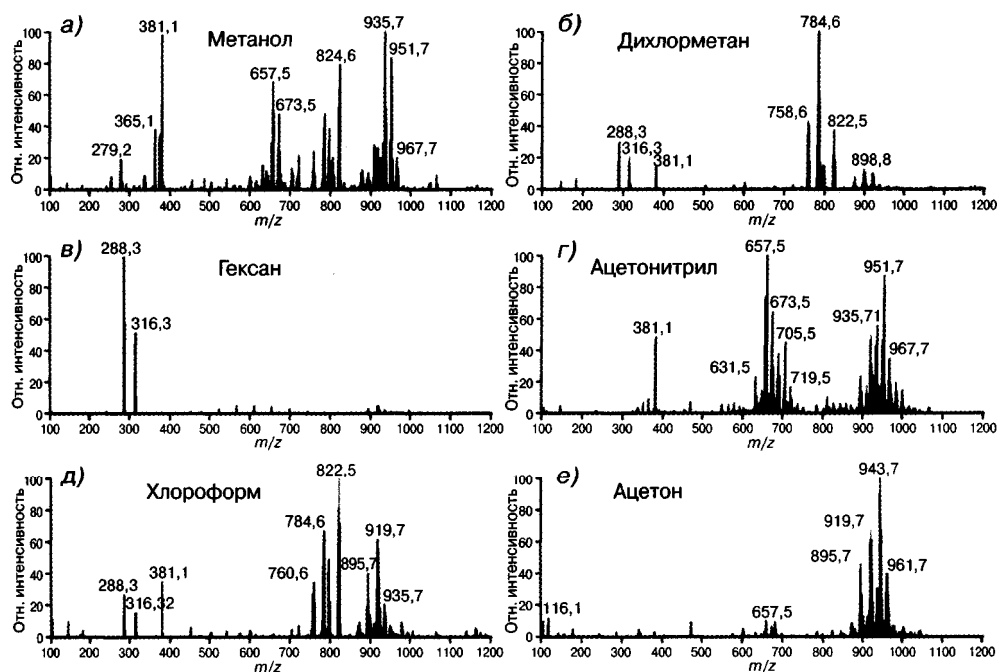


Рис. 9.10. Масс-спектры спрея с листа в режиме регистрации положительных ионов образцов орехов арахиса с различными растворителями: метанол (а), дихлорметан (б), гексан (в), ацетонитрил (г), хлороформ (д), ацетон (е)

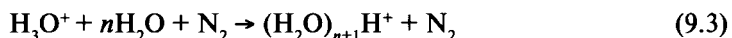
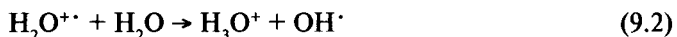
9.2. Плазменные методы

Приборное оформление плазменных методов масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе еще проще, чем в случае спрея. При этом метод не требует использования растворителя, а в качестве расходных материалов необходим только газ, часто, обыкновенный воздух. Недостатком плазменных методов можно считать низкое пространственное разрешение в случае анализа распределения веществ по поверхности и невозможность работать с высокомолекулярными соединениями. Все плазменные методы десорбции/ионизации базируются на термических процессах перехода молекул аналитов с поверхности в газовую фазу, за которыми следует ионизация. К настоящему времени проведено много экспериментов с разными методами и разными разрядными газами, однако безусловным лидером по чувствительности и диапазону анализируемых соединений во всех случаях оказался гелий. Лишь иногда азот, аргон или воздух могут составить ему определенную конкуренцию. Следует, однако, помнить, что использование гелия вместо азота или воздуха для экспериментов, например с низкотемпературной плазмой, часто приводит к возникновению многочисленных фоновых ионов из-за большей ионизирующей способности этого газа.

Принято считать, что наиболее важные ионно-молекулярные реакции, предшествующие ионизации молекул образца, обусловлены долгоживущими и высокоэнергетическими метастабильными атомами гелия (He^*), которые, обладая энергией 19,8 или 20,9 эВ, могут ионизировать практически любую молекулу по механизму ионизации Пеннинга:



Атмосферные газы также не являются исключением, а высокие концентрации азота и паров воды делают образование ионов $\text{N}_2^{+\cdot}$ и $\text{H}_2\text{O}^{+\cdot}$ по реакции (9.1) достаточно очевидным процессом. Тем не менее, поскольку в плазменных методах чаще всего образуются протонированные молекулы аналитов, наиболее эффективными ионами-реагентами в плазме оказываются протонированные кластеры воды $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$, образующиеся в результате вторичных ионно-молекулярных реакций:



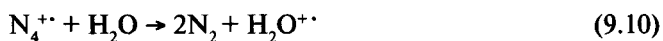
Газофазные органические молекулы со сродством к протону выше, чем у водных кластеров, могут ионизироваться по механизму переноса протона (9.4) аналогично основному процессу в химической ионизации (разд. 5.2).



Тем не менее доказано [684], что ничуть не меньшую, а скорее, большую роль играют не метастабильные атомы гелия, а ион $\text{He}_2^{+\cdot}$, возникающий по крайней мере по трем возможным механизмам (уравнения (9.5)–(9.7)):



Известно, что в плазме при давлениях более 5 Торр число ионов He_2^{++} существенно превосходит число ионов He^{++} [685], причем в условиях ионизации на открытом воздухе реакция (9.5) оказывается столь выгодной, что время конверсии лежит в диапазоне 12–27 наносекунд [686]. Именно He_2^{++} вносит по реакции перезарядки (9.8) основной вклад в образование ионов-реагентов N_2^{++} , которые далее ионизируют пары воды (уравнения (9.9) и (9.10)):



Безусловно, в зависимости от условий эксперимента доля процессов ионизации с участием частиц He^* и He_2^{++} будет различной. Последние будут предпочтительными ионами-реагентами в условиях низкотемпературной плазмы, а, например, в условиях ПАРВ количество ионов He_2^{++} в области взаимодействия с образцом может быть крайне малым [684].

9.2.1. Прямой анализ в реальном времени

В 2005 году появилось сообщение [606] о разработке нового метода анализа (второго по счету после ДЭРИ), который получил название прямого анализа в реальном времени (ПАРВ, Direct analysis in real time, DART). Авторы показали, что новый подход позволяет работать с газообразными, жидкими и твердыми образцами, причем практически без их предварительной подготовки. Хорошие результаты были получены при работе с компонентами химического оружия, взрывчатыми веществами, фармацевтическими препаратами и их метаболитами, экотоксикантами, органическими и металлоорганическими соединениями. Детектирование этих соединений возможно при их наличии на любой поверхности: бетон, асфальт, человеческая кожа, банкноты, стекло, листья, фрукты, одежда и т.д., а, например, для анализа компонентов таблеток лекарственных средств не требуется ни размельчение, ни экстракция аналитов. Принципиальная схема источника ПАРВ представлена на рис. 9.11.

Инертный газ (He или N_2) пропускают через источник ПАРВ со скоростью 1–3 л/мин. Благодаря положительному потенциалу в 1–5 кВ (относительно первого перфорированного дискового электрода), прикладываемому к игольчатому электроду, возникает тлеющий разряд при давлении, близком к атмосферному. В результате образуются катионы, электроны и нейтральные частицы (прежде всего атомы He или молекулы N_2) в возбужденных электронных и колебательных состояниях [687]. Образовавшаяся плазма поступает во вторую секцию источника, где может размещаться второй перфорированный дисковый электрод, предназначенный для удаления ионов.

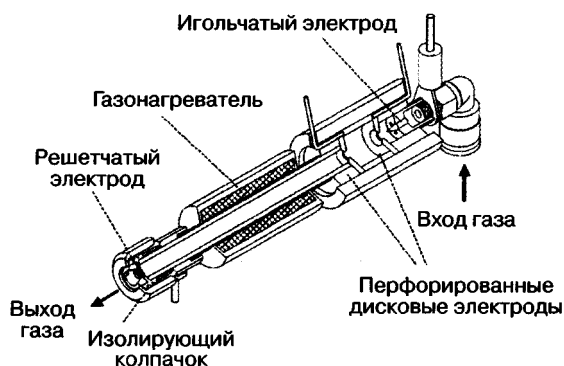


Рис. 9.11. Принципиальная схема источника ПАРВ [606]

В третьей секции температура плазмы может быть увеличена до 500 °С благодаря газонагревателю. Повышенная температура позволяет успешно десорбировать с поверхности менее летучие соединения. Концевой решетчатый электрод отражает ионы той же полярности и устраняет ионы противоположной полярности, которые могут приводить к уменьшению сигнала в результате ионно-ионных реакций. Изолирующий колпачок защищает образец и оператора от контакта с электродами.

Ионизация происходит при взаимодействии газовой плазмы с атмосферными составляющими или с молекулами образцов на поверхности, на которую направлен поток. При взаимодействии возбужденных частиц плазмы с молекулами малополярных или даже неполярных соединений основным механизмом образования ионов является ионизация Пеннинга (реакция (9.1)). Для более полярных аналитов преимущественно образуются протонированные молекулы $[M+H]^+$ (реакция (9.4)). Электроны также образуются в результате ионизации Пеннинга, что дает возможность работать и с отрицательными ионами в результате взаимодействия молекул образца с анион-радикалами кислорода и кластеров воды.

Поток газа может быть направлен непосредственно на атмосферный ввод масс-спектрометра или отражаться от исследуемой поверхности. При этом для каждого аналита существует оптимальная геометрия проведения анализа, включая расстояние от источника до образца и от образца до масс-спектрометра, а также угол подачи потока газа и его скорость [606].

Достоинством метода является незначительное подавление выхода ионов. ПАРВ можно использовать с классическими вариантами ВЭЖХ с фосфатными буферами. Сравнение выхода ионов при анализе образцов речной и сточной вод методом ВЭЖХ с последующим анализом ПАРВ, ИЭР, ХИАД и ФХИАД продемонстрировало значительное преимущество варианта ПАРВ над альтернативными техниками [688].

Методом ПАРВ можно контролировать протекание химических реакций в режиме реального времени [689]. В качестве пробоотборника использовался стеклянный капилляр для измерения температуры плавления, который периодически погружался в реакционную смесь, после чего вводился в область плазмы. Метод показал хорошие результаты при контроле реакций метилирования и дебензилирования, хотя отмечено, что его чувствительность значительно хуже, чем в случае ИЭР.

Эффективен ПАРВ и в качестве детектора жидкостного хроматографа [690]. Его наиболее полезным преимуществом является возможность использования фосфатных буферов концентрацией до 120 мМ в подвижной фазе при обычных потоках 1 мл/мин. При этом не происходит загрязнение источника, а эффекты подавления ионных сигналов отсутствуют. Метод дает возможность работать в режиме регистрации и положительных, и отрицательных ионов с пределами обнаружения порядка мкг/л. Прибор, соединяющий спектрометрию ионной подвижности (разд. 8.4) с ПАРВ, представлен в работе [691]. Первые обнадеживающие результаты получены при прямом анализе твердых образцов лекарственных препаратов.

9.2.2. Низкотемпературная плазма

Метод низкотемпературной плазмы (НТП, Low temperature plasma, LTP) позволяет работать с самыми «чувствительными» образцами. Например, анализ непосредственно на коже человека не только не приводит к ее повреждению, но даже не вызывает какого-либо дискомфорта у испытуемого. Метод основан на разряде в диэлектрическом барьере при комнатной температуре [692] при использовании газовых потоков менее 100 мл/мин и мощности источника электропитания 1 Вт. Эти параметры позволяют применять низкотемпературную плазму в миниатюрных переносных масс-спектрометрах, требующих для эксплуатации всего лишь небольшого газового баллончика (например, с гелием) и батареи. Не нужны ни растворители, ни газовые/жидкостные насосы, а работать можно с пробами в твердом, жидком и газообразном состояниях. Для ионизации часто используется обыкновенный сжатый воздух [693], а основными газами-реагентами в этом случае являются атмосферные азот и кислород. В зависимости от природы аналитов и параметров эксперимента ионизация может протекать по разным механизмам, например протонирование, депротонирование, захват электрона и т.д., приводя к образованию нечетноэлектронных молекулярных ионов (и положительных, и отрицательных) или протонированных (депротонированных) молекул. При использовании в качестве разрядного газа гелия наиболее важным образующимся в зоне разряда ионом является He_2^{+} . Он выполняет две основные роли: переносит энергию из области разряда на периферию, где идут важнейшие аналитические реакции, и ионизирует путем перезарядки атмосферный азот с образованием эффективных ионов-реагентов N_2^+ , которые, в свою очередь, генерируют вторичные ионы-реагенты, например протонированные кластеры молекул воды (см. выше). При сравнении гелия и азота/воздуха в качестве разрядного газа [692] отмечается, что гелий приводит к более интенсивным пикам в спектре, включая ионы фона. Это связано с наличием в плазме возбужденных состояний He (> 19 эВ), способных ионизировать большее число соединений. Спектр при этом усложняется, а отношение сигнал/шум может ухудшаться, но, если задачей является улучшение пределов обнаружения, гелий предпочтителен [611].

Принципиальная схема метода НТП представлена на рис. 9.12. Стекло́нная трубка источника служит в качестве диэлектрического барьера, а внутренняя медная обмотка — внешним электродом, на который подается переменный ток (2–5 кГц) напряжением 3–5 кВ. Внутри стекло́нной трубки коаксиально расположен заземленный

внутренний электрод. Генерация плазмы внутри трубки осуществляется с помощью газового разряда. Зонд НТП электрически изолирован, что исключает возможность поражения оператора. Максимальная температура плазмы НТП не превышает 30 °С, поэтому она не вызывает термического повреждения большинства поверхностей, включая человеческую кожу. Благодаря этому, метод НТП привлекателен для решения задач, требующих использования низких температур для десорбции, например в точках контроля безопасности аэропортов [692, 694] или для мобильных масс-спектрометров. В частности, регистрируя отрицательные ионы, удалось надежно детектировать широкий круг остаточных количеств взрывчатых нитросодержащих веществ [695]. Для тротила предел обнаружения составил всего 0,6 пг, а диапазон линейности — три порядка. Характеристическими для этих соединений ионами являются $[M-NO_2]^-$ и $[M+NO_2]^-$. Чувствительность определения можно повысить добавками реагентов в разрядный газ. В этом случае речь идет о реакционной НТП. Например, для гексогена наблюдается значительное увеличение сигнала при добавке 0,2% трифторуксусной кислоты. Регистрируется при этом ион $[M + TFA]^-$.

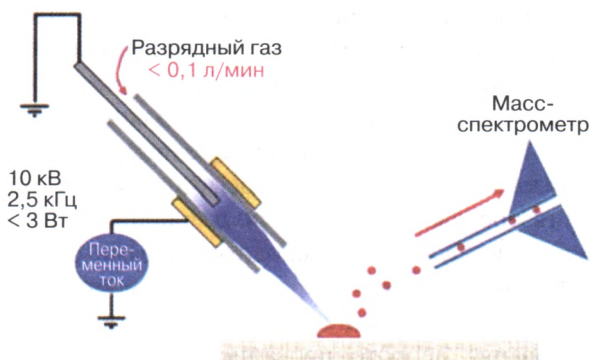


Рис. 9.12. Принципиальная схема метода НТП [621]

Метод низкотемпературной плазмы оказался очень эффективен для установления положения двойных связей в молекулах ненасыщенных жирных кислот и их эфиров [693]. Этот вопрос весьма актуален для масс-спектрометрии, поскольку в условиях ИЭ и ХИ наблюдается миграция двойных связей по цепи. Наиболее эффективным подходом в настоящее время является диссоциация индуцированная озоном (разд. 11.2.3). НТП представляет упрощенный вариант этого метода, когда вполне надежный результат может быть получен очень быстро. На рис. 9.13 представлен масс-спектр НТП этилового эфира пиноленовой кислоты (*цис*-5,9,12-октадекатриеновой), в котором наблюдаются только характеристические ионы: протонированная молекула с m/z 307 и фрагментные ионы $[F + H]^+$, возникающие при озоноллизе по двойным связям в исходной молекуле. Озон генерируется в условиях НТП при использовании в качестве разрядного газа не только воздуха, но и гелия, поскольку весь процесс происходит на открытом воздухе. Если поступление воздуха ограничить, например сильным защитным потоком гелия, то процесс окисления полностью подавляется, и в спектре наблюдается только пик протонированной молекулы [693].

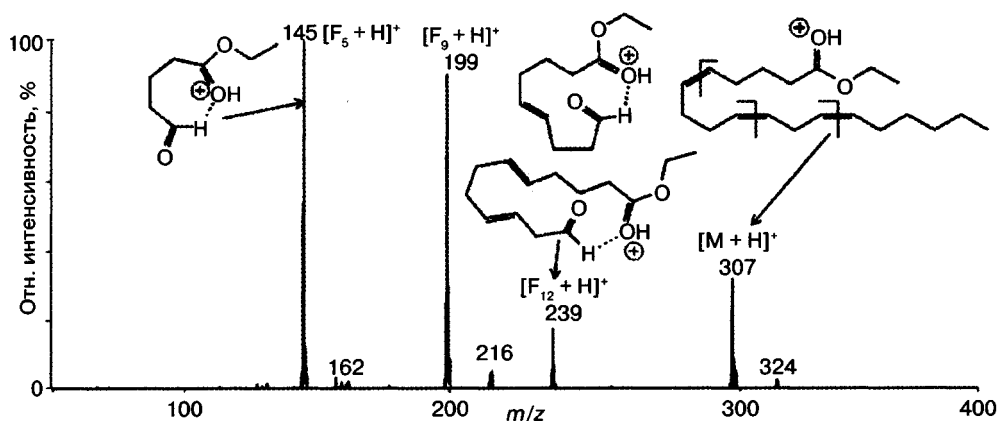


Рис. 9.13. Масс-спектр НТП этилового эфира пиноленовой кислоты [693]

Метод НТП использовали для анализа взрывчатых веществ [692], пестицидов [696], лекарств, наркотиков [694] и даже вязких жидкостей, например оливкового масла [697].

9.2.3. Десорбционная химическая ионизация при атмосферном давлении

Метод десорбционной химической ионизации при атмосферном давлении (ДХИАД, Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization – DAPCI) имеет несколько разновидностей. В варианте [639] его можно классифицировать как метод на основе спрея, поскольку авторы добавили в классический эксперимент ДЭРИ с электрораспыленной водно-метанольной смесью опцию коронного разряда, происходящего рядом с мишенью, на которой располагался образец. Это привело к возрастанию интенсивности сигналов в спектрах некоторых соединений.

Впервые название ДХИАД предложено Куксом [698]. В этом варианте вместо электрораспыления растворителя в непосредственной близости от мишени с образцом был использован коронный разряд. В область разряда подавались пары растворителей, молекулы которых ионизировались, становясь ионами-реагентами для последующей химической ионизации молекул образца. В качестве растворителей были использованы толуол, метанол и некоторые другие соединения. Ионизация протекает по механизмам переноса протона или электрона (перезарядка).

Еще одним вариантом ДХИАД рассматривают **анализ твердых образцов при атмосферном давлении** (atmospheric-pressure solid analysis probe, ASAP), предложенный в 2005 году [265]. В этом случае твердый образец в капилляре для измерения температуры плавления помещается в источник ХИАД, а поток разогретого инертного газа (обычные потоки газов для распыления и десольватации в ИЭР/ХИАД) выносит молекулы аналитов в область коронного разряда. Метод может составить определенную конкуренцию ионизации электронами при анализе смесей, так как обычно образуются только пики протонированных (депротонированных) молекул. Поскольку испарение и ионизация происходят при атмосферном давлении, метод очень быстрый и в некоторых случаях действительно может заменить прямой ввод с ИЭ.

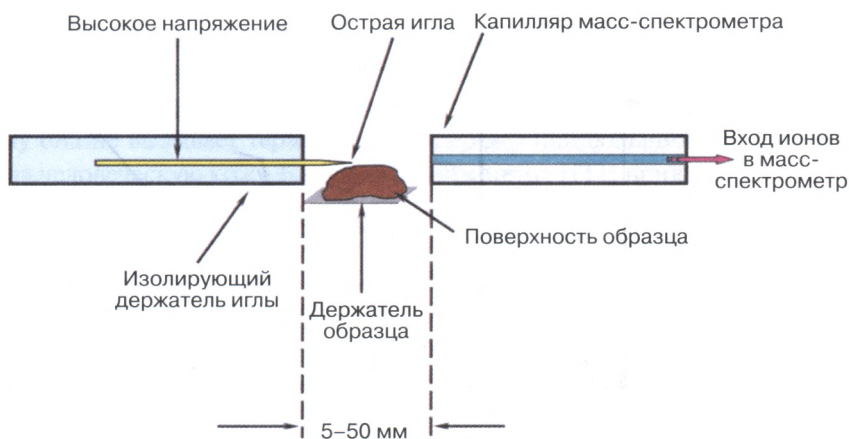


Рис. 9.14. Принципиальная схема метода ДХИАД без растворителей и допантов [700]

При сравнении эффективности ДХИАД, ДЭРИ и ПАРВ для анализа лекарственных препаратов и биологически активных соединений [699] было показано, что ДХИАД предпочтительнее для соединений с низкой полярностью, а вариант с водно-метанольным потоком эффективнее, чем вариант коронного разряда без применения потока растворителя, подобный описанному в [265]. Поскольку использования токсичных реагентов (толуол, метанол) все же лучше избегать, предложен вариант ДХИАД без растворителя с парами воды в атмосферном воздухе в качестве газа-реагента [700]. Принципиальная схема метода представлена на рис. 9.14. Для проведения ионизации в таком варианте не требуется ни растворитель, ни поток газа, ни допанты. Единственным условием успеха является влажность воздуха не менее 20%. В противном случае необходимо подавать в сферу реакции пары воды. Однако следует принимать во внимание, что при чрезмерной влажности (более 60%) интенсивность сигналов резко падает. Поскольку, как и в большинстве других плазменных методов, ключевую роль играет именно вода, основные сигналы обусловлены протонированными или депротонированными молекулами. Чувствительность метода находится в пикограммовом диапазоне. Метод эффективен для детектирования целевых аналитов в пищевых продуктах, на коже и одежде [700].

9.2.4. Масс-спектрометрия с ионизацией быстрым испарением на воздухе

Образование ионов органических соединений при термической обработке образцов в твердой фазе было известно с 1970-х годов. Это явление было использовано при создании метода прямой (десорбционной) химической ионизации (разд. 5.5). Принцип такой ионизации основан на резком нагреве образца до температуры, при которой скорость испарения превосходит скорость термической деструкции. Поскольку на открытом воздухе понижение тепловой энергии частиц за счет столкновений с молекулами газа происходит весьма эффективно, такое «охлаждение» дополнительно подавляет процессы термодеструкции, а термодесорбированные в этих условиях органические катионы характеризуются минимальной термической деградацией [701]. В варианте масс-спектрометрии с ионизацией быстрым испаре-

нием на воздухе (МСИБИВ, Rapid evaporative ionization mass spectrometry, REIMS) формально не важно, каким образом проведено резкое повышение температуры твердого образца. Можно использовать Джоулево нагревание (Joule-heating), контактное нагревание или нагревание в результате облучения. Например, масс-спектры биологических тканей, полученные методами инфракрасной лазерной абляции (лазерной десорбционной ионизации) и электрохимически (Джоулево нагревание), очень похожи [702].

Хотя метод ионизации быстрым испарением на воздухе можно использовать для самых разных целей, самым востребованным приложением оказывается анализ биологических тканей, включая наиболее ценный с медицинской точки зрения вариант *in vivo*. Эксперименты показали, что быстрое термическое испарение биологических тканей позволяет получать информацию о молекулярной массе многих биологически важных групп соединений, например липидов [613], а в качестве нагревателей удобно использовать коммерческие хирургические инструменты: лазерные и электроскальпели.

Присутствие ионизированных молекул воды над рабочим образцом при сечении тканей электроскальпелем позволяет протекать и альтернативному механизму: химической ионизации нейтральных органических молекул в газовой фазе. В результате основными заряженными частицами оказываются протонированные (депротонированные) молекулы аналитов и первичных продуктов их термического разложения. Различные ткани в таких условиях характеризуются разным набором липидных маркеров, что дает возможность устанавливать их природу в течение одной секунды. При этом легко различимы не только принципиально отличные друг от друга ткани, но и близкородственные. Это наблюдение дало возможность создать специальную библиотеку биомаркеров для разных тканей и контролировать хирургические операции по удалению опухолей с масс-спектрометрическим контролем в он-лайн режиме [613]. Преимуществом масс-спектрометрии является возможность быстро и надежно регистрировать наличие не одного (пусть и очень важного) биомаркера, а десятков и даже сотен молекул, которые позволяют получить максимально надежную прямую информацию о природе биологической ткани, о стадии опухоли, о некрозе, о наличии лекарственных препаратов и т.д. Дифференцирование тканей осуществляется методами анализа главных компонент (*principal component analysis*) и линейного дискриминанта (*linear discriminant analysis*) [702]. Созданное программное обеспечение использует 60-мерное пространство. Именно распределение многих биомаркеров, а не детектирование конкретных индивидуальных молекул, позволяет надежно устанавливать природу биологических тканей.

На рис. 9.15 представлена принципиальная схема масс-спектрометрического определения природы биологических тканей во время проведения хирургических операций. Вещества тканей испаряются при контакте с электроскальпелем (дымок над пробой на рис. 9.15). Образующиеся ионы транспортируются внутри гибкого тетрафторэтиленового шланга в масс-спектрометр благодаря эффекту Вентури, создаваемому за счет подачи потока азота или воздуха давлением 4 атм. Для увеличения эффективности переноса ионы засасываются из гибкого шланга перпендикулярно обогреваемому капиллярному вводу в масс-спектрометр. Поскольку генерируются и положительные, и отрицательные ионы, они могут быть разделены по полярности

в области скиммера, а их регистрация предоставляет важную комплементарную информацию по составу биомаркеров. Одновременное образование ионов обеих полярностей дает также возможность использовать для транспортировки ионов к масс-спектрометру гибкий полимерный шланг, поскольку препятствует формированию статических зарядов на стенках благодаря процессам нейтрализации.

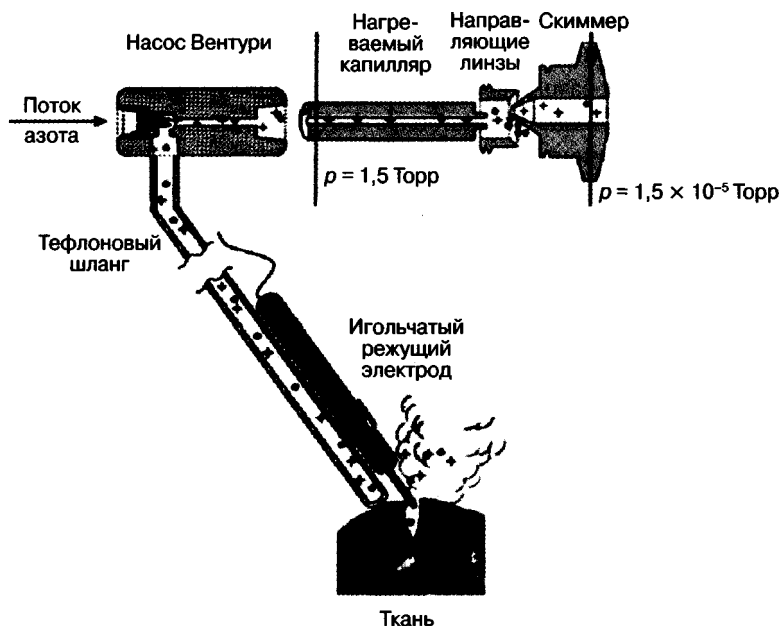


Рис. 9.15. Принципиальная схема анализа тканей методом МСИБИВ [613]

Как и следовало ожидать, качество получаемых масс-спектров существенным образом зависит от скорости нагрева, причем существует оптимум [702]. Увеличение эффективности ионизации с увеличением мощности нагревательного устройства связано с увеличением скорости дезинтеграции биологических тканей и большей скоростью испарения молекул аналитов. Однако при очень большой мощности высокая температура испарения приводит к увеличению термического распада молекул. Например, при анализе фосфоэтаноламинов происходит видимое обугливание образца и потеря аналитами молекулы аммиака.

Совершенно неожиданный вариант масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе, который, вероятно, следует отнести к плазменным методам, предложили авторы [703]. Суть его заключается в аккумулировании высокого электростатического потенциала (до 1 МВ) телом живого человека при коротком контакте (~2 секунды) с генератором Ван де Граафа. В результате все соединения, выдыхаемые или испаряющиеся с поверхности тела человека, ионизируются (вариант полевой ионизации), не вызывая электрического шока у испытуемого, и всасываются в атмосферный ввод масс-спектрометра (рис. 9.16). Для предохранения масс-спектрометра от возможного электростатического повреждения прибор экранирован несколькими заземленными металлическими пластинами. Авторы назвали свой подход **мегавольтовой**

электростатической ионизацией (megavolt electrostatic ionization mass spectrometry). В первых экспериментах метод продемонстрировал возможность детектировать наличие взрывчатых веществ и горючих жидкостей на одежде, кокаин на коже, ацетаминофен в болеутоляющих таблетках, а также многочисленные соединения в выдыхаемом воздухе.

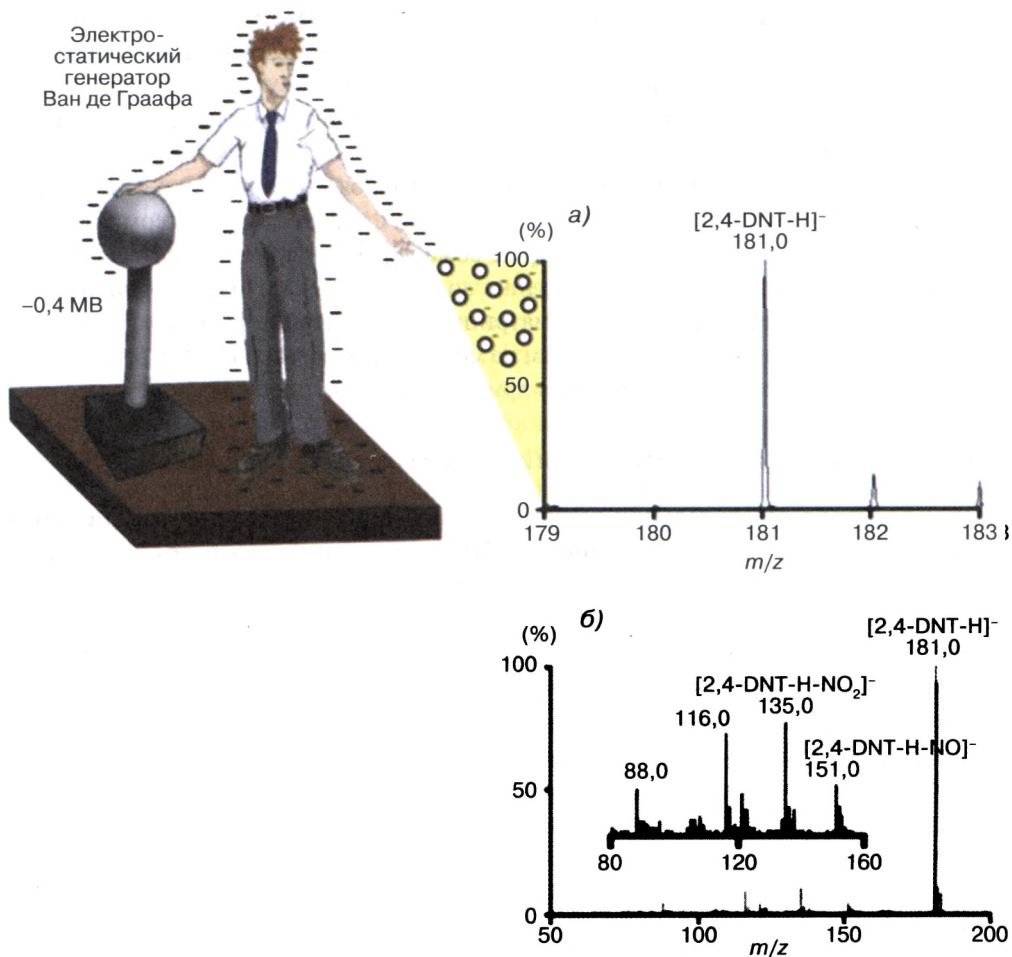


Рис. 9.16. Схематическое изображение использования метода мегавольтовой электростатической ионизации, а также масс-спектр (а) и тандемный масс-спектр (б) динитротолуола, следы которого были на перчатке испытуемого

9.3. Лазерные методы

Количество нейтральных частиц, десорбируемых лазером с поверхности, существенно превосходит количество ионов [704], поэтому последующая ионизация этих частиц интересна как с точки зрения расширения ассортимента анализируемых соединений, так и с точки зрения улучшения пределов обнаружения целевых аналитов. Другим достоинством методов масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе

с использованием лазера является возможность работать с высокомолекулярными соединениями благодаря генерированию многозарядных ионов. Кроме того, эти методы характеризуются более высоким пространственным разрешением по сравнению с распылительными методами благодаря меньшему размеру пятна лазера. Как правило, речь идет о комбинированных методах, когда на первой стадии используется лазер для абляции/десорбции нейтральных частиц с поверхности образца, а на второй – распылительные или плазменные методы ионизации. Следует отметить, что ежегодно появляется большое количество работ, в которых описаны очень близкие техники, но методам даны разные названия [627]. Это создает определенную путаницу и требует детализации условий эксперимента в каждом отдельном случае.

Сечение адсорбции молекулы, матрицы или подложки можно увеличить в миллион раз в условиях резонансного возбуждения. Это позволяет работать с лазерами с энергией 10^6 Вт/см², а десорбция идет по механизму фазового взрыва, термическому, импульсному или электронному [705]. К сожалению, для большинства молекул условия резонанса невозможны при длине волны лазера в оптическом диапазоне. Поэтому используются специальные матрицы, поглощающие фотоны конкретных частот. Нерезонансное возбуждение тем не менее также возможно. При этом анализ молекул анализов осуществляется без привязки к их оптическим свойствам.

9.3.1. Электрораспылительная лазерная десорбция/ионизация

Метод электрораспылительной лазерной десорбции/ионизации (ЭЛДИ, *electrospray-assisted laser desorption/ionization ELDI*) впервые описан в работе [706]. В стандартном варианте требуется азотный УФ-лазер с длиной волны 337 нм (импульсы 4–5 нсек с энергией 150–300 мкДж). Используя угол падения лазерного луча 45°, можно получать на поверхности пятно размером 100 мкм² [707]. Десорбированные частицы, попадая в поток спрея заряженных капель растворителя, ионизируются и втягиваются в атмосферный ввод масс-спектрометра. Для Nd:YAG лазеров с длиной волны 266, 532 и 1064 нм максимальная интенсивность ионного сигнала зарегистрирована при максимальной длине волны. Объяснением этому служит наличие молекул воды в образцах биологических тканей. Лазер с $\lambda = 1064$ нм возбуждает деформационные колебания ОН-связей, вызывая взрывной переход материала в газовую фазу. При этом отсутствие или наличие матрицы практически не сказывается на интенсивности десорбции/ионизации.

Среди многочисленных исследованных материалов мишени для нанесения образца оптимальным оказалась нержавеющая сталь. Объяснением может служить высокая теплопроводность этого материала. При анализе конкретных групп соединений следует учитывать необходимость хорошей растворимости целевых веществ в используемом для электрораспыления растворителе. Например, в случае водно-метанольных смесей с большим содержанием воды при анализе коровьего молока в спектре доминировали пики водорастворимых белков и пептидов, прежде всего казеина. При высоком содержании метанола, напротив, основные пики были обусловлены липидами, растворимость которых в метаноле выше [707].

Наносекундные лазеры используются в основном для резонансного возбуждения и испарения молекул анализов. Такой режим возможен и для фемтосекундных

лазеров, причем фрагментация оказывается менее интенсивной. Причина заключается в том, что возбуждение протекает в этом случае быстрее, чем требуется для начала колебаний атомов в молекуле. Фрагментация оказывается практически полностью подавленной. Напротив, в случае наносекундных лазеров, когда время диссоциации меньше времени лазерного импульса, первичные фрагменты успевают получить дополнительную энергию лазерного пучка и распадаются с образованием вторичных продуктов. Например, наносекундный импульс с интенсивностью 10^7 Вт/см² приводил к более интенсивной фрагментации грамицидина Д, чем фемтосекундный импульс ($\lambda = 245\text{--}265$ нм) с интенсивностью 10^9 Вт/см² [708].

Фемтосекундная лазерная десорбция/ионизация (фс-ЛДИ) предложенная для масс-спектрометрической визуализации на воздухе [709], получила название **лазерной электрораспылительной масс-спектрометрии** (ЛЭМС, laser electrospray ionization mass spectrometry, LEMS) при совместном использовании лазера и электроспрея [710]. Нерезонансное возбуждение высокой мощности ($\sim 10^{14}$ Вт/см²) в ближнем ИК диапазоне ($\lambda = 800$ нм) вызывает десорбцию и ионизацию молекул. Ненужной оказывается и матрица, поскольку облучение такой мощности возбуждает непосредственно молекулы аналитов. Первые эксперименты показали высокую эффективность метода, особенно для низкомолекулярных веществ, хотя отмечено определенное ухудшение результатов с увеличением молекулярной массы аналитов. В качестве примера можно выделить работу [705]. В эксперименте использовались 70 фсек импульсы с длиной волны 800 нм и энергией 1,5 мДж. Угол падения лазерного луча, как и в других вариантах ЭЛДИ, составляет 45°, а интенсивность пучка — около 10^{13} Вт/см². Показана приемлемость метода для работы с пептидами, порфиринами, витамином В₁₂, а благодаря нерезонансному возбуждению он может использоваться и для работы с другими соединениями. Хотя интенсивность сигналов протонированных молекул при использовании матрицы (вариант МАЛДЭРИ) была несколько выше, метод практически устраняет пробоподготовку, что очень важно для биологических образцов и в криминалистике.

Сравнение внутренней энергии образующихся ионов в условиях фемтосекундной нерезонансной ЛЭМС ($\lambda = 800$ нм) для сухих и растворенных образцов показало, что фрагментация бензилпиридиниевых солей и пептидов выше в случае твердых образцов, а для растворов уровень фрагментации оказался аналогичным ИЭР за счет защитного действия кластеров растворителя. Поэтому для реализации наиболее «мягкой» ионизации лучше использовать растворы или понижать энергию лазерного пучка, особенно если существует возможность мультифотонного резонанса для анализируемых молекул [711].

9.3.2. Лазерная абляция с электрораспылительной ионизацией

Родственный ЭЛДИ метод [712] назван лазерной абляцией с электрораспылительной ионизацией (ЛАЭРИ, LAESI). Показана применимость этого подхода для работы с широким кругом соединений с массами до 66 кДа, пределом обнаружения на уровне фемтомолей и динамическим диапазоном количественного определения в четыре порядка. При этом отсутствовала необходимость в какой-либо пробоподготовке, а глубина проникновения в глубь образца составляла 5 мкм.

В классическом варианте метода [713] используется ИК-лазер с длиной волны 2940 нм, 5-секундными импульсами и энергией 100 мкДж. Выбор указанной длины волны связан с возбуждением колебаний ОН связей молекул воды, присутствующих в образцах. Поэтому метод особенно эффективен при работе с образцами с высоким содержанием воды. Обычно лазерный луч перпендикулярен поверхности образца. В результате микровзрыва в точке абляции аналиты оказываются в газовой фазе, где попадают в поток электрораспыленного растворителя. Аналиты либо растворяются внутри капель с последующей ионизацией, либо реагируют с газофазными ионами. Образовавшиеся заряженные частицы аналитов втягиваются в атмосферный ввод масс-спектрометра. Показана возможность пространственного разрешения при изучении метаболитов в листьях растений до 350 мкм по поверхности и 40 мкм в глубину [714]. Разрешение было увеличено дополнительно при исследовании мозга мышей, когда диаметр лазерного пятна составил 200 мкм [713].

9.3.3. Другие лазерные методы

При добавлении матрицы можно достичь улучшения результатов ионизации на воздухе с использованием ИК-, и УФ-лазеров. В этом варианте метод получил название **матрично активированной лазерной десорбции с электрораспылительной ионизацией** (МАЛДЭРИ, MALDESI) [715]. Использование углекислотного лазера с длиной волны 10,6 мкм для работы с жидкими образцами без добавления матрицы позволило получать многозарядные ионы биологических молекул с массами 8–17 кДа [716]. При этом для некоторых белков сигналы регистрировались даже при исключении постиионизации методом ИЭР.

В методе **высоковольтной активированной лазерной десорбции/ионизации** (ВАЛДИ, high-voltage-assisted laser desorption/ionization, HALDI) для получения протонированных молекул (включая полипротонированные) белков, пептидов, олигонуклеотидов, лекарственных соединений и т.д. использован Nd:YAG лазер



Рис. 9.17. Принципиальная схема ВАЛДИ

с длиной волны 1064 нм, десорбирующий заряженные частицы с поверхности жидкой пробы, находящейся на мишени, к которой приложено высокое напряжение до 5,5 кВ [717]. Органическая матрица оказывается ненужной, поверхность мишени может быть проводящей или полупроводящей, а небольшие капельки, отрывающиеся с поверхности в результате воздействия лазера, претерпевают процессы, аналогичные наблюдающимся в условиях электрораспыления. Образовавшиеся ионы втягиваются в атмосферный ввод масс-спектрометра (рис. 9.17). Метод позволяет работать как с положитель-

ными, так и с отрицательными ионами. Без лазера или высокого напряжения ионы не образуются. Эксперименты с величиной прикладываемого напряжения показали, что интенсивность ионного тока растет при увеличении напряжения от 0,5 до 5,5 кВ за счет увеличения плотности заряда на поверхности жидкого образца. Дальнейшее увеличение напряжения нецелесообразно, поскольку может привести к электрическому пробое.

9.4. Методы ионизации в системе ввода

Вариантом ионизации на воздухе является группа методов, названная ионизацией в системе ввода (Inlet Ionization Methods). При использовании источников ионов, работающих в условиях атмосферного давления, основная потеря ионов происходит на стадии переноса ионов из области с атмосферным давлением в область вакуума. Эти потери могут составлять более 99% от числа образовавшихся в источнике ионов (краевые потери, rim losses) [718]. Однако, если направить в интерфейс между двумя этими областями поток молекул аналита и провести его ионизацию именно там, этих потерь можно избежать. В результате возникло новое направление, названное ионизацией в системе ввода. В этом случае ионизация идет в обогреваемом капилляре интерфейса и не требует ни высокого напряжения, ни лазерного излучения, ни сверхзвукового потока газа, а интенсивность пиков ионов аналитов существенно зависит от температуры капилляра.

В 2010 году вышел в свет ряд работ по методу ионизации **лазерным распылением** (laserspray ionization) [719–722]. Лазер использован исключительно для взрывной десорбции матрицы и аналита в атмосферных условиях. При этом образец помещался в 1–2 мм от атмосферного ввода в масс-спектрометр (рис. 9.18). Важнейшим моментом является высокая температура (300–400 °С) капилляра атмосферного ввода. Именно внутри капилляра идет ионизация десорбированных комплексов молекул матрицы и аналитов. Предполагается, что механизм ионизации близок предложенным для ИЭР, причем молекулы матрицы играют роль растворителя. С холодным капилляром получить сигналы ионов аналита не удастся.

В зависимости от способа нанесения образца можно получать ионы разных типов. При использовании классического метода нанесения образца в МАЛДИ «сухая капля» образуются монопротонированные молекулы низкомолекулярных соединений и полипротонированные молекулы высокомолекулярных, например пептидов. Так, для цитохрома С регистрируются ионы с зарядами от +8 до +15 [719]. Это типичные спектры ИЭР, существенно отличающиеся от обычных спектров МАЛДИ. Тем не менее при простом смешивании порошков аналита и матрицы (без применения растворителя) в спектрах доминируют пики именно однозарядных ионов. Таким образом, есть возможность получать нужные спектры в зависимости от целей эксперимента и характеристик используемого оборудования. При этом для пептидов продемонстрирована чувствительность на уровне аттомолей (10^{-18}). Чуть позже стало ясно, что многозарядные ионы макромолекул можно получать при полном отсутствии растворителя, а использование спектрометрии ионной подвижности (разд. 8.4) перед масс-спектрометрическим анализом дает возможность успешно работать со сложными смесями [723].

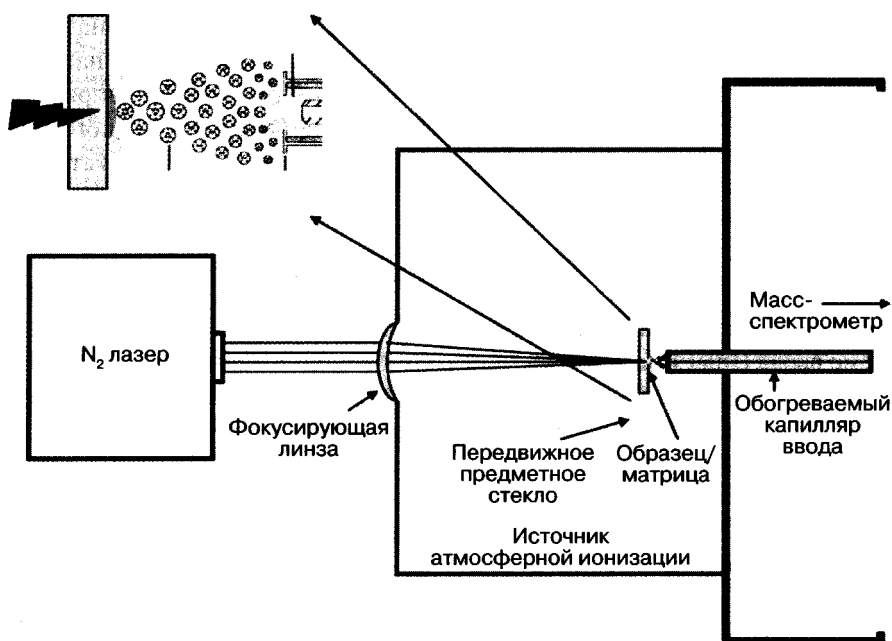


Рис. 9.18. Схема лазерной десорбции с ионизацией в системе ввода [719]

Не обязательно возбуждать образец мощным лазерным облучением [722]. Практически аналогичные результаты получаются при использовании ударной волны (газовая пушка) или даже при касании образца горячим стеклянным капилляром. Ключевым моментом является исключительно температура капилляра интерфейса, а образование ионов не требует ни лазерного облучения, ни подачи высокого напряжения, ни сверхзвуковых потоков газа. Метод был назван **матрично активированной ионизацией в системе ввода** (МАИСВ, matrix assisted inlet ionization, МАИ). Понятно, что опубликованный ранее метод лазерной распылительной ионизации [719] является лишь частным случаем МАИСВ.

Ионизация в системе ввода может использоваться и для жидких образцов [724]. Метод, схема которого представлена на рис. 9.19, назван **активированной растворителем ионизацией в системе ввода** (АРИСВ, solvent assisted inlet ionization, САИ). Поскольку, как и в случае МАИСВ, ионизация протекает в капилляре интерфейса, отсутствуют потери ионов, а чувствительность метода оказывается выше, чем в классических вариантах ИЭР. В частности, для пептидов показана возможность получения качественного сигнала для аттомолярных (10^{-18}) и даже зептомолярных (10^{-21}) концентраций образцов, а для низкомолекулярных соединений (ципрофлоксацин, ацетаминофен) продемонстрирован предел обнаружения ниже одной части на триллион (ppt). Чувствительность сравнима с наноэлектрораспылением, но метод АРИСВ лишен проблем, связанных с работой со сверхмалыми объемами образца и потоками раствора.

Фактически, методы ионизации в системе ввода, как и другие методы ионизации на воздухе, устраняют необходимость использования в конструкциях масс-спектрометра источника ионов.

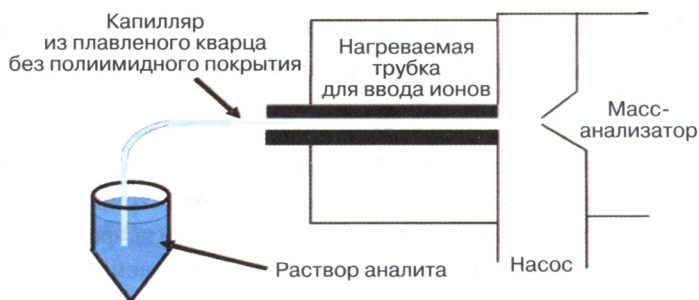


Рис. 9.19. Принципиальная схема метода активированной растворителем ионизации в системе ввода [724]

9.5. Количественные аспекты ионизации на воздухе

Хотя многочисленные варианты масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе уже показали себя превосходным методом детектирования самых разнообразных соединений в самых разнообразных образцах, для того чтобы это направление стало реальным инструментом аналитической химии, очень важна разработка методик количественного определения. То, что масс-спектрометрия с ионизацией на воздухе может быть использована для количественного анализа, уже продемонстрировано в ряде работ, например для спрея с бумаги [665, 668, 725].

Точность количественного определения методами масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе ограничена матричными эффектами. Использование внутренних стандартов, безусловно, улучшает точность и правильность результатов, но их сложно добавлять в твердые образцы. Несмотря на то что пределы обнаружения очень впечатляющи, стабильность ионных сигналов не высока. Поэтому для количественного определения желательно проводить процедуру усреднения спектров. Величина относительного стандартного отклонения при этом может быть на уровне нескольких процентов, хотя обычно она находится в пределах 20% [608]. Однако крайне желательно, чтобы подобные методики не требовали сложной пробоподготовки, как и сами методы анализа. Кукс предложил использовать стеклянные капилляры, покрытые изнутри внутренним стандартом [726]. Жидкая проба, поднимаясь до верхнего конца капилляра за счет капиллярных сил, растворяет заданное количество внутреннего стандарта. При последующем нанесении содержимого капилляра на соответствующую поверхность образуется капля, готовая для проведения анализа. Такой метод пробоподготовки показал отличные результаты с использованием спрея с бумаги, низкотемпературной плазмы и ДЭРИ, причем надежное количественное определение проведено для лекарственных препаратов в крови, наркотиков в моче и пестицидов в природной воде.

Приложение методов масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе для работы с портативными масс-спектрометрами открывает прямой путь для того, чтобы со временем превратить масс-спектрометрию в простой метод, применимый неспециалистами в бытовых условиях. Дополнительную информацию о разных аспектах масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе можно найти в обзорах [607, 608, 614, 616, 621, 623, 624, 626, 627, 727, 728].

9.6. Проведение химических реакций методами масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе

Одно из наиболее интересных направлений развития масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе с точки зрения химика органика — это изучение реакций синтеза органических соединений. Классическая масс-спектрометрия позволяет исследовать в газовой фазе мономолекулярные реакции термоллиза, фотоллиза или катализируемые кислотами и основаниями и даже делать определенные предсказания по структуре и выходу продуктов аналогичных превращений в растворах [729, 730]. Разработанный интерфейс мембранного ввода может с успехом использоваться для детектирования лекарственных препаратов, фенолов и ряда других экотоксикантов в растворах. В частности, продемонстрировано проведение он-лайн контроля реакции хлорирования фенола в воде [57]. Тем не менее существуют значительные отличия протекания химических реакций в источнике масс-спектрометра и в растворе. Они связаны с отсутствием усреднения энергии частиц в результате столкновений, а также эффектов растворителя и противоионов.

Использование многочисленных техник масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе дает возможность изучать не только мономолекулярные процессы, но также би- и тримолекулярные реакции и даже синтезировать самые разнообразные соединения вне колбы. Продукты таких реакций могут либо сразу поступать в атмосферный ввод масс-спектрометра, либо аккумулироваться для последующего анализа или использования в других целях [731]. Таким образом, эти методы можно использовать как в аналитическом, так и в препаративном аспектах. С аналитической точки зрения важным моментом распылительных методов является возможность резко повышать сигналы целевых соединений в результате проведения их дериватизации с образованием легко ионизируемых продуктов. Например, распыление 5% раствора гидроксилamina на поверхность многокомпонентного образца (метод реакционной наноспрейной ДЭРИ) ведет к резкому возрастанию пиков стероидов в результате образования из них оксимов [646]. Ионизация других компонентов смеси, не содержащих кетогрупп, оказалась, наоборот, подавленной (рис. 9.20).

Краунэфиры были использованы [732] в качестве реакционной добавки к электрораспыляемому растворителю (ацетонитрил) для экспрессной проверки качества лекарственного препарата «Тамифлу». Молекулярное распознавание с образованием комплекса гость–хозяин в условиях ДЭРИ позволило надежно детектировать действующее вещество препарата (осельтамивир) с пределом обнаружения на порядок лучше, чем в варианте с чистым ацетонитрилом. Поскольку в спектре наблюдались исключительно ионы протонированного комплекса, метод тандемной масс-спектрометрии (MS^3) дал возможность разработать подходы к количественному определению осельтамивира методом реакционной ДЭРИ.

Реакционный спрей с бумаги применен для анализа альдегидов с диапазоном линейности три порядка. Альдегиды вступают в реакцию с 4-аминофенолом с образованием заряженных иминиевых ионов непосредственно во время проведения спрея с бумаги [733].

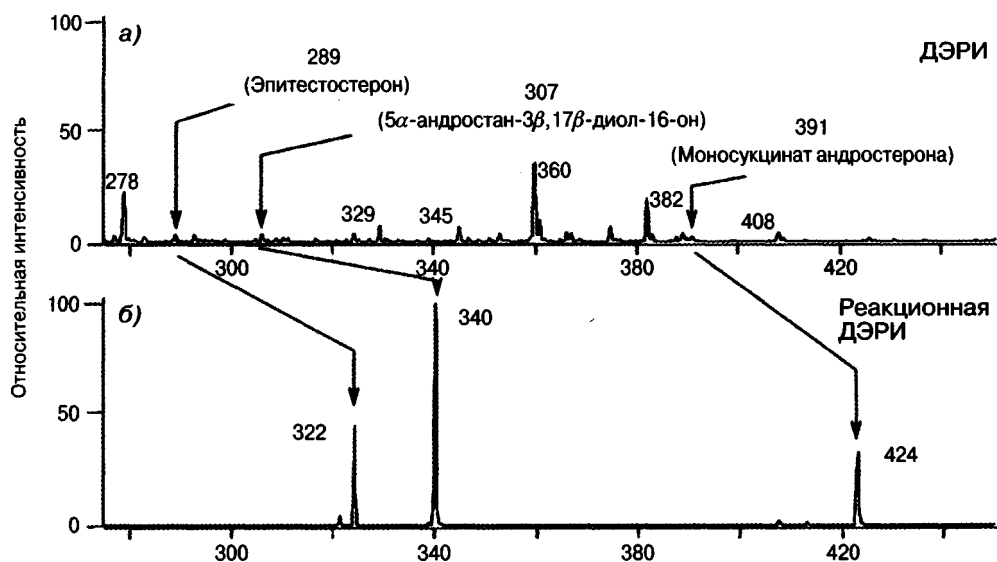


Рис. 9.20. Анализ андростерона, эпитестостерона и 5α -андростан- 3β , 17β -диол-16-она в образце необработанной мочи с использованием ДЭРИ (а) и реакционной ДЭРИ с гидроксиламином в качестве реагента (б) [646]

Еще более интересны препаративные синтетические методы в условиях ионизации на воздухе. Например, методом электроакустической распылительной ионизации (ESSI) удалось провести кротоновую конденсацию инданона-1 и 4-хлорбензальдегида с 92% выходом в течение 1 минуты [731]. Фактически речь идет о химическом микрореакторе, способном генерировать продукт со скоростью 0,6 мг/мин. Уже на достигнутом аппаратном уровне можно применять распылительные методы с ионизацией на воздухе для целей комбинаторной химии. Описано протекание с повышенной скоростью реакций Михаэля, Кляйзена, других реакций с образованием новой С—С связи как в микрокаплях, так и в тонких пленках или в результате мягкого напыления [731, 734]. Если удастся перевести эти процессы на уровни граммов (а лучше килограммов), появится простой, быстрый и дешевый вариант синтетической химии вне колбы. Фактически, это вариант проведения реакций в ограниченном объеме, среди которых наиболее известны реакции в мицеллах [735].

Осуществлять подобные химические превращения на воздухе вне колбы можно в самых разных вариантах, например:

- 1) пересечением двух спреев с заряженными каплями, которые содержат все необходимые реагенты для протекания химической реакции (ЭЭРИ);
- 2) направлением спрея с заряженными частицами одного реагента на поверхность, на которой находится другой реагент в твердом или жидком состоянии (реакционная ДЭРИ);
- 3) простым распылением реакционной смеси, содержащей уже оба реагента и любые необходимые добавки (кислота, щелочь);
- 4) нанесением (одновременно или по очереди) реагентов на бумагу с последующим спреем с бумаги.

Суть всех этих методов заключается в том, что микрокапельки вторичного спрея (радиус порядка 1 мкм), направленного от поверхности образца к атмосферному вводу в масс-спектрометр, представляют собой микрореакторы, в которых по мере уменьшения их объема существенно возрастает концентрация реагентов и меняется рН, что, в свою очередь, дополнительно ускоряет реакции, катализируемые кислотами и основаниями [736]. В таких условиях даже те реакции, которые требуют длительного времени при проведении эксперимента в колбе, идут с очень большими скоростями, приводя к количественному образованию продуктов за минуты и даже секунды [737]. Аналогичный эффект резкого увеличения скоростей химических реакций наблюдается также в тонких пленках, образующихся при распределении капли реакционной смеси на поверхности в комнатных условиях [734]. Если позволить раствору высохнуть в комнатных условиях, образующаяся тонкая пленка также представляет собой микрореактор с ограниченным объемом. Ускорение реакции обусловлено резким уменьшением числа молекул растворителя. Например, S_N2 ионно-молекулярная реакция практически не требует энергии активации, что близко к тому, как это наблюдается для нее в газовой фазе, когда любое столкновение реагентов приводит к образованию продукта [738]. Большие площади поверхности, которыми характеризуются микрокапли или тонкие пленки, облегчают протекание физических процессов испарения и предпочтительного распределения растворенных веществ на поверхности, а не внутри объема [739]. Это означает, что электрораспыление действительно может легко и эффективно генерировать слабосольватированные высокореакционноспособные ионы в воздушной среде. Это наблюдение привело к созданию нового направления исследований [740], известного как мягкое напыление на воздухе (см. ниже).

Методы ионизации на воздухе позволяют также изучать механизмы химических превращений. Поскольку шкала времени реакций в ДЭРИ измеряется микро- и миллисекундами, а чувствительность превосходна, можно «поймать» короткоживущие интермедиаты, которые не могут быть зарегистрированы другими методами (ЯМР, ИК, ИЭР и т.д.), что, безусловно, очень ценно для изучения механизмов. В частности, методом ДЭРИ удалось установить несколько интермедиатов с участием молекул катализатора, субстрата и растворителя в реакциях гидрирования кетонов с использованием металлоорганических Ru катализаторов [741], при проведении реакций нуклеофильного ароматического замещения методом реакционной ДЭРИ детектированы комплексы Мейзенгеймера [742], а в реакции Катрицкого между трифенилпирилиево-й солью и аминами все стабильные соединения, а также интермедиаты с нарушенной ароматичностью (схема 9.1) [743].

Еще одним вариантом изучения реакционных интермедиатов является термическая активация заряженных капель в ИЭР. Это способствует протеканию ионных реакций при атмосферном давлении. В работе [744] удалось провести вне прибора синтез индола по Фишеру и пинаколиновую перегруппировку.

Введение функций в молекулы алканов является одной из важнейших проблем химии. Спрей с бумаги может быть полезным в решении этой задачи [745]. Если нанести на фильтровальную бумагу треугольной формы нормальные алканы (от C_{30} и более), поместить ее в атмосферу азота и приложить потенциал ~ 5 кВ, наблюдается образование ионов $[M + N]^+$. Прямой масс-спектрометрический анализ этих ионов,

а также последующий анализ электрораспылением субстрата, полученного ионным напылением образующихся частиц, показал, что они являются протонированными имидами, т.е. атом азота в условиях эксперимента внедряется по связи C—C. Механизм реакции, вероятно, обусловлен взаимодействием молекулы алкана с ионом N_3^+ , который образуется при электрических разрядах в азоте [745]. В результате реакции происходит выделение молекулы азота и образование нитрениевого иона при внедрения азота по связи C—C. Далее нитрениевый ион перегруппировывается в иминиевый.

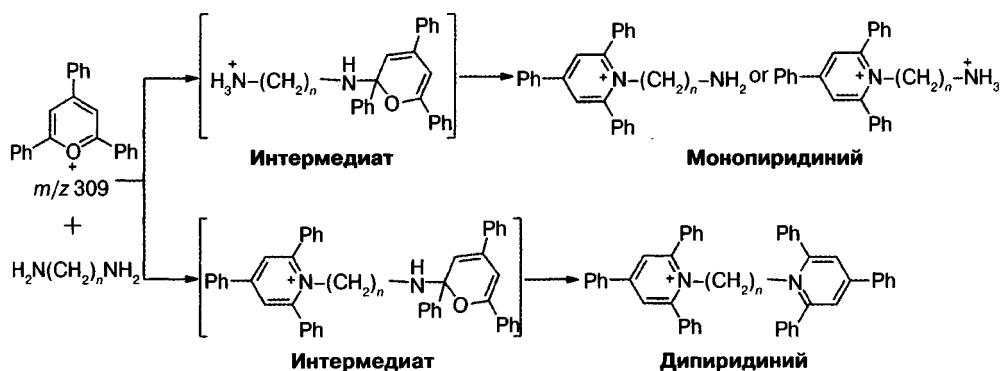


Схема 9.1

9.7. Мягкое напыление на воздухе

Термин «мягкое напыление» означает процесс столкновений гипертермальных многоатомных ионов с кинетической энергией ≤ 100 эВ с поверхностью в условиях вакуума, который приводит к связыванию с поверхностью неизменных ионов или соответствующих молекул [746]. Этот процесс всегда конкурирует с альтернативными: упругими столкновениями, диссоциацией, индуцированной поверхностью (разд. 7.1.2), а также многочисленными реакциями ион—поверхность. Принято выделять три основных механизма мягкого напыления: ион захватывается в неизменном виде [747], ион нейтрализуется с образованием соответствующей молекулы со структурой исходного иона [748], захваченный ион реагирует с молекулами на поверхности (реакционное напыление) [749]. Понятно, что конкурентоспособность этих трех процессов зависит от природы ионов и поверхности. Возможности масс-спектрометрии по выделению нужного иона с требуемой массой, кинетической энергией и зарядом делают этот метод весьма перспективным для производства материалов с модифицированной поверхностью с заданными свойствами. Метод уже был использован для выделения чистых соединений из смесей, депонирования кластеров нужной массы на разных субстратах, иммобилизации биомолекул на металлизированных поверхностях, для экспериментов по созданию новых катализаторов [740].

Мягкое напыление на открытом воздухе осуществляется при направлении заряженных электрораспыленных капель на подготовленную поверхность с помощью отклоняющих электродов. При этом капли должны пролететь по воздуху 10–12 сантиметров [740]. Это необходимо для максимально возможного высушивания капель

в результате быстрого испарения растворителя. Образующиеся микросольватированные ионы далее легко вступают в реакции. Реакционное мягкое напыление подразумевает протекание гетерогенных реакций ионов с твердой поверхностью, в отличие от гомогенных реакций в каплях в условиях ДЭРИ. Тем не менее и те и другие реакции протекают быстро и эффективно [734, 736]. Например, нано-электрораспылительная ионизация может быть использована для доставки реагента и мгновенной количественной дериватизации пептидов на поверхности [750].

Реакции сухих газопазных ионов с реагентом на поверхности могут протекать несколько отлично от аналогичной реакции в растворе. При этом увеличивается не только скорость, но и селективность процесса. Например, взаимодействие трифенилпирилиевых ионов с этаноламином в условиях реакционного мягкого напыления приводит исключительно к трифенилпиридиниевым продуктам, тогда как в растворе возможно образование нежелательных побочных продуктов при протекании реакции по атому кислорода этаноламина [751]. Может несколько меняться и механизм реакции. Этот результат показывает, что гетерогенные реакции ионов с твердыми реагентами на поверхности могут быть весьма интересны для последующего изучения как самостоятельное направление в химии и потенциальный путь для синтеза высокочистых соединений. Уже на данном этапе очевидно, что методами реакционного мягкого напыления можно получать модифицированные поверхности разного состава с четко ограниченными размерами.

Многочисленные примеры проведения химических реакций в комнатных условиях вне колбы представлены в обзорах и статьях [607, 646, 731, 737, 742, 743, 752, 753].

9.8. Использование портативных масс-спектрометров

Миниатюризация — одно из наиболее интересных направлений в современной масс-спектрометрии. Впервые вопрос о миниатюризации был поднят примерно четверть века назад [754]. С созданием методов ионизации на воздухе появилась возможность проводить анализы вне лаборатории, непосредственно на месте пробоотбора, например дома, на огороде, когда не проба доставляется в лабораторию, а прибор доставляется на место проведения анализа [755]. Безусловно, в этом случае простота и вес прибора приобретают ключевое значение [756]. Несколько новых моделей таких приборов создаются ежегодно. Чтобы быть востребованными и эффективными, такие приборы должны быть чувствительными, простыми, быстрыми и дешевыми. Миниатюризация в масс-спектрометрии достойна отдельной главы, но все же это, скорее, аналитическая, а не органическая химия. К тому же совсем недавно опубликован обзор, написанный сотрудниками наиболее продуктивной в этом направлении лаборатории под руководством Грема Кукса [59]. Поэтому в данной главе будут рассмотрены лишь наиболее интересные последние достижения в области применения масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе с использованием портативных приборов.

Говоря о системах ввода образца в прибор, следует выделить мембранный ввод, использование капилляра или твердого сорбента, а также интерфейс дискретного ввода при атмосферном давлении (*discontinuous atmospheric pressure interface*, DAPI).

Масс-спектрометрия с мембранным вводом (разд. 1.3) является одним из наиболее удобных подходов для прямого анализа воздушных и водных проб при использовании портативных масс-спектрометров в он-лайн режиме. Метод надежен, прост и обладает достаточной чувствительностью для непрерывного мониторинга различных экологически важных соединений [757]. Так, портативный тандемный прибор, предложенный в [61], способен работать с водными и воздушными пробами в непрерывном режиме мониторинга с пределом обнаружения до единиц ррб. Твердый сорбент используется для классического варианта анализа паров и газов в воздушной среде методом термодесорбции (разд. 1.4). Система может быть легко автоматизирована и применяться для контроля целевых аналитов на местности. Портативный прибор на основе твердого сорбента для контроля токсичных промышленных выбросов описан в работе [758], а для аналогов компонентов химического оружия в [759]. Ввод при помощи капилляра покрытого полидиметилсилоксаном [760] осуществляется при его контакте с анализируемой пробой с последующей десорбцией аналитов в масс-спектрометре с электронной ионизацией.

Новые методы масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе существенно сократили время анализа и расширили диапазон анализируемых веществ. Однако они требуют наличия мощных насосов для поддержания вакуума. Поскольку для портативных приборов это невозможно, были созданы специальные устройства. Наиболее успешным на сегодняшний день является **интерфейс дискретного ввода при атмосферном давлении** (ДВАД) [761]. Этот интерфейс позволяет работать не только с методами ионизации на воздухе, но и с методами атмосферной ионизации (ИЭР, ХИАД). Канал большой проводимости открывается лишь на короткое время (15 мс). Воздух, пары веществ и ионы попадают в вакуумную камеру, в которой ионы захватываются низковольтным радиочастотным полем, а нейтральные частицы откачиваются до необходимого давления порядка 1 мТорр (обычно это занимает 200–800 мс). После этого включается высоковольтное радиочастотное поле для регистрации масс-спектра (или МС/МС). Такой подход эффективен при работе с пробами в любом агрегатном состоянии и не требует пробоподготовки.

В зависимости от того, где происходит ионизация: в вакууме или в атмосферных условиях, методы ионизации классифицируются как внутренние или внешние. В миниатюрных масс-спектрометрах для большинства аналитов требуются внешние методы, за исключением летучих компонентов, которые могут быть введены посредством мембраны или сорбента. В качестве внутренних используются ИЭ, ИЭР, ХИАД, а методы масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе по определению являются внешними. Для портативных приборов наиболее эффективными оказались ДЭРИ, НТП, спрей с бумаги и ДХИАД [762].

Хотя портативные масс-спектрометры создаются на базе разных анализаторов (квадруполи, ловушки, времяпролетные), наибольшие успехи в миниатюризации связаны с ионными ловушками, которые характеризуются не столь строгими требованиями по поддержанию вакуума (уровень мТорр) и могут работать в режиме тандемной масс-спектрометрии. На сегодняшний день созданы приборы на базе ловушек самых разных типов [59]. В большинстве случаев регистрируются положительные ионы, хотя для определенных классов веществ (нитросоединения) эффективнее оказалась работа с отрицательными ионами [763].

Поскольку в обзоре [59] подробно описаны различные варианты портативных приборов для самых разных целей, ниже представлены только разработки последних 2–3 лет и примеры их использования. Миниатюрный масс-спектрометр с ионизацией на воздухе Mini 12 был создан в 2013 году для работы без пробоподготовки. Его диапазон масс достигает m/z 900, а tandemные эксперименты возможны до уровня МС⁵. Вес прибора 25 кг, а потребляемая мощность 100 Вт. Он может работать от сети переменного тока в 110 В или от батареи. Mini 12 пригоден для соединений разной полярности, а система загрузки образца и программное обеспечение дают возможность работать в автоматизированном режиме без пробоподготовки даже непрофессиональным масс-спектрометристами [764]. Прибор полезен для анализа проб окружающей среды, медицинских препаратов и для контроля качества пищевых продуктов. Использование режима МС/МС позволяет проводить количественное определение целевых аналитов методом внутреннего стандарта, а пределы обнаружения ряда фармацевтических препаратов в крови составляют 7,5 нг/мл.

В ручном беспроводном зонде НТП пистолетного типа для лабораторных и портативных масс-спектрометров в качестве источника разрядного газа используется миниатюрный баллончик с гелием [611]. Конструкция позволяет работать с образцами во всех агрегатных состояниях без пробоподготовки. Небольшой литиевой батареи (7,4 В) хватает на 2 часа непрерывной работы. Сравнение этого зонда с обычными источниками НТП продемонстрировало его улучшенную работу. Благодаря уменьшению потребления газа, причем используя для целей создания НТП именно воздух, Кукс с коллегами создали новый зонд, который в сочетании с миниатюрным прибором Mini 11.5 позволил регистрировать пики взрывчатых веществ на нанограммовых уровнях на стеклянной поверхности [765]. Основным достоинством конструкции является замена баллона со сжатым газом на небольшой диафрагменный насос, подающий атмосферный воздух к плазменному зонду. Портативный масс-спектрометр для изучения других планет [766] способен работать с жидкими и твердыми смесевыми образцами, проводить целевой анализ и устанавливать структуры новых соединений методами tandemной масс-спектрометрии (до МС⁵).

В приборе с разделенными блоками [767] ввод, ионизация, разделение ионов и детектирование протекают в одной части прибора, а блоки питания, насосы и система контроля находятся в другой. Обе части соединены гибкой трубкой из нержавеющей стали длиной 1,2 м и внутренним диаметром 25 мм (рис. 9.21). Входной капилляр был удлинен до 10 см, а его внутренний диаметр увеличен в два раза до 500 мкм. Такая конфигурация привела к расширению вакуумного объема прибора, что считается недостатком для классических масс-спектрометров. Однако для портативного прибора с ДВАД это оказалось преимуществом, поскольку количество удерживаемых ионов в этом случае пропорционально вакуумному объему. Система большего объема позволяет пропустить через ДВАД до достижения того же давления больше газа. Следовательно, больше ионов удастся удерживать. Система оказалась в три раза чувствительнее, чем предыдущий вариант без соединительной трубки, что объясняется увеличением вакуумного объема и большей эффективностью переноса ионов через капилляр большего диаметра. В качестве недостатка отмечено увеличение времени откачки до требуемого давления 2 мТорр с 0,4 до 1,25 секунды. Это привело к увеличению времени получения спектра с 0,7 до 1,5 секунды [767].

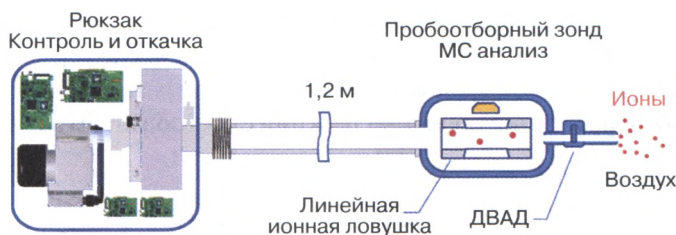


Рис. 9.21. Схематическое изображение миниатюрного масс-спектрометра с гибким соединением [767]

Предложенная конфигурация стала прообразом портативного масс-спектрометра типа пылесоса [768]. В головке прибора весом 2 кг, соприкасающейся с исследуемой поверхностью, находится собственно ионная ловушка с ДВАД и источником НТП. Эта часть гибким шлангом соединена с насосом, блоком питания и управления общим весом 10 кг, которые помещены в рюкзак. Прибор создан в первую очередь для детектирования следов нелетучих соединений на различных поверхностях. Низкотемпературная плазма была выбрана в качестве метода ионизации, поскольку она эффективно работает и с положительными, и с отрицательными ионами. Плазма образуется приложением напряжения низкой амплитуды, потоки разрядного газа невелики, изготовление источника не вызывает проблем, а необходимость в применении растворителей или других реагентов отсутствует. Прибор хорошо зарекомендовал себя для анализа на нанограммовых уровнях взрывчатых и отравляющих веществ, наркотиков и других соединений непосредственно на поверхности в режиме реального времени без какой-либо пробоподготовки. При этом поверхность может иметь сложную геометрию, быть чувствительной к нагреву и содержать сложные матрицы. Энергопотребление масс-спектрометра 65 Вт при автономной работе от батареи в течение полутора часов. Максимальная регистрируемая масса 925 дальтон при единичном разрешении. Важно также подчеркнуть, что оператором может быть человек без профессиональной инструментальной или химической подготовки. Во всех вариантах конструкций важную роль играет размещение и характеристики насосов [769].

Масс-спектрометрический он-лайн контроль за протеканием химических реакций в научных лабораториях и на производстве может дать очень много информации о течении процесса и его механизме. Выше упоминалось об использовании для этой цели ЭЭРИ [663, 664]. Портативные приборы можно разместить в химической лаборатории или на заводе рядом с установкой для проведения реакции. Масс-спектрометр 4000MiD весом 27 кг [770] использован с ИЭР для непрерывного контроля за протеканием перегруппировки Гоффмана (трансформация амидов в амины) [771]. Наблюдая за исходным веществом, конечным продуктом, промежуточным изоцианатом и несколькими примесями, авторы смогли оптимизировать процесс. Хотя на стационарном приборе в лаборатории в офф-лайн режиме можно было увидеть большее число примесей, оперативные выводы об изменении условий реакции можно делать и по результатам работы портативного прибора.

Контроль за еще более сложной цепочкой реакций, включая получение диазотированием дегидробензола с последующей его реакцией с фураном (схема 9.2),

был осуществлен на аналогичном приборе 3500MiD [772]. С помощью этого портативного масс-спектрометра удалось установить оптимальную температуру и время проведения превращения с выходом целевого продукта реакции Дильса – Альдера, а также выявить направления побочных реакций с образованием акридона и других соединений.

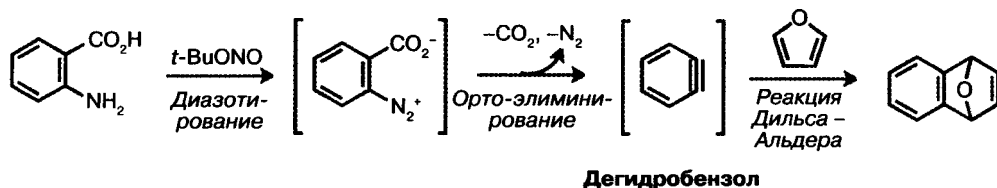


Схема 9.2

9.9. Методы масс-спектрометрической (молекулярной) визуализации (Imaging mass spectrometry)

Молекулярная визуализация (имиджинг) стала чрезвычайно популярным направлением масс-спектрометрии в XXI веке. Это связано с огромным объемом детализированной химической информации, которая может быть получена с ее помощью. В классическом варианте масс-спектрометрия дает возможность идентифицировать и количественно определить самые разные соединения в конкретном образце. Масс-спектрометрическая визуализация позволяет установить распределение этих соединений или их групп по поверхности или объему образца. В первую очередь это важно для биологических объектов, органов и тканей животных и растений. Визуализация является общим принципом нескольких классических методов, например радиоактивного иммуноанализа или флюоресцентной микроскопии. Однако их существенным недостатком является то, что исследуемые молекулы должны быть заранее известны и промаркированы. Напротив, для масс-спектрометрии такая предварительная информация совсем не обязательна. Возможен как целевой, так и нецелевой анализ. Исследователь может заранее не знать, что он увидит в образце, но обнаружить важнейшие маркеры в процессе эксперимента. Кстати, метод используется не только для визуализации распределения биологических молекул. Достаточно много работ по установлению распределения в биологических тканях компонентов лекарственных препаратов и их метаболитов или даже конкретных химических элементов [773].

В обычном варианте (рис. 9.22) проведение эксперимента требует предварительного изготовления образца в виде тонкого среза (например, микротомом). Образец закрепляется на подложке, которая может перемещаться в двух направлениях. В случае МАЛДИ процесс несколько сложнее, поскольку необходимо нанести матрицу. В наиболее распространенном варианте анализа микрозондированием тонкий сфокусированный луч лазера или пучок ионов направляется на конкретный участок пробы и вызывает десорбцию и ионизацию соединений на ее поверхности. Полученный набор ионов направляется в масс-спектрометр для анализа.

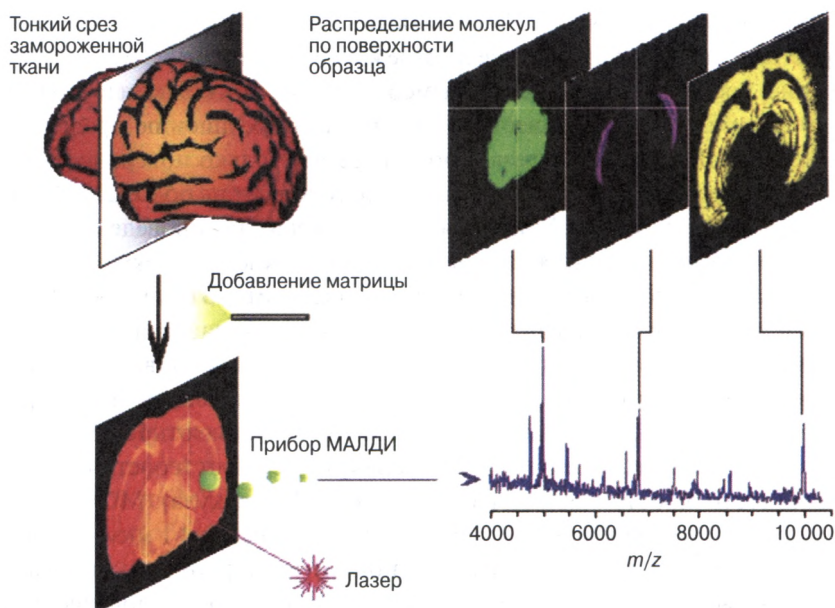


Рис. 9.22. Принципиальная схема проведения масс-спектрометрической визуализации методом МАЛДИ [800]

Генерированный масс-спектр остается в памяти прибора, а десорбирующий пучок перемещается на соседний участок поверхности. Перемещение обычно осуществляется механически за счет движения всей мишени с образцом. Так сканируется вся поверхность образца, а каждый пиксель соотносится с масс-спектром. Чем меньше диаметр этого луча (пучка), тем меньше размер пикселя и тем выше будет пространственное разрешение в эксперименте. Помимо этого, размер пикселя определяется скоростью движения образца, возможностью переноса материала в процессе десорбции на соседние участки, шириной шага и т.д. В настоящее время размер пикселя может составлять менее 10 мкм, а при использовании заряженных пучков фуллерена достигнуто рекордное разрешение 100 нм [259], которое можно использовать для проведения экспериментов на клеточном и даже субклеточном уровне [774]. Дополнительное преимущество создают комбинированные источники, в которых одновременно можно использовать две комплементарные техники, например МАЛДИ и усиленный матрицей C_{60}^+ ВИМС [775]. Перспективным вариантом является визуализация методом **масс-спектрометрии с наноструктурированным инициатором МСНИ** (Nanostructure-initiator mass spectrometry, NIMS), описанным в разд. 5.16. В этом случае [325, 376] практически отсутствует пробоподготовка, пространственное разрешение и диапазон масс (нет матрицы) лучше, чем у МАЛДИ, а отсутствие фрагментации, характерной для ВИМС, улучшает чувствительность, достигающую величин сотен йоктомолей (рис. 5.17).

В альтернативном варианте эксперимента, названном «микроскопирование» использование искаженных траекторий ионов от поверхности к позиционно-чувствительному двумерному детектору дает возможность одновременного сканирования большей площади. Этот вариант значительно быстрее, но требует наличия

специальной оптики и вакуума [776]. Понятно, что чем меньше пятно лазера, тем выше пространственное разрешение и четче картинка, но тем не менее существует ограничение, поскольку уменьшение размера исследуемой области в 10 раз (например, от 10 до 1 мкм) может привести к 100-кратному ухудшению предела обнаружения. В случае ВИМС, когда пучок ионов срезает только поверхностный слой, участок образца размером 1 микрон в диаметре содержит не более 200 000 молекул среднего молекулярного веса. Учитывая, что в образцах для проведения визуализации присутствуют самые разнообразные компоненты, число молекул аналита может измеряться всего несколькими сотнями, а то и десятками. В случае МАЛДИ, когда ионизируется не только поверхностный монослой (глубина десорбции до 300 нм), при использовании лазерного пятна в 1 мкм ситуация, безусловно, лучше. Тем не менее, принимая во внимание, что далеко не все эти молекулы ионизируются в условиях эксперимента, понятно, что надо с осторожностью относиться к увеличению пространственного разрешения. Поскольку существует теоретический предел чувствительности любого аналитического метода (1 молекула), МС-изображения с пространственным разрешением значительно меньше, чем 1 мкм, скорее всего, не будут давать какую-то исключительно полезную информацию при изучении распределения веществ в типичных биоаналитических или экологических образцах. В этих условиях большинство компонентов образца будет присутствовать в количестве ниже предела обнаружения.

При планировании эксперимента надо также помнить, что любое увеличение числа пикселей приведет к квадратичному увеличению времени эксперимента. Поэтому, если выбранное (не самое высокое) пространственное разрешение позволяет решить поставленную аналитическую задачу, не стоит увеличивать его дополнительно.

Если задачей эксперимента является установление распределения целевого соединения, строится масс-хроматограмма по его характеристической массе, а программное обеспечение визуализирует результаты, используя оттенки цвета для демонстрации его интенсивности в каждом пикселе. Присутствие разных соединений на одном рисунке можно отображать интенсивностями разных цветов (рис. 9.23).

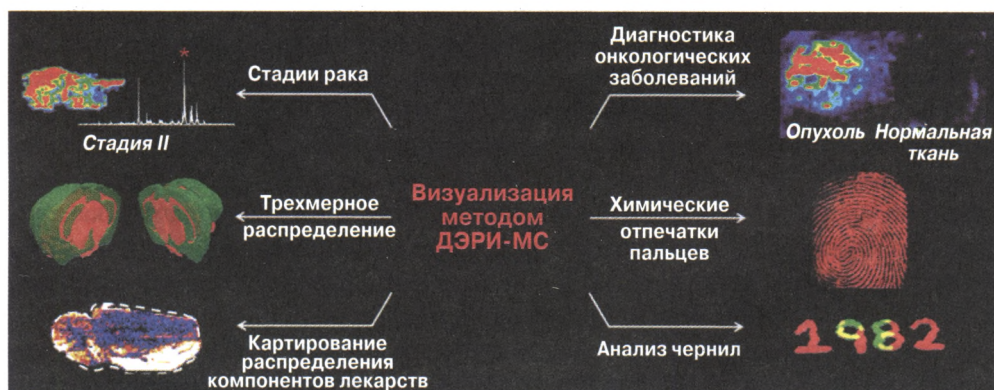


Рис. 9.23. Некоторые варианты исследований с использованием визуализации методом ДЭРИ [777]

Если аналиты предварительно неизвестны (нецелевой анализ), используется специальное программное обеспечение быстрого просмотра сохраненных масс-спектров с выявлением характеристических ионов, по которым далее и выстраивается изображение. Теоретически визуализировать можно ион с любой массой в диапазоне регистрируемого спектра. Кстати, использовать можно и масс-спектрометрию высокого разрешения, и тандемную масс-спектрометрию (см. ниже). Оба варианта улучшают чувствительность и специфичность эксперимента.

Существует ряд программных продуктов, которые на базе масс-спектров полученных в каждом пикселе, создают двумерную картинку. Интенсивности одного цвета отвечают за различия в интенсивностях ионов одного типа от точки к точке. Можно накладывать изображения одного иона на другой [778]. При использовании масс-спектрометрии высокого разрешения размер конечных файлов может быть очень большим, достигая гигабайтов. С файлами слишком большого размера становится сложно работать. Поэтому вновь возникает компромисс между максимальными возможностями прибора, трудоемкостью анализа и важностью информации.

Трехмерные изображения можно получать объединением информации, полученной при сканировании отдельных тонких срезов. В альтернативном варианте возможно последовательное изучение образца в глубину. Если во время первого прохождения первичного пучка по поверхности верхний слой полностью удаляется, последующие сканирования могут дать информацию о более глубоком распределении аналитов. Возможность таких экспериментов зависит от многих параметров, включая метод ионизации, величину пикселя, ширину шага, природу растворителя и т.д. Поскольку ДЭРИ взаимодействует с поверхностью селективно, вымывая определенные группы соединений, эксперименты по прямой трехмерной визуализации оказываются невозможны. Напротив, ВИМС [779] и ЛАЭРИ [714] позволяют проводить подобные исследования с разрешением по глубине < 100 нм и 30 мкм соответственно. Кстати, трехмерные изображения предоставляют прямую корреляцию между распределением конкретных молекул в объеме образца и структурой тканей [780]. Подробнее о технике эксперимента и приложениях метода можно прочитать в обзорах [778, 781–785].

Началом масс-спектрометрической визуализации можно считать работу Хилленкампа [786], который разработал первый прибор для масс-спектрометрического анализа микропроб лазерной десорбцией и показал его эффективность для установления элементного и молекулярного состава биологических образцов с приемлемым пространственным разрешением. К концу XX века основными методами для проведения имиджинга стали матрично активированная лазерная десорбция/ионизация и вторичноионная масс-спектрометрия.

Создание методов масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе придало новый импульс этому направлению. Наиболее эффективными оказались методы ДЭРИ, нано-ДЭРИ, ЛАЭРИ. Их достоинствами являются отсутствие пробоподготовки, возможность работать со сложными поверхностями, включая неровные и большого размера, проведение одновременной дериватизации аналитов, добавляя реагент в спрей растворителя ДЭРИ, и даже контроль за ходом хирургических операций (разд. 9.10). Методы особенно хороши для визуализации небольших молекул, поскольку отсутствует перекрывание с ионами матрицы (как в МАЛДИ), а фраг-

ментация практически отсутствует (в отличие от ВИМС). Эти методы позволяют проводить эксперименты не только в супероснащенных научных центрах, но и в хирургических операционных или криминалистических лабораториях. Все они основаны на двух процессах: десорбции и ионизации, которые могут протекать как одновременно (ДЭРИ), так и последовательно (ЛАЭРИ). На рис. 9.24 представлены схемы четырех основных методов масс-спектрометрической визуализации.

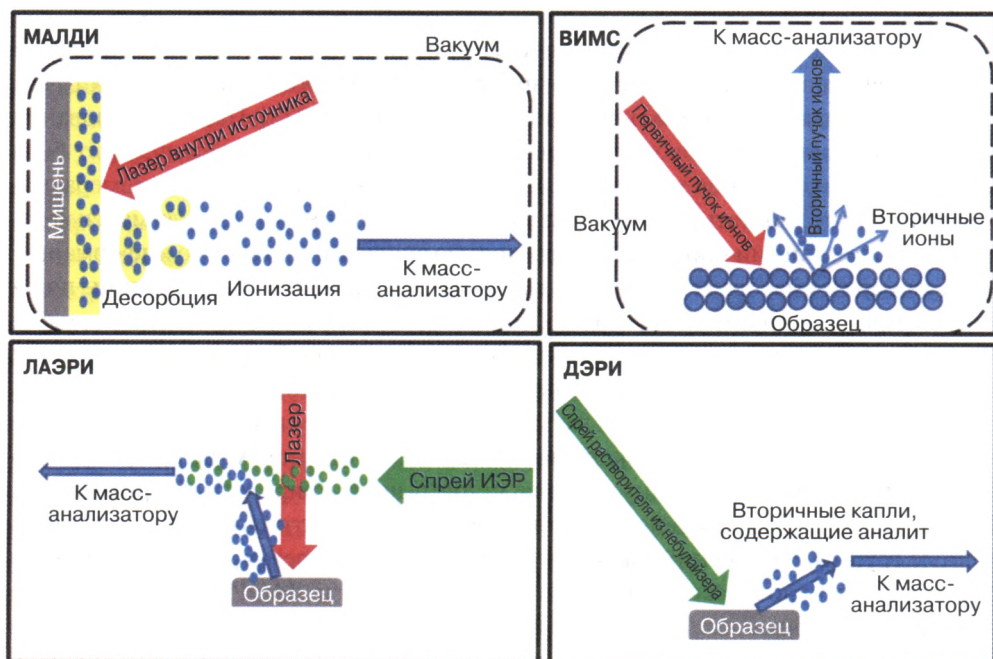


Рис. 9.24. Принципиальные схемы четырех основных методов масс-спектрометрической визуализации: МЛДИ, ВИМС, ЛАЭРИ и ДЭРИ [777]

Когда речь идет о сложных биологических молекулах, вероятность наличия изобарных (с одинаковой целочисленной массой) ионов в спектре очень высока. На рис. 9.25 представлены результаты визуализации фосфолипидов в образце мозга мыши [621]. Ионы А2 и В1 имеют разницу в массах всего 0,065 дальтон и требуют разрешающей способности 15 000.

Если масс-спектрометрия высокого разрешения успешно используется для дифференцирования изобарных молекул, tandem mass spectrometry может быть полезной для дифференцирования изомеров. Идентификация красителя чернил — хороший пример эффективности tandem mass spectrometry для целей криминалистики [620]. На рис. 9.26 красные чернила использованы для написания числа «2700». При этом в цифрах «2» и «7» чернила содержали 2 пигмента (родамин В и родамин 6G), а в написании «00» — только родамин В. Метод ДЭРИ с регистрацией протонированных молекул дает возможность прочесть всю надпись по току ионов с m/z 443, а для ДЭРИ в режиме MS/MS с регистрацией перехода m/z 443 \rightarrow m/z 415 (отщепление молекулы этилена) видимыми оказываются только участки, содержащие родамин 6G.

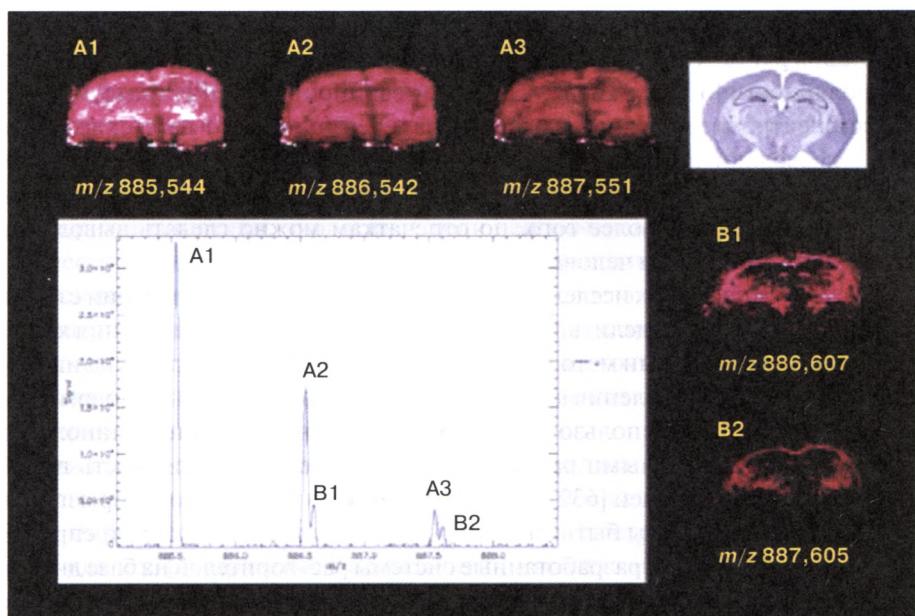


Рис. 9.25. Распределение фосфолипидов в образце мозга мыши методом масс-спектрометрической визуализации с высоким разрешением

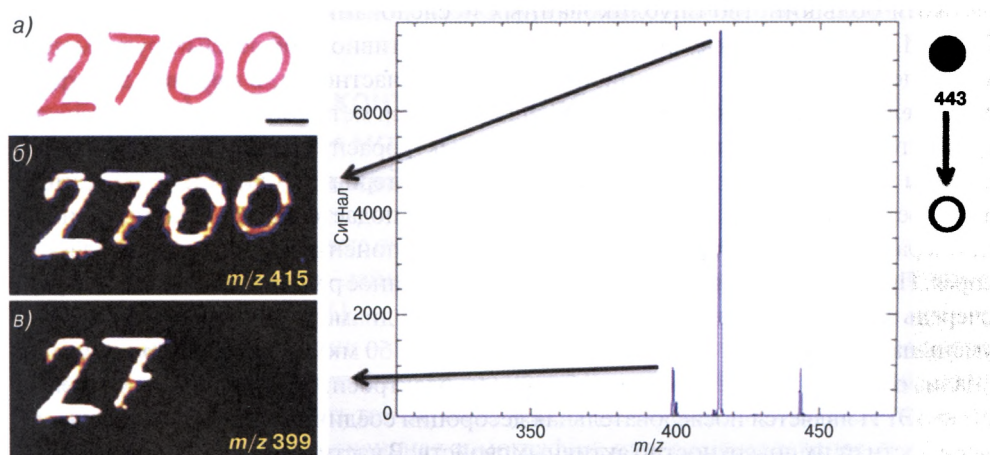


Рис. 9.26. Использование метода tandemной масс-спектрометрии для целей молекулярной визуализации [620]

Наибольшее число работ по визуализации биологических тканей методами масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе выполнено на липидах [785]. Липиды очень хорошо ионизируются и дают интенсивные сигналы не только на воздухе, но и в вакууме (МАЛДИ). Однако липиды могут маскировать присутствие в образце других соединений. Для регистрации, например, белков методом МАЛДИ желательно предварительно удалять липиды [787]. В случае ДЭРИ это не обязательно, хотя определенное подавление сигнала красителей, пептидов, алкалоидов имеет

место, особенно если массы интересующих соединений оказываются в диапазоне масс липидов данного образца. Выходом из этого может быть регистрация ионов другой полярности [618] или использование реакционной ДЭРИ (разд. 9.6 и 9.7).

Масс-спектрометрические отпечатки пальцев (рис. 9.23) на стекле, бумаге, пластике позволяют однозначно связать конкретное соединение и конкретного человека. Положительные результаты можно получить даже при перекрывании нескольких отпечатков. Более того, по отпечаткам можно сделать вывод о том, какие лекарства принимал человек и что он ел [788].

Среди многочисленных исследований по молекулярной визуализации с ионизацией на воздухе можно выделить, например, установление распределения холестерина в биологической ткани методом реакционной ДЭРИ [789] или создание трехмерных образцов распределения конкретных молекул внутри целых биологических органов [714, 790]. При использовании ДЭРИ с обычными водно-метанольными или ацетонитрильно-водными растворителями существует вероятность повреждения биологических тканей [632]. В связи с этим и во избежание разбрызгивания материала образцы должны быть очень точно расположены под струей спрея. Эту проблему решают недавно разработанные системы растворителей на базе диметилформамида (с ацетонитрилом и этанолом). Такие смеси позволяют получить интенсивные сигналы липидов методом ДЭРИ, сохраняя морфологию анализируемой ткани и не нарушая распределения белков. Поэтому есть возможность использовать образцы повторно для проведения, например, МАЛДИ имиджинга [791].

Хотя большинство опубликованных исследований базируется на ДЭРИ и ЛАЭРИ, для целей молекулярной визуализации активно пробуются и другие методы масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе. В частности, в **зондовой электрораспылительной ионизации** (ЗЭРИ) [679] используются металлические иглы в качестве пробоотборника и эмиттера последующего электрораспыления. Игла углубляется в пробу и адсорбирует определенное количество материала. Затем она подносится к атмосферному вводу в масс-спектрометр, на нее подается высокое напряжение, а поток растворителя десорбирует и ионизирует компоненты по механизмам электроспрея. При проведении визуализации пространственное разрешение зависит в первую очередь от диаметра иглы. Обычно используется диаметр 100 мкм, но его можно уменьшать. Например, авторы [792] использовали 50 мкм иглы, хотя последующий анализ основывался на термодесорбции, а не электроспрее. Интересной особенностью ЗЭРИ является последовательная десорбция соединений разных классов в зависимости от их поверхностно активных свойств. В частности, при анализе опухоли сначала в спектре могут наблюдаться интенсивные пики белков, а на поздней стадии — липидов [793]. В качестве недостатков можно отметить возможность загрязнения новых порций материала не полностью десорбированным веществом предыдущих порций и неоднозначность количественной оценки при сорбировании соединений разной природы на металлическую иглу. Роботизированный вариант молекулярной визуализации с использованием металлических игл и ПАРВ позволяет работать с искривленными поверхностями, а лимитирующей стадией вновь является отжиг собранного ранее материала с иглы перед забором новой пробы [794].

Очень высокое пространственное разрешение достижимо при использовании нано-ДЭРИ [644]. Это связано с диаметром капилляров и с отсутствием разбрызги-

вания, как в варианте ДЭРИ, когда возможен перенос вещества на соседние участки. В работе [645] на примере имиджинга образцов злокачественных опухолей и мозга крыс продемонстрировано пространственное разрешение 12 мкм.

Многочисленные примеры других методов масс-спектрометрической визуализации с ионизацией на воздухе представлены в обзорах [777, 785]. Эти подходы продемонстрировали свою эффективность при решении задач биологии, медицины, криминалистики, экологии. Среди первоочередных проблем, тормозящих повсеместное применение масс-спектрометрического имиджинга, можно отметить подавление сигнала одних аналитов другими и недостаточную воспроизводимость результатов в связи с необходимостью поддерживать на заданном уровне сразу несколько параметров. Сюда примыкает и проблема точного количественного анализа, хотя положительного результата можно добиться при гомогенном напылении на поверхность внутреннего стандарта [795].

Хотя исходно масс-спектрометрическая визуализация была востребована прежде всего в медицинской химии, при изучении новых лекарств и их метаболитов, поиске биомаркеров, диагностике заболеваний, быстрый анализ биологических тканей или профилирование с ионизацией на воздухе может быть очень полезным для других биомедицинских целей. Исследования образцов самых разных органов человека продемонстрировали явную корреляцию распределения липидов в зависимости от патологии. Он-лайн пробоотбор с масс-спектрометрическим контролем может быть крайне полезным для характеристики тканей, диагностики заболеваний и эффективных эндоскопических или хирургических решений в он-лайн режиме.

9.10. Он-лайн контроль хирургических операций методами масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе

Масс-спектрометрия впервые оказалась внутри операционных в 1980-х годах, когда стали контролировать в он-лайн режиме выдыхаемый пациентами воздух во время проведения анестезии [796].

Хирургические операции — основной метод борьбы со злокачественными новообразованиями, в частности с опухолью мозга. Важнейшей задачей при этом является необходимость удалить то, что надо удалить, и оставить то, что надо оставить. Безусловно, магнитно-резонансная томография, проведенная заранее, позволяет составить достаточно подробный план операции. Однако во время операции все равно могут возникнуть вопросы о природе конкретных участков тканей. В хорошо оснащенных медицинских центрах в настоящее время используется интраоперационное ультразвуковое [797] или магнитно-резонансное [798] распознавание тканей, однако первое из них имеет ограниченные возможности по дифференцированию тканей, а второе — ограниченное пространственное разрешение. Кроме того, оба метода не дают представления о реальных молекулярных характеристиках тканей и используются исключительно как косвенная оценка наличия опухоли [799].

Метод масс-спектрометрической визуализации с помощью МАЛДИ (разд. 9.9) в последние годы стал наиболее перспективным подходом для принятия правильных

решений во время гистопатологической оценки тканей. Регистрируя весь диапазон масс, метод способен детектировать любые биомаркеры, включая пептиды, белки, липиды. Поэтому количество ценной информации значительно больше, чем при обычной визуальной оценке тканей [800, 801]. Поскольку регистрируется целая гамма молекулярных маркеров, масс-спектрометрический анализ позволяет выявлять самые незначительные различия между анализируемыми тканями, включая, например, ранжирование стадий злокачественных опухолей. Кроме того, поскольку результатом эксперимента является набор структур и интенсивностей соответствующих пиков, информация оказывается абсолютно объективной и принимаемое решение не зависит от субъективного мнения конкретного человека (врача). На самом деле, объем информации, генерируемой в эксперименте МАЛДИ, столь велик, что возникло отдельное направление, связанное с информационными аспектами метода [802].

Уместно упомянуть и то, что пространственное разрешение МАЛДИ несколько уступает достижимому оптическими методами, а сам анализ достаточно долог и дорог. При этом методы визуализации с использованием масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе характеризуются более низким пространственным разрешением, чем МАЛДИ. Несмотря на этот недостаток, у них есть определенные преимущества. Они упрощают проведение эксперимента, устраняя вакуумные ограничения, не требуют использования контрастирующих реагентов или химических меток, а также никакой дополнительной пробоподготовки. Безусловно, при проведении научных исследований желательно получать картинку с максимально возможным разрешением, но среднее пространственное разрешение и высокая скорость анализа на открытом воздухе идеальны для практической работы в клиниках.

Гистопатологические исследования замороженных образцов биопсии опухолей являются на сегодняшний день самым информативным и надежным методом оценки типа и стадии опухолей. Однако даже в самых оснащенных медицинских центрах это исследование занимает около 20 минут и требует приостановки операции. Кроме того, для анализа может быть отобрано крайне ограниченное количество образцов, а полученная картина обычно не предоставляет информации о молекулярном составе пробы. Именно поэтому масс-спектрометрия с ионизацией на воздухе (при атмосферном давлении, без пробоподготовки, со шкалой времени, сравнимой со временем хирургических операций) — наиболее перспективный метод для имиджинга тканей [612].

Использование для подобных целей ДЭРИ или других методов масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе позволяет решить многие проблемы. Непрерывный пробоотбор любых участков тканей, интересующих хирурга, предоставляет важнейшую информацию о типе и стадии опухоли, природе и количестве биомаркеров, а также уровне лекарственных препаратов. Он также дает возможность принимать решения в режиме он-лайн в течение нескольких секунд. Кроме того, информация имиджинга методами ДЭРИ и магнитно-резонансной томографии может быть комплементарна [799].

Основные проблемы, связанные с использованием масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе для отбора проб во время эндоскопических процедур и хирургических операций, связаны с безопасностью для самого больного и медицинского персонала. Поэтому желательно, чтобы не использовались органические

растворители, высокое напряжение, потоки жидкостей или газов, травмирующие ткани. В частности, метод МСИБИВ [702] базируется на образовании ионов при использовании обычного хирургического инструмента, электроскальпеля (рис. 9.27). Эти ионы переносятся по гибкому шлангу в масс-спектрометр, стоящий неподалеку. Оператор масс-спектрометра видит реальный спектр, из которого с помощью программного обеспечения выявляется наличие маркеров опухоли. Хирург, делающий операцию, видит экран, на котором показано, с больной или здоровой тканью контактирует его скальпель в данный момент.

При использовании ДЭРИ процессы десорбции/ионизации протекают на поверхности тканей [612]. В результате исследований удалось оптимизировать процесс образования ионов и их эффективный перенос в масс-спектрометр по гибкому шлангу длиной 4 метра и внешним диаметром 3 мм. Такой диаметр позволяет легко помещать шланг внутрь эндоскопической трубки. Внутри шланга размещаются коаксиальные капилляры меньшего диаметра для подачи электрораспыленного растворителя и распыляющего газа. За счет использования диафрагменного насоса при контакте внешней оболочки шланга с биологической тканью не происходит потери газа, растворителя, а также образующихся при десорбции/ионизации капель, содержащих аналиты. Задержка в получении спектра составляет всего полсекунды.

Обычно метанол в смеси с водой в качестве растворителя ДЭРИ дает лучшие результаты, приводя к образованию капель меньшего размера [630]. Однако оказалось, что при использовании четырехметрового шланга эффективность переноса ионов при использовании чистой воды выше, что очень важно, особенно учитывая, что использование метанола для анализа живых тканей невозможно. Причина, вероятно, заключается именно в большем размере водных капель. Полная десольватация реализуется ближе ко входу в масс-спектрометр, и образующиеся газофазные ионы не успевают погибнуть на стенках интерфейса. При увеличении потока распыляющего газа до 5,2 литра в минуту наблюдается увеличение ионного сигнала, причем не важно, подается для формирования спрея высокое напряжение или нет. Таким образом, предложенный вариант анализа действительно может применяться в медицине, поскольку не использует высокого напряжения, оперирует только водой и воздухом в качестве реагентов и достаточно чувствителен для получения требуемых результатов.

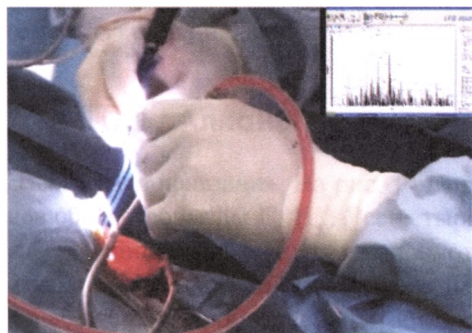


Рис. 9.27. Контроль хирургической операции по удалению злокачественной опухоли методом REIMS. Слева на вставке масс-спектр ионизировавшихся компонентов ткани; справа виден экран, на который ориентируется хирург [117]

9.11. Будущее масс-спектрометрии с ионизацией на воздухе

Учитывая, что масс-спектрометрия с ионизацией на воздухе появилась всего 10 лет назад [605], ее прогресс действительно впечатляет. Скорость, информативность и простота методов привлекают к ним внимание не только аналитиков, но и медиков, криминалистов, экологов, химиков-синтетиков. Наряду с ежегодным созданием новых методов идет интенсивное расширение области их применения. Органический синтез вне колбы, контроль хирургических операций в реальном времени, молекулярная визуализация биологических и экологических объектов становятся самостоятельными научными направлениями. Качественный скачок в области миниатюризации приборов должен произойти в ближайшее время. В результате должны появиться бытовые масс-спектрометры. Для этого созданы все предпосылки.

ГЛАВА 10

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФРАГМЕНТАЦИИ НЕКОТОРЫХ КЛАССОВ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

В данной главе рассматриваются процессы фрагментации молекулярных катион-радикалов (ИЭ), протонированных (ХИ) и депротонированных (ХИОИ) молекул основных классов органических соединений. Разобраны важнейшие, доказанные, реакции фрагментации. Речь идет прежде всего о монофункциональных производных, а в некоторых случаях о бифункциональных. Для более углубленного изучения масс-спектрометрического поведения органических соединений, интересующих читателя, необходимо обращаться к специализированным обзорам и статьям. Много полезной информации по фрагментации самых разнообразных соединений содержится в книге [22].

В этой главе не рассматриваются направления фрагментации гетероциклических соединений. Законы их распада остаются такими же, что и для других органических соединений, однако многообразие структур и связанное с этим многообразие реакций требуют специального обсуждения, что выходит за рамки данного пособия. Для занимающихся масс-спектрометрией гетероциклов можно посоветовать обратиться к книгам [22, 24, 25, 803].

Если основные процессы фрагментации органических соединений в условиях ИЭ в той или иной мере описаны в самых разнообразных учебных пособиях, то спектры химической ионизации остаются в основном предметом оригинальных статей и обзоров. Это связано со значительно меньшей универсальностью этого метода ионизации и большим числом переменных. Поэтому во избежание неоправданного увеличения объема данного пособия описание процессов в условиях химической ионизации дано в общих чертах, но подкреплено достаточным числом ссылок на оригинальную литературу.

10.1. Алканы

Электронная ионизация. На рис. 10.1 представлены спектры изомерных пентадеканов общей формулы $C_{15}H_{32}$. Все четыре соединения характеризуются одинаковым набором пиков фрагментных ионов, отстоящих друг от друга на 14 единиц массы, однако интенсивности этих пиков существенно различаются. Пики молекулярных ионов алканов малоинтенсивны (обычно менее 1% в полном ионном токе), причем их интенсивность уменьшается с увеличением длины цепи или числа разветвлений в молекуле. В спектрах сильноразветвленных алканов пик M^{+} может отсутствовать вовсе. Энергии ионизации алканов довольно высоки, так как ионизируются электроны C–H

или C—C σ -связей. Основную гомологическую серию ионов можно изобразить общей формулой C_nH_{2n+1} (m/z 29, 43, 57, 71...). Условимся называть эту серию алкановой.

Ионы алкановой серии образуются непосредственно из $M^{+\cdot}$ при разрывах любой из C—C связей или в результате отщепления молекулы олефина из первичного алкильного иона. По правилу Стивенсона заряд в результате фрагментации остается на том фрагменте, энергия ионизации которого ниже. Поскольку энергии ионизации алкильных радикалов с m/z 43 ($C_3H_7^{\cdot}$), 57 ($C_4H_9^{\cdot}$), 71 ($C_5H_{11}^{\cdot}$) минимальны и составляют 7,55, 6,93 и 6,94 эВ соответственно, практически всегда пики соответствующих ионов максимальны в спектрах. Следует отметить, что даже в случае алканов нормального строения указанные фрагменты представляют собой изомеризованные структуры, так как вторичные и третичные карбокатионы значительно стабильнее, а, следовательно, процессы изомеризации термодинамически выгодны.

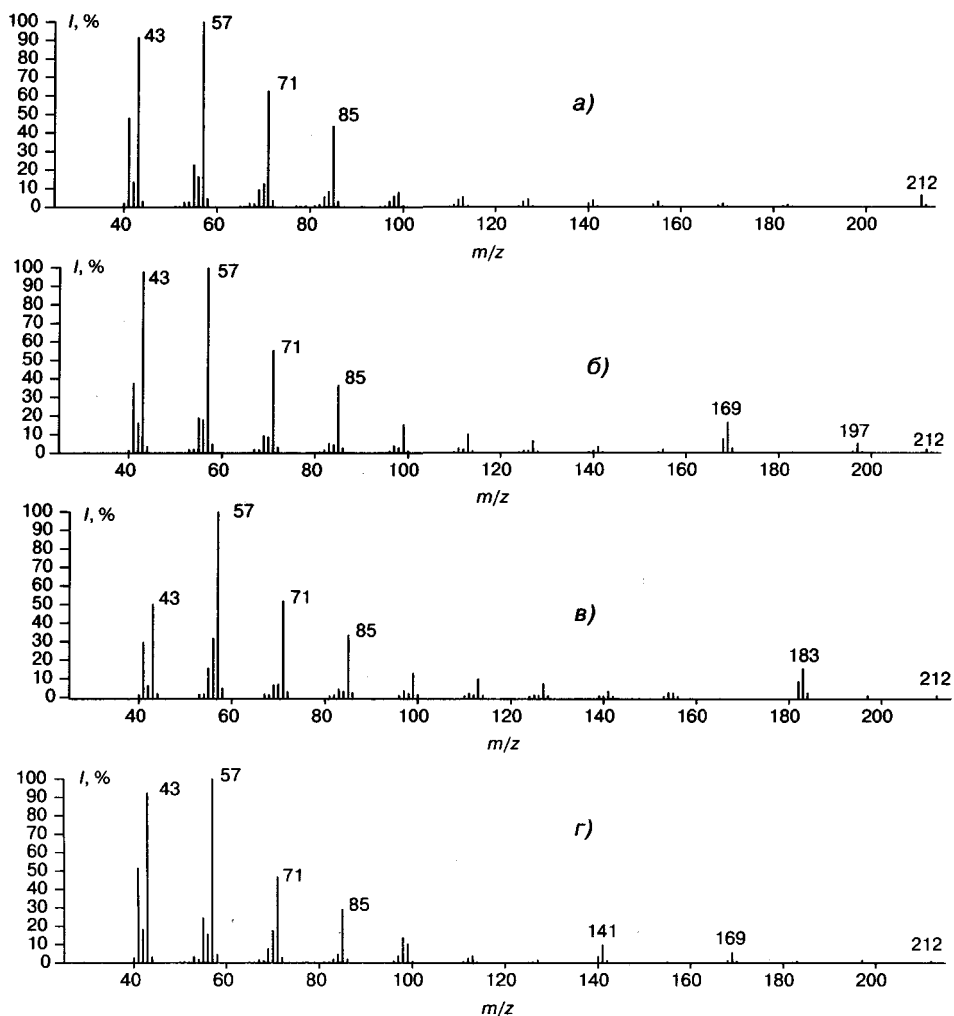


Рис. 10.1. Масс-спектры ионизации электронами: пентадекана (а), 2-метилтетрадекана (б), 3-метилтетрадекана (в), 4,8-диметилтридекана (г)

В целом процессы рандомизации и скрамблинга, т.е. полного смешения атомов водорода и углерода, очень характерны для парафинов. В связи с этим установить структуру сильно разветвленных алканов по их масс-спектрам ИЭ практически невозможно. Для нормальных алканов (рис. 10.1а) характерно экспоненциальное уменьшение интенсивностей пиков ионов алкановой серии, что позволяет однозначно подтверждать структуру этих соединений. При этом пик $[M-CH_3]^+$ либо полностью отсутствует, либо имеет крайне низкую интенсивность (рис. 10.1а). Задача структурного анализа разрешима и для алканов с 1–2 разветвлениями. Для этих соединений разрыв С–С связей в месте разветвления становится более благоприятным по сравнению с разрывом соседних связей, поскольку образуется вторичный, т.е. более устойчивый, ион. Интенсивность соответствующих фрагментов оказывается аномально высокой и нарушает экспоненциальное падение интенсивностей пиков ионов алкановой серии, характерное для нормальных парафинов. Так, для 3-метилтетрадекана (рис. 10.1б) появляется пик иона $[M-CH_3]^+$, а интенсивность пика $[M-C_2H_5]^+$ выше, чем даже иона с m/z 99. В этих процессах четко выполняется правило выброса максимального алкила (разд. 3.1.1). В спектре 2-метилтетрадекана (рис. 10.1б), помимо интенсивного пика $[M-CH_3]^+$, очень высокую интенсивность имеет пик иона $[M-C_3H_7]^+$ с m/z 169. Такой процесс отщепления изопропильной группы является характеристикой изоалканов. В спектре 4,8-диметилтридекана (рис. 10.1в) отчетливо видны повышенные интенсивности пиков ионов с m/z 197, 169 и 141. Первый обусловлен отщеплением метильного радикала, второй – пропильного, третий – амильного. Обратите внимание на четкое выполнение правила выброса максимального алкила. Понятно, что при наличии в цепи четвертичного атома углерода процессы разрыва связей с образованием третичного катиона становятся особенно благоприятными. В частности, пик иона с m/z 57 часто доминирует в спектрах соединений с *трет*-бутильной группой (рис. 10.2).

Помимо алкановой серии, в спектрах можно выделить еще две серии ионов, пики которых достаточно интенсивны. Ионы алкеновой серии с общей формулой $C_n H_{2n-1}^+$ (m/z 27, 41, 55, 69...) образуются в основном при неселективном отщеплении молекулы водорода ионами алкановой серии. В спектрах разветвленных изомеров значительно увеличивается интенсивность пиков нечетноэлектронных фрагментов серии $C_n H_{2n}^{++}$ с четной массой (схема 10.1). Движущей силой этих процессов является выгодность образования термодинамически стабильных замещенных алкенов. Интенсивность пиков нечетноэлектронных ионов оказывается выше при разрыве связи в месте разветвления, т.е. процессы подчиняются закономерностям, описанным для алкановой серии.

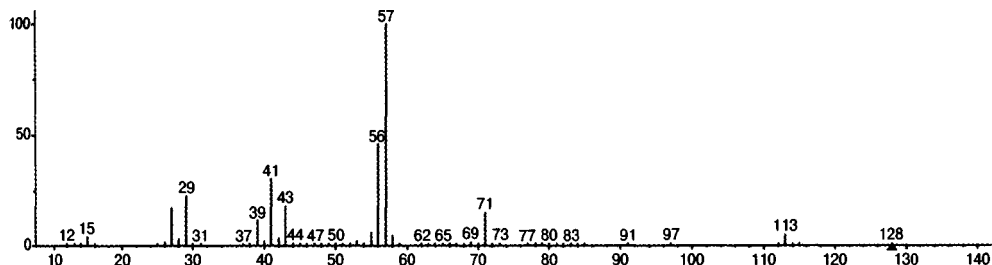


Рис. 10.2. Масс-спектр ИЭ 2,2-диметилгептана

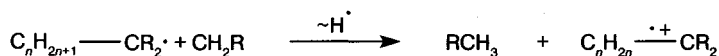


Схема 10.1

Значительного изменения спектра ИЭ алканов можно добиться с использованием техники ультразвуковых молекулярных пучков [120]. В этом случае пик молекулярного иона максимален в масс-спектре (рис. 2.4). Подробнее об этом методе можно прочитать в обзоре [65].

Химическая ионизация. Молекулы алканов обладают очень низкой величиной сродства к протону. Они могут протонироваться по связям С—С или С—Н [804], однако ионы оказываются нестабильными и распадаются с образованием алкильных катионов. Поэтому даже при использовании в качестве газа-реагента метана (высокая протонирующая способность) наибольшую интенсивность в спектре имеет ион $[\text{M}-\text{H}]^+$. Его образование можно рассматривать как потерю молекулы водорода протонированной молекулой MH^+ или как реакцию отрыва аниона (разд. 5.3). Именно реакцию отрыва аниона можно считать основным механизмом образования алкильных ионов (схема 10.2). Безусловно, фрагментные алкильные ионы могут возникать и при отщеплении молекулы алкена первичными ионами $[\text{M}-\text{H}]^+$ (схема 10.2).

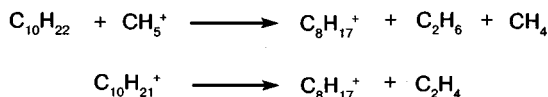


Схема 10.2

Интенсивность пиков ионов $[\text{M}-\text{H}]^+$ очень высока и может достигать 90% в полном ионном токе, что выгодно отличает спектры ХИ от спектров ИЭ. С увеличением числа разветвлений в молекуле интенсивность пика $[\text{M}-\text{H}]^+$ заметно уменьшается. Для ее повышения эффективным оказалось использование в качестве газа-реагента окиси азота [805].

Химическая ионизация отрицательных ионов. Крайне низкие величины кислотности алканов приводят к тому, что они не депротонируются даже наиболее сильным из доступных оснований, ионом NH_2^- . Кроме того, величины сродства к электрону для подавляющего большинства алкильных групп являются отрицательными, т.е. алкильные анионы нестабильны относительно соответствующих радикалов. Получить эти анионы тем не менее можно при фрагментации анионов карбоновых кислот.

Задача 10.1. Интенсивности каких пиков в спектрах ИЭ будут аномально высоки по сравнению с изомером нормального строения?

- А) 4,10-диметилгексадекана;
- Б) 3,12-диметилгексадекана;
- В) 3,9,14-триметилгептадекана;
- Г) 2,2-диметилдекана;
- Д) 5,10,15-триметиллоктадекана;
- Е) 8-метилтетрадекана.

Задача 10.2. Какие различия будут наблюдаться в спектрах ИЭ?

- А) 2-метилоктана и 3-метилоктана;
- Б) 4-метилдекана и 5-метилдекана;
- В) 3,3-диметилнонана и 3-метилдекана;
- Г) 5,5-диметилнонана и 3,6-диметилнонана;
- Д) 2,2-диметилоктана и 3,4-диметилоктана
- Е) 3,3,7-триметилдодекана и 3,7-диметилтридекана.

Задача 10.3. Какие нечетноэлектронные фрагменты будут интенсивны при распаде $M^{+\cdot}$?

- А) 3,3-диметилоктана;
- Б) 3,4-диметилоктана;
- В) 3,5-диметилоктана;
- Г) 5-метилдекана.

Задача 10.4. Идентифицируйте метилалкан по спектру ИЭ (рис. 10.3).

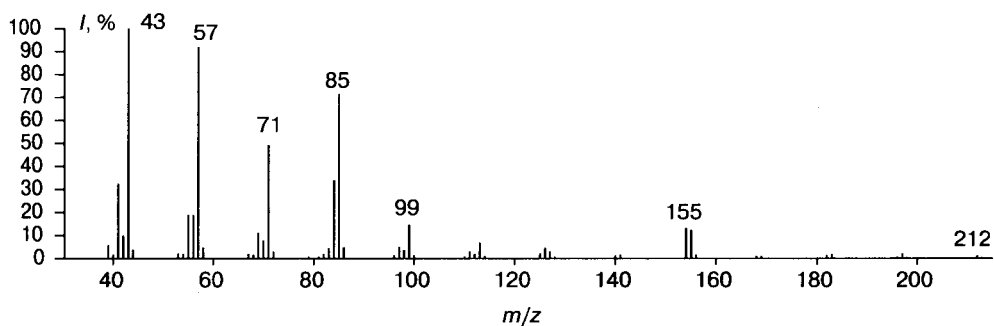


Рис. 10.3

Задача 10.5. Идентифицируйте диметилалкан по спектру ИЭ (рис. 10.4).

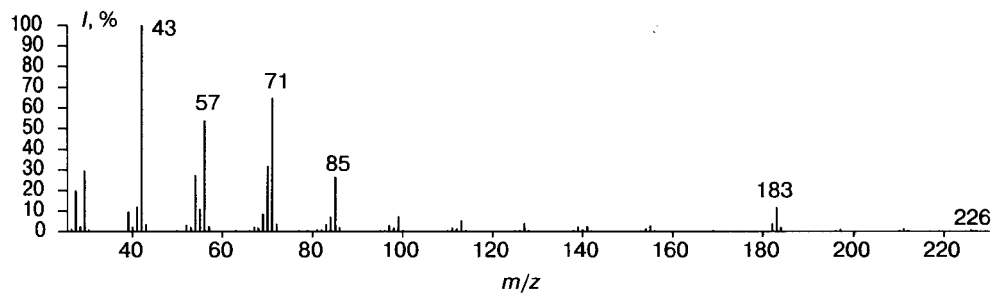


Рис. 10.4

Задача 10.6. Идентифицируйте диметилалкан по спектру ИЭ (рис. 10.5).

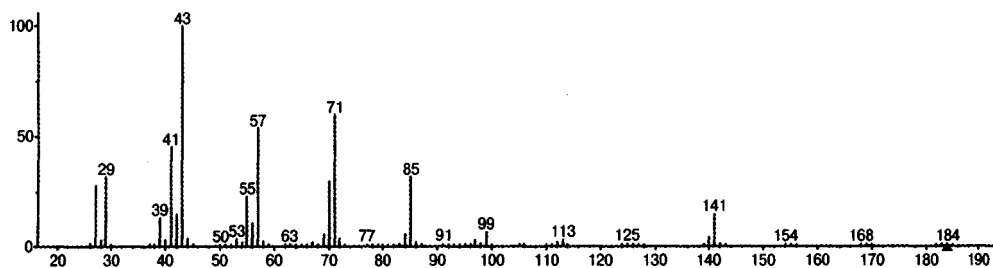


Рис. 10.5

Задача 10.7. Идентифицируйте метилалкан по спектру ИЭ (рис. 10.6).

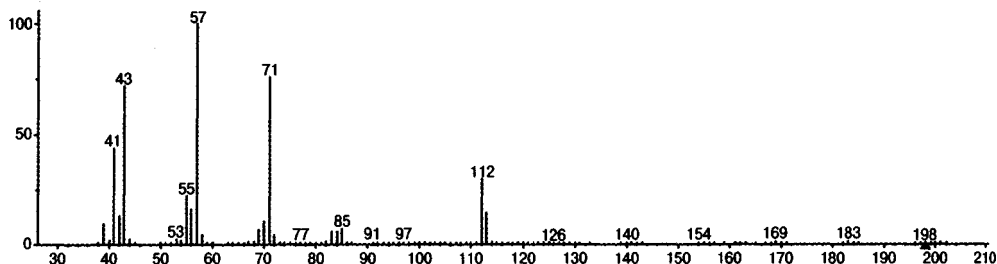


Рис. 10.6

10.2. Алкены и диены

Электронная ионизация. Молекулярные ионы алкенов чуть более стабильны, чем в случае алканов. На рис. 10.7 представлены масс-спектры нескольких соединений этого класса. Спектры характеризуются аналогичными гомологическими сериями ионов: алкановой ($C_nH_{2n+1}^+$) и алкеновой ($C_nH_{2n-1}^+$). Однако, в отличие от алканов, интенсивности пиков второй серии выше, чем первой. Образование алкеновой серии обусловлено аллильным распадом (схема 10.3), приводящим к образованию устойчивых благодаря резонансной стабилизации аллильных катионов.

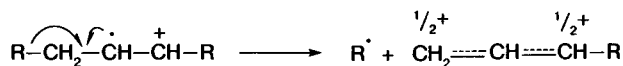


Схема 10.3

Перегруппировки, приводящие к возникновению нечетноэлектронных фрагментов ($C_nH_{2n}^{++}$), как правило, неселективны. Однако заметную роль играет процесс (схема 10.4), протекающий через шестичленное переходное состояние (вариант перегруппировки Мак-Лафферти).

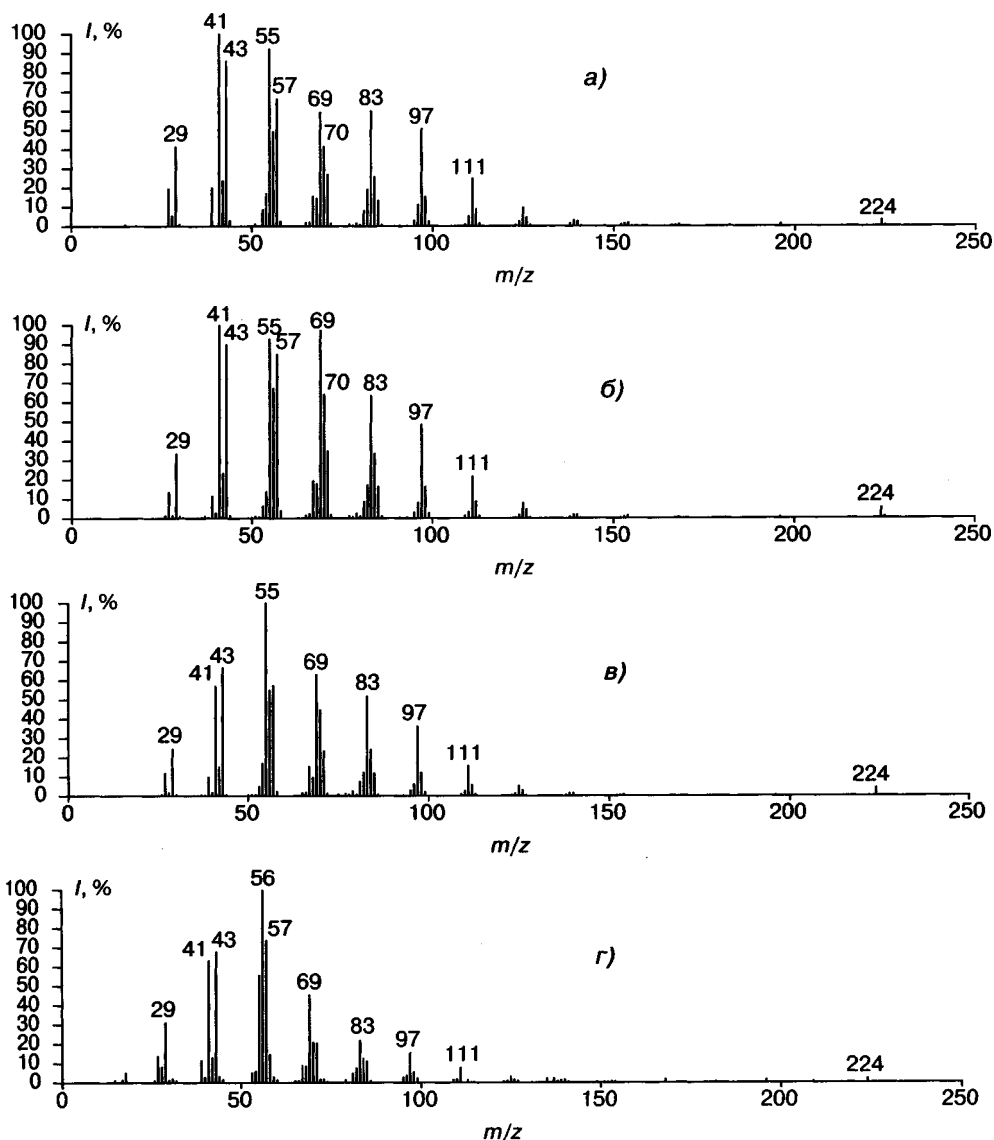
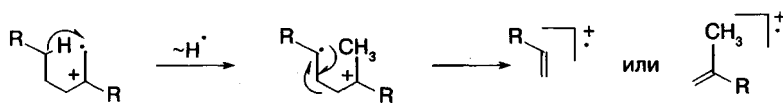


Рис. 10.7. Масс-спектры электронной ионизации: гексадецена-1 (а), гексадецена-3 (б), гексадецена-7 (в), 2-метилпентадецена-1 (г)

Минимальная энергия ионизации молекулы алкена обусловлена удалением электрона π -связи, т.е. можно считать, что в электронно невозбужденном состоянии заряд и неспаренный электрон расположены на соседних атомах углерода, которые

были соединены двойной связью. Однако в результате аллильных перегруппировок (схема 10.5) и неселективных процессов рандомизации, которые протекают с большой скоростью ($\log k \sim 10$), заряд и неспаренный электрон делокализуются по углеродной цепи. Установить по масс-спектру первоначальное положение двойной связи практически невозможно. Единственным исключением являются тетразамещенные алкены.

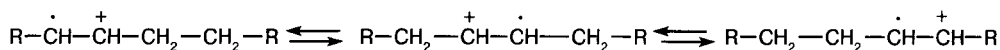


Схема 10.5

Не поддается установлению также принадлежность соединения к *цис*- или *транс*-изомерам, если, правда, нет спектров обоих изомеров. Дело в том, что молекулярный ион, как правило, более интенсивен в спектре *транс*-изомера.

Из-за неселективности масс-спектров для анализа алкенов используют методы дериватизации. Распространено эпоксицирование с последующей трансформацией в кетоны, диолы или аминокислоты [806]. Метод реакционной хромато-масс-спектрометрии (разд. 1.4) используется для анализа алкенов после их каталитического дейтерирования в алканы [30]. Поскольку микрореактор может быть установлен до или после колонки хроматографа, работу можно вести в двух вариантах, хроматографируя или алканы, или алкены. Использование, помимо масс-спектров, информации о временах удерживания повышает эффективность этого подхода.

Установить положение кратной связи в молекуле алкена можно по спектрам полевой ионизации (разд. 2.7). Благодаря минимальному времени пребывания молекулярного иона в источнике (10^{-12} сек) многостадийные аллильные перегруппировки (схема 10.5) не успевают значительно исказить исходную структуру, а аллильные разрывы (схема 10.3) позволяют идентифицировать изомеры [807]. Современные масс-спектрометрические методы определения положения двойной связи в алифатических цепях рассмотрены в разд. 11.2.3.

Для диенов характерна серия гомологических ионов $\text{C}_n\text{H}_{2n-3}^+$. Интенсивность пика M^{++} невысока (рис. 10.8). Процессы фрагментации протекают по механизмам, аналогичным описанным для алкенов. Задача различия изомеров по масс-спектрам очень сложна и может быть решена только в особых случаях при использовании широкого набора стандартов. Полезно также использовать другие физико-химические методы.

Химическая ионизация. В спектрах химической ионизации алкенов метаном, как и в спектрах ИЭ, доминируют две серии ионов (алкановая и алкеновая). Пики протонированных молекул алкенов MH^+ обладают достаточной интенсивностью (до 20% в полном ионном токе) и позволяют установить молекулярную массу соединения. Дополнительную помощь в идентификации оказывают пики ионов $[\text{M}-\text{H}]^+$. Эти ионы образуются в основном при отщеплении атома водорода из аллильного положения исходной молекулы, поэтому интенсивность их пиков падает с увеличением числа алкильных групп вокруг кратной связи [808].

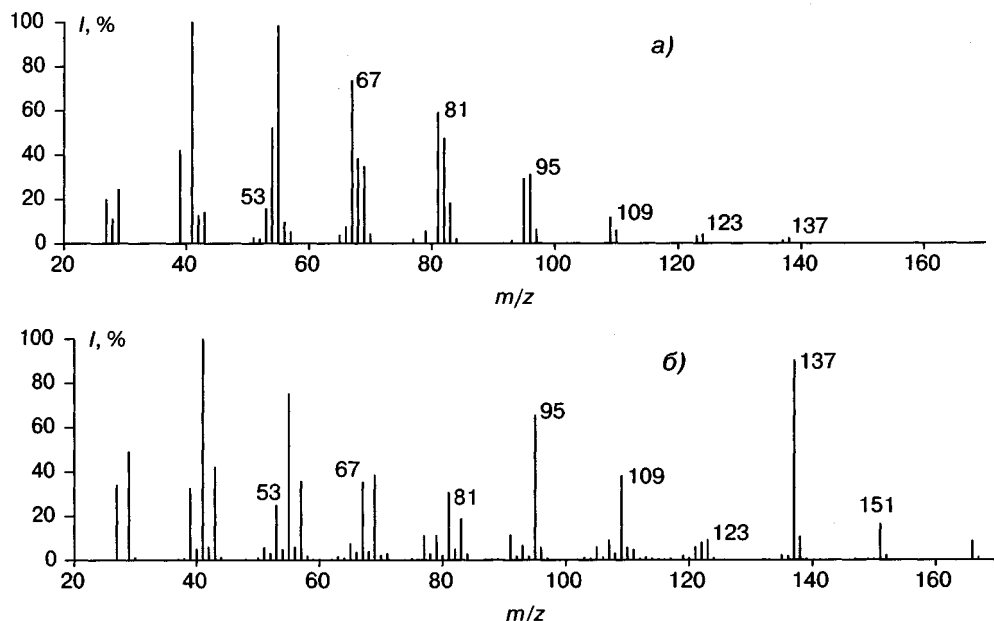
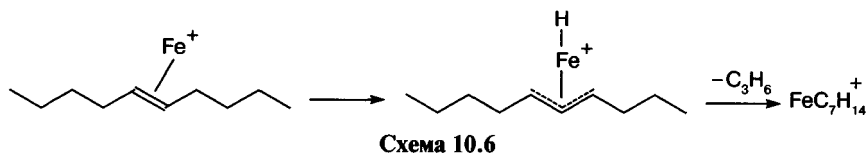


Рис. 10.8. Масс-спектры ИЭ: додекадиена-5,7 (а); 3,4,5,6-тетраметилдоктадиена-2,5 (б)

К сожалению, ни положение двойной связи, ни различия между *цис*- и *транс*-изомерами установить по спектрам ХИ метаном нельзя. Определенных успехов удалось добиться при замене метана изобутаном [809]. Вид спектра оказывается идентичным наблюдаемому для метана, однако появляется новый пик, обусловленный присоединением к молекуле образца *трет*-бутильного катиона. Различия в соотношении интенсивностей пиков ионов $[M+C_4H_9]^+ / [M-H]^+$ (~ 2 для *цис*-изомеров и < 1 для *транс*-изомеров) оказываются достаточными для отнесения образца к тому или иному изомеру. На основании анализа интенсивностей фрагментных ионов в спектрах *цис*-изомеров можно также установить положение двойной связи в исходной молекуле. Однако этот подход неприменим для *транс*-изомеров.

Такой же результат можно получить при использовании в качестве газа-реагента окиси азота. Отношение интенсивностей пиков ионов $[M+NO]^+ / [M-H]^+$ составляет ~ 2 для *цис*-изомеров и < 1 для *транс*-изомеров [809]. В спектрах ХИ алкенов окисью азота, помимо максимальных пиков ионов $[M-H]^+$ и $[M+NO]^+$, присутствуют достаточно интенсивные пики $M^{+\cdot}$. Интенсивность последних увеличивается с увеличением замещенности двойной связи, так как дополнительные алкильные группы уменьшают энергию ионизации олефина, и начиная с определенного значения реакция перезарядки (см. разд. 5.3) становится экзотермичной.

Определить место двойной связи в молекулах олефинов, а также диенов, алкинов и ненасыщенных карбоновых кислот и их эфиров можно с использованием карбонила железа в качестве газа-реагента [226]. В комплексном ионе $[Fe+алкен]^+$ металл внедряется по аллильной связи, после чего β -водородный атом мигрирует с образованием бисолефинового комплекса (схема 10.6). В условиях активации соударением диссоциация этого комплекса приводит к элиминированию меньшего олефинового лиганда.



Для диенов характерны пики протонированных молекул MH^+ и связанная с ними гомологическая серия ионов $C_nH_{2n-1}^+$. Процессы фрагментации аналогичны протекающим для олефинов.

Химическая ионизация отрицательных ионов. Олефины достаточно легко депротонируются в газовой фазе, однако аналитическая ценность спектров этого типа невелика. В частности, максимальной интенсивностью в спектрах ХИОИ олефинов влажной закисью азота (ион-реагент OH^-) обладают пики ионов $[M-H+N_2O]^-$ и $[M-H+N_2O-H_2O]^-$. Депротонированные молекулы $[M-H]^-$, а также ионы $[M-3H]^-$, напротив, характеризуются низкой интенсивностью.

Для ХИОИ диенов характерны достаточно интенсивные пики ионов $[M-H]^-$ и $[M-3H]^-$, предоставляющие полезную информацию о молекулярной массе соединений. К сожалению, значительной структурной информации спектры этого типа не несут [228].

10.3. Алкины

Электронная ионизация. Ацетиленовые углеводороды характеризуются низкой стабильностью молекулярных ионов. Пик M^{++} терминальных алкинов может отсутствовать в спектре. По мере перемещения тройной связи к центру молекулы стабильность M^{++} увеличивается. На рис. 10.9 представлены масс-спектры ИЭ изомерных додецинов с терминальной и внутренней тройной связью.

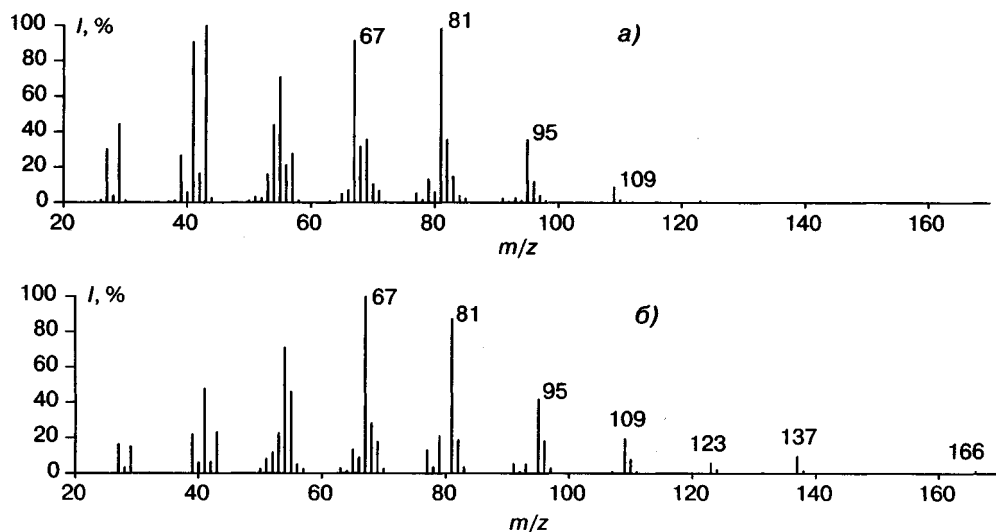


Рис. 10.9. Масс-спектры ИЭ: додецина-1 (а), додецина-5 (б)

Характерной для алкинов является гомологическая серия ионов общей формулы $C_nH_{2n-3}^+$. Основной механизм образования этих ионов аналогичен аллильному разрыву связи в M^{++} алкенов. В данном случае образуются пропаргильные ионы, стабилизированные, хотя и в меньшей степени, чем аллильные, эффектом резонанса. В отличие от алканов и алкенов перегруппировочный процесс (схема 10.7), сопровождающийся образованием шестичленного циклического иона, позволяет делать выводы о положении кратной связи в исходной молекуле. Пики ионов, образование которых протекает по этому механизму, имеют повышенную интенсивность в ряду экспоненциально уменьшающихся интенсивностей пиков ионов алкиновой серии. В частности, в масс-спектре додецина-1 максимальную интенсивность имеет пик иона с m/z 81 (рис. 10.9а), а в спектре додецина-5 повышенную интенсивность имеет пик иона с m/z 137 (рис. 10.9б). Эффективность этого процесса значительно снижается при наличии разветвлений в молекуле алкина [810].

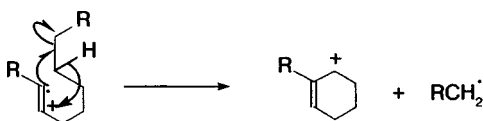


Схема 10.7

Химическая ионизация. В спектрах химической ионизации алкинов метаном и изобутаном пики MH^+ и $[M-H]^+$ достаточно интенсивны, что позволяет установить молекулярную массу соединений. Среди осколочных ионов выделяются гомологические серии ионов $C_nH_{2n-1}^+$ и $C_nH_{2n-3}^+$. В условиях ХИ изобутаном высокую интенсивность имеет пик продукта присоединения $[M+C_4H_9]^+$, а по интенсивностям пиков алкеновой серии $C_nH_{2n-1}^+$ можно определять положение тройной связи в молекуле [811].

Пики гомологической серии ионов $C_nH_{2n-3}^+$ имеют максимальную интенсивность в условиях химической ионизации окисью азота. Другие углеводородные серии менее выражены. Ионы $[M+NO]^+$, характеризующиеся незначительными по интенсивности пиками, при фрагментации приводят к появлению двух гомологических серий ионов: $[C_nH_{2n}NO]^+$ и $[C_nH_{2n-2}NO]^+$. На основании интенсивностей пиков ионов этих серий можно определять положение тройной связи в молекуле [811].

Определить место тройной связи в молекулах алкинов можно также с использованием карбонила железа в качестве газа-реагента [226]. В комплексном ионе $[Fe+алкин]^+$ металл внедряется по пропаргильной связи, после чего протекает миграция β -водородного атома с образованием алкин-алкенового комплекса, дальнейший распад которого позволяет сделать вывод о положении кратной связи в молекуле (схема 10.6).

Для химической ионизации отрицательных ионов алкинов с терминальным положением кратной связи характерны достаточно интенсивные пики ионов $[M-H]^-$ и $[M-3H]^-$, предоставляющие полезную информацию о молекулярной массе соединений.

Задача 10.8. На рис. 10.10 представлены масс-спектры ИЭ двух изомерных тетрадецинов нормального строения. Установите, какому изомеру соответствует каждый спектр.

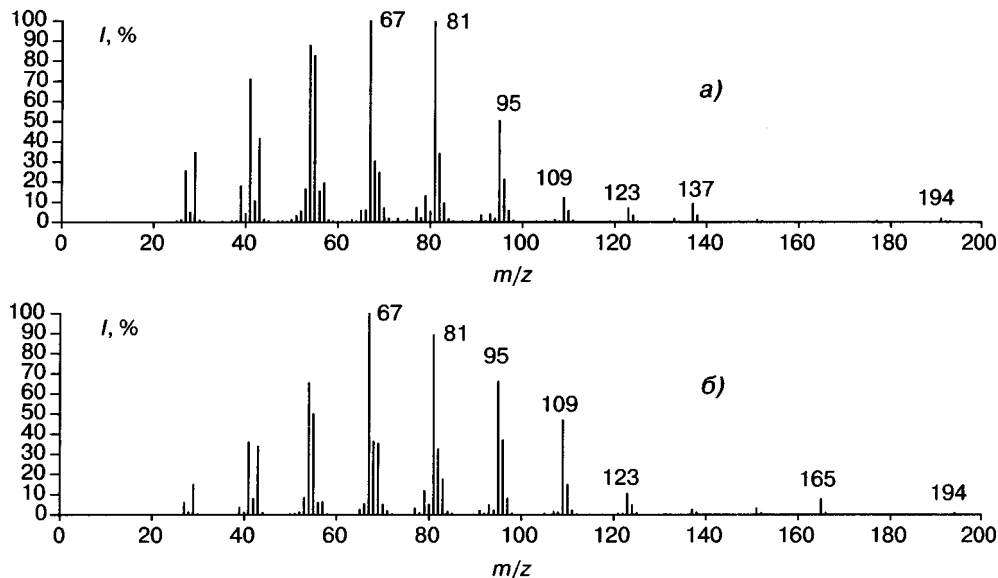


Рис. 10.10. Масс-спектры ИЭ двух изомерных тетрадецинов

Задача 10.9. Установите положение тройной связи в децине (рис. 10.11).

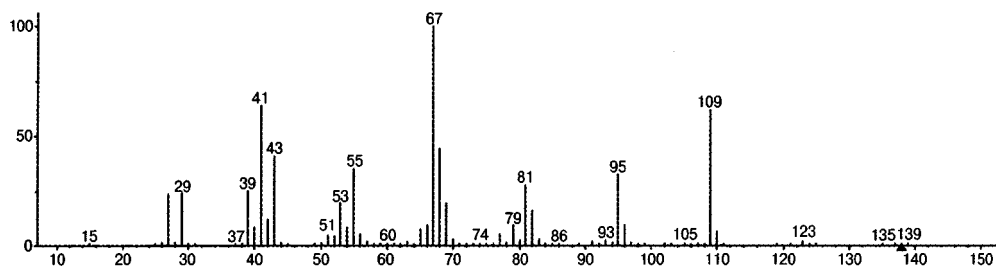


Рис. 10.11. Масс-спектр ИЭ децина

10.4. Алициклические углеводороды

Электронная ионизация. Основная серия гомологических ионов моноциклических нафтеннов (рис. 10.12) совпадает с алкеновой ($C_n H_{2n-1}^+$). Соответственно, для бициклических характерна алкиновая серия ($C_n H_{2n-3}^+$) и т.д. С увеличением длины алкильных заместителей значительную интенсивность приобретают пики ионов алкановой серии ($C_n H_{2n+1}^+$).

Масс-спектрометрии малых циклов посвящена монография [23]. Молекулярные ионы малых циклов менее устойчивы по сравнению с циклогексанами и цикlopентанами. Раскрытие циклопропанового кольца в молекулярном ионе

может протекать до начала фрагментации, поэтому спектры похожи на спектры изомерных алкенов. Для циклобутановых углеводородов важное направление масс-спектрометрического распада связано с разрывами противоположных С—С связей цикла. Из двух родственных нечетноэлектронных ионов более высокую интенсивность будет иметь пик фрагмента с меньшей энергией ионизации (правило Стивенсона, разд. 3.1.2). В частности, на рис. 10.12б интенсивность пика иона с m/z 84 превосходит интенсивность пика иона с m/z 28.

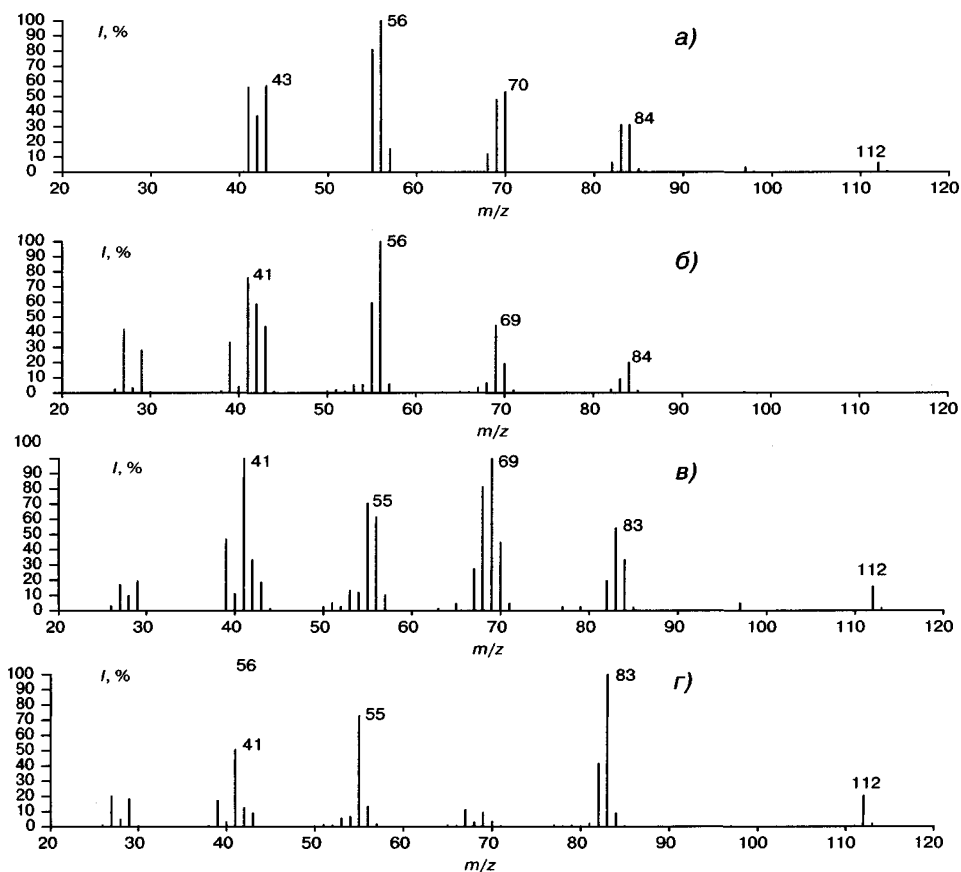


Рис. 10.12. Масс-спектры ИЭ нафтенных с брутто-формулой C_8H_{16} : амилциклопропана (а), бутилциклобутана (б), пропилциклопентана (в), этилциклогексана (г)

Пики молекулярных ионов алкилциклогексанов более интенсивны, чем соответствующие пики алкилциклопентанов. На схеме 10.8 представлены основные направления фрагментации молекулярного иона этилциклогексана, спектр которого изображен на рис. 10.12г. Отщепление экзоциклического заместителя протекает легко, особенно с увеличением длины алкильного заместителя. Он может отщепляться в виде радикала или с миграцией атома водорода в виде алкана или алкена. В результате в спектрах монозамещенных алкилциклогексанов высокой

интенсивностью обладают пики ионов с m/z 84, 83 и 82, а в спектрах монозамещенных алкилциклопентанов — пики ионов с m/z 68, 69, 70. Установление изомеров нафтенос с помощью масс-спектрометрии весьма затруднительно.

Процессы фрагментации молекулярных ионов полициклических нафтенос, а также спиранос не отличаются высокой селективностью и в основном совпадают с изложенными для моноциклических углеводородос. Поскольку стабильность молекулярного иона возрастает с увеличением степени ненасыщенности (в данном случае числа циклов), интенсивность пика M^{+} в спектрах полициклических нафтенос достаточно высока и позволяет надежно устанавливать молекулярную массу соединения.

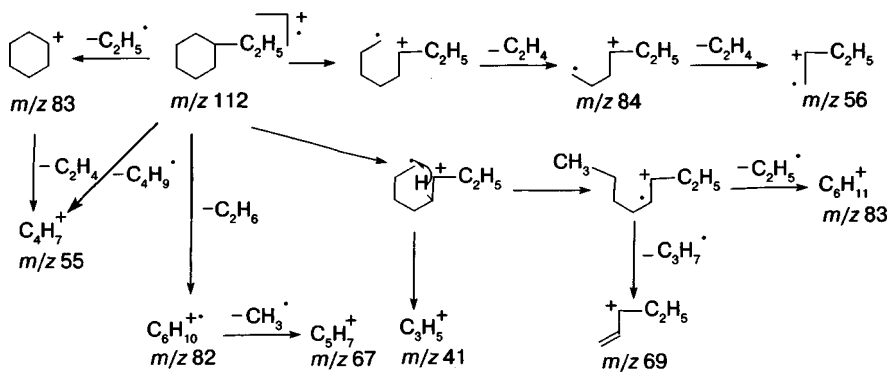


Схема 10.8

Химическая ионизация. Масс-спектры этого типа могут с успехом использоваться для установления молекулярной массы алициклических углеводородос. Максимальной интенсивностью в спектре (до 75% в полном ионном токе) обладает пик иона $[M-N]^+$. Пики ионов MN^+ менее интенсивны, хотя отчетливо наблюдаются в спектрах. Основные фрагментные ионы принадлежат гомологическим алкановой и алкеновой сериям [812]. Ценности для структурного анализа спектры ХИ не имеют, хотя надо отметить, что работ по изучению нафтенос с помощью химической ионизации недостаточно. Использование для анализа алициклов ХИ отрицательных ионов невозможно по причинам, аналогичным описанным для алканос (разд. 10.1).

Задача 10.10. Составьте схему фрагментации метилциклопентана, спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.13.

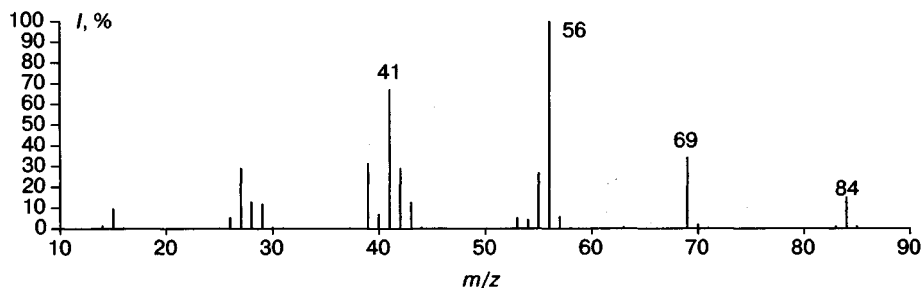


Рис. 10.13. Масс-спектр ИЭ метилциклопентана

10.4.1. Циклоалкены

Электронная ионизация. Пики молекулярных ионов циклоалкенов достаточно устойчивы. Характеристической серией ионов оказывается алкиновая ($C_n H_{2n-3}^+$), хотя интенсивности пиков ионов алкеновой и алкановой серии иногда достаточно высоки. Аллильные перегруппировки могут приводить к существенным перегруппировкам исходной структуры.

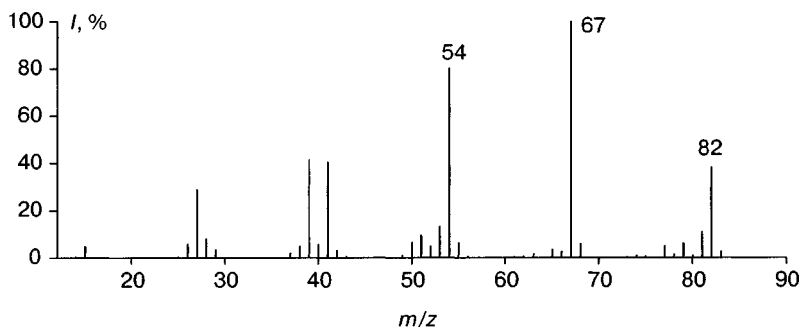


Рис. 10.14. Масс-спектр ИЭ циклогексена

Очень характерен для циклоалкенов ретродиеновый тип распада, заключающийся в раскрытии цикла с образованием алкенового и диенового фрагментов (схема 10.9). Поскольку энергия ионизация диена, как правило, ниже, заряд чаще сохраняется на нем (m/z 54 на рис. 10.14). Алкильные заместители в положениях 1, 2, 3 и 6 приводят к соответствующему сдвигу по шкале масс диенового иона, а заместители в положениях 4 и 5 элиминируются как часть молекулы алкена. По этому признаку можно делать определенные выводы о структуре соединения. Введение электронодонорных заместителей в 4 или 5 положения циклогексенового цикла может уменьшить энергию ионизации соответствующего алкена, и пик такого иона будет более интенсивен, чем пик альтернативного диена.

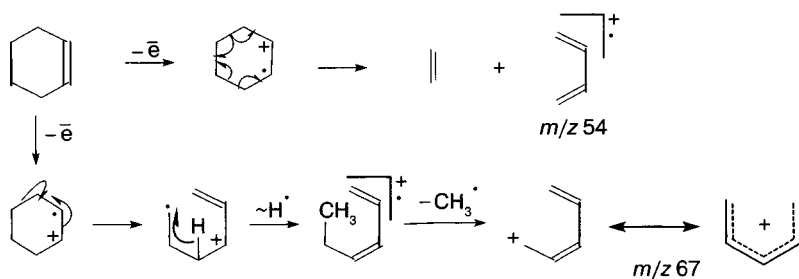


Схема 10.9

Процесс, приводящий к иону с максимальной интенсивностью в спектре (m/z 67), связан с отщеплением метильной группы (рис. 10.14). Методом изотопных меток доказано, что отщепляется, в основном, атом углерода из положения 4 кольца (схема 10.9). Это направление фрагментации демонстрирует, что интенсивные пики

в спектрах ИЭ могут образовываться в результате достаточно сложных перестроек исходного скелета молекулы, т.е. принцип минимальных изменений исходной структуры реализуется далеко не всегда.

Ион $[M-H]^+$ образуется при отщеплении аллильного атома водорода из $M^{+\cdot}$. Этот резонансно стабилизированный фрагмент отщепляет последовательно две молекулы водорода с образованием ароматического фенилкатиона. Это тоже достаточно редкий процесс, когда в спектре наблюдаются ионы с массой на 5 дальтон меньше, чем $M^{+\cdot}$. Это фактически на грани запрещенного для выброса нейтральных частиц диапазона (разд. 4.1). Стоит, однако, подчеркнуть, что в данном случае этот выброс связан с тремя последовательными реакциями фрагментации, а в результате образуется стабильный ароматический ион.

Химическая ионизация. Информации по этому виду спектров циклоалкенов мало. Максимальную интенсивность в спектрах химической ионизации метаном имеют пики $[M-H]^+$. Этот факт позволяет надежно устанавливать молекулярную массу циклоалкенов. В условиях химической ионизации отрицательных ионов молекулы этих углеводородов легко депротонируются, однако спектры малоинформативны [228].

Задача 10.11. На рис. 10.15 представлены масс-спектры ИЭ двух изомерных метилциклогексенов. Что можно сказать об их структурах?

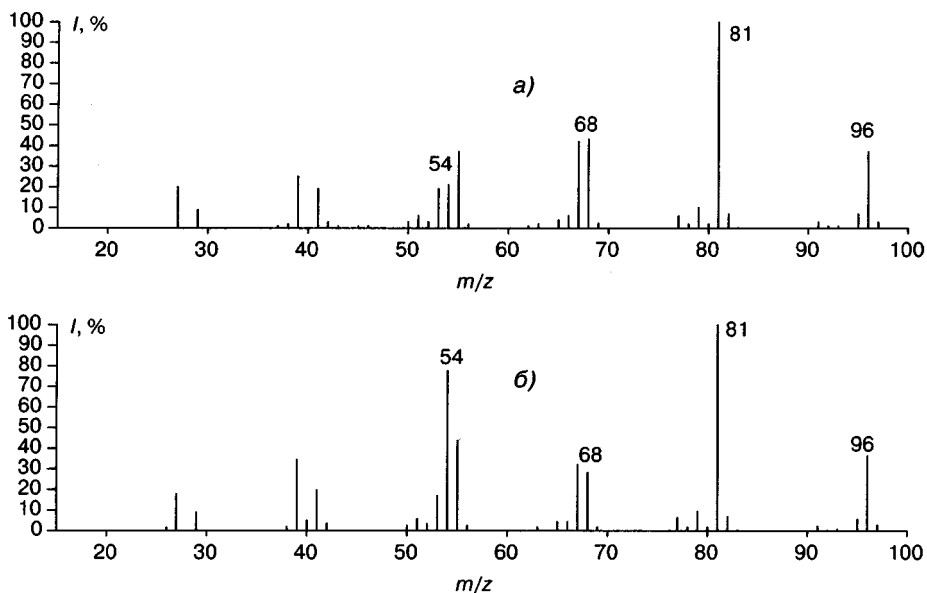


Рис. 10.15

10.5. Ароматические углеводороды

Электронная ионизация. Молекулярные ионы незамещенного бензола и его полициклических аналогов характеризуются максимальными пиками в спектре. С увеличением числа конденсированных колец доля $M^{+\cdot}$ возрастает. Например, для бенз[а]пирена интенсивность пика $M^{+\cdot}$ составляет более 50% в полном ионном

токе (рис. 10.16), причем второй и третий по интенсивности пики в спектре принадлежат двухзарядным ионам M^{++} и $[M-H]^+$. Другие интенсивные пики обусловлены ионами $[M-H_2]^+$, $[M-C_2H_2]^+$, $[M-H_2-C_2H_2]^+$, а также двухзарядными ионами такого же состава. Аналогичные спектры характерны для любых незамещенных полициклических ароматических углеводородов.

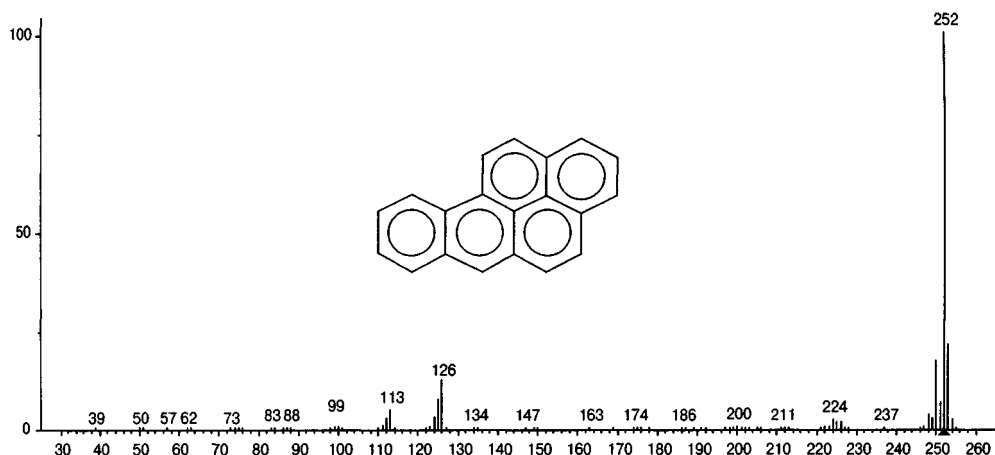


Рис. 10.16. Спектр ИЭ бенз[а]пирена

Важность качественного и количественного определения полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) как приоритетных загрязняющих веществ определила интенсивный поиск их селективного анализа. В частности, существенные различия величины сечения ионизации отмечены в зависимости от структуры изомерного ПАУ в процессе резонансного захвата электрона [813].

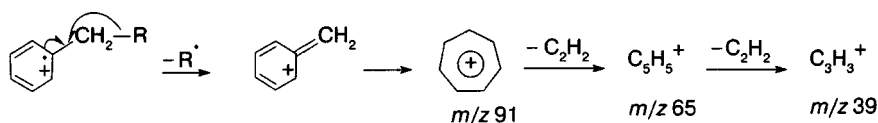


Схема 10.10

Молекулярные ионы алкилзамещенных ароматических углеводородов также характеризуются интенсивными пиками в спектрах ИЭ (рис. 10.17). Для этих соединений доминирующим процессом становится бензильный разрыв с образованием резонансно стабилизированного иона (схема 10.10). При распаде монозамещенного бензола происходит образование полностью рандомизованного тропиий-катиона (m/z 91), который далее последовательно теряет две молекулы ацетилена (схема 10.10). Этот катион можно считать первым в гомологической серии характеристических для алкилбензолов ионов с общей формулой $Ph(CH_2)_n^+$. Если есть возможность альтернативного отщепления нескольких алкильных радикалов, интенсивность пиков соответствующих фрагментных ионов определяется правилом выброса максимального алкильного радикала (разд. 3.1.1).

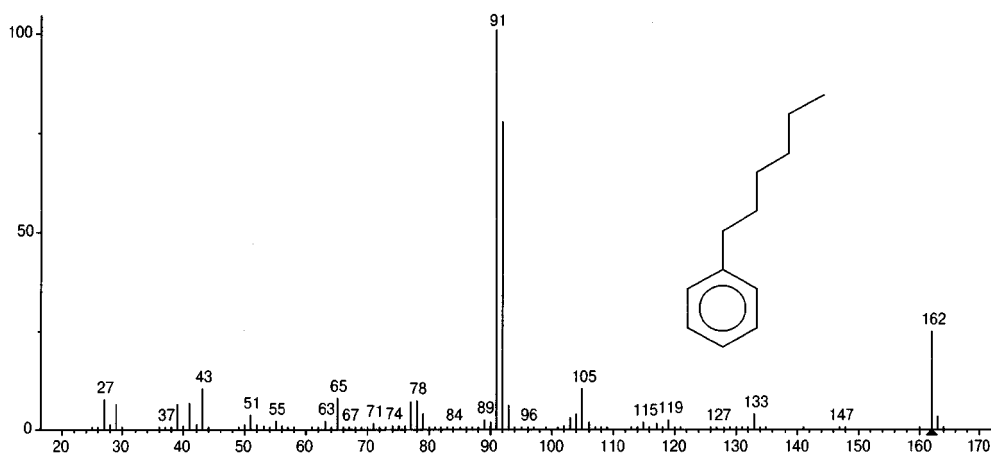


Рис. 10.17. Масс-спектр ИЭ гексилбензола

Процесс отщепления всего заместителя с образованием фенильного катиона идет, но значительно менее эффективно, поскольку прочность фенильной связи С—С 110,8 ккал/моль существенно выше, чем бензильной — 74,1 ккал/моль, а стабильность фенилкатиона значительно ниже, чем бензилкатиона или тропилий-катиона. Тем не менее пики фрагментных ионов, образующихся при разрыве связи Alk—Ph, становятся весьма интенсивными при распаде полиалкилзамещенных бензолов.

Для интерпретации масс-спектра очень важен процесс, идущий по механизму перегруппировки Мак-Лафферти. Это направление распада для случая монозамещенного бензола проиллюстрировано схемой 10.11. В результате образуется молекулярный ион толуола. Для протекания перегруппировки необходима длина цепи заместителя не менее трех атомов. Кроме того, в цепи у первых двух атомов углерода не должно быть разветвлений, а по крайней мере одно *орто*-положение должно быть свободно. Интенсивность пика такого нечетноэлектронного иона (m/z 92) очень высока (рис. 10.17), и для углеводородов с длинной неразветвленной цепью может сравняться с интенсивностью тропилий-катиона (m/z 91).

На основании двух описанных процессов (бензильный разрыв и перегруппировка Мак-Лафферти) можно устанавливать структуры изомерных ароматических углеводородов. Например, пропилбензол будет характеризоваться максимальным пиком с m/z 91 и интенсивным пиком перегруппировочного иона с m/z 92. Для изомерного метилэтилбензола перегруппировочный процесс невозможен ($n = 2$), а бензильный разрыв приводит к ионам с m/z 105 и 119. Изопропилбензол будет терять только метильный радикал (m/z 105). К сожалению *орто*-, *мета*- и *пара*-изомеры алкилзамещенных ароматических углеводородов характеризуются очень близкими масс-спектрами, что не позволяет идентифицировать изомеры этого типа.

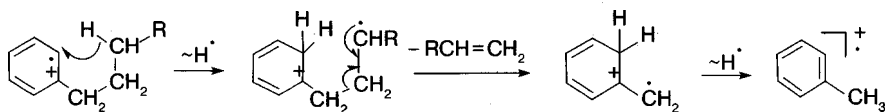


Схема 10.11

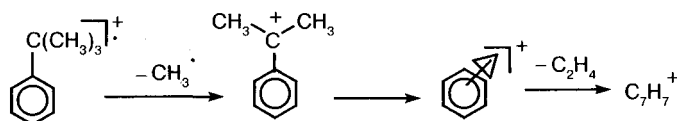


Схема 10.12

В случае *трет*-бутилбензола вслед за бензильным разрывом протекает элиминирование молекулы этилена [814, 815]. Этот факт объясняется изомеризацией иона $[M-CH_3]^+$ в структуру π -комплекса фенилкатиона и циклопропана (схема 10.12).

Совершенно по таким же направлениям распадаются молекулярные ионы алкилзамещенных полициклических ароматических углеводородов и бифенилов. В случае дифенилметана (рис. 10.18), помимо интенсивного пика $[M-H]^+$, обусловленного ионом фенилтропилия, достаточно высокую интенсивность имеет пик иона $[M-3H]^+$.

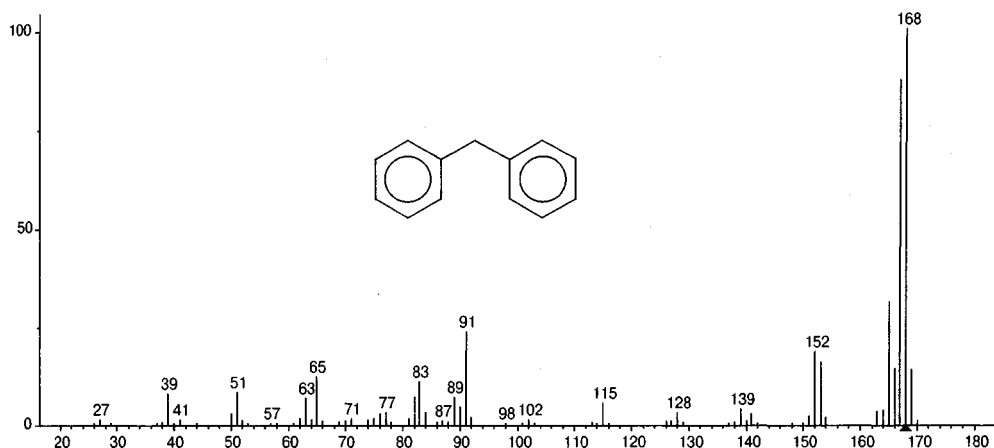


Рис. 10.18. Масс-спектр ИЭ дифенилметана

Этот связано с образованием флуоренил-катиона в результате нуклеофильной атаки одного бензольного ядра по катионному центру в *орто*-положении другого (схема 10.13). Следует отметить, что даже если в *орто*-положениях находятся заместители, происходит их элиминирование с образованием флуоренил-катиона.

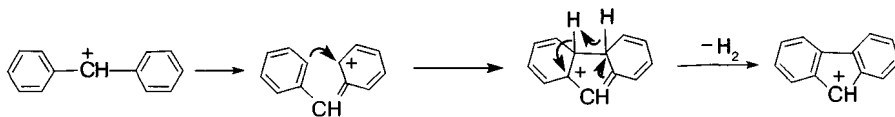


Схема 10.13

Ароматические углеводороды являются хорошими моделями для изучения скрамблинга в масс-спектрометрии. Исследование механизма отщепления молекулы ацетилена из M^{++} бензола показало, что до распада происходит полная рандомизация атомов углерода и водорода. Например, молекулярный ион 1,3,5-три-

дейтеробензола теряет молекулы C_2H_2 , C_2HD и C_2D_2 в отношении 1 : 3 : 1. Изучение распада соединений, меченных изотопами ^{13}C и D , показало, что все $C-H$ связи в молекулярном ионе бензола разрываются и статистически реорганизуются до или во время фрагментации, т.е. скрамблинг атомов водорода осуществляется в результате миграций, а скрамблинг атомов углерода в результате валентной изомерии.

Аналогичные процессы характерны и для более сложных ароматических систем. Например, $M^{+\bullet}$ пентадейтерофенилбензола ($C_6H_5-C_6D_5$) теряет молекулы C_2H_2 , C_2HD и C_2D_2 после полной рандомизации. Отщепление метильного радикала молекулярным ионом стильбена протекает только после полной рандомизации атомов углерода и водорода. Для протекания этого процесса необходимо более 10 000 разрывов и образований новых связей. Это событие кажется невероятным, но действительно возможно, поскольку константы скоростей этих реакций имеют величину $10^{12}-10^{13}$, а время жизни иона в источнике масс-спектрометра в условиях ИЭ 10^{-6} секунды.

Для алифатических соединений, особенно при наличии функциональных групп, скрамблинг не столь характерен при использовании электронов с энергией 70 эВ, однако при понижении энергии электронов этот процесс становится заметным. В целом, следует отметить, что чем быстрее идут реакции фрагментации, тем меньше вероятность рандомизации.

Химическая ионизация. Для незамещенных ароматических углеводородов, как и в случае ИЭ, фрагментация незначительна. Максимальную интенсивность имеет пик протонированной молекулы MH^+ . Кроме него, в спектрах проявляются лишь пики ионов, обусловленных реакцией электрофильного присоединения ($[M+C_2H_5]^+$ и $[M+C_3H_5]^+$ для химической ионизации метаном). Сечение ионизации в случае ХИ метаном меньше, чем в условиях ИЭ. При использовании химической ионизации водородом в спектрах присутствуют только пики ионов $M^{+\bullet}$ и MH^+ . Сечение ионизации при этом сравнимо с наблюдаемым в условиях ИЭ. Доля MH^+ увеличивается с увеличением энергии ионизации молекулы. Соотношение интенсивностей пиков ионов MH^+ и $M^{+\bullet}$ может использоваться для идентификации изомерных ПАУ [816]. Для этой цели используют в качестве газа-реагента смесь метана и аргона.

Интенсивность пиков MH^+ остается высокой и для алкилзамещенных ароматических углеводородов. С увеличением длины и разветвленности алкильного заместителя возрастает интенсивность пиков гомологической серии ароматических ионов (m/z 91, 105, 119 ...). Образование этих ионов может протекать как при фрагментации протонированной молекулы, так и в результате ионизации по механизму отрыва аниона (схема 10.14).

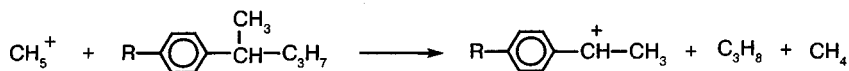


Схема 10.14

Начиная с бутильного заместителя, в спектре появляются пики ионов алкановой серии. Наличие в молекуле *трет*-бутильной группы приводит к максимальному по интенсивности в спектре пику иона с m/z 57. Алкановые ионы образуются при отщеплении ароматического фрагмента из MH^+ . Еще одним процессом фрагментации MH^+ является элиминирование молекулы олефина (схема 10.15).

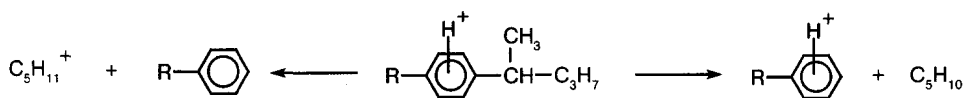
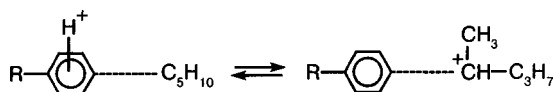


Схема 10.15

Процессы, представленные на схеме 10.15, по-видимому, протекают через промежуточное образование комплексов X-1 [817]. Водородные сдвиги в алкильном катионе комплекса X-1 могут приводить к образованию более стабильного катиона.



X-1

Химическая ионизация позволяет установить молекулярную массу ароматического углеводорода и различить структурные изомеры. Однако, как и в случае ИЭ, различить *орто*-, *мета*- и *пара*-изомеры по спектрам ХИ не удастся.

Количество алкильных заместителей в бензольном ядре можно установить при использовании в качестве газа реагента дейтерированного метанола CH_3OD [818]. Этот реагент позволяет провести замещение всех ароматических атомов водорода на дейтерий. При использовании окиси азота в спектрах алкилбензолов доминируют пики M^{++} и $[\text{M}+\text{NO}]^+$. Соотношение интенсивностей пиков этих ионов зависит от энергии ионизации молекулы [819].

Химическая ионизация отрицательных ионов. Незамещенный бензол не реагирует с гидроксил-анионом в связи с отсутствием кислых атомов водорода. Однако в спектрах незамещенных полициклических ароматических углеводородов наблюдаются пики ионов $[\text{M}-\text{H}]^-$, $[\text{M}+\text{OH}]^-$, $[\text{M}-\text{H}+\text{NO}]^-$, $[\text{M}-\text{H}+\text{N}_2\text{O}]^-$. Сечения ионизации ПАУ выше, чем в условиях ИЭ, что позволяет использовать ХИОИ для детектирования этих соединений в следовых количествах [820]. Для алкилбензолов образование ионов $[\text{M}-\text{H}]^-$ при отщеплении бензильного атома водорода является доминирующим процессом. Депротонированные молекулы очень устойчивы. Они могут присоединять молекулу N_2O . Образовавшиеся ионы могут, в свою очередь, терять молекулу воды. Для химической ионизации O^- характерно образование ионов $[\text{M}-\text{H}]^-$, $[\text{M}-2\text{H}]^-$, $[\text{M}-\text{H}+\text{O}]^-$, $[\text{M}-\text{R}+\text{O}]^-$.

Инициирование фрагментации депротонированных молекул алкилбензолов требует активации соударением [821]. Наиболее характеристичным является элиминирование молекулы алифатического углеводорода с захватом атома водорода из *орто*-положения (схема 10.16).

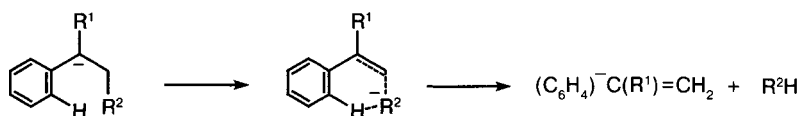


Схема 10.16

Элиминирование молекулы C_4H_4 является доминирующим направлением распада иона $[M-H]^-$ дифенилметана [822]. Этот процесс доказан изучением спектров изотопных аналогов и протекает селективно, вероятно, через промежуточную валентную изомеризацию в структуру бензола Дьюара (схема 10.17).

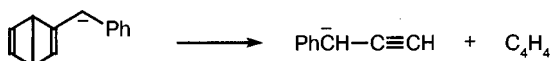


Схема 10.17

Задача 10.12. Какие отличия во фрагментации позволяют различить перечисленные ниже соединения по их масс-спектрам ИЭ?

- А) пропилбензол и изопропилбензол;
- Б) бутилбензол, метилпропилбензол и диэтилбензол;
- В) 2,4-диметилбутилбензол и 2,6-диметилбутилбензол;
- Г) бутилбензол, изобутилбензол, *втор*-бутилбензол и *трет*-бутилбензол;
- Д) 1-пропилнафталин и 1,4,7-триметилнафталин;
- Е) 2-бутил-, 5-метил-2-пропил- и 2,3,4,7-тетраметил-антрацен

Задача 10.13. Какие интенсивные пики первичных фрагментных ионов будут наблюдаться в спектрах ИЭ перечисленных ниже соединений?

- А) *втор*-амилбензол;
- Б) *орто*-метилизобутилбензол;
- В) 1-метилнафталин;
- Г) 2-этилнафталин;
- Д) 2-пропилнафталин;
- Е) 2-этилантрацен;
- Ж) 1-бутилантрацен;
- З) 1-пропилбенз[а]антрацен;
- И) 2-*трет*-бутилнафталин.

Задача 10.14. Идентифицируйте соединение, спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.19 в графическом и табличном виде.

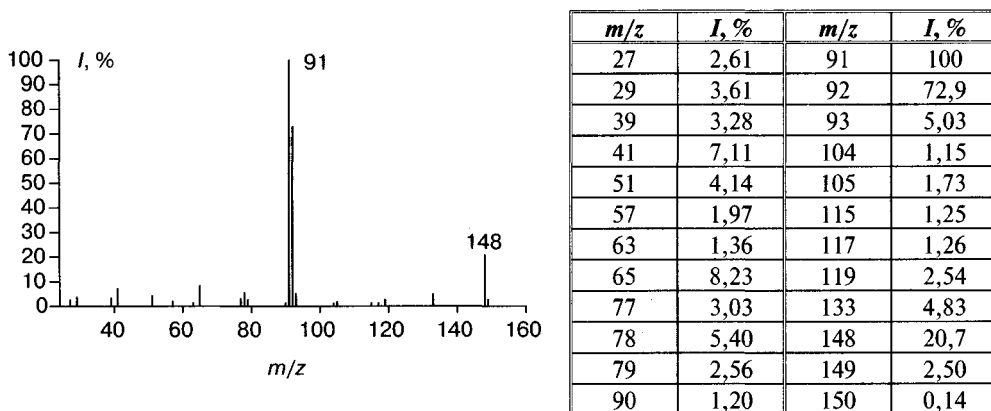
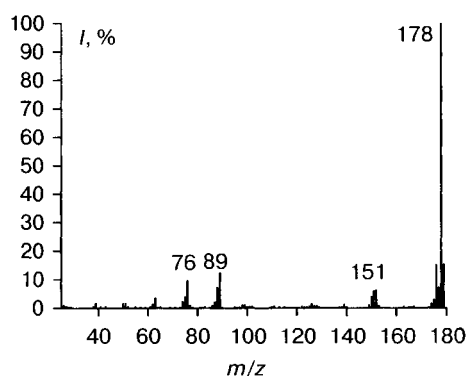


Рис. 10.19

Задача 10.15. Объясните образование устойчивого иона с m/z 165, образующегося при фрагментации трифенилметана в условиях ИЭ.

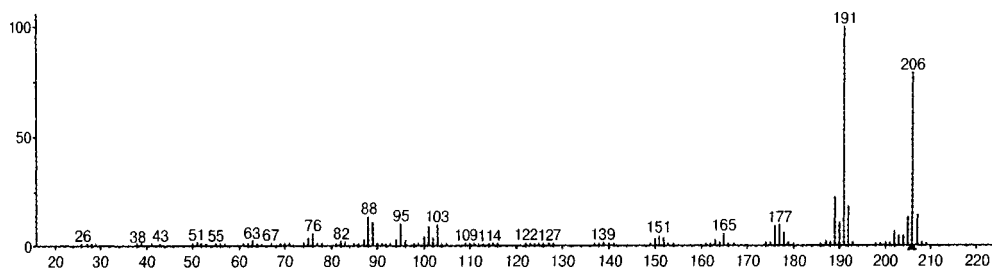
Задача 10.16. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.20) в графическом и табличном виде.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
39	1,58	150	3,93
50	1,60	151	5,96
51	1,61	152	6,03
63	3,41	175	2,89
74	2,17	176	15,0
75	3,86	177	7,22
76	9,51	178	100
88	7,18	179	15,8
89	12,2	180	1,13

Рис. 10.20

Задача 10.17. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.21) в графическом и табличном виде.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
75	34	76	53	82	18	83	20
87	33	88	128	89	102	94	27
95	98	96	25	100	37	101	85
102	31	103	94	150	28	151	44
152	31	163	22	165	55	176	89
177	94	178	59	179	15	187	18
189	220	190	102	191	1000	192	179
193	15	202	62	203	42	204	41
205	128	206	787	207	136	208	11

Рис. 10.21

10.6. Спирты, фенолы, тиолы

10.6.1. Спирты

Электронная ионизация. Введение в молекулу углеводорода гидроксильной группы приводит к снижению энергии ионизации соединения. Однако при этом уменьшается и интенсивность пика M^{+} . В спектрах третичных, а иногда и вторичных спиртов пик M^{+} отсутствует вовсе (рис. 10.22б, в). Минимальная энергия ионизации молекулы спирта обусловлена удалением n -электрона атома кислорода. Это означает, что в электронно невозбужденном состоянии заряд и неспаренный электрон локализованы на атоме кислорода. Нестабильность M^{+} вызвана благоприятными процессами фрагментации, инициируемыми ионизированной гидроксильной группой.

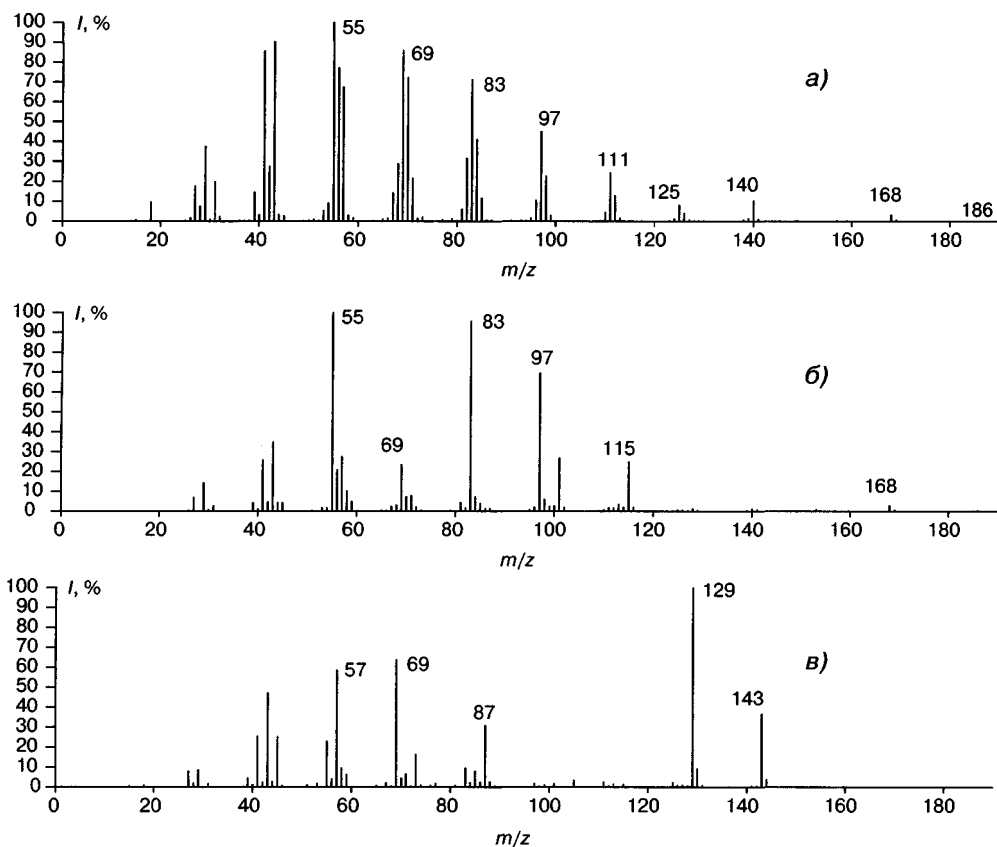


Рис. 10.22. Масс-спектры ИЭ: додеканол-1 (а), 2-метилундеканол-5 (б), 2,6-диметил-4-пропилгептанол-4 (в)

Необходимо отметить, что возможность образования водородной связи между молекулами спиртов иногда приводит к появлению в спектре пиков ионов MH^{+} . Интенсивность таких пиков непостоянна и зависит от давления паров образца в источнике. Снижение напуска образца приводит к уменьшению их интенсивности или полному исчезновению.

Определенные искажения в масс-спектр вносит также термическая деструкция молекул. В результате возникают ионы $[M-2H]^+$, $[M-H_2O]^+$, $[M-H_2, -H_2O]^+$. Эти же ионы могут образовываться и за счет обычных процессов фрагментации M^+ (доказано спектрами метастабильных ионов).

Наиболее характерный процесс фрагментации молекулярных ионов спиртов связан с α -распадом и последующими перегруппировочными процессами с выбросом молекул олефинов. Интенсивности пиков первичных ионов определяются правилом выброса максимального алкила (разд. 3.1.1, схема 10.18, рис. 10.22). Ионы характеристической «спиртовой» серии имеют значения m/z 31, 45, 59, 73 и т.д. Пики ионов этой серии в масс-спектрах могут быть как очень интенсивными, так и едва заметными (рис. 10.22). Схема 10.18 отражает основные направления фрагментации 2,6-диметил-4-пропилгептанола-4, спектр которого приведен на рис. 10.22в.

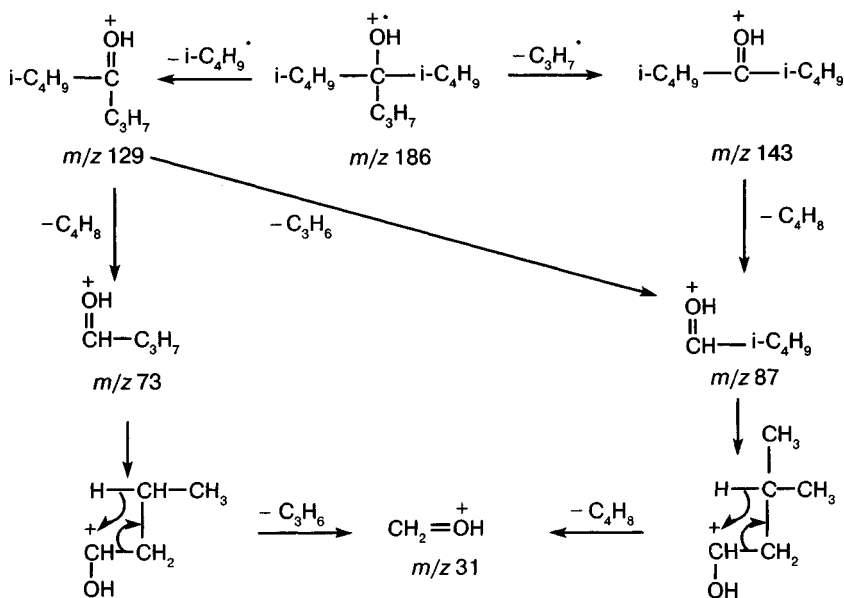


Схема 10.18

Ионы с m/z 73, 87, 31 (рис. 10.22в) образуются в результате вторичных перегруппировочных процессов, протекающих через четырехчленное переходное состояние. Образование иона с m/z 45 можно объяснить протеканием перегруппировочного процесса через шестичленное переходное состояние (схема 10.19).

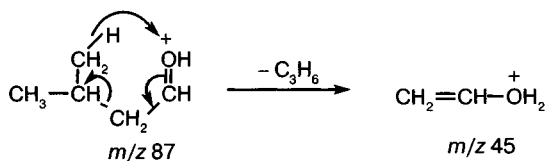


Схема 10.19

Наряду с пиками спиртовой серии высокую интенсивность имеют пики ионов алкановой и алкеновой серий. Особенно это проявляется при распаде неразветвленных соединений. Эти углеводородные фрагменты могут составлять в случае тяжелых спиртов практически весь ионный ток (рис. 10.22а). Важным направлением фрагментации спиртов является элиминирование молекулы воды. Атом водорода, отщепляющийся вместе с гидроксильной группой, может захватываться из самых разных положений, хотя наиболее вероятными являются положения 2, 3 и 4. В результате этого процесса возникают олефиновые или циклановые ионы. Выброс молекулы воды может сопровождаться элиминированием молекулы этилена. Показано, что при этом отщепляются α и β атомы углерода. Этот процесс (образование иона $[M-46]^{+\cdot}$) протекает по механизму, представленному на схеме 10.20. По значению m/z этого иона можно судить о наличии разветвлений у α и β атомов углерода, поскольку в этом случае вместе с молекулой воды отщепляется не C_2H_4 , а C_2H_3R .

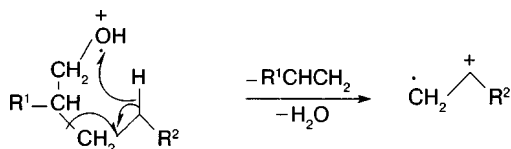


Схема 10.20

Для бензиловых спиртов (рис. 10.23) характерно элиминирование атома водорода, за которым следует отщепление молекулы CO. Далее этот фрагмент с выбросом молекулы водорода превращается в фенил-катион. Следует отметить, что отрыв атома водорода может идти от любого из атомов углерода, что подразумевает трансформацию $M^{+\cdot}$ до распада [40].

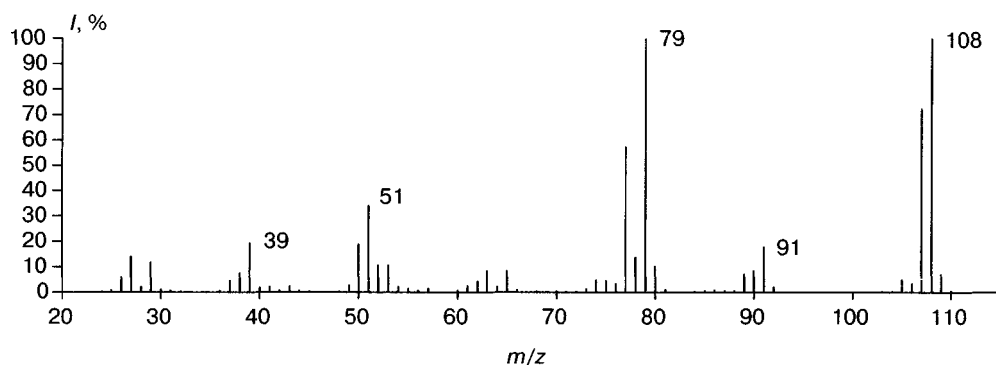


Рис. 10.23. Масс-спектр ИЭ бензинового спирта

Отщепление от $M^{+\cdot}$ гидроксильной группы протекает в случае бензиловых спиртов, поскольку в результате образуется стабильный бензильный (тропилиевый) катион. Фрагментный ион с m/z 105 (рис. 10.23) образуется в результате первоначального окислительного процесса с отщеплением молекулы водорода и образованием молекулярного иона бензальдегида, который в дальнейшем теряет атом водорода [823].

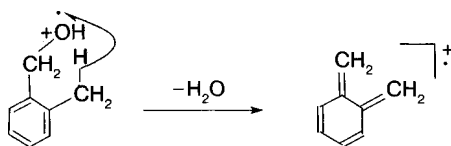
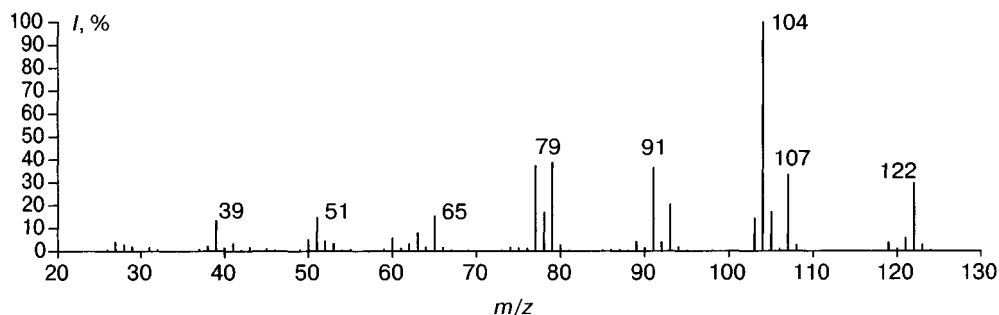


Схема 10.21

Для алкильных производных бензильного спирта характерны процессы, описанные выше для алкилбензолов. Проявление *орто*-эффекта можно наблюдать при фрагментации *орто*-алкилбензильного спирта. В отличие от *мета*- или *пара*-изомеров $M^{+\cdot}$ этих соединений теряют молекулу воды (схема 10.21, рис. 10.24, ион 104).

Рис. 10.24. Масс-спектр ИЭ *орто*-метилбензильного спирта

Для циклических спиртов механизмы фрагментации остаются такими же. α -Распад является основным направлением и протекает с большей вероятностью в месте разветвления углеродного скелета (рис. 10.25 и схема 10.22). Последующие процессы с выбросом молекул олефинов обуславливают серию характеристических нечетноэлектронных ионов с массами 44, 58, 72, 86...

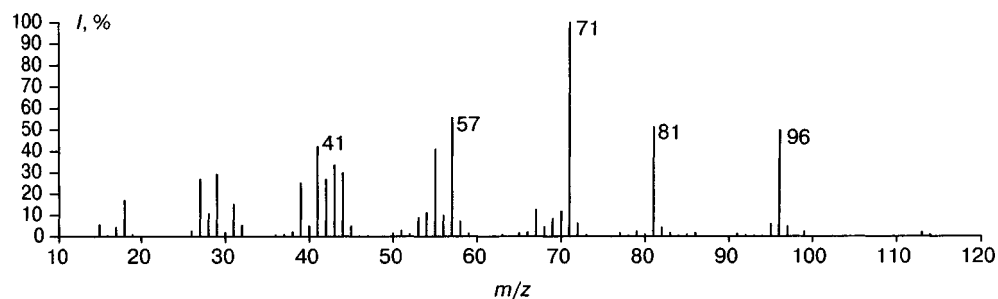


Рис. 10.25. Масс-спектр ИЭ 3-метилциклогексанола

Фрагментация циклопропанолов начинается с раскрытия кольца. Для циклобутанолов, как и для циклобутановых углеводородов, характерен разрыв малого цикла пополам. В образовавшейся паре фрагментов заряд предпочтительно сохраняется на кислородсодержащем. Для циклоалканолов, начиная с циклопентанола, важную роль играют перегруппировочные процессы. В частности, максимальную интенсив-

ность в спектре имеют пики ионов, образовавшиеся в результате миграции атома водорода и отщепления алкильного радикала (m/z 57 и 71 на схеме 10.22). Миграция атома водорода протекает селективно, как это показано на схеме. Механизм процесса подтвержден спектрами дейтерированных аналогов [40].

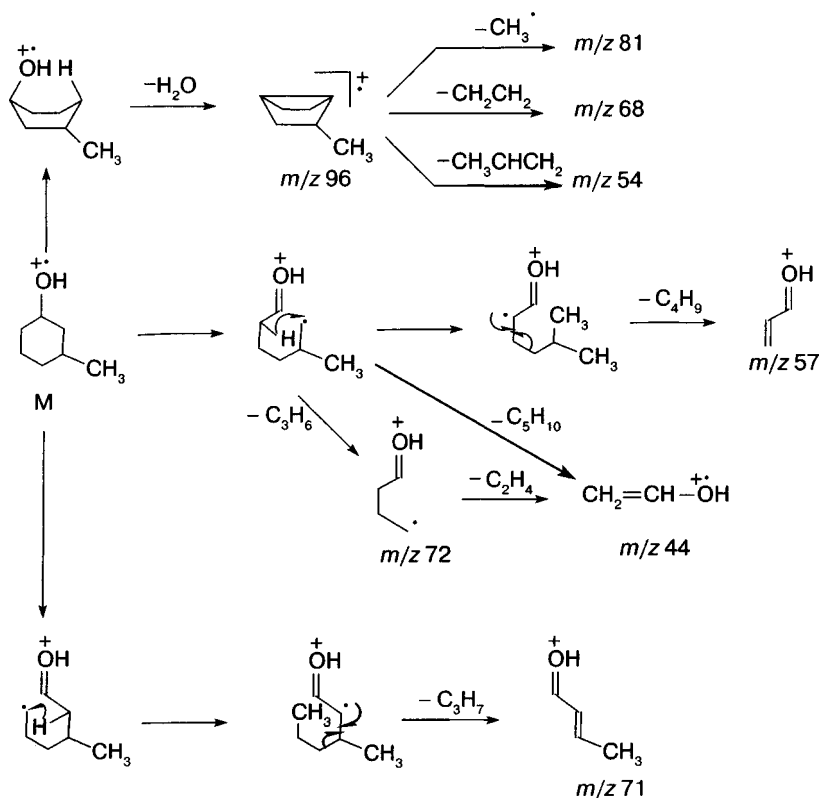


Схема 10.22

На основании молекулярной массы соединения и массы перегруппировочных ионов (m/z 57, 71, 85 и т.д.) можно делать выводы о месте алкильного радикала в молекуле. Если алкильный заместитель расположен в положении 2 циклогексанового кольца, из двух альтернативных фрагментных ионов этого типа, благодаря большей легкости разрыва C—C связи в месте разветвления, чуть более интенсивным будет незамещенный (m/z 57). Для циклогексанолов с алкильным заместителем в положении 3 предпочтительным оказывается образование более тяжелого из пары альтернативных фрагментов. По-видимому, решающим оказывается факт образования замещенного олефина. Если заместитель находится в положении 4, он будет элиминирован в составе алкильного радикала вне зависимости от первоначального разрыва связей C_1-C_6 или C_1-C_2 . Алкильный заместитель в положении 1, напротив, всегда остается в составе заряженного фрагмента этого типа. Однако такой заместитель может легко отщепляться из $M^{+\cdot}$ (α -распад), приводя к интенсивным пикам иона $[M-Alk]^+$.

Элиминирование воды может протекать с захватом атома водорода в основном из положения 4, а также из положений 3 и 5 цикла [155]. Дальнейшая фрагментация иона $[M-H_2O]^{+}$ обуславливает образование ряда углеводородных фрагментов, характеризующихся интенсивными пиками в спектре (схема 10.22).

Гликоли и полиолы распадаются по тем же механизмам, что и монофункциональные спирты. Пики их молекулярных ионов имеют очень низкую интенсивность или вообще отсутствуют. Наиболее благоприятны α -разрывы относительно атомов углерода, связанных с гидроксильными группами (m/z 31, 59, 61 для 1,2-бутандиола, рис. 10.26а).

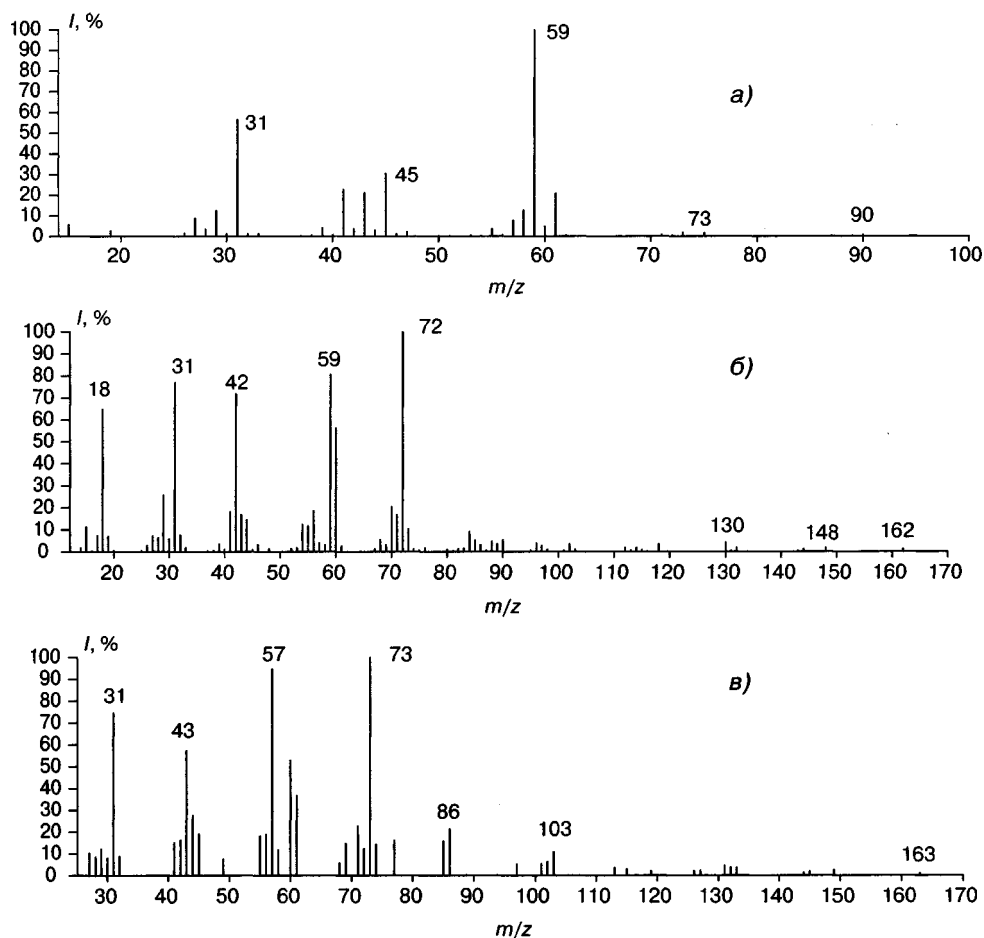


Рис. 10.26. Масс-спектры ИЭ: 1,2-бутандиола (а), глюкозы (б), сахарозы (в)

Низкая летучесть и низкая термическая устойчивость сахаров приводит к появлению в их спектрах ИЭ большого числа пиков ионов, обусловленных продуктами термической деструкции исходной молекулы. На рис. 10.26б представлен масс-спектр ИЭ глюкозы. Пик молекулярного иона отсутствует. В области высоких значений m/z можно отметить последовательные выбросы молекул воды и метилового

спирта, однако интенсивности пиков этих ионов малы. Доминируют в спектре пики ионов с m/z 18 (H_2O^{++}), 31 (CH_2OH^+), 42 ($\text{CH}_2\text{CO}^{++}$), 59 ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^+$), 60 ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2^{++}$), 72 ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2^{++}$), которые образуются как в результате фрагментации M^{++} , так и в результате термической деструкции. Спектры дисахаридов характеризуются полным доминированием ионов с низкими массами (рис. 10.26). С увеличением количества мономеров в молекуле сахара возможности ИЭ значительно уменьшаются по причине термолабильности и крайне низкой летучести этих соединений. Для увеличения термической стабильности молекулы используют метилированные или ацилированные производные сахаров. Хотя молекулярные ионы отсутствуют даже для моносахаридов, масс-спектры содержат меньше пиков, обусловленных продуктами термического распада. Основные направления фрагментации можно классифицировать, допустив, что в электронно невозбужденном состоянии заряд и неспаренный электрон локализованы на гетероциклическом атоме кислорода [24]. Подробнее с фрагментацией сахаров в условиях ИЭ можно познакомиться в обзорах О.С. Чижова [824, 825]. Масс-спектрометрия сахаров другими методами ионизации представлена в разд. 11.3.

Химическая ионизация. Протонированные молекулы MH^+ алифатических, алициклических, аллиловых и бензиловых спиртов нестабильны и распадаются в момент образования с выбросом молекулы воды. Таким образом, в условиях ионизации метаном и даже более мягким изобутаном пик MH^+ в спектре отсутствует. Ион $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$, напротив, характеризуется максимальным пиком в спектре. Установить молекулярную массу спирта можно также по иону $[\text{M}-\text{H}]^+$, пик которого весьма интенсивен. Этот ион образуется по механизму отрыва аниона (гидрид-иона) в момент ионизации (разд. 5.2). Отщепление происходит от α -атома углерода. Поэтому в спектрах третичных спиртов пик этого иона не наблюдается. Ион $[\text{M}-\text{H}]^+$ далее элиминирует молекулу воды с образованием алкенового иона. Дальнейшая фрагментация первичных ионов ($[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ и $[\text{M}-\text{H},-\text{H}_2\text{O}]^+$) связана с выбросами молекул олефинов. Интенсивность пиков соответствующих ионов алкановой и алкеновой серий зависит от избыточной энергии первичных ионов. При ионизации изобутаном внутренняя энергия иона меньше, и, как следствие, интенсивности пиков вторичных фрагментов значительно ниже.

Пик протонированных молекул спирта можно увидеть в спектре полифункциональных соединений с благоприятным пространственным расположением функциональных групп. В частности, пик MH^+ максимален в спектрах гексен-4-ола-1 и гексен-5-ола-1 [826]. В спектрах изомерных 1,4-циклогександиолов (рис. 10.27) интенсивность пика MH^+ крайне низка для *транс*-изомера и очень высока для *цис*-изомера. Причина заключается в образовании внутримолекулярной водородной связи в *цис*-изомере.

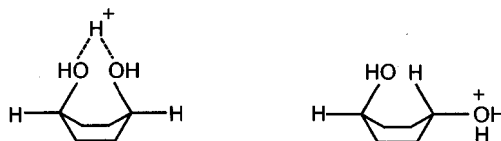


Рис. 10.27

Эффективный масс-спектрометрический метод структурного анализа изомерных диолов предложен Эйхманом [827]. Метод основан на измерении соотношения интенсивностей пиков ионов $[M+H]^+$ и $[M+CH_3OCH_2-CH_3OH]^+$ в спектрах химической ионизации диметиловым эфиром. Триметилборат в качестве газа-реагента позволяет различать стереоизомерные диолы и полиолы [211].

По спектрам химической ионизации окисью азота можно различить изомерные первичные, вторичные и третичные спирты [828]. Третичные спирты характеризуются только ионом $[M-OH]^+$, вторичные – ионами $[M-H]^+$, $[M-OH]^+$ и $[M-2H, +NO]^+$, а первичные – помимо указанных, еще ионом $[M-3H]^+$. Ключевым моментом является реакция окисления молекулы спирта, сопровождающаяся потерей двух атомов водорода и образованием карбонильного соединения. Возникающие из первичных спиртов альдегиды взаимодействуют с ионом-реагентом NO^+ или по механизму электрофильного присоединения, или по механизму отрыва аниона (гидрид-иона), с образованием иона $[M-3H]^+$. Образующиеся из вторичных спиртов кетоны могут только присоединять NO^+ .

Перегруппировка 1,2-диолов, протекающая в ионном источнике масс-спектрометра в условиях химической ионизации [829], совершенно аналогична классической пинаколиновой перегруппировке этих диолов в растворе, впервые описанной Р. Фиттигом еще в 1849 году. На схеме 10.23 этот процесс представлен на примере 2,3-диметилбутандиола-2,3.

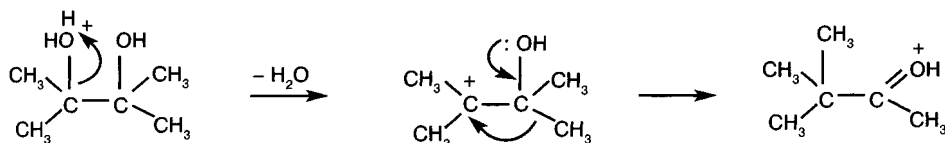


Схема 10.23

При последующем более детальном изучении пинаколиновой перегруппировки в условиях химической ионизации была подтверждена идентичность ее механизма для целого ряда алифатических, алициклических и ароматических соединений [830]. В процессе перегруппировки арильная группа мигрирует предпочтительнее алкильной. Это наблюдение совпадает с известными ранее данными о миграционной способности радикалов в кислотно-катализируемой пинаколиновой перегруппировке в растворах [831].

Химическая ионизация отрицательных ионов. В результате депротонирования молекула спирта теряет протон гидроксильной группы. Образующийся алкоколят-анион обуславливает максимальный пик в спектре. Вторым характеристическим ионом является $[M-3H]^-$, образующийся в результате двухстадийного процесса элиминирования молекулы водорода депротонированной молекулой (схема 10.24). Расчеты *ab initio* и измерение изотопных эффектов при фрагментации дейтерированных аналогов подтвердили протекание 1,2-элиминирования через промежуточное образование комплекса альдегида с гидрид-анионом [832].

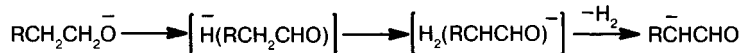


Схема 10.24

Более интенсивная фрагментация наблюдается при использовании в качестве иона-реагента $O^{\cdot-}$. В работе [833] предложен механизм образования ряда фрагментных ионов. В частности, последовательность превращений, изображенная на схеме 10.25, позволяет делать выводы о заместителях у α -атома углерода.

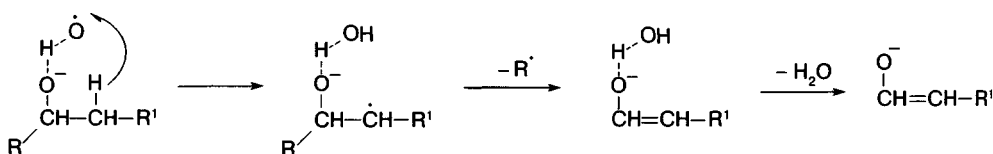


Схема 10.25

Если величина сродства к электрону углеводородного радикала положительна (фенил, бензил и др.), алколят-анионы могут распадаться с выбросом молекулы формальдегида и образованием соответствующего аниона. Анион $PhCH_2^-$ образуется также при распаде депротонированных молекул спиртов $Ph(CH_2)_nOH$, где $n = 3-5$ [834].

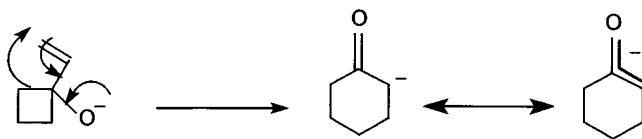


Схема 10.26

Сигматропные [1,3]-сдвиги достаточно редки для химии растворов [835], однако и практика масс-спектрометрии, и теоретические расчеты [170] свидетельствуют о выгоде этих процессов для заряженных частиц. В частности, такой процесс протекает весьма активно в случае снятия стерического напряжения. Например, депротонированный 1-винилциклобутанол изомеризуется до распада в циклогексанон (схема 10.26). Поскольку никаких иных пиков в спектрах активации соударением иона $[M-H]^-$ циклогексанона не наблюдается, перегруппировка протекает для всех исходных молекул винилциклобутанола [836].

Инициирование пинаколиновой перегруппировки щелочами менее известно. Такая перегруппировка протекает в стерически напряженных системах [837] или в α -хлоргидринах [838]. Два основных механизма этой перегруппировки в условиях H^- ионами NH_2^- исследованы методом МС/МС [839]. Если мигрирующие группы – алкильные радикалы и нет стерических ограничений для того, чтобы атомы кислорода могли принять *анти*-конформацию, реакция идет через образование эпоксидного интермедиата (схема 10.27a). В случае миграции ароматических радикалов [840] либо в пространственно затрудненных системах (*цис*-2-метоксициклогексанол) протекает пинаколиновая перегруппировка (схема 10.27b).

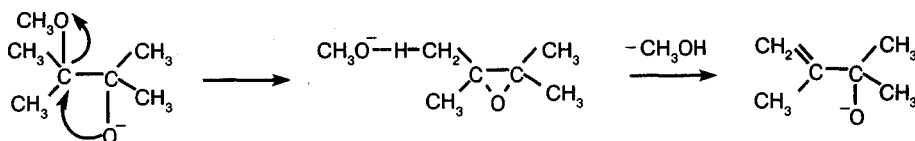


Схема 10.27a

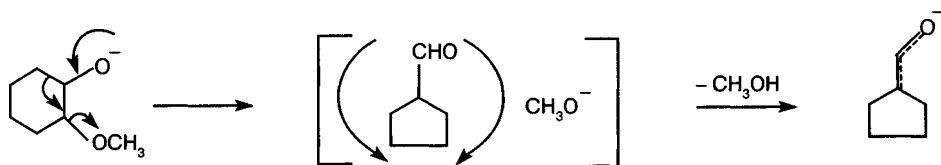


Схема 10.27b

10.6.2. Фенолы

Электронная ионизация. Фенолы характеризуются интенсивным пиком молекулярного иона. Специфический «фенольный» распад заключается в элиминировании из M^{++} частиц CO и HCO^+ (схема 10.28), поскольку в газовой фазе часть молекулярных ионов благодаря кетоенольной таутомерии имеет форму кетона.

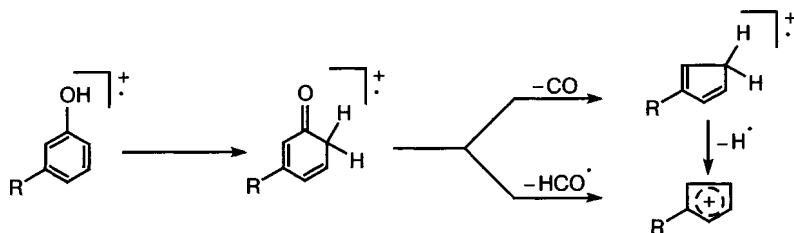


Схема 10.28

Наличие алкильного заместителя в молекуле фенола приводит к реализации бензильного распада и перегруппировке Мак-Лафферти, описанным выше для случая ароматических углеводородов (разд. 10.5). Эти процессы доминируют и могут в существенной мере маскировать «фенольный распад». Например, интенсивность пика $[M-H]^+$ в спектрах метилфенолов практически равна интенсивности пика M^{++} . Следует подчеркнуть, что для *орто*- и *пара*-алкилфенолов, с достаточной для протекания перегруппировки Мак-Лафферти длиной заместителя, предпочтительным оказывается бензильный разрыв, а для *мета*-изомеров — перегруппировочный процесс. Это объясняется возможностью дополнительной стабилизации бензильного катиона благодаря участию заместителя. Энергия появления катиона уменьшается, и процесс простого разрыва связи успешно конкурирует с перегруппировкой Мак-Лафферти. Для *мета*-изомера такое участие заместителя невозможно [841].

Для *орто*-замещенных фенолов можно также отметить процесс, обусловленный *орто*-эффектом. Он связан с элиминированием молекулы воды (схема 10.29). Интенсивность пика $[M-H_2O]^{++}$ невелика, но позволяет отличить *орто*-алкил-

фенол от его *мета*- и *пара*-изомеров (рис. 10.28). Для *мета*- и *пара*-замещенных алкилфенолов, как и для самого фенола, элиминирование молекулы воды из $M^{+\bullet}$ не характерно.

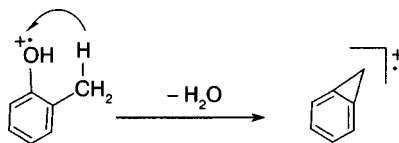
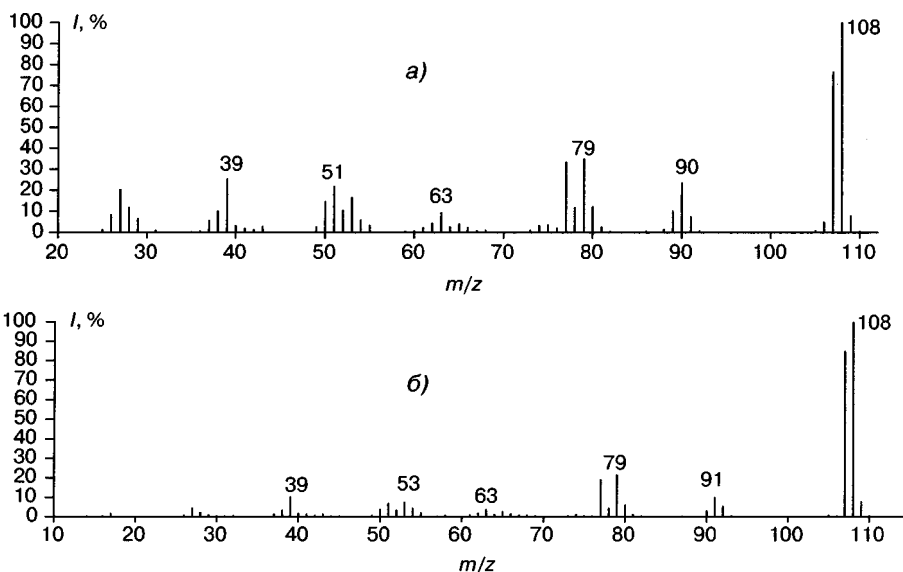


Схема 10.29

Рис. 10.28. Масс-спектр ИЭ: *орто*- (а), *мета*-метилфенола (б)

Химическая ионизация. Пики протонированных молекул фенолов доминируют в спектрах ХИ. Однако отсутствие фрагментации делает спектры этого типа менее информативными, чем спектры ИЭ. Учитывая, что информацию о молекулярной массе фенола можно легко получить по спектру ИЭ, серьезных исследований по ХИ фенолов не проводилось.

Для фенолят-аниона (условия химической ионизации отрицательных ионов) характерны выбросы молекулы СО и радикала НСО^\bullet [842], т.е. вновь процессы, описанные для ионизации электронами.

10.6.3. Тиолы

Энергии ионизации тиолов примерно на 1 эВ ниже, чем у аналогичных спиртов. Молекулярные ионы достаточно стабильны. Их пики имеют интенсивность до 10% в полном ионном токе и отчетливо проявляются в спектрах даже достаточно «тяжелых» соединений (рис. 10.29). Процессы фрагментации $M^{+\bullet}$ тиолов аналогичны описанным для спиртов. В спектрах прослеживаются пики алкано-

вой, алкеновой и тиольной (m/z 47, 61, 75...) серий. Присутствие серы в составе иона легко детектируется по пику изотопного иона $A+2$ (разд. 4.2). M^{++} тиолов элиминируют молекулу H_2S , однако альтернативно может отщепляться радикал SH^{\cdot} . Элиминирование молекулы сероводорода может сопровождаться выбросом молекулы этилена.

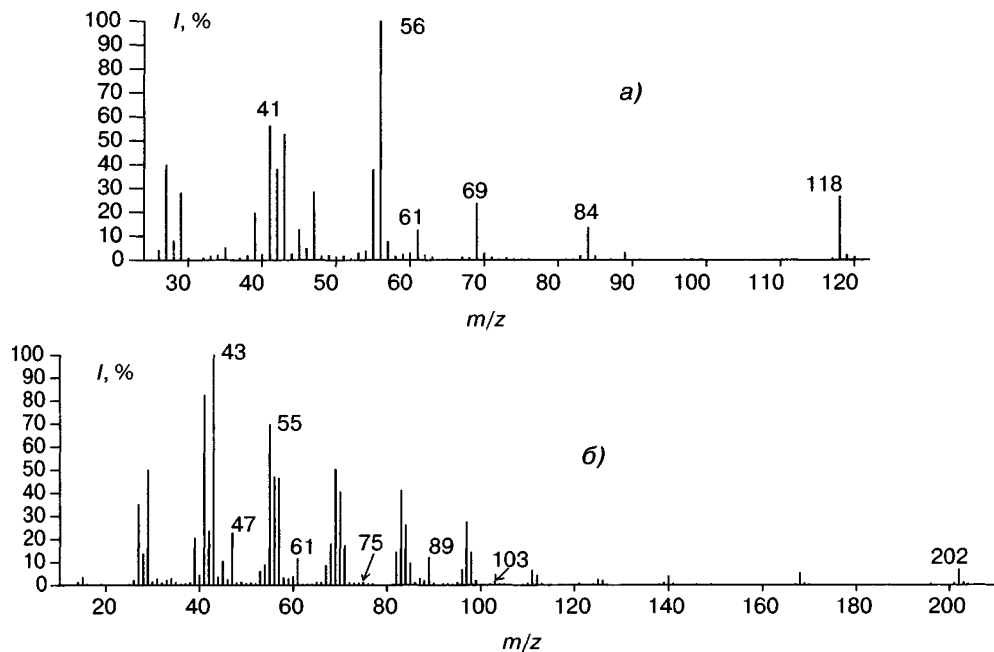


Рис. 10.29. Масс-спектры ИЭ: гексантиола (а), додекантиола (б)

Для меркаптанов с неразветвленной углеводородной цепью аномально высокую интенсивность в тиольной серии имеет пик иона с m/z 89 (рис. 10.29). Ион имеет циклическую структуру и образуется по механизму внутреннего замещения, представленному на схеме 10.30.

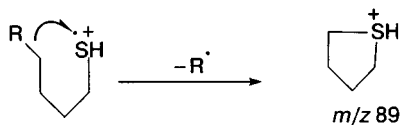


Схема 10.30

Циклоалкилтиолы распадаются аналогично вторичным тиолам. Основной для алициклических спиртов процесс, приводящий к максимальным пикам в спектрах (m/z 71 на схеме 10.22 и рис. 10.25), значительно менее характерен для серных аналогов. В спектрах циклоалкилтиолов интенсивность пика иона с m/z 73 (для замещенных в положения 2, 3, 5, 6 – m/z 72+R) не превышает 10% (рис. 10.30).

Особенности фрагментации тиофенолов позволяют предположить, что для молекулярных ионов этих соединений кетоформа более выгодна, чем енольная. Эта форма

может легко объяснить наличие в спектрах интенсивных пиков ионов $[M-CS]^{+}$ и $[M-C_2H_2]^{+}$. Помимо этого, в отличие от реакций фрагментации фенолов, интенсивно идут процессы с элиминированием радикала SH^{\cdot} и атома серы (рис. 10.31).

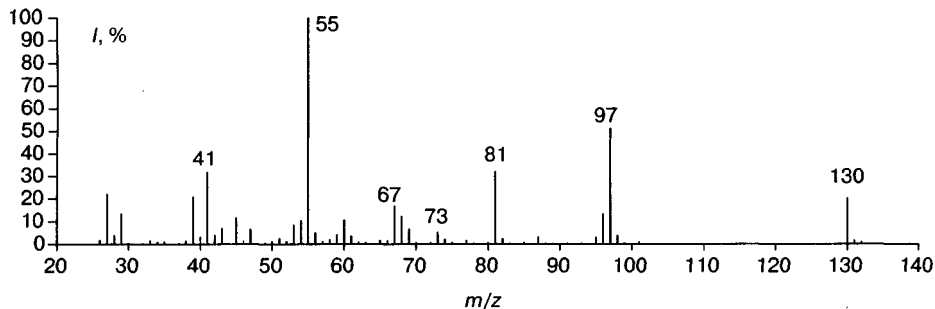


Рис. 10.30. Масс-спектр ИЭ 2-метилциклогексантиола

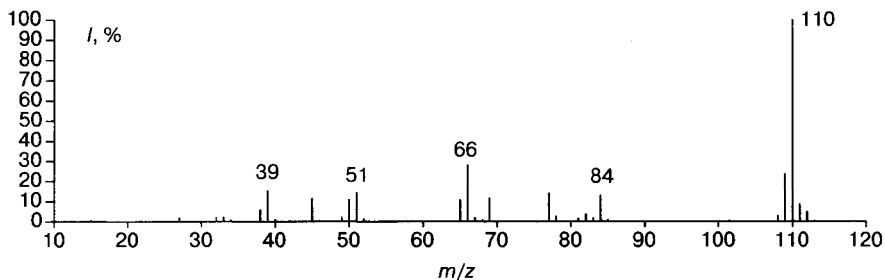


Рис. 10.31. Масс-спектр ИЭ тиофенола

Задача 10.18. Пик какого первичного фрагмента будет наиболее интенсивным в спектрах перечисленных ниже соединений?

- А) метилэтилпропилкарбинол;
- Б) изоамилвторбутилэтилкарбинол;
- В) октанол-3;
- Г) 3-метилдеканол-4;
- Д) 3,3-диметил-4-этилоктанол-4;
- Е) гексадеканол-1;
- Ж) гептадеканол-5;
- З) 2,2-диметилгексанол-3.

Задача 10.19. Как с помощью масс-спектрометрии можно различить перечисленные ниже изомерные соединения?

- А) бутанол-1 и бутанол-2;
- Б) пентанол-1, пентанол-2 и пентанол-3;
- В) гексанол-1 и 2-метилпентанол-1;
- Г) 2-метилоктанол-1 и 3-метилоктанол-1;
- Д) диметилэтилкарбинол и диэтилкарбинол;
- Е) 4,4,4-трифенилбутанол-2 и 3,4,4-трифенилбутанол-2;
- Ж) бутантиол-1 и бутандиол-1,4;

- З) пирокатехин и тиофенол;
И) гексантиол и 2-метилпентантиол.

Задача 10.20. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.32).

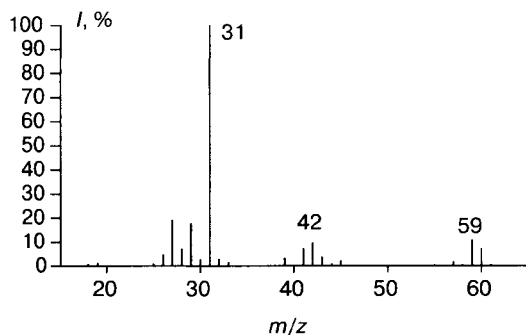


Рис. 10.32

Задача 10.21. Какие различия будут наблюдаться в спектрах ИЭ перечисленных ниже соединений?

- А) 2-метилциклогексанола и 3-метилциклогексанола;
Б) 2-метилциклогексанола и 4-метилциклогексанола;
В) 2-метилциклопентанола и циклогексанола;
Г) 2,4,6-триметилфенола и 4-пропилфенола;
Д) 2-фенилэтанола и 1-фенилэтанола;
Е) декантиола-1 и 3-метилнонантиола-1;
Ж) гидрохинона и тиофенола.

Задача 10.22. Какое из перечисленных ниже соединений характеризуется представленным на рис. 10.33 масс-спектром? Дайте аргументированный ответ.

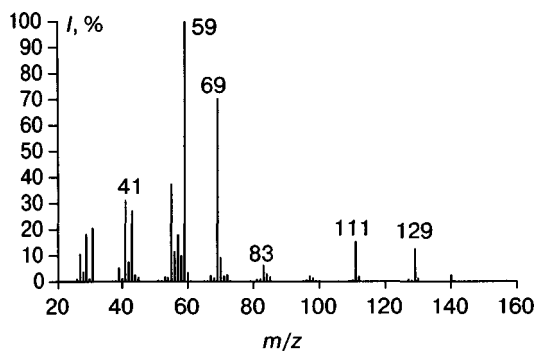


Рис. 10.33

Ундекан; деканол-2; 3,4-диметилоктанол-2; деканол-3; деканол-1; 3-метилнонанол-3; 3,4-диэтилциклогексанол; 2,7-диметилоктанол-4; деканаль; 7-метилнонанол-1, децен-1.

Задача 10.23. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.34).

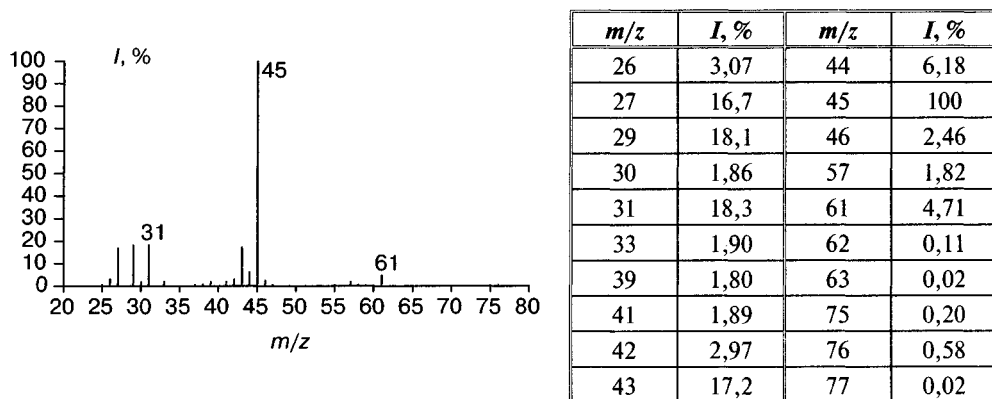


Рис. 10.34

Задача 10.24. Составьте предположительные схемы фрагментации M^{++} перечисленных ниже соединений.

- А) 3-этилгексанол-3,
- Б) диэтилбутилкарбинол,
- В) 5-этилдеканол-3,
- Г) метилэтилпропилкарбинол,
- Д) триэтилкарбинол,
- Е) триизопропилкарбинол,
- Ж) 4-метилфенол,
- З) 3-этилфенол,
- И) 3-метилциклопентанол.

Задача 10.25. На рис. 10.35 представлены масс-спектры ИЭ 2-бромфенола и 3-бромфенола. Сделайте соотнесение.

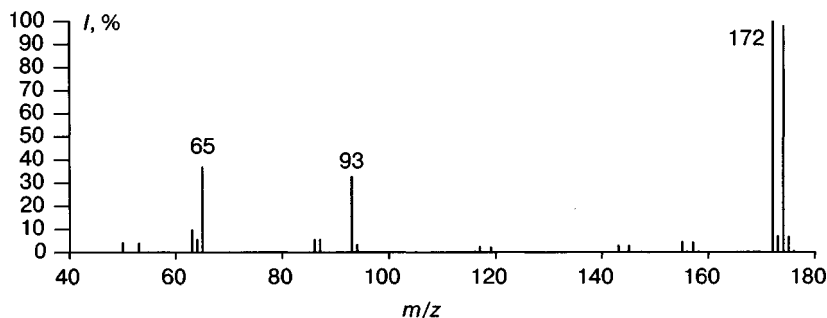


Рис. 10.35а

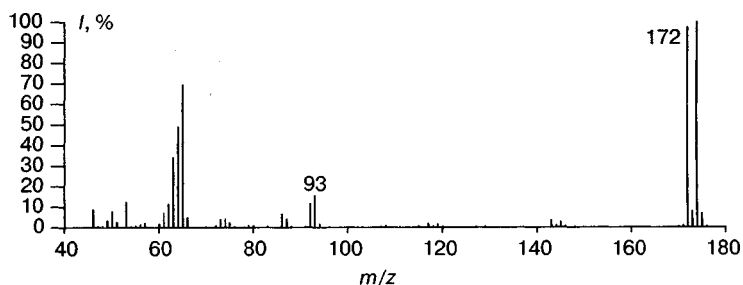


Рис. 10.35б

Задача 10.26. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.36).

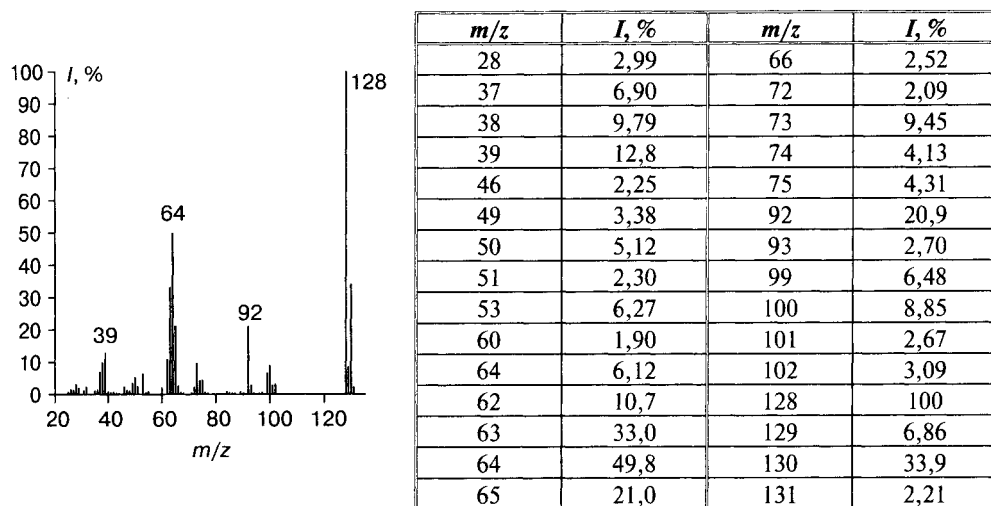


Рис. 10.36

Задача 10.27. Какие различия будут наблюдаться в спектрах химической ионизации водородом, метаном и изобутаном деканола-1?

Задача 10.28. На рис. 10.37 представлен масс-спектр ИЭ этилциклогексанола. Определите положение заместителя.

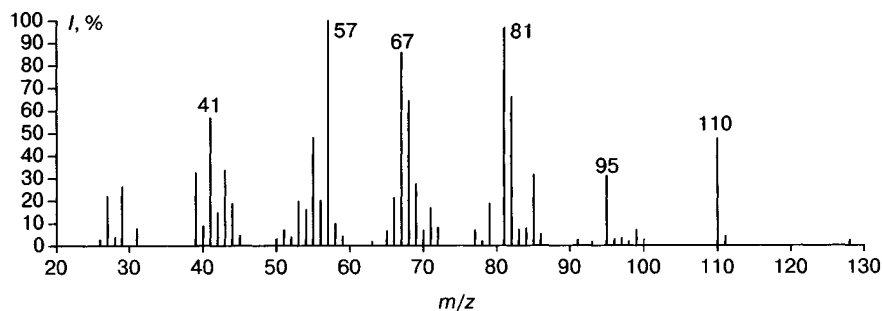


Рис. 10.37

Задача 10.29. Идентифицируйте моnofункциональное соединение с молекулярной массой 132 дальтона по его спектру ИЭ (рис. 10.38).

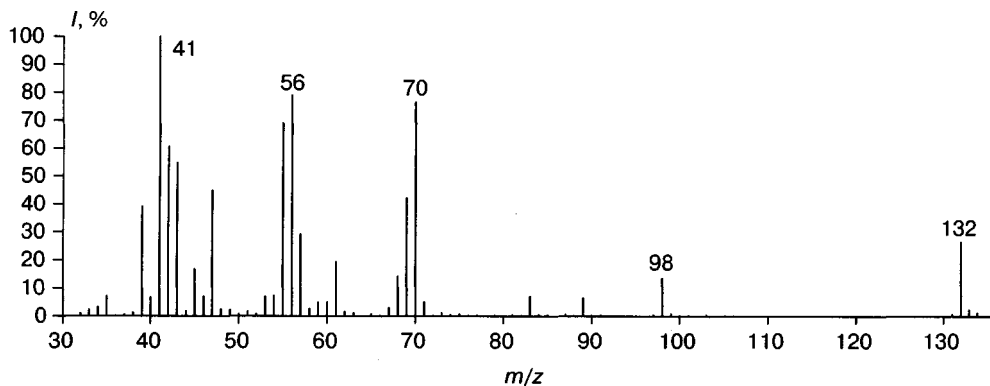


Рис. 10.38

Задача 10.30. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.39).

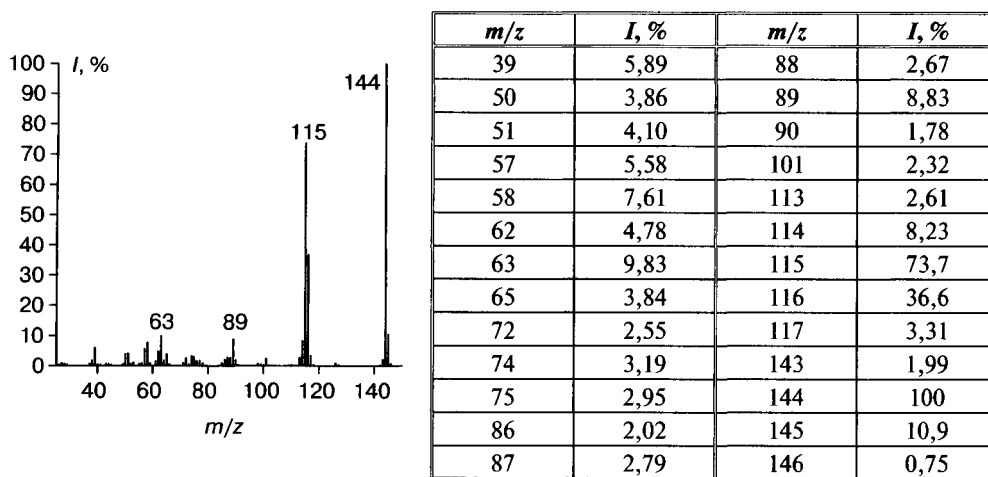
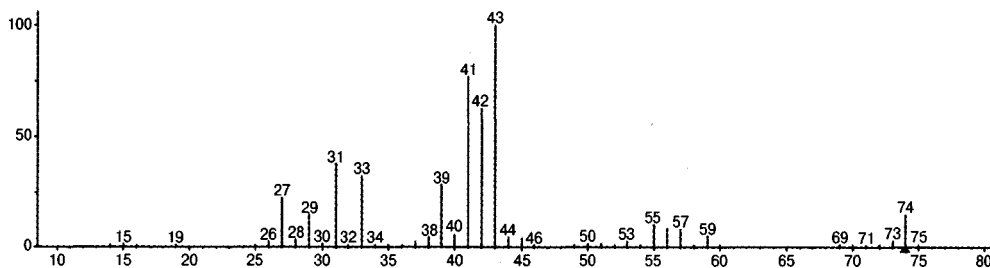


Рис. 10.39

Задача 10.31. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.40).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	25	27	220	28	32	29	150
30	13	31	376	33	317	37	21
38	45	39	280	40	51	41	770
42	620	43	1000	44	43	45	39
50	12	51	11	53	21	55	100
56	82	57	79	59	46	73	26
74	140	75	7				

Рис. 10.40

10.7. Простые эфиры и сульфиды

Электронная ионизация. Пики M^{+} простых эфиров, за исключением низших гомологов, имеют незначительную интенсивность, однако они все же стабильнее, чем M^{+} спиртов. Заряд и неспаренный электрон в электронно невозбужденном состоянии локализованы на атоме кислорода. Ионно-молекулярные реакции, как и в случае спиртов, ведут к образованию ионов MH^{+} . Для устранения этого эффекта необходимо понизить давление паров образца в источнике. В целом масс-спектры эфиров характеризуются теми же гомологическими сериями ионов, что и спектры спиртов: алкановой, алкеновой, спиртовой (рис. 10.41).

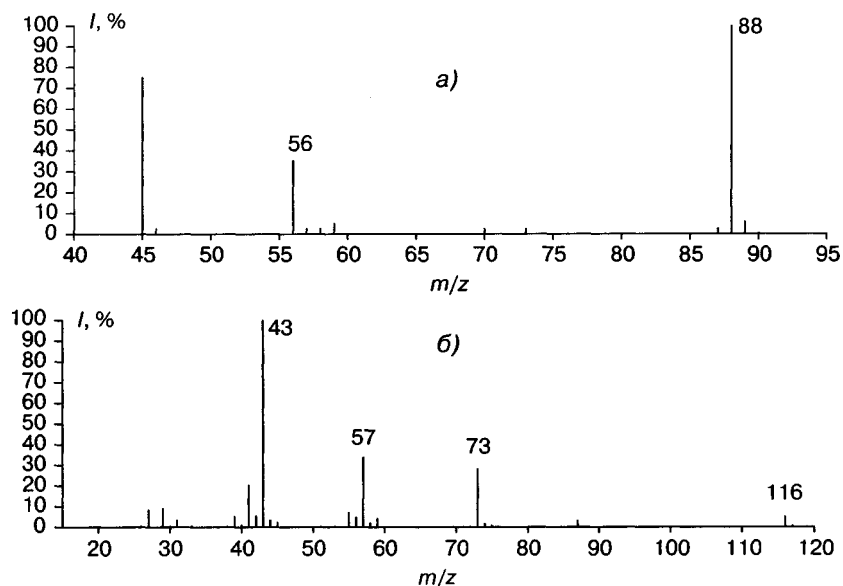


Рис. 10.41. Спектры ИЭ: изобутилметилового эфира (а), изобутилпропилового эфира (б)

На схеме 10.31 в качестве иллюстрации представлены основные направления фрагментации изобутилпропилового эфира. Первичные реакции инициируются радикальным центром (атом кислорода). В результате α -разрывов возникают ионы спиртовой серии, пики которых, как правило, весьма интенсивны. Положительный

заряд в M^{++} локализован на атоме кислорода, который достаточно сильно оттягивает на себя электроны обобществленных с атомами углерода пар. Это активизирует реакции, инициируемые зарядом, с образованием алкильных катионов. Эфиры с большими алкильными радикалами характеризуются интенсивными пиками нечетноэлектронных фрагментов серии $C_n H_{2n}^{++}$, которые образуются в результате элиминирования молекулы RON . Процесс миграции атома водорода в этой реакции неоднозначен, как и в случае отщепления молекулы воды в спиртах. Следует отметить, что молекула воды может отщепляться и молекулярными ионами простых эфиров (m/z 70 на рис. 10.41а), т.е. этот процесс не может служить критерием для отнесения неизвестного образца к спиртам или эфирам.

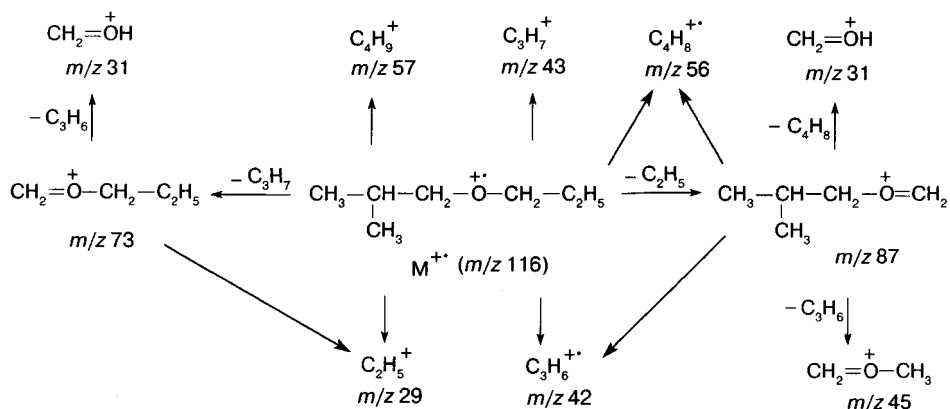


Схема 10.31

Вторичные перегруппировочные процессы (ионы с m/z 31 на схеме 10.31) инициированы зарядом и протекают в основном как 1,3-сигматропный сдвиг через четырехчленное переходное состояние с миграцией гидрид-иона, однако возможен и 1,5-сигматропный сдвиг через шестичленное переходное состояние (схема 10.32). В обоих случаях мигрирует к атому, несущему положительный заряд, гидрид-ион.

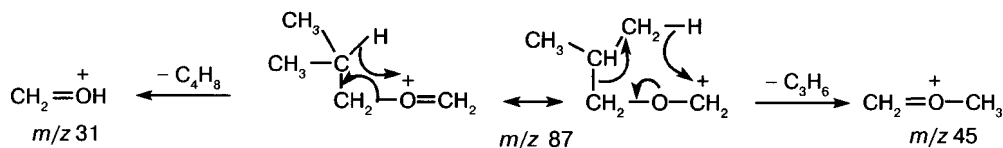


Схема 10.32

На рис. 10.42 представлен масс-спектр циклогексилэтилового эфира. Максимальную интенсивность имеет пик иона с m/z 85, образующегося по механизму, описанному для циклогексанола. Второй по интенсивности пик в спектре принадлежит иону с m/z 57, который образуется при элиминировании молекулы этилена ионом с m/z 85 (схема 10.33). Элиминирование из M^{++} молекулы алифатического спирта (ион с m/z 82 на рис. 10.42) аналогично отщеплению молекулы воды из M^{++} алициклических спиртов (схема 10.22).

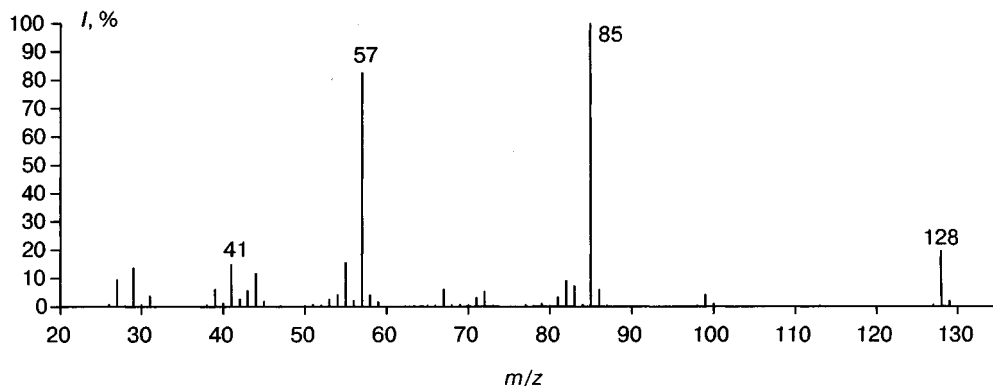


Рис. 10.42. Масс-спектр ИЭ циклогексилэтилового эфира

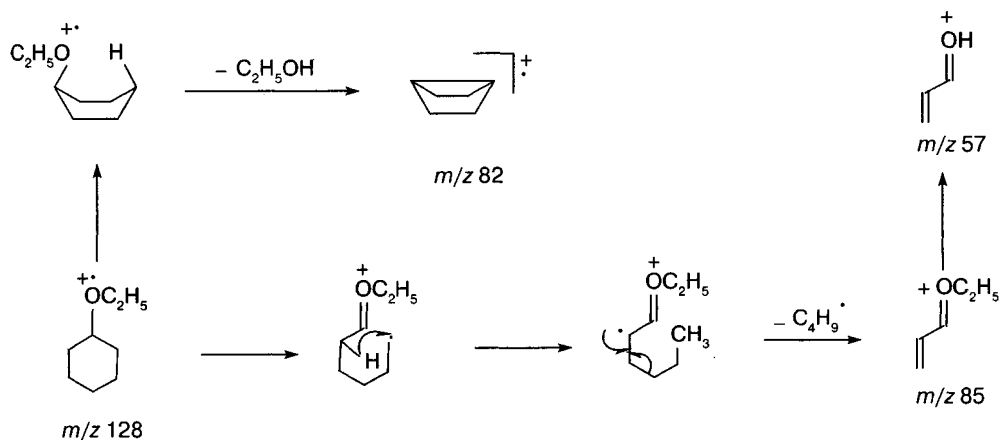


Схема 10.33

Арилалкиловые эфиры характеризуются очень интенсивными пиками молекулярных ионов. Для арилметильных эфиров активно идет отщепление молекулы формальдегида или последовательное отщепление метильной группы и молекулы CO (аналог «фенольного распада», представленного на схеме 10.23). Если в ароматическом ядре такого эфира присутствуют длинные алкильные заместители, то потере молекулы формальдегида предшествует бензильный разрыв (схема 10.10). Еще одной реакцией фрагментации $M^{+\cdot}$ алкилариловых эфиров является отщепление молекулы олефина (схема 10.34). Образующиеся молекулярные катион-радикалы фенолов характеризуются интенсивными пиками и очень полезны для установления принадлежности образца к изомерным алкилфенолам или фенилалкиловым эфирам. Для полиалкоксибензолов возможны последовательные процессы отщепления молекул олефинов согласно схеме 10.34.

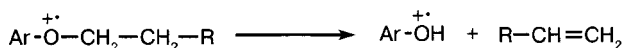


Схема 10.34

Дифениловый эфир распадается в условиях ИЭ с выбросами атома водорода, молекулы CO или радикала HCO[•]. Пик молекулярного иона максимален в спектре, причем фрагментации может предшествовать изомеризация (схема 10.35).

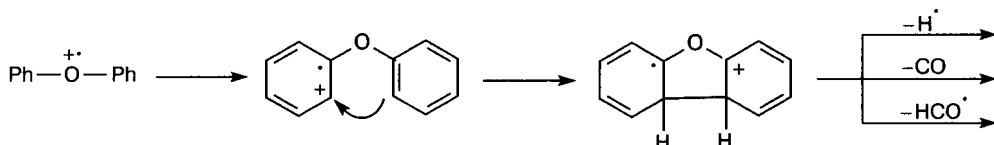


Схема 10.35

Ацетали и кетали имеют большую склонность к α -разрыву, так как в результате образуется резонансно стабилизированный ион (схема 10.36). Как следствие, M⁺ этих соединений нестабильны и в спектрах ИЭ часто не регистрируются. Тем не менее молекулярные массы этих соединений можно установить, поскольку наряду с пиками ионов [M-R¹]⁺ в спектрах наблюдаются также интенсивные пики ионов [M-OR]⁺ и [M-OR²]⁺.

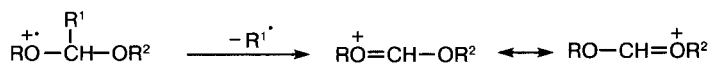


Схема 10.36

Диалкилсульфиды характеризуются интенсивным пиком молекулярного иона. Повышенная интенсивность пика M+2 является важным указанием на наличие в составе образца атома серы (разд. 4.2). Отсутствие пиков ионов [M-SH]⁺ и [M-H₂S]⁺ позволяет легко отличать сульфиды от изомерных тиолов.

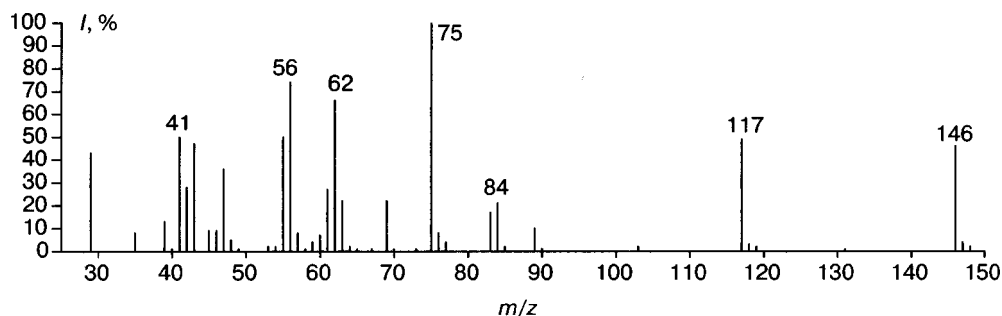


Рис. 10.43. Масс-спектр ИЭ гексилэтилсульфида

Основные процессы фрагментации, как и в случае простых эфиров, инициированы центром, несущим неспаренный электрон, и обусловлены выбросом алкильных радикалов с разрывом α - β C-C связи. Интенсивность образующихся фрагментных ионов определяется правилом выброса максимального алкила. В частности, при распаде M⁺ гексилэтилсульфида (рис. 10.43) пик иона [M-C₅H₁₁]⁺ максимален в спектре, тогда как пик альтернативного иона [M-CH₃]⁺ едва заметен.

Mass fragmentation scheme for ethyl propyl sulfide. The scheme shows the fragmentation of the molecular ion (m/z 146) into various ions. Key fragments include C₆H₁₃-S⁺ (m/z 117), C₆H₁₂⁺ (m/z 84), C₆H₁₁⁺ (m/z 83), C₆H₁₀⁺ (m/z 82), C₆H₉⁺ (m/z 81), C₆H₈⁺ (m/z 80), C₆H₇⁺ (m/z 79), C₆H₆⁺ (m/z 78), C₆H₅⁺ (m/z 77), C₆H₄⁺ (m/z 76), C₆H₃⁺ (m/z 75), C₆H₂⁺ (m/z 74), C₆H⁺ (m/z 73), C₅H₇⁺ (m/z 71), C₅H₆⁺ (m/z 70), C₅H₅⁺ (m/z 69), C₅H₄⁺ (m/z 68), C₅H₃⁺ (m/z 67), C₅H₂⁺ (m/z 66), C₅H⁺ (m/z 65), C₄H₇⁺ (m/z 63), C₄H₆⁺ (m/z 62), C₄H₅⁺ (m/z 61), C₄H₄⁺ (m/z 60), C₄H₃⁺ (m/z 59), C₄H₂⁺ (m/z 58), C₄H⁺ (m/z 57), C₃H₇⁺ (m/z 43), C₃H₆⁺ (m/z 42), C₃H₅⁺ (m/z 41), C₃H₄⁺ (m/z 40), C₃H₃⁺ (m/z 39), C₃H₂⁺ (m/z 38), C₃H⁺ (m/z 37), C₂H₅⁺ (m/z 29), C₂H₄⁺ (m/z 28), C₂H₃⁺ (m/z 27), C₂H₂⁺ (m/z 26), C₂H⁺ (m/z 25), CH₃⁺ (m/z 15), and CH₂⁺ (m/z 14). The scheme also shows the formation of the molecular ion (m/z 146) from the neutral molecule (C₆H₁₂S) and the fragmentation of the molecular ion into various ions.

Среди вторичных процессов фрагментации можно выделить перегруппировочный процесс в ионах, обусловленных α -распадом. Он протекает, как и в случае спиртов или эфиров, через четырех- или шестичленное переходное состояние и сопровождается элиминированием молекулы алкена.

Фрагментация сульфидов с алициклическим заместителем в целом аналогична описанной для родственных циклоалкилтиолов и алициклических простых эфиров. Фрагментация арилсульфидов (рис. 10.44) аналогична описанной выше для соответствующих простых эфиров. Спектры малолинейчатые и обусловлены α -разрывами (m/z 123) и перегруппировками Мак-Лафферти по алкильной цепи (m/z 110).

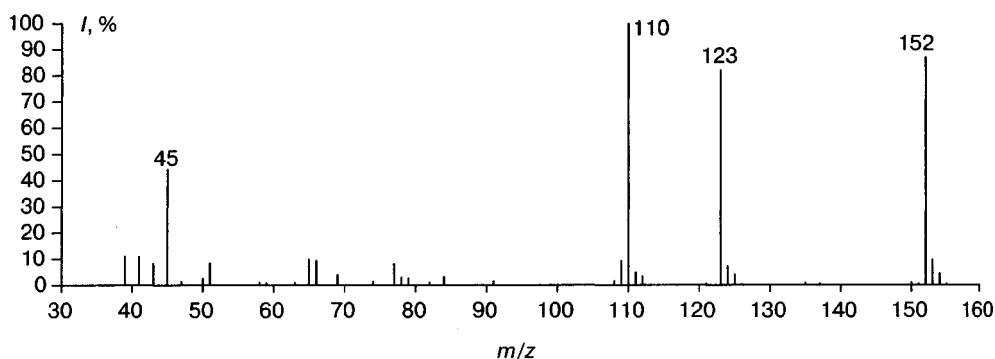


Рис. 10.44. Масс-спектр ИЭ фенилпропилсульфида

Химическая ионизация. В условиях химической ионизации протонирующими газами-реагентами в отличие от спиртов простые эфиры характеризуются максимальными по интенсивности пиками протонированных молекул MH^+ . Это позволяет однозначно определять молекулярные массы этих соединений. Среди фрагментных ионов можно выделить $[M-H]^+$, $RO=CH_2^+$, R^+ и $RONH_2^+$, которые могут образовываться как непосредственно во время процесса ионизации, так и в результате распада MH^+ или $[M-H]^+$. Химическая ионизация окисью азота приводит к образованию ионов $[M-H]^+$ в качестве единственного продукта.

В ионизационной камере масс-спектрометра в условиях химической ионизации может протекать перегруппировка Клайзена [843]. Этот процесс был детально изучен на большой серии аллилфениловых эфиров с применением tandemной масс-спектрометрии [844]. Было достаточно убедительно показано, что механизм (схема 10.38) перегруппировки в масс-спектрометре идентичен наблюдаемому в растворе при его иницировании трихлоридом бора [845] или трифторуксусной кислотой [846]. Аналогичная перегруппировка протекает и для пропаргилфениловых эфиров [844].

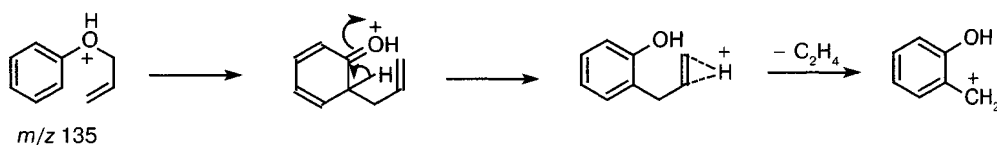


Схема 10.38

Химическая ионизация отрицательных ионов. В условиях химической ионизации отрицательных ионов характеристическим является разрыв $C-O$ связи (схема 10.39). Для диалкиловых эфиров этот процесс протекает столь интенсивно, что пики депротонированных молекул в спектрах не наблюдаются.



Схема 10.39

Для эфиров, содержащих двойную связь, характерно депротонирование по аллильному положению. Ионы $[M-H]^-$ претерпевают перегруппировку по механизму $E1_{cb}$ с образованием интермедиата (схема 10.40), который далее распадается до алколят-аниона [847].

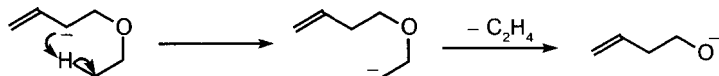


Схема 10.40

Для ряда депротонированных простых эфиров с ненасыщенными заместителями зарегистрированы перегруппировочные процессы, хорошо известные в классической органической химии. В частности, ион $[M-H]^-$ претерпевает перегруппировку Виттига по механизму 1,2- или 3,2-сигматропного сдвига [848], за которой следует перегруппировка Коупа [849] в окси-варианте (схема 10.41).

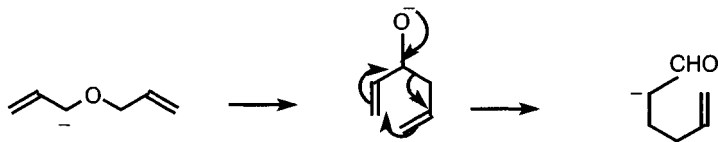


Схема 10.41

Перегруппировка Виттига характерна для депротонированных алкилбензильных эфиров (схема 10.42). Реакция идет через интермедиат, который может быть комплексом радикала с анион-радикалом или аниона с нейтральной молекулой [850].

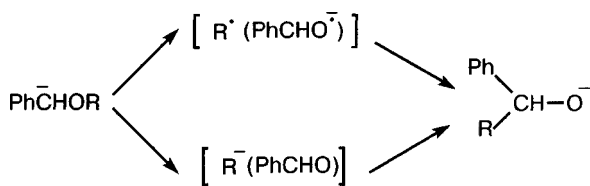


Схема 10.42

Задача 10.32. Оцените интенсивности пиков фрагментных ионов, образующихся по механизмам, инициированным центрами, несущими положительный заряд и неспаренный электрон, в случае перечисленных ниже соединений. Используйте материал этого раздела, а также материал и примеры, изложенные в разделе о правиле Стивенсона (разд. 3.1.2).

- А) метилэтиловый эфир;
- Б) изопропилэтиловый эфир;
- В) третбутилметилловый эфир;
- Г) диизопропиловый эфир;

- Д) бензилэтиловый эфир;
- Е) пропилфениловый эфир;
- Ж) аллилбутиловый эфир;
- З) аллилбензиловый эфир.

Задача 10.33. Объясните образование фрагментных ионов (m/z 123, 110, 109, 77, 65, 45), пики которых имеют значительную интенсивность в спектре ИЭ пропилфенилсульфида (рис. 10.44). Составьте схему фрагментации для этого соединения.

Задача 10.34. Какие различия будут наблюдаться в масс-спектрах ИЭ перечисленных ниже изомерных соединений?

- А) диэтилового эфира и метилпропилового эфира;
- Б) метилэтилового эфира и пропанола-1;
- В) изопропилметилового эфира и пропилметилового эфира;
- Г) пропилфенилового эфира и этилбензилового эфира;
- Д) третбутилэтилового эфира и неопентилметилового эфира;
- Е) *пара*-толилэтилового эфира и фенилпропилового эфира;
- Ж) фенилэтилового эфира и 4-этилфенола;
- З) гексилтиола-1 и дипропилсульфида.

Задача 10.35. Составьте схему фрагментации для *втор*-бутилпропилового эфира, спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.45.

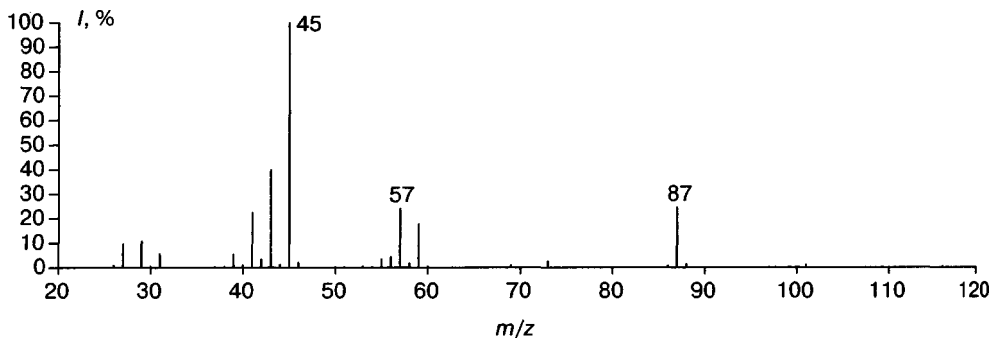
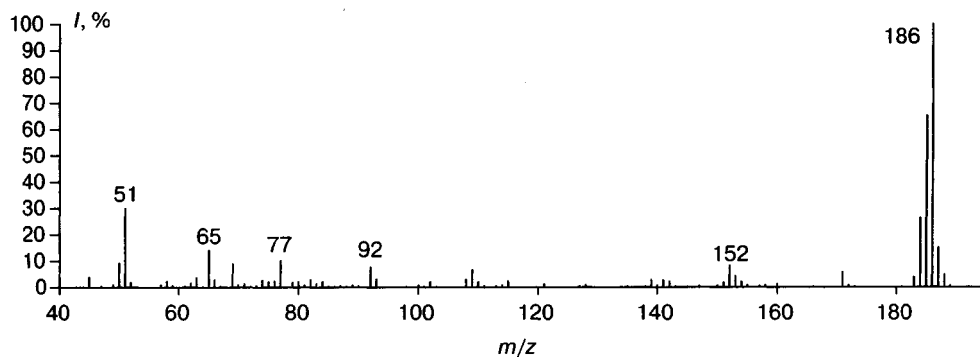


Рис. 10.45. Масс-спектр ИЭ *втор*-бутилпропилового эфира

Задача 10.36. Составьте предполагаемые схемы фрагментации в условиях ИЭ для перечисленных ниже соединений.

- А) диизопропиловый эфир;
- Б) бензилэтиловый эфир;
- В) вторбутилтретбутиловый эфир;
- Г) дибензиловый эфир;
- Д) метилгексиловый эфир.

Задача 10.37. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.46).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
45	3,80	74	2,66	102	1,99	153	4,26
50	9,16	75	2,02	108	2,87	154	2,06
51	29,8	76	2,20	109	6,53	160	1,19
52	1,73	77	10,0	110	1,90	171	5,70
58	2,20	79	1,75	115	2,26	183	3,70
62	1,46	80	2,01	121	1,16	184	26,1
63	3,68	82	2,85	139	2,69	185	65,1
65	13,9	83	1,30	141	2,64	186	100
66	2,81	84	2,04	142	2,17	187	15,8
69	8,92	92	7,56	151	1,70	188	4,69
71	1,18	93	3,09	152	8,13	189	0,61

Рис. 10.46

Задача 10.38. Составьте схему фрагментации для *трет*-бутилпропилового эфира, спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.47.

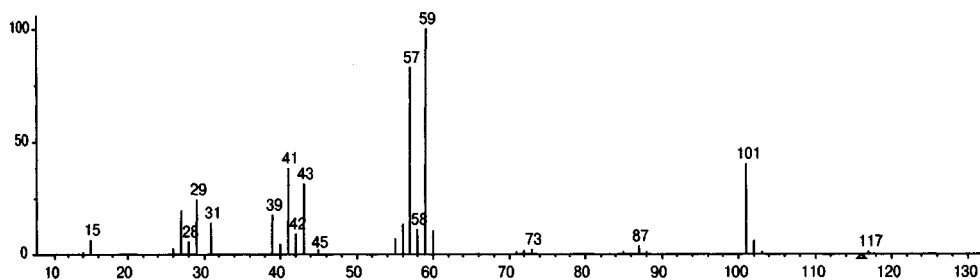


Рис. 10.47

Задача 10.39. На рис. 10.48 представлены спектры двух изомерных эфиров состава $C_6H_{14}O$. Определите строение каждого изомера.

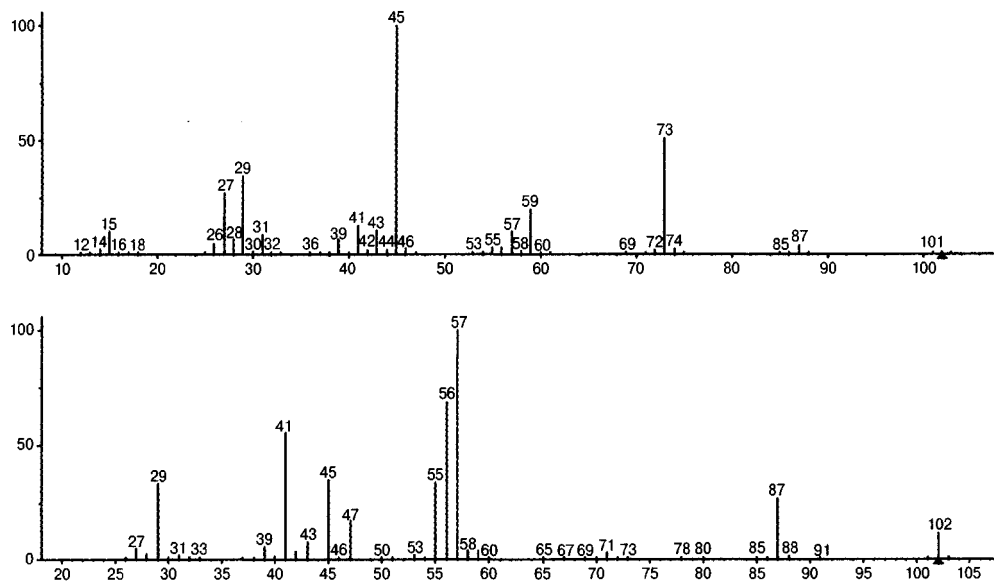
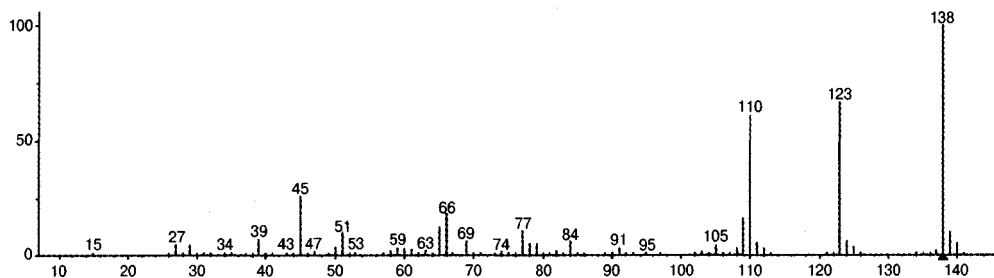


Рис. 10.48

Задача 10.40. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.49).



<i>m/z</i>	<i>I, %</i>	<i>m/z</i>	<i>I, %</i>	<i>m/z</i>	<i>I, %</i>	<i>m/z</i>	<i>I, %</i>
27	43	29	43	38	9	39	68
45	254	47	11	50	34	51	96
58	19	59	30	60	26	61	21
63	20	65	120	66	176	69	59
74	12	77	102	78	46	79	46
82	16	84	60	91	27	103	11
105	36	108	30	109	160	110	600
111	51	112	28	123	660	124	56
125	31	135	10	137	16	138	1000
139	97	140	48				

Рис. 10.49

10.8. Амины и фосфины

Электронная ионизация. Аминогруппа обладает более сильными электронодонорными свойствами по сравнению с гидроксильной. Положительный мезомерный эффект атома азота больше, а отрицательный индуктивный эффект меньше, чем у атома кислорода. Поэтому процессы фрагментации спиртов, прежде всего инициируемые радикальным центром, еще в большей степени характерны для аминов.

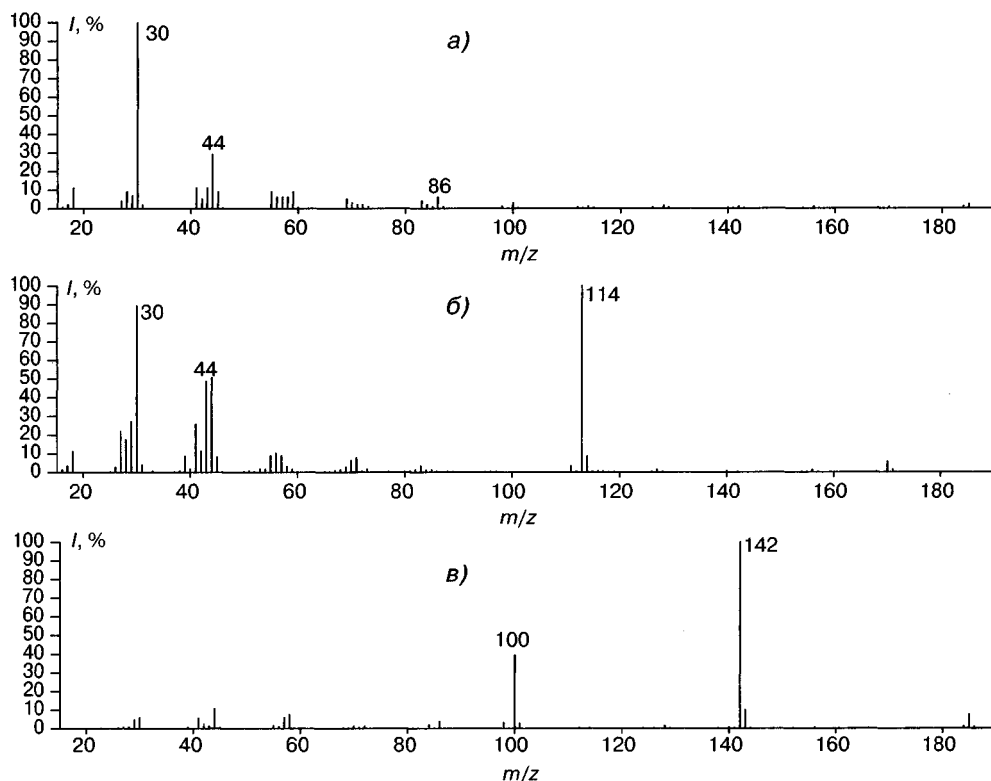


Рис. 10.50. Масс-спектры ИЭ: додециламина (а), дигексиламина (б), трибутиламина (в)

На рис. 10.50 представлены масс-спектры ИЭ изомерных аминов. Амины обладают низкой энергией ионизации (9,4 эВ для этиламина). В электронно-невозбужденном состоянии заряд и неспаренный электрон локализованы на атоме азота. К сожалению, интенсивность пиков молекулярных ионов аминов очень низка из-за высокой интенсивности процессов фрагментации. Тем не менее азотное правило (разд. 4.2.1) позволяет безошибочно установить принадлежность вещества к классу аминов.

Склонность аминогруппы к ионизации и инициированию распада хорошо видна на примере этаноламина (схема 10.43). ЭИ фрагмента CH_2NH_2 6,2 эВ, а фрагмента CH_2OH 7,6 эВ (табл. 3.2). В результате интенсивность пика иона CH_2NH_2^+ в спектре составляет 100%, а альтернативного иона $\text{CH}_2\text{OH}^+ - 2,3\%$. В отличие от спиртов, в спектрах которых пики ионов $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^{++}$ могут быть весьма интенсивными, ионы $[\text{M}-\text{NH}_3]^{++}$ не образуются.

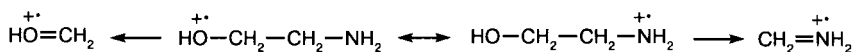


Схема 10.43

Повышенное давление паров образца в ионном источнике приводит, как и в случае спиртов, к появлению ионов MH^+ . Эти ионы имеют четную массу и маскируют наличие атома азота в молекуле. Подавить этот процесс можно варьированием напуска образца. Основные фрагментные ионы обусловлены α -разрывами и последующими перегруппировочными процессами с отщеплением молекул олефинов. Эти реакции аналогичны описанным ранее для спиртов и простых эфиров (разд. 10.6, 10.7) и приводят к характеристической серии «аминных» ионов (m/z 30, 44, 58, 72...). Для первичных аминов в спектре доминирует пик иона CH_2NH_2^+ с m/z 30 (рис. 10.50а). С увеличением длины углеводородного радикала возрастает доля β , γ , δ ... разрывов, которая уменьшается с удалением от аминогруппы, однако в спектрах неразветвленных первичных аминов пик иона с m/z 86 имеет повышенную интенсивность (рис. 10.50а). Он образуется в результате реакции, представленной на схеме 10.44. Любые разветвления резко тормозят этот процесс. Следует отметить, что в отличие от тиолов и алкилгалогенидов образуется именно шестичленный цикл. Правда, в случае аминов этот процесс выражен менее ярко.

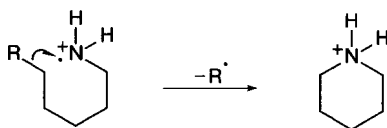


Схема 10.44

Первичные ионы $[\text{M}-\text{Alk}]^+$ теряют молекулу олефина с миграцией гидрид-иона к центру, несущему заряд. Обычно водород мигрирует через четырехчленное переходное состояние, но возможно и шестичленное. Заряд сохраняется на атоме азота во всех этих последовательных процессах. На схеме 10.45 эти процессы представлены для случая дигексиламина (рис. 10.50б).

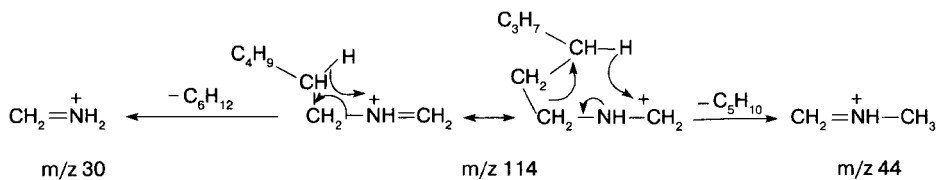


Схема 10.45

Фрагментация циклоалкиламинов обусловлена теми же движущими силами, что и алкиламинов. На рис. 10.51 представлен масс-спектр циклогексилэтиламина. Первой стадией трансформации молекулярного иона является разрыв связей алицикла, инициированный радикальным центром. Именно в результате этого процесса образуются фрагментные ионы, характеризующиеся наиболее интенсивными пиками в спектре.

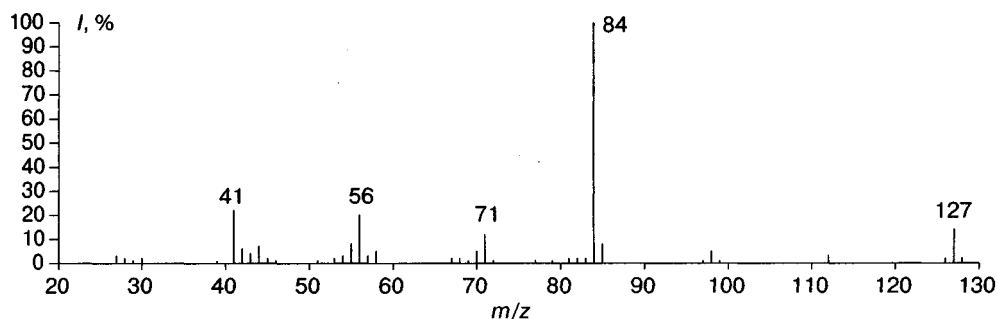


Рис. 10.51. Масс-спектр ИЭ циклогексилэтиламина

На схеме 10.46 представлены основные направления фрагментации $M^{+\cdot}$ циклогексилэтиламина. Схема не претендует на всю полноту описания процессов, но дает представление об основных из них, характерных для циклоалкиламинов. Практически аналогично фрагментируют и производные цикlopentана [40].

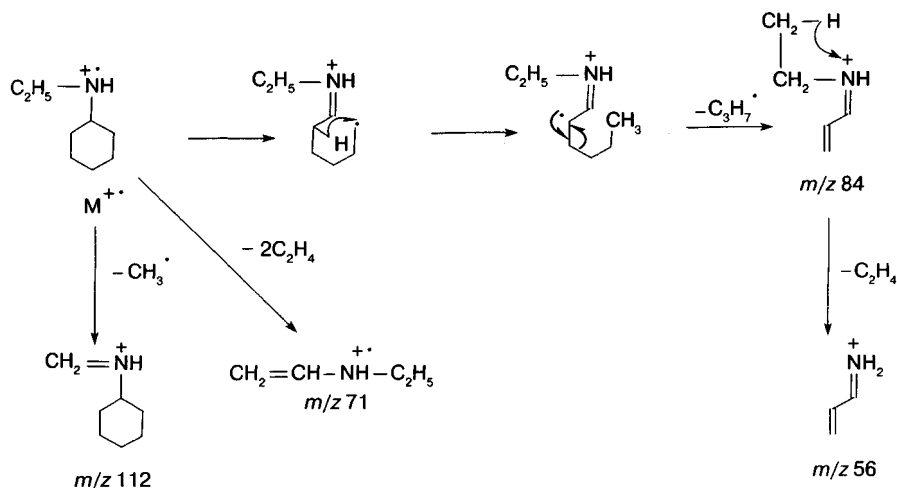


Схема 10.46

Фрагментный ион с m/z 84 на рис. 10.51 (m/z 56 для незамещенного циклогексиламина) аналогичен иону с m/z 57, образующемуся при распаде алициклических спиртов. Его масса позволяет делать выводы о наличии алкильных заместителей в различных положениях циклогексанового кольца. Для 2-алкилзамещенных из двух альтернативных пиков с массами 56 и 55+R для незамещенных по атому азота алкилциклогексиламинов более интенсивным будет первый, для 3-алкилзамещенных — второй. Для 4-алкилзамещенных заместитель отщепляется в любом случае, и в спектре незамещенных по атому азота алкилциклогексиламинов присутствует только ион с m/z 56. Фрагментный ион с m/z 71 может образоваться при разрыве циклогексанового кольца с одновременным отщеплением двух молекул этилена (схема 10.46). Для 1-алкилциклогексиламинов интенсивный пик часто обусловлен ионом, образующимся при отщеплении заместителя.

Анилины характеризуются максимальным в спектре пиком молекулярного иона. Достаточно высокую интенсивность имеет пик иона $[M-H]^+$ с азатропилиевой структурой. Основной процесс фрагментации связан с последовательным элиминированием из $M^{+\cdot}$ молекулы HNC и атома водорода, что аналогично потере молекулы CO и атома водорода из $M^{+\cdot}$ фенолов, т.е. по крайней мере часть молекулярных ионов анилина существует в иминоформе (схема 10.47).

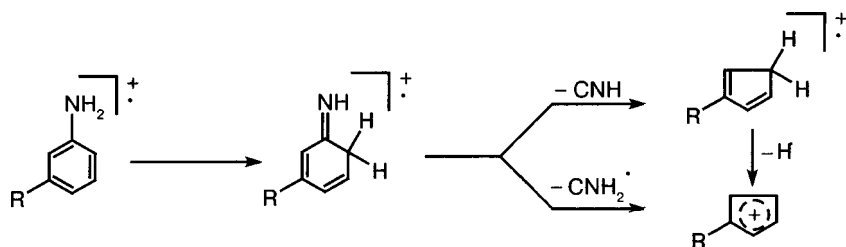


Схема 10.47

Для алкилзамещенных анилинов основное направление фрагментации — отщепление алкильного радикала (бензильный разрыв) с образованием бензильного (аминотропилиевого) катиона (рис. 10.52), который далее последовательно элиминировывает молекулы HNC и H_2 . Для алкилариламинов доминирует α -распад с разрывом алифатической C—C связи.

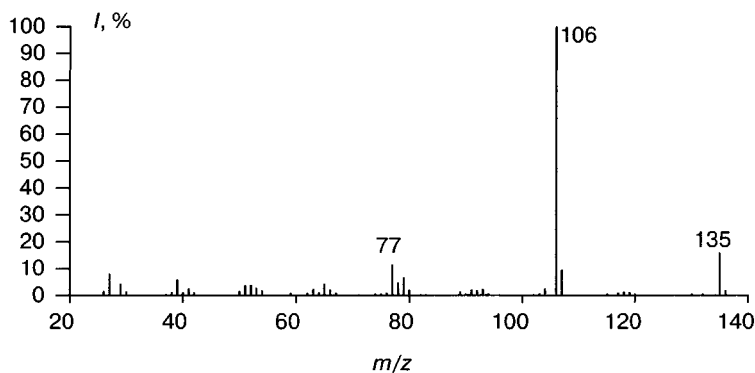


Рис. 10.52. Масс-спектр ИЭ 4-пропиланилина

Ион $[M-3]^+$ образуется из молекулярных ионов диариламинов аналогично тому, как это было описано выше для случая дифенилметана, и, вероятно, имеет структуру карбазолилкатиона (схема 10.48).

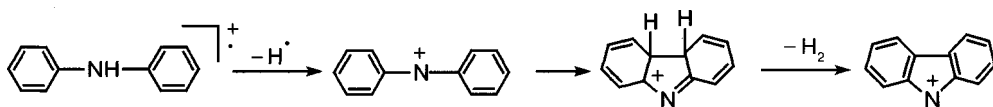


Схема 10.48

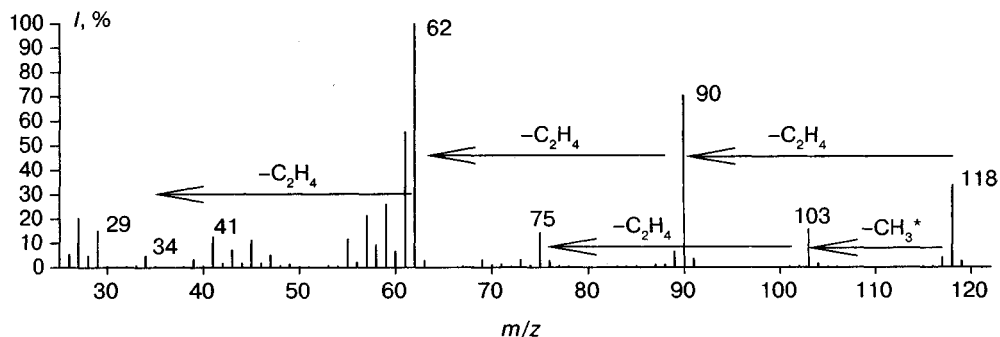


Рис. 10.53. Масс-спектр ИЭ триэтилфосфина

Для фосфинов характерны те же направления фрагментации, что и для аминов. Однако более активно протекают процессы, инициируемые центром, несущим заряд. В частности, помимо α -разрывов C—C связей, активно идут перегруппировочные процессы с отщеплением молекулы олефина и миграцией атома водорода к фосфору. Ионы с m/z 90 и 62 при распаде триэтилфосфина (рис. 10.53) принадлежат диэтилфосфину и моноэтилфосфину соответственно.

Достаточно интенсивные пики в спектрах алкилфосфинов могут принадлежать ионам, образующимся в результате β -разрывов (схема 10.49).

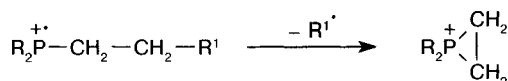


Схема 10.49

Следует подчеркнуть, что в отличие от аминов α -разрывы становятся менее благоприятны для фосфинов и соответствующих соединений других элементов V группы. Причина кроется в более высоком энергетическом барьере трансформации атомов этих элементов из тетрагональной в тригональную форму. Например, разница между энергией ионизации молекулы $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Э}$ и энергией появления иона $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Э}=\text{CH}_2^+$ (где Э — N или P) для фосфина на 1,17 эВ больше, чем для амина.

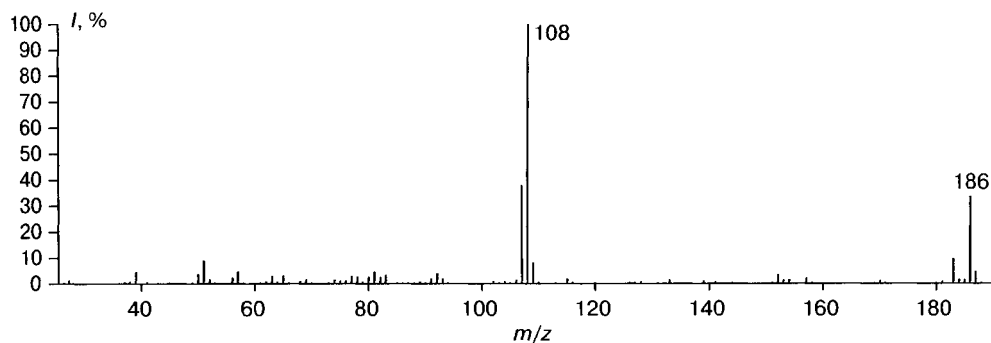


Рис. 10.54. Масс-спектр ИЭ дифенилфосфина

Дифенилфосфин (рис. 10.54) характеризуется интенсивным пиком молекулярного иона. Ион $[M-3]^+$ образуется по механизму, изложенному для случая дифенилметана и дифениламина. Максимальный пик в спектре (m/z 108) обусловлен отщеплением молекулы бензола из M^{++} .

Химическая ионизация. Амины легко протонируются в газовой фазе. В спектрах химической ионизации водородом, метаном и изобутаном пики протонированных аминов MH^+ имеют максимальную или близкую к ней интенсивность. Два других важных характеристических фрагментных иона — $[M-H]^+$ и $[M-R]^+$. Последнему приписывается иминиевая структура, т.е. структура основных первичных фрагментов, образующихся в условиях ИЭ. Расчеты показывают, что наиболее вероятным механизмом образования ионов этого типа является отрыв карбаниона в процессе ионизации. Альтернативный процесс отщепления молекулы алкана из MH^+ менее вероятен, поскольку характеризуется высоким энергетическим барьером [851]. Потеря молекулы NH_3 из MH^+ значительно менее выгодна, чем отщепление молекулы H_2O из MH^+ спиртов (разд. 3.1.3).

Химическая ионизация отрицательных ионов. Два основных направления фрагментации депротонированных аминов связаны с элиминированием молекулы водорода или молекулы алкана (схема 10.50). Последний процесс может привести к альтернативному образованию карбаниона [852]. Представленные на схеме направления распада подтверждены спектрами изотопных аналогов. В спектрах активации соударениями интенсивности пиков ионов, образующихся при отщеплении молекул водорода и алкана, примерно равны.

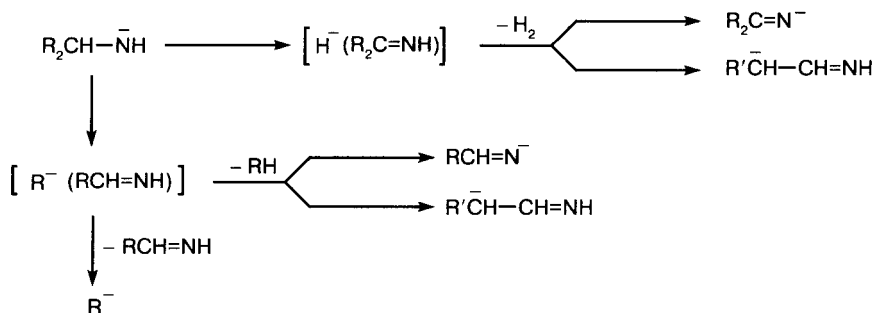


Схема 10.50

Депротонированный анилин фрагментирует аналогично фенолят-аниону с отщеплением молекулы HNC и образованием цикlopentadiенил-аниона. Перегруппировка Стивенса (схема 10.51), которая может считаться азотным аналогом перегруппировки Виттига, изучена в масс-спектрометре на примере трансформации бензилдифениламина в бензгидриланилин [853]. Перегруппировка является доминирующим направлением реакции, о чем свидетельствуют высокие выходы продуктов как в растворах при действии бутиллития [854], так и в условиях химической ионизации отрицательных ионов [855]. Для доказательства механизма протекания этого процесса использовали изотопные аналоги и tandemную масс-спектрометрию, однако установить, идет этот процесс согласованно или поэтапно, пока не удалось.

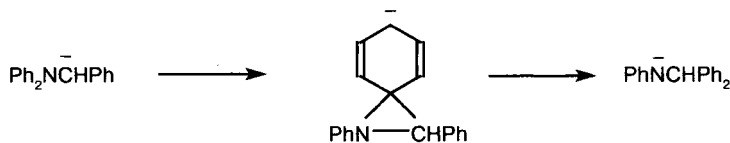


Схема 10.51

Задача 10.41. Какие первичные ионы образуются при фрагментации в условиях ИЭ перечисленных ниже соединений. Оцените относительные интенсивности их пиков?

- А) бутилпропилэтиламин;
- Б) диметилэтиламин;
- В) *трет*-бутил-*изо*-пропиламин;
- Г) *трет*-бутил-*изо*-пропилэтиламин;
- Д) *втор*-бутилпропилэтиламин;
- Е) *изо*-бутил-*втор*-бутил-*трет*-бутиламин.

Задача 10.42. Для соединений, перечисленных в задаче 10.41, приведите схему образования вторичных перегруппировочных фрагментных ионов аминной серии, которые могут образоваться при распаде максимального первичного фрагментного иона.

Задача 10.43. Составьте схему фрагментации в условиях ИЭ бутилизопропиламина, спектр которого представлен на рис. 10.55.

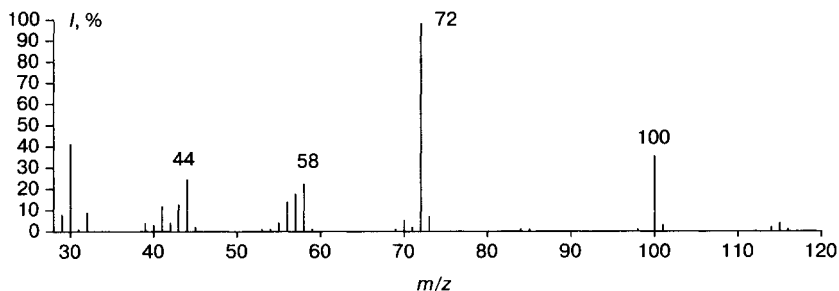


Рис. 10.55. Масс-спектр ИЭ бутилизопропиламина

Задача 10.44. Составьте схему фрагментации в условиях ИЭ метилдиизопропиламина, спектр которого представлен на рис. 10.56.

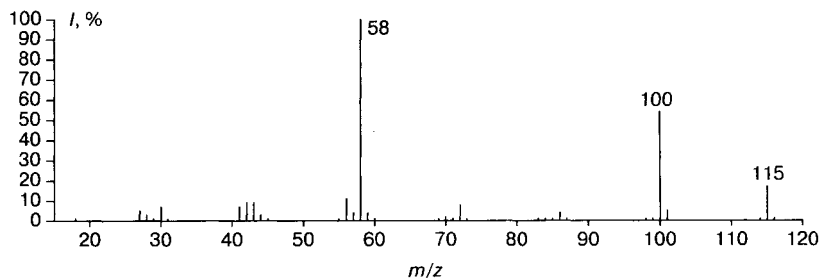


Рис. 10.56. Масс-спектр ИЭ метилдиизопропиламина

Задача 10.45. Составьте схему фрагментации триэтилфосфина, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.53.

Задача 10.46. Составьте предполагаемые схемы фрагментации в условиях ИЭ для перечисленных ниже соединений.

- А) диэтиламин;
- Б) триэтиламин;
- В) бутилдиэтиламин;
- Г) пропилдиэтиламин;
- Д) диизопропиламин.

Задача 10.47. Идентифицируйте вторичный амин по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.57.

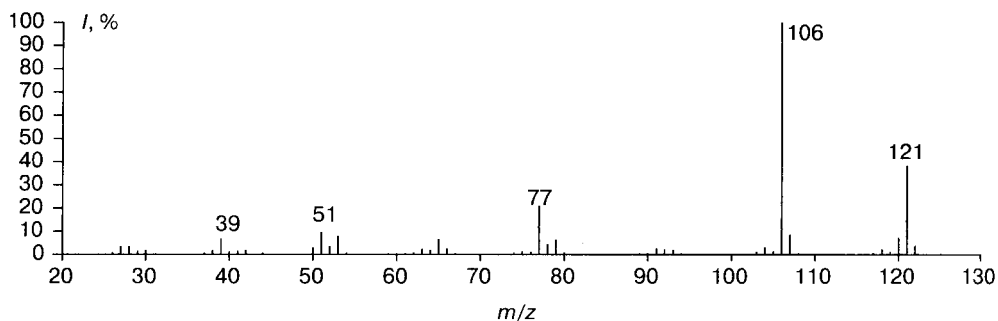
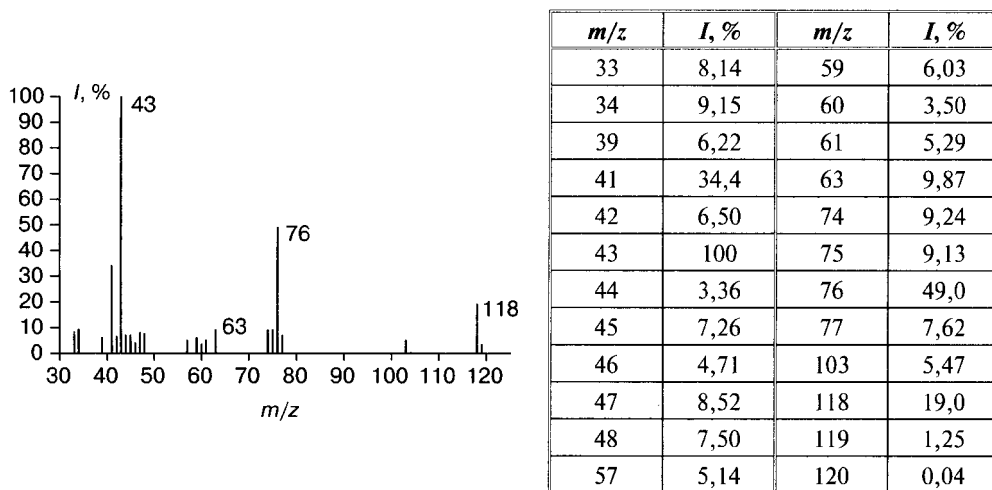


Рис. 10.57

Задача 10.48. Идентифицируйте соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.58.



<i>m/z</i>	<i>I</i> , %	<i>m/z</i>	<i>I</i> , %
33	8,14	59	6,03
34	9,15	60	3,50
39	6,22	61	5,29
41	34,4	63	9,87
42	6,50	74	9,24
43	100	75	9,13
44	3,36	76	49,0
45	7,26	77	7,62
46	4,71	103	5,47
47	8,52	118	19,0
48	7,50	119	1,25
57	5,14	120	0,04

Рис. 10.58

Задача 10.49. Как можно различить перечисленные ниже изомерные соединения по их спектрам ИЭ?

- А) метилэтиламин, пропиламин и изопропиламин;
- Б) дибутиламин и *втор*-бутилбутиламин;
- В) дипентиламин и изопентилпентиламин;
- Г) дипропиламин и диизопропиламин;
- Д) 1-метилциклопентиламин и 2-метилциклопентиламин;
- Е) циклогексиламин и 2-метилциклопентиламин;
- Ж) циклогексиламин и N-метилциклопентиламин;
- З) 2-, 3- и 4-этилциклогексиламины;

Задача 10.50. Составьте схему фрагментации дипропилбутиламина.

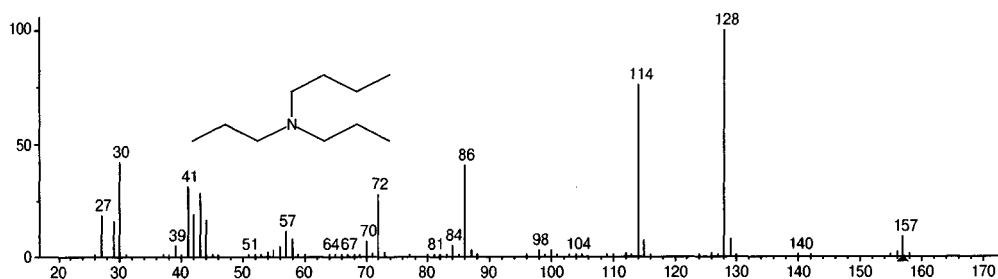


Рис. 10.59. Масс-спектр ИЭ дипропилбутиламина

Задача 10.51. Составьте схему фрагментации этилпропилбутиламина.

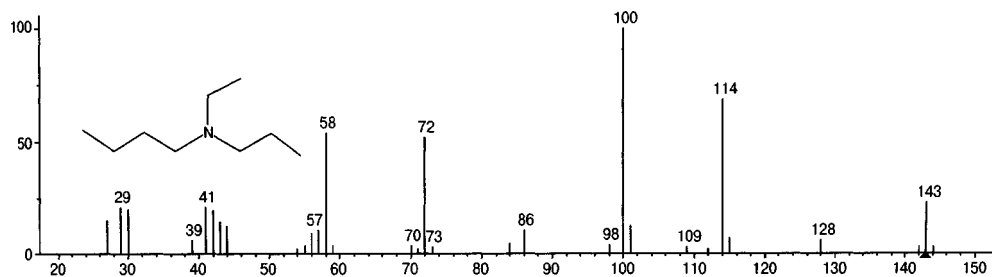


Рис. 10.60. Масс-спектр ИЭ этилпропилбутиламина

Задача 10.52. Составьте схему фрагментации диизопропилпропилфосфина.

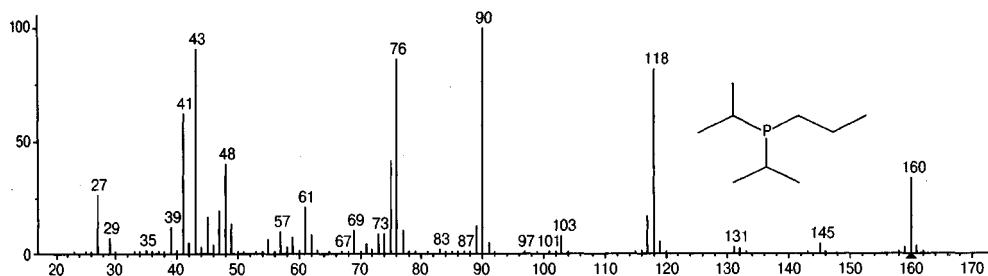


Рис. 10.61

Задача 10.53. На рис. 10.62 представлены спектры двух изомерных алкиланилинов. Идентифицируйте эти соединения.

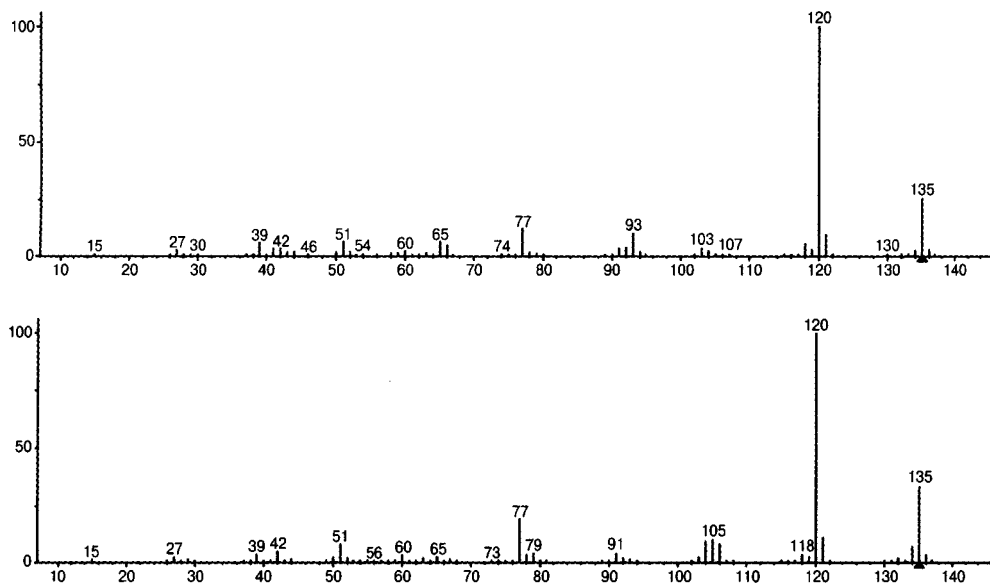


Рис. 10.62

10.9. Алкилгалогениды, арилгалогениды

Электронная ионизация. Молекулы алкилгалогенидов наиболее легко теряют один из электронов неподеленных пар гетероатома. Энергии ионизации невысоки, а заряд и неспаренный электрон в электронно-невозбужденном состоянии $M^{+\bullet}$ локализованы на атоме галогена. Однако эти атомы не склонны к удерживанию заряда. Поэтому интенсивность пика молекулярного иона невысока, а пики фрагментов, содержащих атом галоида, также малоинтенсивны. Сравнивая производные фтора, хлора, брома и иода, можно отметить, что интенсивность пика $M^{+\bullet}$ возрастает при уменьшении электроотрицательности гетероатома (рис. 10.63).

Для фторидов характерна гомологическая серия ионов с m/z 33, 47, 61, 75 и т.д.; для хлоридов (по ^{35}Cl) – серия ионов с m/z 49, 63, 77, 91 и т.д.; для бромидов (по ^{79}Br) – серия ионов с m/z 93, 107, 121, 135 и т.д.; для иодидов – серия ионов с m/z 141, 155, 169 и т.д. В случае хлора и брома, естественно, наблюдается еще одна серия ионов с массами на две единицы больше за счет изотопов ^{37}Cl и ^{81}Br . Кстати, наличие изотопов позволяет очень просто детектировать присутствие в молекуле атомов хлора и брома, а также устанавливать их количество (разд. 4.2). Присутствие иода также легко обнаружить благодаря большой атомной массе и тому факту, что иод имеет всего один природный изотоп. Интенсивности пиков ионов характеристических серий могут быть как весьма высоки (рис. 10.63б, в), так и крайне низки.

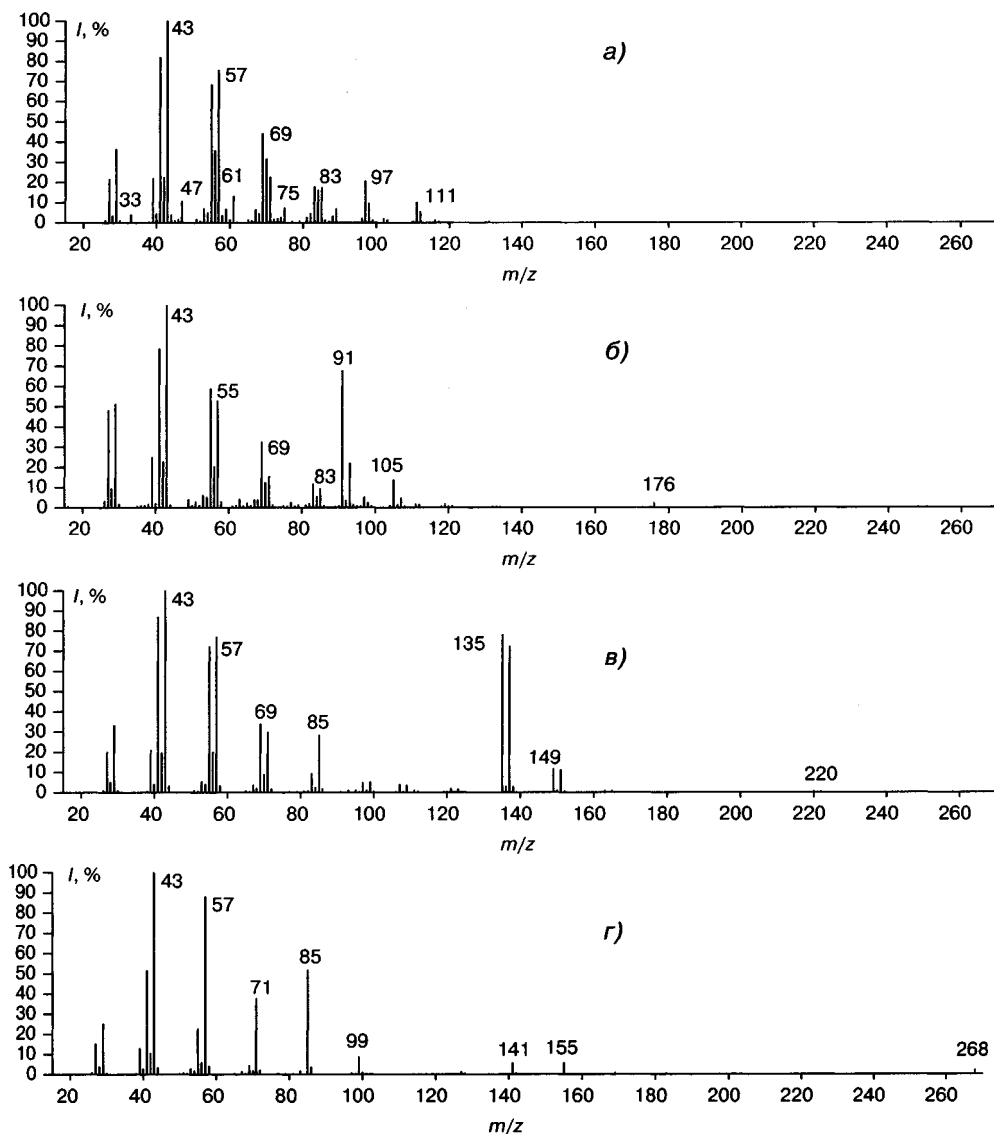


Рис. 10.63. Масс-спектры ИЭ: 1-фтордекана (а), 1-хлордекана (б), 1-бромдекана (в), 1-йоддекана (г)

Для алкилхлоридов и алкилбромидов характерна еще одна особенность. В ряду пиков гомологической серии аномально высокую интенсивность имеют пики ионов $C_4H_8Cl^+$ и $C_4H_8Br^+$. Они образуются по механизму внутримолекулярной циклизации (схема 10.52), описанному выше для алкилтиолов и алкиламинов. Образуются именно пятичленные циклы [856]. Разветвления в углеродной цепи подавляют этот процесс. Для фтора и иода он вообще не характерен (рис. 10.63а, д).

Поскольку положительный заряд лучше стабилизируется «мягкими» атомами, можно было бы предположить большую склонность иода к локализации заряда во

фрагментных ионах. Для ионов Hal^+ это именно так. В спектрах многих иодпроизводных интенсивности пиков ионов I^+ и HI^{++} очень высоки. Они могут быть максимальными в спектре. Однако для ионов $\text{CH}_2=\text{Hal}^+$ наблюдается обратная последовательность. Объяснить этот факт можно более значительным мезомерным эффектом атома фтора, электроны которого расположены на той же $2p$ -орбитали, что и электроны углерода. Увеличение радиуса атома галогена уменьшает возможность подачи электронов для стабилизации заряда. В результате интенсивность пика ионов $\text{CH}_2=\text{Hal}^+$ уменьшается.

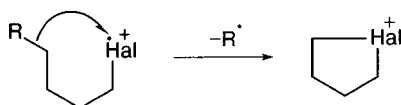


Схема 10.52

Для иодидов, бромидов, а также третичных и реже вторичных хлоридов характерна реакция элиминирования из M^{++} атома галогена. В условиях ионизации электронами может протекать и гетероциклический разрыв связи в нейтральной молекуле (схема 10.53). Молекулярные ионы фторидов и первичных хлоридов отщепляют галоген в виде HHal , причем атом водорода мигрирует из положения 2 или 4 исходной молекулы (четырёх- или шестичленное переходное состояние).

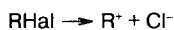


Схема 10.53

Бензилгалогениды теряют в условиях ИЭ атом галогена с образованием устойчивого углеводородного иона, вероятно, тропилиевой структуры, пик которого, как правило, максимален в спектре. Выброс атома галогена оказывается более предпочтительным, чем альтернативный выброс метильной группы в аналогичном положении. Например, в спектре 2,4,6-триизопропилбензилхлорида [857] интенсивность пика иона $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ в 5 раз выше интенсивности пика иона $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$.

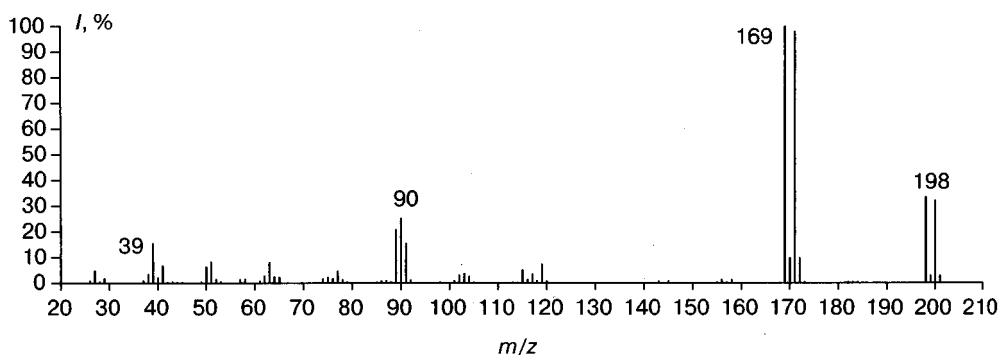
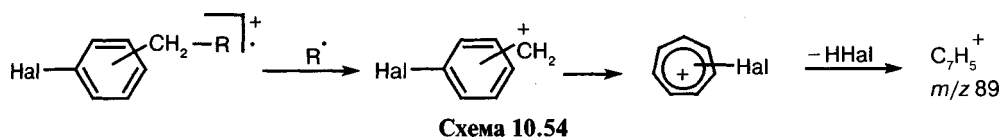


Рис. 10.64. Масс-спектр ИЭ 4-бром-1-пропилбензола

Атомы галогена (за исключением фтора) легко отщепляются из $M^{+\cdot}$ ароматических галогенпроизводных. Интенсивность пика соответствующего иона может быть очень высока, вероятно, в результате трансформации в более устойчивую структуру. Определить положение атома галогена в ароматическом ядре практически невозможно. Выше уже упоминалось, что спектры ИЭ *орто*-, *мета*-, *пара*-бромтолуолов и бензилбромид почти неразличимы ни по массовым числам ионов, ни по интенсивностям их пиков.

Бензильный разрыв предпочтителен для алкилзамещенных арилгалогенидов. Еще одной особенностью этой группы соединений является элиминирование молекулы $HNaI$ первичным ионом $[M-R]^+$ замещенной тропиливой структуры с образованием иона с m/z 89 (рис. 10.64, схема 10.54).



Следует отметить также характерный выброс группы CF_2 в случае трифторметильных производных ароматических углеводородов. Пик образующегося фторароматического производного может быть весьма интенсивен в спектре. Обратите внимание на пик иона с m/z 96 в спектре трифторметилбензола на рис. 10.65.

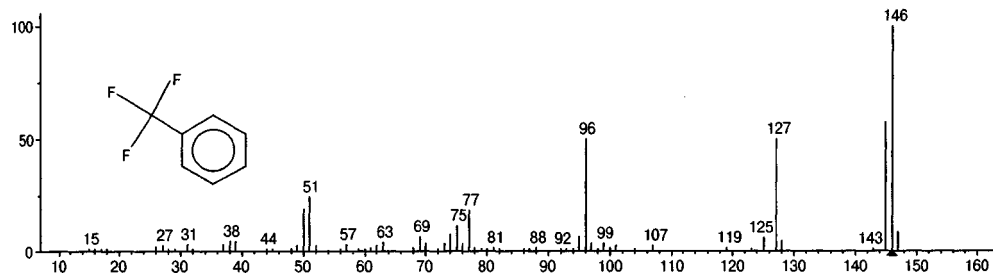


Рис. 10.65. Спектр ИЭ трифторметилбензола

Химическая ионизация. Протонированные алкилгалогениды, циклоалкилгалогениды и бензилгалогениды неустойчивы и легко теряют молекулу $HNaI$, причем интенсивность последующего распада углеводородного фрагмента зависит прежде всего от энергетики реакции протонирования (разд. 5.3). Максимальный, а иногда и единственный, пик в спектре принадлежит иону $[MH-HX]^+$ [858].

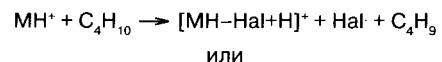
Арилгалогениды, напротив, характеризуются интенсивным пиком MH^+ . Исключением является иодбензол, для которого характерен ион $M^{+\cdot}$ (ХИ водородом). Ионы MH^+ распадаются с выбросом атома галогена или молекулы галогеноводорода. Зависимость выгодности одной или другой реакции от природы галогена полностью совпадает с описанной для случая ИЭ. Кстати, образование нечетноэлектронного иона при выбросе атома галогена весьма нетипично для масс-спектрометрического распада в целом (разд. 3.1.3), а для химической ионизации в особенности. Фенил-

катион, образовавшийся при отщеплении молекулы HNaI , далее присоединяет молекулу водорода (газ-реагент) с образованием протонированного бензола [859].

Ион C_6H_7^+ образуется также в условиях ХИ водородом полигалогенпроизводных. В этом случае идут последовательные реакции элиминирования молекул HNaI и присоединения молекулы водорода [860]. На основании интенсивности пика этого иона можно делать важные структурные выводы, различать изомеры. В частности, его интенсивность очень высока в спектре 2-хлорбифенила, умеренно высока в спектре 4-хлорбифенила и крайне низка в спектре 3-хлорбифенила. Аналогичные наблюдения сделаны и относительно дихлорбифенилов [861].

В условиях химической ионизации метаном интенсивность процессов фрагментации ниже, поскольку величина сродства к протону метана выше, чем водорода (разд. 5.2). В спектрах арилгалогенидов, помимо максимальных по интенсивности пиков MH^+ , присутствуют достаточно интенсивные пики ионов $[\text{M} + \text{C}_2\text{H}_5]^+$ и $[\text{M} + \text{C}_3\text{H}_5]^+$. Фенилкатион, образующийся при отщеплении молекулы HNaI , реагирует с молекулой газа-реагента (метан) с образованием иона $[\text{MH} - \text{HNaI} + \text{CH}_4]^+$, интенсивность пика которого может быть достаточно высока [859, 862].

Процесс образования ионов $[\text{MH} - \text{HNaI} + \text{H}_2]^+$ наблюдается и в условиях ХИ арилгалогенидов изобутаном. Пики этих ионов имеют значительную интенсивность даже в спектрах достаточно сложных галогенпроизводных, например N-галогенфенилсульфонилазетидин-3-онов [863] и N-галогенфенилсульфонилпирролидин-3-онов [864]. В данном случае, реакцию его образования можно представить как замещение атома галогена атомом водорода в протонированной молекуле (схема 10.55).



или

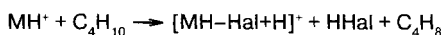


Схема 10.55

Достаточное внимание было уделено ХИ полигалоген-производных, многие из которых являются приоритетными загрязняющими веществами. Неароматические полихлорированные соединения в условиях ХИ метаном характеризуются очень низкой интенсивностью пика MH^+ [865]. Максимальную массу и интенсивность пиков имеют ионы $[\text{MH} - \text{HCl}]^+$ и $[\text{MH} - 2\text{HCl}]^+$. Аналогичная ситуация наблюдается и в случае ароматических производных, содержащих массивные алифатические заместители.

Для полихлорированных бензолов, бифенилов и полициклических ароматических соединений ион MH^+ характеризуется максимальным по интенсивности пиком в спектре [861, 866, 867]. Однако следует отметить, что ХИ не дает дополнительных преимуществ по сравнению с ИЭ ни для качественного, ни для количественного определения этих соединений.

Изомерные гексахлорбифенилы различимы с использованием тандемной масс-спектрометрии, если во втором квадруполе осуществить взаимодействие M^{++} этих соединений с аммиаком [868]. Интенсивности пиков ионов $[\text{M} + \text{NH}_3 - \text{HCl}]^+$ значительно разнятся от изомера к изомеру.

Много внимания уделяется количественному определению полихлорированных дибензодиоксинов и дибензофуранов. Будучи суперэкоотоксикантами, эти соединения опасны для окружающей среды, присутствуя в водоемах даже в концентрации ниже 10^{-13} г/л. Безусловно, разработка чувствительных методов их селективного определения очень важна. Различные подходы к определению этих соединений представлены в работах [34, 614, 869–876], причем для их надежного количественного определения требуется масс-спектрометрия высокого разрешения.

Химическая ионизация отрицательных ионов. Взаимодействие алкилгалогенидов с сильными основаниями в газовой фазе приводит к реакциям замещения (S_N2) или элиминирования ($E2$). Сродство к электрону атома галогена столь высоко, что в спектрах ХИОИ этих соединений зачастую можно увидеть только пик иона Hal^- . Детектировать депротонированные молекулы, как правило, не удастся. Исключением являются фториды. В частности, взаимодействие этилфторида с анионом CD_3O^- [877] приводит наряду с реакцией элиминирования к образованию β -фторэтиланиона (схема 10.56).

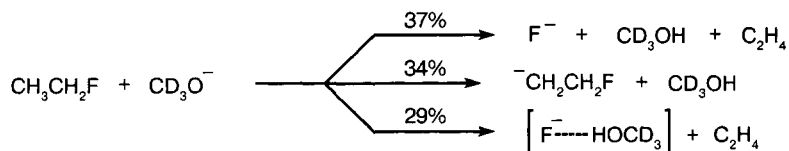


Схема 10.56

Достаточно много внимания было уделено резонансному захвату электрона молекулами полигалоген содержащих соединений [878–880]. Отмечается, что в условиях эксперимента (ХИ метаном) моногалоген производные не дают пика молекулярного иона, тогда как максимальную интенсивность имеет пик иона Hal^- . При увеличении числа атомов галогена в молекуле интенсивность пика $M^{\cdot-}$ увеличивается. Для пента- или гекса-хлорфенил- или бромфенил-производных пик иона $M^{\cdot-}$ может быть максимальным в спектре [881]. Предел обнаружения полихлорированных дибензофуранов и дибензидиоксинов в условиях резонансного захвата электрона можно улучшить на несколько порядков по сравнению с условиями ИЭ [881]. Дополнительного улучшения можно достичь при добавлении к метану кислорода, когда происходит замещение атома хлора на атом кислорода (схема 10.57). Для полихлордибензодиоксинов [882] реакция может идти и с разрывом $C-O$ связей (схема 10.57), т.е. появляется возможность делать выводы о степени замещения бензольных колец.

Использование самых разнообразных масс-спектрометрических техник для анализа полихлорированных бифенилов описано в обзоре [883], полихлорированных дибензодиоксинов и дибензофуранов – в обзорах [614, 869, 876], ДДТ и родственных соединений – в обзоре [884], легких полигалогенированных углеводородов – в обзорах [885, 886], полихлорированных полициклических пестицидов – в обзоре [887], галогенированных антипиренов – в обзорах [872, 873], полифторированных соединений – в обзорах [614, 888], галогенированных побочных продуктов хлорирования воды – в обзорах [614, 886].

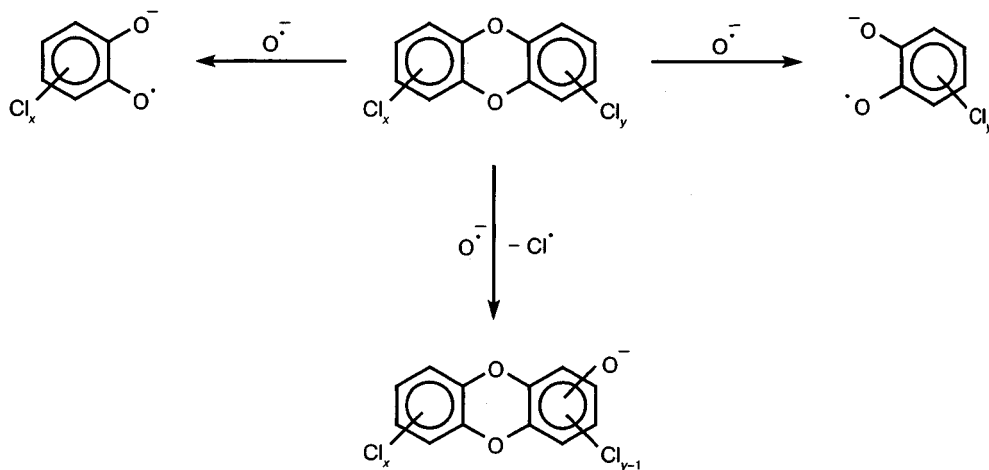
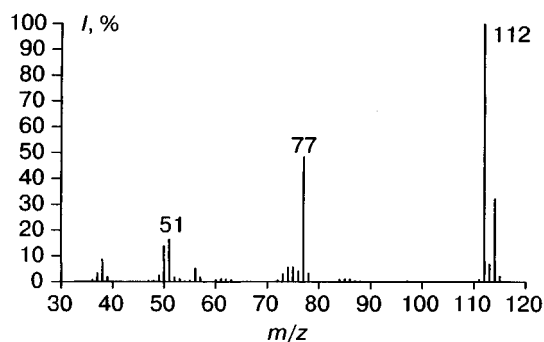


Схема 10.57

Задача 10.54. Как можно по спектрам ИЭ различить перечисленные ниже изомерные соединения?

- А) 1-бромгексан и 3-бромгексан;
- Б) 1-хлоргептан и 1-хлор-2-метилгексан;
- В) 3-пропилбромбензол и 1-фенил-3-бромпропан;
- Г) (*орто*-хлорметил)фенол и (*мета*-хлорметил)фенол.

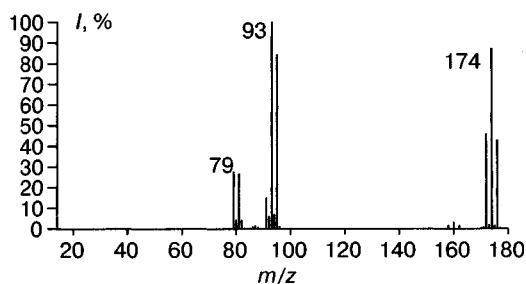
Задача 10.55. Идентифицируйте соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.66.



<i>m/z</i>	<i>I</i> , %	<i>m/z</i>	<i>I</i> , %
37	3,28	73	2,86
38	8,57	74	5,63
39	1,80	75	5,67
49	2,40	76	4,05
50	13,7	77	48,2
51	16,3	78	3,23
52	1,65	85	1,05
56	5,18	86	1,05
57	1,69	112	100
61	1,03	113	6,84
62	0,92	114	32,1
63	0,75	115	2,24

Рис. 10.66

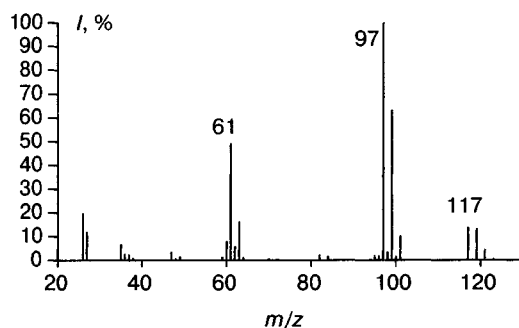
Задача 10.56. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.67).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
79	27,4	96	0,93
80	4,18	158	1,50
81	26,6	160	2,98
82	4,09	162	1,46
87	1,40	172	45,8
91	14,8	173	0,50
92	5,89	174	90,2
93	100	175	1,01
94	6,66	176	44,8
95	84,1	177	0,48

Рис. 10.67

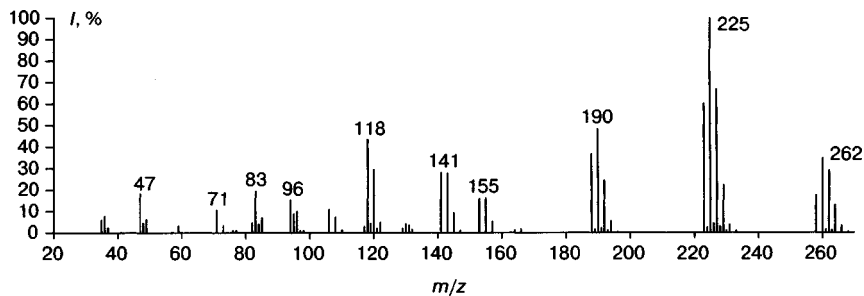
Задача 10.57. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.68).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	19,5	97	100
27	11,7	98	3,27
35	6,49	99	63,0
36	2,42	100	1,57
37	2,11	101	11,0
47	3,23	102	0,24
49	1,25	117	14,0
60	7,74	118	0,31
61	49,0	119	13,9
62	5,57	120	0,30
63	16,0	121	4,59
82	2,07	122	0,10
84	1,42	123	0,51

Рис. 10.68

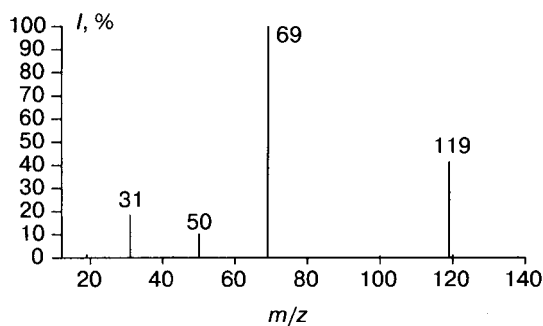
Задача 10.58. Идентифицируйте соединение по масс-спектру ИЭ (рис. 10.69).
Что представляют собой ионы с m/z 129–132?



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
35	3,09	96	10,1	143	27,8	224	2,52
36	3,38	97	0,99	145	9,37	225	100
37	1,04	98	1,04	147	1,02	226	4,40
47	18,4	106	10,8	153	15,9	227	66,7
48	4,62	108	7,20	155	16,1	228	2,93
49	6,24	110	1,25	157	5,24	229	22,2
59	3,10	117	2,98	164	1,36	230	0,98
71	10,6	118	43,5	166	1,75	231	3,70
73	3,45	119	4,41	188	36,7	233	0,95
76	1,10	120	29,6	189	1,61	258	17,4
77	1,08	121	2,06	190	48,4	260	34,8
82	4,57	122	4,88	191	2,15	261	1,53
83	19,4	129	2,05	192	24,5	262	29,0
84	4,01	130	4,10	193	1,07	263	1,28
85	7,09	131	3,42	194	5,44	264	12,9
94	15,3	132	1,52	196	0,45	266	3,22
95	8,79	141	28,1	223	60,1	268	0,43

Рис. 10.69

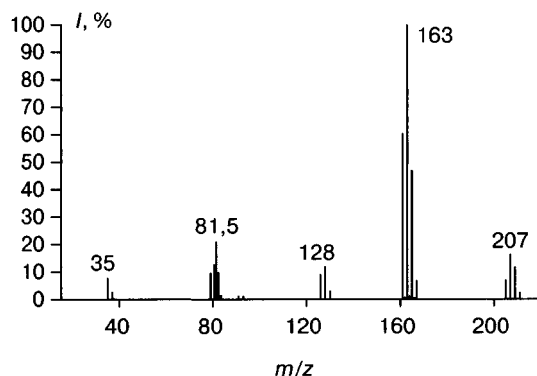
Задача 10.59. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ, представленному на рис. 10.70.



m/z	$I, \%$
12	1,50
19	1,20
31	18,3
32	0,20
50	10,1
69	100
70	1,09
100	0,60
119	41,6
120	0,88

Рис. 10.70

Задача 10.60. Идентифицируйте соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.71. Какова природа иона с m/z 81,5? Пик молекулярного иона отсутствует, но его легко вычислить.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
35	7,61	161	60,2
37	2,52	162	0,66
79	9,51	163	100
80,5	12,5	164	1,09
81	9,47	165	46,8
81,5	20,8	166	0,51
82,5	9,7	167	6,69
83,5	1,39	205	6,90
91	1,12	206	0,08
93	1,09	207	16,1
126	8,81	208	0,18
127	0,10	209	11,5
128	11,7	210	0,12
129	0,12	211	2,28
130	2,94	212	0,03

Рис. 10.71

Задача 10.61. Составьте предполагаемую схему фрагментации 4-бромфенола в условиях ИЭ.

Задача 10.62. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.72). Используйте информацию об интенсивностях следующих пиков: 95 (90%), 96 (6,0%), 97 (0,20%).

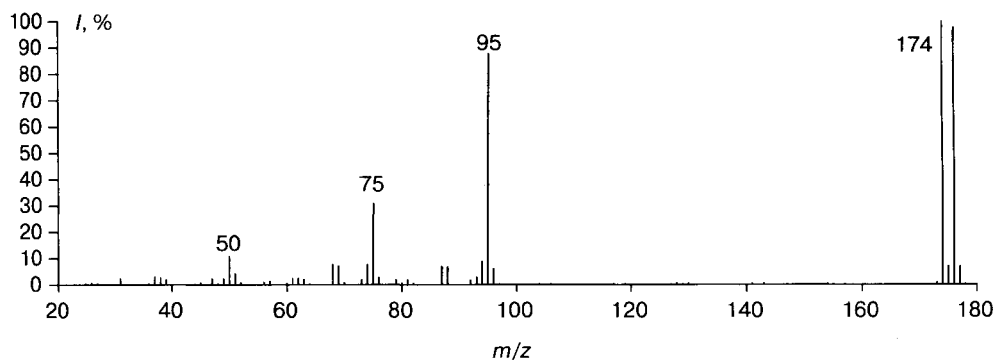


Рис. 10.72

Задача 10.63. На рис. 10.73 представлены спектры *орто*- и *пара*-бромбензальдегидов. Соотнесите спектры и объясните выбор.

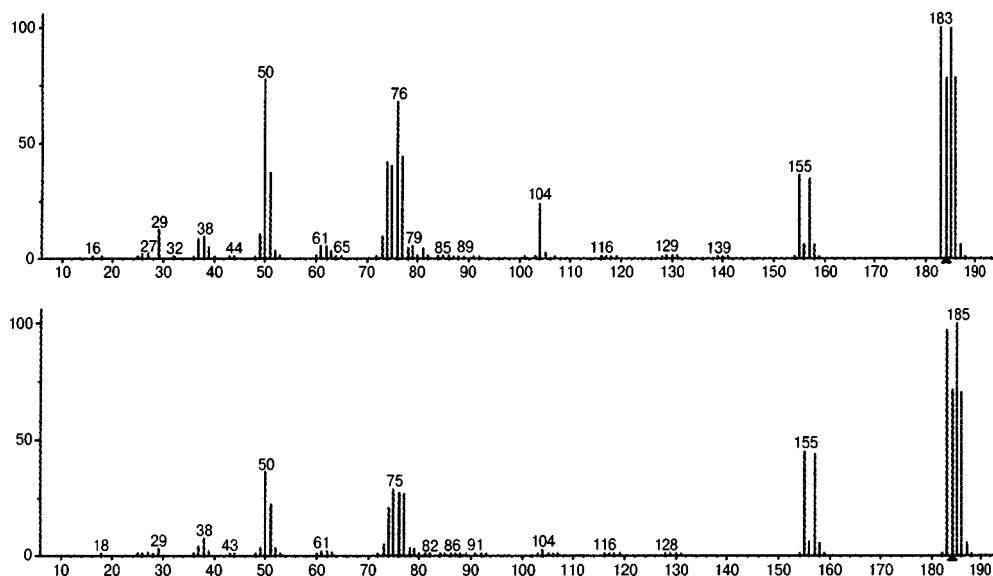


Рис. 10.73

10.10. Карбонильные соединения

Электронная ионизация. Энергии ионизации альдегидов и кетонов лежат в диапазоне 9,4–9,8 эВ. Интенсивность пика молекулярного иона, как правило, достаточно для его надежной регистрации. При переходе к соединениям с длинной цепью пик M^{++} может не наблюдаться в спектрах альдегидов. В электронно-невозбужденном состоянии заряд и неспаренный электрон локализованы на атоме кислорода, однако, благодаря эффекту резонанса (схема 10.58), заряд может находиться и на атоме углерода карбонильной группы. Кстати, механизм подавляющего большинства реакций карбонильных соединений в растворах предусматривает именно такую резонансную форму.

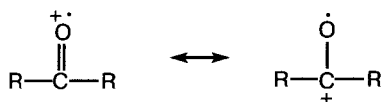


Схема 10.58

Во фрагментации M^{++} карбонильных соединений значительную роль играют перегруппировочные процессы, хотя большинство важнейших фрагментов обусловлено простыми разрывами связей. На рис. 10.74а, б представлены спектры двух альдегидов алифатического ряда.

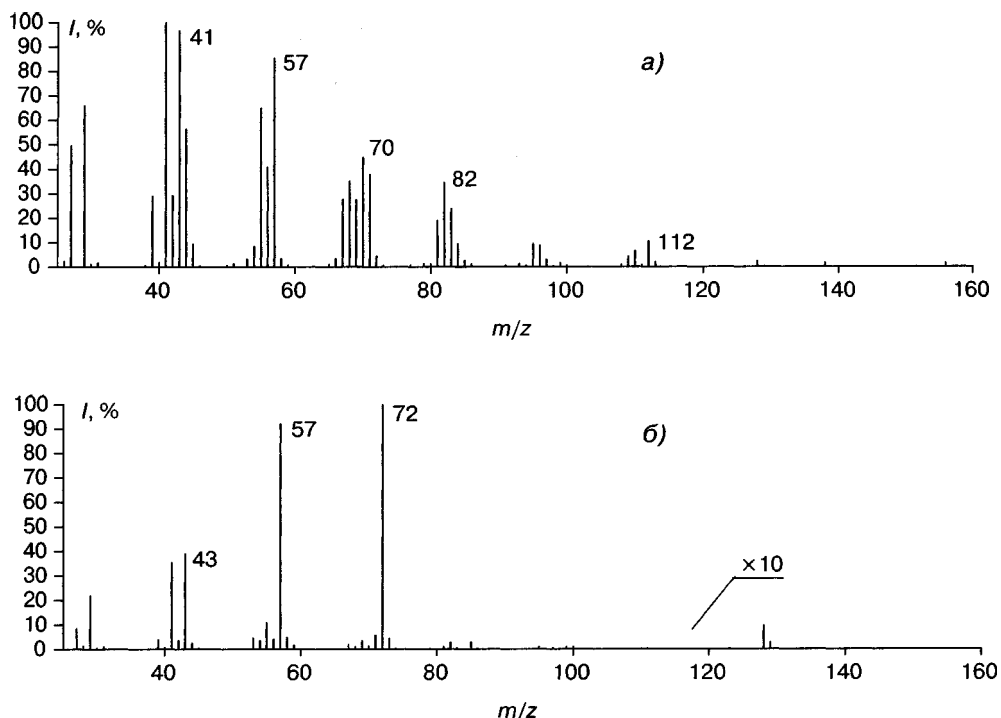


Рис. 10.74. Масс-спектры ИЭ: деканала (а); 2-этилгексанала (б)

Для альдегидов α -распад менее характерен, чем для кетонов. Пик иона HCO^+ наблюдается только в спектрах низших гомологов, а также альдегидов с сильными электроноакцепторными группами (например, $\text{C}_3\text{F}_7\text{CHO}$). Пик иона $[\text{M}-\text{H}]^+$ имеет заметную интенсивность только в случае дополнительной стабилизации заряда (например, ароматические альдегиды). На схеме 10.59 представлены основные направления фрагментации 2-этилгексанала (рис. 10.74б).

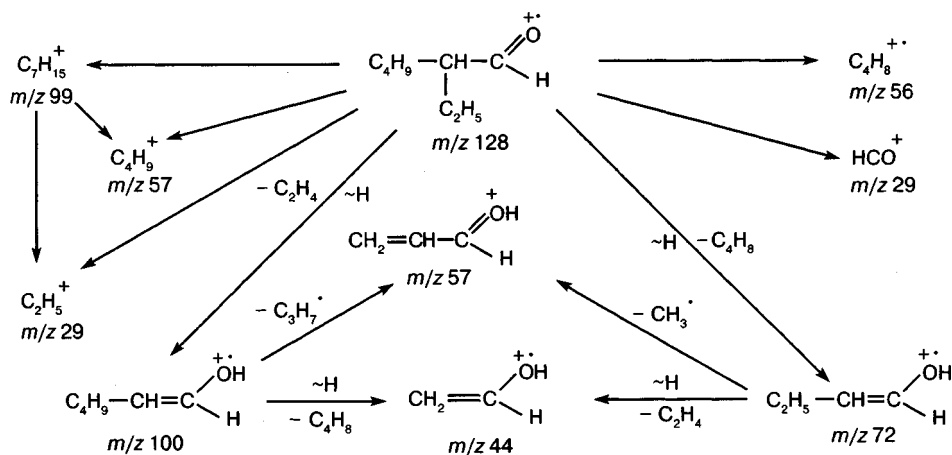


Схема 10.59

При переходе от пропионового к масляному альдегиду появляется новое направление фрагментации – перегруппировка Мак-Лафферти (схема 10.60). Благодаря этому процессу для альдегидов без заместителей у α -атома углерода характерен ион с m/z 44 (рис. 10.74а).

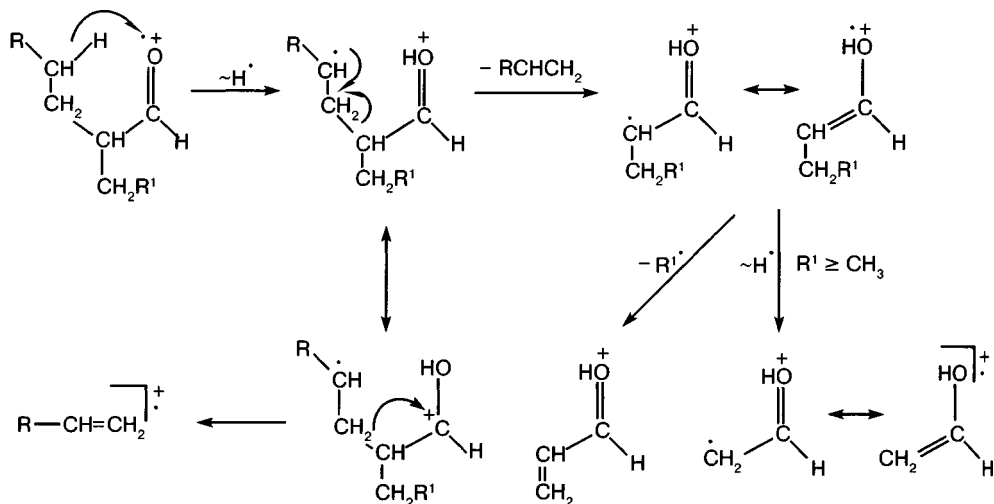


Схема 10.60

Если в α -положении находится алкильный заместитель R, значение m/z этого перегруппировочного иона увеличивается на соответствующую величину (ион с m/z 72 в спектре 2-этилгексаналя на рис. 10.74б). Кроме того, возможна вторичная перегруппировка с элиминированием молекулы олефина (m/z 44 в спектре 2-этилгексаналя на рис. 10.74б). Разветвление у α -атома углерода дает возможность протекать перегруппировке Мак-Лафферти по обоим алкильным цепям, если длина цепочки не меньше двух атомов углерода. Хотя образующиеся ионы обусловлены выбросами молекул, а не радикалов, интенсивности их пиков могут быть предсказаны на качественном уровне по правилу выброса максимального алкила (ионы с m/z 72 и 100 в спектре 2-этилгексаналя на рис. 10.74б). В спектрах α -алкилзамещенных альдегидов высокую интенсивность имеют также пики четноэлектронных ионов, возникающих при отщеплении радикала R' из енольного иона, образующегося в результате перегруппировки Мак-Лафферти: (схема 10.60), и m/z 57 (схема 10.59).

Как уже отмечалось выше (разд. 3.1.2), заряд в результате перегруппировки может оставаться на прежнем месте или мигрировать. В случае альдегидов миграция приводит к возникновению олефинового иона (схема 10.60). Для незамещенного в α -положении альдегида в спектре наблюдается пик иона $[M-44]^+$. Его интенсивность может быть высокой.

Достаточно стабильный молекулярный ион циклогексанкарбоксальдегида элиминирует молекулу воды или радикал HCO^\bullet . Образующиеся углеводородные ионы определяют всю последующую картину фрагментации (рис. 10.75).

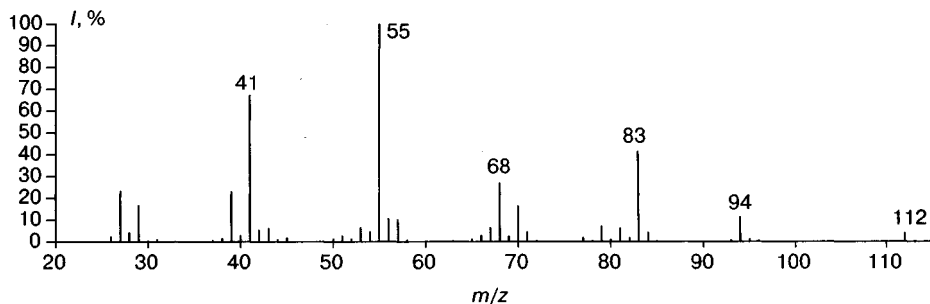
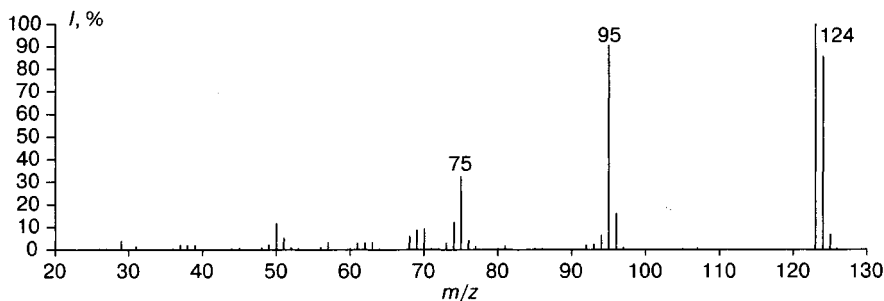


Рис. 10.75. Масс-спектр ИЭ циклогексанкарбоксальдегида

Для ароматических альдегидов очень характерен последовательный или одновременный выброс из M^{++} атома водорода и молекулы CO (пики ионов с m/z 123 и 95 на рис. 10.76). Пик молекулярного иона, как правило, весьма интенсивен. Важным отличием от алифатических альдегидов является интенсивный пик иона $[M-H]^+$, представляющего собой устойчивый резонансно-стабилизированный бензоилкатион $ArCO^+$.

Рис. 10.76. Масс-спектр ИЭ *para*-фторбензальдегида

На рис. 10.77а,б представлены масс-спектры ионизации электронами двух алифатических изомерных кетонов. Разрывы C—C связей с двух сторон от карбонильной группы приводят к образованию двух пар алкильных и ацильных ионов. Из двух ацильных катионов более интенсивный пик будет иметь образовавшийся при отщеплении большего алкила, а из двух алкильных — более стабильный (вторичный, третичный, аллильный и т.д.). Например, в случае децилтретбутилкетона интенсивность пика иона $C_4H_9CO^+$ будет выше, чем $C_{10}H_{21}CO^+$, а интенсивность пика $C_4H_9^+$ выше, чем $C_{10}H_{21}^+$. Эти первичные ионы могут обладать внутренней энергией, достаточной для протекания вторичных процессов распада. На схеме 10.61 отражены основные направления фрагментации M^{++} деканона-5 (рис. 10.77б).

Молекулярные ионы кетонов могут претерпевать перегруппировку Мак-Лафферти с участием любого из алкильных радикалов с длиной цепочки не менее трех атомов углерода и наличии γ -атома водорода. Возможны последовательные перегруппировки с образованием конечного иона со структурой енольной формы ацетона (схема 10.62). Перегруппировка не идет, если γ -атом углерода имеет sp^2 - или sp -гибридизацию, а также в случае α,β -непредельных кетонов и альдегидов.

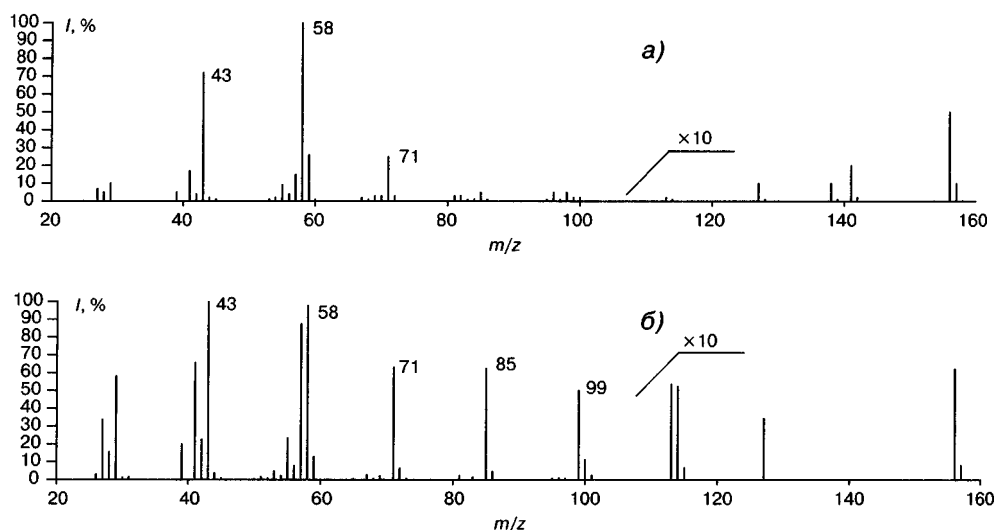


Рис. 10.77. Масс-спектры ИЭ: деканона-2 (а), деканона-5 (б)

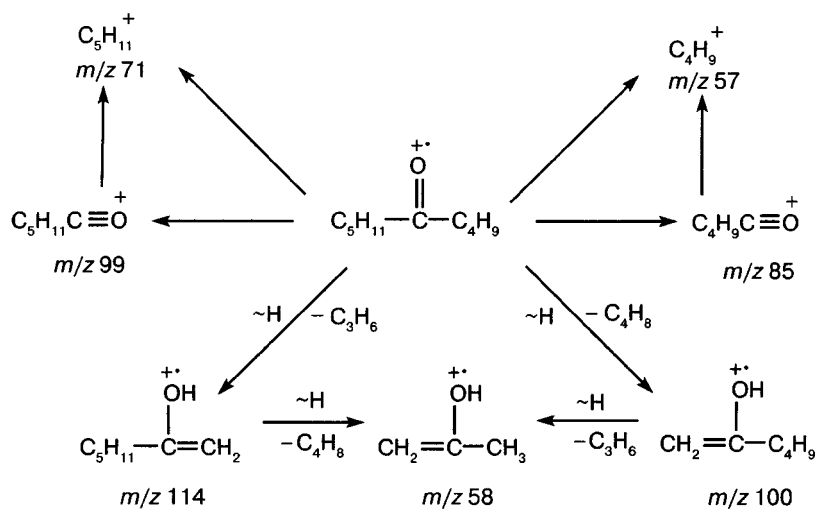


Схема 10.61

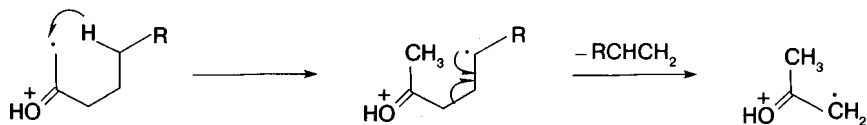


Схема 10.62

Фрагментация алициклических кетонов изучена достаточно хорошо и была подробно описана еще в 60-х годах прошлого века [40, 889–891]. Молекулярные ионы ненапряженных алициклических кетонов достаточно устойчивы. Их пики имеют высокую интенсивность в спектрах ИЭ.

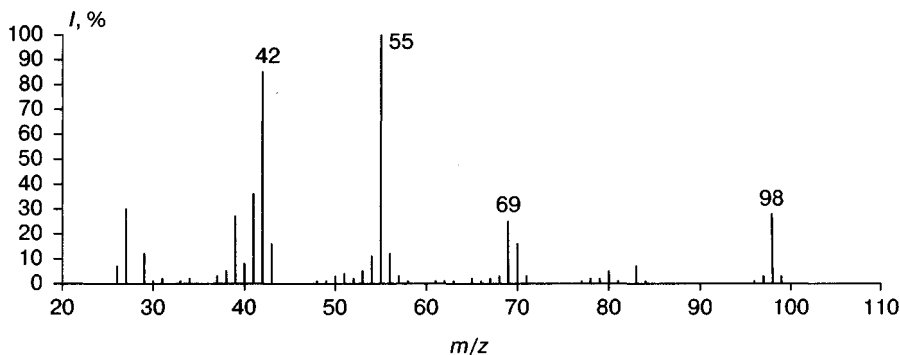


Рис. 10.78. Масс-спектр ИЭ циклогексанона

На рис. 10.78 представлен масс-спектр ИЭ циклогексанона. Схема 10.63 отражает основные направления фрагментации его $M^{+\bullet}$. Интенсивность пика молекулярного иона составляет 30% от интенсивности максимального пика в спектре (рис. 10.78). Отщепление из $M^{+\bullet}$ молекулы воды (ион с m/z 80 на рис. 10.78) идет в результате последовательных, не всегда селективных перегруппировочных процессов. Еще более сложные структурные изменения исходной молекулы приводят к элиминированию этильного радикала, причем на 80% отщепляются атомы углерода из положений 3 и 5 исходного цикла. На примере циклогексанона можно еще раз подчеркнуть, что даже для столь простого и хорошо изученного соединения и даже при использовании современной масс-спектрометрической техники и соединений, меченных изотопами, крайне затруднительно получить исчерпывающую информацию по всем процессам, протекающим при фрагментации молекулярного иона [892].

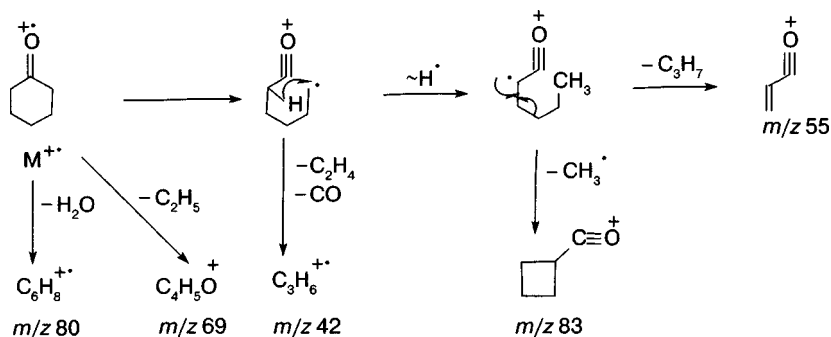


Схема 10.63

Например, ион с m/z 55, характеризующийся максимальным пиком в спектре, является составным (80% — $C_3H_3O^+$ и 20% — $C_4H_7^+$), причем кислородсодержащий фрагмент образуется не только из $M^{+\bullet}$ (схема 10.63), но и из иона $[M-C_2H_4]^+$ в результате потери метильного радикала и из иона $[M-C_3H_6]^+$ в результате потери атома водорода. Углеводородный фрагмент может появиться в результате пяти реакций фрагментации (схема 10.64). Составными являются и большинство

других ионов в спектре [892]. Можно отметить также тот факт, что элиминирование молекулы этилена из M^{++} может протекать по нескольким механизмам с вовлечением атомов углерода C2, C3, C4 и значительным скрамблингом атомов водорода [40, 890].

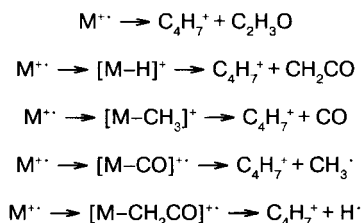


Схема 10.64

Тем не менее установленные пути фрагментации позволяют делать структурные выводы на основании анализа масс-спектров. Например, важное значение имеет максимальный ион в спектре циклогексанонов (m/z 55 на схеме 10.63). Алкильный заместитель в положении 3 приводит к увеличению доли разрыва связи C_1-C_6 по сравнению с C_1-C_2 примерно в 4–5 раз, поскольку в результате фрагментации образуется более термодинамически стабильный ион с внутренней кратной связью (схема 10.65). Алкильный заместитель в положении 2 облегчает разрыв связи C_1-C_2 (более замещенной по сравнению с C_1-C_6), но, с другой стороны, облегчается миграция атома водорода из положения 2 при разрыве связи C_1-C_6 . Результатом является приблизительное равенство интенсивностей двух пиков альтернативных ионов. При фрагментации 4-алкилзамещенных заместитель элиминируется при любом первичном разрыве C–C связей у α -атома углерода. Кстати, ион с m/z 55 характеризуется максимальным или близким к максимальному пиком в спектрах не только циклогексанона, но и циклопентанона и циклоалканонов с большим размером цикла.

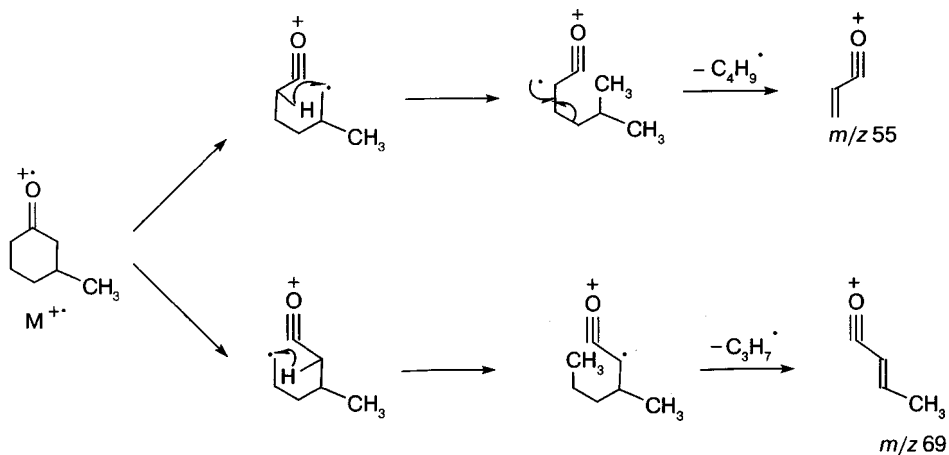


Схема 10.65

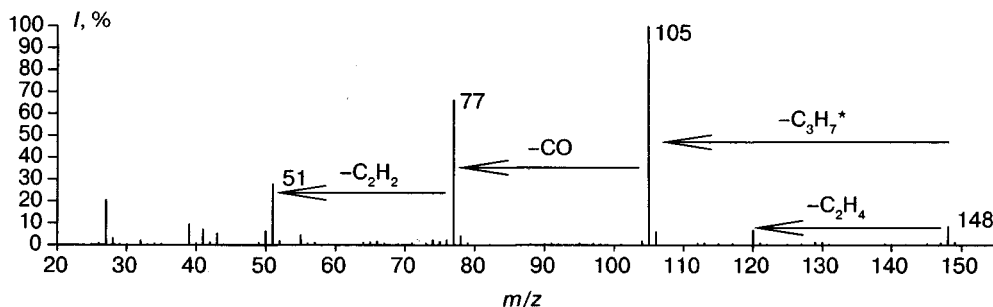


Рис. 10.79. Масс-спектр ИЭ бутирофенона

Алкиларил- и диарилкетоны характеризуются очень интенсивными пиками $M^{+\bullet}$. Фрагментация определяется прежде всего α -разрывами, причем в случае алкиларилкетонов в спектре доминирует пик более устойчивого ароматического бензоильного иона (m/z 105 на рис. 10.79). Пик альтернативного ацильного иона часто едва заметен (m/z 71 на рис. 10.79). Наличие алкильной цепочки достаточной длины приводит к реализации перегруппировки Мак-Лафферти (ион 120 на рис. 10.79). $M^{+\bullet}$ диарилкетонов может элиминировать молекулу CO с последующими выбросами 1–3 атомов водорода. Пики этих фрагментов не очень интенсивны, но отчетливо видны в малолинейчатых спектрах этих соединений.

Химическая ионизация. Пик протонированной молекулы MNH^+ кетонов доминирует в спектре химической ионизации протонирующими газами-реагентами. Кроме него, могут наблюдаться лишь незначительные пики ацильных ионов, образующиеся в результате α -разрывов, и кластерных ионов $[M+Alk]^+$, соответствующих используемым газам-реагентам (разд. 5.2). Для инициирования фрагментации необходимо использовать реагенты, для которых характерна максимальная экзотермичность процесса ионизации. Протонированные альдегиды значительно менее устойчивы. Максимальную интенсивность имеет, как правило, пик иона $[MN-H_2O]^+$. Могут наблюдаться также пики более легких углеводородных ионов. Процесс отщепления воды протекает неоднозначно [893, 894]. В частности, в состав элиминируемой молекулы воды не всегда входит атом водорода, который протонировал молекулу альдегида.

Для спектров химической ионизации кетонов окисью азота характерно протекание процессов перезарядки и электрофильного присоединения [819]. В первом случае образуются ионы $M^{+\bullet}$, а во втором – $[M+NO]^+$. Соотношение интенсивностей их пиков определяется величиной энергии ионизации кетона. Для протекания перезарядки энергия ионизации должна быть ниже 8,8 эВ. В спектрах альдегидов [895], помимо пиков указанных ионов, достаточно интенсивны пики $[M-N]^+$. Эти ионы образуются по механизму отрыва аниона (разд. 5.2).

Изомеризация протонированного пивалинового альдегида в протонированный метилизопропилкетон (схема 10.66) протекает по механизму, близкому классической pinaколиновой перегруппировке [830]. Эта реакция представляет собой частный случай изомеризации альдегидов в более термодинамически устойчивые кетоны. Подобный процесс, протекающий в растворах в условиях кислотного катализа, был ранее описан в работе [896].

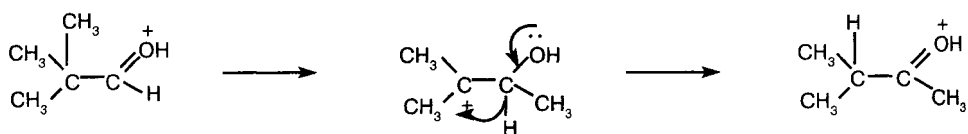


Схема 10.66

Химическая ионизация отрицательных ионов. Депротонирующие агенты эффективно взаимодействуют с карбонильными соединениями в газовой фазе с образованием енолят-анионов $[M-H]^-$, пики которых имеют максимальную интенсивность в спектрах. Меньшую интенсивность имеют пики ионов $[M-3H]^-$. Для инициирования процессов распада енолятов необходимо использовать метод активации соударениями. Работы в этом направлении проводились многими группами исследователей [897–903]. Енолят ацетона выбрасывает молекулу водорода и молекулу метана. Схема 10.67 отражает основные направления фрагментации енолята 3-этилпентан-2-она [900, 901], связанные с элиминированием молекулы метана или с последовательным отщеплением двух молекул этилена. Результаты исследований подтверждены спектрами дейтерированных аналогов.

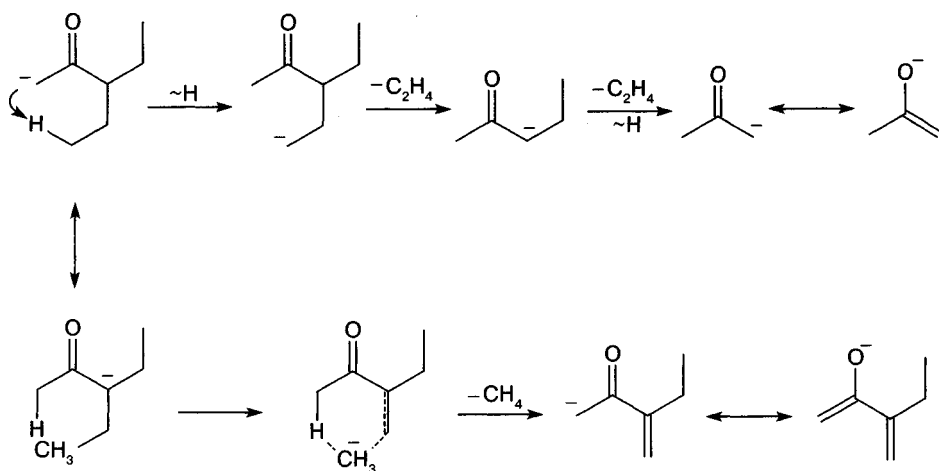


Схема 10.67

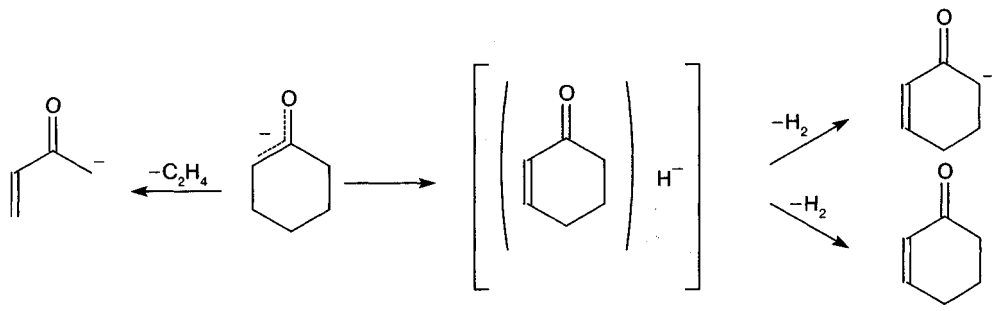


Схема 10.68

Для депротонированных циклогексанонов (схема 10.68) характерны отщепления молекулы водорода с возникновением двух изомерных ионов и реакция разрыва цикла с отщеплением молекулы этилена [898, 901]. Последний процесс можно рассматривать как распад енолят-аниона по механизму ретро Дильса – Альдера. Аналогичным образом фрагментируют и депротонированные алкилзамещенные циклогексаноны [898].

Достаточно насыщенными оказываются масс-спектры химической ионизаций карбонильных соединений при использовании ионов O^{+} [903]. Ионизация осуществляется в результате нуклеофильной атаки O^{+} на атом углерода карбонильной группы и ведет к разрывам связей $C-H$ и $C-C$ с образованием ионов $[M-H]^{+}$, $[M-2H]^{+}$, $RCOO^{+}$ и $R'COO^{+}$. Потеря молекулы водорода осуществляется с участием атомов водорода одного или двух α -атомов углерода, причем эти фрагментные ионы могут распадаться далее с выбросами углеводородных радикалов и образованием различных енолят- и алкоголят-анионов. Таким образом, на основании этих спектров можно устанавливать структуры карбонильных соединений. В особо сложных случаях показано [903], что существенную помощь могут оказать спектры tandemной масс-спектрометрии с инверсией заряда (разд. 7.4).

Задача 10.64. Какие ионы возникают в результате перегруппировки Мак-Лафферти при фрагментации перечисленных ниже соединений в условиях ИЭ?

- А) 3-метилоктанон-4;
- Б) 3-метил-5-этилоктанон-4;
- В) 3,5-диэтилоктанон-4;
- Г) 3-этилоктанон-2;
- Д) 4-метилдеканон-5;
- Е) нонанон-4;
- Ж) 4-пропилдеканон-5;
- З) 4,5-диэтилундеканон-5;
- И) децен-3-он-5;
- К) 6-метил-8-этилтетрадецен-5-он-7.

Задача 10.65. Какие перегруппировочные процессы протекают при фрагментации перечисленных ниже соединений в условиях ИЭ?

- А) фенилпропилкетон;
- Б) бензилметилкетон;
- В) бензилбутилкетон;
- Г) β -фенилэтилэтилкетон.

Задача 10.66. Какие различия наблюдаются в масс-спектрах ИЭ перечисленных ниже изомерных соединений?

- А) пентаналь и 2-метилбутаналь;
- Б) бутаналь и 2-метилпропаналь;
- В) 2-метилбутаналь и 3-метилбутаналь;
- Г) 3,5-диметилоктаналь и 4,4-диметилоктаналь;
- Д) гексаналь и гексанон-2;
- Е) гексен-2-аль и гексен-5-аль;

- Ж) 4,6-диметилдеканона-5 и 4-этилдеканона-5.
 З) бутилфенилкетона и третбутилфенилкетона;
 И) пропилфенилкетона и 4-пропилбензальдегида;
 К) бензилбутилкетона, бензил-*втор*-бутилкетона и β -фенилэтилпропилкетона;
 Л) 3-метилбензальдегида и ацетофенона;
 М) циклогексилметилкетона и циклогексилуксусного альдегида.

Задача 10.67. На рис. 10.80а,б представлены спектры изомерных 3,3-диметилгексаналя и 4,4-диметилгексаналя. Сделайте соотнесение.

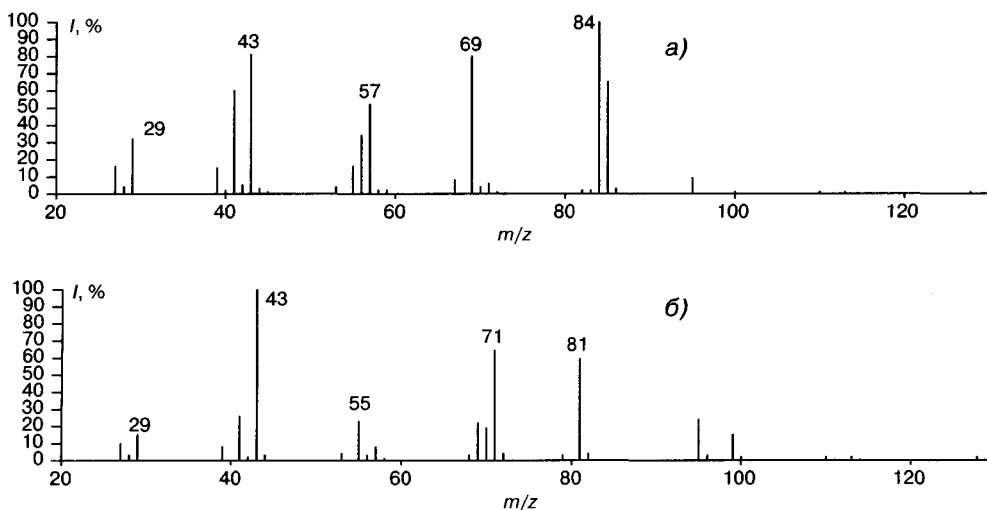
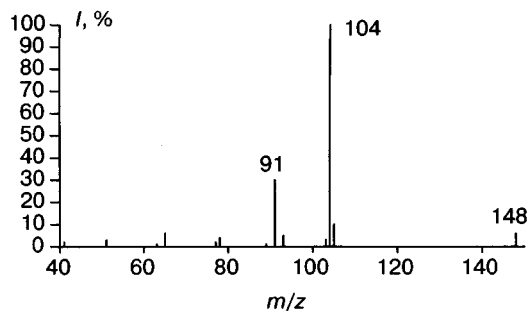


Рис. 10.80

Задача 10.68. Объясните, почему интенсивность пика с m/z 104 столь высока в спектре 4-фенилбутанала (рис. 10.81).



m/z	$I, \%$
51	3,29
65	6,54
77	2,17
78	4,78
89	1,01
91	30,0
93	5,29
103	3,14
104	100
105	8,94
148	4,76

Рис. 10.81

Задача 10.69. Какие ионы будут иметь максимальные пики в спектрах ИЭ перечисленных ниже соединений?

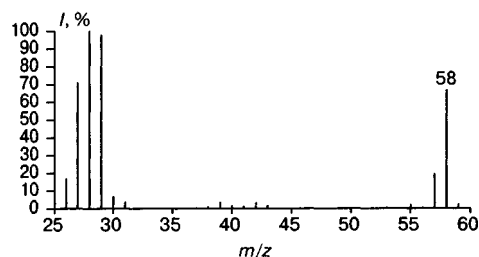
- А) изопропилбутилкетон;
- Б) метилэтилкетон;
- В) вторбутилизопропилкетон;
- Г) бензилэтилкетон;
- Д) изопропилметилкетон.

Задача 10.70. Составьте схему фрагментации бутирофенона, спектр которого представлен на рис. 10.79.

Задача 10.71 Составьте предполагаемые схемы фрагментации в условиях ИЭ перечисленных ниже соединений.

- А) пентанон-2;
- Б) пентанон-3;
- В) 3-метилпентанон-2;
- Г) пропилэтилкетон;
- Д) изопропилпропилкетон;
- Е) дибутилкетон;
- Ж) *трет*-бутилпропилкетон.

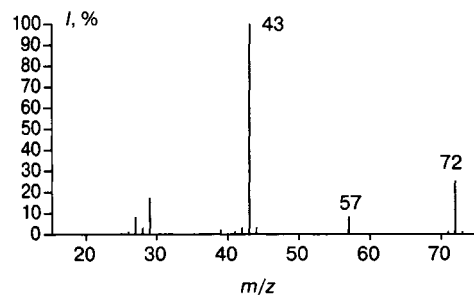
Задача 10.72. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.82.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	16,8	41	1,14
27	70,8	42	3,07
28	100	43	1,56
29	97,4	53	0,42
30	6,51	55	2,08
31	3,67	56	0,45
38	0,76	57	19,3
39	3,38	58	66,5
40	1,45	59	2,29

Рис. 10.82

Задача 10.73. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.83.



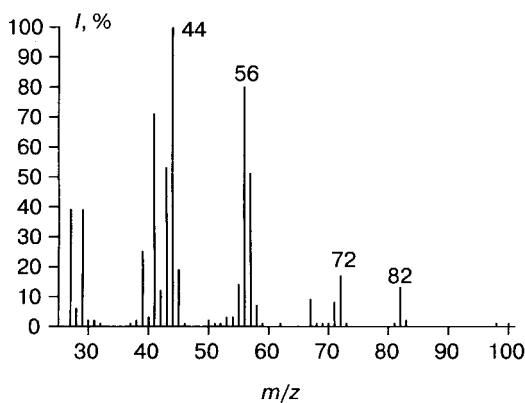
m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
15	4,31	42	3,12
26	1,12	43	100
27	8,34	44	2,23
28	3,25	57	8,87
29	17,6	71	1,29
39	2,78	72	25,0
41	1,03	73	1,11

Рис. 10.83

Задача 10.74. Составьте предполагаемые схемы фрагментации и укажите различия, с помощью которых можно отличить следующие изомерные соединения по их масс-спектрам ИЭ.

- А) 2-метилциклогексанон и 3-метилциклогексанон;
- Б) 2,3-диметилциклогексанон и 2,4-диметилциклогексанон;
- В) 2,5-диметилциклогексанон и 2,6-диметилциклогексанон;
- Г) 2,4-диметилциклогексанон и 3-этилциклогексанон;
- Д) 3-винилциклогексанон и 4-винилциклогексанон;
- Е) циклогексанон и 2-метилциклопентанон;
- Ж) 2-метил-3-этилциклогексанон и 2-этил-3-метилциклогексанон.

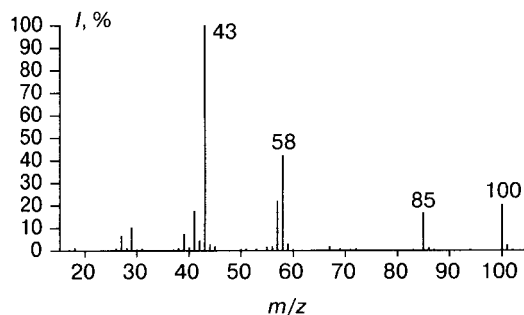
Задача 10.75. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.84.



<i>m/z</i>	<i>I, %</i>
27	39,3
28	6,02
29	39,4
30	2,17
39	25,7
40	3,34
41	71,5
42	12,8
43	53,9
44	100
45	19,8
46	1,03
53	3,45
54	3,54
55	14,9
56	80,7
57	51,6
58	7,32
59	1,75
62	1,57
67	9,87
68	1,12
69	1,21
70	1,25
71	8,39
72	17,4
73	1,23
81	1,18
82	13,3
83	1,02
98	1,13
100	1,33

Рис. 10.84

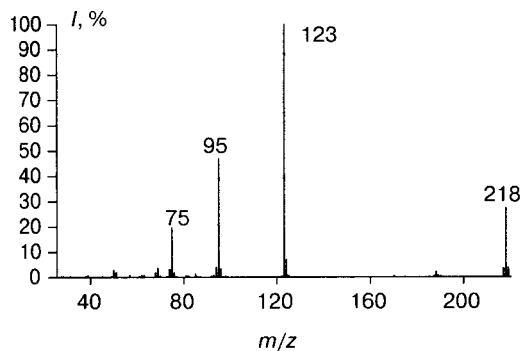
Задача 10.76. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.85.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
15	4,03	55	1,42
18	0,89	56	1,77
27	6,41	57	21,9
28	1,13	58	42,0
29	10,1	59	1,60
39	7,11	67	1,60
40	1,13	69	0,60
41	17,3	85	16,5
42	4,29	86	0,89
43	100	100	20,0
44	2,98	101	1,32
45	1,60	102	0,08

Рис. 10.85

Задача 10.77. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ на рис. 10.86.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
50	2,77	96	3,13
51	1,84	123	100
69	3,51	124	7,86
74	3,09	125	0,44
75	19,4	188	2,06
76	1,32	217	3,35
81	0,51	218	28,4
94	3,82	219	4,12
95	46,8	220	0,32

Рис. 10.86

Задача 10.78. На рис. 10.87а, б представлены масс-спектры изомерных 5-метилгексана-3 и 2-метилгексана-3. Сделайте соотношение.

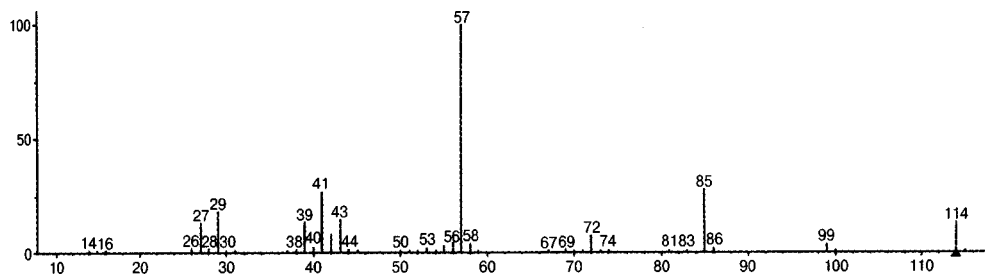


Рис. 10.87а

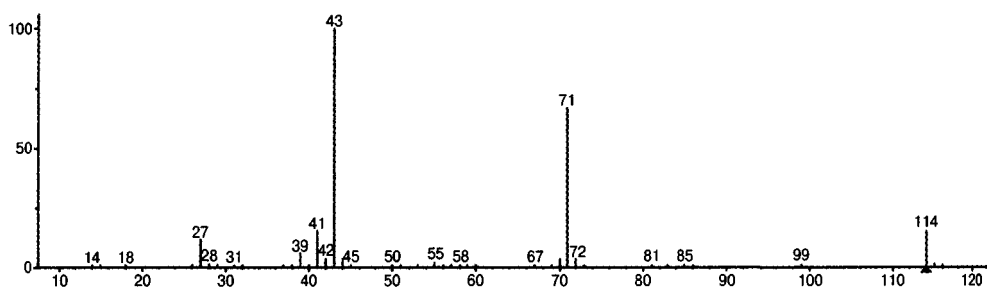


Рис. 10.87б

Задача 10.79. Объясните столь высокую интенсивность иона с m/z 130 в масс-спектре ИЭ 7-фенилгепт-6-ен-2-она (рис. 10.88).

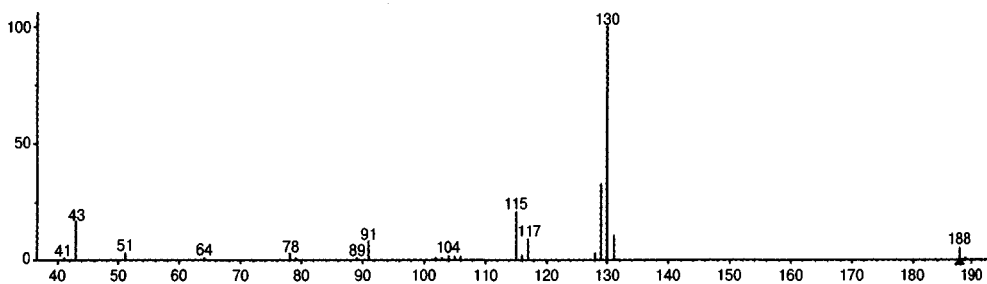
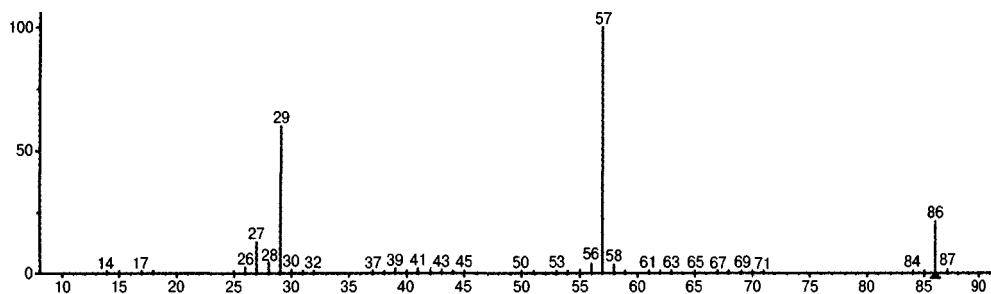


Рис. 10.88

Задача 10.80. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.89.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	24	27	123	28	42	29	593
30	13	39	17	41	19	42	17
43	15	55	12	56	36	57	1000
58	33	86	211	87	11		

Рис. 10.89

10.11. Карбоновые кислоты и их производные

Электронная ионизация. В электронно-невозбужденном состоянии заряд и неспаренный электрон в молекулярных ионах карбоновых кислот и сложных эфиров локализованы на атомах кислорода. На рис. 10.90 представлены масс-спектры ИЭ додекановой и 2-пропилнонановой кислот. Масс-спектры изомерных сложных эфиров представлены на рис. 10.91.

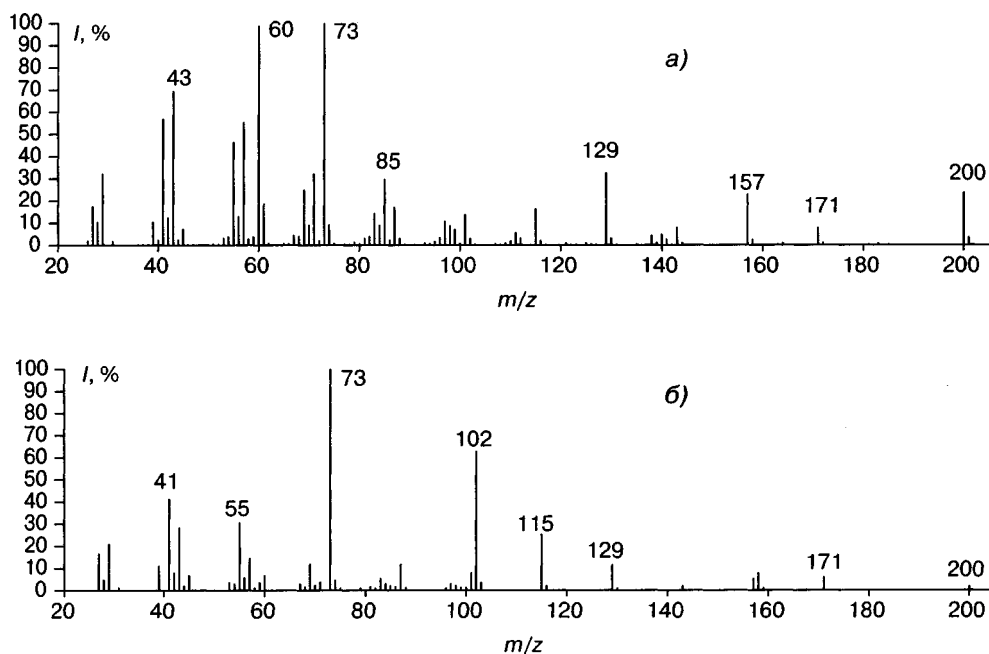


Рис. 10.90. Масс-спектры ИЭ: додекановой (а), 2-пропилнонановой кислот (б)

Пики $M^{+\bullet}$ интенсивны в спектрах даже достаточно тяжелых соединений этих групп. Однако при увеличении длины алкильных радикалов (как кислотной, так и спиртовой части), а также числа разветвлений в цепи они становятся менее устойчивы, а их пики можно и не увидеть в спектре (рис. 10.91а, в). Основные направления фрагментации $M^{+\bullet}$ связаны с разрывами связей рядом с карбонильной группой. Ионы, образовавшиеся при разрыве связи $C-O$, как правило, более интенсивны. Важнейшим исключением является ион OH^+ , интенсивность пика которого в спектрах кислот крайне мала. Напротив, пики ионов OR^+ могут иметь значительную интенсивность в спектрах сложных эфиров.

Ацилий-катион устойчив для легких гомологов, но с увеличением длины цепи интенсивность его пика заметно снижается (53% в спектре масляной кислоты, 7% в спектре нонановой кислоты, 4% в спектре пальмитиновой кислоты). Следует отметить, что неселективная потеря атома водорода молекулярными ионами многих карбоновых кислот приводит к образованию ионов $[M-H]^+$.

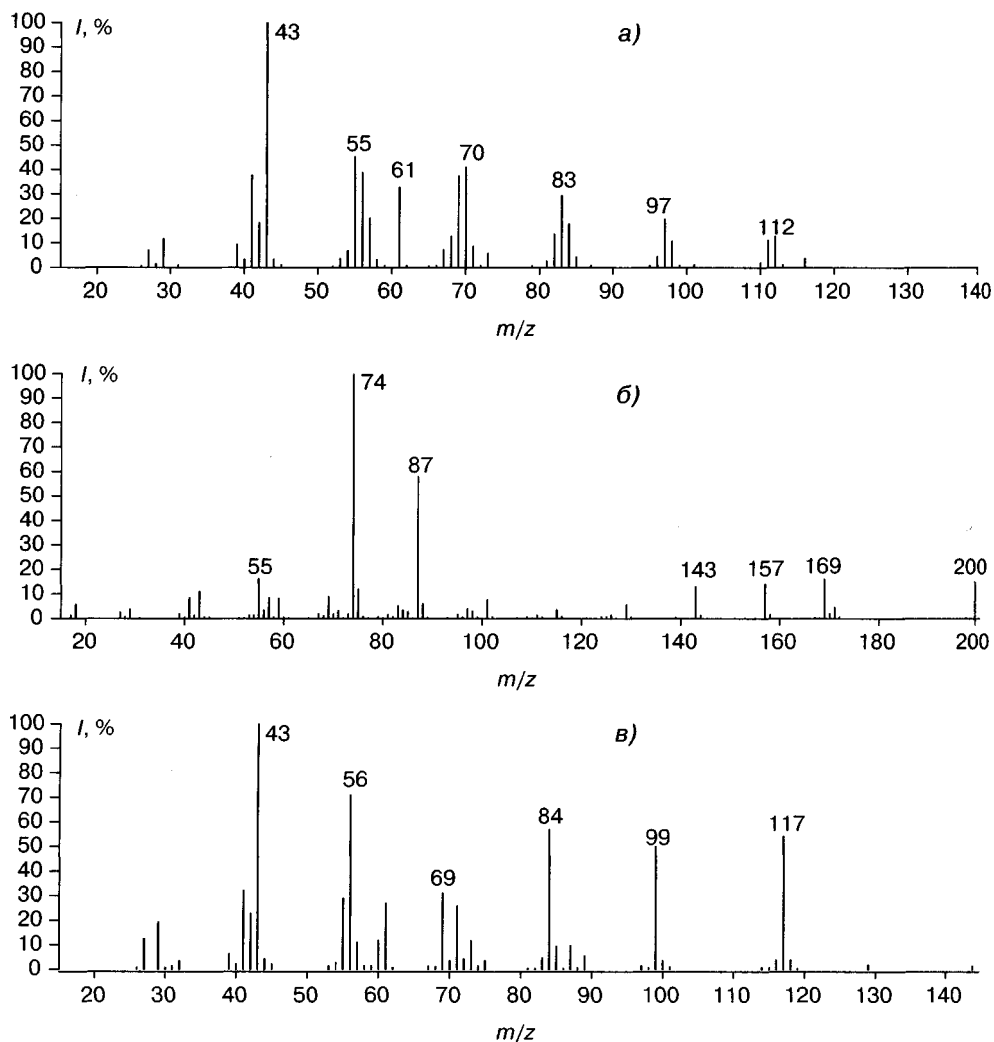


Рис. 10.91. Масс-спектры ИЭ: децилацетата (а), метилундеканоата (б), гексилгексаноата (в)

Разрывы С—С связей в алкильной цепочке кислот и сложных эфиров приводят к появлению ионов характеристической гомологической серии с m/z 59, 73, 87, 101... с общей формулой $[(CH_2)_n COOR]^+$. Через каждые четыре метиленовых звена наблюдается повышенная интенсивность пика соответствующего иона в серии. В случае карбоновых кислот нормального строения повышенные интенсивности будут иметь пики ионов с m/z 73, 129, 185, 241 и т.д. (рис. 10.90а), а в случае их метиловых эфиров — с m/z 87, 143, 199, 255 и т.д. (рис. 10.91б). Предложенная и доказанная масс-спектрами дейтерированных соединений схема 10.69 объясняет образование первого иона этой серии и в определенной мере второго. Оба процесса начинаются с миграции δ - или ϵ -атома водорода на карбонильную группу. Однозначный механизм образования других ионов этой серии не установлен, но

он требует дополнительных миграций атомов водорода. Ион с m/z 73 (для кислот) и его эфирный аналог образуются также благодаря аллильному разрыву из енольной формы (задачи 10.87 и 10.89).

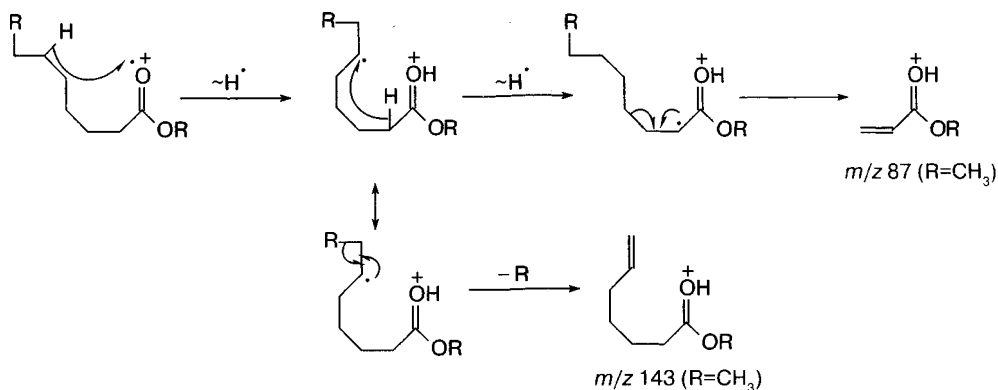


Схема 10.69

Для структурного анализа кислот с длиной цепи не менее девяти атомов углерода важен ион $[M-43]^+$. Он образуется при отщеплении из молекулярного иона α -, β - и γ -атомов углерода (схема 10.70). В этом процессе образуются 5- и 6-членные циклы, т.е. $n = 1, 2$. Аналогичный механизм реализуется и при образовании иона $[M-29]^+$, когда отщепляются α - и β -атомы углерода [904]. По регистрируемым в масс-спектрах величинам m/z этих ионов можно сделать выводы о наличии разветвлений у α -, β - и γ -атомов углерода кислотной цепи.

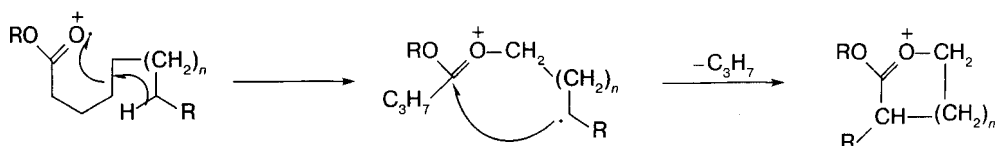


Схема 10.70

Для карбоновых кислот (без заместителя у α -атома углерода) перегруппировка Мак-Лафферти приводит к иону енольной формы уксусной кислоты с m/z 60 (рис. 10.90а, схема 10.71). Для сложных эфиров пик этого перегруппировочного иона сдвинут по шкале масс на соответствующую величину (рис. 10.91). Поскольку энергии ионизации олефинов начиная с пропилена достаточно низки, интенсивности пиков олефиновых ионов могут быть также достаточно высоки.

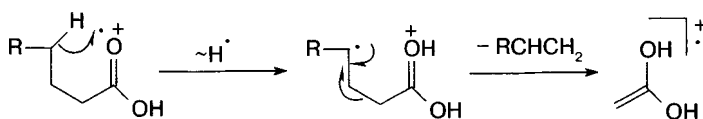


Схема 10.71

Чем длиннее алкильная цепь, тем выше интенсивность пика иона с m/z 61, образующегося при миграции к карбоксильной группе двух атомов водорода алкильной цепи. Наличие у α -атома углерода алкильной группы не короче, чем этильная, помимо сдвига перегруппировочных ионов с m/z 60 и 61 по шкале масс (ионы с m/z 102, 103, 158, 159 на рис. 10.90б для 2-пропилнонановой кислоты), приводит к реализации двух перегруппировочных процессов по обоим алкильным цепям в любой последовательности. Конечным результатом этих перегруппировок вновь оказываются ионы с m/z 60. На схеме 10.72 эти процессы представлены для случая 2-пропилнонановой кислоты, спектр которой представлен на рис. 10.90б.

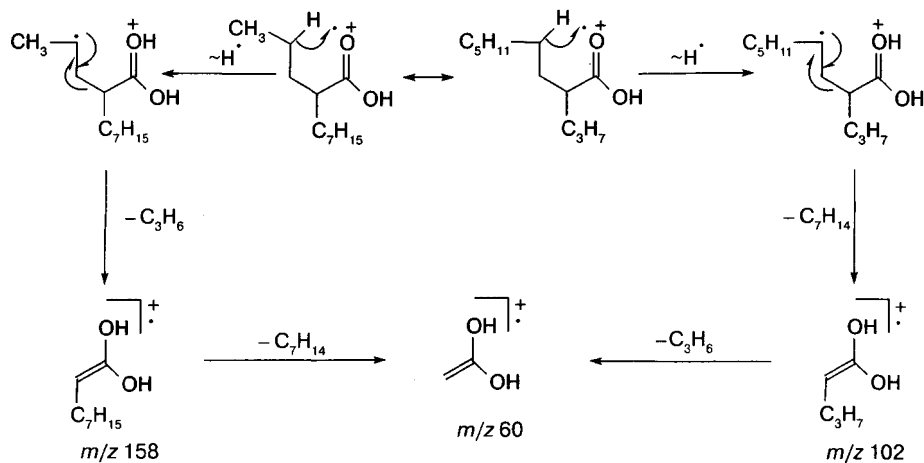


Схема 10.72

В случае сложных эфиров фрагментация $\text{M}^{+\cdot}$ может быть инициирована спиртовым атомом кислорода (аналогично простым эфирам, ионы с m/z 73 на рис. 10.91а и m/z 129 на рис. 10.91б). Помимо указанных выше перегруппировочных процессов, по кислотной цепи при достаточной длине спиртовой цепи (не менее двух атомов углерода) возможны еще две перегруппировки (схема 10.73). Первая из них является типичным примером перегруппировки Мак-Лафферти, а вторая заключается в переносе двух атомов водорода. Иногда ее называют «перегруппировка Мак-Лафферти + 1». Кстати, помимо сложных эфиров, она характерна для фрагментации тиоэфиров, амидов и фосфатов. Миграция гидрид-иона на второй стадии перегруппировки Мак-Лафферти + 1 осуществляется через четырехчленное переходное состояние от того же β -атома углерода, от которого ушел атом водорода на первой стадии [43]. Следует, однако, отметить, что признанного всеми механизма перегруппировки Мак-Лафферти + 1 пока нет. Некоторые исследователи считают, что второй атом водорода мигрирует из любого доступного положения спиртовой цепи [148]. Вновь следует подчеркнуть, что, поскольку энергии ионизации олефинов начиная с пропилена могут быть несколько ниже, чем энергии ионизации комплементарных карбоновых кислот, интенсивности пиков олефиновых ионов могут быть выше, чем интенсивности пиков альтернативных кислородсодержащих ионов. В частности, можно отметить высокие интенсивности пиков алкеновых

$$\begin{array}{c}
 \text{R} \quad \text{O}^+ \\
 \parallel \quad \diagup \\
 \text{C} \quad \text{O} \quad \text{CH}_2 \quad \text{CH} \quad \text{R} \\
 \quad \quad \quad | \\
 \quad \quad \quad \text{H}
 \end{array}
 \xrightarrow{\sim \text{H}^\cdot}
 \begin{array}{c}
 \text{R} \quad \text{OH} \\
 \parallel \quad \diagup \\
 \text{C} \quad \text{O} \quad \text{CH}_2 \quad \text{CH} \quad \text{R} \\
 \quad \quad \quad | \\
 \quad \quad \quad \cdot
 \end{array}
 \xrightarrow{-\text{RCHCH}_2}
 \begin{array}{c}
 \text{R} \quad \text{OH} \\
 \parallel \quad \diagup \\
 \text{C} \quad \text{O} \quad \text{CH}_2 \quad \text{CH} \quad \text{R} \\
 \quad \quad \quad | \\
 \quad \quad \quad \cdot
 \end{array}^+
 \quad m/z \ 60 \ (R=\text{CH}_3)$$

$$\begin{array}{c}
 \text{R} \quad \text{OH} \\
 \parallel \quad \diagup \\
 \text{C} \quad \text{O} \quad \text{CH}_2 \quad \text{CH} \quad \text{R} \\
 \quad \quad \quad | \\
 \quad \quad \quad \cdot
 \end{array}
 \xrightarrow{-\text{RC}_2\text{H}_2^\cdot}
 \begin{array}{c}
 \text{R} \quad \text{OH} \\
 \parallel \quad \diagup \\
 \text{C} \quad \text{O} \quad \text{CH}_2 \quad \text{CH} \quad \text{R} \\
 \quad \quad \quad | \\
 \quad \quad \quad \cdot
 \end{array}^+
 \quad m/z \ 61 \ (R=\text{CH}_3)$$

В предельном случае M^{++} сложных эфиров за счет перегруппировок по кислотной и спиртовой цепям фрагментируют до M^{++} и MH^+ уксусной кислоты. Исключениями являются метиловые эфиры любых кислот, а также любые эфиры α -метилзамещенных карбоновых кислот. На схеме 10.74 изображены основные процессы фрагментации гексилгексаноата, спектр которого представлен на рис. 10.91в.

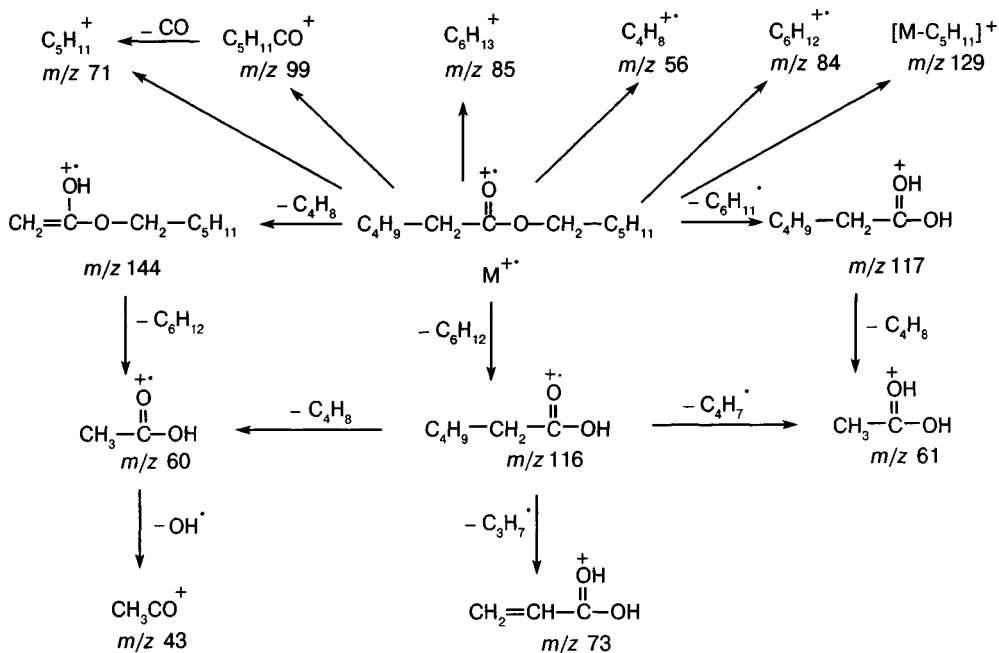


Схема 10.74

Масс-спектрометрическое поведение жиров (триглицеридов) и других липидов рассмотрено в разд. 11.2. Современные методы ионизации и регистрации ионов позволили достичь значительных успехов в определении молекулярных масс, состава, структуры и модификаций этого широчайшего класса соединений.

Молекулярные ионы дикарбоновых кислот менее устойчивы. Их пики в масс-спектрах едва заметны. Основные первичные процессы фрагментации связаны с элиминированием одной или двух молекул воды, а в некоторых случаях — молекулы CO_2 [905]. Ионы $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ далее могут элиминировать молекулы CO , CO_2 или радикал COOH^\cdot , что свидетельствует о возможном образовании ионов со структурой циклических ангидридов. Наличие алкильных заместителей в цепи дикарбоновых кислот и их эфиров благоприятствует протеканию перегруппировки Мак-Лафферти по обоим карбоксильным группам (m/z 74 и 102 на рис. 10.92).

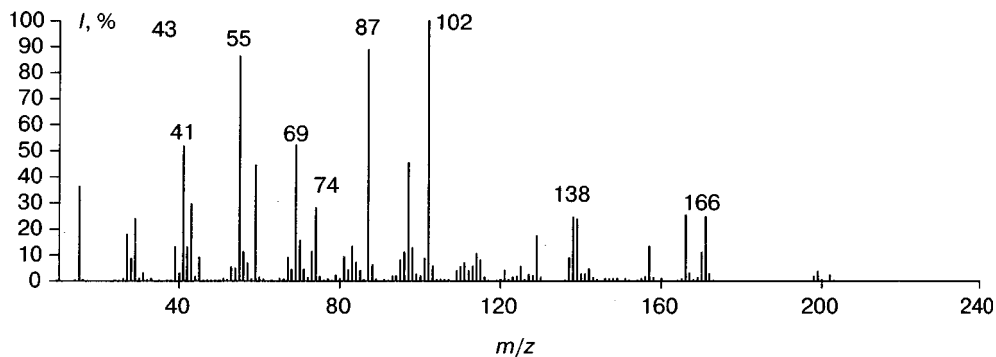


Рис. 10.92. Масс-спектры ИЭ диметилового эфира 2-этилоктандиовой кислоты

Ароматические кислоты и сложные эфиры характеризуются интенсивными пиками молекулярных ионов. Один из наиболее интенсивных пиков фрагментных ионов принадлежит арильному иону, который далее теряет молекулу CO , с образованием арильного катиона. Этот ион может образоваться и напрямую из M^{++} (рис. 10.93). Замещенные ароматические кислоты являются отличными модельными соединениями для изучения *орто*-эффекта. Во многих случаях соответствующий пик имеет максимальную интенсивность в спектре (см. пик иона с m/z 118 в спектре *орто*-толуиловой кислоты на рис. 10.93а).

Для фенилалкановых кислот характерно отщепление молекулы воды. Пик соответствующего иона может быть весьма интенсивен в спектре. Однако максимальную интенсивность чаще имеют пики ионов, обусловленных бензильным разрывом, перегруппировкой Мак-Лафферти, а также пик иона со структурой стирола (рис. 10.94).

Для масс-спектров фениловых эфиров характерен пик иона с m/z 94, имеющего структуру фенола и образующегося по механизму перегруппировки Мак-Лафферти с выбросом молекулы кетена (рис. 10.95). Образование молекулярного иона бензилового спирта в результате перегруппировочного процесса с выбросом молекулы кетена характерно для фрагментации бензиловых эфиров жирных кислот.

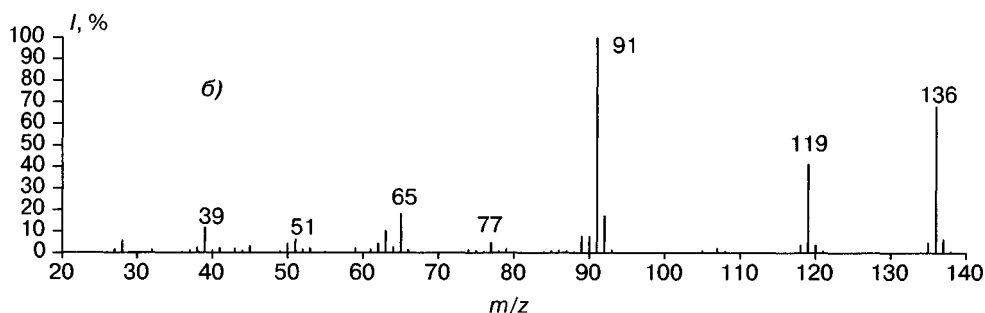
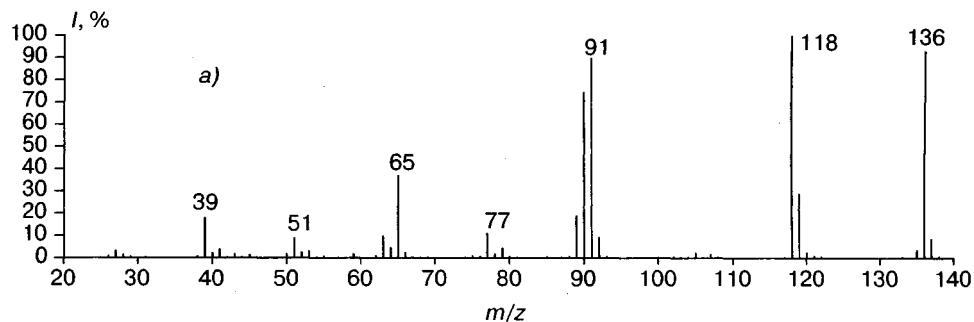


Рис. 10.93. Масс-спектры ИЭ *орто*-толуиловой кислоты (а), *мета*-толуиловой кислоты (б)

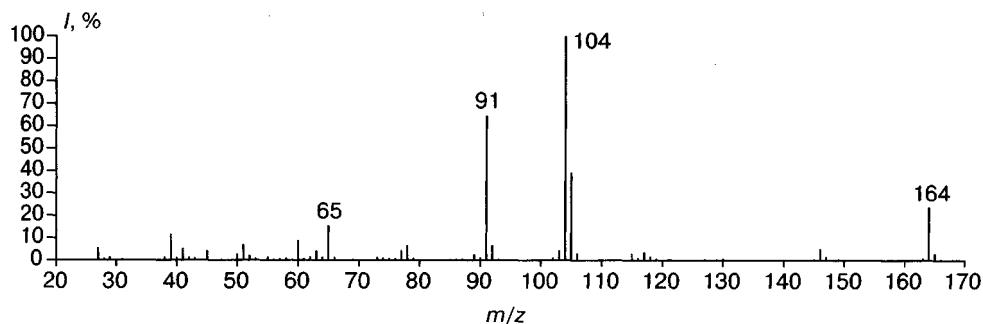


Рис. 10.94. Масс-спектр ИЭ 4-фенилбутановой кислоты

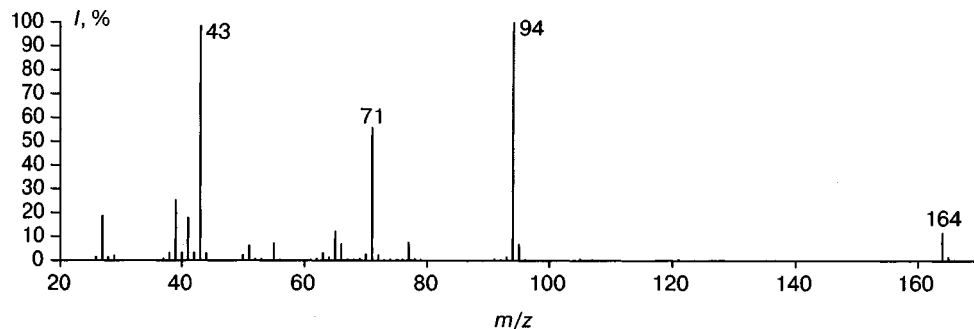


Рис. 10.95. Масс-спектр ИЭ фенилбутирата

Диалкиловые эфиры *орто*-фталевой кислоты являются весьма стабильными соединениями. Их широчайшее использование в качестве пластификаторов привело к значительному загрязнению ими окружающей среды. Фактически любая проба (вода, почва, воздух, пищевые продукты и т.д.), контактировавшая с полимерными материалами, содержит фталаты. Во многих странах они внесены в перечни приоритетных загрязняющих веществ. Для соединений этого класса, за исключением диметилового эфира, важнейшей характеристикой спектра ИЭ является доминирующий пик иона с m/z 149. Именно по этому пику фталаты можно легко детектировать в самых разнообразных смесях. Образование этого иона идет по механизму, представленному на схеме 10.75.

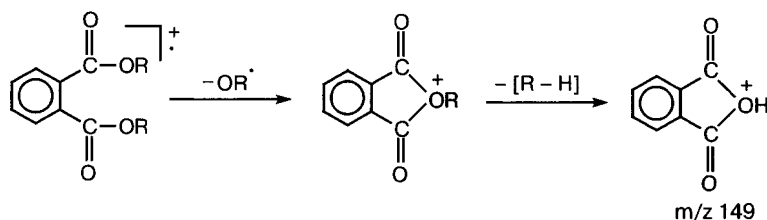


Схема 10.75

Интенсивность пиков молекулярных ионов ангидридов карбоновых кислот низка, несколько увеличиваясь в случае ненасыщенных кислот. Кроме того, при увеличении напуска образца в источник возрастает интенсивность пика иона MH^+ . Основные пики в спектрах ионизации электронами обусловлены ацильными ионами, которые далее теряют молекулу CO (рис. 10.96). В случае смешанных ангидридов по величинам m/z ацильных ионов легко определить, какими кислотами образован ангидрид.

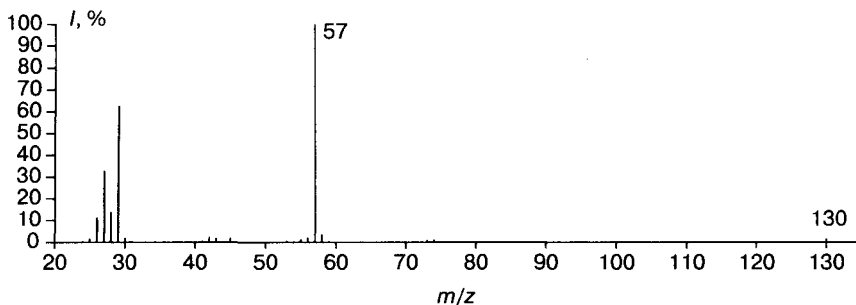


Рис. 10.96. Масс-спектр ИЭ ангидрида пропионовой кислоты

Для циклических ангидридов дикарбоновых кислот основной процесс заключается в элиминировании из M^{++} молекулы CO_2 . Образующийся ион отщепляет далее молекулу олефина или CO. Молекула CO может отщепиться и непосредственно из M^{++} , причем интенсивность этого процесса может быть выше по сравнению с отщеплением CO_2 (m/z 86 и 70 на рис. 10.97). Для фталевого ангидрида характерно последовательное элиминирование молекул CO_2 и CO.

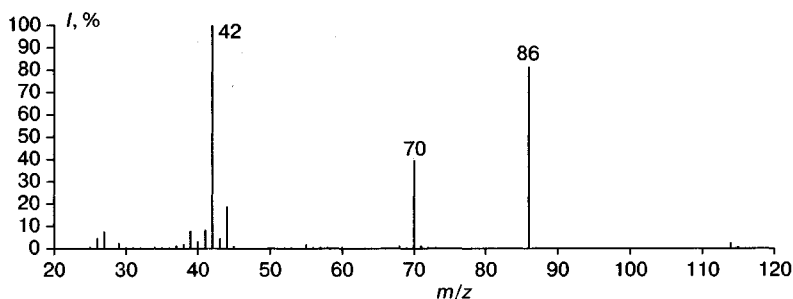


Рис. 10.97. Масс-спектр ИЭ ангидрида глутаровой кислоты

Фрагментация $M^{+\cdot}$ амидов напоминает распад $M^{+\cdot}$ сложных эфиров. Однако атом азота создает свои особенности, поскольку в электронно-невозбужденном состоянии заряд и неспаренный электрон с большей вероятностью локализованы именно на нем. Интенсивности пиков молекулярных ионов невысоки, но эти пики вполне различимы в спектрах.

Максимальной интенсивностью в масс-спектрах амидов низших кислот обладает ион с m/z 44 ($OCNH_2^+$). В случае более длинных алкильных цепей C—C разрывы приводят к гомологической серии ионов с m/z 58, 72, 86 и т.д., а аналогичные разрывы с миграцией атома водорода — к серии ионов с m/z 59, 73, 87 и т.д. В основной серии характеристических ионов с четными массами наблюдаются повышенные интенсивности пиков ионов, отстоящих друг от друга на 56 дальтон, начиная с m/z 72 для незамещенного амида (m/z 72, 128, 184 на рис. 10.98а). Механизм их образования аналогичен описанному выше для карбоновых кислот и их эфиров (схема 10.69). Пики углеводородных ионов значительно менее интенсивны, чем в спектрах кислот и сложных эфиров. На рис. 10.98 представлены масс-спектры ИЭ тетрадеканамида и N,N-диэтилдеканамида.

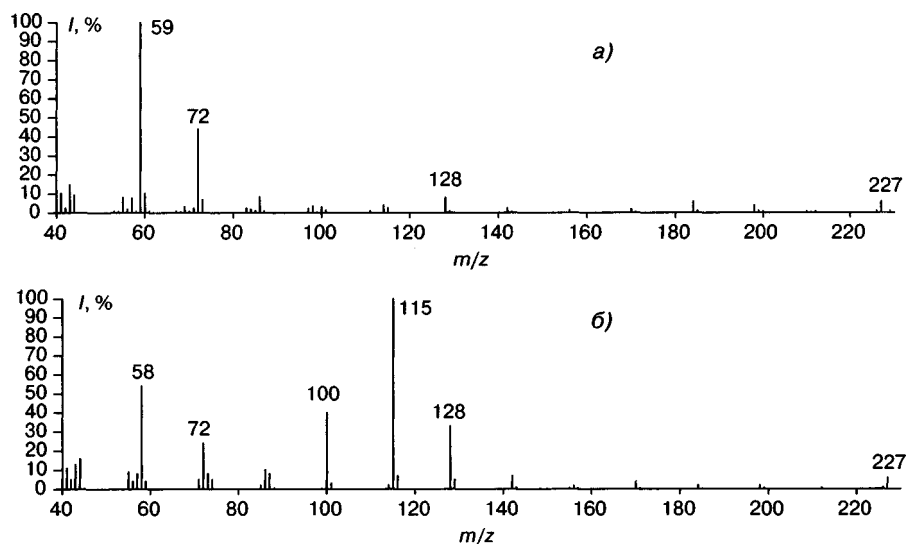


Рис. 10.98. Масс-спектры ИЭ: тетрадеканамида (а), N,N-диэтилдеканамида (б)

Отщепление молекулярным ионом амидной группы с образованием ацильного иона (процесс, характерный для сложных эфиров) в случае незамещенных амидов практически не идет. Несколько облегчается процесс разрыва этой связи в $M^{+\cdot}$ диалкиламидами, однако заряд предпочтительно остается на атоме азота. Например, в спектре N,N-диэтилдеканамида (рис. 10.98б) ацильный пик (m/z 155) едва заметен, тогда как интенсивность пика альтернативного аминного иона (m/z 72) существенна. Следует отметить, что ацилий-катион все же образуется при фрагментации амидов ароматических кислот.

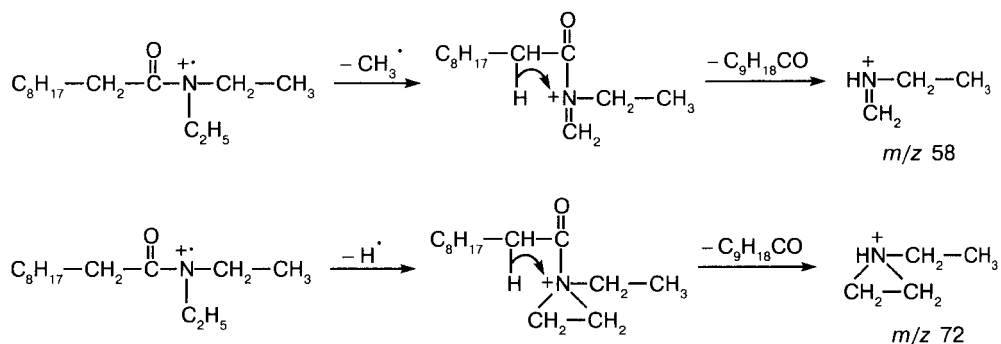


Схема 10.76

Перегруппировка Мак-Лафферти по кислотной цепи наблюдается при распаде амидов кислот начиная с масляной, а по аминным цепям — начиная с этильной. Для N-алкиламидами характерен обычный α -разрыв с последующим отщеплением молекулы кетена, а N-алкиламидами низших кислот могут элиминировать молекулу кетена непосредственно из $M^{+\cdot}$. Достаточно благоприятен для этих соединений также первоначальный β -разрыв. На схеме 10.76 процессы первоначального α - и β -разрыва представлены для случая N,N-диэтилдеканамида (рис. 10.98б). Следует подчеркнуть, что это не единственные направления образования ионов с m/z 58 и 72. Другими могут быть также структуры, и даже состав ионов, которые образуются при распаде $M^{+\cdot}$ амидов и имеют эти величины m/z .

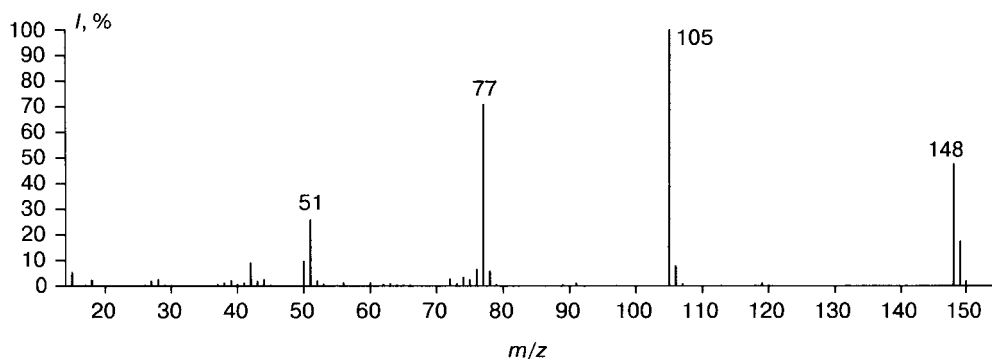


Рис. 10.99. Масс-спектр ИЭ N,N-диметилбензамида

Молекулярные ионы амидов ароматических кислот достаточно устойчивы. Основной процесс распада предполагает отщепление аминного радикала с образованием ароильного иона, который далее теряет молекулу CO (рис. 10.99). В спектрах N-фенилалкиламидов максимальный пик в спектре принадлежит $M^{+\cdot}$ аналина, который образуется при отщеплении молекулы кетена из молекулярного иона.

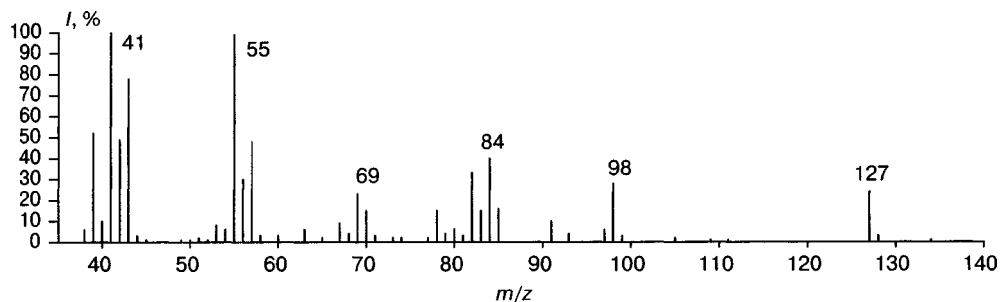


Рис. 10.100. Масс-спектр ИЭ октаноилхлорида

Молекулярные ионы галогенангидридов карбоновых кислот нестабильны, легко отщепляют атом галогена, в связи с чем их пики в спектрах не наблюдаются. Максимальное значение m/z имеют ацильные ионы. Большая часть ионного тока приходится на долю углеводородных фрагментов. Тем не менее атом галогена сохраняется в составе ряда фрагментных ионов. На рис. 10.100 в спектре октаноилхлорида можно выделить два дублета с характерным для одного атома хлора (3 : 1) соотношением интенсивностей (m/z 78, 80 и m/z 91, 93). Первый образуется в результате перегруппировки Мак-Лафферти, а второй эквивалентен иону с m/z 87, образующемуся при распаде метиловых эфиров кислот (схема 10.69). Олефиновый ион с m/z 98 (рис. 10.100) образуется при одновременном отщеплении молекул HCl и CO из $M^{+\cdot}$ (схема 10.77). Этот процесс не характерен для амидов и сложных эфиров.

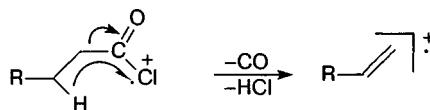


Схема 10.77

Химическая ионизация. Пики протонированных молекул карбоновых кислот достаточно интенсивны в спектрах ХИ метаном. Характерный процесс фрагментации связан с отщеплением молекулы воды. Для ароматических кислот можно отметить также выброс из MH^+ молекулы CO_2 . Интенсивность пика $[MH-H_2O]^+$ резко возрастает при наличии в молекуле второй карбоксильной группы [906] или (для ароматических кислот) *орто*-заместителей с неподеленными парами электронов [907]. Например, отношение интенсивностей пиков ионов $MH-H_2O]^+/MH^+$ для додекановой кислоты составляет 0,7, а для додекандиовой – 50. Геометрия молекулы должна способствовать пространственному распо-

ложению этих функциональных групп, при котором возможно их взаимодействие. В случае дикарбоновых кислот можно предположить образование ангидридов (схема 10.78), а в случае *орто*-замещенных ароматических кислот — взаимодействие заместителей (схема 10.79).

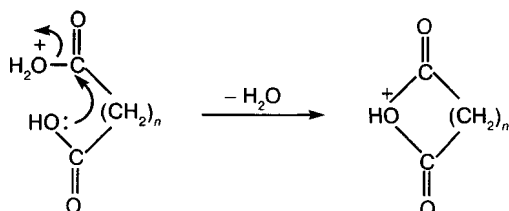


Схема 10.78

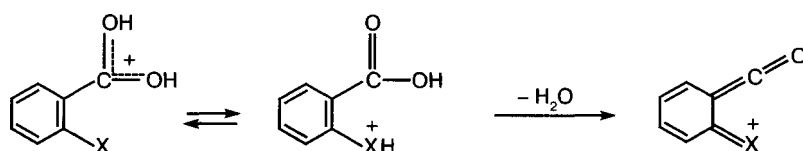


Схема 10.79

Пики протонированных молекул сложных эфиров имеют значительную интенсивность в масс-спектрах XH водородом, метаном, изобутаном. В двух последних случаях, помимо пиков MH^+ наблюдаются пики кластерных ионов, образующихся по механизму электрофильного присоединения (разд. 5.2). Интенсивность процессов фрагментации увеличивается с возрастанием экзотермичности протонирования в ряду водород > метан > изобутан. Для метиловых эфиров основной процесс фрагментации MH^+ обусловлен элиминированием молекулы спирта. Эта реакция аналогична элиминированию воды из MH^+ кислот. Присутствие второй карбоксильной группы активует этот процесс. С увеличением длины кислотной цепи метиловых эфиров усиливаются процессы с образованием иона $[\text{M}-\text{H}]^+$ и последующим отщеплением молекулы метилового спирта.

Для сложных эфиров с длинными цепями элиминирование молекулы спирта подавлено, а основные процессы включают выброс молекулы алкена с миграцией атома водорода от спиртового радикала, а также отщепление молекулы кислоты с возникновением углеводородного карбокатиона (схема 10.80). Фактически в этом процессе за протон конкурируют молекула кислоты и молекула олефина. Результат этой конкуренции определяется величинами сродства к протону этих соединений. Разветвления в спиртовой цепи, понижая СП соответствующего олефина, приводят к увеличению интенсивности алкильного иона [908]. Образование иона протонированной кислоты можно объяснить также на основе 1,3-сигматропного сдвига.

В условиях химической ионизации дикарбоновых кислот метиловым спиртом идет процесс этерификации [909]. Например, максимальный пик в спектре себаценовой кислоты принадлежит иону $[\text{MH}-2\text{H}_2\text{O}+2\text{CH}_3\text{OH}]^+$. Химическая ионизация водой позволяет провести в газовой фазе обратный процесс — гидролиз эфиров [910].

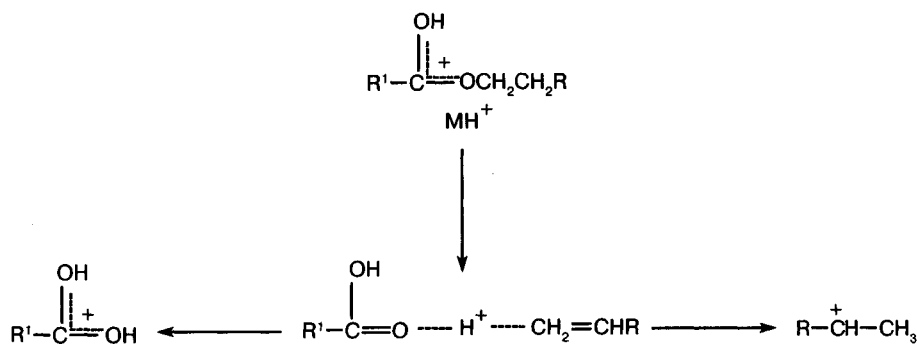


Схема 10.80

Для получения структурной информации об амидах можно использовать три-метилборат в качестве газа-реагента [212]. Ион-реагент $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{B}^+$, присоединяясь к атому азота, вызывает разрыв амидной связи, а присоединяясь к карбонильной группе, образует стабильный аддукт.

Химическая ионизация отрицательных ионов. Гидроксид анион легко отщепляет протон у карбоновых кислот. Образующийся карбоксилат-анион устойчив. Часто его пик оказывается единственным в спектре. Аналогично протекает ХИОИ хлорид-анионом. Следует отметить, что наряду с карбоксилат-анионом образуется и енолят-анион [911]. Дело в том, что, например, для протона карбоксильной группы [912] и протона метильной группы [913] в случае уксусной кислоты $\Delta H^\circ_{\text{кисл}} = 348$ и 363 ккал/моль соответственно. Изомерные ионы имеют определенные различия в направлениях фрагментации (в частности, карбоксилат-анионы теряют молекулу CO_2 , а енолят анионы — молекулу воды), но в условиях активации соударением изомеризуются друг в друга [913].

Депротонирование последующих гомологов карбоновых кислот протекает по карбоксильной группе, однако в результате прототропной таутомерии до начала фрагментации идет изомеризация части ионов $[\text{M}-\text{H}]^-$ в форму енолята. На схеме 10.81 представлены направления фрагментации депротонированной изомасляной кислоты. Потери атома водорода и метильного радикала характерны для карбоксилат-аниона, а потеря молекулы метана и образование гидроксид-аниона — для енолят аниона. Декарбоксилирование в данном случае не идет, поскольку величина сродства к электрону для изопропильного радикала отрицательна [914].

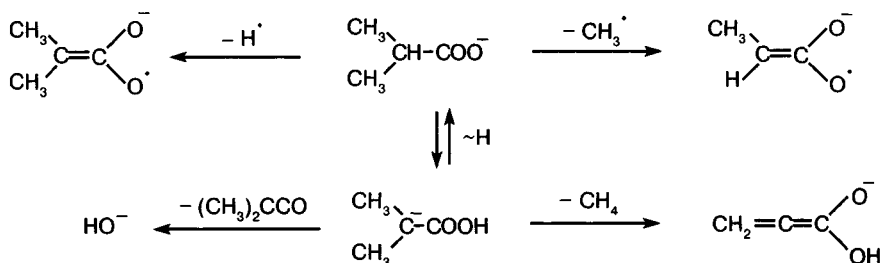


Схема 10.81

Для длинноцепочечных гомологов жирных кислот в условиях химической ионизации отрицательных ионов наиболее характерным процессом распада является фрагментация, удаленная от места локализации заряда (разд. 3.2.1).

Сложные эфиры R^1COOR в условиях химической ионизации гидроксид-анионом распадаются с образованием основных заряженных фрагментов $[M-H]^-$, $[M-H-ROH]^-$ и R^1COO^- [915, 916].

Фрагментация енолят-анионов сложных эфиров, активированная соударениями, протекает по целому ряду направлений [917–919]. На схеме 10.82 представлены направления фрагментации метилового эфира 2-этилмасляной кислоты. За исключением отщепления метильного радикала все реакции можно изобразить исходя из комплекса кетена с метокси-анионом.

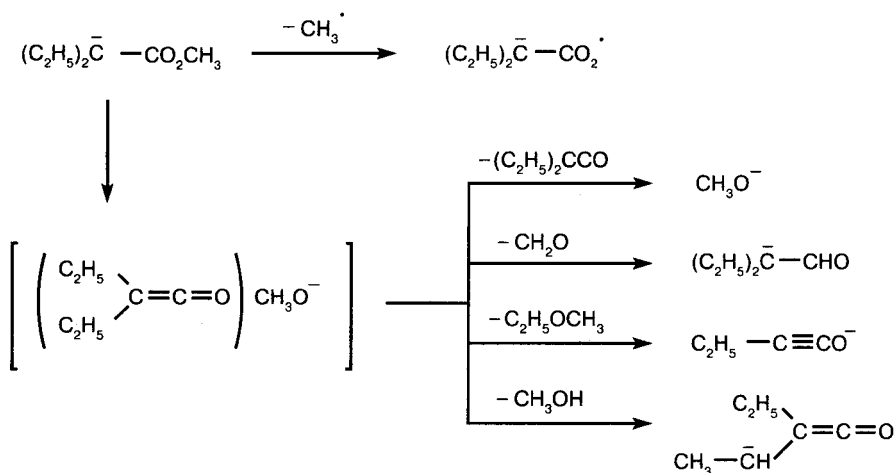


Схема 10.82

Ряд перегруппировочных процессов, характерных для енолятов сложных эфиров в газовой фазе, протекает по механизмам, хорошо известным в классической органической химии. Примером служит перегруппировка Кляйзена [920, 921] для депротонированного аллилфенилацетата (схема 10.83) и конденсация Дикмана [922, 923] для енолята диметилового эфира адипиновой кислоты (схема 10.84).

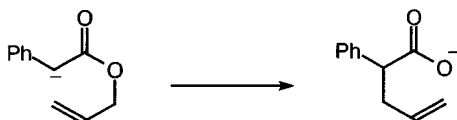


Схема 10.83

Вопросам фрагментации анион-радикалов амидов посвящена работа [924]. Их основные направления распада представлены на схеме 10.85.

В условиях ХИОИ амиды отщепляют прежде всего амидный атом водорода, поскольку его $\Delta H_{\text{кисл}}^\circ = 342$ ккал/моль (для амидного протона ацетамида), а $\Delta H_{\text{кисл}}^\circ$

метильного протона ацетамида составляет 375 ккал/моль [924]. Основные направления распада депротонированных молекул незамещенных, моно- и диалкилзамещенных по атому азота амидов подробно описаны в работе [925]. Схема 10.86 отражает основные направления фрагментации незамещенных амидов. В случае амидов ароматических кислот в спектре наблюдается также пик иона Ar^- . Число возможных направлений фрагментации возрастает при введении алкильного заместителя к атому азота [925].

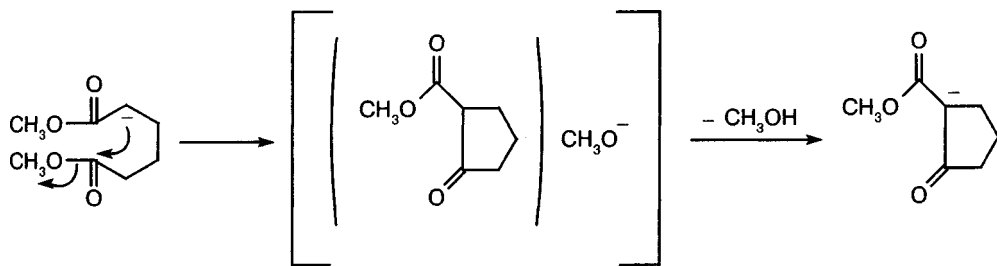


Схема 10.84

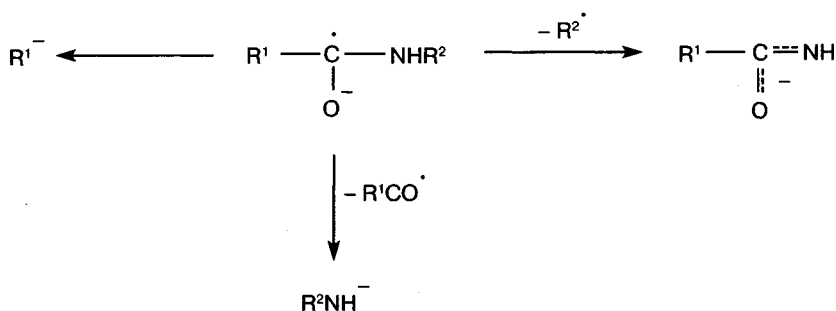


Схема 10.85

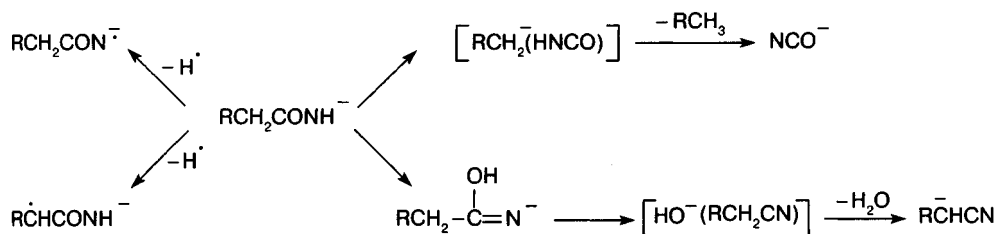


Схема 10.86

Если амидного протона нет, то образуется енолят-анион. На схеме 10.87 представлены основные направления распада депротонированной молекулы N,N -диэтилацетамида в условиях активации соударениями [925]. Богатство процессов фрагментации обусловлено возможной изомеризацией исходного енолят-аниона до начала фрагментации в результате переноса протона.

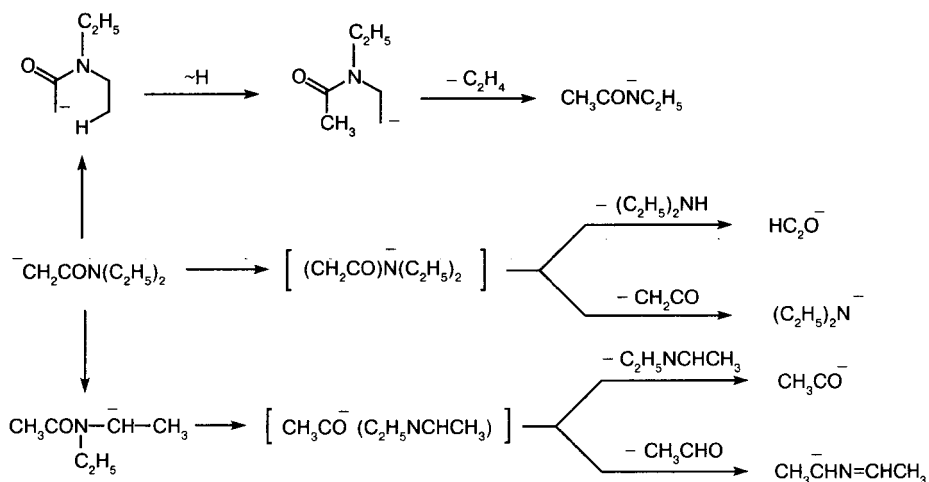


Схема 10.87

Задача 10.81. Для каких из перечисленных ниже соединений возможна перегруппировка Мак-Лафферти?

Ацетон, гексаль, пропиленбензол, диэтилбензол, пропионовая кислота, метилпропионат, этилформиат, пентанон-3, бутилбутаноат, октанол, бутилбензол, декан.

Задача 10.82. Как можно различить по масс-спектрам ИЭ перечисленные ниже изомерные органические соединения?

- масляную и изомасляную кислоты;
- 2-метилвалериановую и 3-метилвалериановую кислоты;
- α -фенилмасляную и β -фенилмасляную кислоты;
- децен-5-овую и децен-2-овую кислоты;
- гексановую кислоту и пропиленпропионат;
- метилоктаноат и октилацетат;
- этилбензоат и фенилпропионат;
- этилацетат и метилпропионат;
- бутилацетат и метилбутаноат;
- метилбутаноат и валериановую кислоту;
- винилпропионат и этилакрилат;
- 2,3,4-триметилдекановую и 5,6,7-триметилдекановую кислоты.

Задача 10.83. Какие перегруппировочные процессы возможны при фрагментации M^{++} перечисленных ниже соединений?

- бутилового эфира масляной кислоты;
- бутилового эфира изомасляной кислоты;
- этилпропионата;
- изопропилпропионата;
- 1-этилгексильного эфира 2-этилвалериановой кислоты;
- 2-(пара-метилфенил)гексильного эфира 6-фенилдодекановой кислоты;
- бензильного эфира валериановой кислоты;
- 3-фенилпропилового эфира 4-фенилмасляной кислоты.

Задача 10.84. Составьте схему фрагментации декановой кислоты, спектр ИЭ которой представлен на рис. 10.101.

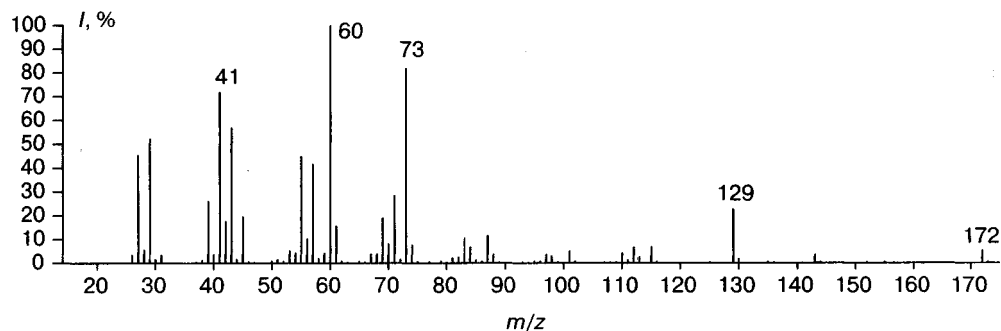


Рис. 10.101. Масс-спектр ИЭ декановой кислоты

Задача 10.85. Составьте схему фрагментации метилового эфира 2,4-диметилгептановой кислоты, спектр ИЭ которой представлен на рис. 10.102.

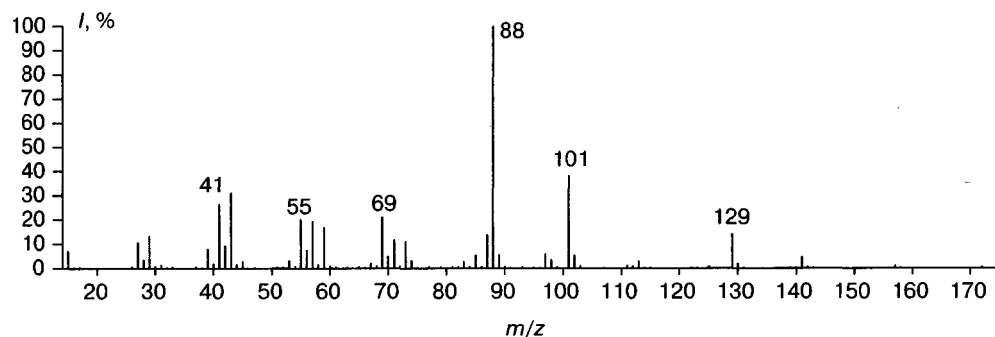


Рис. 10.102. Масс-спектр ИЭ метилового эфира 2,4-диметилгептановой кислоты

Задача 10.86. Составьте схему фрагментации амилового эфира валериановой кислоты, спектр ИЭ которой представлен на рис. 10.103.

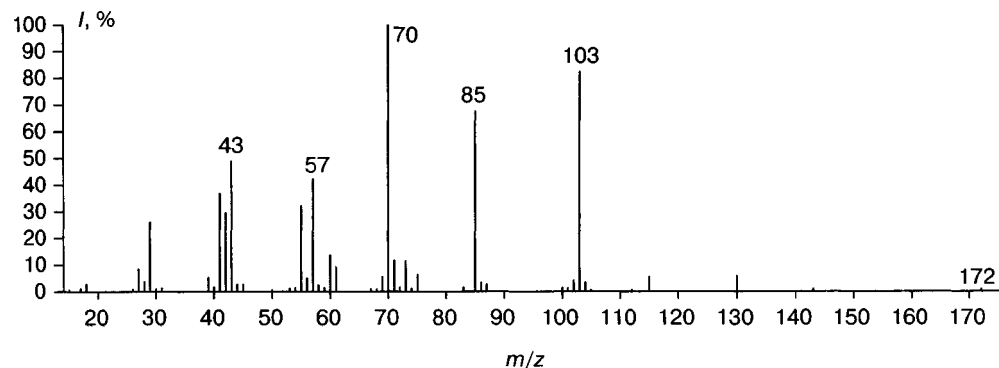
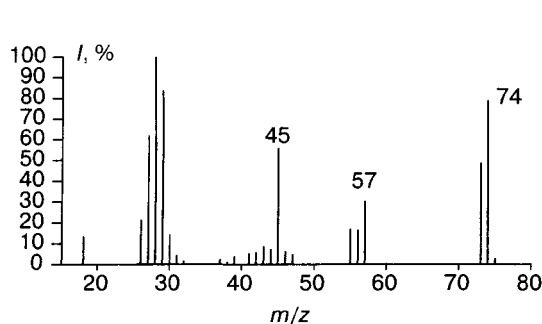


Рис. 10.103. Масс-спектр ИЭ амилового эфира валериановой кислоты

Задача 10.87. Составьте предполагаемые схемы фрагментации для M^{++} перечисленных ниже соединений.

- А) 2-метилбутановая кислота;
- Б) 3-метилбутановая кислота;
- В) изопропилацетат;
- Г) этилпропионат;
- Д) октилпропионат;
- Е) пропилбензоат;
- Ж) бутиловый эфир триметилуксусной кислоты;
- З) *втор*-бутилбензоат;
- И) бензилацетат;
- К) этиловый эфир фенилуксусной кислоты;
- Л) винилпропионат;
- М) 4-метилоктановая кислота.

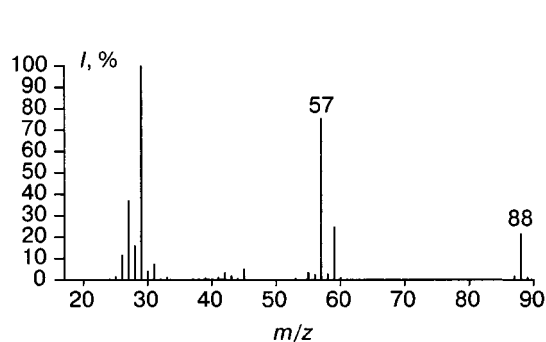
Задача 10.88. Идентифицируйте алифатическое соединение (нет циклов) по спектру ИЭ (рис. 10.104).



<i>m/z</i>	<i>I</i> , %	<i>m/z</i>	<i>I</i> , %
18	13,1	44	7,11
26	21,1	45	55,7
27	61,7	46	6,01
28	100	47	4,50
29	83,6	55	16,8
30	14,1	56	16,4
31	4,20	57	30,1
39	3,60	73	48,4
41	5,10	74	78,5
42	5,50	75	2,54
43	8,41	76	0,31

Рис. 10.104

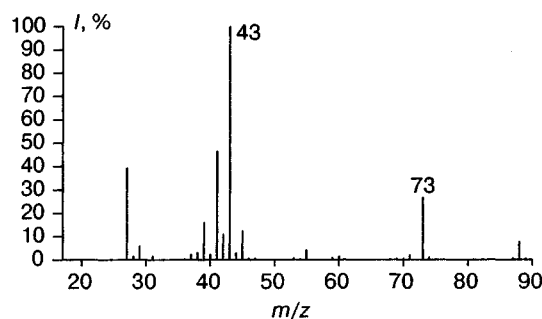
Задача 10.89. Идентифицируйте алифатическое соединение (нет циклов) по спектру ИЭ (рис. 10.105).



<i>m/z</i>	<i>I</i> , %	<i>m/z</i>	<i>I</i> , %
25	1,40	43	1,90
26	11,4	45	5,00
27	36,7	55	3,40
28	15,8	56	2,40
29	100	57	75,2
30	4,00	58	2,70
31	7,21	59	24,6
32	0,30	60	0,64
33	1,10	87	1,60
41	1,10	88	21,3
42	3,10	89	0,89

Рис. 10.105

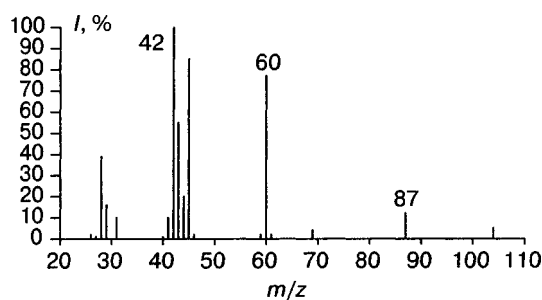
Задача 10.90. Идентифицируйте алифатическое соединение (нет циклов) по спектру ИЭ (рис. 10.106).



m/z	I, %	m/z	I, %
27	39,1	44	2,87
29	5,74	45	14,1
37	2,10	55	3,12
38	2,98	60	1,29
39	15,9	71	1,86
40	2,20	73	27,8
41	46,4	88	9,12
42	9,76	89	0,40
43	100	90	0,04

Рис. 10.106

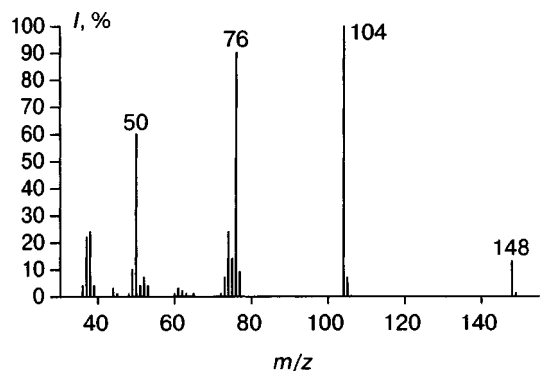
Задача 10.91. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.107).



m/z	I, %	m/z	I, %
26	2,12	45	85,0
27	1,24	46	2,23
28	37,5	59	1,84
29	15,7	60	79,4
31	8,44	61	1,75
40	1,11	69	5,18
41	11,6	87	12,0
42	100	88	0,40
43	55,0	104	5,00
44	20,1	105	0,17

Рис. 10.107

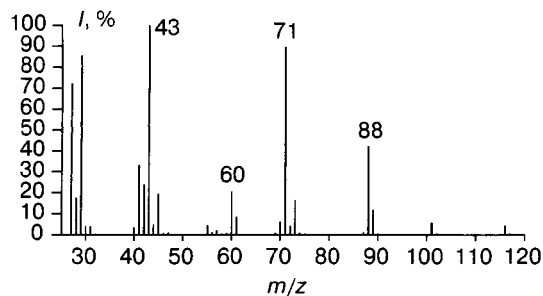
Задача 10.92. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.108).



m/z	I, %	m/z	I, %
26	7,01	53	4,72
27	3,27	61	3,27
28	4,17	73	7,01
29	2,13	74	24,3
36	4,17	75	14,7
37	22,0	76	90,1
38	24,3	77	9,01
39	4,17	104	100
44	3,27	105	7,61
49	10,1	106	0,45
50	60,5	148	13,0
51	4,17	149	1,19
52	7,01	150	0,11

Рис. 10.108

Задача 10.93. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.109).



m/z	I, %	m/z	I, %
27	71,9	56	1,00
28	17,3	60	20,2
29	85,3	61	8,31
30	3,80	70	6,01
31	3,70	71	89,4
41	32,8	73	16,3
42	23,7	88	41,9
43	100	89	11,7
44	4,60	101	5,71
45	19,1	116	5,12
55	4,40	117	0,34

Рис. 10.109

Задача 10.94. Составьте схему фрагментации 3-этилгептановой кислоты $C_9H_{18}O_2$, спектр ИЭ которой представлен на рис. 10.110.

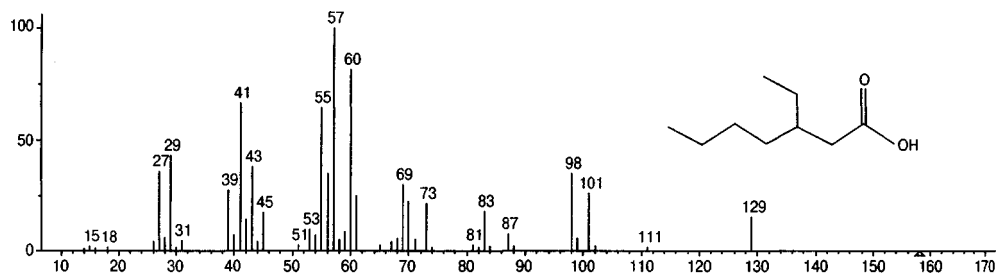


Рис. 10.110

Задача 10.95. Составьте схему фрагментации метилового эфира 4,8-диметилнонановой кислоты (рис. 10.111).

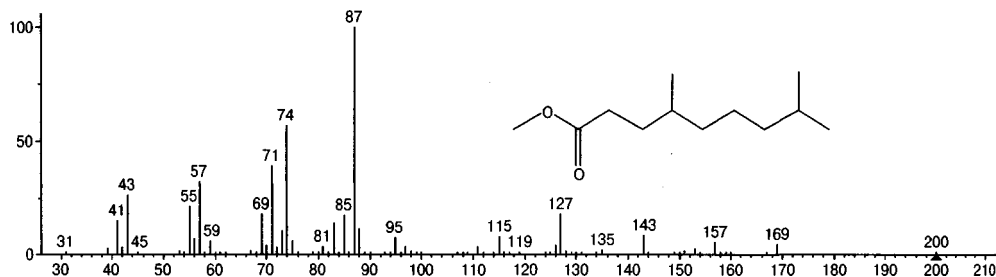


Рис. 10.111

Задача 10.96. На рис. 10.112 представлены спектры ИЭ трех изомерных метилпентановых кислот ($C_6H_{12}O_2$). Определите положение метильной группы для каждого изомера.

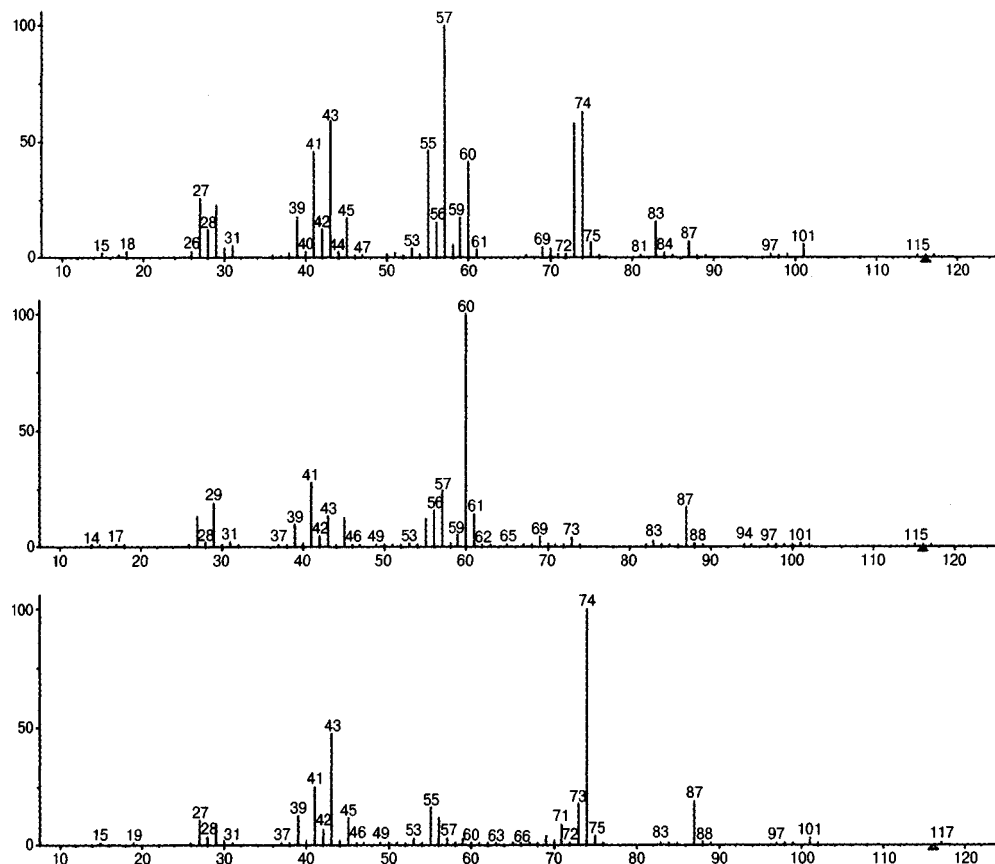


Рис. 10.112

Задача 10.97. Составьте схему фрагментации изобутилового эфира гексановой кислоты, спектр ионизации электронами которого представлен на рис. 10.113.

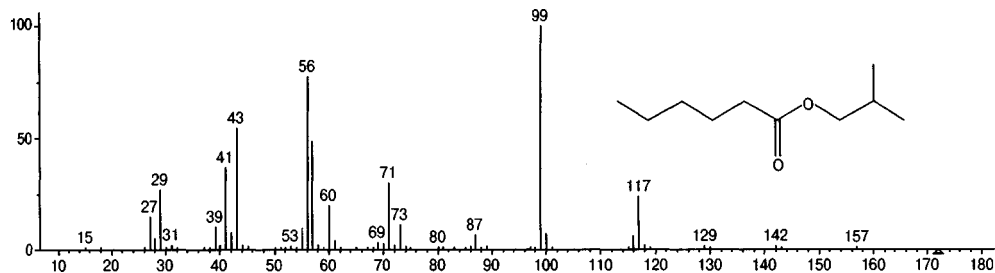


Рис. 10.113

Задача 10.98. Определите структуру органического соединения состава $C_6H_{10}O_4$ по его спектру ионизации электронами, представленному на рис. 10.114.

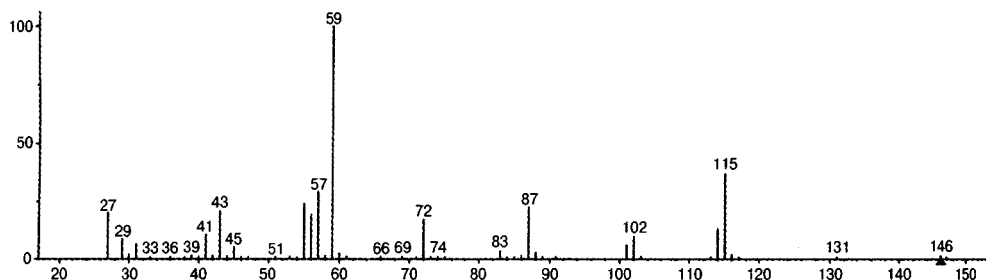
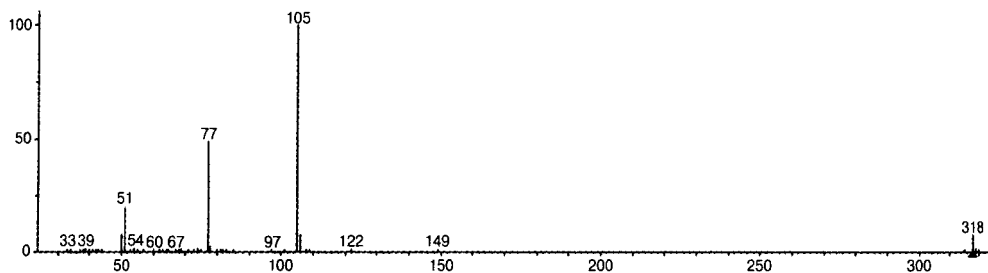


Рис. 10.114

Задача 10.99. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.115).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
38	9	39	15	40	10	50	71
51	194	54	15	74	13	75	10
77	483	78	24	105	1000	106	73
318	72	319	11	320	2		

Рис. 10.115

Задача 10.100. Какие перегруппировочные процессы протекают при фрагментации в условиях ИЭ перечисленных ниже соединений?

- А) N-этилгексанид;
- Б) N-пропилбутанид;
- В) N-изопропилпентанид;
- Г) N,N-диэтилбутанид;
- Д) N,N-диметил-2,10-диэтилгексадекананид.

Задача 10.101. Какие различия наблюдаются в спектрах ИЭ перечисленных ниже изомеров?

- А) N-этилацетида и N,N-диметилацетида;
- Б) бутанида и N-метилпропанида;
- В) 2-метилпропанида и N-этилацетида;
- Г) N-фенилацетида и ацида фенилуксусной кислоты;
- Д) деканида и N-амилпентанида.

Задача 10.102. Объясните образование основных ионов и составьте схему фрагментации в условиях ИЭ N-гексилбутанамида (рис. 10.116).

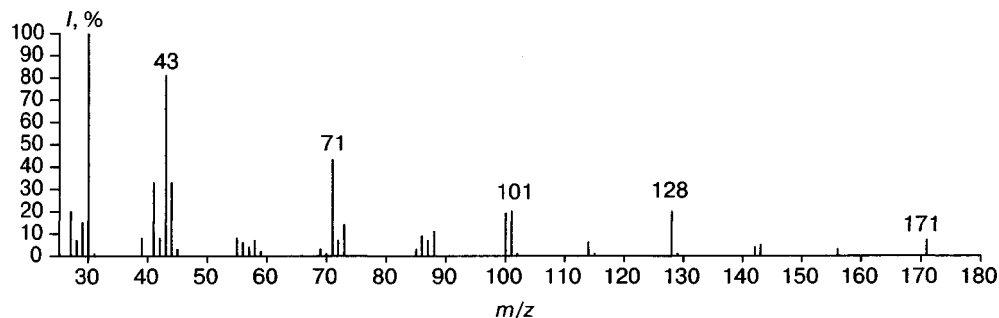


Рис. 10.116. Масс-спектр ИЭ N-гексилбутанамида

Задача 10.103. Объясните образование основных ионов и составьте схему фрагментации в условиях ИЭ N,N-диэтилбутанамида (рис. 10.117).

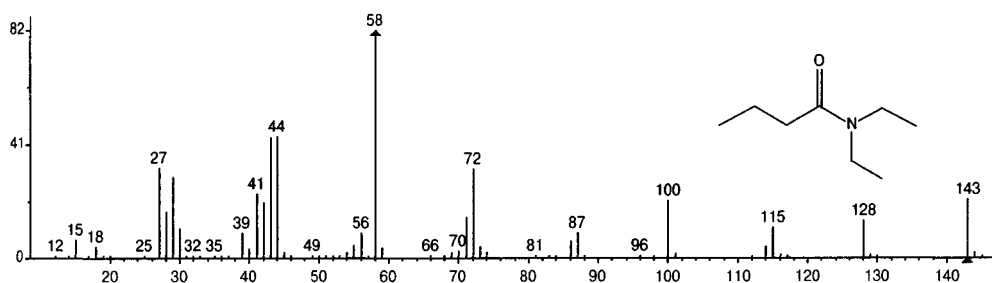
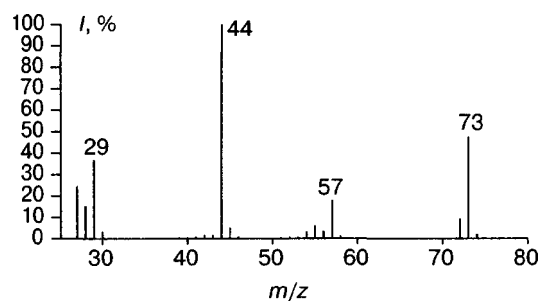


Рис. 10.117. Масс-спектр ИЭ N,N-диэтилбутанамида

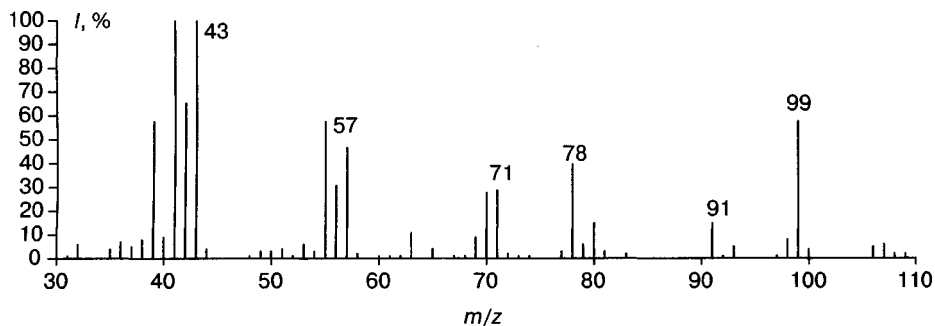
Задача 10.104. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.118).



m/z	I, %	m/z	I, %
27	24,3	54	2,86
28	15,0	55	5,72
29	36,4	56	3,21
30	3,07	57	17,6
42	1,41	58	0,92
43	1,42	72	9,04
44	100	73	49,0
45	4,75	74	1,81

Рис. 10.118

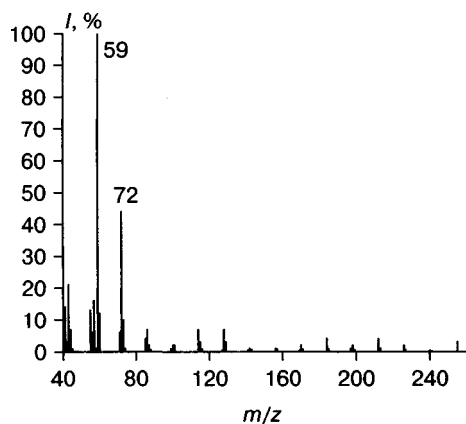
Задача 10.105. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 10.119).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
32	5,94	49	2,97	63	10,8	80	14,8
35	3,96	50	2,97	65	3,96	81	2,97
36	6,93	51	3,96	69	8,91	91	15,1
37	4,95	53	5,94	70	27,7	93	5,02
38	7,92	54	2,97	71	28,7	98	8,12
39	57,4	55	57,4	72	1,98	99	57,8
40	8,91	56	30,6	73	0,99	100	3,86
41	100	57	46,5	74	0,99	105	4,95
42	65,3	58	1,98	77	2,97	106	5,94
43	100	60	0,99	78	39,6	107	1,98
44	3,96	61	0,99	79	5,94	108	1,97

Рис. 10.119

Задача 10.106. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.120).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
41	14,2	101	2,47
43	21,0	114	7,57
44	7,72	115	3,18
55	13,7	128	7,24
56	6,39	129	3,32
57	16,6	142	1,03
59	100	156	1,38
60	12,3	170	2,76
71	6,27	184	4,23
72	44,3	197	1,09
73	10,9	198	2,55
74	1,02	212	4,78
85	4,87	213	1,11
86	7,56	226	2,34
87	2,22	255	3,15
100	2,54	256	0,55

Рис. 10.120

Задача 10.107. Составьте предполагаемые схемы фрагментации перечисленных ниже соединений в условиях ИЭ.

- А) N-этилбензамид;
- Б) N-этилпропанамид;
- В) N-этил-N-пропилацетамид;
- Г) бромангидрид валериановой кислоты;
- Д) 2-метилпропаноилхлорид.

Задача 10.108. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.121).

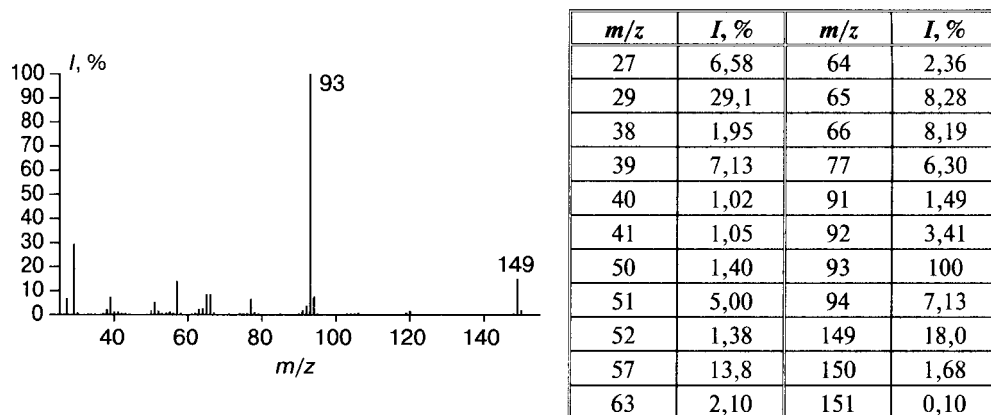


Рис. 10.121

10.12. Нитрилы, изонитрилы, нитросоединения, гидразины, оксимы и диазосоединения

Электронная ионизация. Среди монофункциональных соединений нитрилы характеризуются самыми высокими энергиями ионизации. В электронно невозбужденном состоянии заряд и неспаренный электрон локализованы на атоме азота. На рис. 10.122 представлен масс-спектр деканонитрила.

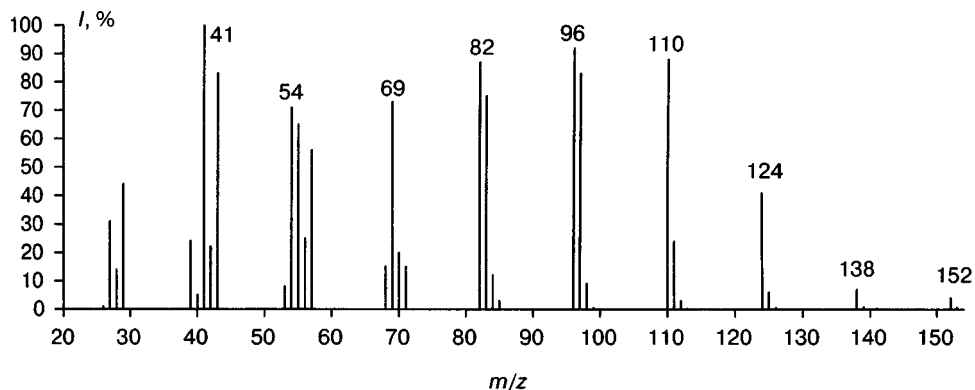


Рис. 10.122. Масс-спектр ИЭ деканонитрила

Молекулярные ионы нитрилов очень неустойчивы, хотя их пики все-таки присутствуют в спектрах. Более интенсивны (m/z 152 на рис. 10.122) пики ионов $[M-H]^+$. Атом водорода в этом случае отщепляется от атома C_2 , для которого энергия связи $C-H$ имеет значение, близкое к энергии аналогичной связи для аллильного положения [926]. При работе с нитрилами трудно избежать образования ионов MH^+ . α -Разрыв не характерен для нитрилов, поскольку должен приводить к четверной связи в катионе CN^+ . Элиминирование молекулы HCN также не является доминирующим направлением и протекает лишь при наличии в цепочке достаточно лабильных атомов водорода.

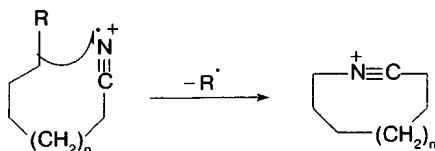


Схема 10.88

Две основные гомологические серии ионов имеют величины m/z 26, 40, 54, 68 и 27, 41, 55, 69, т.е. оказываются изобарны углеводородным сериям (разд. 10.1, 10.2). Ионы первой серии образуются в результате разрывов $C-C$ связей по всей длине углеводородной цепи, причем следует подчеркнуть, что обычные для других классов соединений α -разрывы не характерны для нитрилов. Наиболее интенсивные пики в этой серии (m/z 96, 110 на рис. 10.122) обусловлены, по-видимому, реакцией замещения с образованием циклических ионов (схема 10.88). Большой размер цикла по сравнению с рассмотренными ранее аналогичными реакциями аминов, тиолов и галогенидов объясняется геометрией тройной связи. Для того чтобы не было существенных искажений валентных углов, размер цикла должен быть не менее 6, а наиболее вероятны циклы, в которых $n = 0-2$.

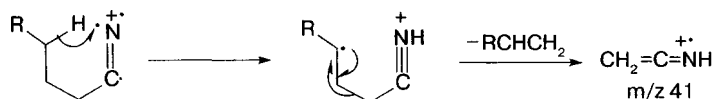


Схема 10.89

Серия нечетноэлектронных ионов образуется в результате элиминирования из M^{++} молекул олефинов. Для нитрилов эти реакции протекают достаточно активно, но оказываются не столь селективными, как это было описано для других классов органических соединений [927]. Значительно влияние скелетных перегруппировок и рандомизации атомов водорода. В частности, если ион с m/z 41 образуется по механизму перегруппировки Мак-Лафферти (схема 10.89), то потеря молекулы этилена из M^{++} может протекать с участием атомов углерода из разных положений алкильной цепи [154]. Наиболее интенсивный пик с m/z 97 в спектрах высших нитрилов обусловлен ионом циклической структуры (схема 10.90).

Энергии ионизации изонитрилов несколько ниже, чем у изомерных нитрилов. В электронно-невозбужденном состоянии заряд, по-видимому, расположен на ато-

ме азота, а неспаренный электрон — на атоме углерода. Молекулярный ион имеет большую склонность к α -разрыву с элиминированием радикала CN^\cdot и образованием углеводородного иона алкановой серии (рис. 10.123). Достаточно интенсивны также пики ионов, обусловленных выбросами из $\text{M}^{+\cdot} \text{HCN}$ и $\text{H}_2\text{CN}^\cdot$. Эти процессы позволяют различить изомерные нитрилы и изонитрилы по их масс-спектрам ИЭ.

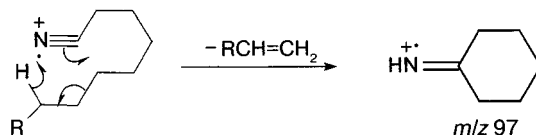


Схема 10.90

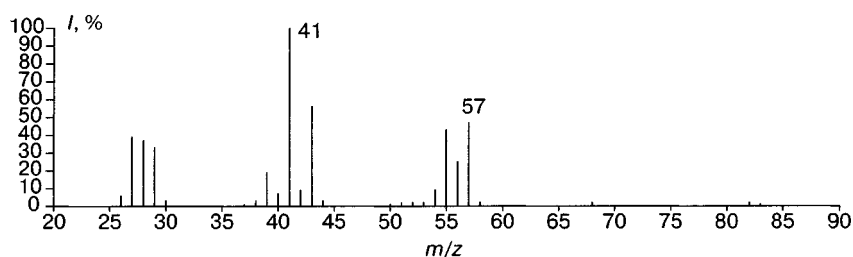


Рис. 10.123. Масс-спектр ИЭ бутилизоцианида

Достаточно высокую интенсивность имеет пик иона с m/z 41, образующийся в результате перегруппировки Мак-Лафферти (схема 10.91).

В отличие от алифатических аналогов ароматические нитрилы и изонитрилы характеризуются очень близкими масс-спектрами ИЭ. Пики $\text{M}^{+\cdot}$ очень интенсивны. Масс-спектр 4-фторбензонитрила представлен на рис. 10.124. Помимо пика $\text{M}^{+\cdot}$, можно отметить достаточно интенсивный пик иона $[\text{M}-\text{HCN}]^{+\cdot}$. Ионы $[\text{M}-\text{H}]^+$ и $[\text{M}-\text{CN}]^+$ характеризуются пиками с низкими интенсивностями. Для алкилзамещенных бензонитрилов важную роль играет предварительный бензильный разрыв с образованием иона тропилиевой структуры, который далее теряет молекулу HCN .

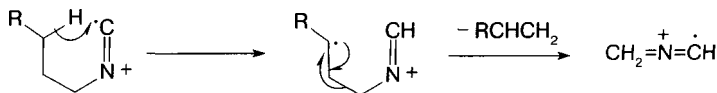


Схема 10.91

Введение в молекулу нитрогруппы приводит к заметному увеличению энергии ионизации. Благодаря высокому значению электроотрицательности нитрогруппа дестабилизирует катионы. В масс-спектрах алифатических нитросоединений пики $\text{M}^{+\cdot}$ отсутствуют. Главный первичный процесс распада связан с потерей нитрогруппы (рис. 10.125). В спектрах доминируют углеводородные ионы. Фактически отсутствует и серия гомологических ионов. Минорный процесс включает отщепление атома кислорода и молекулы воды с образованием ионов нитрилов. Аналогично распадаются алициклические нитросоединения.

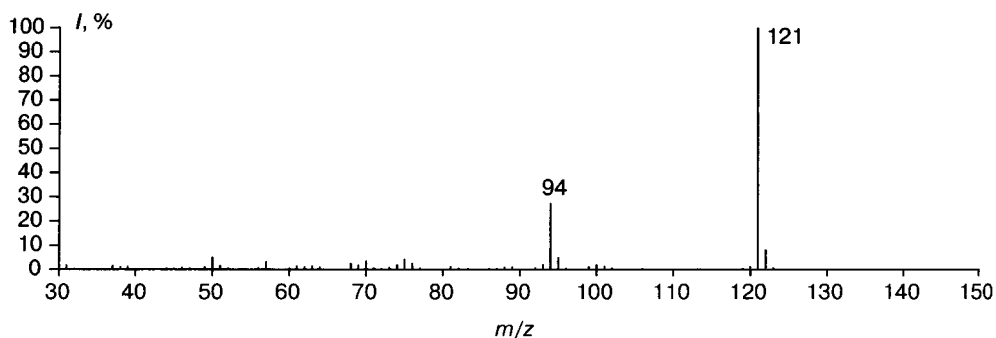


Рис. 10.124. Масс-спектр ИЭ 4-фторбензонитрила

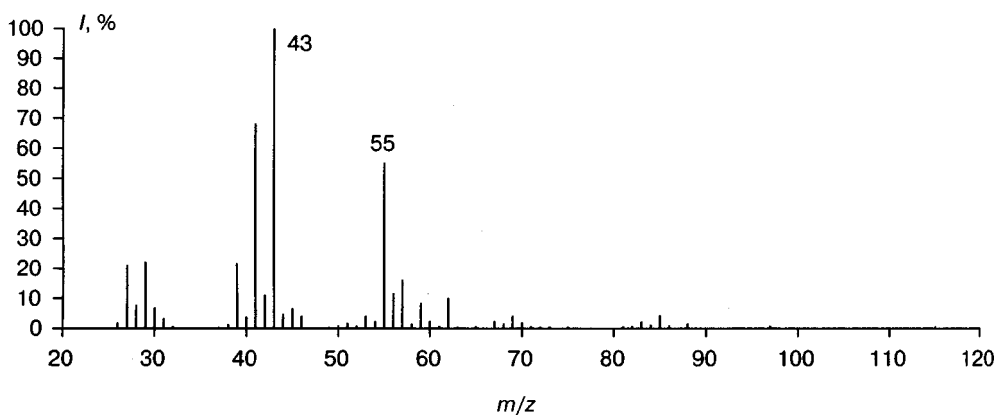


Рис. 10.125. Масс-спектр ИЭ 1-нитрогексана

Наличие алкильного заместителя соответствующей длины инициирует процесс по механизму перегруппировки Мак-Лафферти (схема 10.92). С увеличением длины цепи возрастает интенсивность пика иона, возникающего в результате миграции к нитрогруппе двух атомов водорода. Два иона с m/z 61 и 62 (для незамещенных по α -положению нитросоединений) образуются таким образом (аналоги ионов с m/z 60 и 61 в спектрах кислот).

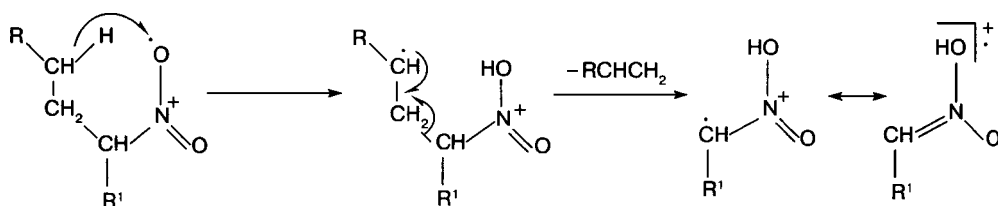


Схема 10.92

Пики молекулярных ионов ароматических нитросоединений достаточно интенсивны (рис. 10.126). Помимо нитрогруппы M^{+} , элиминируют атом кислорода и молекулу NO. Последний процесс становится возможным благодаря установлению

равновесия между двумя формами молекулярного иона (схема 10.93). Выброс молекулы NO сопровождается последующим отщеплением молекулы CO. Изомеризация в нитриты протекает и в случае алифатических нитросоединений. α -Разрыв в ионе такой формы обуславливает образование иона с m/z 60 при фрагментации незамещенных в α -положении нитроалканов [154].

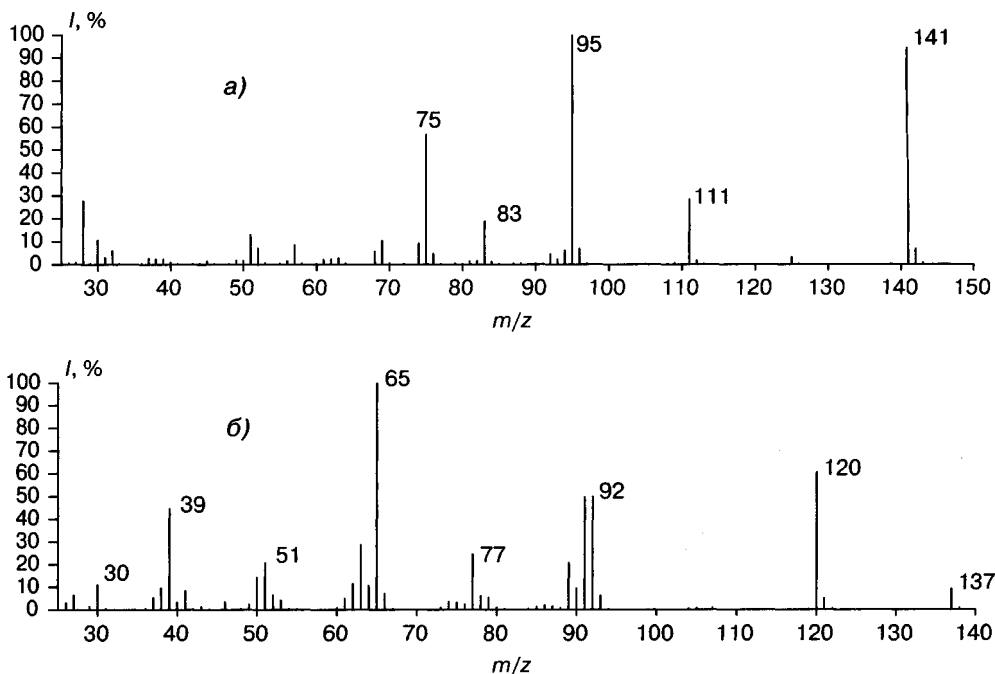


Рис. 10.126. Масс-спектры ИЭ: 4-фторнитробензола (а), 2-нитротолуола (б)

Наличие двух и более нитрогрупп в молекуле не меняет основных направлений распада. Высокую интенсивность в спектре могут иметь катионы NO_2^+ и NO^+ . Для алкилзамещенных нитробензолов наиболее характерен бензильный разрыв. При наличии трех атомов углерода в цепи протекает перегруппировка Мак-Лафферти (разд. 10.4).

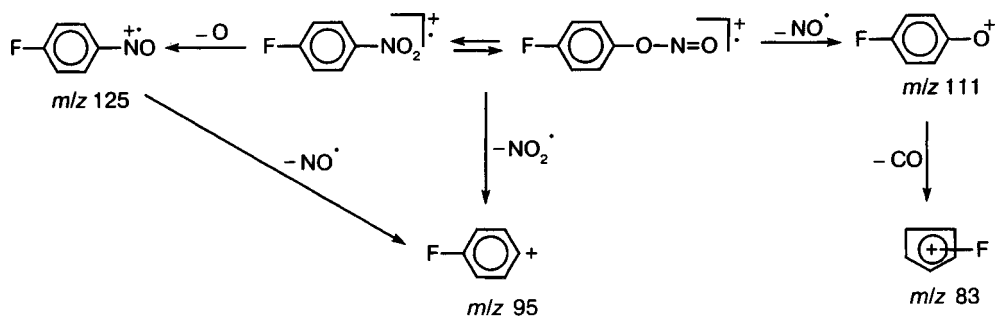


Схема 10.93

Нитрогруппа активно взаимодействует с заместителями в орто-положении, содержащими атомы водорода [162]. В спектре *орто*-нитротолуола максимальную интенсивность имеет пик иона $[M-OH]^+$, который образуется по механизму, аналогичному представленному на схеме 3.16. Этот факт позволяет легко отличать *орто*-нитросоединения от их *мета*- и *пара*-изомеров. Ион $[M-OH]^+$ в случае *орто*-нитротолуола далее элиминирует молекулу CO (m/z 92, рис. 10.126б), что свидетельствует об изомеризации исходной структуры иона $[M-OH]^+$. Этот процесс изомеризации предусматривает восстановление нитрогруппы. На схеме 10.94 подобный процесс восстановления, доказанный изотопными метками, показан на примере фрагментации *орто*-нитрофенилциклопропанов [928].

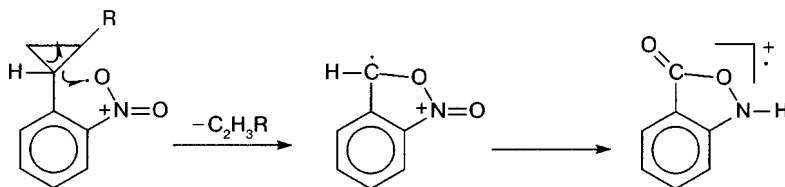


Схема 10.94

Молекулярные ионы замещенных гидразинов достаточно устойчивы (рис. 10.127). Заряд и неспаренный электрон могут быть локализованы на любом из атомов азота (предпочтительнее на более замещенном). Как следствие, первичная фрагментация идет по любому из заместителей. Может разорваться как связь C—C (аминный распад), так и связь C—N. Этот процесс становится особенно благоприятным для три- и тетраалкил-гидразинов (ион с m/z 87 на рис. 10.127б). Для полиалкилированных гидразинов возможно также образование иона R_2N^+ (фрагмент с m/z 72 на рис. 10.127б).

Схема 10.95 отражает направления фрагментации 1,1-дибутилгидразина, спектр которого приведен на рис. 10.127а. Основной первичный ион (m/z 101) распадается далее с выбросом молекул олефинов через четырехчленное или шестичленное переходное состояние (схема 10.45 для аминов). Достаточно интенсивными могут быть пики алкильных ионов (m/z 57 на рис. 10.127а). Возможен выброс молекулы аммиака (ион m/z 84).

Для арилзамещенных гидразинов предпочтительно сохранение ароматического ядра в заряженном фрагменте. В этом случае также возможен первоначальный разрыв N—N связи (рис. 10.127в).

В работе [829] описан синтез индолов по Фишеру в условиях химической ионизации (схема 10.96). Доказательством его протекания служит полная идентичность спектров MIKES иона $[M-NH_3]^+$ исходного фенилгидразона ацетона и MH^+ образующегося 2-метилиндола. Приведенная в работе схема превращения является общей для реакции в растворе и в условиях химической ионизации. Безусловно, лишь часть молекулярных ионов фенилгидразона ацетона трансформируется в индол, остальные же распадаются по ряду конкурентных направлений. Это наблюдение совпадает с известным фактом о незначительном выходе 2-метилиндола в реакции Фишера.

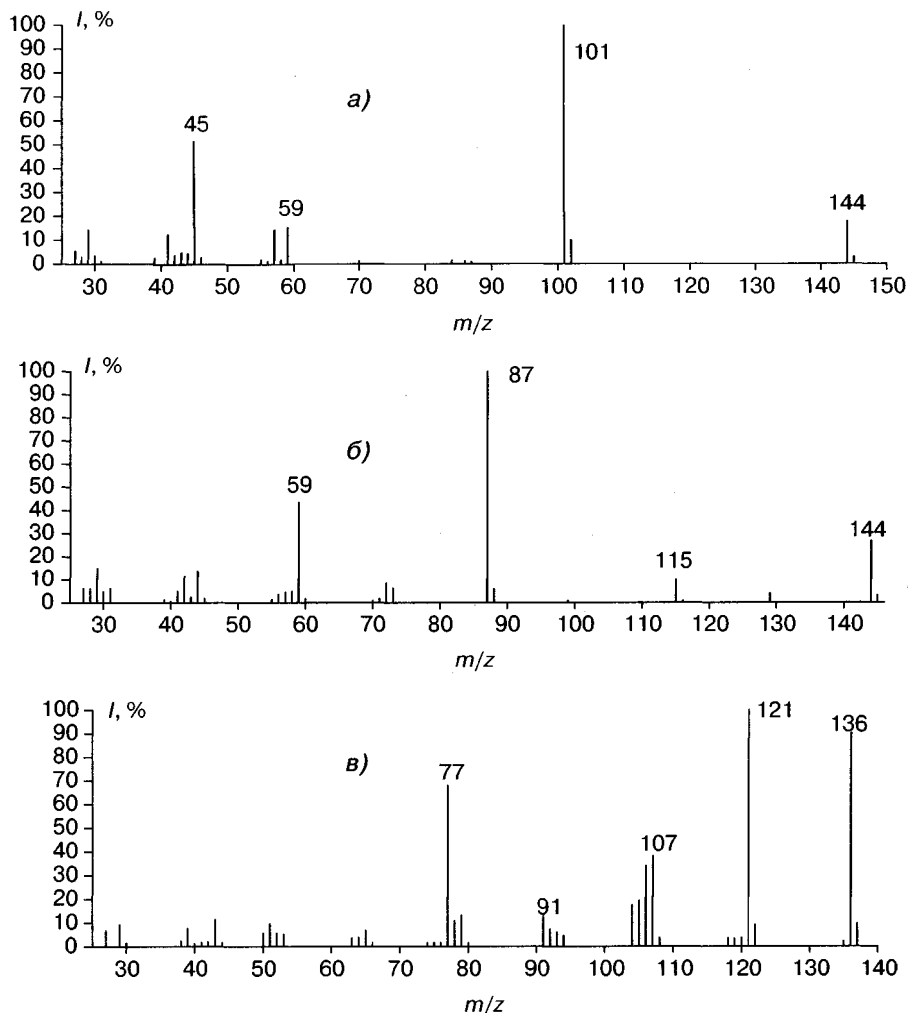


Рис. 10.127. Масс-спектры ИЭ: 1,1-дибутилгидразина (а); 1,1-диэтил-2-втор-бутилгидразина (б); 1-фенил-1-этилгидразина (в)

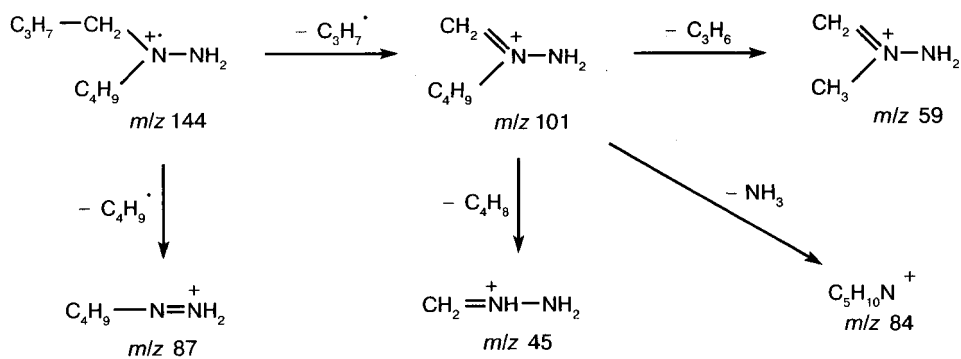


Схема 10.95

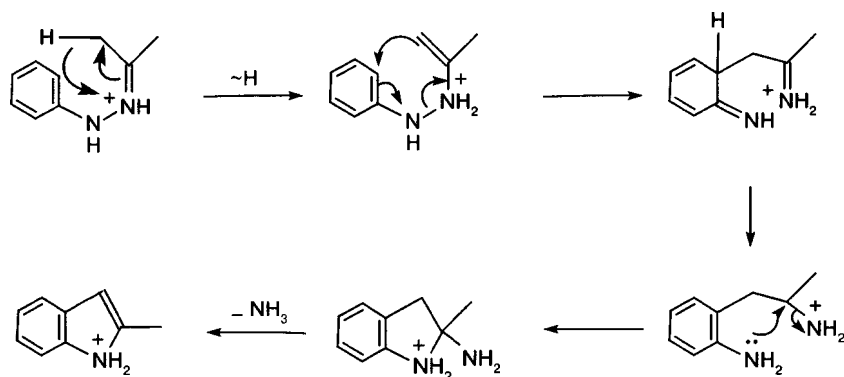


Схема 10.96

Интенсивность пиков молекулярных ионов оксимов алифатических альдегидов и кетонов мала (рис. 10.128). Наиболее важными процессами фрагментации являются перегруппировка Мак-Лафферти и выброс алкильного радикала с образованием циклического иона с m/z 72 (для алдоксинов). На схеме 10.97 представлены основные направления фрагментации оксима бутанала, масс-спектр которого приведен на рис. 10.128а. В случае кетоксинов перегруппировка Мак-Лафферти может идти последовательно по двум цепям (ионы с m/z 101 и 73 на рис. 10.128б).

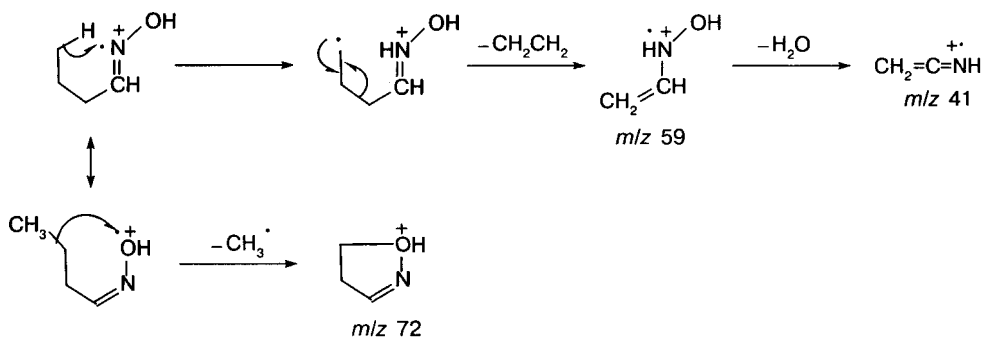


Схема 10.97

Пики M^{++} оксимов ароматических альдегидов и кетонов весьма интенсивны. Основные первичные направления фрагментации связаны с выбросом простейших частиц OH^+ , H_2O , CO , HCN , $HCNO$ и т.д. Для протекания этих процессов зачастую необходима значительная перестройка исходной структуры молекулы. Пики ионов $[M-R]^+$ в спектрах алдоксинов малоинтенсивны.

На схеме 10.98 представлены основные направления распада N-пропилимина гептанона-4. Схема не претендует на полноту и включает прежде всего перегруппировку Мак-Лафферти и вторичные перегруппировочные процессы через четырехчленное переходное состояние, а также α -разрывы. Все они очевидны, исходя из информации, полученной при рассмотрении фрагментации других классов органических соединений.

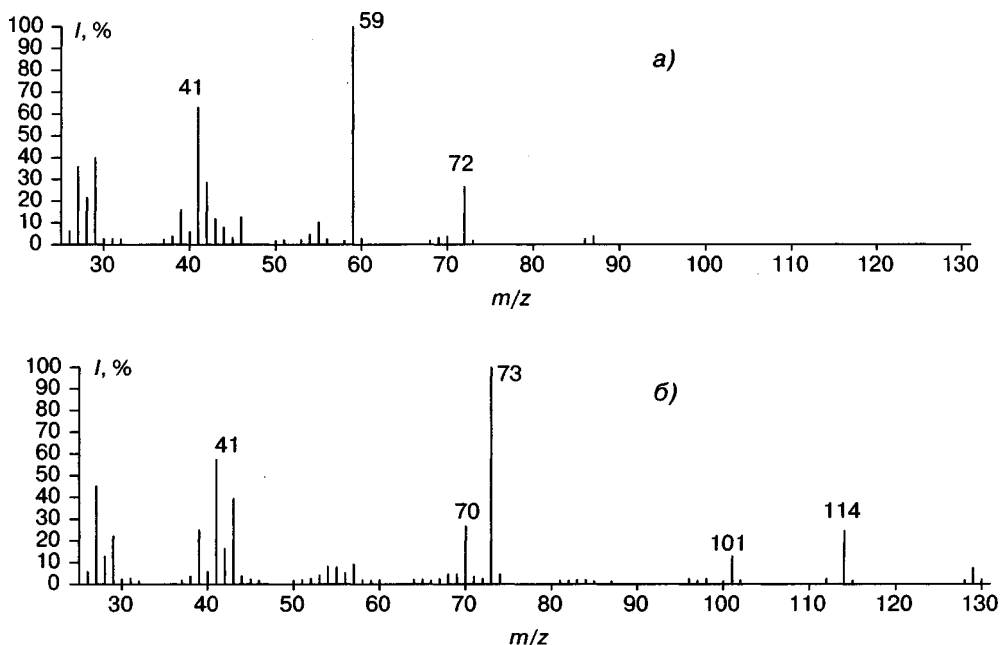


Рис. 10.128. Масс-спектры ИЭ: оксим бутаналь (а); оксим гептанона-4 (б)

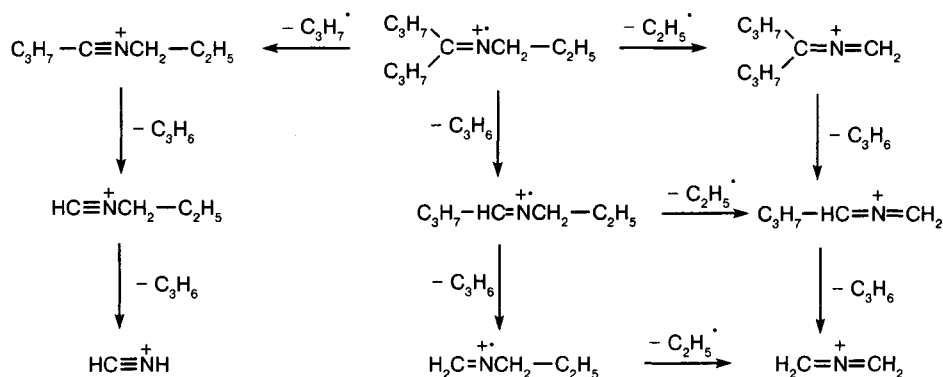


Схема 10.98

Интенсивность пиков $\text{M}^{+\cdot}$ диазокетонов существенно зависит от строения молекулы и для многих ароматических представителей этого класса может быть весьма высокой (рис. 10.129). Помимо очевидного отщепления радикала CHN_2^\cdot с образованием ацильного катиона, в спектрах диазокетонов наблюдается выброс молекулы азота, сопровождающийся перегруппировкой Вольфа, хорошо известной с начала XX века в органической химии (схема 10.99).

Зеллер с соавторами [929–931] установил, что перегруппировка протекает для широкого круга алифатических диазокетонов и диазокетоэфиров при их ионизации электронами, а также в условиях термоллиза и фотолиза. Так, трансформируются не только простейшие, но и более сложные циклические диазокетоны [932–935].

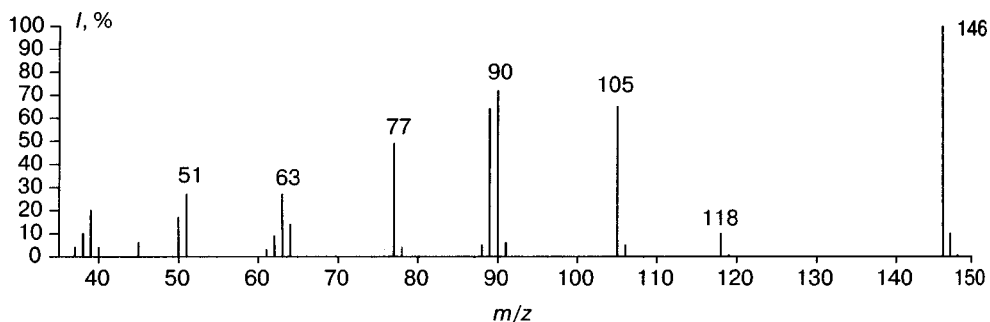


Рис. 10.129. Масс-спектр ИЭ диазоацетофенона

Было доказано, что во всех изученных случаях перегруппировка Вольфа является доминирующим процессом. С помощью изотопных аналогов было установлено, что альтернативный механизм, связанный с образованием эпоксидного цикла в качестве интермедиата, не реализуется [931]. Перегруппировка Вольфа является основным направлением трансформации и ароматических диазокетонов, в частности замещенных диазоацетофенонов [936].



Схема 10.99

Если в алифатической цепи диазокетонов содержатся гетероатомы или гетероатомные группировки, способные оказать анхимерное содействие элиминированию молекулы азота диазогруппы, то в присутствии кислых агентов такие диазокетоны могут подвергаться циклизации [729, 730]. Это наблюдение было положено в основу синтеза ряда ранее недоступных или труднодоступных гетероциклических систем. Движущей силой подобной реакции в растворе служит протонирование атома углерода диазокарбонильной группы (схема 10.100) с дальнейшей нуклеофильной атакой по возникшему электронодефицитному центру.

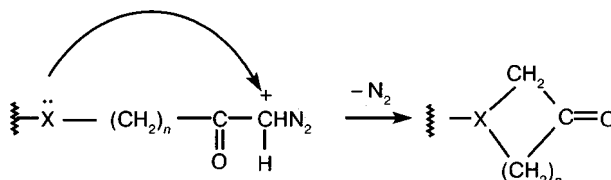


Схема 10.100

Детальные масс-спектрометрические исследования на широком круге диазокетонов, диазоэфиров и диазоамидов показали, что подобный процесс протекает и в газовой фазе в условиях электронной и химической ионизации [729, 730].

Химическая ионизация. Протонированные молекулы MH^+ нитро- и полинитроалканов достаточно устойчивы. Их пики имеют высокие интенсивности в

масс-спектрах ХИ метаном [937]. Это выгодно отличает химическую ионизацию от ионизации электронами. Основные процессы распада MH^+ включают элиминирование молекул H_2O , HNO , HNO_2 . Еще более надежную информацию о молекулярной массе алифатических нитросоединений можно получить при использовании в качестве газа-реагента аммиака [938]. В этом случае в спектрах доминируют пики ионов $[M+NH_4]^+$. В спектрах полинитроалканов высокую интенсивность может иметь пик иона NO_2^+ .

ХИ позволяет различать изомеры нитро-ароматических соединений [939]. Поскольку для этой цели желательно, помимо пика протонированной молекулы, иметь представительный ряд фрагментных ионов, лучшие результаты получаются при использовании в качестве газа-реагента водорода, для которого процесс ионизации характеризуется максимальной экзотермичностью (разд. 5.2). Ключевыми направлениями фрагментации, по которым можно идентифицировать изомер, являются потери молекулы воды и азотсодержащих фрагментов (NO , HNO , NO_2 , HNO_2). В частности, электронодонорные заместители с атомами водорода в *орто*-положении к нитрогруппе активизируют процесс элиминирования молекулы воды за счет *орто*-эффекта.

Отщепление гидроксильного радикала очень выгодно при наличии электронодонорного радикала в *орто*- или *пара*-положениях к нитрогруппе, тогда как потери азотсодержащих фрагментов благоприятны для *мета*-изомеров. Идентификация изомеров с электроноакцепторными группами проблематична [939].

Протонированные молекулы полинитроароматических соединений характеризуются интенсивными пиками. Фрагментация неинтенсивна и протекает с выбросами OH^+ , H_2O и NO [940]. Особенностью нитроароматических соединений является их способность восстанавливаться в амины в условиях химической ионизации протонирующими газами-реагентами [939, 941, 942]. Благодаря этому процессу в спектрах наблюдаются интенсивные пики протонированных молекул соответствующих аминов, которые ранее принимали за изобарные им ионы $[MH-NO]^+$. Этот процесс активируется при повышении температуры и наличии паров воды в источнике.

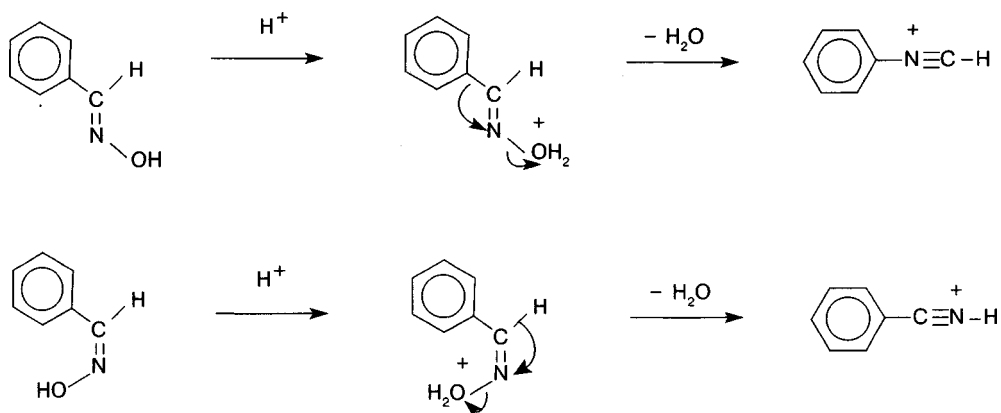


Схема 10.101

Первое сообщение о протекании в масс-спектрометре в условиях химической ионизации перегруппировки Бекмана появилось в работе [943]. Результаты более тщательного изучения этого процесса на целом ряде оксимов с ароматическими и алифатическими радикалами [944] показали, что механизм масс-спектрометрических процессов аналогичен перегруппировке Бекмана, катализируемой кислотами. Во всех случаях зарегистрирован высокий выход перегруппировочных ионов. Как и в растворах, мигрирует заместитель, находящийся в исходной молекуле в *анти*-положении к гидроксильной группе (схема 10.101).

Химическая ионизация отрицательных ионов. Нитросоединения характеризуются достаточно интенсивными пиками ионов $M^{-\cdot}$ в спектрах резонансного захвата электрона. В работах [940, 945] детально изучены процессы фрагментации их молекулярных анион-радикалов.

Выше уже отмечалось, что перегруппировка Бекмана для оксимов, протекающая в растворах под действием кислот, воспроизводится и в ионизационной камере масс-спектрометра в условиях химической ионизации. Пока нет данных об осуществлении подобного процесса в растворах под действием щелочей. Возможно, причина здесь кроется в том, что гидроксид-анион оксимов является чрезвычайно плохой уходящей группой. Между тем спектры активации соударением депротонированных простейших оксимов обнаруживают максимальный по интенсивности пик, обусловленный элиминированием молекулы воды. На основании исследования образующегося фрагмента с помощью изотопных аналогов сделан вывод о протекании перегруппировки Бекмана (схема 10.102) в этом случае [946]. Усложнение структуры оксимов приводит к конкурентным направлениям распада, а, например, для семикарбазонов перегруппировка вообще не наблюдается.

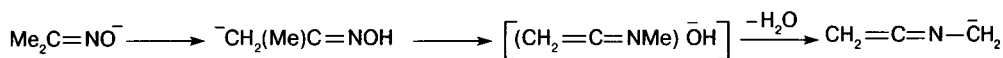


Схема 10.102

Перегруппировка Вольфа, подробно рассмотренная выше для положительных ионов, протекает и в условиях химической ионизации отрицательных ионов [947]. Например, депротонированный диазоацетофенон трансформируется в депротонированный арилкетен (схема 10.103), спектр активации соударением которого оказывается полностью идентичным полученному при фрагментации арилкетенового аниона, генерированного из этилового эфира фенилуксусной кислоты. Вероятно, перегруппировка, как и для катион-радикала, обусловлена миграцией карбаниона к электронодефицитному (хотя и несущему отрицательный заряд) атому углерода.

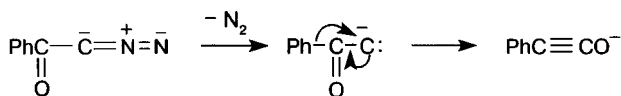


Схема 10.103

Задача 10.109. Объясните образование иона m/z 60 из молекулярного иона 1-нитродекана.

Задача 10.110. На рис. 10.130 представлены масс-спектры *орто*- и *мета*-нитротолуолов. Сделайте соотнесение.

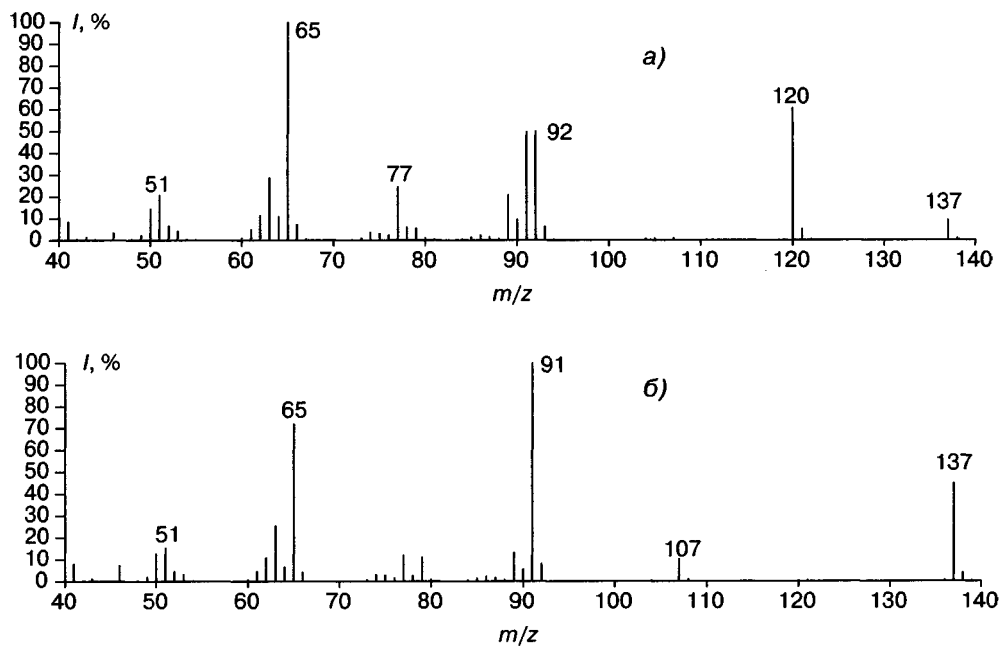


Рис. 10.130. Масс-спектры ИЭ *орто*- и *мета*-нитротолуолов

Задача 10.111. Объясните образование ионов с m/z 122, 109, 94, 93, 92, 81, 65 и составьте схему фрагментации в условиях ИЭ $M^{+\cdot}$ *орто*-нитрофенола (рис. 10.131).

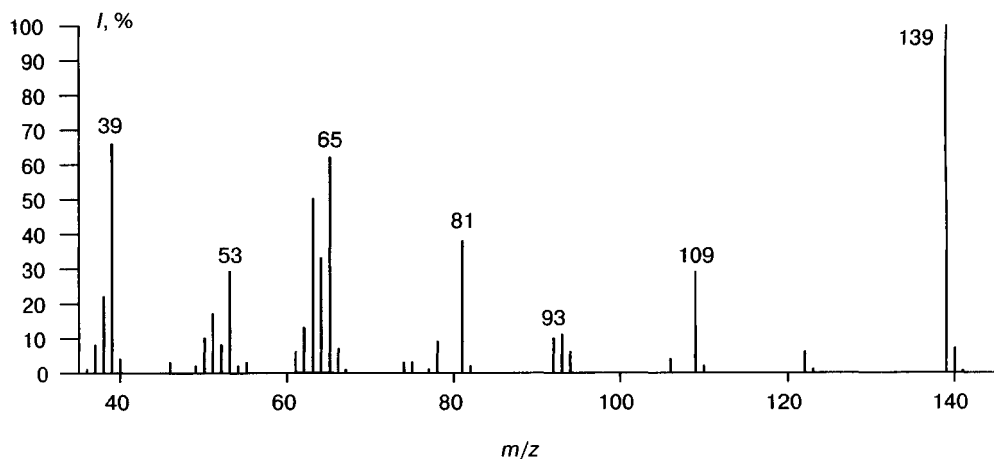


Рис. 10.131. Масс-спектр ИЭ *орто*-нитрофенола

Задача 10.112. Составьте предполагаемые схемы фрагментации в условиях ИЭ перечисленных ниже соединений.

- А) *пара*-нитротолуол;
- Б) 3-хлорнитробензол;
- В) 4-пропилнитробензол;
- Г) 3-нитрофенол;
- Д) 2-нитроантрацен;
- Е) тетраэтилгидразин;
- Ж) 1,2-диамилгидразин;
- З) оксим гексана-2;
- И) *пара*-хлордiazоацетофенон.

Задача 10.113. Объясните образование ионов, характеризующихся наиболее интенсивными пиками, при фрагментации $M^{+•}$ оксима пентанала (рис. 10.132). Составьте схему фрагментации.

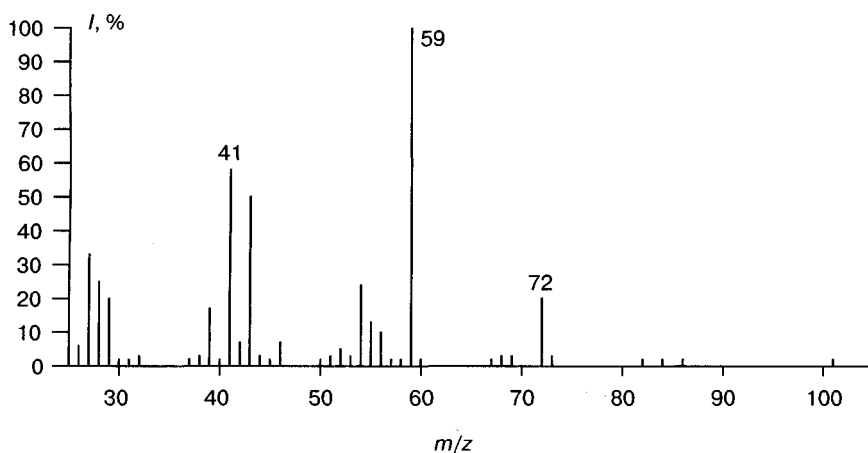


Рис. 10.132. Масс-спектр ИЭ оксима пентанала

Задача 10.114. Составьте схему фрагментации в условиях ИЭ оксима 4-метилпентанона-2 (рис. 10.133).

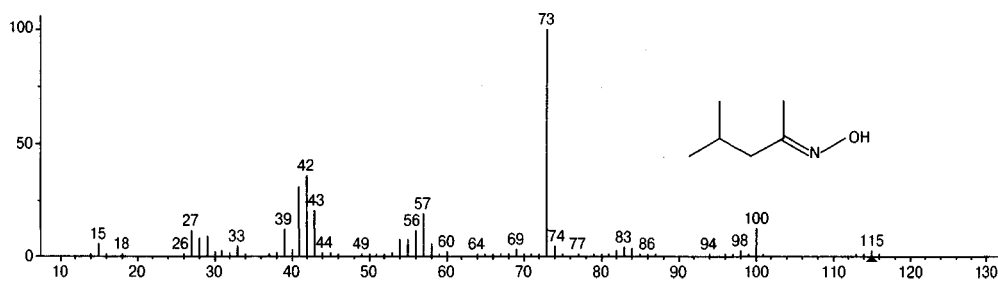


Рис. 10.133. Масс-спектр ИЭ оксима 4-метилпентанона-2

Задача 10.115. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.134).

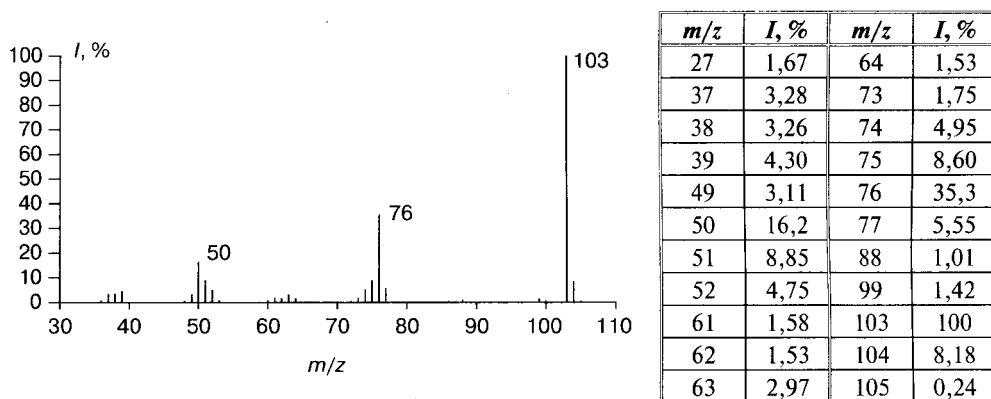


Рис. 10.134

Задача 10.116. Объясните образование ионов, характеризующихся наиболее интенсивными пиками, при распаде M^{++} оксима ацетофенона (рис. 10.135). Составьте схему фрагментации.

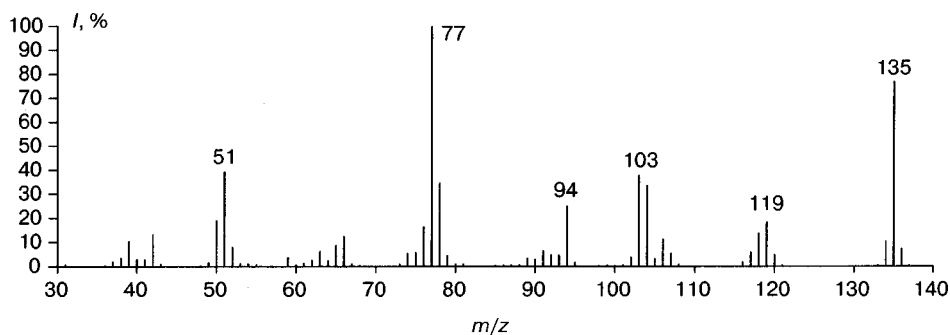
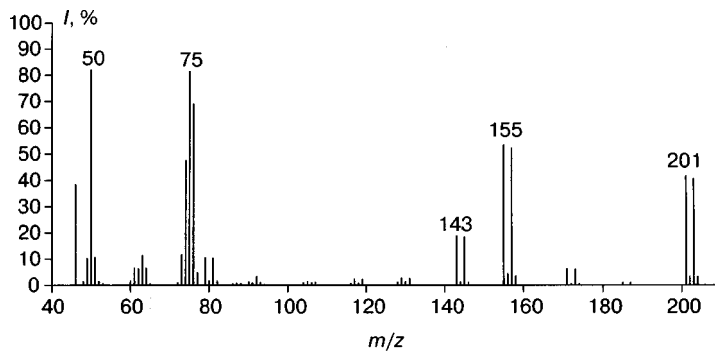


Рис. 10.135. Масс-спектр ИЭ оксима ацетофенона

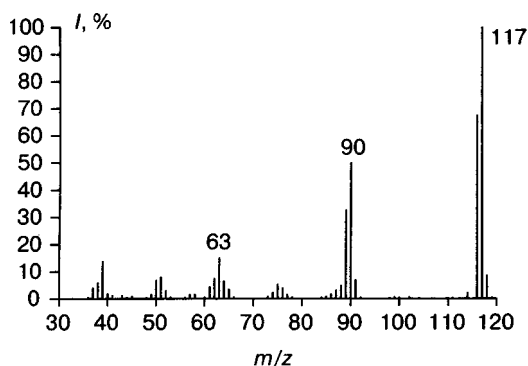
Задача 10.117. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.136).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
46	38,4	74	47,5	105	1,20	145	18,3
48	1,30	75	81,5	106	0,90	155	53,4
49	10,2	76	69,0	107	1,10	156	4,30
50	82,0	77	4,70	117	2,40	157	52,2
51	10,6	79	10,5	119	2,20	158	3,50
52	1,40	80	1,60	128	1,10	171	6,10
61	6,30	81	10,4	129	2,70	173	5,90
62	6,10	82	1,50	130	1,20	201	41,6
63	11,4	90	1,20	131	2,60	202	3,30
64	6,40	92	3,30	143	18,7	203	40,6
73	11,7	93	1,03	144	1,20	204	3,10

Рис. 10.136

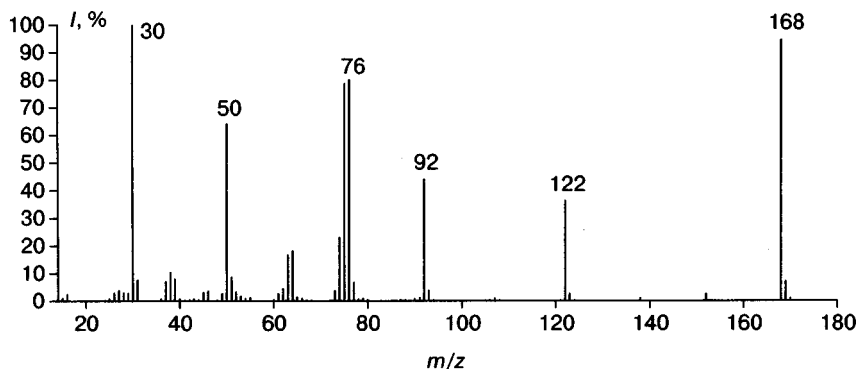
Задача 10.118. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.137).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	2,65	65	3,44
37	3,77	74	2,25
38	5,89	75	5,23
39	13,6	76	3,84
40	1,74	87	2,95
50	6,71	88	4,69
51	7,88	89	32,5
52	2,92	90	49,9
57	1,43	91	6,71
58	1,58	114	2,01
61	4,30	116	67,3
62	7,40	117	100
63	15,4	118	8,52
64	6,50	119	0,32

Рис. 10.137

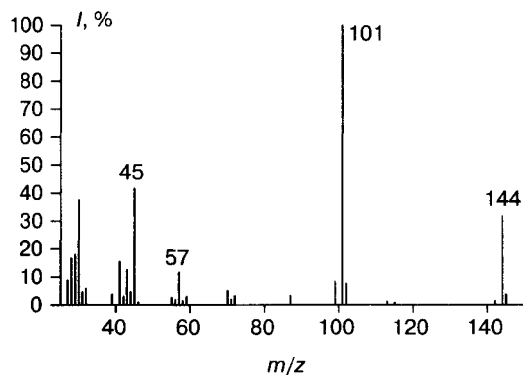
Задача 10.119. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.138).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	2,89	45	3,10	63	16,6	92	44,0
27	3,81	46	3,59	64	18,1	93	2,92
28	2,96	49	2,67	65	1,40	107	1,03
29	2,92	50	64,1	73	3,58	122	36,3
30	100	51	8,65	74	22,9	123	2,57
31	7,63	52	3,22	75	78,6	152	2,55
37	7,07	53	1,77	76	79,9	168	94,4
38	10,4	61	2,68	77	6,69	169	7,02
39	8,01	62	4,46	91	1,21	170	1,00

Рис. 10.138

Задача 10.120. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 10.139).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	8,71	58	1,54
28	16,7	59	2,93
29	17,9	70	5,01
30	37,5	71	1,97
31	4,60	72	3,13
32	5,83	87	3,36
39	3,80	99	8,30
41	15,4	101	100
42	2,96	102	6,34
43	12,4	103	0,12
44	4,62	142	1,31
45	41,6	144	33,6
55	2,43	145	3,23
57	11,6	146	0,12

Рис. 10.139

10.13. Сульфоксиды, сульфоны, сульфокислоты

Электронная ионизация. Поскольку сера является $A+2$ элементом, ее присутствие в молекулах соединений легко заметить по пику изотопного иона (разд. 4.2). Сульфоксиды характеризуются достаточно интенсивными пиками молекулярных ионов (рис. 10.140).

В отличие от кетонов первичная фрагментация M^{++} связана не с α -разрывами, а с элиминированием гидроксильного радикала (ион 117) и молекулы алкена (ион 92 на рис. 10.140а). Первый процесс подразумевает предварительную изомеризацию M^{++} в енольную форму (схема 10.104). Второй протекает по механизму перегруппировки Мак-Лафферти.

Важнейшим вторичным процессом является α -разрыв в первичном перегруппировочном ионе с образованием четноэлектронного фрагмента с m/z 63, единого для всех диалкилсульфоксидов (схема 10.104). Благодаря достаточно необычной массе этот ион сразу позволяет предположить структуру сульфоксида. Простой

разрыв C—S связи может идти с сохранением заряда на алкильном фрагменте (ион с m/z 43 на рис. 10.140а). Этот ион может образоваться практически из любого предшественника, представленного на схеме 10.104. Ион с m/z 41 имеет состав $C_3H_5^+$. Для сульфоксидов с более длинными алкильными цепями повышается доля пиков углеводородных ионов, появляется алкильная серия.

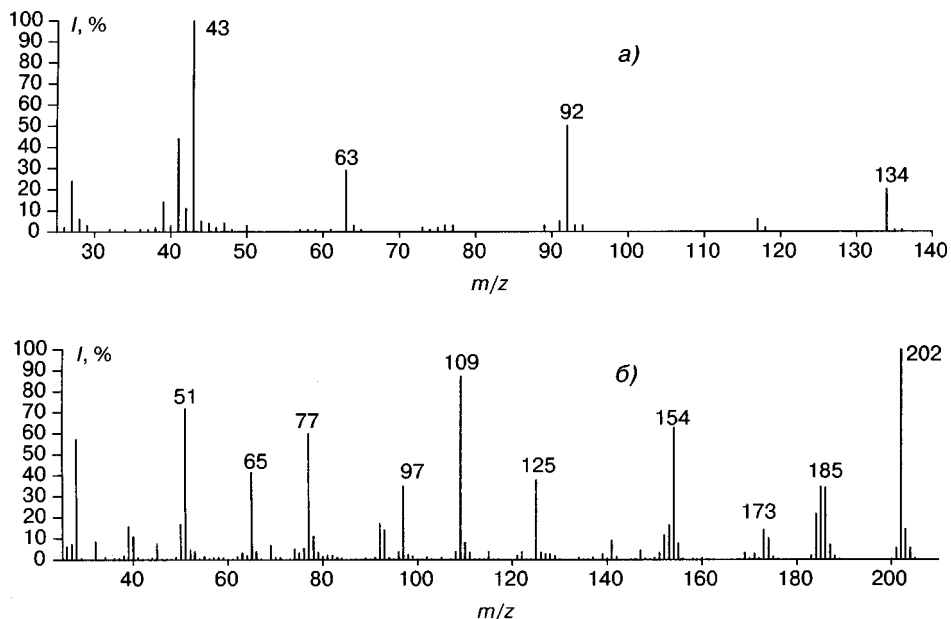


Рис. 10.140. Масс-спектры ИЭ: дипропилсульфоксида (а), дифенилсульфоксида (б)

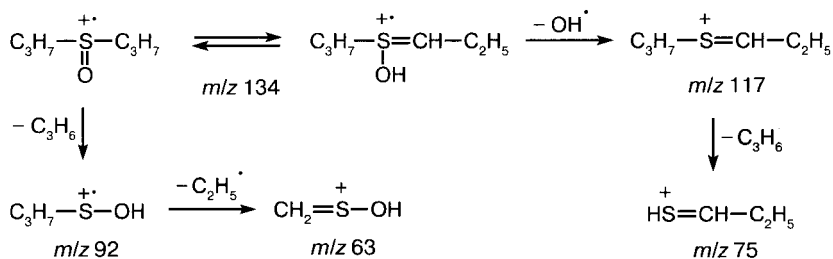


Схема 10.104

Разнообразие процессов фрагментации ароматических сульфоксидов (рис. 10.140б) указывает на существенную долю изомеризованных молекулярных ионов. Составить схему фрагментации, как правило, несложно, учитывая, что, помимо изомеризации $M^{+\cdot}$ в сульфенатную форму, идут более сложные перестройки, в результате которых возможно элиминирование частиц OH^\cdot , H_2O , CO , HCO^\cdot , CS и т.д. На схеме 10.105 представлены четыре простейшие изомерные структуры $M^{+\cdot}$ дифенилсульфоксида, исходя из которых могут быть образованы все фрагментные ионы (рис. 10.140б). Масс-спектрометрии этих соединений посвящен обзор [948].

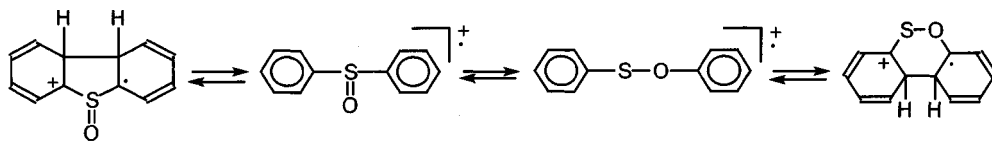


Схема 10.105

По сравнению с сульфоксидами фрагментация диалкилсульфонов протекает по большому числу направлений. Однако эти направления достаточно очевидны, и интерпретация спектра не вызывает большой сложности. На рис. 10.141а представлен спектр ИЭ бутилпропилсульфона. Схема 10.106 отражает основные направления фрагментации этого соединения и объясняет образование ионов, характеризующихся наиболее интенсивными пиками в спектре.

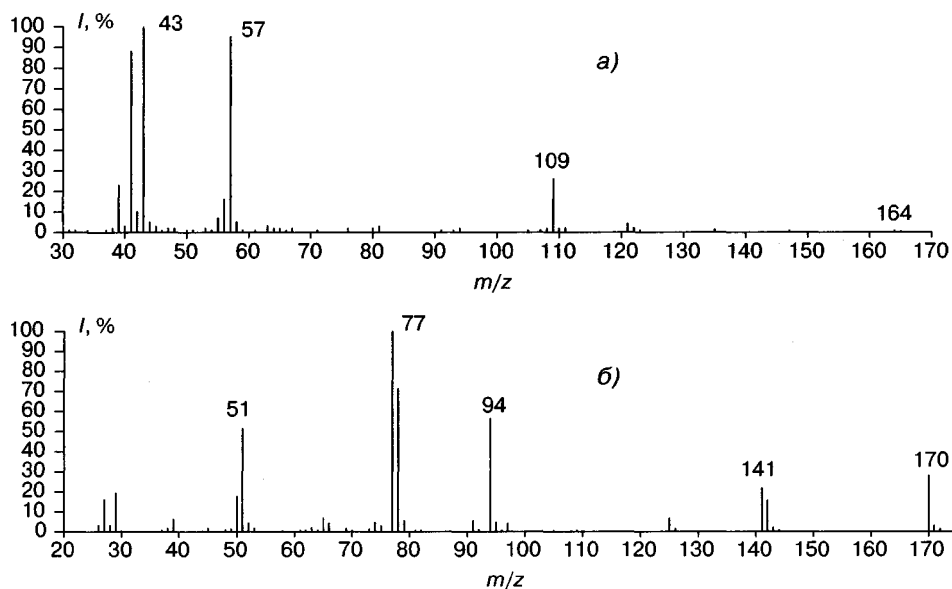


Рис. 10.141. Масс-спектры ИЭ: бутилпропилсульфона (а), фенилэтилсульфона (б)

Наряду с отщеплением гидроксильного радикала, $M^{+\cdot}$ диалкилсульфонов претерпевают разрыв C—S связи с элиминированием алкильных групп. Помимо перегруппировочного процесса с выбросом молекулы олефина (см. сульфоксиды), эффективно протекает перегруппировка с миграцией двух атомов водорода на сульфогруппу, или простое отщепление алкильного радикала (схема 10.106). Прогнозировать, какой процесс окажется предпочтительнее, достаточно сложно. Например, при распаде бутилпропилсульфона (рис. 10.141а) бутильный заместитель отщепляется в основном с миграцией двух атомов водорода (m/z 109), а пропильный примерно с равной вероятностью выбрасывает частицы $C_3H_5^+$, $C_3H_6^+$ и $C_3H_7^+$ (m/z 121–123). Правило выброса максимального алкила, как всегда, выполняется. Очень высокую интенсивность имеют пики углеводородных ионов, доля тока которых в полном ионном токе еще более возрастает с увеличением длины алифатических цепей.

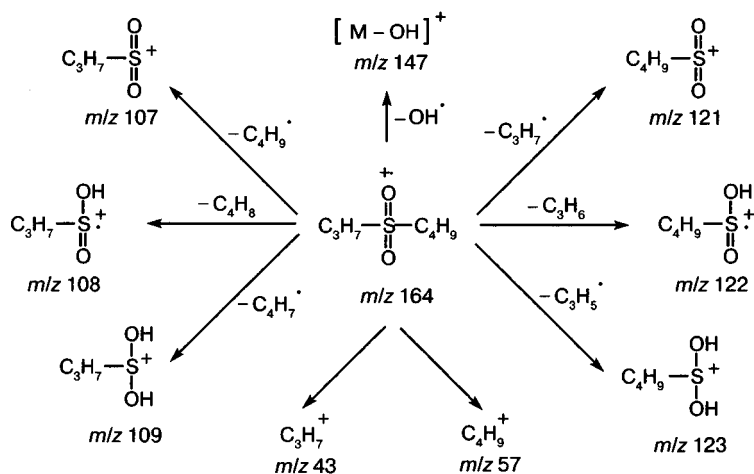


Схема 10.106

Как и в случае арилсульфоксидов, для арилсульфонов характерны процессы изомеризации молекулярного иона до его распада (схема 10.107). Наиболее выражены миграции радикалов от атома серы к атому кислорода. В спектрах могут наблюдаться интенсивные пики ионов ArO^+ , $\text{ArOH}^{\bullet+}$ и ArSO^+ . Миграция алкильной группы в алкиларилсульфонах менее благоприятна, чем арильной, однако и этот процесс реализуется (пик иона с $m/z \ 125$ в спектре фенилэтилсульфона на рис. 10.141б). Кстати, последующая фрагментация иона PhSO^+ может протекать с выбросом молекулы CO (ион с $m/z \ 97$ на рис. 10.141б). Этот процесс подразумевает существенную предварительную перестройку. Пик иона $[\text{ArSO} - \text{CO}]^+$ может быть весьма интенсивен в спектрах диарилсульфонов, когда пик родительского иона ArSO^+ оказывается максимальным в спектре. Ион ArSO^+ может элиминировать и молекулу CS . Однако этот процесс менее благоприятен по сравнению с выбросом CO .

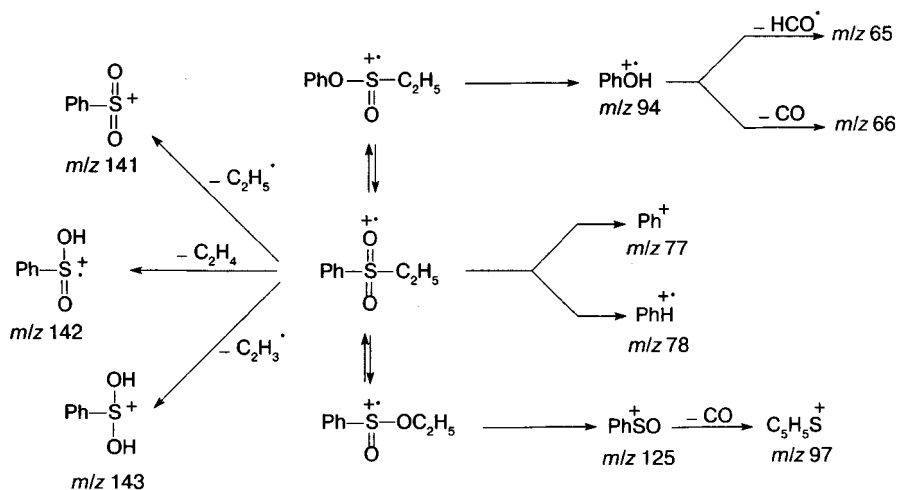


Схема 10.107

Алкильные радикалы в алкиларилсульфонах могут отщепляться без миграции или с миграцией одного или двух атомов водорода (m/z 141–143 на рис. 10.141б). Потеря молекулярным ионом диарилсульфонов молекулы SO_2 является заметным процессом и может сопровождаться элиминированием одного или двух атомов водорода.

На рис. 10.142 представлен масс-спектр ИЭ *para*-толилсульфоновой кислоты. Все процессы фрагментации очевидны. Наличие интенсивного пика иона с m/z 108 свидетельствует об изомеризации молекулярного иона с миграцией толильной группы к атому кислорода (схема 10.107 для арилсульфонов).

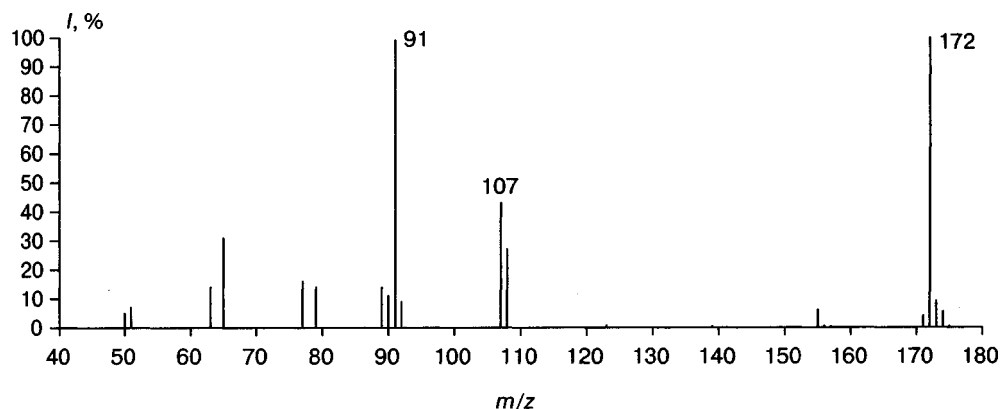


Рис. 10.142. Масс-спектр ИЭ *para*-толилсульфоновой кислоты

Задача 10.121. Определите состав фрагментных ионов и составьте схему фрагментации дибутилсульфоксида, спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.143.

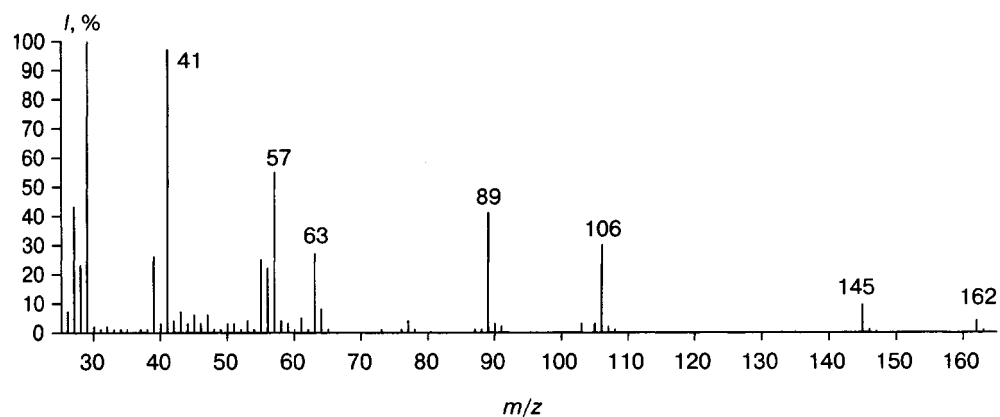
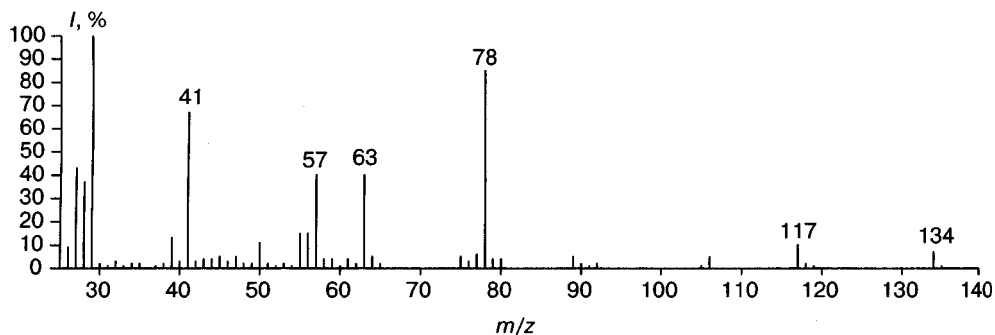


Рис. 10.143. Масс-спектр ИЭ дибутилсульфоксида

Задача 10.122. Предложите состав фрагментных ионов и составьте схему фрагментации дифенилсульфоксида, спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.140б.

Задача 10.123. Идентифицируйте соединение, спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.144.



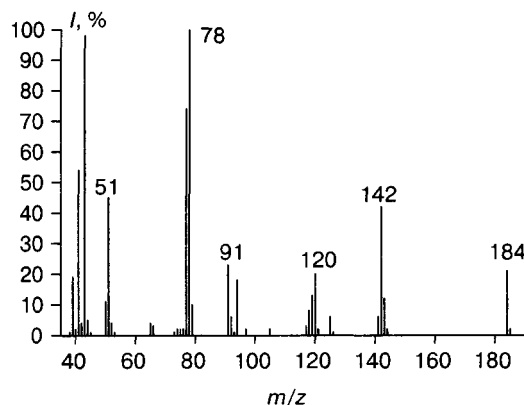
m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	9,01	47	4,89	76	3,38
27	43,7	48	2,37	77	6,01
28	36,9	49	2,44	78	85,0
29	100	50	11,1	79	3,77
30	2,12	51	2,04	80	3,71
32	3,13	53	2,71	89	5,28
34	2,31	55	15,9	90	2,01
35	2,27	56	15,4	91	1,11
38	1,89	57	42,1	92	2,41
39	13,3	58	4,13	105	1,25
40	3,04	58	4,29	106	5,79
41	67,7	61	3,93	117	10,0
42	3,56	62	1,89	118	1,94
43	4,71	63	40,2	119	1,00
44	4,59	64	5,15	134	8,34
45	5,19	65	2,12	135	0,62
46	2,94	75	5,34	136	0,40

Рис. 10.144

Задача 10.124. Предложите состав фрагментных ионов и составьте схему фрагментации *para*-толилсульфоновой кислоты, спектр ИЭ которой представлен на рис. 10.142.

Задача 10.125. Составьте предполагаемую схему фрагментации фенилнафтилсульфона в условиях ИЭ.

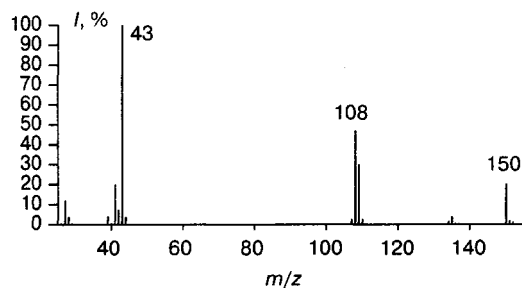
Задача 10.126. Идентифицируйте соединение, спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.145.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
39	19,4	92	6,29
40	2,13	94	18,0
41	54,8	105	2,79
42	4,21	117	3,18
43	98,1	118	8,44
44	5,10	119	13,9
50	11,6	120	20,7
51	45,7	121	2,13
52	4,33	125	6,49
65	4,33	141	6,49
66	3,18	142	49,9
75	2,13	143	12,4
77	74,5	144	3,18
78	100	184	24,9
79	10,4	185	2,79
91	25,0	186	1,29

Рис. 10.145

Задача 10.127. Идентифицируйте соединение, спектр ИЭ которого представлен на рис. 10.146.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	11,7	108	46,6
28	3,53	109	29,8
39	3,92	110	2,35
41	19,6	134	1,18
42	7,06	135	3,53
43	100	150	20,0
44	3,33	151	1,55
107	2,35	152	1,01

Рис. 10.146

10.14. Элементоорганические соединения

Описание масс-спектрометрического поведения соединений этого класса значительно реже встречается в литературе. В настоящем пособии будет дана только общая характеристика фрагментации нескольких представителей этого широчайшего класса соединений. Лишь в последние годы появились работы, обобщающие данные по методам ионизации и направлениям фрагментации этих соединений [577, 949–951].

В группу элементоорганических соединений, помимо классических стабильных молекул со связью углерод-элемент, включают самые разнообразные координационные соединения, металлоцены, короткоживущие интермедиаты каталитических реакций и т.д. Все эти соединения требуют индивидуального подхода для ионизации и изучения структуры. В любом случае элементоорганические соединения все шире используются в современном обществе, а знание закономерностей их трансформации в газовой фазе в условиях масс-спектрометрических экспериментов полезно с точки зрения и синтеза, и анализа, и изучения химических свойств, и применения, и метаболизма. Разнообразие масс-спектрометрических превращений этих соединений значительно шире, что создает определенные проблемы с интерпретацией спектров, но открывает новые возможности по фундаментальным исследованиям законов фрагментации. Необходимо также отметить, что многие соединения этого класса являются опасными экотоксикантами и требуют постоянного мониторинга за их присутствием в объектах окружающей среды. Именно масс-спектрометрия позволяет проводить надежную идентификацию и количественное определение этих соединений в существующих природных формах на следовом уровне.

Для масс-спектрометрических исследований элементоорганических соединений используются любые типы масс-спектрометров (гл. 6). Понятно, что с мягкими методами ионизации желательно применять tandemную масс-спектрометрию. Следить за течением каталитических процессов и регистрировать короткоживущие интермедиаты (т.е. изучать реакции не только распада, но и синтеза) наиболее эффективно можно на ионных ловушках и приборах ионного циклотронного резонанса, а также используя проточные методы (например, SIFT, разд. 8.3). Вопросам детектирования металлоорганических интермедиатов в каталитических процессах в растворах посвящена монография [952]. В обзоре [577] представлено несколько примеров использования масс-спектрометрии для изучения всего каталитического цикла, включая каталитические процессы с участием экзотических частиц, например Fe_4^+ , возникновение которых в растворе маловероятно. Тем не менее принципиальная возможность осуществления той или иной каталитической реакции может быть принята во внимание для проработки условий для ее модифицирования и реализации в растворе. В этом же обзоре можно найти многочисленные ссылки на более ранние исследования по масс-спектрометрии элементоорганических соединений.

Наиболее эффективным методом ионизации максимального набора элементоорганических соединений является, безусловно, ИЭР (разд. 5.13). Хотя обычно в этих условиях образуются катионированные или протонированные (депротонированные) молекулы, возможно образование более сложных аддуктов, включая продукты олигомеризации. Эти процессы ведут к существенному усложнению масс-спектров. При этом пик молекулярного иона часто имеет далеко не самую большую величину m/z . ИЭР оказывается очень удобным методом не только для стабильных соединений, но и для лабильных веществ, а также для короткоживущих интермедиатов каталитических процессов [577, 953, 954]. Для менее полярных соединений можно использовать ХИАД и ФИАД [955, 956]. Для координационных соединений, дендримеров и плохо растворимых веществ важную информацию может предоставить МАЛДИ [957–960]. Варианты используемых методов ионизации для соединений разных металлов суммированы в обзоре [951].

Наиболее простые спектры получаются при работе с ионными соединениями. Часто, переключая полярность прибора, можно зарегистрировать и катион, и анион [950]. Самыми распространенными ионами в спектрах ИЭР, ХИАД, МАЛДИ элементоорганических соединений являются катионированные молекулы $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$. Можно добавлять к образцу неорганические соли для получения аддуктов с конкретными металлами (Rb, Ag и т.д.). При наличии лигандов с достаточным сродством к протону можно наблюдать в этих масс-спектрах и протонированные молекулы MH^+ . Пики депротонированных молекул $[M-H]^-$ доминируют в спектрах отрицательных ионов. Сложности создают ионы-аддукты исходных соединений с продуктами своего гидролиза и растворителем. Возможны процессы димеризации, тримеризации, прочие ионно-молекулярные реакции. В частности, в спектрах соединения R_3SnCl_3 наблюдаются пики ионов, $SnCl_4$ и R_2SnCl_2 [961].

Следует помнить, что в условиях ИЭР могут протекать электрохимические процессы. Для легко окисляющихся или восстанавливающихся веществ, каковыми являются многие элементоорганические соединения, необходимо учитывать, что регистрируемые ионы не обязательно присутствовали в исходном растворе. В частности, двухвалентные медь и ртуть часто восстанавливаются до одновалентных, а при работе с ионами Ag^+ можно наблюдать отложение металлического серебра на капилляре [962]. Аналогичные отложения можно наблюдать при работе с двухвалентными ионами ртути и меди в режиме регистрации отрицательных ионов, причем при переходе на регистрацию положительных ионов можно вновь окислить выделившиеся на капилляре металлы и наблюдать их ионы в спектре [962]. Процессы восстановления зависят от многих параметров, включая структуру субстрата, напряжение на капилляре, природу лигандов, растворителя и т.д. Например, при анализе соединений Cu^{2+} в ацетонитриле в масс-спектрах ИЭР образуются исключительно пики ионов Cu^{1+} , что связано со стабилизацией именно этого иона в комплексе с молекулами этого растворителя [963].

К сожалению, качественные спектры электронной ионизации элементоорганических соединений доступны лишь для узкого круга достаточно летучих и термически стабильных соединений. Им были посвящены две монографии 70-х годов [964, 965]. Иногда спектры очень просты. Например, в спектре ферроцена три максимальных пика обусловлены ионами M^{++} , $[M-C_5H_5]^+$ и Fe^+ (рис. 10.147). Кстати, благодаря высокой эффективности ионизации и простоте спектров производные ферроцена используются в качестве агентов дериватизации. Например, ферроценоилазид применяется для дериватизации самых разных спиртов, стероидов, фенолов. Реакция идет с промежуточным образованием ферроценилкарбамата, который и реагирует с молекулой спирта [966].

Детектирование присутствия нестандартного для органических соединений элемента, как правило, не вызывает особых сложностей в связи с уникальной изотопной картиной и специфической массой такого элемента. Например, кадмий имеет восемь изотопов, свинец — четыре, ртуть — семь (см. Приложение 2). Очень часто в спектре присутствует атомный пик элемента, что еще более облегчает идентификацию.

В условиях электронной ионизации металлоорганические и координационные соединения ML_n фрагментируют, как правило, с последовательным выбросом лигандов.

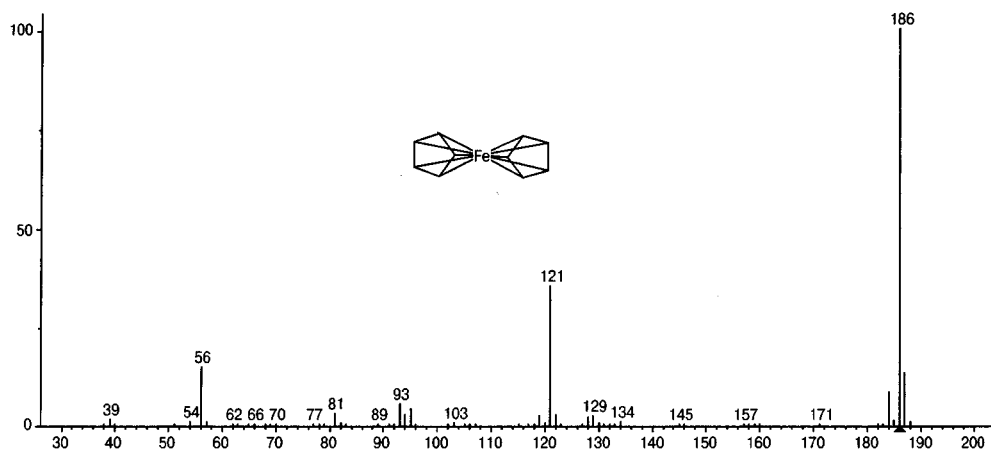


Рис. 10.147. Масс-спектр электронной ионизации ферроцена

Элиминироваться могут либо радикалы, либо молекулы, причем второй вариант доминирует в случае, когда лигандами являются молекулы (CO , PR_3 , алкен). Напротив, галогены элиминируются в виде радикалов. Процессы усложняются для бидентатных лигандов.



На рис. 10.148 представлен масс-спектр ЭИ диметилртути. Помимо характерного кластера молекулярного иона и иона $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, высокую интенсивность имеют пики всех изотопов ртути с m/z 196–204. Отсутствие пиков в области от 30 до 200 атомных единиц масс также свидетельствует о присутствии в составе соединения тяжелого элемента.

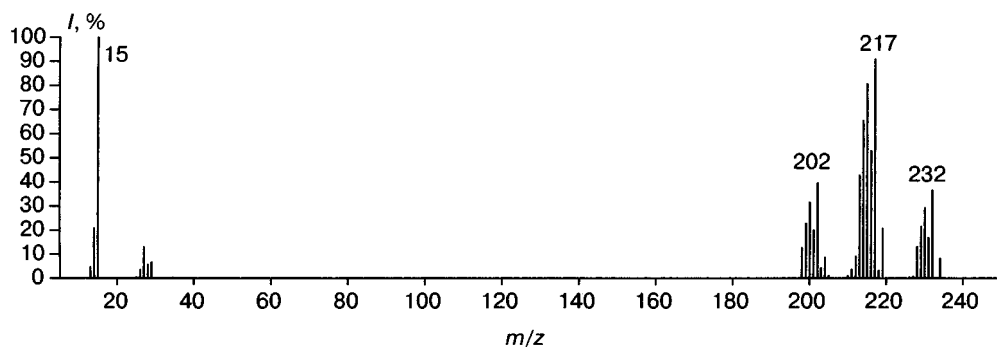


Рис. 10.148. Масс-спектр электронной ионизации диметилртути

Несколько более сложная картина наблюдается в спектре тетраэтилсвинца (рис. 10.149), еще одного важного и опасного экотоксиканта, применяющегося иногда до сих пор в качестве добавки к топливу (этилированный бензин). Кластер

его M^{++} малоинтенсивен (пики ионов с m/z 322–324), а основной процесс фрагментации связан с последовательным отщеплением этильных радикалов. Поскольку при этом сохраняется четкая изотопная картина, спектр очень легко интерпретировать даже новичку. Кстати, такая последовательность распада противоречит правилу четноэлектронных ионов, т.е. приведенный пример является исключением (разд. 3.1.3). Правило четноэлектронных ионов плохо выполняется для элементоорганических соединений, по-видимому, благодаря участию d - и f -орбиталей элемента.

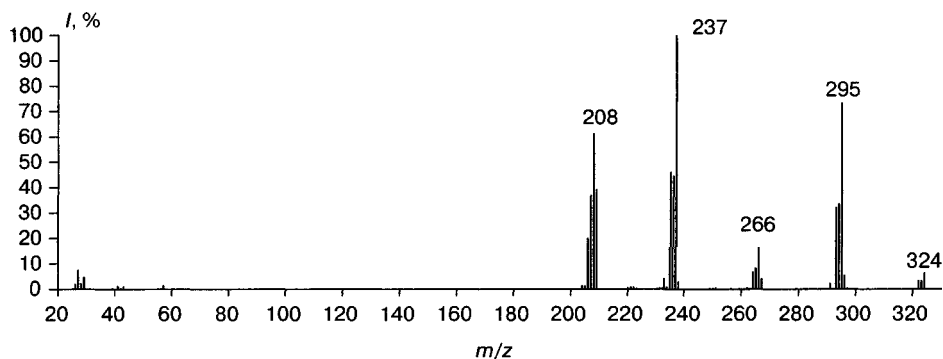


Рис. 10.149. Масс-спектр электронной ионизации тетраэтилсвинца

Помимо элиминирования этильных радикалов, протекает отщепление молекулы этилена. Это особенно отчетливо видно по интенсивным пикам ионов с m/z 267 (ион $[(C_2H_5)_2^{208}PbH]^+$) и m/z 209 (ион $[^{208}PbH]^+$). Эти реакции аналогичны соответствующим реакциям фрагментации аминов, сульфидов, фосфинов и т.д. Такие перегруппировочные процессы несколько искажают характерную для свинца изотопную картину (см. Приложение 1).

Следует обратить также внимание на пики ионов с m/z 57, 43, 41. Эти ионы образуются в результате первоначального перегруппировочного процесса с образованием новой связи C—C между двумя этильными радикалами, исходно связанными через атом свинца. Аналогичные процессы протекают при фрагментации других полиалкил(арил)-элементоорганических соединений: кремния, германия, олова и т.д. [24, 967, 968]. Если элемент входит в состав цикла, может протекать его элиминирование, сопровождающееся уменьшением размера цикла (схема 10.108). Особенно характерен этот процесс для дигалогенпроизводных [967].

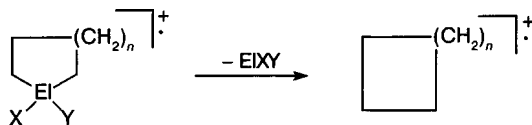


Схема 10.108

Еще более многолинейчатыми становятся спектры при наличии в молекуле нескольких атомов полиизотопных элементов. На рис. 10.150 представлен масс-спектр ЭИ триэтиловохлорида.

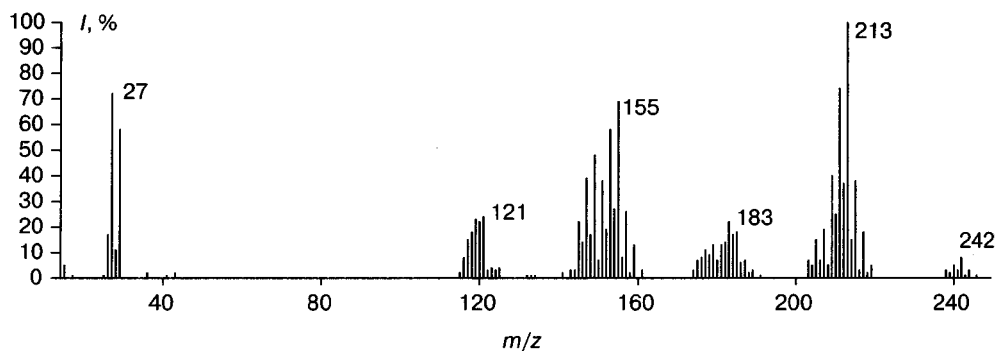


Рис. 10.150. Масс-спектр электронной ионизации триэтиловохлорида

Два изотопа хлора и десять изотопов олова приводят к очень сложным кластерам, хотя, по сути, весь процесс фрагментации связан лишь с отщеплениями этильных радикалов и атома хлора в любой последовательности. Группа пиков в области m/z 120 обусловлена кластерами двухзарядного молекулярного иона и иона Sn^{2+} .

Наличие атома галогена, окси- или аминогруппы в органическом заместителе, связанном с элементом, инициирует переруппировочный процесс элиминирования молекулы олефина из M^{2+} или первичного иона $[\text{M}-\text{R}]^+$ с миграцией гетероатома или гетероатомной группировки к элементу (схема 10.109). Эта перегруппировка аналогична приведенной для вторичного распада спиртов (схема 10.18) или аминов (схема 10.45). Вероятность протекания процесса определяется природой элемента, мигрирующей группы и остальных заместителей, а также пространственным расположением элемента и мигрирующей группы [28]. Как правило, лучше всего миграция протекает из β -положения заместителя (четырёхчленное переходное состояние), однако атом фтора легко мигрирует из любого положения [969].

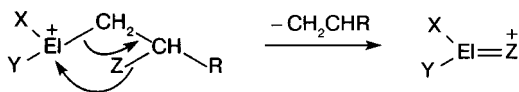


Схема 10.109

Фрагментация в условиях ИЭ π -комплексов с простыми лигандами протекает с последовательным элиминированием лигандов. На рис. 10.151 представлен масс-спектр бензолтрикарбонила хрома. Отчетливо прослеживается серия пиков, отстоящих друг от друга на 28 атомных единиц массы. Она обусловлена последовательным отщеплением молекул CO. Ион 130 теряет молекулу бензола, образуя ион Cr^+ (m/z 52).

Аналогично распадаются π -комплексы с более сложными органическими лигандами. Например, в спектре ферроцена (рис. 10.147) основные пики обусловлены молекулярным ионом (m/z 186), а также ионами $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_5]^+$ (m/z 121) и $[\text{M}-2\text{C}_5\text{H}_5]^+$ (m/z 56). Последний ион является не чем иным, как атомарным ионом железа.

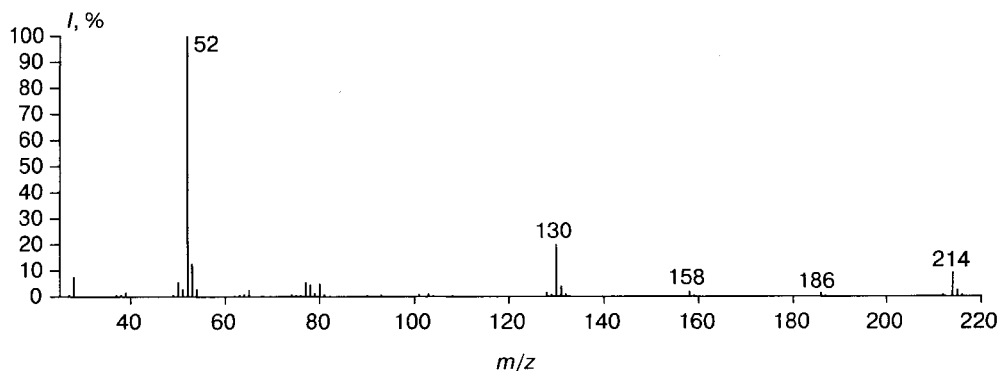
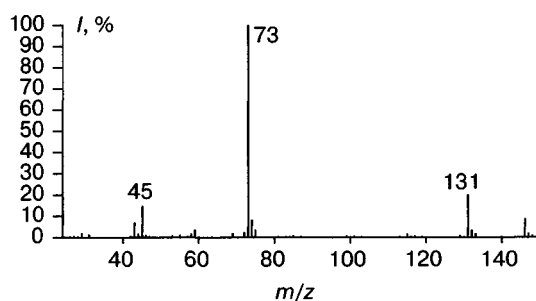


Рис. 10.151. Масс-спектр электронной ионизации бензолтрикарбонила хрома

Задача 10.128. Идентифицируйте соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.152.



<i>m/z</i>	<i>I, %</i>	<i>m/z</i>	<i>I, %</i>
29	1,83	73	100
31	1,28	74	8,37
43	6,82	75	3,36
44	1,52	115	1,40
45	14,6	131	24,9
46	0,95	132	3,91
58	1,54	133	1,71
59	3,45	146	8,59
69	1,68	147	1,44
72	2,31	148	0,60

Рис. 10.152

Задача 10.129. Идентифицируйте неорганическое соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.153.

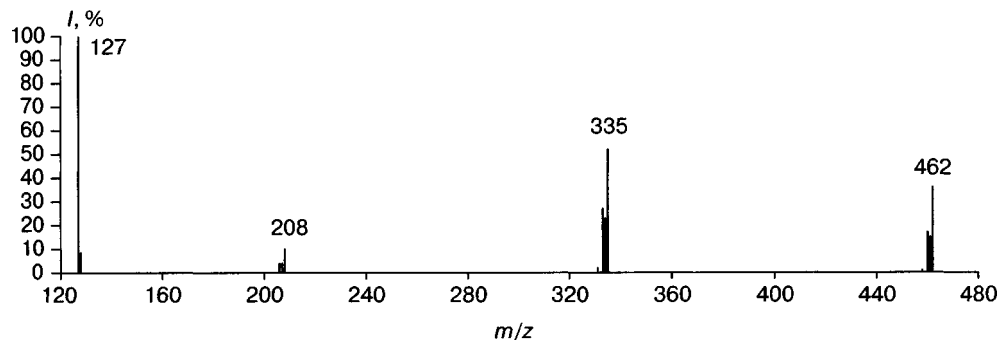
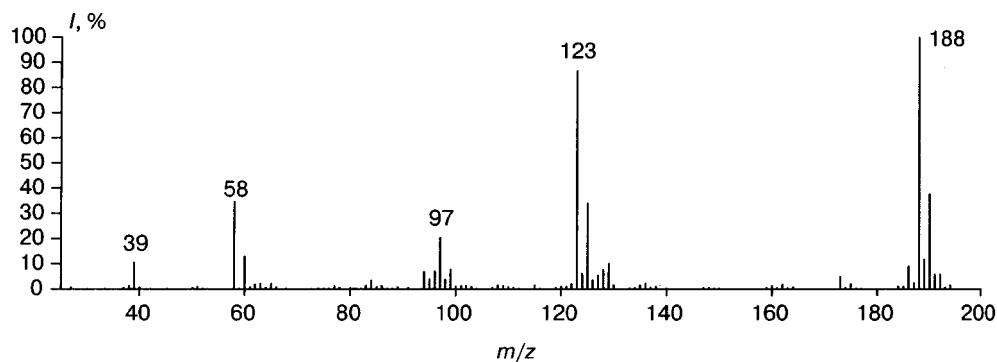


Рис. 10.153

Задача 10.130. Идентифицируйте элементоорганическое соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.154.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
38	1,18	95	3,81	123	86,5	173	4,82
39	10,4	96	6,96	124	4,76	175	1,93
58	34,5	97	20,3	125	33,7	184	1,06
60	13,1	98	3,62	126	3,43	185	0,83
61	0,63	99	7,67	127	5,38	186	8,92
62	1,86	100	1,06	128	7,63	187	2,31
63	2,06	101	1,15	129	10,3	188	100
64	0,61	102	1,22	130	1,54	189	11,1
65	2,07	108	1,37	135	1,50	190	39,1
84	3,28	109	1,25	136	2,14	191	6,14
86	1,24	115	1,35	160	1,19	192	5,74
94	6,74	122	1,97	162	1,76	194	2,34

Рис. 10.154

Задача 10.131. На рис. 10.155 представлен масс-спектр ИЭ запрещенного в настоящее время металлоорганического пестицида. Установите его структуру.

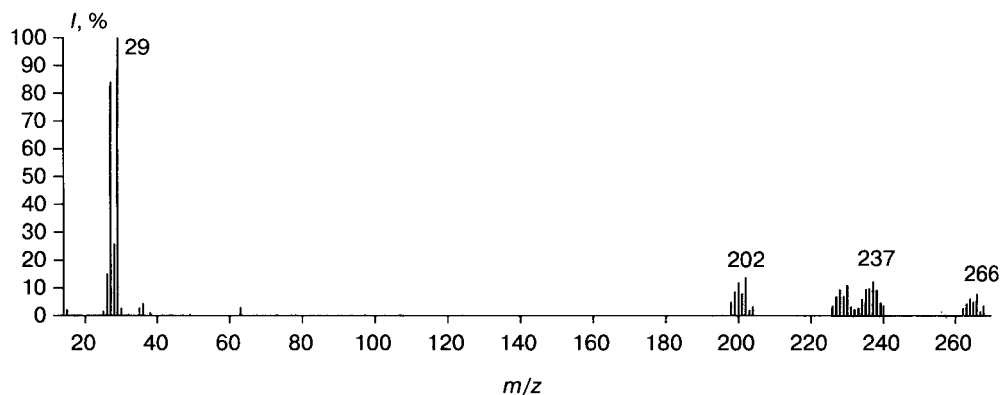
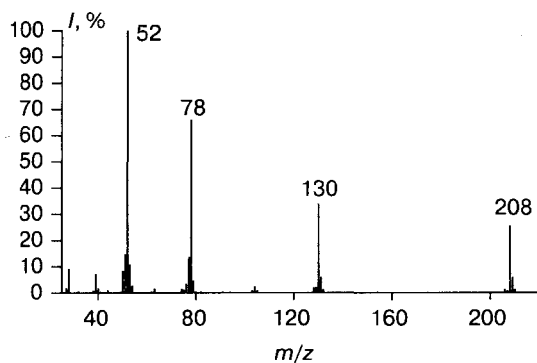


Рис. 10.155

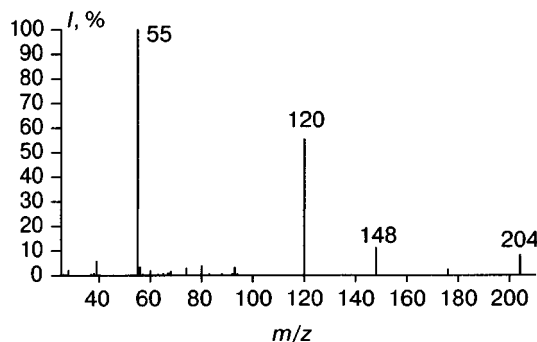
Задача 10.132. Идентифицируйте элементоорганическое соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.156.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
28	9,04	78	65,8
39	7,05	79	4,44
40	1,66	104	2,20
50	8,15	128	1,81
51	14,5	129	1,96
52	100	130	33,6
53	10,6	131	6,05
54	2,49	132	1,01
74	1,28	206	1,20
75	1,05	208	25,3
76	3,17	209	6,22
77	13,4	210	0,91

Рис. 10.156

Задача 10.133. Идентифицируйте элементоорганическое соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.157.



m/z	$I, \%$
28	2,18
39	5,79
55	100
65	1,13
120	56,0
121	3,11
148	12,5
149	0,84
176	2,24
204	10,1
205	0,96

Рис. 10.157

Задача 10.134. Идентифицируйте металлоорганическое соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 10.158.

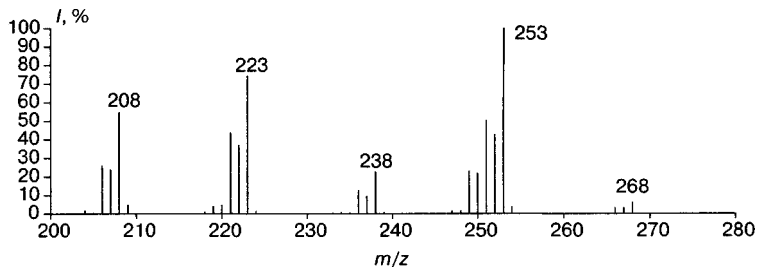


Рис. 10.158

ГЛАВА II

БИОПОЛИМЕРЫ

11.1. Аминокислоты, пептиды, белки

11.1.1. Масс-спектрометрия аминокислот

Поскольку недавно в свет вышло учебное пособие [5], в данной главе представлены лишь самые основные аспекты масс-спектрометрии белков и пептидов.

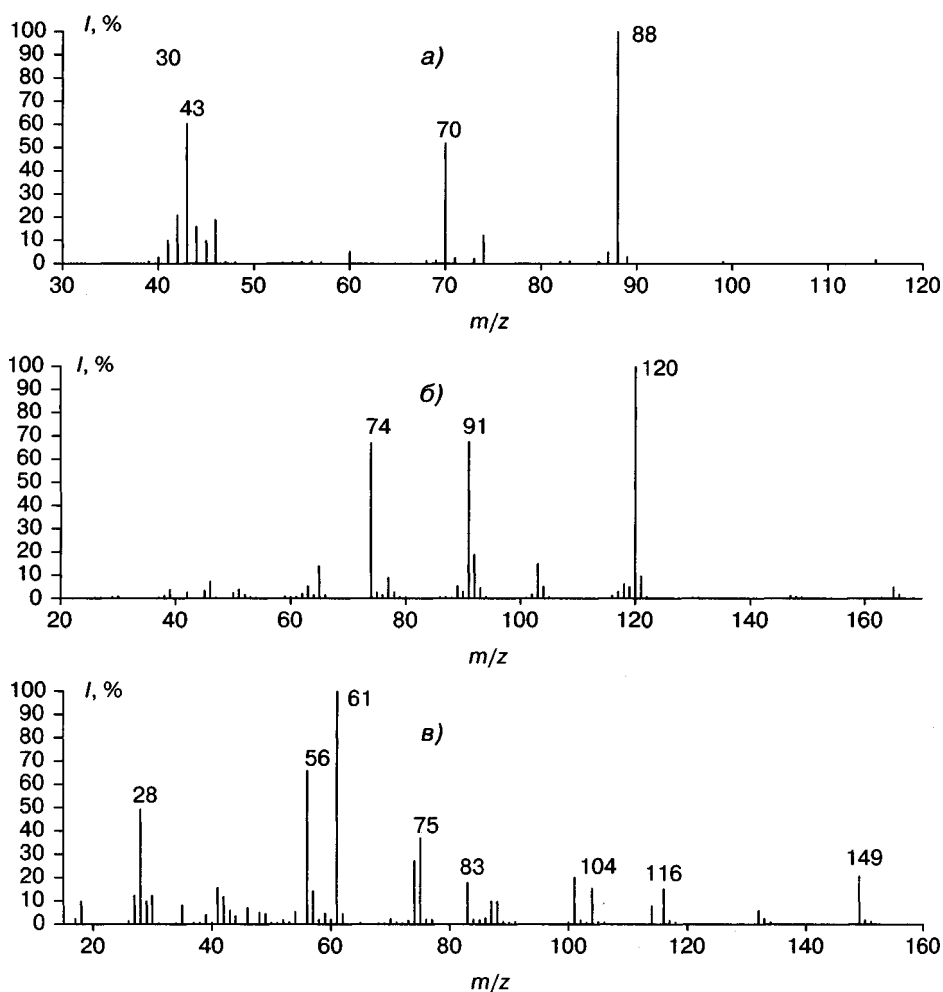


Рис. 11.1. Масс-спектры электронной ионизации аминокислот: аспарагина (а), фенилаланина (б), метионина (в)

С тех пор как в 1958 году Клаус Биман [970] впервые получил спектры аминокислот, масс-спектрометрия шагнула далеко вперед. Основной проблемой Бимана было ввести полярные термолабильные молекулы в ионный источник и провести их ионизацию. Это обычно требовало дериватизации. В последующие двадцать лет с появлением химической ионизации, полевой десорбции и полевой ионизации удалось добиться определенных успехов в анализе простых пептидов, однако эксперименты были трудоемки, характеризовались плохой воспроизводимостью и обычно требовали проведения химической дериватизации исходных соединений для повышения их летучести. Достижения масс-спектрометрии в этой области по 1978 год изложены в исчерпывающей монографии Б.В. Розынова [29].

Хотя α -аминокислоты, являющиеся «кирпичиками» белков, можно изобразить общей формулой $\text{RNH}-\text{CHR}-\text{COOH}$, разнообразие структур боковых групп (R) приводит к высокой индивидуальности их спектров (рис. 11.1). Среди общих направлений можно выделить аминный распад (элиминирование боковой группы R и карбоксильной группы). Сохранение заряда на R (ионы R^+) характерно для ароматических аминокислот (тирозин, триптофан, фенилаланин). В частности, в спектре последнего (рис. 11.1б) пик иона PhCH_2^+ с m/z 91 — второй по интенсивности в спектре. При достаточной длине цепи R возможна перегруппировка Мак-Лафферти (треонин).

Для увеличения летучести соединений их дериватизируют. Наиболее распространенными вариантами являются алкилирование и ацилирование. На рис. 11.2 представлены масс-спектры ИЭ N-ацетилизолейцина и метилового эфира лейцина.

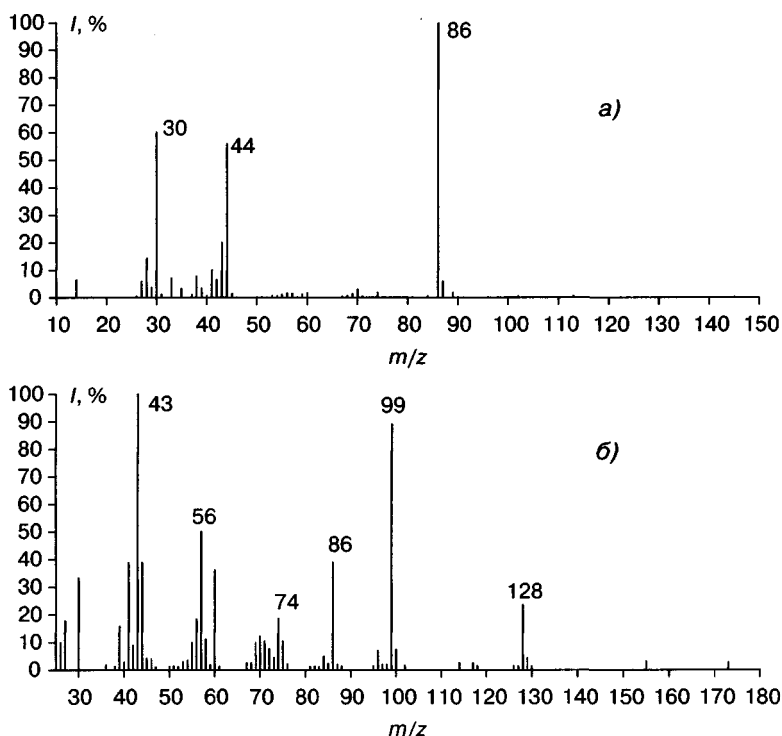


Рис. 11.2. Масс-спектры ИЭ: метилового эфира лейцина (а), N-ацетилизолейцина (б)

Спектры химической ионизации аминокислот столь же индивидуальны. Пики протонированных молекул аминокислот имеют достаточно высокую интенсивность [971], особенно при использовании в качестве газа-реагента изобутана [972]. Фрагментация, как обычно в условиях ХИ, незначительна и существенно зависит от структуры аминокислоты, резко возрастая при увеличении температуры источника [972]. В спектрах химической ионизации отрицательных ионов при использовании в качестве иона-реагента OH^- [915] доминируют пики депротонированных молекул $[\text{M}-\text{H}]^-$. При использовании Cl^- помимо этих ионов, образуются также ионы $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, однако их пики исчезают из спектров аминокислот, содержащих дополнительные полярные группы [973].

11.1.2. Масс-спектрометрия пептидов

Возможности электронной и химической ионизации резко уменьшаются при переходе к пептидам в связи с еще меньшей летучестью и повышенной термолабильностью этих соединений. Для анализа простейших пептидов этими методами используются различные виды дериватизации, включая алкилирование, ацилирование, триметилсилилирование и т.д. [29, 974]. Тем не менее по этим спектрам уже можно было устанавливать последовательность аминокислотных звеньев [29, 975, 976].

Однако реальный прорыв в масс-спектрометрии пептидов связан с появлением бомбардировки быстрыми атомами (разд. 5.10). ББА исторически была первым эффективным методом для установления молекулярных масс и последовательности аминокислотных звеньев в недериватизованных олигопептидах с массами в несколько тысяч дальтон [977, 978]. В сочетании с масс-спектрометром высокого разрешения ББА позволяет устанавливать массы молекулярного и фрагментных ионов с большой точностью, а время анализа при этом невелико. Однако, поскольку диапазон молекулярных масс в условиях ББА обычно не превышает 8000 дальтон, а для анализа необходимо иметь не менее 100 пикомолей чистого образца, он может применяться только для анализа олигопептидов. *Мета*-нитробензиловый спирт оказался наилучшей матрицей для этой цели. В качестве растворителя образца используют смесь воды и ацетонитрила с возможными добавками метанола, уксусной и трифторуксусной кислот. ББА не является мягким методом. Поэтому обычный спектр характеризуется значимой фрагментацией молекулярного иона. Тем не менее для целей определения последовательности аминокислотных звеньев в пептиде лучше использовать тандемную масс-спектрометрию (гл. 7).

Значительно больших успехов удалось добиться с помощью методов электро-распыления (разд. 5.13) и МАЛДИ (разд. 5.15), которые позволили анализировать сложнейшие белковые молекулы и сделали масс-спектрометрию ключевым методом новой науки — протеомики [979].

МАЛДИ обладает высокой чувствительностью (уровень 10^{-18} – 10^{-21} М), не требует сложной пробоподготовки и позволяет работать с гетерогенными образцами. Метод дает возможность установить молекулярную массу пептида или белка в сотни тысяч дальтон с точностью 0,5–0,01%. Рекордные для масс-спектрометрии массы однозарядных ионов в несколько миллионов дальтон [322] были зарегистрированы именно с помощью матрично активированной лазерной десорбции/

ионизации. Метод удобен для скринингового анализа, например для установления молекулярных масс протеолитических пептидов в смеси после энзиматического расщепления белка. Для МАЛДИ характерны протонированные молекулы MH^+ и аддукты с катионами щелочных металлов $[M+Na]^+$ и $[M+K]^+$. В качестве матриц для анализа пептидов наиболее часто используют 2,5-дигидроксibenзойную и α -циано-4-гидроксикоричную кислоты. Первая особенно удобна для легких соединений с молекулярной массой до 1000 дальтон, поскольку характеризуется незначительными фоновыми пиками в области низких масс. Отмывание пробы, уже нанесенной на матрицу, от примесей солей и ПАВ приводит к улучшению качества спектра, но приемлемого результата можно достигнуть и с неочищенной пробой. К недостаткам метода можно отнести тот факт, что некоторые компоненты неочищенных смесей могут давать очень интенсивные пики в спектрах. Эти пики могут маскировать наличие действительно важных для исследователя компонентов, т.е. МАЛДИ не является методом количественного анализа.

Благодаря образованию многозарядных ионов электрораспыление в режиме прямого ввода пробы или ЖХ/МС позволяет устанавливать молекулярные массы пептидов и белков, работать со смесями соединений, надежно определять последовательность аминокислотных звеньев в условиях МС/МС. Практические наблюдения показывают, что для электроспрея характерно присоединение одного протона на участок цепи аминокислот массой в 1000 дальтон. Таким образом, белок с молекулярной массой 100 килодальтон можно зарегистрировать в области m/z 1000, а спектр будет представлен набором полипротонированных молекул. В разд. 5.13 подробно описан метод расчета молекулярной массы соединения по такому спектру. Процессы деконволюции спектра и установления молекулярной массы осуществляются программным обеспечением современных масс-спектрометров.

Помимо высочайшей чувствительности (10^{-18} – 10^{-21} М) и возможности работы с термолабильными и нелетучими веществами, электроспрей позволил анализировать соединения с молекулярными массами выше миллиона дальтон [304]. Зафиксированный рекорд составляет 110 000 000 дальтон [14], когда в масс-спектрометре с преобразованием Фурье удалось измерить молекулярную массу ДНК бактериофага Т4, зарегистрировав протонированные молекулы с зарядом 28–35 тысяч. Все же следует отметить, что электроспрей работает с максимальной эффективностью для анализа соединений с массой до ~ 150 000 дальтон. К недостаткам метода можно отнести требования высокой гомогенности пробы и отсутствия значимых уровней солей (менее 1 миллимоля).

Молекулярная масса белка является его ключевой физико-химической характеристикой. Она отражает его аминокислотный состав и наличие модифицирующих заместителей. Измерение массы позволяет выявить также чистоту и гомогенность образца. Определение молекулярной массы пептидов не представляет сложности. Для «легких» представителей этого класса (молекулярная масса 1–8 килодальтон) можно использовать все три указанные выше метода (ББА, МАЛДИ, ИЭР). Любой анализатор, включая квадруполь и ионные ловушки, дает возможность определить среднюю молекулярную массу (разд. 4.3) соединения, а разрешающая способность современных времяпролетных анализаторов, орбитальных ловушек и приборов ионного циклотронного резонанса позволяет надежно установить моноизотоп-

ную массу, что во многих случаях достаточно для определения элементного состава пептидов. Для полипептидов и белков с большими молекулярными массами бомбардировка быстрыми атомами неприменима, но два другие метода отлично справляются с задачей.

11.1.2.1. Установление последовательности аминокислотных звеньев

Пептиды – это сложные молекулы, состоящие из тысяч атомов. Поэтому количество возможных путей фрагментации их молекулярных ионов практически не ограничено и определяется конкретной структурой каждой индивидуальной молекулы. Однако основные направления распада оказываются общими для всех соединений этого класса. Они связаны с разрывами пептидных связей вдоль скелета молекулы с образованием характеристических серий ионов [5, 978, 980]. Безусловно, для получения информативных масс-спектров требуется применение тендеменной масс-спектрометрии (гл. 7). Большинство белков состоит из 20 аминокислот (таблица в Приложении 1). В этой таблице наряду с химической формулой представлены молекулярные массы этих кислот, массы их остатков (фрагментов цепочки пептида) и массы боковых групп (заместители у α -атома углерода). Поскольку на одном конце пептида находится аминогруппа, а на другом – карбоксильная группа, масса пептида равна сумме масс остатков аминокислот плюс 18 дальтон (вода). Полные структурные формулы пептидов для упрощения изображаются в виде последовательности аминокислотных остатков в однобуквенном или трехбуквенном изображении (таблица в Приложении 1).

Можно выделить два основных направления масс-спектрометрического исследования пептидов. Первое связано с детектированием в образце и идентификацией уже известных пептидов. Этот подход стал рутинным для пептидов с молекулярной массой до 3–4 тысяч дальтон. Он особенно ценен для идентификации белков. Второе направление посвящено установлению первичной структуры ранее неизвестных пептидов (*de novo* секвенирование). Масс-спектрометрия практически полностью вытеснила классический биохимический метод эдмановского разложения [981]. Чувствительность эдмановского разложения невысока, пептиды перед секвенированием должны быть хорошо очищены от примесей, а реагент Эдмана не взаимодействует с модифицированными по терминальной аминогруппе пептидами. Поскольку каждый шаг деградации не протекает количественно, с каждым новым шагом появляется все больше аминокислот, не отщепившихся на более ранних стадиях. Хроматограммы усложняются, что сильно затрудняет интерпретацию получаемых данных. Надежно идентифицировать можно лишь пептиды длиной не более 25 аминокислотных звеньев, а для пептидов с числом звеньев более 35 установление полной первичной структуры становится практически невозможным. Кроме того, поскольку эдмановское расщепление основано на последовательном разрыве амидных связей, любые посттрансляционные модификации исходного пептида приведут к образованию нестандартных молекул. Для их идентификации необходимо иметь богатейшую библиотеку стандартов всех возможных модификаций аминокислот. Метод несравнимо медленнее масс-спектрометрического. Определение одного аминокислотного остатка в последовательности пептида занимает 45 минут. Да и стоимость секвенирования по Эдману выше, чем с использованием масс-спектрометрии.

Леддерное секвенирование представляет собой энзиматический гидролиз амидных связей исходного пептида с С- или N-конца с масс-спектрометрическим определением всей совокупности продуктов реакции. Детектируются леддеры пептида, содержащие на одну, две, три и т.д. концевых аминокислоты меньше, чем исходный пептид. По разнице в массах леддеров устанавливается последовательность звеньев в исходном пептиде. МАЛДИ представляет собой наиболее удобный метод анализа леддеров [5].

Для наиболее надежного установления последовательности аминокислотных звеньев в пептидах используют метод tandemной масс-спектрометрии. Можно работать со спектрами как положительных, так и отрицательных ионов. Если есть возможность, всегда полезно использовать ионы-предшественники разной зарядности и разные методы инициирования фрагментации, поскольку они предоставляют комплементарную информацию. Благодаря предпочтительным разрывам конкретных связей молекулярного иона в спектре доминируют пики ионов, образующихся в результате элиминирования 1,2,3 и т.д. аминокислот. Величины m/z фрагментных ионов указывают на исходную последовательность аминокислот в пептиде.

10.1.2.1.1. Классификация фрагментных ионов

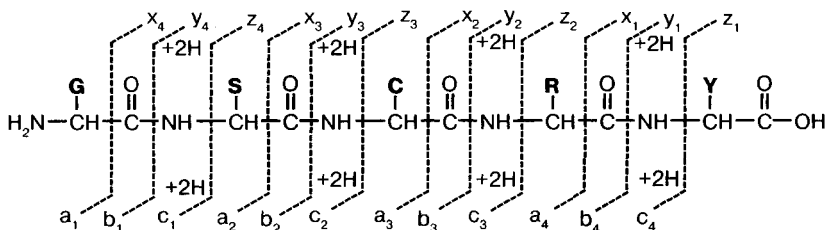


Рис. 11.3. Основные направления фрагментации молекулярного иона пептида GSCRY

Рассмотрим структурную формулу молекулы пентапептида глицил-серил-цистил-аргинил-тирозина (рис. 11.3). Это соединение можно записать также в трехбуквенном (GlySerCysArgTyr) или однобуквенном (GSCRY) варианте. Классификация общих фрагментов, образующихся при фрагментации пептидов, была предложена Ропшторфом в 1984 году [1980]. Чуть позже К. Биман [1982] предложил несколько отличную номенклатуру, включившую иммониевые и сателлитные (вторичные) фрагментные ионы. В зависимости от того, какая связь рвется и на какой части молекулы сохраняется заряд (N-конец или С-конец), выделяют несколько серий ионов. Фрагменты с зарядом на С-концевой части исходной молекулы изображаются символами X, Y и Z, а фрагменты, в которых заряд сохраняется на N-концевой части исходной молекулы, — символами A, B и C (рис. 11.3). Различия в номенклатурах Ропшторфа и Бимана заключаются лишь в том, что во втором случае ионы обозначаются строчными, а не заглавными буквами, а ионы серий Y и C образуются в результате не простого разрыва C—N связи, а разрыва с миграцией двух атомов водорода к заряженному фрагменту, что, кстати, соответствует действительности. На рис. 11.4 приведены структуры нескольких фрагментных ионов серий a, b, c, x, y, z,

образующихся в условиях ДИС MH^+ пентапептида, представленного на рис. 11.3. Следует отметить, что ионы b преимущественно существуют не в представленной на рис. 11.3 линейной, а в циклической оксазоланоновой форме. Отсутствие ионов b_1 в спектрах ДАС объясняется невозможностью образования циклического интермедиата в этом случае. Существование как циклической, так и ациклической формы b -ионов убедительно доказано [5]. Есть данные [983] о возможности существования ионов b еще в нескольких формах (дикетопиперазина, ацилия, с протоном на N-конце). Механизмам образования и структурам b ионов посвящен обзор [984]. Еще одна форма b -ионов связана с их циклизацией по типу голова-хвост. Наличие свободной N-концевой аминогруппы является главным условием циклизации. Возникающий циклический ион может далее раскрыться по любой пептидной связи. В результате возникает набор b -ионов с измененной последовательностью аминокислотных звеньев. Чем дольше ионы находятся в ячейке, тем выше выход перегруппировочных ионов [5]. Этот процесс может помешать провести корректное *de novo* секвенирование как в ручном, так и в автоматическом режиме с применением компьютерных программ. Возможность подобной циклизации привела даже к дискуссии в масс-спектрометрическом сообществе о потенциальной невозможности надежного прочтения сиквенса пептидов по масс-спектру. Тем не менее анализ ДАС и ДАСПЭ спектров более 25 000 триптических пептидов показал, что менее 1% исследованных соединений претерпевают скрамблинг, т.е. проблема не столь критична [985].

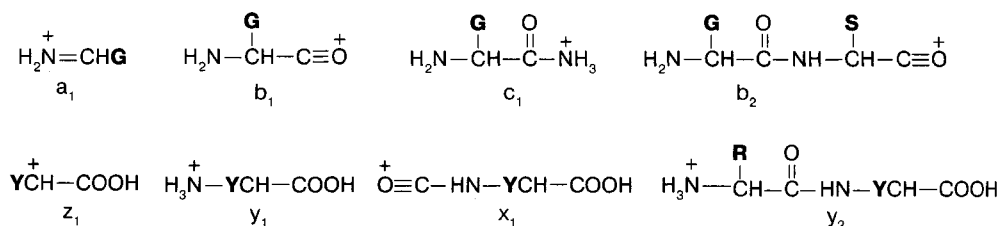


Рис. 11.4 Структуры некоторых фрагментов пептида GSCRY

Наиболее ценными при использовании низкоэнергетических столкновений оказываются ионы серий y и b . Они образуются в результате разрыва амидной связи, а их пики, как правило, доминируют в спектре. Например, в спектре пентапептида GSCRY должны наблюдаться пики ионов с m/z 528, 441, 404, 338, 248, 182, 145.

Как уже отмечалось, и электрораспыление, и МАЛДИ приводят к образованию исключительно протонированных молекул пептидов, и для проведения структурного анализа необходима тандемная масс-спектрометрия. Существует целый ряд методов активации разрывов пептидной цепи (гл. 7).

На схеме 11.1 представлены типы ионов, образующихся при некоторых способах активации фрагментации пептидов. Стрелками изображены методы активации разрывов различных связей в цепи протонированных пептидов. Чаше других используется диссоциация, активированная соударениями (ДАС), – с ее помощью получена львиная доля тандемных масс-спектров пептидов. Методы диссоциации при отрыве электрона (ДОЭ), диссоциации при захвате электрона (ДЭЗ), диссоци-

ации при переносе электрона (ДПЭ), инфракрасной мультифотонной диссоциации (ИКМФД), ультрафиолетовой фотодиссоциации (УФФД), диссоциации, индуцируемой поверхностью (ДИП), а также распад в источнике (РВИ) и за пределами источника (РПИ) в случае МАЛДИ представлены в гл. 7.

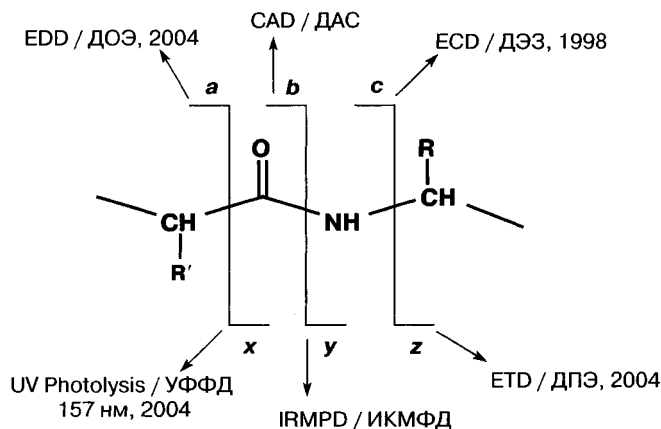


Схема 11.1. Важнейшие методы инициирования фрагментации пептидных ионов

Метод расшифровки масс-спектров основан на дедуктивном подходе, восстанавливающем последовательность аминокислот в пептиде по разностям в массах фрагментных ионов. Этот подход детально обсуждается в [986]. Полностью автоматизированные методы детектирования и количественного определения известных пептидов и белков по спектрам ДАС очень эффективны (см. ниже). Примеров же установления однозначного пептидного *de novo* сиквенса, т.е. выявления первичной структуры неизвестного ранее пептида, исключительно на основе ДАС спектров не так много.

Первичной задачей расшифровки спектра ДАС пептидов является поиск двух ионов, масса которых отличается от массы протонированной молекулы на массу остатка какой-либо кислоты или на сумму масс аминокислотного остатка и молекулы воды. Первый ион открывает у-серию, а второй — b-серию. Пики ионов обеих серий отстоят друг от друга на величину массы аминокислотных остатков (табл. 2 Приложения). Практически никогда не удается дойти до конца серий у и b. В области низких масс интенсивности соответствующих пиков очень низкие (за исключением пары ионов a_2/b_2). Иногда пики отсутствуют вовсе. Поэтому важно приступать к расшифровке последовательности с двух сторон. Если удалось дойти до места, где серии у и b начинают перекрываться, задачу можно считать решенной. Большое количество пиков других ионов делает масс-спектр многолинейчатым. Зачастую определить пики ионов серий у и b не так просто, поскольку их интенсивности существенно ниже, чем интенсивности пиков ионов других типов. На интенсивности пиков характеристических ионов влияют несколько факторов: различия в легкости разрыва пептидной связи между разными аминокислотами, дополнительные выгодные направления фрагментации конкретных аминокислот, вторичные процессы фрагментации и т.д.

Эффективность протонирования различных аминокислотных остатков зависит от величины их сродства к протону. Преимущественными местами протонирования являются основные аминокислоты (Arg (251 ккал/моль) > Lys (238 ккал/моль) \approx \approx His (236 ккал/моль)) и атом азота концевой аминокислотной группы пептида. Чем легче протонируется конкретная пептидная связь, тем более интенсивными будут пики, обусловленные ее разрывом (фрагментация инициируемая заряженным центром, разд. 3.2). Если на N-конце молекулы находятся аргинин или лизин, в масс-спектре будут доминировать пики ионов серии b. Если эти аминокислоты замыкают C-конец пептида, наиболее интенсивными будут пики ионов серии y [987].

Кислотные группы боковых цепей аминокислот могут стабилизировать положительный заряд, поэтому разрывы пептидной связи рядом с глутаматным или аспартатным остатком зачастую приводят к интенсивным пикам в спектре. Очень часто повышенной интенсивностью обладают пики ионов, образовавшихся в результате разрыва амидных связей в центральной части молекулы.

11.1.2.1.2. Концепция мобильного протона

Разрыв полипептидной цепи в условиях ДАС инициируется катионным центром протонированного аминокислотного остатка. Возникновение серий b- и y-ионов возможно только в случае разрывов разных пептидных связей, т.е. при статистическом распределении мест протонирования аминокислот в пептиде. Для объяснения экспериментальных результатов была выдвинута концепция мобильного протона [988]. В этом случае все основные аминокислоты протонированы, а один дополнительный протон (мобильный) мигрирует по всей пептидной цепи, поскольку все остальные потенциальные места связывания имеют близкую величину сродства к протону. Подробнее с механизмами диссоциации пептидной связи в условиях разных видов инициирования фрагментации можно познакомиться в учебном пособии [5] и цитированных в нем статьях.

Если мобильный протон в системе отсутствует, то протекают в основном процессы разрывов связей, удаленных от места локализации заряда. Это, кстати, характерно для МАЛДИ, когда фрагментирует, как правило, монопротонированная молекула.

11.1.2.1.3. Альтернативные процессы фрагментации

Некоторые боковые группы аминокислот отвечают за специфические направления фрагментации, не связанные с разрывом пептидных связей. В частности, серин и треонин, содержащие гидроксильные группы в боковых цепях, легко отщепляют молекулу воды. Аналогично, молекула сероводорода легко отщепляется цистеиновым фрагментом. Интенсивность таких побочных ионов может значительно превосходить интенсивность пиков основных характеристических ионов.

На схеме 11.2 представлены процессы отщепления боковой группы с образованием вторичных ионов w, d и v. Высокоэнергетические столкновения приводят к спектру, в котором доминируют именно пики ионов серий a и d (рис. 11.5). Регистрация этих ионов дает возможность подтверждать установленную по основным ионам последовательность аминокислот, а также делать полезные для структурных исследований выводы, например различать изомерные лейцин и изолейцин (разд. 11.1.2.1.4).

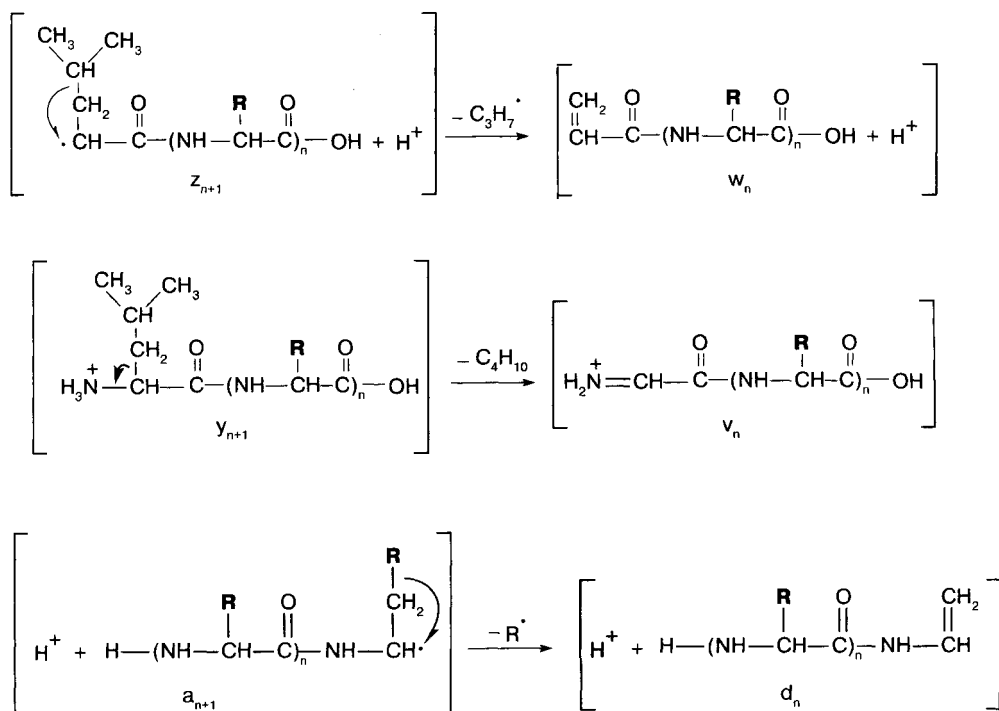
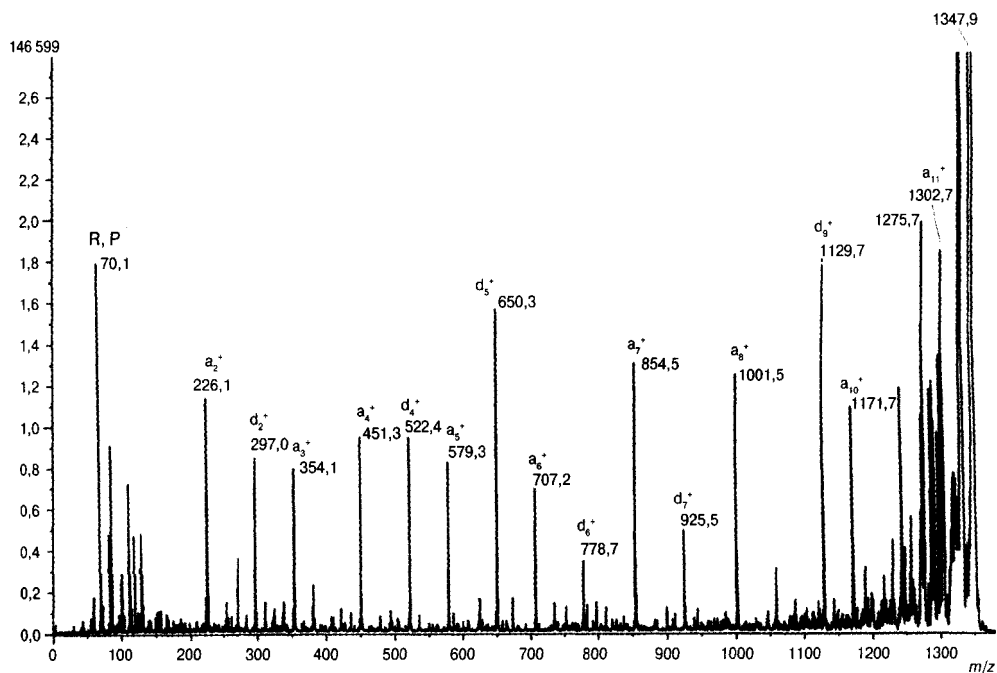


Схема 11.2

Рис. 11.5. Спектр высокоэнергетической ДАС MH^+ пептида RRPQQFFGLM с m/z 1348,7

Пролин обладает специфическими свойствами. Например, он препятствует расщеплению пептидной связи трипсином, если связан с С-концом лизина или аргинина. Аналогичный эффект наблюдается и в случае масс-спектрометрической фрагментации. Пептидные связи пролина могут не разорваться в условиях эксперимента, и соответствующие ионы серий у и b будут отсутствовать в спектре. Тем не менее при повышении энергии соударений (ДАСПЭ) эти разрывы идут достаточно интенсивно [989]. Такой эффект пролина можно объяснить его структурой (α -пирролидинкарбоновая кислота). Пирролидиновый цикл, включающий и α -атом углерода, и аминогруппу в пептидной цепи, имеет очень низкую основность. Его протонирование и последующий разрыв пептидной связи крайне затруднен. Энергетически невыгодна и циклическая структура интермедиата, возникающего при его фрагментации по обычному механизму [5].

Для проверки или более надежного установления сиквенса пептиды дериватизуют. Например, обработка пептида раствором HCl в метаноле позволяет прометилировать все свободные карбоксильные группы, а ацетилирование – дифференцировать изобарные лизин и глутамин.

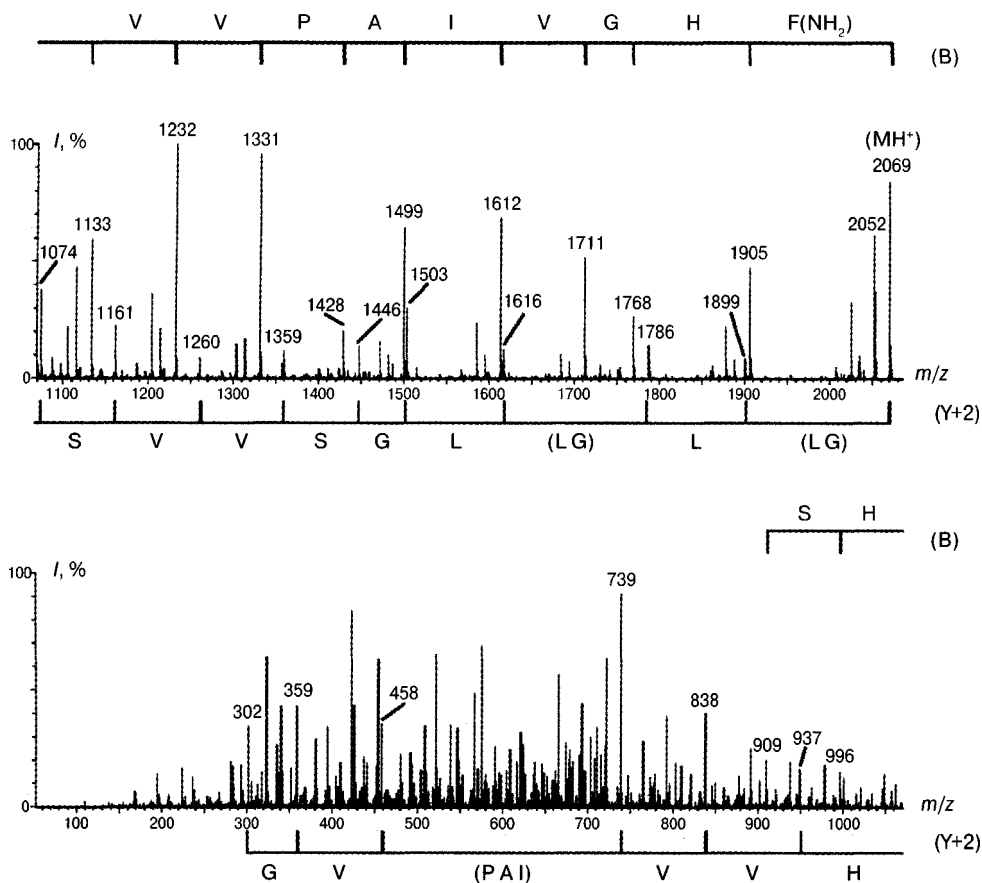


Рис. 11.6. Масс-спектр ДАС протонированной молекулы пептида (GL)L(GL)LGSV-VSHVVPAlVGHF-NH₂

На рис. 11.6 представлен масс-спектр ДАС MH^+ пептида состава (GL)L(GL)LGSVSVSHVVPAlVGHF-NH₂ с амидированным С-концом. Над спектром обозначена последовательность аминокислотных звеньев со стороны С-конца (серия b), а под спектром — со стороны N-конца (серия y). Некоторые ионы этих серий отсутствуют в спектре. В этих случаях нельзя точно установить порядок пары (LG или GL) аминокислотных звеньев. Поскольку серии y и b дополняют друг друга, иногда можно установить точную последовательность, используя информацию лишь одной серии. Например, в серии y последовательность аминокислот внутри участка PAI не определяется (рис. 11.6). Однако это легко сделать по серии b.

Как уже отмечалось, в случае тяжелых пептидов и белков процесс определения последовательности аминокислотных звеньев часто проводится не с самой молекулой, а с ее более короткими фрагментами, которые получают путем химического или ферментатического расщепления исходной молекулы.

Задача 11.1. По спектру активации соударением MH^+ пептида (рис. 11.7) установите последовательность аминокислот по пикам ионов серий y и b. Принимайте во внимание только маркированные пики. С-концевая гидроксильная группа заменена на аминную.

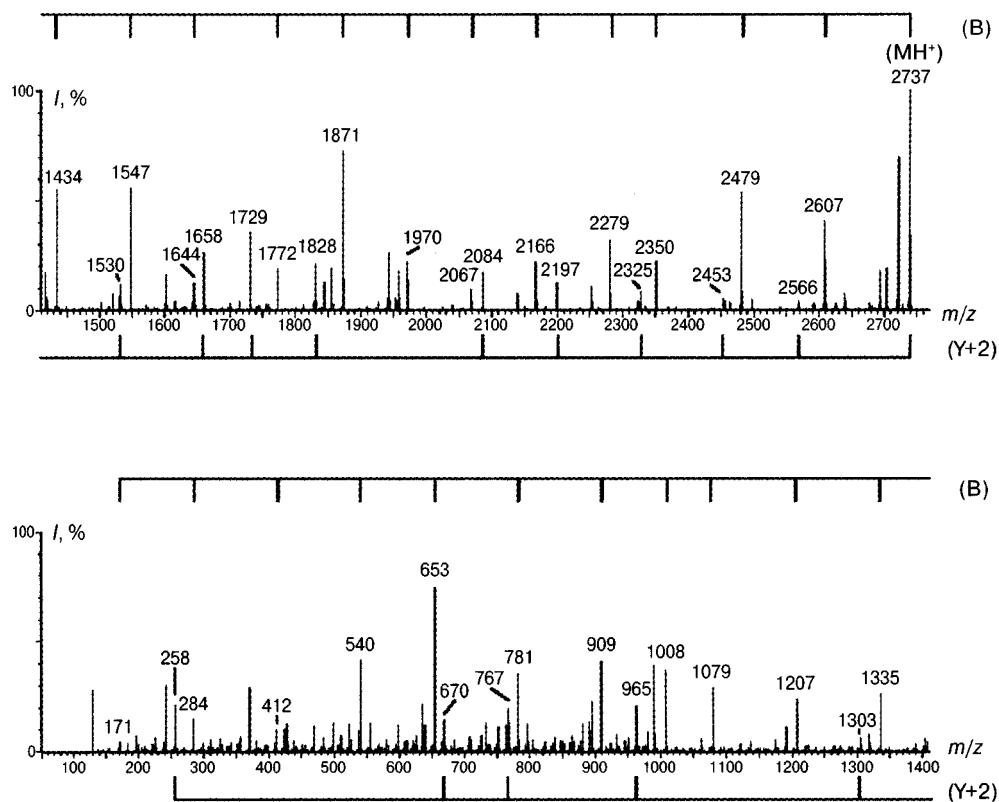


Рис. 10.7. Масс-спектр активации соударением MH^+ олигопептида

Задача 11.2. Определите последовательность аминокислотных звеньев в масс-спектре активации соударением MH^+ олигопептида, представленном на рис. 11.8. Принимайте во внимание только маркированные пики. С-концевая гидроксильная группа заменена на аминную.

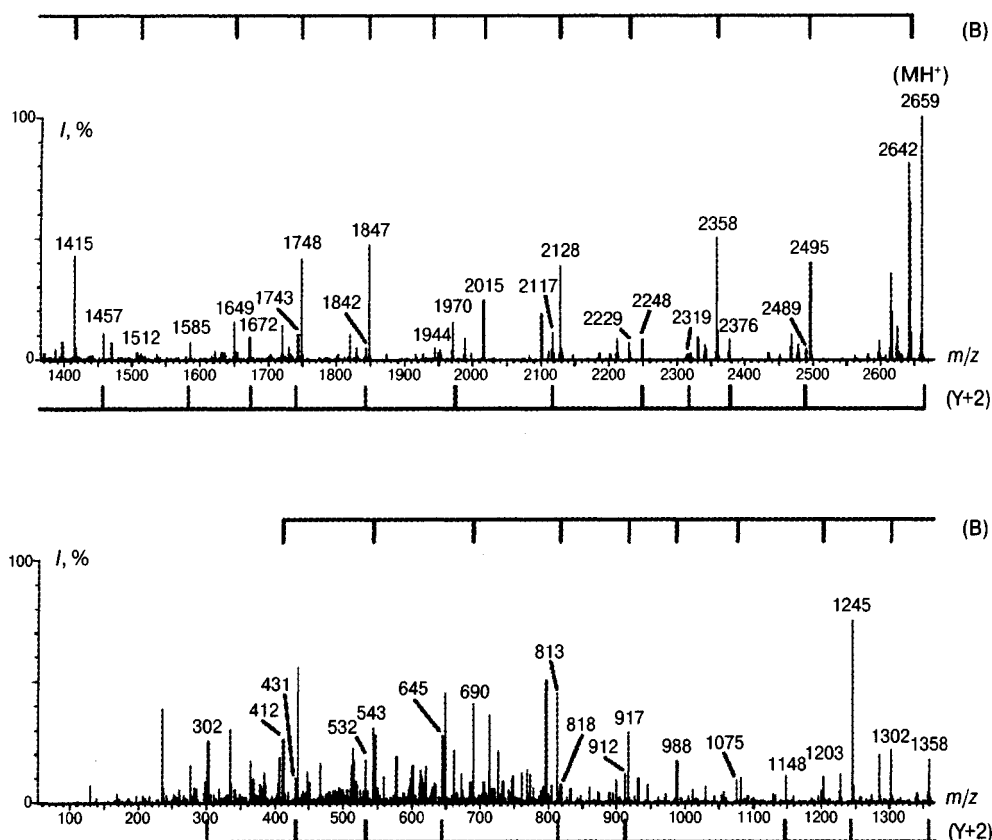


Рис. 11.8. Масс-спектр активации соударением MH^+ олигопептида

11.1.2.1.4. Проблемные вопросы секвенирования пептидов

Расшифровка масс-спектра пептида представляет собой достаточно сложную, но увлекательную процедуру. Среди всего многообразия пиков в спектре (см. все спектры в гл. 11) надо выбрать ключевые, которые предоставляют структурную информацию. Говоря о сложностях, можно выделить покрытие сиквенса (не все пептидные связи рвутся), циклизацию b -ионов, наличие изобарных (например, лизин и глутамин) и изомерных (лейцин и изолейцин) аминокислот, существование внутри- и межпептидных $S-S$ связей за счет присутствия в цепочках цистеина. Все эти сложности могут быть преодолены химическими или исключительно масс-спектрометрическими методами [5].

Покрываемость сиквенса может быть увеличена при использовании полипротонированных молекул пептида с разным числом протонов (зарядов) или нескольких методов инициирования фрагментации. В разд. 7.1.3.1 приведен пример с установ-

лением аминокислотной последовательности эскулентина-2Ra при использовании комплементарной информации спектров ДАС и ДЗЭ [466].

Изобарные аминокислоты легко различить при использовании приборов высокого разрешения или дериватизации [5]. Проблема циклизации b-ионов не столь критична [985], а в необходимых случаях можно использовать процессы дериватизации с модификацией N-концевой аминогруппы. Наиболее эффективными являются процессы ацилирования, сульфобензоилирования и введения фиксированного заряда [178]. В последнем случае в спектре появляется даже пик иона b_1 .

Межцепочечные дисульфидные связи усложняют прочтение спектра, а внутримолекулярные делают невидимой последовательность аминокислот внутри образующегося цикла. Разорвать дисульфидные связи можно, применив высокоэнергетические разрывы при активации соударениями [990], методы распада за пределами источника [991] и при захвате электрона [992], а также используя спектры отрицательных ионов [993]. Иногда удается прочесть последовательность внутри дисульфидного цикла и без разрушения S—S связи. Характеристическая серия ионов может присутствовать в спектрах ДАС или ДАСПЭ. Она связана с предварительной изомеризацией протонированной молекулы с раскрытием цикла в результате разрыва связи между двумя крайними аминокислотными остатками на C-конце [989, 994]. Однако во всех этих случаях успех не гарантирован, и полный сиквенс может быть не установлен.

Наиболее распространенным методом химического разрушения дисульфидной связи является ее восстановление с образованием свободных тиольных групп цистеинов. Для того чтобы предотвратить возможное окисление с повторным образованием дисульфидной связи, обычно используют алкилирование цистеина по тиольной группе (схема 11.3).

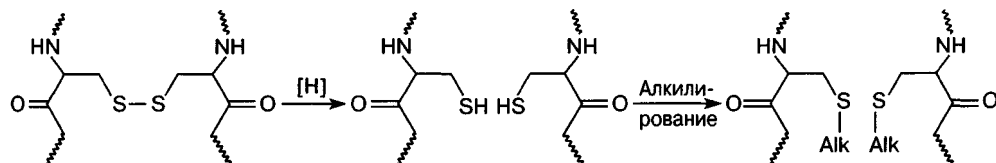


Схема 11.3

Существуют самые разнообразные методы восстановления и алкилирования [5, 974, 995]. Наиболее популярен для секвенирования белков метод восстановления дисульфидной связи дитиотреитолом с последующим превращением SH-групп в карбоксамидометильные производные иодацетамидом. Дисульфидную связь можно также разрушить надмуравьиной кислотой [996]:

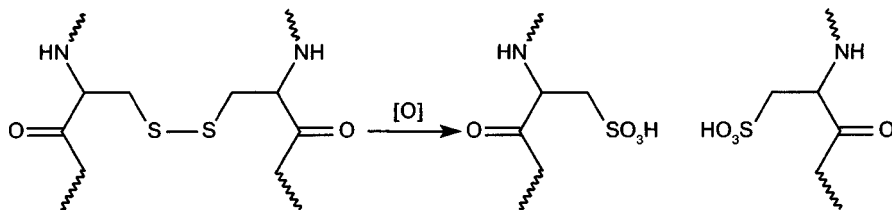


Схема 11.4

Преимущество окисления (схема 11.4) надмуравьиной кислотой проявляется в более выраженной фрагментации окисленных по цистеинам пептидов в условиях РПИ и ДАС. На рис. 11.9 представлен спектр МАЛДИ-ВП-ВП бревинина 2Ra с молекулярной массой 2636 Да, выделенного из кожного секрета лягушки *Rana ridibunda*, после окисления дисульфидной связи [997]. Два дополнительных протона сульфоновых кислот, образовавшихся в результате окисления, резко изменяют картину фрагментации пептида в МАЛДИ, превращая ее из фрагментации под действием удаленного заряда в более эффективную фрагментацию под действием мобильного протона. В результате появляется интенсивная серия у-ионов $y_2 - y_7$, позволяющая надежно установить С-концевую последовательность.

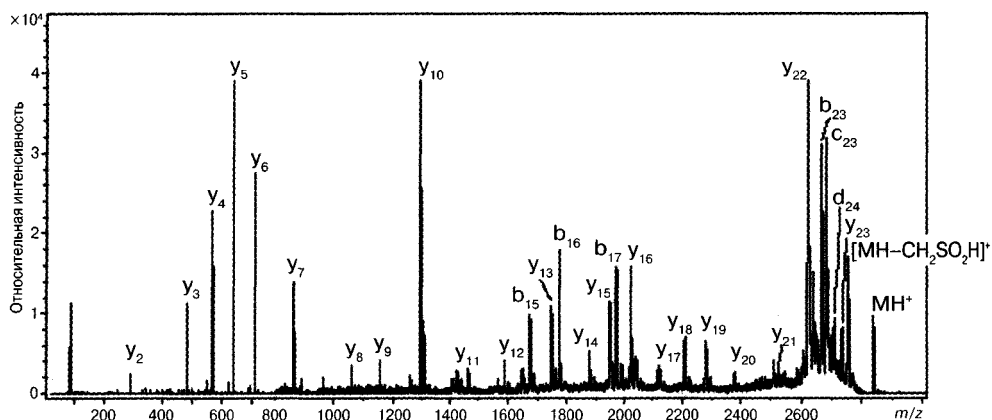


Рис. 11.9. Спектр МАЛДИ-ВП-ВП бревинина 2Ra, выделенного из кожного секрета лягушки *Rana ridibunda*, после окисления S–S связи [997]

Наиболее эффективный подход дифференцирования изомерных (лейцин и изолейцин) аминокислот базируется на возможности регистрации в спектрах полипептидов вторичных d- и w-ионов (схема 11.2). Эти ионы редко проявляются в низкоэнергетических спектрах ДАС. Даже при их наличии их можно пропустить, поскольку интенсивности их пиков очень малы. Существует несколько вариантов решения этой проблемы [489]. Наиболее информативным до последнего времени был метод захвата электронов с энергией около 10 эВ с образованием вторичных w-ионов из z-ионов [998]. Этот процесс представлен на схеме 11.2. К сожалению, и этот метод не очень эффективен, поскольку ему не хватает селективности, так как в процессе задействованы все первичные ионы и спектры оказываются очень сложными. Проблема была решена с появлением орбитальной ловушки Fusion (Thermo), которая позволила разделить процессы. Сначала методом диссоциации при переносе электрона генерируются нечетноэлектронные z-ионы. Далее z-ионы со спорным аминокислотным остатком (I или L) на N-конце выделяются и их фрагментация инициируется соударениями. При передаче минимальной дополнительной энергии идет исключительно селективный распад с выбросом этильного (метильного) или изопропильного радикала (инициирование распада

радикальным центром, разд. 3.2), который и определяет присутствие лейцина или изолейцина [489]. На рис. 11.10 представлен масс-спектр ДПЭ-ДАСПЭ первичного иона z_{23}^{3+} , образующегося при фрагментации тетрапротонированной молекулы VIPFVASVAAEMMQHVYCAASRRRC (бrevinin-1Ra). В спектре присутствуют только ион-предшественник (полный кластер) и ионы-продукты (полные кластеры), возникающие при выбросе метильного, этильного радикалов и молекулы бутилена, что характерно для изолейцинового фрагмента. Нет даже следов альтернативного выброса 43 единиц массы (изопропил), что было бы характерно для лейцина. На вставке рис. 11.10 представлена вся шкала масс. Никаких других пиков нет, т.е. процесс выброса характеристических частиц предельно селективен. Аналогичная селективность характерна и для всех других экспериментов по установлению присутствия лейцина или изолейцина в пептидных цепях методом ДПЭ-ДАСПЭ. На рис. 11.11 представлен масс-спектр ДПЭ-ДАСПЭ первичного иона z_{12}^{2+} , образующегося при фрагментации трипротонированной молекулы FLPLLAGLAANFLPKIFCKITRKC (бrevinin-1E). Помимо кластера иона-предшественника, в спектре присутствует только кластер ионов-продуктов w_{12}^{2+} , образовавшийся при отщеплении изопропильного радикала, что однозначно определяет лейцин в положении 12 пептида [489].

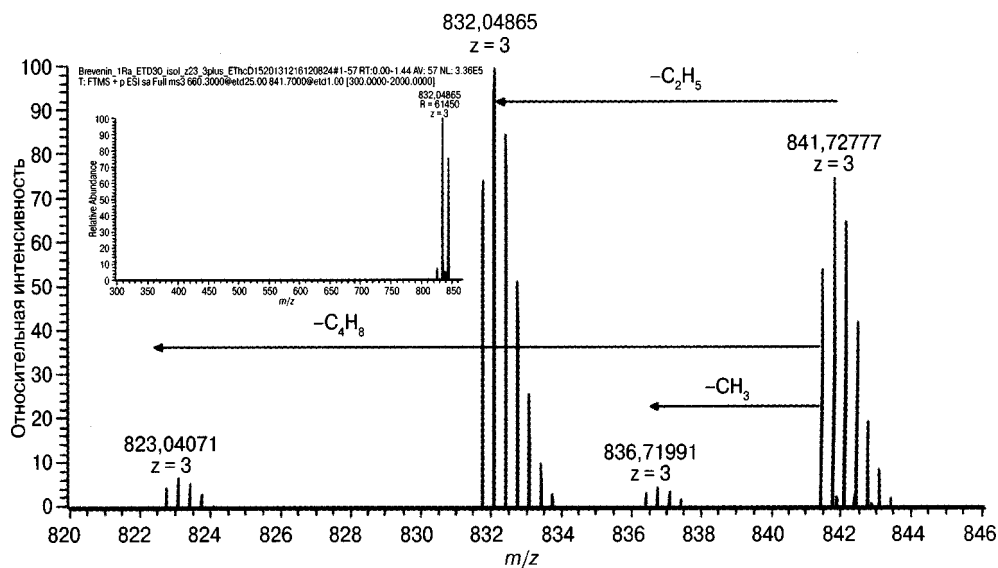


Рис. 11.10. Масс-спектр ДПЭ-ДАСПЭ первичного иона z_{23}^{3+} , образующегося при фрагментации бревинина-1Ra. На вставке тот же спектр в полной шкале масс

В условиях ДПЭ-ДАСПЭ не идет процесс миграции радикального центра, а изомерные остатки могут быть надежно определены даже при их соседнем расположении в пептидной цепочке. В качестве ионов предшественников метод позволяет использовать протонированные молекулы с зарядностью >2 , а z -ионы любой зарядности [489].

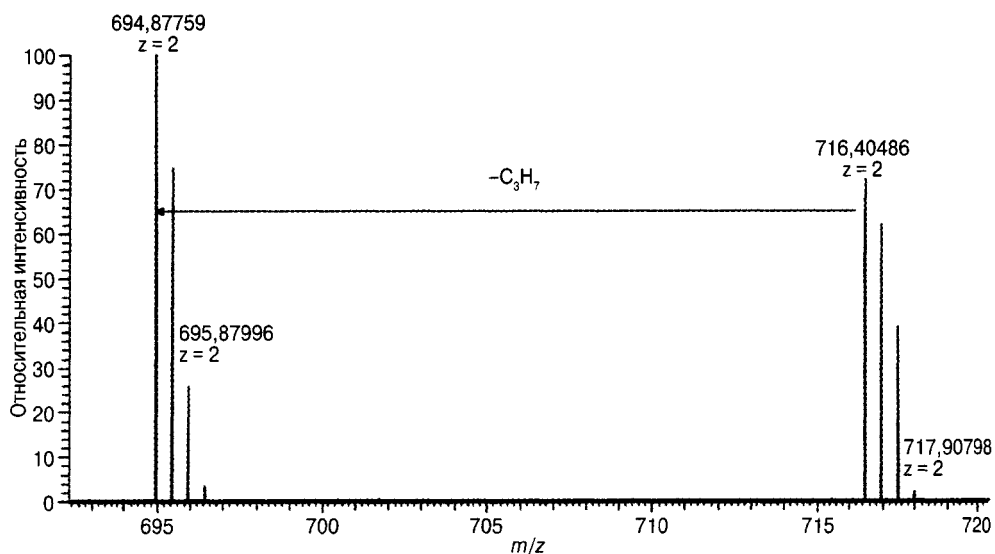


Рис. 11.11. Масс-спектр ДПЭ-ДАСПЭ первичного иона z_{12}^{2+} , образующегося при фрагментации бревинина-1Е

11.1.2.1.5. Масс-спектры отрицательных ионов пептидов

Для целей секвенирования можно использовать и спектры отрицательных ионов [999, 1000]. Разрывы полипептидной цепи депротонированных молекул протекают по механизму, включающему образование енолат-ионов непосредственно при депротонировании пептида или в результате переноса протона к концевой COO^- (CONH^-) группе [1001]. В большинстве случаев по спектрам отрицательных ионов установить сиквенс пептида сложно, а спектры положительных ионов, зарегистрированные для тех же пептидов, оказываются значительно более информативными. Однако иногда масс-спектры депротонированных пептидов характеризуются весьма представительными сериями фрагментных ионов. В некоторых случаях, особенно для коротких пептидов, применение масс-спектрометрии отрицательных ионов позволяет без предварительной дериватизации разорвать S—S связь и установить сиквенс пептида внутри дисульфидного цикла [993]. Подробнее о масс-спектрометрическом секвенировании пептидов с использованием отрицательных ионов можно прочитать в пособии [5]

11.1.3. Масс-спектрометрия белков

В настоящее время, когда определены последовательности аминокислотных звеньев миллионов различных пептидов и белков, полностью или частично расшифрованы геномы самых разнообразных организмов, во многих случаях определение молекулярной массы полипептида или белка позволяет его идентифицировать.

Как правило, в наиболее популярных базах данных сам масс-спектр не содержится, он генерируется программным обеспечением, исходя из известной аминокислотной последовательности (сиквенса) белка или пептида. Существует несколько способов идентификации полипептидов, и алгоритмы генерирования

теоретических масс-спектров напрямую зависят от выбранного метода (МС или МС/МС), а также основных направлений фрагментации полипептидных цепей (например, образование пар b/y, a/x или c/z ионов при использовании tandemной масс-спектрометрии).

Практически все известные к настоящему моменту последовательности белков объединены в базы данных, которые находятся в открытом через Интернет доступе. Наиболее популярной среди масс-спектрометристов является объединенная база белковых сиквенсов UniProt (<http://www.uniprot.org/>), поддерживаемая тремя ранее независимыми провайдерами. UniProt включает в себя:

UniProtKB/Swiss-Prot: база данных белковых последовательностей швейцарского института Биоинформатики в Женеве (ранее она называлась Swissprot), а основным достоинством этой библиотеки является тщательная проверка приводимых последовательностей, незначительное (по сравнению с другими базами) число ошибок, а также наличие ссылок и аннотаций. На январь 2015 года эта база данных содержала 547 357 последовательностей;

UniProtKB/TrEMBL: надежная база данных о белках, генерированная компьютерным анализом (в том числе цитирование и аннотация) доступных данных о последовательностях. Эта база данных (ранее называемая TrEMBL) поддерживается европейским институтом биоинформатики в Хинкстоне (Великобритания). На январь 2015 года эта база данных содержала 89 451 166 последовательностей.

Национальным фондом исследований в области биомедицины (Вашингтон, США) создана база данных белковых последовательностей PIR-PSD..

Помимо этого, консорциумом UniProt обеспечен доступ к белковым базам данных ряда других организаций в Европе и Японии.

11.1.3.1. Метод идентификации белков «снизу вверх»

Для идентификации белков наиболее популярным вариантом является энзиматическое расщепление молекулы с последующим масс-спектрометрическим анализом его фрагментов. Часть этих фрагментов могла быть изучена кем-либо ранее, а соответствующая информация присутствовать в базах данных. С остальными фрагментами надо вновь проводить процедуру биохимического расщепления с установлением молекулярных масс и строения фрагментов уже второго поколения. Наиболее популярным ферментом является трипсин, который расщепляет белковую цепь по С-концам лизина и аргинина. Поскольку доля этих аминокислот составляет около 11%, в результате расщепления появляются пептиды, содержащие 5–15 аминокислотных звеньев. Их масса составляет примерно 1–2 килодальтона и позволяет использовать процедуру прямого масс-спектрометрического секвенирования. Еще одно преимущество в случае триптических пептидов заключается в образовании при электрораспылении в основном двухзарядных ионов, причем заряды расположены на противоположных концах пептида. Учитывая, что С-конец триптических пептидов всегда представлен самыми основными среди аминокислот аргинином или лизином, именно на них и на N-конце будут располагаться два протона, причем N-концевой будет мобильным. Поэтому в спектрах ДАС триптических пептидов практически всегда наблюдаются представительные серии b- и y-ионов, чем обеспечивается высокое покрытие сиквенса.

Введение полученного массива данных в компьютерную библиотеку белкового поиска (например, Mascot) позволяет идентифицировать исходный белок и оценить надежность его определения по доле полной последовательности белка, охарактеризованной идентифицированными фрагментами (score). Такой подход называется «снизу вверх», а в англоязычной литературе — «bottom up» [5].

Протеолиз нескольких белков может быть проведен и без их предварительного разделения. Это, безусловно, значительно увеличивает сложность пептидного набора, но одновременно существенно ускоряет процесс идентификации белков с незначительным уменьшением покрытия сиквенса, т.е. надежности идентификации. Широкое использование баз данных и программного обеспечения привело к созданию метода [1002], названного скорострельной протеомикой (shotgun proteomics). Он особенно эффективен, когда геном организма полностью расшифрован.

11.1.3.1.1. Пептидная карта масс

Ручная идентификация пептидов, а тем более белков по масс-спектрам весьма трудоемка и, помимо значительных временных затрат, требует высокого профессионализма оператора [5]. Поскольку решение прикладных биомедицинских проблем подразумевает идентификацию тысяч самых разнообразных белков в кратчайшие сроки, адекватным решением является использование компьютерных баз данных с соответствующим программным обеспечением. Подавляющее большинство масс-спектрометрических исследований в области пептидов и белков выполняется с использованием разнообразных систем компьютерной идентификации.

Пептидное картирование — простой вариант идентификации белков, связанный с установлением только молекулярной массы пептидов [5], полученных при энзиматическом расщеплении анализируемого белка. Для его осуществления нет необходимости использовать тандемную масс-спектрометрию. Обычные масс-спектры ИЭР или МАЛДИ предоставляют достаточно информации для применения поисковых систем. Наряду с масс-спектрометрическим картированием используются хроматографические и электрофоретические методы.

Суть заключается в том, что каждый белок при ферментативном гидролизе может быть охарактеризован практически уникальным набором пептидов. Продукты энзиматического расщепления конкретной протеазой данного белка имеют определенную первичную структуру, и, как следствие, молекулярную массу. Теоретически, масс-спектр анализируемого белкового гидролизата должен предоставлять молекулярных массы всех протеолитических пептидов, а набор этих масс (по сути, чисел) является «отпечатком пальцев» данного белка. Различие в массах между расчетом и экспериментом означает, что данный фрагмент исходной молекулы модифицирован. Важным условием проведения идентификации белков путем пептидного картирования является измерение молекулярной массы с максимальной точностью, т.е. использование масс-спектрометра с максимальной разрешающей способностью и проведение частой калибровки шкалы масс. Это обусловлено тем, что количество возможных вариантов пептидных последовательностей значительно уменьшается с каждым последующим точно известным десятичным знаком [5, 1003].

Пептидная карта масс позволяет проверить правильность сиквенса, установить конформационные изменения в результате связывания лигандов, выявить

посттрансляционные модификации (природу заместителей и места связывания), а также закрытые участки в структуре белка. Сравнение карт белков, сиквенс которых незначительно различается, дает возможность изучать мутации и посттрансляционные модификации. Использование метода ЖХ/МС превносит в картирование пептидов дополнительное измерение – время удерживания [5].

Экспериментально полученная таблица молекулярных масс протеолитических пептидов загружается далее в поисковик для нахождения соответствующих белковых последовательностей в базах данных. Для проведения этого поиска существует несколько вариантов поисковиков, наиболее популярными из которых являются MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>) и Mascot (Peptide mass fingerprint) (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). Существуют также сайты для проведения поиска по белковым профилям конкретных организмов, например по пептидным последовательностям нематод: http://www.nematodes.org/Lumbribase/lumbribase_php/search_pmf.php. Программы по анализу сиквенса белков входят также в пакет программного обеспечения основных производителей масс-спектрометров. Эти программы, используя данные сиквенса белка в качестве основы, позволяют рассчитывать молекулярные массы конкретных пептидных фрагментов (например, после обработки данного белка трипсином). Сравнение полученных результатов с расчетами дает возможность делать надежные выводы о составе и структуре белка.

Обычно белок расщепляется трипсином, проводится масс-спектрометрический анализ смеси продуктов, поиск по белковым базам данных всех теоретически возможных пептидов (продуктов расщепления) для всех известных белков и, наконец, выбор наиболее вероятного соединения, пептидная карта масс которого наиболее близка полученной в эксперименте. Метод проверки установленного сиквенса включает компьютерную программу (SEQUEST), реконструирующую модельный тандемный масс-спектр, который далее сравнивается с реальным масс-спектром с помощью корреляционных функций [1004]. Работа с базами данных становится более эффективной при наличии «меток сиквенса» [1005]. Этот термин означает, что, помимо массы пептида, известна начальная последовательность его аминокислотных звеньев (несколько аминокислот) с любого конца. Если такая метка позволяет подобрать хорошего кандидата в пептидной базе данных, тандемная масс-спектрометрия может быть использована только для подтверждения выбора. Этим методом можно анализировать и модифицированные пептиды. Такой подход значительно сокращает время анализа белков, поскольку расшифровка тандемных спектров, часто требующая длительного времени, опускается.

Если необходимо проанализировать модифицированный белок, последовательность действий отличается незначительно. Сначала определяют молекулярную массу исходного белка. Затем составляют пептидную карту, чтобы обнаружить модифицированные пептиды. Затем ферментативно или химически удаляют модифицирующие группы. Завершается процесс сравнительным масс-спектрометрическим анализом модифицированных и нормальных пептидов.

Метод пептидной карты масс используется также для межвидовой идентификации. В этом случае базы данных по белкам одного организма используются для идентификации менее изученного организма [1006]. В основе этого подхода лежит

правило: если организмы обладают аналогичными белками, места протеолитического расщепления белка на олигопептиды также будут аналогичны.

11.1.3.1.2. Использование МС/МС

Наиболее популярный вариант анализа «снизу вверх» в настоящее время пригоден для анализа самых сложных белковых смесей, а его схема анализа включает денатурацию белковой смеси, в том числе разрушение дисульфидных связей, последующий трипсинолиз и анализ реакционной смеси методом ЖХ-МС/МС. Все полученные в эксперименте tandemные масс-спектры, содержащие информацию о времени удерживания триптических пептидов, величинах m/z ионов-предшественников и ионов-продуктов, преобразовываются в текстовый вид и загружаются в поисковик. Экспериментальные tandemные спектры сравниваются с теоретическими, как и в случае пептидного картирования. В результате выдается пептидный сиквенс и белок, который ему соответствует с наилучшим индексом достоверности. В отличие от пептидного картирования в этом варианте для идентификации всего белка достаточно сиквенса хотя бы одного пептида. «Золотым стандартом» считается идентификация белка как минимум по двум пептидам с индексом достоверности, превышающим граничный.

В наиболее надежном варианте поиска используется информация о частичной или полной аминокислотной последовательности, установленной на основании расшифровки tandemного масс-спектра любого типа или комплекса спектральной информации. Эта информация (последовательность в однобуквенной кодировке) загружается для проведения компьютерного поиска. Наиболее популярными программами для проведения подобного поиска являются следующие: MS-Pattern (<http://prospector.ucsf.edu/>); FASTA [1007] (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_list2.shtml); BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>); Mascot (Sequence Query) (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). Поскольку поисковая система предоставляет полный сиквенс пептида, есть возможность вернуться к масс-спектру и попробовать обнаружить соответствующие фрагментные ионы. Это, безусловно, повышает уровень достоверности идентификации [5].

11.1.3.2. Метод идентификации белков «сверху вниз»

Несмотря на эффективность метода идентификации белков «снизу вверх», он не лишен серьезных недостатков. Энзиматическое расщепление приводит к набору пептидов, причем идентификация исходного белка проводится лишь по нескольким из них с незначительным покрытием полной аминокислотной последовательности. Учитывая, что белки, как правило, характеризуются широким кругом посттрансляционных модификаций и возможных мутаций, подобная идентификация может быть не совсем корректной [1008]. В случае же белков с неизвестным сиквенсом установление правильной последовательности найденных протеолитических пептидов в молекуле белка становится чрезвычайно сложной задачей, поскольку последовательность соединения пептидов в единую молекулу белка неочевидна. В этом случае необходимо использовать несколько протеаз и комбинировать затем полученные результаты.

Методом преодоления недостатков алгоритма «снизу вверх» стал анализ белков «сверху вниз» (top-down). Он базируется на установлении структуры белков исклю-

чительно масс-спектрометрически. Вслед за определением молекулярной массы белка следует инициирование его фрагментации и запись спектров с использованием всего арсенала масс-спектрометрии. Нетривиальный выброс задает поиск некой мутации или модификации на соответствующем участке последовательности белка. Безусловно, необходимо использовать приборы высокого разрешения, tandemную масс-спектрометрию не только в варианте MS^2 , но и в MS^n , а также комплементарные методы инициирования фрагментации. Тем не менее именно таким образом можно не потерять ни одного фрагмента последовательности исходной молекулы [1009]. Рекордным для секвенирования белка «сверху вниз» считается результат определения полного сиквенса молекулы с массой 669 000 дальтон [315].

К недостаткам метода «сверху вниз» можно отнести крайнюю сложность спектров с многочисленными перекрывающимися мультиплетами фрагментных ионов в разных зарядовых состояниях. Расшифровка таких спектров требует специального программного обеспечения, причем основной сложностью является установление моноизотопной массы иона, зачастую просто отсутствующей в мультиплете (разд. 4.3). Кроме того, поскольку речи идет об экспериментах MS^n , требуются значительные количества исходного белка, так как на каждом следующем шаге выбирается лишь один ион в спектре для его последующего анализа.

11.1.4. Протеомика

Говоря о масс-спектрометрии белков нельзя не сказать о протеомике. Этой области знаний посвящена едва ли не половина современных масс-спектрометрических исследований и монографий [255, 986, 1010–1018]. Протеомика занимается изучением протеома, связанного с геном конкретного организма. Термины «протеомика» и «протеом» были введены в мировую практику Марком Уилкинсоном в начале 1990-х годов. В определенной степени эти термины навеяны аналогией с геномикой и геномом. Целью протеомики является установление составов, структур, модификации, а также количественных соотношений и назначения всех белков, производимых геномом организма. Это очень сложная задача, поскольку диапазон концентраций белков в живых системах составляет девять порядков. В отличие от привычной белковой химии протеомика изучает мультибелковые системы как часть всего организма. Работа ведется со смесями белков, идентификация которых осуществляется благодаря секвенированию и широкому использованию протеомных и геномных баз данных. Это скорее системная, а не структурная биология. Поэтому задача протеомики — охарактеризовать поведение системы в целом, а не ее отдельных компонентов.

Хотя, расшифровав геном, можно знать *a priori*, какие белки может произвести данный организм, протеомика оказывается очень востребованной. Во-первых, расшифровка генома и даже знание количеств конкретных РНК в клетке не дает надежной информации о количестве конкретных белков в клетке. Белки различаются по своей устойчивости, реакционной способности и функциям. Часть их может быть вовлечена в разнообразные быстрые и медленные клеточные циклы. Во-вторых, эндогенные посттрансляционные модификации, мутации и другие изменения под действием веществ из окружающей среды дополнительно изменяют структуру и свойства исходных белков.

Масс-спектрометрия является важнейшим методом протеомики. Она используется, как уже было отмечено выше, для установления молекулярных масс белков и пептидов (продуктов расщепления белков), для установления последовательности аминокислотных звеньев в пептидах, а также природы и мест связывания модифицирующих групп. Масс-спектрометрия активно используется и для количественного определения белков и пептидов с фундаментальными и прикладными (диагностика заболеваний) целями [5]. Методы количественного анализа белков можно разделить на две категории: сравнительная протеомика и точное количественное определение, которое сродни классическим биохимическим методам и заключается в установлении абсолютных количеств нескольких целевых белков. Напротив, сравнительная протеомика используется для установления относительных количеств множества белков, но не дает информации об их абсолютном количестве. Такой тип анализа более чем достаточен и эффективно используется в клинических исследованиях, где принципиальным вопросом является установление факта достоверного повышенного или пониженного содержания определенного набора белков, что может быть, например, показателем отклонения в нормальном функционировании клеток. Такое сравнение зачастую проводят на пробах пары «образец-контроль». Вопросы количественной протеомики не входят в предмет классической органической масс-спектрометрии и поэтому не представлены в данном пособии.

Помимо масс-спектрометрических экспериментов, в протеомике активно используются базы данных по белкам, меткам сиквенса (expressed sequence tag) и сиквенса генома в целом, комплекс программного обеспечения для коррелирования известных белковых сиквенсов с данными масс-спектрометрических экспериментов, а также методы выделения и очистки белков.

Говоря о приложениях протеомики, можно прежде всего выделить следующие.

1. **Прямой поиск (mining)** — работа по идентификации максимального числа белков в каждой пробе. Цель — получить информацию о протеоме напрямую, а не опосредованно через информацию о сиквенсе генов.

2. **Поиск изменений состава белков организма (protein-expression profiling)** — идентификация белков в образце в зависимости от состояния системы (организма, клетки). Имеется в виду стадия размножения, роста, болезнь или реакция на воздействие лекарств, химических или физических факторов. Например, сравнение белков здоровой и больной клетки позволяет получать важнейшую информацию, которую в дальнейшем можно использовать в диагностике болезней, выявлении мишеней для последующего медикаментозного лечения.

3. **Установление межбелковых взаимодействий (protein-network mapping)** определяет, каким образом белки взаимодействуют друг с другом в живом организме. Поскольку большинство функций организма определяется не индивидуальным белком, а их совокупностью, информация о взаимодействиях белков имеет первостепенное значение [1019]. Ряд биохимических подходов для изучения взаимодействий белок — белок был адаптирован для применения метода скорострельной протеомики [1002]. Чувствительный метод для установления межбелковых взаимодействий включает связывание белка с твердой подложкой, используемой в качестве «наживки». Клеточный экстракт выливается на такую подготовленную поверхность, и белки с высоким сродством к иммобилизованному белку задерживаются. Метод

позволяет детектировать ассоциаты с константой связывания до 10^{-5} , что объясняется высокой концентрацией неподвижного компонента [1019]. Модификацией этого метода, когда прямо за связыванием проводится масс-спектрометрический анализ [353, 354], является метод поверхностно-активированной лазерной десорбции/ионизации (разд. 5.16).

Другим методом идентификации межбелкового связывания является использование антител для соосаждения взаимодействующих белков. Обычно короткая последовательность аминокислот встраивается в анализируемый белок, образуя эпитоп, для связывания которого имеются подходящие антитела. За стадией осаждения следует стадия масс-спектрометрического анализа. Изучению взаимодействий белок — белок и белок — лиганд посвящен ряд специализированных статей и обзоров [1020–1025]. Результаты определений от первичной до четвертичной структуры белков и межбелковых взаимодействиях опубликованы в работе [1026].

4. Картирование белковых модификаций направлено на установление того, в какой момент, каким образом, по какой причине, в каком месте клетки белки приобретают модифицирующие группы. Многие распространенные посттрансляционные изменения белков определяют их пространственную структуру, назначение и функциональные особенности. Модификации обусловлены не только эндогенными причинами, но и влиянием лекарств, химических соединений, поступающих в организм из окружающей среды. Кстати, основополагающей характеристикой белка является информация о том, в каком месте клетки он находится. Задачи белков ядра, цитоплазмы или клеточной мембраны различны. Поэтому место локализации белка — первый шаг определения его функционального назначения.

11.2. Масс-спектрометрия липидов

Липиды (жиры), наряду с белками, углеводами и нуклеиновыми кислотами, представляют собой один из важнейших классов биологических молекул. Помимо наиболее распространенных жирных кислот и триацилглицеридов, к жирам относят фосфолипиды, сфинголипиды, сахаролипиды, стероидные и фенольные липиды, а также ряд других типов соединений. Можно говорить о трех основных строительных блоках липидов: основе (глицерин, холестерин, сфингоиды), полярной головной группе и алифатических цепях (рис. 11.12). Именно установление природы и связывания этих трех блоков входит в задачу масс-спектрометрического анализа жиров.

Интерес к жирам обусловлен не только химическими задачами, но прежде всего биомедицинскими, поскольку они являются одним из важнейших классов соединений, необходимых для существования жизни. Проблемой анализа жиров является существование большого числа близкородственных соединений, синтезируемых клетками живых организмов. Триацилглицериды или фосфолипиды представлены в клетках сотнями, а то и тысячами изомеров и гомологов. Тем не менее иногда организм отдает предпочтение одному конкретному виду молекул. В частности, холестерин производится клетками на порядки в больших количествах, чем другие подобные молекулы.

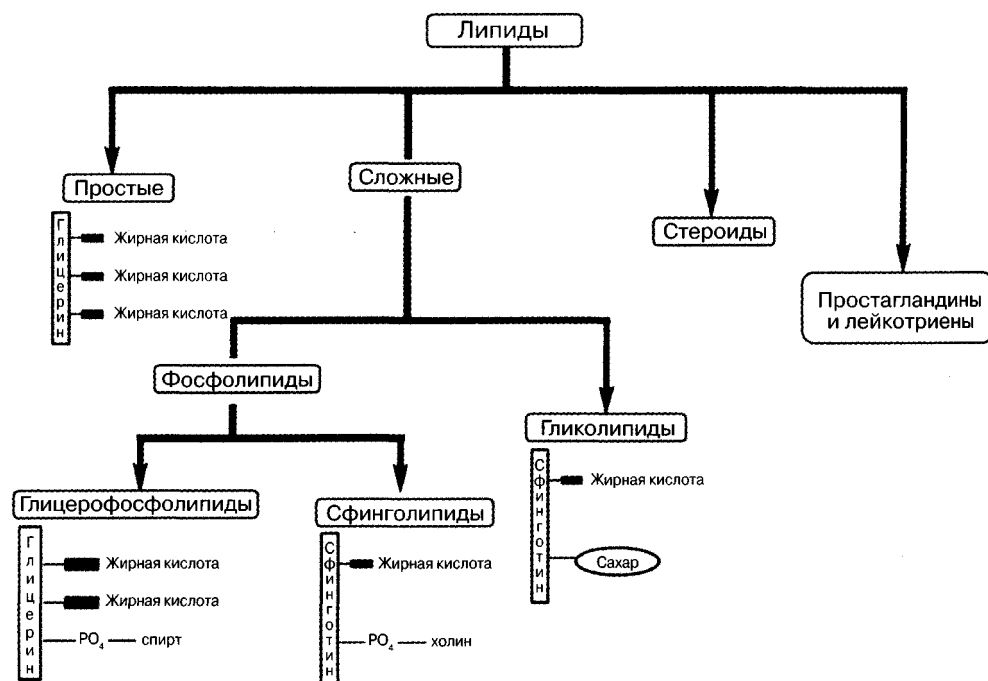


Рис. 11.12. Вариант классификации липидов

Существует достаточно много интернет-сайтов, посвященных липидам. Большое количество ссылок на разнообразные интернет ресурсы, связанные с липидами, представлено в обзорах [332, 1027]. Можно отметить американский консорциум LIPID Metabolites and Pathway Strategy (LIPID MAPS), на сайте которого (www.lipidmaps.org) представлены самые разные аспекты химии липидов, разделенных на восемь категорий, а каждому пептиду присвоен уникальный 12-значный номер. В японской базе данных (www.lipidbank.jp) липиды животных и растений разделены на 17 категорий. Существует возможность использования готовых алгоритмов идентификации липидов по масс-спектрам, например <http://www.helsinki.fi/science/lipids/software.html>. На рис. 11.12 представлен вариант одной из простейших классификаций липидов.

Благодаря чувствительности и информативности масс-спектрометрия стала в последние десятилетия наиболее эффективным методом анализа жиров. Наряду с различными «омиками», появилась и липидомика [1028] — наука, целью которой является установление структуры, свойств и предназначения всех жиров в живых организмах. В эту категорию попадают и многочисленные окисленные в результате ферментативных и неферментативных процессов формы. Именно липиды оказались наиболее ценными биомаркерами для диагностики заболеваний и проведения хирургических операций с масс-спектрометрическим контролем (гл. 9). В отличие от протеомики липидомика практически всегда связана с подходом top-down (сверху вниз), т.е. представляет собой фактически *de novo* процесс полной расшифровки структуры вещества, начиная с молекулярного иона, на основании масс-спектрометрических данных.



Для анализа жиров использовались практически все известные методы ионизации. К сожалению, электронная ионизация оказывается не столь эффективной для этого класса соединений, большинство которых имеет низкую летучесть, поскольку содержит высокополярные группы и имеет большую молекулярную массу [1029]. Тем не менее отдельные задачи липидомики решаются с помощью ИЭ и в настоящее время. Например, изучение пероксидазного окисления липидов с образованием альдегидов возможно с использованием ГХ/МС с ИЭ [1030]. Значительные успехи в липидном анализе были достигнуты при использовании масс-спектрометрии вторичных ионов (ВИМС) и бомбардировки быстрыми атомами (ББА) [1031, 1032]. Именно эти методы дали возможность регистрировать молекулярные ионы липидов и изучать их структуру с использованием закономерностей фрагментации (см. ниже). В настоящее время ВИМС активно применяется для масс-спектрометрической визуализации (разд. 9.9), т.е. установления пространственного распределения липидов в биологических образцах. Наиболее популярными методами анализа липидов в настоящее время являются ИЭР [1033–1051] и ХИАД [1052–1054]. Много работ посвящено анализу липидов методом МАЛДИ [331, 332, 1055–1057].

В последнее время все больше работ выполняется с использованием методов масс-спектрометрии с ионизацией на открытом воздухе (гл. 9). Наиболее востребован среди них для липидного анализа метод ДЭРИ [618]. Помимо обычного структурного анализа, ДЭРИ показал себя высокоэффективным инструментом для нужд масс-спектрометрической визуализации в биологии, медицине, экологии, криминалистике, пищевой промышленности и т.д. [777]. Липиды оказались весьма благодатными субстратами для проведения анализа и другими методами масс-спектрометрии без пробоподготовки: ПАРВ, ИАРНУ, НТП, МСИБИВ (гл. 9).

В настоящее время в липидомике существует два основных подхода. Первый из них основан на предварительном хроматографическом разделении образца, как правило, методом ЖХ и вводом элюата в масс-спектрометр в он-лайн режиме, а второй — на прямом вводе всей пробы непосредственно в ионный источник (скорострельная липидомика). Основным достоинством второго подхода является возможность получения сигнала молекулярного иона конкретного липида с постоянной интенсивностью. Это позволяет провести любые tandemные эксперименты, необходимые для установления структурных особенностей молекулы. Тем не менее следует учитывать, что при одновременном вводе сложных смесей в источник возможна дискриминация отдельных компонентов.

Вопросам фрагментации липидов, идентификации ранее неизвестных представителей этого класса соединений и извлечению структурной информации из масс-спектров посвящены обзоры [332, 1027, 1050, 1058–1062]. Безусловно, наиболее информативными являются подходы с использованием tandemной масс-спектрометрии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Для установления структуры липидов полезными оказываются все варианты МС/МС, включая спектры ионов-продуктов, ионов-предшественников, выбросов идентичных нейтральных частиц, а также мониторинг выбранных реакций (гл. 7).

В работах Майкла Гросса по липидомике активно пропагандируется метод многомерной масс-спектрометрии [332, 1063, 1064]. В этом варианте получают двумерные масс-спектры, в которых для каждого молекулярного иона, зарегистри-

рованного в обычном спектре, снимают тандемные спектры в одном или нескольких режимах. Авторы называют предложенный подход многомерным, поскольку в качестве переменных можно использовать любые параметры масс-спектрометра (все варианты МС/МС, энергию соударений, давление газа в камере соударений, природу газа, температуру источника и капилляра ИЭР, напряжение в ИЭР), пробоподготовки (полярность растворителя, наличие добавок, концентрацию аналитов, условия экстракции), а также любых других аналитических процедур. Метод позволяет надежно устанавливать структуры новых липидов в условиях ЖХ/МС, но особенно эффективен в варианте скорострельной липидомики.

Безусловно, эффективность анализа в липидомике во многом определяется возможностями оборудования. Например, использование последней модели орбитальной ловушки фирмы «Термо» (Fusion) позволяет работать с разрешающей способностью 450 000 и с несколькими вариантами последовательных и параллельных тандемных экспериментов методом MS^{ALL} для качественного и количественного определения сотен липидов в биологических образцах [1065]. Структурная близость липидов одного типа позволяет использовать для идентификации и количественного определения методы вычислительной липидомики. В частности, предложен вариант одновременного полуколичественного определения более 800 фосфолипидов в клеточных экстрактах [1066]. Достаточно эффективным методом современной липидомика стала сверхкритическая флюидная хроматография/масс-спектрометрия. Несколько примеров использования этой техники для анализа жиров представлено в разд. 1.6.

Постоянно обновляющийся список публикаций по липидомике представлен на сайте http://lipidlibrary.aocs.org/lit_surv/general/lipidome.htm. Следует подчеркнуть, что все аспекты липидомики не входят в рамки данного пособия. Интересующимся этим направлением можно порекомендовать более полные литературные источники, например [332, 1067, 1068]. Два основных класса липидов (триацилглицериды и фосфолипиды) будут рассмотрены подробнее. Масс-спектрометрия ИЭ длинноцепочечных жирных кислот, которые также относят к липидам, обсуждается в гл. 10.

11.2.1. Триацилглицериды

Триацилглицериды (ТАГ) представляют собой сложные эфиры глицерина и жирных кислот. Низкомолекулярные представители этого класса легко могут быть проанализированы с помощью ГХ/МС. Для более тяжелых (и более распространенных) жиров удобно использовать суперкритическую флюидную хроматографию в стыковке с электронной ионизацией. Тем не менее этот метод не является идеальным для анализа достаточно тяжелых ТАГ. Вопросам электронной и химической ионизации применительно к этой группе соединений посвящена работа [1069]. С помощью ЭИ и ХИ можно установить длину и степень ненасыщенности ацильных групп, но не место кратной связи или ацильного заместителя в положениях sn-1, sn-2 или sn-3.

Хотя для анализа ТАГ были использованы практически все известные методы ионизации, наиболее значимых успехов для полной характеристики структуры ТАГ (за исключением точного установления оптического изомера за счет заместителя в положении sn-2) удалось добиться методами тандемной масс-спектрометрии с ББА и ИЭР. Следует отметить, что для получения исчерпывающей структурной информации желательно применять методы инициирования фрагментации с вы-

сокоэнергетическими соударениями [1047]. Наиболее информативные результаты можно получить при инициировании фрагментации катионированных молекул, например $[M + Na]^+$. Специальная номенклатура фрагментных ионов ТАГ (рис. 11.13 и табл. 11.1) разработана таким образом, чтобы ответить на все структурные вопросы, причем фрагментные ионы образуются и по механизму инициирования распада заряженным центром, и по механизму удаленной фрагментации (гл. 3). Всего выделяется восемь типов характеристических ионов (от А до J). Индекс в обозначении иона (например, A_{12} , C_{23} , F_1 и т.д.) означает, что ион образован при сохранении указанных алкильных цепочек в положениях sn-1, sn-2 и sn-3 ТАГ. Понятно, что одинаковые цепочки приведут к образованию ионов (А, В, С и т.д.) с одинаковой величиной m/z . По массе отщепившегося фрагмента при образовании ионов А, В или С можно легко установить число атомов углерода и число двойных связей в элиминированной цепи. Начиная с ионов D в их составе остается лишь одна алкильная цепь. Ионы Е-J позволяют делать вывод о положении цепей (sn-1, sn-2 и sn-3) в ТАГ. Ионы Е, F, G возникают только при сохранении заместителей в положениях sn-1 и sn-3, а J — только в положении sn-2. Таким образом, в спектрах ТАГ может быть не более двух ионов G и только один ион J. Методом МС³ показано, что ионы А-J образуются в основном непосредственно из катионированных молекул [1047]. Лишь ионы В и С могут возникать при вторичной фрагментации ионов А.

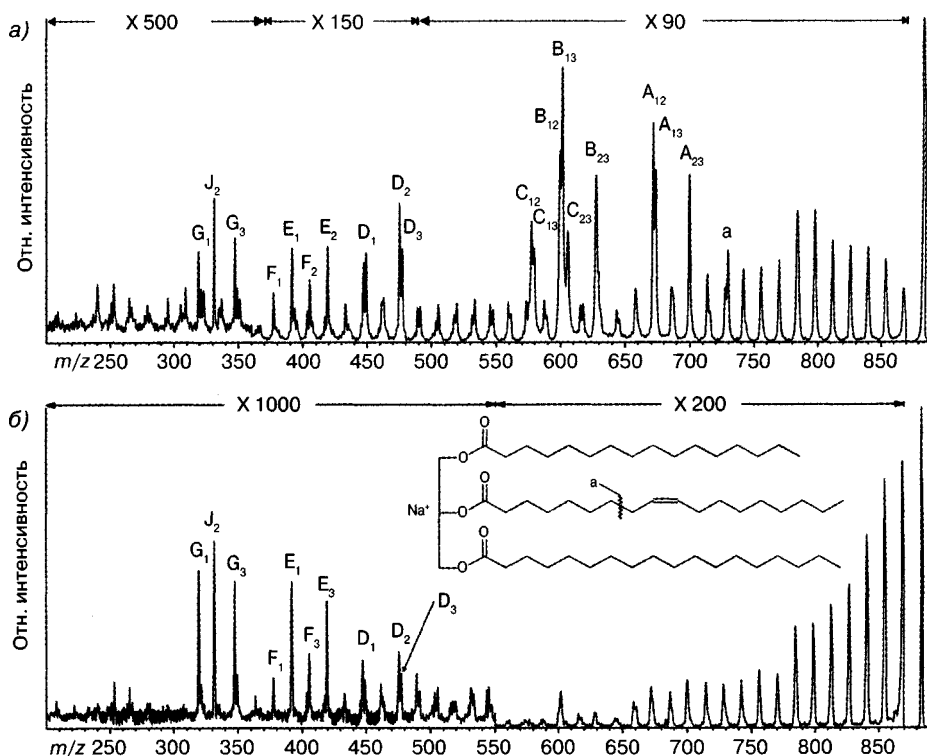
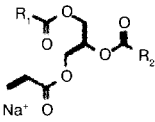
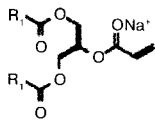
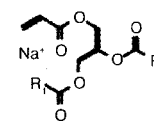
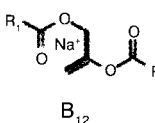
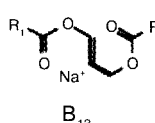
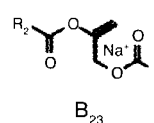
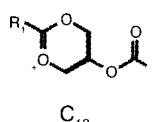
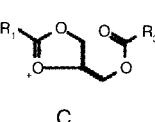
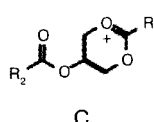
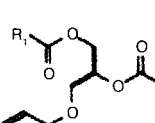
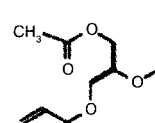
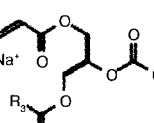
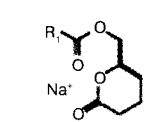
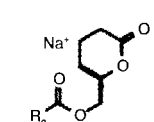
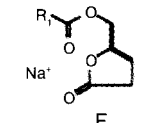
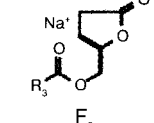
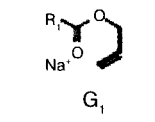
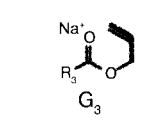
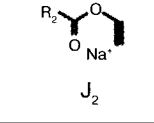


Рис. 11.13. Спектры ДАС ионов $[M + Na]^+$ 1-пальмитоил-2-олеоил-3-стеароилглицерина (16:0/18:1/18:0) с молекулярной массой 860,8 Да методами ББА (а) и ИЭР (б) [1047]

Таблица 11.1. Структуры характеристических фрагментных ионов в высокоэнергетических ДАС спектрах триацилглицеридов

 <p>A₁₂</p>	 <p>A₁₃</p>	 <p>A₂₃</p>
 <p>B₁₂</p>	 <p>B₁₃</p>	 <p>B₂₃</p>
 <p>C₁₂</p>	 <p>C₁₃</p>	 <p>C₂₃</p>
 <p>D₁</p>	 <p>D₂</p>	 <p>D₃</p>
 <p>E₁</p>		 <p>E₃</p>
 <p>F₁</p>		 <p>F₃</p>
 <p>G₁</p>		 <p>G₃</p>
	 <p>J₂</p>	

Не стоит забывать и о серии ионов с высокой массой в результате потерь алкильных фрагментов цепочки по механизму распада удаленного от места локализации заряда. Если в цепи нет разветвлений или двойных связей, наблюдается непрерывная последовательность соответствующих пиков, различающихся на 14 дальтон. Поскольку аллильные разрывы энергетически предпочтительны, соответствующие пики имеют повышенную интенсивность в спектрах (ион «а» на рис. 11.13а). Их регистрация дает возможность делать выводы о положении двойных связей в цепочках.

Так как ВП/ВП метод также характеризуется высокоэнергетическими столкновениями [179], он столь же эффективен для установления структуры ТАГ. Если моноизотопный ион катионированной молекулы, полученной в условиях МАЛДИ, выбрать для проведения тандемных экспериментов в режиме ВП/ВП, все регистрируемые фрагментные ионы также будут моноизотопными. Это упрощает спектр. Авторам [1070] удалось расшифровать состав жиров образца оливкового масла именно таким образом.

Пользуясь структурами ионов, представленными в табл. 11.1, и имея информацию о молекулярной массе ТАГ, легко вычислить длину алкильных заместителей, положение двойных связей и различить положения sn-1, sn-2 и sn-3 ацильных групп в ТАГ. Расчетам помогает также информация о том, что жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода в цепи редко встречаются в природе. Для установления положения двойных связей предложены и более эффективные методы (см. ниже).

11.2.2. Глицерофосфолипиды и сфинголипиды

Для этого класса соединений возможно полное установление структуры по масс-спектрам как положительных, так и отрицательных ионов. Прежде всего, необходимо по характеристическим ионам установить природу головной группы. Кстати, именно она определяет предпочтительность работы с положительными или отрицательными ионами [1061]. Например, при фрагментации протонированных молекул глицерофосфохолинов и их лизопроизводных образуется интенсивный пик с m/z 184 [1040]. Спектр ионов-предшественников (гл. 7) этого характеристического фрагмента позволит установить все соединения этого класса, присутствующие в образце. Протонированные молекулы глицерофосфэтаноламинов фрагментируют с выбросом головной группы фосфэтаноламина массой 141 дальтон, а глицерофосфосеринов — фосфосерина с массой 185 дальтон. Депротонированные молекулы глицерофосфэтаноламинов фрагментируют в условиях ДАС с образованием характеристических ионов с m/z 140 и 196, определяющих природу головной полярной группы. В аналогичных спектрах депротонированных молекул глицерофосфоинозитолов наблюдается интенсивный пик дегидрированной головной группы с m/z 241. Соответствующие характеристические ионы наблюдаются в спектрах и других представителей класса фосфолипидов [1027]. Весьма эффективным подходом является ДАС катионированных молекул, причем для липидов, помимо щелочных металлов, используют также двухвалентные ионы Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Zn. Например, в спектрах ДАС $[M + Na]^+$ глицерофосфохолинов и сфингомиелинов наблюдаются интенсивные пики с m/z 147 (аддукт пятичленного циклофосфана с Na^+ и $[M + Na - 59]^+$) за счет выброса молекулы триметиламина.

Для установления природы жирнокислотных фрагментов также можно использовать спектры положительных и отрицательных ионов. Например, депротонированные молекулы глицерофосфолипидов в режиме ДАС фрагментируют с образованием характеристических ионов $R_x\text{COO}^-$, $[\text{M}-\text{H}-R_x\text{COOH}]^-$, $[\text{M}-\text{H}-R'_x\text{CH}=\text{C}=\text{O}]^-$.

Протонированные молекулы сфинголипидов легко теряют одну или две молекулы воды с образованием интенсивных первичных фрагментных ионов. Фрагментация аддуктов керамидов с ионом лития позволяет генерировать характеристические ионы для каждого подкласса керамидов, а также для установления структуры кислотных цепочек [1071]. Сфингомиелины можно легко отличить от других классов жиров по интенсивному пику с m/z 184 в спектрах ДАС их протонированных молекул. Этот пик обусловлен протонированной головной фосфохолиновой группой. Важную информацию о структуре этих соединений можно также получать из ДАС спектров катионированных молекул. Дополнительно данные по ИЭР фосфолипидов можно найти в обзоре [1041], а схемы фрагментации и структуры фрагментных ионов в обзоре [1061].

11.2.3. Установление положения двойных связей в алифатических цепях

Установление положения двойных связей в алифатических цепях является достаточно сложной масс-спектрометрической задачей. В условиях электронной или химической ионизации быстрая миграция атомов водорода по цепи приводит к перемещению двойной связи до начала фрагментации. Поэтому для решения этой задачи используются более сложные подходы. Например, ацетонитрил в качестве газа реагента ХИ приводит к образованию аддуктов ненасыщенных алифатических соединений с ионом $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}^+$ ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{N}^+=\text{CH}_2$). Последующая активация соударением этих ионов приводит к разрывам $\text{C}-\text{C}$ связей цепи по винильным положениям исходной двойной связи [1072, 1073]. Этот подход работает в режиме не только ГХ, но и ЖХ [1054]. В альтернативном варианте используется предварительное окисление двойных связей OsO_4 до *цис*-диолов [1074]. Благодаря миграциям атомов водорода через шестичленные переходные состояния можно определять положения двойных связей в цепи по ДАС спектрам дилитиевых производных $[\text{M}-\text{H}+2\text{Li}]^+$. Места расположения двойных связей и даже *цис-транс* изомеры можно определить, анализируя спектры ДАС ионов $[\text{M}-\text{H}+\text{Cu}^{\text{II}}]^+$ [1075]. Метод многомерной масс-спектрометрии также может быть весьма эффективным [1064].

Тем не менее наиболее надежные и однозначные результаты получены при использовании озона в качестве добавки к газу-распылителю в условиях ИЭР или коронного разряда в присутствии кислорода [1076]. Еще лучше использовать озон в качестве газа для соударений после выделения иона-предшественника нужной массы. Наиболее воспроизводимые результаты получаются при выделении катионированной молекулы $[\text{M}+\text{Na}]^+$ липида [1077]. Авторы назвали такой вариант **диссоциацией, индуцированной озоном** (ДИОз, *ozone-induced dissociation, OzID*). Метод ДИОз дает возможность работать со смесями липидов, поочередно выделяя катионированные молекулы компонентов. Аналогичные результаты можно получить также [693] в условиях низкотемпературной плазмы (гл. 9, рис. 9.12).

Суть метода заключается в газофазном озонлизе двойных связей (схема 11.5), в результате которого образуются ионы со структурой альдегида (m/z 672) и кислоты (m/z 688). В некоторых случаях регистрируется и ион промежуточного озонида с массой больше, чем у иона-предшественника (m/z 830). Процесс активно протекает при работе и с положительными, и с отрицательными ионами. На рис. 11.14 представлен масс-спектр ДИОз фосфатидилхолина GPCho(16:0/9z-18:1) [1077].

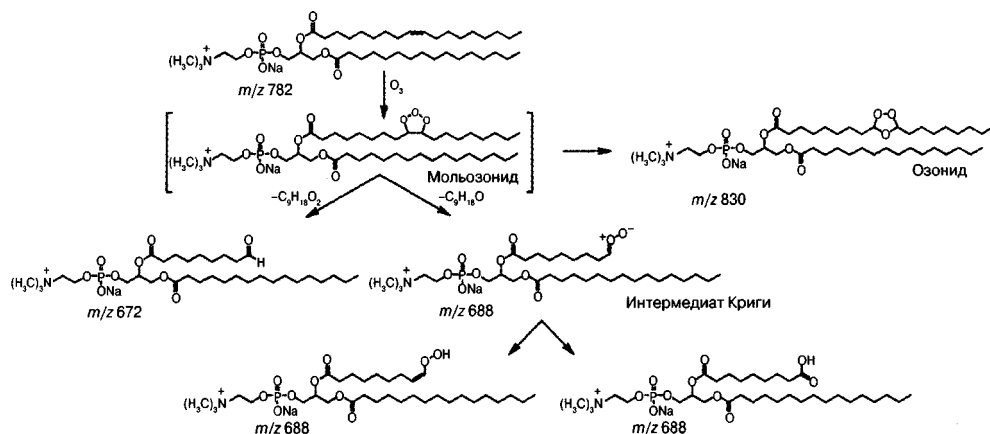


Схема 11.5. Механизм масс-спектрометрического озонлиза в условиях ДИОз на примере фосфатидилхолина [GPCho(16:0/9z-18:1) + Na]⁺ [1077]

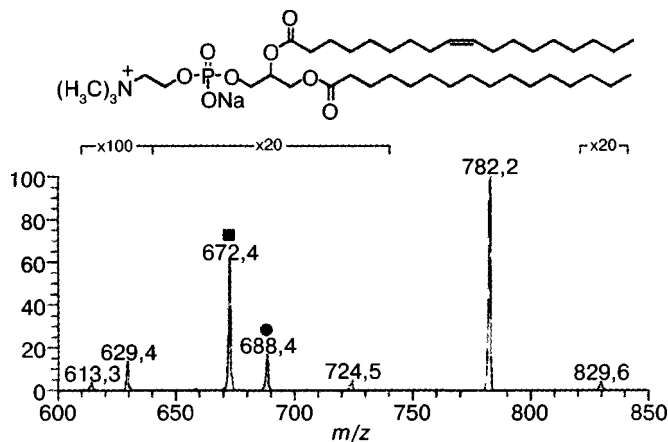


Рис. 11.14. Масс-спектр ДИОз фосфатидилхолина [GPCho(16:0/9z-18:1) + Na]⁺ [1077]

ДИОз надежно работает и в случае неизвестных липидов в отсутствие стандартов. В частности, одна из цепей дигидросфингомилина (рис. 11.15) содержала одну двойную связь. Однако в спектре ДИОз зарегистрировано три дублета, различающихся на 16 единиц массы (атом кислорода). Это означает, что выбранный ион-предшественник представлял три изомера с кратной связью в 15, 17 и 19 положениях цепи. Благодаря простоте, надежности и отсутствию необходимости в стандартных образцах, метод ДИОз может стать основой для автоматизированного липидного анализа.

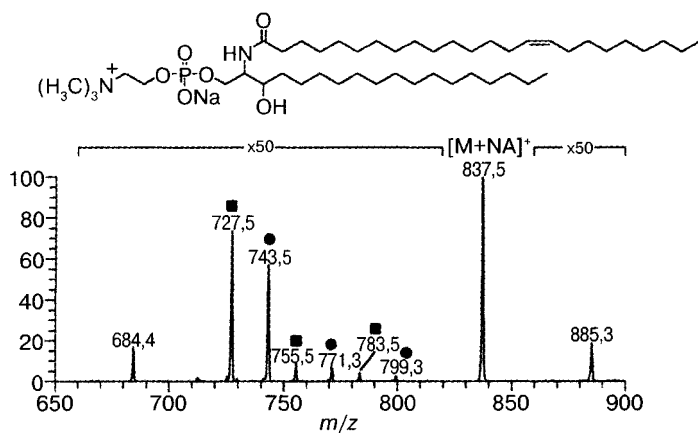


Рис. 11.15. Масс-спектр ДИОз дигидросфингомиелина [SM(d18:0/24:1) + Na]⁺ [1077]

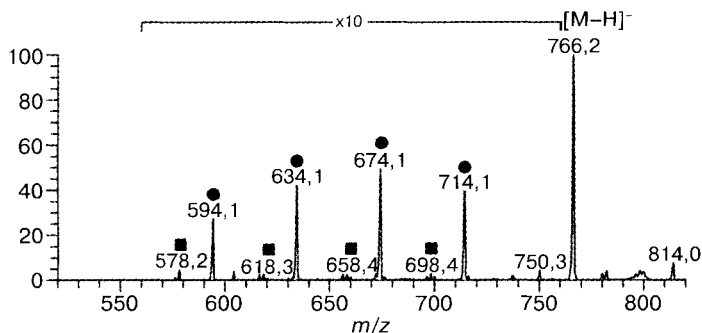


Рис. 11.16. Масс-спектр ДИОз глицерофосфатидилэтиленамина GPEtn(18:0/20:4)

Задача 11.3. Установите положение двойных связей в цепи глицерофосфатидилэтиленамина GPEtn(18:0/20:4) по масс-спектру ДИОз на рис. 11.16.

11.3. Масс-спектрометрия сахаров (углеводов)

Углеводы — еще один важный класс биоорганических соединений. Это неотъемлемые компоненты клеток и тканей всех живых организмов. Именно они составляют (по массе) основную часть органического вещества на Земле. Разнообразие сахаров очень велико, причем помимо «чистых» сахаров (моно, олиго- и полисахариды), в природе встречается огромное количество гликозилированных молекул другого типа. Наиболее важны с точки зрения биологии и медицины гликолипиды и гликопротеины. Например, большинство белков живых организмов гликозилированы [1078]. Это самый распространенный тип посттрансляционных модификаций белков. Гликаны весьма разнообразны, что существенно усложняет исходную молекулу. Они изменяют свойства и функции исходного белка: свертываемость, время жизни, распознавание молекул для связывания в комплексы. Именно эти соединения интересуют в последние годы масс-спектрометристов в большей степени, чем сами углеводы [1079]. Значимым достижением последнего времени является, например, установление полной

последовательности углеводных цепей протеогликанов [1080]. Масс-спектрометрии углеводов и их конъюгатов с другими молекулами посвящен ряд представительных обзоров, например [1079, 1081–1084]. В отличие от масс-спектрометрии белков и пептидов масс-спектрометрия углеводов развивается существенно медленнее. Прежде всего, это связано с большей сложностью и разнообразием структур этих соединений при одновременном сходстве отдельных структурных фрагментов. Для исчерпывающего структурного описания этих молекул недостаточно одного сиквенса. Необходимо изучить, по каким положениям идет связывание между моносахаридами, степень разветвленности, стереохимические аспекты. Да и чувствительность масс-спектрометрии к сахарам ниже, чем, например, к белкам.

Работы по масс-спектрометрии сахаров появились в начале 1960-х годов. Однако электронная ионизация не могла напрямую работать с углеводами по причине их высокой полярности и малой летучести. Основным подходом служило исчерпывающее метилирование или триметилсилилирование. Следует, правда, отметить, что при использовании высокотемпературной газовой хроматографии можно работать методом ИЭ с перметилированными не только моно- или дисахаридами, но и весьма сложными олигосахаридами с 15 мономерными звеньями и молекулярной массой до 2300 дальтон [1085, 1086]. Кстати, дериватизация углеводов часто используется и в настоящее время при работе с ИЭР или МАЛДИ. Основными процедурами являются перметилирование и перацетилирование, причем перметилирование предпочтительнее, поскольку в этом случае прирост массы меньше, а летучесть производных выше. Анализ олигосахаридов с полностью дериватизованными спиртовыми группами имеет еще одно преимущество. В результате разрыва гликозидной связи в ионе-продукте появляется единственная свободная гидроксильная группа, которую легко детектировать на последующих стадиях тандемного эксперимента. Кроме того, внутренние ионы, образующиеся за счет разрывов и с восстанавливающей, и с невозстанавливающей части молекулы, не будут изобарны первичным ионам-продуктам, возникающим при разрыве одной связи.

Химическая ионизация несколько улучшает ситуацию по сравнению с ИЭ, но только для низкомолекулярных сахаров. Причина заключается все в той же необходимости переводить вещество в газовую фазу. Пики протонированных молекул низкой интенсивности появляются в масс-спектрах ХИ метаном [1087] и изобутаном [1088]. По этим спектрам можно делать и определенные структурные выводы. Напротив, спектры ХИ с использованием ионов аммония [1089] или хлорид-анионов [1090] позволяют легко устанавливать молекулярные массы сахаров. Они характеризуются интенсивными пиками продуктов присоединения $[M+NH_4]^+$ и $[M+Cl]^-$. Поскольку в спектрах олигосахаридов наблюдается интенсивный пик молекулярного иона и пики фрагментных ионов (альтернативно их можно получить с использованием тандемной масс-спектрометрии), образующихся в результате разрыва гликозидных связей [1091], стало возможно масс-спектрометрическое секвенирование сахаров.

Использование десорбционной химической ионизации (разд. 5.5) позволило в некоторой степени преодолеть проблемы с летучестью образцов [1092]. Как и в случае классической химической ионизации, лучших результатов удастся добиться при использовании мягких ионов-реагентов (NH_4^+ и Cl^-).

11.3.1. Номенклатура фрагментных ионов сахаров

В связи с однотипностью связей очень сложна и фрагментация сахаров. Первая номенклатура фрагментных ионов была предложена Олегом Сергеевичем Чижовым в 1966 году [1093]. Возможности масс-спектрометрии в анализе углеводов существенно возросли с введением в практику бомбардировки быстрыми атомами (ББА). Номенклатура на основе спектров ББА, а также tandemных спектров с активацией соударениями (ДАС, гл. 7) была предложена Домоном и Костелло в 1988 году [1094]. Эта номенклатура используется и в настоящее время, так как она оказалась применимой и для появившихся позже наиболее эффективных методов масс-спектрометрии сахаров: МАЛДИ и электрораспыления. Ее дополнительным преимуществом является применимость для спектров и положительных, и отрицательных ионов.

Формулу углевода принято располагать горизонтально, причем с левой стороны находится невосстанавливающий моносахарид, а с правой — восстанавливающий или агликон (пептид, липид и т.д.). Наиболее ценная информация по сиквенсу олигосахаридов и гликоконъюгатов может быть получена при разрыве гликозидной связи между моносахаридными кольцами (рис. 11.17). Разрывы могут идти и с разрушением моносахаридных циклов. Если заряд в образующемся фрагментном ионе остается на левой (невосстанавливающей) части исходной молекулы, ионы-продукты обозначаются A_n , B_n , C_n , где индексами обозначается номер гликозидной связи, начиная с невосстанавливающего конца. Если заряд сохраняется в правой (восстанавливающей или содержащей агликон) части исходной молекулы, ионы-продукты обозначаются X_n , Y_n , Z_n , где индексами обозначается номер гликозидной связи, начиная с восстанавливающего конца. Гликозидная связь с агликоном получает номер 0.

Как правило, в спектрах доминируют ионы серии B и Y. Механизмы образования этих фрагментных ионов в условиях регистрации положительных ионов были предложены в работе [1094] и представлены на рис. 11.18.

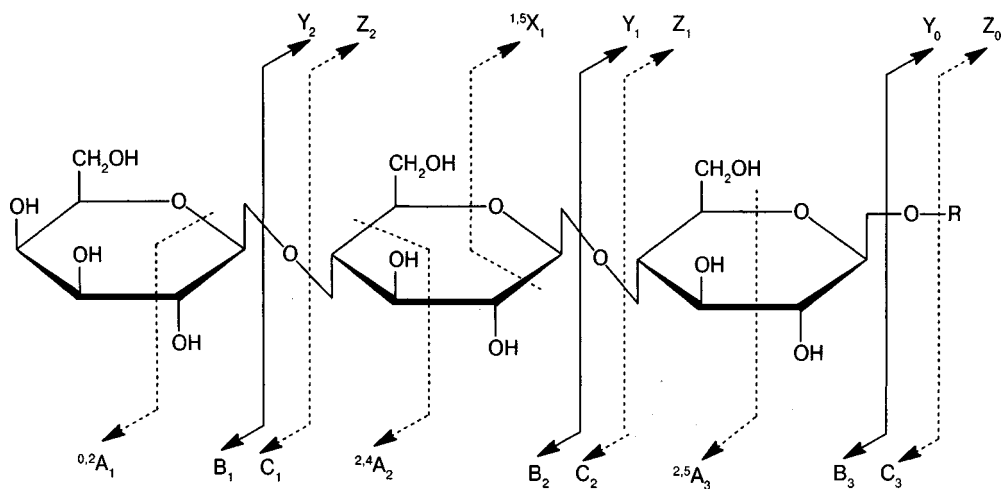


Рис. 11.17. Типы фрагментных ионов углеводов

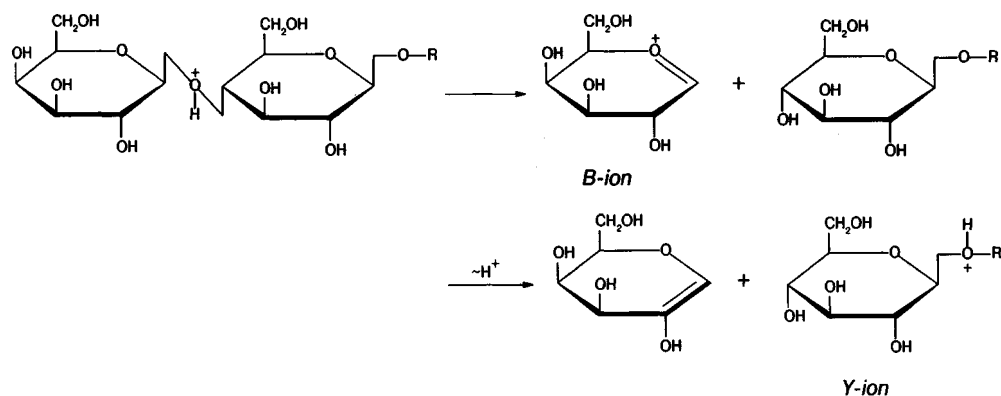


Рис. 11.18. Механизм фрагментации с образованием положительных ионов В и Y серий

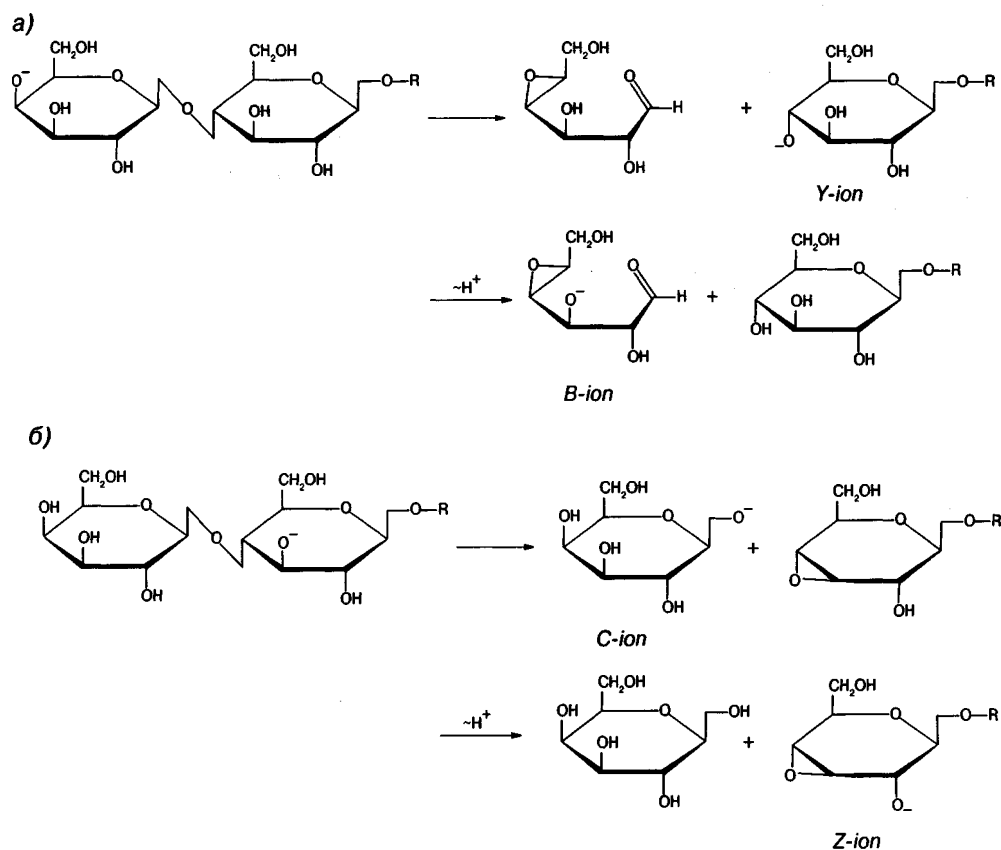


Рис. 11.19. Механизм фрагментации с образованием отрицательных ионов В, Y, С и Z

Механизм образования отрицательных фрагментных ионов немного сложнее (рис. 11.19). Для его доказательства были использованы изотопномеченные и дериватизованные по селективным положениям соединения [1095]. В этих условиях достаточно представительными оказываются и серии ионов С и Z (рис. 11.19).

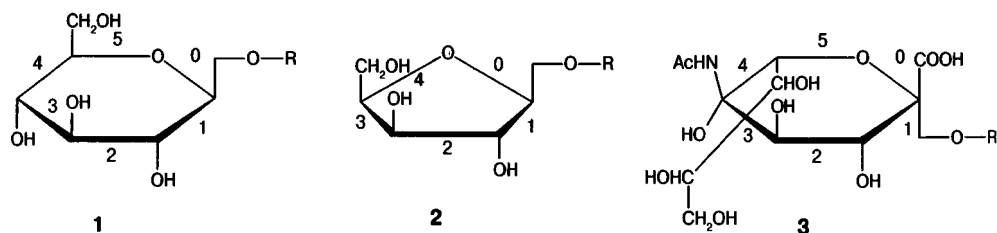


Рис. 11.20. Нумерация связей в кольцах наиболее часто встречающихся моносахаридов

Ионы, образующиеся при раскрытии колец, принадлежат сериям А и Х. Поскольку в зависимости от разрывающихся связей возможно образование нескольких ионов, необходимо было ввести дополнительные надстрочные символы, указывающие на конкретную рвущуюся связь, например $^{2,4}A_3$, $^{2,5}A_4$ (рис. 11.17). На рис. 11.20 представлена нумерация связей в кольцах наиболее часто встречающихся моносахаридов.

Ситуация становится более сложной при наличии разветвлений в молекуле полисахарида. В этом случае углеводная часть молекулы подразделяется на «основу» и разветвления, называемые «антеннами». Каждая антенна получает свой дополнительный индекс α , β , γ и т.д. по убыванию ее размера. Если фрагментный ион образуется при распаде основы, он обозначается обычным образом, например B_2 или Y_3 . Если же идет фрагментация в боковой цепи (антенне), ионы обозначаются с добавлением соответствующего индекса, например $B_{1\alpha}$, $Y_{2\beta}$. Дополнительные разветвления внутри антенн обозначаются апострофами, например $Y_{3\alpha'}$, $B_{2\beta'}$ (рис. 11.21).

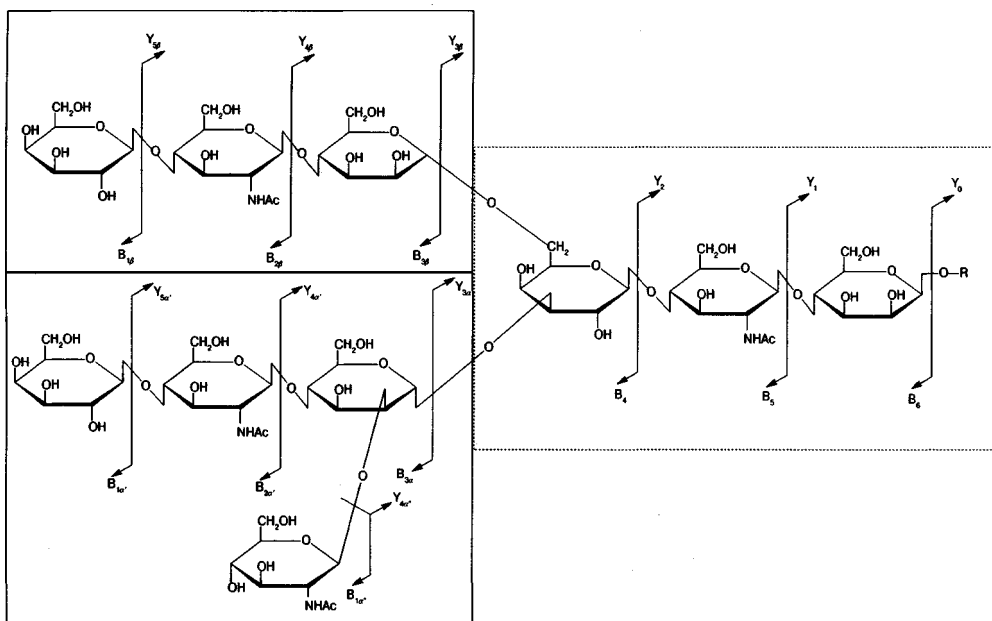


Рис. 11.21. Обозначения фрагментных ионов в разветвленных углеводах

Еще более сложная ситуация наблюдается при появлении в спектре вторичных ионов. Они вызывают определенные сложности и часто требуют проведения дополнительных экспериментов в измененных условиях или с применением тандемной масс-спектрометрии высоких порядков [1096]. Дополнительную информацию по маркировке таких ионов можно найти в работе [1094].

11.3.2. Современные методы масс-спектрометрического анализа сахаров

Наиболее эффективными методами ионизации сахаров являются МАЛДИ и ИЭР [1084, 1097–1104]. Благодаря меньшей внутренней энергии молекулярных ионов в этих случаях удастся установить молекулярную массу, а также получить значимую структурную информацию. Для анализа нативных углеводов с успехом применяют масс-спектрометрию как положительных, так и отрицательных ионов. При наличии в структуре молекул специфических функциональных групп предпочтительнее становится конкретная полярность. Например, введение аминогрупп в молекулы углеводов или их конъюгатов способствует работе с положительными ионами, а введение кислотных групп (фосфатной, карбоксильной, сульфатной) – с отрицательными. Перметилирование обычно делает обе полярности равноэффективными, но, поскольку спектры несколько отличаются друг от друга, их можно использовать в качестве комплементарной структурной информации. Перметилирование облегчает и ЖХ разделение сахаров перед масс-спектрометрическим анализом, снижая их полярность. Оно также стабилизирует лабильные связи с кислотными группами в гликанах и гликопептидах, делая их более удобными для масс-спектрометрического анализа. Часто структурную информацию извлекают из тандемных спектров катионированных или анионированных молекул, причем аддукты молекул сахаров с NO_3^- или Cl^- характеризуются не только более высокой интенсивностью пиков в условиях регистрации отрицательных ионов, но и дополнительной структурной информацией в условиях МС/МС [1105].

Степень фрагментации катионированных углеводов в условиях ДАС обратно пропорциональна размеру катиона, уменьшаясь в ряду $\text{H}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$. При этом механизм фрагментации протонированных молекул определяется местом локализации заряда, а катионированные молекулы (особенно с Cs^+) распадаются по механизму удаленной фрагментации [1106]. В связи с этим спектры ДАС катионированных сахаров могут отличаться от спектров их протонированных аналогов. Существенно влияет на спектры и энергия соударений. Спектры ДАС высокой энергии характеризуются более выраженной фрагментацией, включая разрывы внутри углеводных циклов. Напротив, в условиях низкоэнергетической ДАС рвутся в основном наиболее слабые связи. Детальное изучение структуры сахаров и их конъюгатов облегчается при использовании режима MS^n , когда удастся расшифровать структуру крупных фрагментов молекулы. В работе [1107], например, представлено успешное структурное исследование сахаров с применением тандемной масс-спектрометрии в варианте до MS^5 включительно. Помимо ДАС, важную структурную информацию можно получить при использовании для ини-

циирования фрагментации ИКМФД или ДЗЭ [1082]. Эти методы предоставляют комплементарную информацию, причем ДЗЭ особенно полезен для установления мест гликозилирования в гликопротеинах [1108].

Классический метод анализа сахаров заключается в их предварительной щелочной деградации [1109]. Поскольку метод не очень эффективен и связан с расщеплением молекулы, начиная с восстанавливающего конца, в реакционной смеси после нескольких часов обнаруживаются олигосахариды, содержащие на 1, 2, 3 и т.д. моносахаридных звена меньше, чем в исходной молекуле. Последующий анализ методом МАЛДИ оказывается сродни лестничному секвенированию пептидов (разд. 11.1). Часто используется и энзиматическое расщепление экзо- или эндогликозидазами, за которым следует инструментальный анализ [1110].

МАЛДИ с успехом может использоваться и для количественного определения смесей углеводов, причем показано, что воспроизводимость такого анализа в случае перметилированных сахаров не уступает воспроизводимости хроматографического анализа с введением в молекулы хромофоров [1111].

Поскольку углеводы обычно представляют собой сложную смесь близкородственных молекул, масс-спектрометрическому анализу предшествует процедура разделения. Наиболее популярным вариантом является ВЭЖХ метилированных образцов (см. выше). В качестве эффективной альтернативы используется ион-парная хроматография с обратной фазой. В этом случае в мобильную фазу добавляют липофильные ионы, связывающие ионы сахаров [1112]. Перспективные результаты получены и методом хроматографии с гидрофильными взаимодействиями [1113]. Удобной стационарной фазой для анализа нативных олигосахаридов и гликопептидов оказался пористый графитированный углерод [1114]. Правильный выбор метода разделения углеводов требует учета их индивидуальных особенностей и зависит от природы аналита [1115].

Достаточно успешно в анализе сахаров используется и спектрометрия ионной подвижности [1116, 1117]. У этого метода хороший потенциал для разделения изомерных углеводов, хотя пока разделение изомеров на пористом графитированном углероде более успешно. Тем не менее при увеличении разрешающей способности метода ионной подвижности он может оказаться востребованным для целей высокопроизводительных анализов благодаря своей скорости (разд. 8.4).

Аффинные технологии основаны на извлечении и последующем МАЛДИ анализе заданных углеводов из комплексных матриц в результате их взаимодействия с нанесенными на мембрану веществами с высоким сродством к углеводам [1082].

Использование автоматизированных алгоритмов идентификации сахаров и их конъюгатов находится в начальной стадии, хотя перспективы повышения эффективности этого подхода, безусловно, имеются [1118–1120]. Недавно запущен проект по созданию компьютерной базы гликанов, содержащей их структуры, происхождение, тандемные масс-спектры и хроматографическое время удерживания [1121]. Представлено программное обеспечение для идентификации перметилированных N-гликанов по тандемным масс-спектрам [1122]. Программа GlycoPeptide Finder (GP Finder) разработана для правильного отнесения гликопептидов вне зависимости от использованной протеазы [1123].

11.4. Масс-спектрометрия нуклеиновых кислот

Будучи еще более сложными, чем липиды и белки, биополимерами, нуклеиновые кислоты (НК) долгое время были вне рамок досягаемости масс-спектрометрии, хотя дериватизованные нуклеиновые основания, нуклеотиды и нуклеозиды были предметом исследования еще в середине 1960-х годов.

11.4.1. Масс-спектрометрия нуклеиновых оснований, нуклеотидов и нуклеозидов

Звенья цепи дезоксирибонуклеиновой кислоты (дезоксирибонуклеотиды) состоят из моносахарида β -D-2-дезоксирибофуранозы (6), фосфатной группы и одного из четырех азотистых оснований (аденин — 1, гуанин — 2, тимин — 3, цитозин — 4), представленных на рис. 11.22. Звенья цепи рибонуклеиновой кислоты (рибонуклеотиды) состоят из моносахарида β -D-рибофуранозы (7), фосфатной группы и одного из четырех азотистых оснований (аденин, урацил — 5, гуанин, цитозин), представленных на рис. 11.22. Пуриновые основания (аденин и гуанин) присоединяют рибозный фрагмент по атому азота N9, а пиримидиновые основания (тимин, цитозин, урацил) — по атому азота N1. Фураноза присоединяет все основания по атому углерода C1 сахара. Образующиеся нуклеозиды соединяются друг с другом через гидроксильные группы в положениях 3 и 5 фуранозного цикла посредством фосфатных групп.

Работать с нуклеозидами и нуклеотидами масс-спектрометристы начали еще в середине прошлого века. Как и для других полярных нелетучих соединений, основному методу исследования (ионизация электронами) предшествовала дериватизация. Основное внимание уделялось трем сериям ионов: серия M — предоставляла информацию о молекулярной массе, серия B — о нуклеиновом основании, а серия S — об углеводном фрагменте. Как только появилась возможность использовать для анализа нуклеотидов/нуклеозидов ЖХ/МС, этот метод практически полностью вытеснил ИЭ [1124].

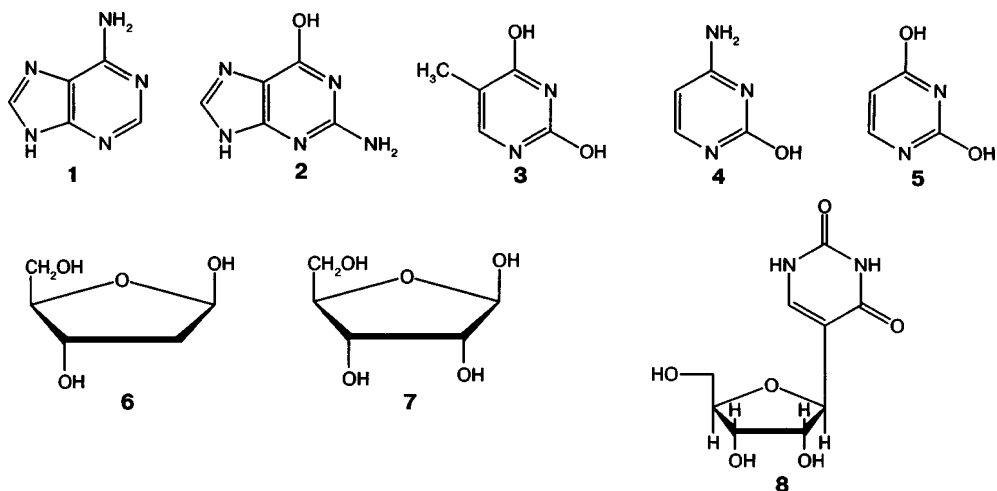


Рис. 11.22

Фрагментация нуклеиновых оснований детально изучена с использованием самых разных методов ионизации и условий фрагментации, а также при исследовании соединений, меченных по всем положениям изотопами. Обычно протекает раскрытие шестичленного цикла с выбросом небольших нейтральных частиц. Иногда процессы усложняются. В частности, в экспериментах MS^4 с добавками D_2O [1125] показано, что фрагментные ионы могут реагировать с остаточными молекулами воды внутри прибора с образованием аддуктов.

Для нуклеозидов характерно первичное расщепление гликозидной $C-O$ связи. Отдельную группу составляют C -нуклеозиды, в которых соединение фрагментов основания и сахара осуществляется за счет связи $C-C$. Наиболее распространенным соединением этого типа является псевдоуридин (8) на рис. 11.22, который даже иногда называют пятым нуклеозидом РНК. В этом случае фрагментация молекулярного иона идет или по фрагменту сахара (последовательные выбросы молекул воды), или по азотистому основанию с раскрытием цикла и выбросом небольших нейтральных частиц [1126]. Нуклеозиды можно успешно ионизировать и изучать их фрагментацию на открытом воздухе (гл. 9) в условиях ПАРВ [1127] и ASAP [1128]. Важные аналитические аспекты подготовки проб для анализа нуклеозидов/нуклеотидов, включая денатурирование, выделение, концентрирование и т.д., представлены в обзоре [1129].

11.4.2. Масс-спектрометрия олигонуклеотидов

До 90-х годов XX века более или менее значимых результатов по масс-спектрометрическому исследованию олигонуклеотидов удавалось добиться с использованием ББА (разд. 5.10) или плазмерной десорбции (разд. 5.9). Эти методы позволили получать спектры молекул с несколькими (до 10) нуклеотидами в цепи [1130, 1131]. Прорыв произошел с внедрением в практику исследований электрораспыления (разд. 5.13) и МАЛДИ (разд. 5.15). Несколько хороших обзоров посвящено результатам исследования нуклеиновых кислот этими методами [1129, 1132–1141]. Оба метода ионизации вкупе с масс-спектрометром высокого разрешения позволяют получать интенсивные пики молекулярных ионов и устанавливать точную молекулярную массу НК. В спектре часто присутствует исключительно пик молекулярного иона. В спектрах МАЛДИ могут наблюдаться пики небольшой интенсивности за счет элиминирования нескольких нуклеиновых оснований цепи.

Работают со спектрами как положительных, так и отрицательных ионов. В первом случае протонируются азотистые основания и частично фосфатная группа, а во втором — депротонируется фосфатная группа [1142]. Число зарядов при этом может быть очень большим. Благодаря генерированию многозарядных ионов ИЭР позволяет получать масс-спектры очень тяжелых молекул, регистрируя молекулярные ионы с сотнями и тысячами зарядов. Рекордная масса в 110 мегадальтон, зарегистрированная масс-спектрометрически [14], принадлежит ДНК колифага Т4. Тем не менее следует отметить, что получить качественный масс-спектр нуклеиновой кислоты значительно сложнее, чем масс-спектр белка с таким же количеством звеньев в цепи. Это связано с тем, что олигонуклеотиды в растворе представляют собой полианионы с очень высокой гидрофильностью, что препятствует эффек-

тивному использованию и ИЭР, и МАЛДИ. Кроме того, вариабельность последовательностей нуклеиновых кислот значительно меньше, чем пептидов, так как первые имеют лишь четыре типа строительных блоков (нуклеиновые основания), а вторые — 20 (аминокислоты). Дополнительно можно отметить, что масса каждого мономерного звена (нуклеотида) примерно в три раза больше массы мономерного звена белка (аминокислотный остаток). Это приводит к необходимости работы с более высокими массами и требует адекватного повышения разрешающей способности прибора.

Первые данные о сохранении двойной спирали в условиях ИЭР были получены еще в 1993 году [1143], причем цепочки удерживаются вместе в газовой фазе за счет водородных связей между азотистыми основаниями [1144—1146]. Классические кислотные матрицы МАЛДИ обычно приводят к денатурированию двойной спирали. В некоторых случаях это делается намеренно, чтобы работать методами tandemной масс-спектрометрии с отдельными цепями [1147]. Однако работать можно и с двойной спиралью. При использовании смеси 3-гидроксипиколиновой и пиколиновой кислот в качестве матрицы и лазера с длиной волны 266 нм [1148] удалось получить масс-спектры двойной спирали нуклеиновой кислоты с 500 основаниями в цепи ($m/z > 160\,000$). Хороших результатов удалось добиться в замороженной водной матрице на медной подложке. При облучении образца лазером с длиной волны 578 или 589 нм в газовую фазу переходят неразрушенные молекулы, содержащие до 600 азотистых оснований в цепи [1149—1151]. Недостатком этого подхода является плохая воспроизводимость.

Еще в ранних исследованиях методом МАЛДИ было отмечено, что интенсивность пиков зависит от природы нуклеотидов. Например, за счет меньшей величины сродства к протону по сравнению с остальными нуклеотидами самым высоким фактором отклика характеризуется тимин [1152]. Поскольку первичные реакции фрагментации инициируются протонированием азотистого основания, за которым следует 1,2-транс-элиминирование (E2) с разрывом C—N гликозидной связи [1153, 1154], тиминовые фрагменты оказываются более устойчивыми. РНК, как правило, дают более интенсивные сигналы, чем ДНК. Кроме того, МАЛДИ позволяет получить спектры более тяжелых РНК по сравнению с ДНК [1155—1157]. Эти факты обусловлены тем, что процесс элиминирования включает атом водорода в положении 2 фуранозного цикла. Наличие в этом положении гидроксильной группы в случае РНК в определенной степени препятствует фрагментации, приводя к большей стабильности молекулярных ионов РНК по сравнению с ДНК [1154].

Уже для олигомера с 15 основаниями существует по одному изобарному иону каждой целочисленной массы. Для олигомера с 20 основаниями необходимо выбирать уже из трех изобарных ионов с каждой целочисленной массой [1158]. Выбору правильного состава НК может существенно помочь информация о сиквенсе обеих цепей двойной спирали [1159]. Поскольку нуклеиновые основания в двойной спирали комплементарны, информация о сиквенсе одной цепи предоставляет информацию и о сиквенсе другой цепи. Так, для комплементарных цепочек с массами 33071,462 Да и 32889,450 Да точность измерения массы 1 ppm дает более 80 вариантов состава для каждой цепи, а точность 25 ppm — более 900. Тем не менее лишь один вариант комбинации этих суммарных 1800 вариантов удовлетворяет

условию комплементарности [1160]. Расчеты и эксперименты показали, что, если пики цепочек олигонуклеотидов длиной 20–21 разрешены (без перекрывания изотопных серий), их состав может быть однозначно установлен при точности измерения масс 5 ppm [1161].

Тем не менее вариант анализа «сверху вниз», весьма популярный в протеомике, не используется в анализе НК. Спектры оказываются слишком сложными даже для современных приборов. Для идентификации этих биополимеров на первой стадии осуществляется специфическое химическое или энзиматическое (рибонуклеаза) расщепление на более мелкие олигонуклеотиды, которые и подвергаются масс-спектрометрическому анализу. В случае НК с известным сиквенсом положительный результат может быть получен уже на этой стадии. Молекулярные ионы образовавшихся олигонуклеотидов должны быть измерены с максимальной точностью. Для установления характеристических пиков в спектре используются обычные встроенные программы для деконволюции масс-спектров. Для расчета молекулярных масс НК или их фрагментов (олигонуклеотидов) можно использовать многочисленные имеющиеся калькуляторы, например Mongo Oligo Mass calculator (<http://mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-Oligo>), специально созданный для работы с НК. Далее экспериментальные массы сравниваются с массами фрагментов *in silico* расщепления НК из баз данных. Эта процедура может оказаться несколько сложнее, чем в протеомике, когда белок может быть идентифицирован по одному энзиматическому пептиду длиной 4–6 аминокислотных остатков. Тем не менее показано, что для успешной идентификации РНК достаточно зарегистрировать последовательность более девяти нуклеотидов после энзиматического расщепления исходной молекулы рибонуклеозой T1 [1162].

Для количественной меры сходства экспериментального и генерированного из базы данных спектров была предложена «формула совпадения спектров», которая позволила устанавливать, например, филогенетическое родство микроорганизмов [1163]. Масс-спектрометрические профили дайджестов тРНК *E.coli* были использованы для нахождения характеристических фрагментов и однозначного установления класса тРНК. Эти исследования послужили основой создания компьютерной программы идентификации тРНК, названной RNAccess (<http://bearcatms.uc.edu/rnaccess/>). Программа RMM разработана для идентификации НК по масс-спектру дайджеста экспериментального образца [1164]. Она похожа на аналогичные протеомные программы и основана на сравнении экспериментального спектра и спектра генерированного *in silico* на основе последовательностей известных НК из баз данных. Программа доступна на сайте <http://yass.sdu.dk/RMM/>. Она позволяет количественно оценивать, насколько похожи экспериментальный и теоретический спектры и рассчитывать индекс сходимости. Однако чистота образца НК для достижения положительного результата должна быть не ниже 80% [1164].

11.4.3. Масс-спектрометрическое секвенирование олигонуклеотидов

С каждым годом масс-спектрометрия все более активно используется для установления не только молекулярных масс, но и последовательности нуклеотидов [1165, 1166]. На рис. 11.23 представлен фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты.

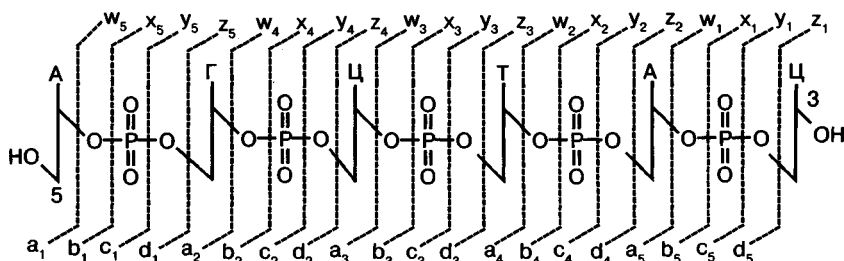


Рис. 11.23. Основные направления фрагментации молекулярного иона гексамера ДНК

Для упрощения записи фуранозный фрагмент обозначают вертикальной чертой, фосфатную группу часто обозначают буквой Р в круге, а основание первой буквой его названия. Молекулу принято располагать по горизонтали, причем на левом краю находится фураноза с незанятой гидроксильной группой в положении 5, а на правом — в положении 3.

Среди многочисленных процессов фрагментации молекулярных ионов нуклеиновых кислот в масс-спектрометре особую ценность имеют те, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов. Аналогично фрагментации пептидов была разработана классификация характеристических серий фрагментных ионов, образующихся при распаде нуклеиновых кислот [1167]. На рис. 11.23 представлены основные серии ионов для гексамера. Серии а, b, с, d включают фрагменты со свободной гидроксильной группой в положении 5 (левая часть молекулы). Серии w, x, y, z включают фрагменты со свободной гидроксильной группой в положении 3 (правая часть молекулы). Поскольку основная цепь нуклеиновых кислот характеризуется четырьмя типами разрывов с каждой стороны (в отличие от пептидов с тремя типами разрывов), обозначения d и w относятся не к побочным, как в случае пептидов, а к основным ионам. Основание обозначается B_n , где n — положение данного основания по отношению к концу молекулы со свободной 5-гидроксильной группой. Аббревиатура а4-В3(С) означает фрагментный ион серии а по четвертому положению исходной молекулы, который дополнительно выбросил цитозин из положения 3. Помимо этих ионов, в спектре всегда регистрируется большое количество пиков других ионов, что делает спектр многолинейчатым и трудным для интерпретации. На рис. 11.24 представлен спектр ДАС 12-мерного олигонуклеотида. В спектре хорошо представлены ионы серий а и w. Тем не менее большинство пиков в спектре не соотнесено.

Тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения весьма эффективна для секвенирования нуклеиновых кислот, поскольку последовательность легко определяется по известной разности масс между ионами одного типа (аналогично секвенированию пептидов). Однако в связи со сложностью спектров для установления сиквенса активно используется комбинация химических, энзиматических и масс-спектрометрических методов [1168]. В частности, популярна леддерная техника, аналогичная описанной для белков (разд. 11.1). Процесс включает последовательное энзиматическое отщепление нуклеотидов от одного или другого конца цепи с измерением разницы в массе. В данном случае требования к разрешающей способности менее строги, хотя остаются достаточно жесткими [1169–1171].

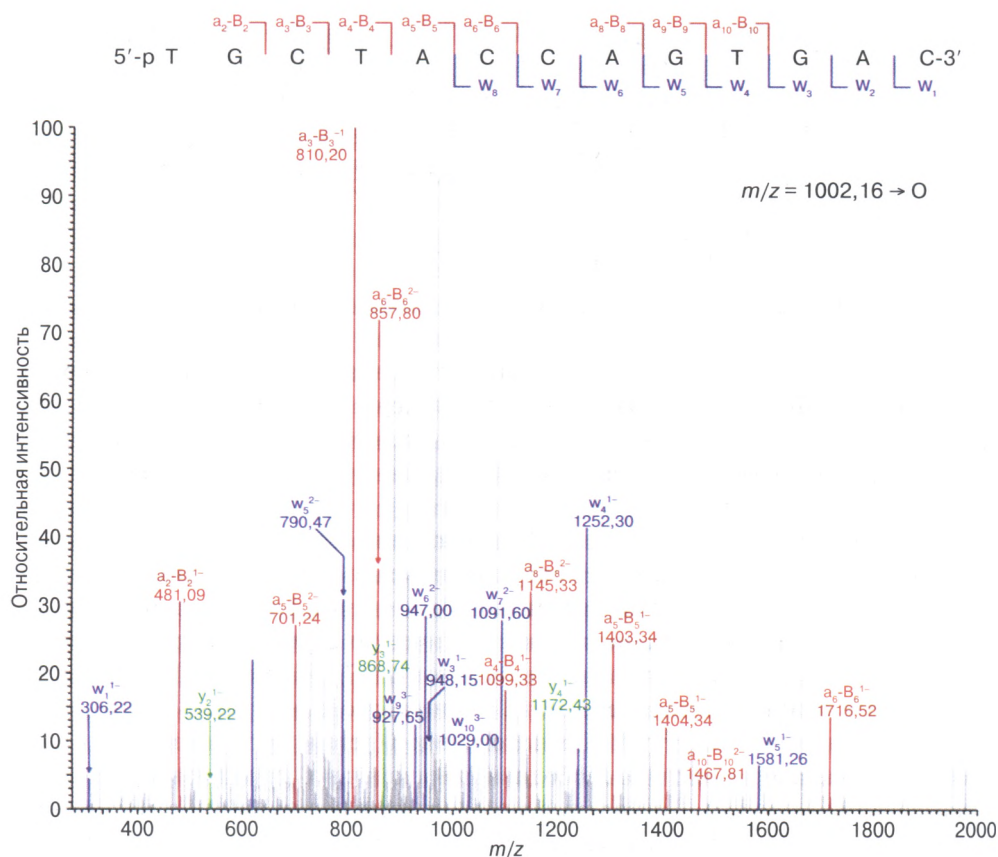


Рис. 11.24. ДАС спектр двухзарядной депротонированной молекулы 12-мерного олигонуклеотида. Последовательность нуклеотидов, доказанная фрагментацией, представлена верхней строчкой. (С разрешения Н.Ю. Третьяковой)

Наиболее простым методом секвенирования является процесс Зангера с масс-спектрометрическим окончанием. Замена классической гель-хроматографии на масс-спектрометрию привела к значительному сокращению времени анализа. В этом случае требования к разрешающей способности прибора минимальны, поскольку характеристические пики отстоят друг от друга примерно на 300 дальтон [1136, 1172, 1173].

Весь арсенал tandemных масс-спектрометров и методов активации фрагментации используется для проведения прямого масс-спектрометрического секвенирования. Безусловно, наиболее широко применяется ДАС. Здесь вновь необходимо использовать максимальную разрешающую способность и точность измерения масс, для того чтобы избежать неоднозначности в отнесении состава фрагментов. Тем не менее спектры получаются очень сложными и требуют значительного времени для их интерпретации. В качестве примеров конкретных исследований можно привести работы [493, 1140, 1154, 1167, 1174–1176]. Все же прямой анализ НК может быть успешным даже при работе с неразрушенными молекулами двойной спирали. Хотя спектр дуплекса может быть очень сложным, полное секвенирование

удается провести, выбирая в качестве предшественников ионы одиночных цепей, образующиеся после разрыва нековалентных водородных связей в дуплексе [1176].

Эффективен для секвенирования нуклеиновых кислот метод ИКМФД (разд. 7.1), поскольку частота деформационных колебаний Р–О связей в цепи резонансна излучению ИК-лазера с длиной волны 10,6 нм [477]. Метод ДИИАЧТ (разд. 7.1) дает возможность не только получать информацию о сиквенсе, но и измерять энергии диссоциации конкретных связей. В частности, существование двойной спирали Уотсона – Крика в газовой фазе доказано измерением энергии активации фрагментации специфического дуплекса A_7T_7 , которая оказалась существенно выше, чем у неспецифических дуплексов A_7A_7 и T_7T_7 [1177].

11.4.4. Программное обеспечение для секвенирования олигонуклеотидов

Для автоматизации процесса установления последовательности НК по tandemным масс-спектрам была разработана специальная компьютерная программа Simple Oligonucleotide Sequencer (SOS). Она эффективна для *de novo* секвенирования олигонуклеотидов длиной до ~20 звеньев [1178]. Эта программа может успешно использоваться и для идентификации химически модифицированных нуклеотидов [1179]. Тем не менее следует подчеркнуть, что получение правильного сиквенса в программе SOS во многом зависит от пользователя, поскольку алгоритм не содержит функции оценки результата. Такой оценочный алгоритм есть у программы расшифровки спектров ДАС олигонуклеотидов с регистрацией отрицательных ионов COMPAS [1180]. Коэффициент сходимости спектров основан на учете величин m/z , интенсивности пиков фрагментных ионов, числе общих и «лишних» фрагментных ионов. Существующая версия программы оперирует олигонуклеотидами длиной до 12 звеньев. Еще одна программа идентификации НК по tandemным спектрам называется Ariadne [1181]. Ее интернет версия доступна на сайте <http://ariadne.riken.jp/>. Программа оперирует достаточно короткими олигонуклеотидами, полученными в результате энзиматического расщепления НК. Она также применима для идентификации модифицированных нуклеотидов и может быть полезна в исследованиях посттранскрипционных НК. Сейчас в Интернете существует достаточно много других баз данных, созданных на основе узких выборок по различным классам НК [1141]. Поиск по ним может оказаться в некоторых случаях достаточно эффективным и с меньшим количеством ложноположительных результатов.

11.4.5. Прикладные аспекты масс-спектрометрии нуклеиновых кислот

Масс-спектрометрический анализ нуклеиновых кислот активно применяется в криминалистике, поскольку может надежно подтвердить или исключить подозреваемого на основании информации о его ДНК. Для такого анализа существует ряд подходов [1138]. Представительный обзор по масс-спектрометрическому генотипированию методом коротких tandemных повторов (Short Tandem Repeat, STR) опубликован в 2001 году [1182].

Как и в случае белков, секвенирование нуклеиновых кислот позволяет не только определить последовательность нуклеотидов, но и сделать вывод о мутациях, других изменениях молекул. Масс-спектрометрия также используется для

структурного анализа аддуктов с самыми разнообразными соединениями, включая лекарственные препараты, металлы, белки и вещества, загрязняющие окружающую среду [1166, 1183]. Масс-спектрометрия справляется и с этой задачей, хотя, как правило, доля измененных нуклеотидов составляет 10^{-8} – 10^{-9} от их общего числа. Метод ИЭР-ИЦР ПФ эффективен для изучения нековалентных взаимодействий небольших молекул с нуклеиновыми кислотами. Он используется для установления стехиометрии и констант связывания, а также для определения мест связывания. В последнем случае можно использовать различия в спектрах исходного и связанного образца НК [1184]. Альтернативный вариант основан на эксперименте с двумя разными лигандами, когда образуется аддукт НК либо с двумя, либо с одним лигандом. Это означает, что в первом случае лиганды связываются с НК в разных местах, а во втором – в одном, причем один из них, обладая большей константой связывания, вытесняет второй [1185].

11.5. Метаболомика (метабономика)

В отличие от протеомики, гликомики и липидомики метаболомика занимается не отдельным классом органических соединений. Все эндогенные вещества, а также вещества, поступающие в живой организм извне, претерпевают в нем многочисленные превращения. Соединения, образующиеся в результате таких превращений, называются метаболитами, а их совокупность – метаболомом. Метаболитами могут быть соединения самых разных классов: альдегиды, кетоны, жирные кислоты, аминокислоты, сахара, углеводороды, нуклеиновые основания, нуклеозиды, нуклеотиды и т.д. Эти соединения существенно отличаются друг от друга по своим физико-химическим свойствам, а их количества в образце могут отличаться на порядки. Использование масс-спектрометрии для анализа мочи, выдыхаемого воздуха, пота представляет собой отличный неинвазивный метод диагностики состояния живого организма. Фактически метаболомика занимается исследованием фенотипа и его изменением в связи с болезнью, природными условиями или изменениями в генотипе.

В литературе встречаются два термина: метаболомика и метабономика. И метаболомика, и метабономика изучают метаболом отдельных клеток или организма в целом. Оба термина очень близки друг другу, что зачастую приводит к определенной путанице. Исходно термин «метаболомика» использовался для изучения флоры, а метабономика – фауны. Позже дифференцирование базировалось на методе анализа. Масс-спектрометрические исследования метаболома назывались метаболомикой, а исследования методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – метабономикой [1186]. В 1999 году авторы [1187] предложили называть метабономикой количественные измерения изменений метаболического отклика живой системы во времени под влиянием патофизиологических воздействий или генетических изменений. Позже они же определили метабономику как получение «отпечатков пальцев» биохимических отклонений, вызванных болезнью, лекарствами или токсинами [1188]. Таким образом, речь идет о динамических изменениях метаболома в результате какого-либо воздействия на организм. Напротив, установление полного состава метаболома в конкретный момент времени принято называть метаболомикой [1189].



Основными матрицами, которыми оперирует метабомика, являются моча, выдыхаемый воздух, кровь, пот, слюна, спинномозговая жидкость или целые клетки и ткани. Метод извлечения метаболитов и их последующего анализа зависит от их физико-химических свойств. Если речь идет о количественном определении, в экстракт добавляют внутренние стандарты. Для ГХ/МС обычно необходима дериватизация, поскольку большинство метаболитов — полярные соединения. Аналитические аспекты метаболомных исследований, включая пробоотбор, пробоподготовку и масс-спектрометрический анализ, достаточно подробно представлены в обзорах [70, 1190, 1191].

В прикладных исследованиях метабомика используется прежде всего для нахождения биомаркеров и осуществления диагностики конкретных заболеваний. Тем не менее метаболомные исследования могут носить и фундаментальный характер, поскольку дают возможность изучать причины и протекание болезней. Изменения метаболома свидетельствуют об изменении определенных метаболических цепочек, которые могут быть причиной заболевания. Методы метабомики, а именно сочетание методик получения данных путем анализа чрезвычайно сложных образцов на современных приборах и последующие статистические методы обработки результатов, представляющих огромные массивы данных, полученных при анализе сотен, а часто и тысяч образцов, широко применяются не только в медицине, но и в других областях, требующих анализа и сравнения сложных смесей. Метабомику применяют, например, в исследованиях для повышения эффективности селекции растений, для выявления подделок продуктов питания, напитков, лекарственных препаратов, для изучения влияния на организмы лекарств и других биологически активных веществ, а также внешних факторов. Применение масс-спектрометрии для задач метабомики — очень быстро развивающееся направление, которое заставляет решать множество непростых задач, начиная с более эффективной и быстрой пробоподготовки, улучшения характеристик приборов и методов для увеличения точности и чувствительности анализа и заканчивая методами обработки данных и отображения полученных результатов.

11.5.1. Инструментальные аспекты метабомики

Следует отметить, что метабомика является тем направлением науки, в котором совместные исследования двумя наиболее мощными методами (ЯМР и масс-спектрометрия) идут рука об руку, позволяя получать действительно уникальную информацию. Оба метода по отдельности имеют свои недостатки и преимущества. Поэтому, подходя к конкретной научной задаче, следует хорошо представлять, какой подход может быть наиболее эффективным. Часто вещество плохо ионизируется, что характерно для небольших полярных молекул. Часть молекул может оказаться неудобными для ЯМР в результате интенсивных обменных процессов с водой (например, 2,8-дигидроксиаденин). Понятно, что в первом случае лучше использовать ЯМР, а во втором масс-спектрометрию. Пожалуй, наиболее важной проблемой масс-спектрометрии является необходимость использования стандартов и баз данных для идентификации, а также сложности с количественным определением в связи с разным сечением ионизации для разных соединений. Напротив, количе-

ственные измерения очень просто проводить методом ЯМР. Кроме того, ЯМР не деструктивный метод исследования, и образец можно использовать в дальнейшем для других экспериментов. Однако чувствительность ЯМР существенно уступает чувствительности масс-спектрометрии и важные метаболиты можно просто не заметить. Преимуществом масс-спектрометрии является также сочетаемость с практически любыми методами предварительного разделения, включая все виды хроматографии, электрофорез, спектрометрию ионной подвижности [1192]. Особенно эффективным может быть подход, объединяющий хроматографию, ЯМР и масс-спектрометрию [1193] в единое целое (рис. 11.25). В этом случае исследователь получает комплементарную информацию о составе образца и структуре его компонентов.

Поскольку подавляющее большинство метаболитов представляет собой полярные соединений, наиболее популярным методом является комбинация масс-спектрометрии с обратнофазной высокоэффективной [1194] или ультраэффективной [1195] жидкостной хроматографией, а также с жидкостной хроматографией гидрофильных взаимодействий [1186, 1196], когда стационарной фазой служит полярный недириватизованный силикагель или силикагель, модифицированный полярными аминопропильными или цианопропильными группами, а подвижная фаза состоит из воды со смешивающимися с ней растворителями: ацетонитрил, метанол. Метод позволяет разделять высокополярные аналиты и не использовать растворители, которые плохо стыкуются с МС в режиме атмосферных методов ионизации. Описано и применение монолитных колонок [1197]. Полезным вариантом может быть ЖХ/МС анализ с регистрацией и положительных, и отрицательных ионов. Комплементарная информация дает возможность получить большую и более достоверную информацию о метаболитах [1198].

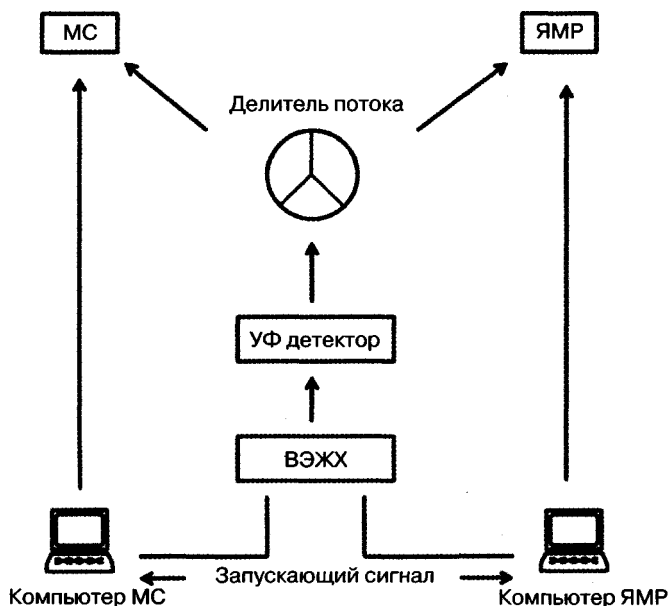


Рис. 11.25. Принципиальная схема прибора ВЭЖХ-ЯМР-МС

ГХ/МС может быть успешной, учитывая более высокую разрешающую способность и воспроизводимость [1199]. Эти достоинства зачастую превосходят недостаток метода, связанный с необходимостью проведения дериватизации, порой весьма трудоемкой [70, 974]. Процедура дериватизации может быть многостадийной, включая, например, защиту определенных функциональных групп перед проведением очередного этапа. При этом исходные полифункциональные соединения могут в итоге выходить несколькими пиками, поскольку дериватизация не всегда протекает на 100%. ГХ/МС также очень популярна при изучении растительных метаболитов. В случае очень сложных смесей метаболитов лучше использовать метод ГХ×ГХ/МС. На рис. 11.26 представлены примеры разделения метаболитов для нахождения биомаркеров диабета этим методом.

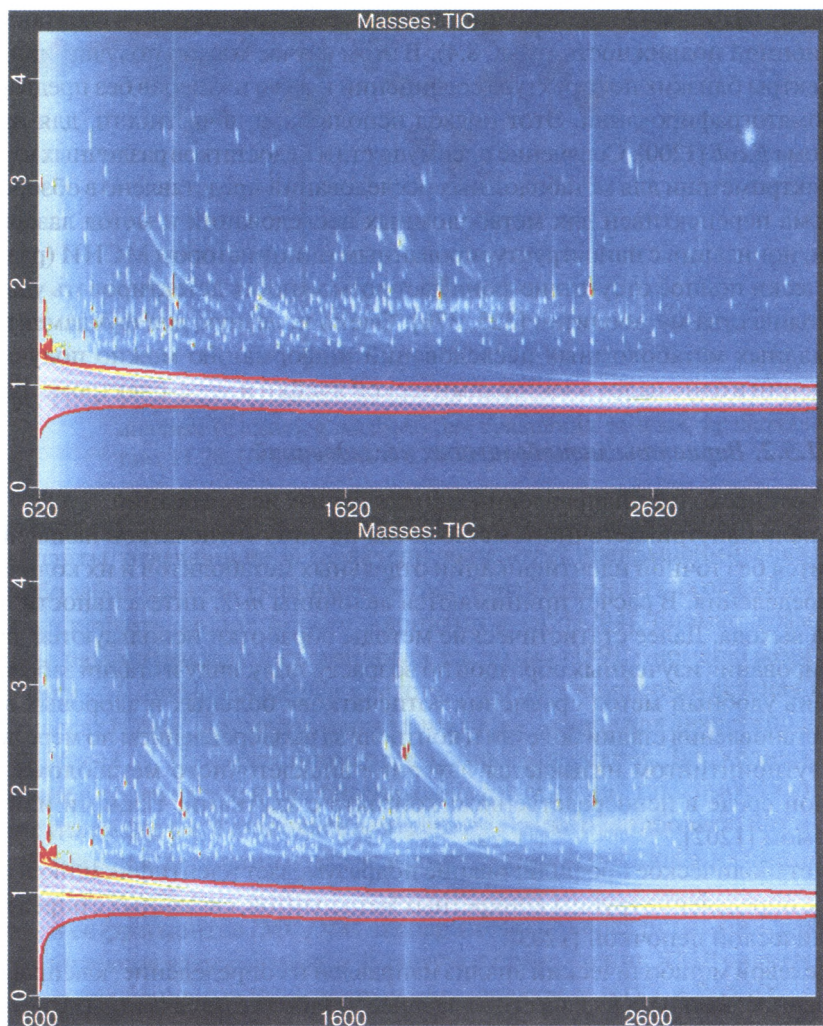


Рис. 11.26. Двумерные хроматограммы с результатами анализа проб здорового (верх) и больного диабетом человека (низ), полученные методом ГХ×ГХ/МС на приборе Pegasus 4D, LECO. (С разрешения LECO Corporation)

Важные результаты можно получать, используя в качестве предварительного метода разделения капиллярный электрофорез (разд. 1.7). Преимуществом его для метаболомных исследований является крайне малый объем пробы, обычно составляющий 0,1–10 нл, что позволяет работать с единичными клетками [101]. Тем не менее иногда чувствительности не хватает и приходится проводить предварительное концентрирование [95].

Безусловно, достаточно эффективен и прямой анализ образца (без какого-либо разделения) в источнике электрораспыления. Это наиболее быстрый метод анализа сложных образцов в варианте «отпечатков пальцев» либо с последующим структурным анализом каждого пика молекулярного иона методами МС/МС. Недостатками этого подхода, как и для других аналитов, является невозможность исследования изомеров и подавление ионного сигнала определенных соединений. Значительно увеличивает эффективность использование масс-спектрометрии в сочетании с методами ионной подвижности (разд. 8.4). В этом случае можно получать tandemные масс-спектры близких по структуре соединений и даже изомеров без предварительного хроматографирования. Этот подход использован, в частности, для изучения метаболома *E.coli* [1200]. Сравнение преимуществ и недостатков различных вариантов масс-спектрометрии для метаболомных исследований представлено в обзоре [1190].

Весьма перспективен для метаболомных исследований и метод лазерной десорбции/ионизации с наноструктурированным инициатором МСНИ (разд. 5.16). Практически полное отсутствие фона дает возможность детектировать ультраследовые количества метаболитов [325, 376]. Очень полезную для фундаментальных и прикладных метаболомных исследований информацию можно получить при объединении в одно целое электрохимической ячейки и масс-спектрометра [1201].

11.5.2. Варианты метаболомных исследований

Существует несколько направлений метаболомных исследований.

1. Анализ внутриклеточного метаболома по типу «отпечатков пальцев» часто проводится без точной идентификации отдельных метаболитов и их количественного определения. В расчет принимаются величины m/z , интенсивности пиков и времена выхода. Далее статистические методы обработки используются для дифференцирования изученных образцов по возрасту, полу, виду и стадии заболевания. Это очень удобный метод сравнения «отпечатков» больных и здоровых людей с целью установления стадии болезни и контроля за выздоровлением по мере лечения.

2. Футпринтингом называется изучение внеклеточного метаболома в культуральной среде в непосредственном контакте с клетками, тканями или целым организмом [1202].

3. Метаболическое профилирование подразумевает идентификацию и количественное определение группы конкретных метаболитов, связанных с определенной метаболической цепочкой [1203].

4. Целевой метаболический анализ направлен на определение, как правило количественное, нескольких известных заранее метаболитов, связанных с изучаемым процессом в организме. В результате можно получить информацию о минорных, но важных для целей диагностики метаболитах, например регуляторных эйкозаноидах, которые могут быть пропущены при анализе методом «отпечатков пальцев».

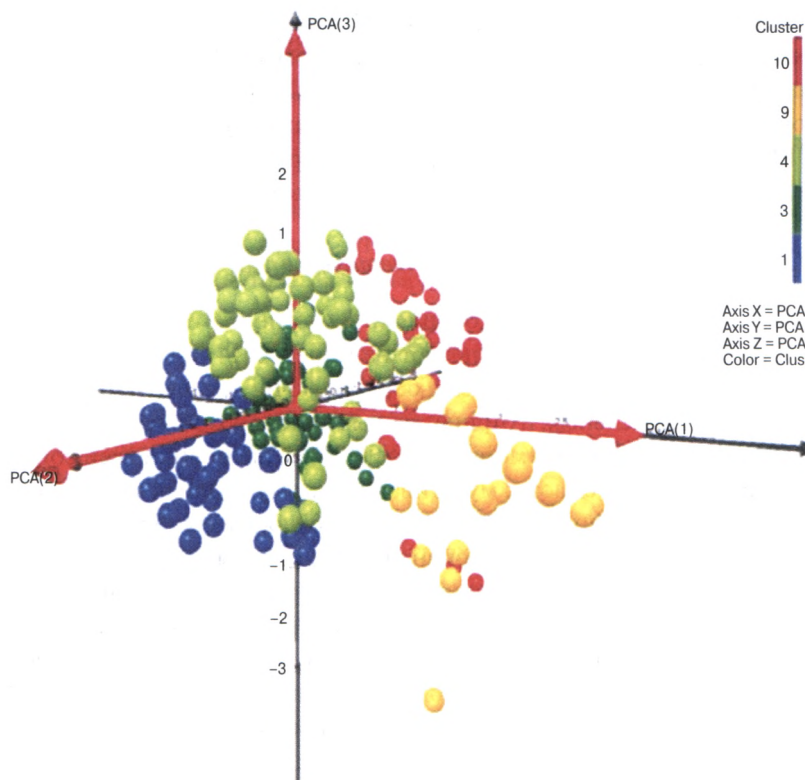


Рис. 11.27. Результаты применения метода главных компонент (PCA) и кластерного анализа (Clustering Analysis) для сравнения данных, представленных на рис. 11.26. (С разрешения LECO Corporation)

В двух последних случаях на первых стадиях исследований находят биомаркеры, т.е. метаболиты, отвечающие за характерную цепочку превращений и связанные с каким-либо заболеванием. Например, биомаркерами рака легких оказались таурин, гиппуровая кислота, валин, бетаин, карнитин и т.д. [1204], биомаркерами атеросклероза — пальмитиновая и стеариновая кислоты [1199], биомаркерами диабета второго типа — 4-аминобензойная кислота, 2,5-гидроксифенилуксусная кислота, диметилмалеат [1205]. Пример установления биомаркеров для диабета представлен на рис. 11.26 и 11.27. Ценность биомаркеров хорошо известна. Так, количественное определение в крови простейших биомаркеров (холестерин, глюкоза) стало рутинной медицинских анализов. Установление структуры нового метаболита, как и в любом случае работы с неизвестными соединениями, требует использования всего арсенала масс-спектрометрии, включая разные методы ионизации, измерение точных масс молекулы и ее фрагментов, МС/МС эксперименты разных порядков, дериватизацию, учет индексов удерживания, а зачастую и привлечения ЯМР спектроскопии. Помогают и две основные базы данных масс-спектров: NIST и WILEY.

Метаболическое профилирование эффективно для исследования самых разнообразных заболеваний. Большой цикл работ связан с изучением врожденных аномалий метаболизма. В обзоре [1206] представлены результаты исследований по этому

направлению методом ГХ/МС, а в обзоре [1207] — методом ИЭР-МС/МС. В XXI веке в большинстве развитых стран процедуру метаболомного детектирования наиболее значимых биомаркеров проходят все новорожденные. Так, в Новой Англии МС/МС использована для детектирования 23 метаболомных нарушений у 160 000 новорожденных [1208], а в Германии у 250 000 [1209]. В Австралии МС/МС использована для поиска 31 метаболомного нарушения у 362 000 новорожденных [1210].

11.5.3. Программное обеспечение метаболомики

Метаболом любого организма многообразен. В частности, база данных метаболома человека (<http://www.hmdb.ca/>) включает на конец 2014 года 41 818 соединений. В случае нецелевого анализа, например образца мочи, исследователь получает при регистрации и положительных, и отрицательных ионов хроматограмму с тремя-пятью тысячами пиков самых разных метаболитов [1211]. Для оценки всей совокупности результатов обычно прибегают к мультивариантному анализу, который позволяет сократить объем данных до уровня, приемлемого для классификации. Хорошо работает метод анализа главных компонент [1186], который переводит результаты в двух- или трехмерный формат. Варианты и примеры использования разных типов мультивариантного метаболомного анализа представлены в обзорах [70, 1212].

В качестве примера на рис. 11.26 представлены хроматограммы метаболома здорового человека и больного диабетом, полученные методом ГХ×ГХ/МС. Даже простое визуальное сравнение двух приведенных хроматограмм обнаруживает очевидное различие между двумя типами проб. Однако для принятия решения необходимо провести обработку этих данных. На рис. 11.27 представлены результаты применения метода главных компонент (PCA) и кластерного анализа (Clustering Analysis), использованных для сравнения данных рис. 11.26. Каждая цветная сфера на графике представляет различные метаболиты. Цвет сфер характеризует относительную концентрацию метаболитов в образце (шкала представлена справа от графика, где красный — наиболее высокая концентрация, а синий — наименьшая). С помощью статистических методов сравнительно легко выявляются наиболее характерные метаболиты, которые могут быть связаны с проявлением диабета у пациента, его отсутствием или вообще никак не связанными с данным заболеванием.

В связи с многочисленными параметрами метаболомного анализа еще в 2004 году был предложен формат, названный MIAMET (minimal information about metabolomics analysis) и направленный на синхронизацию публикуемых результатов [1213]. Для описания метаболомного эксперимента необходимо подробно указывать условия пробоотбора и пробоподготовки, детали методов разделения, ионизации и масс-спектрометрического анализа, метод сбора и обработки данных.

Весьма полезны метаболомные базы данных. Выше уже упомянута база <http://www.hmdb.ca/>. База METLIN содержит информацию по метаболитам и более 60 000 тандемных масс-спектров высокого разрешения (<http://metlin.scripps.edu/>). Координаты других интернет-ресурсов можно найти на сайте метаболомного общества: <http://metabolomicssociety.org/>. Дополнительную информацию о масс-спектрометрии в метаболомных исследованиях можно найти в обзорах, в частности [70, 1129, 1186, 1190, 1191, 1201, 1211, 1212].

11.6. Масс-спектрометрический анализ микроорганизмов

Проблема идентификации микроорганизмов возникла, как только стала понятна взаимосвязь бактерий с заболеваниями. В классическом варианте идентификацию гомогенных образцов микроорганизмов, полученных культивированием в лабораторных условиях, проводили с помощью микроскопа. Современные методы идентификации, включая автоматы для характеристики микроорганизмов по набору энзиматических реакций со спектральным детектированием, хемотаксономическая характеристика, основанная на анализе жирных кислот с помощью газовой хроматографии, а также характеристика генов не лишены недостатков. Такие анализы занимают много времени, а для их проведения необходимы чистые виды (штаммы). Работа со смесями микроорганизмов значительно менее эффективна и может привести к ложным результатам.

Масс-спектрометрия оказалась превосходным методом анализа биологических образцов, позволяющим преодолеть указанные сложности. Современный прибор дает возможность анализировать молекулы с молекулярной массой выше 10^7 дальтон, в том числе в неразделенных и неочищенных смесях (клеточные лизаты, смеси пептидов и белков после различных расщеплений и т.д. [1214–1216]). Для проведения анализа требуются считанные минуты и фемто-атто-моли (10^{-15} – 10^{-18}) вещества. В частности, образец для детектирования маркеров широкого круга микроорганизмов в смешанных популяциях может быть проанализирован в течение нескольких минут.

Можно выделить три вида масс-спектрометрического анализа микроорганизмов. Наиболее примитивный подход подразумевает быстрый скрининг для установления присутствия бактерий, вирусов, грибов, других микроорганизмов в воде, воздухе, продуктах и т.д. Второй вариант анализа включает идентификацию микроорганизмов, иногда на уровне вида или штамма. Для этой цели масс-спектрометрия, как правило, используется в комбинации с другими методами, а для подготовки образца проводят лабораторное культивирование. Благодаря обобщению накопленного в этой области материала и переходу к созданию соответствующих библиотек масс-спектрометрия позволяет в кратчайшие сроки эффективно идентифицировать смесевые препараты. Третий, наиболее трудоемкий уровень исследований подразумевает установление состава и структуры отдельных молекул в конкретных микроорганизмах.

В последнее время набирает популярность работа с бактериями на клеточном уровне. Для идентификации методами МС оказывается достаточно одной клетки. При этом устраняются проблемы, связанные с присутствием в пробе нескольких штаммов микроорганизмов. Эти аспекты масс-спектрометрии микроорганизмов отражены в обзорах [1216–1219].

Масс-спектрометрия была впервые применена для анализа микроорганизмов по типу «отпечатков пальцев» в 70-х годах прошлого века. Использовали пиролитическую масс-спектрометрию (разд. 8.1) с детектированием низкомолекулярных (молекулярные массы ниже 150 дальтон) продуктов разложения или контролируе-

мый нагрев обезвоженных бактерий с регистрацией соединений с молекулярными массами до 700 дальтон [1220]. Внедрение в практику исследований бомбардировки быстрыми атомами, методов лазерной десорбции, электрораспыления, а также tandemной масс-спектрометрии позволило проводить анализ смесей нелетучих органических соединений с большими молекулярными массами. В результате появилась возможность идентифицировать биомаркеры конкретных групп и индивидуальных микроорганизмов. В качестве таких маркеров используются углеводы, гликолипиды, фосфолипиды, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты и т.д. [15, 1221–1223].

Самый ценный биомаркер – это, безусловно, нуклеиновые кислоты, которые являются наиболее индивидуальным и полным признаком объекта. Масс-спектрометрическое секвенирование генов пока не дает столь эффективных результатов, как секвенирование пептидов и белков (разд. 11.4 и 11.1), однако измерение молекулярных масс продуктов расщепления генов позволяет получать достоверную информацию о составе исходной молекулы. Сравнение результатов с базами данных дает возможность распознавать отдельные виды даже в смешанных популяциях. К сожалению, каждая клетка содержит лишь одну молекулу ДНК, а количество молекул РНК не превышает 0,01% сухого веса бактерий и 1% сухого веса спор.

Хорошим биомаркером являются белки. Большинство белков микроорганизмов имеют молекулярные массы в диапазоне 4000–15 000 дальтон [1224]. Они составляют более 50% сухого веса микроорганизмов. С их помощью можно различать очень близкие друг другу виды, а также подвиды, штаммы и их споры [1225]. Например, метод МАЛДИ позволяет получить информацию о молекулярной массе белка, а также молекулярных массах продуктов его энзиматического расщепления. Уже по набору этих продуктов можно делать важные выводы о принадлежности образца к тому или иному виду микроорганизмов. Для экспрессного установления последовательности аминокислот в структуре пептидов, полученных в результате расщепления белков, применяют tandemную масс-спектрометрию.

Технически МАЛДИ анализ белков микроорганизмов мало отличается от обычного анализа белков. Важнейшим различием является дополнительная процедура по разрушению оболочки клеток. Однако эта стадия легко осуществима при добавлении к образцу кислот [1225], метанола [1226] или этанола [1227], причем метанол стабилизирует образец лучше, чем, например, трифторуксусная кислота [1228]. Кроме того, следует подчеркнуть, что, поскольку подавляющее большинство матриц МАЛДИ является органическими кислотами, контакт микроорганизмов с матрицей часто приводит к разрушению оболочек клеток без каких-либо дополнительных стадий. МАЛДИ все более активно используется для идентификации и классификации микроорганизмов на видовом и субвидовом уровне [1229, 1230]. Обычно для этой цели принимают во внимание пики в диапазоне 2000–20 000 дальтон, которые обусловлены в основном рибосомальными пептидами и белками [1231–1233]. Спектры МАЛДИ нескольких штаммов *Thalassospira* и штамма *Brevundimonas sp.* VKM Ac-1178, которые использованы для сравнительного изучения нового выделенного из почвы штамма *Thalassospira permensis sp. nov.*, представлены на рис. 11.28 [1234].

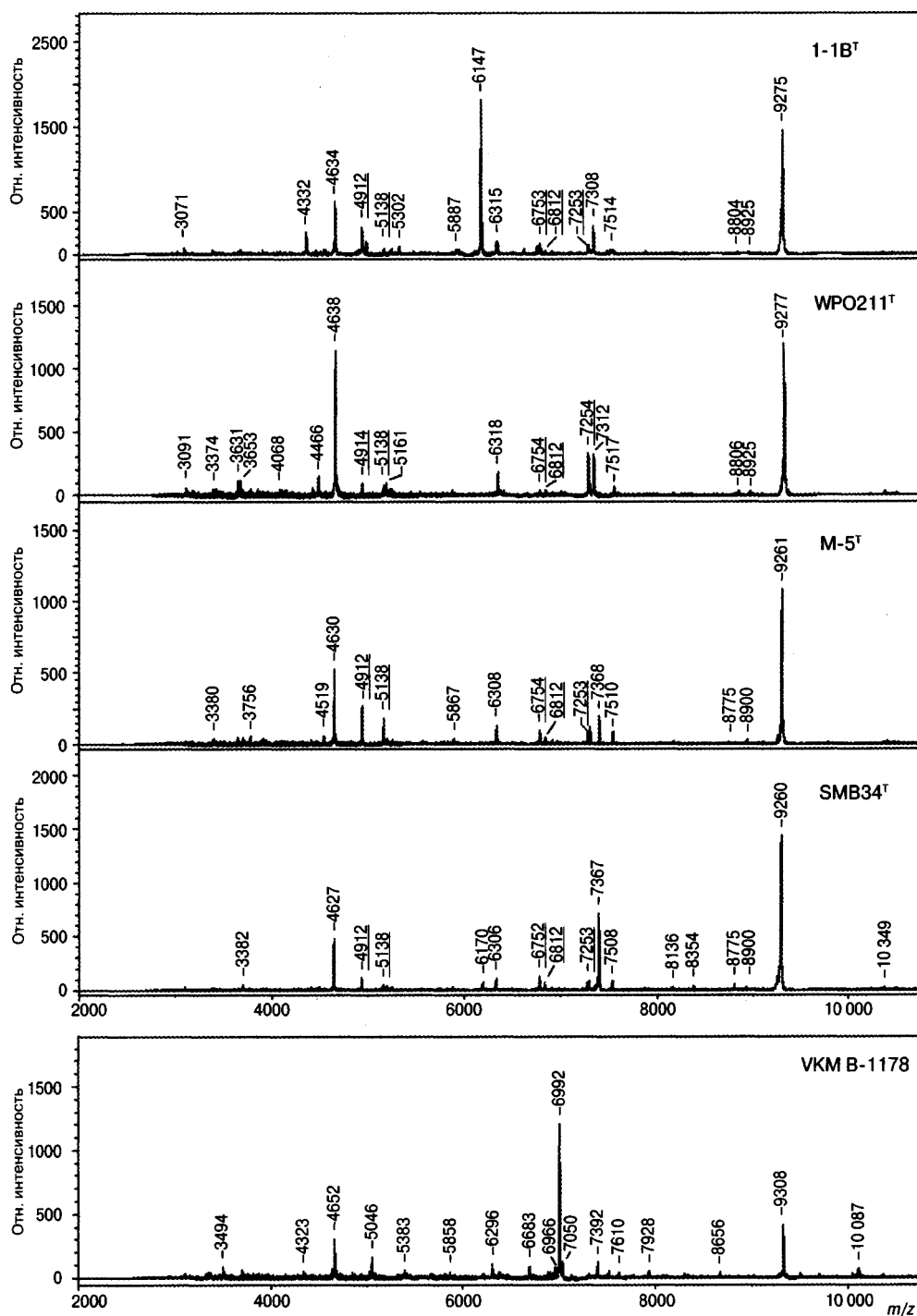


Рис. 11.28. Спектры МАЛДИ нескольких штаммов *Thalassospira* и штамма *Brevundimonas* sp. VKM Ac-1178, которые использованы для сравнительного изучения нового выделенного из почвы штамма *Thalassospira permensis* sp. nov

Для таксономических исследований очень хорошо зарекомендовал себя биотайпер, производимый компанией «Брукер». Это программное обеспечение позволяет классифицировать анализируемые штаммы, используя биомаркеры семейств, родов, видов микроорганизмов.

Расшифровка генома микроорганизма значительно облегчает работу и увеличивает надежность белкового анализа. Например, многие пики в спектре МАЛДИ *Saccharomyces cerevisiae* хорошо коррелировали с молекулярными массами белков, предсказанных на основе генома данного микроорганизма [1235]. Этот подход активно используется и в других исследованиях [1224, 1236]. Повышенная надежность такого варианта объясняется тем, что в зависимости от типа пробоподготовки, состояния анализируемого микроорганизма набор детектируемых белков может быть различным. Однако все эти белки могут быть легко связаны с ДНК организма. Тем самым надежность идентификации организма возрастает.

Очень широко используется в анализе белков компьютерный поиск по базам данных (разд. 11.1). В них собраны данные о сотнях тысяч белков, поэтому информация о молекулярной массе пептида или белка и о начальной последовательности аминокислотных звеньев (метка сиквенса) дает возможность вести эффективный компьютерный поиск.

При масс-спектрометрическом изучении целых (интактных) микроорганизмов и их спор полезную информацию предоставляют полярные липиды. В этом случае готовят суспензию клеток микроорганизма в растворителе или наносят их на твердую подложку, например матрицу МАЛДИ. За счет взаимодействия со средой в этих условиях идет лизирование большинства бактериальных клеток. Хотя состав жирных кислот может изменяться в жизненном цикле организма, полярные головные группы фосфолипидов достаточно стабильны, чтобы использовать их для таксономической характеристики. Полярные липиды составляют около 5–8% сухого веса бактерий, их легко выделять и анализировать. В связи с этим полярные липиды оказались наиболее удобным классом органических соединений, анализ которых позволяет проводить идентификацию микроорганизмов. В частности, для грам-отрицательных бактерий характерен фосфатидилэтаноламин, для грам-положительных бактерий – фосфатидилглицерин, для грибов – фосфатидилинозитол, для инкапсулированных вирусов – фосфатидилхолин, для микроводорослей – сульфолипиды. Для регистрации этих характеристических головных групп полярных липидов используют тандемную масс-спектрометрию (разд. 11.2). Выделяя молекулярный ион, проводя его активацию соударением и регистрируя спектры ионов-продуктов или спектры выбросов идентичных нейтральных частиц, можно детектировать характеристическую группу и отнести образец к тому или иному классу микроорганизмов.

Масс-спектрометрическое исследование вирусов включает не только идентификацию вирусов, но и изучение связывания вирус – антитело, взаимодействия белок – белок и динамических изменений белков [1237]. Использование электрораспыления дает возможность измерять молекулярные массы ДНК интактных вирусов [13, 1238]. Интереснейшим фактом является то, что вирус может не погибнуть во время анализа. В частности, Сьюздаку [1237] удалось инфицировать листья табака вирусом табачной мозаики, подвергнутым предварительному масс-спектрометрическому анализу.

Анализ белков капсид вирусов [304, 1239] становится рутинной, поскольку молекулярные массы этих соединений редко превышают 10 000 дальтон. В условиях МАЛДИ при взаимодействии с кислой матрицей происходит денатурация белков, так что для установления первичной структуры необходимо лишь смешать солюбилизованный образец с материалом матрицы и провести анализ. Масс-спектрометрическая идентификация вирусов по белкам их капсид достаточно проста, поскольку последовательность аминокислот в вирусном пептиде и последовательность нуклеотидов в ДНК уже известны для большинства вирусов. Поэтому идентификация по величинам m/z продуктов энзиматического расщепления является скорее компьютерной и легко осуществляется в автоматическом режиме с использованием баз данных.

В последнее время возрастает важность экспрессной идентификации патогенных микроорганизмов как части контртеррористических мероприятий. Масс-спектрометрия действительно может быть крайне эффективно использована для этой цели. Получают спектр типа «отпечатков пальцев» и сравнивают его со спектрами библиотеки масс-спектров микроорганизмов, которые потенциально могут быть использованы в качестве биологического оружия [1240]. Для анализа атмосферы можно использовать прямой забор проб воздуха [1241] или депонирование частиц из воздуха на полимерный материал [1242]. Для определения микроорганизмов в воде [1243, 1244] хорошо зарекомендовали себя специально подготовленные поверхности (разд. 5.16).

ГЛАВА 12

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МАСС–СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Помимо идентификации соединения, важнейшим аналитическим аспектом является выявление его относительного или абсолютного количества в исследуемом образце [2, 7, 1245]. Масс-спектрометрия — один из наиболее надежных методов количественного определения самых разных соединений. Существует несколько вариантов такого анализа, различающихся по времени, стоимости, надежности и т.д. В зависимости от задач экспериментатора можно выбирать любой из представленных ниже подходов

Например, для самой грубой количественной оценки можно использовать площадь под кривой полного ионного тока, полученной при полном испарении образца из штока прямого ввода. Важно только, чтобы кривая испарения вещества не перекрывалась кривой испарения другого компонента образца. Однако даже в случае перекрывания можно провести измерения, если использовать для расчетов площади под кривой не всего ионного тока, а тока характеристических для каждого из компонентов ионов. Эти варианты анализа, называемые масс-хроматографией и масс-фрагментографией, будут рассмотрены в разд. 12.1.

На рис. 12.1 (верх) представлена кривая полного ионного тока, полученная при полном испарении образца, состоящего из двух компонентов. В данном случае можно говорить о термограмме образца. Компоненты существенно различаются по температуре испарения, поэтому плавный нагрев пробы позволяет получить их индивидуальные пики. Масс-спектры компонентов представлены на рис. 12.2 (середина и низ). Спектры не накладываются друг на друга и позволяют надежно идентифицировать соединения, а площади под кривыми на термограмме дают возможность провести количественную оценку состава смеси.

Если необходимо измерить абсолютное количество конкретного соединения в образце, оптимальным вариантом является предварительное построение калибровочной кривой, связывающей количество анализируемого соединения в единицах массы и площадь под кривой полного ионного тока или тока характеристического иона. Однако прямой ввод может более или менее эффективно использоваться только для анализа простых смесей, когда есть различия в температурах кипения компонентов, а в их спектрах можно выделить характеристические фрагментные ионы, отсутствующие в спектрах других компонентов смеси и самой матрицы.

Такой подход используется крайне редко, что связано с его невысокими характеристиками и возможностями современных приборов, когда масс-спектрометрическому анализу предшествует разделение компонентов смеси в он-лайн режиме.

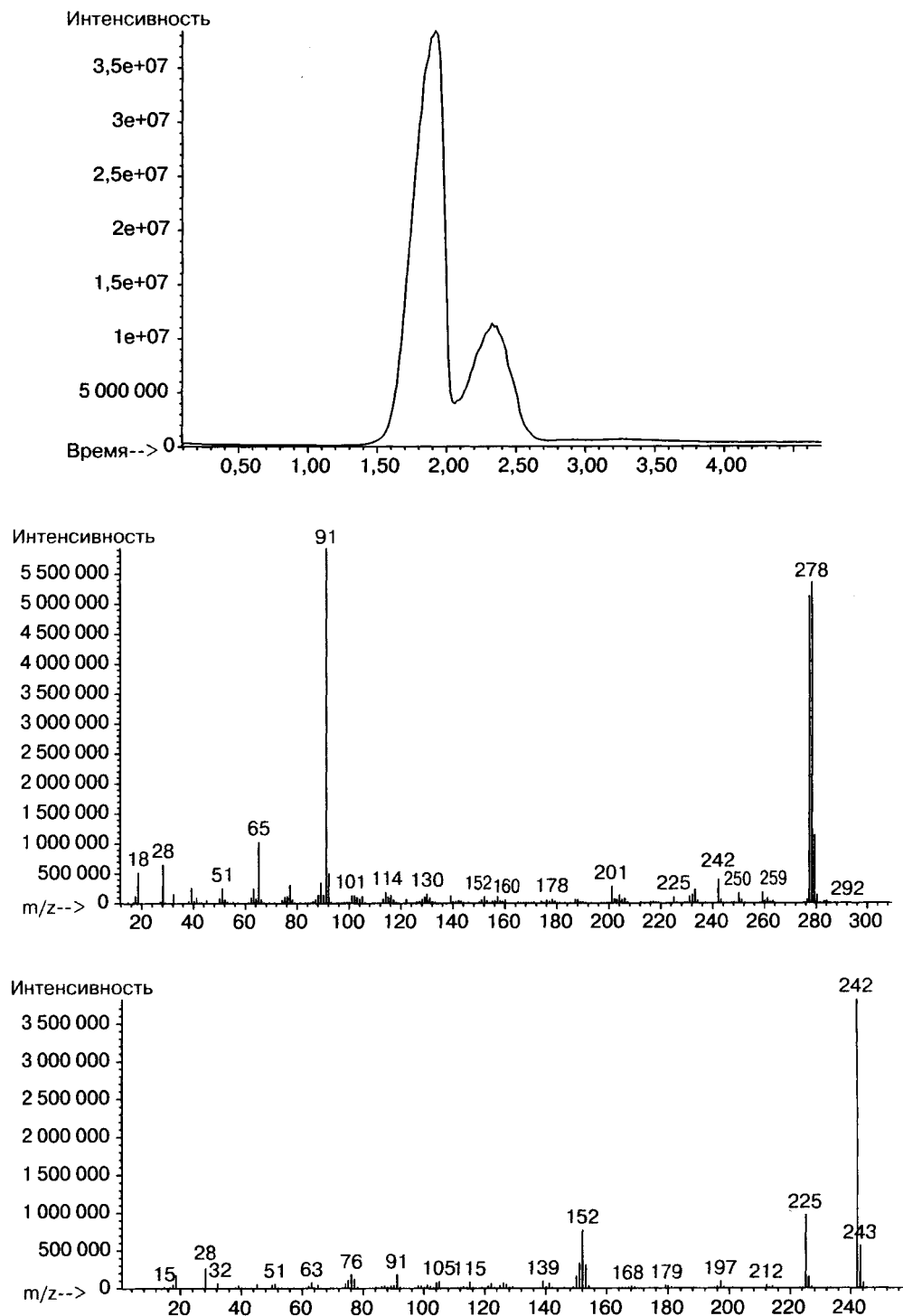


Рис. 12.1. Кривая полного ионного тока двухкомпонентного образца, испаряемого из штока прямого ввода (верх), и масс-спектры компонентов (середина и низ)

Наиболее эффективным инструментом для проведения количественного анализа смесей органических соединений является хроматомакс-спектрометрия. В этом случае на входе мы имеем неизвестную смесь органических соединений, а на выходе — полную информацию о ее качественном и количественном составе. Масс-спектр позволяет идентифицировать соединение, а площадь хроматографического пика — оценить количество этого соединения в пробе. В дальнейшем суть метода будет излагаться на примере ГХ/МС, но необходимо подчеркнуть, что абсолютно аналогичные подходы используются с любым другим методом разделения при его стыковке с масс-спектрометром (жидкостная хроматография, суперкритическая флюидная хроматография, ионная хроматография и т.д.). На рис. 12.2 представлена хроматограмма по полному ионному току смеси 46 приоритетных загрязняющих соединений. Все пики разрешены у нулевой линии, их площади могут быть легко и точно проинтегрированы. При этом всегда существует корреляция между площадями хроматографических пиков компонентов и их концентрацией в смеси.

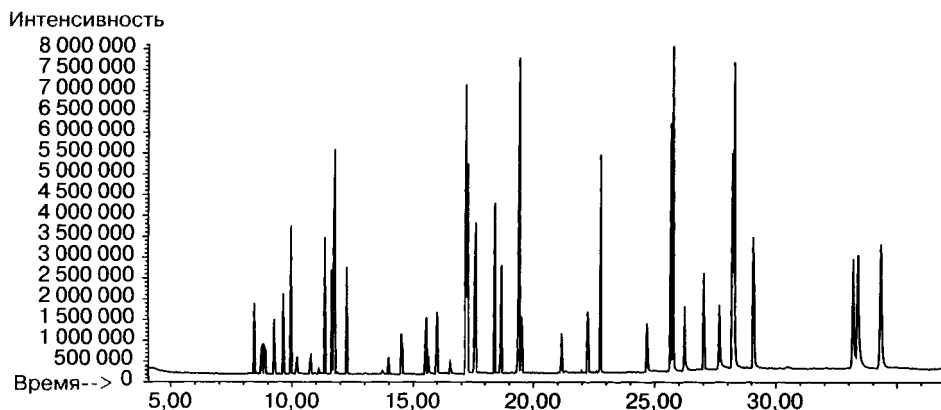


Рис. 12.2. Хроматограмма приоритетных органических загрязняющих веществ, экстрагируемых из нейтральной и щелочной среды (метод 625 Агентства по охране окружающей среды США)

Проблемы возникают при анализе сложных многокомпонентных систем, например природных соединений. На рис. 12.3 (верх) представлена хроматограмма по полному ионному току (ПИТ) дихлорметанового экстракта образца природной воды. На этой хроматограмме более половины пиков недостаточно разрешены, а часть пиков обусловлена двумя и более компонентами с близкими временами выхода. Высокий уровень фона. В таком варианте прямое интегрирование площади пика приведет к неправильным результатам. Программное обеспечение современных масс-спектрометров позволяет провести автоматическую обработку такого спектра и создать реконструированную хроматограмму по полному ионному току (РПИТ), представленную на рис. 12.3 (низ). В этом случае ордината вновь представляет собой величину полного ионного тока, но большинство пиков разрешено до нулевой линии благодаря вычитанию фоновых пиков. Качество масс-спектров при такой обработке тоже улучшается, но проблема наложения хроматографических пиков не устраняется, и многие спектры представляют собой суперпозицию масс-спектров двух или более соединений.

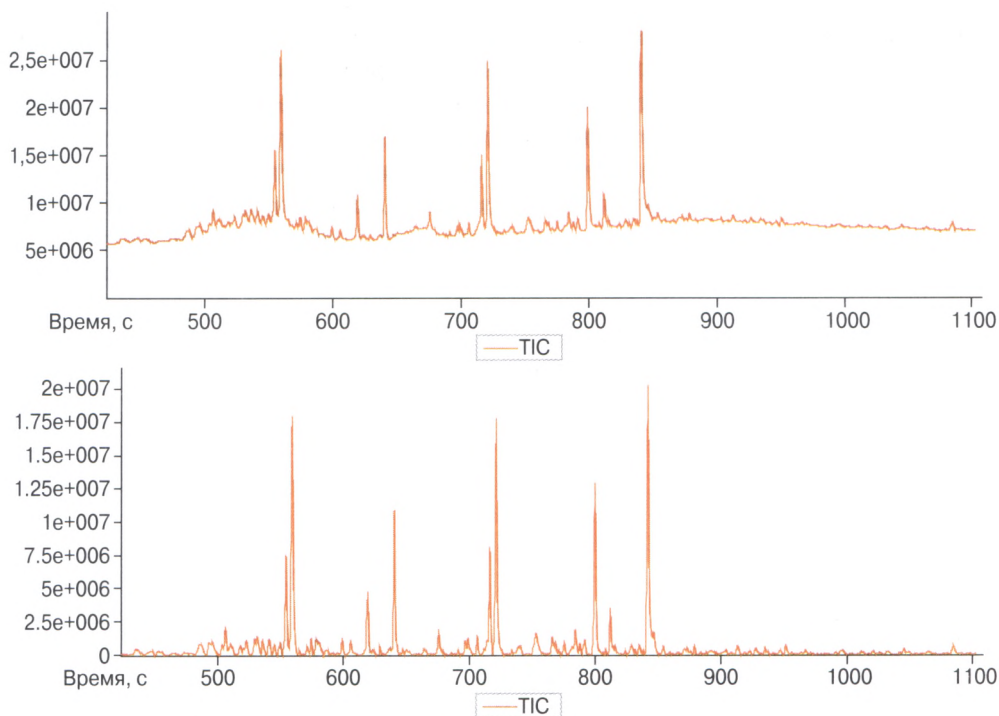


Рис. 12.3. Хроматограмма по полному ионному току (верх) и реконструированная хроматограмма по полному ионному току (низ) дихлорметанового экстракта образца природной воды

Для решения проблемы неполного хроматографического разделения и проведения количественного хроматомасс-спектрометрического анализа смесей органических соединений используют две родственные техники: масс-хроматографию и масс-фрагментографию. В варианте тандемной масс-спектрометрии надежность результатов можно дополнительно увеличить, если использовать метод мониторинга заданных реакций

12.1. Масс-хроматография

Масс-хроматография не связана ни с каким особым проведением эксперимента. Ведется обычный хроматомасс-спектрометрический анализ с полным сканированием масс-спектра в заданном диапазоне масс. Качественное определение ингредиентов осуществляется по их масс-спектрам и временам выхода. Однако для количественного определения компьютер строит хроматограммы по току характеристических для каждого соединения ионов. Внешний вид хроматограммы может полностью измениться по сравнению с исходной ПИТ хроматограммой, поскольку все ионы, за исключением заданных, игнорируются.

На рис. 12.4 представлена хроматограмма по полному ионному току дихлорметанового экстракта тюленьего жира и масс-хроматограммы по току ионов с

m/z 326, 360 и 394, характерных для пентахлор-, гексахлор- и гептахлорбифенилов соответственно. Все пики на полученных масс-хроматограммах хорошо разрешены, а их площади могут быть легко вычислены интегрированием. Следует обратить внимание, что ни один из этих пиков не может быть надежно зарегистрирован на хроматограмме по полному ионному току. Этот факт тем более интересен, что речь не идет об увеличении чувствительности метода. Фактически меняется только форма представления результатов. Такая форма характеризуется повышенной селективностью за счет уменьшения сигналов фона. Поскольку сигнал характеристических ионов при этом не уменьшается, результатом оказывается существенное увеличение параметра сигнал/шум.

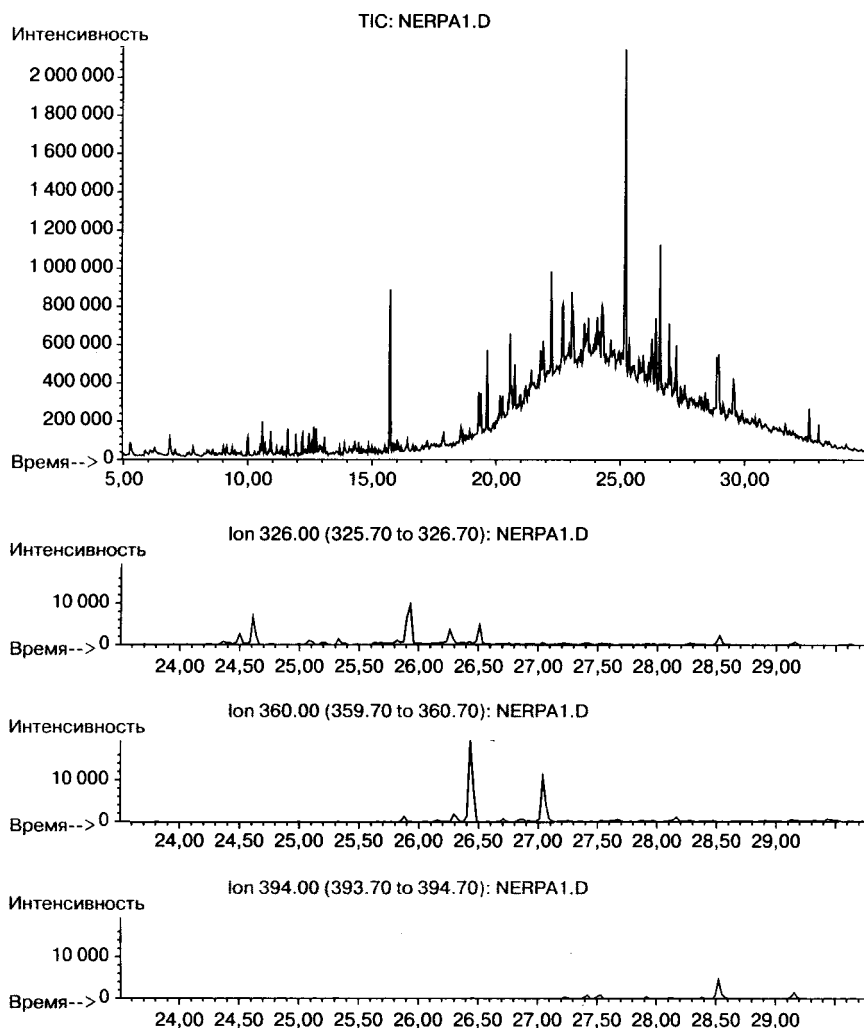


Рис. 12.4. Хроматограмма по полному ионному току дихлорметанового экстракта тюленьего жира и масс-хроматограммы по току ионов с m/z 326, 360 и 394, характерных для пентахлор-, гексахлор- и гептахлорбифенилов соответственно

В зависимости от сложности матрицы и интенсивности фоновых сигналов целевых аналитов может быть совсем не видно на хроматограмме по полному ионному току (рис. 12.5а) даже при отсутствии хроматографического горба. Однако на масс-хроматограмме они окажутся весьма интенсивными (рис. 12.5б). На рис. 12.5 обратите внимание на ординату. Интенсивность пиков на рис. 12.5б составляет около 2000, а на рис. 12.5а — более миллиона. Тем не менее практически нулевой фон на рис. 12.5б позволяет провести надежное количественное определение.

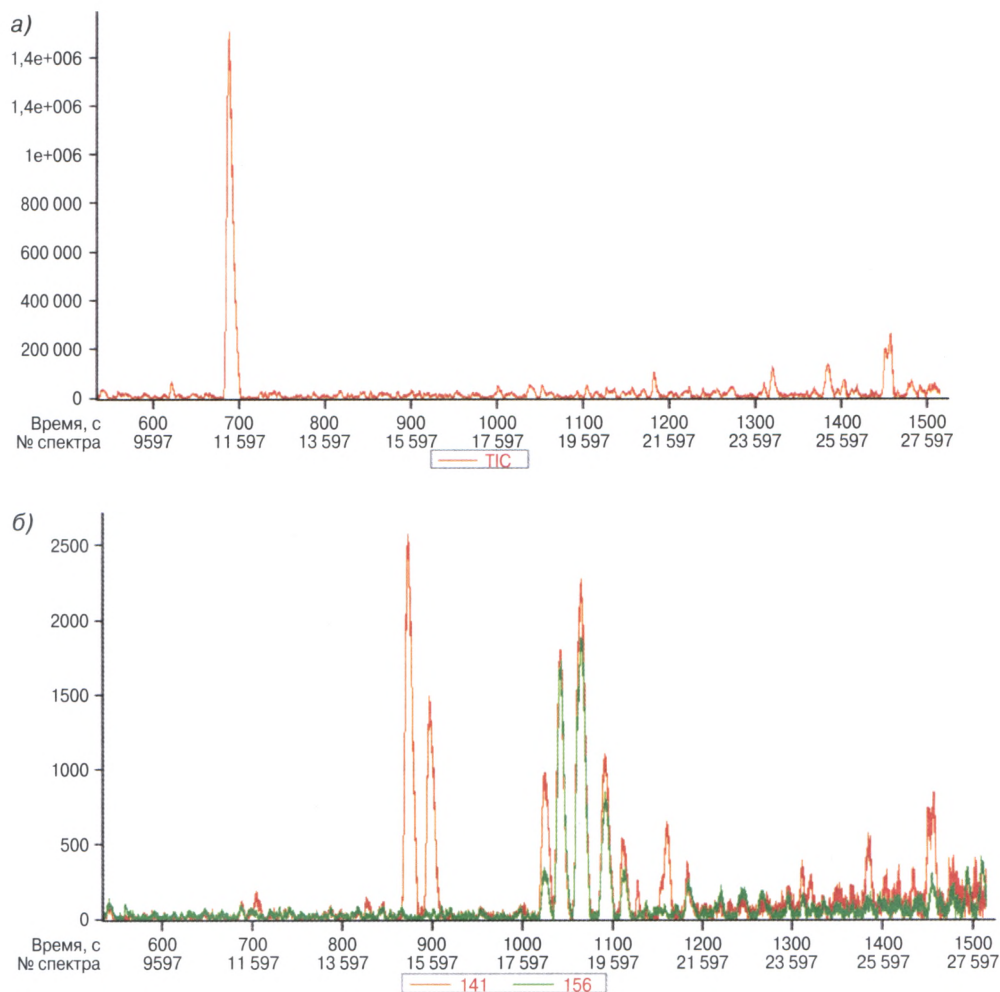


Рис. 12.5. Хроматограмма образца природной воды по полному ионному току (а). Масс-хроматограмма по току ионов с m/z 141 (рыжий) и m/z 156 (зеленый), характерных для метилнафталинов и диметилнафталинов соответственно (б)

Масс-хроматография дает возможность во многих случаях проводить качественный и количественный анализ компонентов, которые не разделяются хроматографически.

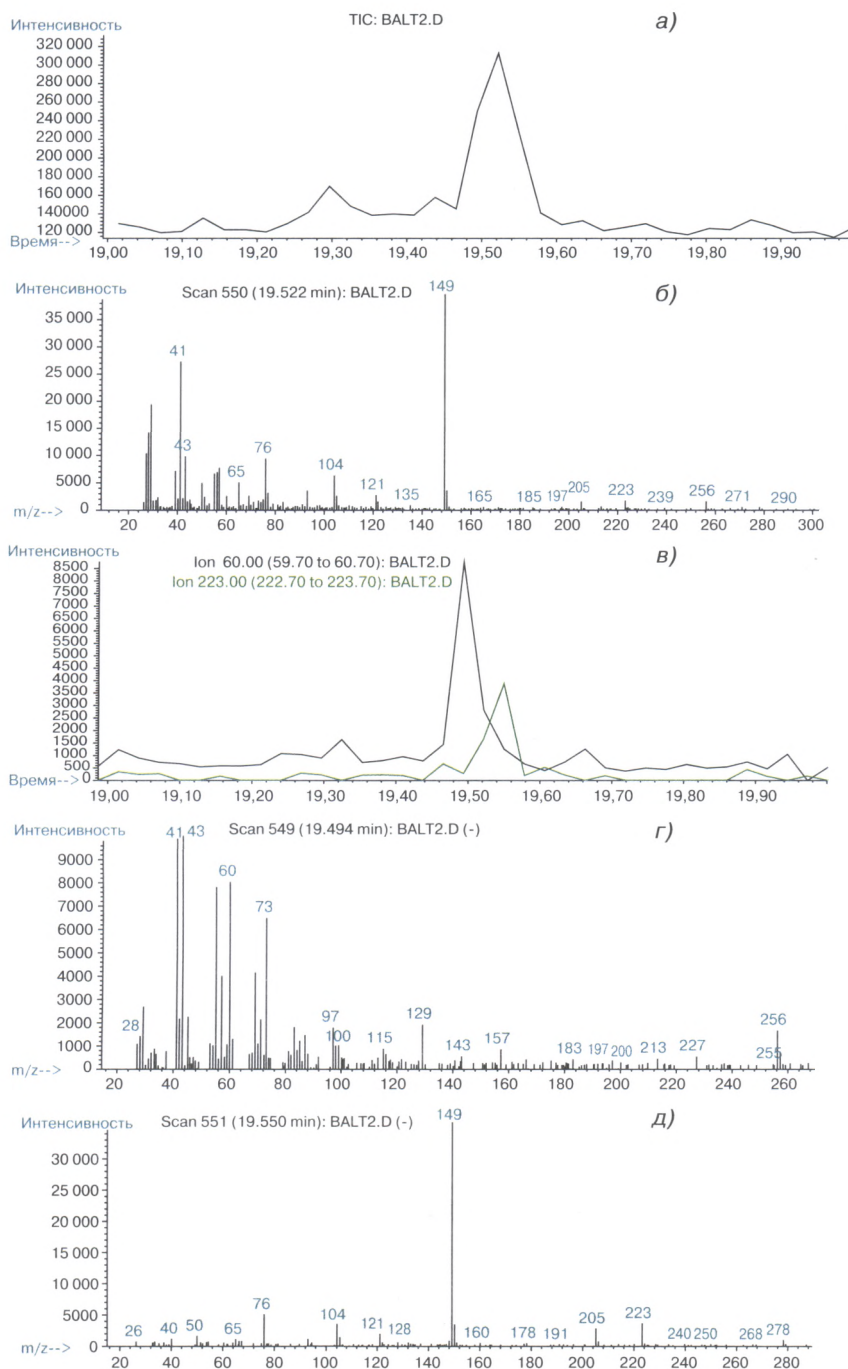


Рис. 12.6. Хромотограмма пробы воды из Балтийского моря по полному ионному току (а), масс-спектр на вершине хроматографического пика 19,522 мин (б), масс-хроматограммы ионов с m/z 256 и m/z 223 (в), масс-спектр первого компонента (пальмитиновая кислота) (г), масс-спектр второго компонента (дибутилфталат) (д)

Если есть подозрение о наложении масс-спектров двух соединений с близкими временами выхода, имеет смысл построить масс-хроматограммы по ионам, характеризующимся наиболее интенсивными пиками. Как правило, компоненты выходят не абсолютно одновременно. Пик на хроматограмме по полному ионному току оказывается уширенным (рис. 12.6а), а масс-спектр (рис. 12.6б) представляет собой суперпозицию спектров двух соединений, что приводит к очень низкой степени сходимости при библиотечном поиске. На масс-хроматограммах, построенных по току ионов с m/z 223 и 256, отчетливо видно, что вершины пиков характеристических ионов, принадлежащих двум компонентам, сдвинуты друг относительно друга (рис. 12.6в).

Проведя вычитание масс-спектра, записанного на вершине второго пика, из масс-спектра, записанного на вершине первого, можно получить индивидуальный спектр первого компонента. Вычитание масс-спектра первого пика из масс-спектра второго позволит получить чистый масс-спектр второго компонента. Таким образом, решается вопрос идентификации. Полученные после процедуры вычитания масс-спектры (рис. 12.6г, д) характеризуются хорошим совпадением с библиотечными и позволяют надежно идентифицировать соединения (дибутилфталат и пальмитиновую кислоту).

Для количественного определения этих соединений необходимо просто проинтегрировать площадь пиков на соответствующих масс-хроматограммах (рис. 12.6е). Следует подчеркнуть, что коэлюирование двух компонентов образца при использовании масс-хроматографии никак не мешает ни идентификации соединений, ни их надежному количественному определению. Необходимо лишь выбирать характеристические ионы таких неразделенных соединений таким образом, чтобы их не было в спектрах друг друга. В противном случае интегрирование площадей будет не столь однозначным.

Для увеличения надежности качественного и количественного анализа имеет смысл строить масс-хроматограммы не по одному, а по двум-трем характеристическим для данного соединения ионам. Расчет по любому из этих пиков с учетом фактора отклика (см. ниже) дает правильный результат и позволяет провести усреднение. Профиль всех трех пиков должен быть одинаковым, а соотношение их площадей должно соответствовать интенсивности пиков этих ионов в масс-спектре (рис. 12.7а). Если один из пиков оказывается уширенным (рис. 12.7б) или его интенсивность явно завышена (рис. 12.7в), вероятно, другой компонент смеси, имеющий близкое время удерживания, характеризуется пиком с такой же величиной m/z . В этих случаях (рис. 12.7б, в) расчет надо вести по двум «чистым» пикам, а для повышения надежности выбрать еще один характеристический ион, пик которого на масс-хроматограмме не был бы искажен. Каждый пик на масс-хроматограмме по целочисленной массе дает одно идентификационное очко (см. ниже).

Для хроматомасс-спектрометрического определения приоритетных органических экотоксикантов в воде Агентством по охране окружающей среды США предложены по 10 наиболее интенсивных пиков ионов в спектрах каждого определяемого соединения [1246]. Такой набор позволяет выбрать несколько характеристических ионов в каждом случае, избегая перекрытий с другими компонентами смеси.

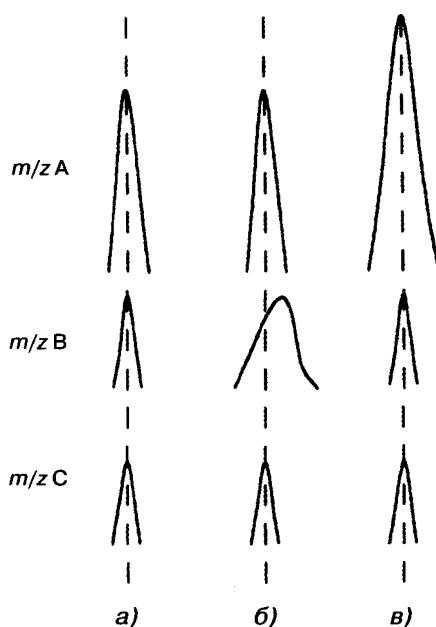


Рис. 12.7. Пример формы пиков характеристических ионов: формы трех характеристических пиков в эталонном образце (а), пик иона В на масс-хроматограмме уширен в связи с присутствием другого компонента смеси с близким временем удерживания (б); интенсивность пика иона А на масс-хроматограмме завышена в связи с присутствием другого компонента смеси с близким временем удерживания (в)

Стремление сделать качественный и количественный анализ более надежным и точным, а также все более широкое применение быстрой хроматомасс-спектрометрии [1247] стимулируют создание все более мощных компьютерных программ по деконволюции плохо разрешенных хроматографических пиков. В программе Биллера — Бимана [1248] компьютер строит масс-хроматограммы для всех целочисленных значений масс сканируемого диапазона. Если несколько масс-хроматограмм одновременно достигают максимума, независимо от полного ионного тока в этом месте хроматограммы регистрируется хроматографический пик. Все ионы, ток которых не достигает максимума в этот момент времени, игнорируются. Так строятся **хроматограммы, разрешенные по массе (mass-resolved chromatograms)**. Реконструированный масс-спектр содержит только пики ионов, проходящие через максимум в конкретный момент времени. В этом спектре отсутствуют наложения со стороны колонного фона, который никогда не достигает максимума, и подавляющее большинство наложений со стороны других компонентов смеси, характеризующихся близкими временами удерживания. Для того чтобы хроматографические пики компонентов были разрешенными, необходимо, чтобы их реальные максимумы отстояли друг от друга хотя бы на три сканирования. Понятно, что увеличение скорости сканирования приводит к успешному разделению компонентов смесей. Именно поэтому переход на времяпролетные анализаторы с записью десятков и даже сотен полных спектров в секунду позволил значительно ускорить хроматомасс-спектрометриче-

ский анализ [64, 1247, 1249]. Метод Биллера — Бимана характеризуется надежными результатами и в случае равных концентраций выходящих рядом компонентов, и в том случае, когда один из них является минорной примесью. Несколько хуже оказываются результаты, когда пики обусловлены структурно близкими соединениями (например, изомерами). Более сложные в математическом отношении методы [1250, 1251] позволяют разделять хроматографические пики компонентов, различающиеся на 1,5 скана.

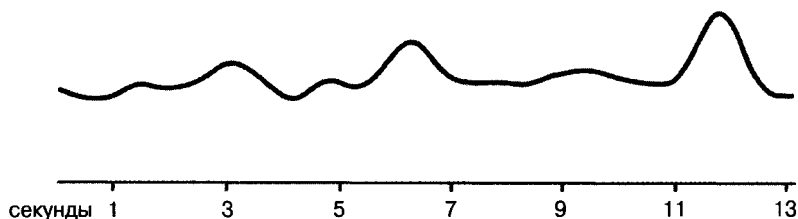


Рис. 12.8. Сколько пиков присутствует на этом 13-секундном участке хроматограммы?

Современные времяпролетные приборы позволяют записывать до 500 полных масс-спектров в секунду. Последующая математическая обработка результатов (деконволюция) дает возможность получить хорошие масс-спектры соединений, выходящих из хроматографа практически одновременно. На рис. 12.8 представлена хроматограмма по полному ионному току смеси органических соединений. Глаз человека может различить на этом 13-секундном отрезке хроматограммы не более 7–8 пиков [1252]. Однако современная процедура математической обработки с использованием масс-хроматографического подхода однозначно показывает, что на этом участке хроматограммы имеются пики 21 соединения (рис. 12.9). При этом программное обеспечение предоставляет список кандидатов библиотечного поиска с максимальными индексами сходимости для каждого из выявленных 21 соединения. Оператору остается лишь проверить правильность библиотечного поиска и выбрать верный результат. В таком варианте не происходит потери информации о компонентах смеси.

Методы становятся еще более продуктивными при использовании масс-спектрометрии высокого разрешения и получения информации о точных массах всех ионов в спектре. Если в алгоритм вводятся еще и правила поиска молекулярного иона и основные законы фрагментации (гл. 3 и 4), эффективность математической обработки хроматомасс-спектрометрических результатов становится очень высокой. Такой подход называется «химической деконволюцией», а весь программный продукт можно рассматривать как третье и четвертое измерения комплексного метода хроматография — масс-спектрометрия — математические расчеты — использование правил органической химии [1253].

Химическая деконволюция основана на выявлении потенциальных молекулярных ионов в масс-спектрах с наложением и на знании правил фрагментации. Такой подход позволяет исключить лишние сигналы из экспериментального масс-спектра и получить чистые спектры компонентов образца, для разделения которых исключительно математические принципы деконволюции не работают.

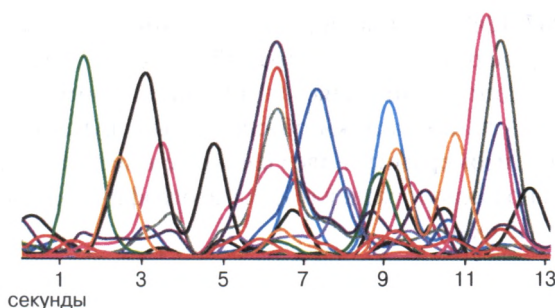


Рис. 12.9. Компьютерная обработка выявляет на представленном 13-секундном участке хроматограммы (рис. 12.8) пики 21 соединения. (С разрешения ЛЕКО Корп.)

Это происходит, когда пики компонентов выходят из колонки хроматографа практически одновременно. Для проведения химической деконволюции очень важны точные массы ионов. Поэтому желаемых результатов удастся добиться при использовании масс-спектрометров с разрешающей способностью более 10,000 для 10% ложбины (разд. 6.3) и точностью определения массы 1 ppm. Метод рассматривает каждый сигнал в масс-спектре как точку в пространстве с параметрами массы, дефекта массы и интенсивности. Точки соединяются во фрагментационные графы в диапазоне химически разумных минимального и максимального дефектов масс с учетом возможных ионов предшественников, ионов-продуктов и элиминируемых нейтральных частиц [1253]. Отправной точкой каждого графа является конкретный молекулярный ион или ион с максимальной массой, не связанный с каким-либо более тяжелым ионом. Сигналы, которые не попадают ни в один из графов, удаляются. Для каждого потенциального молекулярного иона или наиболее тяжелого иона при нестабильности молекулярного генерируется новый (чистый) спектр, содержащий фрагментные ионы с известным составом и интенсивностью. Таким образом, можно получить спектры компонентов в сложном масс-спектре, обусловленном суперпозицией спектров нескольких соединений, а стандартный библиотечный поиск дает возможность идентифицировать эти компоненты с приемлемым индексом сходимости [1253].

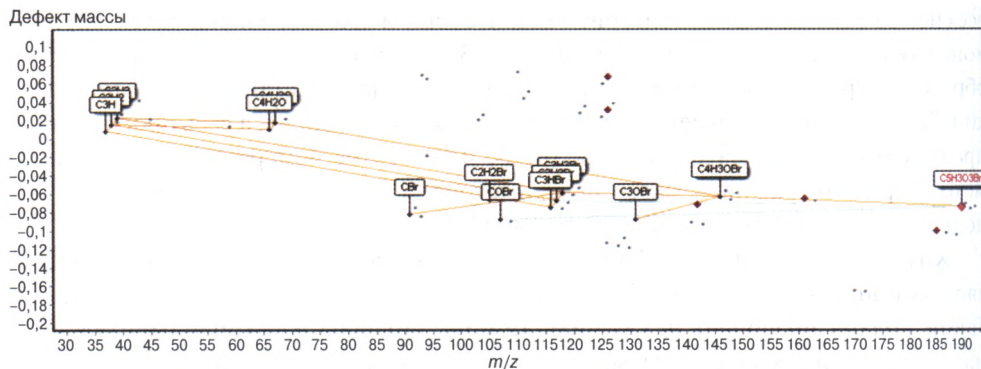


Рис. 12.10. Фрагментационный граф молекулярного иона состава $C_5H_3O_3Br$

На рис. 12.10 представлен фрагментационный граф потенциального молекулярного иона состава $C_5H_3O_3Br$. Все остальные точки на двумерной карте «дефект массы — масса» принадлежат другим соединениям, поскольку соответствующие им ионы не могут образоваться из предшественника $C_5H_3O_3Br$.

Важным моментом количественного анализа является скорость сбора данных. Для максимальной надежности идентификации и количественного определения каждый хроматографический пик должен быть охарактеризован не менее чем 10 масс-спектрами. Эти вопросы подробно рассмотрены в разд. 1.4.2 (рис. 1.9 и 1.10).

Возможность измерения точных масс ионов (масс-спектрометрия высокого разрешения) создает условия для значительного увеличения надежности результатов масс-хроматографии. Прежде всего, это связано с резким увеличением отношения сигнал/шум (S/N). Дело в том, что количество целевых ионов, которые достигают детектора, практически не изменяется (скорее несколько уменьшается) при переходе из режима низкого к режиму высокого разрешения. Однако количество фоновых ионов в этом случае падает на порядки величины, что и приводит к увеличению параметра S/N [1254]. На рис. 12.11 представлены масс-хроматограммы по целочисленной массе и по массе с тремя знаками после запятой ($R = 36\,000$). Очевидно значительное улучшение результата.

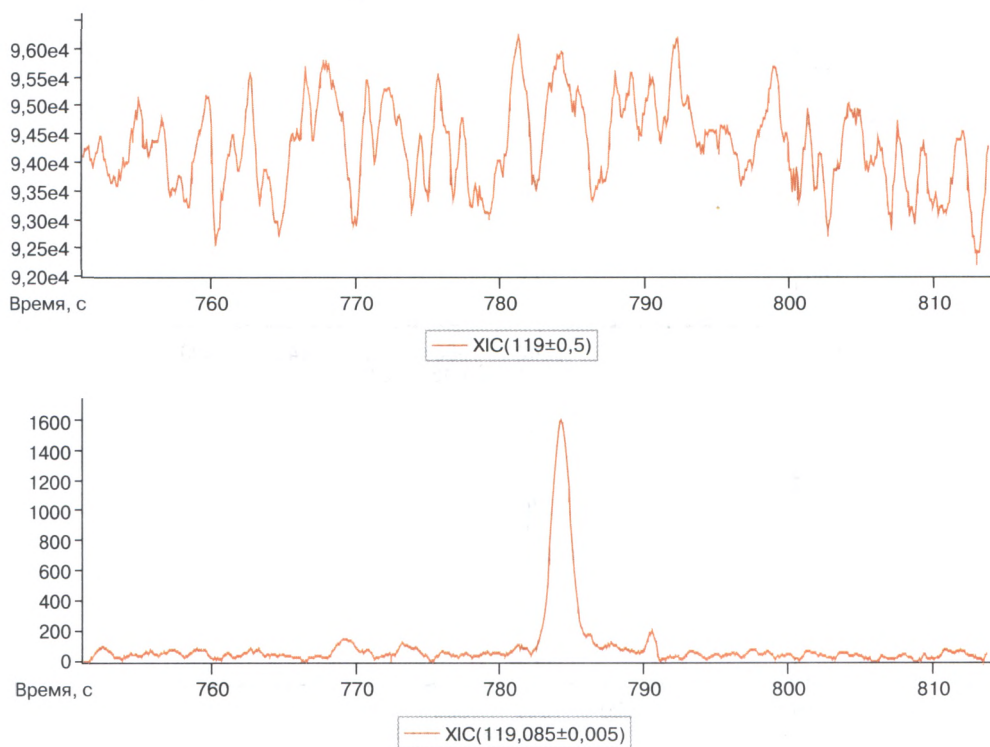


Рис. 12.11. Масс-хроматограммы для поиска кариофеллина в экстракте листьев растения *Turnera* по целочисленной массе (верх) и по массе с тремя знаками после запятой с $R = 36\,000$ (низ)

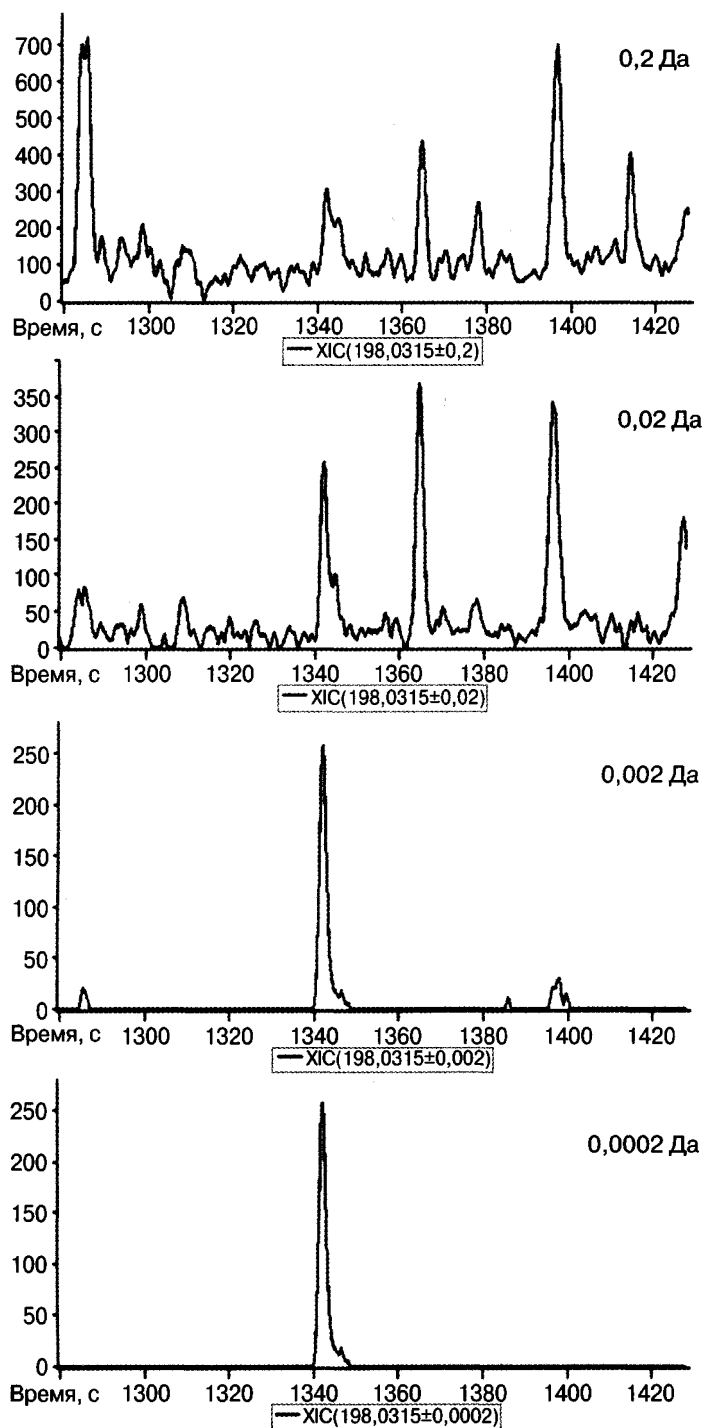


Рис. 12.12. Масс-хроматограммы с разной шириной массового окна в эксперименте по детектированию нафталиндикарбоновой кислоты по иону с точной массой 198,0315

На рис. 12.12 представлены четыре масс-хроматограммы, использованные для детектирования присутствия в образце воды нафталиндикарбоновой кислоты [198]. Отчетливо видно, что с уменьшением окна для выбора массы (с каждым дополнительным десятичным знаком) существенно изменяется число пиков на масс-хроматограмме, и при использовании максимального разрешения (четыре десятичных знака) на масс-хроматограмме остается исключительно пик целевого соединения, по которому легко провести количественное определение. Несколько дополнительных примеров, демонстрирующих преимущества масс-спектрометрии высокого разрешения для детектирования спортивного допинга и пестицидов, представлены в сборнике [7].

Другим преимуществом регистрации ионов с точной массой является существенное сокращение мешающих надежному количественному определению соединений. На рис. 12.13 представлен масс-спектр экстракта образца снега без хроматографического разделения в области целочисленной массы 252 дальтона. Именно эта величина m/z используется для детектирования одного из наиболее значимых экотоксикантов — бенз[а]пирена по многочисленным методикам, включая метод 8270 Агентства по охране окружающей среды США. Однако на рис. 12.13 видно, что в достаточно простом образце присутствует 13 пиков с одной целочисленной массой 252, но разной точной массой [614]. Следовательно, в этом образце присутствуют ионы 13 разных элементных составов с целочисленной массой 252. Необходимо подчеркнуть, что речь идет именно об элементных составах. Каждому из них может соответствовать несколько изомеров, т.е. в данном образце присутствует около 100 соединений, в спектрах ИЭ которых есть ион с m/z 252. Если хоть одно из этих соединений будет иметь время удерживания близкое времени удерживания бенз[а]пирена, произойдет наложение пиков и будет получен ложноположительный результат. В варианте измерения точной массы число мешающих компонентов кардинально сокращается. Для других ионов и других образцов число мешающих компонентов может быть значительно больше [198].

Таким образом, метод масс-хроматографии очень полезен и для качественного, и для количественного анализа. Его достоинством является сохранение всей информации, получаемой при использовании классического варианта хромато-масс-спектрометрии. Тем не менее существуют варианты проведения хроматомасс-спектрометрического анализа, когда чувствительность эксперимента увеличивается на один-два порядка.

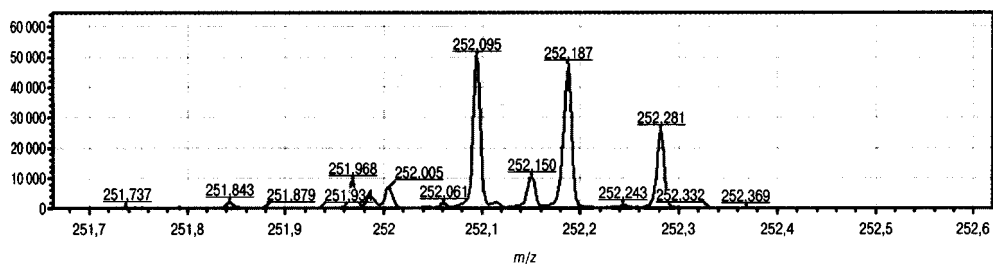


Рис. 12.13. Масс-спектр экстракта образца снега дихлорметаном в области m/z 252 без хроматографического разделения

12.2. Масс-фрагментография, мониторинг заданных ионов

Иногда задачей анализа является количественное определение конкретных ультрамикроскопических компонентов смеси. Для повышения чувствительности метода можно использовать технику масс-фрагментографии (мониторинг заданных ионов). В англоязычной литературе используется термин Selected Ion Monitoring (SIM). В этом случае масс-спектрометр не сканирует весь диапазон масс, а жестко настраивается на регистрацию ионов с заданными значениями m/z . Как правило, это именно те характеристические ионы, которые выбираются и в варианте масс-хроматографии. В чем причина улучшенных пределов обнаружения в таком эксперименте? Представим себе, что в обычном сканирующем режиме скорость развертки спектра от m/z 50 до m/z 550 составляет 1 секунду. Следовательно, за 1 секунду прибор должен зарегистрировать по очереди токи ионов 500 различных масс. Даже без учета времени, которое требуется для возвращения с верхней границы масс на нижнюю до начала нового сканирования, прибор фиксирует конкретную целочисленную массу лишь 1/500 долю секунды. Поскольку ионы генерируются непрерывно, это означает, что детектора достигает 0,2% ионов каждого типа. Подавляющую часть ионов, образовавшихся в ионном источнике, сканирующий масс-спектрометр просто не может зарегистрировать, так как «занят» определением других ионов. Понятно, что, если вместо сканирования настроить прибор на регистрацию ионов только с определенным значением m/z , все 100% ионов этого типа будут достигать детектора. Это равносильно увеличению чувствительности в 500 раз. Попеременное пропускание через анализатор ионов с двумя разными величинами m/z увеличит чувствительность в 250 раз, пяти ионов – в 100 раз. В любом случае метод масс-фрагментографии дает по сравнению с классическим вариантом выигрыш в чувствительности на два порядка. Метод хорошо зарекомендовал себя для анализов суперэкоотоксикантов (полихлорированных бифенилов, дибензодиоксинов и дибензофуранов). На рис. 12.14 представлены масс-фрагментограммы анализа содержания в воде фенантрена, пердеитерированного фенантрена (внутренний стандарт) и изомерных гексахлорциклогексанов, полученные при мониторинге ионов с тремя значениями m/z .

Как правило, в одной пробе требуется определить несколько соединений. Однако одновременный мониторинг большого числа характеристических ионов приводит к закономерному уменьшению чувствительности. Поэтому одновременно регистрируется не более двух-четырех ионов, но, поскольку время выхода искомого соединения известно, можно вести мониторинг в течение узкого интервала времени, когда из колонки выходит целевой аналит, а затем переключаться на регистрацию другого набора из двух-четырех ионов, характерных для соединений, выходящих из колонки позже. Такой последовательный процесс регистрации искомого соединения программируется и может осуществляться в автоматическом режиме.

К сожалению, выигрыш в чувствительности сопровождается значительным проигрышем в информативности и надежности метода. Во-первых, полностью теряется информация о других компонентах смеси. Конечно, если исследователя интересует исключительно одно конкретное соединение, этим можно пренебречь,

однако зачастую можно пропустить что-то важное. Во-вторых, существует определенная вероятность неправильно измерить концентрацию или вообще неверно определить присутствие в смеси какого-нибудь вещества. Поскольку весь диапазон масс не сканируется, полный масс-спектр соединения не регистрируется, а именно масс-спектр является уникальной характеристикой вещества. В режиме масс-фрагментографии исследователь имеет время выхода соединения и интенсивность пика одного или нескольких характеристических для этого соединения ионов. Это, конечно, уже лучше, чем просто хроматография, когда время выхода является единственным параметром. Однако в реальной смеси близкие времена выхода могут иметь несколько соединений, причем с меньшей, но не равной нулю вероятностью эти соединения могут иметь характеристические пики с одной и той же величиной m/z . В этом случае мы получим искаженный пик искомого иона. В качестве примера можно вновь обратиться к рис. 12.7б, в. В худшем варианте определяемое соединение может отсутствовать в пробе, но какое-либо вещество с близким временем выхода и образующее при фрагментации ионы с такими же величинами m/z приведет к появлению пиков на масс-фрагментограмме. Поскольку метод мониторинга заданных ионов используется, как правило, для определения действительно опасных соединений, цена такой ошибки может быть велика.

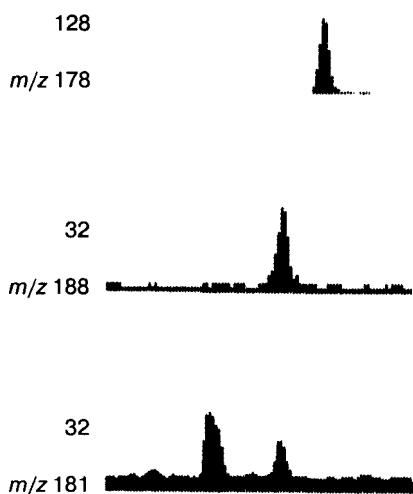


Рис. 12.14. Масс-фрагментограммы дихлорметанового экстракта пробы природной воды. m/z 178 – фенантрен, m/z 188 – пердеутерированный фенантрен (внутренний стандарт), m/z 181 – гексахлорциклогексаны (α -, β - и γ -изомеры). Число над значением m/z означает ранг чувствительности детектора. Площадь пика с учетом ранга чувствительности прямо пропорциональна количеству образца в пробе



Рис. 12.15. Масс-фрагментограмма низкого $R = 500$, m/z 74 (а) и высокого $R = 5000$, m/z 74,0480 разрешения (б) образца, содержащего диметилнитрозамин

Повысить надежность метода можно при использовании масс-фрагментографии высокого разрешения. В этом случае актуальны все выкладки, представленные в разд. 12.1 при обсуждении масс-хроматографии высокого разрешения. Например, для детектирования диметилнитрозамина используют регистрацию иона с массой 74,0480 дальтона. Хотя все равно остается шанс регистрации ложного сигнала, вероятность такого случая ничтожна, поскольку селективность очень высока. На рис. 12.15а, б представлены масс-фрагментограммы низкого и высокого разрешения образца, содержащего диметилнитрозамин. Комментарии преимущества масс-фрагментографии высокого разрешения излишни.

12.3. Мониторинг заданных реакций

Еще одним улучшенным вариантом масс-фрагментографии для количественного определения целевых аналитов является использование тандемной масс-спектрометрии с регистрацией выбранных процессов фрагментации. Этот метод называется мониторингом заданных реакций (**MЗР, selected reaction monitoring, SRM** или **multiple reaction monitoring, MRM**). Он заключается в регистрации фрагментации выбранного иона-предшественника (зачастую молекулярного иона) с образованием известного иона-продукта. Этот вариант значительно более селективен, чем одновременное детектирование двух характеристических ионов, поскольку в этом случае второй характеристический ион (фрагментный) образуется именно из первого характеристического иона (предшественника). Даже если в образце будет присутствовать соединение с тем же временем удерживания, что и у целевого аналита, а в его спектре будет присутствовать ион с точным значением массы второго характеристического иона, оно не мешает правильному количественному определению. Прибор увидит только то количество фрагментных ионов с одинаковой массой, которое образуется при фрагментации иона-предшественника. Метод очень селективен и с учетом времени выхода аналита позволяет получить надежные результаты качественного и количественного анализа даже при работе с самыми сложными матрицами. Понятно, что метод становится еще надежнее при использовании масс-спектрометрии высокого разрешения и регистрации точной массы ионов-предшественников и ионов-продуктов.

Для дополнительной надежности можно регистрировать несколько реакций фрагментации. Одним из самых надежных и широко используемых в экологических и биомедицинских исследованиях методом хроматомасс-спектрометрического анализа является одновременная регистрация двух реакций фрагментации иона-предшественника с образованием наиболее интенсивного иона-продукта для количественного определения и второго по интенсивности — для подтверждения идентификации целевого аналита (рис. 12.16).

Используя информацию о времени удерживания соединения, можно создать программу, которая за один ввод пробы в прибор будет регистрировать несколько сотен целевых аналитов. Рисунок 12.17 иллюстрирует результат автоматизированного количественного определения 700 пестицидов в образце методом МЗР. На рисунке показаны все пики, хотя можно выводить на экран 1, 10, 50 и т.д. пиков. Важно, что для всех 700 соединений в таком автоматизированном анализе будут

получены надежные результаты. Чувствительность, селективность да и скорость (12 минут на все соединения) метода при этом очень высоки. Именно методом МЗР проводят количественное определение биомаркеров в биомедицинских исследованиях, пестицидов и других экотоксикантов в образцах объектов окружающей среды, проводят допинг-контроль и т.д.

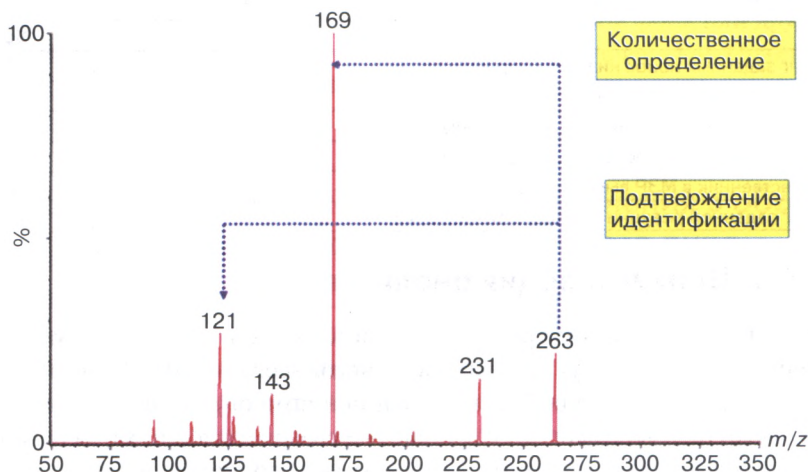


Рис. 12.16. Выбор ионов-продуктов для количественного определения и подтверждения идентификации методом мониторинга заданных реакций. Ион-предшественник – m/z 263, ионы продукты – m/z 169 и 121

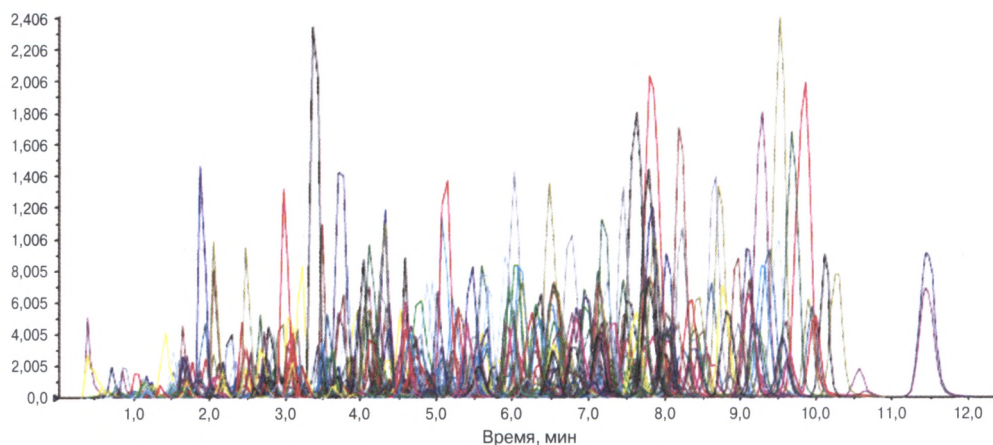


Рис. 12.17. Результат автоматизированного количественного определения 700 пестицидов в образце методом МЗР

В 2002 году Еврокомиссия опубликовала резолюцию (2002/657/ЕС) об аналитических методах и интерпретации результатов определения остаточных количеств ветеринарных препаратов методами хроматомасс-спектрометрии. Запрещенный препарат считается идентифицированным, если его время удерживания находится в приемлемых пределах, а метод его детектирования характеризуется оценкой не ниже

4 идентификационных баллов. Таблица 12.1 демонстрирует баллы в зависимости от использованного метода. Сейчас этот подход используется для оценки достоверности идентификации самых разнообразных аналитов в самых разнообразных образцах методом масс-спектрометрии.

Таблица 12.1. Количество идентификационных баллов, присваиваемых за регистрацию одного характеристического иона методами масс-фрагментографии

МС метод	Балл
Мониторинг заданных ионов низкого разрешения	1,0
Ион-предшественник в МЗР низкого разрешения	1,0
Мониторинг заданной реакции низкого разрешения	1,5
Мониторинг заданных ионов высокого разрешения	2,0
Ион-предшественник в МЗР высокого разрешения	2,0
Мониторинг заданной реакции высокого разрешения	2,5

12.4. Дериватизация аналитов

Поскольку хроматомасс-спектрометрия является комбинированным методом, недостатки одного из них могут ухудшать результаты всего анализа. В частности, и для ГХ, и для ЖХ существуют проблемы с соединениями определенных классов. Они могут не проходить через колонку вообще, не разделяться или характеризоваться широкими пиками. Можно работать с разными колонками, но наиболее эффективным подходом является дериватизация.

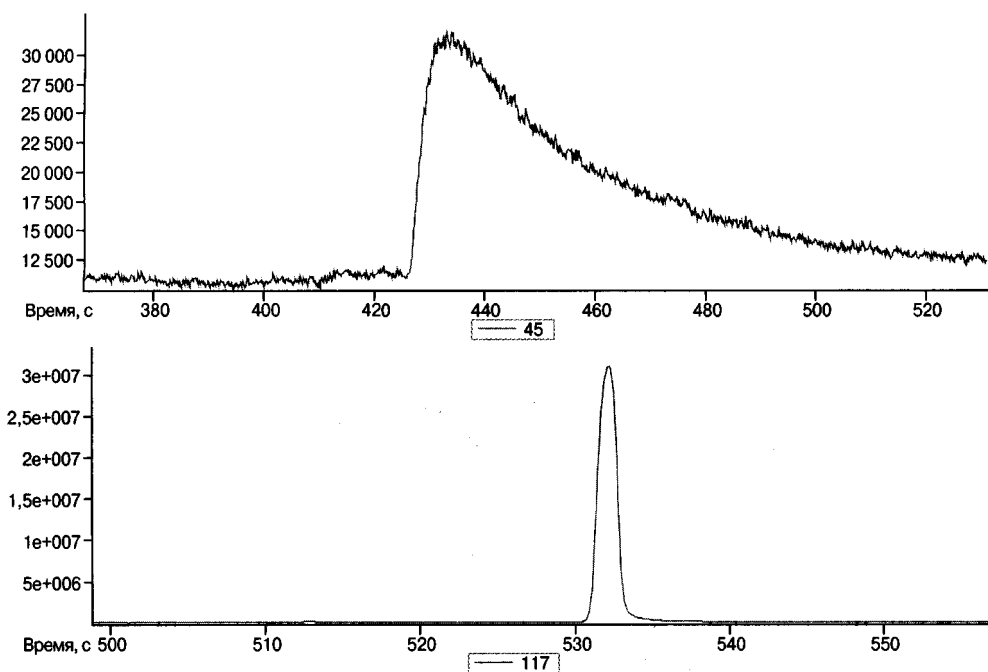


Рис. 12.18. Масс-хроматограммы по току наиболее интенсивных ионов в спектрах триэтилглицоля (верх, m/z 45) и его бис-триметилсилильного производного (низ, m/z 117)

Пример улучшения результатов детектирования триэтиленгликоля представлен на рис. 12.18. После дериватизации (триметилсилилирование) наблюдается 100-кратное увеличение высоты хроматографического пика с одновременным уменьшением его ширины со 100 до 3 секунд. Кроме того, для количественного определения используется характеристический ион с более высокой величиной m/z (m/z 117 вместо m/z 45). Это всегда предпочтительнее, поскольку с увеличением величины m/z уменьшается вероятность наложения ионов фона или других компонентов. Выигрыш в селективности и чувствительности очевиден. Практическую информацию о самых разных дериватизирующих агентах для масс-спектрометрии можно найти в книге В. Заикина и Дж. Халкета [974].

12.5. Установление количества соединения в образце по площади хроматографического пика

На рис. 12.19 представлена хроматограмма по полному ионному току анализируемого образца. Смесь достаточно простая. Все вещества легко идентифицируются, а программное обеспечение автоматически проводит интегрирование пиков и выдает относительные количества каждого из идентифицированных компонентов (табл. 12.2). Очень важно отдавать себе отчет, что это не количественное определение, а в лучшем случае очень приблизительная оценка содержания аналитов в образце.

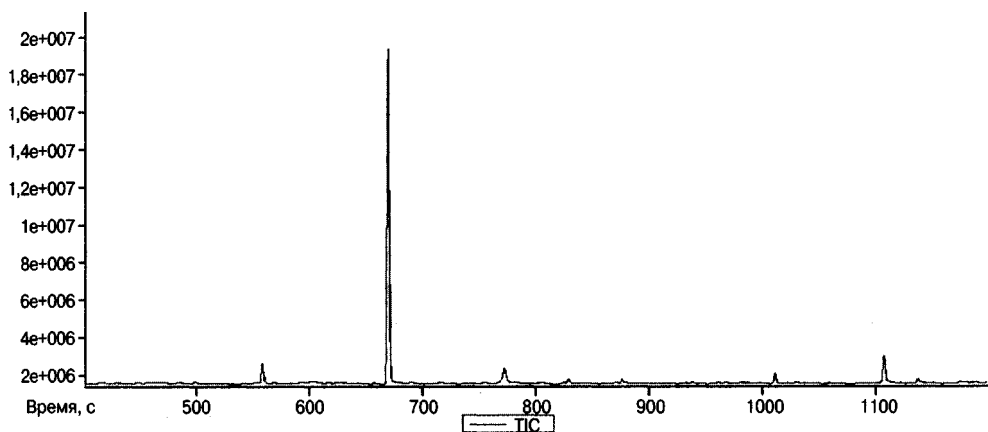


Рис. 12.19. Хроматограмма по полному ионному току анализируемого образца

Таблица 12.2. Идентифицированные соединения, их времена удерживания и относительные площади хроматографических пиков

№ п/п	Название	Время удерживания, с	Площадь, %
1	Нафталин -d8	558,741	4,45
2	1-Метилнафталин	669,841	78,07
3	4-(1-гидроперокси-2,2-диметил-6-метиленинцклогексил) пентен-3-он-2	772,641	3,89
4	1-Хлорэтилнафталин	828,841	0,94
5	Диэтилфталат	876,141	0,97

Таблица 12.2 (окончание)

№ п/п	Название	Время удерживания, с	Площадь, %
6	Антрацен-d10	1010,94	3,01
7	Бутилоктилфталат	1107,74	7,26
8	Изопропилпальмитат	1138,04	2,12
	Всего		100

Следует принимать во внимание, что простое интегрирование площади хроматографического пика (любого типа) соединения не означает автоматического установления его концентрации в анализируемом образце. Площадь пика зависит от нескольких параметров.

- 1. Сечение ионизации.** Любое органическое вещество характеризуется своей уникальной величиной сечения ионизации, т.е. количеством ионов, образовавшихся из молекул в условиях эксперимента. В разд. 2.1 было сказано, что в условиях ИЭ примерно 1 из 10 000 молекул ионизируется. Эта величина зависит от структуры соединения и может изменяться от вещества к веществу в широком диапазоне. Эффективность ионизации методом ИЭР зависит от еще большего числа параметров, может подавляться для одних соединений в присутствии других. Таким образом, одинаковые навески двух разных чистых соединений после ионизации приведут к возникновению разного количества ионов. Как следствие, площади пиков на хроматограмме в полном ионном токе, на масс-хроматограммах и масс-фрагментограммах будут существенно отличаться.
- 2. Дискриминация по массе.** Анализатор масс любого типа пропускает ионы с разными значениями m/z по-разному. В результате 100 ионов с m/z 56 дадут пик с интенсивностью, отличной от пика 100 ионов с m/z 326. Этот процесс мало сказывается на интенсивности пиков на хроматограммах по полному ионному току, но важен для масс-хроматографии и масс-фрагментографии. Если два соединения имеют существенно отличающиеся характеристические массы, то дискриминация по массе скажется и на интенсивностях хроматографических пиков по полному ионному току.
- 3. Доля тока характеристического иона в полном ионном токе** зависит от природы соединения. Например, доля характеристического иона бенз[а]пирена с m/z 252 в полном ионном токе этого соединения составляет 52%, тогда как доля характеристического иона 2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксина с m/z 324 – менее 10%.

Эти сложности заставляют использовать для количественного масс-спектрометрического анализа специальные стандарты. Математическая зависимость, связывающая площади пиков стандарта и искомого вещества, а также известное количество используемого стандарта, позволяет проводить количественное определение с высокой точностью.

12.6. Метод внешнего стандарта

Метод заключается в приготовлении стандартного раствора соединения, которое требуется проанализировать. Известный объем этого раствора вводится в прибор. Измеряется интенсивность сигнала, т.е. устанавливается зависимость между коли-

чеством введенного соединения и интенсивностью его сигнала. Затем, не изменяя никаких условий эксперимента, в прибор вводится такой же объем анализируемой пробы, и вновь измеряется интенсивность сигнала анализируемого соединения. В диапазоне линейности зависимости «количество образца — интенсивность регистрируемого сигнала» рассчитать количество анализируемого вещества в пробе можно, используя простейшую формулу:

$$M = kS, \quad (12.1)$$

где M — количество определяемого соединения в объеме, введенном в прибор, S — интенсивность сигнала определяемого соединения, k — фактор отклика, равный отношению количества соединения, введенного в прибор из стандартного раствора к интенсивности его сигнала ($M_{\text{ст}}/S_{\text{ст}}$).

Для ионизации электронами зависимость **количество образца — интенсивность регистрируемого сигнала** сохраняет линейность в широком диапазоне (до шести порядков). В случае других методов ионизации диапазон линейности уже в связи с протеканием в источнике ионов побочных процессов. Поэтому для проведения количественного анализа требуется построение калибровочного графика. Для этого в прибор вводятся одинаковые объемы стандартных растворов, содержащих разные известные количества анализируемого соединения. На основании интенсивностей полученных сигналов строится график. В идеале это должна быть прямая, продолжение которой должно пересечь точку начала координат.

К сожалению, метод внешнего стандарта зачастую приводит к значительным ошибкам. Это связано с невозможностью абсолютного совпадения объемов пробы, вводимой в прибор, а также с изменениями работы масс-спектрометра в течение проведения калибровок и анализа. Небольшие изменения, связанные с величиной напряжения на различных линзах, с изменением потока газа-носителя или с делением потока в сплиттерном режиме, с давлением в источнике ионов, делают два последовательных анализа не абсолютно идентичными. Эти различия возрастают при проведении анализа большой серии образцов в течение дня. В связи с этим общепринятым является предпочтительнее использование метода внутреннего стандарта.

12.7. Метод внутреннего стандарта

В этом случае интенсивности сигналов анализируемых соединений сравниваются с сигналом стандартного вещества, которое добавляется непосредственно в образец, вводимый в прибор. Такой стандарт может использоваться для одновременного определения многих соединений, присутствующих в анализируемом образце.

Поскольку внутренний стандарт добавляется непосредственно в анализируемую пробу, все перечисленные выше недостатки метода внешнего стандарта устраняются. В качестве внутреннего стандарта может использоваться любое вещество, важно только, чтобы оно было чистым, не реагировало с растворителем и другими компонентами смеси и отсутствовало изначально в анализируемом образце. Широкое распространение, особенно для анализа объектов окружающей среды, получили соединения, меченные изотопами D, ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O и т.д.

Анализ начинается с последовательного введения в прибор серии стандартных растворов, с точно известным содержанием внутреннего стандарта и целевых соединений, которые планируется определять в дальнейшем. Количество внутреннего стандарта в этих растворах, как правило, одно и то же, хотя это и не обязательно. Его концентрация должна попадать в середину диапазона, потенциальных концентраций целевых аналитов в пробах. Концентрации аналитов в стандартных растворах должны перекрывать весь диапазон их предполагаемых концентраций в пробах. Обычно концентрационный диапазон составляет два-три порядка. В этом диапазоне зависимость регистрируемого отклика от концентрации линейна, т.е. фактор отклика, рассчитанный по формуле (12.2), должен быть постоянным.

$$RF = \frac{S_{is} \times M_x}{S_x \times M_{is}}, \quad (12.2)$$

где RF — response factor, фактор отклика, M — количество соединения в данном стандартном растворе, S — интенсивность сигнала соединения; индекс is относится к внутреннему стандарту, а индекс x — к определяемому соединению.

Величина фактора отклика может изменяться в широком диапазоне в зависимости от природы определяемого соединения и внутреннего стандарта. На эту величину прежде всего влияют три фактора, рассмотренные в разд. 12.4. Для получения достоверных результатов фактор отклика должен быть как можно ближе к единице. Если фактор отклика составляет менее 0,1 или более 10, для анализа данного соединения желательно подобрать другой внутренний стандарт.

После завершения работ со стандартными растворами приступают к анализу образцов. Для этого в образец добавляется точная навеска внутреннего стандарта. Концентрация внутреннего стандарта должна примерно соответствовать величине, использованной для определения факторов отклика. Такой вариант количественного анализа можно использовать в любой из перечисленных выше модификаций: хроматограмма по полному ионному току, масс-хроматография или масс-фрагментография.

Расчет количества анализируемого вещества в пробе осуществляется по формуле:

$$M = RF \times \frac{S \times M_{is}}{S_{is}}, \quad (12.3)$$

где M — количество анализируемого соединения в пробе, S — площадь пика анализируемого соединения, RF — фактор отклика, M_{is} — количество введенного внутреннего стандарта, S_{is} — площадь пика анализируемого соединения. Для измерения площадей пиков можно использовать масс-хроматограмму, масс-фрагментограмму или хроматограмму по полному ионному току.

Существуют разные варианты того, в какой момент лучше добавлять внутренний стандарт к пробе. Эту процедуру можно осуществлять в любой момент от отбора пробы до введения ее в прибор. Если внутренний стандарт по своей природе очень близок определяемым соединениям, лучше добавлять его как можно раньше. В этом случае на всех стадиях пробоподготовки (экстракция, очистка, концентрирование)

его потери будут адекватны потерям анализируемых компонентов, и конечный результат будет точнее соответствовать реальной концентрации вещества в пробе. Однако, если свойства внутреннего стандарта существенно отличны (например, он хуже экстрагируется используемым растворителем или его летучесть значительно выше, чем у определяемых компонентов), лучше добавлять его на поздних стадиях пробоподготовки, например непосредственно перед вводом образца в инжектор. В некоторых методиках количественного анализа, помимо внутреннего стандарта, который добавляется в пробу только перед вводом вещества в масс-спектрометр, используют дополнительное вещество, называемое **суррогатом**. Его добавляют перед началом любых операций пробоподготовки, а его химическая природа должна быть близка природе определяемых компонентов. В этом случае внутренний стандарт не теряется в процессе работы с пробой и позволяет провести точное количественное определение соединений в готовой для ввода в прибор пробе. Оценить же потери веществ при пробоподготовке можно исходя из разницы между введенным и измеренным количеством суррата.

Как уже упоминалось, в качестве внутренних стандартов удобно использовать соединения, аналогичные по своей природе искомым, но содержащие стабильные изотопы. Во избежание перекрытия с изотопными пиками немеченых соединений, предпочтительно работать с полидейтерированными соединениями или с соединениями с большим количеством изотопов ^{13}C . Например, отличными стандартами являются пердейтерированные полициклические ароматические углеводороды. Они инертны, достаточно стабильны, хорошо экстрагируются, имеют высокую величину сечения ионизации и интенсивность пика молекулярного иона около 50% в полном ионном токе. Это позволяет использовать их для количественного определения самых разнообразных соединений (например, приоритетных загрязняющих соединений в объектах окружающей среды).

12.8. Метод изотопного разбавления

Предельным вариантом метода внутренних стандартов является анализ, когда каждому определяемому компоненту соответствует свой внутренний стандарт, представляющий собой его изотопный аналог, например пердейтерированное производное. Такие соединения обладают практически идентичными физико-химическими свойствами, тогда как величины m/z их характеристических ионов различаются. Факторы отклика для таких стандартов будут равны единице. Добавление такого стандарта до начала всех процедур пробоподготовки позволит не только с минимальной погрешностью вычислить количество искомого вещества в готовой пробе, но и точно компенсировав все потери, неизбежные в процессе пробоподготовки, надежно установить концентрацию вещества в исходной пробе. Для конечного расчета используется формула (12.3), причем фактор отклика принимается равным единице. Безусловно, такой подход является самым эффективным и предпочтительным для количественного хроматомасс-спектрометрического анализа. Единственным серьезным недостатком является резкое удорожание анализа в таком режиме. Стоимость меченых соединений очень высока и может достигать

сотен и тысяч долларов за миллиграмм (например, для полихлорированных дибензодиоксинов, в которых все атомы углерода являются изотопами ^{13}C).

12.9. Метод добавок

Количественный хроматомасс-спектрометрический анализ можно проводить, используя классический метод аналитической химии. Для осуществления метода добавок используют добавление к пробе известного количества анализируемого вещества. Вновь, как и в случае метода внутреннего стандарта, эту процедуру можно осуществлять на любой стадии пробоподготовки. Однако предпочтительным вариантом является добавление этих веществ сразу после пробоотбора, поскольку потери вещества во время хранения пробы и пробоподготовки можно будет оценить по результатам анализа.

Простейшим вариантом метода является деление пробы на две части и добавление в одну из них известного количества анализируемых соединений. Добавляется в 2–5 раз больше (по массе) соединений, чем их ожидаемое количество в пробе. Поскольку часто нельзя заранее оценить уровни анализируемых соединений в реальной пробе, можно провести пробоподготовку и анализ первой порции с добавлением внутреннего стандарта. Затем, грубо оценив концентрации искомым компонентов, добавить во вторую порцию нужные соединения в нужных количествах (в 2–5 раза больше, чем было определено в первой порции пробы). Кстати, внутренний стандарт можно не использовать, а приблизительно оценить уровни компонентов в пробе по величине сигнала (фактически метод внешнего стандарта). Можно осуществить добавку непосредственно в готовую пробу из первой порции и провести ее повторный анализ. Однако в этом случае нельзя оценить потери веществ в результате пробоподготовки.

После анализа второй порции вещества оператор имеет два набора результатов. Обозначим концентрацию искомого вещества в пробе за X . Пусть площадь проинтегрированного пика, обусловленного этим компонентом, будет S . Тогда для второй порции пробы содержание искомого компонента будет $X + A$, а площадь соответствующего пика S_1 . Решая пропорцию, получаем:

$$X = \frac{SA}{S_1 - S}. \quad (12.4)$$

ГЛАВА 13

ОБОБЩЕННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 13.1. На рис. 13.1 представлен масс-спектр ИЭ органического соединения. Установите, какому из перечисленных ниже соединений принадлежит этот спектр: бензойная кислота, орто-этилфенол, орто-метокситолуол, пара-этилфенол, фенилэтиловый эфир, пара-толилметилэфир, 2-фенилэтиловый спирт, 1-фенилэтиловый спирт, 2,4-диметилфенол, 2,6-диметилфенол.

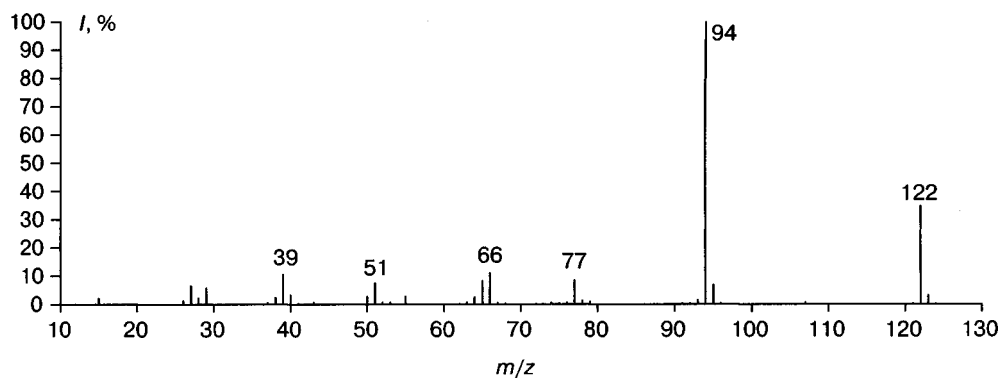
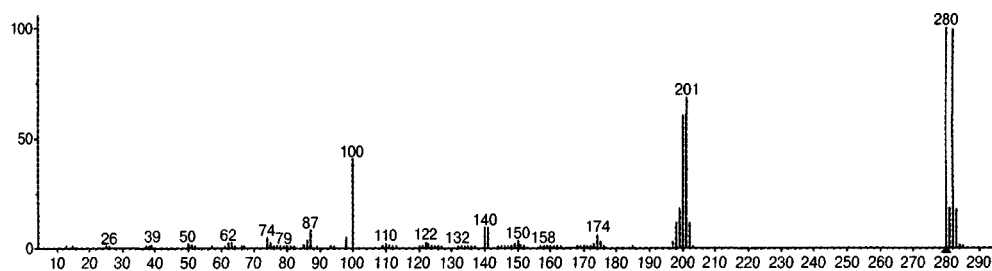


Рис. 13.1

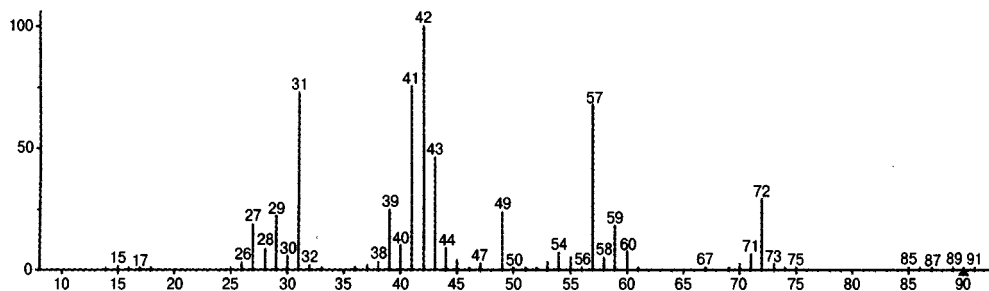
Задача 13.2. Идентифицируйте соединене по спектрам ИЭ (рис. 13.2). Объясните образование иона с m/z 100.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
280	1000	281	177	282	994	283	173
284	14	285	1				

Рис. 13.2

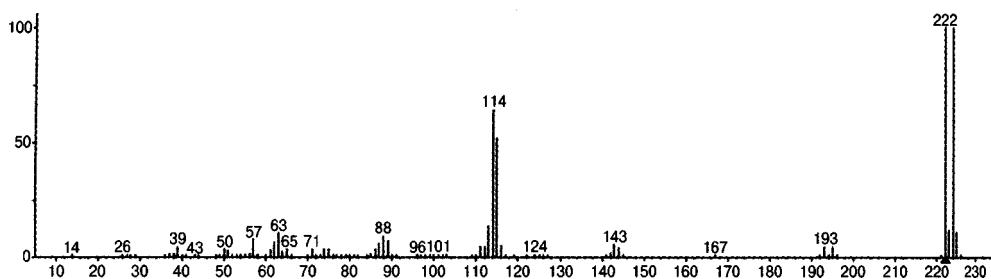
Задача 13.3. Идентифицируйте соединение состава $C_4H_{10}O_2$ по его спектру электронной ионизации (рис. 13.3).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
15	15	26	26	27	181	28	85
29	219	30	55	31	724	32	18
37	17	38	30	39	243	40	97
41	750	42	1000	43	461	44	90
45	38	47	25	49	233	50	10
53	27	54	69	55	48	57	677
58	47	59	177	60	71	70	22
71	64	72	290	73	22	90	1

Рис. 13.3

Задача 13.4. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.4).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
37	11	38	15	39	41	50	31
51	26	56	11	47	76	58	9
61	26	62	65	63	105	64	24
65	32	71	31	74	34	75	31
85	13	86	35	87	56	88	90
89	70	111	45	112	44	113	134
114	639	115	517	116	50	143	51
144	36	193	45	195	43	222	997
223	116	224	1000	225	110	226	7

Рис. 13.4

Задача 13.5. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 13.5).

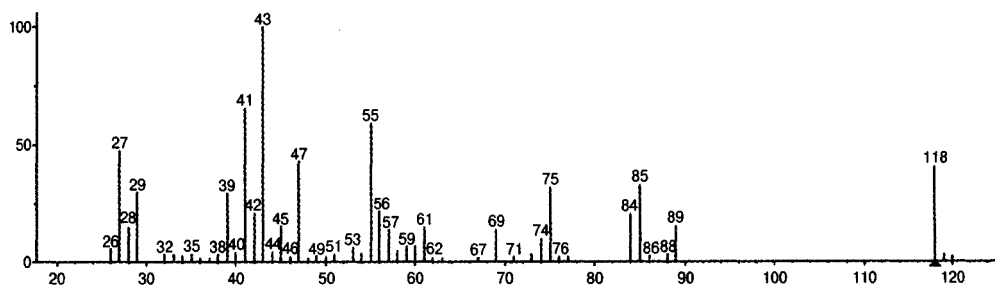


Рис. 13.5

Задача 13.6. Идентифицируйте изомерные метилциклогексанола по спектрам ИЭ (рис. 13.6).

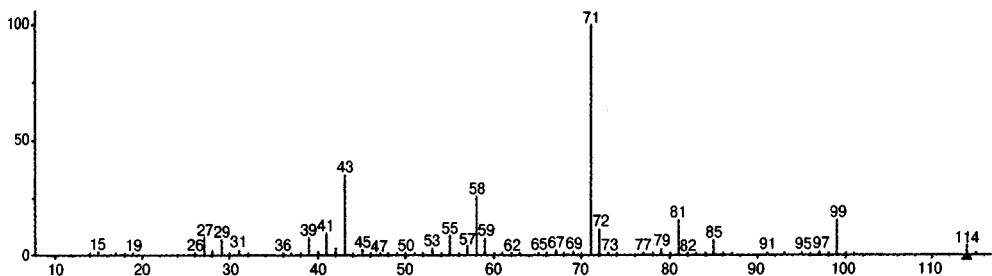
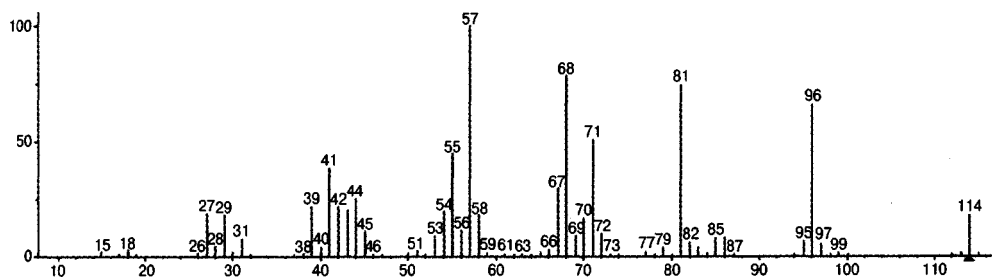


Рис. 13.6

Задача 13.7. Идентифицируйте третичный амин по спектру ИЭ (рис. 13.7).

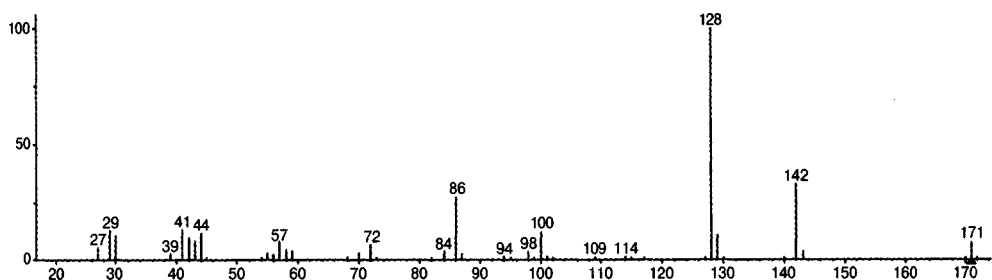


Рис. 13.7

Задача 13.8. Идентифицируйте монозамещенный бензол по его спектру ИЭ (рис. 13.8).

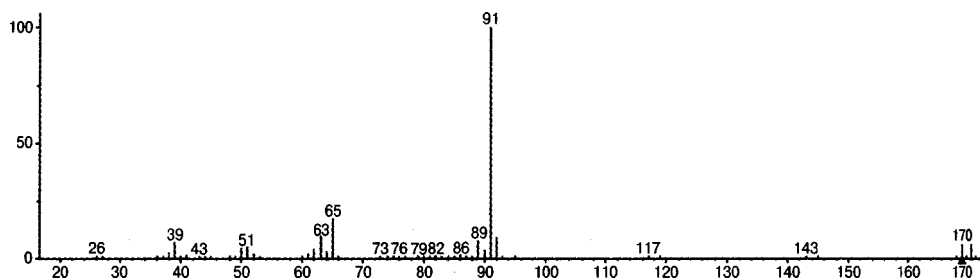
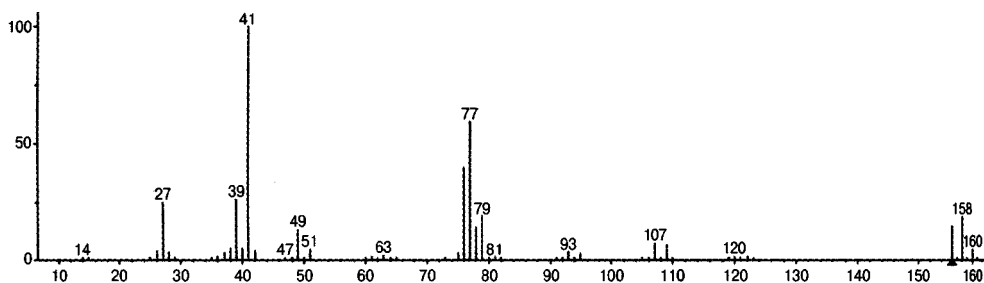


Рис. 13.8

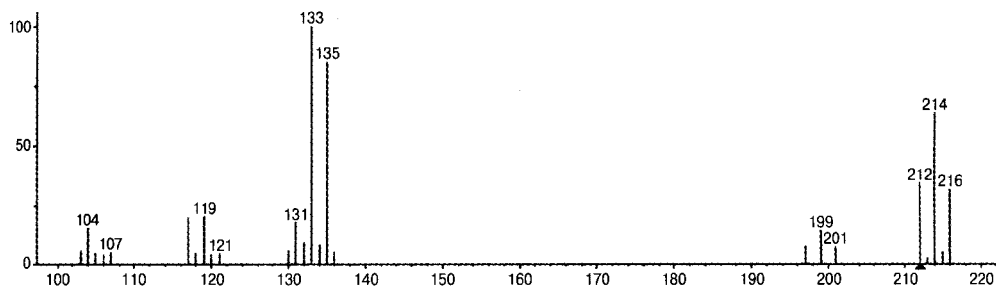
Задача 13.9. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.9).



<i>m/z</i>	<i>I</i> , %	<i>m/z</i>	<i>I</i> , %
26	39	76	394
27	245	77	589
28	33	78	136
36	12	79	186
37	26	81	15
38	50	93	32
39	261	95	28
40	50	107	66
41	1000	109	62
42	38	120	13
49	128	122	12
51	42	156	144
61	11	158	185
63	19	160	43
75	26	161	1

Рис. 13.9

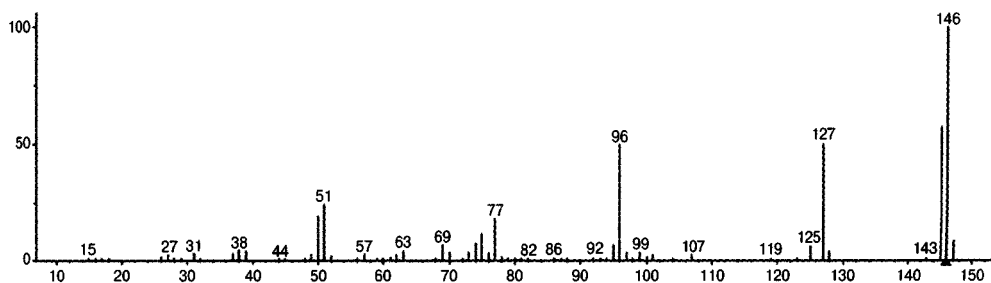
Задача 13.10. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 13.10).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
103	52	104	146	105	41	106	37
107	50	117	193	118	41	119	196
120	39	121	43	130	54	131	174
132	87	133	1000	134	76	135	848
136	46	197	72	199	139	201	70
212	337	213	24	214	635	215	46
216	310	217	22				

Рис. 13.10

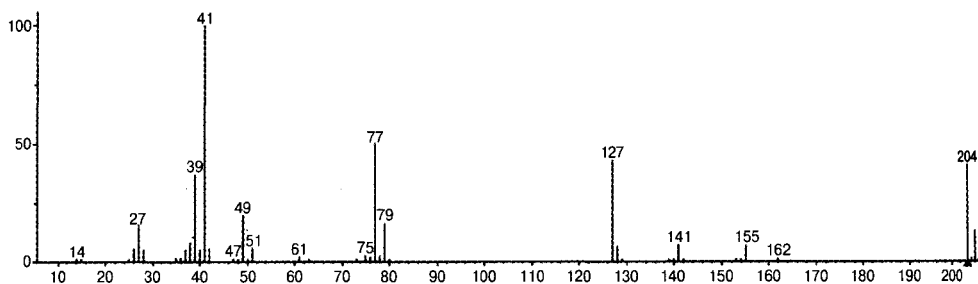
Задача 13.11. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 13.11).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	15	27	22	31	28	31	28
37	28	38	42	39	40	49	23
50	187	51	239	52	20	57	26
61	12	62	22	63	39	68	10
69	82	70	32	73	33	74	73
75	112	76	33	77	179	78	13
81	10	88	10	95	63	96	497
97	32	99	31	100	12	101	23
107	21	119	10	125	59	127	495
128	40	145	570	146	1000	147	82
148	25						

Рис. 13.11

Задача 13.12. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 13.12).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	52	27	154	28	47	35	14
36	11	37	48	38	77	39	363
40	46	41	1000	42	54	48	10
49	193	50	2	51	60	61	17
75	21	76	18	77	498	78	23
79	158	127	424	128	65	141	70
155	62	204	406	205	13	206	128
207	4						

Рис. 13.12

Задача 13.13. Идентифицируйте изомерные соединения по спектрам ИЭ (рис. 13.13).

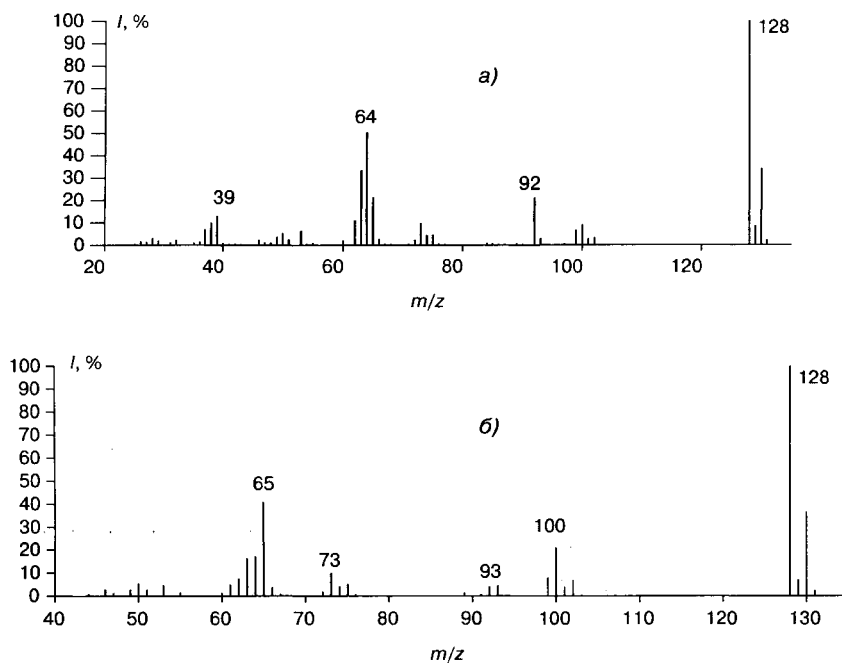
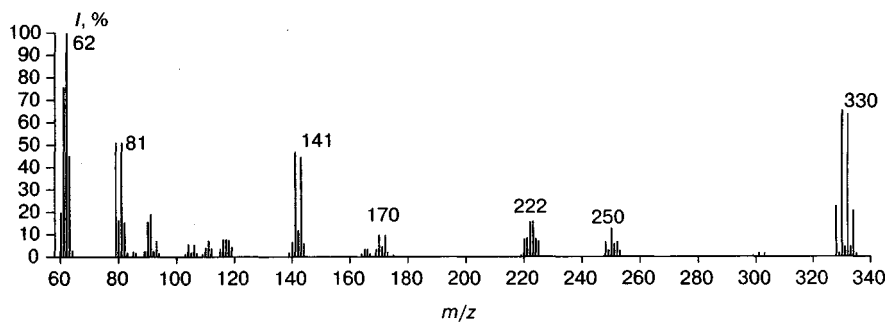


Рис. 13.13

Задача 13.14. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 13.14).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
60	19,8	104	5,47	165	3,28	250	12,5
61	75,7	106	5,29	166	3,28	251	5,47
62	100	110	3,91	167	1,15	252	6,45
63	44,9	111	6,90	169	3,28	253	2,73
64	2,73	112	3,63	170	9,76	299	0,40
79	51,0	115	3,42	171	4,49	301	1,53
80	16,1	116	7,69	172	9,51	303	1,53
81	50,8	117	7,69	173	1,95	305	0,31
82	15,8	118	7,22	220	7,69	328	22,6
85	2,13	119	4,19	221	8,27	329	1,49
86	1,53	140	6,45	222	15,4	330	65,1
89	2,37	141	46,7	223	15,6	331	4,30
90	15,4	142	11,6	224	8,03	332	63,6
91	18,9	143	44,9	225	6,90	333	4,30
92	2,37	144	5,90	248	6,45	334	20,6
93	6,90	164	1,12	249	2,73	335	1,46

Рис. 13.14

Задача 13.15. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.15).

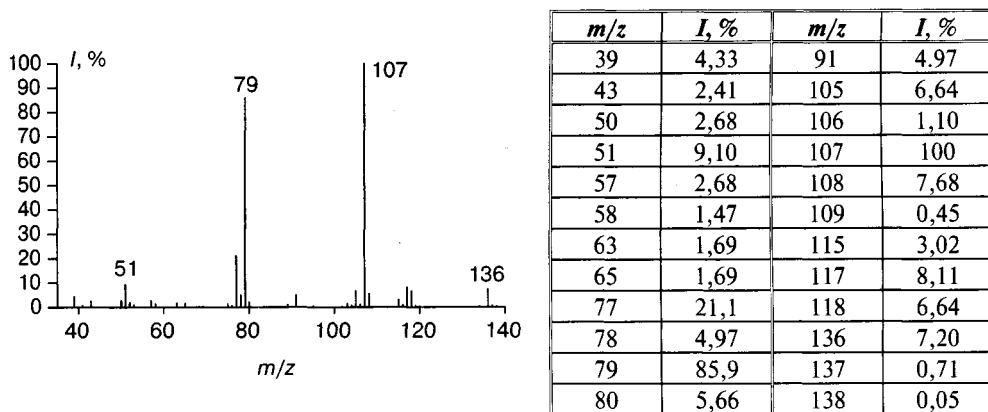
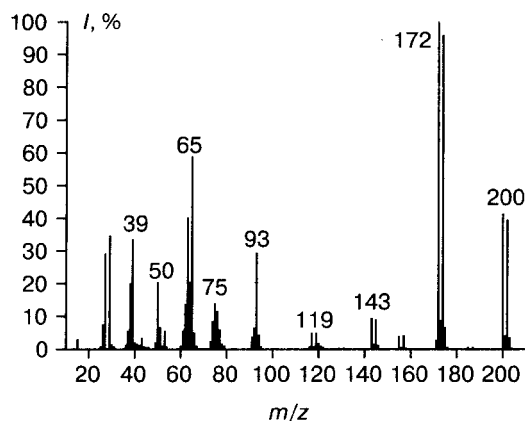


Рис. 13.15

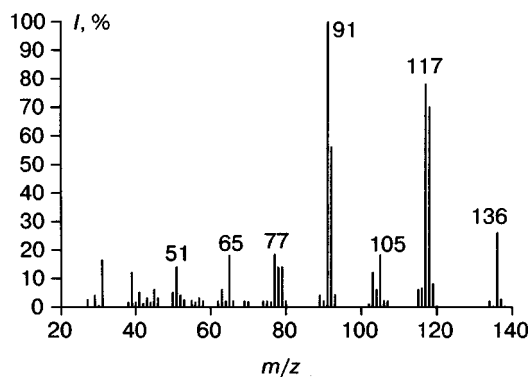
Задача 13.16. Идентифицируйте соединение по спектру ИЭ (рис. 13.16).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	29,0	93	29,2
29	34,5	94	4,24
38	19,8	117	4,89
39	33,3	119	4,89
50	20,2	120	1,63
51	6,51	143	9,31
53	5,44	144	1,44
61	5,44	145	8,91
62	13,5	155	3,80
63	39,9	157	4,07
64	20,2	171	2,63
65	58,7	172	100
66	4,89	173	8,71
74	8,31	174	95,6
75	13,7	175	6,51
76	11,3	200	41,1
77	5,81	201	3,65
91	3,62	202	40,3
92	6,21	203	3,51

Рис. 13.16

Задача 13.17. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.17).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
31	16,3	91	100
39	12,0	92	56,0
41	5,24	93	4,18
45	6,18	103	12,0
46	3,00	104	6,51
50	5,24	105	18,1
51	14,0	106	2,18
52	4,03	107	2,13
57	3,00	115	6,00
63	6,51	116	6,58
65	18,0	117	78,0
66	2,13	118	70,0
77	18,3	119	6,34
78	13,7	134	2,13
79	14,0	136	26,0
80	2,13	137	2,59
89	4,49	138	0,16

Рис. 13.17

Задача 13.18. Идентифицируйте изомерные 4-пропилфенол и фенилпропиловый эфир по спектрам ИЭ (рис. 13.18).

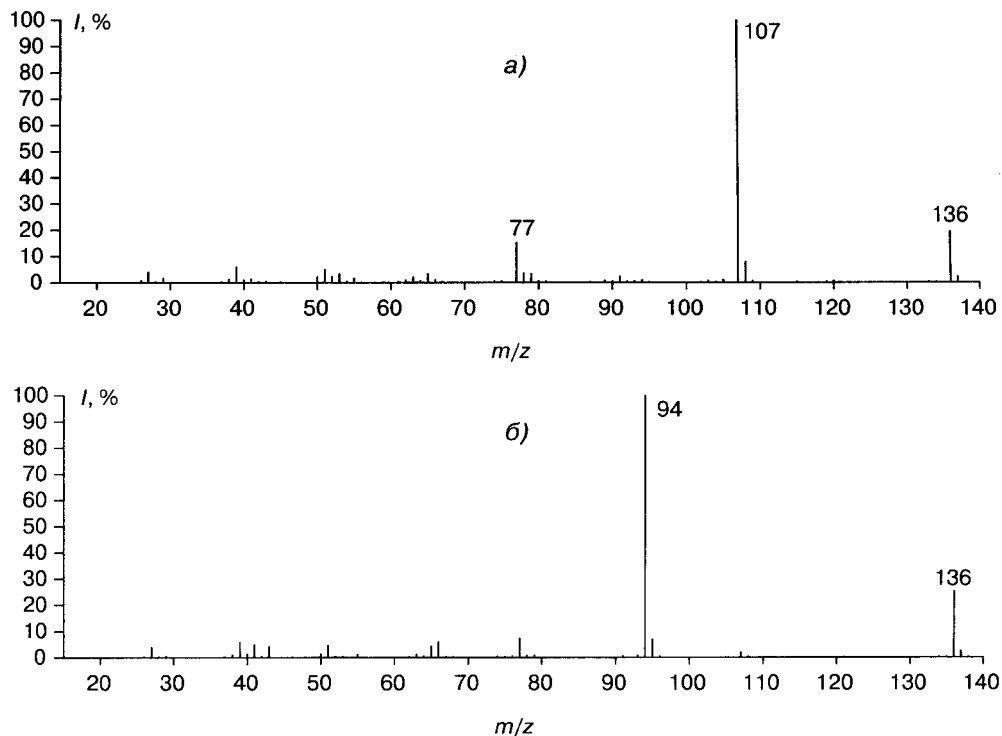


Рис. 13.18

Задача 13.19. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.19).

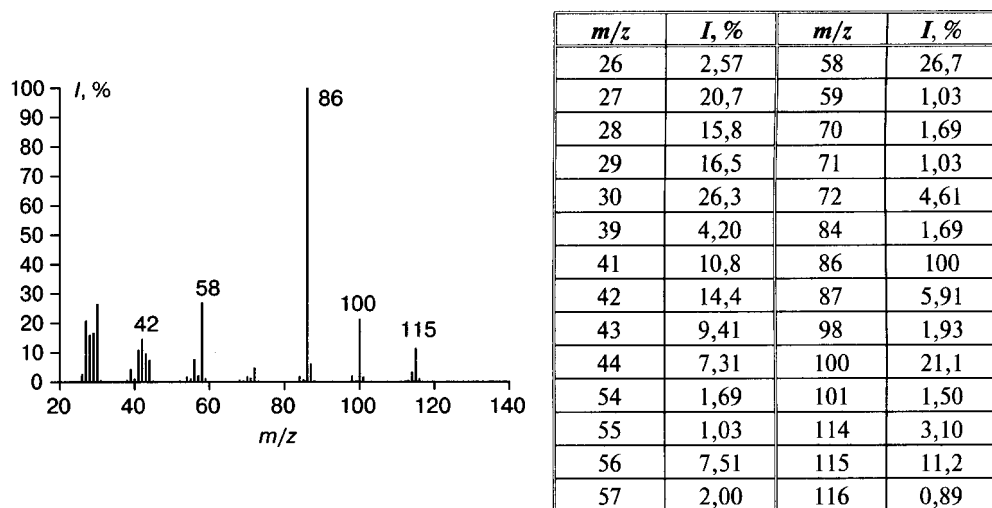
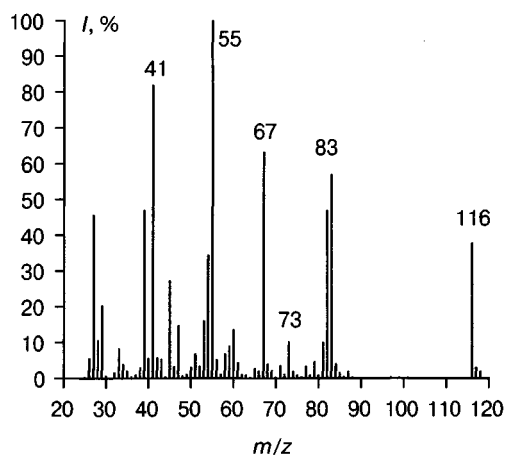


Рис. 13.19

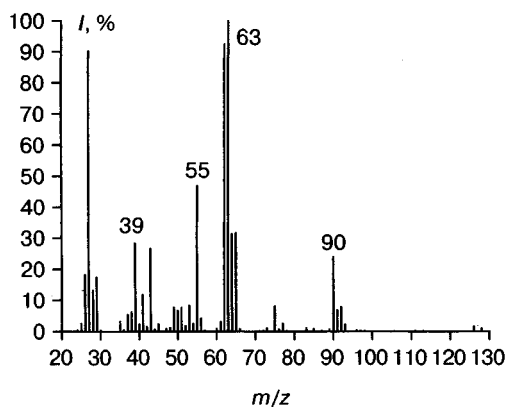
Задача 13.20. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.20).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	45,5	58	6,61
28	10,5	59	8,81
29	20,1	60	13,4
33	8,11	61	4,22
34	3,80	67	63,0
39	46,8	68	3,80
40	5,41	69	2,11
41	81,7	71	3,40
42	5,61	73	10,1
43	5,20	77	3,21
45	27,0	79	4,55
46	3,18	81	9,81
47	10,6	82	46,8
51	6,61	83	56,8
52	3,18	84	3,92
53	15,9	85	1,40
54	34,3	87	1,03
55	100	116	37,63
56	5,10	117	2,81
57	1,03	118	1,75

Рис. 13.20

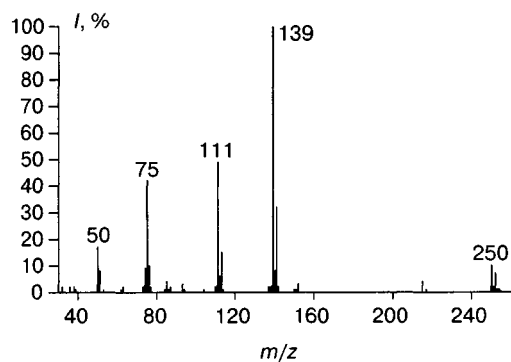
Задача 13.21. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.21).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
25	2,52	53	8,31
26	18,2	54	2,52
27	90,2	55	46,8
28	13,2	56	4,20
29	17,3	61	3,33
35	3,33	62	92,4
37	5,38	63	100
38	6,21	64	31,3
39	28,3	65	31,6
40	2,32	75	8,11
41	11,7	77	2,67
42	1,60	90	24,1
43	26,5	91	6,71
45	2,30	92	7,94
48	1,17	93	2,18
49	7,61	126	1,50
50	6,61	128	1,02
51	7,61	130	0,17

Рис. 13.21

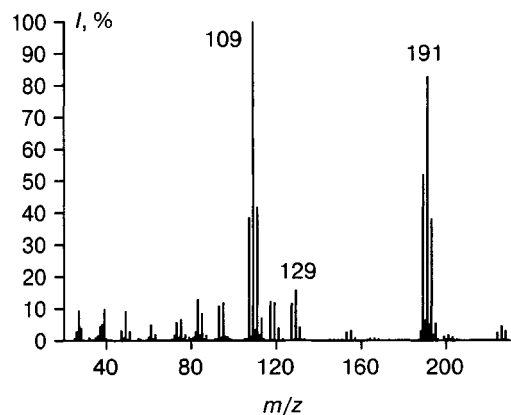
Задача 13.22. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.22).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
50	17,8	139	100
51	8,94	140	7,84
74	9,71	141	32,5
75	42,0	142	2,54
76	10,9	150	1,24
77	2,12	151	1,31
85	4,42	152	3,45
87	2,55	215	4,74
93	3,91	217	1,54
111	49,4	250	10,8
112	4,13	251	1,54
113	16,4	252	7,20
114	1,12	253	1,03
137	2,23	254	1,20
138	2,45	255	0,17

Рис. 13.22

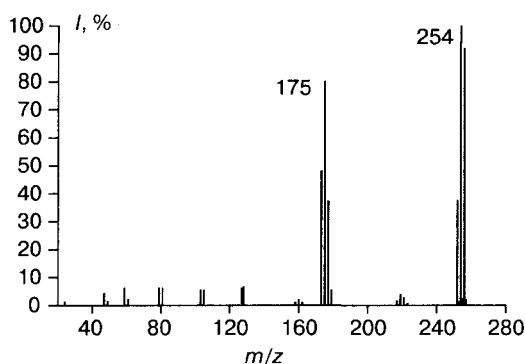
Задача 13.23. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.23). Малоинтенсивные пики ионов с m/z в области 199–203 обусловлены примесями.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	9,31	113	6,81
28	3,70	117	12,0
37	4,20	119	11,8
38	4,80	121	3,90
39	9,61	127	11,9
49	9,01	129	15,9
51	2,70	131	4,00
61	4,80	153	2,40
63	1,70	155	2,90
73	5,50	188	2,70
75	6,41	189	50,1
82	2,50	190	6,21
83	12,7	191	82,9
84	1,50	192	4,90
85	8,31	193	38,6
87	1,40	194	1,60
93	10,9	195	5,20
95	11,0	224	2,70
107	38,3	226	5,40
108	1,20	227	0,18
109	100	228	3,61
110	3,30	229	0,12
111	41,6	230	1,02
112	1,50	232	0,10

Рис. 13.23

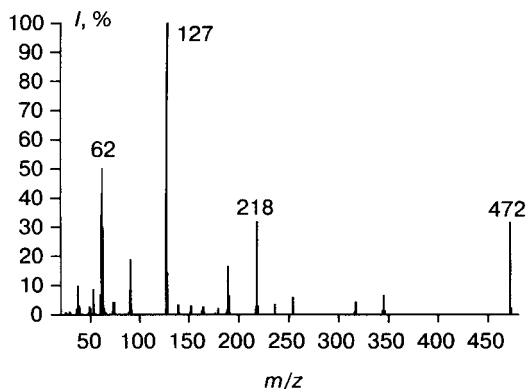
Задача 13.24. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.24).
Объясните природу ионов с m/z 127 и 128.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
47	4,2	177	37,3
49	1,4	178	0,82
59	6,0	179	5,32
61	2,0	217	1,62
79	6,1	219	3,78
81	6,0	221	2,70
103	5,4	223	0,54
105	5,3	252	37,5
127	6,1	253	0,83
128	6,4	254	100
158	1,0	255	2,20
160	1,9	256	91,7
162	0,9	257	2,02
173	48,0	258	33,3
174	1,06	259	0,73
175	80,0	260	4,17
176	1,76	261	0,09

Рис. 13.24

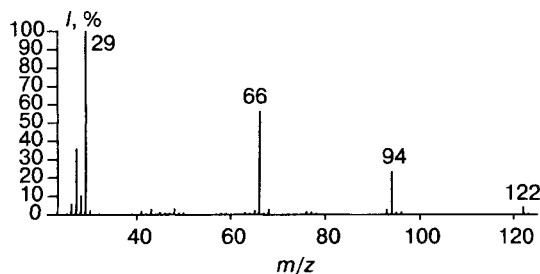
Задача 13.25. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.25).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
36	2,13	139	4,26
37	8,65	152	1,96
38	2,73	163	1,19
39	2,17	164	3,30
49	1,96	179	1,78
50	1,74	188	1,50
53	9,14	189	16,5
60	5,89	190	6,47
61	34,9	217	2,73
62	52,1	218	31,7
63	30,9	219	2,09
64	1,37	220	0,12
73	3,79	254	4,98
74	5,02	317	4,28
90	9,14	345	6,47
91	18,7	346	0,43
92	1,42	472	34,5
127	100	473	2,28
128	14,4	473	0,13

Рис. 13.25

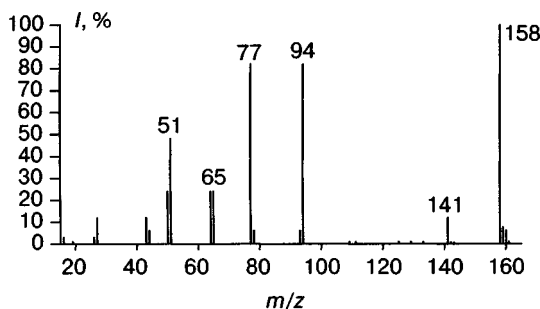
Задача 13.28. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.28).



m/z	I, %	m/z	I, %
27	35,6	68	2,66
28	10,0	76	1,27
29	100	93	2,56
30	2,12	94	23,2
41	1,48	95	0,70
43	2,54	96	1,13
48	2,80	122	5,16
65	1,94	123	0,27
66	56,0	124	0,25

Рис. 13.28

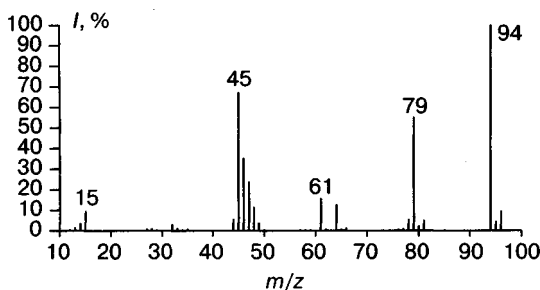
Задача 13.29. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.29).



m/z	I, %	m/z	I, %
16	3,31	93	6,28
26	3,31	94	82,0
27	12,7	95	5,42
43	12,7	96	0,31
44	6,28	125	1,01
50	24,5	141	12,0
51	48,9	142	0,88
64	24,5	143	0,60
65	24,5	158	100
77	82,0	159	7,52
78	6,28	160	5,18

Рис. 13.29

Задача 13.30. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.30).



m/z	I, %	m/z	I, %
15	9,51	64	12,3
32	3,00	65	0,58
33	0,92	66	1,19
44	5,35	78	5,25
45	66,9	79	55,0
46	35,0	80	1,49
47	23,5	81	4,84
48	11,2	94	100
49	3,67	95	3,81
61	15,4	96	8,83
62	0,63	97	0,26

Рис. 13.30

Задача 13.31. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.31).

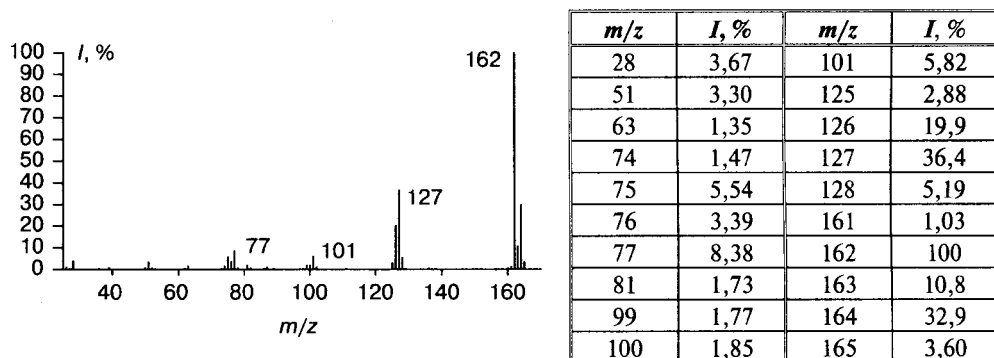
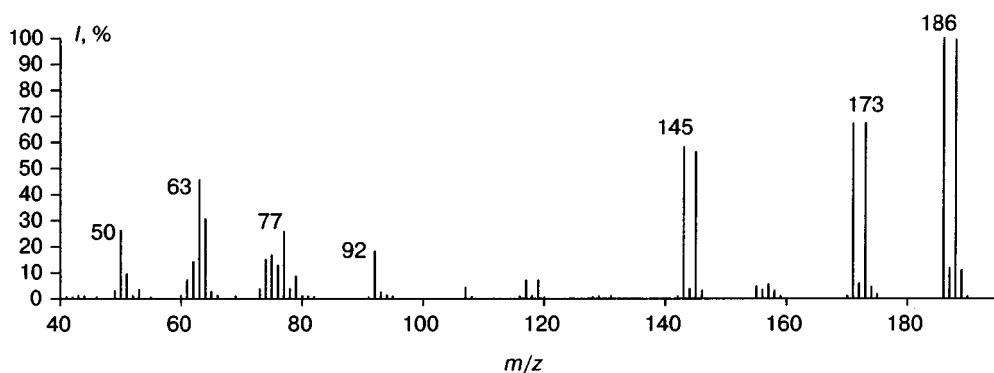


Рис. 13.31

Задача 13.32. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.32).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
15	7,50	53	3,70	80	1,00	156	3,40
26	2,90	60	1,20	92	18,2	157	5,40
27	2,10	61	7,20	93	2,50	158	3,10
28	4,50	62	14,2	94	1,30	170	1,00
29	2,20	63	45,6	95	0,80	171	67,1
31	1,50	64	30,6	107	4,30	172	4,43
36	1,10	65	2,60	117	7,00	173	67,3
37	7,30	66	1,30	118	1,10	174	4,50
38	21,0	73	3,80	119	7,00	175	0,25
39	7,10	74	15,1	131	1,00	186	100
43	1,20	75	16,8	143	58,1	187	7,78
49	3,10	76	12,8	144	3,70	188	99,7
50	26,3	77	25,7	145	56,2	189	7,71
51	9,50	78	3,80	146	3,00	190	0,45
52	1,10	79	8,60	155	4,70		

Рис. 13.32

Задача 13.33. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.33).

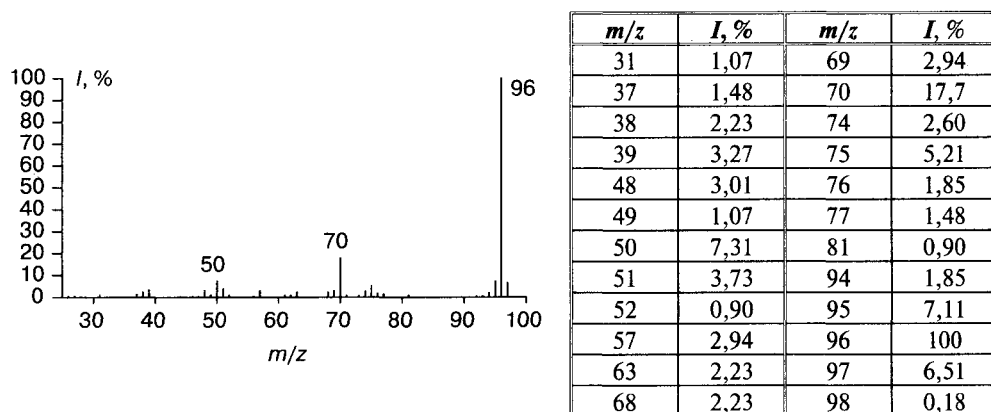
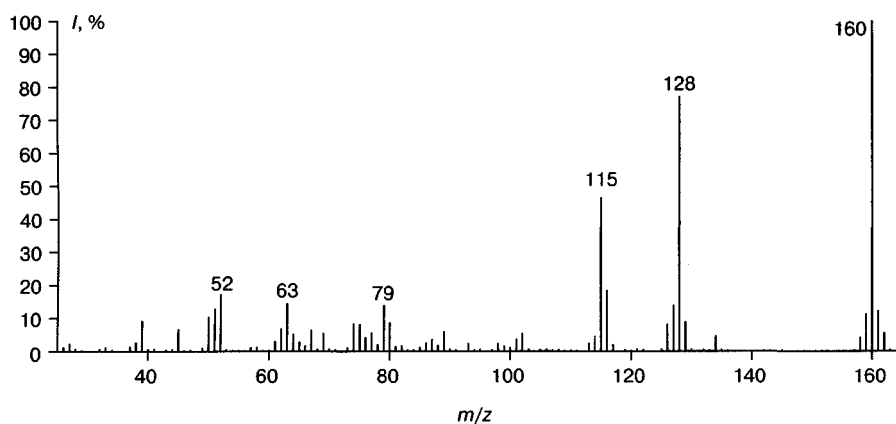


Рис. 13.33

Задача 13.34. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.34).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
33	1,10	65	2,68	82	1,65	115	46,4
37	1,28	66	1,50	85	1,10	116	18,3
38	2,57	67	6,29	86	2,38	117	1,83
39	9,17	69	5,37	87	3,48	126	8,07
45	6,60	73	0,99	88	1,65	127	13,8
50	10,3	74	8,25	89	5,83	128	77,0
51	12,7	75	8,07	93	2,20	129	7,60
52	17,1	76	4,11	98	2,20	134	4,59
58	1,16	77	5,50	99	1,47	158	4,03
61	2,93	78	1,89	101	3,48	159	11,2
62	6,71	79	13,8	102	5,25	160	100
63	14,3	80	8,62	113	2,38	161	12,0
64	5,14	81	1,28	114	4,40	162	4,96

Рис. 13.34

Задача 13.35. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.35).

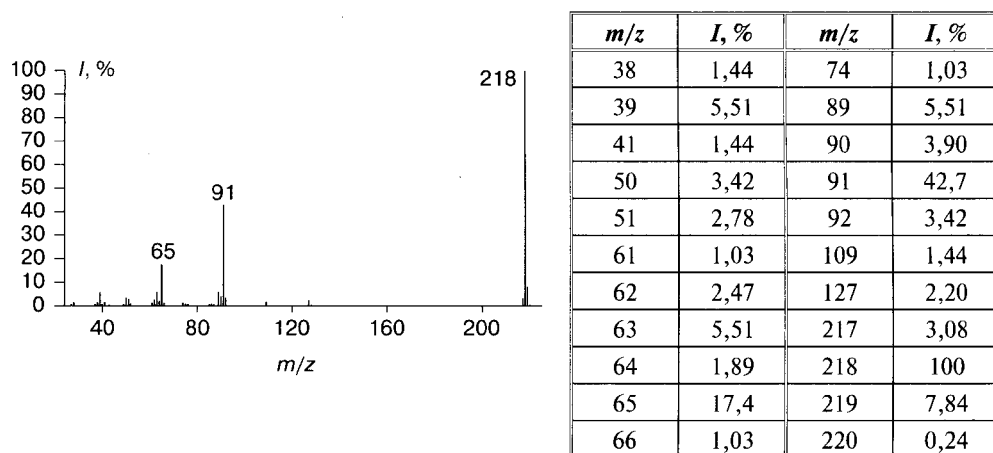
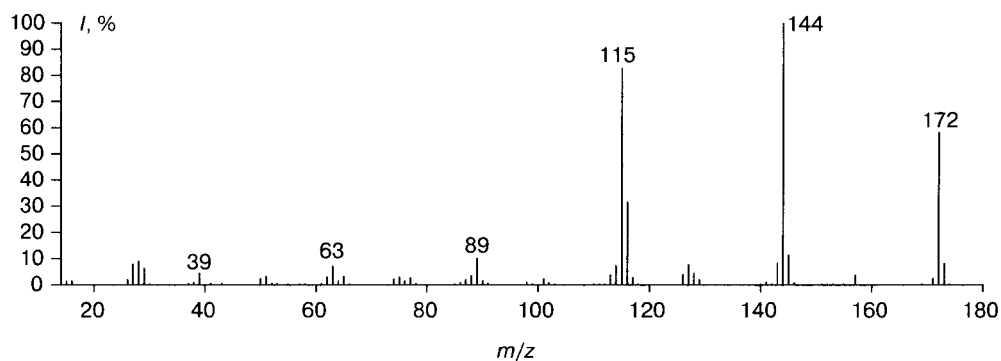


Рис. 13.35

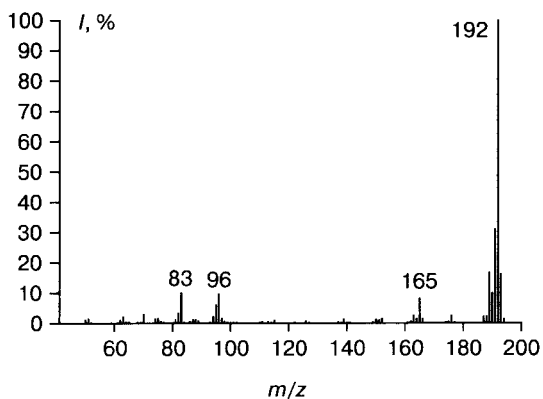
Задача 13.36. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.36).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
15	1,22	63	6,93	90	1,47	129	1,89
16	1,35	64	1,49	101	2,13	141	0,98
26	1,82	65	3,11	113	3,73	143	8,20
27	7,86	74	2,01	114	7,31	144	100
28	8,88	75	2,79	115	82,69	145	11,3
29	6,28	76	1,30	116	31,40	157	3,66
39	4,36	77	2,52	117	2,75	171	2,37
50	2,21	87	1,78	126	3,88	172	58,1
51	3,03	88	3,46	127	7,56	173	7,72
62	2,88	89	9,97	128	4,36	174	0,61

Рис. 13.36

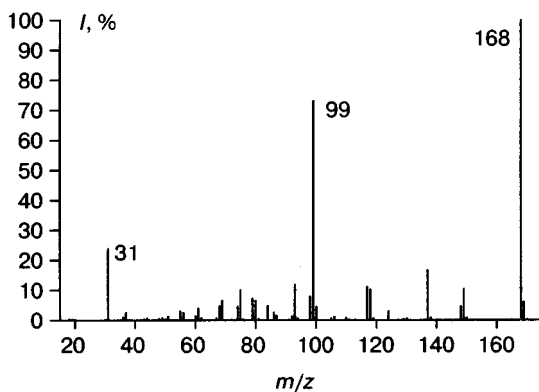
Задача 13.37. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.37).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
50	1,00	150	1,10
51	1,40	151	0,90
63	2,10	152	1,40
70	2,80	163	2,40
74	1,30	164	1,40
75	1,50	165	8,21
82	3,20	166	1,30
83	9,91	176	2,40
87	1,20	187	2,10
88	1,10	188	2,10
94	2,10	189	16,6
95	5,91	190	9,81
96	9,51	191	30,9
97	1,60	192	100
115	0,90	193	16,4
139	1,30	194	1,28

Рис. 13.37

Задача 13.38. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.38).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
31	23,8	93	11,8
37	2,49	98	7,80
51	1,22	99	73,0
55	2,90	100	4,46
56	2,44	106	1,12
61	3,82	117	11,0
68	4,76	118	10,2
69	6,58	124	2,91
74	4,53	137	16,5
75	9,99	148	4,62
79	7,23	149	10,2
80	6,54	168	100
84	4,80	169	6,04
86	2,58	170	0,20

Рис. 13.38

Задача 13.39. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.39).

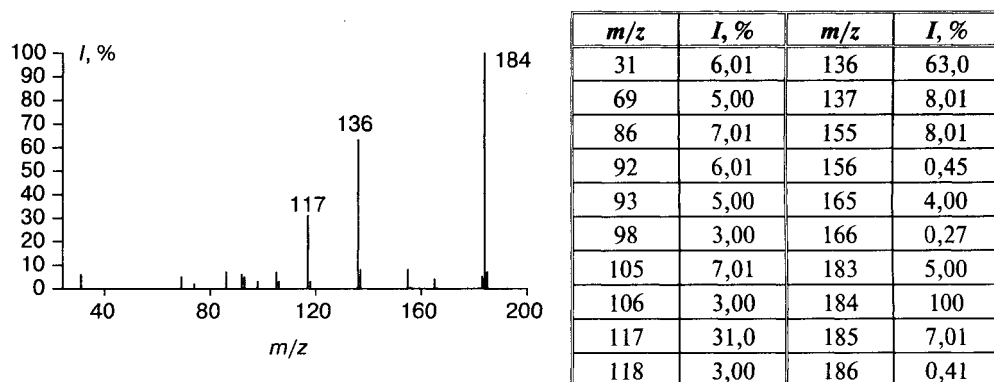


Рис. 13.39

Задача 13.40. Идентифицируйте сложный эфир по его спектру ИЭ (рис. 13.40).

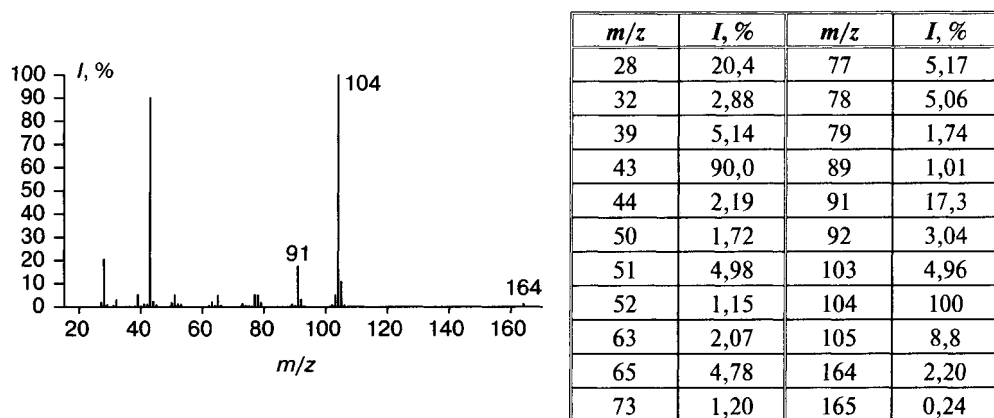
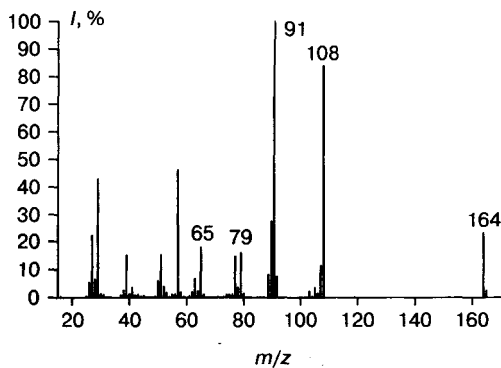


Рис. 13.40

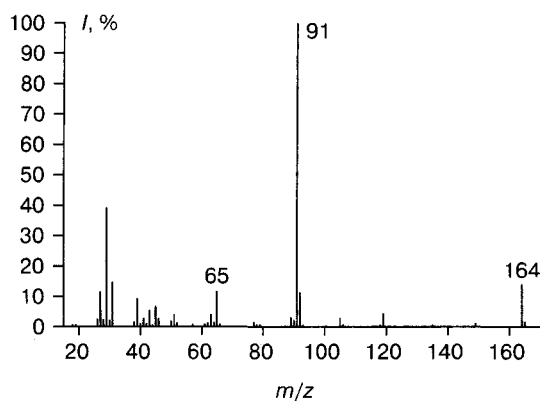
Задача 13.41. Идентифицируйте сложный эфир по его спектру ИЭ (рис. 13.41).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	5,30	50	5,81	65	17,8	80	1,40	107	9,13
27	22,0	51	15,2	66	1,10	89	8,21	108	84,1
28	6,41	52	3,90	75	1,10	90	27,4	109	6,35
29	42,8	57	46,2	76	1,20	91	100	164	25,0
30	1,20	58	1,90	77	14,7	92	7,61	165	2,75
39	15,2	63	6,71	78	3,70	105	3,12	166	0,22
41	3,60	64	2,30	79	15,9	106	1,24		

Рис. 13.41

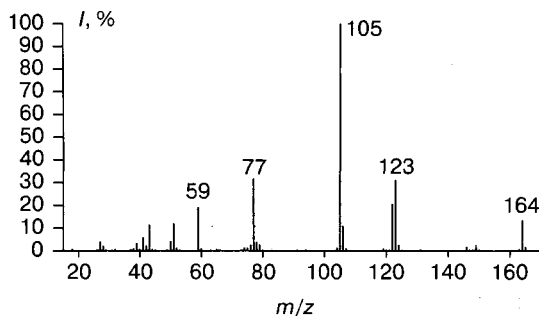
Задача 13.42. Идентифицируйте сложный эфир по его спектру ИЭ (рис. 13.42).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	2,50	52	1,10
27	11,4	62	1,20
28	2,20	63	3,90
29	39,0	64	1,30
30	2,10	65	11,5
31	14,6	77	1,30
38	1,50	89	2,90
39	9,11	90	2,10
40	0,90	91	100
41	2,70	92	8,03
42	1,00	105	2,70
43	5,20	119	6,28
45	6,51	149	1,34
46	2,50	164	15,0
50	1,70	165	1,65
51	3,90	166	0,13

Рис. 13.42

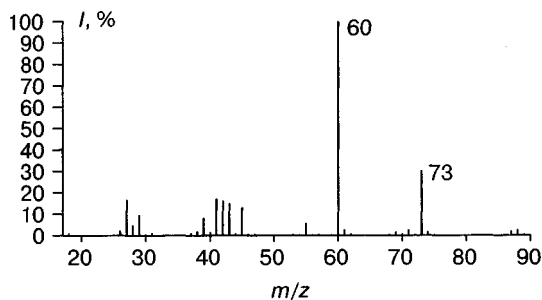
Задача 13.43. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.43).



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	3,90	79	2,60
39	3,10	104	1,10
41	5,71	105	100
42	2,10	106	8,27
43	11,3	122	20,4
50	4,06	123	30,8
51	11,8	124	2,40
52	1,00	146	1,10
59	18,9	149	3,78
76	2,50	164	15,3
77	31,6	165	1,65
78	3,70	166	0,13

Рис. 13.43

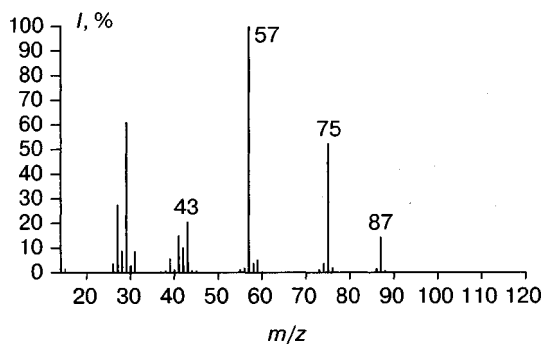
Задача 13.44. Идентифицируйте соединение по его спектру ИЭ (рис. 13.44).



<i>m/z</i>	<i>I</i> , %	<i>m/z</i>	<i>I</i> , %
18	1,00	45	12,9
26	2,00	55	5,50
27	16,4	60	100
28	4,40	61	2,20
29	9,31	62	0,40
38	1,60	71	2,30
39	8,01	73	30,0
40	1,30	74	1,50
41	16,8	87	1,80
42	16,0	88	3,12
43	14,8	89	0,14

Рис. 13.44

Задача 13.45. Идентифицируйте сложный эфир с молекулярной массой 116 по его спектру ИЭ (рис. 13.45).



<i>m/z</i>	<i>I</i> , %	<i>m/z</i>	<i>I</i> , %
15	1,56	55	0,96
26	3,48	56	1,65
27	27,3	57	100
28	8,63	58	3,38
29	60,9	59	4,99
30	2,75	74	3,58
31	8,45	75	52,1
39	5,47	76	1,77
41	14,8	86	1,36
42	9,99	87	14,2
43	20,4	116	1,62

Рис. 13.45

Задача 13.46. На рис. 13.46а–в представлены масс-спектры ИЭ изомерных метилциклогексанонов. Сделайте соотнесение.

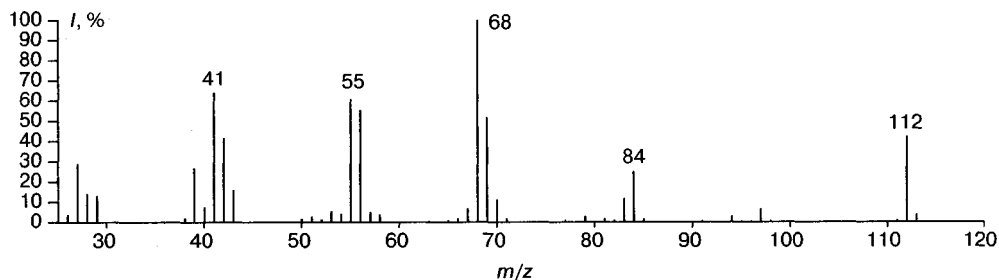


Рис. 13.46а

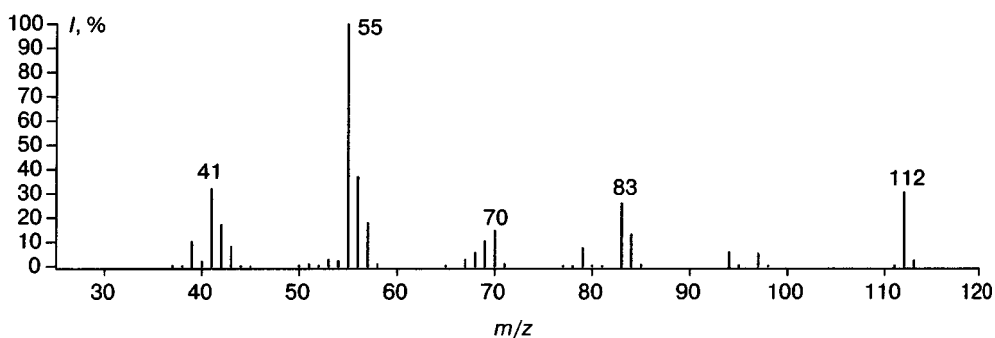
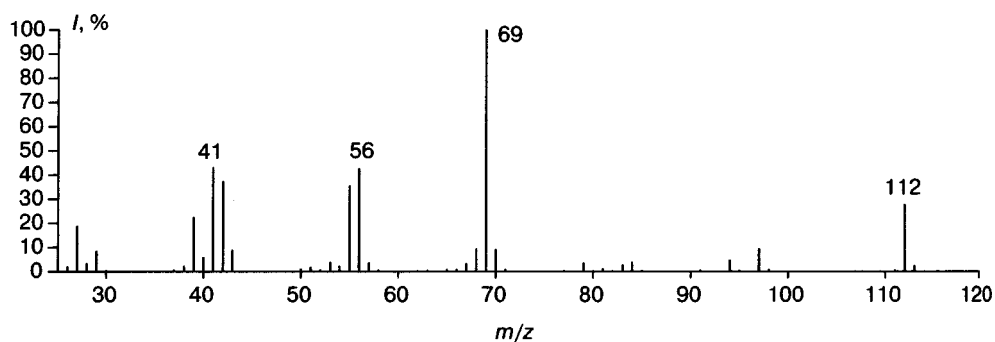
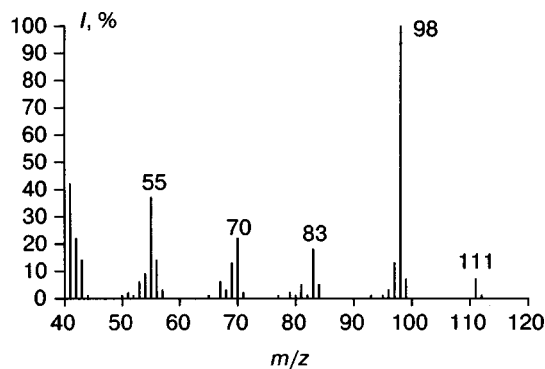


Рис. 13.46 б, в

Задача 13.47. Идентифицируйте соединение с молекулярной массой 140,1201 дальтона, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.47.



<i>m/z</i>	<i>I, %</i>	<i>m/z</i>	<i>I, %</i>
41	42,3	79	2,89
42	22,7	81	5,44
43	14,5	82	1,37
53	6,32	83	18,8
54	9,87	84	5,62
55	37,7	95	1,02
56	14,9	96	3,59
57	3,24	97	13,9
67	6,54	98	100
68	3,29	99	6,52
71	2,22	111	9,14
69	13,1	112	0,70
70	22,4	140	2,96

Рис. 13.47

Задача 13.48. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.48.

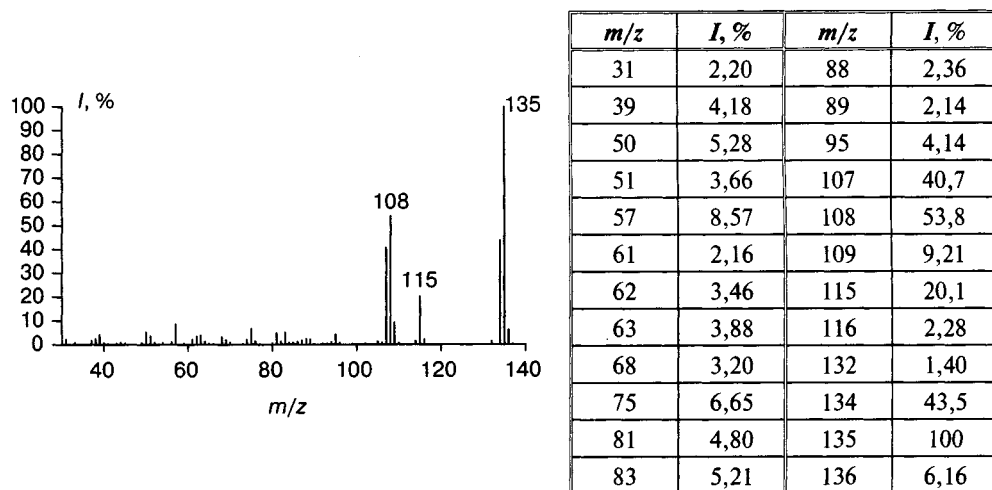


Рис.13.48

Задача 13.49. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.49.

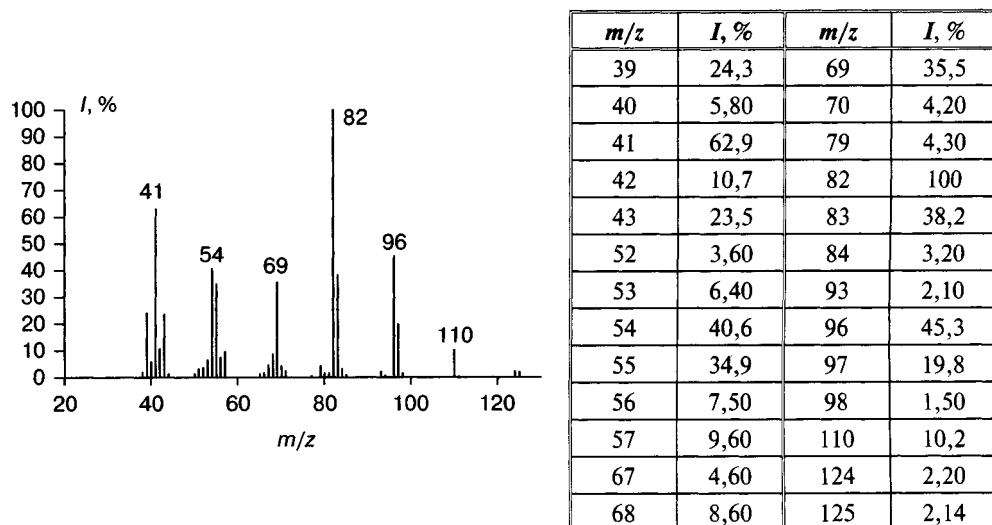


Рис. 13.49

Задача 13.50. Идентифицируйте соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 13.50.

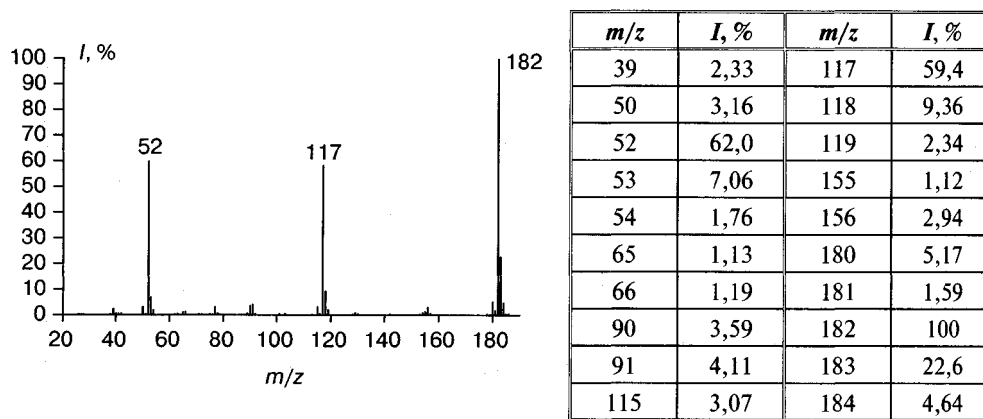


Рис. 13.50

Задача 13.51. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.51.

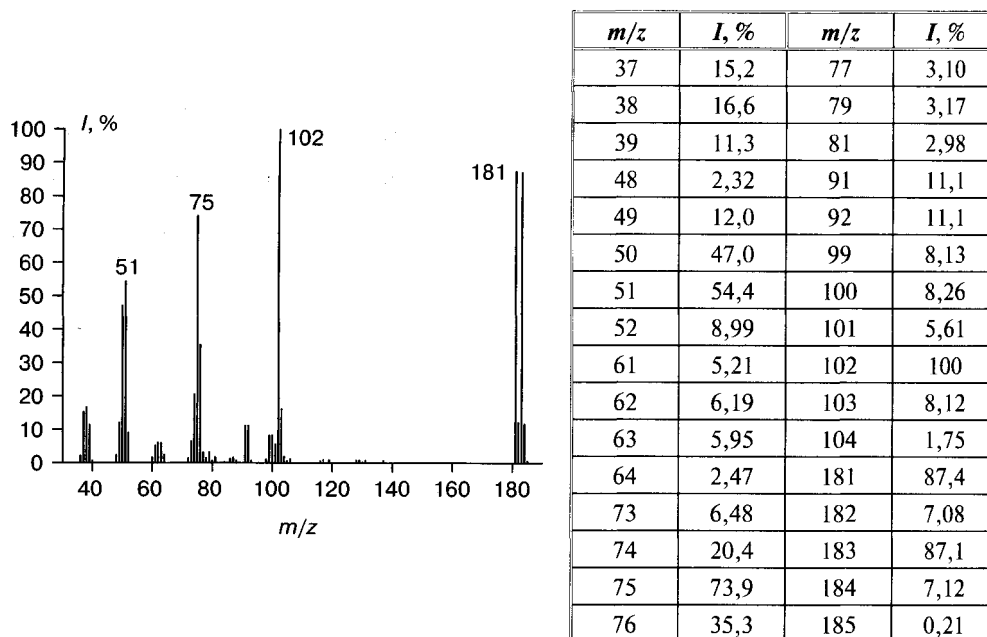
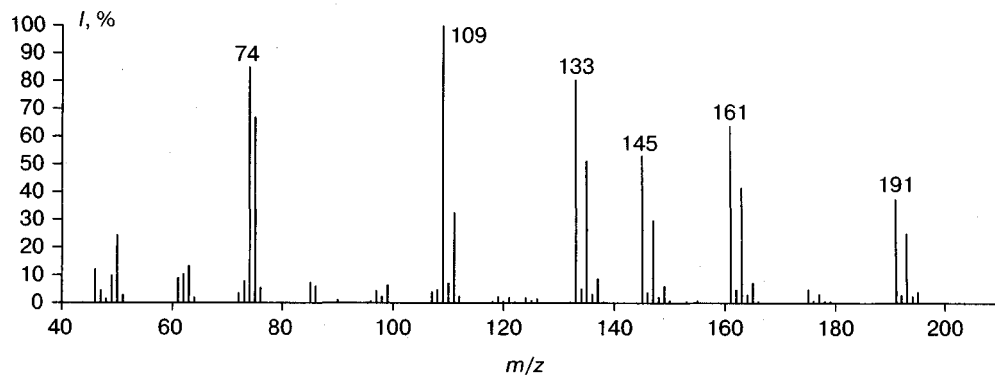


Рис. 13.51

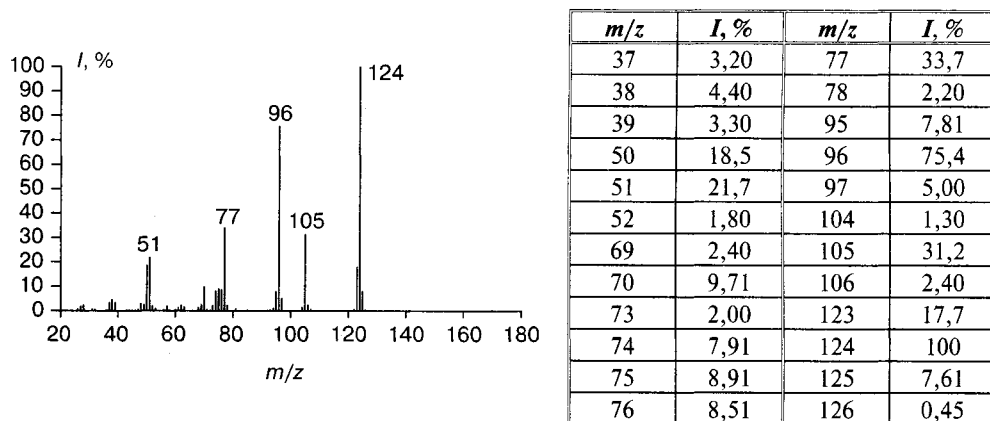
Задача 13.52. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.52.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
46	12,0	76	5,41	121	1,77	162	4,63
47	4,37	85	7,27	133	80,3	163	42,4
49	9,82	86	5,97	134	4,93	164	2,91
50	24,3	97	4,31	135	51,1	165	7,17
61	8,83	99	6,34	136	3,01	175	4,78
62	10,2	107	3,90	137	8,78	177	3,12
63	13,2	108	4,72	145	52,9	191	37,4
64	1,87	109	100	146	3,69	192	2,65
72	3,43	110	6,78	147	35,3	193	25,0
73	7,84	111	33,1	148	2,42	194	1,75
74	84,8	112	2,21	149	5,97	195	4,12
75	66,7	119	2,23	161	63,7	196	0,31

Рис. 13.52

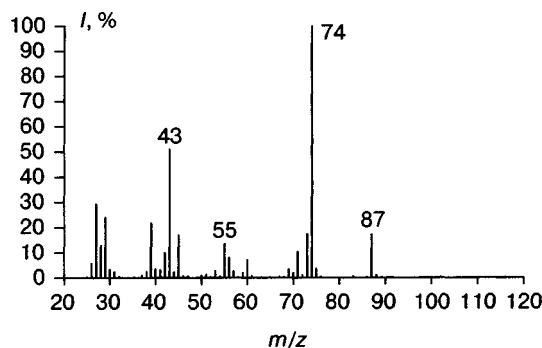
Задача 13.53. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.53.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
37	3,20	77	33,7
38	4,40	78	2,20
39	3,30	95	7,81
50	18,5	96	75,4
51	21,7	97	5,00
52	1,80	104	1,30
69	2,40	105	31,2
70	9,71	106	2,40
73	2,00	123	17,7
74	7,91	124	100
75	8,91	125	7,61
76	8,51	126	0,45

Рис. 13.53

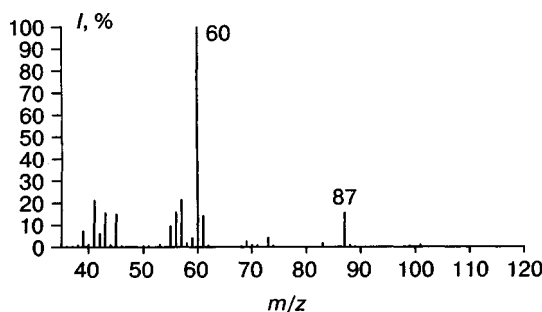
Задача 13.54. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.54.



m/z	I, %	m/z	I, %	m/z	I, %
27	29,3	44	2,20	70	1,90
28	12,9	45	16,9	71	10,3
29	23,8	53	2,60	73	17,3
30	3,20	55	13,5	74	100
39	21,7	56	8,01	75	3,50
40	3,40	57	2,60	87	17,1
41	3,10	59	2,00	88	1,00
42	9,91	60	7,11	116	0,11
43	51,0	69	3,30		

Рис. 13.54

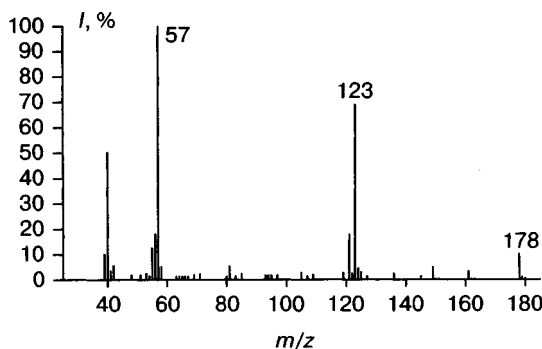
Задача 13.55. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.55.



m/z	I, %	m/z	I, %	m/z	I, %
38	0,72	55	9,54	69	2,67
39	7,20	56	15,7	70	0,94
40	1,21	57	21,4	73	4,17
41	21,1	58	1,74	83	1,67
42	6,04	59	4,11	87	15,5
43	15,3	60	100	88	0,96
44	0,95	61	14,0	116	0,13
45	14,8				

Рис. 13.55

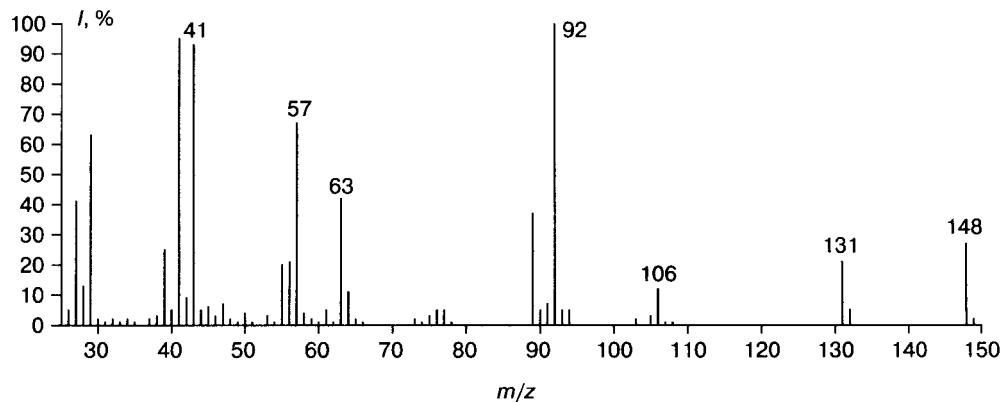
Задача 13.56. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.56.



m/z	I, %	m/z	I, %	m/z	I, %
39	10,0	81	5,39	125	3,44
40	50,1	85	2,54	136	2,51
41	3,50	105	2,87	145	1,30
42	5,54	109	2,03	149	4,80
55	12,5	119	2,87	161	3,33
56	18,0	121	17,8	178	10,0
57	100	122	2,50	179	0,96
58	4,58	123	68,9	180	0,50
71	2,37	124	3,58		

Рис. 13.56

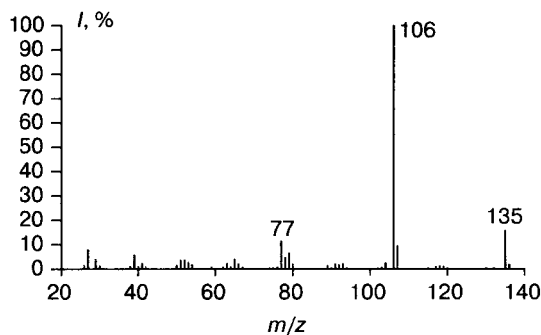
Задача 13.57. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.57.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	5,93	43	93,8	61	5,32	93	4,46
27	41,7	44	5,14	63	42,4	94	4,62
28	13,9	45	6,21	64	11,2	103	2,44
29	63,6	46	3,59	65	2,76	105	3,12
30	2,71	47	7,72	66	1,29	106	14,5
32	2,41	48	2,18	73	2,57	107	0,75
34	2,27	50	4,22	75	3,18	108	0,72
37	2,74	53	3,82	76	5,41	131	21,0
38	3,19	55	20,5	77	5,59	132	4,13
39	25,7	56	21,8	89	37,7	133	1,01
40	5,74	57	67,6	90	5,29	148	27,7
41	95,9	58	4,13	91	7,44	149	2,35
42	9,44	59	2,54	92	100	150	1,33

Рис. 13.57

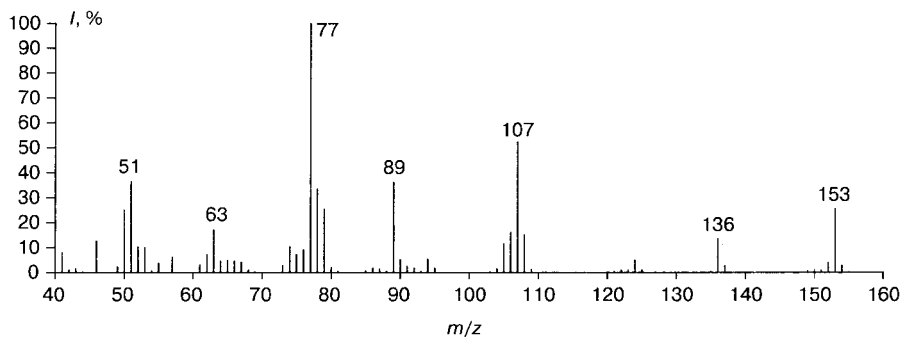
Задача 13.58. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.58.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	7,87	65	4,17	104	2,42
29	4,18	66	2,54	106	100
39	5,74	77	11,3	107	9,40
41	2,32	78	4,67	118	1,20
51	3,62	79	6,54	119	1,20
52	3,78	80	1,93	135	15,6
53	2,72	91	1,93	136	1,61
54	1,61	92	1,64	137	0,44
63	2,29	93	2,17		

Рис. 13.58

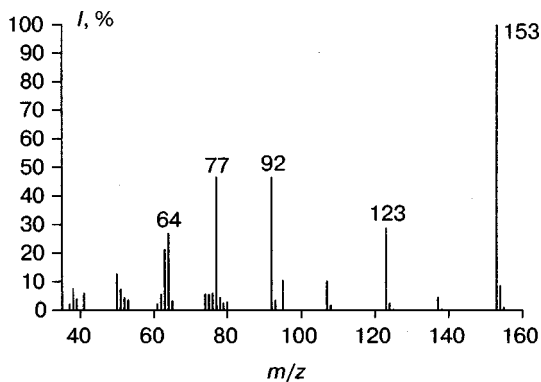
Задача 13.59. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.59.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
26	1,92	50	25,1	74	10,3	95	1,92
27	6,84	51	36,5	75	7,21	105	11,4
28	15,3	52	10,2	76	9,18	106	16,2
29	14,0	53	10,1	77	100	107	52,2
30	29,5	55	3,78	78	33,5	108	15,1
31	12,8	57	6,37	79	25,4	109	1,20
32	6,84	61	3,39	80	1,92	124	2,90
37	3,02	62	7,21	86	1,92	125	1,02
38	6,37	63	17,0	87	1,44	136	13,6
39	17,0	64	4,56	89	36,2	137	2,61
40	3,39	65	4,87	90	5,16	152	3,90
41	8,28	66	4,56	91	2,64	153	30,0
46	12,7	67	4,10	92	1,92	154	2,43
49	2,24	73	2,64	94	5,20	155	0,26

Рис. 13.59

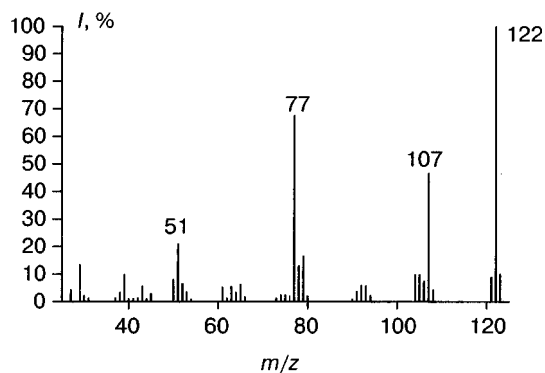
Задача 13.60. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.60.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
37	2,09	64	26,7	95	10,3
38	7,59	65	3,19	96	0,66
39	3,79	74	5,50	107	10,0
41	5,79	75	5,39	108	0,78
50	12,6	76	5,89	123	28,6
51	7,29	77	46,5	124	2,32
52	4,19	78	4,39	137	4,39
53	3,50	79	2,39	153	100
61	2,09	80	2,79	154	8,24
62	5,50	92	46,5	155	0,91
63	21,0	93	3,39		

Рис. 13.60

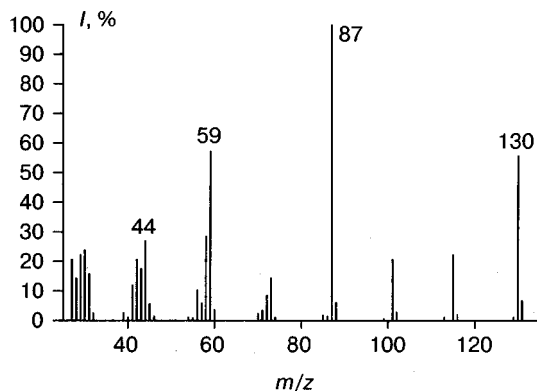
Задача 13.61. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.61.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	4,23	77	67,5
29	13,2	78	13,0
30	2,12	79	16,5
38	3,39	80	1,90
39	9,80	91	3,39
43	5,64	92	5,64
45	2,87	93	5,64
50	7,92	94	2,12
51	21,0	104	9,80
52	6,51	105	9,80
53	3,39	106	7,92
61	5,64	107	46,5
63	5,64	108	3,44
64	3,39	121	8,87
65	6,13	122	100
74	2,12	123	8,51
75	2,12	124	0,26

Рис. 13.61

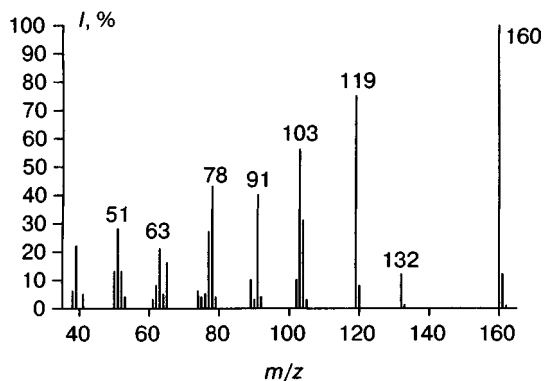
Задача 13.62. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.62.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	20,6	60	3,56
28	14,2	70	2,42
29	22,2	71	3,38
30	23,8	72	8,46
31	15,8	73	14,3
32	2,42	87	100
41	11,9	88	5,26
42	20,6	101	20,6
43	17,4	102	1,30
44	27,0	115	22,2
45	5,67	116	1,64
56	10,3	117	0,18
57	5,87	130	55,6
58	28,5	131	4,73
59	57,1	132	0,25

Рис. 13.62

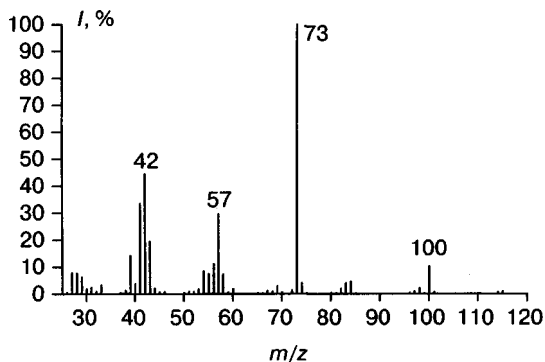
Задача 13.63. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.63.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
39	22,0	79	4,17
41	5,24	89	10,1
50	13,7	90	3,23
51	28,4	91	40,4
52	13,4	92	4,17
53	4,17	102	10,1
61	3,76	103	56,6
62	8,28	104	31,7
63	21,5	105	3,72
64	5,24	119	75,1
65	16,9	120	6,61
74	6,07	132	12,4
75	4,17	133	1,24
76	5,24	160	100
77	27,0	161	10,7
78	43,8	162	0,65

Рис. 13.63

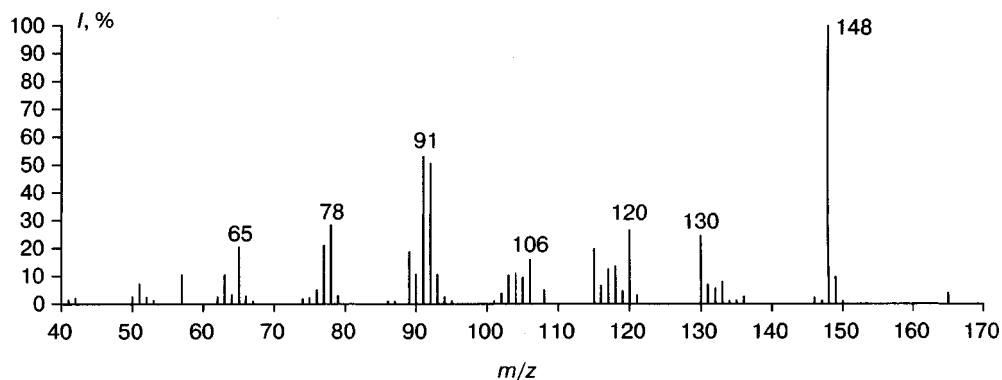
Задача 13.64. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.64. Точная молекулярная масса соединения – 115,0997 дальтона.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	7,83	55	7,41
28	7,83	56	11,1
29	6,21	57	29,6
30	1,84	58	7,41
31	2,33	69	2,93
33	3,27	73	100
38	1,24	74	3,72
39	14,1	82	1,84
40	3,88	83	4,03
41	33,6	84	4,68
42	44,4	98	2,93
43	19,5	100	10,2
44	2,10	101	0,62
54	8,53	115	1,00

Рис. 13.64

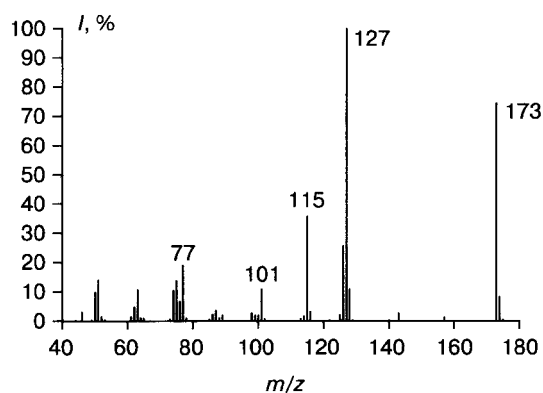
Задача 13.65. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.65.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
42	2,13	76	5,03	104	11,0	131	7,24
50	2,67	77	21,0	105	9,45	132	5,59
51	7,24	78	28,4	106	15,8	133	8,28
52	2,13	79	2,84	108	5,03	134	1,12
57	10,5	89	18,8	115	19,8	135	1,29
62	2,54	90	10,7	116	6,46	136	2,84
63	10,5	91	53,0	117	12,4	146	2,13
64	3,28	92	50,5	118	13,5	148	100
65	20,5	93	10,5	119	4,50	149	10,3
66	2,84	94	2,84	120	26,5	150	0,64
74	1,88	102	3,77	121	3,77	165	5,02
75	2,13	103	10,2	130	24,5	166	0,52

Рис. 13.65

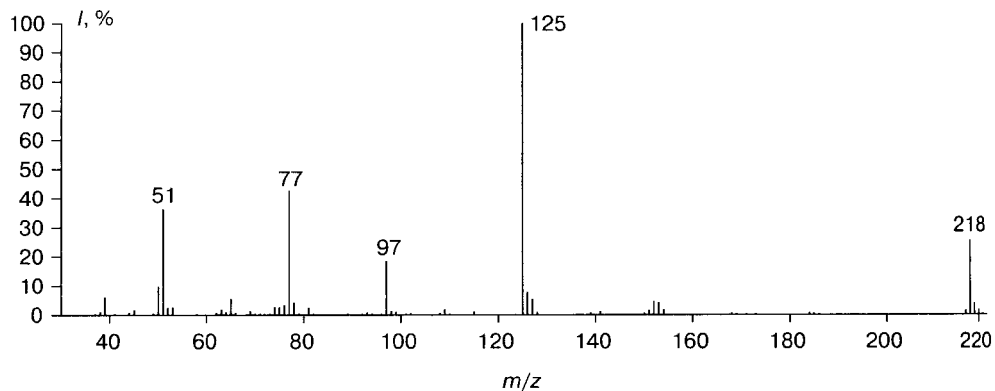
Задача 13.66. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.66.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
46	3,00	76	6,53	115	35,6
50	9,81	77	18,8	116	3,53
51	13,9	86	2,14	126	25,5
52	1,44	87	3,61	127	100
61	1,44	89	1,93	128	10,7
62	4,69	98	2,71	143	2,70
63	10,6	99	1,94	157	1,28
64	1,09	100	1,97	173	74,3
65	0,95	101	10,8	174	8,47
74	10,2	102	0,95	175	0,94
75	13,6	114	1,56		

Рис. 13.66

Задача 13.67. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.67.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	3,48	63	1,63	81	2,19	151	1,28
38	0,96	65	5,34	97	18,2	152	4,56
39	5,88	69	1,12	98	1,15	153	3,97
45	1,50	74	2,48	99	0,84	154	1,44
50	9,51	75	2,39	109	1,74	217	1,19
51	36,1	76	3,25	125	100	218	25,2
52	2,31	77	42,5	126	7,49	219	3,63
53	2,44	78	3,98	127	4,78	220	1,44

Рис. 13.67

Задача 13.68. Идентифицируйте соединение по его масс-спектру ИЭ, представленному на рис. 13.68. Учтите, что кластер ионов с максимумом m/z 439 обусловлен ионом $[M-Ph]^+$.

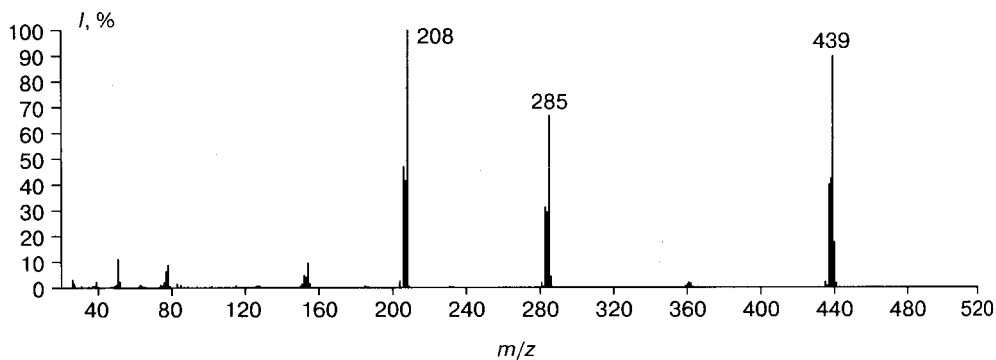
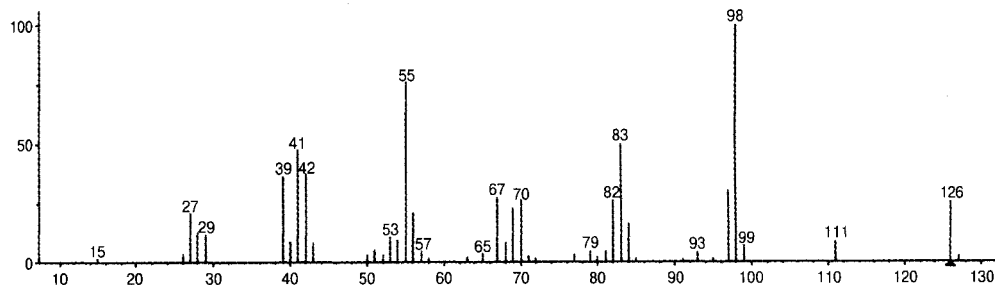


Рис. 13.68

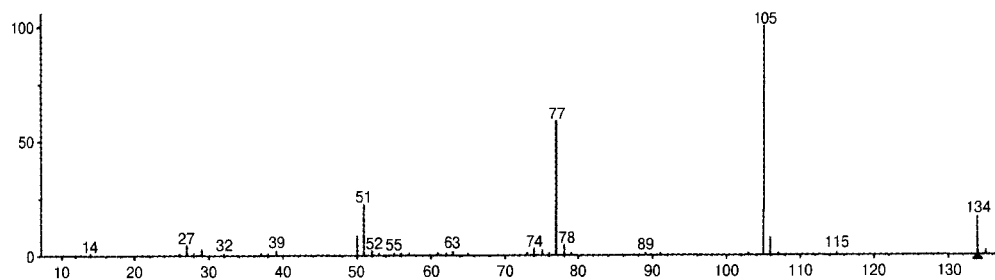
Задача 13.69. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.69.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	102	28	122	29	113	39	357
40	83	41	471	42	367	43	77
50	28	51	47	52	28	53	105
54	88	55	756	56	203	57	45
63	17	65	31	67	269	68	79
69	226	70	259	71	23	77	29
79	42	80	19	81	41	82	257
83	495	84	156	85	15	93	39
95	12	97	300	98	1000	99	68
111	84	126	248	127	23	128	0,14

Рис. 13.69

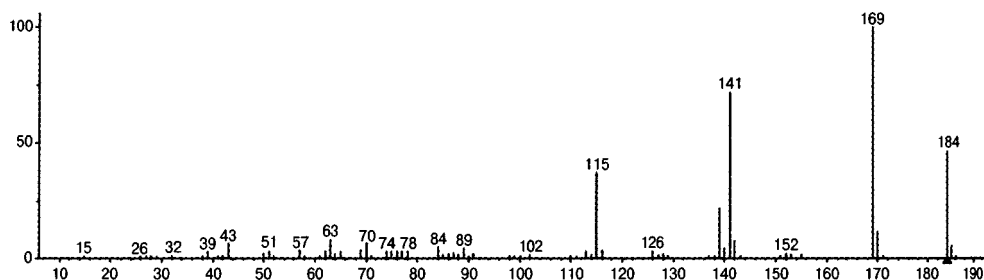
Задача 13.70. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.70.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	41	29	25	39	18	50	82
51	219	52	16	63	13	74	27
75	19	77	586	78	43	105	1000
106	75	134	64	135	16	136	1

Рис. 13.70

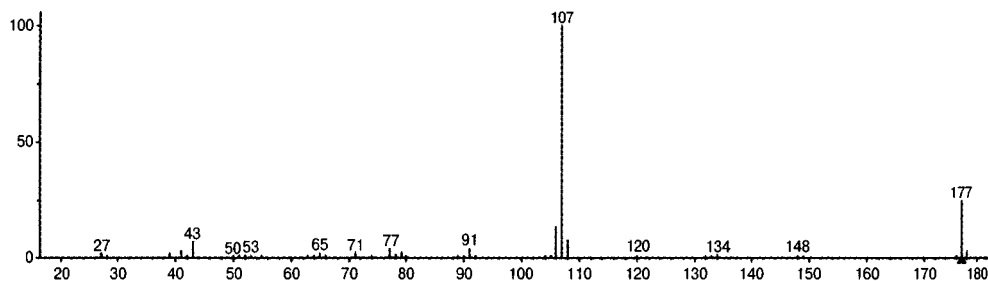
Задача 13.71. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.71.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
39	28	43	63	50	17	51	29
57	35	62	26	63	76	64	18
65	27	69	33	70	65	74	28
75	28	76	27	77	29	78	28
84	49	85	13	86	16	87	25
88	13	89	45	91	19	102	13
113	27	114	15	115	367	116	32
126	27	127	11	128	16	139	215
140	42	141	714	142	74	152	19
153	13	155	11	169	1000	170	130
171	1	184	460	185	66	186	1,1

Рис. 13.71

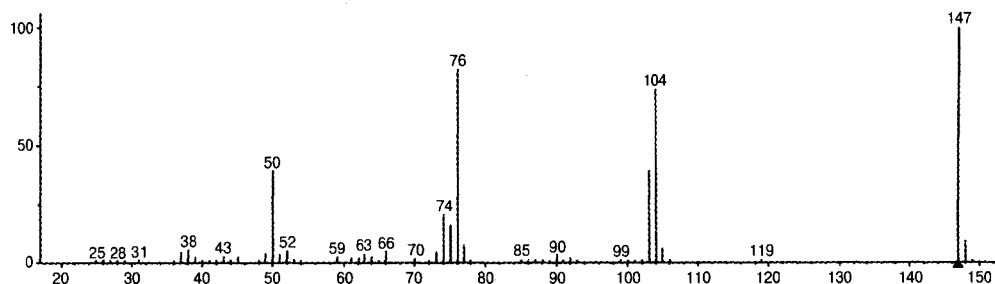
Задача 13.72. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.72.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	19	39	17	41	29	43	69
65	19	71	25	77	39	78	15
79	24	91	36	104	9	106	131
101	1000	108	73	134	12	177	242
178	30	179	2,1				

Рис. 13.72

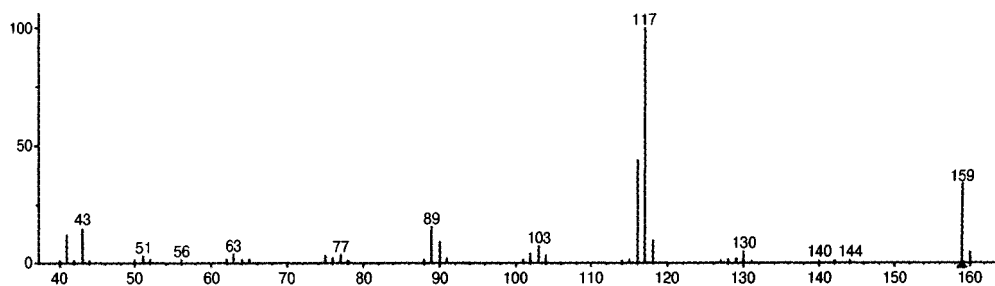
Задача 13.73. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.73.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
37	45	38	53	39	21	43	22
45	25	49	37	50	390	51	31
52	47	53	15	59	23	61	17
62	17	63	33	64	25	66	49
70	11	73	45	74	205	75	160
76	824	77	75	90	33	92	18
103	387	104	735	105	56	147	1000
148	89	149	8				

Рис. 13.73

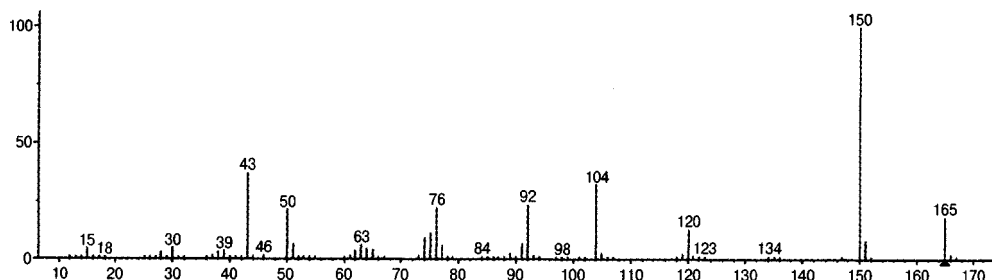
Задача 13.74. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.74.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
40	10	41	116	43	144	50	11
51	26	63	36	65	15	75	29
76	17	77	32	88	13	89	155
90	90	91	17	101	12	102	36
103	67	104	33	115	12	116	436
117	1000	118	91	128	12	129	20
130	49	142	8	144	7	159	336
160	45	161	2,4				

Рис. 13.74

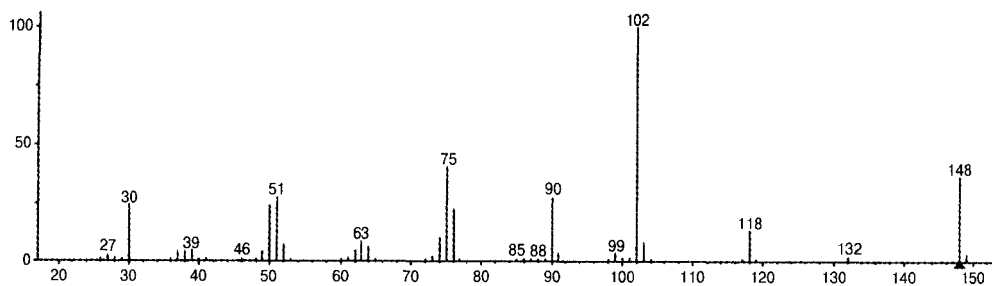
Задача 13.75. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.75.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
30	47	38	30	39	32	43	365
44	11	50	213	51	61	61	15
62	34	63	60	64	45	65	37
73	15	74	90	75	107	76	218
77	60	89	25	91	64	92	230
93	15	104	320	105	25	119	17
120	122	121	11	150	1000	151	80
152	9	165	176	166	16	167	1

Рис. 13.75

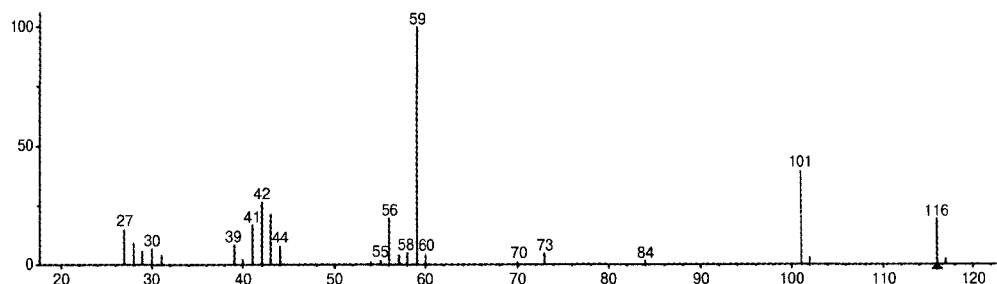
Задача 13.76. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.76.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	22	30	240	37	40	38	39
39	42	49	36	50	232	51	268
52	69	61	15	62	43	63	82
64	59	73	19	74	97	75	400
76	221	90	270	91	35	99	34
100	12	102	1000	103	79	118	128
132	20	148	360	149	28	150	2,6

Рис. 13.76

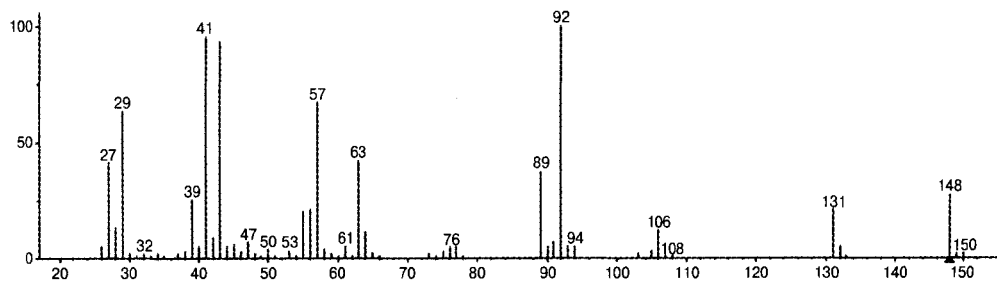
Задача 13.77. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.77.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	144	28	87	29	52	30	64
31	39	39	78	40	17	41	165
42	261	43	211	44	73	55	14
56	193	57	36	58	49	59	1000
60	36	73	43	84	14	101	390
102	27	116	190	117	22	118	0,72

Рис. 13.77

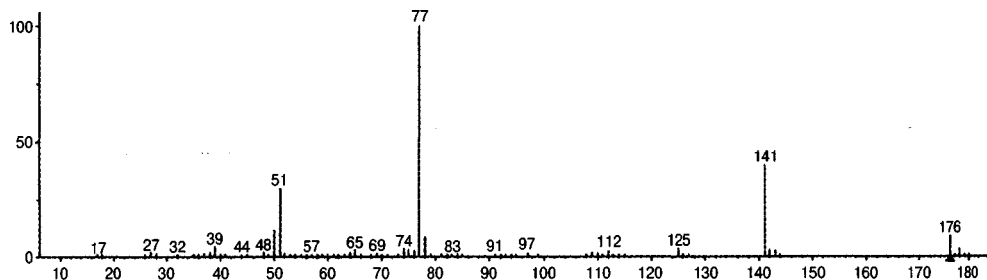
Задача 13.78. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.78.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	400	28	140	29	400	30	10
32	20	34	30	38	40	39	300
40	60	41	900	42	190	43	1000
44	50	45	50	46	30	47	20
50	40	55	190	56	370	57	870
58	50	59	40	60	20	61	30
63	420	64	70	65	20	73	20
75	30	76	40	77	110	78	20
89	910	90	60	91	60	92	110
93	10	94	10	106	870	107	40
108	40	131	30	132	20	148	300
149	30	150	20				

Рис. 13.78

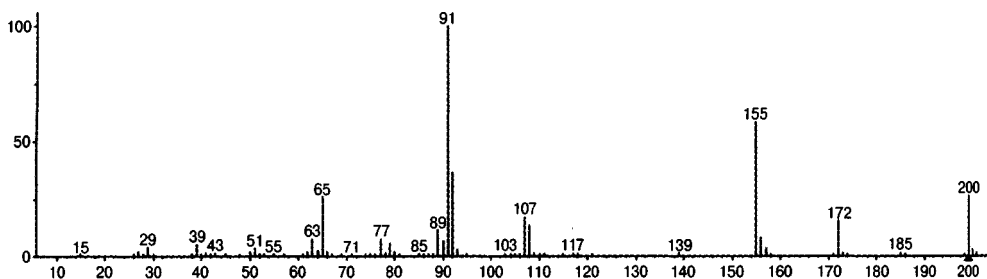
Задача 13.79. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.79.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	20	28	15	37	11	38	18
39	43	48	16	50	111	51	293
52	15	64	19	65	29	69	12
74	32	75	26	76	25	77	1000
78	84	97	12	109	19	110	13
112	21	125	32	141	393	142	28
143	21	176	87	177	6	178	31
179	2	180	1				

Рис. 13.79

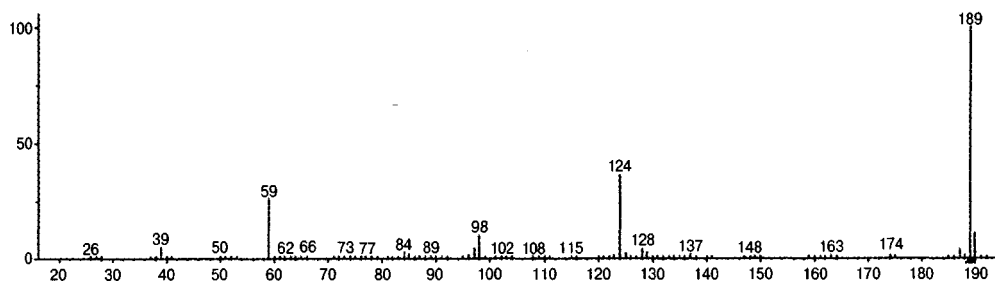
Задача 13.80. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.80.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
29	36	39	48	41	13	43	12
50	18	51	31	62	19	63	75
64	24	65	260	66	16	77	73
78	15	79	54	80	18	89	113
90	65	91	1000	92	360	93	29
107	167	108	133	109	11	139	12
155	580	156	78	157	33	172	153
173	14	174	8	185	13	199	8
200	259	201	28	202	14		

Рис. 13.80

Задача 13.81. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.81.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
39	46	59	257	65	10	84	26
85	16	96	11	97	45	98	99
123	11	124	361	125	23	128	36
129	21	137	16	174	14	187	37
188	14	189	1000	190	110	191	6

Рис. 13.81

Задача 13.82. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.82.

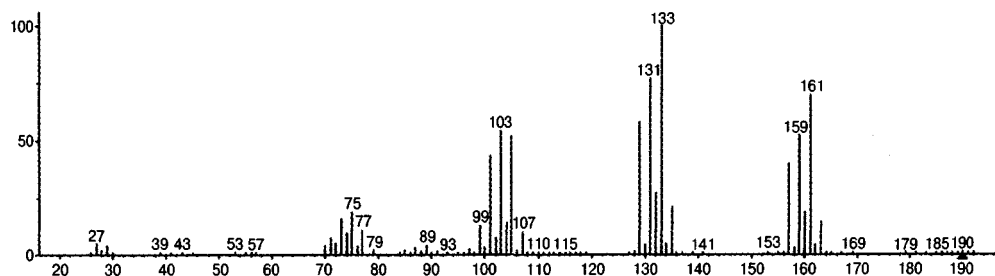
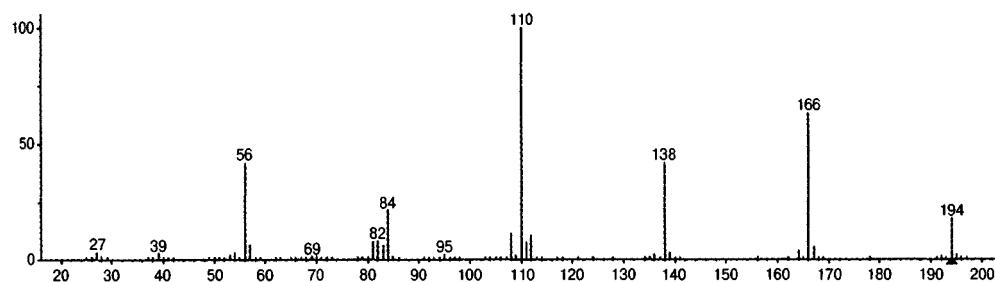


Рис. 13.82

Задача 13.83. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ИЭ которого представлен на рис. 13.83.



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
27	30	28	12	39	28	51	10
53	17	54	27	56	413	57	61
69	12	70	14	81	73	82	76
83	59	84	213	95	18	110	1000
111	74	112	104	136	25	138	416
139	29	164	36	166	627	167	52
192	13	193	1				

Рис. 13.83

ГЛАВА 14

РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ

В главе приводятся решения не всех задач. В некоторых случаях решения очень просты. Для задач со многими вариантами разбирается ход решения для 1–2 примеров.

Задача 1. Можно рассмотреть только наиболее интенсивные пики в спектре. Это пики ионов с массами 60, 45, 43, 28 и 15. Самый тяжелый ион отражает массу всей молекулы, а остальные — массы наиболее устойчивых фрагментов. Таким образом, ион 45 образуется при потере молекулярным ионом 15 единиц массы, а ион 43 — 17 единиц. Учитывая, что отщепляться могут реальные радикалы и молекулы, вероятно, в первом случае отщепляется метильная группа, а во втором — гидроксильная группа. Следовательно, органическая молекула с массой 60 дальтон имеет в составе с одной стороны CH_3 , а с другой — OH группу. Общая масса этих фрагментов 32 дальтона. Вычитая 32 из 60, получаем массу неизвестного фрагмента, который, вероятно, находится в центре молекулы. Его масса — 28 дальтон. Пик с такой массой тоже есть в спектре. Перебирая с использованием таблицы Менделеева возможные варианты, получаем CO , C_2H_4 , NCH_2 и N_2 . Учитывая брутто-формулу соединения, получаем только один вариант — CO . Теперь соединяем три фрагмента в единое целое.

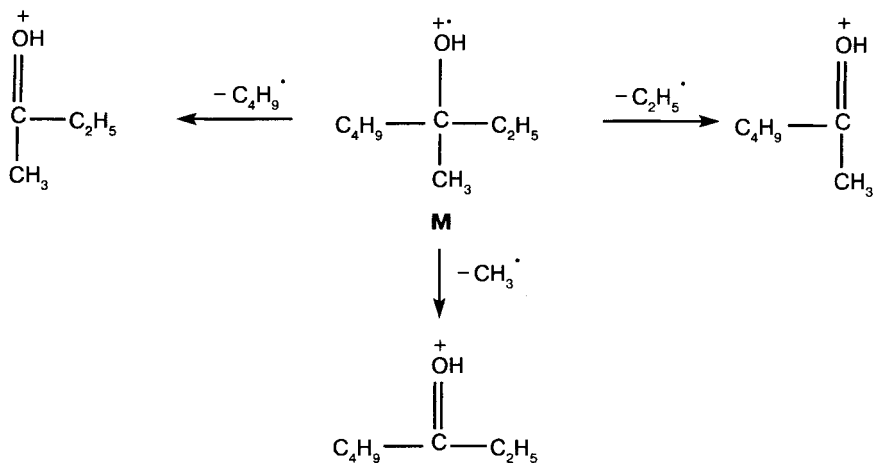
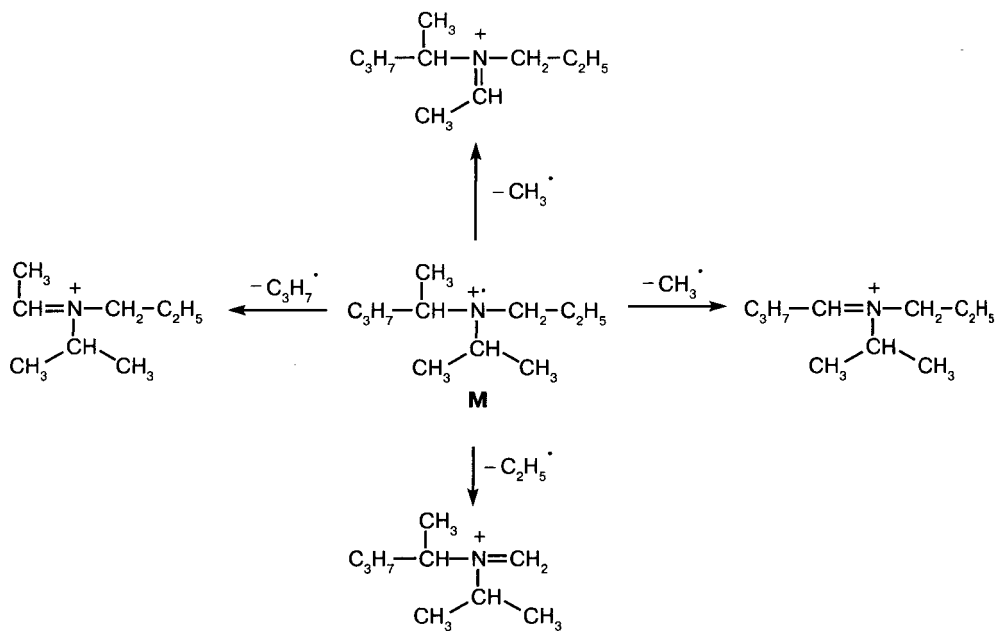
$\text{CH}_3\text{—CO—OH}$ — уксусная кислота.

Задача 3.1В. Основной первичный процесс распада аминов связан с расщеплением C—C связи между α - и β -атомами углерода любой из алкильных групп и сохранением заряда на атоме азота.

Как следует из представленной схемы, $\text{M}^{+\cdot}$ втор-пентилизопропилпропиламина может отщеплять этильный радикал пропильной группы, один из метильных радикалов изопропильной группы, метильный или пропильный радикалы втор-пентильной группы (схема 14.1). По правилу выброса максимального алкила наиболее интенсивный пик должен принадлежать иону $[\text{M—C}_3\text{H}_7]^+$, менее интенсивный — иону $[\text{M—C}_2\text{H}_5]^+$, а минимальный — иону $[\text{M—CH}_3]^+$. Следует, однако, учесть, что вероятность выброса метильного радикала увеличивается, поскольку могут отщепиться три разные метильные группы. Это приводит к увеличению интенсивности пика соответствующего иона.

Задача 3.1Д. Основной первичный процесс распада спиртов обусловлен расщеплением C—C связи между атомом углерода, связанным с гидроксильной группой, и атомами углерода любой из алкильных групп. Как следует из схемы 14.2, $\text{M}^{+\cdot}$ 3-метилгептанола-3 может элиминировать метильную, этильную или бутильную группы. Максимальную интенсивность будет иметь пик иона $[\text{M—C}_4\text{H}_9]^+$, меньшую — пик иона $[\text{M—C}_2\text{H}_5]^+$, а минимальную — пик иона $[\text{M—CH}_3]^+$. Поскольку все радикалы тривиальны, можно попытаться рассчитать интенсивности первичных ионов, учитывая, однако, что интенсивность пика иона $[\text{M—CH}_3]^+$ будет завышена.

Принимая интенсивность пика иона $[M-C_4H_9]^+$ (m/z 73) за 100%, получаем, что интенсивность пика иона $[M-C_2H_5]^+$ (m/z 101) будет примерно 72% ($73 \div 101 \times 100\%$), а интенсивность пика иона $[M-CH_3]^+$ (m/z 115) – примерно 63% ($73 \div 115 \times 100\%$).



Задача 3.2А. Катионный и радикальный центры на атоме серы диэтилсульфида приведут к двум типам реакций. Благодаря тенденции к спариванию электрона важную роль будет играть α -распад с отщеплением атома водорода или метильного радикала (схема 14.3). По правилу выброса максимального алкила интенсивность

пика иона $[M-H]^+$ будет значительно ниже интенсивности пика $[M-CH_3]^+$. Катионный центр инициирует гетеролитический распад по связи C—S, причем заряд может сохраняться и на углеводородном, и на серусодержащем фрагменте. Перегруппировочный процесс через четырехчленное переходное состояние с выбросом молекулы этилена может быть инициирован и радикальным, и катионным центром.

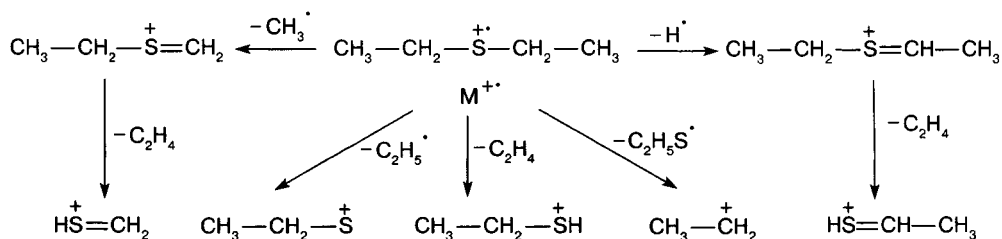


Схема 14.3

Задача 3.2Д. Радикальный центр, расположенный на атоме хлора (схема 14.4), вызовет α -распад с образованием катиона CH_2Cl^+ . Однако хлор мало активен в таких реакциях. Как следствие, интенсивность пика этого иона будет низка. Катионный центр на атоме хлора инициирует притяжение электронной пары связи C—Cl, гетероциклический разрыв этой связи и образование алкильного иона. Высокая активность атомов галогенов в подобных реакциях приведет к высокой интенсивности пика этого иона. Перегруппировочный процесс с переносом атома водорода и отщеплением молекулы хлористого водорода приведет к образованию нечетноэлектронного алкенового иона.

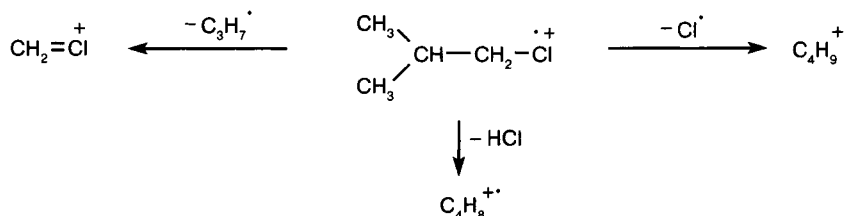


Схема 14.4

Задача 3.3А. Молекулярные ионы всех альдегидов с незамещенным α -углеродным атомом в результате перегруппировки Мак-Лафферти распадаются с образованием иона с m/z 44 (схема 14.5).

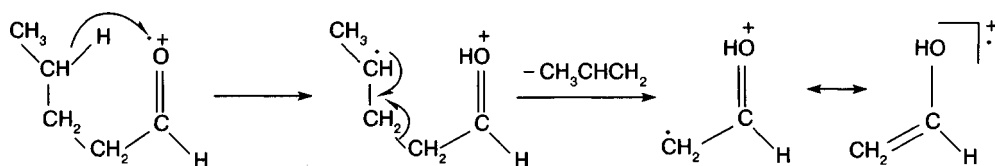


Схема 14.5

Задача 3.3Г. При фрагментации $M^{+\cdot}$ 3-метилпентанона-2 в результате перегруппировки Мак-Лафферти (схема 14.6) образуется катион-радикал енольной формы метилэтилкетона и молекула этилена. Обратный вариант с образованием катион-радикала этилена и отщеплением енольной формы метилэтилкетона практически не реализуется, поскольку ЭИ енола ниже, чем ЭИ этилена на ~ 1 эВ.

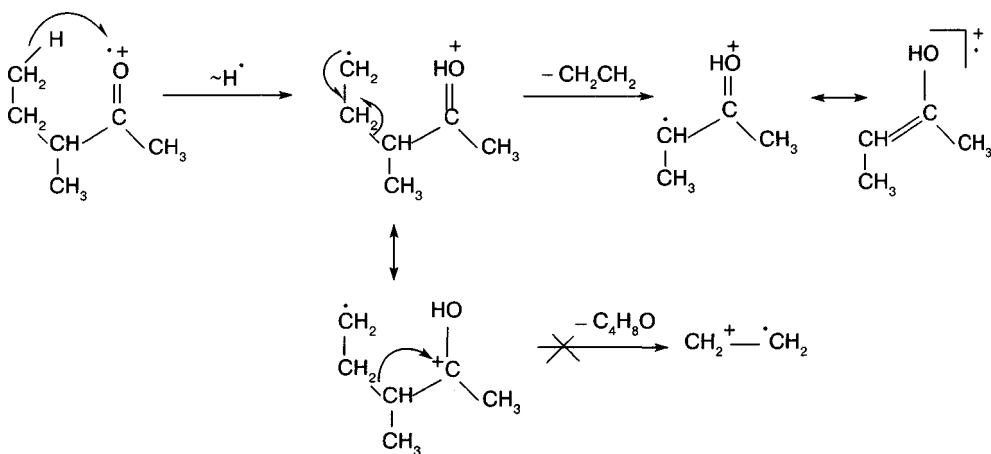


Схема 14.6

Задача 3.4В. Для протекания перегруппировки Мак-Лафферти необходима миграция атома водорода от γ -атома углерода. В молекуле гептен-5-она-2 γ -атом углерода имеет sp^2 -гибридизацию. Связь C—H в этом случае значительно прочнее, чем для sp^3 -гибридизованного углерода. В результате конкурентоспособность перегруппировки резко падает (схема 14.7).

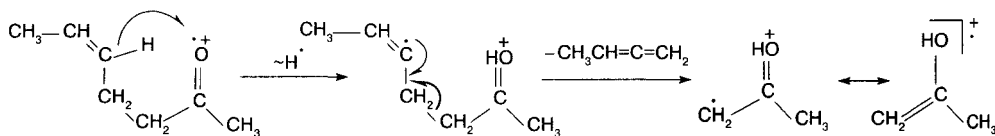


Схема 14.7

Задача 4.1. Во всех случаях, поскольку рассматриваемый ион заведомо имеет максимальную массу, а его элементного состава не приводится, можно рассмотреть только выбросы нейтральных частиц.

А) Представленные фрагменты могут быть обусловлены выбросами следующих частиц: 129 — $[M-1] - [M-H]^+$, 115 — $[M-15] - [M-CH_3]^+$, 113 — $[M-17] - [M-OH]^+$, 102 — $[M-28] - [M-CO]^+$, или $[M-N_2]^+$, или $[M-C_2H_4]^+$, 101 — $[M-29] - [M-HCO]^+$, или $[M-C_2H_5]^+$, или $[M-H, -N_2]^+$, 97 — $[M-33] - [M-SH]^+$, или $[M-CH_3, -H_2O]^+$. Следовательно, ион 130 может быть молекулярным.

В) Ионы с массами 78 и 77 образоваться из иона 100 не могут, так как отщепление 22 и 23 атомных единиц массы невозможно. Следовательно, ион с массой 100 не молекулярный.

Задача 4.2. В отличие от предыдущей задачи, наличие брутто-формулы позволяет, помимо выбросов нейтральных частиц, установить степень ненасыщенности иона, а также проверить, является ли он нечетноэлектронным.

Б) Прежде всего, рассчитываем степень ненасыщенности. $R = 12 - 7,5 + 1 = 5,5$. Следовательно, ион четноэлектронный и молекулярным быть не может. Можно проверить выбросы нейтральных частиц, но ответ на вопрос уже получен.

В) Рассчитываем степень ненасыщенности. $R = 8 - 6 + 1 = 3$. Ион нечетноэлектронный, т.е. этот критерий позволяет считать его молекулярным. Теперь необходимо проверить выбросы нейтральных частиц. $C_8H_{11} - [M-H]^+$, $C_7H_9 - [M-CH_3]^+$, $C_6H_{12} - [M-24] - ?!$ Такой процесс невозможен, следовательно, ион C_8H_{12} молекулярным быть не может.

Л) Рассчитываем степень ненасыщенности. $R = 8 - 6,5 + 1,5 + 1 = 4$. Следовательно, по этому критерию наиболее тяжелый ион в последовательности ($C_8H_{13}N_3O_2$) может быть молекулярным. Массы всех остальных ионов ниже, чем у M^{++} , и не попадают в запрещенные интервалы. Однако ион $C_7H_{10}NO_3$ содержит три атома кислорода, т.е. по четвертому критерию (разд. 4.1) приведенный в последовательности ион с максимальной массой не является молекулярным.

Задача 4.3А. Для расчета пятого пика ($M+8$) изотопной серии в случае соединения с пятью атомами хлора необходимо вычислить пятый член формулы биномиального разложения для $a = 1$; $b = 0,325$; $n = 5$.

$$\frac{n(n-1)(n-2)(n-3)a^{n-4}b^4}{4!} = \frac{5 \times 4 \times 3 \times 2 \times 1^1 \times 0,325^4}{24} = 0,056.$$

Таким образом, интенсивность пика $M+8$ будет составлять 5,6% от интенсивности M .

Задача 4.4Г. Простейший расчет интенсивностей для мультиплета молекулярного иона соединения с двумя атомами хлора и тремя атомами брома можно провести следующим образом.

Пять атомов $A+2$ элементов дадут шесть сигналов в мультиплете.

Два атома хлора $(3+1)^2$ дадут триплет с соотношением 9 : 6 : 1.

Три атома брома $(1+1)^3$ дадут квартет с соотношением 1 : 3 : 3 : 1.

Перемножая матрично одно на другое, получаем:

$$\begin{array}{r} (9 : 6 : 1) \times (1 : 3 : 3 : 1) = 9 : 6 : 1 \\ 27 : 18 : 3 \\ 27 : 18 : 3 \\ 9 : 6 : 1 \\ \hline 9 : 33 : 46 : 30 : 9 : 1 \end{array}$$

Таким образом, соотношение интенсивностей пиков ионов M , $M+2$, $M+4$, $M+6$, $M+8$ и $M+10$ будет 9 : 33 : 46 : 30 : 9 : 1.

Задача 4.5. Для решения задач удобно использовать данные табл. 4.2 либо механически делить интенсивность пика $M+1$ на 1,1 и проверять полученное число атомов углерода по интенсивности пика $M+2$ (табл. 4.2). При этом необходимо

помнить об азотном правиле и о возможном присутствии $A+2$ элементов. Если в задаче интенсивность M^{++} не 100%, необходимо самостоятельно осуществить нормирование на 100%. Не стоит ожидать также абсолютного совпадения рассчитанных и реальных интенсивностей пиков в спектре.

а) Для определения числа атомов углерода делим интенсивность пика иона $M+1$ на 1,1 (7,8 : 1,1 ~ 7). Для соединения с семью атомами углерода интенсивность пика $M+2$ должна составить 0,25% (табл. 4.2), что примерно соответствует значению, приведенному в задаче. Следовательно, в молекуле соединения семь атомов углерода.

г) Присутствие в спектре пика иона $M+2$ (m/z 136) с интенсивностью 33% от M (m/z 134) означает, что соединение содержит один атом хлора (табл. 4.1). Интенсивность пика $M+1$ делим на 1,1. Получаем $n = 6$. Наличие атома хлора маскирует долю интенсивности пика $M+2$, обусловленную одновременным присутствием двух атомов ^{13}C в молекуле. В связи с этим для проверки нельзя воспользоваться интенсивностью пика $M+2$ (табл. 4.2). Тем не менее проверить результат можно по интенсивности пика $M+3$, обусловленного ионом, содержащим по одному изотопу ^{13}C и ^{37}Cl . Для соединения с одним атомом хлора и шестью атомами углерода его интенсивность должна составлять 1/3 от интенсивности пика $M+1$ или 6,6% от интенсивности пика $M+2$.

2,1/6,6 ~ 0,32; 2,1/33 ~ 0,064, т.е. совпадение вполне удовлетворительное.

Таким образом, соединение содержит шесть атомов углерода.

м) Пик молекулярного иона имеет интенсивность 33%. Принимаем эту величину за 100% и нормируем интенсивности остальных пиков по M^{++} . Получаем новую последовательность: M^{++} (m/z 107) – 100%, $M+1$ (m/z 108) – 8,1%, $M+2$ (m/z 109) – 0,24%. Поскольку молекулярная масса нечетная, вещество содержит нечетное число атомов азота. Делим интенсивность пика $A+1$ на 1,1. Получаем ~7,4. Скорее всего, соединение имеет семь атомов углерода в молекуле, но на всякий случай проверим варианты 8 и 6. Если атомов углерода восемь, их масса 96. На другие элементы остается 11 дальтон. Азот уже не подходит, а без азота масса не может быть нечетной. Если атомов углерода шесть, их масса 72. На другие элементы остается 35. В этом случае должен быть один атом азота. Оставшиеся 21 единицы массы могут быть обусловлены составами OH_5 или FN_2 . Тогда полный состав будет $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}$ или $\text{C}_6\text{H}_2\text{NF}$. Проверим их по интенсивности пика $M+2$. Шесть атомов углерода дадут интенсивность 0,18%. Азот и фтор не имеют изотопов $A+2$. Присутствие изотопа ^{18}O приведет к увеличению интенсивности этого пика на 0,2%. Таким образом, для состава $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}$ интенсивность пика $M+2$ должна быть 0,38%, что заметно выше 0,24%, а рассчитанная интенсивность пика $M+1$ должна быть 6,6 + 0,4 = 7,0, что ниже значения, приведенного в условии задачи (8,1). Для состава $\text{C}_6\text{H}_2\text{NF}$ интенсивность пика $M+1$ должна быть тоже 7,0%, а пика $M+2$ – 0,18%. Это несколько ближе к условиям задачи.

Если в молекуле семь атомов углерода, их масса 84. Оставшиеся 23 единицы массы могут быть обусловлены только азотом и водородом. Состав $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}$. Интенсивность пика $M+1$ должна быть 8,1, что точно соответствует условию, а интенсивность пика $M+2$ – 0,25%, что вновь практически совпадает с условием. Следовательно, в качестве наиболее вероятного решения выбираем последнее. Вещество содержит семь атомов углерода.

Задача 4.6. Для решения задач удобно использовать данные табл. 4.2. При этом необходимо помнить об азотном правиле и о возможном присутствии A+2 элементов. Если в задаче интенсивность M^{++} не 100%, необходимо самостоятельно осуществить нормирование на 100%. Не стоит ожидать также абсолютного совпадения рассчитанных и реальных интенсивностей пиков в спектре.

а) Поскольку интенсивность пика M+2 составляет только 0,4% от M^{++} , вещество не содержит атомов серы, кремния, хлора и брома, но может содержать один или два атома кислорода. По интенсивности пика M+1 определяем число атомов углерода в молекуле: $7,7/1,1 = 7$. Семь атомов углерода дадут интенсивность пика M+2 0,2% (табл. 4.2). Еще 0,2% интенсивности пика M+2 должны быть обусловлены одним атомом кислорода. Масса семи атомов углерода и одного атома кислорода 100. Оставшиеся 8 единиц массы могут быть обусловлены только атомами водорода. Следовательно, брутто-формула — C_7H_8O .

б) Интенсивность пика M+2 составляет только 0,1% от интенсивности M. Это означает, что вещество не содержит атомов серы, кремния, хлора и брома и маловероятно, что содержит один атом кислорода. Масса соединения нечетная, следовательно, в составе нечетное число атомов азота. Учитывая массу соединения, число атомов азота может быть один или три. Азот — A+1 элемент. Это надо помнить при подсчете числа атомов углерода по пику M+1. Делим 5,9 на 1,1. Получаем 5,37. Шесть атомов углерода даже с одним атомом азота не проходят по массе. Пять атомов углерода и один атом азота дадут интенсивность пика M+1 равную $1,1 \times 5 + 0,4 = 5,9$, что точно соответствует условию задачи. Интенсивность пика M+2 в этом случае будет 0,1% (табл. 4.2), что вновь совпадает с величиной, приведенной в условии. Пять атомов углерода и один атом азота имеют суммарную массу 74. Оставшиеся 5 единиц массы — водород. Следовательно, брутто-формула соединения C_5H_5N .

Задача 4.7. Хотя в условии задачи требуется идентифицировать соединение по изотопным пикам молекулярного иона, на основании предоставленных данных можно установить лишь брутто-формулу соединения, т.е. решить задачу с точностью до изомера. Правда, в некоторых случаях решения оказываются однозначными. Обычно же для установления структурной формулы соединения необходима информация о фрагментных ионах. Для решения удобно использовать данные табл. 4.2. При этом необходимо помнить об азотном правиле и о возможном присутствии A+2 элементов. Если в задаче интенсивность пика M не 100%, необходимо самостоятельно осуществить нормирование на 100%. Не стоит ожидать также абсолютного совпадения рассчитанных и реальных интенсивностей пиков в спектре.

а) Наличие пика M+2 с интенсивностью 98% от M позволяет сделать вывод о присутствии в молекуле атома брома (табл. 4.1). Учитывая, что по условию задачи ион с массой 94 молекулярный, можно легко установить массу остальной части молекулы: $94 - 79 = 15$. По пику M+1 (1,1%) можно сделать вывод о наличии одного атома углерода. Следовательно, состав соединения CH_3Br . В этом случае соединение определяется однозначно, так как не имеет изомеров.

в) Интенсивность 4,8% пика M+2 указывает на наличие в молекуле атома серы или кремния (табл. 4.1). Кремний, однако, можно отвергнуть, так как в противном случае интенсивности пика M+1 была бы больше, чем интенсивность пика M+2.

Следовательно, вещество содержит один атом серы. По пику $M+1$ можно сделать вывод об отсутствии в молекуле атомов углерода, так как его интенсивность (0,8%) обусловлена исключительно изотопом ^{33}S . Изотоп ^{34}S ответственен за 4,4% интенсивности пика $M+2$, следовательно, в составе соединения должен присутствовать еще $A+2$ элемент, которым может быть только кислород. На его долю приходится 32 единицы массы ($64 - 32 = 32$). Такая масса соответствует двум атомам кислорода. Эти атомы дадут прибавку 0,4% к интенсивности пика $M+2$, что полностью соответствует условию задачи ($4,4 + 0,4 = 4,8$). Следовательно, искомое вещество диоксид серы.

е) В данном случае прежде всего необходимо пронормировать интенсивности изотопных ионов на 100%. Получаем новый ряд: M (m/z 46) – 100%, $M+1$ (m/z 47) – 2,2%, $M+2$ (m/z 48) – 0,2%. По интенсивности пика $M+2$ можно сделать вывод о возможном присутствии одного атома кислорода. По пику $M+1$ находим, что в составе два атома углерода ($2,2 : 1,1 = 2$). Их вклад в интенсивность пика $M+2$ нулевой. По-видимому, пик $M+2$ обусловлен именно изотопом кислорода. В таком случае состав соединения $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$. Это может быть этиловый спирт или диметилвый эфир.

Задача 4.8. Для решения задач удобно использовать формулу биномиального разложения.

а) Два атома брома приводят к появлению пиков $M+2$ и $M+4$. Интенсивности этих пиков можно рассчитать по формуле квадрата суммы. Для простоты можно считать, что изотопы ^{79}Br и ^{81}Br имеют равную природную распространенность. Тогда $(1+1)^2 = 1 + 2 + 1$, т.е. соотношение пиков M , $M+2$ и $M+4$ будет 1 : 2 : 1. Молекулярная масса дибромметана равна 172 дальтона (по ^{79}Br), следовательно, пики с m/z 172, 174 и 176 будут иметь интенсивности 50%, 100% и 50%. Кроме того, в молекуле присутствует один атом углерода. Каждый из трех указанных пиков будет сопровождаться пиком иона с массой на единицу больше, обусловленный изотопом ^{13}C , с интенсивностью 1,1% от интенсивности предшествующего пика, содержащего изотоп ^{12}C . Общая картина будет следующей: 172 (50%), 173 (0,5%), 174 (100%), 175 (1,1%), 176 (50%), 177 (0,5%).

г) В случае сероуглерода расчет несколько сложнее в связи с изотопом ^{33}S . Начать расчет следует с пиков $M+2$ и $M+4$. Будем считать, что природное соотношение изотопов ^{32}S к ^{34}S составляет 25:1 или 1:0,044. Для упрощения не будем принимать в расчет изотоп ^{36}S , природная распространенность которого составляет лишь 0,11% (табл. 4.1). По формуле квадрата суммы получаем $(1 + 0,044)^2 = 1 + 0,088 + 0,0019$. Таким образом, интенсивности пиков M , $M+2$ и $M+4$ будут 100%, 8,8% и 0,2% соответственно. Теоретически в интенсивность пика $M+2$ будет вносить вклад пик иона $^{13}\text{C}^{33}\text{S}^{32}\text{S}$, однако его вклад составит $0,008 \times 0,011 \times 2 = 0,000176$, т.е. менее 0,02%. Еще меньшим окажется вклад пика иона $^{13}\text{C}^{33}\text{S}^{34}\text{S}$ в интенсивность пика $M+4$. Поэтому этими вкладами можно пренебречь. Для расчета интенсивностей пиков $M+1$, $M+3$ и $M+5$ необходимо учесть вклад изотопов ^{13}C и ^{33}S . Интенсивность пика $M+1$ за счет двух атомов ^{33}S составит 1,6% от M , а за счет одного атома ^{13}C – 1,1% от M , т.е. суммарная интенсивность пика $M+1$ будет 2,7%. Интенсивность пика $M+3$ будет 2,7% от интенсивности пика $M+2$, т.е. $8,8\% \times 0,027 = 0,16\%$. Аналогично, интенсивность пика $M+5$ будет 2,7% от интенсивности пика $M+4$, т.е. $0,2\% \times 0,027 = 0,0054\%$. Эта величина слишком мала для надежного детектирования.

В результате кластер пиков молекулярного иона будет выглядеть следующим образом: 76 (100%), 77 (2,7%), 78 (8,8%), 79 (0,2%), 80 (0,2%).

Задача 4.9. В отличие от предыдущих задач молекулярный ион не обязательно оказывается первым в ряду представленных ионов. Пики более легких ионов образуются за счет выброса атомов или молекул водорода из $M^{+\cdot}$. Если в задаче интенсивность пика M не 100%, необходимо самостоятельно осуществить нормирование на 100%. Не стоит ожидать также абсолютного совпадения рассчитанных и реальных интенсивностей пиков в спектре.

а) Два первых иона серии (m/z 94 и m/z 95) не могут быть молекулярными, поскольку интенсивность пика иона с m/z 96 слишком велика, чтобы ее можно было объяснить тяжелым изотопом какого-нибудь элемента. Не может быть молекулярным и ион с m/z 97. В этом случае аномально интенсивным оказался бы пик иона $[M-H]^+$. Такое соотношение интенсивностей пиков ионов $M^{+\cdot}$ и $[M-H]^+$ в масс-спектрометрии органических соединений не встречается. Следовательно, единственным кандидатом в молекулярные ионы остается ион с m/z 96. Интенсивность пика $M+2$ составляет 0,2% и указывает на отсутствие в составе молекулы атомов хлора, брома, серы и кремния. Интенсивность пика $M+1$ составляет 6,5%, что приблизительно соответствует шести атомам углерода. Можно уточнить интенсивность пика $M+1$, если учесть поправку, обусловленную ионом $[M-H]^+$. Интенсивность пика этого фрагмента 7,1%. Учитывая, что в молекуле шесть атомов углерода, изотопный пик этого фрагмента с целочисленной массой равной массе $M^{+\cdot}$ будет иметь интенсивность 0,47%. Это означает, что интенсивность пика самого $M^{+\cdot}$ составляет 99,53%. Для точного учета интенсивностей пиков изотопных ионов необходимо нормировать приведенные в задаче интенсивности пиков на 100%, однако, поскольку различия в этом случае будут крайне малы (на уровне ошибки измерений), эту процедуру можно не проводить.

Итак, по интенсивности пика $M+1$ сделан вывод о присутствии в молекуле шести атомов углерода. Пользуясь данными табл. 4.2, устанавливаем, что интенсивность пика $M+2$ в этом случае должна составлять 0,18%, что точно соответствует условию задачи. Одновременно это означает, что в молекуле отсутствуют атомы кислорода, а также другие $A+1$ и $A+2$ элементы. Масса шести атомов углерода 72 дальтона. Оставшиеся 24 атомные единицы массы приходятся на A элементы. На основании данных табл. 4.1 можно сделать вывод, что единственным приемлемым вариантом является один атом фтора и пять атомов водорода. Следовательно, состав молекулы C_6H_5F . Это ответ задачи. В данном случае можно попытаться идентифицировать соединение. Учитывая, что максимальный пик в спектре обусловлен молекулярным ионом, можно предположить, что речь идет об ароматическом соединении — фторбензоле.

ж) Как и в задаче 7.9а, устанавливаем, что молекулярным ионом может быть только ион с m/z 129. Остальные варианты нереальны, поскольку этот ион имеет доминирующий пик в спектре и не может быть ни изотопным к более легким, ни фрагментным к более тяжелым. Интенсивность пика $M+2$ составляет 0,5% и указывает на отсутствие в составе молекулы атомов хлора, брома, серы и кремния. Интенсивность пика $M+1$ составляет 10%, что приблизительно соответствует де-

вяти атомам углерода. Можно уточнить интенсивность пика $M+1$, если учесть поправку, обусловленную ионом $[M-N]^+$. Интенсивность пика этого фрагмента 16%. Учитывая, что в молекуле девять атомов углерода, изотопный пик этого фрагмента с целочисленной массой равной массе M будет иметь интенсивность 1,6%. Это означает, что интенсивность пика самого M составляет 98,4%. Для точного учета интенсивностей пиков изотопных ионов необходимо нормировать приведенные в задаче интенсивности пиков на 100%. Интенсивность пика $M+1$ будет 10,2%, а пика $M+2$ не изменится. Нечетная масса M указывает на присутствие нечетного числа атомов азота. Рассмотрим несколько вариантов.

Пусть в молекуле девять атомов углерода и один атом азота. Они составят 122 дальтона. Оставшиеся девять единиц массы могут быть обусловлены только водородом. Состав соединения C_9H_7N . Интенсивность пика $M+2$ в этом случае 0,44% (табл. 4.2), что примерно соответствует условию задачи. Вариант с девятью атомами углерода и тремя атомами азота не проходит по массе.

Возможно, что в молекуле восемь атомов углерода, а интенсивность пика $M+1$ выше теоретической за счет протекания ионно-молекулярных реакций. Вариант с тремя атомами азота вновь не проходит по массе. Если в молекуле восемь атомов углерода и один атом азота, их общая масса 110 дальтон. Оставшиеся 19 единиц массы могут быть обусловлены либо атомом фтора, либо тремя атомами водорода и одним атомом кислорода. Оба эти варианта маловероятны с химической точки зрения.

Можно рассматривать более экзотические варианты с пятью или семью атомами азота. Тем не менее состав соединения C_9H_7N представляется наиболее вероятным и соответствует хинолину.

Задача 4.10а. Для расчета используем подход, изложенный в разд. 4.2.3 (табл. 14.1). Ион с m/z 120 может быть обусловлен только немеченным ацетофеноном. Поскольку интенсивность пика этого иона 15%, будем считать, что в смеси 15 частей немеченного соединения. Исходя из этого, рассчитаем интенсивности пиков ионов с m/z 121 и 122, обусловленных изотопными ионами немеченного соединения. Поскольку чистое (100 частей) немеченное соединение (табл. 4.2) характеризуется следующим спектром 120 (100%), 121 (8,8%), 122 (0,54%), то 15 частей дадут 120 (15,0%), 121 (1,32%), 122 (0,08%). Именно эти цифры представлены во втором ряду табл. 14.1. В третьем ряду (Остаток 1) представлен спектр образца после вычета вклада немеченного соединения. Теперь необходимо оценить долю монодейтерированного ацетофенона. Интенсивность 30,68 пика с m/z 121 обусловлена ионом M этого соединения. Рассчитаем интенсивности изотопных пиков для такой доли этого продукта. Получим следующий ряд: 121 (30,68%), 122 (2,70%), 123 (0,17%). Вновь проводим вычитание этих интенсивностей из спектра (Остаток 1) и получаем Остаток 2, т.е. спектр, обусловленный только соединениями с двумя и тремя атомами дейтерия в молекуле. Повторяем эту процедуру еще дважды и получаем Остаток 4. Здесь получаем интенсивность 0,03 для иона 124 и отрицательный пик (0,02) для иона 125. Эти цифры соответствуют уровню ошибки измерения. Таким образом, мы получили следующий ряд: d_0 — 15 частей, d_1 — 30,68 части, d_2 — 47,22 части, d_3 — 95,67 части. Принимая сумму изотопомеров за 100%, получаем доли каждого: d_0 — 8,0%, d_1 — 16,3%, d_2 — 25,0%, d_3 — 50,7%.

Таблица 14.1. Расчет доли молекул ацетофенона с различным содержанием атомов дейтерия

Изотопномер	m/z 120	m/z 121	m/z 122	m/z 123	m/z 124	m/z 125
Спектр	15,0	32,0	50,0	100	8,7	0,5
d_0	15,0	1,32	0,08	—	—	—
Остаток 1	—	30,68	49,92	100	8,7	0,5
d_1	—	30,68	2,70	0,17	—	—
Остаток 2	—	—	47,22	99,83	8,7	0,5
d_2	—	—	47,22	4,16	0,25	—
Остаток 3	—	—	—	95,67	8,45	0,5
d_3	—	—	—	95,67	8,42	0,52
Остаток 4	—	—	—	—	0,03	—0,02

Задача 4.11а. Для расчета используем подход, изложенный в разд. 4.2.3 (табл. 14.2). Интенсивность пика иона $[M-H]^+$ составляет менее 1% от интенсивности пика M^{++} , т.е. ею можно пренебречь. Ион с m/z 124 может быть обусловлен только немеченным *para*-метоксифенолом. Поскольку интенсивность пика этого иона 30%, будем считать, что в смеси 30 частей немеченного соединения.

Таблица 14.2. Расчет доли молекул *para*-метоксифенола с различным содержанием атомов дейтерия

Изотопномер	m/z 124	m/z 125	m/z 126	m/z 127	m/z 128	m/z 129
Спектр	30,0	60,0	80,0	100	7,7	0,6
d_0	30,0	2,31	0,2	—	—	—
Остаток 1	—	57,69	79,8	100	7,7	0,6
d_1	—	57,69	4,44	0,37	—	—
Остаток 2	—	—	75,36	99,63	7,7	0,6
d_2	—	—	75,36	5,8	0,49	—
Остаток 3	—	—	—	93,83	7,21	0,6
d_3	—	—	—	93,83	7,22	0,61
Остаток 4	—	—	—	—	—0,01	—0,01

Исходя из этого, рассчитаем интенсивности пиков ионов с m/z 125 и 126, обусловленных изотопными ионами немеченного соединения. Поскольку чистое (100 частей) немеченное соединение (табл. 4.2) характеризуется следующим спектром: 124 (100%), 125 (7,7%), 126 (0,65%), то 30 частей дадут 124 (30,0%), 121 (2,31%), 122 (0,2%). Именно эти цифры представлены во втором ряду табл. 14.2. В третьем ряду (Остаток 1) представлен спектр образца после вычета вклада немеченного соединения. Теперь необходимо оценить долю монодейтерированного *para*-метоксифенола. Интенсивность 57,69 пика с m/z 121 обусловлена пиком M этого соединения. Рассчитаем интенсивности изотопных пиков для такой доли этого продукта. Получим следующий ряд: 125 (57,69%), 126 (4,44%), 127 (0,37%). Вновь проводим вычитание этих интенсивностей из спектра (Остаток 1) и получаем Остаток 2, т.е. спектр, обусловленный только соединениями с двумя и тремя атомами дейтерия в молекуле. Повторяем эту процедуру еще дважды и получаем Остаток 4. Здесь получаем отрицательный пик (—0,01) для иона 128 и отрицательный пик (—0,01) для иона 129. Эти цифры соответствуют уровню ошибки измерения. Таким образом, мы получили следующий ряд: d_0 — 30 частей, d_1 — 57,69 части, d_2 — 75,36 части, d_3 — 93,83 части. Принимая сумму изотопномеров за 100%, получаем доли каждого: d_0 — 11,7%, d_1 — 22,5%, d_2 — 29,3%, d_3 — 36,5%.

Задача 4.12а. Для расчета используем подход, изложенный в разд. 4.2.3 (табл. 14.3). Интенсивность пика иона $[M-H]^+$ составляет менее 1% от интенсивности пика M^{+} , т.е. ею можно пренебречь. Ион с m/z 156 может быть обусловлен только немеченным 4-фтор-2-метоксианизолом. Поскольку интенсивность пика этого иона 20%, будем считать, что в смеси 20 частей немеченного соединения.

Таблица 14.3. Расчет доли молекул 4-фтор-2-метоксианизола с различным содержанием атомов дейтерия

Изотопмер	m/z 156	m/z 157	m/z 158	m/z 159	m/z 160
Спектр	20,0	100	12,0	1,0	0,02
d_0	20,0	1,76	0,15	—	—
Остаток 1	—	98,24	11,85	1,0	0,02
d_1	—	98,24	8,65	0,73	—
Остаток 2	—	—	3,20	0,27	0,02
d_2	—	—	3,20	0,28	0,02
Остаток 3	—	—	—	—0,01	—

Исходя из этого, рассчитаем интенсивности пиков ионов с m/z 157 и 158, обусловленных изотопными ионами немеченного соединения. Поскольку чистое (100 частей) немеченное соединение (табл. 4.2) характеризуется следующим спектром: 156 (100%), 125 (8,8%), 126 (0,74%), то 20 частей дадут 156 (30,0%), 157 (2,31%), 158 (0,2%). Именно эти цифры представлены во втором ряду табл. 14.3. В третьем ряду (Остаток 1) представлен спектр образца после вычета вклада немеченного соединения. Теперь необходимо оценить долю монодейтерированного 4-фтор-2-метоксианизола. Интенсивность 98,24 пика с m/z 157 обусловлена пиком M этого соединения. Рассчитаем интенсивности изотопных пиков для такой доли этого продукта. Получим следующий ряд: 157 (98,24%), 125 (8,65%), 126 (0,73%). Вновь проводим вычитание этих интенсивностей из спектра (Остаток 1) и получаем Остаток 2, т.е. спектр, обусловленный только молекулами с двумя атомами дейтерия. Повторяем эту процедуру еще раз и получаем Остаток 3. Здесь имеем лишь отрицательный пик (—0,01) для иона 159. Эта цифра соответствует уровню ошибки измерения. Таким образом, мы получили следующий ряд: d_0 — 20 частей, d_1 — 98,24 части, d_2 — 3,20 части. Принимая сумму изотопмеров за 100%, получаем доли каждого: d_0 — 16,5%, d_1 — 80,9%, d_2 — 2,6%.

Задача 4.13. Решать задачу удобно с помощью таблицы (разд. 4.2.3), учитывая, что кластер молекулярного иона чистого немеченного (табл. 4.2) дифторнафтилметилкетона имеет следующий вид: 206 (100%), 207 (13,2%), 208 (1,0%), 209 (0,03%).

Таблица 14.4. Расчет интенсивностей изотопных пиков в масс-спектре дейтерированного дифторнафтилметилкетона

Изотопмер	m/z 206	m/z 207	m/z 208	m/z 209	m/z 210	m/z 211	m/z 212
d_0	100	13,2	1,0	0,03	—	—	—
d_1	—	100	13,2	1,0	0,03	—	—
d_2	—	—	100	13,2	1,0	0,03	—
d_3	—	—	—	100	13,2	1,0	0,03
10% d_0	10,0	1,32	0,1	<0,01	—	—	—



Таблица 14.4 (окончание)

Изотопмер	m/z 206	m/z 207	m/z 208	m/z 209	m/z 210	m/z 211	m/z 212
20% d_1	—	20,0	2,64	0,2	<0,01	—	—
30% d_2	—	—	30,0	3,96	0,3	<0,01	—
40% d_3	—	—	—	40,0	5,28	0,4	0,01
$\sum d_0-d_3$	10,0	21,32	32,74	44,16	5,58	0,4	0,01
Нормализ. $\sum d_0-d_3$ (%)	22,6	48,3	74,1	100	12,5	0,7	0,02

Задача 4.14. Фторид, нитрил, амин.

Задача 4.15. Додекантиол, додеканол, додецен.

Задача 5.1. Прежде всего, необходимо определить заряды ионов. Для этой цели используем формулу (5.5). Ее можно применить к любой паре соседних ионов. Например, проводя расчет по паре ионов 951,8 и 883,8, получаем $n = (883,8 - 1)/(951,8 - 883,8) = 12,98$. Это означает, что ион 951,8 имеет заряд 13. Аналогично, делая расчет для пары ионов 825,0 и 883,8, получаем $n = 14,01$, т.е. ион 883,8 имеет заряд 14. Ион 825,0 имеет заряд 15 и т.д.

Теперь можно рассчитать молекулярную массу пептида по любому из этих ионов. Для этого используем формулу (5.4). Для иона 951,8 с зарядом 13 получаем $M = 13(951,8 - 1) = 12\,360,4$. Для иона 883,8 с зарядом 14 получаем 12 359,2. Для иона 825,0 с зарядом 15 — 12360,0. Желательно провести этот расчет для всех ионов в спектре и усреднить полученное значение.

Молекулярная масса цитохрома С (рис. 5.11) — 12360,2 дальтона.

Задача 7.1. Прежде всего, можно отметить высокое разрешение прибора по ионам-предшественникам при использовании в режиме МС/МС третьей или четвертой (Q_1) реакционной области. В таком режиме можно изучать и низкоэнергетические, и высокоэнергетические процессы. Использование для получения спектра ионов-продуктов второй реакционной области позволяет улучшить разрешение по этим ионам в режиме MIKES. Этот эффект наблюдается благодаря квадруполю, который суживает широкие пики ионов, прошедших через электростатический анализатор. Для записи спектров ионов-предшественников настраивают квадруполь на пропускание выбранных ионов-продуктов и сканируют напряженность магнитного поля, используя для активации соударением третью или четвертую реакционную область. Для записи спектров ионов, выбрасывающих идентичные нейтральные частицы, одновременно сканируют B и Q , при условии $B^2/Q = \text{const}$. Можно работать в режиме обычного секторного двухфокусного прибора BE, настроив квадруполи на пропускание всех ионов.

Помимо МС/МС экспериментов, прибор BEQQ позволяет работать в режиме тройной масс-спектрометрии (МС/МС/МС). Например, ионы m_1^+ пропускают через магнит. В камере соударений в реакционной области 2 они активируются и распадаются с образованием ионов-продуктов первого поколения. Электростатический анализатор настраивается на пропускание только ионов-продуктов m_2^+ . Эти ионы распадаются после активации в реакционной области 3 или 4, после чего сканирование квадруполя позволяет зарегистрировать спектр ионов-продуктов третьего поколения для m_1^+ (он же спектр ионов-продуктов для m_2^+).

Задача 10.1. а) Предпочтительные разрывы в $M^{+ \cdot}$ 4,10-диметилгексадекана будут происходить в местах разветвлений (схема 14.8). В алкановой серии ионов повышенными интенсивностями по сравнению с изомерным октадеканом нормального строения будут характеризоваться пики ионов $[M-C_3H_7]^+$ (m/z 211), $[M-C_6H_{13}]^+$ (m/z 169), $C_8H_{17}^+$ (m/z 113) и $C_5H_{11}^+$ (m/z 71). Три первые пика будут отчетливо выделяться среди пиков алкановой серии, характеризующихся экспоненциальным падением интенсивностей. Пик иона $C_5H_{11}^+$ (m/z 71) – один из наиболее интенсивных в спектрах алканов любого строения.

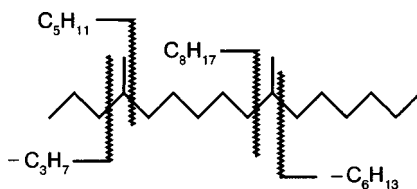


Схема 14.8

Задача 10.2. б) В спектре 4-метилдекана аномально высокую интенсивность среди пиков алкановой серии будут иметь ионы $[M-C_3H_7]^+$ и $C_5H_{11}^+$. Второй ион имеет массу 71 и не является характеристическим, поскольку его пик один из наиболее интенсивных в спектрах алканов любого строения. Тем не менее иногда интенсивность этого пика оказывается значительно выше пика иона 57. Это может служить указанием на наличие разветвления в соответствующем положении молекулы. В спектре 5-метилдекана аномально высокую интенсивность среди пиков алкановой серии будут иметь ионы $[M-C_4H_9]^+$ и $C_6H_{13}^+$. Помимо ионов алкановой серии, для различения изомеров можно использовать перегруппировочные нечетноэлектронные ионы. В первом случае в спектре будет отчетливо проявляться пик иона $[M-C_3H_8]^{+ \cdot}$, а во втором – $[M-C_4H_{10}]^{+ \cdot}$.

Задача 10.3. а) Пики нечетноэлектронных ионов имеют повышенную интенсивность в местах разветвлений углеродного скелета алканов. В случае 3,3-диметилгексана в спектре будут отчетливо проявляться два пика, обусловленные разрывами С–С связи у атома углерода C_3 . По правилу выброса максимального алкила интенсивность пика иона $[M-C_2H_5]^{+ \cdot}$ будет значительно ниже, чем пика иона $[M-C_5H_{11}]^{+ \cdot}$. Поскольку атом углерода C_3 имеет еще метильные радикалы, теоретически возможно отщепление метильной группы и молекулы метана. Однако конкурентоспособность этих процессов мала. Соответствующий пик нечетноэлектронного иона $[M-CH_4]^{+ \cdot}$ будет либо едва замечен либо вообще отсутствовать в спектре.

Задача 10.4. В спектре отчетливо видны повышенные интенсивности пиков ионов 84, 85, 154 и 155. Незначительный по интенсивности пик молекулярного иона все же позволяет установить молекулярную массу алкана – 212 дальтон. Таким образом, в спектре алкана брутто-формулы $C_{15}H_{32}$ наблюдаются характеристические ионы, связанные с расщеплением С–С связи у атома углерода C_5 . Следовательно, на рис. 10.3 представлен масс-спектр 5-метилтетрадекана.

Задача 10.5. Молекулярная масса алкана — 226, т.е. речь идет о диметилтетрадекане с брутто-формулой $C_{16}H_{34}$. В ряду пиков ионов алкановой серии аномально интенсивны пики ионов $[M-C_3H_7]^+$ с m/z 183 и $C_5H_{11}^+$ с m/z 71. Поскольку таких (аномальных) ионов всего два, речь идет о симметричном соединении или о соединении с двумя метильными группами у одного атома углерода. В первом случае единственным вариантом является 4,11-диметилтетрадекан. Второй случай невозможен, поскольку отщепление пропильного радикала означает разветвление у атома углерода C_4 . Однако наличие двух метильных групп у этого атома привело бы к образованию максимального по интенсивности пика фрагментного иона $C_6H_{13}^+$, а не $C_5H_{11}^+$. Таким образом на рис. 10.4 представлен спектр 4,11-диметилтетрадекана.

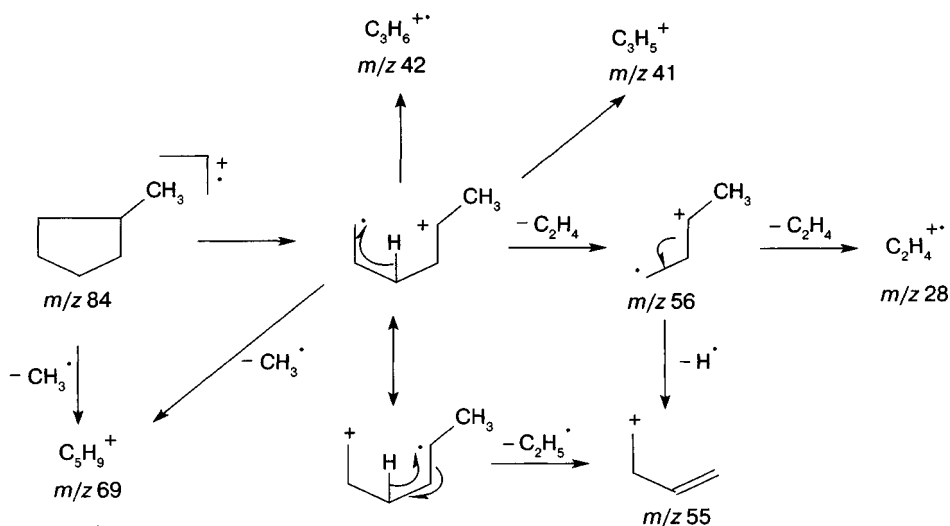
Задача 10.6. 4,8-Диметилундекан.

Задача 10.7. 7-Метилтридекан.

Задача 10.8. Для решения используем интенсивности пиков ионов характеристической для алкинов серии. Повышенную интенсивность будет иметь пик иона, образующийся по механизму, представленному на схеме 10.7. На рис. 10.10а повышенную интенсивность имеет ион с m/z 137, а на рис. 10.10б — ион с m/z 165. Следовательно, в первом случае приведен спектр тетрадецина-5, а во втором — тетрадецина-7.

Задача 10.9. Децин-3.

Задача 10.10. Основные направления фрагментации молекулярного иона метилциклопентана связаны с отщеплением метильного радикала (как экзоциклического, так и с участием атома углерода кольца), молекулы этилена и этильного радикала. Следует также отметить образование ионов $C_3H_6^{++}$, $C_3H_5^+$ и $C_2H_4^{++}$ (схема 14.9).



Задача 10.11. В спектре 10.15а интенсивность пика иона 68 примерно в два раза выше, чем пика иона 54. В спектре 10.15б соотношение интенсивностей прямо противоположно. Следовательно, на рис. 10.15б представлен спектр 4-метилциклогексена (ретродииеновый распад, схема 10.9). На рис. 10.15а представлен спектр 1-метил- или 3-метилциклогексена. Выбор между двумя этими изомерами неочевиден. Поскольку в случае 3-метилциклогексена метильная группа находится в аллильном положении, ее отщепление более благоприятно, чем в случае 1-метилциклогексена, когда она находится в винильном положении. Однако для такого выбора необходимо иметь спектры обоих изомеров.

Задача 10.12. а) Для пропилбензола основным первичным направлением распада будет бензильный разрыв с отщеплением этильного радикала и образованием иона тропилия ($C_7H_7^+$, m/z 91). Для изомерного кумола подобный процесс приводит к отщеплению метильного радикала и образованию иона $C_8H_9^+$. Кроме того, для первого соединения возможна перегруппировка Мак-Лафферти, протекающая через шестичленное переходное состояние и приводящая к нечетноэлектронному фрагменту с m/z 92. Для изопропилбензола подобный процесс не реализуется.

Задача 10.13. д) Фрагментация алкилзамещенных полициклических ароматических углеводородов протекает по тем же направлениям, что и углеводородов ряда бензола. Основные направления фрагментации 2-пропилнафталина представлены на схеме 14.10.

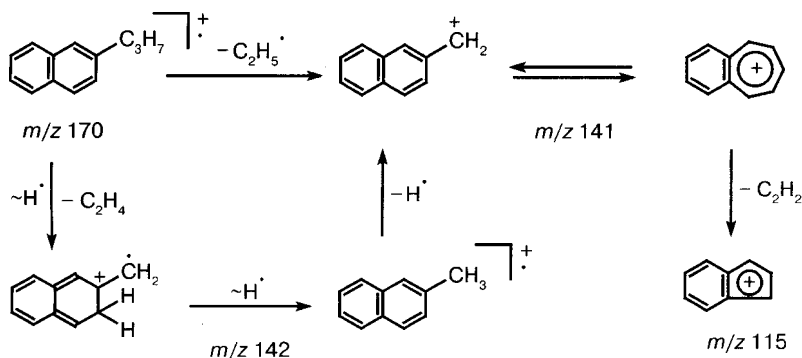


Схема 14.10

Задача 10.14. Уже по общему виду спектра можно сделать определенные предположения о природе соединения. Доминирующие в спектре пики ионов 91 и 92 с большой вероятностью свидетельствуют о том, что образец является монозамещенным (бензильным) ароматическим соединением. Ион 91 имеет строение тропилий-катиона, а ион 92 — строение молекулярного иона толуола. Высокая интенсивность пика иона 92, как правило, свидетельствует о неразветвленной цепи заместителя.

По кластеру молекулярного иона рассчитаем брутто-формулу соединения. Прежде всего, необходимо пронормировать интенсивности изотопных пиков на 100%. Получаем следующий ряд: 148 (100%), 149 (12,1%), 150 (0,68%). Невысокая интенсивность пика $M+2$ означает, что соединение не содержит $A+2$ элементов. Расчет

числа атомов углерода по пику $M+1$ дает 11 (12,1/1,1). Проверяя по табл. 4.2, какую интенсивность будет иметь пик $M+2$ в спектре соединения с 11 атомами углерода, получаем 0,67%, что практически совпадает с условием задачи. Следовательно, соединение содержит 11 атомов углерода, масса которых составляет 132 дальтона. Оставшиеся 16 единиц массы могут быть обусловлены только атомами водорода. Остальные варианты не имеют смысла. Брутто-формула соединения $C_{11}H_{16}$. Его степень ненасыщенности 4. Это соответствует алкилбензолу. Учитывая первоначальное наблюдение (ионы 91 и 92), можно сделать вывод, что соединение является пентилбензолом. Разветвление скелета амильного заместителя маловероятно. В случае 2-фенилпентана бензильный разрыв приводил бы к иону 105 (а не 91), а перегруппировка Мак-Лафферти была бы сильно подавлена. В случае 3-фенилпентана бензильный разрыв приводил бы к иону 119. Для 2-метил-1-фенилбутана перегруппировка Мак-Лафферти протекала бы значительно менее интенсивно, а в спектре присутствовал бы достаточно интенсивный пик иона 57. Однако его интенсивность в спектре составляет всего 2%. Несколько сложнее выбрать между нормальным пентилбензолом и изоамилбензолом. Тем не менее во втором случае в спектре должен был бы наблюдаться достаточно интенсивный пик иона 43 (разрыв углеродной цепи в месте разветвления). Поскольку пик этого иона в спектре отсутствует, можно сделать однозначное отнесение. Пентилбензол.

Задача 10.15. Этот процесс аналогичен описанному для случая дифенилметана (схема 10.13). Отщепление молекулярным ионом трифенилметана фенильной группы приводит к образованию устойчивого дифенилметильного иона, который может циклизироваться во флуоренил-катион с выбросом двух атомов водорода из *орто*-положений бензольных колец.

Задача 10.16. Столь высокая интенсивность пика молекулярного иона, доминирующего в спектре, характерна для полициклических ароматических соединений. Попробуем рассчитать брутто-формулу соединения по кластеру молекулярного иона. Интенсивность пика $M+2$ невысока, т.е. из $A+2$ элементов в составе молекулы может быть только кислород. Далее рассчитываем число атомов углерода. $15,8/1,1 = 14,4$. Скорее всего, соединение содержит 14 атомов углерода, но на всякий случай имеет смысл проверить варианты с 13 и 15 атомами. Если атомов углерода 15, их общая масса 180 дальтон, что больше молекулярной массы соединения. Если атомов углерода 14, единственным вариантом является соединение $C_{14}H_{10}$. Если атомов углерода 13, на долю других элементов приходится 22 атомных единицы массы. Поскольку присутствие одного атома азота невозможно (азотное правило), остаются варианты $C_{13}H_{22}$, $C_{13}H_6O$ и $C_{13}H_3F$. Последний вариант явно маловероятен. Проверим три приемлемых варианта по пику $M+2$. Для состава $C_{14}H_{10}$ его интенсивность должна составлять 1,10%, для состава $C_{13}H_{22}$ — 0,94%, а для состава $C_{13}H_6O$ — 1,14%. Наибольшие погрешности в интенсивностях изотопных пиков $M+1$ и $M+2$ наблюдаются для состава $C_{13}H_{22}$. Кроме того, учитывая, что степень ненасыщенности такого соединения 3, оно никак не может обладать столь стабильным молекулярным ионом. Оставшиеся два варианта характеризуются очень высокими величинами степени ненасыщенности (10 для $C_{14}H_{10}$ и 11 для $C_{13}H_6O$). Выбор между этими вариантами достаточно сложен. В спектре, помимо кластера

молекулярного иона и пиков ионов $[M-H]^+$ и $[M-2H]^{2+}$, присутствуют лишь три группы более или менее интенсивных пиков ионов. Первая группа (m/z 150–152), а также ионы $[M-H]^+$ и $[M-2H]^{2+}$ характерны для полициклических ароматических соединений (рис. 10.16). Группа пиков (m/z 88,89) обусловлена двухзарядными ионами M^{2+} и $[M-2H]^{2+}$, а группа пиков (m/z 75,76) – заряженными фрагментами бензольного кольца. Обе группы вновь характерны для полициклических ароматических соединений. Выбор легко можно было бы сделать, имея данные масс-спектрометрии высокого разрешения. Без такой подсказки остается попробовать нарисовать возможные структуры соединений состава $C_{13}H_6O$ и оценить основные направления их фрагментации. По типу фрагментации и по более точному совпадению интенсивностей пиков изотопных ионов можно сделать выбор в пользу состава $C_{14}H_{10}$. Такой состав среди ароматических полициклических углеводородов имеют антрацен и фенантрен. Выбор между этими изомерами только по спектру ИЭ невозможен. На рис. 10.20 представлен масс-спектр антрацена.

Задача 10.17. 2-Этилфенантрен.

Задача 10.18. а) Основной первичный процесс фрагментации M^{++} спиртов идет с расщеплением C–C связи между атомом углерода, связанным с гидроксильной группой, и атомами углерода любой из алкильных групп. Следовательно, M^{++} метилэтилпропилкарбинола может элиминировать метильную, этильную или пропильную группу. Максимальную интенсивность будет иметь пик иона $[M-C_3H_7]^+$, меньшую – пик иона $[M-C_2H_5]^+$, а минимальную – пик иона $[M-CH_3]^+$. Поскольку все радикалы тривиальны, можно рассчитать интенсивности первичных ионов, учитывая, однако, что интенсивность пика иона $[M-CH_3]^+$ будет завышена. Принимая интенсивность пика иона $[M-C_3H_7]^+$ (m/z 73) за 100%, получаем, что интенсивность пика иона $[M-C_2H_5]^+$ (m/z 87) будет примерно 84% ($73 \div 87 \times 100\%$), а интенсивность пика иона $[M-CH_3]^+$ (m/z 101) – примерно 72% ($73 \div 101 \times 100\%$).

Задача 10.19. а) Основной первичный процесс фрагментации M^{++} спиртов связан с расщеплением C–C связи между атомом углерода, связанным с гидроксильной группой, и атомами углерода алкильных групп. Для бутанола-1 первичными фрагментными ионами будут $[M-H]^+$ и $[M-C_3H_7]^+$, причем по правилу выброса максимального алкила интенсивность пика $[M-C_3H_7]^+$ будет значительно выше. Интенсивность пиков спиртовой серии $[M-C_2H_5]^+$ и $[M-CH_3]^+$ будет низка. В случае бутанола-2 первичными фрагментами будут $[M-H]^+$, $[M-CH_3]^+$ и $[M-C_2H_5]^+$, причем их интенсивность будет возрастать в указанной последовательности.

Задача 10.20. В этом случае определить элементный состав соединения по изотопным пикам не удастся, поскольку интенсивность предполагаемого молекулярного иона (m/z 60) низка. К тому же пик иона $[M-H]^+$ имеет равную интенсивность. Тем не менее простое деление интенсивности пика иона с m/z 61 на интенсивность пика иона с m/z 60 позволяет ориентировочно оценить, что в составе вещества три атома углерода. Поскольку молекулярная масса соединения невысока, интерпретация спектра не представляет большого труда.

Максимальный по интенсивности пик в спектре принадлежит иону с m/z 31. Этот ион – представитель характеристической спиртовой серии. Два другие иона

этой серии (m/z 45 и m/z 59) также представлены в спектре заметными пиками, причем важным фактом является значительно более высокая интенсивность более тяжелого. Ион с m/z 42 обусловлен отщеплением от M^{++} 18 единиц массы, т.е. молекулы воды. Можно предположить, что вещество является спиртом или простым эфиром с молекулярной массой 60 дальтон. Этому условию удовлетворяют только пропиловый и изопропиловый спирты, а также метилэтиловый эфир. В спектре эфира и изопропанола максимальный по интенсивности пик на основании правила выброса максимального алкила должен принадлежать иону $[M-CH_3]^+$. Однако ион с m/z 45 обладает пиком с интенсивностью ниже 2%. Кроме того, интенсивность пика с m/z 31 в спектрах этих соединений должна быть невелика. Пропанол, напротив, должен характеризоваться максимальным по интенсивности пиком иона с m/z 31, низкой интенсивностью пика иона с m/z 45 и заметным пиком иона с m/z 59. Представленный в задаче спектр полностью соответствует этим условиям. Следовательно, на рис. 10.32 представлен спектр пропанола.

Задача 10.21. б) 2-Метилциклогексанол и 4-метилциклогексанол можно легко различить по спектрам ИЭ. Перегруппировочный процесс с образованием наиболее устойчивого иона в первом случае приведет к двум фрагментам с m/z 57 и 71, а во втором – только фрагменту с m/z 57 (схема 14.11).

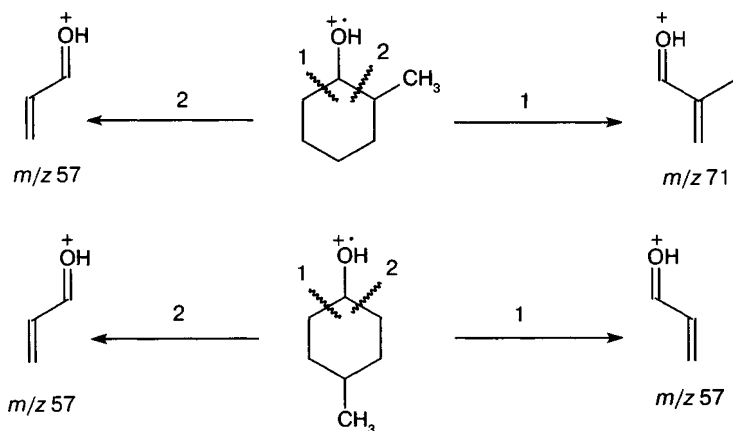


Схема 14.11

Задача 10.22. Попробуем установить молекулярный ион соединения. Наиболее тяжелый ион в спектре (m/z 140) не может быть молекулярным, поскольку не может обусловить образование фрагмента с m/z 129 (третье необходимое условие для молекулярного иона). Следовательно, M^{++} данного соединения нестабилен и в спектре ИЭ не проявляется. Молекулярные массы ундекана и деканала 156 дальтон, дещена-1 – 140 дальтон. Эти соединения не могут характеризоваться представленным на рис. 10.33 спектром. Остальные соединения, перечисленные в условии задачи, являются спиртами. Среди них только диэтилциклогексанол имеет молекулярную массу 156, а остальные спирты – 158 дальтон. Отщепление воды молекулярными ионами спиртов хорошо известный процесс. Вероятно, ион с m/z 140 обусловлен

именно этим процессом. Поэтому можно исключить из рассмотрения диэтилциклогексанол. Следовательно, соединение является жирным спиртом. Рассмотрим гомологическую спиртовую серию ионов. Максимальный пик в спектре принадлежит иону этой серии с m/z 59. Достаточно интенсивны также пики ионов с m/z 31 и m/z 129. Остальные ионы этой серии характеризуются пиками очень низкой интенсивности. Как известно, основной первичный процесс фрагментации $M^{+\cdot}$ спиртов связан с расщеплением C—C связи между атомом углерода, связанным с гидроксильной группой, и атомами углерода алкильных групп. Максимальной интенсивностью в случае деканола-2 и 3,4-диметилоктанола-2 должен обладать пик иона с m/z 45, в случае деканола-3 — пики ионов с m/z 59 и m/z 129, в случае деканола-1 и 7-метилнонанола-1 — пик иона с m/z 31, в случае 3-метилнонанола-3 — пики ионов с m/z 73, 129 и 143, в случае 2,7-диметилоктанола-4 — пики ионов с m/z 87 и 101. Исходя из этих данных, можно сделать однозначный вывод, что спектр на рис. 10.33 принадлежит деканолу-3. Ион с m/z 31 образуется в результате вторичного перегруппировочного процесса (схема 10.18) из любого из двух указанных первичных фрагментов.

Задача 10.23. В качестве подсказки в условии задачи указаны точные интенсивности пиков изотопных ионов. В реальном спектре пики с интенсивностью 0,1% от максимального и ниже не могут быть точно измерены. Молекулярный ион, по-видимому, имеет массу 76 дальтон. По интенсивности пика $M+1$ можно установить, что в составе молекулы, вероятно, три атома углерода ($2/58 = 0,034$). Наиболее важные пики в спектре принадлежат ионам с массами 31, 45, 61. Два первых иона характерны для распада спиртов. Ион 61 обусловлен отщеплением метильного радикала из $M^{+\cdot}$. По его изотопным пикам можно установить, что в его составе два атома углерода и два атома кислорода. Брутто-формула соединения $C_3H_8O_2$. Рассчитывая степень ненасыщенности этого соединения, получаем $R = 3 - 4 + 1 = 0$. Следовательно, в молекуле отсутствуют циклы и кратные связи. Речь может идти о бифункциональном спирте или простом эфире. Кроме того, понятно, что в молекуле присутствует метильная группа. Это позволяет отвергнуть структуру пропандиола-1,3. Кроме того, маловероятны изомерные структуры диметоксиметана и 2-метоксиэтанола-1. Таким образом, необходимо выбрать между структурами пропандиола-1,2 и 1-метоксиэтанола-1. Максимальный пик в спектре обусловлен ионом $C_2H_5O^+$, который образуется при отщеплении радикала состава CH_3O из $M^{+\cdot}$. Этот катион действительно должен быть наиболее устойчивым для обеих оставшихся структур. Ион 31 также не позволяет сделать однозначный выбор в пользу одной из этих структур. Пожалуй, единственной возможностью для выбора является процесс отщепления гидроксильного радикала из $M^{+\cdot}$. Для пропандиола-1,2 этот процесс маловероятен, поскольку приводит к нестабильному иону, тогда как для полуацетала, которым является 1-метоксиэтанол-1, отщепление гидроксильной группы, хотя и менее выгодно, чем альтернативный процесс с выбросом метоксигруппы, однако должно протекать, поскольку образующийся фрагментный ион должен быть весьма устойчивым (схема 14.12). Поскольку пик этого иона (m/z 59) отсутствует в спектре, следует признать, что масс-спектр на рис. 10.34 принадлежит пропандиолу-1,2.

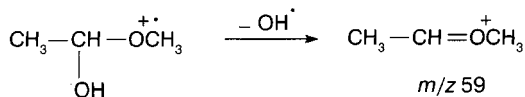


Схема 14.12

Задача 10.24. а) Пик M^{++} 3-этилгексанола-3 будет малоинтенсивен. Он может вовсе отсутствовать в спектре. Будет наблюдаться пик иона $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, причем он может иметь максимальную массу в спектре. Первичные процессы распада (схема 14.13) связаны с элиминированием углеводородных радикалов от α -атома углерода. По правилу выброса максимального алкила пик иона $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ будет иметь большую интенсивность в спектре, а пик иона $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$ меньшую. Однако надо учесть, что в молекуле два этильных радикала. Этот факт приведет к увеличению интенсивности пика иона $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$. Возможен ряд вторичных и даже третичных процессов с образованием перегруппировочных ионов. Ион $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$ может последовательно элиминировать в любом порядке молекулы этилена и пропилена, а ион $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ две молекулы этилена. В результате этих процессов будут возникать ионы спиртовой серии.

Помимо кислородсодержащих ионов, будет регистрироваться ряд углеводородных фрагментов алкеновой и алкановой серий. Интенсивности пиков этих фрагментов могут быть достаточно высоки. Схему фрагментации 3-этилгексанола-3 можно представить следующим образом:

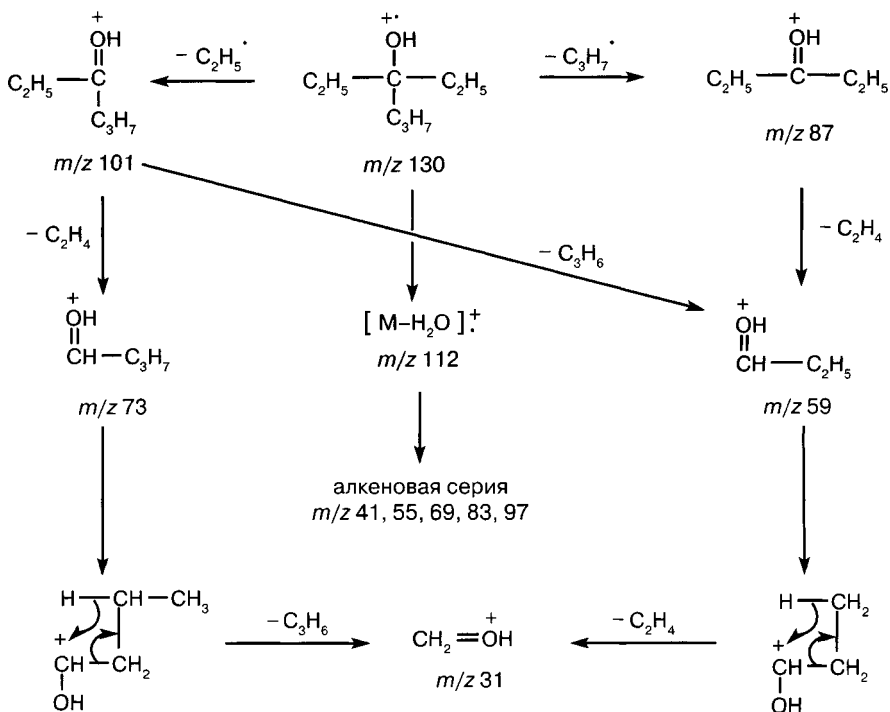


Схема 14.13

Задача 10.24. з) Спектр 3-этилфенола будет характеризоваться интенсивным пиком молекулярного иона и максимальным по интенсивности пиком иона $[M-CH_3]^+$. Этот ион далее может отщеплять молекулу CO или радикал HCO^\bullet . Эти же частицы могут элиминироваться и непосредственно из молекулярного иона («фенольный» распад). Однако предпочтительными будут процессы, изображенные в правой части схемы фрагментации 3-этилфенола (схема 14.14).

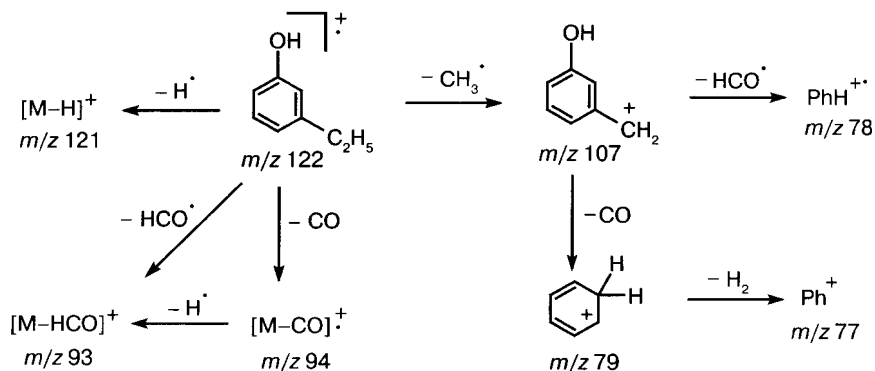


Схема 14.14

Задача 10.25. Для выбора между изомерными структурами необходимо обратить внимание на пик иона с m/z 92, присутствующий только в спектре 10.35б. Он обусловлен отщеплением молекулы HBr из M^{++} благодаря орто-эффекту. Следовательно, этот спектр принадлежит 2-бромфенолу.

Задача 10.26. Очень много дает уже внешний вид спектра. Прежде всего, пик иона 130 с интенсивностью в три раза меньше, чем пик иона 128, позволяет сделать вывод о наличии одного атома хлора в молекуле. Этот вывод подтверждается отщеплением 36 атомных единиц массы (ион 92) из M^{++} . Кроме того, поскольку пик M^{++} максимальный в спектре, скорее всего, соединение имеет ароматический характер.

Рассчитаем элементный состав соединения. К сожалению, присутствие хлора маскирует пик иона $M+2$. По пику $M+1$ устанавливаем, что в молекуле шесть атомов углерода. Этот же вывод можно сделать по пику иона $M+3$ относительно $M+2$. Шесть атомов углерода и один атом хлора имеют массу 107 дальтон. Оставшиеся 21 единица массы могут быть обусловлены составами FH_2 и OH_3 . В первом случае брутто-формула соединения C_6H_5OCl , во втором — C_6H_2FCl . Степень ненасыщенности первой структуры $R = 6 - 3 + 1 = 4$, второй — $R = 6 - 2 + 1 = 5$. Оба варианта могут иметь ароматическую природу и интенсивный пик молекулярного иона.

Первичный процесс распада M^{++} связан с элиминированием 28 и 29 дальтон (ионы 99–102). Для состава C_6H_5OCl эти процессы могут быть обусловлены выбросами частиц CO и HCO^\bullet . В случае состава C_6H_2FCl частицы с такой массой отщепиться не могут. Следовательно, брутто-формула соединения C_6H_5OCl . Об ароматичности соединения, помимо доминирующей интенсивности пика M^{++} , свидетельствует характерная серия фрагментных ионов с массами 92, 74, 75, 50, 51, 39. Учитывая, что все шесть атомов углерода должны участвовать в образовании бензольного

ядра, соединение может быть только хлорфенолом. Этот вывод подтверждается «фенольным» типом распада (выбросы частиц CO и HCO^\bullet из $\text{M}^{+\bullet}$). Для того чтобы установить взаимное расположение заместителей, вновь надо обратить внимание на ион с m/z 92. Этот фрагмент обусловлен выбросом молекулы HCl из $\text{M}^{+\bullet}$. Такой процесс активно протекает только в случае *орто*-изомера (см. предыдущую задачу). Следовательно, на рис. 10.36 представлен масс-спектр 2-хлорфенола.

Задача 10.27. Поскольку энергия, переносимая на ионизируемую молекулу спирта в результате ионно-молекулярной реакции, возрастает в ряду изобутан < метан < водород, в этом же ряду возрастают интенсивности пиков ионов, образующихся в результате вторичных, третичных и т.д. процессов распада. Для изобутана характерны в основном лишь пики ионов, обусловленных первичными процессами. Тем не менее пик протонированной молекулы оказывается нестабильным во всех трех случаях.

Задача 10.28. Для ответа на вопрос задачи необходимо вспомнить основные направления распада циклогексанолов (схема 10.22). Предварительно можно исключить из рассмотрения 1-этилциклогексанол, так как пик иона $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$ имеет очень низкую интенсивность. При распаде 1-этилциклогексанола его интенсивность была бы значительно выше (80–100%). Основное направление распада приводит к паре альтернативных фрагментов в зависимости от того, какая связь рвется на первой стадии (C_1-C_2 или C_1-C_6). В случае 4-этилциклогексанола в обоих случаях этильный заместитель не сохранится. Поэтому пик иона с m/z 85 должен иметь очень незначительную интенсивность. Напротив, для 3-этилциклогексанола интенсивность этого пика должна быть выше, чем пика альтернативного иона с m/z 57. Спектр на рис. 10.37 противоречит и тому, и другому варианту. Для 2-этилциклогексанола первичные интенсивности этих пиков должны быть примерно равны (схема 14.15). Однако в результате вторичных процессов часть ионов с m/z 85 трансформируется далее. Таким образом, интенсивность пика иона с m/z 57 в спектре будет в 3–4 раза выше интенсивности пика иона с m/z 85. На рис. 10.37 представлен масс-спектр 2-этилциклогексанола.

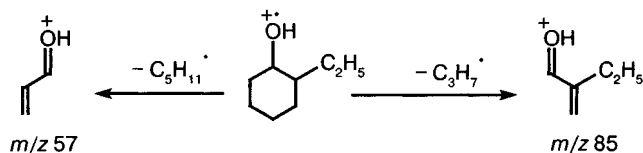


Схема 14.15

Задача 10.29. Соединение характеризуется достаточно устойчивым молекулярным ионом, хотя интенсивные пики в области низких значений m/z свидетельствуют об алифатической природе образца. Очень важно увидеть повышенную интенсивность пика $\text{M}+2$. Такая интенсивность свидетельствует о присутствии атома серы или кремния. Ион с m/z 98 образуется в результате выброса 34 единиц массы из $\text{M}^{+\bullet}$. Такой процесс характерен для меркаптанов и связан с отщеплением молекулы сероводорода. Дополнительным подтверждением тиольной или сульфидной функции является гомологическая серия ионов 47, 61, 75, 89... Интенсивности

их пиков весьма высоки, причем, поскольку интенсивность пика иона 89 выше, чем пика иона 75, можно сделать вывод о неразветвленном углеродном скелете и наличии тиольной группы у первого атома углерода. На рис. 10.38 представлен спектр гептантиола-1.

Задача 10.30. Внешний вид спектра свидетельствует об ароматической природе образца. По интенсивности изотопных пиков определяем состав молекулы. На основании интенсивности пика $M+1$ находим, что число атомов углерода 10. Одновременное присутствие двух изотопов ^{13}C в молекуле должно в этом случае привести к интенсивности 0,54% пика $M+2$. Оставшиеся 0,2% интенсивности это пика, вероятно, обусловлены изотопом кислорода ^{18}O . В этом случае состав соединения $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}$. Степень ненасыщенности $R = 10 - 4 + 1 = 7$.

Вариант состава $\text{C}_{11}\text{H}_{12}$ хуже согласуется с интенсивностями изотопных пиков. Кроме того, M^{++} такого соединения, например метилдигидронафталина, не сможет элиминировать частицы с массами 28 и 29 дальтон. Если в составе молекулы девять атомов углерода, ее брутто-формула может быть $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2$, $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}$, $\text{C}_9\text{H}_4\text{O}_2$, $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{F}$, C_9NOF . Варианты $\text{C}_9\text{H}_4\text{O}_2$ и C_9NOF маловероятны с химической точки зрения. Варианты с 20 и 17 атомами водорода представляют алифатические соединения, пик молекулярного иона которых не может быть столь интенсивен. Вариант $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2$ очень разумен с химической точки зрения (например, аминокинолин), однако плохо согласуется с интенсивностью пика $M+2$ (она должна быть почти в два раза ниже). Маловероятны также выбросы частиц с массами 28 и 29 дальтон из M^{++} . Против присутствия атомов азота в молекуле свидетельствует отсутствие более или менее интенсивных пиков ионов с четной массой в левой части спектра.

Выбросы частиц с массами 28 и 29 дальтон из M^{++} обычно обусловлены «фенольным» распадом (CO и HCO) или элиминированием этильного радикала и молекулы этилена, причем последний процесс сопровождается перегруппировкой. Однако спектр на рис. 10.39, а также брутто-формула соединения ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}$) не позволяют разместить в составе молекулы этоксильный, пропилфенильный или этиларилкетонный фрагмент. Вероятно, молекула содержит фенольную функцию. В этом случае речь может идти о нафтоле. Масс-спектр ИЭ не позволяет сделать вывод о точном положении гидроксильной группы. Более экзотические варианты, например производные метилиндена, должны были бы характеризоваться дополнительными фрагментными ионами. На рис. 10.39 представлен масс-спектр нафтола-1.

Задача 10.31. 2-Метилпропанол-1.

Задача 10.32. б) В молекулярном ионе изопропилэтилового эфира положительный заряд и неспаренный электрон локализованы на атоме кислорода. Наиболее интенсивные пики обусловлены ионами, образующимися при отрыве алкильных радикалов (α -распад, инициированный радикальным центром). И изопропилыльный, и этильный заместители будут элиминировать метильный радикал (схема 14.16). Алкильные ионы образуются при инициировании распада центром, несущим заряд. Вторичный изопропилыльный катион весьма устойчив. Поэтому его пик будет иметь заметную интенсивность в спектре. Напротив, первичный этильный катион нестабилен, а его пик будет едва заметен в спектре. Интенсивность пиков алкоксильных ионов низка.


$$\begin{array}{c}
 \text{Ph}-\overset{+}{\text{S}}=\text{CH}_2 \xleftarrow{-\text{C}_2\text{H}_5^\cdot} \text{Ph}-\overset{+}{\text{S}}-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_5 \\
 m/z\ 123 \qquad \qquad \qquad m/z\ 110 \\
 \downarrow \qquad \qquad \qquad \downarrow -\text{C}_3\text{H}_7\text{S}^\cdot \\
 \text{HCS}^+ \qquad \qquad \qquad \text{Ph}^+ \\
 m/z\ 45 \qquad \qquad \qquad m/z\ 77
 \end{array}$$

$$\begin{array}{c}
 \text{Ph}-\overset{+}{\text{S}}-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_5 \xrightarrow{-\text{C}_3\text{H}_6} \text{Ph}-\overset{+}{\text{S}}\text{H} \xrightarrow{-\text{CS}} m/z\ 65 \\
 \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad m/z\ 110 \\
 \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \downarrow -\text{C}_3\text{H}_7^\cdot \\
 \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{Ph}-\overset{+}{\text{S}} \xrightarrow{-\text{CS}} m/z\ 65 \\
 \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad m/z\ 109
 \end{array}$$

Схема 14.17

Задача 10.35. Основные направления фрагментации *втор*-бутилпропилового эфира представлены на схеме 14.18.



Задача 10.36. а) Наиболее важные направления распада диизопропилового эфира, инициированные радикальным центром (ионы 87 и 45) и катионным центром (ионы 59 и 43), представлены на схеме 14.19.

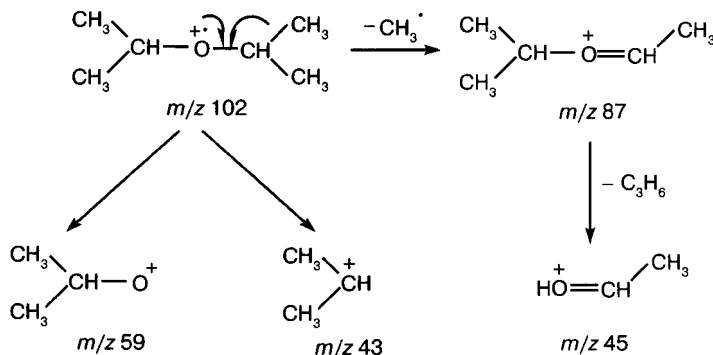


Схема 14.19

Задача 10.37. Внешний вид спектра свидетельствует об ароматической природе образца. Пик молекулярного иона доминирует в спектре, причем активно идут процессы отщепления из M^{++} атома и молекулы водорода. Об ароматичности соединения свидетельствуют также основные фрагментные ионы с m/z 51, 65, 77, 92. Высокая интенсивность пика иона $[M-H]^+$ несколько усложняет расчет элементного состава образца по изотопным пикам.

Интенсивность пика $M+1$ составляет 15,8% от M . Следовательно, в молекуле 14–15 атомов углерода. Необходимо внести поправку в интенсивность пика M^{++} за счет наложения со стороны изотопного пика иона $[M-H]^+$. Интенсивность пика иона $[M-H]^+$ 65,1%. Следовательно, интенсивность изотопного пика этого иона за счет одного изотопа ^{13}C будет примерно 15% от этого значения, т.е. почти 10%, а одновременное присутствие двух изотопов ^{13}C в молекуле приведет к пику $A+2$ с интенсивностью около 1% (табл. 4.2). Таким образом, интенсивность пика молекулярного иона должна быть примерно 90% ($100 - 10$), а пика $M+1$ – 14,8% ($15,8 - 1$). Теперь пронормируем интенсивности пиков кластера молекулярного иона на 100%. Получаем следующую серию: 186 (100%), 187 (16,3%), 188 (5,2%), 189 (0,7%). Такая интенсивность пика $M+2$ практически однозначно означает присутствие в молекуле одного атома серы. В этом случае надо еще раз провести корректировку интенсивностей изотопных пиков за счет присутствия изотопов серы в ионе $[M-H]^+$. Если интенсивность пика M изменяется не существенно (на 0,8%), то интенсивность пика $M+1$ должна была быть (до нормирования) не 14,8%, а 11,9% ($14,8 - 65,1 \times 0,044$). Интенсивность пика $M+2$ уменьшится примерно на 0,4% за счет одновременного присутствия в молекуле одного атома ^{13}C и одного атома ^{34}S . Тогда имеем следующую серию: 186 (89,2%), 187 (11,91%), 188 (4,8%), 189 (0,61%) или после нормирования: 186 (100%), 187 (13,1%), 188 (5,2%), 189 (0,7%). Расчет элементного состава образца, исходя из этих интенсивностей, дает $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{S}$. Степень ненасыщенности $R = 12 - 5 + 1 = 8$. Остановимся на этом варианте, хотя для полной корректности расчетов необходимо было бы, исходя из этого элементного

состава, пересчитать интенсивности пиков кластера M^{++} с учетом наложений со стороны ионов $[M-H]^+$ и $[M-2H]^{++}$. Поскольку все основные фрагментные ионы обусловлены фрагментацией бензольных ядер, можно предположить два варианта ответа: дифенилсульфид и меркаптобифенил.

Для выбора между двумя этими структурами можно использовать следующие особенности фрагментации соединения. Интенсивные пики ионов $[M-H]^+$ и $[M-2H]^{++}$ не характерны для тиофенольных структур. С другой стороны, подобные процессы очень характерны для структурно близких дифенилметана, дифениламина или дифенилфосфина. Они связаны с циклизацией по орто-положениям бензольных ядер. В данном случае образуется молекулярный ион дибензотиофена (схема 14.20). Кроме того, для тиофенолов характерны выбросы молекул CS и C_2H_2 . В данном случае пики этих ионов малоинтенсивны. На рис. 10.46 представлен масс-спектр дифенилсульфида.

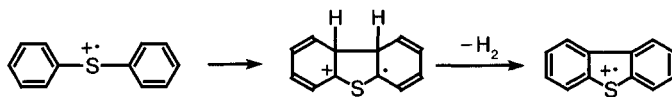


Схема 14.20

Задача 10.39. а) вторбутилэтиловый эфир, б) метоксинеопентан.

Задача 10.40. Фенилэтилсульфид.

Задача 10.41. Основные первичные процессы фрагментации аминов связаны с разрывами $C-C$ связей α -углеродных атомов, причем действует правило выброса максимального алкила (разд. 3.1.1).

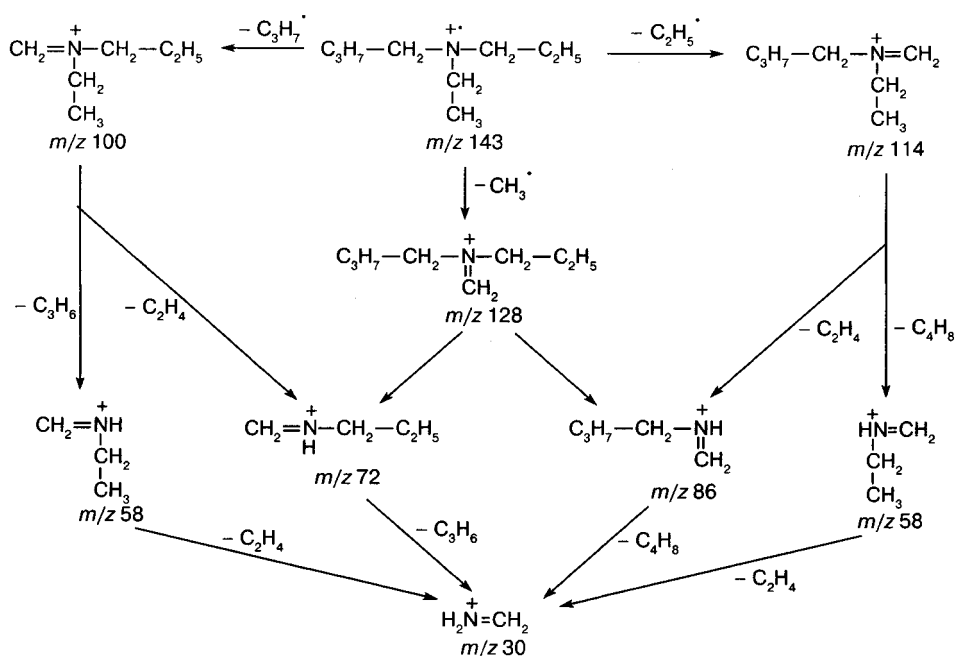
а) При распаде молекулярного иона бутилпропилэтиламина максимальную интенсивность среди первичных ионов будет иметь пик иона $[M-C_3H_7]^+$, меньшую — $[M-C_2H_5]^+$, минимальную — $[M-CH_3]^+$.

Задача 10.42. Вторичные процессы распада аминов связаны с перегруппировочными процессами, которые идут через четырехчленное (реже шестичленное) переходное состояние. В результате элиминируется молекула олефина. Заряд сохраняется на атоме азота. Для протекания процесса необходима длина радикала не менее двух атомов углерода.

а) Процессы распада бутилпропилэтиламина можно отобразить единой схемой 14.21.

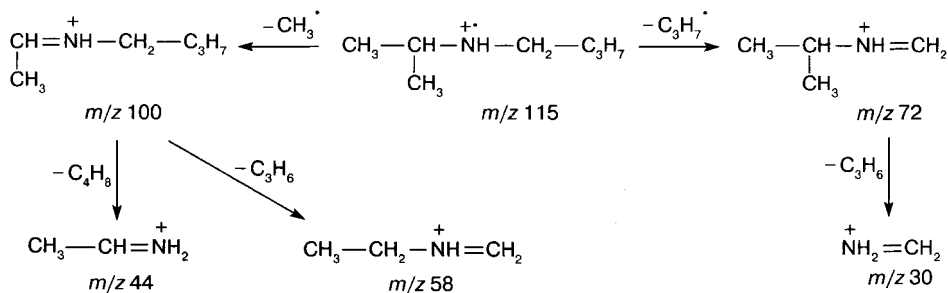
Ион $[M-C_3H_7]^+$ может претерпевать распад по пропильной группе с выбросом молекулы пропилена или по этильной группе с выбросом молекулы этилена. В результате образуются ионы с m/z 58 и 72. Первый из них далее отщепляет далее молекулу этилена, а второй — пропилена. Оба процесса приводят к образованию иона с m/z 30.

Ион $[M-C_2H_5]^+$ может претерпевать распад по бутильной группе с выбросом молекулы бутилена или по этильной группе с выбросом молекулы этилена. В результате образуются ионы с m/z 58 и 86. Первый из них далее отщепляет молекулу этилена, а второй — бутилена. Оба процесса приводят к образованию иона с m/z 30.



Ион $[M-CH_3]^+$ может претерпевать распад по бутильной группе с выбросом молекулы бутилена или по пропильной группе с выбросом молекулы пропилена. В результате образуются ионы с m/z 72 и 86. Первый из них далее отщепляет молекулу пропилена, а второй – бутилена. Оба процесса приводят к образованию иона с m/z 30.

Задача 10.43. Основные направления распада бутилизопропиламина инициированы неспаренным электроном (схема 14.22). Все наиболее интенсивные пики в спектре обусловлены ионами, образующимися в результате первичного α -распада, или вторичных перегруппировок. Эти вторичные перегруппировки протекают через четырехчленное (ионы 44 и 30) или шестичленное (ион 58) переходное состояние. Механизмы этих процессов представлены на схеме 10.45. На схеме не указаны направления фрагментации, связанные с отщеплением от M^{++} атома водорода, поскольку интенсивность пика этого первичного иона очень низка.



Так как атом азота обладает очень высокой склонностью к удержанию заряда, пики алкильных ионов имеют очень низкую интенсивность.

Задача 10.44. Как и в случае бутилизопропиламина (задача 10.43), основные направления распада метилдиизопропиламина инициированы неспаренным электроном (схема 14.23). Все наиболее интенсивные пики в спектре обусловлены ионами, образующимися в результате первичного α -распада, или вторичных перегруппировок. Так как атом азота обладает очень высокой склонностью к удержанию заряда, пики алкильных ионов имеют очень низкую интенсивность. Ион 86, малоинтенсивный пик которого присутствует в спектре, вероятно, обусловлен незначительной примесью амина с пропильной группой нормального строения.

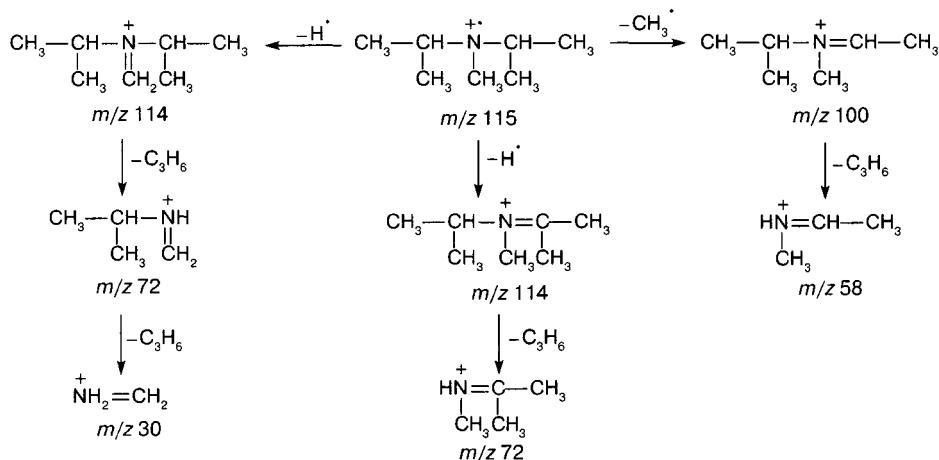


Схема 14.23

Задача 10.45. Для атома фосфора в отличие от атома азота, помимо реакций фрагментации, инициированных радикальным центром, характерны процессы распада, инициированные катионным центром. Этил-катион ($m/z \ 29$) может образоваться практически из любого фрагмента, представленного на схеме 14.24.

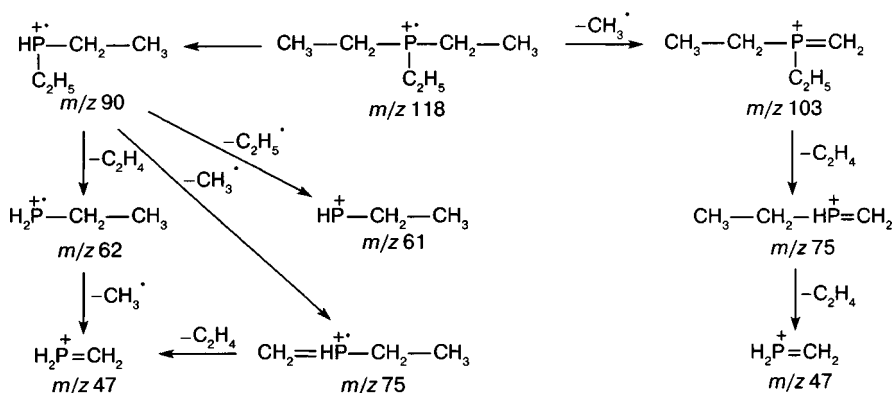


Схема 14.24

Задача 10.46. а) Основные процессы фрагментации $M^{+\cdot}$ диэтиламина могут быть отражены следующей схемой.

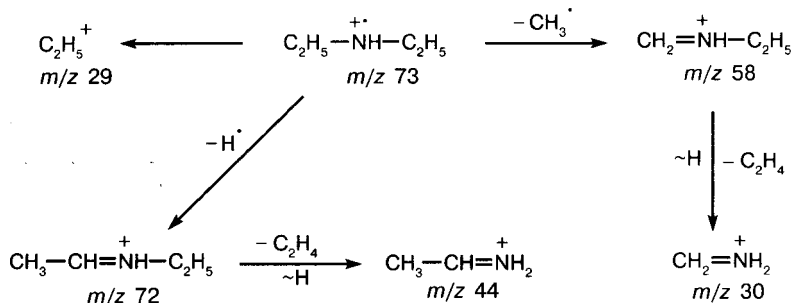


Схема 14.25

Задача 10.47. Интенсивный пик молекулярного иона и отчетливая серия ионов с m/z 39, 51, 77 указывает на наличие ароматического фрагмента в молекуле. Помимо фенильной группы, в молекуле имеется еще структурный фрагмент с массой 44 дальтона. Поскольку в условии задачи указано, что спектр принадлежит вторичному амину, еще 15 дальтон принадлежит группе NH. Оставшиеся 29 единиц массы должны быть обусловлены этильной группой. Первичный процесс, приводящий к наиболее стабильному иону в спектре, обусловлен отрывом метильной группы этильного заместителя. Следовательно, на рис. 10.57 представлен спектр фенилэтиламина.

Задача 10.48. Молекулярная масса соединения 118 дальтон. Рассчитаем его элементный состав, предварительно проведя нормирование на 100%. Получаем следующий вид кластера $M^{+\cdot}$: 118 (100%), 119 (6,6%), 120 (0,2%). Отсюда можно сделать вывод, что в молекуле шесть атомов углерода и отсутствуют другие A+1 и A+2 элементы. На долю A элементов приходится 46 дальтон. Возможными вариантами состава могут быть $C_6H_{15}P$ и $C_6H_8F_2$. Степень ненасыщенности в первом случае $R = 6 - 7,5 + 0,5 + 1 = 0$, а во втором $R = 6 - 5 + 1 = 2$. Основные процессы распада связаны с выбросами 15 (метильная группа) и 42 дальтон. По изотопному пику (m/z 77) можно рассчитать, что отщепляется молекула пропилена. Пропильным фрагментом обусловлен, вероятно, и ион с m/z 43. Первичный перегруппировочный процесс с потерей молекулы олефина, не сопровождающийся интенсивным процессом отщепления соответствующего алкильного радикала, характерен для фосфинов. В случае алкилфторидов селективность этого процесса не может быть столь высокой. Следовательно, речь идет о фосфине. Наличие атома фосфора можно подтвердить пиками с m/z 33 и 34. Они обусловлены ионами RH_2^+ и $RH_3^{+\cdot}$. Малолинейчатость спектра может свидетельствовать о симметричности структуры соединения. Учитывая, что основным направлением фрагментации соединения является выброс молекулы пропилена, можно сделать вывод о том, что образец является дипропилфосфином. Для выбора между изомерными дипропилфосфином и диизопропилфосфином следует обратить внимание на ион $[M-CH_3]^+$. Он образуется в результате α -распада изопропильного заместителя. Аналогичный

процесс в случае пропильного заместителя привел бы к элиминированию этильного радикала. Поскольку пик иона $[M-C_2H_5]^+$ в спектре отсутствует, можно утверждать, что на рис. 10.58 представлен масс-спектр диизопропилфосфина.

Задача 10.49. Для решения необходимо составить схемы фрагментации для предложенных изомеров и найти различия в величинах m/z характеристических фрагментов.

б) Дибутиламин и *втор*-бутилбутиламин. Для дибутиламина, молекула которого симметрична, возможен только один первичный фрагментный ион $[M-C_3H_7]^+$. Молекулярный ион *втор*-бутилбутиламина, помимо пропильного радикала, может отщеплять этильный и метильный (схема 14.26). Уже на этом основании, не рассматривая весь спектр, можно различить два изомера.

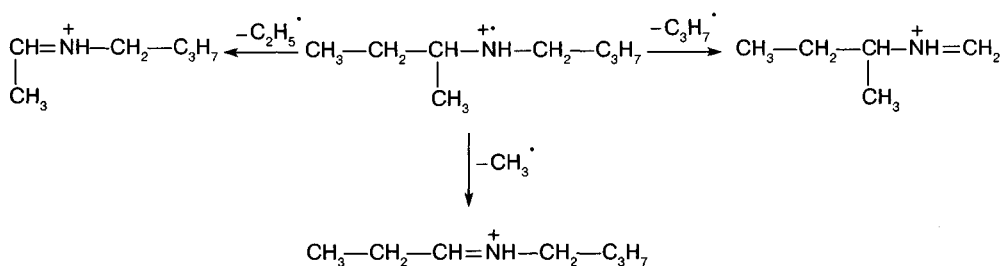


Схема 14.26

в) Все первичные и вторичные фрагменты дипентиламина и изопентилпентиламина будут идентичны. Однако для изопентилпентиламина возрастает вероятность вторичного процесса, проходящего через шестичленное переходное состояние (схема 14.27). В результате этого процесса интенсивность пика с m/z 44 в спектре соединения будет выше.

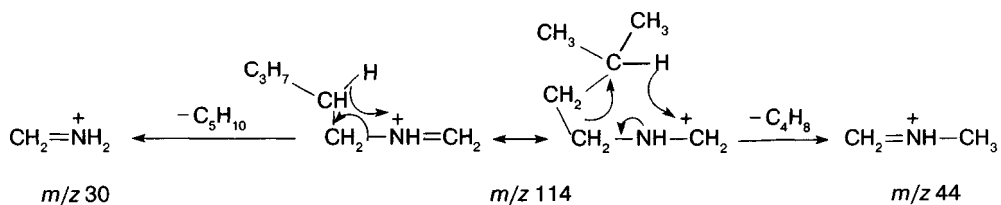
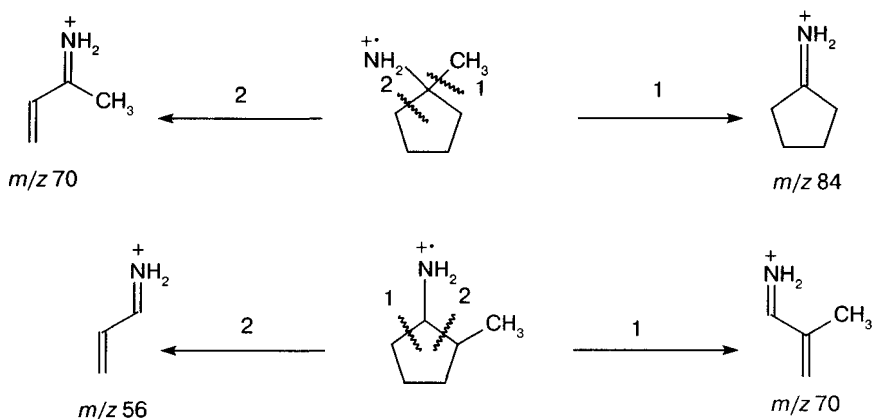


Схема 14.27

д) 1-Метилциклопентиламин и 2-метилциклопентиламин. Максимальный по интенсивности пик фрагментного иона при распаде M^{++} 1-метилциклопентиламина будет иметь величину m/z 70. Интенсивность пика $[M-\text{CH}_3]^+$ будет достаточно высока (схема 14.28). Процесс распада с разрывом цикла приводит к иону с m/z 70. При фрагментации 2-метилциклопентиламина интенсивность пика иона $[M-\text{CH}_3]^+$ будет низка. Распад с раскрытием цикла в зависимости от первоначального разрыва C_1-C_2 или C_1-C_5 приведет к образованию ионов с величиной m/z 70 или 56 (схема 4.28), при этом разрыв 2 будет предпочтительным.



и) В спектре дифениламина будут наблюдаться интенсивные пики ионов $[M-H]^+$, $[M-2H]^+$. Будет замечен и пик иона $[M-3H]^+$. Эти ионы обусловлены процессом внутримолекулярной циклизации (схема 10.48). Для 4-аминобифенила такой процесс невозможен, зато большей интенсивностью будут обладать пики ионов $[M-HCN]^+$ и $[M-H_2CN]^+$.

Задача 10.53. а) N-изопропиланилин б) N-метил-N-этиланилин.

Задача 10.54. а) Один из основных процессов фрагментации молекулярного иона 1-бромгексана связан с образованием пятичленного бромониевого катиона (схема 10.52). Интенсивность пика этого иона ($[M-C_2H_5]^+$, m/z 135, 137) будет очень высока. Этот процесс полностью подавлен по стерическим причинам в случае 3-бромгексана, а пик иона $[M-C_2H_5]^+$ будет малоинтенсивен.

Задача 10.55. Внешний вид спектра позволяет сразу сделать два важных вывода. Во-первых, в составе молекулы есть один атом хлора, во-вторых, высокая интенсивность пика молекулярного иона и фрагментные ионы с m/z 77, 76, 51, 50, 39, 38 свидетельствуют об ароматической природе образца. В молекуле шесть атомов углерода (расчет по пику $M+1$ или по $M+3$). Оставшиеся пять единиц массы могут быть обусловлены только атомами водорода. Состав C_6H_5Cl . Хлорбензол.

Задача 10.56. Триплет молекулярного иона с соотношением пиков ионов $M/M+2/M+4 = 1/2/1$ однозначно указывает на присутствие двух атомов брома в молекуле. Соответственно, пики 79 и 81 обусловлены двумя изотопами брома, а пики 93 и 95 ионом CH_2Br^+ , который образуется при отщеплении атома брома из M^+ . Дибромметан.

Задача 10.57. В спектре легко увидеть несколько групп пиков. В этих группах наиболее интенсивные пики отстоят друг от друга на две единицы массы. Это указывает на наличие в составе $A+2$ элементов. Легко определить, что дублет пиков с m/z 61 и 63 обусловлен ионом с одним атомом хлора (соотношение интенсивностей пиков 3:1), триплет пиков с m/z 97, 99, 101 — ионом с двумя атомами хлора (соотношение интенсивностей пиков 9 : 6 : 1), а квартет пиков с m/z 117, 119, 121, 123 —

ионом с тремя атомами хлора (соотношение интенсивностей пиков $27 : 27 : 9 : 1$). В последнем случае состав иона легко определить, поскольку три атома хлора (изотопы ^{35}Cl) имеют массу 105. Оставшиеся 12 единиц массы — атом углерода, а состав иона CCl_3 . Однако этот ион, хотя и обладает максимальной массой в спектре, не может быть молекулярным, поскольку не может обусловить образование следующего иона, содержащего только два атома хлора. Масса атома хлора 35 дальтон, а разница в массах между этими ионами 20 дальтон (второе необходимое условие для определения молекулярного иона, разд. 4.1). Следовательно, молекулярный ион данного соединения нестабилен, а его пик в спектре не регистрируется. По изотопному пику $A+1$ иона с m/z 97 определяем, что в его составе два атома углерода. Тогда его состав CH_3CCl_2 , а ион с m/z 61 образуется при отщеплении этим ионом молекулы HCl . Комбинируя информацию по составу двух наиболее тяжелых ионов (CCl_3 и CH_3CCl_2), можно предположить, что первый образовался из M^+ при отщеплении метильного радикала, а второй — атома хлора. Следовательно, брутто-формула соединения: CH_3CCl_3 . Отщепление метильной группы возможно только из одной изомерной структуры такого состава. На рис. 10.68 представлен спектр 1,1,1-трихлорэтана.

Задача 10.58. В спектре легко увидеть несколько групп пиков. В этих группах наиболее интенсивные пики отстоят друг от друга на две единицы массы. Это указывает на наличие в составе $A+2$ элементов. Легко определить, что триплет пиков 118, 120, 122 обусловлен ионом с двумя атомами хлора (соотношение интенсивностей пиков $9 : 6 : 1$), а квартеты пиков 141, 143, 145, 147 и 153, 155, 157, 159 — ионами с тремя атомами хлора (соотношение интенсивностей пиков $27 : 27 : 9 : 1$). Массы первых ионов более тяжелых мультиплетов 188, 223 и 258 отстоят друг от друга на 35 дальтон. Следовательно, эти ионы содержат четыре, пять и шесть атомов хлора соответственно. Проверить это можно по формуле бинома (разд. 4.2). Высокая интенсивность пиков кластера молекулярного иона позволяет рассчитать число атомов углерода в молекуле. Расчет легко провести по ионам с m/z 261 и 263. Кроме того, можно использовать для расчета изотопные пики за счет атомов углерода ^{13}C иона $[\text{M}-\text{Cl}]^+$. Во всех случаях получается четыре атома углерода. Шесть атомов хлора (по ^{35}Cl) и четыре атома углерода имеют суммарную массу 258 дальтон, что совпадает с молекулярной массой образца. Брутто-формула соединения: C_4Cl_6 . Его степень ненасыщенности $R = 4 - 3 + 1 = 2$. Следовательно, вещество является диеном или алкином. Варианты производных циклопропана, циклопропена и циклобутена можно исключить, поскольку молекулярные ионы таких соединений нестабильны. Выбирая между перхлорированными бутином-1, бутином-2, бутадиеном-1,2 и бутадиеном-1,3, следует отдать предпочтение последнему. Его молекулярный ион очень устойчив, а фрагментация заключается в последовательном отщеплении атомов и молекул хлора. Разрывы винильных, а тем более кратных $\text{C}=\text{C}$ связей не выгодны. Наличие трихлорметильной группировки в составе трех других соединений неизбежно повлекло бы образование соответствующего иона, однако его пик в спектре не наблюдается. Таким образом, на рис. 10.69 представлен масс-спектр гексахлорбутадиена-1,3. Пики с m/z 129–132 обусловлены двухзарядными молекулярными ионами.

Задача 10.59. Наиболее тяжелый ион в спектре имеет нечетную массу. Либо в молекуле нечетное число атомов азота, либо молекулярный ион нестабилен и его пик в спектре отсутствует. Расчет числа атомов углерода в наиболее стабильных ионах (m/z 119 и 69) по пикам $A+1$ показывает, что в первом ионе два атома углерода, а во втором — один. Кроме того, в этих ионах нет других $A+1$ и $A+2$ элементов. Для иона с m/z 69 состав достаточно очевиден. Это CF_3 . Азотсодержащих ионов в спектре нет. Состав иона с m/z 119 в этом случае должен быть C_2F_5 . Этот ион четноеэлектронный и молекулярным быть не может. Поскольку все ионы в спектре обусловлены атомами углерода и фтора в разных численных комбинациях, логично предположить, что и наиболее тяжелый фрагментный ион образуется при элиминировании радикала, состоящего из этих атомов. Наиболее простым и разумным вариантом является атом фтора. Если бы речь шла о перфторированном производном пропана или более тяжелого гомолога, в спектре наблюдались бы пики ионов с большим числом атомов углерода. Следовательно, на рис. 10.70 представлен масс-спектр гексафторэтана.

Задача 10.60. В данном случае уже в условии задачи сказано, что пик молекулярного иона в спектре отсутствует. Попытаемся установить элементный состав наиболее тяжелых фрагментов. Легко установить, что во всех тяжелых фрагментах содержится несколько атомов $A+2$ элементов (возможно, хлора и брома). На эти элементы указывают также пики ионов с m/z 35, 37 и 79, 81. Оценка числа атомов углерода во всех фрагментах показывает, что они содержат лишь один атом С и отличаются лишь набором галогенов. Три основных группы пиков, таким образом, обусловлены ионами CClBr^+ , CCl_2Br^+ и CClBr_2^+ . Отсюда легко сделать вывод, что на рис. 10.71 представлен масс-спектр дибромдихлорметана. Интенсивный пик с m/z 81,5 обусловлен двухзарядным ионом $\text{CCl}_2\text{Br}^{2+}$. Пик однозарядного иона этого состава (m/z 163) является максимальным в спектре. Другие ионы с нецелочисленными массами также являются двухзарядными.

Задача 10.61. Основные направления фрагментации молекулярного иона 4-бромфенола связаны с отщеплением атома брома, молекулы HBr и «фенольным» распадом (схема 14.29).

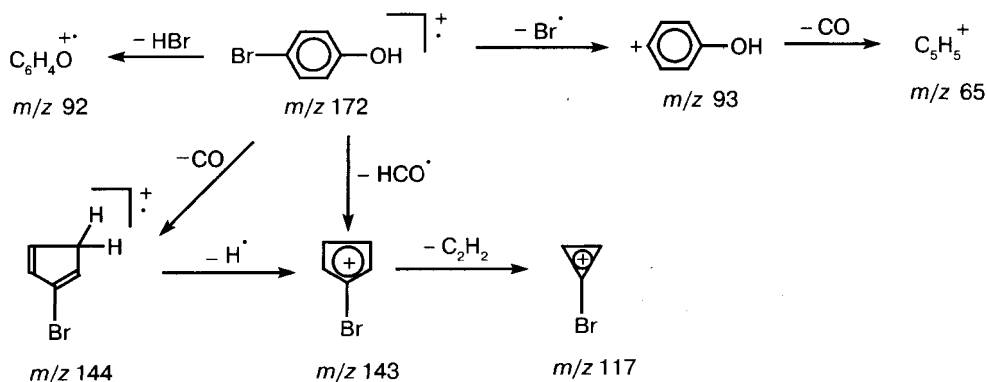


Схема 14.29

Задача 10.62. Отсутствие спектра в табличном виде не позволяет напрямую установить элементный состав молекулярного иона. Однако наличие двух пиков ионов равной интенсивности с массами, отличающимися на 2 дальтона, означает, что в составе есть атом брома. Высокая интенсивность пика молекулярного иона, а также присутствие в спектре пиков ионов 75, 51, 50, 39 свидетельствует об ароматической природе соединения. Ион с m/z 95 – $[M-Br]^+$. Вычисление с использованием интенсивностей изотопных пиков показывает, что в его составе шесть атомов углерода, которые, видимо, составляют бензольное ядро. Оставшиеся 23 ($95 - 72$) единицы массы должны быть обусловлены моноизотопными элементами. Единственным возможным составом соединения в этом случае является C_6H_4BrF – бромфторбензол. К сожалению, по спектру нельзя установить взаимное расположение атомов фтора и брома в молекуле. На рис. 10.72 представлен масс-спектр 4-бромфторбензола.

Задача 10.63. а) *орто*-бромбензальдегид, б) *пара*-бромбензальдегид.

Задача 10.64. Перегруппировка Мак-Лафферти протекает через шестичленное переходное состояние. Для ее реализации необходима длина цепочки, связанной с ароматическим ядром или карбонильной группой, не менее трех атомов. Разветвления в цепи и кратные связи могут препятствовать перегруппировке.

а) В молекулярном ионе 3-метилоктанона-4 заряд и неспаренный электрон локализованы на атоме кислорода. Оба алкильных заместителя имеют достаточную длину для протекания перегруппировки. В одном случае возникает ион с m/z 114, а во втором – с m/z 100 (схема 14.30).

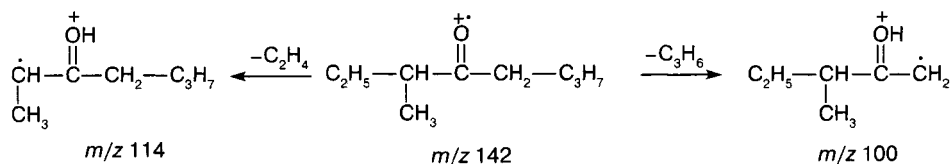


Схема 14.30

и) В молекулярном ионе децен-3-она-5 заряд и неспаренный электрон локализованы на атоме кислорода. Оба алкильных заместителя имеют достаточную длину для протекания перегруппировки. Однако перегруппировочный процесс по заместителю с кратной связью невозможен, поскольку на второй стадии процесса должен проходить разрыв именно двойной связи $\text{C}=\text{C}$. Энергетически это невыгодно. В масс-спектре будет наблюдаться только один пик перегруппировочного иона $[M-C_4H_8]^+$ с m/z 98.

Задача 10.65. в) В молекулярном ионе бензилбутилкетона заряд и неспаренный электрон могут быть локализованы как на атоме кислорода, так и на бензольном ядре. В первом случае возможен процесс с отщеплением молекулы пропилена и образованием енольной формы молекулярного иона бензилметилкетона (схема 14.31), тогда как перегруппировка по бензильному заместителю невозможна. Она должна была бы сопровождаться миграцией фенильного атома водорода. Этот процесс и образующийся ион энергетически невыгодны. Однако во втором случае

(заряд и неспаренный электрон локализованы на ароматическом ядре) миграция атома водорода с элиминированием молекулы кетена приводит к образованию стабильного иона $C_7H_8^{++}$.

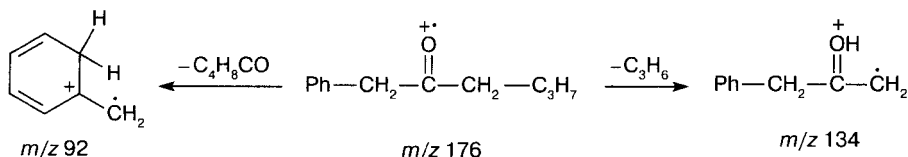


Схема 14.31

Задача 10.66. Для решения необходимо представлять основные направления фрагментации молекулярных ионов изомеров, указанных в условиях. Во всех случаях существуют фрагментные ионы, интенсивности пиков которых будут совершенно различны.

а) Изомерные пентаналь и 2-метилбутаналь можно очень легко различить по спектру ИЭ на основании иона, образующегося в результате перегруппировки Мак-Лафферти. Поскольку α -атом углерода карбонильного соединения сохраняется в составе фрагментного иона, метильная группа 2-метилбутанала приведет к смещению пика перегруппировочного иона на 14 дальтон по сравнению с пентаналем (с $m/z\ 44$ до $m/z\ 58$). Интенсивность обоих пиков будет высока.

е) Гексен-2-аль и гексен-5-аль вновь легко различить по спектру ИЭ на основании иона, образующегося в результате перегруппировки Мак-Лафферти. Перегруппировка невозможна для гексен-2-аля, поскольку должна протекать с разрывом кратной связи. Пик перегруппировочного иона ($m/z\ 44$) в спектре отсутствует. Структура гексен-5-аля, напротив, благоприятствует перегруппировке Мак-Лафферти. В данном случае первая стадия процесса облегчается, так как мигрирует аллильный атом водорода (схема 14.32). Кроме того, в результате последующего разрыва заряд может сохраняться как на енольном (ЭИ 9,5), так и на бутадиеновом (ЭИ 9,1) фрагменте. Следствием этого будут два интенсивных пика в спектре ($m/z\ 44$ и 54), причем пик бутадиенового фрагмента будет выше благодаря меньшей энергии ионизации.

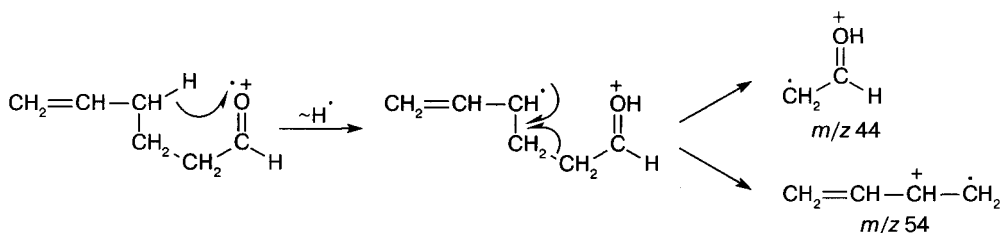


Схема 14.32

Задача 10.67. Спектры изомерных 3,3-диметилгексаналя и 4,4-диметилгексаналя достаточно сильно различаются (рис. 10.80а, б). Как правило, наиболее полезными для установления структуры оказываются пики перегруппировочных

(нечетноэлектронных) ионов. На рис. 10.80а пик перегруппировочного иона (m/z 84) является максимальным в спектре, тогда как на рис. 10.80б он вообще отсутствует. Ион 84 образуется в результате перегруппировки Мак-Лафферти, которая протекает через шестичленное переходное состояние. Для реализации процесса необходима длина углеродной цепочки не менее трех атомов и наличие атома водорода у γ -атома углерода. В случае 4,4-диметилгексаналя такого атома водорода нет, и перегруппировка не идет. В случае 3,3-диметилгексаналя пик перегруппировочного иона также имеет нестандартное для альдегидов значение (как правило, m/z 44), обусловленное ионом енольной формы ацетальдегида. Дело в том, что на второй стадии перегруппировки за заряд и неспаренный электрон конкурируют две молекулы. Наличие двух метильных групп у атома углерода C_3 исходной молекулы приводит к образованию тризамещенного олефина, энергия ионизации которого оказывается значительно ниже, чем у альтернативного енола (схема 14.33). В результате пик олефинового иона доминирует в спектре. Таким образом, на рис. 10.80а, б представлены спектры 3,3-диметилгексаналя и 4,4-диметилгексаналя соответственно.

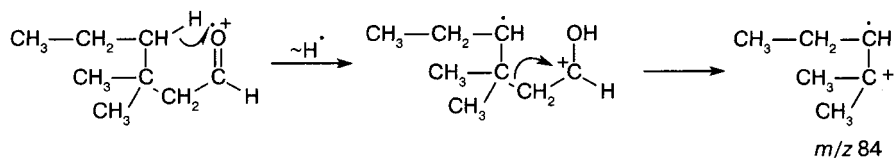


Схема 14.33

Задача 10.68. Решение этой задачи базируется на том же принципе, что и предыдущей. Пик иона с m/z 104 обусловлен перегруппировкой Мак-Лафферти. Интенсивности пиков альтернативных енольного и олефинового ионов определяются энергиями ионизации этих соединений. При распаде 4-фенилбутаналь конкурируют енольная форма ацетальдегида (ЭИ 9,5) и стирол (ЭИ 8,4). Поскольку энергия ионизации последнего значительно ниже, в спектре наблюдается пик стирольного иона, а пик кислородсодержащего фрагмента (m/z 44) отсутствует вовсе (схема 14.34).

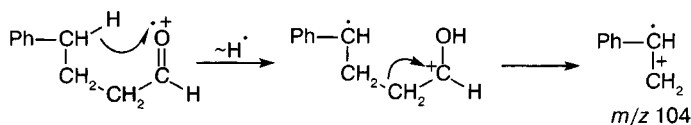


Схема 14.34

Задача 10.69. г) Основное направление распада кетонов связано с расщеплением $C-C$ связей с двух сторон от карбонильной группы. В случае бензилэтилкетона по этому механизму образуются два ацильных и два углеводородных иона. В паре ацильных ионов пик $C_2H_5CO^+$ (m/z 57) будет более интенсивен по правилу выброса максимального алкила и в связи с последующей фрагментацией альтернативного иона $PhCH_2CO^+$ (m/z 119). В паре углеводородных ионов безусловным лидером будет

тропилий-катион (m/z 91). Он может обладать максимальным пиком в спектре. Пик второго иона (m/z 29) будет значительно менее интенсивен. Тропилий катион далее теряет последовательно две молекулы ацетилена с образованием ионов с m/z 65 и 39. Незначительную интенсивность будет иметь фенил-катион (m/z 77) и продукт его вторичного распада ион с m/z 51. Единственный перегруппировочный процесс заключается в элиминировании метилкетена с образованием нечетноэлектронного иона $C_7H_8^{+}$ (схема 14.35).

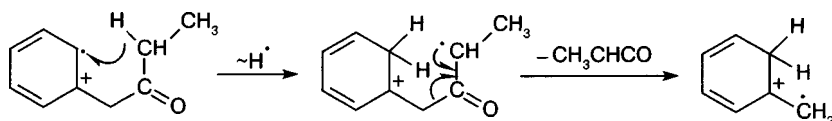


Схема 14.35

Задача 10.70. Основные направления фрагментации бутирофенона представлены на схеме 14.36. В спектре доминируют пики ионов, обусловленных ароматическим ядром. Перегруппировка Мак-Лафферти приводит к образованию единственного нечетноэлектронного иона с m/z 120. Значительно большая стабильность иона $PhCO^+$ (m/z 105) по сравнению с ионом $C_3H_7CO^+$ (m/z 71) отчетливо проявляется при сравнении интенсивностей их пиков.

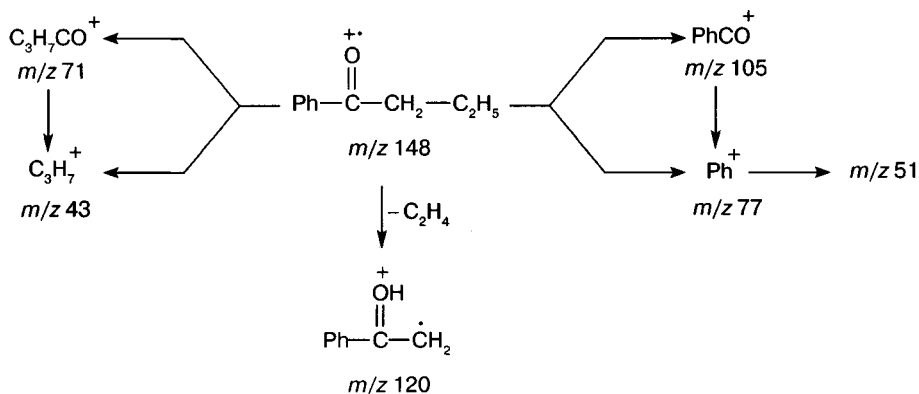


Схема 14.36

Задача 10.71. е) Основное направление распада кетонов связано с расщеплением $C-S$ связей с двух сторон от карбонильной группы. Поскольку дибутилкетон является симметричной молекулой, эти процессы приводят к образованию не четырех, а двух ионов: $C_4H_9^+$ и $C_4H_9CO^+$. Перегруппировка Мак-Лафферти может протекать последовательно по обоим заместителям с выбросами молекул пропилена и приводить к иону со структурой енольной формы ацетона (схема 14.37). Пики этих четырех ионов будут доминировать в спектре. Минорные пики будут обусловлены углеводородными ионами, образующимися при распаде бутил-катиона, и благодаря менее выгодным направлениям распада (например, выброс этильного радикала из M^{+} при разрыве связи C_2-C_3).

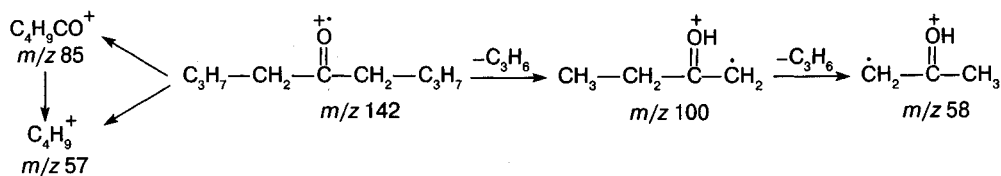


Схема 14.37

Задача 10.72. Соединение обладает небольшой молекулярной массой. Пик с m/z 58 удовлетворяет всем критериям для того, чтобы его можно было рассматривать в качестве молекулярного. Интенсивность пика $[\text{M}-\text{H}]^+$ высока, что несколько затрудняет расчет элементного состава молекулы по пикам изотопных ионов. Тем не менее установить, что в молекуле три атома углерода, достаточно легко, а два возможных состава — $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ и $\text{C}_3\text{H}_3\text{F}$. Интенсивные пики фрагментных ионов с m/z 28 и 29 позволяют отвергнуть фторсодержащее соединение. Степень ненасыщенности кислородсодержащего соединения $\text{R} = 3 - 3 + 1 = 1$. Реальных изомеров с такой брутто-формулой всего семь. Для установления структуры необходимо обратиться к фрагментным ионам. Крайне низкая интенсивность пиков с m/z 57, 31 и 43 позволяет отвергнуть структуры пропен-2-ола-1, метилоксирана и ацетона. Интенсивные пики фрагментных ионов с m/z 28 и 29 не согласуются со структурой метилвинилового эфира. Молекулярный ион оксетана рвется преимущественно по противоположащим связям цикла (аналогично циклобутану). В спектре доминирует пик иона 28, но пик иона 29 малоинтенсивен. Для циклопропанола характерно отщепление гидроксильной группы и молекулы воды. Полностью соответствует картине фрагментации структура пропионового альдегида. Наиболее важные ионы $[\text{M}-\text{H}]^+$ и HCO^+ характерны для низших альдегидов. Легко представить также образование ионов с m/z 26–27 в результате самых разнообразных процессов. Следовательно, на рис. 10.82 представлен масс-спектр пропаналя.

Задача 10.73. Соединение обладает небольшой молекулярной массой. Пик с m/z 72 удовлетворяет всем критериям для того, чтобы его можно было рассматривать в качестве молекулярного. По пику $\text{M}+1$ легко установить, что в молекуле четыре атома углерода, а брутто-формула соединения $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$. По интенсивности пика иона 44 можно сделать вывод, что ион 43 (максимальный пик в спектре) имеет состав $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$ и образуется в результате элиминирования этильного радикала из $\text{M}^{+\cdot}$. Среди возможных изомеров состава $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ только бутанон-2 распадается подобным образом. Исходя из структуры этого соединения, легко объяснить также образование остальных ионов, пики которых имеют значительную интенсивность в спектре. В частности, поскольку при фрагментации кетонов образуется две пары ацильных и алкильных ионов, то ион с m/z 43 образуется при элиминировании метильного радикала из $\text{M}^{+\cdot}$, а ион с m/z 29 представляет собой этил-катион. Следовательно, на рис. 10.83 представлен масс-спектр бутанона-2.

Задача 10.74. г) Наиболее интенсивные пики в спектрах изомерных 2,4-диметилциклогексанона и 3-этилциклогексанона будут обусловлены ионами с разными величинами m/z . Основное направление распада алкилзамещенных

циклогексанонов связано с разрывом цикла и элиминированием алкильного радикала, которому предшествует миграция атома водорода (схема 10.65). В случае 2,4-диметилциклогексанона метильная группа из положения 4 будет элиминироваться в составе нейтрального фрагмента, а два основных иона с пиками примерно равной интенсивности будут иметь величины m/z 55 и 69. В случае 3-этил-циклогексанона подобный процесс приводит к образованию основных ионов с величинами m/z 55 и 83, причем интенсивность пика последнего должна быть выше (схема 14.38). Достаточно высокой интенсивностью будет обладать также пик иона $[M-C_2H_5]^+$.

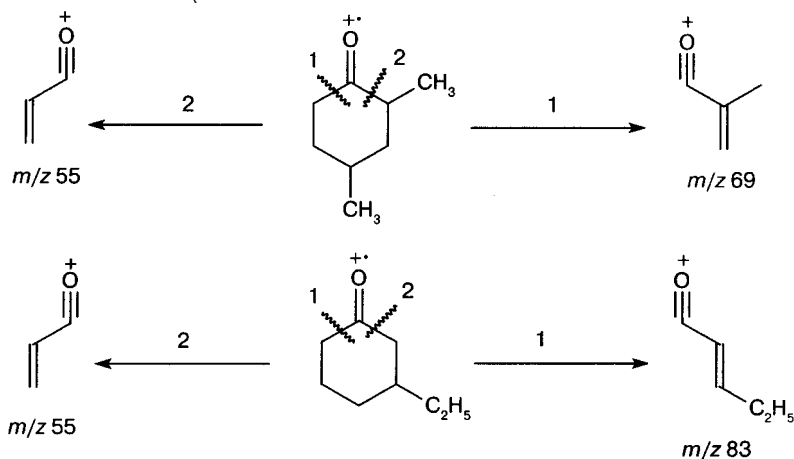


Схема 14.38

Задача 10.75. Общий вид спектра позволяет заключить, что соединение принадлежит алифатическому ряду. Молекулярный ион имеет массу 100. Можно заподозрить наличие атома брома (ионы 98 и 100), однако величины m/z фрагментных ионов дают основание отвергнуть эту гипотезу. К сожалению, крайне низкая интенсивность пика M^{++} не позволяет сделать вывод об элементном составе соединения по изотопным пикам. Достаточно интенсивный пик (m/z 82) обусловлен отщеплением молекулы воды из M^{++} . Этот процесс характерен для спиртов и карбонильных соединений. Ион 82 предоставляет также возможность рассчитать, что в его составе шесть атомов углерода (по иону $A+1$, m/z 83). Следовательно, брутто-формула соединения $C_6H_{12}O$, а его степень ненасыщенности 1. Этим параметрам удовлетворяют альдегиды, кетоны, ненасыщенные или карбоциклические спирты. Невыраженная спиртовая серия гомологических фрагментных ионов ставит под сомнение варианты спиртов. Наиболее интенсивный пик в спектре (ион с m/z 44) характерен для альдегидов с незамещенным α -атомом углерода. Об этом же свидетельствует интенсивный пик иона с m/z 56 (ион $[M-44]$, разд. 10.10). Пик иона с m/z 44 не может иметь столь высокую интенсивность в случае кетонов любого состава. Следовательно, на рис. 10.84 представлен спектр одного из изомеров гексаналя. Весьма затруднительно сделать вывод о месте разветвлений в углеродном скелете. Понятно, что цепь не может иметь разветвлений в положении 2 (ион с

m/z 44). Метильный заместитель в положении 3 или 4 приводит к перераспределению интенсивностей пиков ионов с m/z 44 и 56. Поскольку олефиновый фрагмент, конкурирующий за заряд с енольной формой ацетальдегида в перегруппировке Мак-Лафферти, оказывается в этих случаях разветвленным, его энергия ионизации ниже, чем кислородсодержащего фрагмента. Как следствие, пик иона с m/z 56 становится интенсивнее, чем пик иона с m/z 44. Таким образом, с большой степенью вероятности можно считать углеродный скелет гексаналя неразветвленным. На рис. 10.84 представлен масс-спектр *n*-гексаналя.

Задача 10.76. Ион с m/z 100 хорошо проходит тест на то, чтобы быть молекулярным. Его состав легко рассчитать по изотопным пикам — $C_6H_{12}O$ при степени ненасыщенности 1. Наиболее интенсивные пики в спектре принадлежат четно-электронным ионам с массами 85, 57 и 43, а также перегруппировочному иону с массой 58. Этот ион характерен для метилкетонов и α -метилальдегидов. Он образуется в результате перегруппировки Мак-Лафферти. Можно допустить наличие в структуре молекулы одного из двух фрагментов CH_2COCH_3 или CH_3CHCHO . Эти фрагменты должны быть связаны с пропильным или изопропильным заместителем. Следовательно, необходимо выбрать одно из четырех возможных карбонильных соединений. Достаточно интенсивный пик иона $[M-CH_3]^+$ позволяет исключить из рассмотрения оба альдегида. Напротив, пик этого иона должен присутствовать в спектрах обоих метилкетонов. Сделать выбор между гексаном-2 и 4-метилпентаном-2 действительно очень сложно. Если вы дошли до этого места, можно считать, что задача решена. Полезным, но не очень надежным критерием выбора может служить интенсивность пиков ионов 43 и 44. Расчет числа атомов углерода в ионе 43 по интенсивности пика 44 дает 2,7. Это означает, что пик 43 обусловлен ионами двух составов (CH_3CO и C_3H_7), причем доля второго больше. Точный анализ интенсивностей пиков этих ионов можно было бы легко сделать с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения. Учитывая, что пик иона CH_3CO^+ очень интенсивен в спектрах метилкетонов, тот факт, что интенсивность пика иона $C_3H_7^+$ еще выше, означает, что структура молекулы благоприятствует образованию этого углеводородного иона. На рис. 10.85 представлен масс-спектр 4-метилпентанона-2.

Задача 10.77. Присутствие в спектре лишь нескольких интенсивных пиков и отсутствие пиков в области низких масс свидетельствует об ароматической структуре соединения. Малолинейчатость спектра позволяет также вычислить элементный состав для основных ионов (m/z 75, 95, 123, 218). Получаем, что в составе ионов с m/z 75 и 95 по шесть атомов углерода (к сожалению, отсутствуют пики $A+2$), состав иона 123 — C_7H_4OF , а иона 218, который является молекулярным, — $C_{13}H_8OF_2$. Степень ненасыщенности двух последних ионов — 5 и 9 соответственно. Разница в массах между ионами 123 и 218 составляет 95 дальтон, что, кстати, соответствует массе второго по интенсивности иона в спектре. Разница в массах между ионами 123 и 95 составляет 28 дальтон, что с учетом состава можно интерпретировать как выброс молекулы CO . Тогда разница в массах между ионами 95 и 75 в 20 дальтон обусловлена выбросом молекулы HF . Вероятно, ион 95 имеет структуру фторфенила, а ион 123 — фторбензоила. Тогда соединение, скорее всего, является

ди(фторфенил)кетон. Выявить расположение атомов фтора в бензольных ядрах по масс-спектру невозможно. На рис. 10.86 представлен масс-спектр 4,4'-дифтор-бензофенона.

Задача 10.78. а) 5-метилгексанон-3, б) 2-метилгексанон-3.

Задача 10.80. Пентанон-3.

Задача 10.81. Перегруппировка Мак-Лафферти протекает через шестичленное переходное состояние в молекулярных ионах карбонилсодержащих соединений и замещенных ароматических соединений. К месту локализации неспаренного электрона мигрирует γ -атом водорода, после чего происходит разрыв между α - и β -атомами (C, N, O, S) цепи. Протеканию перегруппировки могут мешать пространственные препятствия, наличие кратных связей между α - и β -, β - и γ -, γ - и δ -атомами цепи. Среди перечисленных соединений претерпевают перегруппировку гексаналь, пропиленбензол, этилформиат, бутилбутаноат, бутилбензол.

Задача 10.82

а) Масляная кислота имеет углеродную цепь достаточной длины для протекания перегруппировки Мак-Лафферти. В молекуле изомасляной кислоты цепь оказывается слишком короткой. В результате в спектре масляной кислоты будет присутствовать интенсивный пик иона с m/z 60. В спектре изомасляной кислоты его не будет.

д) Отличий будет много. Достаточно выводов, сделанных на основании основных перегруппировочных ионов. Перегруппировка Мак-Лафферти в гексановой кислоте приведет к образованию иона с m/z 60. Достаточно высокой интенсивностью будет обладать также пик иона (m/z 61), образующегося в результате миграции двух атомов водорода. Для пропиленпропионата перегруппировки Мак-Лафферти и Мак-Лафферти + 1 возможны только по спиртовой цепи. В его спектре будут наблюдаться интенсивные ионы перегруппировочных ионов с m/z 74 и 75.

л) Перегруппировка Мак-Лафферти позволяет различить изомерные винилпропионат и этилакрилат. В первом случае перегруппировка невозможна ни по спиртовой, ни по кислотной цепи. Во-втором перегруппировочный процесс по спиртовой группе приводит к потере молекулы этилена и образованию нечетно-электронного иона с m/z 72.

Задача 10.83

а) Бутиловый эфир масляной кислоты может претерпевать перегруппировку Мак-Лафферти по кислотной (m/z 116) и спиртовой (m/z 88) цепи (схема 14.39). Кроме того, возможна перегруппировка Мак-Лафферти + 1 (m/z 89). Механизм этого процесса представлен на схеме 10.73. Конечным продуктом является ион со структурой молекулярного иона уксусной кислоты (m/z 60).

г) Для изопропилпропионата перегруппировки Мак-Лафферти (m/z 74) и Мак-Лафферти + 1 (m/z 75) возможны лишь по спиртовой цепи (схема 14.40). Кислотная цепь слишком коротка для реализации необходимого шестичленного переходного состояния.

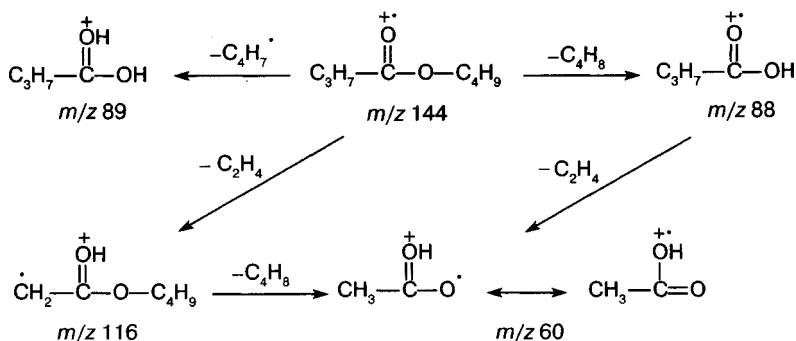


Схема 14.39

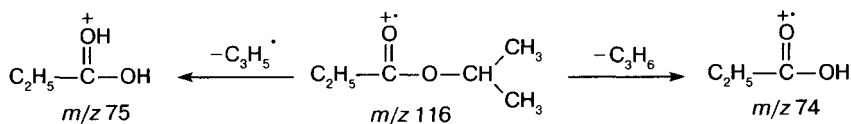


Схема 14.40

Задача 10.84. Важнейшие характеристические направления фрагментации молекулярных ионов декановой кислоты включают образование перегруппировочных ионов (m/z 129 и 73) по механизму представленному на схеме 10.69. Перегруппировка Мак-Лафферти приводит к иону с m/z 60. Двойная миграция атомов водорода обуславливает образование иона с m/z 61. Эти четыре процесса отражены на схеме 14.41. Кроме того, достаточно высокую интенсивность имеют пики ионов кислотной (87, 101, 115...), алкановой (29, 43, 57...) и алкеновой (41, 55, 69...) гомологических серий. Эти ионы образуются по самым разнообразным механизмам и могут быть первичными, вторичными, третичными и т.д. Ион с m/z 129 образуется также по механизму, представленному на схеме 10.70 с элиминированием пропильного радикала, включающего α -, β - и γ -атомы углерода исходной молекулы. Этот ион имеет циклическую структуру (схема 14.41). Аналогичный процесс с элиминированием этильного радикала, включающего α - и β -атомы углерода исходной молекулы, приводит к иону кислотной гомологической серии с m/z 143.

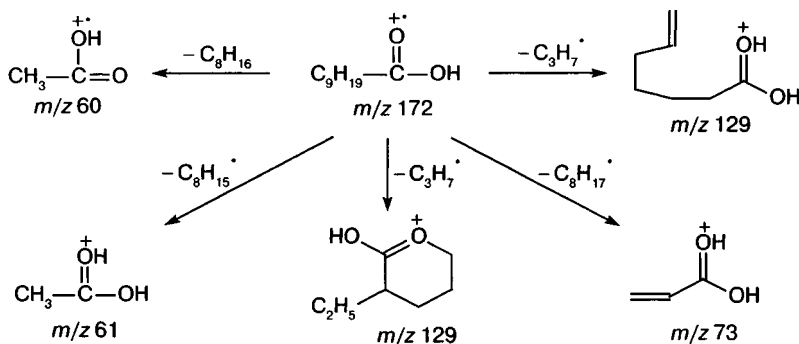


Схема 14.41

Задача 10.85. Схема 14.42 отражает основные направления фрагментации M^{++} метилового эфира 2,4-диметилгептановой кислоты. Перегруппировочные ионы циклической структуры, образующиеся по механизму, представленному на схеме 10.70, в данном случае имеют величины m/z 129 и 101. Первый из них обусловлен отщеплением пропильного радикала с включением α - и β -атомов углерода и метильной группы в положении 2 исходной молекулы. Второй обусловлен выбросом амильного радикала, включающего α -, β -, γ -атомы углерода и метильные группы в положениях 2 и 4 исходной молекулы. Ион с m/z 101 образуется также по другому механизму (схема 10.69) и имеет линейную структуру (схема 14.42). Перегруппировка Мак-Лафферти приводит к иону с m/z 88, пик которого максимален в спектре. Ион с m/z 141 обусловлен ацильным ионом $[M-OCH_3]^+$. Достаточно высокую интенсивность имеют также пики ионов кислотной (87, 101, 115...), алкановой (29, 43, 57...) и алкеновой (41, 55, 69...) гомологических серий. Эти ионы образуются по самым разнообразным механизмам и могут быть первичными, вторичными, третичными и т.д.

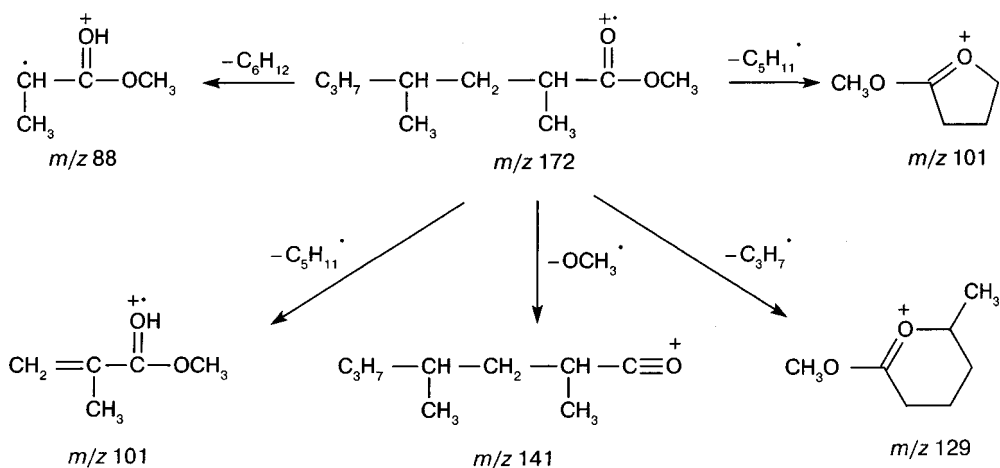


Схема 14.42

Задача 10.86. Ионы с m/z 85 и 115 образуются при фрагментации M^{++} амилового эфира валериановой кислоты в результате α -разрывов. Перегруппировка Мак-Лафферти по спиртовой цепи обуславливает возникновение ионов с m/z 102 и 70 (схема 14.43). Меньшая энергия ионизации второго иона делает его пик значительно более интенсивным по сравнению с альтернативным. Ион с m/z 103 появляется в результате перегруппировки Мак-Лафферти + 1. Перегруппировка Мак-Лафферти по кислотной цепи приводит к иону с m/z 130, который далее распадается по механизмам перегруппировок Мак-Лафферти и Мак-Лафферти + 1 до ионов с m/z 60 и 61. Кроме того, достаточно высокую интенсивность имеют пики ионов кислотной (87, 101, 115...), алкановой (29, 43, 57...) и алкеновой (41, 55, 69...) гомологических серий. Эти ионы образуются по самым разнообразным механизмам и могут быть первичными, вторичными, третичными и т.д.

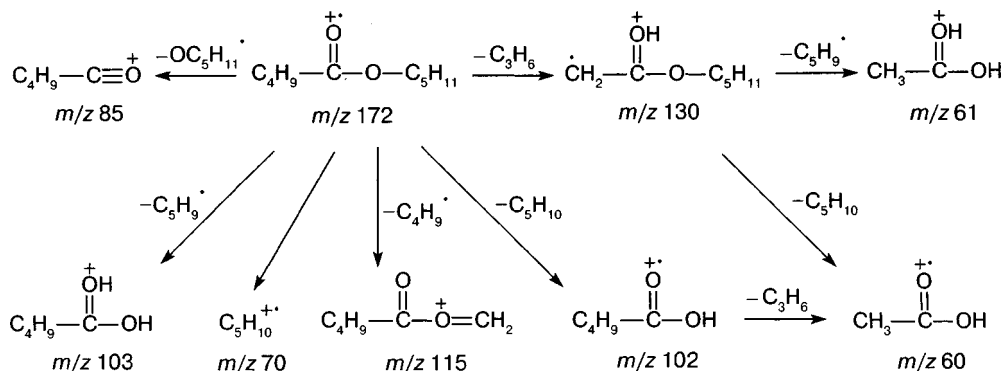


Схема 14.43

Задача 10.87

а) Основные процессы фрагментации 2-метилбутановой кислоты в условиях электронной ионизации представлены на схеме 14.44. Помимо указанных ионов, характеризующихся максимальными по интенсивности пиками, в спектре будут наблюдаться пики ионов кислотной, алкановой и алкеновой серий.

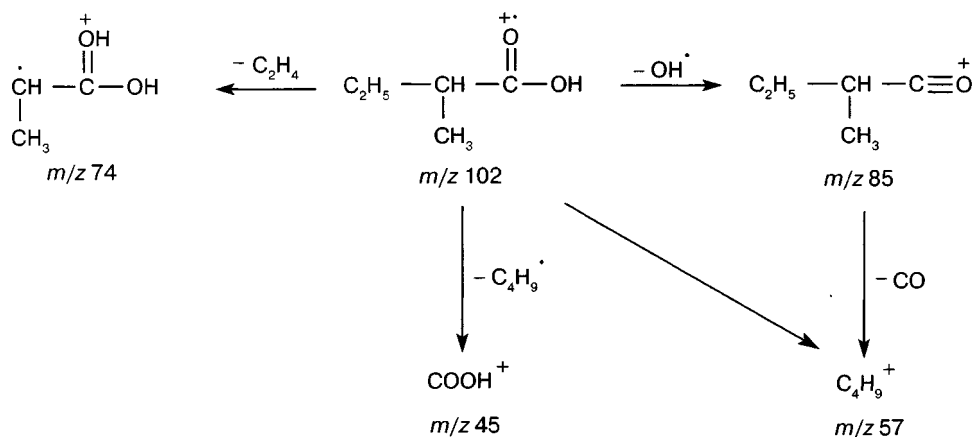


Схема 14.44

и) Основные процессы фрагментации бензилацетата в условиях ИЭ представлены на схеме 14.45.

Ацетил-катион ($m/z\ 43$), тропилий-катион ($m/z\ 91$) и фрагмент с $m/z\ 73$ образуются в результате α -разрывов. Последний из них далее теряет молекулу кетена в результате вторичного перегруппировочного процесса через четырехчленное переходное состояние ($m/z\ 31$). Такой процесс может протекать также непосредственно в M^{++} . В этом случае возникает фрагмент со структурой бензилового спирта ($m/z\ 108$), который далее последовательно теряет атом водорода ($m/z\ 107$) и молекулу CO ($m/z\ 79$). Фенильный ($m/z\ 77$) и тропилиевые ионы в результате вторичных процессов образуют ароматическую серию ионов ($m/z\ 39, 51, 65$).

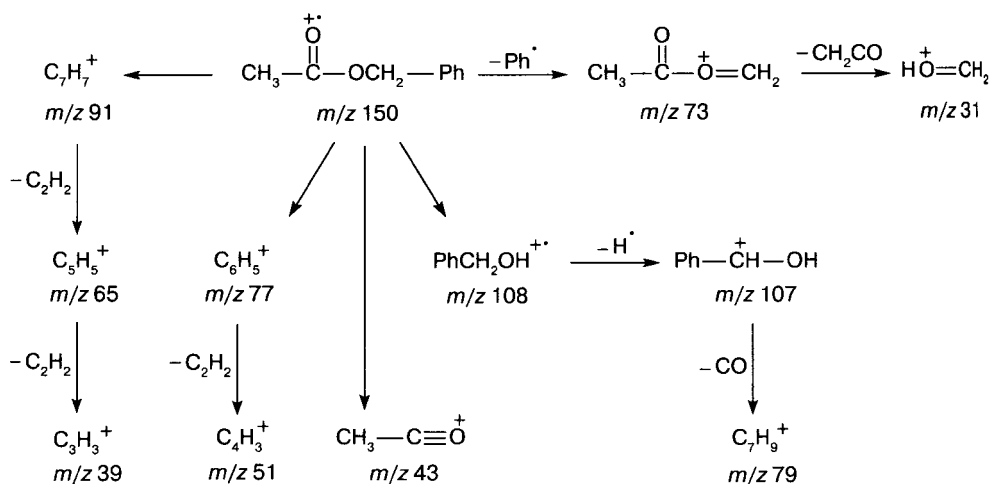


Схема 14.45

Задача 10.88. Молекулярный ион, вероятно, имеет массу 74 дальтона. По изотопным пикам можно определить, что в составе молекулы три атома углерода и два атома кислорода. Обратите внимание, что интенсивности изотопных пиков несколько занижены по сравнению с теоретическими значениями в связи с высокой интенсивностью пика иона $[\text{M}-\text{H}]^+$. Состав соединения $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$, степень ненасыщенности 1. Интенсивные пики ионов с m/z 45 и 73 характерны для спиртов, кислот и эфиров. Поскольку циклические структуры исключаются по условию задачи, можно рассмотреть лишь 1-гидроксипропанон-2, пропионовую кислоту, этилацетат, этилформиат, 2-гидроксипропаналь, 3-гидроксипропаналь, 2-метоксиэтаналь. Для сложных эфиров и 2-метоксиэтаноля не характерно отщепление гидроксильной группы и молекулы воды, тогда как пики ионов с m/z 67 и 56 весьма интенсивны в спектре на рис. 10.104. Кроме того, ацетил-катион (m/z 43) должен иметь максимальный пик в спектре метилацетата, а этилформиат может претерпевать перегруппировку Мак-Лафферти с образованием молекулярного иона муравьиной кислоты (m/z 46). Гидроксипропанон должен иметь в спектре два доминирующих пика (ионы CH_3CO^+ и CH_2OH^+). Для 2-гидроксипропаноля должен быть маловероятен выброс атома водорода, но весьма благоприятен выброс метильной группы. Поскольку пик иона $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ в спектре задачи отсутствует вовсе, альдегид такой структуры можно также исключить из рассмотрения. Для фрагментации 3-гидроксипропаноля не характерен ион с m/z 45, а максимальный пик в спектре должен быть обусловлен ионом CH_2OH^+ (m/z 31). Единственным соединением, удовлетворяющим условию задачи, является пропионовая кислота. Углеводородные ионы с m/z 26–29 обусловлены этильной группой. Карбоксильная группа обуславливает ион с m/z 45. Отщепление гидроксильной группы и молекулы воды приводит к появлению ионов с m/z 57 и 56. Ион $[\text{M}-\text{H}]^+$ образуется в результате отщепления атома водорода метильной группы по механизму аллильного распада енольной формы $\text{M}^{+\bullet}$ (схема 14.46). Следовательно, на рис. 10.104 представлен спектр пропионовой кислоты.

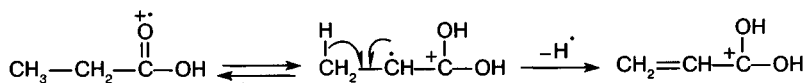


Схема 14.46

Задача 10.89. Отсутствие в спектре пика $M+2$ не позволяет установить точный элементный состав соединения. По пику $M+1$ можно сделать вывод о наличии в молекуле четырех атомов углерода. В спектре отсутствуют пики перегруппировочных ионов. Высокая интенсивность пика иона $[M-31]^+$ при низкой интенсивности пика иона с m/z 31 характерна для метиловых эфиров карбоновых кислот. Пик иона с m/z 60 (изотопного для m/z 59) имеет интенсивность 2,2%, т.е. ион содержит два атома углерода и обусловлен потерей этильной группы из M^{++} . Объединение этих наблюдений приводит к однозначному варианту решения. На рис. 10.105 представлен спектр метилпропаноата.

Задача 10.90. Точные величины интенсивностей изотопных пиков позволяют легко рассчитать элементный состав M^{++} : $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ при степени ненасыщенности 1. Интенсивный пик иона с m/z 73 связан с элиминированием метильного радикала, а ион с m/z 71 — с элиминированием гидроксильного радикала из M^{++} . В спектре отсутствуют интенсивные пики перегруппировочных ионов, что позволяет исключить из рассмотрения 4-гидоксибутанон-2, 1-метоксипропанон-2, масляную кислоту, этилацетат, пропилформиат и изопропилформиат. Отсутствие в спектре пика иона $[M-\text{OCH}_3]^+$ дает возможность отвергнуть метилпропионат и 1-гидоксибутанон-2. Пользуясь правилами фрагментации альдегидов, спиртов и простых эфиров, достаточно просто исключить любые альдегиды со спиртовой или алкоксильной группой. Циклические соединения исключены по условию задачи. Единственным вариантом, удовлетворяющим спектру, является изомасляная кислота. Ион с m/z 45 обусловлен карбоксильной группой, с m/z 43 — изопропильной группой. Ион $[M-\text{CH}_3]^+$ образуется в результате отщепления метильной группы по механизму аллильного распада енольной формы M^{++} (схема 14.47). Следовательно, на рис. 10.106 представлен спектр изомасляной кислоты.

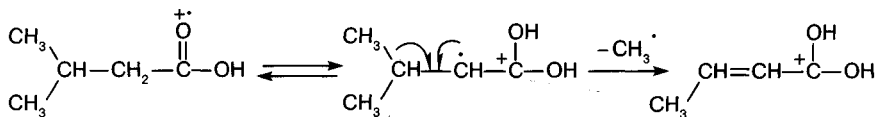


Схема 14.47

Задача 10.91. В составе наиболее тяжелого иона (m/z 104) всего три атома углерода (по пику 105). Спектр позволяет также получить определенную информацию о составе ионов с m/z 87 и 60. В первом вновь три атома углерода (отщепление гидроксильного радикала), а во втором — два. Благоприятное отщепление 44 единиц массы с одним атомом углерода возможно только в случае CO_2 . Для протекания такого процесса необходима циклическая структура, например лактонов, ангидридов дикарбоновых кислот, либо наличие в линейной молекуле других гетероатомов,

возможных центров локализации заряда и неспаренного электрона (кетокислоты, дикарбоновые кислоты). Важную информацию можно извлечь из иона с m/z 69. Он может возникнуть только в результате последовательных выбросов гидроксильного радикала и молекулы воды. Следовательно, в молекуле соединения, скорее всего, две гидроксильные группы, причем по крайней мере одна из них карбоксильная. Это устраняет варианты лактона и циклического ангидрида.

Три атома углерода, три атома кислорода и два атома водорода имеют массу 86 дальтон, т.е. на остальные элементы приходится 18 единиц массы. Поскольку присутствие атома азота невозможно (четная молекулярная масса), единственным вариантом состава может быть $C_3H_4O_4$ при степени ненасыщенности 2. Так как циклические структуры уже отвергнуты, остается три возможных варианта: 3-гидрокси-2-оксопропановая кислота, 2-гидрокси-3-оксопропановая кислота и малоновая кислота.

Молекулярный ион 3-гидрокси-2-оксопропановой кислоты не может претерпевать перегруппировку Мак-Лафферти с выбросом CO_2 . Среди направлений ее распада будут превалировать потери частиц CH_2OH^\cdot , $HOOC^\cdot$ и образование иона CH_2OH^+ . Перегруппировка Мак-Лафферти с элиминированием CO_2 возможна для $M^{+\cdot}$ 2-гидрокси-3-оксопропановой кислоты, однако значительной интенсивностью должны обладать пики ионов $[M-HOOC]^+$ и $[M-HCO]^+$. Эти пики отсутствуют в спектре задачи. Следовательно, на рис. 10.107 представлен масс-спектр малоновой кислоты. Все фрагментные ионы легко объяснимы очевидными направлениями распада этого соединения.

Задача 10.92. В спектре ярко выражен выброс из $M^{+\cdot}$ 44 дальтон. Однако в данном случае благодаря высокой интенсивности пиков ключевых ионов легко определить их элементные составы по пикам $A+1$ и $A+2$. Для иона с m/z 148, по-видимому молекулярного, состав $C_8H_4O_3$; а для иона с m/z 104 — C_7H_4O . В спектре отчетливо прослеживается ароматическая серия (m/z 76, 50, 38), причем такой ряд (не m/z 77, 51, 39) характерен для дизамещенного бензола. Если учесть наличие в молекуле дизамещенного бензольного ядра, состав остальных структурных элементов C_2O_3 . Такой состав возможен только для *орто*-фталевого ангидрида. Следовательно, на рис. 10.108 представлен масс-спектр *орто*-фталевого ангидрида.

Задача 10.93. Молекулярная масса соединения 116 дальтон, причем оно содержит шесть атомов углерода в молекуле (пик $M+1$). Интенсивные пики ионов с m/z 60 и 61 характерны для жирных кислот и их эфиров. В спектре задачи интенсивны также пики перегруппировочных ионов с m/z 88 и 89. Отщепления 28 и 27 атомных единиц массы характеризуют перегруппировку Мак-Лафферти и Мак-Лафферти + 1 для этиловых эфиров карбоновых кислот. Об этиловом эфире дополнительно свидетельствует ацильный ион с m/z 71, образующийся при отщеплении этоксигруппы из $M^{+\cdot}$. Поскольку в спектре наблюдается также достаточно интенсивный пик нечетноэлектронного иона с m/z 60, вероятно, первичный ион с m/z 88 претерпевает еще одну перегруппировку с элиминированием молекулы этилена. Такая перегруппировка возможна по кислотной цепи сложного эфира. Отщепление этилена указывает на масляную кислоту. Следовательно, на рис. 10.109 представлен спектр этилбутирата.

Задача 10.96. 4-метилпентановая, 3-метилпентановая, 2-метилпентановая.

Задача 10.98. Диметиловый эфир 2-метилпропандиовой кислоты.

Задача 10.99. Дибензоат гидрохинона.

Задача 10.100. а) Для N-этилгексанамида идут последовательные перегруппировки Мак-Лафферти по кислотной цепи и по алкильному заместителю у атома азота. Еще одна перегруппировка идет через четырехчленное переходное состояние в ионе $[M-CH_3]^+$. Указанные процессы представлены на схеме 14.48.

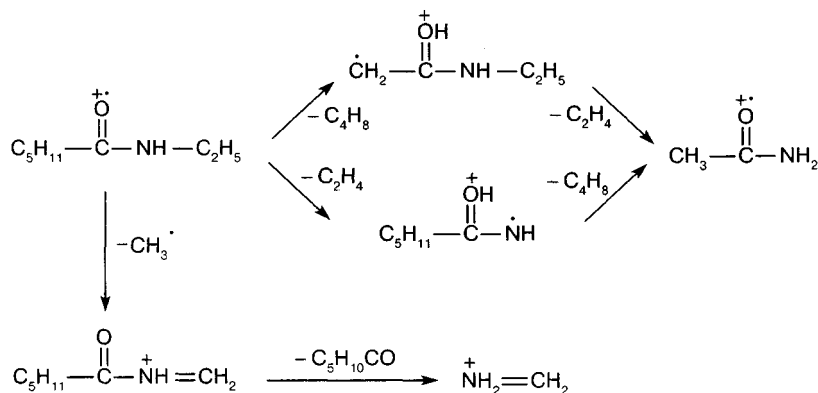
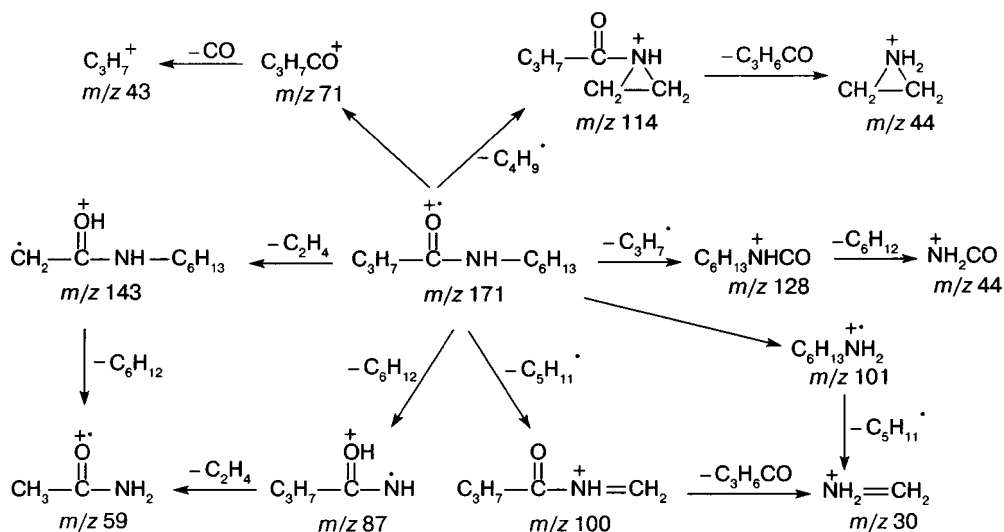


Схема 14.48

Задача 10.101. д) Два этих изомера легко различить по фрагментным ионам, образующимся в результате перегруппировки Мак-Лафферти. В спектре деканамида интенсивный пик будет обусловлен распадом по кислотной цепи с выбросом молекулы октена (ион m/z 59). Для N-амилпентанамида перегруппировка Мак-Лафферти протекает по обоим алкильным цепям. Распад по кислотной цепи с выбросом молекулы пропена приводит к иону с m/z 129, а по аминной группе — к иону с m/z 101 (выброс молекулы пентена). Пики этих ионов будут достаточно интенсивны. Вторичные перегруппировочные процессы в обоих указанных первичных ионах приведут к возникновению иона с m/z 59, аналогичного образующемуся при распаде деканамида.

Задача 10.102. Разрыв связи C—N в $M^{+·}$ приводит к ацильному иону с m/z 71. Этот же разрыв с миграцией атома водорода к азоту ведет к иону со структурой гексиламина (m/z 101), дальнейший распад которого обуславливает образование иона с m/z 30 (максимальный пик в спектре). Аминный тип распада отвечает за возникновение двух фрагментных ионов (m/z 128 и 100). Дальнейший распад первого из них приводит к иону с m/z 44, а второго — вновь к иону с m/z 30. Результат перегруппировки Мак-Лафферти по кислотной цепи — ион с m/z 143, а по аминному заместителю — ион с m/z 87. Ион с m/z 114 образуется в результате β -разрыва в аминном заместителе. Распадаясь далее, он превращается в циклический фрагмент с m/z 44. Помимо приведенных на схеме 14.49, в спектре отчетливо проявляются другие пики ионов аминной (58, 72, 86...), перегруппировочной амидной (73, 87, 101...), алкановой и алкеновой серий.



Задача 10.104. Если считать, что M^{++} соединения имеет массу 73 дальтона, в его составе должно быть нечетное число атомов азота. Расчет изотопного кластера M^{++} (с учетом наложения со стороны иона $[M-H]^+$) дает в качестве наиболее вероятного варианта присутствие в составе трех атомов углерода и одного азота. Вариантами элементного состава молекулы будут C_3H_7NO и C_3H_4NF . Степень ненасыщенности указанных соединений 1 и 2 соответственно. Интенсивный пик иона с m/z 44 в спектре характерен для фрагментации аминов и амидов. С учетом возможных элементарных составов ион с m/z 57 может образоваться только при отщеплении аминогруппы из M^{++} . Этот процесс наблюдается в условиях ИЭ для первых членов ряда незамещенных по азоту амидов жирных кислот, но абсолютно не характерен для аминов. На этом основании можно исключить из рассмотрения состав C_3H_4NF . Единственным приемлемым вариантом остается амид пропионовой кислоты. Ион с m/z 57 имеет состав C_2H_5CO , а ион с m/z 44 — NH_2CO . На рис. 10.118 представлен спектр пропанамида.

Задача 10.105. Дублеты, на которые следует обратить внимание (m/z 78, 80 и 91, 93), обусловлены ионом, содержащим один атом хлора (соотношение интенсивностей пиков $\sim 3:1$). Следует также отметить, что первый из этих ионов, скорее всего, перегруппировочный, поскольку имеет четную массу. В составе соединения не должно быть атомов азота. В противном случае в области низких масс наблюдались бы интенсивные пики с четной массой.

Основные пики в спектре принадлежат ионам алкановой (возможно, ацильной) и алкеновой серий. Поскольку интенсивные пики перегруппировочных ионов не характерны для алкилгалогенидов, соединение должно принадлежать к классам хлорангидридов, хлоркетонатов или хлоральдегидов. Наиболее тяжелый ион, не содержащий атома хлора, имеет массу 99 дальтон. По изотопному пику $A+1$ можно установить, что в его составе шесть атомов углерода. По всей видимости, состав

этого иона $C_6H_{11}O$, а образуется он при отщеплении атома хлора из M^{+} . Тогда хлорсодержащие ионы (m/z 105–108) образуются при отщеплении из M^{+} молекулы этилена и этильного радикала. Брутто-формула соединения $C_6H_{11}OCl$. Столь интенсивный пик, обусловленный отщеплением атома хлора из M^{+} , значительно лучше согласуется со структурой хлорангидрида, чем со структурами изомерных альдегидов или кетонов, для которых должны доминировать распады, связанные с карбонильной группой. В спектре наблюдались бы другие пики. Следовательно, речь идет о хлорангидриде гексановой кислоты.

Для того чтобы установить структуру углеводородного скелета, вновь обратимся к хлорсодержащим фрагментам. Дублет с m/z 78, 80 обусловлен перегруппировкой Мак-Лафферти и означает, что у α -атома углерода разветвлений нет. Дублет ионов с m/z 91, 93 образуется в результате перегруппировочного процесса (схема 10.69) или аллильного разрыва енольной формы соединения (схема 14.47). Регистрируемая величина m/z этого иона означает, что заместителей нет и у β -атома углерода. Выбор между изомерными гексановой и изогексановой кислотами позволяет сделать еще один хлорсодержащий ион. Отщепление этильной группы обусловлено процессом образования циклического пятичленного хлорониевого иона (схема 10.52). Любые разветвления в углеводородной цепи подавляют этот процесс. Кроме того, отщепление этильной группы и молекулы этилена вообще крайне маловероятно из M^{+} изогексаноилхлорида. Следовательно, на рис. 10.119 представлен масс-спектр гексаноилхлорида.

Задача 10.106. Считая, что молекулярная масса соединения 255 дальтон, а фрагменты основной гомологической серии имеют четные массы, можно сделать вывод, что вещество является амином или амидом. Ионы с m/z 59 и 72, пики которых максимальны в спектре, характерны для амидов жирного ряда. Молекулярная масса 255 дальтон действительно соответствует гексадеканамиду. К сожалению, низкая интенсивность пика M^{+} не позволяет рассчитать элементный состав соединения по изотопным пикам с достаточной степенью надежности. Тем не менее состав $C_{16}H_{33}NO$ не противоречит интенсивности пика $M+1$. Несложно сделать выводы и о структуре углеводородной цепи. Массы перегруппировочных ионов (m/z 59 и 72) характерны для неразветвленной углеводородной цепи у α - и β -атомов углерода. Повышенные интенсивности пиков ионов с m/z 128 и 184 в ряду пиков характеристической серии позволяют заключить, что углеродный скелет молекулы неразветвлен (схема 10.69). Следующий ион с аномальной интенсивностью должен иметь массу 240 дальтон. Однако элиминирование метильного радикала обычно подавлено более энергетически выгодными процессами. Повышенная интенсивность пика иона с m/z 212 объяснима на основе механизма элиминирования пропильного радикала, включающего α -, β - и γ -атомы углерода исходной молекулы. Механизм этого процесса для случая кислот представлен схемой 10.70. На рис. 10.120 представлен масс-спектр n -гексадеканамида.

Задача 10.107

а) Основные процессы распада M^{+} N -этилбензамида представлены на схеме 14.50. Доминировать в спектре будут ионы с m/z 149, 105, 77.

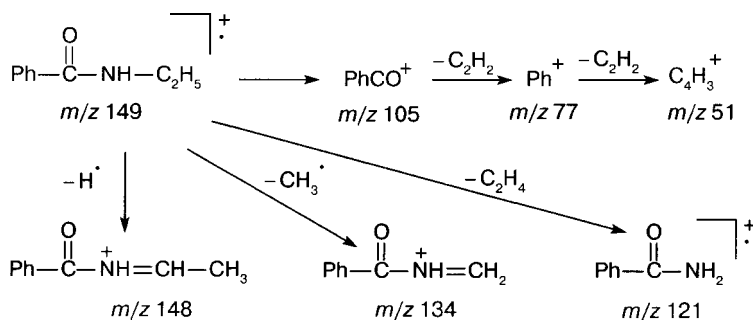


Схема 14.50

г) Основные процессы фрагментации $\text{M}^{+\bullet}$ бромангида валериановой кислоты представлены на схеме 14.51.

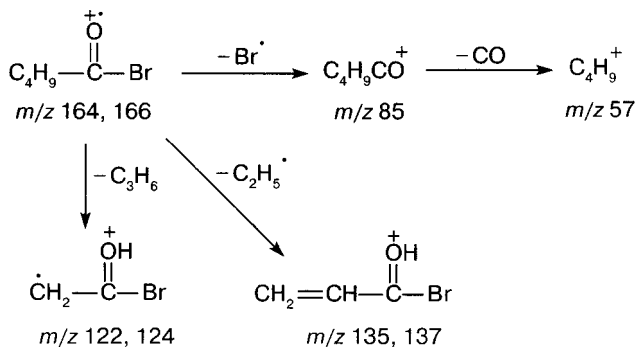


Схема 14.51

Задача 10.108. Считая ион с m/z 149 молекулярным, делаем вывод о нечетном числе атомов азота в молекуле. Расчет элементного состава соединения по изотопным пикам приводит к брутто-формуле $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$. На ароматическую природу соединения указывают пики характеристических фрагментов с m/z 91, 77, 65, 51, 39 и др. Доминирующий в спектре пик, вероятно, обусловлен ионом анилиновой структуры, образующимся в результате перегруппировочного процесса. Состав этого иона $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}$ можно вычислить по интенсивности пика $A+1$. Вторичные ионы с m/z 66 и 65 образуются при элиминировании из $\text{M}^{+\bullet}$ анилина частиц HNC и $\text{H}_2\text{NC}^\bullet$. Ион с m/z 120 образуется при элиминировании 29 дальтон из $\text{M}^{+\bullet}$. Учитывая, что в состав молекулы входит фрагмент PhNH , можно оценить два варианта структур соединения: N-фенилпропанамид и 2-фениламинопропаналь. Молекулярный ион альдегида должен, помимо отщепления 29 дальтон (HCO^\bullet), элиминировать также метильный радикал. Поскольку пика этого фрагментного иона в спектре не наблюдается, можно сделать вывод, что на рис. 10.121 представлен спектр N-фенилпропанамид.

Задача 10.109. Процесс возникновения иона с m/z 60 обусловлен изомеризацией части молекулярных ионов нитродекана в нитритную форму. Механизм трансформации представлен на схеме 14.52.

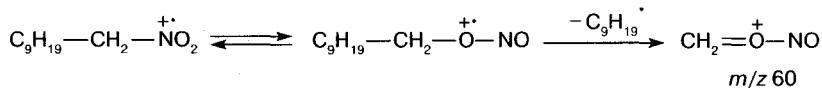
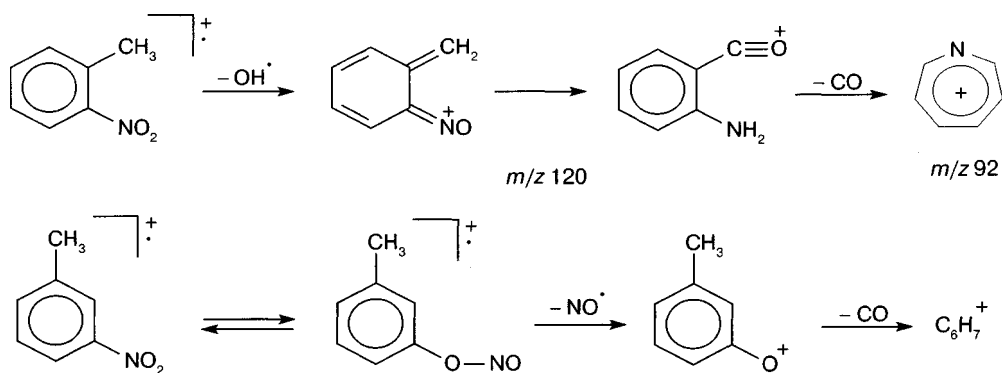
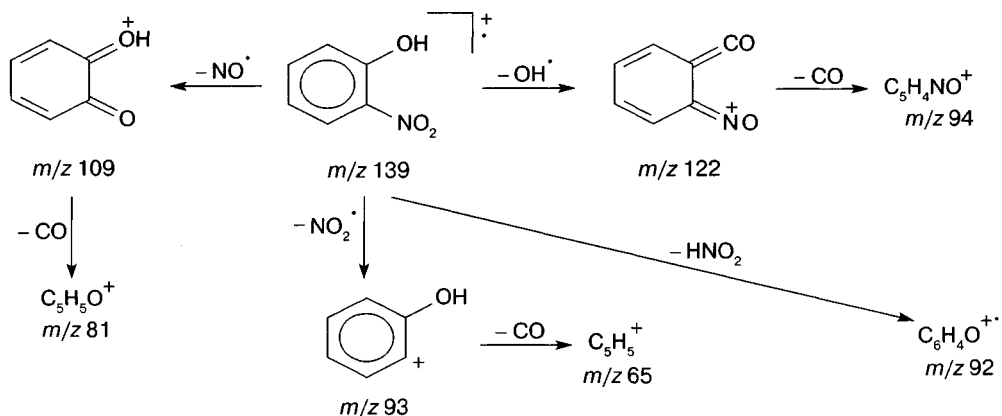


Схема 14.52

Задача 10.110. На рис. 10.130а представлен масс-спектр *орто*-, а на рис. 10.130б – *мета*-изомера. Помимо общих направлений распада, в первом случае активно идут процессы, приводящие к образованию ионов с m/z 120 и 92 (схемы 10.94 и 14.53), а во втором – ионов с m/z 107 и 93 (схема 14.53).



Задача 10.111. Основные направления фрагментации молекулярного иона *орто*-нитрофенола представлены на схеме 14.54.



Наличие нитрогруппы полностью подавляет «фенольный» путь распада, который реализуется только после предварительного элимирования нитрогруппы, в ионе $[\text{M}-\text{NO}_2]^+$ с m/z 93. Изомеризация $\text{M}^{+\bullet}$ в нитритную форму обуславливает возникновение ионов с m/z 109 и 81, а *орто*-эффект – ионов с m/z 122 и 94.

Задача 10.112

в) На схеме 14.55 представлены основные первичные и вторичные направления распада *para*-пропилнитробензола. Они связаны с первоначальной фрагментацией по обоим заместителям в бензольном ядре.

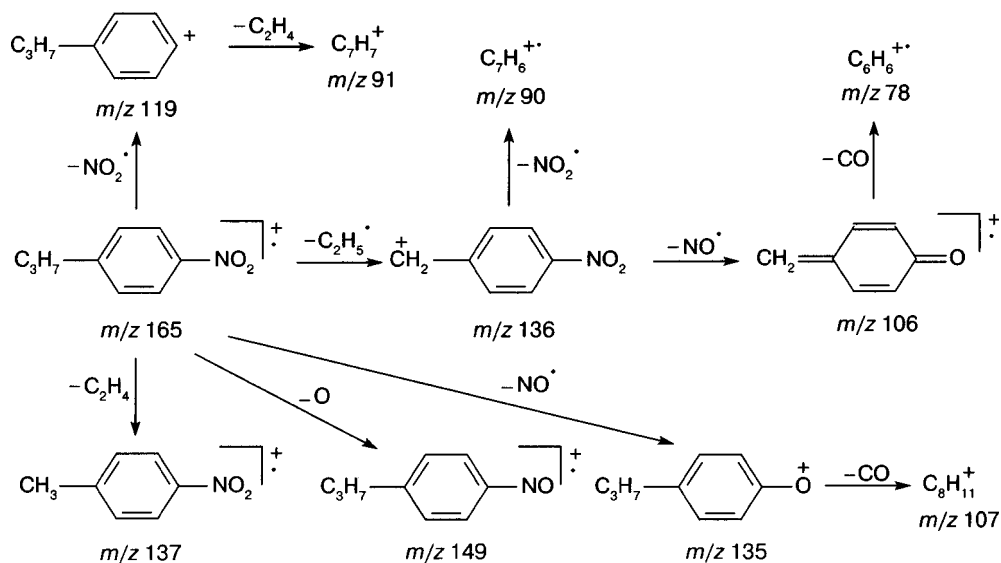


Схема 14.55

ж) Основные направления фрагментации $\text{M}^{+\bullet}$ симметричного диамильгидразина связаны с α -распадом. Поскольку в $\text{M}^{+\bullet}$ заряд и неспаренный электрон могут равновероятно размещаться на любом из атомов азота, элиминироваться может или бутильный, или амилный радикал (схема 14.56). Вторичные процессы приводят к иону с $m/z \ 30$.

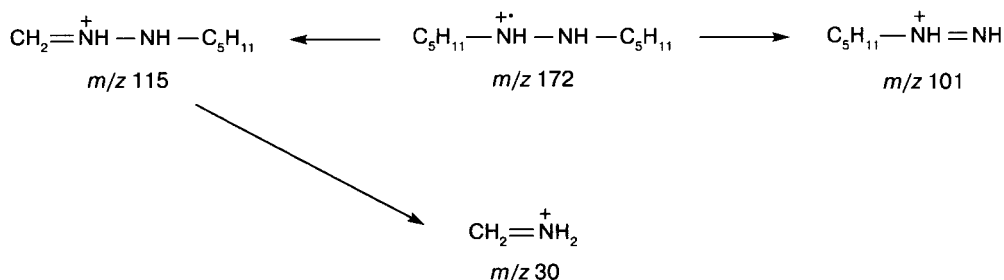


Схема 14.56

Задача 10.113. Два наиболее важных процесса фрагментации $\text{M}^{+\bullet}$ оксима пентанала являются общими для всех оксимов алифатического ряда. Перегруппировка Мак-Лафферти приводит к иону с $m/z \ 59$, который далее отщепляет молекулу воды и превращается в ион с $m/z \ 41$ (схема 14.57). Отщепление из $\text{M}^{+\bullet}$ алкильного

радикала (в данном случае этильного) сопровождается циклизацией (ион с m/z 72). Интенсивный пик (m/z 43) обусловлен ионами двух составов: $C_3H_7^+$ и $HCNO^+$.

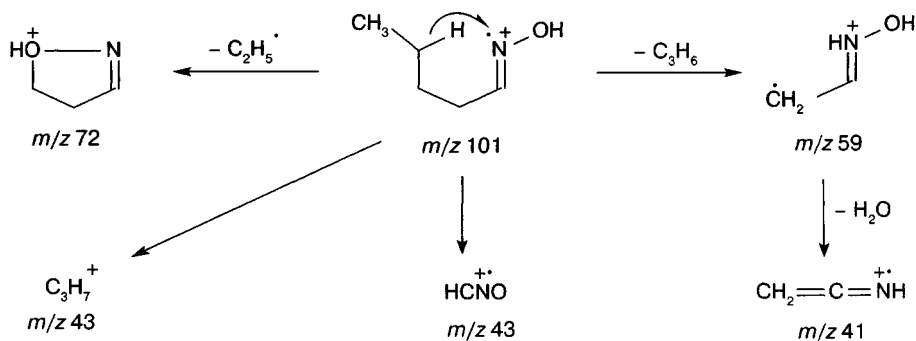


Схема 14.57

Задача 10.115. Нечетная масса наиболее тяжелого иона (вероятно, $M^{+\cdot}$) свидетельствует о нечетном числе атомов азота в молекуле. Высокая интенсивность пика этого иона и две группы фрагментов в области 76 и 50 дальтон характерны для ароматических соединений. Достаточно легко вычислить элементный состав молекулы по изотопным пикам: C_7H_5N , при степени ненасыщенности 6. Учитывая, что соединение ароматическое, можно уже на этой стадии оставить лишь два варианта: бензонитрил и бензизонитрил. К сожалению, выбор между двумя этими изомерами по представленному в задаче масс-спектру сделать невозможно. На рис. 10.134 спектр бензонитрила.

Задача 10.116. Достаточно богатая схема фрагментации оксима ацетофенона (схема 14.58) обусловлена возможностью отщепления из $M^{+\cdot}$ самых разнообразных частиц.

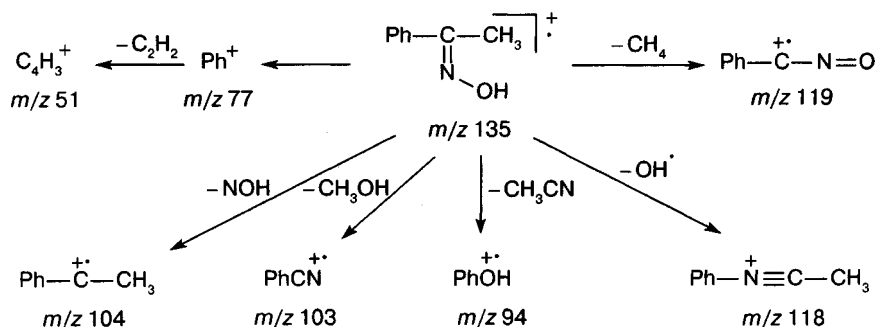


Схема 14.58

Некоторые из этих процессов (ионы с m/z 103, 94) требуют значительной перестройки исходной структуры молекулы. Механизмы этих структурных изменений остаются мало изученными. Отщепление гидроксильной группы сопровождается перегруппировкой Бекмана с миграцией заместителя, находившегося в исходной

молекуле в антиположении. Этот процесс подробно изучен в условиях химической ионизации, когда отщепление молекулы воды является доминирующей реакцией фрагментации протонированной молекулы.

Задача 10.117. Даже предварительный взгляд на спектр позволяет сделать важные выводы. Соединение имеет ароматический характер (интенсивный пик M^{++} и характерная серия ароматических фрагментов с m/z 76, 75, 50), содержит один атом брома (дублет с соотношением 1 : 1 пиков M^{++} и ряда фрагментных ионов) и нечетное число атомов азота (нечетная молекулярная масса). Первичные фрагментные ионы обусловлены выбросами 16, 30 и 46 дальтон из M^{++} , что однозначно указывает на нитрогруппу. Дополнительным подтверждением нитроароматической природы вещества является ион $[M-NO, -CO]^+$, представленный в спектре дублетом с m/z 143, 145. Масса атома брома и нитрогруппы $79 + 46 = 125$ дальтон. Оставшиеся 76 дальтон обусловлены бензольным ядром C_6H_4 . Следовательно, мы имеем дело с бромнитробензолом. Установить расположение заместителей по спектру, к сожалению, нельзя. На рис. 10.136 представлен спектр 3-бромнитробензола.

Задача 10.118. Нечетная масса и высокая интенсивность пика молекулярного иона, а также набор фрагментных ионов (m/z 90, 76, 63, 51, 39) указывают на ароматическое азотсодержащее соединение. По изотопным пикам (с учетом наложения со стороны иона $[M-H]^+$) легко установить его элементный состав — C_8H_7N при степени ненасыщенности 6. Помимо фенильного ядра, все остальные фрагменты имеют состав C_2H_2N при степени ненасыщенности 2. Выброс из M^{++} 27 дальтон согласуется со структурой нитрила, изонитрила, анилина или этинилбензола. Интенсивный пик иона $[M-H]^+$ при отсутствии пиков $[M-Alk]^+$ характерен для метилбензолов и позволяет отвергнуть структуры изомерных этиниланилинов. В спектре N-этиниланилина должен присутствовать пик $HNCCN^+$ (m/z 42). В спектрах изомерных фенилацетонитрила и фенилизоацетонитрила, помимо пиков ионов, отмеченных в задаче, достаточно интенсивными были бы пики ионов с m/z 91 и 77. Поскольку пики ионов с m/z 42 и 77 отсутствуют в спектре, а интенсивность пика иона с m/z 91 крайне мала, можно отвергнуть и N-этиниланилин, и фенилацетонитрил, и фенилизоацетонитрил.

Напротив, спектры изомерных метилбензонитрилов и метилбензоизонитрилов будут очень близки друг другу и спектру на рис. 10.137. Установить точное расположение заместителей и нитрильную или изонитрильную природу соединения по приведенному в задаче спектру нельзя. На рис. 10.137 представлен масс-спектр 3-метилбензонитрила.

Задача 10.119. Интенсивные пики M^{++} (m/z 168) и фрагментных ионов (m/z 92, 76, 75, 50) указывают на ароматическую природу вещества. Первичные фрагментные ионы (m/z 152, 138, 122) обусловлены выбросами 16, 30 и 46 дальтон из M^{++} и однозначно указывают на нитрогруппу. Поскольку молекулярная масса вещества четная, в его состав должен входить еще один атом азота. Ион с m/z 30 (максимальный пик в спектре) может иметь состав NO (характерно для полинитроароматических соединений) или CH_2NH_2 (характерно для аминов).

Высокая интенсивность пика $M^{+\cdot}$ позволяет использовать изотопные пики для установления элементного состава соединения. Обращает на себя внимание высокая интенсивность пика $M+2$ при сравнительно небольшой интенсивности пика $M+1$. По пику $M+1$ можно еще раз убедиться, что соединение содержит два атома азота и ароматическое ядро. Масса фрагмента C_6N_2 составляет 100 дальтон, а вклад изотопов ^{13}C в интенсивность пика $M+2$ — 0,2%. По пику $M+2$ определяем, что молекула должна содержать 3–5 атомов кислорода. Тогда элементный состав соединения может быть $C_6HN_2O_3F$ и $C_6H_4N_2O_4$. Вариант с пятью атомами кислорода не проходит по массе. Вариант с тремя атомами кислорода также маловероятен. Следовательно, в задаче приведен спектр динитробензола. Точное расположение заместителей установить нельзя. На рис. 10.138 представлен масс-спектр 1,3-динитробензола.

Задача 10.120. Пики ионов с m/z 144 (вероятно, $M^{+\cdot}$) и 101 достаточно интенсивны, чтобы определить их элементный состав по изотопам. Для $M^{+\cdot}$ вариантами состава будут $C_8H_{20}N_2$, C_8HN_2F , C_9H_5P и C_9H_7F , а для иона с m/z 101 — $C_6H_{10}F$, C_5H_8NF и $C_5H_{13}N_2$. Поскольку ион с m/z 101 обусловлен выбросом из $M^{+\cdot}$ частицы с массой 43 дальтона, можно исключить из рассмотрения фосфорсодержащее соединение и вещество с элементным составом C_8HN_2F .

Состав $C_9H_{17}F$ может принадлежать либо алкену, либо нафтену. Спектры этих классов органических соединений значительно отличаются от представленного на рис. 10.139. Следовательно, состав анализируемой молекулы $C_8H_{20}N_2$ при степени ненасыщенности 0. Речь может идти либо о диаминоалкане, либо об алкилгидразине. Обращает на себя внимание тот факт, что в области низких масс наибольшую интенсивность имеют пики ионов с нечетной массой (m/z 57, 45, 43, 41). Это позволяет отвергнуть вариант диамина. В спектрах этой группы соединений доминирует аминная серия гомологических ионов (m/z 30, 44, 58 ...).

Не столь просто установить точную структуру алкилгидразина, поскольку в составе молекулы может быть от одной до четырех алкильных групп разной длины и разветвленности. Очень важно, что первичный распад идет фактически по единственному направлению (выброс пропильного радикала). Учитывая, что соединение содержит восемь атомов углерода, такая картина фрагментации возможна только в случае, когда гидразин имеет два бутильных или изобутильных заместителя.

Образование вторичного иона с m/z 30 можно легко объяснить исходя из структуры симметричного дибутил- или диизобутилгидразина (схема 14.59). Для несимметричного изомерного гидразина такой процесс невозможен. Дополнительным свидетельством в пользу симметричного гидразина является отсутствие пика иона $[M-C_3H_7-NH_3]^+$ с m/z 84. Пик этого иона, хотя и имеет незначительную интенсивность, является характеристичным для структуры 1,1-диалкилгидразинов. Кроме того, заметную интенсивность должен иметь пик иона с m/z 59 (рис. 10.127 и схема 10.95).

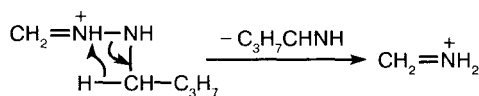
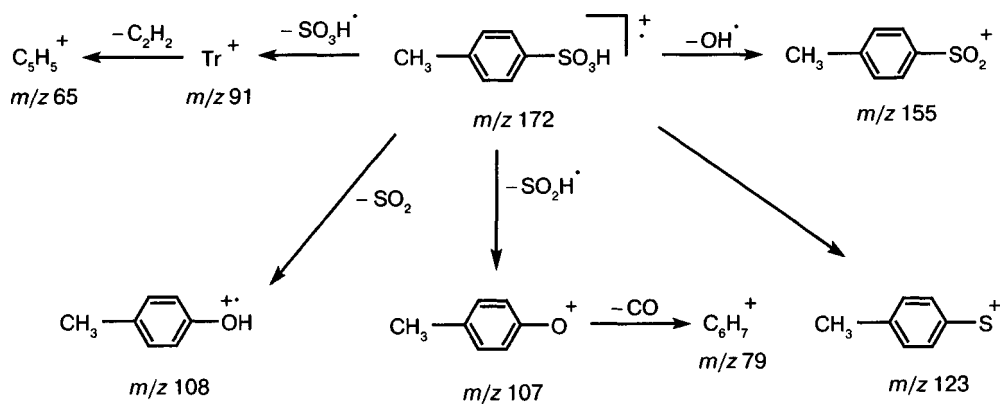


Схема 14.59

Задача 10.123. Один из наиболее интенсивных пиков в спектре обусловлен ионом с m/z 63. Этот ион достаточно редок для любых классов органических соединений и характерен для сульфоксидов. Повышенные интенсивности пиков $A+2$ подтверждают наличие в составе атома серы. Точные величины интенсивностей пиков изотопных ионов позволяют рассчитать элементный состав соединения: $C_6H_{14}SO$. Предполагая, что образец является сульфоксидом, следует обратить внимание на массы фрагментных ионов. Отщепление гидроксильной группы (m/z 117) характерно для сульфоксидов. Два пика перегруппировочных ионов (m/z 106 и 78) дают возможность предположить, что два алкильных радикала представляют собой этильную и бутильную группы. Об этом же свидетельствуют и пики алкильных ионов с m/z 57 и 29. Интенсивность второго несколько завышена, поскольку этильный фрагмент может образовываться из бутильного. Кроме того, часть ионного тока обусловлена изобарным ионом HSO^+ . Ион с m/z 41 часто сопутствует бутильному фрагменту. Достаточно сложно сделать выводы о структуре бутильного радикала, однако изобутильная группа характеризовалась бы большей интенсивностью пика иона с m/z 43, а вторбутильная группа была бы не столь эффективна в перегруппировке Мак-Лафферти (m/z 78). На рис. 10.144 представлен масс-спектр бутилэтилсульфоксида.

Задача 10.124. Спектр *пара*-толуилсульфоновой кислоты малолинейчатый. Среди первичных фрагментов можно выделить ион с m/z 108, обладающий структурой *пара*-крезола (схема 14.62). Максимальный пик в спектре обусловлен тропилий-катионом (m/z 91). Ионы с m/z 155, 123, 107 образуются при отщеплении из M^{++} частиц OH^+ , O_3H^+ и SO_2H^+ соответственно. Два последних требуют предварительной изомеризации сульфогруппы.



Задача 10.125. В спектре нафтилфенилсульфона будет достаточно много пиков. На схеме 14.63 представлены лишь наиболее значимые первичные и вторичные процессы распада.

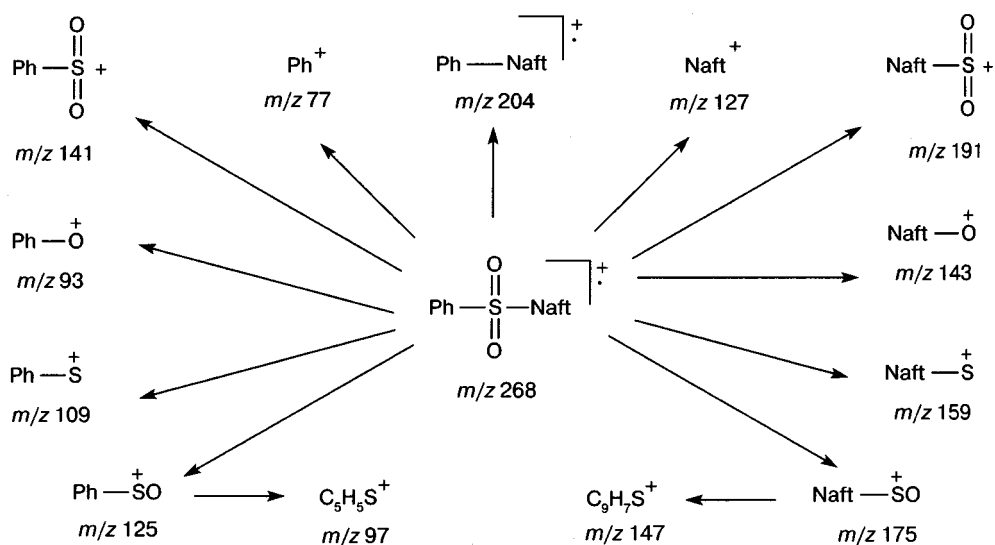


Схема 14.63

Задача 10.126. Общий вид спектра, представленного на рис. 10.145, позволяет сделать вывод об ароматической природе образца (интенсивные пики ионов M^{++} и m/z 91, 78, 77, 51). Учитывая высокую интенсивность пика $M+2$, можно предположить наличие в молекуле атома серы или кремния. Точный расчет элементного состава соединения дает единственный вариант: $C_9H_{12}SO_2$. Любые другие варианты значительно хуже согласуются с данными задачи. Серия ароматических ионов с m/z 78, 77, 51 характерна для монозамещенной ароматики. Если в молекуле присутствует фенильная группа, то остальные фрагменты молекулы можно изобразить брутто-формулой $C_3H_7SO_2$. Отщепление 42 дальтона из M^{++} (ион с m/z 142) может быть связано с элиминированием молекул кетена или пропилена. Следующая группа фрагментных ионов (m/z 120, 119, 118) должна быть обусловлена выбросами сульфогруппы и атомов водорода. Такие процессы характерны для сульфонов. Два указанных процесса позволяют приписать образцу структуру пропилфенилсульфона. Дополнительным подтверждением этого служат фрагментные ионы $PhSO^+$ (m/z 125), $[PhSO-CO]^+$ (m/z 97), $PhOH^{++}$ (m/z 94). Интенсивности пиков этих ионов не очень высоки, но они очень полезны для идентификации. Тропилий-катион (m/z 91) образуется при отщеплении этильного радикала ионом $[M-SO_2]^{++}$. К сожалению, невозможно сделать однозначный выбор между пропилфенилсульфоном и изопропилфенилсульфоном. На рис. 10.145 представлен спектр пропилфенилсульфона.

Задача 10.127. Поскольку в спектре присутствует лишь несколько пиков, причем среди них нет характеристических для ароматических соединений, можно предположить, что соединение содержит несколько одинаковых групп. Высокая интенсивность пика $M+2$ свидетельствует о присутствии в молекуле атома серы, а точный элементный состав соединения $C_6H_{14}SO_2$. Отщепление 41 и 42 дальтона из M^{++} и образование фрагментных ионов с m/z 41–43 указывает на пропильную

группу, причем тип распада M^{++} с миграцией одного или двух атомов водорода характерен для сульфонов. Структура дипропилсульфона хорошо согласуется со спектром задачи. Вновь по масс-спектру нельзя точно установить, пропильные или изопропильные группы входят в состав молекулы. На рис. 10.146 представлен спектр дипропилсульфона.

Задача 10.128. Малолинейчатость спектра и достаточно высокая интенсивность пиков позволяет рассчитать элементный состав ионов с m/z 146, 131, 73. Во всех трех случаях очевидно присутствие кремния. Состав основного иона в спектре C_3H_9Si , а двух других $C_5H_{15}Si_2$ и $C_6H_{18}Si_2$. Степень ненасыщенности во всех случаях равна 0. Единственным вариантом структуры, удовлетворяющим спектру, будет гексаметилдисилан. На рис. 10.152 представлен масс-спектр гексаметилдисилана.

Задача 10.129. Подсказка в условии задачи о неорганической природе соединения несколько упрощает идентификацию. В спектре отчетливо видны три группы пиков с идентичным изотопным распределением (m/z 462, 335, 208). Разница в массах между этими группами 127 дальтон. Кроме того, пик иона с m/z 127 максимален в спектре. Иод является моноизотопным элементом с массой 127. Поэтому можно сделать вывод, что в составе молекулы два атома иода. На основании табл. 1 Приложения можно легко определить, что группа пиков ионов с m/z 206–208 обусловлена изотопами свинца. Следовательно, на рис. 10.153 представлен спектр иодида свинца.

Задача 10.130. На первый взгляд может показаться, что соединение содержит атом хлора. Однако следует обратить внимание, что интенсивность пика $M+2$, а также пиков $A+2$ для фрагментов с m/z 123, 97 и 58 несколько выше, чем для изотопа ^{37}Cl . Кроме того, последняя пара ионов с m/z 58 и 60 не может содержать атом хлора и по массе. Такое соотношение интенсивностей дублета во всех указанных случаях определяется каким-то другим элементом. По табл. 1 Приложения можно установить, что этим элементом является никель. Поскольку никель не имеет изотопа $A+1$, можно предположить, что пик $M+1$ обусловлен в основном изотопами ^{13}C и, возможно, ^{15}N . Наиболее подходящим является вариант с десятью атомами углерода в молекуле. В этом случае элементный состав соединения $C_{10}H_{10}Ni$. Элементный состав иона с m/z 123 C_5H_5Ni , а основной первичный процесс фрагментации M^{++} заключается в элиминировании частицы C_5H_5 . Аналогичная частица отщепляется далее. В результате образуется катион Ni^+ . Среди частиц такого состава наиболее вероятной является циклопентадиенильный радикал. Следовательно, соединение является никелецем. Кстати, ферроцен, спектр которого представлен на рис. 10.147, характеризуется аналогичными фрагментными ионами. Этот факт может служить косвенным подтверждением решения. На рис. 10.154 представлен масс-спектр никелецена.

Задача 10.131. Основу соединения составляет полиизотопный элемент с достаточно большой атомной массой. Четыре кластера пиков с максимумами 202, 230, 237 и 266 дальтон представляют собой M^{++} и три первичных фрагмента. Разница в массах между M^{++} и фрагментами составляет 29, 35 и 64 дальтона. В первом случае речь может идти об элиминировании этильного радикала или частицы $HCOS^+$, а

во втором отщепляется молекула HCl. Кстати, об этом свидетельствует и заметное изменение соотношений интенсивностей пиков в кластере. Максимальный пик обусловлен ионом с m/z 29, причем, поскольку ему сопутствует фрагмент с m/z 27, этот ион может быть только этильным. Сумма масс этильного радикала и атома хлора составляет 64 дальтона. Эта величина как раз составляет разницу в массах между M^{++} и наиболее легким полиизотопным фрагментным ионом. По табл. 1 Приложения легко установить, что массы и соотношения интенсивностей изотопов этого кластера соответствуют ртути (см. также спектр на рис. 10.148). Следовательно, на рис. 10.155 представлен масс-спектр этилмеркурхлорида, который использовался в качестве действующего вещества пестицида под торговым названием гранозан.

Задача 10.132. Четыре основных пика в спектре обусловлены ионами с m/z 208, 130, 52, 78. Предполагая, что наиболее тяжелый из этих ионов является молекулярным, можно вычислить, что основные процессы фрагментации связаны с последовательным элиминированием двух частиц массой 78 дальтон (ионы с m/z 130 и 52). Ион с m/z 78 также представлен в спектре интенсивным пиком. Воспользовавшись табл. 1 Приложения, можно установить, что элемент с наиболее распространенным изотопом с m/z 52 является хромом. Можно также подсчитать соотношение интенсивностей пиков $A+1$ к A для ионов с m/z 208 и 130. В первом случае получаем величину 24,5, а во втором — 18,0. Вероятно, первичный процесс включает элиминирование частицы с шестью атомами углерода. Учитывая, что масса этой частицы 78 дальтон, можно сделать вывод, что речь идет о составе C_6H_6 , т.е. о молекуле бензола. Следовательно, молекула образца состоит из атома хрома и двух молекул бензола. На рис. 10.156 представлен масс-спектр дибензолхрома.

Задача 10.133. Предполагая, что ион с m/z 204 является молекулярным, можно рассчитать, что первые фрагментные ионы образуются при последовательном элиминировании трех частиц с массой 28 дальтон (m/z 176, 148, 120). Такой характер распада наблюдается в случае карбониллов металлов. Ион с m/z 120 отщепляет 65 дальтон с образованием иона с m/z 55, пик которого максимален в спектре. Этот ион не содержит в составе углерода, так как интенсивность пика $A+1$ менее 1%. По-видимому, он обусловлен катионом металла. По табл. 1 Приложения легко установить, что этим элементом является марганец. Этот элемент является моноизотопным, поэтому пик иона с m/z 121 обусловлен исключительно изотопом ^{13}C в органическом фрагменте с m/z 65. Расчет показывает, что состав этого фрагмента C_5H_5 . Резюмируя все сделанные выше наблюдения, можно сделать вывод, что вещество, спектр которого представлен на рис. 10.157, — цикlopentadiенилтрикарбонил марганца.

Задача 10.134. В данном случае решение не представляет сложности. В спектре отчетливо проявляются четыре группы пиков с одинаковым изотопным соотношением. Отстоят эти пики друг от друга на 15 атомных единиц массы. Это могут быть только метильные группы. Изотопная картина и массы (206–208 дальтон) изотопов однозначно определяют свинец (см. также рис. 10.149 и 10.153). Следовательно, на рис. 10.158 представлен масс-спектр тетраметилсвинца.

Задача 11.1. Пользуясь табл. 2 Приложения и отметками в спектре на рис. 11.7, можно получить следующую последовательность аминокислотных звеньев: GLLKKLKKVAKKVLPKVVPVIAEKL-NH₂.

Задача 11.2. Пользуясь табл. 2 Приложения и отметками в спектре на рис. 11.8, можно получить следующую последовательность аминокислотных звеньев: GLLGAMFKVASKVLPNHVVPVIAEHL-NH₂.

Задача 13.1. Фенилэтиловый эфир.

Задача 13.2. 2-Бромпирен.

Задача 13.3. 2-Метилпропандиол-1,3.

Задача 13.4. 1-Бромнафтол-2.

Задача 13.5. Гексантиол-3.

Задача 13.6. 2-метилциклогексано-1 (верх) 1-метилциклогексано-1 (низ).

Задача 13.7. Дибутилпропиламин.

Задача 13.8. Бензилбромид.

Задача 13.9. 1-Хлор-3-бромпропан.

Задача 13.10. 1,2-Дибромбутен-1.

Задача 13.11. Трифторметилбензол.

Задача 13.12. 1-Хлор-3-иодпропан.

Задача 13.13. а) *Орто*-хлорфенол. б) *Пара*-хлорфенол.

Задача 13.14. Трибромфенол.

Задача 13.15. 1-Фенилпропанол-1.

Задача 13.16. 4-Бромфенилэтиловый эфир.

Задача 13.17. 3-Фенилпропанол-1.

Задача 13.18. а) 4-Пропилфенол. б) Фенилпропиловый эфир.

Задача 13.19. Диэтилпропиламин.

Задача 13.20. Циклогексантиол.

Задача 13.21. 2,3-Дихлорбутан.

Задача 13.22. 4,4'-Дихлорбензофенон.

Задача 13.23. 3-Бром-1,1,1-трихлорпропан.

Задача 13.24. 1,2-Дибром-1,2-дихлорэтилен.

Задача 13.25. 2,4,6-Трииодфенол.

Задача 13.26. Сера (S₈).

Задача 13.27. Трифенилфосфин.

Задача 13.28. Диэтилсульфон.

Задача 13.29. Бензолсульфоновая кислота.

Задача 13.30. Диметилдисульфид.

Задача 13.31. 2-Хлорнафталин.

Задача 13.32. Броманизол.

Задача 13.33. Фторбензол.

Задача 13.34. Тионафтол.

Задача 13.35. 4-Иодтолуол.

Задача 13.36. Этоксинафталин.

Задача 13.37. Метилантрацен.

Задача 13.38. Пентафторбензол.

- Задача 13.39. Пентафторфенол.
- Задача 13.40. 2-Фенилэтиловый эфир уксусной кислоты.
- Задача 13.41. Бензилпропионат.
- Задача 13.42. Этиловый эфир фенилуксусной кислоты.
- Задача 13.43. Изопропиловый эфир бензойной кислоты.
- Задача 13.44. Масляная кислота.
- Задача 13.45. Пропилпропионат.
- Задача 13.46. а) 2-Метил-, б) 3-метил-, в) 4-метилциклогексанон.
- Задача 13.47. 2-Пропилциклогексанон.
- Задача 13.48. 3-Фторфенилацетонитрил.
- Задача 13.49. Октанонитрил.
- Задача 13.50. Хромоцен.
- Задача 13.51. *орто*-Бромбензонитрил.
- Задача 13.52. 2,4-Дихлорнитробензол.
- Задача 13.53. Бензоилфторид.
- Задача 13.54. 2-Метилпентановая кислота.
- Задача 13.55. 3-Метилпентановая кислота.
- Задача 13.56. Дибутилсульфон.
- Задача 13.57. Бутилпропилсульфоксид.
- Задача 13.58. 4-Пропиланилин.
- Задача 13.59. 4-Нитробензиловый спирт.
- Задача 13.60. 4-Нитроанизол.
- Задача 13.61. 1-Метил-1-фенилгидразин.
- Задача 13.62. 1,1-Диэтил-2-пропилгидразин.
- Задача 13.63. α -Диазо-*мета*-метилацетофенон.
- Задача 13.64. Оксим 4-метилпентан-2-она.
- Задача 13.65. 2-Пропилнитробензол.
- Задача 13.66. 2-Нитронафталин.
- Задача 13.67. Дифенилсульфон.
- Задача 13.68. Тетрафенилсвинец.
- Задача 13.69. 2-Этилциклогексанол.
- Задача 13.70. Фенилэтилкетон.
- Задача 13.71. 6-Метил-2-ацетилнафталин.
- Задача 13.72. N-(3-метилфенил)-бутанамид.
- Задача 13.73. Фталимид.
- Задача 13.74. 4-Бутилбензонитрил.
- Задача 13.75. 4-Нитроацетофенон.
- Задача 13.76. 4-Нитробензонитрил.
- Задача 13.77. N,N'-диизопропилгидразин.
- Задача 13.78. Бутилизопропилсульфоксид.
- Задача 13.79. Бензолсульфонилхлорид.
- Задача 13.80. Этиловый эфир *пара*-толилсульфоновой кислоты.
- Задача 13.81. Кобальтоцен.
- Задача 13.82. Тетраэтилгерманий.
- Задача 13.83. 1,3-Бутадиен-трикарбонил железа.

Приложение

Таблица 1. Природная распространенность и масса изотопов химических элементов

Элемент	Изотоп	Масса, у.е.	Интенсивность к \sum изотопов, %	Интенсивность к максимальному изотопу, %
Водород	^1H	1,007825	99,985	100,00
Дейтерий	^2H	2,014102	0,015	0,02
Гелий	^3He	3,016029	0,0001	0,00
	^4He	4,002603	100,00	100,00
Литий	^6Li	6,015123	7,52	8,13
	^7Li	7,016005	92,48	100,00
Бериллий	^9Be	9,012183	100,00	100,00
Бор	^{10}B	10,012938	18,98	23,43
	^{11}B	11,009305	81,02	100,00
Углерод	^{12}C	12,000000	98,89	100,00
	^{13}C	13,003355	1,11	1,12
Азот	^{14}N	14,003074	99,64	100,00
	^{15}N	15,000109	0,36	0,37
Кислород	^{16}O	15,994915	99,76	100,00
	^{17}O	16,999131	0,04	0,04
	^{18}O	17,999159	0,20	0,20
Фтор	^{19}F	18,998403	100,00	100,00
Неон	^{20}Ne	19,992439	90,92	100,00
	^{21}Ne	20,993845	0,26	0,28
	^{22}Ne	21,993845	8,82	9,70
Натрий	^{23}Na	22,989770	100,00	100,00
Магний	^{24}Mg	23,985045	78,60	100,00
	^{25}Mg	24,985839	10,11	12,86
	^{26}Mg	25,982595	11,29	14,36
Алюминий	^{27}Al	26,981541	100,00	100,00
Кремний	^{28}Si	27,976928	92,18	100,00
	^{29}Si	28,976496	4,71	5,11
	^{30}Si	29,973772	3,12	3,38
Фосфор	^{31}P	30,973763	100,00	100,00
Сера	^{32}S	31,972072	95,02	100,00
	^{33}S	32,971459	0,75	0,79
	^{34}S	33,967868	4,21	4,44
	^{36}S	35,967079	0,11	0,11
Хлор	^{35}Cl	34,968853	75,40	100,00
	^{37}Cl	36,965903	24,60	32,63
Аргон	^{36}Ar	35,967546	0,34	0,34
	^{38}Ar	37,962732	0,06	0,06
	^{40}Ar	39,962383	99,60	100,00
Калий	^{39}K	38,963708	93,08	100,00
	^{40}K	39,963999	0,01	0,01
	^{41}K	40,961825	6,91	7,42

Таблица 1 (продолжение)

Элемент	Изотоп	Масса, у.е.	Интенсивность к \sum изотопов, %	Интенсивность к максимальному изотопу, %
Кальций	⁴⁰ Ca	39,962591	96,92	100,00
	⁴² Ca	41,958622	0,64	0,66
	⁴³ Ca	42,958770	0,13	0,13
	⁴⁴ Ca	43,955485	2,13	2,20
	⁴⁶ Ca	45,953689	0,00	0,00
	⁴⁸ Ca	47,952532	0,18	0,18
Скандий	⁴⁵ Sc	44,955914	100,00	100,00
Титан	⁴⁶ Ti	45,952633	7,95	10,82
	⁴⁷ Ti	46,951765	7,75	10,55
	⁴⁸ Ti	47,947947	73,45	100,00
	⁴⁹ Ti	48,947870	5,51	7,50
	⁵⁰ Ti	49,944786	5,34	7,27
Ванадий	⁵⁰ V	49,947161	0,24	0,24
	⁵¹ V	50,943962	99,76	100,00
Хром	⁵⁰ Cr	49,946046	4,31	5,15
	⁵² Cr	51,940510	83,76	100,00
	⁵³ Cr	52,940651	9,55	11,40
	⁵⁴ Cr	53,938882	2,38	2,84
Марганец	⁵⁵ Mn	54,938046	100,00	100,00
Железо	⁵⁴ Fe	53,939612	5,90	6,45
	⁵⁶ Fe	55,934939	91,52	100,00
	⁵⁷ Fe	56,935396	2,25	2,46
	⁵⁸ Fe	57,933278	0,33	0,36
Кобальт	⁵⁹ Co	58,933198	100,00	100,00
Никель	⁵⁸ Ni	57,935347	67,76	100,00
	⁶⁰ Ni	59,930789	26,16	38,61
	⁶¹ Ni	60,931059	1,25	1,84
	⁶² Ni	61,928346	3,66	5,40
	⁶⁴ Ni	63,927968	1,16	1,71
Медь	⁶³ Cu	62,929599	69,09	100,00
	⁶⁵ Cu	64,927792	30,91	44,74
Цинк	⁶⁴ Zn	63,929145	48,89	100,00
	⁶⁶ Zn	65,926035	27,81	56,88
	⁶⁷ Zn	66,927129	4,11	8,41
	⁶⁸ Zn	67,924846	18,56	37,96
	⁷⁰ Zn	69,925325	0,62	1,27
Галлий	⁶⁹ Ga	68,925581	60,20	100,00
	⁷¹ Ga	70,924701	39,80	66,11
Германий	⁷⁰ Ge	69,924250	20,52	56,16
	⁷² Ge	71,922080	27,43	75,07
	⁷³ Ge	72,923464	7,76	21,24
	⁷⁴ Ge	73,921179	36,54	100,00
	⁷⁶ Ge	75,921403	7,76	21,24
Мышьяк	⁷⁵ As	74,921595	100,00	100,00

Таблица 1 (продолжение)

Элемент	Изотоп	Масса, у.е.	Интенсивность к Σ изотопов, %	Интенсивность к максимальному изотопу, %
Селен	⁷⁴ Se	73,922477	0,96	1,92
	⁷⁶ Se	75,919207	9,12	18,25
	⁷⁷ Se	76,919908	7,50	15,01
	⁷⁸ Se	77,917304	23,61	47,26
	⁸⁰ Se	79,916520	49,96	100,00
	⁸² Se	81,916709	8,84	17,69
Бром	⁷⁹ Br	78,918336	50,57	100,00
	⁸¹ Br	80,916290	49,43	97,75
Криптон	⁷⁸ Kr	77,920397	0,35	0,62
	⁸⁰ Kr	79,916375	2,27	3,99
	⁸² Kr	81,913483	11,56	20,32
	⁸³ Kr	82,914134	11,55	20,30
	⁸⁴ Kr	83,911506	56,90	100,00
	⁸⁶ Kr	85,910614	17,37	30,53
Рубидий	⁸⁵ Rb	84,911800	72,15	100,00
	⁸⁷ Rb	86,909184	27,85	38,60
Стронций	⁸⁴ Sr	83,913428	0,56	0,68
	⁸⁶ Sr	85,909273	9,86	11,94
	⁸⁷ Sr	86,908890	7,02	8,50
	⁸⁸ Sr	87,905625	82,56	100,00
Иттрий	⁸⁹ Y	88,905856	100,00	100,00
Цирконий	⁹⁰ Zr	89,904708	51,46	100,00
	⁹¹ Zr	90,905644	11,23	21,82
	⁹² Zr	91,905039	17,11	33,25
	(⁹⁴ Zr)	93,906319	17,40	33,81
	⁹⁶ Zr	95,908272	2,80	5,41
Ниобий	⁹³ Nb	92,906378	100,00	100,00
Молибден	⁹² Mo	91,906809	15,05	62,71
	⁹⁴ Mo	93,905086	9,35	38,96
	⁹⁵ Mo	94,905838	14,78	61,58
	⁹⁶ Mo	95,904675	16,56	69,00
	⁹⁷ Mo	96,906018	9,60	40,00
	⁹⁸ Mo	97,905405	24,00	100,00
	¹⁰⁰ Mo	99,907473	9,68	40,33
Рутений	⁹⁶ Ru	95,907596	5,68	18,12
	(⁹⁸ Ru)	97,905287	2,22	7,08
	⁹⁹ Ru	98,905937	12,81	40,87
	(¹⁰⁰ Ru)	99,042175	12,70	40,52
	(¹⁰¹ Ru)	100,905581	16,98	54,18
	¹⁰² Ru	101,904347	31,34	100,00
	¹⁰⁴ Ru	103,905422	18,27	58,30
Родий	¹⁰³ Ro	102,905503	100,00	100,00
Палладий	¹⁰² Pd	101,905609	0,80	2,95
	¹⁰⁴ Pd	103,904026	9,30	34,32
	¹⁰⁵ Pd	104,905075	22,60	83,40

Таблица 1 (продолжение)

Элемент	Изотоп	Масса, у.е.	Интенсивность к Σ изотопов, %	Интенсивность к максимальному изотопу, %
Палладий	¹⁰⁶ Pd	105,903475	27,10	100,00
	¹⁰⁸ Pd	107,903894	26,70	98,52
	¹¹⁰ Pd	109,905169	13,50	49,81
Серебро	¹⁰⁷ Ag	106,905095	51,35	100,00
	¹⁰⁹ Ag	108,904754	48,65	94,74
Кадмий	¹⁰⁶ Cd	105,906461	1,22	4,23
	¹⁰⁸ Cd	107,904186	0,89	3,09
	¹¹⁰ Cd	109,903007	12,43	43,14
	¹¹¹ Cd	110,904182	12,86	44,64
	¹¹² Cd	111,902761	23,79	82,57
	¹¹³ Cd	112,904401	12,34	42,83
	¹¹⁴ Cd	113,903361	28,81	100,00
	¹¹⁶ Cd	115,904758	7,66	26,59
Индий	¹¹³ In	112,904056	4,16	4,34
	¹¹⁵ In	114,903875	95,84	100,00
Олово	¹¹² Sn	111,904823	0,95	2,88
	¹¹⁴ Sn	113,902781	0,65	1,97
	¹¹⁵ Sn	114,903344	0,34	1,03
	¹¹⁶ Sn	115,901743	14,24	43,19
	¹¹⁷ Sn	116,902954	7,57	22,96
	¹¹⁸ Sn	117,901607	24,01	72,82
	¹¹⁹ Sn	118,903310	8,58	26,02
	¹²⁰ Sn	119,902199	32,97	100,00
	¹²² Sn	121,903440	4,71	14,29
	¹²⁴ Sn	123,905271	5,98	18,14
Сурьма	¹²¹ Sb	120,903824	57,25	100,00
	¹²³ Sb	122,904222	42,75	74,67
Теллур	¹²⁰ Te	119,904021	0,09	0,26
	¹²² Te	121,903055	2,46	7,13
	¹²³ Te	122,904278	0,87	2,52
	¹²⁴ Te	123,902825	4,61	13,37
	¹²⁵ Te	124,904435	6,99	20,27
	¹²⁶ Te	125,903310	18,71	54,25
	¹²⁸ Te	127,904464	31,79	92,17
	¹³⁰ Te	129,906229	34,49	100,00
Иод	¹²⁷ I	126,904477	100,00	100,00
Ксенон	¹²⁴ Xe	123,906120	0,10	0,37
	¹²⁶ Xe	125,904281	0,09	0,33
	¹²⁸ Xe	127,903531	1,92	7,14
	¹²⁹ Xe	128,904780	26,44	98,33
	¹³⁰ Xe	129,903509	4,08	15,17
	¹³¹ Xe	130,905076	21,18	78,76
	¹³² Xe	131,904148	26,89	100,00
	¹³⁴ Xe	133,905395	10,44	38,82
	¹³⁶ Xe	135,907219	8,87	32,99

Таблица 1 (продолжение)

Элемент	Изотоп	Масса, у.е.	Интенсивность к Σ изотопов, %	Интенсивность к максимальному изотопу, %
Цезий	¹³³ Cs	132,905433	100,00	100,00
Барий	¹³⁰ Ba	129,906277	0,10	0,14
	¹³² Ba	131,905042	0,10	0,14
	¹³⁴ Ba	133,904490	2,42	3,38
	¹³⁵ Ba	134,905668	6,59	9,20
	¹³⁶ Ba	135,904556	7,81	10,90
	¹³⁷ Ba	136,905816	11,32	15,80
	¹³⁸ Ba	137,905236	71,66	100,00
Лантан	¹³⁸ La	137,907114	0,09	0,09
	¹³⁹ La	138,906355	99,91	100,00
Церий	¹³⁶ Ce	135,907140	0,19	0,21
	¹³⁸ Ce	137,905996	0,25	0,28
	¹⁴⁰ Ce	139,905442	88,48	100,00
	¹⁴² Ce	141,909249	11,07	12,51
Празеодим	¹⁴¹ Pr	140,907657	100,00	100,00
Неодим	¹⁴² Nd	141,907731	27,09	100,00
	¹⁴³ Nd	142,909823	12,14	44,81
	¹⁴⁴ Nd	143,910096	23,83	87,97
	¹⁴⁵ Nd	144,912582	8,29	30,60
	¹⁴⁶ Nd	145,913126	17,26	63,71
	¹⁴⁸ Nd	147,916901	5,74	21,19
	¹⁵⁰ Nd	149,920900	5,63	20,78
Самарий	¹⁴⁴ Sm	143,912009	3,16	11,87
	¹⁴⁷ Sm	146,914907	15,07	56,59
	¹⁴⁸ Sm	147,914832	11,27	42,32
	¹⁴⁹ Sm	148,917193	13,84	51,97
	¹⁵⁰ Sm	149,917285	7,47	28,05
	¹⁵² Sm	151,919741	26,63	100,00
	¹⁵⁴ Sm	153,922218	22,53	84,60
Европий	¹⁵¹ Eu	150,919860	47,77	91,46
	¹⁵³ Eu	152,921243	52,23	100,00
Гадолиний	¹⁵² Gd	151,919803	0,20	0,80
	¹⁵⁴ Gd	153,920876	2,15	8,64
	¹⁵⁵ Gd	154,922629	14,73	59,23
	¹⁵⁶ Gd	155,922130	20,47	82,31
	¹⁵⁷ Gd	156,923967	15,68	63,05
	¹⁵⁸ Gd	157,924111	24,87	100,00
	¹⁶⁰ Gd	159,927061	21,90	88,06
Тербий	¹⁵⁹ Tb	158,925350	100,00	100,00
Диспрозий	(¹⁵⁶ Dy)	155,924287	0,05	0,18
	¹⁵⁸ Dy	157,924412	0,09	0,32
	¹⁶⁰ Dy	159,925203	2,29	8,13
	¹⁶¹ Dy	160,926939	18,88	67,00
	¹⁶² Dy	161,926805	25,53	90,60
	¹⁶³ Dy	162,928737	24,97	88,61
	¹⁶⁴ Dy	163,929183	28,18	100,00

Таблица 1 (продолжение)

Элемент	Изотоп	Масса, у.е.	Интенсивность к \sum изотопов, %	Интенсивность к максимальному изотопу, %
Гольмий	^{165}Ho	164,930332	100,00	100,00
Эрбий	^{162}Er	161,928787	0,14	0,42
	^{164}Er	163,929211	1,56	4,64
	^{166}Er	165,930305	33,41	100,00
	^{167}Er	166,932061	22,94	68,66
	^{168}Er	167,932383	27,07	81,02
	^{170}Er	169,935476	14,88	44,54
Тулий	^{169}Tm	168,934225	100,00	100,00
Иттербий	^{168}Yb	167,933908	0,14	0,44
	(^{170}Yb)	169,934774	3,03	9,52
	(^{171}Yb)	170,936338	14,31	44,94
	(^{172}Yb)	171,936393	21,82	68,53
	(^{173}Yb)	172,938222	16,13	50,66
	(^{174}Yb)	173,938873	31,84	100,00
	(^{176}Yb)	175,942576	12,73	40,06
Лютеций	(^{175}Lu)	174,940785	97,40	100,00
	^{176}Lu	175,940065	2,60	2,67
Гафний	(^{174}Hf)	173,940065	0,20	0,64
	^{176}Gf	175,941420	5,23	16,83
	^{177}Gf	176,943233	18,55	59,70
	^{178}Gf	177,943710	27,23	87,64
	^{179}Gf	178,945827	13,79	44,38
	^{180}Gf	179,946561	31,07	100,00
Тантал	^{181}Ta	180,948014	99,99	100,00
Вольфрам	^{180}W	179,946727	0,13	0,42
	^{182}W	181,948225	26,31	85,87
	^{183}W	182,950245	14,28	46,61
	^{184}W	183,950953	30,64	100,00
	^{186}W	185,954377	28,64	93,47
Рений	(^{185}Re)	184,952977	37,07	58,91
	(^{187}Re)	186,955765	62,93	100,00
Осмий	(^{184}Os)	183,952514	0,02	0,05
	(^{186}Os)	185,953852	1,59	3,88
	(^{187}Os)	186,955762	1,64	4,00
	(^{188}Os)	187,955850	13,20	32,19
	(^{189}Os)	188,958156	16,10	39,27
	(^{190}Os)	189,958455	26,40	64,39
	(^{192}Os)	191,961487	41,00	100,00
Иридий	(^{191}Ir)	190,960603	38,50	62,60
	(^{193}Ir)	192,962942	61,50	100,00
Платина	(^{190}Pt)	189,959937	0,01	0,03
	(^{192}Pt)	191,961049	0,78	2,31
	(^{194}Pt)	193,962679	32,80	97,33
	(^{195}Pt)	194,964785	33,70	100,00
	(^{196}Pt)	195,964947	25,40	75,37
	^{198}Pt	197,967879	7,23	21,45

Таблица 1 (окончание)

Элемент	Изотоп	Масса, у.е.	Интенсивность к Σ изотопов, %	Интенсивность к максимальному изотопу, %
Золото	^{197}Au	196,966560	100,00	100,00
Ртуть	^{196}Hg	195,965812	0,15	0,50
	^{198}Hg	197,966760	10,02	33,62
	^{199}Hg	198,968269	16,84	56,51
	^{200}Hg	199,968316	23,13	77,62
	^{201}Hg	200,970293	13,22	44,36
	^{202}Hg	201,970632	29,80	100,00
	^{204}Hg	203,973481	6,85	22,92
Таллий	^{203}Tl	202,972336	29,50	41,84
	^{205}Tl	204,974410	70,50	100,00
Свинец	^{204}Pb	203,973037	1,37	2,62
	^{206}Pb	205,974455	25,15	48,01
	^{207}Pb	206,975885	21,11	40,30
	^{208}Pb	207,976641	52,38	100,00
Висмут	^{209}Bi	208,980388	100,00	100,00
Торий	^{232}Th	232,038054	100,00	100,00
Уран	^{234}U	234,040947	0,01	0,01
	^{235}U	235,043925	0,71	0,71
	^{238}U	238,050786	99,28	100,00

Таблица 2. Масса и структура наиболее распространенных аминокислот

Аминокислота	Символ	Структура остатка	Масса остатка
Аланин	Ala A	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	71,03711
Аргинин	Arg R	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—(CH}_2\text{)}_2\text{—NH—C—NH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{—NH—CH—CO—} \quad \text{NH} \end{array}$	156,10110
Аспарагин	Asn N	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—CONH}_2 \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	114,04292
Аспарагиновая к-та	Asp D	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—COOH} \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	115,02694
Цистеин	Cys C	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—SH} \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	103,00918
Глутаминовая к-та	Glu E	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—COOH} \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	129,04259
Глутамин	Gln Q	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—CONH}_2 \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	128,05857
Глицин	Gly G	$\text{—NH—CH}_2\text{—CO—}$	57,02146
Гистидин	His H	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—} \begin{array}{c} \diagup \text{N} \diagdown \\ \text{NH} \end{array} \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	137,05891

Таблица 2 (окончание)

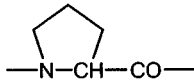
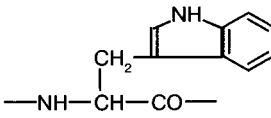
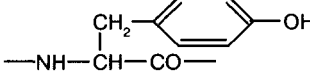
Аминокислота	Символ	Структура остатка	Масса остатка
Изолейцин	Ile I	$\begin{array}{c} \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	113,08406
Лейцин	Leu L	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	113,08406
Лизин	Lys K	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2 \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	128,09496
Метионин	Met M	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	131,04048
Орнитин	Orn O	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2 \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	114,07931
Фенилаланин	Phe F	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{Ph} \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	147,06841
Пролин	Pro P		97,05276
Серин	Ser S	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	87,03202
Треонин	Thr T	$\begin{array}{c} \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3 \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	101,04767
Триптофан	Trp W		186,07931
Тирозин	Tyr Y		163,06332
Валин	Val V	$\begin{array}{c} \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	99,06841

Таблица 2а. Масса и структура менее распространенных аминокислот

Аминокислота	Символ	Структура остатка	Масса остатка
α -аминомасляная кислота	Aba	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	85,05276
Аминоэтилцистеин	AECys	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2 \\ \\ -\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}- \end{array}$	146,05138
α -аминоизомасляная кислота	Aib	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{NH}-\text{C}-\text{CO}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	85,05276

Таблица 2а (окончание)

Аминокислота	Символ	Структура остатка	Масса остатка
Карбоксиметил-цистеин	CMCys	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—S—CH}_2\text{—COOH} \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	161,01466
Дегидроаланин	Dha	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{—NH—C—CO—} \end{array}$	69,02146
Дегидроамино- α -масляная кислота	Dhb	$\begin{array}{c} \text{CH—CH}_3 \\ \\ \text{—NH—C—CO—} \end{array}$	83,03711
Гидроксилизин	Hyl	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH(OH)CH}_2\text{—NH}_2 \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	144,08987
Гидроксипролин	Hyp	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{—N—CH—CO—} \end{array}$	113,04767
Изовалин	Iva	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—CH}_3 \\ \\ \text{—NH—C(CH}_3\text{)—CO—} \end{array}$	99,06841
Норлейцин	nLeu	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—(CH}_2\text{)}_2\text{—CH}_3 \\ \\ \text{—NH—CH—CO—} \end{array}$	113,08406
2-Пиперидин-карбоновая кислота	Pip	$\begin{array}{c} \text{—N—CH—CO—} \end{array}$	111,06841
Пироглутаминовая кислота	pGlu	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—N—CH—CO—} \end{array}$	111,03203
Саркозин	Sar	$\text{—N(CH}_3\text{)—CH}_2\text{—CO—}$	71,03711

Таблица 3. Величины m/z состав и структуры фрагментных ионов, характерных для распада органических соединений, рассмотренных в пособии

m/z	Состав (структура) ионов	Соединения, для которых характерны данные ионы
15	CH ₃	Алкилпроизводные
16	O	Кислородсодержащие соединения
	NH ₂	Азотсодержащие соединения
	CH ₄	Алкилпроизводные
17	OH	Кислородсодержащие соединения
18	H ₂ O	Кислородсодержащие соединения
	NH ₄	Амины
19	F	Фторсодержащие соединения
	H ₃ O	Полиолы
20	Ar	Аргон (двухзарядный ион)
	HF	Алкилфториды
26	C ₂ H ₂	Ароматические соединения
	CN	Азотсодержащие ароматические соединения
27	C ₂ H ₃	Ароматические соединения
	HCN	Азотсодержащие ароматические соединения
28	CO	Ангидриды, циклические кетоны
	N ₂	Азот (воздух)

Таблица 3 (продолжение)

m/z	Состав (структура) ионов	Соединения, для которых характерны данные ионы
	CH ₂ N	Алкиламины, этиленимины
	C ₂ H ₄	Алкилпроизводные
29	C ₂ H ₅	Алкилпроизводные
	CHO	Ароматические альдегиды, фенолы
	SiH	Кремнийорганические соединения
30	CH ₂ O	Метоксипроизводные
	CH ₂ NH ₂	Амины
	NO	Нитросоединения
31	CH ₂ OH	Алифатические спирты, эфиры, ацетали
	CF	Фторсодержащие соединения
32	S	Тиолы, сульфиды, полисульфиды
	O ₂	Кислород (воздух)
	CH ₃ OH	Спирты
	NHOH	Оксимы
33	CH ₂ O	Спирты, полиолы, ацетали
	HS	Тиолы, сульфиды
	PH ₂	Фосфины
	CH ₂ F	Фторсодержащие соединения
34	H ₂ S	Тиолы, сульфиды
	PH ₃	Фосфины
35	³⁵ Cl	Хлорсодержащие соединения
	H ₃ S	Тиолы, сульфиды
36	H ³⁵ Cl	Хлорсодержащие соединения
37	³⁷ Cl	Хлорсодержащие соединения
38	H ³⁷ Cl	Хлорсодержащие соединения
	C ₃ H ₂	Ароматические соединения с электроакцепторными заместителями
39	C ₃ H ₃	Алкены, диены, ацетилены, ароматические соединения
40	Ar	Аргон (воздух)
	C ₃ H ₄	Ароматические соединения
41	C ₃ H ₅	Алкилпроизводные, алициклы, алкеновая серия
	CH ₂ CNH	Нитрилы
42	C ₃ H ₆	Алкилпроизводные, алкены, алициклы
	CH ₂ CO	Ацетилпроизводные, циклические кетоны
	CH ₂ NCH ₂	Этиленимины
43	C ₃ H ₇	Алкилпроизводные
	CH ₃ CHNH	Нитрилы
	CH ₃ CO	Ацетильные производные, кетоны, циклические спирты
	C ₂ F	Перфторуглеводороды
	SiCH ₃	Кремнийпроизводные
44	C ₃ H ₈	Алкилпроизводные
	CH ₂ CHOH	Альдегиды, циклические спирты, сложные эфиры
	CO ₂	Кислоты, ангидриды, воздух
	CS	Тиофенолы, диарилсульфиды,
	CH ₃ SiH	Силаны, силициклоалканы
	CH ₃ CHNH ₂ , CH ₂ NHCH ₃	Амины

Таблица 3 (продолжение)

<i>m/z</i>	Состав (структура) ионов	Соединения, для которых характерны данные ионы
	CONH ₂	Амиды
45	CH ₃ CHOH	Спирты, эфиры
	CH ₃ CH ₂ O	Этоксипроизводные
	CH ₃ OCH ₂	Простые эфиры
	COOH	Карбоновые кислоты, сложные эфиры
	(CH ₃) ₂ NH	Диметиламинопроизводные
	CH ₃ NNH ₂	Метилалкилгидразины
	CHS	Ароматические тиолы, сульфиды
	CH ₃ SiH ₂	Алкилсиланы
46	CH ₃ CH ₂ OH	Этиловые эфиры кислот
	CH ₂ S	Тиолы, сульфиды
	NO ₂	Нитросоединения
47	C ₂ H ₇ O	Диолы, алкоксиспирты
	CH ₃ O ₂	Ацетали
	CH ₂ SH	Тиолы, сульфиды
	C ₂ H ₄ F	Алкилфториды
	CH ₂ PH ₂	Фосфины
48	CH ₃ SH	Тиолы, метилсульфиды
	SO	Сульфоксиды, сульфоны
	CH ₃ PH ₂	Фосфины
	CH ³⁵ Cl	Хлорсодержащие соединения
49	CH ₃ SH ₂	Метилсульфиды
	CH ₂ ³⁵ Cl	Хлорметильные производные
50	C ₄ H ₂	Ароматические, полиненасыщенные соединения
	CH ³⁷ Cl	Хлорсодержащие соединения
	CF ₂	Перфторуглеводороды
51	C ₄ H ₃	Ароматические, полиненасыщенные соединения
	CHF ₂	Перфторуглеводороды
	CH ₂ ³⁷ Cl	Хлорметильные производные
52	C ₄ H ₄	Ароматические, полиненасыщенные соединения
53	C ₄ H ₅	Ненасыщенные углеводороды
54	C ₄ H ₆	Ненасыщенные углеводороды, циклоалкены
	CH ₂ CH ₂ CN	Алифатические нитрилы
55	C ₄ H ₇	Алкилпроизводные, алициклы, алкеновая серия
	CH ₂ CHCO	Циклические кетоны
	C ₂ H ₃ CN	Нитрилы
	C ₃ F	Перфторуглеводороды
56	C ₄ H ₈	Алкилпроизводные, алициклы
	CH ₂ CHCHNH ₂	Циклоалкиламины
	C ₂ H ₄ CO	Циклические кетоны
57	C ₄ H ₉	Алкилпроизводные
	C ₂ H ₃ CO	Этилкетоны, производные пропионовой кислоты
	CH ₂ CHCHON	Циклоалканолы
	NH ₂ CHCO	α-Аминокислоты

Таблица 3 (продолжение)

m/z	Состав (структура) ионов	Соединения, для которых характерны данные ионы
	C_3H_2F	Фторуглеводороды
58	$CH_2C(OH)CH_3$	Кетоны
	$CH_3CHCHOH$	α -Метилальдегиды
	C_2H_6CO	Циклоалканола
	C_3H_8N	Алкиламины
	CH_2NCO	Амиды
	C_2H_2S	Сульфиды
59	C_3H_6OH	Спирты
	$C_2H_5OCH_2$	Простые эфиры
	CH_3OCO	Метилвые эфиры кислот
	$CH_2C(OH)NH_2$	Амиды карбоновых кислот
	$CH_2CHNHOH$	Альдоксимы
	$C_2H_7N_2$	Алкилгидразины
	C_2H_3S	Тиацикланы
	$SiH(CH_3)_2$	Алкилсиланы
60	$CH_2C(OH)_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	$HOCHCHOH$	Углеводы
	C_3H_8O	Спирты, полиолы, простые эфиры $>C_5$
	C_2H_6NO	Амиды карбоновых кислот
	CH_2ONO	Алифатические нитросоединения
	C_2H_4S	Циклические сульфиды
61	$CH_2C(OH)_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	C_3H_8O	Спирты, полиолы, простые эфиры $>C_5$
	C_2H_5S	Тиолы, сульфиды
	C_2H_6P	Фосфины
	CH_2NO_2H	Нитроалканы
62	$HO(CH_2)_2OH$	Полиолы
	$C_2H_5PH_2$	Фосфины
	C_2H_5SH	Сульфиды
	$CH_2N(OH)_2$	Нитроалканы
63	C_5H_3	Ароматические, полиненасыщенные соединения
	CH_2SOH	Диалкилсульфоксиды
	$C_2H_4^{35}Cl$	Алкилхлориды
64	C_5H_4	Ароматические, полиненасыщенные соединения
	S_2	Сера, дисульфиды
	SO_2	Сульфоны, сульфокислоты
65	C_5H_5	Ароматические соединения, металлоцены
	$C_2H_4^{37}Cl$	Алкилхлориды
66	C_5H_6	Ароматические, полиненасыщенные соединения
	S_2H_2	Алкилдисульфиды
67	C_5H_7	Ацетилены, диены, циклоалканы
68	C_5H_8	Циклоалканы, циклоалканола
	C_4H_6N	Нитрилы
69	C_5H_9	Алкилпроизводные, алициклы, алкеновая серия

Таблица 3 (продолжение)

<i>m/z</i>	Состав (структура) ионов	Соединения, для которых характерны данные ионы
	C_4H_5O	Алициклические спирты, кетоны
	C_4H_7N	Нитрилы
	CF_3	Фторуглеводороды
70	C_5H_{10}	Алкилпроизводные, алициклы, алкены
	C_4H_6O	Алициклические кетоны
	C_4H_8N	Алициклические амины
71	C_5H_{11}	Алкилпроизводные
	C_3H_7CO	Кетоны, алициклические спирты
72	C_4H_8O	Кетоны, альдегиды, алициклические спирты
	$C_4H_{10}N$	Амины
	C_2H_5NCO	Амиды
73	C_4H_9O	Алифатические спирты, эфиры
	$C_3H_5O_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	CH_2COCH_2OH	Углеводы
	C_2H_7NCO	Амиды
	$C_3H_5N_2$	Диалкилгидразины
	$(CH_3)_3Si$	Триметилсилильные производные
74	C_6H_2	Ароматические, полиненасыщенные соединения
	$C_3H_6O_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	$C_2H_4NO_2$	Алифатические нитросоединения
	$NH_2CHCOOH$	α -Аминокислоты
	C_3H_6S	Циклические сульфиды
75	C_6H_3	Ароматические, полиненасыщенные соединения
	$C_4H_{11}O$	Спирты, полиолы, простые эфиры $>C_5$
	$C_3H_7O_2$	Карбоновые кислоты, их эфиры, ацетали
	$NH_2CHC(OH)_2$	α -Аминокислоты
	C_3H_7S	Тиолы, сульфиды
	$(CH_3)_2SiOH$	Триметилсилильные эфиры
	C_3H_8P	Алкилфосфины
76	C_6H_4	Ароматические, полиненасыщенные соединения
	$C_3H_7PH_2$	Алкилфосфины
	C_3H_7SH	Диалкилсульфиды
77	C_6H_5	Монозамещенные бензолы, ароматические, полиненасыщенные соединения
	$C_3H_6^{35}Cl$	Алкилхлориды
78	C_6H_6	Монозамещенные бензолы
	C_5H_4N	Ароматические амины
	C_2H_5SOH	Этилалкилсульфоксиды
79	C_6H_7	Ароматические, полиненасыщенные соединения
	C_5H_5N	Ароматические амины
	$C_3H_6^{37}Cl$	Алкилхлориды
	^{79}Br	Бромсодержащие соединения
80	C_6H_8	Замещенные циклогексены
	CH_3SSH	Метилдисульфиды
	$H^{79}Br$	Бромсодержащие соединения

Таблица 3 (продолжение)

m/z	Состав (структура) ионов	Соединения, для которых характерны данные ионы
81	C ₆ H ₉	Циклоалкены, диены, ацетилены,
	C ₅ H ₅ O	Алициклические спирты, эфиры, альдегиды
	⁸¹ Br	Бромсодержащие соединения
82	C ₆ H ₁₀	Монозамещенные циклогексаны, полизамещенные циклопентаны, циклоалканола
	C ₄ H ₈ CN	Алифатические нитрилы
	CHCF ₃	Трифторметилалканы
	C ³⁵ Cl ₂	Полихлорсодержащие соединения
	H ⁸¹ Br	Бромсодержащие соединения
83	C ₆ H ₁₁	Алкилпроизводные, алициклы, алкеновая серия
	CH ³⁵ Cl ₂	Полихлорсодержащие соединения
	C ₄ H ₇ CO	Алициклические спирты, эфиры, альдегиды, кетоны
84	C ₆ H ₁₂	Алкилпроизводные, алициклы, алкены
	C ₅ H ₈ O	Алициклические кетоны
	C ₅ H ₁₀ N	Алициклические амины
85	C ₆ H ₁₃	Алкилпроизводные
	C ₄ H ₉ CO	Кетоны, алициклические спирты
86	C ₃ H ₇ C(OH)CH ₂	Пропилалкилкетоны
	C ₅ H ₁₂ N	Алифатические амины
	C ₄ H ₁₀ Si	Силациклоалканы
87	C ₅ H ₁₁ O	Спирты, эфиры
	C ₃ H ₇ CO ₂	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	C ₄ H ₁₁ N ₂	Диалкилгидразины
	C ₃ H ₉ NCO	Амиды
88	C ₄ H ₈ O ₂	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	C ₃ H ₆ NO ₂	Алифатические нитросоединения
	C ₄ H ₈ S	Циклические сульфиды
89	C ₅ H ₁₃ O	Спирты, полиолы, простые эфиры >C ₅
	C ₄ H ₉ O ₂	Карбоновые кислоты, их эфиры, ацетали
	C ₄ H ₉ S	Сульфиды, тиолы
	(CH ₃) ₃ SiO	Триметилсилильные эфиры
	C ₄ H ₁₀ P	Алкилфосфины
90	C ₇ H ₆	Ароматические соединения, замещенные бензонитрилы
	C ₄ H ₉ PH ₂	Алкилфосфины
91	C ₇ H ₇ (Tr ⁺)	Ароматические соединения, монозамещенные бензолы
	C ₆ H ₅ N	Производные анилина
		1-Хлоралканы
92	C ₇ H ₈	Ароматические соединения, монозамещенные бензолы
	C ₆ H ₆ N	Производные анилина
	C ₃ H ₇ SOH	Пропилалкилсульфоксиды
93	C ₇ H ₉	Циклодиены, терпены
	C ₆ H ₅ O	Производные фенола
	CH ₂ ⁷⁹ Br	Алкилбромиды
94	C ₆ H ₅ OH	Фениловые эфиры, бензопилены

Таблица 3 (продолжение)

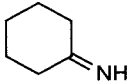
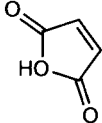
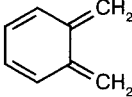
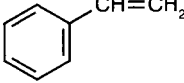
<i>m/z</i>	Состав (структура) ионов	Соединения, для которых характерны данные ионы
95	C_7H_{11}	Диены, циклоалкены, ацетилены
	$CH_2^{81}Br$	Алкилбромиды
96	$C_5H_{10}CN$	Алифатические нитрилы
97	C_7H_{13}	Алкилпроизводные, алициклы, алкеновая серия
	C_5H_9CO	Алициклические кетоны
		Алифатические нитрилы
98	C_7H_{14}	Алкилпроизводные, алициклы, алкены
	$C_5H_{10}CO$	Алициклические кетоны
	$C_6H_{12}N$	Алициклические амины
99	C_7H_{15}	Алкилпроизводные
	$C_5H_{11}CO$	Алифатические кетоны
	$C_6H_{11}O$	Алициклические спирты
		Диалкилмалеаты
	$CH_3CONHCHCO$	N-ацетил- α -аминокислоты
100	$C_5H_{12}CO$	Алифатические кетоны
	$C_6H_{12}O$	Алициклические спирты
	$C_6H_{14}N$	Алифатические амины
	$C_4H_{10}NCO$	Алифатические амиды
	C_2F_4	Перфторалканы
101	$C_5H_9O_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	$C_6H_{13}O$	Алифатические спирты, эфиры, кетоны
	C_5H_9S	Алициклические тиолы, сульфиды
102	C_6H_5CCH	Ароматические производные
	$C_5H_{10}O_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	$C_5H_{12}NO$	Алифатические амиды
	$C_4H_8NO_2$	Алифатические нитросоединения
	$H_2NCHCO_2C_2H_5$	Этиловые эфиры α -аминокислот
103	$C_6H_5C_2H_2$	Алкенилбензолы
	$C_6H_{15}O$	Спирты, полиолы, простые эфиры
	$C_5H_{11}O_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	$C_5H_{11}S$	Тиолы, сульфиды
104		Орто-замещенные бензолы
		β -Фенилэтиловые эфиры, алкенилбензолы
	$C_5H_{11}PH_2$	Алифатические фосфины
105	$C_6H_5C_2H_4$	Алкилбензолы, алкилароматические спирты

Таблица 3 (продолжение)

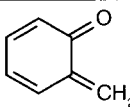
<i>m/z</i>	Состав (структура) ионов	Соединения, для которых характерны данные ионы
	C_6H_5CO	Бензоилпроизводные
	$C_5H_{10}^{35}Cl$	Хлоралканы
106	$C_6H_5C_2H_5$	Алкилбензолы
	$C_6H_5NHCH_2$	Алкиланилины
		Орто-замещенные феноловые эфиры
	C_4H_9SOH	Бутилалкилсульфоксиды
107	C_8H_{11}	Циклодиены, терпены
	C_7H_6OH	Алкилфенолы
	$C_2H_4^{79}Br$	Бромсодержащие соединения
108	C_8H_{12}	Циклодиены, терпены
	C_7H_7OH	Бензиловые и толиловые эфиры
109	C_8H_{13}	Диены, циклоалкены, ацетилены
	PhS	Фенилсульфиды, фенилсульфоксиды
110	$C_6H_4(OH)_2$	Алкоксифенолы (алкил $\geq C_2H_5$)
	$C_6H_{12}CN$	Алифатические нитрилы
111	C_8H_{15}	Алкилпроизводные, циклоалканы, алкены
	$C_6H_{11}CO$	Алициклические кетоны
112	C_8H_{16}	Алкилпроизводные, циклоалканы, алкены
	$C_7H_{12}O$	Алициклические кетоны
	$C_7H_{14}N$	Алициклические амины
113	C_8H_{17}	Алкилпроизводные
114	$C_7H_{16}N$	Алифатические амины
115	C_9H_7	Нафталины, индены
	$C_6H_{11}O_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	$C_6H_{13}NO$	Алифатические амиды
	$C_6H_{11}S$	Алициклические тиолы, сульфиды
116	$C_6H_{12}O_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	$C_6H_{14}NO$	Алифатические амиды
117	$C_6H_5C_3H_4$	Алкенилбензолы, замещенные стиролы, циклоалкилбензолы
	$C_7H_{17}O$	Спирты, полиолы, простые эфиры
	$C_6H_{13}O_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
	$(CH_3)_3SiOOC$	Триметилсилильные эфиры α -аминокислот
	$C^{35}Cl_3$	Трихлорметилные производные
118	$C_6H_5C_3H_5$	Алкенилбензолы
119	$C_6H_5C_3H_6$	Алкилбензолы
	$CH_3C_6H_4CO$	Толуиловые кислоты и их эфиры
	CF_3CF_2	Перфторалканы
	$C^{35}Cl_2^{37}Cl$	Трихлорметилные производные
120	C_9H_{12}	Алкилбензолы
	$C_6H_5C(OH)CH_2$	Фенилалкилкетоны
	$C_8H_{10}N$	Алкиланилины
121	C_9H_{13}	Терпены
	C_8H_9O	Замещенные фенолы, метоксибензолы

Таблица 3 (окончание)

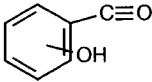
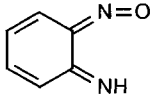



<i>m/z</i>	Состав (структура) ионов	Соединения, для которых характерны данные ионы
		Производные салициловой кислоты
		О-нитроанилины
	$C_3H_6^{79}Br$	Бромсодержащие соединения
122	C_6H_5COOH	Производные бензойной кислоты
123	$C_8H_{11}O$	Терпены
	$C_6H_5COOH_2$	Производные бензойной кислоты
	$C_3H_6^{81}Br$	Бромсодержащие соединения
124	$C_7H_{14}CN$	Алифатические нитрилы
125	C_9H_{17}	Алкилпроизводные, циклоалканы, алкены
	C_6H_5SO	Алкилфенилсульфоксиды
126	C_9H_{18}	Алкилпроизводные, циклоалканы, алкены
	C_6H_5SOH	Алкилфенилсульфоксиды
127	C_9H_{19}	Алкилпроизводные
	$C_{10}H_7$	Нафталины
	I	Иодсодержащие соединения
128	$C_{10}H_8$	Нафталины
	$C_8H_{18}N$	Алифатические амины
	HI	Иодсодержащие соединения
129	$C_7H_{13}O_2$	Алифатические карбоновые кислоты, их эфиры
131	C_3F_5	Перфторалканы
132	$C_{10}H_{12}$	Алкенилбензолы
133	$C_{10}H_{13}$	Алкилбензолы
135		Монозамещенные адамантаны
		Алкилбромиды
137		Алкилбромиды
138	$C_8H_{16}CN$	Алифатические нитрилы
140	$C_{10}H_{20}$	Алкилпроизводные, циклоалканы, алкены
141	$C_{10}H_{21}$	Алкилпроизводные
	$C_{11}H_9$	Алкилнафталины
	CH_2I	Алкилиодиды
147	$C_{11}H_{15}$	Полиалкилбензолы
	$C_4H_{11}Si_2O_2$	Полидиметилсилоксаны (фаза колонки)
149	$C_8H_5O_3$	Эфиры орто-фталевой кислоты
155	$C_{12}H_{11}$	Алкилнафталины
207	$C_5H_{15}Si_3O_3$	Полидиметилсилоксаны (фаза колонки)
221	$C_6H_{17}Si_3O_3$	Полидиметилсилоксаны (фаза колонки)
281	$C_7H_{21}Si_3O_4$	Полидиметилсилоксаны (фаза колонки)

Таблица 4. Масса и состав наиболее распространенных частиц, элиминируемых молекулярными ионами органических соединений

Масса	Состав	Соединения, M^{++} которых элиминируют данные частицы
1	H	Большинство органических соединений
2	2H	Силаны, фосфины, полициклические ароматические углеводороды
3	3H	Фосфины, бензиловые спирты, соединения $Ar-X-Ar$
15	CH_3	Алкилпроизводные, циклоалкилпроизводные
16	NH_2	Ароматические амиды
	O	Сульфоксиды, ароматические нитросоединения
	CH_4	Алкилпроизводные (редко), элементоорганические соединения
17	NH_3	Амины, полиамины (редко)
	OH	Карбоновые кислоты, оксимы, некоторые спирты, сульфоны, сульфоксиды, <i>орто</i> -нитроалкилбензолы
18	H_2O	Спирты, альдегиды, кетоны, простые эфиры
19	F	Фторпроизводные
20	HF	Фторпроизводные
	$H_2 + H_2O$	Алифатические спирты (часто термически)
26	C_2H_2	Ароматические соединения
	CN	Ароматические нитрилы
27	C_2H_3	Ароматические соединения, этиловые эфиры кислот
	HCN	Нитрилы, ароматические амины
28	C_2H_4	Функциональные этилпроизводные, цикланы, циклоалкены
	CO	Фенолы, алициклические кетоны, диарилловые эфиры
	N_2	Дiazосоединения, ароматические азосоединения
	$H + HCN$	Ароматические амины
29	C_2H_5	Алкилпроизводные, алициклические соединения
	HCO	Фенолы, ароматические альдегиды, диарилловые эфиры
30	CH_2O	Метоксиарилы, ацетали
	C_2H_6	Алкилпроизводные
	NO	Ароматические нитросоединения
31	CH_3O	Метоксипроизводные, полиолы
32	CH_3OH	Простые и сложные эфиры
	S	Сульфиды, тиофенолы
33	$CH_3 + H_2O$	Некоторые спирты
	HS	Сульфиды, тиофенолы
	CH_2F	Фторпроизводные
34	H_2S	Тиолы, сульфиды
35	^{35}Cl	Хлорпроизводные
36	$H^{35}Cl$	Хлорпроизводные
	$2H_2O$	Полиолы, сахара
37	^{37}Cl	Хлорпроизводные
38	$H^{37}Cl$	Хлорпроизводные
39	C_3H_3	Некоторые алленовые и пропаргильные производные
40	C_3H_4	Ароматические соединения, алкениларилловые эфиры
	CH_2CN	Нитрилы

Таблица 4 (продолжение)

Масса	Состав	Соединения, М ⁺⁺ которых элиминируют данные частицы
41	C ₃ H ₅	Пропиловые эфиры кислот, пропиламиды
42	C ₃ H ₆	Функциональные пропилпроизводные, цикланы, циклоалкены
	CH ₂ CO	Ацетилпроизводные, алициклические кетоны
43	C ₃ H ₇	Алкилпроизводные
	CH ₃ CO	Ацетилпроизводные
	HNCO	Циклические амиды
44	C ₃ H ₈	Алкилпроизводные
	CH ₃ CHO	Альдегиды (с образованием стабилизированного иона)
	CO ₂	Ангидриды
	CS	Тиофенолы, диарилсульфиды
	CONH ₂	Ароматические амиды
45	C ₂ H ₅ O	Этоксипроизводные
	COOH	Карбоновые кислоты, α-аминокислоты
	HCS	Тиофенолы
	(CH ₃) ₂ NH	Диметиламинопроизводные
46	C ₂ H ₅ OH	Простые и сложные эфиры (этиловые)
	H ₂ O + C ₂ H ₄	Первичные спирты с длинной цепью
	H ₂ O + CO	Некоторые карбоновые кислоты
	NO ₂	Нитропроизводные
	CH ₂ S	Метиларилсульфиды
47	HNO ₂	Алифатические нитросоединения
	C ₂ H ₄ F	Фторпроизводные
	CH ₃ S	Некоторые метилсульфиды, тиолы
48	CH ₃ SH	Некоторые метилсульфиды, тиолы
	SO	Ароматические сульфоксиды
49	HF + C ₂ H ₅	Фторпроизводные
	CH ₂ ³⁵ Cl	Хлорпроизводные
50	H ₂ O + CH ₃ OH	Полиолы, метиловые эфиры полиолов
	CF ₂	Трифторметильные производные
51	CHF ₂	Фторпроизводные
	CH ₂ ³⁷ Cl	Хлорпроизводные
53	C ₄ H ₅	Некоторые алленовые и пропаргильные соединения
54	C ₄ H ₆	Ароматические соединения, алкениларилловые эфиры, циклоалкены
	C ₃ H ₂ O	Ненасыщенные алициклические кетоны
55	C ₄ H ₇	Бутиловые эфиры кислот, N-бутиламиды
56	C ₄ H ₈	Функциональные бутилпроизводные, цикланы, циклоалкены
	CH ₃ CHCO	Пропионильные производные, алициклические кетоны
57	C ₄ H ₉	Алкилпроизводные
	C ₂ H ₅ CO	Некоторые этилкетоны, алициклические кетоны
	CH ₃ NCO	Циклические амиды
58	C ₄ H ₁₀	Алкилпроизводные
	C ₂ H ₆ CO	Метилкетоны (с образованием стабилизированного иона)

Таблица 4 (окончание)

Масса	Состав	Соединения, М ⁺⁺ которых элиминируют данные частицы
	NO + CO	Ароматические нитросоединения
59	C ₃ H ₇ O	Пропоксипроизводные
	CH ₃ CO ₂	Метилловые эфиры карбоновых кислот, некоторые алкилацетаты
60	C ₃ H ₇ OH	Простые и сложные эфиры (пропиловые)
	CH ₃ OH + CO	Некоторые метилловые эфиры карбоновых кислот
	CH ₃ COOH	Некоторые ацетаты
61	C ₂ H ₅ S	Этилсульфиды
62	H ₂ S + C ₂ H ₄	Тиолы
63	C ₂ H ₄ ³⁵ Cl	Хлорпроизводные
64	(CH ₃ OH) ₂	Полиолы, сахара, их метилловые эфиры
	SO ₂	Сульфоны, алкилсульфонаты
65	C ₂ H ₄ ³⁷ Cl	Хлорпроизводные
67	C ₅ H ₇	Некоторые алленовые и пропаргильные соединения
68	C ₅ H ₈	Ароматические соединения, алкениларилловые эфиры, циклоалкены, терпены
69	C ₅ H ₉	Амилловые эфиры кислот, N-амиламиды
	CF ₃	Трифторметилпроизводные
70	C ₅ H ₁₀	Функциональные амилпроизводные, цикланы, циклоалкены
	C ₃ H ₆ CO	Бутирильные производные, алициклические кетоны
71	C ₅ H ₁₁	Алкилпроизводные
	C ₃ H ₇ CO	Некоторые пропилкетоны, алициклические кетоны
	C ₂ H ₅ NCO	Циклические амиды
72	C ₅ H ₁₂	Алкилпроизводные
	C ₃ H ₈ CO	Некоторые кетоны и альдегиды
73	C ₄ H ₉ O	Бутоксипроизводные
	C ₂ H ₅ CO ₂	Метилловые эфиры некоторых карбоновых кислот, некоторые про- пионаты
	(CH ₃) ₃ Si	Триметилсилильные производные
74	C ₄ H ₉ OH	Простые и сложные бутиловые эфиры
	(CH ₃) ₃ SiH	Триметилсилильные производные
76	H ₂ S + C ₃ H ₆	Тиолы
77	Ph	Некоторые фенилпроизводные
78	PhH	Некоторые фенилпроизводные
79	⁷⁹ Br	Бромпроизводные
80	H ⁷⁹ Br	Бромпроизводные
81	⁸¹ Br	Бромпроизводные
82	H ⁸¹ Br	Бромпроизводные
88	(CH ₃) ₄ Si	Политриметилсилильные производные
91	C ₇ H ₇	Бензильные и толильные производные
93	C ₆ H ₅ O	Феноксипроизводные
	CH ₂ ⁷⁹ Br	Бромпроизводные
95	CH ₂ ⁸¹ Br	Бромпроизводные
127	I	Иодпроизводные

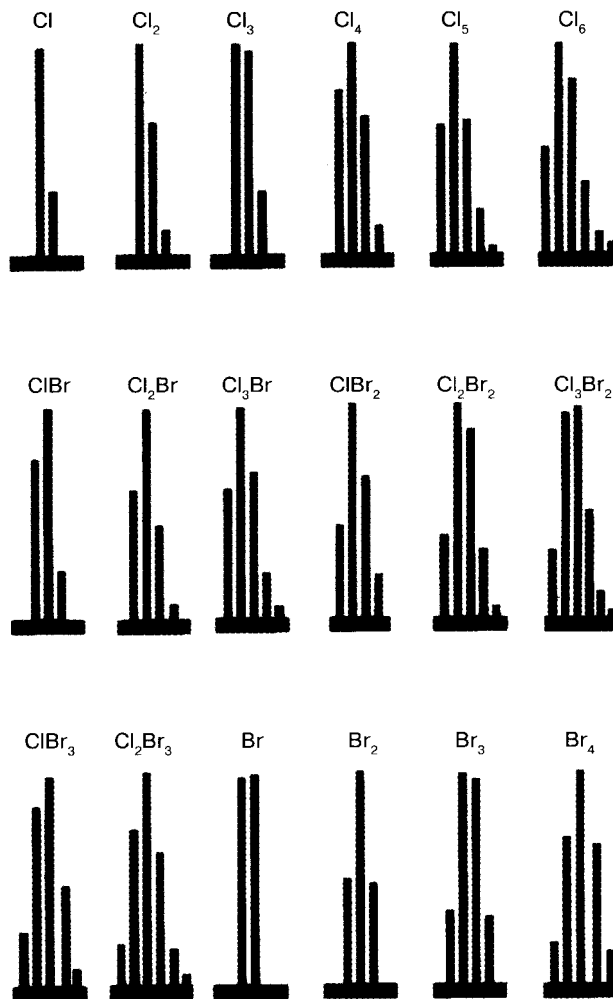


Рис. 1. Графический вид кластеров ионов с разным содержанием атомов хлора и брома

Литература

1. Мильман Б.Л. Введение в химическую идентификацию. — СПб.: ВВМ, **2008**. — 180 с.
2. Экман Р., Зильберинг Е., Вестман-Бринкмальм Э., Край А. Масс-спектрометрия: аппаратура, толкование и приложения. — М.: Техносфера, **2013**. — 352 с.
3. Заикин В.Г. Масс-спектрометрия синтетических полимеров. — М.: ВМСО, **2009**. — 332 с.
4. Зякун А.М. Теоретические основы изотопной масс-спектрометрии в биологии. — Пушкино: Фотон-век, **2010**. — 224 с.
5. Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. — М.: Техносфера, **2012**. — 176 с.
6. Ласкин Дж., Лифшиц Х. (Ред.). Принципы масс-спектрометрии в применении к биомолекулам. — М.: Техносфера, **2012**. — 608 с.
7. Лебедев А.Т. (Ред.). Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды. — М.: Техносфера, **2013**. — 632 с.
8. Grayson M.A. (Ed.). Measuring mass. From positive rays to proteins, Chemical Heritage Press. Philadelphia, **2002**. — 149 p.
9. Бейнон Дж. Масс-спектрометрия и ее применение в органической химии. — М.: Мир, **1964**. — 701 с.
10. Леман Т.А., Берси М.М. Спектрометрия ионного циклотронного резонанса. — М.: Мир, **1980**. — 215 с.
11. Graul S.T., Squires R.R. *Mass Spectrom. Rev.* — **1988**. — 7. — 263.
12. Snyder P. Biochemical and biotechnological applications of electrospray ionization mass spectrometry. — ACS. — Washington D.C. — **1995**. — 601 p.
13. Karas M., Hillenkamp F. Advances in Mass Spectrom. Longevialle P. (Ed.). London: Heyden & Son, **1989**. — P. 416.
14. Chen R., Cheng X., Mitchell D.W., Hofstadler S.A., Wu Q., Rockwood A.L., Sherman M.G., Smith R.D. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 1159.
15. Fenselau C. (Ed.). Mass Spectrometry for the characterization of microorganisms. — ACS. — Washington D.C., **1994**. — 240 p.
16. Лободин В.В., Лебедев А.Т. *Масс-спектрометрия*. — **2005**. — 2. — 91.
17. Schwarz H. in Proc. 15th International Mass Spectrometry Conference. — Barcelona, **2000**. — P. 11.
18. McLafferty F.W., Horn D.M., Ge Y., Cerda B., Fridriksson E., Breuker K. in Proc. 15th International Mass Spectrometry Conference. — Barcelona, **2000**. — P. 12.
19. Полякова А.А. Молекулярный масс-спектральный анализ органических соединений. — М.: Химия, **1983**. — 248 с.
20. Полякова А.А., Хмельницкий Р.А. Введение в масс-спектрометрию органических соединений. — Л.: Химия, **1966**. — 204 с.
21. Шеховцов Н.А. Магнитные масс-спектрометры. — М.: Атомиздат, **1971**. — 232 с.
22. Вульфсон Н.С., Заикин В.Г., Микая А.И. Масс-спектрометрия органических соединений. — М.: Химия, **1986**. — 312 с.



23. Заикин В.Г., Микая А.И., Вдовин В.М. Масс-спектрометрия малых циклов. — М.: Наука, **1983**. — 159 с.
24. Терентьев П.Б. Масс-спектрометрия в органической химии. — М.: Высшая школа, **1979**. — 223 с.
25. Терентьев П.Б., Станкявичюс А.П. Масс-спектрометрический анализ биологически активных азотистых оснований. — Вильнюс: Мокслас, **1987**. — 280 с.
26. Лебедев А.Т. Задачник по масс-спектрометрии органических соединений. — М.: МГУ, **1991**. — 103 с.
27. Заикин В.Г., Варламов А.В., Микая А.И., Простаков Н.С. Основы масс-спектрометрии органических соединений. — М.: Наука/Интерпериодика, **2001**. — 286 с.
28. Толстиков Г.А. (Ред.). Химия несольватированных ионов в газовой фазе. — Уфа: **1987**. — 183 с.
29. Розынов Б.В. Масс-спектрометрия в органической химии. Применение в анализе аминокислот, пептидов, белков, Итоги науки и техники. Органическая химия. Т. 2. — М.: ВИНТИ, **1978**. — 179 с.
30. Заикин В.Г., Микая А.И. Химические методы в масс-спектрометрии органических соединений. — М.: Наука, **1987**. — 200 с.
31. Тахистов В.В. Органическая масс-спектрометрия. — Л.: Наука, **1990**. — 223 с.
32. Тахистов В.В. Практическая масс-спектрометрия органических соединений. — Л.: ЛГУ, **1977**. — 278 с.
33. Зенкевич И.Г., Иоффе Б.В. Интерпретация масс-спектров органических соединений. — Л.: Химия, **1986**. — 175 с.
34. Хмельницкий Р.А., Бродский Е.С. Масс-спектрометрия загрязнений окружающей среды. — М.: Химия, **1990**. — 182 с.
35. Хвостенко В.И. Масс-спектрометрия отрицательных ионов в органической химии. — М.: Наука, **1981**. — 159 с.
36. Анисимова О.С., Линдберг Л.Ф., Шейнкер Ю.Н. Масс-спектрометрия в исследовании метаболизма лекарственных препаратов. — М.: Медицина, **1978**. — 168 с.
37. Хмельницкий Р.А., Бродский Е.С. Хроматомасс-спектрометрия. — М.: Химия, **1984**. — 216 с.
38. Исидоров В.А., Зенкевич И.Г. Хроматомасс-спектрометрическое определение следов органических веществ в атмосфере. — Л.: Химия, **1982**. — 136 с.
39. Толстиков Г.А. (Ред.). Физические основы масс-спектрометрии: Методы ионизации. — Уфа: Башкирский филиал АН СССР, **1985**. — 120 с.
40. Будзикевиц Г., Джерасси К., Уильямс Д. Интерпретация масс-спектров органических соединений. — М.: Мир, **1966**. — 323 с.
41. Джонстон Р. Руководство по масс-спектрометрии для химиков-органиков. — М.: Мир, **1975**. — 236 с.
42. Чепмен Дж. Практическая органическая масс-спектрометрия. — М.: Мир, **1988**. — 216 с.
43. McLafferty F.W., Turecek F. Interpretation of mass spectra, Mill Valey: University Science Books, **1993**. — 422 p.

44. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. — М.: Бином, **2003**. — 493 с.
45. Cooks R.G., Rockwood A.L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1991**. — 5. — 2.
46. Hoch G., Kok B. *Arch. Biochem. Biophys.* — **1963**. — 101. — 160.
47. Lapack M.A., Tou J.C., Enke C.G. *Anal. Chem.* — **1990**. — 62. — 1265.
48. Lapack M.A., Tou J.C., Enke C.G. *Anal. Chem.* — **1991**. — 63. — 1631.
49. Virkki V.T., Ketola R.A., Ojala M., Kotiaho T., Komppa V., Grove A., Facchetti S. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 1421.
50. Bier M.E., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **1987**. — 59. — 597.
51. Soni M., Bauer S., Amy J.W., Wong P., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 1409.
52. Etzcom J., Davey N., Thompson A., Creba A., LeBlanc C., Simpson C., Krogh E., Gill C. *J. Chromatogr. Sci.* — **2009**. — 1. — 57.
53. Brkic B., France N., Taylor S. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 6230.
54. Cisper M.E., Gill C.G., Townsend L.E., Hemberger P.H. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 1413.
55. Lauritsen F.R., Gylling S. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 1418.
56. Chen H., Xia Z.N., Pedersen-Bjergard S., Svensmark B., Lauritsen F.R. *Anal. Chem.* — **2009**. — 81. — 4010.
57. Duncan K.D., B.McCauley E.P., Krogh E.T., Gill C.G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2011**. — 25. — 1141.
58. Davey N.G., Krogh E.T., Gill C.G. *Trends Anal. Chem.* — **2011**. — 30. — 1477.
59. Шарма Г., Нолл Р.Дж., Оуянг Дж., Кукс Р.Г. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 242.
60. Davey N.G., Fitzpatrick C.T.E., Etzcom J.M., Martinsen M., Crampton R.S., Onstad G.D., Larson T.V., Yost M.G., Krogh E.T., Gilroy M., Himes K.H., Saganic E.T., Simpson C.D., Gill C.G. *J. Environ. Sci. Health A.* — **2014**. — 49. — 1199.
61. Bell R.J., Davey N.G., Martinsen M., Collin-Hansen C., Krogh E.T., Gill C.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2015**. — 26. — 201.
62. Holmes J.C., Morrell F.A. *Appl. Spectrosc.* — **1957**. — 11. — 86.
63. Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. — Wiley-VCH, **1997**. — 264 p.; Pawliszyn J. (Ed). Handbook of Solid Phase Microextraction. — Chemical Industry Press, **2009**. — 496 p.
64. Ternes T.A., Baumann W., Nagel R. *Fresenius J. Anal. Chem.* — **1995**. — 354. — 237.
65. Артеменко К.А., Фиалков А.Б., Гордин А., Амирав А., Лебедев А.Т. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 170.
66. Bertoncini F., Courtiade-Tholance M., Thiebaut D. Gas chromatography and 2D-gas chromatography for petroleum industry. — Editions Technip. — Paris, France, **2013**. — 340 p.
67. Niessen W.M.A. (Ed.). Current practice of gas chromatography-mass spectrometry. — Marcel Dekker Inc. — NY, **2001**. — 528 p.
68. Niessen W.M.A. (Ed.). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. — CRC Press. — Boca Raton, **2006**. — 603 p.

69. Willoughby R., Sheehan E., Mitrovich S. A Global View of LC/MS. — Global View Publishing. — Pittsburg, PA, **2002**. — 518 p.
70. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. *Mass Spectrom. Rev.* — **2007**. — 26. — 51.
71. McFadden W.H., Schwartz H.L., Evans S. *J. Chromatogr.* — **1976**. — 122. — 389.
72. Klesper E., Corwin A.H., Turner D.A. *J. Org. Chem.* — **1962**. — 27. — 700.
73. Pinkston J.D. in Practical supercritical fluid chromatography and extraction, Caude M., Thiebaut D. (Eds.). — Harwood Acad. Publ. — Amsterdam, **1999**. — P. 161.
74. Sadoun F., Virilizier H., Arpino P.J. *J. Chromatogr.* — **1993**. — 647. — 351.
75. Zheng J., Pinkston J.G., Zoutendam P.H., Taylor L.T. *Anal. Chem.* — **2006**. — 78. — 1535.
76. Hurugaverl B., Voorhees K.J., Luca S.J. *J. Chromatogr.* — **1993**. — 633. — 17.
77. Goss V., Cazenave-Gassiot A., Pringle A., Postle A. *Current. Anal Chem.* — **2014**. — 10. — 121.
78. Zeng L., Xu R., Zhang Y., Kassel D.B. *J. Chromatogr.* — **2011**. — 1218. — 20. — 3080.
79. Yamada T., Uchikata T., Sakamoto S., Yokoi Y., Nishiumi S., Yoshida M., Fukusaki E., Bamba T. *J. Chromatogr. A.* — **2013**. — 1301. — 237.
80. Ishibashi M., Ando T., Sakai M., Matsubara A., Uchikata T., Fukusaki E., Bamba T. *J. Chromatogr. A.* — **2012**. — 1266. — 143.
81. Li F., Hsieh Y. *J. Separat. Sci.* — **2008**. — 31. — 1231.
82. Bolanos B., Greig M., Ventura M., Farrell W., Aurigemma C.M., Li H., Quenzer T.L., Tivel K., Bylund J.M.R., Tran P., Pham C., Phillipson D. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2004**. — 238. — 85.
83. Bosch M.E., Sanchez A.J., Antonin J.R., Rojas F.S., Ojeda C.B. *Curr. Drug Discov. Technol.* — **2009**. — 6. — 214.
84. Bamba T., Lee J.W., Matsubara A., Fukusaki E. *J. Chromatogr.* — **2012**. — 1250. — 212.
85. Jorgenson J.W., Lukacs K.D. *Anal. Chem.* — **1981**. — 53. — 1298.
86. Olivares J.A., Nguyen N.T., Yonker C.R., Smith R.D. *Anal. Chem.* — **1987**. — 59. — 1230.
87. Smith R.D., Wahl J.H., Goodlett D.R., Hofstadler S.A. *Anal. Chem.* — **1993**. — 65. — 574A.
88. Gaspar A., Englmann M., Fakete A., Harir A., Schmitt-Kopplin P. *Electrophoresis.* — **2008**. — 29. — 66.
89. Zamfir A.D. *J. Chromatogr. A.* — **2007**. — 1159. — 2.
90. Hirabayashi A., Sakairi M., Koizumi M. *Anal. Chem.* — **1994**. — 66. — 4557.
91. Hirabayashi A., Sakairi M., Koizumi M. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 2878.
92. Arinobu T., Hattori H., Seno H., Ishii A., Suzuki O. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2002**. — 13. — 204.
93. Stutz H. *Electrophoresis.* — **2005**. — 26. — 1254.
94. Preisler J., Hu P., Rejtar T., Moskovets E., Karger B.L. *Anal. Chem.* — **2002**. — 74. — 12.
95. Chalcraft K.R., Britz-McKibbin P. *Anal. Chem.* — **2009**. — 81. — 307.
96. Monnig C.A., Jorgenson J.W. *Anal. Chem.* — **1991**. — 63. — 802.
97. Banks J.F., Dresch T. *Anal. Chem.* — **1996**. — 68. — 1480.

98. Hofstadler S.A., Swanek F.D., Gale D.C., Ewing A.G., Smith R.D. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 1477.
99. Simpson D.C., Smith R.D. *Electrophoresis.* — **2005**. — 26. — 1291.
100. Mischak H., Coon J.J., Novak J., Weissinger E.M., Schanstra J.P., Dominiczak A.F. *Mass Spectrom. Rev.* — **2009**. — 28. — 703.
101. Lapanis T., Rubakhin S.S., Sweedler J.V. *Anal. Chem.* — **2009**. — 81. — 5858.
102. Haddad P.R., Nesterenko P.N., Buchberger W. *J. Chromatogr. A.* — **2008**. — 1184. — 456.
103. Barron L., Gilchrist E. *Anal. Chim. Acta.* — **2014**. — 806. — 27.
104. Corr J.J., Anacieto J.F. *Anal. Chem.* — **1996**. — 68. — 2155.
105. Xiang X.Z., Ko C.Y., Guh H.Y. *Anal. Chem.* — **1996**. — 68. — 3726.
106. Лейкин А.Ю., Нэлмс С. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 288.
107. Divjak B., Goessler W. *J. Chromatogr. A.* — **1999**. — 844. — 161.
108. Patsar-Kallio M., Manninen P.K.G. *Anal. Chim. Acta.* — **1998**. — 360. — 161.
109. Loos R., Barcelo D. *J. Chromatogr. A.* — **2001**. — 938. — 45.
110. Buchberger W., Ahrer W. *J. Chromatogr. A.* — **1999**. — 850. — 99.
111. Soukup-Hein R.J., Remsburg J.W., Breitbach Z.S., Sharma P.S., Payagala T., Wanigasekara E., Huang J., Armstrong D.W. *Anal. Chem.* — **2008**. — 80. — 2612.
112. Zhang X., Wanigasekara E., Breitbach Z.S., Dodbiba E., Armstrong D.W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2010**. — 24. — 1113.
113. Slingsby R.W., Al-Horr R., Pohl C.A., Lee J.H. *Amer. Lab.* — **2007**. — 39. — 42.
114. Yang B., Zhang F., Liang X. *Central Eur. J. Chem.* — **2012**. — 10. — 472.
115. Burgess K., Creek D., Dewsbury P., Cook K., Barrett M.P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2011**. — 25. — 3447.
116. Gilchrist E.S., Nesterenko P.N., Smith N.W., Barron L.P. *Anal. Chim. Acta.* — **2015**. — 865. — 83.
117. Takats Z. Proc. 61th ASMS Meeting. — Minneapolis, USA, **2013**.
118. Бейкер А., Беттеридж Д. Фотоэлектронные спектры. — М.: Мир, **1975**. — 200 с.
119. Самохин А.С., Ревельский И.А. *Масс-спектрометрия.* — **2012**. — 9. — 58.
120. Amirav A. *Org. Mass Spectrom.* — **1991**. — 26, 1.
121. Waugh R.J., Bowie J.H., Gross M.L. *Austr. J. Chem.* — **1993**. — 46. — 693.
122. Лебедев А.Т., Казарян А.Г., Бакулев В.А., Шафран Ю.М., Фалько В.С., Лукин В.Г., Петросян В.С. *Химия гетероцикл. соед.* — **1987**. — 7. — 941.
123. Voinov V., Deinzer M.L., Beckman J.S., Barofsky D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2011**. — 22. — 607.
124. Vasil'ev Yu.V., Figard B.J., Voinov V.G., Barofsky D.F., Deinzer M.L. *J. Am. Chem. Soc.* — **2006**. — 128. — 5506.
125. Ляпина Н.К., Симаков В.С., Фурлей И.И., Улендеева А.Д., Воробьев А.С., Толстиков Г.А. *Изв. АН СССР. — Сер. Химия.* — **1987**. — 1688.
126. Rosenshtock H.M., Wallenstein H.B., Warhaftig A., Eyring H. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* — **1952**. — 38. — 667.
127. Marcus R.A. *J. Chem. Phys.* — **1952**. — 20. — 359.

128. Бродский А.И. Физическая химия. — М.: Госхимиздат, **1948**. — Т. 2. — С. 942.
129. Price W.D., Schnier P.D., Jockusch R.A., Strittmatter E.F., Williams E.R. *J. Am. Chem. Soc.* — **1996**. — 118. — 10640.
130. Laskin J., Futrell J.H. *Mass Spectrom. Rev.* — **2005**. — 24. — 135.
131. Dunbar R.C. in Gas Phase Ion Chemistry. Bowers M.T. (Ed.). — Vol. 3. — Academic Press. — NY, **1984**. — 129.
132. Dunbar R.C. in The Encyclopedia of Mass Spectrometry Armentrout P.B., Gross M.L., Caprioli R.M. (Eds.). — Elsevier. — Amsterdam, **2003**. — 1. — 403.
133. Cui W., Hu Y., Lifshitz C. *Eur. Phys. J., D: Atom. Mol. Opt. Phys.* — **2002**. — 20. — 565.
134. Weltzel K.-M. *Mass Spectrom. Rev.* — **2011**. — 30. — 221.
135. Lebedev A.T., Alekseeva T.N., Bakulev V.A., Kolobov M.Yu., Petrosyan V.S. *Org. Mass Spectrom.* — **1988**. — 23. — 825.
136. Aubagnac J.-L., Champion P., Guenot P. *Org. Mass Spectrom.* — **1978**. — 13. — 571.
137. Cooks R.G., Kruger T.L. *J. Am. Chem. Soc.* — **1977**. — 99. — 1279.
138. Biemann K. Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications. — New-York. — McGraw Hill, **1962**. — 370 p.
139. Benz W. Massenspektrometrie Organischer Verbindungen. — Leipzig. — Akademische Verlagsgesellschaft. — **1969**. — 369 p.
140. Ponomarev O.A., Takhistov V.V. in Recent Advances in Analytical Techniques. Attaur-Rahman M. (Ed.). — Harwood Acad. Publ. — Reading. — UK, **2000**. — P. 369.
141. Hammond G.S. *J. Am. Chem. Soc.* — **1955**. — 77. — 334.
142. Zahorszky U.I. *Org. Mass Spectrom.* — **1979**. — 14. — 66.
143. Stevenson D.P. *Disc. Faraday Soc.* — **1951**. — 10. — 35.
144. Audier H.E. *Org. Mass Spectrom.* — **1969**. — 2. — 280.
145. Harrison A.G., Finney C.D., Sherk J.A. *Org. Mass Spectrom.* — **1971**. — 5. — 1313.
146. Gilpin J.A., McLafferty F.W. *Anal. Chem.* — **1957**. — 29. — 990.
147. Harrison A.G. *Org. Mass Spectrom.* — **1970**. — 3. — 549.
148. Kingston D.G.I., Bursey J.T., Bursey M.M. *Chem. Rev.* — **1974**. — 74. — 215.
149. Karni M., Mandelbaum A. *Org. Mass Spectrom.* — **1980**. — 15. — 53.
150. Field F.H. in Mass Spectrometry. Maccoll A. (Ed.). — MTP Int. Rev. Sci. Butterworths, **1972**. — P. 133.
151. Bowen R.D., Stapleton B.J., Williams D.H. *Chem. Commun.* — **1978**. — 24.
152. Bente III P.F., McLafferty F.W., McAdoo D.J., Lifshitz C. *J. Phys. Chem.* — **1975**. — 79. — 713.
153. Hoffman M.K., Wallace J.C. *J. Am. Chem. Soc.* — **1973**. — 95. — 5064.
154. Budzikiewicz H., Djerassi C., Williams D.H. Mass Spectrometry of Organic Compounds San Fransisco: Holden Day, **1967**. — 690 p.
155. Green M.H., Cooks R.J., Schwab J.M., Roy R.B. *J. Am. Chem. Soc.* — **1970**. — 92. — 3076.
156. Pechine J.M. *Org. Mass Spectrom.* — **1971**. — 5. — 705.
157. Suming H., Yaozu C., Longfrei J., Shuman X. *Org. Mass Spectrom.* — **1986**. — 21. — 7.
158. Green M.H. in Topics in stereochemistry, Allinger N.L., Eliel E.L. (Eds.). — WILEY Interscience, **1976**. — P. 35.

159. Mandelbaum A. in Stereochemistry. Kagan N.B. (Ed.). – Thieme. – Stuttgart, **1977**. – 1. – 137.
160. Mandelbaum A. *Mass Spectrom. Rev.* – **1983**. – 2. – 223.
161. Splitter J.S., Turecek F. (Eds.). Application of mass spectrometry to organic stereochemistry. – VCH Publishers Inc. – NY, **1994**. – 705 p.
162. Schwarz H. *Top. Curr. Chem.* – **1978**. – 73. – 232.
163. Lebedev A.T., Alekseeva T.N., Kutateladze T.G., Mochalov S.S., Shabarov Yu.S., Petrosyan V.S. *Org. Mass Spectrom.* – **1989**. – 24. – 149.
164. Lebedev A.T., Dianova I.V., Mochalov S.S., Lobodin V.V., Samguina T.Yu., Gazzaeva R.A., Blumental T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2001**. – 12. – 956.
165. Ilisz I., Aranyi A., Pataj Z., Peter A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* – **2012**. – 69. – 28.
166. Awad H., El-Aneed A. *Mass Spectrom. Rev.* – **2013**. – 32. – 466.
167. Dwivedi P., Wu C., Matz L.M., Clowers B.H., Siems W.F., Hill H.H. *Anal. Chem.* – **2006**. – 78. – 8200.
168. Tao W.A., Cooks R.G. *Anal. Chem.* – **2003**. – 75. – 25; Enders J.R., Mclean J.A. *Chirality*. – **2009**. – 21. – E253.
169. Hammerum S. *Mass Spectrom. Rev.* – **1988**. – 7. – 123.
170. Lambert J.B., Shurvell H.F., Lightner D.A., Cooks R.G. Organic Structural Spectroscopy. – Prentice-Hall Inc. – New Jersey, **1998**. – 568 p.
171. Clark T. *J. Am. Chem. Soc.* – **1987**. – 109. – 6838.
172. Tomer K.B., Crow F.W., Gross M.L. *J. Am. Chem. Soc.* – **1983**. – 105. – 5487.
173. Tomer K.B., Jensen N.J., Gross M.L. *Anal. Chem.* – **1986**. – 58. – 2429.
174. Jensen N.J., Tomer K.B., Gross M.L., Lyon P.A. in Desorption Mass Spectrometry. Lyon P.A. (Ed.). – ACS. – Washington D.C., **1985**. – P. 194.
175. Cerny R.L., Tomer K.B., Gross M.L. *Org. Mass Spectrom.* – **1986**. – 21. – 655.
176. Adams J., Gross M.L. *J. Am. Chem. Soc.* – **1989**. – 111. – 435.
177. Adams J. *Mass Spectrom. Rev.* – **1990**. – 9. – 141.
178. Samgina T.Yu., Kovalev S.V., Gorshkov V.A., Artemenko K.A., Poljakov N.B., Lebedev A.T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2010**. – 21. – 104.
179. Cotter R.J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2013**. – 24. – 657.
180. Trimpin S., Clemmer D.E., McEwen C.N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2007**. – 18. – 1967.
181. Pittenauer E., Allmaier G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2009**. – 20. – 1037.
182. Narouz M.R., Soliman S.E., Fridgen T.D., Nashed M.A., Banoub J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – **2014**. – 28. – 169.
183. Baum F., Fedorova M., Ebner J., Hoffmann R., Pischetsrieder M. *J. Proteome Res.* – **2013**. – 12. – 5447.
184. Yan Y., Ubukata M., Cody R.B., Holy T.E., Gross M.L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2014**. – 25. – 1404.
185. Soffer M.D. *Science*. – **1958**. – 127. – 880.
186. Lobodin V.V., Marshall A.G., Hsu C.S. *Anal. Chem.* – **2012**. – 84. – 3410.
187. Kind T., Fiehn O. *BMC Bioinformatics*. – **2007**. – 8. – 105.
188. Kind T., Fiehn O. *BMC Bioinformatics*. – **2006**. – 7. – 234.

189. Талибова А., Токарев М., Хилькерт А. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 587.
190. Sharp Z. Principles of Stable Isotope Geochemistry. — Pearson Education Inc. — **2006**. — 360 p.
191. Fry B. Stable Isotope Ecology. — Springer, **2007**. — 308 p.
192. Wei J. et al. 62d ASMS Meeting. — Baltimore, **2014**.
193. Valeja S.G., Kaiser N.K., Xian F., Hendrikson C.L., Rouse J.C., Marshall A.G. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 8391.
194. Shaw J.B., Brodbelt J.S. *Anal. Chem.* — **2013**. — 85. — 8313.
195. Lössl P., Snijder J., Heck A.J.R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 906.
196. McLafferty F.W. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 9th Edition. — John Wiley & Sons, Hoboken. — New Jersey, USA, **2010**.
197. Спаркман О.Д. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 128.
198. Lebedev A.T., Polyakova O.V., Mazur D.M., Artaev V.B. *Analyst.* — **2013**. — 138. — 6946.
199. Wang Y., Wu M. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 7055.
200. Лебедев А.Т., Сагинова Л.Г., Алексеева Т.Н., Малошицкая О.А., Шабаров Ю.С., Петросян В.С. *Вестник МГУ. — Сер. 2, Химия.* — **1990**. — 31. — 425.
201. Лебедев А.Т., Казарян А.Г., Шарбатян П.А., Сипягин А.М., Карцев В.Г., Петросян В.С. *ЖОрХ.* — **1988**. — XXIV. — 1393.
202. Lossing F.P., Tanaka I.J. *J. Chem. Phys.* — **1956**. — 25. — 1031.
203. Munson M.S.B., Field F.H. *J. Am. Chem. Soc.* — **1966**. — 88. — 2621.
204. Harrison A.G. Chemical Ionization Mass Spectrometry CRC Press. — Boca Raton, **1992**. — 208 p.
205. Тальрозе В.Л., Любимова А.К. *ДАН СССР.* — **1952**. — 86. — 909.
206. Dempster A.J. *Philos. Mag.* — **1916**. — 31. — 438.
207. Brodbelt J.S. *Mass Spectrom. Rev.* — **1997**. — 16. — 91.
208. Burrows E. *Mass Spectrom. Rev.* — **1995**. — 14. — 107.
209. Donovan T., Brodbelt J. *Org. Mass Spectrom.* — **1992**. — 27. — 9.
210. Eichmann E.S., Brodbelt J.S. *Org. Mass Spectrom.* — **1993**. — 28. — 737.
211. Suming H., Yaozu C., Longfrei J., Shuman X. *Org. Mass Spectrom.* — **1985**. — 20. — 719.
212. Nanayakkara V.K., Kenttamaa H.I. in Proc. 42nd ASMS Conf. On Mass Spectrom & Allied Topics. — Chicago, **1994**. — 737.
213. Alvarez E.J., Brodbelt J.S. *J. Mass Spectrom.* — **1995**. — 30. — 625.
214. Kreaser C.S., Williamson B.L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* — **1996**. — 3. — 427.
215. Shaw G.J., Eglinton G., Quirke J.M.E. *Anal. Chem.* — **1981**. — 53. — 2014.
216. Bowen D.V., Field F.H. *Org. Mass Spectrom.* — **1974**. — 9. — 195.
217. Subba Rao S.C., Fenselau C. *Anal. Chem.* — **1978**. — 50. — 511.
218. Van de Sande C.C., van Gaever F., Sandra P., Monstrey J. *Z. Naturforsch.* — **1977**. — 32B. — 573.
219. Jelus B.L., Munson B., Fenselau C. *Biomed. Mass Spectrom.* — **1974**. — 1. — 96.

220. Keough T., De Stefano A.J. *Org. Mass Spectrom.* — **1981**. — 16. — 527.
221. Munson B. *Anal. Chem.* — **1977**. — 49. — 722A.
222. Hunt D.F., Harvey T.M., Brumley W.C., Ryan III J.F., Russell J.W. *Anal. Chem.* — **1982**. — 54. — 492.
223. Hunt D.F., Ryan III J.F. *Anal. Chem.* — **1972**. — 44. — 1306.
224. Hunt D.F., McEwen C.N., Upham R.A. *Anal. Chem.* — **1972**. — 44. — 1292.
225. Hodges R.V., Beauchamp J.L. *Anal. Chem.* — **1976**. — 48. — 825.
226. Peake D.A., Gross M.L. *Anal. Chem.* — **1985**. — 57. — 115.
227. Burnier R.C., Byrd G.D., Freiser B.S. *Anal. Chem.* — **1980**. — 52. — 1641.
228. Bowie J.H. *Mass Spectrom. Rev.* — **1990**. — 9. — 349.
229. Bose A.K., Fujiwara H., Pramanik B.N. *Tetrahedron Lett.* — **1979**. — 4017.
230. Dougherty R.C. *Anal. Chem.* — **1981**. — 53. — 625A.
231. Tannenbaum H.P., Roberts J.D., Dougherty R.C. *Anal. Chem.* — **1975**. — 47. — 49.
232. Bowie J.H. *Mass Spectrometry Specialists Reports*. — Royal Society of Chemistry. — London, **1989**. — 10. — 145.
233. Dougherty R.C. in *Mass Spectrometry in Environmental Sciences*. Karasek F.W., Hutzinger O., Safe S. (Eds.). — Plenum Press. — New York, **1985**. — P. 77.
234. Hunt D.F., Stafford G.C., Crow F.W. *Anal. Chem.* — **1976**. — 48. — 2098.
235. Baldwin M.A., McLafferty F.W. *Org. Mass Spectrom.* — **1973**. — 7. — 1353.
236. Dell A., Williams D.H., Morris H.R., Smith G.A., Feeney J., Roberts G.C.K. *J. Am. Chem. Soc.* — **1975**. — 97. — 2497.
237. Bruins A.P. *Biomed. Mass Spectrom.* — **1981**. — 8. — 31.
238. Beckey H.D. *Principles of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry*. — Pergamon. — London, **1977**. — 348 p.
239. Otsuki A., Shiraishi H. *Anal. Chem.* — **1979**. — 51. — 2329.
240. Matsuo T., Matsuda H., Katakuse I. *Anal. Chem.* — **1979**. — 51. — 1329.
241. Harrison W.W., Magee C.W. *Anal. Chem.* — **1974**. — 46. — 461.
242. Harrison W.W., Barschick C.M., Klingler J.A., Ratliff P.H., Mei Y. *Anal. Chem.* — **1990**. — 62. — 943A.
243. Hoffmann V., Kasik M., Robinson P.K., Venzago C. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2005**. — 381. — 173.
244. Веренчиков А.Н., Колосов А.П. *Масс-спектрометрия*. — **2014**. — 11. — 206.
245. Macfarlane R.D., Torgerson D.F. *Science*. — **1976**. — 191. — 920.
246. Sundqvist B., Macfarlane R.D. *Mass Spectrom. Rev.* — **1985**. — 4. — 421.
247. Fackler J.P., McNeal C.J., Pignolet L.H., Winpenny R.E.P. *J. Am. Chem. Soc.* — **1989**. — 111. — 6434.
248. Barber M., Bordoli R.S., Elliott G.J., Sedgwick R.D., Tyler A.N. *Anal. Chem.* — **1982**. — 54. — 645A.
249. Honig R.E. in *Advances in Mass Spectrometry*. Elliott R.M. (Ed.). — Heyden & Son. — London, **1962**. — Vol. 2. — P. 25.
250. Benninghoven A., Jaspers D., Sichtermann W. *Appl. Phys.* — **1976**. — 11. — 35.
251. Benninghoven A., Sichtermann W.K. *Anal. Chem.* — **1978**. — 50. — 1180.
252. Танцырев Г.Д., Николаев Е.Н. *ЖЭТФ*. — **1971**. — 13. — 473.

253. Танцырев Г.Д., Клейменов Н.А. *ДАН СССР*. – **1973**. – 213. – 649.
254. Busch K.L., Unger S.E., Vincze A., Cooks R.G., Keough T. *J. Am. Chem. Soc.* – **1982**. – 104. – 1507.
255. Siuzdak G. *Mass Spectrometry for Biotechnology* Academic Press Inc. – San Diego. – CA, **1996**. – 161 p.
256. Lyon P.A. (Ed.) *Desorption Mass Spectrometry*. – ACS. – Washington D.C., **1985**. – 326 p.
257. Richter K., Nygren H., Malmberg P., Hagenhoff B. *Microsc. Res. Tech.* – **2007**. – 70. – 640.
258. Cheng J., Kozole J., Hengstebeck R., Winograd N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2007**. – 18. – 406.
259. Carado A., Passaralli M.K., Kozole J., Wingate J.E., Winograd N., Loboda A.V. *Anal. Chem.* – **2008**. – 80. – 7921.
260. Boxer S.G., Kraft M.L., Weber P.K. *Annu. Rev. Biophys.* – **2009**. – 38. – 53.
261. Ito Y., Takeuchi I., Ishii D., Goto M. *J. Chromatogr.* – **1985**. – 346. – 161.
262. Pleasance S., Thibault M., Mosely M., Deterding L., Tomer K., Jorgenson J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **1990**. – 1. – 312.
263. Horning E.C., Horning M.G., Carroll D.I., Dzidic I., Stillwell R.N. *Anal. Chem.*, **1973**. – 45. – 936.
264. French J.B., Thomson B.A., Davidson W.R., Reid N.M., Buckley J.A. in *Mass Spectrometry in Environmental Sciences*. Karasek F.W., Hutzinger O., Safe S. (Eds.). – Plenum Press. – New York, **1985**. – P. 101.
265. McEwen C.N., McKay R.G., Larsen B.S. *Anal. Chem.* – **2005**. – 77. – 7826.
266. Cristoni S., Bernardi L.R., Biunno I., Tubaro M., Guidugli G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – **2003**. – 17. – 1973.
267. Cristoni S., Bernardi L.R., Guidugli G., Tubaro M., Traldi P. *J. Mass Spectrom.* – **2005**. – 40. – 1550.
268. Cristoni S., Rubini S., Bernardi L.R. *Mass Spectrom. Rev.* – **2007**. – 26. – 645.
269. Driscoll J.N. *J. Chromatogr.* – **1977**. – 134. – 49.
270. Locke D.C., Dhingra B.S., Baker A.D. *Anal. Chem.* – **1982**. – 54. – 447.
271. Ревельский И.А., Яшин Ю.С., Вознесенский В.Н., Курочкин В.К., Костяновский Р.Г. *Известия АН СССР. – Сер. Химия*. – **1986**. – 9. – 1987.
272. De Wit J.S.M., Jorgenson J.W. *J. Chromatogr.* – **1987**. – 411. – 201.
273. De Wit J.S.M., Jorgenson J.W. *J. Chromatogr.* – **1987**. – 411. – 201.
274. Kauppila T.J., Kuuranne T., Meurer E.C., Eberlin M.N., Kotiaho T., Kostianen R. *Anal. Chem.* – **2002**. – 74. – 5470.
275. Marotta E., Seraglia R., Fabris F., Traldi P. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2003**. – 228. – 841.
276. Kauppila T.J., Kersten H., Benter T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2014**. – 25. – 1870.
277. Mejean M., Giuliani A., Brunelle A., Touboul D. *Eur. J. Mass Spectrom.* – **2014**. – 20. – 403.
278. Marshall A.G. *Proc. Petromass-2014, Tbilisi*. – **2014**. – 11.
279. Raffaelli A., Saba A. *Mass Spectrom. Rev.* – **2003**. – 22. – 318.

280. Dole M., Hines R.L., Mack R.C., Mobley R.C., Ferguson L.D., Alice M.B. *J. Chem. Phys.* — **1968**. — 49. — 2240.
281. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов В.Н., Николаев В.И., Павленко В.А., Шкуров В.А. *Доклады АН СССР*. — **1984**. — 277. — 379.
282. Yamashita M., Fenn M. *J. Phys. Chem.* — **1984**. — 88. — 4451.
283. Yamashita M., Fenn M. *J. Phys. Chem.* — **1984**. — 88. — 4671.
284. Whitehouse C.M., Dreyer R.N., Yamashita M., Fenn J.B. *Anal. Chem.* — **1985**. — 57. — 675.
285. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. *Science*. — **1989**. — 246. — 64.
286. Mora J.F., Van Berkel G.J., Enke C.G., Cole R.B., Martinez-Sanchez M., Fenn J.B. *J. Mass Spectrom.* — **2000**. — 35. — 939.
287. Iribarne J.V., Thomson B.A. *J. Chem. Phys.* — **1976**. — 64. — 2287.
288. Chingin K., Frankevich V., Balabin R.M., Barylyuk K., Chen H., Wang R., Zenobi R. *Angew. Chem., Intern. Ed.* — **2010**. — 49. — 2358
289. Yue X., Vahidi S., Konermann L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 1322.
290. Larriba C., de la Mora J.F., Clemmer D.E. *J. Am. Chem. Soc.* — **2014**. — 25. — 1332.
291. Gaskell S.J. *J. Mass Spectrom.* — **1997**. — 32. — 677.
292. Gamero-Castano M., Fernandes de la Mora J. *J. Mass Spectrom.* — **2000**. — 35. — 790.
293. Kebarle P. *J. Mass Spectrom.* — **2000**. — 35. — 804.
294. Ganguly A.K., Gross M.L. in *Applied electrospray mass spectrometry*. Pramanik B.N. (Ed.). — Marcel Dekker Inc. — **2002**. — 464 p.
295. Cole R.B. (Ed.) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. — Global view publishing, USA, **1997**. — 600 p.
296. Pramanik B.N., Ganguly A.K., Gross M.L. (Eds). *Applied Electrospray Mass Spectrometry*. — CRC Press, **2002**. — 446 p.
297. Rechke B.R., Timperman A.T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2011**. — 22. — 2115.
298. Kebarle P., Verkerk U.H. *Mass Spectrom. Rev.* — **2009**. — 28. — 898.
299. Liigand J., Kruve A., Leito I., Girod M., Antoine R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 1853.
300. Hopfgartner G., Wachs T., Bean K., Henion J. *Anal. Chem.* — **1993**. — 65. — 439.
301. Wilm M.S., Mann M. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — **1994**. — 136. — 167.
302. Schmidt A., Karas M., Dulks T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2003**. — 14. — 492.
303. Chernushevich I.V., Bahr U., Karas M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2004**. — 18. — 2479.
304. Tito M.A., Tars K., Valegard K., Hajdu J., Robinson C.V. *J. Am. Chem.Soc.* — **2000**. — 122. — 3550.
305. Benjamin D.R., Robinson C.V., Hendrick J.P., Hartl F.U., Dobson C.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — **1998**. — 95. — 7391.
306. Uetrecht C., Versluis C., Watts N.R., Wingfield P.T., Steven A.C., Heck A.J.R. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2008**. — 47. — 6247.
307. Fuerstenau S.D., Benner W.H., Thomas J.J., Brigidou C., Bothner B., Siuzdak G. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2001**. — 40. — 541.

308. Pratt S.N., Austin D.E. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 712.
309. Fernandez de la Mora J. *Anal. Chim. Acta.* — **2000**. — 406. — 93.
310. Sterling H.J., Daly M.P., Feld G.K., Thoren K.L., Kintzer A.F., Krantz B.A., Williams E.R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2010**. — 21. — 1762.
311. Yin S., Loo J.A. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2011**. — 300. — 118.
312. Chingin K., Xu N., Chen H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 928.
313. Verkerk U.H., Kebarle P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2005**. — 16. — 1325.
314. Shou W.Z., Naidong W. *J. Chromatogr. B.* — **2005**. — 825. — 186.
315. Karabacak N.M., Tiwari A., Hayward L.J., Hong P., Easterling M.L., Agar J.N. *Mol. Cell. Proteomics.* — **2009**. — 8. — 846.
316. Hirabayashi A., Hirabayashi Y., Sakairi M., Koizumi H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1996**. — 10. — 1703.
317. Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F. *Anal. Chem.* — **1985**. — 57. — 2935.
318. Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — **1987**. — 78. — 53.
319. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1988**. — 2. — 151.
320. Karas M., Hillenkamp F. *Anal. Chem.* — **1988**. — 60. — 2299.
321. Spengler B., Cotter R.S. *Anal. Chem.* — **1990**. — 62. — 793.
322. Hillenkamp F., Berkenkamp S., Leisner A. Proc. 50th ASMS Meeting. — Orlando, FL, **2002**.
323. Dreisewerd K. *Chem. Rev.* — **2003**. — 103. — 395.
324. Trauger S.A., Go E.P., Zhouxin Shen, Apon J.V., Compton B.J., Bouvier E.S.P., Finn M.G., Siuzdak G. *Anal. Chem.* — **2004**. — 76. — 4484.
325. Northen T.R., Yanes O., Northen M.T., Marrinucci D., Uritboonthai W., Apon J., Golledge S.L., Nordstrom A., Siuzdak G. *Nature.* — **2007**. — 449. — 1033.
326. Hillenkamp F., Peter-Katalinic J. (Eds). MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications. — Wiley, **2007**. — 346 p.
327. Huang J.P., Yuan C.H., Shiea J., Chen Y.C. *J. Anal. Toxicol.* — **1999**. — 23. — 337.
328. Li Y.L., Gross M.L., Hsu F.S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2005**. — 16. — 679.
329. Ham B.M., Jacob J.T., Cole R.B. *Anal. Chem.* — **2005**. — 77. — 4439.
330. Cheng H., Sun G., Yang K., Gross R.W., Han X. *J. Lipid. Res.* — **2010**. — 51. — 1599.
331. Fuchs B., Suss R., Shiller J. *Prog. Lipid Res.* — **2010**. — 49. — 450.
332. Han X., Yang K., Gross R.W. *Mass Spectrom. Rev.* — **2012**. — 31. — 134.
333. Rechthaler J., Pittenauer E., Schaub T.M., Allmaier G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2013**. — 24. — 701.
334. Crank J.A., Armstrong D.W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2009**. — 20. — 1790.
335. Cramer R., Pirkel A., Hillenkamp F., Dreisewerd K. *Angew. Chem. — Int. Ed.* — **2013**. — 52. — 2364.
336. Bierstedt A., Stindt A., Warschat C., Panne U., Riedel J. *Eur. J. Mass Spectrom.* — **2014**. — 20. — 367.
337. Cramer R., Haglund R.F., Hillenkamp F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — **1997**. — 169/170. — 51.

338. Preisler J., Hu P., Rejtar T., Karger B.L. *Anal. Chem.* — **2000**. — 72. — 4785.
339. Axelsson J., Hoberg A.M., Waterson C., Myatt P., Shield G.L., Varney J., Haddleton D.M., Derrick P.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1997**. — 11. — 209.
340. Skelton R., Dubois F., Zenobi R. *Anal. Chem.* — **2000**. — 72. — 1707.
341. Gluckmann M., Pfenninger A., Kruger R., Thierolf M., Karas M., Horneffer V., Hillenkamp F., Strupat K. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2001**. — 210/211. — 121.
342. Felton M.J., Harris C.M. *Anal. Chem.* — **2003**. — 75. — 54A.
343. Xu Y., Bruening M.L., Watson J.T. *Mass Spectrom. Rev.* — **2003**. — 22. — 429.
344. Zenobi R., Knochenmuss R. *Mass Spectrom. Rev.* — **1999**. — 17. — 337.
345. Karas M., Gluckmann M., Schafer J. *J. Mass Spectrom.* — **2000**. — 35. — 1.
346. Knochenmuss R., Stortelder A., Breuker K., Zenobi R. *J. Mass Spectrom.* — **2000**. — 35. — 1237.
347. Spengler B., Kirsch D. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2003**. — 226. — 71.
348. Tomalova I., Frankevich V., Zenobi R. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2014**. — 372. — 51.
349. Cai Y., Peng W.P., Kuo S.J., Sabu S., Han C.C., Chang H.C. *Anal. Chem.* — **2002**. — 74. — 4434.
350. Frankevich V., Zhang J., Dashtiev M., Zenobi R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2003**. — 17. — 2343.
351. O'Connor P.B., Costello C.E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2001**. — 15. — 1862.
352. Laiko V.V., Baldwin M.A., Burlingame A.L. *Anal. Chem.* — **2000**. — 72. — 652.
353. Hutchens T.W., Yip T.T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1993**. — 7. — 576.
354. Bruenner B.A., Yip T.T., Hutchens T.W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1996**. — 10. — 1797.
355. Merchant M., Weinberger S.R. *Electrophoresis.* — **2000**. — 21. — 1164.
356. Petruk S., Sedkov Y., Smith S., Tillib S., Kraevski V., Nakamura T., Canaani E., Croce C., Mazo A. *Science.* — **2001**. — 249. — 1331.
357. Sato K., Sasaki K., Tsao M., Yamaguchi K. *Cancer Lett.* — **2002**. — 176. — 199.
358. Ball G., Mian S., Holding F., Allibone R.O., Lowe J., Ali S., Li G., McCardle S., Ellis I.O., Creaser C., Rees R.C. *Bioinformatics.* — **2002**. — 18. — 395.
359. Trimpin S., Inutan E.D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2013**. — 24. — 722.
360. Cohen L.H., Gusev A.I. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2002**. — 373. — 571.
361. Van Kampen J., Burgers P., De Groot R., Gruters R., Luider T. *Mass Spectrom. Rev.* — **2011**. — 30. — 101.
362. Bergman N., Shenchenko D., Bergquist J. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2014**. — 406. — 49.
363. Hercules D.M., Day R.J., Balasanmugam K., Dang T.A., Li C.P. *Anal. Chem.* — **1982**. — 54. — 280A.
364. Zhan Q., Wright S.J., Zenobi R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **1997**. — 8. — 525.
365. Sunner J., Dratz E., Chen Y.C. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 4335.
366. Murray K.K., Boyd R.K., Eberlin M.N., Langley G.J., Li L., Naito Y. *Pure Appl. Chem.* — **2013**. — 85. — 1515.
367. Alimpiev S.S., Nikiforov S.M., Karavanskii V.A., Sunner J. *J. Chem. Phys.* — **2001**. — 115. — 1891.
368. Alimpiev S.S., Grechnikov A.A., Sunner J., Borodkov A.S., Karavanskii V.A., Simanovsky Y.O., Nikiforov S.M. *Anal. Chem.* — **2009**. — 81. — 1255.

369. Гречников А.А., Бородков А.С., Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Симановский Я.О., Караванский В.А. *Масс-спектрометрия*. — **2010**. — 7. — 53.
370. Lewis W.G., Shen Z., Finn M.G., Siuzdak G. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2003**. — 226. — 107.
371. Wei J., Buriak J., Siuzdak G. *Nature*. — **1999**. — 401. — 243.
372. Kruse R.A., Li X.L., Bohn P.W., Sweedler J.V. *Anal. Chem.* — **2001**. — 73. — 3639.
373. Alimpiev S.S., Grechnikov A.A., Sunner J., Karavanskii V.A., Zhabin S., Simanovsky Y.O., Nikiforov S.M. *J. Chem. Phys.* — **2008**. — 128. — 014711.
374. Laiko V.V., Taranenko N.I., Berkout V.D., Musselman B.D., Doroshenko V.M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2002**. — 16. — 1737.
375. Go E.P., Shen Z.X., Harris K., Siuzdak G. *Anal. Chem.* — **2003**. — 75. — 5475.
376. Greving M.P., Patti G.J., Siuzdak G. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 2.
377. Amantonico A., Flamigni L., Glaus R., Zenobi R. *Metabolomics*. — **2009**. — 5. — 346.
378. Lin Y.S., Chen Y.C. *Anal. Chem.* — **2002**. — 74. — 5793.
379. Ho K.C., Lin Y.S., Chen Y.C. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* — **2003**. — 17. — 2683.
380. Chen C.T., Chen Y.C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2004**. — 18. — 1956.
381. Peterson D.S. *Mass Spectrom. Rev.* — **2007**. — 26. — 19.
382. Kailasa S.K., Wu H.F. *Microchim. Acta*. — **2013**. — 180. — 405.
383. Lu T., Olesik S.V. *Anal. Chem.* — **2013**. — 85. — 4384.
384. Niziol J., Rode W., Zielinski Z., Ruman T. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2013**. — 335. — 22.
385. Etxebearria J., Calvo J., Reichardt N.C. *Analyst*. — **2014**. — 139. — 2873.
386. Kim J.I., Park J.M., Hwang S.J., Kang M.J., Pyun J.C. *Anal. Chim. Acta*. — **2014**. — 836. — 53.
387. Abdelhamid H.N., Wu B.S., Wu H.F. *Talanta*. — **2014**. — 126. — 27.
388. Rainer M., Qureshi M., Boon G. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2011**. — 400. — 2281.
389. Kuzema P. *J. Anal. Chem.* — **2011**. — 66. — 1227.
390. Law K., Larkin J. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2011**. — 399. — 2597.
391. Silina Y.E., Volmer D.A. *Analyst*. — **2013**. — 138. — 7053.
392. Kim S., Rogers R.P., Marshall A.G. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2006**. — 251. — 260.
393. Hsu C.S., Hendrickson C.L., Rodgers R.P., McKenna A.M., Marshall A.G. *J. Mass Spectrom.* — **2011**. — 46. — 337.
394. Bristow A.W.T., Webb K.S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2003**. — 14. — 1086.
395. Lawrence E.O., Edelfsen N.E. *Science*. — **1930**. — 72. — 376.
396. Sommer H., Thomas H.A., Hipple J.A. *Phys. Rev.* — **1949**. — 76. — 1877.
397. Marshall A.G., Comisarow M.B., Parisod G. *J. Chem. Phys.* — **1979**. — 71. — 4434.
398. Schweikhard L., Hill N.C., Alber G.M., Marshall A.G. *Proc. 12 Intern. Mass Spectrom. Conf.* — Amsterdam, **1991**. — P. 76.
399. Лободин В.В., Роджерс Р.П., Маршалл А.Дж. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 515.
400. Шмитт-Копплин Ф., Харир М., Тциотис Д., Габелика Д., Херткорн Н. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 547.

401. Laude D.A., Beu S.C. in Experimental mass spectrometry. Russel D.H. (Ed.). – Plenum Press, NY, **1994**. – p. 188.
402. Marshall A.G., Verdun F.R. Fourier Transforms in NMR, optical and mass spectrometry Elsevier. – Netherlands, **1990**. – 450 p.
403. Dienes T., Pastor S.J., Scherch S., Scott J.R., Yao J., Cui S., Wilkins C.L. *Mass Spectrom. Rev.* – **1996**. – 15. – 163.
404. Weickhardt C., Moritz F., Grotemeyer J. *Mass Spectrom. Rev.* – **1996**. – 15. – 139.
405. Marshall A.G., Hendrickson C.L., Jackson G.S. *Mass Spectrom. Rev.* – **1998**. – 17. – 1.
406. Marshall A.G. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2000**. – 200. – 331.
407. Marshall A.G., Rodgers R.P. *Acc. Chem. Res.* – **2004**. – 37. – 53.
408. McKenna A.M., William J.T., Putman J.C., Aeppli C., Reddy C.M., Valentine D.L., Lemkau K.L., Kellermann M.Y., Savory J.J., Kaiser N.K., Marshall A.G., Rogers R.P. *Energy Fuels*. – **2014**. – 28. – 2454.
409. Qi Y., O'Connor P.B. *Mass Spectrom. Rev.* – **2014**. – 33. – 333.
410. Dawson P.H. *Mass Spectrom. Rev.* – **1986**. – 5. – 1.
411. Cooks R.G., Glish G.L., McLuckey S.A., Kaiser R.E. *Chem. Engin. News*. – **1991**. – 69. – 26.
412. Stephens W.E. *Phys. Rev.* – **1946**. – 69. – 691.
413. Cameron A.E., Eggers D.F. *Rev. Sci. Instrum.* – **1948**. – 19. – 605.
414. Wiley M.C., McLaren I.H. *Rev. Sci. Instrum.* – **1955**. – 26. – 1150.
415. Мамырин Б.А., Каратаев В.И., Шмикк Д.В., Загулин В.А. *ЖЭТФ*. – **1973**. – 64. – 82.
416. Хасин Ю.И., Веренчиков А.Н., Гаврик М.А., Явор М.И. *Науч. приборостр.* – **2005**. – 15. – 97.
417. Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Laiko V.V. in Time-of-Flight Mass Spectrometry (Chapter 7), R.J.Cotter (Ed.). – ACS Symposium Series 549. – Washington D.C., **1994**. – 108.
418. Laiko V.V., Dodonov A.F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – **1994**. – 8. – 720.
419. Dawson J.H.J., Guilhaus M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – **1989**. – 3. – 155.
420. Makarov A.A. Mass Spectrometer. *US Pat. 5,886,346*, **1999**.
421. Makarov A.A. *Anal. Chem.* – **2000**. – 72. – 1156.
422. Makarov A., Denisov E., Kholomeev A., Balschun W., Lange O., Strupat K., Hornig S. *Anal. Chem.* – **2006**. – 78. – 2113.
423. Kingdon K.H. *Phys. Rev.* – **1923**. – 21. – 408.
424. Perry R.H., Cooks R.G., Noll R.J. *Mass Spectrom. Rev.* – **2008**. – 27. – 661.
425. Zubarev R.A., Makarov A.A. *Anal. Chem.* – **2013**. – 85. – 5288.
426. Michalski A., Damoc E., Lange O., Denisov E., Nolting D., Mueller M., Viner R., Schwartz J., Remes P., Belford M., Duniyach J.J., Cox J., Hornig S., Mann M., Makarov A. *Mol. Cell. Proteomics*, **2012**, 11, O111.013698.
427. Lange O., Damoc E., Wieghaus A., Makarov A. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2014**. – 369. – 16.
428. Makarov A., Denisov E., Lange O., Hornig S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2006**. – 17. – 977.

429. Rose R.J., Damoc E., Denisov E., Makarov A., Heck A.J.R. *Nature Methods*. – **2012**. – 9. – 1084.
430. Сысоев А.А., Артаев В.Б., Кашеев В.В. Изотопная масс-спектрометрия. – М.: Энегеоатомиздат, **1993**. – С. 58.
431. Busch K.L., Glish G.L., McLuckey S.A. *Mass spectrometry/mass spectrometry. Techniques and applications of tandem mass spectrometry*. – VCH Publishers, Inc. – USA, **1988**. – 333 p.
432. Holmes J.L., Aubry C., Mayer P.M. *Assigning structures to ions in the mass spectrometry*. – NY: CRC Press, **2007**. – 472 p.
433. McLuckey S.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **1992**. – 3. – 509.
434. Mayer P.M., Poon C. *Mass Spectrom. Rev.* – **2009**. – 28. – 608.
435. Aston F.W. *Proc. Cambridge Philos. Soc.* – **1919**. – 19. – 317.
436. Haddon W.K., McLafferty F.W. *J. Am. Chem. Soc.* – **1968**. – 90. – 4745.
437. Jennings K.R. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* – **1968**. – 1. – 227.
438. McLafferty F.W., Bente P.F., Kornfeld F.C., Tsai S.C., Howe I. *J. Am. Chem. Soc.* – **1973**. – 95. – 2120.
439. Guo X., Duursma M.C., Al-Khalili A., Heeren R.M.A. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2003**. – 225. – 71.
440. Bordoli R.S., Bateman R.H. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* – **1992**. – 122. – 243.
441. Kim H.T., Liu J., Anderson S.L. *J. Phys. Chem. A* – **2002**. – 106. – 9798.
442. McLuckey S.A., Cameron D., Cooks R.G. *J. Am. Chem. Soc.* – **1981**. – 103. – 1313.
443. Marzluff E.M., Campbell S., Rodgers M.T., Beauchamp J.L. *J. Am. Chem. Soc.* – **1994**. – 116. – 7787.
444. Casey J., Alhasmi A., Mayer P.M. *Eur. J. Mass Spectrom.* – **2005**. – 11. – 557
445. McLafferty F.W., Todd P.J., McGilvery D.C., Baldwin M.A. *J. Am. Chem. Soc.* – **1980**. – 102. – 3360.
446. Glish G.L., Todd P.J. *Anal. Chem.* – **1982**. – 54. – 842.
447. Lebedev A.T., Bakulev V.A., Hayes R.N., Bowie J.H. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* – **1991**. – 5. – 234.
448. Olsen J.V., Macek B., Lange O., Makarov A., Horning S., Mann M. *Nature methods*. – **2007**. – 4, 9. – 709.
449. Shukla A.K., Futrell J.H., Sen A.D. *J. Chem. Phys.* – **2003**. – 118. – 11217.
450. Cooks R.G., Ast T., Beynon J.H. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* – **1975**. – 16. – 348.
451. Dongre A.R., Samogyi A., Wysocki V.H. *J. Mass Spectrom.* – **1996**. – 31. – 339.
452. Cooks R.G., Ast T., Pradeep T., Wysocki V.H. *Acc. Chem. Res.* – **1994**. – 27. – 316.
453. de Maaijer-Gielbert J., Samogyi A., Wysocki V.H., Kistemaker P.G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* – **1998**. – 174. – 81.
454. Laskin J., E.Denisov, Futrell J. *J. Am. Chem. Soc.* – **2000**. – 122. – 9703.
455. Park J.T., Song K., Hase W.L. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2007**. – 265. – 326.
456. Laskin J., Futrell J.H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2003**. – 14. – 1340.
457. Laskin J., Bailey T.H., Futrell J.H. *J. Am. Chem.Soc.* – **2003**. – 125. – 1625.
458. Meroueh O., Hase W.L. *Phys. Chem. Chem. Phys.* – **2001**. – 3. – 2306.
459. Laskin J., Denisov E., Futrell J.H. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2002**. – 129. – 189.

460. Laskin J. *Eur. J. Mass Spectrom.* — **2004**. — 10. — 259.
461. Grill V., Shen J., Evans C., Cooks R.G. *Rev. Sci. Instr.* — **2001**. — 72. — 3149.
462. Laskin J., Futrell J.H. *Mass Spectrom. Rev.* — **2003**. — 22. — 158.
463. Wysocki V.H., Joyce K.E., Jones C.M., Beardsley R.L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2008**. — 19. — 190.
464. Zubarev R.A., Kelleher N.L., McLafferty F.W. *J. Am. Chem. Soc.* — **1998**. — 120. — 3265.
465. Syka J.E.P., Coon J.J., Schroeder M.J., Shabanowitz J., Hunt D.F. *PNAS*. — **2004**. — 101. — 9528.
466. Samgina T.Yu., Artemenko K.A., Gorshkov V.A., Ogurtsov S.V., Zubarev R.A., Lebedev A.T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2008**. — 22. — 3517.
467. Budnik B.A., Zubarev R.A. *Chem. Phys. Lett.* — **2000**. — 316. — 1, 19.
468. Fung Y.M.E., Kjeldsen F., Silivra O.A., Chan T.W.D., Zubarev R.A. *Angew. Chem., Int. Ed.* — **2005**. — 44. — 6399.
469. Mosely J.A., Smith M.J.P., Prakash A.S., Sims M., Bristow A.W.T. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 4068.
470. Lioe H., O'Hair R.A.J. *Anal. Bional. Chem.* — **2007**. — 389. — 1429.
471. Cord J.R., Horning S.R., Wood J.M., Cooks R.G., Freiser B.S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **1993**. — 4. — 145.
472. Feketeova L., Khairallah G.N., Brunet C., Lemoine J., Antoine R., Degourd P., O'Hair R.A.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2010**. — 24. — 3255.
473. Kalli A., Grigorean G., Hakansson K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2011**. — 22. — 2209.
474. Dunbar R.C. in *Gas Phase Ion Chemistry*. Bowers M. (Ed.). — Academic: New York, **1979**. — Vol. 2. — 359 p.
475. Payne A.H., Glish G.L. *Anal. Chem.* — **2001**. — 73. — 3542.
476. Sleno L., Volmer D.A. *J. Mass Spectrom.* — **2004**. — 39. — 1091.
477. Little D.P., Speir J.P., Senko M.W., O'Connor P.B., McLafferty F.W. *Anal. Chem.* — **1994**. — 66. — 2809.
478. Dodds E.D., Hagerman P.J., Lebrilla C.B. *Anal. Chem.* — **2006**. — 78. — 8506.
479. Dodds E.D., Jerman J.B., Lebrilla C.B. *Anal. Chem.* — **2007**. — 79. — 9547.
480. Ge Y., Horn D.M., McLafferty F.W. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2001**. — 210/211. — 203.
481. Klassen J.S., Schnier P.D., Williams E.R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **1998**. — 9. — 1117.
482. Dunbar R.C. *Mass Spectrom. Rev.* — **2004**. — 23. — 127.
483. Gabryelski W., Li L. *Rev. Sci. Instrum.* — **1999**. — 70. — 4192.
484. Joly L., Antoine R., Broyer M., Dugourd P., Lemoine J. *J. Mass Spectrom.* — **2007**. — 42. — 818.
485. Thompson M.S., Cui W., Reilly J.P. *Angew. Chem., Int. Ed.* — **2004**. — 43. — 4791.
486. Reilly J.P. *Mass Spectrom. Rev.* — **2009**. — 28. — 425.
487. Kalcic C.L., Gunaratne T.C., Jones A.D., Dantus M., Reid G.E. *J. Am. Chem. Soc.* — **2009**. — 131. — 940.
488. Samgina T.Yu., Gorshkov V.A., Artemenko K.A., Kovalev S.V., Ogurtsov S.V., Zubarev R.A., Lebedev A.T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2010**. — 24. — 1749.

489. Lebedev A.T., Damoc E., Makarov A.A., Samgina T.Yu. *Anal. Chem.* — **2014**. — 86. — 7017.
490. Hunt D.F., Bone W.M., Shabanowitz J., Rhodes J., Ballard J.M. *Anal. Chem.* — **1981**. — 53. — 1704.
491. Marshall A.G., Wang T.C.L., Ricca T.L. *J. Am. Chem. Soc.* — **1985**. — 107. — 7893.
492. Gauthier J.W., Trautman R.R., Jacobson D.B. *Anal. Chim. Acta.* — **1991**. — 246. — 211.
493. Brown R.S., Lennon J.J. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67, 21. — 3990.
494. Macht M. *Bioanalysis*. — **2009**. — 1. — 1131.
495. Zhang Q., Tang N., Brock J.W., Mottaz H.M., Ames J.M., Baynes J.W., Smith R.D., Metz T.O. *J. Proteome Res.* — **2007**. — 6. — 2323.
496. Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1991**. — 5. — 198.
497. Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R. *J. Phys. Chem.* — **1992**. — 96. — 9678.
498. Jimenez C.R., ter Maat A., Pieneman A., Burlingame A.L., Smit A.B., Li K.W. *J. Neurochem.* — **2004**. — 89. — 865.
499. Medzihradszky K.F., Campbell J.M., Baldwin M.A., Falick A.M., Juhasz P., Vestal M.L., Burlingame A.L. *Anal. Chem.* — **2000**. — 72. — 552.
500. Suckau D., Resemann A., Schuerenberg M., Hufnagel P., Franzen J., Holle A. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2003**. — 376. — 952.
501. Cotter R.J., Gardner B., Iltchenko S., English R.D. *Anal. Chem.* — **2004**. — 76. — 1976.
502. Chernushevich I.V., Loboda A.V., Thomson B.A. *J. Mass Spectrom.* — **2001**. — 36. — 849.
503. Ekroos K., Chernushevich I.V., Simons K., Shevchenko A. *Anal. Chem.* — **2002**. — 74. — 941.
504. Giles K., Pringle S.D., Worthington K., Bateman R.H. Proc. 51st ASMS Conf. — Montreal, Canada, **2003**.
505. Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Walker S., Widmer M. *Analyst*. — **2011**. — 136. — 1898.
506. Chapman J.D., Goodlett D.R., Masselon C.D. *Mass Spectrom. Rev.* — **2014**. — 33. — 452.
507. Michalski A., Cox J., Mann M. *J. Proteome Res.* — **2011**. — 10. — 1785.
508. Venable J.D., Dong M.Q., Wohlschlegel J., Dillin A., Yates J.R. — *Nature Methods*. — **2004**. — 1. — 39.
509. Purvine S., Eppel J.T., Yi E.C., Goodlett D.R. *Proteomics*. — **2003**. — 3. — 847.
510. Silva J.C., Denny R., Dorshel C.A., Gorenstein M., Kass I.J., Li G.Z., McKenna T., Nold M.J., Richardson K., Young P., Geromanos S. *Anal. Chem.* — **2005**. — 77. — 2187.
511. Silva J.C., Gorenstein M., Li G.Z., Vissers J.P., Geromanos S.J. *Mol. Cell. Proteomics*. — **2006**. — 5. — 144.
512. Geiger T., Cox J., Mann M. *Mol. Cell. Proteomics*. — **2010**. — 9. — 2252.
513. Bond N.J., Shliaha P.V., Lilley K.S., Gatto L. *J. Proteome Res.* — **2013**. — 12. — 2340.
514. Canterbury J.D., Merrihew G.E., MacCoss M.J., Goodlett D.R., Shaffer S.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 2048.
515. Bowie J.H., Blumenthal T. *J. Am. Chem. Soc.* — **1975**. — 97. — 2959.

516. Lehman T.A., Bursey M.M., Hass J.R. *Org. Mass Spectrom.* — **1983**. — 18. — 373.
517. Villeneuve S., Burgers P.C. *Org. Mass Spectrom.* — **1986**. — 21. — 733.
518. Zagorevskii D.V. *Coord. Chem. Rev.* — **2002**. — 225. — 5.
519. Terlouw J.K., Schwarz H. *Angew. Chem, Intern. Ed.* — **1987**. — 26. — 805.
520. Holmes J.L. *Mass Spectrom. Rev.* — **1989**. — 8. — 513.
521. Wesdemiotis C., McLafferty F.W. *Chem. Rev.* — **1987**. — 87. — 485.
522. Schwarz H. *Pure Appl. Chem.* — **1989**. — 61. — 685.
523. Holmes J.L. *Adv. Mass Spectrom.* — **1989**. — 11. — 53.
524. McLafferty F.W. *Science.* — **1990**. — 247. — 925.
525. Shalley C.A., Hornung G., Schroder D., Schwarz H. *Chem. Soc. Rev.* — **1998**. — 27. — 91.
526. Terlow J.K. *Adv. Mass Spectrom.* — **1989**. — 11. — 984.
527. Cordero M.M., Wesdemiotis C. in *Biological Mass Spectrometry: Present and Future*. Matsuo T., Caprioli R.M., Gross M.L., Seyama Y. (Eds.). — New York, Wiley, **1994**. — 119.
528. Burgers P.C., Holmes J.L., Mommers A.A., Terlouw J.K. *Chem. Phys. Lett.* — **1983**. — 102. — 1.
529. Wesdemiotis C., Feng R., Williams E.R., McLafferty F.W. *Org. Mass Spectrom.* — **1986**. — 21. — 689.
530. Terlouw J.K., Burgers P.C., van Baar B.L.M., Weiske T., Schwarz H. *Chimia.* — **1986**. — 40. — 357.
531. Zagorevskii D.V., Holmes J.L. *Organometallics.* — **1992**. — 11. — 3224.
532. Gaillard M.J., de Pinho A.G., Poizat J.C., Remillieux J., Saoudi R. *Phys. Rev.* — **1983**. — A28. — 1267.
533. Gellene G.I., Porter R.F. *J. Chem. Phys.* — **1984**. — 81. — 5570.
534. Gellene G.I., Porter R.F. *High Temp. Sci.* — **1984**. — 17. — 171.
535. Turecek F. *J. Mass Spectrom.* — **1998**. — 33. — 779.
536. Zagorevskii D.V., Holmes J.L. *Mass Spectrom. Rev.* — **1994**. — 13. — 133.
537. Zagorevskii D.V., Holmes J.L. *Mass Spectrom. Rev.* — **1999**. — 18. — 87.
538. Sephton M.A. *Mass Spectrom. Rev.* — **2012**. — 31. — 560.
539. Хмельницький Р.А., Лукашенко И.М., Бродский Е.С. Пиролитическая масс-спектрометрия высокомолекулярных соединений. — М.: Химия, **1980**. — 279 с.
540. Gutteridge C.S., Vallis L., MacFie H.J.H. in *Computer-Assisted Bacterial Systematics*. Goodfellow M., Jones D., Priest F. — London. — Academic Press, **1985**. — 369.
541. Goodacre R., Kell D.B. *Anal. Chim. Acta.* — **1993**. — 279. — 17.
542. Greenwood P.F. *Anal. Appl. Pyrolysis.* — **2011**. — 92. — 426.
543. Boccini P., Traldi P. *J. Mass Spectrom.* — **1998**. — 33. — 1053.
544. al Sandouk-Lincke N.A., Schwarzbauer J., Hartkopf-Froder C., Volk H., Fuentes D., Young M., Littke R. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* — **2014**. — 107. — 211.
545. Gonzales-Perez J.A., Almendros G., de la Rosa J.M., Gonzalez-Vila F.J. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* — **2014**. — 109. — 1.
546. Kronimus A., Schwarzbauer J. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* — **2007**. — 80. — 471.
547. Antic A., Antic M., Kronimus A., Oing K., Schwarzbauer J. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* — **2011**. — 90. — 93.

548. Schwarzbauer J., al Sandouk-Lincke N.A. *Proc. Petromass-2014*. – Tbilisi, **2014**. – 43.
549. Lindiger W., Hansel A., Jordan A. *Int. J. Mass Spectrom.* – **1998**. – 173. – 191.
550. Blake R.S., Monks P.S., Ellis A.M. *Chem. Rev.* – **2009**. – 109. – 861.
551. Mielke L.H., Pratt K.A., Shepson P.B., McLuckey S.A., Wisthaler A., Hansel A. *Anal. Chem.* – **2010**. – 82. – 7952.
552. Cao W., Duan Y. *Crit. Rev. Anal. Chem.* – **2007**. – 37. – 3.
553. Brilli F., Ruuksanen T.M., Schnitzhofer R., Muller M., Breitenlechner M., Bittner V., Wohlfahrt G., Loreto F., Hansel A. *PLoS One*. – **2011**. – 6. – e20419.
554. Zhan X., Duan J., Duan Y. *Mass Spectrom. Rev.* – **2013**. – 32. – 143.
555. Hansel A., Jordan A., Holzinger R., Prazeller P., Vogel W., Lindiger W. *Int. J. Mass Spectrom.* – **1995**. – 149. – 609.
556. Hunter E., Lias S. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. – **1998**. – 27. – 413.
557. Goebbert D.J., Wenthold P.G. *Eur. J. Mass Spectrom.* – **2004**. – 10. – 837.
558. Jordan A., Haidacher S., Hanel G., Hartungen E., Mark L., Seehauser H., Schottkowsky R., Sulzer P., Mark T.D. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2009**. – 286. – 122.
559. Warneke C., van der Veen C., Luxembourg S., de Gouw J.A., Kok A. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2001**. – 207. – 167.
560. Keck L., Hoeschen C., Oeh U. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2008**. – 270. – 156.
561. Wyche K.P., Blake R.S., Willis K.A., Monks P.S., Ellis A.M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – **2005**. – 19. – 3356.
562. Jordan A., Haldacher S., Hanel G., Hartungen E., Herbig J., Mark L., Schottkowsky R., Seehauser H., Sulzer P., Mark T.D. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2009**. – 286. – 32.
563. Sulzer P., Etbauer A., Hartungen E., Jurschik S., Jordan A., Hanel G., Feil S., Jaksch S., Mark L., Mark T.D. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2012**. – 321–322. – 66.
564. Shen C., Niu W., Huang C., Xia L., Lu Y., Wang S., Wang H., Jiang H., Chu Y. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2014**. – 371. – 36.
565. Liang C-W., Lee Y.T., Chen C-H., Wang Y-S. *Int. J. Mass Spectrom.* – **2010**. – 291. – 61.
566. Adams N.G., Smith D. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics*. – **1976**. – 21. – 349.
567. Smith D., Adams N.G. *Topics Curr.Chem.* – **1980**. – 89. – 1.
568. Smith D., Spanel P. *Acc. Chem. Res.* – **1992**. – 25. – 414.
569. Spanel P., Smith D. *Mass Spectrom. Rev.* – **2011**. – 30. – 236.
570. Smith D., Adams N.G. *Adv. Atom. Mol. Phys.* – **1987**. – 24. – 1.
571. Boshier P.R., Marczin N., Hanna G.B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2010**. – 21. – 1070.
572. Spanel P., Smith D. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* – **1997**. – 167. – 375.
573. Smith D., Spanel P. *Analyst*. – **2007**. – 132. – 390.
574. Boshier P.R., Cushnir J.R., Mistry V., Knaggs A., Spanel P., Smith D., Hanna G.B. *Analyst*. – **2011**. – 136. – 3233.
575. Storer M., Dummer J., Sturney S., Epton M. *Curr. Anal. Chem.* – **2013**. – 9. – 576.
576. Clough T.J., Sherlock R.R., Mautner M.N., Milligan D.B., Wilson P.F., Freeman C.G., McEwan M.J. *Austr. J. Soil. Res.* – **2003**. – 41. – 421.
577. O’Hair R.A.J. *Intern. J. Mass Spectrom.* – **2015**, in press.
578. Smith D., Spanel P. *Mass Spectrom. Rev.* – **2005**. – 24. – 661.

579. Cohen M.J., Karasek F.W. *J. Chromatogr. Sci.* — **1970**. — 8. — 330.
580. Raneko Y., Megill M.R., Hasted J.B. *J. Chem. Phys.* — **1966**. — 45. — 3741.
581. Kanu A.B., Dwivedi P., Tam M., Matz L., Hill Jr H.H. *J. Mass Spectrom.* — **2008**. — 43. — 1.
582. Adamov A., Mauriala T., Teplov V., Laakia J., Schack Pederson C., Kotiaho T., Sysoev A.A. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2010**. — 298. — 24.
583. Tang K., Shvartsburg A.A., Lee Hak-No, Prior D.C., Buschbach M.A., Li F., Tolmachev A.V., Anderson G.A., Smith R.D. *Anal. Chem.* — **2005**. — 77. — 3330.
584. Revercomb H.W., Mason E.A. *Anal. Chem.* — **1975**. — 47. — 970.
585. von Helden G., Hsu M.-T., Kemper P.R., Bowers M.T. *J. Chem. Phys.* — **1991**. — 93. — 3835.
586. Hunter J.M., Fue J.L., Roscamp E.J., Jarrold M.F. *J. Phys. Chem.* — **1994**. — 98. — 1810.
587. Clemmer D.E., Jarrold M.F. *J. Mass Spectrom.* — **1997**. — 32. — 577.
588. Sysoev A.A., Chernyshev D.M., Poteshin S.S., Karpov A.V., Fomin O.I. *Anal. Chem.* — **2013**. — 85. — 9003.
589. Laphorn C., Pullen F., Chowdhry B.Z. *Mass Spectrom. Rev.* — **2013**. — 32. — 43.
590. Hill H.H., Siems W.F., St.Louis R.H., McMinn D.G. *Anal. Chem.* — **1990**. — 62. — 1201A.
591. Chen Y.H., Hill H.H., Wittmer D.P. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — **1996**. — 154. — 1.
592. Hagen D.F. *Anal. Chem.* — **1979**. — 51. — 870.
593. Sysoev A.A., Poteshin S.S., Chernyshev D.M., Karpov A.V., Tuzkov Y.B., Kyzmin V.V. *Eur. J. Mass Spectrom.* — **2014**. — 20. — 185.
594. Буряков И.А., Крылов Е.В., Макасы А.Л., Назаров Э.Г., Первухин В.В., Расулев У.Х. *Письма в ЖТФ*. — **1991**. — 17. — 60.
595. Shvartsburg A.A., Smith R.D. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 23.
596. Shvartsburg A.A., Li F., Tang K., Smith R.D. *Anal. Chem.* — **2006**. — 78. — 3706.
597. Giles K., Pringle S.D., Worthington K.R., Little D., Wildgoose J.L., Bateman R.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2004**. — 18. — 2401.
598. Pringle S.D., Giles K., Wildgoose J.L., Williams J.P., Slade S.E., Thalassinou K., Bateman R.H., Bowers M.T., Scrivens J.H. *Intern. J. Mass Spectrom.* — **2007**. — 261. — 1.
599. Fernandez-Lima F.A., Kaplan D.A., Park M.A. *Rev. Sci. Instruments.* — **2011**. — 82. — 126106-1.
600. Hernandez D.R., DeBord J.D., Ridgeway M.E., Kaplan D.A., Park M.A., Fernandez-Lima F. *Analyst.* — **2014**. — 139. — 1913.
601. Vidal-de-Miguel G., Macia M., Cuevas J. *Anal. Chem.* — **2012**. — 84. — 7831.
602. Vidal-de-Miguel G., Macia M., Cuevas J. Proc. 19th IMSC, 15–21 September 2012, Kyoto, Japan.
603. Glaskin R.S., Valentine S.J., Clemmer D.E. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 8266.
604. Tang K., Li F., Shvartsburg A.A., Strittmatter E.F., Smith R.D. *Anal. Chem.* — **2005**. — 77. — 6381.
605. Takats Z., Wiseman J.M., Gologan B., Cooks R.G. *Science.* — **2004**. — 306. — 471.

606. Cody R.B., Laramée J.A., Durst H.D. *Anal. Chem.* — **2005**. — 77. — 2297.
607. Badu-Tawiah A.K., Eberlin L.S., Ouyang Z., Cooks R.G. *Annu. Rev. Phys.Chem.* — **2013**. — 64. — 481.
608. Cooks R.G., Ouyang Z., Takats Z., Wiseman J.M. *Science*. — **2006**. — 311. — 1566.
609. Cotte-Rodriguez I., Mulligan C.C., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2007**. — 79. — 7069.
610. Garimella S., Xu W., Huang G., Harper J.D., Cooks R.G., Ouyang Z. *J. Mass Spectrom.* — **2012**. — 47. — 20.
611. Wiley J.S., Shelley J.T., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2013**. — 85. — 6545.
612. Chen C.H., Lin Z., Garimella S., Zheng L., Shi R., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2013**. — 85. — 11843.
613. Schafer K.C., Denes J., Albrecht K., Szaniszlo T., Balog J., Skoumal R., Katona M., Toth M., Balogh L., Takats Z. *Angew. Chem. Int.Ed.* — **2009**. — 48. — 8240.
614. Lebedev A.T. *Annu. Rev. Anal. Chem.* — **2013**. — 6. — 163.
615. Venter A., Neflieu M., Cooks R.G. *Trends Anal. Chem.* — **2008**. — 27. — 284.
616. Van Berkel G.J., Pasilis S.P., Ovchinnikova O. *J. Mass Spectrom.* — **2008**. — 43. — 1161.
617. Harris G.A., Nyadong L., Fernandez F.M. *Analyst*. — **2008**. — 133. — 1297.
618. Manicke N.E., Wiseman J.M., Ifa D.R., Cooks R.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2008**. — 19. — 531.
619. Chen H., Gamez G., Zenobi R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2009**. — 20. — 1947.
620. Ifa D.R., Jackson A.U., Paglia G., Cooks R.G. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2009**. — 394. — 1995.
621. Ifa D.R., Wu C., Ouyang Z., Cooks R.G. *Analyst*. — **2010**. — 135. — 669.
622. Chen H-W., Hu B., Zhang X. *Chin. J. Anal. Chem.* — **2010**. — 38. — 1069.
623. Weston D.J. *Analyst*. — **2010**. — 135. — 661.
624. Huang M.Z., Cheng S.C., Cho Y.T., Shiea J. *Anal. Chim. Acta*. — **2011**. — 702. — 1.
625. Чернецова Е.С., Морлок Г.Е., Ревельский И.А. *Успехи химии*. — **2011**. — 80. — 249.
626. Альберичи Р.М., Симас Р.С., Эберлин М.Н. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 198.
627. Harris G.A., Galhena A.S., Fernandez F.M. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 4508.
628. Paine M.R.L., Baker P.J., Blanksby S.J. *Anal. Chim. Acta*. — **2014**. — 808. — 70.
629. Лебедев А.Т. *Успехи химии*. — **2015**. — 84. — 665.
630. Green F.M., Salter T.L., Gilmore I.S., Stokes P., O'Connor G. *Analyst*. — **2010**. — 135. — 731.
631. Badu-Tawiah A.K., Bland C., Campbell D.I., Cooks R.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2010**. — 21. — 572.
632. Eberlin L.S., Ferreira C.R., Dill A.L., Ifa D.R., Cheng L., Cooks R.G. *Chem. Bio-Chem.* — **2011**. — 12. — 2129.
633. Badu-Tawiah A.K., Cooks R.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2010**. — 21. — 1423.
634. Jackson A.U., Shum T., Sokol E., Dill A., Cooks R.G. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2011**. — 399. — 367.

635. Venter A., Sojka P.E., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2006**. — 78. — 8549.
636. Eberlin L.S., Dill A.L., Golby A.J., Ligon K.L., Wiseman J.M., Cooks R.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2010**. — 49. — 5953.
637. Campbell D.I., Ferreira C.R., Eberlin L.S., Cooks R.G. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2012**. — 404. — 389.
638. Wang H., So P.K., Yao Z.P. *Anal. Chim. Acta.* — **2014**. — 809. — 109.
639. Williams J.P., Scrivens J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2005**. — 19. — 3643.
640. Liu Y., Miao Z., Lakshmann R., Loo R.R.O., Loo J.A., Chen H. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2012**. — 325/327. — 161.
641. Zhang Y., Yuan Z., Dewald H.D., Chen H. *Chem. Commun.* — **2011**. — 47. — 4171.
642. Cai Y., Adams D., Chen H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 286.
643. Cai Y., Liu Y., Helmy R., Chen H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 1820.
644. Roach P.J., Laskin J., Laskin A. *Analyst.* — **2010**. — 135. — 2233.
645. Laskin J., Heath B.S., Roach P.J., Cazares L., Semmes O.J. *Anal. Chem.* — **2012**. — 84. — 141.
646. Laskin J., Eckert P.A., Roach P.J., Heath B.S., Nizkorodov S.A., Laskin A. *Anal. Chem.* — **2012**. — 84. — 7179.
647. Liu P., Lanekoff I.T., Laskin J., Dewald H.D., Chen H. *Anal. Chem.* — **2012**. — 84. — 5737.
648. Eckert P., Roach P.J., Laskin A., Laskin J. *Anal. Chem.* — **2012**. — 84. — 1517.
649. Hsieh C.H., Chang C.H., Urban P.L., Chen Y.C. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 2866.
650. Haddad R., Sparrapan R., Eberlin M.N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2006**. — 20. — 2901.
651. Haddad R., Sparrapan R., Kotiaho T., Eberlin M.N. *Anal. Chem.* — **2008**. — 80. — 898.
652. Santos V.G., Regiani T., Dias F.F.G., Romao W., Klitzke C.F., Coelho F., Eberlin M.N. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 1375.
653. Eberlin L.S., Abdelnur P.V., Passero A., de Sa G.F., Daroda R.J., De Souza V., Eberlin M.N. *Analyst.* — **2009**. — 134. — 1652.
654. Porcari A.M., Schwab N.V., Alberici R.M., Cabral E.C., de Moraes D.R., Montanher P.F., Ferreira C.R., Eberlin M.N., Visentainer J.V. *Anal. Methods.* — **2012**. — 4. — 3551.
655. Porcari A.M., Fernandes G.D., Belaz K.R.A., Schwab N.V., Santos V.G., Alberici R.M., Gromova V.A., Eberlin M.N., Lebedev A.T., Tata A. *Anal. Methods.* — **2014**. — 6. — 2436.
656. Cabral E.C., Simas R.C., Santos V.G., Queiroga C.L., da Cunha V.S., de Sa G.F., Daroda R.J., Eberlin M.N. *J. Mass Spectrom.* — **2012**. — 47. — 1.
657. Schwab N.V., Porcari A.M., Coelho M.B., Schmidt E.M., Jara J.L., Visentainer J.V., Eberlin M.N. *Analyst.* — **2012**. — 137. — 2537.
658. Chen H., Venter A., Cooks R.G. *Chem. Commun.* — **2006**. — 19. — 2042.
659. Chen H., Wortmann A., Zhang W., Zenobi R. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2007**. — 46. — 580.
660. Chen H., Wortmann A., Zenobi R. *J. Mass Spectrom.* — **2007**. — 42. — 1123.
661. Williams J.P., Scrivens J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2008**. — 22. — 187.

662. Chen H., Sun Y., Wortmann A., Gu H., Zenobi R. *Anal. Chem.* — **2007**. — 79. — 1447.
663. Zhu L., Gamez G., Chen H.W., Huang H.X., Chingin K., Zenobi R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2008**. — 22. — 2993.
664. McCullough B.J., Bristow T., O'Connor G., Hopley C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2011**. — 25. — 1445.
665. Wang H., Liu J., Cooks R.G., Ouyang Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2010**. — 49. — 877.
666. Liu J., Wang H., Manicke N.E., Lin J.M., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 2463.
667. Manicke N.E., Abu-Rabie P., Spooner N., Ouyang Z., Cooks R.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2011**. — 22. — 1501.
668. Zhang Z., Xu W., Manicke N.E., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2012**. — 84. — 931.
669. Li A.Y., Wang H., Ouyang Z., Cooks R.G. *Chem. Commun.* — **2011**. — 47. — 2811.
670. Espy R.D., Muliadi A.R., Ouyang Z., Cooks R.G. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2012**. — 325–327. — 167.
671. Yang Q., Wang H., Maas J.D., Chappell W.J., Manicke N.E., Cooks R.G., Ouyang Z. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2012**. — 312. — 201.
672. Ren Y., Liu J., Li L., McLuckey M.N., Ouyang Z. *Anal. Methods.* — **2013**. — 5. — 6686.
673. Zhang Z., Cooks R.G., Ouyang Z. *Analyst.* — **2012**. — 137. — 2556.
674. Soparawalla S., Tadjimukhamedov F.K., Wiley J.S., Ouyang Z., Cooks R.G. *Analyst.* — **2011**. — 136. — 4392.
675. Liu J., Wang H., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 7608.
676. Zhang J.I., Li X., Ouyang Z., Cooks R.G. *Analyst.* — **2012**. — 137. — 3091.
677. Tadjimukhamedov F.K., Huang G., Ouyang Z., Cooks R.G. *Analyst.* — **2012**. — 137. — 1082.
678. Malaj N., Ouyang Z., Sindona G., Cooks R.G. *Anal. Methods.* — **2012**. — 4. — 1913.
679. Hiraoka K., Nishidate K., Mori K., Asakawa D., Suzuki S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2007**. — 21. — 3139.
680. Rahman M.O., Mandal M.K., Shida Y., Ninomiya S., Chen L.C., Nonami H., Hiraoka K. *J. Mass Spectrom.* — **2013**. — 48. — 823.
681. Hu B., So P.K., Chen H.W., Yao Z.P. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 8201.
682. Kerian K.S., Jarmusch A.K., Cooks R.G. *Analyst.* — **2014**. — 139. — 2714.
683. Pirro V., Jarmusch A.K., Vincenti M., Cooks R.G. *Anal. Chim. Acta.* — **2015**. — 861. — 47.
684. Chan G.C.Y., Shelley J.T., Wiley J.S., Engelhard C., Jackson A.U., Cooks R.G., Hieftje G.M. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 3675.
685. Deloche R., Monchicourt P., Cheret M., Lambert F. *Phys. Rev. A.* — **1976**. — 13. — 1140.
686. Stevefelt J., Pouvesle J.M., Bouchoule A. *J. Chem. Phys.* — **1982**. — 76. — 4006.
687. Cody R.B. *Anal. Chem.* — **2009**. — 81. — 1101.
688. Beissmann S., Buchberger W., Hertsens R., Klampfl C.W. *J. Chromatogr. A.* — **2011**. — 1218. — 5180.
689. Perucci C., Diffendal J., Kaufman D., Mekonnen B., Terefenko G., Musselman B. *Anal. Chem.* — **2007**. — 79. — 5064.

690. Eberherr W., Buchberger W., Herstens R., Klampfl C.W. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 5792.
691. Keelor J.D., Dwivedi P., Fernandez F.M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 1538.
692. Harper J.D., Charipar N.A., Mulligan C.C., Zhang X., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2008**. — 80. — 9097.
693. Zhang J.I., Tao W.A., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 4738.
694. Jackson A.U., Garcia-Reyes J.F., Harper J.D., Wiley J.S., Molina-Díaz A., Ouyang Z., Cooks R.G. *Analyst.* — **2010**. — 135. — 927.
695. Garcia-Reyes J.F., Harper J.D., Salazar G.A., Charipar N.A., Ouyang Z., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 1084.
696. Wiley J.S., Garcia-Reyes J.F., Harper J.D., Charipar N.A., Ouyang Z., Cooks R.G. *Analyst.* — **2010**. — 135. — 971.
697. Garcia-Reyes J.F., F.Mazzotti, Harper J.D., Charipar N.A., Oradu S., Ouyang Z., Sindona G., Cooks R.G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2009**. — 23. — 3057.
698. Takats Z., Cotte-Rodriguez I., Talaty N., Chen H., Cooks R.G. *Chem. Commun.* — **2005**. — 1950.
699. Williams J.P., Patel V.J., Holland R., Scrivens J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2006**. — 20. — 2901.
700. Chen H., Zheng J., Zhang X., Luo M., Wang Z., Qiao X. *J. Mass Spectrom.* — **2007**. — 42. — 1045.
701. Chen H., Ouyang Z., Cooks R.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2006**. — 45. — 3656.
702. Balog J., Szaniszló T., Schaefer K.C., Denes J., Lopata A., Godorhazy L., Szalay D., Balog L., Sasi-Szabo L., Toth M., Takats Z. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 7343.
703. Ng K-M., Tang H-W., Man S-H., Mak P-Y., Choi Y-C., Wong M.Y-M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 1515.
704. Van Breemen R.B., Snow M., Cotter R.J. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — **1983**. — 49. — 35.
705. Brady J.J., Judge E.J., Levis R.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2009**. — 23. — 3151.
706. Shiea J., Huang M.Z., Hsu H.J., Lee C.Y., Yuan C.H., Beech I., Sunner J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2005**. — 19. — 3701.
707. Huang M.Z., Jhang S.S., Cheng C.N., Cheng S.C., Shiea J. *Analyst.* — **2010**. — 135. — 759.
708. Weinkauff R., Aicher P., Wesley G., Grotemeyer J., Schlag E.W. *J. Phys. Chem.* — **1994**. — 98. — 8381.
709. Coello Y., Jones A.D., Cunaratne T.C., Dantus M. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 2753.
710. Judge E.J., Brady J.J., Dalton D., Levis R.J. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 3231.
711. Flanigan IV P.M., Shi F., Perez J.J., Karki S., Pfeiffer C., Schafmeister C., Levis R.J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 1572.
712. Nemes P., Vertes A. *Anal. Chem.* — **2007**. — 79. — 8098.
713. Nemes P., Woods A.S., Vertes A. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 982.
714. Nemes P., Barton A.A., Vertes A. *Anal. Chem.* — **2009**. — 81. — 6668.

715. Sampson J.S., Hawkrigde A.M., Muddiman D.C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2006**. — 17. — 1712.
716. Sampson J.S., Muddiman D.C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2009**. — 23. — 1989.
717. Ren X., Liu J., Zhang C., Luo H. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* — **2013**. — 27. — 613.
718. Sheehan E.W., Willoughby R.C. US Patent 7060976, 13.06.2006.
719. Trimpin S., Inutan E.D., Herath T.N., McEwen C.N. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 11.
720. Trimpin S., Inutan E.D., Herath T.N., McEwen C.N. *Mol. Cell. Proteomics.* — **2010**. — 9. — 362.
721. McEwen C.N., Larsen B.S., Trimpin S. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 4998.
722. McEwen C.N., Pagnotti V.S., Inutan E.D., Trimpin S. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 9164.
723. Wang B., Lietz C.B., Inutan E.D., Leach S.M., Trimpin S. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 4076.
724. Pagnotti V.S., Chubatyi N.D., McEwen C.N. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 3981.
725. Manicke N.E., Yang Q.A., Wang H., Oradu S., Ouyang Z., Cooks R.G. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2011**. — 300. — 123.
726. Liu J., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2013**. — 85. — 5632.
727. Huang M.Z., Yuan C.H., Cheng S.C., Cho Y.T., Shiea J. *Annu. Rev. Anal. Chem.* — **2010**. — 3. — 43.
728. Такач З. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 223.
729. Lebedev A.T. *Mass Spectrom. Rev.* — **1992**. — 10. — 91.
730. Лободин В.В., Лебедев А.Т. *Масс-спектрометрия*. — **2005**. — 2. — 91.
731. Muller T., Badu-Tawiah A., Cooks R.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2012**. — 51. — 11832.
732. Nyadong L., Hohenstein E.G., Johnson K., Sherrill C.D., Green M.D., Fernandez F.M. *Analyst.* — **2008**. — 133. — 1513.
733. Bag S., Hendricks P.I., Reynolds J.C., Cooks R.G. *Anal. Chim. Acta.* — **2015**. — 860. — 37.
734. Badu-Tawiah A.K., Campbell I.D., Cooks R.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2012**. — 23. — 1077.
735. Dwars T., Paetzold E., Oehme G. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2005**. — 44. — 7174.
736. Girod M., Moyano E., Campbell D.I., Cooks R.G. *Chem. Sci.* — **2011**. — 2. — 501.
737. Espy R.D., Wlekinski M., Yan X., Cooks R.G. *Trends Anal. Chem.* — **2014**. — 57. — 135.
738. Bohme D.K., Raksit A.B. *J. Am. Chem. Soc.* — **1984**. — 106. — 3447.
739. Ablyazov P.N., Vasilevskaya V.V., Khokhlov A.R. *Colloid J.* — **2007**. — 69. — 265.
740. Badu-Tawiah A.C., Wu, C. Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 2648.
741. Perry R.H., Splendore M., Chien A., Davis N.K., Zare R.N. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2011**. — 50. — 250.
742. Cotte-Rodriguez I., Takats Z., Talaty N., Chen H.W., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2005**. — 77. — 6755.
743. Yan X., Augusti R., Li X., Cooks R.G. *ChemPlusChem.* — **2013**. — 78. — 1142.
744. Chen H., Eberlin L.S., Neftliu M., Augusti R., Cooks R.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2008**. — 47. — 3422.

745. Li G., Li X., Ouyang Z., Cooks R.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2013**. — 52. — 1040.
746. Franchetti V., Solka B.H., Baitinger W.E., Amy J.W., Cooks R.G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* — **1977**. — 23. — 29.
747. Miller S.A., Luo H., Pachuta S.J., Cooks R.G. *Science*. — **1997**. — 275. — 1447.
748. Ouyang Z., Takats Z., Blake T.A., Cologan B., Guymon A.J., Wiseman J.M., Oliver J.C., Davidson V.J., Cooks R.G. *Science*. — **2003**. — 301. — 1351.
749. Volny M., Elam W.T., Branca A., Ratner B.D., Turecek F. *Anal. Chem.* — **2005**. — 77. — 4890.
750. Badu-Tawiah A.K., Li A., Jjunju F.P.M., Cooks R.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2012**. — 51. — 9417.
751. Badu-Tawiah A.K., Cyriac J., Cooks R.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2012**. — 23. — 842.
752. Roithova J., Schroder D. *Chem. Rev.* — **2010**. — 110. — 1170.
753. Huang C., Chen H., Zhang X., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2007**. — 79. — 8327.
754. Kaiser R.E., Cooks R.G., Moss J., Hemberger P.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1989**. — 3. — 50.
755. Puliam C.J., Bain R.M., Wiley J.S., Ouyang Z., Cooks R.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2015**. — 26. — 224.
756. Gao L., L.Sugiarto L., Harper J.D., Cooks R.G., Zheng O.Y. *Anal. Chem.* — **2008**. — 80. — 7198.
757. Janfelt C., Frandsen H., Lauritsen F.R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2006**. — 20. — 1441.
758. Smith J.N., Keil A., Likens J., Noll R.J., Cooks R.G. *Analyst*. — **2010**. — 135. — 994.
759. Smith J.N., Noll R.J., Cooks R.G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2011**. — 25. — 1437.
760. Meurer E.C., Tomazela D.M., Silva R.C., Augusto F., Eberlin M.N. *Anal. Chem.* — **2002**. — 74. — 5688.
761. Gao L., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2008**. — 80. — 4026.
762. Jjunju F.P.M., Maher S., Li A., Badu-Tawiah A.K., Taylor S., Cooks R.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2015**. — 26. — 271.
763. Sanders N.L., Kothari S., Huang G., Salazar G., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 5313.
764. Li L., Chen T-C., Ren Y., Hendricks P.I., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2014**. — 86. — 2909.
765. Dalgleish J.K., Hou K., Ouyang Z., Cooks R.G. *Anal. Lett.* — **2012**. — 45. — 1440.
766. Sokol E., Noll R.J., Cooks R.G., Beegle L.W., Kim H.I., Kanik I. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2011**. — 306. — 187.
767. Hou K., Xu W., Xu J., Cooks R.G., Ouyang Z. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 1857.
768. Hendricks P.I., Dalgleish J.K., Shelley J.T., Kirleis M.A., VcNicholas M.T., Li L., Chen T-C., Chen C-H., Duncan J.S., Boudreau F., Noll R.J., Denton J.P., Roach T.A., Ouyang Z., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2014**. — 86. — 2900.

769. Chen C-H., Chen T-C., Zhou X., Kline-Dchoder R., Sorensen P., Cooks R.G., Ouyang Z. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2015**. — 26. — 240.
770. Bristow T.W.T., Ray A.D., O’Kearney-McMullan A., Lim L., McCullough B., Zammataro A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 1794.
771. Malcolm A., Wright S., Syms R.R.A., Moseley R.W., O’Prey S., Dash N., Pegus A., Crichton E., Hong G., Holmes A.S., Finlay A., Edwards P., Hamilton S.E., Welch C.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2011**. — 25. — 3281.
772. Browne D.L., Wright S., Deadman B.J., Dunnage S., Baxendale I.R., Turner R.M., Ley S.V. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2012**. — 26. — 1999.
773. Becker J.S., Matusch A., Wu B. *Anal. Chim. Acta.* — **2014**. — 835. — 1.
774. Lanni E.J., Rubakhin S.S., Sweedler J.V. *J. Proteome.* — **2012**. — 75. — 5036.
775. Lanni E.J., Dunham S.J.B., Nemes P., Rubakhin S.S., Sweedler J.V. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 1897.
776. Heeren R.M.A., Smith D.F., Stauber J., Kukrer-Kaletas B., MacAleese L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2009**. — 20. — 1006.
777. Dill A.L., Eberlin L.S., Ifa D.R., Cooks R.G. *Chem. Commun.* — **2011**. — 47. — 2741.
778. Шпенглер Б. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 568.
779. Wucher A., Cheng J., Winograd V. *Anal. Chem.* — **2007**. — 79. — 5529.
780. Seeley E.H., Caprioli R.M. *Anal. Chem.* — **2012**. — 84. — 2105.
781. McDonnell L.A., Heeren R.M.A. *Mass Spectrom. Rev.* — **2007**. — 26. — 606.
782. Vidova V., Volny M., Lemr K., Havlichek B. *Coll. Czech Chem. Commun.* — **2009**. — 74. — 1101.
783. Chughtai K., Heeren R.M.A. *Chem. Rev.* — **2010**. — 110. — 3237.
784. Vickerman J.C. *Analyst.* — **2011**. — 136. — 2199.
785. Wu C., Dill A.L., Eberlin L.S., Cooks R.G., Ifa D.R. *Mass Spectrom. Rev.* — **2013**. — 32. — 218.
786. Hillenkamp F., Unsold E., Kaufmann R., Nitsche R. *Nature.* — **1975**. — 256. — 119.
787. Seeley E.H., Caprioli R.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — **2008**. — 105. — 18126.
788. Ifa D.R., Manicke N.E., Dill A.L., Cooks R.G. *Science.* — **2008**. — 321. — 805..
789. Wu C., Ifa D.R., Manicke N.E., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2009**. — 81. — 7618
790. Eberlin L.S., Ifa D.R., Wu C., Cooks R.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* — **2010**. — 49. — 873.
791. Eberlin L.S., Liu X., Ferreira C.R., Santagata S., Agar N.Y.R., Cooks R.G. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 8366.
792. Ovchinnikova O.S., Kertesz V., Van Berkel G.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2011**. — 25. — 3735.
793. Mandal M.K., Chen L.C., Hiraoka K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2011**. — 22. — 1493.
794. Bennett R.V., Morzan E.M., Huckaby J.O., Monge M.E., Christensen H.I., Fernandez F.M. *Analyst.* — **2014**. — 139. — 2658.
795. Solon E.G., Schweitzer A., Stoeckli M., Prideaux B. *AAPS J.* — **2010**. — 12. — 11.
796. Ozanne G.M., Young W.G., Mazzei W.J., Severinghaus J.M. *Anesthesiology.* — **1981**. — 55. — 62.

797. Tang H., Sun H., Xie L., Tang Q., Gong Y., Mao Y., Xie Q., Zheng M., Wang D., Zhu H., Zhu J., Feng X., Yao Z., Chen X., Zhou L. *Chin. J. Cancer Res.* — **2013**. — 25. — 339.
798. Kettenbach J., Kacher D.F., Koskinen S.K., Silverman S.G., Nabavi A., Gering D., Tempany C.M., Schwartz R.B., Kikinis R., Black P.M., Jolesz F.A. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* — **2000**. — 2. — 661.
799. Calligaris D., Norton I., Feldman D.R., Ide J.L., Dunn I.F., Eberlin L.S., Cooks R.G., Jolesz F.A., Golby A.J., Santagata S., Agar N.Y. *J. Mass Spectrom.* — **2013**. — 48. — 1178.
800. Stoeckli M., Chaurand P., Hallahan D.E., Caprioli R.M. *Nat. Med.* — **2001**. — 7. — 493.
801. Thomas A., Patterson N.H., Marcinkiewicz M.M., Lazaris A., Metrakos P., Chaurand P. *Anal. Chem.* — **2013**. — 85. — 2860.
802. Fenyo D., Beavis R.C. *Mass Spectrom. Rev.* — **2008**. — 27. — 1.
803. Porter Q.N. *Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds* John Wiley & Sons. — USA, **1985**. — 966 p.
804. Hiraoka K., Kebarle P. *J. Am. Chem. Soc.* — **1976**. — 98. — 6119.
805. Hunt D.F., Harvey T.M. *Anal. Chem.* — **1975**. — 47. — 1965.
806. Dommes V., Wirtz-Peitz F., Kunau W.H. *J. Chromatogr. Sci.* — **1976**. — 14. — 360.
807. Levsen K. *Fundamental aspects of organic mass spectrometry* Weinheim. — New York: Verlag Chemie, **1978**. — 312 p.
808. Field F.H. *J. Am. Chem. Soc.* — **1968**. — 90. — 5649.
809. Budzikiewicz H., Busker E. *Tetrahedron*. — **1980**. — 36. — 255.
810. Ранг С., Эйзен О., Мюрисепп А. Инфракрасные и масс-спектры ненасыщенных углеводов. — Таллин: Варгус, **1977**. — 616 с.
811. Busker E., Budzikiewicz H. *Org. Mass Spectrom.* — **1979**. — 14. — 222.
812. Field F.H., Munson M.S.B. *J. Am. Chem. Soc.* — **1968**. — 89. — 4272.
813. Buchanan M.J., Olerich G. *Org. Mass Spectrom.* — **1984**. — 19. — 486.
814. Rylander P.N., Meyerson S. *J. Am. Chem. Soc.* — **1956**. — 78. — 5799.
815. Meyerson S. *Org. Mass Spectrom.* — **1989**. — 24. — 267.
816. Simonsick W.J., Hites R.A. *Anal. Chem.* — **1984**. — 56. — 2949.
817. Berthomieu D., Audier H., Denhez J.-P., Monteiro C., Mourgues P. *Org. Mass Spectrom.* — **1991**. — 26. — 271.
818. Hawthorne S.B., Miller D.J. *Anal. Chem.* — **1985**. — 57. — 694.
819. Chai R., Harrison A.G. *Anal. Chem.* — **1983**. — 55. — 969.
820. Oehme M. *Anal. Chem.* — **1983**. — 55. — 2290.
821. O'Hair R.A.J., Bowie J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1989**. — 3. — 293.
822. Currie G.J., Bowie J.H., Massy-Westropp R.A., Adams G.W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*. — **1988**. — 403.
823. Eliel E.L., McCollum J.D., Meyerson S., Rylander P.N. *J. Am. Chem. Soc.* — **1961**. — 83. — 2481.
824. Чижов О.С., Отт А.Я. Успехи биологической химии. — М.: Наука, **1978**. — С. 151.
825. Каденцев В.И., Трушкина И.А., Чижов О.С., Таймуразов А.Г. *Биоорганическая химия*. — **1988**. — 14. — 1317.

826. Munson B., Feng T.-M., Ward H.D., Murray R.K. *Jr. Org. Mass Spectrom.* — **1987.** — 22. — 606.
827. Eichmann E.S., Alvarez E., Brodbelt J.S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **1992.** — 3. — 535.
828. Daishima S., Iida Y., Kanda F. *Anal. Sci.* — **1991.** — 7. — 203.
829. Glish G.L., Cooks R.G. *J. Am. Chem. Soc.* — **1978.** — 100. — 6720.
830. Maquestiau A., Flammang R., Flammang-Barbieux M., Mispereuve H. *Tetrahedron.* — **1980.** — 36. — 1993.
831. Реутов О.А., Курц А.Л., Бутин К.П. Органическая химия. — М.: МГУ, **1999.** — С. 285.
832. Hayes R.N., Sheldon J.C., Bowie J.H., Lewis D.E. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* — **1984.** — 1431.
833. Houriet R., Stahl D., Winkler F.J. *Environ. Health Perspect.* — **1980.** — 36. — 63.
834. Raftery M.J., Bowie J.H., Sheldon J.C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* — **1988.** — 563.
835. Thies R.W., E.P.Seitz. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* — **1976.** — 846.
836. Eichinger P.C.H., Bowie J.H. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.* — **1992.** — 117. — 1.
837. Denis J.M., Conia J.M. *Tetrahedron Lett.* — **1972.** — 4593.
838. Bartlett P.D., Rosewald R.H. *J. Am. Chem. Soc.* — **1934.** — 56. — 1990.
839. Dua S.K., Whait R.B., Alexander M.J., Hayes R.N., Lebedev A.T., Eichinger P.C.H., Bowie J.H. *J. Am. Chem. Soc.* — **1993.** — 115. — 5709.
840. Dua S.K., Alexander M.J., Bowie J.H. *Org. Mass Spectrom.* — **1993.** — 28. — 1155.
841. Gorfinkel M.I., Ivanovskaia L.Yu., Koptuyug V.A. *Org. Mass Spectrom.* — **1969.** — 2. — 273.
842. Eichinger P.C.H., Bowie J.H., Hayes R.N. *J. Am. Chem. Soc.* — **1989.** — 111. — 4224.
843. Каденцев В.И., Соковых В.Д., Чижов О.С. *Изв. АН СССР. — Сер. Химия.* — **1978.** — 8. — 1949.
844. Kingston E.E., Beynon J.H., Liehr J.G., Meyrant P., Flammang R., Maquestiau A. *Org. Mass Spectrom.* — **1985.** — 20. — 351.
845. Gerrard W., Lappert M.F., Silver H.B. *Proc. Chem. Soc.* — **1957.** — 19.
846. Svanholm U., Parker V.D. *Chem. Commun.* — **1972.** — 645.
847. Waugh R.J., Hayes R.N., Eichinger P.C.H., Downard K.M., Bowie J.H. *J. Am. Chem. Soc.* — **1990.** — 112. — 2537.
848. Eichinger P.C.H., Bowie J.H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* — **1988.** — 497.
849. Rozeboom M.D., Kiplinger J.P., Bartmess J.E. *J. Am. Chem. Soc.* — **1984.** — 106. — 1025.
850. Eichinger P.C.H., Bowie J.H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* — **1987.** — 1499.
851. Reiner E.J., Poirier R.A., Peterson M.R., Csizmadia I.G., Harrison A.G. *Can. J. Chem.* — **1986.** — 64. — 1652.
852. Raftery M.J., Bowie J.H. *Austr. J. Chem.* — **1988.** — 41. — 1477.
853. Eisch J.J., Kovacs C.A. *J. Organomet. Chem.* — **1971.** — 30. — 97.
854. Eisch J.J., Dua S.K., Kovacs C.A. *J. Org. Chem.* — **1987.** — 52. — 4437.
855. Reeks L.B., Dua S., Bowie J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1993.** — 7. — 282.
856. McLafferty F.W. *Anal. Chem.* — **1962.** — 34. — 2.
857. McLafferty F.W. *Anal. Chem.* — **1962.** — 34. — 16.

858. Harrison A.G., Lin P.H. *Can. J. Chem.* — **1975**. — 53. — 1314.
859. Leung H.W., Harrison A.G. *Can. J. Chem.* — **1976**. — 54. — 3439.
860. Liauw W.G., Harrison A.G. *Org. Mass Spectrom.* — **1981**. — 16. — 388.
861. Harrison A.G., Onuska F.I., Tsang C.W. *Anal. Chem.* — **1981**. — 53. — 1183.
862. Leung H.W., Harrison A.G. *J. Am. Chem. Soc.* — **1980**. — 102. — 1623.
863. Шарбатян П.А., Лебедев А.Т., Сипягин А.М., Карцев В.Г., Петросян В.С. *Химия гетероцикл. соед.* — **1982**. — 3. — 334.
864. Лебедев А.Т., Шарбатян П.А., Сипягин А.М., Карцев В.Г., Петросян В.С. *Химия гетероцикл. соед.* — **1982**. — 7. — 919.
865. Oswald E.O., Albro P.W., McKinney J.D. *J. Chromatogr.* — **1974**. — 98. — 363.
866. Biros F.J., Dougherty R.C., Dalton J. *Org. Mass Spectrom.* — **1972**. — 6. — 1161.
867. Cairns T.C., Siegmund E.G. *Anal. Chem.* — **1981**. — 53. — 1599.
868. White E.L., Bursey M.M. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* — **1989**. — 18. — 413.
869. Webster G.R.B., Olie K., Hutzinger O. in *Mass Spectrometry in Environmental Sciences*. Karasek F.W., Hutzinger O., Safe S. (Eds.). — Plenum Press, New York, **1985**. — P. 257.
870. de Vos J., Gorst-Allman P., Rohwer E. *J. Chromatogr. A*. — **2011**. — 1218. — 3282.
871. Ieda T., Ochiai N., Miyawaki T., Ohura T., Horii Y. *J. Chromatogr. A*. — **2011**. — 1218. — 3224.
872. Besis A., Samara C. *Environ. Pollut.* — **2012**. — 169. — 217.
873. Guerra P., Eljarrat E., Barcelo D. *Trends Anal. Chem.* — **2011**. — 30. — 842.
874. Richardson S.D., Ternes T.A. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 4614.
875. Richardson S.D. *Anal. Chem.* — **2012**. — 84. — 747.
876. Клемент Р., Райнер Э. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 409.
877. Ridge D.P., Beauchamp J.L. *J. Am. Chem. Soc.* — **1974**. — 96. — 3595.
878. Crow F.W., Bjorseth A., Knapp K.T., Bennett R. *Anal. Chem.* — **1981**. — 53. — 619.
879. Buser H.R. *Anal. Chem.* — **1986**. — 58. — 2913.
880. Stemmler E.A., Hites R.A. *Electron Capture Negative Ion Mass Spectra of Environmental Contaminants and Related Compounds*. — Wiley-VCH Verlag GmbH, **2001**. — 408 p.
881. Buser H.R., Rappe C., Berqvist P.A. *Environ. Health Perspect.* — **1985**. — 60. — 293.
882. Hunt D.F., Harvey T.M., Russell J.W. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* — **1975**. — 151.
883. Webster G.R.B., Birkholz D.A. in *Mass Spectrometry in Environmental Sciences*, Karasek F.W., Hutzinger O., Safe S. (Eds.). — Plenum Press, New York, **1985**. — P. 209.
884. Sundstrom G., Jansson B. in *Mass Spectrometry in Environmental Sciences*. Karasek F.W., Hutzinger O., Safe S. (Eds.). — Plenum Press, New York, **1985**. — P. 297.
885. Eiceman G.A. in *Mass Spectrometry in Environmental Sciences*. Karasek F.W., Hutzinger O., Safe S. (Eds.). — Plenum Press, New York, **1985**. — P. 311.
886. Ричардсон С.Д. // Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. — М.: Техносфера, **2013**. — С. 333.
887. Onuska F.I. in *Mass Spectrometry in Environmental Sciences*. Karasek F.W., Hutzinger O., Safe S. (Eds.). — Plenum Press, New York, **1985**. — P. 405.

888. Houde M., de Silva A.O., Muir D.C.G., Letcher R.J. *Environ. Sci. Technol.* — **2011**. — 45. — 7962.
889. Beynon J.H., Saunders R.A., Williams A.E. *Appl. Spectrosc.* — **1960**. — 14. — 95.
890. Seibl J., Gaumann Z. *Helv. Chim. Acta.* — **1963**. — 46. — 2857.
891. Gross M.L., McLafferty F.W. *J. Am. Chem. Soc.* — **1971**. — 93. — 1267.
892. Lebedev A.T., Hayes R.N., Bowie J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1991**. — 5. — 160.
893. Fales H.M., Fenselau C., Duncan J.H. *Org. Mass Spectrom.* — **1976**. — 11. — 669.
894. Headley J.V., Harrison A.G. *Can. J. Chem.* — **1985**. — 63. — 609.
895. Jardine I., Fenselau C. *Org. Mass Spectrom.* — **1975**. — 10. — 748.
896. Olah G.A., O'Brien D.H., Calin M.J. *J. Am. Chem. Soc.* — **1967**. — 89. — 3582.
897. Foster R.F., Tumas W., Brauman J.I. *J. Chem. Phys.* — **1983**. — 79. — 4644.
898. Raftery M.J., Bowie J.H. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — **1987**. — 79. — 267.
899. Stringer M.B., Bowie J.H., Holmes J.L. *J. Am. Chem. Soc.* — **1986**. — 108. — 3888.
900. Stringer M.B., Bowie J.H., Currie G.J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* — **1986**. — 1821.
901. Hunt D.F., Giordani A.B., Shabanowicz J., Rhodes G. *J. Org. Chem.* — **1982**. — 47. — 738.
902. Chowdhury S., Harrison A.G. *J. Am. Chem. Soc.* — **1988**. — 110. — 7345.
903. Marshall A., Tkaczyk M., Harrison A.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **1991**. — 2. — 292.
904. Ryhage R., Stenhagen E. in *Mass Spectrometry of Organic Ions*. McLafferty F.W. (Ed.). — Academic Press, New York, **1963**. — P. 403.
905. Holmes J.L. *Org. Mass Spectrom.* — **1970**. — 3. — 1505.
906. Harrison A.G., Kallury R.K.M.R. *Org. Mass Spectrom.* — **1980**. — 15. — 277.
907. Ichikawa H., Harrison A.G. *Org. Mass Spectrom.* — **1978**. — 13. — 389.
908. Herman J.A., Harrison A.G. *Can. J. Chem.* — **1981**. — 59. — 2133.
909. Chai W., Wang G., Xu Z., Pan J., Duan S. *Org. Mass Spectrom.* — **1983**. — 18. — 64
910. Hawthorne S.B., Miller D.J. *Appl. Spectrosc.* — **1986**. — 40. — 1200.
911. Grabowski J.J., Cheng X. *J. Am. Chem. Soc.* — **1989**. — 111. — 3106.
912. Fujio M., McIver R.T., Taft R.W. *J. Am. Chem. Soc.* — **1981**. — 103. — 4017.
913. O'Hair R.A.J., Gronert S., DePuy C.H., Bowie J.H. *J. Am. Chem. Soc.* — **1989**. — 111. — 3105.
914. Stringer M.B., Bowie J.H., Eichinger P.C.H., Currie G.J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* — **1987**. — 385.
915. Smit A.L.C., Field F.H. *J. Am. Chem. Soc.* — **1977**. — 99. — 6471.
916. Bruins A.P. *Anal. Chem.* — **1979**. — 51. — 967.
917. Hunt D.F., Shabanowicz J., Giordani A.B. *Anal. Chem.* — **1980**. — 82. — 386.
918. Froelicher S.W., Lee R.E., Squires R.R., Fraser B.S. *Org. Mass Spectrom.* — **1985**. — 20. — 4.
919. Hayes R.N., Bowie J.H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* — **1986**. — 1827.
920. Hayes R.N., Bowie J.H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* — **1986**. — 1827.
921. Ireland R.E., Mueller R.H., Willard A.K. *J. Am. Chem. Soc.* — **1976**. — 98. — 2868.
922. Burinsky D.J., Cooks R.G. *J. Org. Chem.* — **1982**. — 47. — 4864.
923. Raftery M.J., Bowie J.H. *Org. Mass Spectrom.* — **1988**. — 23. — 719.

924. Bowie J.H. in *Experimental Mass Spectrometry*. Russell D.H. (Ed.). — Plenum Press, New York, **1994**. — P. 1.
925. Raftery M.J., Bowie J.H. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — **1988**. — 85. — 167.
926. Pottie R.F., Lossing F.P. *J. Am. Chem. Soc.* — **1961**. — 83. — 4737.
927. McLafferty F.W. *Anal. Chem.* — **1962**. — 34. — 26.
928. Depke G., Klose W., Schwarz H. *Org. Mass Spectrom.* — **1983**. — 18. — 495.
929. Zeller K.P., Meier H., Muller E. *Org. Mass Spectrom.* — **1971**. — 5. — 373.
930. Zeller K.P., Meier H., Muller E. *Tetrahedron*. — **1972**. — 28. — 5831.
931. Zeller K.P. *Org. Mass Spectrom.* — **1975**. — 10. — 317.
932. Kinson P.H., Trost B.V. *Tetrahedron Lett.* — **1969**. — 1075.
933. Undheim K., Thorstad O., Hvistendahl G. *Org. Mass Spectrom.* — **1971**. — 5. — 73.
934. Thorstad O., Undheim K., Hvistendahl G. *Org. Mass Spectrom.* — **1974**. — 9. — 548.
935. Hvistendahl G., Undheim K. *Org. Mass Spectrom.* — **1975**. — 6. — 217.
936. Караханова Н.К., Сергеева Т.А., Лебедев А.Т., Яшина Н.С., Ларионова В.Г., Карцев В.Г., Петросян В.С. *Вестн. МГУ. — Сер. Химия*. — **1988**. — 29. — 290.
937. Chizhov O.S., Kadentsev V.I., Palmbach G.G., Burstein K.I., Shevelev S.A., Feinsilberg A.A. *Org. Mass Spectrom.* — **1978**. — 13. — 611.
938. Ballantine J.A., Barton J.D., Carter J.F., Davies J.P., Smith K., Stedman G., Kingston E.E. *Org. Mass Spectrom.* — **1988**. — 23. — 1.
939. Harrison A.G., Kallury R.K.M.R. *Org. Mass Spectrom.* — **1980**. — 15. — 284.
940. Yinon J. *Forensic Applications of Mass Spectrometry*. — CRC Press, Boca Raton, FL, **1995**. — 297 p.
941. Yinon J., Laschever M. *Org. Mass Spectrom.* — **1981**. — 16. — 264.
942. Brophy J.J., Diakiv V., Goldsack R.J., Nelson D., Shannon J.S. *Org. Mass Spectrom.* — **1979**. — 14. — 117.
943. Kallury R.K.M.R., Rao P.L.M.K. *Org. Mass Spectrom.* — **1977**. — 12. — 411.
944. Maquestiau A., Van Haverbeke Y., Flammang R., Meyrant P. *Org. Mass Spectrom.* — **1977**. — 15. — 80.
945. Stemmler E.A., Hites R.A. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* — **1987**. — 14. — 417.
946. Adams G.W., Bowie J.H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*. — **1989**. — 2159.
947. Lebedev A.T., Hayes R.N., Bowie J.H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*. — **1991**. — 1127.
948. Хмельницкий Р.А., Ефремов Ю.А. *Успехи химии*. — **1977**. — 46. — 83.
949. Henderson W., McIndoe J.S. *Mass spectrometry of inorganic and organometallic compounds*. — WILEY, **2005**. — 271 p.
950. Traeger J.C. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2000**. — 200. — 387.
951. Jirasko R., Holcapek M. *Mass Spectrom. Rev.* — **2011**. — 30. — 1013.
952. Santos L.S. (Ed.). *Reactive intermediates. MS investigation in solution*. — Wiley-VCH, Weinheim, **2010**. — 341 p.
953. Plattner D.A. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2001**. — 207. — 125.
954. Santos L.S. *Eur. J. Org. Chem.* — **2008**. — 2. — 235.
955. Rosenberg E. *J. Chromatogr. A*. — **2003**. — 1000. — 841.

956. Dorcier A., Dyson P.I., McIndoe J.S. *Eur. J. Inorg. Chem.* — **2003**. — 24. — 4294.
957. Kotova O.V., Eliseeva S.V., Lobodin V.V., Lebedev A.T., Kuzmina N.P. *J. Alloys Comp.* — **2008**. — 451. — 410.
958. Royo E., Britzinger H.H. *J. Organomet. Chem.* — **2002**. — 663. — 213.
959. Schumann H., Aksu Y., Schutte S., Wassermann B.C., Muhle S.H. *J. Organomet. Chem.* — **2006**. — 691. — 4717.
960. Wyatt M.F., Stein B.K., Brenton A.G. *Analyst.* — **2008**. — 133. — 47.
961. Jirasko R., Holcapek M., Kolarova L., Baul T.S.B. *J. Mass Spectrom.* — **2007**. — 42. — 918.
962. Van Berkel G.J. *J. Mass Spectrom.* — **2000**. — 35. — 773.
963. Deng H., Kebarle P. *J. Am. Chem. Soc.* — **1998**. — 120. — 2925.
964. Litzow M.R., Spalding T.R. *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds.* — Elsevier, Amsterdam, **1973**. — 620 p.
965. Charlabous J. (Ed). *Mass Spectrometry of Metal Compounds.* — Butterworth, London, **1975**. — 297 p.
966. Van Berkel G.J., Quirke J.M.E., Tigani R.A., Dilley A.S., Covey T.R. *Anal. Chem.* — **1998**. — 70. — 1544.
967. Бочкарев В.Н. Дис. ... канд. хим. наук. — М., **1975**. — 209 с.
968. Чернышев А.Е. Дис. ... канд. хим. наук. — М., **1985**. — 209 с.
969. Бочкарев В.Н., Слюсаренко Т.Ф., Поливанов А.Н., Бернадский А.А. *ЖОХ.* — **1980**. — 50. — 1783.
970. Biemann K., Seibl J., Gapp F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — **1959**. — 1. — 307.
971. Tsang C.W., Harrison A.G. *J. Am. Chem. Soc.* — **1976**. — 98. — 1301.
972. Meot-Ner M., Field F.H. *J. Am. Chem. Soc.* — **1973**. — 95. — 7207.
973. Vairamani M., Srinivas R., Viswandha Rao G.K. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* — **1988**. — 17. — 299.
974. Zaikin V., Halket J. *A handbook of derivatives for mass spectrometry.* — IMPublications, UK, **2009**. — 513 p.
975. Kiryushkin A.A., Fales H.M., Axenrod T., Gilbert E.J., Milne G.W.A. *Org. Mass Spectrom.* — **1971**. — 5. — 19.
976. Bradley C.V., Howe I., Beynon J.H. *Biomed. Mass Spectrom.* — **1981**. — 8. — 85.
977. Bradley C.V., Williams D.H., Hanley M.R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — **1982**. — 104. — 1223.
978. Hunt D.F., Buko A.M., Ballard J.M., Shabanowitz J., Giordani A.B. *Biomed. Mass Spectrom.* — **1981**. — 8. — 397.
979. Aebersold R., Mann M. *Nature.* — **2003**. — 422. — 198.
980. Roepstorff P., Fohlmann J. *Biomed. Mass Spectrom.* — **1984**. — 11. — 601.
981. Edman P. *Acta Chem. Scand.* — **1950**. — 4. — 283.
982. Biemann K. in *Methods in Enzimology*. McCloskey J.A. (Ed.). — Academic Press, San Diego, **1990**. — Vol. 193. — 866.
983. Высоцки В.Г., Ченг Г., Жанг К., Херрманн К.А., Бердсли Р.Л., Гильдербранд Э.И. // Принципы масс-спектрометрии в приложении к биомолекулам / Под ред. Ю. Ласкин. — М.: Техносфера, **2012**. — С. 254.
984. Harrison A. *Mass Spectrom. Rev.* — **2009**. — 28. — 640.

985. Goloborodko A.A., Gorshkov M.V., Good D.M., Zubarev R.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2011**. — 22. — 1121.
986. Kinter M., Sherman E. Protein Sequencing and identification using tandem mass spectrometry. — John Wiley & Sons, New York, **2000**. — 320 p.
987. McCormack A.L., Somogyi A., Dongr'e A.R., Wysocki V.H. *Anal. Chem.* — **1993**. — 65. — 2859.
988. Wysocki V.H., Tsaprilis G., Smith L.L., Brei L.S. *J. Mass Spectrom.* — **2000**. — 35. — 1399.
989. Samgina T.Yu., Vorontsov E.A., Gorshkov V.A., Artemenko K.A., Zubarev R.A., Lebedev A.T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2014**. — 28. — 2595.
990. Bean M.F., Carr S.A. *Anal. Biochem.* — **1992**. — 201. — 216.
991. Jones M.D., Patterson S.D., Lu H.S. *Anal. Chem.* — **1998**. — 70. — 136.
992. Zubarev R.A., Kruger N.A., Fridriksson E.K., Lewis M.A., Horn D.M., Carpenter B.K., McLafferty F.W. *J. Am. Chem. Soc.* — **1999**. — 121. — 2857.
993. Bilusich D., Maselli V.M., Brinkworth C.S., Samguina T., Lebedev A.T., Bowie J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2005**. — 19. — 3063.
994. Samgina T.Yu., Vorontsov E.A., Gorshkov V.A., Artemenko K.A., Zubarev R.A., Ytterberg J.A., Lebedev A.T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2013**. — 24. — 1037.
995. Артеменко К.А., Самгина Т.Ю., Лебедев А.Т. *Масс-спектрометрия*. — **2006**. — 3. — 225.
996. Dai J., Zhang Y., Wang J., Li X., Lu Z., Cai Y., Qian X. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2005**. — 19. — 1130.
997. Samgina T.Y., Artemenko K.A., Gorshkov V.A., Poljakov N.B., Lebedev A.T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2008**. — 19. — 479.
998. Kjeldsen F., Haselmann K.F., Sørensen E.S., Zubarev R.A. *Anal. Chem.* — **2003**. — 75. — 1267.
999. Bowie J.H., Brinkworth C.S., Dua S. *Mass Spectrom. Rev.* — **2002**. — 21. — 87.
1000. Bilusich D., Bowie J.H. *Mass Spectrom. Rev.* — **2009**. — 28. — 20.
1001. Brinkworth C.S., Dua S., McAnoy A.M., Bowie J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2001**. — 15. — 1965.
1002. McCormack A.L., Schieltz D.M., Goode B., Yang S., Barnes G., Drubin D., Yates J.R. *Anal. Chem.* — **1997**. — 69. — 767.
1003. Spengler B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2004**. — 15. — 703.
1004. Yates III J.R., Eng J.K., McCormack A.L., Schieltz D. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 1426.
1005. Mann M., Wilm M.S. *Anal. Chem.* — **1994**. — 66. — 4390.
1006. Cordwell S.J., Wasinger V.C., Cerpa Poljak A., Duncan M.W., Humphrey-Smith I. *J. Mass Spectrom.* — **1997**. — 32. — 370.
1007. Lipman D.J., Pearson W.R. *Science*. — **1985**. — 227. — 1435.
1008. Nesvizhskii A.I., Aebersold R. *Mol. Cell. Proteomics*. — **2005**. — 4. — 1419.
1009. Kelleher N.L. *Anal. Chem.* — **2004**. — 76. — A197.
1010. Hancock W.S. (Ed.) *New Methods in Peptide Mapping Character of Proteins*. — Global View Publishing, Pittsburg, PA, **1996**.

1011. Larsen B.S., McEwen C.N. (Eds). Mass Spectrometry of Biological material. – Global View Publishing, Pittsburg, PA, 2nd edition, **1998**. – 488 p.
1012. Reid R.E. (Ed.). Peptide and Protein Drug Analysis. – CRC Press, USA, **1999**. – 904 p.
1013. Snyder A.P. Interpreting Protein Mass Spectra: A Comprehensive Resource ACS. – USA, **2000**. – 544 p.
1014. Howard G.C., Brown W.E. (Eds.). Modern Protein Chemistry: Practical Aspects. – CRC Press, USA, **2001**. – 272 p.
1015. Liebler D.C. Introduction to Proteomics. – Humana Press. – USA, **2002**. – 198 p.
1016. Roboz J. Mass Spectrometry in Cancer Research. – CRC Press. – USA, **2002**. – 576 p.
1017. Walker J.M. (Ed.). The Protein Protocols Handbook. – Humana Press, USA, 2nd Edition, **2002**. – 1176 p.
1018. Lipton M.S., Pasa-Tolic L. (Eds.). Mass Spectrometry of Proteins and Peptides. – Springer Protocols, 2nd Edition, **2009**. – 470 p.
1019. Phizicky E.M., Fields S. *Microbiol. Rev.* – **1995**. – 59. – 94.
1020. O Loo R.R., Goodlett D.R., Smith R.D., Loo J.A. *J. Am. Chem. Soc.* – **1993**. – 115. – 4391.
1021. Loo J.A. *Mass Spectrom. Rev.* – **1997**. – 16. – 1.
1022. Huang E.C., Pramanic B.N., Tsarbopoulos A., Reichert P., Gauguly A.K., Trotta P.P., Nagabhushan T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **1993**. – 4. – 624.
1023. Pramanik B.N., Bartner P.L., Mirza U.A., Liu Y.H., Ganguly A.K. *J. Mass Spectrom.* – **1998**. – 33. – 911.
1024. Robinson C.V., Chung E.E., Kragelund B.B., Knudsen J., Aplin R.T., Poulsen F.M., Dobson C.M. *J. Am. Chem. Soc.* – **1996**. – 118. – 6643.
1025. Yates III J.R. *J. Mass Spectrom.* – **1998**. – 33. – 1.
1026. Farmer T.B., Caprioli R.M. *J. Mass Spectrom.* – **1998**. – 33. – 697.
1027. Khalil M.B., Hou W., Zhou H., Elisma F., Swayne L.A., Blanchard A.P., Yao Z., Bennett S.A.L., Figeys D. *Mass Spectrom. Rev.* – **2010**. – 29. – 877.
1028. Kishimoto K., Urade R., Ogawa T., Moriyama T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – **2001**. – 281. – 657.
1029. Murphy R.C. Mass spectrometry of lipids. – New York. Plenum Press, **1993**. – 312 p.
1030. Rawai Y., Takeda S., Terao J. *Chem. Res. Toxicol.* – **2007**. – 20. – 99.
1031. Griffiths W.J. *Mass Spectrom. Rev.* – **2003**. – 22. – 81.
1032. Matsubara T., Hayashi A. *Prog. Lipid Res.* – **1991**. – 30. – 301.
1033. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **1999**. – 10. – 587.
1034. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **1999**. – 10. – 600.
1035. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2000**. – 11. – 986.
1036. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2000**. – 11. – 797.
1037. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2000**. – 11. – 892.
1038. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2001**. – 12. – 61.
1039. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2002**. – 13. – 558.
1040. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2003**. – 14. – 352.
1041. Pulfer M., Murphy R.C. *Mass Spectrom. Rev.* – **2003**. – 22. – 332.

1042. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2005**. — 16. — 1510.
1043. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2006**. — 17. — 1146.
1044. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2007**. — 18. — 2065.
1045. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2008**. — 19. — 1673.
1046. Hsu F.F., Turk J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2008**. — 19. — 1681.
1047. Cheng C., Gross M.L. *Anal. Chem.* — **1998**. — 70. — 4417.
1048. Smith J.C., Hou W., Whitehead S.N., Ethier M., Bennett S.A., Figeys D. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* — **2008**. — 22. — 3579.
1049. Han X., Gross R.W. *J. Lipid Res.* — **2003**. — 44. — 1071.
1050. Han X., Gross R.W. *Mass Spectrom. Rev.* — **2005**. — 24. — 367.
1051. Hsu F.F., Lodhi I.J., Turk J., Semenkovich C.F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2014**. — 25. — 1412.
1052. Byrdwell W.C. *Lipids.* — **2001**. — 36. — 327.
1053. Byrdwell W.C. *Lipids.* — **2005**. — 40. — 383.
1054. Xu Y. — J.T. Brenna. *Anal. Chem.* — **2007**. — 79. — 2525.
1055. Guittard J., Hronowski X.L., Costello C.E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1999**. — 13. — 1838.
1056. Fuchs B., Schober C., Richter C., Suss R., Shiller J. *J. Biochem. Biophys. Methods.* — **2007**. — 70. — 689.
1057. Dreisewerd K., Muthing J., Rohlfing A., Meisen I., Vukelic Z., Peter-Katalinic J., Hillenkamp F., Berkenkamp S. *Anal. Chem.* — **2005**. — 77. — 4098.
1058. Guan Z. *J. Chromatogr. B.* — **2009**. — 877. — 2814.
1059. Hsu F.F., Turk J. *J. Chromatogr. B.* — **2009**. — 877. — 2673.
1060. Ivanova P.T., Milne S.B., Brown H.A. *J. Lipid Res.* — **2010**. — 51. — 1581.
1061. Murphy R.C., Axelsen P.H. *Mass Spectrom. Rev.* — **2011**. — 30. — 579.
1062. Li M., Zhou Z., Nie H., Bai Y., Liu H. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2011**. — 399. — 243.
1063. Han X., Gross R.W. *Expert Rev. Proteom.* — **2005**. — 2. — 253.
1064. Yang K., Zhao Z., Gross R.W., Han X. *Anal. Chem.* — **2011**. — 83. — 4243.
1065. Almeida R., Paulin J.K., Sokol E., Hannibal-Bach H.K., Ejsing C.S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2015**. — 26. — 133.
1066. Forrester J.S., Milne S.B., Ivanova P.T., Brown H.A. *Mol. Pharmacol.* — **2004**. — 65. — 813.
1067. Christie W.W., Han X. *Lipid Analysis — Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, (4th edition). — Oily Press, Bridgwater, UK, **2010**. — 446 p.
1068. Aiello D., De Luca D., Gionfriddo E., Naccarato A., Napoli A., Romano E., Russo A., Sindona G., Tagarelli A. *Eur. J. Mass Spectrom.* — **2011**. — 17. — 1.
1069. Murphy R.C. In *Handbook of Lipid Research. 7: Mass spectrometry of Lipids*. Snyder F. (Ed.). — Plenum Press, NY, **1993**. — P. 213.
1070. Kubo A., Satoh T., Itoh Y., Hashimoto M., Tamura J., Cody R.B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2013**. — 24. — 684.
1071. Hsu F.F., Turk J., Stewart M.E., Downing D.T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2002**. — 13. — 680.
1072. Michaud A.L., Diau G.Y., Abril R., Brenna J.T. *Anal. Biochem.* — **2002**. — 307. — 348.

1073. Moneti G., Pieraccini G., Dani F.R., Catinella S., Traldi P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1996**. — 10. — 167.
1074. Moe M.K., Jensen E. *Eur. J. Mass Spectrom.* — **2004**. — 10. — 47.
1075. Afonso C., Riu A., Xu Y., Fournier F., Tabet J.C. *J. Mass Spectrom.* — **2005**. — 40. — 342.
1076. Thomas M.C., Mitchell T.W., Blanksby S.J. *J. Am. Chem. Soc.* — **2006**. — 128. — 58.
1077. Thomas M.C., Mitchell T.W., Harman D.G., Deeley J.M., Nealon J.R., Blanksby S.J. *Anal. Chem.* — **2008**. — 80. — 303.
1078. Apweiler R., Hermjakob H., Sharron N. *Biochim. Biophys. Acta.* — **1999**. — 1473. — 4.
1079. Zaia J. *Mass Spectrom. Rev.* — **2004**. — 23. — 161.
1080. Ly M., Leach III F.E., Laremore T.N., Toida T., Amster I.J., Linhardt R.J. *Nat. Chem. Biol.* — **2011**. — 7. — 827.
1081. Harvey D.J. *Proteomics.* — **2001**. — 1. — 311.
1082. Park Y., Lebrilla C.B. *Mass Spectrom. Rev.* — **2005**. — 24. — 232.
1083. Zaia J. *J. Chem. Biol.* — **2008**. — 15. — 881.
1084. Kailemia M.J., Ruhaak L.R., Lebrilla C.B., Amster I.J. *Anal. Chem.* — **2014**. — 86. — 196.
1085. Karlsson H., Carlstedt I., Hansson G.C. *Anal. Biochem.* — **1989**. — 182. — 438.
1086. Wang W.T., Matsuura F., Sweeley C.C. *Anal. Biochem.* — **1983**. — 134. — 398.
1087. Radford T., DeJongh D.C. Carbohydrates in Biomedical Application of Mass Spectrometry. — First Supplementary Volume. Waller G.R., Dermer O.C. (Eds.). — Wiley Interscience, New York, **1980**.
1088. Hogg A.M., Nagabhusan T.L. *Tetrahedron Lett.* — **1972**. — 4827.
1089. Dougherty R.C., Roberts J.D., Binkley W.W., Chizhov O.S., Kadentsev V.I., Solovyanov A.A. *J. Org. Chem.* — **1974**. — 39. — 451.
1090. Ganguly A.K., Cappuccino N.F., Fujiwara H., Bose A.K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* — **1979**. — 148.
1091. Chizhov O.S., Kadentsev V.I., Solovyanov A.A., Leonowich P.F., Dougherty R.C. *J. Org. Chem.* — **1976**. — 41. — 3425.
1092. Reinhold V.N., Carr S.A. *Anal. Chem.* — **1982**. — 54. — 499.
1093. Kochetkov N.K., Chizhov O.S. *Adv. Carbohydr. Chem.* — **1966**. — 21. — 39.
1094. Domon B., Costello C.E. *Glycoconjugate J.* — **1988**. — 5. — 395.
1095. Prome J.C., Aurelle H., Prome D., Savagnac A. *Org. Mass Spectrom.* — **1987**. — 22. — 6.
1096. Jiao J., Zhang H., Reinhold V.N. *J. Mass Spectrom.* — **2011**. — 303. — 109.
1097. Mock K.K., Davey M., Cottrell J.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — **1991**. — 177. — 644.
1098. Duffin K.L., Welply J.K., Huang E., Henion J.D. *Anal. Chem.* — **1992**. — 64. — 1440.
1099. Reinhold V.N., Reinhold B.B., Costello C.E. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 1772.
1100. Weiskopf A.S., Vouros P., Harvey D.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1997**. — 11. — 1493.
1101. Chai W., Piskarev V., Lawson A.M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2002**. — 13. — 670.
1102. Harvey D.J. *Mass Spectrom. Rev.* — **2006**. — 25. — 595.
1103. Harvey D.J. *Mass Spectrom. Rev.* — **2008**. — 27. — 125.
1104. Harvey D.J. *Mass Spectrom. Rev.* — **2011**. — 30. — 1.

1105. Domann P., Spencer D.I.R., Harvey D.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2012.** — 26. — 469.
1106. Cancilla M.T., Penn S.G., Carroll J.A., Lebrilla C.B. *J. Am. Chem. Soc.* — **1996.** — 118. — 6736.
1107. Konig S., Leary J.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **1998.** — 9. — 1125.
1108. Mirgorodskaya E., Roepstorff P., Zubarev R.A. *Anal. Chem.* — **1999.** — 71. — 4431.
1109. Whistler R.L., BeMiller J.N. In: *Advances in carbohydrate chemistry*. Wolfrom M.L. (Ed.). — New York: Academic Press. **1958.** — 289 p.
1110. Prime S., Dearnley J., Ventom A.M., Parekh R.B., Edge C.J. *J. Chromatogr. A.* — **1996.** — 720. — 263.
1111. Viseux N., Hronowski X., Delaney J., Domon B. *Anal. Chem.* — **2001.** — 73. — 4755.
1112. Jones C.J., Beni S., Larive C.K. *Anal. Chem.* — **2011.** — 83. — 6762.
1113. Zauner G., Deelder A.M., Wuhler M. *Electrophoresis.* — **2011.** — 32. — 3456.
1114. Ruhaak L.R., Deelder A.M., Wuhler M. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2009.** — 394. — 163.
1115. Melmer M., Stangler T., Premstaller A., Lindner W. *J. Chromatogr. A.* — **2011.** — 1218. — 118.
1116. Creese A.J., Cooper H.J. *Anal. Chem.* — **2012.** — 84. — 2597.
1117. Fenn L.S., Kliman M., Mahsut A., Zhao S.R., McLean J.A. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2009.** — 394. — 235.
1118. Aldredge D., An H.J., Tang N., Waddell K., Lebrilla C.B. *J. Proteome Res.* — **2012.** — 11. — 1958.
1119. Woodin C.L., Maxon M., Desaire H. *Analyst.* — **2013.** — 138. — 2793.
1120. Desaire H. *Mol. Cell Proteomics.* — **2013.** — 12. — 893.
1121. Hayes C.A., Karlsson N.G., Struwe W.B., Lisacek F., Rudd P.M., Parker N.H., Campbell M.P. *Bioinformatics.* — **2011.** — 27. — 1343.
1122. Peltoniemi H., Natunen S., Ritamo I., Valmu L., Rabina J. *Glycoconjugate J.* — **2013.** — 30. — 159.
1123. Strum J.S., Kim J., Wu S., De Leoz M.L.A., Peacock K., Grimm R., German J.B., Mills D.A., Lebrilla C.B. *Anal. Chem.* — **2012.** — 84. — 7793.
1124. Esmans E.L., Geboes P., Luyten Y., Alderweireldt F.C. *Biomed. Mass Spectrom.* — **1985.** — 12. — 241.
1125. Tuytten R., Lemiere F., Van Dongen W., Esmans E.L., Witters E., Herrebout W., Van Der Veken B., Dudley E., Newton R.P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2005.** — 16. — 1291.
1126. Dudley E., Tuytten R., Bond A., Lemiere F., Brenton A.G., Esmans E.L., Newton R.P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2005.** — 19. — 3075.
1127. Curtis M., Minier M.A., Chitranshi P., Sparkman O.D., Jones P.R., Xue L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2010.** — 21. — 1371.
1128. Rozenski J. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2011.** — 304. — 204.
1129. Dudley E., Bond L. *Mass Spectrom. Rev.* — **2014.** — 33. — 302.
1130. Crain P.F. *Mass Spectrom. Rev.* — **1990.** — 9. — 505.
1131. Spengler B., Pan Y., Cotter R.J., Kan L.-S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1990.** — 4. — 99.

1132. McCloskey J.A., Crain P.F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — **1992.** — 118/119. — 593.
1133. Fitzgerald M.C., Smith L.M. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* — **1995.** — 24. — 117.
1134. Murray K.K. *J. Mass Spectrom.* — **1996.** — 31. — 1203.
1135. Burlingame A.L., Boyd R.K., Gaskell S.J. *Anal. Chem.* — **1996.** — 68. — 599.
1136. Limbach P.A. *Mass Spectrom. Rev.* — **1996.** — 15. — 297.
1137. Banoub J.H., Newton R.P., Esmans E., Ewing D.F., Mackenzie G. *Chem. Rev.* — **2005.** — 105. — 1869.
1138. Hofstadler S.A., Sannes-Lowery K.A., Hannis J.C. *Mass Spectrom. Rev.* — **2005.** — 24. — 265.
1139. Thomas B., Akoulichev A.V. *Trends Biochem. Sci.* — **2006.** — 31. — 173.
1140. Beverly M. *Mass Spectrom. Rev.* — **2011.** — 30. — 979.
1141. Nakayama H., Takahashi N., Isobe T. *Mass Spectrom. Rev.* — **2011.** — 30. — 1000.
1142. Draper D.E. *RNA.* — **2004.** — 10. — 335.
1143. Light-Wahl K., Springer D., Winger B., Edmonds C., Camp D., Thrall B., Smith R. *J. Am. Chem. Soc.* — **1993.** — 115. — 803.
1144. Yang M., Thompson G., Hall J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2004.** — 15. — 1354.
1145. Pan S., Sun X., Lee J.K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **2006.** — 17. — 1383.
1146. Pan S., Sun X., Lee J.K. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2006.** — 253. — 238.
1147. Tang K., Allman S.L., Chen C.H., Chang L.Y., Schell M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1994.** — 8. — 183.
1148. Tang K., Taranenko N.I., Allman S.L., Chang L.Y., Chen C.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1994.** — 8. — 727.
1149. Nelson R.W., Rainbow M.J., Lohr D.E., Williams P. *Science.* — **1989.** — 246. — 1585.
1150. Nelson R.W., Thomas R.M., Williams P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1990.** — 4. — 348.
1151. Schieltz D.M., Chou C., Luo C., Thomas R.M., Williams P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1992.** — 6. — 631.
1152. Greco F., Liguori A., Sindona G., Uccella N. *J. Am. Chem. Soc.* — **1990.** — 112. — 9092.
1153. Zhu L., Parr G.R., Fitzgerald M.C., Nelson C.M., Smith L.M. *J. Am. Chem. Soc.* — **1995.** — 117. — 6048.
1154. Nordorff E., Karas M., Cramer R., Hahner S., Hillenkamp F., Kirpeka F., Lezius A., Muth J., Meier C., Engels J.W. *J. Mass Spectrom.* — **1995.** — 30. — 99.
1155. Nordhoff E., Ingendoh A., Cramer R., Overberg A., Stahl B., Karas M., Hillenkamp F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1992.** — 6. — 771.
1156. Nordhoff E., Cramer R., Karas M., Hillenkamp F., Kirpekar F., Kristiansen K., Roepstorff P. *Nucleic Acids Res.* — **1993.** — 21. — 3347.
1157. Kirpekar F., Nordhoff E., Kristiansen K., Roepstorff P., Lezius A., Hahner S., Karas M., Hillenkamp F. *Nucleic Acids Res.* — **1994.** — 22. — 3866.
1158. Pomerantz S.C., Kowalak J.A., McCloskey J.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — **1993.** — 4. — 204.
1159. McLafferty F.W., Aaserud D.J., Guan Z., Little D.P., Kelleher N.L. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — **1997.** — 165. — 457.

1160. Muddiman D.C., Van der Rest G., Anderson G.A., Marshall A.G. *Genomics Tools*. – **2000**. – V1.0.
1161. Taoka M., Yamauchi Y., Nobe Y., Masaki S., Nakayama H., Ishikawa H., Takahashi N., Isobe T. *Nucleic Acids Res.* – **2009**. – 37. – e140.
1162. Zhang Z., Jackson W.J., Fox G.E., Willson R.C. *BMC Bioinformatics*. – **2006**. – 7. – 117.
1163. Jackson G.W., McNichols R.J., Fox G.E., Willson R.C. *BMC Bioinformatics*. – **2006**. – 7. – 321.
1164. Matthiesen R., Kirpekar F. *Nucleic Acids Res.* – **2009**. – 37. – e48.
1165. Beck J.L., Colgrave M.L., Ralph S.F., Sheil M.M. *Mass Spectrom. Rev.* – **2001**. – 20. – 61.
1166. Huber C.G., Oberacher H. *Mass Spectrom. Rev.* – **2001**. – 20. – 311.
1167. McLuckey S.A., Van Berkel G.J., Glish G.L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **1992**. – 3. – 60.
1168. Farand J., Grosselin F. *Anal. Chem.* – **2009**. – 81. – 3723.
1169. Bentzley C.M., Johnston M.V., Larsen B.S., Gutteridge S. *Anal. Chem.* – **1996**. – 68. – 2141.
1170. Glover R.P., Sweetman G.M.A., Farmer P.B., Roberts G.C.K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – **1995**. – 9. – 897.
1171. Bahr U., Aygun H., Karas M. *Anal. Chem.* – **2009**. – 81. – 3173.
1172. Shaler T.A., Tan Y., Wickham J.N., Wu K.J., Becker C.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – **1995**. – 9. – 942.
1173. Chang L., Tang K., Schell M., Ringelberg C., Matteson K.J., Allman S.L., Chen C.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – **1995**. – 9. – 772.
1174. McLuckey S.A., Habibi-Goudarzi S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **1994**. – 5. – 740.
1175. Ni J., Pomerantz S.C., Rozenski J., Zhang Y., McCloskey J.A. *Anal. Chem.* – **1996**. – 68. – 1989.
1176. Huang T.Y., Liu J., Liang X., Hodges B.D., McLuckey S.A. *Anal. Chem.* – **2008**. – 80. – 8501.
1177. Schnier P.D., Klassen J.S., Strittmatter E.F., Williams E.R. *J. Am. Chem. Soc.* – **1998**. – 120. – 9605.
1178. Rozenski J., McCloskey J.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – **2002**. – 13. – 200.
1179. Guymon R., Pomerantz S.C., Crain P.F., McCloskey J.A. *Biochemistry*. – **2006**. – 45. – 4888.
1180. Oberacher H., Wellenzohn B., Huber C.G. *Anal. Chem.* – **2002**. – 74. – 211.
1181. Nakayama H., Akiyama M., Taoka M., Yamauchi Y., Nobe Y., Ishikawa H., Takahashi N., Isobe T. *Nucleic Acids Res.* – **2009**. – 37. – e47.
1182. Null A.P., Muddiman D.C. *J. Mass Spectrom.* – **2001**. – 36. – 589.
1183. Третьякова Н., Гоггин М. // Масс-спектрометрия для объектов окружающей среды / Ред. А.Т. Лебедев. – М.: Техносфера, **2013**. – С. 478.
1184. Griffey R.H., Hofstadler S.A., Sannes-Lowery K.A., Esker D.J., Crooke S.T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – **1999**. – 96. – 10129.
1185. Griffey R.H., Sannes-Lowery K.A., Drader J.J., Mohan V., Swayze E.E., Hofstadler S.A. *J. Am. Chem. Soc.* – **2000**. – 122. – 9933.

1186. Cubbon S., Antonio C., Wilson J., Tomas-Oates J. *Mass Spectrom. Rev.* — **2010**. — 29. — 671.
1187. Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E. *Xenobiotics*. — **1999**. — 29. — 1181.
1188. Lindon J.C., Holmes E., Nicholson J.K. *Anal. Chem.* — **2003**. — 75. — 384A.
1189. Oliver S.G. *Microbiology (Reading, UK)*. — **1997**. — 143. — 1483.
1190. Villas-Boas S.G., Mas S., Akesson M., Smedsgaard J., Nielsen J. *Mass Spectrom. Rev.* — **2005**. — 24. — 613.
1191. Kuban P., Foret F. *Anal. Chim. Acta.* — **2013**. — 805. — 1.
1192. Bedair M., Summer L.W. *Trends Anal. Chem.* — **2008**. — 27. — 238.
1193. Godejohann M. *J. Chromatogr. A.* — **2007**. — 1156. — 87.
1194. Theodoridis G., Gika H.G., Wilson I.D. *Trends Anal. Chem.* — **2008**. — 27. — 251.
1195. Masson P., Alves A.C., Ebbels T.M.D., Nicholson J.K., Want E.J. *Anal. Chem.* — **2010**. — 82. — 7779.
1196. Tolstikov V.V., Fiehn O. *Anal. Biochem.* — **2002**. — 301. — 298.
1197. Tolstikov V.V., Lommen A., Nakanishi K., Tanaka N., Fiehn O. *Anal. Chem.* — **2003**. — 75. — 6737.
1198. Idborg-Bjorkman H., Edlund P.O., Kvalheim O.M., Schuppe-Koistinen I., Jakobsson S.P. *Anal. Chem.* — **2003**. — 75. — 4784.
1199. Chen X., Liu L., Palacios G., Gao J., Zhang N., Li G., Lu J., Song T., Zhang Y., Ly H. *J. Sep. Sci.* — **2010**. — 33. — 2776.
1200. Dwivedi P., Wu P., Klopsch S.J., Puzon G.J., Xun L., Hill H.H. Jr. *Metabolomics*. — **2008**. — 4. — 63.
1201. Faber H., Vogel M., Karst U. *Anal. Chim. Acta.* — **2014**. — 834. — 9.
1202. Allen J., Davey H.M., Broadhurst D., Heald J.K., Rowland J.J., Oliver S.G., Kell D.B. *Nat. Biotechnol.* — **2003**. — 21. — 692.
1203. Fiehn O. *Plant Mol. Biol.* — **2002**. — 48. — 155.
1204. Yang Q., Shi X., Wang Y., Wang W., He H., Lu X., Xu G. *J. Sep. Sci.* — **2010**. — 33. — 1495.
1205. Yuan K., Kong H., Guan Y., Yang J., Xu G. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* — **2007**. — 850. — 236.
1206. Kuhara T. *Mass Spectrom. Rev.* — **2005**. — 24. — 814.
1207. Chace D.H., Kalas T.A. *Clin. Biochem.* — **2005**. — 38. — 296.
1208. Zytovicz T.H., Fitzgerald E.F., Marsden D., Larson C.A., Shih V.E., Johnson D.M., Strauss A.W., Comeau A.M., Eaton R.B., Grady G.F. *Clin. Chem.* — **2001**. — 47. — 1945.
1209. Schulze A., Lindner M., Kohlmuller D., Olgemoller K., Mayatepek E., Hoffmann G.F. *Pediatrics*. — **2003**. — 111. — 1399.
1210. Wilcken B., Wiley V., Hammond J., Carpenter K. *N. Engl. J. Med.* — **2003**. — 348. — 2304.
1211. Patterson A.D., Lanz C., Gonzalez F.J., Idle J.R. *Mass Spectrom. Rev.* — **2010**. — 29. — 503.
1212. Mishur R.J., Rea S.L. *Mass Spectrom. Rev.* — **2012**. — 31. — 70.
1213. Bino R.J., Hall R.D., Fiehn O., Kopka J., Saito K., Draper J., Nikolau B.J., Mendes P., Roessner-Tunali U., Beale M.H., Trethewey R.N., Lange B.M., Wurtele E.S., Sumner L.W. *Trends Plant Sci.* — **2004**. — 9. — 418.

1214. Liu E.C., Hofstadler S.A., Bresson J.A., Udseth H.R., Tsukuda T., Smith R.D., Snyder A.P. *Anal. Chem.* — **1998**. — 70. — 1797.
1215. Xiang F., Anderson G.A., Veenstra T.D., Lipton M.S., Smith R.D. *Anal. Chem.* — **2000**. — 72. — 2475.
1216. Russell S.C. *Mass Spectrom. Rev.* — **2009**. — 28. — 376.
1217. Sullivan R.C., Prather K.A. *Anal. Chem.* — **2005**. — 77. — 3861.
1218. Nash D.G., Baer T., Johnston M.V. *Int. J. Mass Spectrom.* — **2006**. — 258. — 2.
1219. Hinz K., Spengler B. *J. Mass Spectrom.* — **2007**. — 42. — 843.
1220. Anhalt J.P., Fenselau C. *Anal. Chem.* — **1975**. — 47. — 219.
1221. Fenselau C., Demirev P.A. *Mass Spectrom. Rev.* — **2001**. — 20. — 157.
1222. Lay J.O. *Mass Spectrom. Rev.* — **2001**. — 20. — 172.
1223. Krishnamurthy T., Rajamani U., Ross P.L., Jabhour R., Nair H., Eng J., Yates J., Davis M.T., Stahl D.C., Lee T.D. *J. Toxicol-Toxin Rev.* — **2000**. — 19. — 95.
1224. Demirev P.A., Ho Y.P., Ryzhov V., Fenselau C. *Anal. Chem.* — **1999**. — 71. — 2732.
1225. Ryzhov V., Hathout Y., Fenselau C. *Appl. Environ. Microbiol.* — **2000**. — 66. — 3824.
1226. Wang Z.P., Russon L., Li L., Roser D.C., Long S.R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1998**. — 12. — 456.
1227. Madonna A.J., Basile F., Ferrer I., Meetani M.A., Rees J.C., Voorhees K.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **2000**. — 14. — 2220.
1228. Winkler M.A., Uher J., Cepa S. *Anal. Chem.* — **1999**. — 71. — 3416.
1229. Veloo A.C.M., Erhard M., Welker M., Welling G.W., Degener J.E. *Syst. Appl. Microbiol.* — **2011**. — 34. — 58.
1230. Welker M., Moore E.R.B. *Syst. Appl. Microbiol.* — **2011**. — 34. — 2.
1231. Sato H., Teramoto K., Ishii Y., Watanabe K., Benno Y. *Syst. Appl. Microbiol.* — **2011**. — 34. — 76.
1232. Teramoto K., Sato H., Sun L., Torimura M., Tao H., Yoshikawa H., Hotta Y., Hosoda A., Tamura H. *Anal. Chem.* — **2007**. — 79. — 8712.
1233. Teramoto K., Sato H., Sun L., Torimura M., Tao H. *J. Proteome Res.* — **2007**. — 6. — 3899.
1234. Plotnikova E.G., Anan'ina L.N., Krauzova V.I., Ariskina E.V., Prisyazhnaya N.V., Lebedev A.T., Demakov V.A., Evtushenko L.I. *Microbiology.* — **2011**. — 80. — 703.
1235. Eliasi B., Fenselau C. *Anal. Chem.* — **2001**. — 73. — 5228.
1236. Demirev P.A., Lin J.S., Pineda E.J., Fenselau C. *Anal. Chem.* — **2001**. — 73. — 4566.
1237. Siuzdak G. *J. Mass Spectrom.* — **1998**. — 33. — 203.
1238. Fuerstenau S.D., Benner W.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — **1995**. — 9. — 1528.
1239. Thomas J.J., Falk B., Fenselau C., Jackman J., Ezzel J. *Anal. Chem.* — **1998**. — 70. — 3863.
1240. Hayek C.S., Pineda F.J., Doss O.W., Lin J.S. *Johns Hopkins APL Technical Digest.* — **1999**. — 20. — 363.
1241. Gieray R.A., Reilly P.T.A., Yang M., Whitten W.B., Ramsey J.M. *J. Microbiol. Methods.* — **1997**. — 29. — 191.
1242. Scholl P.F., Leonardo M.A., Rule A.M., Carlson M.A., Antoine M.D., Buckley T.J. *Johns Hopkins APL Technical Digest.* — **1999**. — 20. — 343.

1243. Brockman A.H., Orlando R. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 4581.
1244. Nelson R.W., Krone J., Bieber A., Williams P. *Anal. Chem.* — **1995**. — 67. — 1123.
1245. Budde W.L. Analytical mass spectrometry. Strategies for environmental and related applications. — American Chemical Society, Washington, D.C., **2001**. — 386 p.
1246. Middleditch B.S., Missler S.R., Hines H.B. Mass Spectrometry of priority pollutants. — Plenum Press, New York, **1981**. — 308 p.
1247. Ternes T.A., Hany J., Baumann W., Nagel R. *Fresenius J. Anal. Chem.* — **1995**. — 351. — 790.
1248. Biller J.E., Biemann K. *Anal. Lett.* — **1974**. — 7. — 515.
1249. Leclercq P.A., Cramers C.A. *Mass Spectrom. Rev.* — **1998**. — 17. — 37.
1250. Dromley R.G., Stefik M.J., Rindfleisch T.C., Duffield A.M. *Anal. Chem.* — **1976**. — 48. — 1368.
1251. Ghosh R.J., Anderegg R. *Anal. Chem.* — **1989**. — 61. — 2118.
1252. Glisson F. CD version of the Proc. GC-GC-TOF-MS Workshop. — Prague, 13–15 November, 2002.
1253. Siek K., Makarov V., Artaev V., Lebedev A.T., Mazur D. Proc. 63 ASMS Conference. — St. Luis, USA, **2015**.
1254. Li Z., Pittman E.N., Trinidad D.A., Romanoff L.C., Mulholland J., Sjodin A. *Anal. Bioanal. Chem.* — **2010**. — 396. — 1321.

Список принятых и предлагаемых сокращений, русских и английских терминов, относящихся к масс-спектрометрии

При составлении списка англоязычных терминов учитывались термины и определения, рекомендованные ИЮПАК на 2013 г. (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. — Vol. 85. — № 7. — P. 1515–1609).

Русские названия и сокращения на кириллице

- Да — дальтон (масса, рассчитанная с использованием шкалы ^{12}C ;
 $1 \text{ Да} = 1,66053886(28) \times 10^{-27} \text{ кг}$).
- кДа — килодальтон (10^3 Да).
- кэВ — килоэлектрон-вольт.
- эВ — электрон-вольт ($1 \text{ эВ} = 1,60217653(14) \times 10^{-19} \text{ Дж}$).

Русские названия и обозначения на латинице

- В — магнитный анализатор.
- e^- — электрон.
- Е — электростатический анализатор.
- m/z — величина отношения массы иона к его заряду используется для обозначения положения пика иона в масс-спектре.
- $M^{+\cdot}$ — положительно заряженный нечетно-электронный молекулярный ион-радикал (катион-радикал).
- $M^{-\cdot}$ — отрицательно заряженный молекулярный ион-радикал (анион-радикал).
- $[M+H]^+$ или $[MH]^+$ — протонированная молекула. Использовать этот термин и не использовать следующие: протонированный молекулярный ион, молекулярный протонированный ион, квазимолекулярный ион, псевдомолекулярный ион.
- $[M+Cat]^+$ (примеры, $[M+Na]^+$ или $[M+K]^+$) — катионированная молекула. Использовать этот термин и не использовать следующие: квазимолекулярный ион, псевдомолекулярный ион.
- Кластерные ионы — ионы, образованные несколькими молекулами с присоединенным катионом или анионом. Если кластерный ион содержит n молекул А, m молекул В и катион (Cat^+ , например, H^+ , Na^+) или анион (An^- , например, HPO_3^-), рекомендуется его обозначать следующим образом: $[nA+mB+Cat]^+$ или, соответственно, $[nA+mB+An]^-$.

Английские термины (принятая аббревиатура) и предлагаемый их эквивалент на русском языке (аббревиатура на кириллице)

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Accelerating Potential (уст.) Accelerating Voltage	Ускоряющий потенциал (уст.) Ускоряющее напряжение	Электрическое напряжение, ускоряющее ионы на выходе из источника ионов
Accelerator Mass Spectrometry (AMS)	Ускорительная масс-спектрометрия	
Accurate Mass	Точная масса	Масса иона, измеренная с учетом дефекта масс
Accurate Mass and Time tags (AMT)	Метод точных масс и времен	Точные массы и времена элюирования пептидов, полученных при ферментативном гидролизе белка
Ambient Mass Spectrometry (Ionization)	Масс-спектрометрия с ионизацией на воздухе	Комплекс масс-спектрометрических методов, основанных на ионизации при обычных условиях (на воздухе)
Analogue-to-Digital Converter (ADC)	Аналогово-цифровой преобразователь (АЦП)	Используется в системах регистрации данных и устройствах автоматизации при оцифровке аналоговых сигналов для их последующей обработки компьютером
Analyte	Аналит	Обнаруживаемый или количественно определяемый компонент
Appearance Energy (AE)	Энергия появления (ЭП)	Минимальная энергия, необходимая для образования конкретного иона (не использовать термины «appearance potential», «потенциал появления»)
Atmospheric Solids Analysis Probe (ASAP)	Анализ твердых проб при атмосферном давлении	
Atmospheric Pressure Ionization (API)	Ионизация при атмосферном давлении (ИАД)	Общий тип ионизации, включающий ХИАД, ИЭР, ФИАД, когда образование первичных и осколочных ионов происходит при атмосферном давлении

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)	Химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД)	
Atmospheric Pressure Glow Discharge Ionization (APGDI)	Ионизация в тлеющем разряде при атмосфер- ном давлении	
Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization (AP MALDI)	Матрично-активи- рованная лазерная десорбция/ионизация при атмосферном давлении (АД-МАЛДИ)	
Atmospheric Pressure Penning Ionization (APPeI)	Пеннинговская ионизация при атмос- ферном давлении	
Atmospheric Pressure Photoionization (APPI)	Фотоионизация при атмосферном давлении (ФИАД)	
Atmospheric Pressure Photochemical ionization (APPCI)	Фотохимическая ионизация при атмосферном давлении (ФХИАД)	
Atomic Emission Detec- tor (AED)	Атомно-эмиссионный детектор	Детектор для газовой хромото- графии. Позволяет селективно регистрировать сигналы всех элементов, кроме гелия. С его помощью получают инфор- мацию об элементном составе органических или металлоор- ганических соединений, раз- деленных методом газовой хро- мотографии
Unified Mass Unit (u)	Атомная единица массы (а.е.м.)	$1/12$ массы изотопа ^{12}C ($1,66053886(28) \times 10^{-27}$ кг)
Autoionization	Автоионизация	Спонтанный выброс электрона из молекулы, имеющей внут- реннюю энергию выше энер- гии ионизации
Auxiliary Gas	Вспомогательный газ	Дополнительный газ, исполь- зуемый в электроспрейных источниках для удаления рас- творителя

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Background mass spectrum	Фоновый масс-спектр	Спектр, зарегистрированный при отсутствии молекул аналита в ионном источнике
Base peak (BP)	Основной пик	Пик в спектре с наибольшей интенсивностью
Blackbody Infrared Radiative Dissociation (BIRD)	Диссоциация, протекающая в результате поглощения инфракрасного излучения абсолютно черного тела	
«Bottom-up» Approach	Подход «снизу-вверх»	Используется при анализе белков или длинных пептидов и включает их ферментативное расщепление, последующий масс-спектрометрический анализ образующихся протеолитических пептидов и реконструкцию структуры исходной макромолекулы
Capillary Electrophoresis (CE)	Капиллярный электрофорез (КЭ)	
Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry (CE/MS)	Капиллярный электрофорез/масс-спектрометрия (КЭ/МС)	
Capillary Zone Electrophoresis (CZE)	Капиллярный зонный электрофорез	
Channel Electron Multiplier	Канальный электронный умножитель	Вторично-электронный умножитель с непрерывным динодом в форме канала
Charge exchange ionization (CEI)	Ионизация при обмене зарядом	Ионизация при переносе заряда от иона на нейтральную молекулу
Charge-Induced (Mediated) Fragmentation (CIF)	Фрагментация, индуцируемая зарядом	Тип фрагментации, инициируемой зарядом
Charge-Remote Fragmentation (CRF)	Фрагментация, индуцируемая удаленным зарядом	Тип фрагментации четно-электронных ионов с разрывом связей в удалении от заряда
Charged Residue Model (CRM)	Модель заряженного остатка	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Charge Site Derivatization	Дериватизация с введением фиксированного заряда	
Chemical Ionization (CI)	Химическая ионизация (ХИ)	
Cluster ion	Кластерный ион	Ион, образованный при присоединении одной или нескольких нейтральных молекул к заряженной частице
Collisionally Activated Dissociation (CAD) = = Collision-Induced Dissociation (CID)	Диссоциация, активируемая соударением (ДАС) = диссоциация, индуцируемая соударением (ДИС)	Различают высокоэнергетическую и низкоэнергетическую диссоциацию, когда распадающийся ион имеет энергию поступательного движения более 1 кэВ и менее 100 эВ соответственно
Collision-Activated Reaction (CAR)	Реакция, активируемая соударением	
Collision Cell	Ячейка соударений	Камера, обычно заполняемая газом и располагающаяся между двумя масс-анализаторами или между источником ионов и первым анализатором в тандемной масс-спектрометрии
Collision Gas	Газ для соударений	Инертный газ, используемый в ячейке соударений
Combination of Infrared and Collisional Activation (CIRCA)	Комбинированный метод инфракрасной активации с активацией соударением	
Continuous-Flow Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (CF-MALDI)	Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация непрерывного потока	
Corona discharge ionization	Ионизация в коронном разряде	
Data Dependent Acquisition	Зависимое сканирование	
Data Independent Acquisition	Независимое сканирование	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Delayed Extraction	Экстракция с задержкой	Метод использует пульсирующее вытягивающее напряжение для фокусировки ионов по энергии во время пролета масс-спектрометрах
Deprotonated Molecule	Депротонированная молекула	Отрицательный ион, образованный при удалении из молекулы протона, то есть ион $[M-H]^-$ (не использовать термины квазимолекулярный ион и псевдомолекулярный ион)
Desorption atmospheric pressure chemical ionization (DAPCI)	Десорбционная химическая ионизация при атмосферном давлении (ДХИАД)	
Desorption atmospheric pressure photoionization (DAPPI)	Десорбционная фотоионизация при атмосферном давлении (ДФИАД)	
Desorption Chemical Ionization (DCI)	Десорбционная химическая ионизация (ДХИ)	Химическая ионизация газообразных молекул, выделяющихся из образца при быстром нагревании
Desorption Electrospray Ionization (DESI)	Десорбционная электрораспылительная ионизация (ДЭРИ)	
Desorption Ionization on Silicon (DIOS)	Десорбция/ионизация на пористой поверхности кремния	
Detection Limit	Предел обнаружения	Отражает наименьшее количество вещества, которое дает сигнал, отличный от шумового сигнала
Digital-to-Analogue Converter (DAC)	Цифро-аналоговый преобразователь (ЦАП)	Используется в системах регистрации данных и устройствах автоматизации для программного управления аналоговыми сигналами
Direct Analysis in Real Time (DART)	Прямой анализ в режиме реального времени (ДАРТ)	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Direct Insertion Probe (DIP), Direct Inlet	Прямой ввод (образца в ионный источник)	
Discontinuous Atmospheric Pressure Interface (DAPI)	Интерфейс дискретного ввода при атмосферном давлении	
Distonic Ion	Дистонический ион	Ион, в котором катионный и радикальный центры не на- ходятся на одном атоме или в сопряжении друг с другом
Double-Focusing Mass Spectrometer	Масс-спектрометр с двойной фокусировкой	Масс-спектрометр, включаю- щий комбинацию магнитного и электростатического m/z -ана- лизаторов
Drift Tube	Область дрейфа	Область, наполненная буфер- ным газом при давлении, доста- точном для того, чтобы макро- скопическое движение ионов под воздействием приложен- ного электрического поля явля- лось равномерным.
Drift Tube Ion Mobility Spectrometry	Дрейфовая спектрометрия ионной подвижности	Метод спектрометрии ионной подвижности, в котором ком- поненты пробы в форме увлека- емых электрическим полем ионных сгустков разделяются по времени дрейфа в противо- токе дрейфового газа.
Dynamic Range	Динамический диапазон	Отношение наибольшего к наименьшему детектируемым сигналам
Easy Ambient Sonic Spray Ionization (EASI)	Ионизация акустическим распыле- нием на воздухе	
Electron Affinity	Сродство к электрону	Минимальная энергия, необ- ходимая для процесса $M^- \rightarrow M + e^-$
Electron Capture Chemical Ionization (ECCI)	Химическая ионизация при захвате электрона (ХИЗЭ)	
Electron-Capture Dissociation (ECD)	Диссоциация при захвате электрона (ДЗЭ)	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Electron-Capture Negative Ion (ECNI) Mass Spectrometry	Масс-спектрометрия отрицательных ионов с захватом электрона	
Electron Detachment Dissociation (EDD)	Диссоциация при отрыве электрона (ДОЭ)	
Electron Energy	Энергия электрона	Энергия, приобретаемая элект- роном в электростатическом поле
Electron Ionization (EI)	Ионизация электро- нами или электронная ионизация (ИЭ)	Термин «электронный удар» («electron impact») больше не используется
Electron Multiplier	Электронный умножитель	
Electron Transfer Dissociation (ETD)	Диссоциация при переносе электрона (ДПЭ)	
Electrosonic Spray Ion- ization (ESSI)	Электроакустическая распылительная ионизация	
Electrospray/Ionization (ESI)	Ионизация электрорас- пылением (ИЭР)	Термин «ионное распыление» («ion spray») не использовать
Electrospray Laser Desorption Ionization (ELDI)	Электрораспылительная лазерная десорбция/ ионизация	
Electrostatic Analyser (ESA)	Электростатический анализатор	Используется в магнитно-сек- торных масс-спектрометрах для фокусирования пучков ионов
Even Electron Ion (EE = ee)	Обычно речь идет о частице с четным количеством электронов (например, катион)	
Exact Mass	Точная масса	Рассчитанная точная масса с учетом определенного изо- топного состава
Extractive Electrospray Ionization (EESI)	Экстракционная электрораспылительная ионизация	
Fast Atom Bombardment (FAB)	Бомбардировка быс- трыми атомами (ББА)	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Fast Ion Bombardment (FIB)	Бомбардировка бы- стрыми ионами (ББИ)	
Femtosecond Laser- Induced Ionization/ Dissociation (fs-LID)	Ионизация/диссоциа- ция, индуцированная фемтосекундным лазером (ФСИДИС)	
Field Desorption (FD)	Десорбция полем (ДП)	Образование ионов из образ- цов, нанесенных на поверх- ность под действием элект- рического поля с высоким градиентом потенциала
Field-Free Region (FFR)	Бесполевая область или бесполовое пространство	Области в масс-спектрометре, где нет магнитных или элект- ростатических полей
Field Ionization (FI)	Полевая ионизация (ПИ)	Ионизация газообразных мо- лекул под действием электри- ческого поля с высоким гра- диентом потенциала (обычно реализуется туннельный пере- ход электрона)
Flame Ionization Detector (FID)	Пламенно-ионизаци- онный детектор (ПИД)	
Forward Geometry (Normal Geometry)	Прямая геометрия	В масс-спектрометре с двой- ной фокусировкой электроста- тический сектор располагается перед магнитным секторным анализатором
Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR) = (FTICR-MS)	Масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразо- ванием Фурье (МС-ИЦР ПФ)	
Fourier Transform Mass Spectrometry (FTMS)	Масс-спектрометрия с преобразованием Фурье (МС ПФ)	
Full Width at Half Maximum (FWHM)	Ширина на половине высоты максимума	Значение ширины сигнала (например, пика на хромато- грамме или в масс-спектре), определяемое на его высоте, при которой интенсивность сигнала равна половине ее максимального значения

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Gas Chromatography (GC)	Газовая хроматография (ГХ)	
Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS)	Газовая хро- матография/масс- спектрометрия (ГХ/МС)	Метод, включающий разделе- ние смеси с помощью газового хроматографа и масс-спектро- метрическое детектирование ее компонентов в режиме ре- ального времени
Glow Discharge Mass Spectrometry (GDMS)	Масс-спектрометрия с ионизацией тлеющим разрядом	Включает ионизацию газов или паров твердых веществ на катоде под действием разно- сти потенциалов между двумя электродами при низком дав- лении
Higher-Energy Collision Dissociation (HCD)	Диссоциация, активируемая соударениями при повышенной энергии (ДАСПЭ)	
High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry (FAIMS)	Спектрометрия приращения ионной подвижности	
High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	
High-Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (HPLC/MS)	Высокоэффектив- ная жидкостная хроматография/ масс-спектрометрия (ВЭЖХ/МС)	
High Resolution (HR)	Высокое разрешение	
High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS)	Масс-спектрометрия высокого разрешения	
High-Voltage-Assisted Laser Desorption/ Ionization (HALDI)	Метод высоковольтной активированной лазерной десорбции/ ионизации	
Hybrid Mass Spectrometer	Гибридный масс- спектрометр	Содержит несколько разно- типных m/z -анализаторов для регистрации МС ⁿ спектров

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Imaging mass spectrometry (or MS Imaging)	Масс-спектрометрическая визуализация	Масс-спектрометрическое детектирование выбранных ионов, десорбированных с поверхности, с построением изображения их распределения
Inductively Coupled Plasma (ICP)	Индуктивно-связанная плазма (ИСП)	
Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP MS)	Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП МС)	
Infra-Red Multi-Photon Dissociation (IRMPD)	Инфракрасная мультифотонная диссоциация (ИКМФД)	Фрагментация в результате поглощения нескольких инфракрасных фотонов
In-Source Decay (ISD)	Распад внутри источника	
Ion Chromatograph	Ионный хроматограф	
Ion Chromatography/ Mass Spectrometry (IC/MS)	Ионная хроматография/ масс-спектрометрия (ИХ/МС)	
Ion Collector	Коллектор ионов	Обычно электронный умножитель или чаша Фарадея
Ion Cyclotron Resonance (ICR)	Ионный циклотронный резонанс (ИЦР)	
Ionization Cross Section	Сечение ионизации	Мера вероятности ионизации атома или молекулы при взаимодействии с фотоном или электроном
Ionization Efficiency	Эффективность ионизации	Отношение числа образующихся ионов к числу поступающих электронов или фотонов
Ionization Energy (IE) (Adiabatic or Vertical Ionization Energy)	Энергия ионизации (ЭИ) (адиабатическая или вертикальная энергия ионизации)	Минимальная энергия, необходимая для отрыва электрона от молекулы, когда возникающий ион находится в основном или возбужденном состоянии соответственно (не использовать термины «ionization potential», «потенциал ионизации»)

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Ion Mobility Spectrometry (IMS)	Спектрометрия ионной подвижности (СИП)	Метод основан на разделении ионов по подвижности при дрейфе через буферный газ
Ion Source	Источник ионов	Часть масс-спектрометра, где генерируются ионы
Ion Trap (IT)	Ионная ловушка	
Ion Trap Detector (ITD)	Детектор типа «ионная ловушка»	
Isobaric Ions	Изобарные ионы	Ионы, имеющие одинаковые номинальные, но разные точные массы
Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ)	iTRAQ	Реагент для введения изотопной метки к N-концу пептида или белка в сравнительной количественной протеомике
Isotope Cluster	Изотопный кластер	Группа пиков ионов, обусловленных ионами одинакового элементного, но разного изотопного составов
Isotope-coded Affinity Tag (ICAT)	ICAT	Реагенты для введения изотопной метки в сравнительной количественной протеомике. Содержит реакционную группу для модификации цистеина и группу для связывания с носителем в аффинной хроматографии и выделения меченых пептидов и белков
Isotope Dilution Mass Spectrometry	Масс-спектрометрия с изотопным разбавлением	
Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) or Stable Isotope Mass Spectrometry	Масс-спектрометрия изотопных отношений	
Isotopic Scrambling	Перемещение изотопов	Хаотическое перемещение изотопов в ионе
Isotopolog Ions	Ионы-изотопологи	Ионы, отличающиеся изотопным составом одного или нескольких атомов

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Isotopomeric ions	Изотопомерные ионы	Ионы, имеющие одинаковый изотопный состав элементов, но разное их расположение
Laser Ablation	Лазерная абляция	Быстрый выброс частиц конденсированной материи с поверхности твердого тела или жидкости под воздействием импульса лазера. Не путать с лазерной десорбцией!
Laser Ablation Electrospray Ionization (LAESI)	Лазерная абляция/ ионизация электро- распылением	Комбинированный способ ионизации, при котором продукты лазерной абляции направляют в поток заряженных капель и ионов, генерированный в результате ионизации электрораспылением
Laser Desorption (LD)	Лазерная десорбция	Быстрый выброс молекул или атомов с поверхности твердого тела или жидкости под воздействием импульса лазера. Не путать с лазерной абляцией!
Laser desorption/ atmospheric pressure chemical ionization (LD–APCI)	Химическая ионизация при атмосферном давлении с лазерной десорбцией (ХИАДЛД)	
Laser Desorption/ Ionization (LDI)	Лазерная десорбция/ ионизация (ЛДИ)	
Laser Ionization (LI)	Ионизация лазерным излучением (ИЛ)	Фотоионизация с применением лазерного источника излучения. Возможны многофотонные процессы. Не путать с лазерной абляцией и лазерной десорбцией!!!
Laserspray Ionization	Лазерно- распылительная ионизация	
Limit of Detection = Detection Limit	Предел обнаружения (ПО)	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Limit of Quantitation	Предел количественного определения	Наименьшее содержание ана- лита, которое может быть коли- чественно определено с помо- щью данной методики анализа вещества или материала с уста- новленными значениями ха- рактеристик погрешности или неопределенности
Linear Discriminant Analysis	Линейный дискрими- нантный анализ	
Linear Ion Trap (LIT)	Линейная ионная ловушка	
Linear Time of Flight (LTOF)	Линейный время- пролетный (масс- анализатор)	
Liquid Chromatography (LC)	Жидкостная хромато- графия (ЖХ)	
Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (LC/MS)	Жидкостная хро- матография/масс- спектрометрия (ЖХ/МС)	
Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS)	Жидкостная масс- спектрометрия вторич- ных ионов (ЖВИМС)	
Mass Defect	Дефект массы	Численная разница между но- минальной массой и моно- изотопной массой атома, мо- лекулы, иона
Massive Cluster Impact (MCI)	Бомбардировка тяже- лыми кластерами	
Mass Range	Диапазон измеряемых масс	Область величин m/z , в кото- рой может быть зарегистриро- ван масс-спектр
Mass Spectrometry (MS)	Масс-спектрометрия (МС)	
Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (MS/MS); MS/MS ⁿ а) MS/MS in Time б) MS/MS in Space	Масс-спектрометрия/ масс-спектрометрия, тандемная масс- спектрометрия (МС/МС); МС/МС ⁿ а) МС/МС во времени б) МС/МС в пространстве	а) реализуется в едином ана- лизаторе, например, ионной ловушке или ячейке ИЦР; б) реализуется в приборах с несколькими анализаторам с ячейкой соударений между ними

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Match	Индекс сходимости	
Matrix Assisted Ionization in Vacuum (MAIV)	Матрично активированная ионизация в вакууме (МАИВ)	
Matrix-Assisted Laser Desorption/Electrospray Ionization (MALDESI)	Матрично-активиро- ванная лазерная десорбция/электро- распылительная ионизация	
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)	Матрично-активи- рованная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ)	
Mattauch–Herzog geometry	Геометрия Маттауха– Герцога	В масс-спектрометре с двой- ной фокусировкой за электро- статическим анализатором, дающим отклонение $\pi/(4\sqrt{2})$ радиан, следует магнитный с отклонением $\pi/2$ радиан
Megavolt Electrostatic Ionization Mass Spectrometry	Масс-спектрометрия с мегавольтной электростатической ионизацией	
Membrane Introduction (Inlet or Interface) Mass Spectrometry (MIMS)	Масс-спектрометрия с мембранным вводом	
Membrane Separator	Мембранный сепаратор	В газовом хроматографе/масс- спектрометре обеспечивает селективное пропускание ор- ганических аналитов в масс- спектрометр
Metastable Ion	Метастабильный ион	Ион, имеющий внутреннюю энергию, достаточную для дальнейшего распада, но боль- шое время жизни, чтобы иметь возможность претерпеть рас- пад вне источника ионов (не употреблять жаргонный тер- мин «метастабильный пик»)

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Microelectrospray/ Ionization (μ ESI)	Микроэлектрораспы- лительная ионизация (μ ИЭР)	Реализуется при скорости по- тока меньше 1 мкл мин ⁻¹ при внутреннем диаметре капил- ляра меньше 50 мкм
Molecular imaging	Молекулярная визуализация	
Molecular Ion	Молекулярный ион	По массе отвечает массе моле- кулы и образуется отщеплени- ем или присоединением одно- го или нескольких электронов
Monitoring	Мониторинг	Относительно продолжитель- ное наблюдение за измене- ниями характеристик объекта или процесса в пространствен- но-временной системе коор- динат
Monoisotopic Mass Spectrum	Моноизотопный масс-спектр	Масс-спектр, состоящий из пиков ионов, содержащих только наиболее распростра- ненные изотопы всех входя- щих элементов
MS/MS Spectrum	Спектр МС/МС	Спектр, зарегистрированный на тандемном масс-спектро- метре
MS ⁿ	МС ⁿ	Масс-спектрометрия, обеспе- чивающая эксперименты с многостадийным превраще- нием иона-предшественника
Multiphoton Ionization (MPI)	Многофотонная ионизация	Ионизация происходит при поглощении нескольких фо- тонов
Multiple Reactions Monitoring (MRM) = Metastable Reaction Monitoring = Selected Reaction Monitoring (SRM)	Мониторинг заданных (выбранных) реакций	
Nanoelectrospray/ Ionization (nESI)	Наноэлектрораспы- лительная ионизация (наноИЭР)	Реализуется при скорости по- тока меньше 100 нл мин ⁻¹ при внутреннем диаметре капилля- ра меньше 1–3 мкм

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Negative Ion Chemical Ionization (NICI=NCI)	Химическая ионизация с регистрацией отрицательных ионов (ХИОИ)	
Nier–Johnson Geometry	Геометрия Нира–Джонсона	Конфигурация масс-спектрометра с двойной фокусировкой, создающего отклонения в $\pi/2$ и $\pi/3$ радиан электростатического и магнитного анализаторов соответственно
Nominal Mass	Номинальная масса	Масса, рассчитанная с использованием целочисленных масс всех наиболее распространенных изотопов элементов в молекуле
Odd Electron (OE = oe)	Обычно речь идет о частице с нечетным количеством электронов (например, катион-радикал)	Нечетноэлектронный ион
Orbitrap (OT)	Орбитальная ионная ловушка	
Orthogonal Acceleration (oa)	Ортогональное ускорение	Импульсное ускорение ионов в направлении, перпендикулярном исходному, при вводе во времяпролетный анализатор
Orthogonal Acceleration Time of Flight (oa-TOF)	Времяпролетный (масс-анализатор) с ортогональным ускорением	
Ozone-induced dissociation (OzID)	Диссоциация, индуцированная озоном ДИОз	
Penning ionization	Пеннинговская ионизация	Ионизация путем удаления электрона при соударении атомов в метастабильном состоянии (например, высшее ридберговское) с молекулами (атомами, имеющими более низкую энергию ионизации)

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Photo-Induced Dissociation (PhID)	Фотоиндуцированная диссоциация (ФИД)	
Photoionization (PhI)	Фотоионизация (ФИ)	Ионизация при действии фо- тона по реакции $M + h\nu \rightarrow M^{++} + e^-$
Plasma Desorption (PD) Mass Spectrometry	Масс-спектрометрия с плазменной десорбцией	
Post-Source Decay (PSD)	Распад за пределами источника	Фрагментация метастабиль- ных ионов, ускоренных в ион- ном источнике (для метода МАЛДИ)
Precursor Ion (instead of Parent Ion)	Ион-предшественник или исходный ион (использовать вместо «родительский ион»)	
Principal Component Analysis	Анализ главных компонент	
Principal Ion	Основной ион	Наиболее интенсивный ион в изотопном кластере
Probe electrospray ionization (PESI)	Электрораспылитель- ная ионизация с ис- пользованием твердой пробы	
Product Ion (instead of Daughter Ion)	Ион-продукт (исполь- зовать вместо «дочер- ный ион»)	
Proton Affinity (PA)	Сродство к протону (СП)	Изменение энтальпии в про- цессе $M^o + H^+ \rightarrow [MH]^+$
Proton Transfer Reaction (PTR)	Реакция переноса про- тона (РПП)	
Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry (Py-GC/MS)	Пиролитическая газовая хроматография/ масс-спектрометрия (Пи-ГХ/МС)	
Pyrolysis Mass Spectrometry (Py-MS)	Пиролитическая масс-спектрометрия (Пи-МС)	
Quadrupole Ion Store = QUISTOR= Quadrupole Ion Trap (QIT)	Квадрупольная ионная ловушка	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Quadrupole Time-of-Flight (QTOF)	Квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр	Тандемный масс-спектрометр на основе квадрупольного и времяпролетного масс-анализаторов с ортогональным ускорением, разделенными квадруполем с ячейкой соударений
Quasi-equilibrium Theory (QET)	Квазиравновесная теория	
Radio Frequency (RF)	Радиочастота	Подразумевается переменное электрическое поле с радиочастотой
Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry (REIMS)	Масс-спектрометрия с ионизацией быстрым испарением	
Reflectron Time of Flight (RTOF)	Времяпролетный (масс-анализатор) с рефлектроном	
Relative Intensity or Relative Abundance	Относительная интенсивность	Обычно это отношение интенсивности пика к интенсивности основного пика, выраженное в процентах
Relative Isotope-Ratio Difference, δ	Относительное отклонение изотопных отношений, δ	$\delta = (R_{\text{обр}}/R_{\text{станд}} - 1)1000\text{‰}$
Resolution (Resolving Power)	Разрешающая способность	Величина ($R = m/\Delta m$), определяемая отношением массового числа пика к его ширине на некоторой высоте (по умолчанию 50%, но может быть и $R_{20\%}$, $R_{10\%}$ и т.д.)
Resonance Electron Capture (REC)	Резонансный захват электрона	
Reverse Geometry	Обратная геометрия (для двухфокусных масс-спектрометров)	Конфигурация масс-спектрометра, в котором пучок ионов сначала попадает в магнитный, а затем электростатический анализаторы
Reverse Match	Обратный индекс сходимости	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Secondary-Ion Mass Spectrometry (SIMS)	Масс-спектрометрия вторичных ионов (МСВИ)	
Selected reaction monitoring (SRM)	Мониторинг выбранных реакции (МВР)	Мониторинг ионов-продуктов, возникающих из выбранного иона-предшественника, с использованием тандемной масс-спектрометрии
Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS)	Масс-спектрометрия выбранных ионов в потоке (МСВИП)	
Selected-Ion Monitoring (SIM)	Мониторинг выделенных ионов	Регистрация интенсивности одного или нескольких ионов, а не всего масс-спектра (термин «multiple ion detection, MID» больше не употребляется)
Shotgun Proteomics	Скорострельная протеомика	Включает ферментативное расщепление белка, разделение пептидов с помощью ВЭЖХ и их идентификацию методом тандемной масс-спектрометрии
Soft Landing	«Мягкое» напыление	
Sonic Spray Ionization	Ионизация акустическим распылением	
Spark Source Mass Spectrometry (SSMS)	Масс-спектрометрия с искровым источником	
Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)	Введение метки стабильного изотопа в клеточную культуру с помощью меченых аминокислот	При проведении сравнительных количественных анализов в протеомике применяют параллельное выращивание клеточных культур в присутствии меченой (например, изотопами ^2H , ^{13}C и/или ^{15}N) аминокислоты и немеченой
Static Secondary Ion Mass Spectrometry (SSIMS)	Статическая масс-спектрометрия вторичных ионов (СМСВИ)	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Stored Waveform Inverse Fourier Transform (SWIFT)	Метод сохраненной формы волны с обратным преобразо- ванием Фурье	
Supercritical Fluid Chromatography/Mass Spectrometry (SFC/MS)	Сверхкритическая флюидная хрома- тография/масс- спектрометрия (СФХ/МС)	
Surface-Activated Chemical Ionization (SACI)	Химическая ионизация активированная по- верхностью	
Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization (SALDI)	Поверхностно- активируемая лазерная десорбция/ионизация (ПАЛДИ)	
Surface Enhanced Laser Desorption Ionization (SELDI)	Поверхностно усиленная лазерная десорбция/ионизация (ПУЛДИ)	
Surface-Induced Dissociation (SID)	Диссоциация, индуци- руемая столкновением с поверхностью	
Surface Ionization	Поверхностная ионизация	
Sustained Off-Resonance Excitation (SORI).	Непрерывное вне-резонансное возбуждение	
Tandem Mass Spectrometry (MS/MS or MS ⁿ)	Тандемная масс- спектрометрия (МС/МС или МС ⁿ)	
Thermospray/Ionization (TSI)	Ионизация при термо- распылении (ИТР)	
Thermal Ionization (TI) Mass Spectrometry	Масс-спектрометрия с термической ионизацией	Ионизация происходит при контакте с нагретой поверх- ностью
Thin-Layer Chromatography (TLC)	Тонкослойная хромато- графия (ТСХ)	
Thin-Layer Chromatography/Mass Spectrometry (TLC/MS)	Тонкослойная хроматография/масс- спектрометрия (ТСХ/МС)	

Английские термины (аббревиатура)	Предлагаемый перевод на русский язык (аббревиатура)	Некоторые пояснения и комментарии
Time Lag Focusing = Delayed Extraction	Фокусировка временной задержкой	Фокусировка ионов по энергии во времяпролетных масс-спектрометрах путем введения временной задержки между образованием иона и его ускорением
Time-of-Flight (TOF = ToF) Analyzer	Времяпролетный масс-анализатор	
Time-Resolved Photodissociation (TRPD)	Фотодиссоциация с разрешением по времени	
«Top-down» Approach	Подход «сверху-вниз»	При установлении точной структуры белков включает определение молекулярной массы целого белка и последующее применение всего арсенала методов tandemной масс-спектрометрии, а также по возможности масс-спектрометрии высокого разрешения
Total Ion Current (TIC)	Полный ионный ток (ПИТ)	
Triple Quadrupole Mass Spectrometer	Тройной квадрупольный масс-спектрометр	Масс-спектрометр содержит два квадрупольных масс-анализатора и расположенный между ними квадруполь, служащий ячейкой соударений
Ultra Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (UPLC/MS)	Ультразэффективная жидкостная хроматография/ масс-спектрометрия (УЭЖХ/МС)	
Ultrasound Ionization (USI)	Ультразвуковая ионизация	
Wien filter	Фильтр Вина	Скрещенные под прямым углом магнитное и электростатическое поля

Производство книг на заказ
Издательство «ТЕХНОСФЕРА»
тел.: (495) 234-01-10
e-mail: knigi@technosphere.ru

Реклама в книгах:

- модульная
- статьи

Подробная информация о книгах на сайте
<http://www.technosphere.ru>

Лебедев Альберт Тарасович

Масс-спектрометрия в органической химии

Издание второе, переработанное и дополненное

Компьютерная верстка – В.В. Павлова
Дизайн – М.А. Костарева
Корректор – О.Ч. Кохановская
Выпускающий редактор – О.Н. Кулешова
Ответственный за выпуск – С.А. Орлов

Подписано в печать 04.09.2015.

Формат 70х100/16. Печать офсетная.

Гарнитура Ньютон

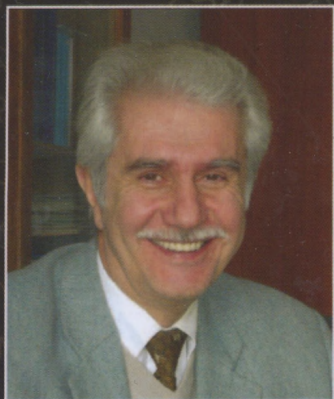
Печ.л. 44. Тираж 3000 экз. (1-ый завод 1500 экз.) Зак. № О-2500.

Бумага офсет №1, плотность 65 г/м²

Издательство «ТЕХНОСФЕРА»

Москва, ул. Краснопролетарская, д.16, стр.2

Отпечатано в полном соответствии с качеством
предоставленного электронного оригинал-макета в типографии
филиала АО «ТАТМЕДИА» «ПИК «Идел-Пресс»
420066, г. Казань, ул. Декабристов, 2



Лебедев Альберт Тарасович — д.х.н., профессор МГУ имени М.В.Ломоносова, член президиума Всероссийского масс-спектрометрического общества, член бюро Научного совета РАН по аналитической химии (председатель секции масс-спектрометрии), автор 5 монографий, 200 статей, более 200 аттестованных методик определения химических соединений в объектах окружающей среды.

В книге рассматриваются основы современной масс-спектрометрии органических соединений: методы ионизации и разделения ионов, физико-химические аспекты процессов масс-спектрометрической фрагментации, наиболее важные направления фрагментации важнейших классов органических соединений, аналитические аспекты масс-спектрометрии, а также области применения масс-спектрометрии.

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

ISBN 978-5-94836-409-4



9 785948 364094



ТЕХНОСФЕРА

