

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Ленина и  
Ордена Октябрьской Революции Институт геохимии и аналитической химии  
им. В.И. Вернадского Российской академии наук

*На правах рукописи*



**Гречников Александр Анатольевич**

**МЕТОД ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИИ/ИОНИЗАЦИИ НА ПОВЕРХНОСТИ  
КРЕМНИЕВЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ  
СОЕДИНЕНИЙ**

02.00.02 – Аналитическая химия

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание учёной степени  
доктора химических наук

Москва - 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	6
Глава 1. Методы лазерной десорбции-ионизации для определения органических соединений (обзор литературы).....	18
1.1. Метод селективной многофотонной ионизации.....	18
1.2. Прямая лазерная десорбция/ионизация.....	21
1.3. Лазерная десорбция/ионизация на основе ультратонких металлических порошков.....	25
1.4. Матрично активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI)	27
1.4.1. Матрицы для MALDI.....	28
1.4.2. Механизм образования ионов.....	30
1.4.3. MALDI в аналитической практике.....	33
1.5. Лазерная десорбция/ионизация, усиленная поверхностью (SELDI)...	35
1.6. Лазерная десорбция/ионизация, активированная поверхностью (SALDI).....	39
1.6.1. SALDI с использованием наночастиц.....	40
1.6.2. SALDI с использованием подложек.....	50
1.6.3. SALDI с использованием кремниевых подложек.....	52
1.6.3.1. Способы получения кремниевых подложек для SALDI.....	53
1.6.3.2. Механизм лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых подложек.....	57
1.6.3.3. Применение кремниевых подложек для определения органических соединений.....	60
1.7. Заключение.....	63
Глава 2. Факторы, определяющие эффективность лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на поверхности кремниевых материалов..	66
2.1. Экспериментальная установка.....	68
2.1.1. Масс-спектрометр с системой сбора данных.....	68
2.1.2. Оптическая система с лазерным блоком.....	70
2.1.3. Ввод пробы в масс-спектрометр.....	74
2.2. Исследование роли физико-химического состава поверхности кремниевых эмиттеров ионов.....	75
2.2.1. Влияние химического состава поверхности на эффективность лазерной десорбции/ионизации.....	76

2.2.2. Влияние структуры поверхности на эффективность лазерной десорбции/ионизации.....	85
2.2.3. Влияние природы материала подложки на эффективность лазерной десорбции/ионизации.....	92
2.3. Исследование роли лазерного излучения.....	94
2.3.1. Зависимость эффективности ионизации от плотности энергии лазерного излучения.....	95
2.3.2. Зависимость эффективности ионизации от длины волны лазерного излучения.....	100
2.4. Влияние паров воды на эффективность лазерной десорбции/ионизации.....	101
2.5. Влияние свойств определяемых соединений на эффективность лазерной десорбции/ионизации.....	104
2.5.1. Зависимость эффективности ионизации от величины основности соединения в газовой фазе.....	104
2.5.2. Влияние молекулярной массы соединения на величину выхода ионов.....	110
2.6. Заключение.....	111
Глава 3. Исследование механизма лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на поверхности кремниевых материалов.....	114
3.1. Расчет температуры поверхности эмиттеров ионов при воздействии импульсным лазерным излучением.....	117
3.2. Вода – источник протонов в процессе SALDI.....	127
3.3. Модификация поверхности эмиттера ионов полимерными кислотами.....	130
3.4. Лазерно-индуцированная ионизация.....	133
3.5. Лазерно-индуцированная десорбция.....	139
3.7. Заключение.....	142
Глава 4. Лазерная десорбция/ионизация для количественного определения летучих соединений.....	144
4.1. Разработка способов формирования активной поверхности кремниевых эмиттеров ионов.....	145
4.1.1. Способ получения пористого кремния.....	147
4.1.2. Аморфный кремний как эмиттер ионов.....	150
4.1.3. Способ лазерно-индуцированного формирования активного слоя.....	152
4.2. Сочетание лазерной десорбции/ионизации с термодесорбционным	

методом.....	155
4.2.1. Узел термодесорбционного ввода пробы.....	156
4.2.2. Определение эффективности ионизации химических соединений.....	157
4.2.3. Определение лекарственных соединений с использованием программируемой термодесорбции.....	161
4.2.4. Аналитические характеристики.....	165
4.2.5. Определение лекарственных соединений в моче без пробоподготовки.....	168
4.3. Сочетание лазерной десорбции/ионизации с газовой хроматографией.....	171
4.3.1. Узел сопряжения газового хроматографа с времяпролетным масс-спектрометром.....	171
4.3.2. Определение соединений группы фенилалкиламинов.....	173
4.3.3. Аналитические характеристики.....	178
4.3.4. Определение фенилалкиламинов в плазме крови.....	183
4.4. Исследование закономерностей фрагментации ионов в условиях лазерной десорбции/ионизации с переносом протона.....	185
4.5. Сравнение с электронной и химической ионизацией.....	193
4.6. Заключение.....	198
Глава 5. Лазерная десорбция/ионизация с нанесением пробы при атмосферном давлении для анализа атмосферы и для определения нелетучих соединений.....	199
5.1. Лазерная десорбция/ионизация для анализа атмосферы.....	201
5.1.1. Масс-спектрометрическая установка с узлом ввода пробы на основе вращающегося шара.....	201
5.1.2. Генератор микропотока паров органических соединений на основе массочувствительных пьезопреобразователей.....	204
5.1.2.1. Принцип действия генератора микропотока.....	206
5.1.2.2. Источник микропотока паров вещества.....	209
5.1.3. Определение содержания паров органических соединений в атмосферном воздухе.....	213
5.1.3.1. Выбор подложки - эмиттера ионов.....	213
5.1.3.2. Аналитические характеристики.....	216
5.2. Лазерная десорбция/ионизация для определения нелетучих соединений.....	219

5.2.1. Нанесение проб электрораспылением.....	220
5.2.2. Аналитические характеристики.....	223
5.2.3. Сочетание ионного источника SALDI с масс-анализатором Q-TOF.....	230
5.2.3.1. Масс-спектрометрическая установка.....	231
5.2.3.2. Сочетание с термодесорбционным способом ввода пробы.....	234
5.3. Сочетание ионного источника SALDI с масс-анализатором «Orbitrap».....	237
5.4. Заключение.....	240
Глава 6. Лазерная десорбция/ионизация для определения химических соединений с низкой величиной основности.....	242
6.1. Дериватизация определяемых соединений для улучшения метрологических характеристик лазерной десорбции/ионизации.....	243
6.1.1. Дериватизация молекул аналита для увеличения эффективности ионизации.....	243
6.1.2. Дериватизация ионов аналита.....	246
6.2. Режим регистрации отрицательно заряженных ионов.....	254
6.3. Лазерная десорбция/ионизация с переносом электрона.....	261
6.3.1. Исследованные комплексные соединений металлов.....	262
6.3.2. Выбор интенсивности лазерного излучения.....	264
6.3.3. Масс-спектры комплексных соединений металлов в условиях ионизации с переносом электрона.....	265
6.3.4. Сравнение характеристик LETDI с методами MALDI, LDI и электрораспыления.....	272
6.4. Заключение.....	276
Выводы.....	278
Список условных обозначений и сокращений.....	281
Список литературы.....	282
Список публикаций по теме диссертации.....	314

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы**

Масс-спектрометрические методы, основанные на ионизации атомов или химических соединений и детектировании образующихся ионов, относятся к числу наиболее информативных методов анализа, позволяющих решать самые сложные задачи в различных областях науки и техники. Важное место в современной масс-спектрометрии органических соединений занимают методы лазерной десорбции/ионизации, разработка которых началось в 70-е годы прошлого века и интенсивно продолжается в настоящее время. В ходе развития лазерной десорбционной масс-спектрометрии выделилось два подхода к ионизации определяемых соединений. Первый из них, матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI), основан на использовании матриц – нелетучих низкомолекулярных органических соединений, хорошо поглощающих лазерное излучение. MALDI сыграл особую роль в развитии масс-спектрометрии высокомолекулярных соединений и остается одним из основных методов определения таких аналитов.

Второй подход – лазерная десорбция/ионизация, активированная поверхностью (SALDI), базируется на использовании наночастиц или специально приготовленных подложек, хорошо поглощающих лазерное излучение, в качестве средства для ионизации органических соединений. В рамках метода анализируемую пробу наносят на поверхность наночастиц или специально приготовленной подложки, после чего воздействуют излучением импульсного лазера. Ионы, образующиеся в результате лазерной десорбции/ионизации, детектируются в масс-анализаторе. Важный стимул развития метода заключался в решении задачи определения органических и биоорганических соединений с относительно низкими молекулярными массами.

Отдельным вариантом SALDI является лазерная десорбция/ионизация на поверхности кремниевых материалов и, в частности, пористого кремния. Высокая чувствительность при определении различных классов органических соединений, «мягкая» ионизация с низкой степенью фрагментации ионов, простота исполнения характеризуют его как исключительно перспективный вариант лазерной масс-спектрометрии, который может быть использован для решения широкого круга

актуальных задач аналитической химии, медицины, экологии, обеспечения безопасности и многих других. Однако, несмотря на достигнутые успехи метода, существует ряд проблем на пути его дальнейшего развития.

Уже с начальных этапов развитие SALDI базировалось, в основном, на применении серийных лазерных масс-спектрометров, оборудованных ионным источником MALDI. Широкое распространение MALDI масс-спектрометров, с одной стороны, способствовало развитию метода SALDI, но, с другой стороны, во многом предопределило основное направление этого развития – определение нелетучих органических и биоорганических соединений с относительно низкими молекулярными массами. К числу низкомолекулярных относится большое количество важных на практике соединений, которые характеризуются относительно высокой летучестью или могут быть сравнительно легко переведены в газовую фазу путем нагрева. Традиционные варианты SALDI мало пригодны для их определения. Введение таких соединений в сферу аналитических задач, решаемых с помощью лазерной десорбции/ионизации, является важным и актуальным направлением развития метода SALDI.

Одной из наиболее сложных проблем в методе SALDI является проблема низкой воспроизводимости результатов анализа. Трудность количественного анализа связана, в первую очередь, с тем, что эффективность ионизации в SALDI критическим образом зависит от физико-химического состава поверхности эмиттера ионов. Разработка новых подходов, позволяющих проводить количественный анализ образцов сложного состава методом SALDI, представляет большой практический интерес.

Актуальной является также задача разработки новых теоретических представлений о механизме лазерной десорбции/ионизации органических соединений на поверхности кремниевых материалов. Известные из литературы модели SALDI, в которых существенная роль в процессе образования ионов отводится растворителю и особенностями структуры кремниевой подложки, предложены для описания процессов, протекающих при анализе растворов аналитов, и не согласуются с данными, полученными при определении летучих соединений.

Разработка новых теоретических и экспериментальных подходов к определению летучих соединений открывает перспективы дальнейшего развития традиционного для метода SALDI направления - анализа растворов нелетучих аналитов. В рамках этого развития можно выделить такие актуальные задачи, как создание новых, более эффективных вариантов аппаратного обеспечения метода; улучшение метрологических характеристик метода; увеличение количества классов химических соединений, которые можно детектировать с высокой чувствительностью методом SALDI.

### **Цели и задачи работы**

Разработка новых подходов и научных основ метода лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов для высокочувствительного количественного определения летучих органических соединений и дальнейшее развитие метода для определения нелетучих органических соединений в пробах сложного состава.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- Теоретическое и экспериментальное исследование основных факторов, определяющих эффективность лазерной десорбции/ионизации, активированной поверхностью: физико-химических свойств материала подложки – эмиттера ионов, параметров лазерного излучения и химических свойств определяемых соединений.
- Разработка модели, описывающей процессы лазерно-индуцируемой ионизации и десорбции химических соединений на поверхности кремниевых материалов.
- Разработка новых способов формирования активного поверхностного слоя кремниевых подложек, обеспечивающих высокую воспроизводимость ионизационных свойств эмиттеров ионов и высокую чувствительность анализа.
- Создание новых вариантов приборной реализации метода, основанных на сочетании времяпролетного масс-анализатора, оборудованного ионным источником SALDI, с термодесорбционным методом и газовой хроматографией.
- Разработка методов высокочувствительного количественного определения летучих органических соединений и оценка основных аналитических



характеристик методов – эффективности ионизации, предела обнаружения, чувствительности, воспроизводимости и динамического диапазона.

- Исследование системы ввода пробы, позволяющей согласовать импульсный режим лазерной десорбции/ионизации с непрерывным отбором пробы из газовой фазы и разработка на этой основе метода on-line анализа газовых сред, и в частности, атмосферного воздуха.

- Развитие новых методологических подходов и инструментальных вариантов метода SALDI для количественного определения нелетучих химических соединений.

- Обоснование и исследование путей дальнейшего развития лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов, позволяющих улучшить метрологические характеристики метода и увеличить количество классов химических соединений, которые можно детектировать с высокой чувствительностью.

### **Научная новизна**

В работе развивается новое направление лазерной масс-спектрометрии – лазерная десорбция/ионизация, активированная кремниевой поверхностью, для определения летучих органических соединений. Развитие направления состоит в разработке теоретических представлений о механизме лазерной десорбции/ионизации на кремниевых поверхностях; создании новых приборов и устройств для инструментальной реализации метода; разработке методов количественного анализа органических соединений в различных пробах.

В результате исследований получены следующие новые результаты.

Установлены зависимости эффективности ионизации органических соединений в условиях лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов от плотности энергии лазерного излучения, давления паров воды в ионном источнике масс-спектрометра, молекулярной массы и величины основности аналитов в газовой фазе. Найдены оптимальные значения этих параметров для определения летучих органических соединений.

Определена роль факторов, влияющих на протекание процессов лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов: морфологии поверхности и структуры приповерхностного слоя, химического состава

поверхности, лазерного излучения, паров воды, химических свойств аналита. Предложена модель, которая описывает процессы ионизации с переносом протона и десорбции ионов.

Предложены новые эмиттеры ионов и разработаны простые способы их формирования, обеспечивающие однородность и высокую воспроизводимость ионизационных свойств, а также высокую чувствительность анализа.

Разработаны методы количественного определения органических соединений, основанные на сочетании лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов с термодесорбционным методом и газовой хроматографией. Определены основные аналитические параметры разработанных методов на примере определения ряда лекарственных соединений и фенилалкиламинов, изучены закономерности фрагментации аналитов. Методы апробированы для анализа биологических жидкостей.

Разработан метод определения органических соединений в атмосферном воздухе, позволяющий осуществлять непрерывный контроль химического состава атмосферы. Создан генератор микропотока паров химических соединений на основе массочувствительных кварцевых пьезорезонаторов. Формируемый микропоток паров веществ используется в условиях on-line анализа воздуха и других газовых сред.

Разработан способ количественного анализа растворов нелетучих органических соединений. Найдены его основные аналитические характеристики при определении ряда лекарственных веществ.

Исследованы новые варианты приборной реализации лазерной десорбции/ионизации, активированной поверхностью, для определения нелетучих органических соединений, основанные на сочетании ионного источника SALDI с масс-анализаторами типа Q-TOF и «Orbitrap» с прямым вводом ионов.

Предложены подходы к увеличению числа классов органических соединений, которые можно ионизовать в условиях SALDI: химическая модификация молекул аналита с целью их перевода в форму, удобную для лазерной десорбции/ионизации, и использование других механизмов лазерно-индуцированной ионизации на поверхности эмиттера ионов. Показано, что метод SALDI может быть использован для высокочувствительного определения

нитроароматических соединений в режиме регистрации отрицательных ионов. Предложен новый вариант лазерной десорбции/ионизации, активированной поверхностью, - инициированная лазерным излучением ионизация с переносом электрона. Получены результаты по применению нового варианта метода для детектирования и идентификации комплексных соединений металлов.

### **Практическая значимость**

На основе исследования и оптимизации факторов, определяющих эффективность ионизации органических соединений, предложены новые материалы в качестве эмиттеров ионов и найдены условия, обеспечивающие высокую воспроизводимость, чувствительность и селективность анализа методом лазерной десорбции/ионизации, активируемой поверхностью.

Разработанные масс-спектрометрические методы, основанные на лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов, применимы для высокочувствительного определения и идентификации широкого круга химических соединений, которые могут быть переведены в газовую фазу без разложения путем нагрева. Методы апробированы для определения лекарственных соединений в биологических пробах. Продемонстрирована возможность прямого определения содержания лекарств в моче без предварительной пробоподготовки с использованием сочетания SALDI с термодесорбционным вводом проб. Предложена методика определения соединений в плазме крови на основе сочетания SALDI с газовой хроматографией. Достигнутые пределы обнаружения варьируются для различных исследованных соединений от 2 до 400 пг/мл, что до трех порядков величины ниже, чем при использовании стандартных масс-спектрометрических методов с электронной и химической ионизацией.

Разработан метод определения органических соединений в атмосферном воздухе, позволяющий осуществлять непрерывный контроль химического состава атмосферы и проводить определение высокоосновных загрязнителей в воздухе с концентрациями на уровне 100 ppt и ниже.

Предложенный способ определения нелетучих соединений, основанный на сочетании ионного источника SALDI с масс-анализатором Q-TOF и системой ввода пробы с вращающимся шаром, позволяет проводить количественный анализ

лекарственных соединений в биологических образцах на уровне 1 пг вещества, введенного в прибор.

Показано, что SALDI является высокочувствительным методом определения нитроароматических соединений с пределами обнаружения аналитов до трех порядков величины ниже, чем при использовании традиционных масс-спектрометрических методов.

Разработанный метод лазерно-индуцированной десорбции/ионизации с переносом электрона (LETDI) применим для высокочувствительного масс-спектрометрического определения металлов и комплексных соединений металлов, в том числе, лекарственных препаратов с противоопухолевой активностью, комплексов с органическими реагентами и комплексов с биолигандами. По эффективности ионизации исследованных комплексных соединений металлов метод LETDI превосходит стандартные масс-спектрометрические методы MALDI и электрораспылительной ионизации более чем на три порядка величины.

Спектр потенциальных областей применения результатов работы весьма широк. Разработанные методы и подходы могут применяться в медицинской практике для терапевтического лекарственного мониторинга, для решения задач фармакокинетики, для развития методов экологического контроля, в системах безопасности, в аналитической практике для определения следовых количеств органических соединений в природных и промышленных объектах.

**На защиту выносятся:**

1. Подход к обнаружению органических соединений методом SALDI, основанный на адсорбции из газовой фазы молекул аналита на поверхности специально приготовленной кремниевой подложки, воздействию на подложку импульсным лазерным излучением и детектировании ионов.

2. Результаты исследования факторов, определяющих процессы лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на поверхности кремниевых материалов. Зависимости эффективности ионизации от плотности энергии излучения для различных длин волн, давления паров воды в ионном источнике, основности органических соединений в газовой фазе.

3. Модель лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на поверхности кремниевых материалов.

4. Способы формирования активной поверхности кремниевых материалов для лазерной десорбции/ионизации органических соединений. Новые кремниевые материалы для использования в качестве эмиттеров ионов в процессе SALDI.

5. Методы масс-спектрометрического определения органических соединений, основанные на сочетании лазерной десорбции/ионизации, активированной поверхностью, с термодесорбционным методом с газовой хроматографией. Основанные на этих методах способы определения лекарственных соединений в моче и плазме крови. Закономерности фрагментации определяемых соединений на примере фенилалкиламинов.

6. Метод определения органических соединений в атмосферном воздухе и других газовых средах, основанный на сочетании ионного источника SALDI и системы ввода пробы с вращающимся шаром. Применение метода для непрерывного контроля химического состава атмосферы.

7. Генератор микропотока на основе массочувствительных кварцевых пьезорезонаторов и его использование в масс-спектрометрическом анализе атмосферного воздуха методом SALDI.

8. Способ определения нелетучих соединений, включающий нанесение аналита на подложку путем электрораспыления анализируемого раствора, перемещение подложки с нанесенной пробой в вакуумную камеру масс-анализатора с использованием шарового интерфейса и лазерную десорбцию/ионизацию определяемых соединений. Результаты исследования новых вариантов инструментальной реализации метода, основанные на сочетании SALDI с масс-анализаторами типа Q-TOF и Orbitrap для определения нелетучих соединений.

9. Подходы к определению органических соединений с низкой величиной основности методом SALDI: дериватизация молекул соединений с низкой величиной основности и дериватизация образующихся в процессе SALDI ионов; лазерная десорбция/ионизация, активированная поверхностью, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов; инициированная лазерным излучением ионизация путем переноса электрона. Результаты применения этих подходов для определения соединений с амидной группой, нитроароматических соединений и комплексных соединений металлов.

### Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях, съездах и семинарах: Всероссийская конференция «Аналитика России» (Москва, РФ, 2004 г.), II-ая международная семинар-школа «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии» (Звенигород, РФ, 2004 г.), International conference «Analytical chemistry and chemical analysis» (Kiev, Ukraine, 2005 г.), Всероссийская конференция с международным участием "Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы" (Москва, РФ, 2005 г.), International Congress on Analytical Sciences ICAS-2006, Moscow, RF, 2006 г.), 40. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (Bremen, Germany, 2007 г.), International conference on laser applications in life sciences LALS-2007 (Moscow, RF, 2007), II Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, РФ, 2007 г.), XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Москва, РФ, 2007 г.), 15-th International School on Condensed Matter Physics «Interfaces, thin films and Biomolecular layers» (Varna, Bulgaria, 2008 г.), III Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, РФ, 2009 г.), 57-th ASMS Conference on Mass Spectrometry (Philadelphia, USA, 2009 г.), 7-th BPU General Conference (Alexandroupolis, Greece, 2009 г.), 16-th International Summer School on Vacuum, Electron and Ion Technologies (Sunny Beach, Bulgaria, 2009 г.), Съезд аналитиков России "Аналитическая химия – новые методы и возможности" (Москва, РФ, 2010 г.), 16-th International School on Condensed Matter Physics "Progress in Solid State and Molecular Electronics Ionics and Photonics" (Varna, Bulgaria, 2010 г.), VIII Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2011" (Архангельск, РФ, 2011 г.), 7-th International Symposium on Technetium and Rhenium Science and Utilization (ISTR-2011) (Moscow, RF, 2011 г.), IV Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, РФ, 2009 г.), III Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, РФ, 2011 г.), Desorption-2012 (Rauischholzhausen, Germany, 2012 г.), 10-th International Seminar on Mathematical Models and Modeling in Laser-Plasma Processes (Petrovac, Montenegro, 2012 г.), 17-th

International School on Condensed Matter Physics (Varna, Bulgaria, 2012 г.), Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, РФ, 2012 г.), XXXVIII Colloquium Spectroscopicum Internationale (Tromsø, Norway, 2013 г.), Innovations in Mass Spectrometry Instrumentation Conference (Saint-Petersburg, RF, 2013 г.), Второй съезд аналитиков России (Москва, РФ, 2013 г.), VI Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, РФ, 2013 г.), 18-th International School on Condensed Matter Physics (Varna, Bulgaria, 2014 г.), II Всероссийская конференция с международным участием по аналитической спектроскопии (Краснодар, РФ, 2012 г.), 19-th International Summer School on Vacuum, Electron and Ion Technologies (Sozopol, Bulgaria, 2015 г.), I Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина» (Москва, РФ, 2015 г.), Третий съезд аналитиков России (Москва, РФ, 2017 г.) и ряд других.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 44 работы, в том числе 33 статьи и 11 патентов.

### **Вклад автора**

Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включённые в диссертацию, состоит в формировании направления и общей постановке задач, разработке подходов к их решению, руководстве или непосредственном участии в экспериментальных исследованиях, разработке теоретических решений, анализе, интерпретации, обобщении и оформлении полученных результатов.

### **Структура и объём работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, пяти глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 318 страницах текста, содержит 99 рисунков и 14 таблиц.

**Во введении** сформулирована актуальность темы диссертационной работы, поставлены цели и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость, а также представлены положения, выносимые на защиту.

**В первой главе** представлен обзор литературы, посвященной применению методов лазерной десорбции/ионизации в масс-спектрометрическом анализе,

рассмотрены аналитические возможности и ограничения известных методов. Особое внимание уделено методу лазерной десорбции/ионизации, активированной поверхностью (SALDI). Рассмотрены направления дальнейшего развития метода.

**Во второй главе** приведены результаты исследования основных факторов, определяющих процессы лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов: морфологии поверхности и структуры приповерхностного слоя, химического состава поверхности, лазерного излучения, давления паров воды в ионном источнике, основности аналитов. Установлены закономерности, определяющие эффективность ионизации, найдены оптимальные значения параметров для определения летучих органических соединений.

**В третьей главе** представлены результаты теоретических и экспериментальных исследований механизма лазерной десорбции/ионизации. Проведено численное моделирование температуры поверхности эмиттеров ионов при воздействии импульсного лазерного излучения, выполнены квантово-механические расчёты, моделирующие процессы переноса протона к молекуле, адсорбированной на кремниевой поверхности и последующей десорбции образующихся ионов. Предложена модель лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на поверхности кремниевых материалов.

**Четвертая глава** посвящена разработке методов количественного определения летучих органических соединений. Рассмотрены новые способы формирования активной поверхности кремниевых эмиттеров ионов, обеспечивающие высокую воспроизводимость ионизационных свойств и высокую чувствительность анализа. Предложены новые варианты инструментальной реализации метода SALDI, основанные на сочетании лазерной десорбции/ионизации с термодесорбционным методом и газовой хроматографией. Определены основные аналитические параметры разработанных методов при определении фенилалкиламинов и ряда лекарственных соединений: эффективность ионизации, чувствительность, предел обнаружения, динамический диапазон. Изучены закономерности фрагментации ионов аналитов.

**Пятая глава** посвящена развитию новых методологических подходов и инструментальных вариантов лазерной десорбции/ионизации для анализа атмосферы и для определения нелетучих соединений. Представлен метод



определения органических соединений в атмосферном воздухе, позволяющий осуществлять непрерывный контроль химического состава атмосферы. Рассмотрен генератор микропотока паров химических соединений на основе массочувствительных кварцевых пьезорезонаторов. Разработан способ анализа растворов нелетучих соединений и приведены его основные аналитические параметры при определении ряда лекарственных веществ.

**В шестой главе** рассмотрены некоторые перспективные направления дальнейшего развития метода SALDI: дериватизация молекул соединений с низкой величиной основности и дериватизация образующихся в процессе SALDI ионов; лазерная десорбция/ионизация, активированная кремниевой поверхностью, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов; инициированная лазерным излучением ионизация с переносом электрона.

## Глава 1. Обзор литературы.

### Методы лазерной десорбции/ионизации для определения органических соединений

Развитие лазерной техники в последние десятилетия привело к появлению новых подходов и методов в масс-спектрометрии органических соединений. Вопросы ионизации атомов и молекул с помощью лазерного излучения стали изучаться практически сразу после создания первых экспериментальных лазерных установок. Уже в 1963 г. было показано, что воздействие сфокусированного излучения импульсного рубинового лазера на поверхность различных твердотельных материалов приводит к эмиссии ионов, которые могут быть зарегистрированы с помощью масс-спектрометра [1]. Однако в течение следующих двух десятилетий развитие лазерной масс-спектрометрии шло, в основном, в направлении разработки методов ионизации вещества, находящегося в газовой фазе. Одним из стимулов такого развития являлась задача разделения изотопов. Важным достижением в этом направлении стало создание метода селективной многофотонной ионизации.

#### 1.1. Метод селективной многофотонной ионизации

В основе процесса селективной фотоионизации атомов лежит способность интенсивного лазерного излучения при резонансном поглощении существенно менять соотношения населенностей на уровнях энергии, связанных резонансным переходом [2]. Ионизация происходит путем резонансного поглощения лазерного излучения, приводящего к электронному возбуждению атома или молекулы, и последующей фотоионизации. Первые экспериментальные результаты по двухступенчатой ионизации атомов на примере ионизации и детектировании атомов рубидия Rb были опубликованы в работе [3]. В экспериментах использовали две различные лазерные системы: перестраиваемый лазер на красителях и рубиновый импульсный лазер. Излучение перестраиваемого лазера настраивали точно в резонанс перехода  $5s^2S_{1/2} \rightarrow 5p^2P_{1/2}$ , что приводило к электронному возбуждению атомов Rb. Фотоионизацию возбужденных атомов осуществляли воздействием излучения второй гармоники рубинового лазера. Энергия кванта излучения второй гармоники составляет 3.57 эВ, что достаточно

для фотоионизации возбужденного атома, потенциал ионизации которого равен 2.62 эВ, но недостаточно для фотоионизации атома из основного состояния с потенциалом ионизации 4.18 эВ.

Прямым обобщением метода двухступенчатой фотоионизации является многоступенчатая, в которой осуществляется последовательное резонансное возбуждение атома или молекулы с последующей фотоионизацией из верхнего возбуждённого состояния. В качестве примера на рисунке 1.1 показан характерный вид электронных уровней и оптических переходов между ними для трёхступенчатой селективной фотоионизации (следует отметить, что в методе трёхступенчатой фотоионизации во многих случаях может быть использовано излучение только двух длин волн путем соблюдения условия  $\omega_1 = \omega_3$ ).

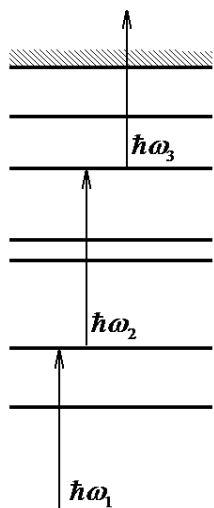


Рис. 1.1. Схема трёхступенчатой селективной фотоионизации [4].

Такая схема позволяет достигать высоких значений эффективности ионизации, обеспечивая при этом и высокую селективность. Эффективность фотоионизации можно определить как отношение количества частиц, ионизированных за один лазерный импульс, к общему числу частиц, находящихся в области ионизации [4]. Вследствие резонансного характера поглощения и относительно высокой плотности энергии лазерного излучения в области ионизации возбуждение атома или молекулы за счёт поглощения происходит очень эффективно, что при достаточно высокой плотности излучения приводит к насыщению поглощения. При этом эффективность ионизации может быть близка к единице [4, 5]. В то же время, различное расположение системы дискретных

уровней возбуждённых состояний разных молекул позволяет реализовать селективное воздействие на смесь различных молекул и ионизовать только молекулы определённого вида.

Однако, наряду с достоинствами, метод селективной многофотонной ионизации имеет и ряд принципиальных недостатков. Одна из наиболее серьезных проблем – это высокие значения временной и пространственной скважности. Под временной скважностью понимают тот факт, что процессы селективной фотоионизации протекают только во время действия излучения. Кроме того, ионизация имеет место только в небольшом объёме, соответствующем области пересечения фокальных перетяжек двух лазеров, что обуславливает пространственную скважность. Поэтому, несмотря на исключительно высокую эффективность ионизации, ионизируется только малая часть молекул, введенных в ионный источник. Селективность воздействия лазерного излучения также приводит к снижению доли ионизируемых молекул. Селективное воздействие предполагает ограничение на допустимую ширину спектра излучения: такая ширина, как правило, меньше, чем ширина неоднородного уширения линий переходов. Уменьшить величину неоднородного уширения можно, используя охлаждение газа в камере ионизации, но это приводит к дополнительному усложнению метода. Другая немаловажная проблема – это высокая стоимость, громоздкость и сложность лазерных систем, которые в состоянии обеспечить плавно перестраиваемое излучение высокой мощности в ультрафиолетовой (УФ) области.

Метод селективной многофотонной ионизации развивался только для ионизации вещества, находящегося в газовой фазе. Очевидная причина этому заключается в том, что в газовой фазе интенсивность взаимодействия частиц между собой относительно мала. Релаксационные процессы в газе идут со скоростью, определяемой частотой столкновений, и соответствующие значения времени релаксации достаточно велики для того, чтобы способствовать сохранению селективности. Применение же этого метода для анализа состава конденсированных сред наталкивалось на проблему селективности, поскольку отдельные дискретные состояния молекул в конденсированном состоянии размываются.

В целом, несмотря на высокие значения эффективности ионизации и селективности, метод селективной многофотонной ионизации не получил широкого распространения в практике масс-спектрометрического анализа и применялся лишь для ионизации атомов и относительно простых химических соединений, а приборная реализация метода осталась на уровне единичных лабораторных установок.

## 1.2. Прямая лазерная десорбция/ионизация

В 1980-е годы основной фокус исследований сместился в область лазерной десорбционной масс-спектрометрии, в которой лазерное излучение используется для испарения и ионизации вещества, находящегося в конденсированном состоянии. Быстрому развитию этого направления способствовала разработка и последующая коммерциализация приборов типа «LAMMA» – лазерного масс-анализатора микропроб [6]. Принципиальная схема прибора «LAMMA-500» приведена на рис. 1.2 [7].

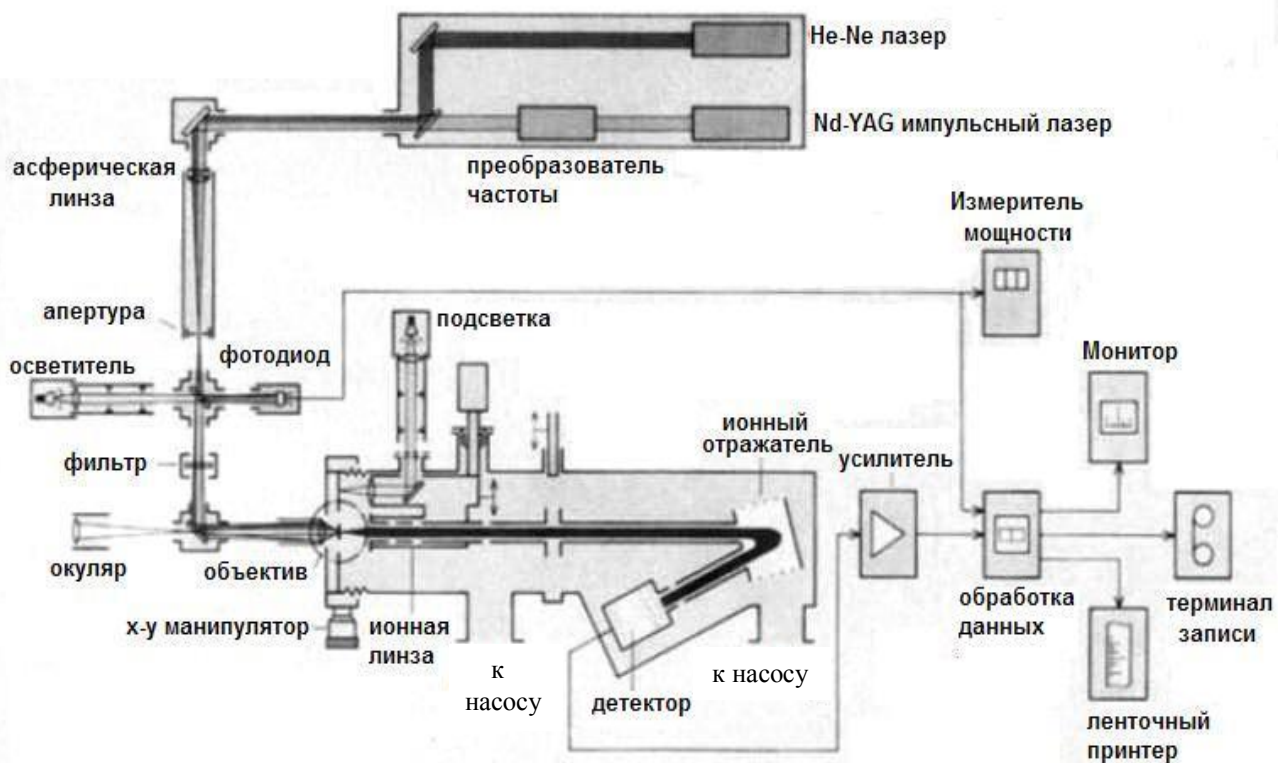


Рис. 1.2. Схема оптического и ионного трактов лазерного масс-анализатора микропроб «LAMMA-500».

В приборе был впервые использован времяпролетный масс-анализатор типа рефлектрон, изобретенный за несколько лет до выпуска «LAMMA» Б.А.Мамыриным [8]. Для импульсного лазерного испарения пробы в приборе первоначально использовалась вторая гармоника излучения рубинового лазера (длина волны 347 нм), затем – четвертая гармоника излучения Nd:YAG лазера (длина волны 266 нм). Анализируемую пробу (например, металлическую пластину или срез биологической ткани) устанавливали в ионном источнике масс-анализатора. На поверхность пробы фокусировали лазерное излучение в пятно диаметром  $0.5 \div 1$  мкм. Интенсивность излучения регулировали с помощью аттенюатора, а максимальная плотность мощности в фокальном пятне составляла величину порядка  $10^{11}$  Вт/см<sup>2</sup>. Воздействие излучением такой мощности достаточно для абляции пробы – взрывного испарения вещества верхних слоёв образца в газовую фазу. При этом над поверхностью образца формируется слабоионизованная плазма, масс-спектр ионов которой регистрируется с помощью времяпролетного рефлектрона.

Приборы типа «LAMMA» применялись, главным образом, для элементного анализа твердых тел. Однако уже в 1978 г. П.Кистемакером с соавторами было продемонстрировано, что лазерная десорбционная масс-спектрометрия может быть использована для ионизации и детектирования нелетучих органических молекул [9]. В рамках предложенного ими подхода раствор аналита наносят на металлическую подложку. После испарения растворителя подложку помещают в ионный источник масс-спектрометра, и фокусируют на ее поверхность излучение импульсного лазера, под воздействием которого нанесенные соединения переводятся в газовую фазу и ионизируются. Ионизация чаще достигается путем катионизации – присоединения молекулой катиона металла ( $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$ ), присутствующего или специально добавленного в пробу в виде соли. Высокоосновные соединения, например аргинин и гистидин, могут также ионизоваться путем протонирования [10]. Группе П.Кистемакера достаточно долгое время принадлежал рекорд по максимальной массе ионов химического соединения, зарегистрированных в масс-спектре (ионы дигитонина состава  $(\text{M}+\text{Na})^+$  с массой 1251 а.е.м.) [9].

В дальнейшем это направление лазерной масс-спектрометрии получило название «лазерная десорбция/ионизация» (laser desorption/ionization, LDI), поскольку воздействие лазерного излучения приводит как к десорбции, так и к последующей ионизации молекул в газовой фазе. В настоящее время вариант LDI, предложенный в работе [9] и обычно называемый “прямой лазерной десорбцией-ионизацией” (direct LDI), используется сравнительно редко – главным образом для ионизации молекул, поглощающих лазерное излучение. В частности, метод LDI применяли для идентификации различных порфиринов в биологических жидкостях [11] и нефтях [12], для исследования производных триглицеридов [13] и триборанов [14], для выявления распределения по массам лигнинов, выделенных из древесины ели и березы [15] и содержащихся в биотопливе, полученном из биомассы путем быстрого пиролиза [16], для детектирования полициклических ароматических углеводородов [17] и замещенных полициклических карбоновых кислот [18]. С помощью метода LDI охарактеризованы фенольные кислоты и природный фитоалексин ресвератрол в красных винах различных сортов [19], проведен мониторинг реакций с участием частиц и аэрозолей в воздухе [20], изучена структура молекул липидов, выделенных из различных бактерий [21]. С использованием алюминиевой фольги в качестве металлической подложки зарегистрированы LDI масс-спектры моносахаридов, пептидов и жирных кислот [22]. Отдельно следует отметить работы, посвященные исследованию комплексных соединений металлов. Метод прямой LDI был использован для идентификации неорганических комплексов иридия и рутения [23], комплексов цинка с азометинами [24], осмия и рутения с бипиридинами [25], палладия и цинка с бис(1-нафтиламино)аценафтенном, различных комплексных соединений рения [26], платины и рутения [27].

В большинстве экспериментов анализируемую пробу наносили на подложку в виде пленки толщиной от единиц до сотен и тысяч монослоев, а ионы детектировали в режиме регистрации положительных ионов. В ряде работ (например, [28, 29]) детектирование проводили в режиме регистрации отрицательных ионов. При этом основным каналом ионизации является депротонирование молекул определяемых соединений. Требования к подложке обусловлены простым условием: подложка должна быть выполнена из инертного,

проводящего и хорошо поглощающего излучение материала, который позволяет быстро преобразовать энергию излучения в тепловую энергию молекул, находящихся на его поверхности. В качестве такого материала обычно используют нержавеющую сталь, в редких случаях – другие металлы.

LDI обычно рассматривается как метод качественного анализа. Лишь в небольшом числе работ были произведены оценки пределов обнаружения и других метрологических параметров. Так, в работе [10] на примере определения аминокислот показано, что пределы обнаружения большинства исследованных аналитов составляют величину порядка  $1 \text{ нг/см}^2$  (эта величина примерно соответствует нескольким десятым пикомоль вещества в лазерном пятне). Было также найдено, что ионный сигнал прямо пропорционален количеству нанесенного на подложку вещества в диапазоне двух порядков величины, а типичное значение относительного стандартного отклонения для 14 измерений ( $n=14$ ) составляет 10%. Оценка чувствительности LDI при определении фенольных кислот и ресвератрола, проведенная в работе [19], показала, что пределы обнаружения восьми исследованных аналитов варьируется в диапазоне  $0.12 \div 87 \text{ пмоль}$  в лазерном пятне, что при использованном способе нанесения пробы соответствует концентрациям  $0.1 \div 60 \text{ мкг/мл}$ . При этом предел обнаружения ресвератрола составил  $0.02 \text{ пмоль}$  в пятне. Пределы обнаружения комплексных соединений платины (II) с дихлорид(1,2-диаминоциклогексаном) и рутения (III) с дихлоридбис-(бипиридином), определенные в работе [27] составили, соответственно,  $27 \text{ мкг/мл}$  и  $1 \text{ мкг/мл}$ .

К достоинствам метода прямой LDI следует отнести простоту способа пробоподготовки, малое время анализа, малый объем анализируемой пробы. Однако такие недостатки, как низкая чувствительность, ограничение по молекулярной массе десорбируемых соединений, а также в ряде случаев значительная фрагментация образующихся ионов сужают область применения метода до решения отдельных частных задач. Тем не менее, сам подход, основанный на лазерной десорбции-ионизации, оказался плодотворным и получил дальнейшее развитие в середине 1980-х годов, когда были предложены два принципиально новых варианта LDI. Их отличительная особенность заключалась в



том, что кроме аналита, на поверхность металлической подложки наносили также специальную матрицу, хорошо поглощающую лазерное излучение.

### **1.3. Лазерная десорбция/ионизация на основе ультратонких металлических порошков**

Одна из причин ограничения по массе десорбируемых соединений в процессе термодесорбции – это диссоциация молекул аналита на поверхности при нагреве. Разложение высокомолекулярных соединений обусловлено тем, что константа скорости диссоциации для таких соединений превышает константу скорости их испарения. Однако эти константы имеют различные температурные зависимости (вследствие различия энергий активации), и при высоких температурах может быть достигнуто условие, при котором константа скорости процесса испарения будет заметно выше константы скорости разложения. Поэтому одно из направлений развития LDI заключалось в решении задачи обеспечения очень быстрого нагрева материала подложки с целью десорбции/ионизации высокомолекулярных соединений. Исследования в этой области привели к идее использования «ультратонких металлических порошков» – металлических наночастиц с характерным размером в несколько десятков нанометров. По сравнению с монолитными подложками, наночастицы позволяют увеличить эффективность использования лазерного излучения, как это иллюстрирует рис. 1.3а [30], и тем самым, значительно увеличить скорость нагрева материала при лазерном воздействии.

Следующий важный шаг сделал К.Танака, который предложил использовать суспензии «ультратонких металлических порошков» в глицерине в качестве матрицы, обеспечивающей при лазерном воздействии десорбцию и ионизацию макромолекул. Принцип предложенного метода иллюстрирует рис. 1.3б [30]. В суспензию наночастиц вводится определяемое соединение, после чего полученную смесь наносят на металлическую подложку – держатель, и помещают в ионный источник масс-спектрометра. Воздействие лазерного излучения приводит к импульсному испарению (абляции) матрицы и последующей ионизации молекул аналита в газовой фазе. Уже в первых экспериментах на примере определения витамина В12 было показано, что использование суспензии наночастиц кобальта

(средний диаметр 30 нм) в глицерине позволяет перевести тяжелые молекулы аналита в газовую фазу без разложения, а также обеспечивает их мягкую ионизацию.

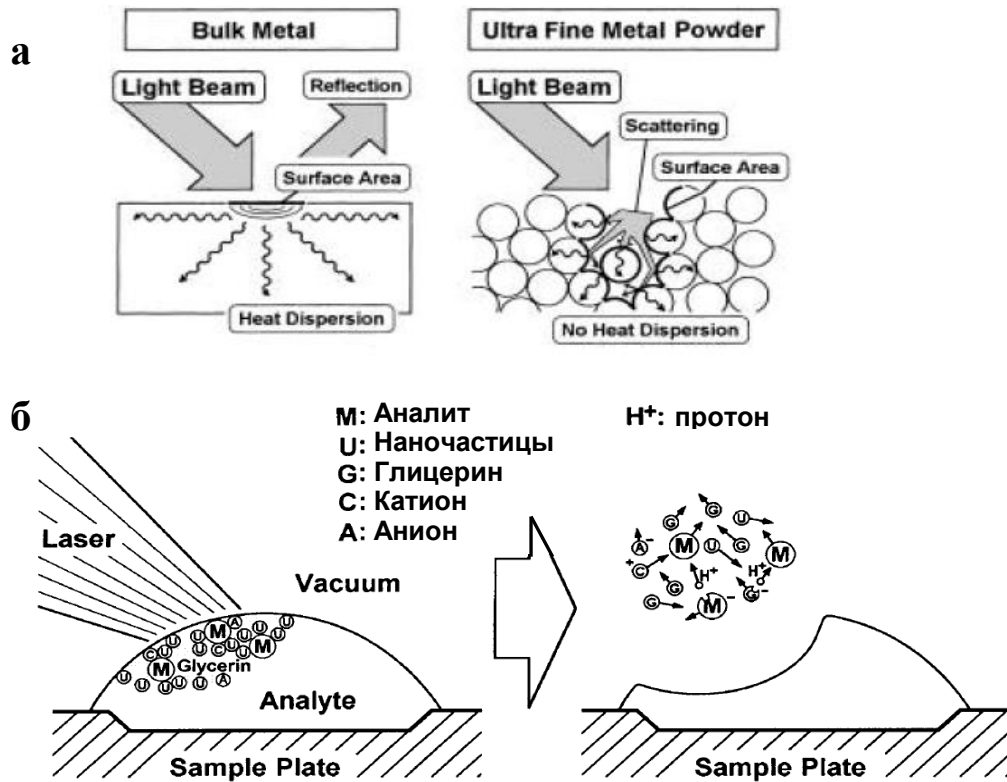


Рис. 1.3. Различие между процессами поглощения лазерного излучения монолитной металлической подложкой и металлическими наночастицами (а). Принцип мягкой десорбции-ионизации макромолекул с использованием суспензии «ультратонких металлических порошков» в глицерине (б) [30].

Первая научная публикация по новому методу вышла в свет в 1987 г. [31], хотя еще в 1985 г. была подана заявка на получение патента Японии (патент №JP01769145). Более детально результаты исследований изложены в работе [32]. В экспериментах использовали импульсный азотный лазер с длиной волны 337 нм в сочетании с времяпролетным масс-спектрометром (Shimadzu LAMS-50K). В качестве образцов для анализа и калибровки использовали смесь полиэтиленгликолей (ПЭГ 200, 400, 600, 1000, 1500 и 2000), фермент химотрипсиноген с молекулярной массой 25717 а.е.м., а также лизоцим из белка куриных яиц, представляющий собой небольшой фермент с молекулярной массой

14306 а.е.м., состоящий из 129 аминокислотных остатков. Структура белка лизоцима к этому времени была известна, что упрощало расшифровку масс-спектра. Полученный с использованием матрицы масс-спектр лизоцима содержал набор однозарядных и двухзарядных кластерных ионов аналита (размером от 2 до 7), и на момент публикации статьи это был первый зарегистрированный масс-спектр, содержащий ионы с отношением массы к заряду  $m/z$ , превышающим 100000. Точность определения масс на использованном в работе масс-анализаторе была недостаточна для того, чтобы однозначно определить вид ионов, однако авторы предположили, что ионизация в большинстве случаев достигается путем катионизации.

Возможность регистрации масс-спектров белков означала, что эти важнейшие биоорганические соединения могут быть введены в сферу задач, решаемых с помощью масс-спектрометрии. В 2002 г. К.Танака был награжден Нобелевской премией по химии “за разработку методов мягкой лазерной десорбции для масс-спектрометрического анализа биологических макромолекул”. Однако в аналитической практике более эффективным для детектирования тяжелых молекул оказался другой метод LDI, основанный на использовании матрицы – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация).

#### **1.4. Матрично активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI)**

Первая работа, посвященная методу MALDI, была опубликована в 1985 г. [33]. Авторы работы Ф.Хилленкамп и М.Карас исследовали процессы LDI аминокислот с использованием прибора «LAMMA» и установили, что добавление триптофана к чистому раствору аланина позволяет увеличить эффективность ионизации аланина и уменьшить плотность лазерной энергии. Авторы предположили, что триптофан, хорошо поглощающий лазерное излучение на длине волны 266 нм (четвертая гармоника основного излучения Nd:YAG лазера), выполняет роль матрицы, обеспечивающей эффективную десорбцию/ионизацию аланина. Целенаправленный поиск эффективных матриц привел к идее использования низкомолекулярных нелетучих органических кислот. Уже в следующей статье [34] был продемонстрирован масс-спектр мелиттина (пептида

пчелиного яда) с молекулярной массой 2845 а.е.м., полученный с использованием в качестве матрицы никотиновой кислоты. Масс-спектры белков с массами до 100000 а.е.м. и выше были опубликованы в работах [35, 36]. Дальнейшие исследования в этой области сделали MALDI одним из основных масс-спектрометрических методов определения нелетучих высокомолекулярных соединений, а также привели к появлению целой серии коммерческих приборов для научного и рутинного использования в лабораториях и на производстве.

#### ***1.4.1. Матрицы для MALDI***

В основе метода MALDI лежит облучение лазерным излучением смеси вещества, сокристаллизованного с органической матрицей, в результате которого происходит электронное или колебательное возбуждение и ионизация молекул матрицы. Матрица играет ключевую роль в процессе MALDI, выполняя две основные функции: перевод молекул определяемых соединений в газовую фазу и их ионизацию. Воздействие лазерного излучения приводит к импульсному испарению (абляции) матрицы и сокристаллизованного с ней определяемого соединения. Над поверхностью образца формируется область сравнительно высокого давления (“факел”) – облако ионов и незаряженных частиц с начальными скоростями от 400 до 800 м/с [37], в котором и протекают реакции ионизации. Можно отметить некоторые важные требования к свойствам матриц:

- высокий коэффициент молярной экстинкции на длине волны лазерного излучения. Типичные значения коэффициента молярной экстинкции используемых матриц составляют  $10^3$ - $10^4$  л/(моль×см);

- способность ионизовать определяемые соединения с высокой эффективностью и минимальной фрагментацией образующихся ионов. Наиболее часто ионизация осуществляется путем протонирования или, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, - депротонирования молекул аналита. В ряде случаев используется катионизация [38, 39], например, путем добавления в матрицу солей щелочных металлов. Значительно реже используются реакции с переносом электрона;

- растворимость матрицы в таком же растворителе, что и определяемые соединения;

- способность изолировать молекулы аналита и тем самым предотвращать их агрегацию. Обычно матрица берется в большом избытке ( $10^3$  раз и выше), поскольку эффективность ионизации существенно зависит от молярного соотношения между матрицей и аналитом [40].

- высокая стабильность и низкая летучесть в условиях вакуума. Стандартные приборы с ионным источником MALDI предполагают проведение лазерной десорбции/ионизации в условиях высокого вакуума.

За период развития MALDI в качестве матриц предложено большое число органических соединений, однако только малая их часть находит широкое применение в аналитической практике. Для определения пептидов и белков наиболее часто используют органические кислоты, такие как синапиновая кислота [41], 2,5-дигидроксibenзойная кислота (DHB) [42] и  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота ( $\alpha$ -HCCA) [43]. При анализе полярных липидов широко применяются DHB и 2,4,6-тригидроксиацетофенон [44]. Менее универсальные матрицы используются для решения более специфичных задач. Например, для того чтобы избежать интерференции ионных сигналов матрицы и аналита при определении соединений с относительно низкими молекулярными массами предложено применять матрицы с большой молекулярной массой, в частности, на основе порфиринов [45, 46]. Для определения ряда комплексных соединений предложено использовать в качестве матрицы флавоноиды [47]. При этом масс-спектры комплексных соединений Ru(III), Pt(II), Pt(IV) являются более простыми, а степень фрагментации ионов намного ниже, чем при использовании традиционных матриц [48]. Специальные матрицы предложены для анализа фосфолипидов, что сделало метод более чувствительным, а интерпретацию масс-спектров – более простой [49, 50].

Методология подготовки образца для анализа включает большое число вариантов. Наиболее часто используют способы высушивания капли и быстрого испарения. В первом случае матрицу и аналит растворяют по-отдельности в подходящем растворителе и наносят последовательно на подложку (как правило, из нержавеющей стали), или растворяют совместно в одном растворителе, и полученный раствор наносят на подложку. После испарения растворителя подложку помещают в ионный источник масс-спектрометра, обычно с использованием системы шлюзов. Во втором случае матрицу растворяют в

растворителе с высокой летучестью (например, в ацетоне) и наносят раствор на подложку. После испарения растворителя на матрицу наносят раствор определяемого соединения. Почти все варианты нанесения пробы основаны на ее предварительном растворении, однако известен способ нанесения образца без использования растворителя [51]. В этом способе порошок матрицы и аналита смешивается, измельчается и затем наносится на подложку. Регистрируемые масс-спектры, однако, характеризуются большей степенью фрагментации и меньшей величиной верхнего диапазона определяемых молекулярных масс.

#### ***1.4.2. Механизм образования ионов***

Процесс генерации ионов в условиях MALDI исследовался во многих работах, однако детальный механизм ионизации до настоящего времени остается недостаточно ясным. Общий подход к описанию процесса базируется на использовании двухстадийных моделей, в которых ионизация разделяется на первичную и вторичную [52]. При этом предполагается, что в облаке десорбированных частиц достигается локальное тепловое равновесие, и это позволяет применять стандартные для кинетики и термодинамики подходы.

Первый этап процесса MALDI инициируется импульсным лазерным излучением и заключается в поглощении матрицей излучения с последующим преобразованием энергии излучения в тепловую, а также кинетическую энергию молекул. На этой стадии происходит выброс матрицы и аналита в газовую фазу в виде эмиссии микрочастиц различных размеров с образованием «факела». Фотографии «факела», полученные методом скоростной фотосъемки через 45 нс и 311 нс после лазерного воздействия с длиной волны 266 нм и длительностью импульса 8 нс, приведены на рис. 1.4.

На начальном этапе образования факела его плотность близка к величине плотности вещества в конденсированном состоянии. Температура в факеле оценивается как  $10^3$  К [53, 54]. С расширением факела происходит распад кластеров и микрочастиц вплоть до образования отдельных молекул или их фрагментов, а также заряженных (в основном матричных) частиц. Такую ионизацию молекул, происходящую непосредственно при выбросе материала из конденсированного состояния, рассматривают как первичную, а характерное время первичной ионизации составляет величину порядка  $10^{-8}$  с.

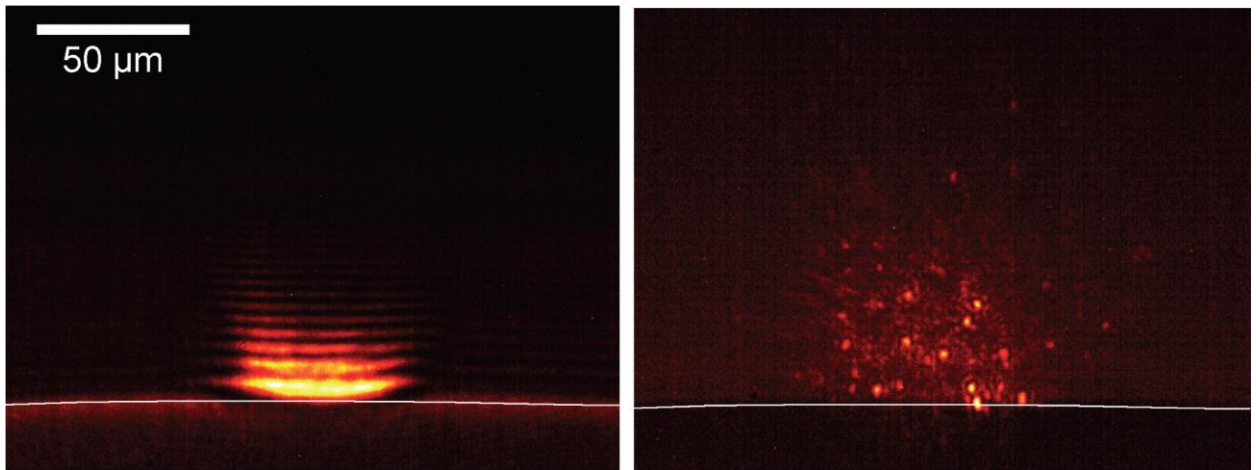


Рис. 1.4. Фотографии «факела», полученные после воздействия лазерного излучения с длиной волны 266 нм и длительностью импульса 8 нс на матрицу из нитробензилового спирта. Левая фотография получена через 45 нс, правая – через 311 нс после лазерного воздействия. Тонкой линией отмечена верхняя поверхность матрицы [55].

Можно выделить два подхода к описанию процесса генерации первичных ионов. В основе первого из них лежит предположение о том, что аналит в твердой матрице присутствует в виде ионов, а матрица необходима для их десорбции. В рамках этого подхода наиболее известна «кластерная модель» [56-58], согласно которой в процессе абляции в газовую фазу переходят кластеры, представляющие собой заряженные молекулы аналита в окружении нейтральных или заряженных молекул матрицы. В процессе расширения факела происходит испарение кластеров с освобождением ионов, а также интенсивная нейтрализация заряда (в частности, электронами в случае положительных ионов). «Выжившие» в этом процессе ионы аналита («lucky survivor») детектируются в масс-анализаторе. Ключевое предположение в кластерной модели о том, что аналит присутствует в твердой матрице в ионной (обычно, протонированной) форме, до настоящего времени остаётся предметом дискуссии.

Второй подход базируется на описании процесса образования первичных ионов через предварительное электронное возбуждение молекул матрицы. Потенциал ионизации почти всех используемых матриц превышает энергию двух фотонов лазерного излучения (7.36 эВ для азотного лазера), и вероятность

фотоионизации молекул матрицы мала. Поэтому предполагается, что первоначально облучение приводит к образованию возбужденных молекул или кластеров матрицы, которые затем участвуют в ионизации. Для объяснения процесса первичной ионизации предложено несколько моделей.

Модель переноса протона из возбужденного состояния рассматривалась еще в ранних работах по механизму MALDI [59-61]. Предполагалось, что поглощение одного фотона и переход молекул матрицы в первое электронно возбужденное состояние приводит к значительному увеличению кислотности матричного соединения и, следовательно, к эффективной передаче протона молекулам аналита. Дальнейшие исследования показали, что соединения, для которых хорошо известен эффект переноса протона из возбужденного состояния, оказались малоэффективными матрицами для MALDI [62]. Тем не менее, предложенный механизм, по-видимому, реализуется в некоторых случаях, главным образом, когда комплексы матрица-аналит предрасположены к передаче протонов через сильные асимметричные водородные связи и стабилизирующие соседние заместители.

В модели «полярной жидкости» [63] предполагается, что испаренная матрица существует некоторое короткое время в виде полярной жидкости, и подобно жидкому полярному растворителю, обеспечивает разделение ионов. Одно из существенных возражений против такой модели заключается в том, что многие эффективные матрицы являются соединениями с низкой величиной диэлектрической проницаемости, которая, к тому же, уменьшается с ростом температуры. Другая проблема связана с трудностью объяснения сильной зависимости величины выхода ионов в MALDI от интенсивности лазерного воздействия, хотя температура «факела» слабо от нее зависит. Тем не менее, модель «полярной жидкости» не утратила полностью своего значения, и входит в качестве составной части в разрабатываемые в настоящее время модели процесса MALDI.

Модель «ступенчатого возбуждения» основана на представлении о перераспределении энергии возбуждения между соседними молекулами матрицы [54, 62, 64]. При взаимодействии двух возбужденных молекул может происходить передача энергии возбуждения от одной из молекул к другой, в результате чего одна из возбужденных молекул переходит в основное состояние, а другая – в состояние с более высокой энергией. Такой процесс имеет низкую эффективность,



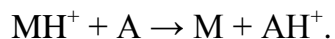
когда он реализуется на возбужденных парах молекул, случайно созданных лазерным излучением. Поэтому в разработанных вариантах модели предполагается, что возбуждение переносится в матрице на значительное расстояние экситонами. Объединение трех или большего числа экситонов в одной молекуле матричного соединения приводит к ее ионизации. Разработанная модель применительно к матрице DHB предсказывает, что отношение ионов к нейтральным молекулам матрицы в процессе MALDI составляет  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , что соответствует экспериментальным данным [65, 66].

Вторичная ионизация представляет собой результат ион-молекулярного взаимодействия между матричными ионами и молекулами аналита в расширяющемся факеле. Если характерное время процессов первичной ионизации составляет величину порядка  $10^{-8}$  с, то длительность вторичной ионизации, по крайней мере, на порядок величины выше. В большинстве моделей предполагается, что реакции переноса заряда следуют обычным уравнениям скорости Аррениуса. Так, в модели, базирующейся на «ступенчатом возбуждении», рассматривается следующий механизм образования протонированных молекул определяемых соединений [62, 67, 68]:

- протонирование молекулы матрицы



- протонирование молекул аналита А



Таким образом, ионный сигнал соединения полностью определяется вторичными реакциями. При этом химические свойства молекул матрицы и аналита при известных параметрах факела однозначно определяют величину ионного сигнала.

Наряду с протонированием (депротонированием), для ионизации аналита в условиях MALDI могут быть реализованы реакции переноса катиона (обычно, щелочных металлов) и реакции с переносом электрона. В последнем случае молекулярные ионы аналита чаще всего образуются путем переноса электрона от нейтральных молекул определяемых соединений к ионам матрицы [69].

#### ***1.4.3. MALDI в аналитической практике***

Инструментальная реализация метода MALDI в большинстве случаев базируется на применении времяпролетных масс-анализаторов, которые хорошо

совместимы с импульсным характером ионизации во всех методах LDI. К преимуществам таких масс-анализаторов следует также отнести высокий верхний порог детектируемых масс, высокую скорость анализа, возможность определения в одном спектре всех ионов. Большинство современных времяпролетных масс-спектрометров, оборудованных ионным источником MALDI, собраны по схеме «рефлектрон» с применением задержанной экстракции ионов. Задержанная экстракция, основанная на том, что напряжение, прикладываемое к электродам ускоряющего промежутка, подаётся с некоторой регулируемой задержкой по отношению к десорбирующему лазерному импульсу, используется для компенсации разброса начальных скоростей и пространственных положений ионов и увеличения разрешающей способности прибора [70].

С целью выбора оптимальных параметров лазерного воздействия для десорбции и ионизации исследованы различные типы лазерных систем, с различными длинами волн, в частности, эксимерные лазеры (193, 248, 308 и 351 нм), азотный лазер (337 нм), Nd:YAG лазеры с генерацией гармоник, Er:YAG лазер (2.94 мкм), TEA CO<sub>2</sub> лазер (10.6 μm) и ряд других. В современных приборах с ионным источником MALDI обычно используется излучение азотного лазера или третья гармоника основного излучения Nd:YAG лазера (355 нм).

В настоящее время MALDI широко применяется для решения самых различных задач аналитической химии, биологии, биохимии, медицины и других дисциплин. Основное преимущество метода – это возможность масс-спектрометрического определения высокомолекулярных соединений (до 10<sup>6</sup> а.е.м. и выше). К достоинствам MALDI следует также отнести экспрессность анализа, «мягкие» условия ионизации с низким уровнем фрагментации образующихся ионов, малый объем анализируемых проб, возможность построения масс-спектрометрических изображений распределения соединений в твердых (в том числе, биологических) пробах. При этом соединения, содержащие в своем составе высокоосновные функциональные группы, детектируются с высокой чувствительностью. Например, типичные значения пределов обнаружения пептидов достигают величину порядка фемтомоль аналита, введенного в прибор.

К основным недостаткам метода MALDI традиционно относят проблему детектирования низкомолекулярных органических соединений и трудность

количественного анализа. Поскольку матрица берется в большом избытке, то и ионов матрицы и их фрагментов обычно на несколько порядков величины больше, чем ионов определяемых соединений. Высокие фоновые сигналы в области низких значений  $m/z$ , соответствующие ионам матрицы, часто делают проблематичным детектирование соединений в этой области спектра.

Метод MALDI в большинстве своих приложений остается методом качественного анализа. Процессы совместной кристаллизации аналита и матрицы неконтролируемы и сложны, а определяемое соединение распределено в матрице неравномерно. Негативную роль в MALDI играет и эффект подавления ионизации («ion suppression»). В ряде исследований предприняты попытки разработать методики количественного определения некоторых соединений. Здесь основной подход заключается в унификации процедуры приготовления образцов, тщательной очистке матрицы и использовании правильно подобранных внутренних стандартов [71-73]. Лучшие результаты получены при использовании в качестве внутреннего стандарта изотопно меченных аналогов аналита.

К недостаткам МАЛДИ следует также отнести:

- необходимость подбора матрицы и оптимизации условий пробоподготовки. Процесс подготовки пробы во многих случаях заключается в переборе доступных матриц, растворителей, относительных концентраций матрицы и аналита, и занимает значительное время. Кроме того, нет универсальной матрицы, которая бы подходила для анализа различных химических классов соединений. Поэтому для эффективного анализа проб надо примерно представлять их состав;

- ограниченный круг определяемых соединений. В частности, метод неприменим к определению летучих соединений;

- сложность анализа многокомпонентных образцов, особенно отличающихся по физико-химическим свойствам. При этом метод МАЛДИ плохо совместим с методами предварительного разделения компонентов пробы, например, с методом жидкостной хроматографии.

### **1.5. Лазерная десорбция/ионизация, усиленная поверхностью (SELDI)**

В 1993 г. Т.Хатченс с соавторами предложили новый подход к LDI, который назвали Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization – SELDI (усиленная

поверхностью лазерная десорбция/ионизация) [74]. Подход разрабатывался для решения таких проблем MALDI, как высокий фоновый сигнал, создаваемый ионами матрицы, и низкая селективность при анализе биологических проб. Принцип метода SELDI заключается в химической модификации поверхности твердотельных подложек (или микрочастиц) путем формирования чувствительного покрытия, обеспечивающего селективное связывание тех или иных компонентов анализируемой пробы и/или их эффективную десорбцию/ионизацию. В отличие от прямой LDI, поверхностный слой в SELDI играет активную роль в очистке, экстракции, селективной адсорбции аналитов, а также выполняет функцию матрицы при лазерной десорбции-ионизации.

Метод SELDI объединяет две стратегии. Первая получила название Surface-Enhanced Neat Desorption – SEND (усиленная поверхностью прямая (чистая) десорбция), вторая – Surface-Enhanced Affinity Capture – SEAC (усиленный поверхностью аффинный захват). SEND основан на применении подложек с привитыми к поверхности низкомолекулярными соединениями, хорошо поглощающими лазерное излучение. В большинстве случаев это – соединения, которые широко используют в качестве матриц в методе MALDI. Так, например, в работе [75] DHB была внедрена в структуру кремнезема с использованием золь-гель технологии (рис. 1.5а). В работе [76] предложена схема формирования полимерной пленки, содержащей  $\alpha$ -циано-4-метакрилоил-оксикоричную кислоту (рис. 1.5б). Функционализация кремнезема рассмотрена в работе [77], в которой к кремнезему типа SBA-15 был привит 8-гидроксихинолин (рис. 1.5в). Аналогичный подход развивается в работе [78], в которой предложено модифицировать поверхность кремнезема SBA-15 кислотой  $\alpha$ -HCCA.

Стратегия SEAC базируется на модификации поверхности твердотельных подложек сорбентами, позволяющими проводить твердофазную экстракцию и концентрирование определенного класса соединений. Стандартный подход заключается в использовании покрытий на основе известных хроматографических фаз для аффинной, обращённо-фазовой, ионообменной хроматографии. Анализируемую многокомпонентную пробу наносят на поверхность, обладающую свойством селективно связывать тот или иной класс соединений. Последующая промывка поверхности удаляет соединения, не связанные с поверхностью.

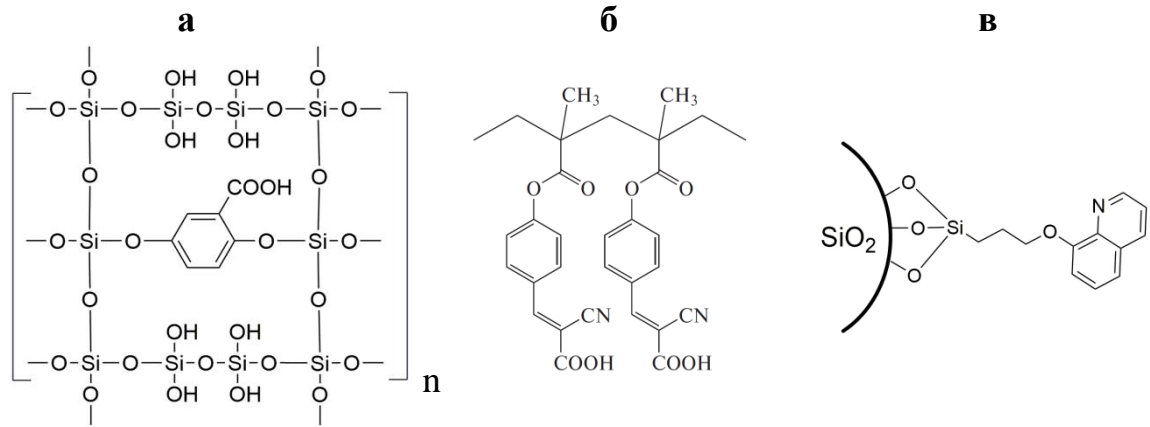


Рис. 1.5. Примеры чувствительных слоев для SEND: а) дигидроксibenзойная кислота ДНВ, привитая на поверхность кремнезема [75], б) полимерная пленка, содержащая  $\alpha$ -циано-4-метакрилоил-оксикоричную кислоту [76], в) 8-гидрокси-хинолин, привитый на кремнеземе [77].

Основная область применения SEAC – протеомика, поэтому выбор покрытия поверхности обычно ориентирован на специфическое связывание белков, в то время как такие мешающие анализу соединения, как соли или липиды, удаляются при промывке. Адсорбированные аналиты затем исследуют методом прямой LDI или MALDI. В последнем случае, на поверхность наносят раствор матрицы для того, чтобы элюировать и сокристаллизовать аналит с матрицей. Необходимость элюирования накладывает дополнительные ограничения на природу растворителя и матричного компонента. Технология SEAC коммерциализована в 1997 г. как система “ProteinChip”, и в настоящее время реализуется и продвигается на рынок компанией Bio-Rad Laboratories (США). Большинство исследователей под методом SELDI подразумевают именно эту технологию. Наряду с хроматографическими фазами, в последние годы в качестве покрытий все чаще используются антитела, рецепторы, ДНК и другие вещества.

Метод SELDI успешно применяется для решения фундаментальных проблем протеомики, в частности, установления состава белка, построения белкового профиля биологических образцов, анализа экспрессии белков в клетках и др. [79-81]. Однако наибольшее число работ по применению SELDI относится к области клинической протеомики и, главным образом, обнаружению белковых биомаркеров различных заболеваний. Процесс поиска биомаркеров заключается в

сопоставлении белковых профилей проб, взятых у пациентов, и проб контрольной группы с целью выяснения статистически значимых различий в экспрессии белка. Картирование белкового профиля обеих групп поводят в одинаковых экспериментальных условиях с использованием одного и того же набора SELDI-подложек. Большое число исследований посвящено ранней диагностике различных форм онкологических заболеваний. Метод SELDI использовали для диагностики рака легких [82, 83], груди [84, 85], простаты [86], назофарингеальной карциномы [87] и других форм рака. Диагностическая чувствительность обычно превышает 80%, а специфичность – 90%. SELDI применяли для выявления и идентификации белковых биомаркеров других заболеваний, в частности, туберкулеза [88], синдрома Шегрена [89], болезни Альцгеймера [90] и других. Перспективным направлением развития метода является одновременное использование обоих его вариантов – SEND и SEAC. Такое сочетание позволяет упростить пробоподготовку и повысить чувствительность анализа [91]. Примером эффективности сочетания может служить работа [92], в которой авторы сформировали на поверхности смешанные полимерные пленки, содержащие фрагменты коричной и дигидробензойной кислот, для облегчения ионизации, акриловую кислоту для усиления сигнала, стеарилметакрилат для усиления экстракции и триметоксилилметакрилат для стабилизации самой пленки.

В большинстве приложений SELDI используется как метод качественного анализа. Однако в ряде работ исследованы возможности SELDI и для количественного анализа. Основной подход, как и в MALDI, основан на применении изотопно меченных соединений в качестве внутреннего стандарта в сочетании со строгим следованием унифицированной процедуре приготовления и анализа образцов.

В настоящее время SELDI рассматривается как вариант MALDI, в котором «матрица заменена покрытием хроматографической стационарной фазы, предназначенной для селективного связывания различных подмножеств белков или пептидов из смеси в зависимости от их физико-химических свойств или характеристик биохимической аффинности» [93]. В целом, метод SELDI позволяет решить (по крайней мере, частично) одну из важных проблем MALDI – высокий уровень фонового сигнала. К недостаткам метода можно отнести:

- сложности, возникающие при подборе материалов для создания чувствительных покрытий;
- проблемы разложения самих пленочных покрытий под воздействием лазерного излучения;
- сравнительно низкую эффективность ионизации, обусловленную, в том числе, ограниченным количеством функциональных групп на поверхности, которые селективно связывают определяемые белки или пептиды.
- трудность количественного анализа.

### **1.6. Лазерная десорбция/ионизация, активированная поверхностью (SALDI)**

Дальнейшие исследования в области LDI привели к созданию нового метода – лазерной десорбции/ионизации, активированной поверхностью (Surface Assisted Laser Desorption Ionization – SALDI). Первый вариант SALDI, предложенный Я.Саннером, был тесно связан с методом К.Танака и основан на использовании суспензий микрочастиц графита в глицерине или воде в качестве матрицы [94, 95]. Первоначальная цель исследований заключалась в поиске универсальных матриц с низким уровнем фонового сигнала. Подход, основанный на использовании суспензий микрочастиц графита в замороженном водном растворе аналита, оказался эффективным для определения пептидов и белков [95]. При воздействии лазерным излучением с длиной волны 3.28 мкм зарегистрированы масс-спектры 20 пептидов с пределом обнаружения порядка 1 фмоль. Воздействие излучения на замороженный водный раствор аналита без микрочастиц графита не давало ионный сигнал, и авторы предположили, что ключевую роль в процессе ионизации играет поверхность микрочастиц.

Развитие метода привело к появлению другого, безматричного варианта SALDI, в котором суспензия микрочастиц графита заменена графитовой подложкой с шероховатой поверхностью (эмиттер ионов) [96, 97]. Важным шагом в этом направлении стала работа [98], в которой предложено использовать в качестве материала эмиттера ионов твердотельную подложку из пористого кремния. В настоящее время оба основных варианта SALDI динамично развиваются, появляются новые способы реализации метода как на основе наночастиц различной природы, так и твердотельных подложек со специально подготовленным поверхностным слоем.

### ***1.6.1. SALDI с использованием наночастиц***

Первый вариант SALDI основан на применении наночастиц неорганических материалов с характерным размером менее 100 нм. За последние годы были исследованы самые различные классы наночастиц, из которых широкое применение находят наночастицы металлов, оксидов металлов, кремния и некоторых других полупроводников, а также различных форм углерода (в том числе, углеродные нанотрубки и фуллерены).

Среди металлических материалов наиболее часто используют наночастицы благородных металлов. Наночастицы золота впервые применены в работе [99] для определения пептидов. Исследованы частицы с размерами 2, 5 и 10 нм, среди них лучшие результаты достигаются для частиц с минимальным размером. Аналогичные результаты получены при исследовании частиц золота с размерами 14, 32 и 56 нм - максимальное отношение сигнал/шум при определении аминокислот зарегистрировано для частиц с размером 14 нм [100]. Предел обнаружения составляет примерно 1 мкмоль/л. Концентрирование с помощью наночастиц позволяет снизить предел обнаружения от 20 до 40 раз.

Один из важных недостатков наночастиц золота (как и многих других наночастиц) – это необходимость использования стабилизаторов для предотвращения их агрегации. В качестве стабилизатора наиболее часто применяется цитратный буфер. Однако при лазерном воздействии цитраты, как и другие стабилизаторы, дают интенсивный фоновый сигнал в области низких масс, что нивелирует преимущество метода SALDI относительно MALDI. В работе [101] на примере определения моно- и дисахаридов продемонстрировано, что наночастицы золота с размером 10÷14 нм могут быть успешно использованы и без добавления стабилизирующего агента. Без проведения дериватизации аналитов пределы обнаружения рибозы, глюкозы и мальтозы составили, соответственно, 82, 41 и 151 нмоль/л.

В большинстве приложений используют наночастицы золота, модифицированные различными органическими функциональными группами. Такой подход близок к методу SELDI. В работе [102] показано, что модификация  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислотой с добавлением глицерина и лимонной кислоты значительно увеличивает эффективность ионизации пептидов по



сравнению с наночастицами золота в цитратном буфере. Для определения пептидов и белка цитохрома С могут быть использованы наночастицы с привитыми на поверхности молекулами 4-аминотиофенола [103]. Модификация аптамером предложена для селективного определения аденозинтрифосфата с пределом обнаружения 0.5 мкмоль/л [104]. Для модификации наночастиц могут быть использованы и неорганические материалы и соединения. Так, в работе [105] показано, что наночастицы золота с силикатным покрытием позволяют детектировать пептиды и холестерин.

Вследствие эффекта локализованного поверхностного плазмонного резонанса лазерная десорбция/ионизация на основе наночастиц золота может быть реализована при воздействии лазерным излучением в видимом и ближнем инфракрасном (ИК) диапазонах [106-108].

По сравнению с золотом, наночастицы платины характеризуются более высокой стабильностью, меньшей теплопроводностью и большей температурой плавления. С другой стороны, определенные трудности вызывает их модификация органическими функциональными группами. Эффективность применения наночастиц платины в SALDI для детектирования аминокислот, пептидов и белков показана в работе [109]. Наноструктуры платины с тонкими «лепестками», которые получили название «платиновые наноцветы», синтезированы и использованы для определения пептидов, липидов, углеводов и некоторых низкомолекулярных соединений, в частности, кофеина [110, 111]. В работе [112] «платиновые наноцветы» модифицировали перфтордецилтрихлоросиланом и исследовали в качестве эмиттера ионов для лазерной десорбции/ионизации аминокислот и пептидов. Установлено, что такие наноструктуры дают возможность определять одновременно двадцать аминокислот в режиме регистрации отрицательных ионов, в то время как MALDI с матрицей  $\alpha$ -HCCA позволяет детектировать только две из них. Отмечена линейная корреляция между величиной выхода ионов и кислотностью в газовой фазе аминокислоты. Способность наночастиц платины эффективно участвовать в процессе SALDI обычно связывают с локализованным поверхностным плазмонным резонансом [113].

Для определения аминокислот и пептидов могут быть также использованы наночастицы серебра. Так, в работе [114] продемонстрировано, что наночастицы

серебра, полученные восстановлением из  $\text{AgNO}_3$ , позволяют детектировать пептиды. Наночастицы серебра являются эффективным материалом для определения эстрогенов [115]. После проведения стандартной процедуры пробоподготовки и концентрирования аналитов на поверхности наночастиц пределы обнаружения эстрона, эстрадиола и эстриола в моче составили, соответственно, 2.23, 0.23 и 2.11 мкмоль/л. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме регистрации отрицательных ионов. С использованием разработанной методики найдено, что содержание эстрадиола в образце мочи беременной женщины составляет  $0.16 \pm 0.05$  мкмоль/л ( $n = 10$ ).

Перспективным выглядит применение специфического взаимодействия серебра с функциональными группами определяемых соединений с целью селективного связывания аналита. Так, в работе [116] продемонстрировано использование наночастиц серебра для селективной ионизации олефиновых соединений, в частности, холестерина и каротиноидов из сложных смесей без предварительного разделения. Аналиты детектируются в виде аддуктов с серебром состава  $(M+Ag)^+$ . Взаимодействие серебра с функциональными группами, содержащими атом серы, использовано для определения цистеина и гомоцистеина в образцах мочи с пределами обнаружения, соответственно, 7 и 22 нмоль/л [117]. Серебро применяли в качестве покрытия наночастиц золота для детектирования антибиотиков группы аминогликозидов в образцах плазмы крови с пределами обнаружения  $3 \div 38$  нмоль/л [118].

Наночастицы других металлов используются в SALDI сравнительно редко. Более широкое применение находят наночастицы оксидов металлов. Химическое взаимодействие оксида титана  $\text{TiO}_2$  с катехинами использовано для концентрирования и последующего определения этих соединений методом SALDI с пределами обнаружения  $0.45 \div 1.85$  мкмоль/л [119]. Одним из фактов, свидетельствующих о взаимодействии  $\text{TiO}_2$  с аналитами, является изменение окраски раствора наночастиц при добавлении катехинов. Наночастицы аморфного  $\text{TiO}_2$ , модифицированные тетраэтоксисиланом, использованы для фотокаталитической деградации полиэтиленгликоля ПЭГ6000 и определения в нем примесей [120]. В работе [121] наночастицы  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{TiSiO}$ ,  $\text{BaSrTiO}$ , а также алмаза и серебра исследованы для ионизации углеводов в режиме регистрации

положительных и отрицательных ионов. Найдено, что оксиды металлов позволяют реализовать более высокую эффективность ионизации углеводов.

Наночастицы ZnO различной формы и размеров (20÷200 нм) использованы для детектирования верапамила, тестостерона и фосфолипидов [122]. Сравнение SALDI и MALDI показало, что оба метода характеризуются близкими значениями пределов обнаружения аналитов, а относительное стандартное отклонение результатов при анализе методом SALDI в три раза ниже. Нанопроволоки из ZnO диаметром 50 нм и длинами от 25 до 1600 нм исследованы для определения лекарственных соединений клонидина, тамоксифена, кетоконазола и азитромицина [123]. Показано, что эффективность ионизации зависит от длины нанопроволок, а максимальный выход ионов зарегистрирован при использовании нанопроволок с длиной 250 нм. Наночастицы оксида цинка, дополнительно содержащие 4% восстановленного оксида графена (ZnO-rGO), использованы для определения бензопирена и других ароматических соединений, сорбированных на поверхности полупроводниковых пластин для микроэлектроники [124]. Примерами наночастиц оксидов других металлов, применяемых для SALDI, могут служить: оксид циркония  $ZrO_2$ , исследованный для детектирования циклодекстринов, пептидов и фосфопротеинов [125], оксиды рения и вольфрама  $ReO_3$  and  $WO_3$ , использованные для определения кокаина, апигенина, холина и ряда других биологически активных соединений [126]. Частицы MgO и NiO позволяют детектировать липиды в различных пробах и, в том числе, в образцах сложного состава с минимальной пробоподготовкой [127].

Перспективным подходом является использование наночастиц магнитных материалов, которые могут служить средством не только для лазерной десорбции/ионизации, но и для предварительного магнитного разделения и концентрирования аналитов при анализе сложных смесей. Принцип применения магнитных материалов иллюстрирует рис. 1.6 на примере наночастиц оксида железа  $Fe_3O_4$ , модифицированных полидопамином [128]. Наночастицы помещают в анализируемую пробу для селективного концентрирования аналита на модифицированной поверхности. Затем прикладывают магнитное поле для осаждения наночастиц. Осажденный слой наносят на металлическую подложку и помещают в ионный источник для анализа методом SALDI. Такой вариант

магнитной твердофазной экстракции в сочетании с SALDI успешно применен для определения ряда загрязняющих веществ с молекулярными массами от 251.6 до 499.3 а.е.м., в частности, бензопирена, перфторорганических соединений и антибиотиков в режимах регистрации положительных и отрицательных ионов.

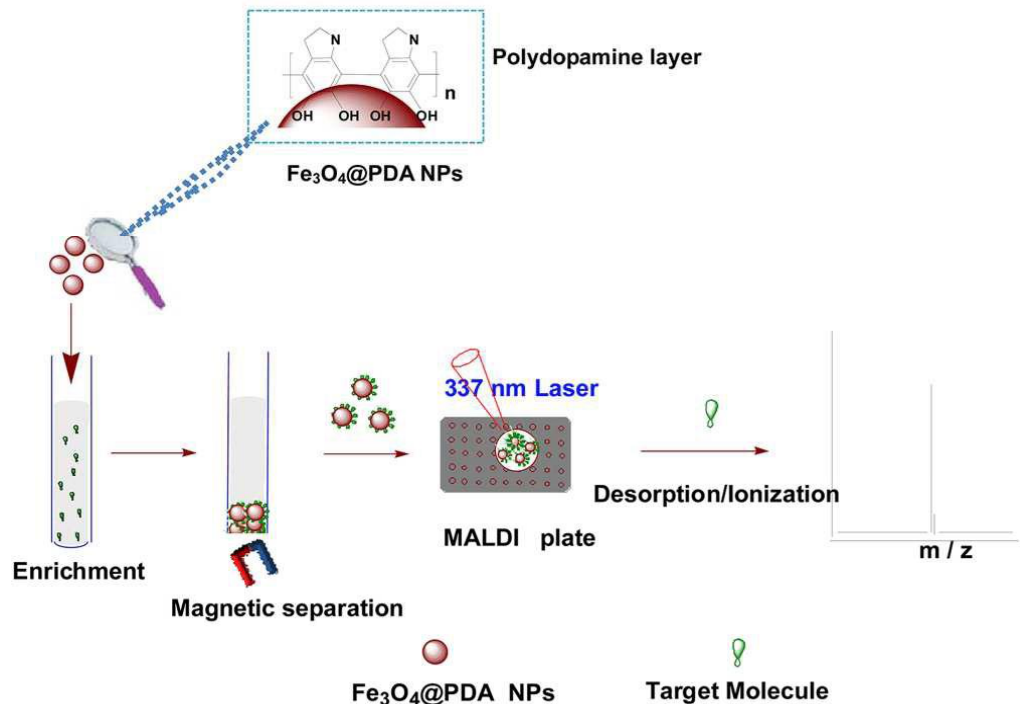


Рис. 1.6. Схема применения магнитных наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, модифицированных полидопамином, для выделения, концентрирования и определения органических соединений методом SALDI [128].

Наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> с покрытием из TiO<sub>2</sub> предложены для определения пептидов [129]. Вследствие сочетания активной поверхности TiO<sub>2</sub> и магнитных свойств Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> такие наночастицы, конъюгированные с определяемыми фосфопептидами, концентрируют аналиты и легко выделяются из анализируемых растворов при приложении магнитного поля. Модификация поверхности оксида железа глутатионом предложена для селективного определения гликанов [130]. Модификация фенильными группами использована для детектирования соединений, имеющие в своём составе ароматическую систему [131]. Наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и CuFeO<sub>2</sub>, модифицированные хитозаном, использованы для выделения из

образцов мочи эндотоксина и его последующего масс-спектрометрического определения с пределами обнаружения, соответственно, 0.45 и 0.25 мг/мл [132].

Продемонстрированная в работе [94] возможность применения микрочастиц графита с размерами порядка микрометра для SALDI привела к интенсивным исследованиям наночастиц различных форм углерода. В работе [133] показано, что суспензия графита позволяет определять пептиды, белки и олигосахариды. Частицы графита с субмикронным размером успешно использованы для определения различных метаболитов растений (фосфолипидов, цереброзидов, олигосахаридов и флавоноидов) [134]. Для лазерной десорбции/ионизации может быть использован карандашный грифель [135, 136]. Область подложки, используемая для анализа, закрашивают карандашом (на практике, лучшие результаты получены с карандашами марки 2B). Затем на графитовую основу наносят анализируемый раствор, и после испарения растворителя помещают в ионный источник SALDI. Такой простой в реализации вариант позволяет детектировать широкий круг органических соединений, в частности, метилэфедрин, цитозин и пептиды.

Технический углерод (высокодисперсный аморфный углеродный продукт) использован для твердофазной экстракции органофосфатных эфиров, сульфаниламидов и некоторых лекарственных соединений с последующим детектированием методом SALDI [137]. Для определения пропранолола более эффективным является окисленный технический углерод, содержащий на поверхности карбоксильные группы [138]. Активированный уголь, нанесенный на алюминиевую подложку, исследован для лазерной десорбции/ионизации глюкозы, кофеина и брадикинина [139]. Микрочастицы активированного угля с размерами 40÷150 мкм использованы для определения десяти эндогенных стероидов [140] с пределом обнаружения 1.5÷18 нг аналита, введенного в масс-спектрометр.

Среди углеродсодержащих материалов широкое применение в SALDI находят углеродные нанотрубки. В качестве материала для лазерной десорбции/ионизации углеродные нанотрубки впервые исследованы в работе [141] для детектирования пептидов и  $\beta$ -циклодекстрина. Сравнение с активированным углем на примере определения ряда лекарственных соединений показало, что углеродные нанотрубки обеспечивают более высокую чувствительность анализа в условиях

SALDI [142]. С целью улучшения таких параметров, как дисперсность нанотрубок в растворе, эффективность адсорбции и последующей ионизации аналита, воспроизводимость результатов анализа, предложено проводить предварительное окисление поверхности нанотрубок с образованием гидроксильных или карбоксильных групп [143-145]. Окисленные таким образом углеродные нанотрубки успешно использовали для определения аминокислот [143], для детектирования олигосахаридов [144], для мониторинга ферментативной активности ацетилхолинэстеразы и контроля низкомолекулярных ингибиторов ферментов [146].

В последние годы значительный интерес вызывает применение графена для SALDI. Впервые графен в качестве эмиттера ионов исследован в работе [147], в которой продемонстрирована эффективность этого наноматериала для детектирования аминокислот, полиаминов (спермина, спермидина, путресцина), холестерина, сквалена и ряда других соединений. В последующих работах графен и окисленный графен исследовали в режиме регистрации отрицательных ионов для определения флавоноидов и фенилпропаноидов [148], октахлородибензо-р-диоксина [149], пептидов, жирных кислот и нуклеозидов [150], липидов [151], нитрополициклических ароматических углеводов [152]. Магнитный графен, представляющий собой композит с оксидом железа  $Fe_3O_4$ , синтезирован и исследован в качестве материала для концентрирования и последующей ионизации метаболитов никотина и активных компонентов лекарственных средств традиционной китайской медицины [153].

Примерами других углеродных материалов, исследованных для SALDI, могут служить модифицированные фуллерены [154, 155], модифицированные наноалмазы [156], углеродные квантовые точки [157].

Наночастицы кремния с размерами  $5 \div 50$  нм использованы для определения некоторых лекарственных соединений, пептидов, пестицидов и кислот [158]. Предел обнаружения пропафенона и верапамила составил примерно 10 нмоль/мл. В работе [159] показано, что наночастицы кремния размером 30 нм позволяют увеличить на несколько порядков величины эффективности лазерной десорбции/ионизации нелетучих органофосфатов, иммобилизованных на поверхности частиц кремнезема, диатомита, глинозема и ряда других материалов.

Ряд работ посвящен исследованию халькогенидов переходных металлов (в том числе, квантовых точек) в качестве материалов для SALDI. Наночастицы ZnS, модифицированные различными функциональными группами, изучены для детектирования циклодекстринов, убиквитина и инсулина [160]. Лучшие результаты получены с покрытием из 3-меркаптопропановой кислоты: пределы обнаружения  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстринов составили  $20 \div 55$  нмоль/л, инсулина – 85 нмоль/л. Наночастицы CdSe, модифицированные 11-меркаптоундециловой кислотой, применены для концентрирования и определения пептидов [161]. Наночастицы CdTe и CdS, модифицированные различными кислотами, могут быть использованы для определения содержания углеводов в сыворотке крови [162].

Методология подготовки образца для анализа методом SALDI с использованием наночастиц включает несколько вариантов. Чаще всего раствор аналита добавляют в суспензию наночастиц, центрифугируют, удаляют супернатант, после чего частицы с аналитом наносят на металлическую пластину для последующей лазерной десорбции/ионизации. Другой вариант включает предварительное нанесение одного или нескольких слоев наночастиц на пластину и последующее осаждения определяемых соединений на образовавшийся слой. При построении масс-спектрометрических изображений наночастицы наносят на сам образец. С целью обеспечения гомогенного распределения наночастиц при их нанесении лучше использовать методы распыления [163] или осаждения из газовой фазы без применения растворителя [164].

Для построения масс-спектрометрических изображений распределения тех или иных соединений по поверхности образца (imaging mass spectrometry) исследованы наночастицы различной природы. Наночастицы железа размером 3.7 нм, модифицированные  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисиланом, использованы для визуализации распределения липидов и пептидов в биологических тканях с пространственным разрешением около 15 мкм [165]. Масс-спектрометрические изображения группы эндогенных низкомолекулярных метаболитов в срезах мозга мышей получены с помощью наночастиц TiO<sub>2</sub> [166]. Наночастицы серебра использованы для нахождения распределения жирных кислот (стеариновой, олеиновой, арахидоновой и других) в тканях печени [167], различных метаболитов – в эпикутикулярном воске на поверхностях листьев и цветов [168]. Микрочастицы

графита позволяют получать распределения органических кислот, флавоноидов, олигосахаридов и фосфолипидов в тканях растений и фруктов [134, 169]. Ряд работ посвящен построению изображений и определению химического состава отпечатков пальцев. Микрочастицы технического углерода с гидрофобным кремнеземным покрытием использовали для определения в отпечатках пальцев некоторых лекарственных соединений и их метаболитов [170], никотина и котинина [171]. Нанчастицы серебра применяли для визуализации отпечатков пальцев и детектированию в них триптамина, мелатонина и кофеина [172]. Наночастицы сплава Au-Ag (60:40) эффективны для построения масс-спектрометрических изображений и определения жирных кислот [173]. Присутствие золота препятствует агрегации и увеличивает стабильность изображения отпечатков пальцев.

Таким образом, наночастицы из различных материалов могут использоваться для лазерной десорбции/ионизации различных классов органических и биоорганических соединений. Основная функция наночастиц заключается в эффективном поглощении лазерного излучения и передаче энергии определяемым соединениям. Образование положительных ионов происходит в результате катионизации (обычно, путем присоединения ионов щелочных металлов, иногда – ионов материала наночастиц, например  $\text{Ag}^+$ ) или протонирования. Донорами протонов являются специально добавленные вещества (часто, лимонная кислота и другие органические кислоты) или, при использовании модифицированных наночастиц, привитые на их поверхности кислотные функциональные группы. Аналогичные подходы применяют для лазерной десорбции/ионизации в режиме регистрации отрицательных ионов.

По сравнению с MALDI, вариант SALDI, основанный на применении наночастиц, характеризуется меньшей величиной фонового сигнала, большей устойчивостью к присутствию солей в пробе, лучшей воспроизводимостью результатов. Вместе с тем, за исключением отдельных аналитов, эффективность ионизации органических соединений методом MALDI обычно выше. В табл. 1.1 представлены некоторые характерные для анализа методом SALDI результаты, полученные при использовании наночастиц различной природы.



Таблица 1.1. Пределы обнаружения биологически активных соединений методом SALDI с использованием наночастиц.

Наночастицы	Определяемые соединения	Предел обнаружения, мкмоль/л	Ссылка
Au	моно- и дисахариды	0.08÷0.15	[101]
Au, модифицированные 4-меркаптобензойной кислотой	каптоприл	1	[174]
Au, модифицированные аптамером	аденозинтрифосфат	0.48	[104]
Ag	эстрогены	0.23÷2.23	[115]
Ag	цистеин, гомоцистеин	0.007, 0.022	[117]
Au+Ag	аминогликозиды	0.003÷0.038	[118]
Pt	кофеин	10	[111]
Pt	цитохром C, ангиотензин I	15, 0.043	[175]
TiO <sub>2</sub>	катехины	0.45÷1.85	[119]
TiO <sub>2</sub>	1-кестоза	2.5	[121]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	глутатион, ангиотензин I	8.3, 0.1	[175]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> с покрытием из ZrO <sub>2</sub>	фосфопептиды	0.045	[176]
Активированный уголь	стероиды	10÷100	[140]
Окисленный технический углерод	пропранолол	6	[138]
Углеродные нанотрубки	хинин	0.01	[142]
Углеродные нанотрубки	1-кестоза	50	[121]
Алмаз	1-кестоза	5	[121]
Графен	сквален	0.2	[147]
Графен	9-нитроантрацен	10	[152]
Углеродные квантовые точки	β-адреностимуляторы	0.2÷0.5	[157]
C <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	1-нитропирен	1	[177]
Si	пропафенон, верапамил	0.01	[158]
ZnS, модифицированные 3-меркаптопропановой кислотой	циклодекстрины, инсулин	0.02÷0.055, 0.085	[160]
HgTe	альбумин	0.014	[178]

Недостатки SALDI во многом аналогичны недостаткам MALDI. Среди них следует отметить следующие:

- отсутствие «универсальных» наночастиц, подходящих для высокочувствительного определения широкого круга химических соединений. Для успешного анализа необходимо предварительно правильно подобрать тип, размер наночастиц, а также, во многих случаях, модифицирующее покрытие;
- трудность количественного определения, особенно при анализе многокомпонентных образцов. Метод плохо совместим со способами предварительного разделения компонентов пробы;
- относительно высокий фоновый сигнал, создаваемый ионами материала (особенно, ионами металлов), их кластерами, а также соединениями, входящими в состав буфера;
- проблема разложения пленочных покрытий под воздействием лазерного излучения при использовании некоторых модифицированных наночастиц;
- трудность определения соединений с высокой летучестью.

#### ***1.6.2. SALDI с использованием подложек***

Второй вариант SALDI основан на применении для лазерной десорбции/ионизации подложек со специально приготовленной поверхностью. Замена суспензии микрочастиц графита на графитовые поверхности с микроразмерной шероховатостью и возможность использования таких подложек для лазерной десорбции/ионизации синтетических полимеров с молекулярными массами 100÷1000 а.е.м. исследована в работе [96]. Графитовые подложки могут быть использованы для определения жирных кислот без предварительной дериватизации аналитов [179]. Основным каналом ионизации является катионизация, - определяемые соединения регистрируются в виде аддуктов с Na. В работе [180] продемонстрирована возможность применения излучения с длиной волны 532 нм (вторая гармоника основного излучения Nd:YAG лазера) для лазерной десорбции/ионизации полимеров и биомолекул (брадикинина, инсулина и ряда других). Для увеличения эффективности ионизации биомолекул аналиты наносили на поверхность графитовой подложки вместе с глицерином. Сравнение со методом MALDI на примере определения пептида брадикинина показало, что степень ионизация в SALDI меньше. Наноструктурированные

алмазно-подобные углеродные пленки, нанесенные на стандартный DVD-диск, могут быть использованы для определения аминокислот, углеводов, липидов и пептидов. Углеводы и аминокислоты регистрируются в виде аддуктов с Na и K, пептиды – в виде протонированных молекул. Пределы обнаружения пептидов составляют величину порядка 10 пг/мл. Анализ структуры пленок показал высокое относительное содержание углерода в  $sp^2$ -гибридном состоянии, а также большое количество вакансий и других дефектов.

В работе [97] показано, что метод SALDI может быть использован для определения соединений, находящихся в газовой фазе. Молекулы аналитов вводили в вакуумную камеру масс-спектрометра с помощью капилляра. При этом один конец капилляра располагался над источником паров аналита (в частности, пиридина и диэтиламина) при атмосферном давлении, а второй конец находился в вакуумной камере масс-спектрометра. На основе полученных данных сделан вывод, что шероховатость поверхности на субмикронном уровне является важным фактором, определяющим эффективность ионизации.

Ряд работ посвящен изучению подложек из оксида титана. В работе [181] для детектирования пептидов и белка цитохрома C использовали пленки  $TiO_2$ , полученные золь-гель методом. Однако эффективная ионизация достигалась только при добавлении в раствор аналита цитратного буфера. Эти же авторы показали, что применение золь-гель метода в сочетании с молекулярным импринтингом (молекулярными отпечатками) позволяет обеспечить высокую селективность определения аналита, в частности, циклодекстрина [182]. Золь-гель метод также использован для получения на подложках из  $SiO_2$  мезопористых пленок  $TiO_2$ , которые применяли для определения красителя метиленового голубого и исследования процессов его фотодеградации под воздействием УФ-излучения [183].

Метод электрохимического травления использован для формирования поверхностного слоя из нанотрубок  $TiO_2$  на титановых подложках [184]. Показано, что при добавлении лимонной кислоты и ее солей такие подложки позволяют детектировать пептиды и белки с массами до 29000 а.е.м. Предел обнаружения пептида брадикинина составил 6 фмоль. Метод электрохимического травления титановой фольги использован также в работе [185]. Путем варьирования условий

анодирования были получены поверхностные слои нанотрубок  $\text{TiO}_2$  одинакового диаметра (100 нм), но разной длины (0.5, 1 и 2 мм). Сравнение различных слоев показало, что более высокой эффективностью ионизации характеризуются нанотрубки с длиной 0.5 мм. При их использовании величина ионного сигнала сунитиниба в 20 раз выше по сравнению с сигналом MALDI с матрицей DHB.

Метод электронно-лучевого испарения применен для формирования тонких пленок  $\text{TiO}_2$  (толщиной 50 нм) и последующей лазерной десорбции/ионизации на их поверхности соединений с небольшими молекулярными массами, в частности, аминокислот, сахаров и полиэтиленгликоля [186].

В качестве подложек для SALDI также изучен ряд других материалов. Наноструктурированные слои германия, полученные методом молекулярно-лучевой эпитаксии на кремниевые подложки, исследованы для лазерной десорбции/ионизации пептидов, белков, синтетических олигомеров и ряда других соединений в работе [187]. Вследствие рассогласования объёмных постоянных решёток германия и кремния нанесенные эпитаксией атомы германия собираются в нанокристаллиты с характерными размерами  $150 \div 200$  нм в ширину и около 50 нм в высоту. Предел обнаружения при определении пептида ангиотензина-1 оценен как 1 нмоль/л, а верхний диапазон детектируемых масс достигает 17000 а.е.м. Пленки  $\text{ZnO}$  толщиной 0.5 мкм, полученные магнетронным распылением, могут быть использованы для определения атенолола, резерпина и грамицидина С с пределом обнаружения на уровне 10 нмоль/л [188]. Мезопористый материал на основе оксидов титана и вольфрама изучен для детектирования пептидов [189]. Пленки оксида индия-олова (ИТО), нанесенные на стеклянную подложку с помощью магнетронного распыления, применяли для определения метаболитов аденозиндифосфата, стеариновой кислоты, монофосфата глицерина и пальмитиновой кислоты [190].

Среди различных материалов подложек, исследованных в качестве эмиттеров ионов, особое место занимают кремниевые материалы со специально приготовленным активным поверхностным слоем.

### ***1.6.3. SALDI с использованием кремниевых подложек***

Важным шагом в направлении развития варианта SALDI с использованием подложек стала работа [98], в которой показано, что высокая эффективность

лазерной десорбции/ионизации при анализе растворов органических соединений достигается при использовании пористого кремния. Этот вариант метода, получивший название DIOS (Desorption/Ionization on porous Silicon), получил интенсивное развитие в последующие годы.

Пористый кремний представляет собой материал, состоящий из нанокристаллитов кремния и пор размером от единиц до сотен нанометров, и характеризуется высокими значениями удельной поверхности (до  $500 \text{ м}^2/\text{см}^3$  и выше, в зависимости от степени пористости [191]), коэффициента поглощения в УФ-диапазоне (более  $10^4 \text{ см}^{-1}$  [192]), а также относительно низкой теплопроводностью (от трех до пяти порядков ниже, чем у монокристаллического кремния [193]). На рис. 1.7 приведены типичные изображения поверхности и среза подложки пористого кремния, полученные методом сканирующей электронной микроскопии.

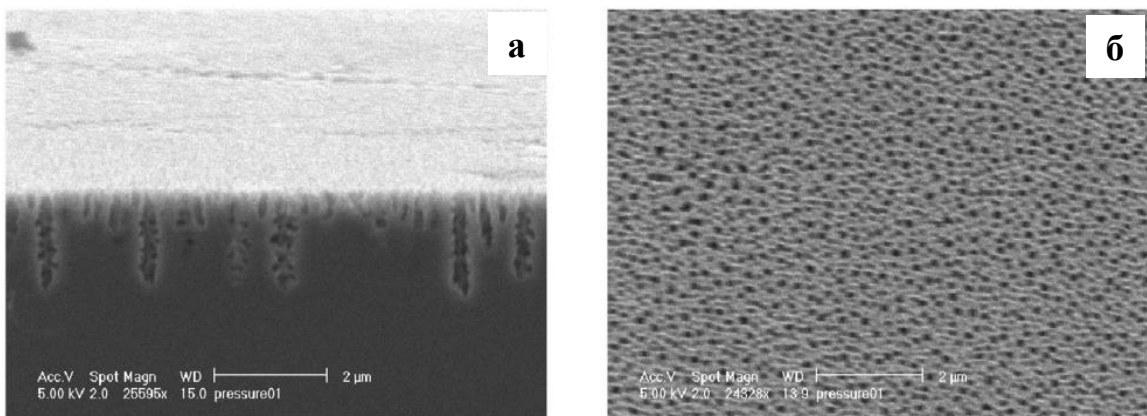


Рис. 1.7. Электронные микрофотографии среза (а) и поверхности (б) подложки пористого кремния, сформированного путем электрохимического травления [194].

### ***1.6.3.1. Способы получения кремниевых подложек для SALDI***

Стандартный способ формирования слоя пористого кремния основан на электрохимическом травлении (анодировании) пластины монокристаллического кремния в растворе, содержащем фтористоводородную кислоту HF [191]. При этом на обратной стороне пластины предварительно создают омический контакт, например, путем напыления алюминия. При положительном потенциале на кремниевом электроде (аноде), погруженном в раствор, содержащий HF, протекают многоступенчатые реакции растворения кремния. Катодом обычно

служит платиновая пластина. В результате на поверхности формируется пористый слой, изображенный на рис. 1.7. Толщина слоя пористого кремния практически линейно зависит от длительности травления. Варьируя параметры анодирования, можно получать слои с различной степенью пористости. Важным недостатком стандартного способа является значительная вариабельность между образцами. Кроме того, свежеприготовленные образцы нестабильны, и при хранении на воздухе быстро окисляются с образованием на поверхности диэлектрического оксидного слоя. Поэтому в ходе развития метода разработано большое число альтернативных способов формирования кремниевых поверхностей для SALDI.

Для получения пористого слоя разработан способ, основанный на электрохимическом травлении кремния в растворе, содержащем HF и I<sub>2</sub> [195]. Показано, что полученные таким образом подложки могут находиться на воздухе длительное время без ухудшения их ионизационных свойств. Сочетание стандартного варианта электрохимического травления с воздействием лазерного УФ-излучения предложено в работе [196] для формирования пористых слоев микрометровой глубины, обладающих высокой устойчивостью к воздействию лазерным излучением.

Способ химического травления с использованием системы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-металл-HF предложен в работе [197] и применен для получения эффективных кремниевых эмиттеров ионов [198, 199]. Способ основан на нанесении тонкого (около 3 нм) слоя металла, например, золота, на выбранный участок кремниевой пластины и последующем химическом травлении в водном растворе HF, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1:1:1). В результате формируется активный слой из вертикально расположенных плотно упакованных нановолокон диаметром порядка 10 нм и глубиной несколько мкм. После высушивания формируются поры размерами от 20 нм до 80 нм. Схожий вариант химического травления предложен в работе [200] и основан на обработке кремниевых пластин в растворе, содержащем HF и AgNO<sub>3</sub>. В процессе травления ионы серебра восстанавливаются до металлического серебра, которое осаждается в виде тонкого слоя на поверхности. Поэтому предварительное осаждение металлической пленки не требуется. В результате травления формируются нанокристаллический кремниевый слой, по своей структуре аналогичный слою при использовании системы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-металл-HF.

В работе [201] предложен способ обработки кремнийсодержащих материалов паро-газовой смесью, содержащей пары кислот  $\text{HNO}_3$  и  $\text{HF}$ . Кремниевую подложку помещают в кювету, частично заполненную смесью  $\text{HNO}_3$  (65%) и  $\text{HF}$  (40%), над поверхностью указанной смеси. Паро-газовая смесь, образующаяся при испарении кислот, реагирует с кремниевой подложкой, в результате чего на ее поверхности формируется слой мезопористого кремния.

Наряду с химическими методами, для получения активных кремниевых поверхностей для SALDI используются и физико-химические методы. В работе [97] исследованы непористые шероховатые подложки, полученные бомбардировкой кремниевых пластин быстрыми (с энергией примерно 5 эВ) атомами фтора. Подложку обрабатывали  $10^4$  импульсами пучка атомов фтора, что соответствует дозе  $10^{19}$  атомов/см<sup>2</sup>. Тонкие нанопористые пленки, полученные с помощью технологии скользящего углового осаждения, исследованы в работе [202] для определения углеводов.

Способ плазмохимического газофазного осаждения применен для формирования на поверхности вертикально расположенных стержнеобразных кремниевых структур диаметром порядка 10 нм и высотой до 100 нм [203, 204].

Способ формирования упорядоченных массивов наноразмерных полостей на кремниевой пластине предложен в работах [205, 206]. Способ иллюстрируется на рис. 1.8 и включает следующие стадии: 1) – окисление кремниевой пластины озоном, 2) – осаждение сферических наночастиц  $\text{SiO}_2$  с образованием тонкой пленки из плотно упакованных наносфер (матрицу) в результате конвективной самосборки, 3) – реактивное ионное травление смесью  $\text{SF}_6$  and  $\text{O}_2$ , в процессе которого матрица наночастиц используется в качестве маски для избирательного удаления участков поверхности пластины, 4) – удаление нанесенных наночастиц  $\text{SiO}_2$  путем ультразвуковой обработки пластин, 5) – удаление оставшегося окисленного слоя с помощью раствора  $\text{HF}$ .

В работах [207, 208] для получения поверхностного слоя из кремниевых нанопроволок диаметром  $10\div 40$  нм и длиной до 5 мкм применяли способ химического осаждения из газовой фазы, основанный на предварительном осаждении наночастиц золота и последующем выращивании кремниевых нанопроволок с использованием паров силана  $\text{SiH}_4$  в качестве реагента.

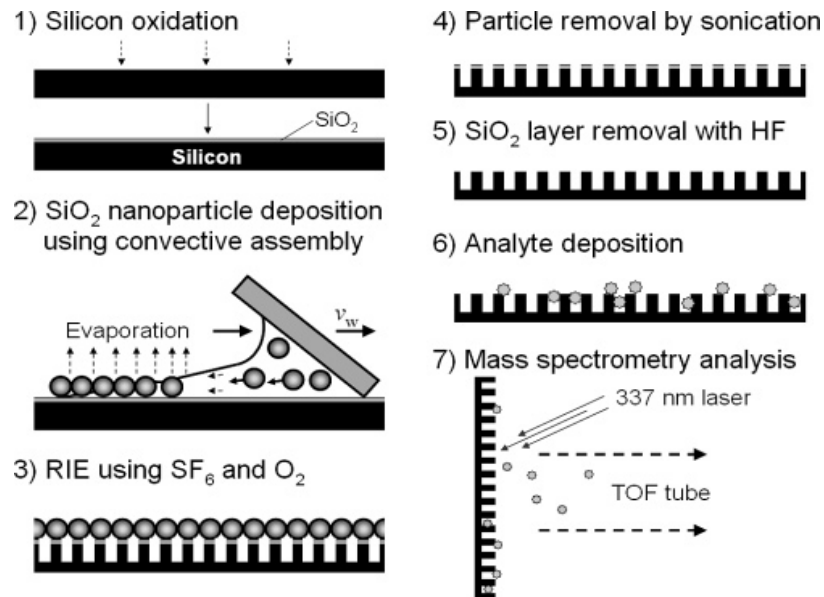


Рис. 1.8. Схема формирования упорядоченных массивов наноразмерных полостей на кремниевой пластине [206].

Способ формирования наноструктурированного кремниевого слоя, основанный на лазерной абляции кремниевой пластины в воде, в парах  $\text{SF}_6$  или атмосфере воздуха, предложен в работе [209]. В рамках способа пластину помещают в деионизованную воду или соответствующую атмосферу и обрабатывают лазерным излучением с плотностью лазерной энергии, превышающей порог абляции материала. В водной среде при использовании излучения с длиной волны 355 нм, плотность энергии составляет  $0.13 \text{ Дж/см}^2$ , количество лазерных выстрелов – 600.

Также, как и в вариантах SALDI на основе наночастиц, при формировании SALDI-активных кремниевых подложек часто используют химическую модификацию их поверхности органическими молекулами и функциональными группами. Целями модификации могут являться как предотвращение процесса окисления и увеличение стабильности ионизационных свойств подложек, так и увеличение эффективности ионизации. Предложено большое число различных вариантов модификации. В работе [210] модификацию осуществляли путем ковалентного прикрепления к кремниевой поверхности алкенов и алкинов гидросилилированием. 10-ундециленовая кислота или ее этиловый эфир использовали для модификации поверхности пористого кремния путем



ковалентного связывания через Si-C связи [211]. В работе [200] модификацию поверхности проводили путем воздействия растворов октадецилтрихлорсилана, перфтордецилтрихлорсилана или октилдиметилхлорсилана в гексане на подложку, полученную после травления в смеси HF и AgNO<sub>3</sub>. Для получения фторированных гидрофобных поверхностей свежеприготовленный пористый кремний обрабатывали парами (пентафторфенил)пропилдиметилхлорсилана [199]. Для определения ионных красителей, содержащих анионо- или катионообменные группы, предложено использовать пористый кремний с привитыми катионообменными (алкилсульфоновая кислота) и анионообменными (хлорид пропилоктадецилдиметиламмония) группами [212].

### *1.6.3.2. Механизм лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых подложек*

Несмотря на успешное применение кремниевых подложек для анализа различных образцов в условиях SALDI, сравнительно малое число работ посвящено исследованию механизмов десорбции/ионизации. Еще на начальном этапе развития метода было установлено, что монокристаллические кремниевые подложки не могут быть использованы в качестве эффективных эмиттеров ионов [97]. Степень ионизации химических соединений на них мала даже при высокой плотности энергии излучения (близкой к температуре плавления материала). Поэтому в процессе развития метода неоднократно предпринимались попытки найти корреляцию между эффективностью ионизации и структурными свойствами кремниевой подложки, а важная роль в моделях ионизации отводилась морфологии ее поверхности, в частности, «шероховатости», пористости или степени ее развитости. Можно выделить два подхода к описанию процесса SALDI.

В основе первого из них лежит представление о том, что аналит на поверхности эмиттера ионов находится в частично ионизованной форме, а твердотельный материал необходим для десорбции ионов. На базе такого подхода предложена модель образования ионов при лазерном воздействии на суспензии микрочастиц графита в замороженном водном растворе аналита [95], которая развита в работе [97] для описания процессов SALDI на поверхности пористого и шероховатого кремния и графита. Согласно модели, образование ионов обусловлено диссоциацией определяемых соединений в растворителе с

образованием протонированных или депротонированных молекул аналита. На основе экспериментов с относительно небольшим количеством различных органических соединений сделан вывод о том, что при использовании воды в качестве растворителя основным параметром, определяющим эффективность ионизации соединения, является величина  $pK_a$ . Предполагается, что ключевую роль в процессах разделения зарядов и последующей десорбции ионов играют полевые эффекты, связанные с наноразмерной шероховатостью поверхности эмиттера. Наноразмерные поверхностные структуры (острия) обеспечивают разделение противоположно заряженных ионов (ион-противоион) в условиях лазерного воздействия и приложенного электростатического поля, а также облегчают десорбцию ионов в газовую фазу. Основная роль лазерного излучения заключается в быстром локальном разогреве поверхности подложки и десорбции уже образованных ионов. Оценка температуры, необходимой для десорбции ионов, дала величину примерно 800 К [97].

Другой подход к построению моделей SALDI базируется на представлении о том, что процесс ионизации аналита протекает в газовой фазе над поверхностью эмиттера ионов, в облаке десорбированных ионов. На базе такого подхода развиваются модели SALDI, аналогичные моделям MALDI [198, 209, 213]. Схематично процесс лазерной десорбции/ионизации иллюстрируется рис. 1.9.

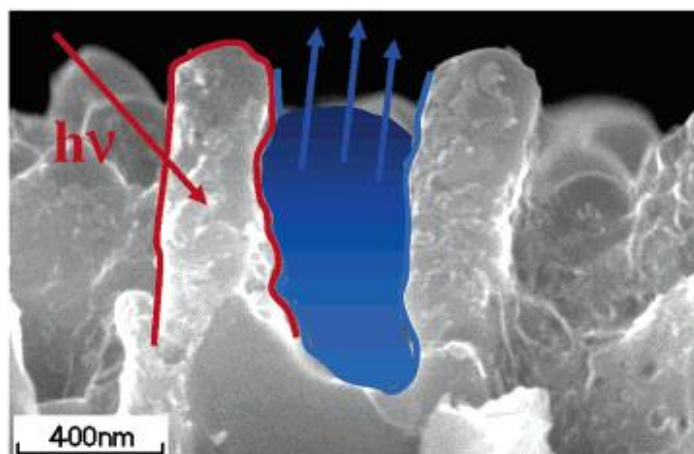


Рис. 1.9. Схема, описывающая процесс лазерной десорбции/ионизации на кремниевых подложках [209]. Растворитель, находящийся в порах, выполняет роль, аналогичную роли матрицы в методе MALDI.

Согласно предложенным моделям, важную роль играет пористая структура материала подложки, позволяющая удерживать анализируемый раствор в порах капиллярными силами в условиях вакуума. Вследствие высокого коэффициента поглощения и низкой теплопроводности пористого кремния воздействие лазерного излучения приводит к быстрому нагреву поверхности пористого слоя, передаче тепловой энергии находящемуся в порах раствору и взрывному совместному испарению молекул растворителя и аналита. Ионизация определяемых соединений протекает над поверхностью в области, аналогичной «факелу» в условиях MALDI. Таким образом, растворитель выполняет функцию, аналогичную функции матрицы, обеспечивая десорбцию и последующую ионизацию аналита. Один из выводов модели заключается в том, что для реализации более эффективной десорбции необходимо применять такую модификацию поверхности, которая позволяет уменьшить энергию связи адсорбированных молекул с поверхностью пористого кремния [213].

В работе [206] предложена «гибридная» модель, согласно которой десорбция/ионизация обусловлена двумя конкурирующими процессами: для кремниевых подложек с низкой степенью пористости преобладает прямая лазерная десорбция/ионизация (LDI), в которой аналиты десорбируются непосредственно с нагретой поверхности кремния; для подложек с высокой пористостью реализуется описанный выше механизм «псевдо-MALDI».

В ряде работ по исследованию механизма SALDI с поверхности наночастиц предполагается, что движущей силой процесса десорбции является плавление материала наночастиц или разрушение их поверхности [214-216]. Нетермический механизм десорбции рассматривается и при описании лазерной десорбции/ионизации с подложек, выполненных из пористого алюминия, покрытого тонкими пленками металлов [217] и углеродных материалов, включая нанопористый графитизированный углерод и пиролитический графит [218]. Для пористого кремния отмечена корреляция между величиной ионного сигнала и изменениями морфологии поверхности, на основании чего высказано предположение о том, что десорбция не является строго термическим процессом и может быть частично обусловлена реструктуризацией и плавлением поверхностного слоя [219, 220].

### *1.6.3.3. Применение кремниевых подложек для определения органических соединений*

В ходе развития метода опубликовано большое количество работ по применению лазерной десорбции/ионизации на кремниевых подложках для определения различных химических соединений. Почти во всех экспериментах приборная реализация SALDI базируется на применении серийных лазерных масс-спектрометров, оборудованных ионным источником MALDI. В качестве масс-анализатора чаще всего используется времяпролетный рефлектрон, а в качестве источника лазерного излучения - азотный лазер или Nd:YAG лазер на третьей гармонике излучения. Обычно анализ проб включает нанесение раствора, содержащего определяемые соединения, на активную поверхность кремниевой подложки, установку подложки в ионный источник масс-спектрометра (после испарения растворителя), воздействие на поверхность лазерного излучения и регистрацию масс-спектров.

Нанесение раствора капельным способом может приводить к неоднородному распределению молекул определяемых соединений по поверхности эмиттера ионов. Для более однородного и контролируемого нанесения пробы предложено использовать стандартный метод электрораспыления растворов аналита при атмосферном давлении [221]. Преимуществами электрораспыления по сравнению с капельным способом являются равномерность, стабильность и лучшая воспроизводимость нанесения пробы.

Одно из наиболее широко используемых приложений SALDI – это решение задач протеомики, в частности, детектирование и идентификация пептидов, которые плохо определяются методом MALDI, повышение надежности идентификации белков путем использования «информационного окна» в области малых масс спектра, определение посттрансляционных модификаций белков. Здесь основное направление – это развитие восходящей «снизу вверх» протеомики. Уже в первых работах по применению кремниевых материалов в качестве эмиттеров ионов для лазерной десорбции/ионизации исследованы некоторые пептиды, и показано, что по чувствительности их определения метод SALDI не уступает MALDI [97, 98, 210, 222]. В работе [223] изучена лазерная десорбция/ионизация пептидов с пористого кремния (AP-DIOS) при атмосферном давлении. Сравнение

масс-спектров AP-DIOS и AP-MALDI на примере анализа пептидной смеси, полученной в результате трипсинолиза альбумина, показало, что в диапазоне масс  $200 \div 1000$  а.е.м. лазерная десорбция/ионизация с пористого кремния обеспечивает идентификацию большего числа пептидных компонентов. При этом комбинация методов позволяет удвоить количество детектируемых соединений по сравнению с использованием методов по отдельности. Сравнение DIOS и MALDI с различными матрицами проведено также в работе [224] на примере определения пептидов, содержащих группу цистеин-сульфоуксусной кислоты (Cys-SO<sub>3</sub>H). Показано, что добавление цитрата диаммония позволяет существенно увеличить отношение сигнал/шум для обоих методов. Подложки нанокристаллического кремния, полученные химическим травлением кремниевых пластин в водном растворе NH<sub>4</sub>F/HNO<sub>3</sub>/AgNO<sub>3</sub>, изучены в качестве эмиттеров ионов для определения большого количества пептидов, включая синтетические пептиды и смеси, полученные в результате трипсинолиза белков [225]. В результате исследований продемонстрирована высокая эффективность метода для идентификации белков по их «пептидному отпечатку» в области малых масс ( $380 \div 1700$  а.е.м).

В работе [226] пористый кремний был применен для мониторинга биохимических реакций, катализируемых энзимами. Исследовано несколько энзимных систем, и в частности, изучена кинетика реакции гидролиза ацетилхолина до холина, катализируемой ацетилхолинэстеразой. Эффективность такого подхода также подтверждена в работе [227] при исследовании активности энзимов, иммобилизованных на поверхности пористого кремния.

В последние годы активно развивается направление, в котором метод SALDI используют для решения задач метаболомики. В работе [228] показано, что при анализе смеси из 30 метаболитов лазерная десорбция/ионизация с пористого кремния позволяет детектировать 26 соединений при комбинации режимов регистрации положительных и отрицательных ионов. Метод может быть использован для получения метаболитических следов при анализе бесклеточных супернатантов. Возможность эффективного применения SALDI для профилирования эндогенных метаболитов дрожжей продемонстрирована в работе [229]. Подложки из наноструктурированного кремния исследованы в качестве эмиттеров ионов для детектирования в стандартных образцах большого числа

(более 370) метаболитов, включая аминокислоты, нуклеотиды, углеводы, ксенобиотики, липиды и другие классы. Полученные результаты использованы для анализа образцов сыворотки крови человека, в которых удалось идентифицировать 108 метаболитов и липидов [230].

Значительное число работ посвящено применению SALDI для высокочувствительного определения лекарственных соединений, запрещенных стимуляторов и наркотических веществ. Ряд исследований посвящен анализу самих препаратов. Например, в работах [231, 232] пористый кремний был успешно применен для анализа нелегальных таблеток на содержание 3,4-метилендиокси-N-метамфетамина («экстази»). Дополнительно, в [231] показано, что в зависимости от используемого синтеза, в таблетках регистрируются различные примеси и высказано предположение, что профилирование примесей может предоставить информацию о происхождении нелегального продукта.

В большинстве исследований по этому направлению анализировали модельные растворы соединений, и аналитические параметры метода приводятся для чистых растворов. Однако, ряд работ посвящен анализу биологических жидкостей. Пористый кремний, модифицированный пентафторфенилпропилом, использовали для определения соединений группы амфетаминов, кокаина, диазепама и некоторых других в образцах слюны, с пределом обнаружения на уровне 100 нг/мл [233]. Для обеспечения длительного срока хранения, а также для снижения вязкости, образцы слюны разбавляли стандартным буфером типа «Cozar». Существенно более высокая чувствительность достигнута при использовании в качестве буфера бикарбоната аммония; предел обнаружения кокаина в образцах слюны составил 3.8 нг/мл [234]. В работе [235] подложки наноструктурированного кремния изучены для определения пяти лекарственных препаратов (хинидина, сульпирида, галоперидола, празозина и верапамил) в моче: 1 мкл анализируемого образца наносили на поверхность подложки, после чего инкубировали в увлажненной камере в течение 20 мин, промывали подложку и проводили анализ методом SALDI. Все пять соединений обнаруживали при концентрациях, превышающих 100 нг/мл, а четыре из них (кроме галоперидола) – при концентрации 10 нг/мл. Наноструктурированный кремний также успешно использовали для определения амфетамина, метамфетамина, кодеина, морфина и

кетамин в моче [236]. Образцы мочи предварительно центрифугировали в течение 10 мин, после чего 10 мкл супернатанта наносили на подложку и анализировали в условиях лазерной десорбции/ионизации. Пределы обнаружения лекарственных соединений в чистых растворах варьировались от 30 пг/мл для кодеина до 135 нг/мл для амфетамина. При анализе крови требуется более сложная, часто многостадийная пробоподготовка, которая обычно включает жидкостно-жидкостную или твердофазную экстракцию. В работе [237] пористый кремний использовали для идентификации катехоламинов (допамина и норадреналина) в экстракте лимфоцитов периферической крови с пределом обнаружения на уровне единиц фмоль аналита, нанесенного на подложку. Твердофазную экстракцию использовали для определения содержания салициловой кислоты в сыворотке крови в режиме регистрации отрицательных ионов, однако, с низкой чувствительностью [238]. Экстракцию в хлороформ использовали для определения в крови метадона с пределом обнаружения 19.5 нг/мл [239].

### 1.7. Заключение

Представленный в главе 1 обзор литературы показывает, что SALDI занимает важное место в ряду методов лазерной десорбции/ионизации. SALDI выгодно отличается высокой чувствительностью при определении различных классов органических соединений, простотой исполнения, «мягкой» ионизацией с низкой степенью фрагментации ионов, и может быть использован для решения различных задач аналитической химии.

В ходе развития SALDI выделилось два основных варианта метода, которые основаны на использовании для лазерной десорбции/ионизации наночастиц и подложек с активным поверхностным слоем. В настоящее время оба варианта динамично развиваются, появляются новые способы реализации метода на основе использования как наночастиц различной природы, так и твердотельных подложек. Все это затрудняет однозначную дефиницию понятия, выражаемого термином SALDI. Так, например, в ранних редакциях списка масс-спектрометрических терминов, рекомендованных ИЮПАК, SALDI определяли сначала как вариант MALDI, использующий в качестве матрицы «жидкость плюс частицы», затем – как самостоятельный «метод получения в газовой фазе ионов из молекул, нанесенных на специально приготовленную поверхность материала, который облучается

импульсным лазером”. В редакции списка 2013 г. под SALDI понимается “класс безматричных способов лазерной десорбции/ионизации биологических макромолекул” [93]. Такая дефиниция отражает тот факт, что метод SALDI развивался, главным образом, для анализа растворов нелетучих аналитов, в том числе высокомолекулярных биоорганических соединений. Задача определения летучих соединений обычно даже не ставилась, а исследования с использованием летучих соединений ограничивались выяснением механизмов лазерной десорбции/ионизации на различных поверхностях [97, 219]. Вместе с тем, как следует из обзора литературы, основная «аналитическая ниша» метода SALDI – это определение органических и биоорганических соединений с относительно низкими молекулярными массами. К числу низкомолекулярных относится большое количество важных на практике соединений, которые характеризуются относительно высокой летучестью или могут быть сравнительно легко переведены в газовую фазу путем нагрева. Традиционные варианты SALDI мало пригодны для их определения. Разработка новых подходов и научных основ, позволяющих ввести такие соединения в сферу аналитических задач, решаемых с помощью лазерной десорбции/ионизации, является важным и актуальным направлением дальнейшего развития метода SALDI.

Разработка нового направления лазерной масс-спектрометрии, включающего перевод определяемых соединений в газовую фазу, их адсорбцию на поверхности специально приготовленной кремниевой подложки и последующую лазерную десорбцию/ионизацию является основной целью диссертационной работы. Среди ряда фундаментальных и прикладных научно-технических задач, которые необходимо решить для достижения поставленной цели, следует выделить три следующих:

- разработка теоретических представлений о механизме лазерной десорбции/ионизации на кремниевых поверхностях. Рассмотренные в главе 1 модели SALDI были предложены для описания процессов, имеющих место при анализе растворов аналитов. Развитие нового направления требует разработки новых подходов к описанию механизма ионизации и десорбции летучих соединений в условиях их адсорбции из газовой фазы. При этом теоретические



модели должны опираться на результаты детальных исследований факторов, определяющих основные стадии процессов SALDI;

- разработка и создание принципиально новых вариантов инструментальной реализации метода. Все основные методы лазерной десорбции/ионизации в ходе развития базировались, главным образом, на использовании серийных лазерных масс-спектрометров, которые мало пригодны для определения содержания летучих соединений;

- разработка способов количественного анализа органических соединений в различных пробах. Низкую воспроизводимость результатов определения аналитов традиционно относят к основным проблемам методов лазерной десорбции/ионизации.

Разработка новых теоретических и экспериментальных подходов к определению летучих соединений открывает перспективы дальнейшего развития традиционного для метода SALDI направления - анализ растворов нелетучих аналитов. В рамках этого развития можно выделить такие актуальные задачи, как создание новых, более эффективных вариантов аппаратного обеспечения метода; улучшение метрологических характеристик метода; увеличение количества классов химических соединений, которые можно детектировать с высокой чувствительностью методом SALDI.

Достижение поставленной в диссертации цели позволит решить принципиально новый класс задач высокочувствительного определения и идентификации химических соединений с использованием лазерной десорбции/ионизации.

## **ГЛАВА 2. Факторы, определяющие эффективность лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на поверхности кремниевых материалов**

Одним из наиболее важных этапов в развитии любого метода анализа является экспериментальное и теоретическое исследование основных факторов, определяющих его аналитические характеристики. Методология масс-спектрометрического анализа с использованием лазерной десорбции/ионизации отличается простотой и включает нанесение пробы на поверхность твердого материала, воздействие на материал импульсным лазерным излучением и последующую регистрацию образовавшихся в результате такого воздействия ионов. Эффективность лазерной десорбции/ионизации (отношение числа ионов соединения, десорбированных с облучаемой лазером поверхности, к числу молекул соединения, нанесенных на эту поверхность) определяется тремя основными факторами: физико-химическими свойствами материала эмиттера ионов, параметрами лазерного излучения и химическими свойствами определяемых соединений.

Как отмечено в главе 1, результаты исследования влияния свойств материала на аналитические параметры метода и выбор на этой основе материалов – эмиттеров ионов составляют существенную часть опубликованных работ по SALDI. В ходе развития метода был изучен широкий круг различных веществ в качестве потенциальных эмиттеров ионов, но лишь небольшое число из них оказались эффективными для лазерной десорбции/ионизации органических соединений. Наибольшее распространение в безматричном варианте SALDI нашли кремниевые материалы, среди достоинств которых следует выделить следующие:

- самую высокую эффективность ионизации с переносом протона,
- исключительно высокую степень чистоты материала,
- сравнительную легкость обработки материала.

Необходимость предварительной обработки обусловлена тем фактом, что эффективность лазерной десорбции/ионизации на поверхности монокристаллических кремниевых подложках мала, и для реализации процесса SALDI необходимо предварительно сформировать на поверхности слой, отличающийся по своей структуре от монокристаллического. В процессе развития

SALDI неоднократно предпринимались попытки найти корреляцию между чувствительностью метода и структурой поверхностного слоя. Как показано в главе 1, чаще всего как ключевой фактор, определяющий эффективность лазерной десорбции/ионизации на кремниевых материалах, рассматривалась пористость слоя. Выдвигались и другие предположения, связывающие эффективность ионизации с особенностями структуры поверхности, например, со степенью шероховатости и ее характерным размером [97] или степенью развитости поверхности [219]. Однако, в целом, такие попытки не привели к успеху и не дали ответ на важный вопрос: какие свойства кремниевой подложки делают ее эмиттером ионов органических соединений при лазерном воздействии? Решение этой проблемы особенно важно для разработки метода количественного анализа с использованием кремниевых материалов.

Роль двух других факторов – лазерного излучения и химических свойств определяемых соединений, также остается недостаточно ясной. В традиционных подходах к описанию механизма SALDI предполагается, что основная функция лазерного излучения заключается в быстром нагреве эмиттера ионов для десорбции нанесенных на его поверхность молекул. Однако, как показано ниже, такая простая модель не объясняет многие экспериментальные данные. Остается также невыясненным вопрос, какие свойства молекул аналита определяют эффективность их ионизации и, соответственно, соединения каких химических классов могут быть определены методом SALDI на кремниевых материалах?

Практически все известные по литературе результаты исследований характеристик метода SALDI получены в условиях нанесения жидких проб при атмосферном давлении, когда крайне сложно обеспечить неизменность параметров, влияющих на ионный сигнал, и следовательно, высокую воспроизводимость результатов анализа при многократном нанесении пробы на поверхность эмиттера ионов.

В данной главе приведены результаты исследований основных факторов, определяющих эффективность SALDI с переносом протона, в условиях газо-фазного ввода пробы. При таком подходе эмиттер ионов постоянно находится в вакууме под воздействием десорбирующего лазерного излучения, а проба наносится путем адсорбции молекул аналита из газовой фазы. Использованный

вариант метода позволяет обеспечить постоянство условий анализа при многократном нанесении пробы на одну и ту же поверхность эмиттера ионов и нивелировать влияние дополнительных факторов, влияющих на результаты измерений.

## **2.1. Экспериментальная установка**

Схема экспериментальной установки для исследования основных факторов, определяющих эффективность SALDI, приведена на рис. 2.1. Установка включает времяпролётный масс-спектрометр, оптическую систему с лазерным блоком и систему регистрации и обработки масс-спектрометрических данных.

### **2.1.1. Масс-спектрометр с системой сбора данных**

В качестве масс-спектрометра используется времяпролётный масс-анализатор, собранный по линейной схеме, с длиной свободного пролёта 650 мм и ускоряющим промежутком 14 мм. Камера масс-спектрометра (1) откачивается турбомолекулярным насосом (VarianTurbo-V250), что обеспечивает остаточное давление в камере на уровне  $10^{-7}$  мм.рт.ст.

Детектором ионов (2) служит сборка двух микроканальных пластин (МКП) (F9892-11, Hamamatsu) с диаметром активной поверхности 42 мм. Длительность одноионного импульса МКП не превышает 1 нс. Сигнал с детектора ионов усиливается и подается для обработки на плату сбора данных (3) на основе высокоскоростного суммирующего аналого-цифрового преобразователя (АЦП) (AgilentU1081A, AcqirisAP100) с частотой дискретизации 1 ГГц и полосой пропускания 500 МГц, установленную в персональном компьютере (4). АЦП имеет локальный накопитель, который позволяет реализовать операцию аппаратного суммирования заданного количества подряд идущих отсчётов, что позволяет усреднять масс-спектры, следующие с частотой до 500 Гц, при частоте обмена с компьютером 1 Гц. Для временного согласования начала отсчётов используются синхроимпульсы от лавинного фотодиода (11) с временным разрешением примерно 1 нс. Система регистрации обеспечивает надёжное обнаружение сигнала единичного иона амплитудой 2 мВ, что соответствует 5 битам АЦП. Коэффициент пересчёта АЦП-отсчётов в ионный поток составляет  $0.2 (\text{бит} \times \text{нс})^{-1}$ .

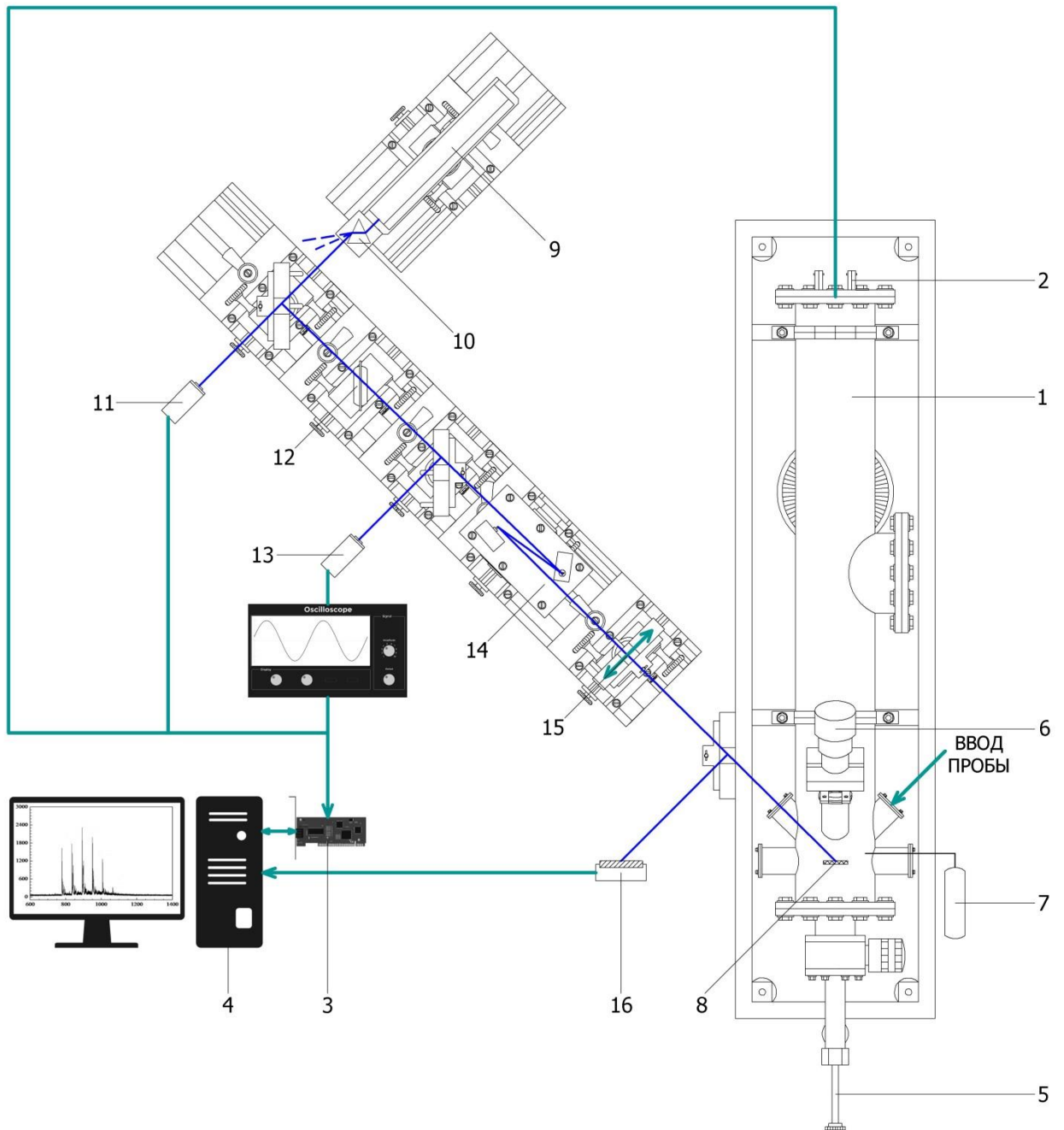


Рис. 2.1. Схема экспериментальной установки: 1 – вакуумная камера масс-спектрометра, 2 – детектор ионов, 3 – плата сбора данных, 4 – система регистрации и обработки сигнала, 5 – шлюзовая система, 6 – телевизионная камера, 7 – устройство регулируемой подачи паров химических соединений, 8 – подложка, эмиттер ионов, 9 – лазерная система, 10 – призма, 11 – фотодиод синхронизации, 12 – аттенюатор, 13 – фотодиод для измерения мощности излучения, 14 – двужеркальное устройство сканирования, 15 – линза, 16 – ПЗС-матрица.

Дальнейшая аппаратная обработка сигнала состоит в накоплении разовых сигналов во внутренней памяти платы сбора данных, передаче накопленного сигнала в персональный компьютер с частотой 1 Гц и последующей его обработке специальной программой [240]. Программа позволяет сохранять зарегистрированные масс-спектры во внутреннем формате данных, распечатывать масс-спектры и временные зависимости ионных токов, а также проводить обработку масс-спектров, в частности, определять центр каждого массового пика, производить калибровку по массам, обнаруживать спектральные пики (в том числе – перекрывающиеся) с автоматическим определением базовой и пороговой линий.

Масс-спектрометр оборудован шлюзовой камерой (5) для быстрой замены подложки – эмиттера ионов (8), позволяющей устанавливать подложку в ионном источнике без развакуумирования системы. Телевизионная камера (6), установленная перед одним из окон вакуумной камеры масс-спектрометра, дает возможность визуально контролировать установку подложки и правильность позиционирования пятна лазерного излучения на её поверхности. Еще одно окно, расположенное в плоскости подложки, используется для устройства регулируемой подачи в ионный источник паров воды, метанола или других химических соединений (7).

### ***2.1.2. Оптическая система с лазерным блоком***

В качестве источника лазерного излучения в экспериментальной установке используется Nd:YAG-лазер с диодной накачкой и генератором гармоник (9) (E.L.S. Co., Москва, модель РЛ-02.355) работающий с частотой повторения 300 Гц при длительности импульса 0.37 нс. Лазер излучает на длине волны 1064 нм. С помощью кристаллов нелинейного преобразования генерировалось излучение на удвоенной (длина волны  $\lambda = 532$  нм) и утроенной ( $\lambda = 355$  нм) частотах. Лазер обеспечивает высокую импульсную мощность (до 30 мкДж для третьей гармоники излучения) и отличается высокой стабильностью и надежностью в эксплуатации.

В экспериментах также использовали другие лазерные системы:

- азотный лазер с длиной волны 337 нм, энергией в лазерном импульсе 100 мкДж, длительностью импульса 3 нс, частотой следования импульсов до 50 Гц;

- Nd:YAG-лазер с диодной накачкой ТЕСН-351 («Лазер-компакт», Москва) с длиной волны 351 нм (третья гармоника основного излучения), энергией в

лазерном импульсе 200 мкДж, длительностью импульса 4.5 нс, частотой следования импульсов до 4 кГц.

Оптическая схема установки обеспечивает прохождение излучения в ионный источник и фокусировку на рабочей поверхности подложки с помощью линзы (15). Для ввода излучения в ионный источник установка оборудована окном из кварцевого стекла, расположенным под углом  $45^\circ$  к поверхности подложки. Излучение нужной длины волны выделяется с помощью призмы (10). Для регулировки плотности лазерной энергии используется аттенюатор (12), представляющий собой многослойное диэлектрическое зеркало, закрепленное на поворотном столике. Для контроля плотности энергии излучения в процессе измерений используется фотодиод ФД-7 (13).

Для увеличения площади облучаемой поверхности в экспериментальной установке реализовано сканирование поверхности лазерным лучом. С этой целью используется двузеркальное электромеханическое устройство (УСЛ-03, ИМКЭС СО РАН) (14), позволяющее задавать с компьютера скорость и траекторию движения лазерного луча по поверхности эмиттера ионов. Сканер состоит из 2-х зеркал, обеспечивающих развертку лазерного излучения в горизонтальной и в вертикальной плоскостях, что позволяет направлять излучение в любое заданное место поверхности эмиттера ионов. Форму и размер кадра можно менять в соответствии с решаемой задачей с помощью специально разработанной компьютерной программы. Длительность одного цикла сканирования в большинстве экспериментов составляла 1 с, что при частоте следования лазерных импульсов 300 Гц обеспечивало увеличение облучаемой площади в 300 раз.

Для исследования пространственного распределения плотности лазерной энергии на пути луча между линзой и окном вакуумной камеры устанавливали плоскопараллельную пластинку из кварцевого стекла. Часть излучения отражалась и попадала на чувствительный элемент ПЗС-матрицы (Gentec WinCamD, размер пиксела  $4 \times 4$  мкм, разрешение  $1024 \times 1200$ ) (16), которую использовали для определения поперечного распределения по поверхности интенсивности сфокусированного излучения. Плоскость рабочей поверхности ПЗС-матрицы могла быть ориентирована как параллельно плоскости поверхности кремниевой подложки, так и перпендикулярно падающему на неё излучению. В первом

варианте расположения вид распределения излучения на матрице воспроизводит распределение лазерного излучения на подложке, а второй вариант используется для определения параметров излучения.

На рис. 2.2 приведена схема эксперимента по исследованию распределения лазерного излучения по поверхности подложки. Лазерный луч, отраженный от кварцевого стекла, попадал на ПЗС-матрицу. Положение ПЗС-матрицы подбирали таким образом, чтобы длина оптического пути от точки отражения до её поверхности совпадала с длиной оптического пути от этой же точки до поверхности подложки – эмиттера ионов. С помощью программы DataRay осуществлялась оцифровка и передача в компьютер данных с ПЗС-матрицы. На компьютере производилась дальнейшая обработка полученных изображений. Характерный вид распределения по поверхности ПЗС-матрицы третьей гармоники излучения Nd:YAG-лазера, а также поперечное распределение мощности лазерного излучения в пятне фокусировки приведены на рис. 2.3. На основе этих данных, зная полную энергию лазерного импульса, получали значения плотности энергии в максимуме распределения, а также определяли площадь пятна. Площадь оценивали по уровню  $1/e$ . Для третьей гармоники излучения площадь пятна равнялась примерно  $10^{-4} \text{ см}^2$ .

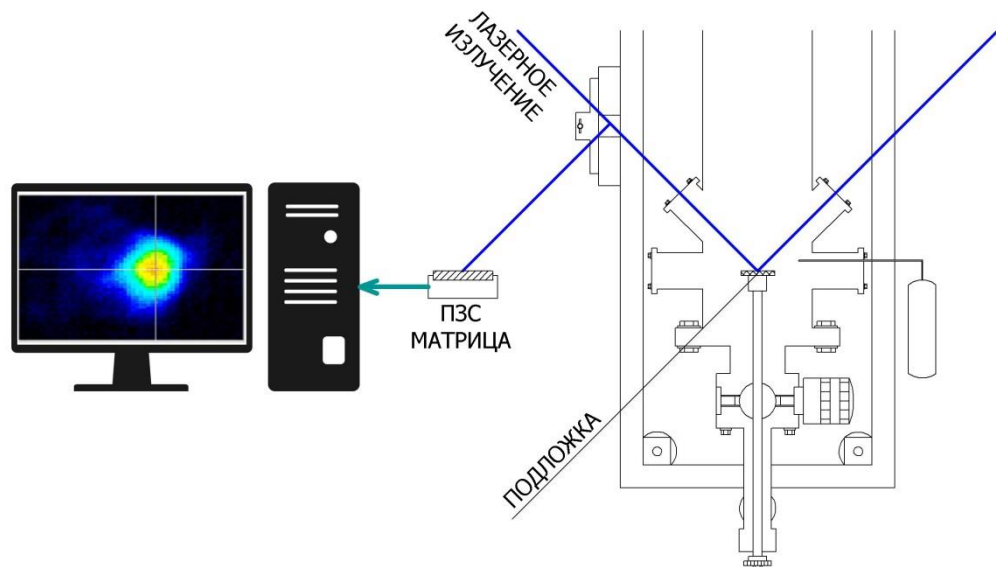


Рис. 2.2. Схема эксперимента по исследованию распределения излучения на поверхности эмиттера ионов с использованием ПЗС-матрицы.



На рис. 2.4 приведено изображение кадра сканирования, полученного с помощью ПЗС-матрицы. Измеренные расстояния между фокусами соседних лазерных импульсов и расстояние между дорожками в кадре составили, соответственно, 65 и 80 мкм. Плотность заполнения кадра сканирования была достаточной для того, чтобы обеспечить десорбцию адсорбированных соединений со всей площади кадра.

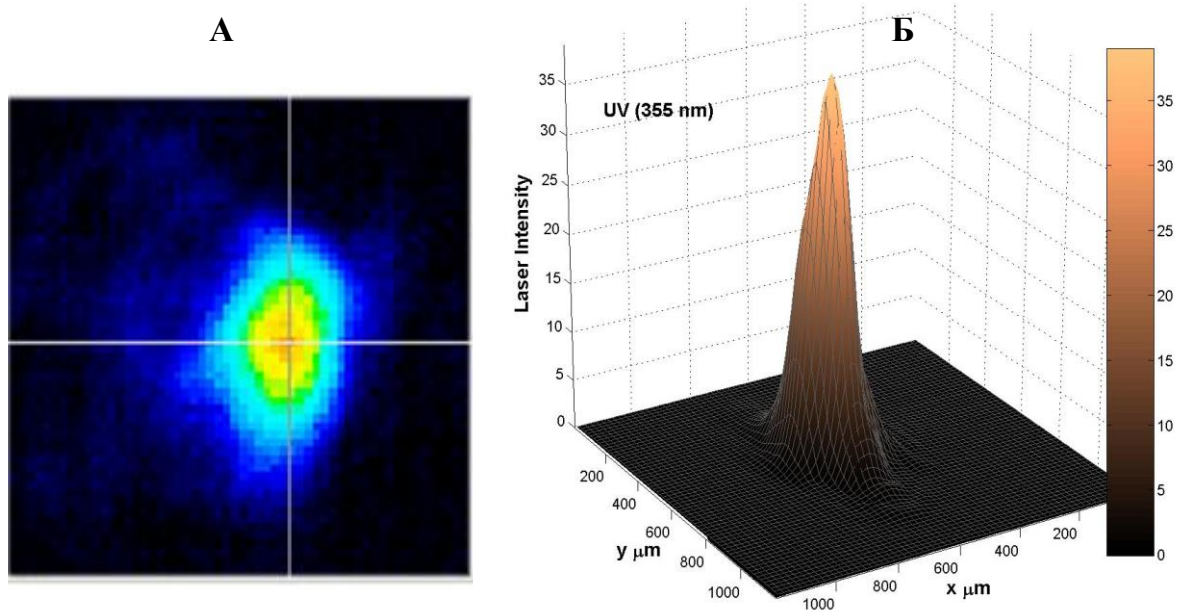


Рис. 2.3. Распределение плотности энергии излучения Nd:YAG-лазера (третья гармоника, длина волны 355 нм) по поверхности ПЗС-матрицы.

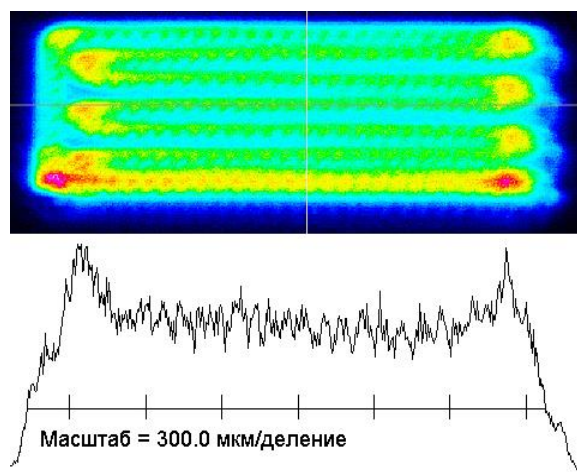


Рис. 2.4. Общий вид кадра и продольное распределение интенсивности лазерного излучения по поверхности эмиттера ионов в процессе сканирования лазерным излучением.

### ***2.1.3. Ввод пробы в масс-спектрометр***

Экспериментальная установка оснащена тремя различными окнами, предназначенными для ввода химических соединений в ионный источник масс-спектрометра. Ввод определяемых соединений осуществляли двумя различными способами.

Первый способ основан на использовании прогреваемого капилляра, выход которого располагается в вакуумной камере масс-спектрометра под углом  $45^\circ$  к оси источника на расстоянии 2 см от поверхности эмиттера ионов. Такое расположение обеспечивает прямой поток определяемых соединений на поверхность и не приводит к искажению ускоряющего поля в ионном источнике. Для импульсного ввода пробы применяли газовый хроматограф (ThermoQuest, GC8000 Series, Italy), разделительную колонку которого заменяли капилляром. Для создания постоянного потока определяемых соединений вход капилляра помещали при атмосферном давлении над парами соединения или раствором соединения в метаноле или другом растворителе.

Второй способ основан на использовании эффузионной ячейки Кнудсена – относительно простого, стабильного и воспроизводимого источника потока молекул. Ячейка Кнудсена представляет собой небольшой резервуар с отверстием известного размера, внутрь которого помещают твердую пробу, создающую при нагреве насыщенный пар. Зная давление насыщенного пара, температуру и геометрию расположения ячейки Кнудсена относительно поверхности подложки, легко подсчитать поток молекул соединения, поступающих на поверхность подложки.

В работе использовали ячейку Кнудсена с круглым выходным отверстием диаметром 0.3 мм, которую располагали под углом  $45^\circ$  к поверхности эмиттера ионов на расстоянии 2.5 см от поверхности. Проходящий через отверстие ячейки поток попадает непосредственно на поверхность подложки. Для регулирования величины потока молекул аналита ячейка Кнудсена снабжена термосенсором PT100 и нагревателем. При необходимости поток можно было перекрывать специальной заслонкой. Более детально узел ввода проб рассмотрен в главе 4.

Кроме аналита, в ионный источник масс-спектрометра могут быть введены и другие химические соединения. С этой целью установка оборудована системой

регулируемой подачи паров жидкостей (7), позволяющей создавать ненаправленный поток соединений в вакуумную камеру прибора.

Использованные в работе химические соединения, материалы и растворители получены коммерчески и использовались без дальнейшей очистки.

## **2.2. Исследование роли физико-химического состава поверхности кремниевых эмиттеров ионов**

В качестве эмиттеров ионов на первом этапе исследований были изучены следующие подложки:

1. Пористый кремний, полученный по стандартной методике электрохимического травления [191]. Для проведения травления один электрод закрепляли на обратной стороне пластины монокристаллического кремния (производство ОАО «ЭЛМА», РФ) а другой, представляющий собой платиновую пластину, помещали в раствор фтористоводородной кислоты HF. Степень пористости, а также толщину пористого слоя варьировали путем изменения концентрации кислоты (5÷50%), величины плотности тока (1÷50 мА/см<sup>2</sup>), а также длительности процесса травления (1÷10 мин). По окончании процесса травления подложки промывали сначала в 5% водном растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 3 минут, затем – в бидистиллированной воде в течение 3 минут, и, наконец, в 5% водном растворе HF в течение 1 минуты. Подложки изготавливали непосредственно перед их использованием в качестве эмиттера ионов. Обусловлено это быстрой деградацией ионизационных свойств пористого слоя при хранении на воздухе, обусловленной его окислением.

2. Пористый кремний, полученный по модифицированной методике электрохимического травления [195]. Методика была разработана для решения проблемы ухудшения ионизационных свойств пористого кремния при хранении. Отличительная особенность методики заключается в том, что травление ведут в электролите, дополнительно содержащем I<sub>2</sub>. Использованные в работе образцы пористого кремния формировали электрохимическим травлением при плотности тока 1 мА/см<sup>2</sup> в течение 1.5 мин в электролите, полученном путем добавления в раствор состава HF:H<sub>2</sub>O:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 1:1:2 равного объема 5% раствора йода в этаноле. В отличие от «стандартного» пористого кремния, подложки, полученные

по модифицированной методике, можно хранить в течение нескольких месяцев без существенного ухудшения их ионизационных свойств.

3. Непористый «шероховатый» кремний. Для формирования эмиттеров ионов применяли шлифовку кремниевых пластин и их ультразвуковую обработку шлифовальными порошками. С этой целью использовали суспензии в метаноле алмазных или сапфировых порошков со средними размерами 0.1, 1 и 5 мкм. Полученные кремниевые поверхности характеризовались отсутствием регулярной микроструктуры, а средний размер шероховатости был близок к среднему размеру зерна порошка.

Физико-химические свойства кремниевых поверхностей изучали методами атомно-силовой микроскопии (Solver P47, NT-MDT), Оже-спектроскопии с высоким пространственным разрешением (PHI-680, Physical Electronics Industries Inc.), ИК-Фурье спектроскопии (IFS-66v/S, Bruker), сканирующей электронной микроскопии (Supra 50VP, LEO, Karl Zeiss Group, и PHI-680, Physical Electronics Industries Inc.), а также SALDI масс-спектрометрии.

### ***2.2.1. Влияние химического состава поверхности на эффективность лазерной десорбции/ионизации***

Уже первые эксперименты со свежеприготовленным пористым кремнием показали, что выход ионов меняется в широких пределах в процессе лазерного облучения поверхности. Учет этого эффекта крайне важен как в практическом плане – при разработке методик количественного анализа проб, так и в теоретическом – для выяснения механизма ионизации.

Типичная зависимость полного ионного тока от времени воздействия лазерным излучением (количества циклов сканирования) в условиях постоянного потока молекул аналита на поверхность подложки и в присутствии паров воды приведена на рис. 2.5. В качестве аналита использовали кофеин. Полученная зависимость состоит из двух участков. На первом участке наблюдается быстрое уменьшение величины полного ионного тока в процессе лазерной обработки поверхности пористого кремния. Очевидным объяснением этого факта является очистка поверхности от адсорбированных соединений. Известно, что пористый кремний характеризуется высокими значениями удельной площади поверхности

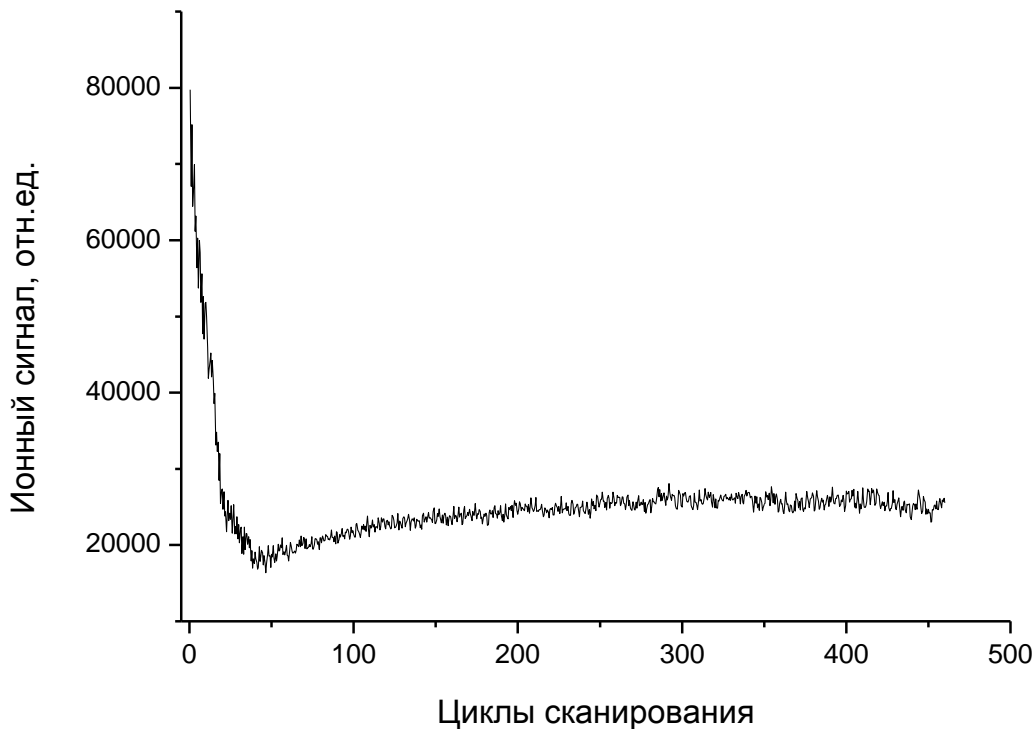


Рис. 2.5. Зависимость полного ионного тока (в диапазоне  $m/z$  100÷200) от времени воздействия лазерным излучением на свежеприготовленную подложку пористого кремния. Плотность энергии излучения  $20 \text{ мДж/см}^2$ , давление паров воды в камере масс-спектрометра –  $10^{-6}$  мм.рт.ст., анализ – кофеин.

(свыше  $500 \text{ м}^2/\text{см}^2$  [191]) и, следовательно, высокой сорбционной емкостью. Уменьшение сигнала при лазерной обработке обусловлено термической десорбцией молекул химических соединений, адсорбированных поверхностью за время, прошедшее между формированием пористого слоя и установкой подложки в масс-спектрометр.

Неожиданным выглядит то, что после участка снижения ионного тока наблюдается рост ионного сигнала. Сигнал возрастает в течение нескольких сотен циклов сканирования и достигает насыщения. Сравнение масс-спектров, полученных в процессе лазерной обработки, показывает, что рост сигнала имеет место только для протонированных молекул  $\text{MH}^+$  определяемых соединений (и их фрагментов). В качестве примера на рис. 2.6а и рис. 2.6б приведены два масс-спектра, зарегистрированных в начале и в конце процесса лазерной обработки в условиях эксперимента на рис. 2.5. Масс-спектр на рис. 2.6а практически не

содержит протонированных молекул кофеина (отношение массы к заряду  $m/z$  195), в то время на рис. 2.6б пик аналита становится доминирующим (в спектре также наблюдаются пики, соответствующие ионам щелочных металлов  $K^+$  и  $Na^+$ , и фрагментным ионам кофеина с  $m/z$  138).

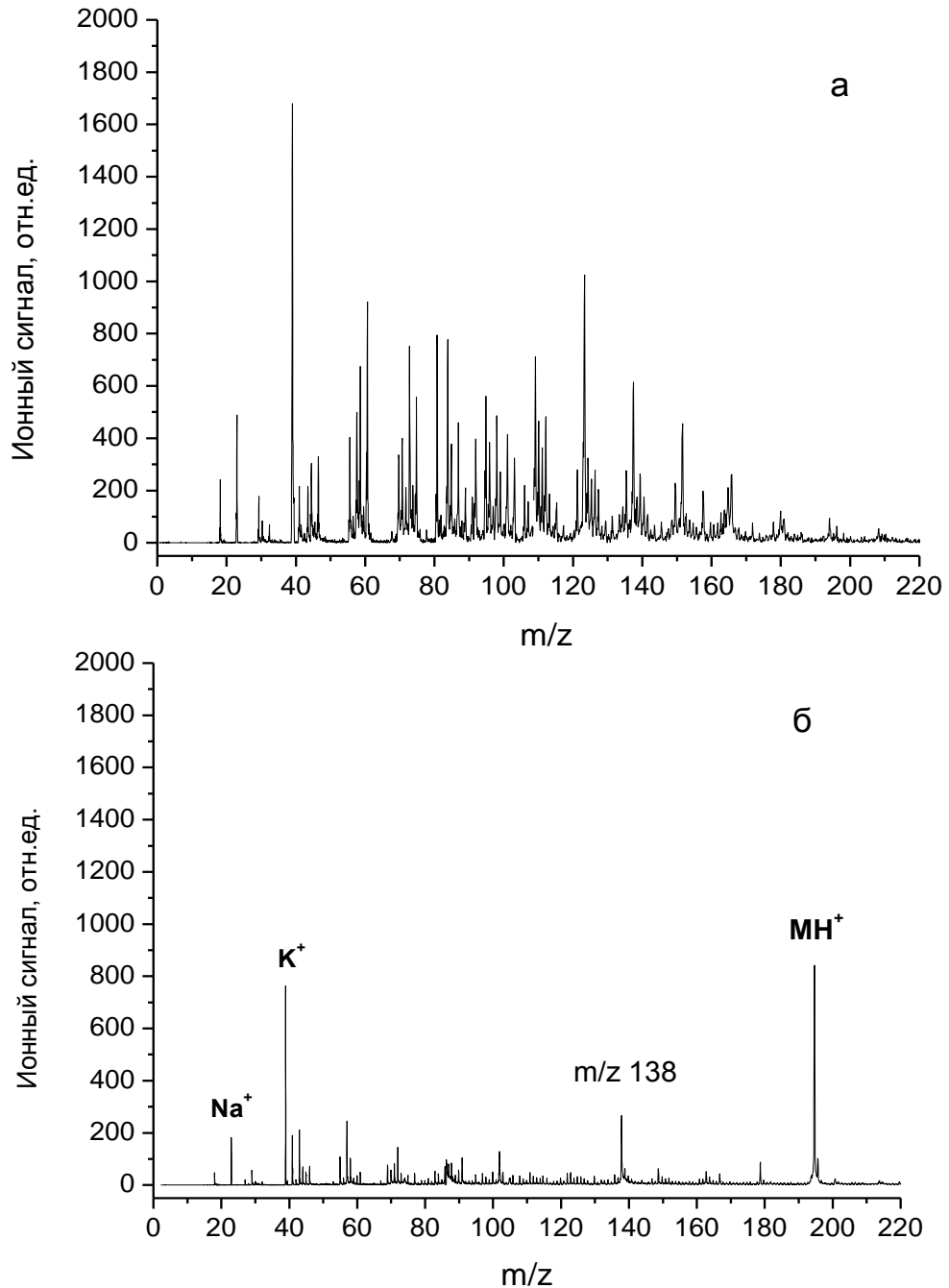


Рис. 2.6. Масс-спектры кофеина, зарегистрированные: (а) в начале, (б) в конце процесса лазерной обработки подложки пористого кремния в условиях эксперимента на рис. 2.5.

На рис. 2.7 показана зависимость ионного сигнала кофеина в области  $m/z$  195, из которой следует, что в процессе лазерной обработки поверхности пористого кремния сигнал возрастает на два порядка величины. Сравнение данных, приведенных на рис. 2.5 и рис. 2.7, позволяет сделать вывод, что участок роста на рис. 2.5 обусловлен исключительно увеличением ионного тока протонированных молекул аналита. С практической точки зрения важно, что ионный сигнал достигает максимума, выходит на насыщение и в дальнейшем сохраняется длительное время.

Процесс, аналогичный представленному на рис. 2.5, наблюдался для всех исследованных образцов пористого кремния и для всех соединений, которые ионизируются на его поверхности с образованием протонированных молекул. Различия заключались только в диапазоне энергий излучения, при которых процесс наблюдался, а также в длительности воздействия излучения до достижения насыщения ионного сигнала аналита.

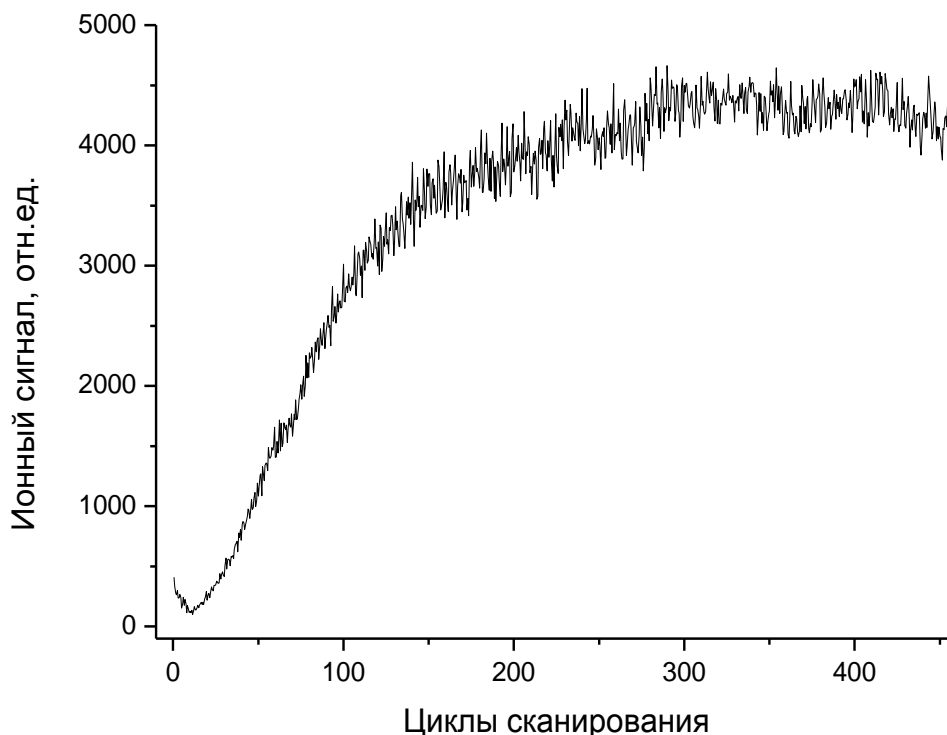


Рис. 2.7. Зависимость ионного тока протонированных молекул кофеина ( $m/z$  195) от времени воздействия лазерным излучением на свежеприготовленную подложку пористого кремния в условиях эксперимента на рис. 2.5.

Результаты исследования морфологии поверхности подложек до и после лазерного воздействия методами атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии показали, что процесс активации не приводит к каким-либо структурным изменениям поверхности. Более того, в соответствии с полученными данными, верхний предел диапазона энергий излучения, при котором процесс еще наблюдался, соответствует порогу разрушения пористого слоя. Рост ионного сигнала имел место как в условиях постоянного потока молекул аналита на подложку, так и при периодическом импульсном вводе пробы, что исключает в качестве возможной причины роста накопление молекул на поверхности вследствие их неполной десорбции при лазерном воздействии.

Представленные результаты позволяют предположить, что процесс нарастания ионного сигнала обусловлен химической активацией пористого кремния, связанной с изменением химического состава его поверхности. Для проверки этого предположения методом электронной Оже-спектроскопии был проведен сравнительный анализ элементного состава поверхности пористого кремния до и после лазерной обработки. Полученные Оже-спектры представлены на рис. 2.8. Из данных рис. 2.8а видно, что Оже-спектры исходных поверхностей, исследованных сразу после окончания процесса электрохимического травления, содержат только линии кремния (метод Оже-спектроскопии не позволяет детектировать легкие атомы водорода и гелия). Это согласуется с известными в литературе данными, что такие поверхности содержат, главным образом, силановые SiH-, SiH<sub>2</sub>- и SiH<sub>3</sub>-группы [191]. Результаты локального анализа химического состава показывают, что после проведения лазерной обработки поверхности в присутствии паров воды химический состав поверхности меняется. Наиболее существенное изменение заключается в появлении в спектрах интенсивной линии кислорода (рис. 2.8б).

Метод Оже-спектроскопии дает информацию об элементном составе, однако не может однозначно ответить на вопрос, какие кислородсодержащие функциональные группы формируются на поверхности в процессе химической активации. Ответ на этот вопрос может быть получен с помощью лазерной десорбции/ионизации. При высоких значениях плотности энергии лазерного излучения, превышающих порог разрушения пористого кремния, в масс-спектрах



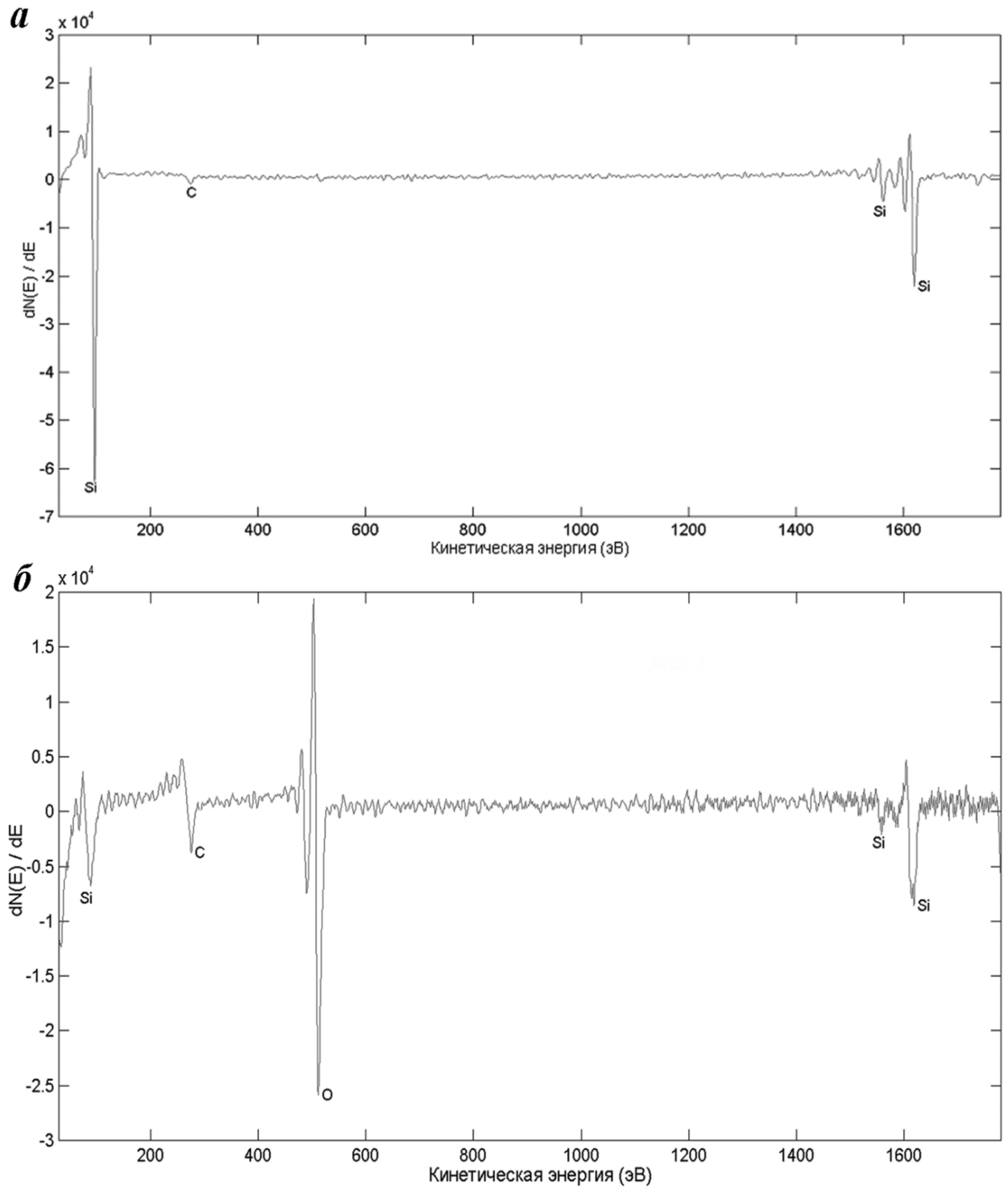


Рис. 2.8. Оже-спектры поверхности пористого кремния, полученные: а) – до начала, б) – после завершения процесса лазерной обработки.

появляются пики кремнийсодержащих ионов, характеризующие химический состав поверхности. Один из таких спектров, полученный после проведения активации, показан на рис. 2.9а.

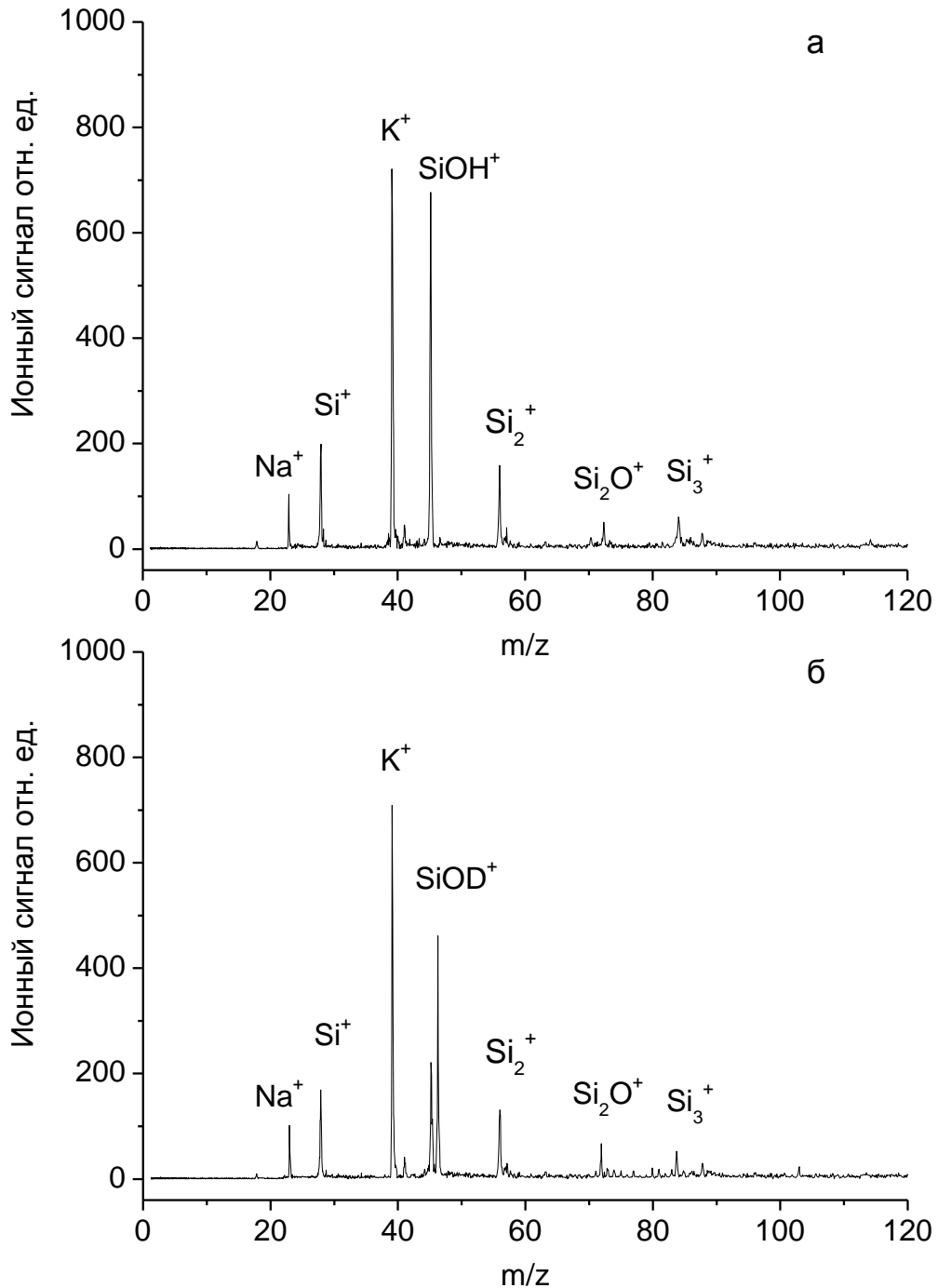


Рис. 2.9. Масс-спектры поверхности пористого кремния, полученные при плотности энергии лазерного излучения  $30 \text{ мДж/см}^2$  после активации в присутствии: (а) – паров воды  $\text{H}_2\text{O}$ , (б) – паров тяжёлой воды  $\text{D}_2\text{O}$ .

Масс-спектр зарегистрирован при выключенном сканирующем устройстве (отсутствие сканирования поверхности необходимо для того, чтобы избежать влияния органических соединений) при плотности энергии излучения  $30 \text{ мДж/см}^2$ . Видно, что масс-спектр содержит пики кремния и его кластеров  $\text{Si}^+$  ( $m/z$  28),  $\text{Si}_2^+$

( $m/z$  56),  $\text{Si}_3^+$  ( $m/z$  84), пики щелочных металлов  $\text{Na}^+$  ( $m/z$  23) и  $\text{K}^+$  ( $m/z$  39), а также пики с  $m/z$  45 и  $m/z$  72, которые легко интерпретировать как соответствующие ионам  $\text{SiOH}^+$  и  $\text{SiOSi}^+$ . Следует отметить, что кислородсодержащие пики с  $m/z$  45 и  $m/z$  72 отсутствуют в масс-спектрах, полученных до проведения активации поверхности. При включенном сканирующем устройстве, когда участок поверхности обрабатывается с частотой, в 300 раз меньшей, амплитуды всех регистрируемых пиков практически не менялись (в отличие от пиков, которые соответствуют молекулам соединений, сорбируемых поверхностью из газовой фазы). Этот факт свидетельствует о том, что наблюдаемые пики характеризуют химический состав самой поверхности.

Добавление в вакуумную камеру паров тяжелой воды в процессе активации приводило к смещению пика с  $m/z$  45 до  $m/z$  46 (рис. 2.9б), что можно объяснить образованием на поверхности пористого кремния дейтерированных силанольных групп  $\text{SiOD}^+$ . При этом положение других пиков в масс-спектре не менялось. Полученный результат служит дополнительным подтверждением интерпретации пиков на рис. 2.9.

Как показали эксперименты, лазерно-индуцированную активацию поверхности пористого кремния можно провести, используя и некоторые другие химические соединения, содержащие гидроксильную группу, например, метанол или уксусную кислоту. В качестве примера на рис. 2.10 приведен масс-спектр, характеризующий состав поверхности пористого кремния после проведения активации в присутствии паров метанола. Видно, что масс-спектр содержит тот же набор пиков, что и на рис. 2.9. Дополнительно, в спектре регистрируется интенсивный пик с  $m/z$  59, соответствующий ионам состава  $\text{SiOCH}_3^+$ . При замене метанола на дейтерированный метанол  $\text{CD}_3\text{OD}$  наблюдалось смещение пика с  $m/z$  45 до  $m/z$  46, а пика с  $m/z$  59 до  $m/z$  62 вследствие замены ионов  $\text{SiOH}^+$  на  $\text{SiOD}^+$  и  $\text{SiOCH}_3^+$  на  $\text{SiOCD}_3^+$ . Этот результат свидетельствует о том, что формирование поверхностных групп в процессе активации обусловлено воздействием метанола. Следует, однако, отметить, что в отличие от воды, активация поверхности с использованием органических соединений приводит к постепенной деградации ионизационных свойств пористого кремния, причина которой рассмотрена в разделе 2.4.

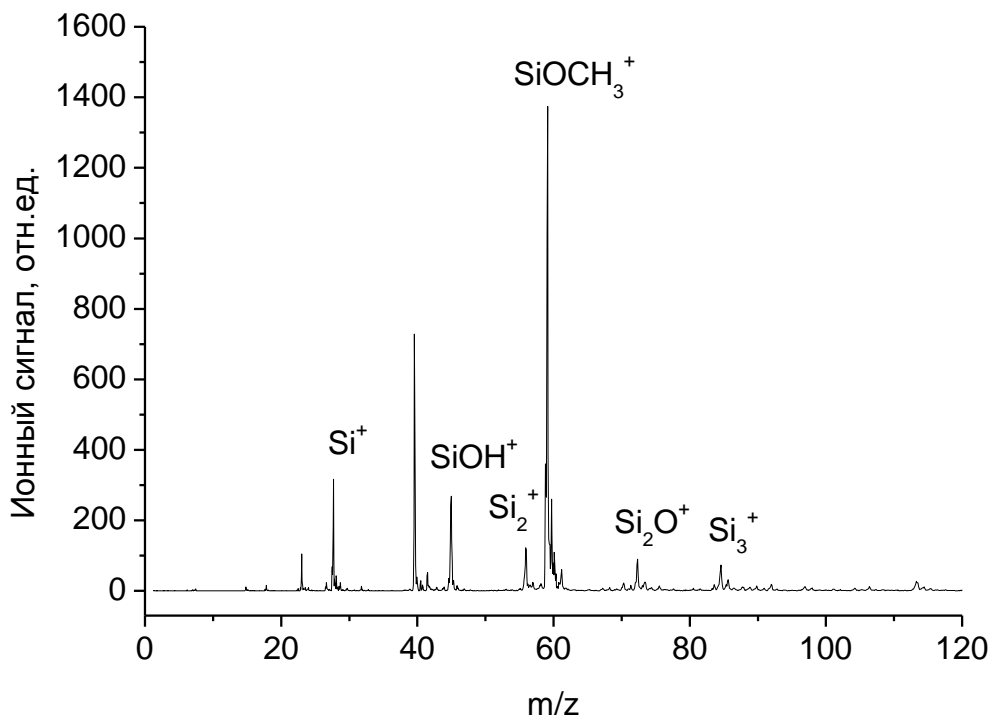


Рис. 2.10. Масс-спектр поверхности пористого кремния, полученный при плотности энергии лазерного излучения  $30 \text{ мДж/см}^2$  после активации в присутствии паров метанола.

Дополнительным свидетельством в пользу химической природы активации могут служить эксперименты с пористым кремнием, полученным анодированием в йодсодержащем электролите. Поверхность такого пористого кремния частично пассивирована йодом. При воздействии лазерным излучением йод десорбируется и детектируется в режиме регистрации отрицательных ионов в виде ионов  $\Gamma^-$ . На рис. 2.11 приведены зависимости величины выхода ионов  $\Gamma^-$  в процессе лазерной обработки свежеприготовленных подложек (кривая 1). Уменьшение ионного сигнала йода сопровождается соответствующим ростом ионного сигнала аналита триэтиламина (кривая 2), как и в приведенных на рис. 2.7 данных. Исследования химического состава поверхности с помощью лазерной десорбции/ионизации в режиме высоких значений плотности лазерной энергии показали, что масс-спектры поверхности пористого кремния, полученного анодированием в йодсодержащем электролите, после его активации полностью аналогичны масс-спектрам на рис. 2.9.

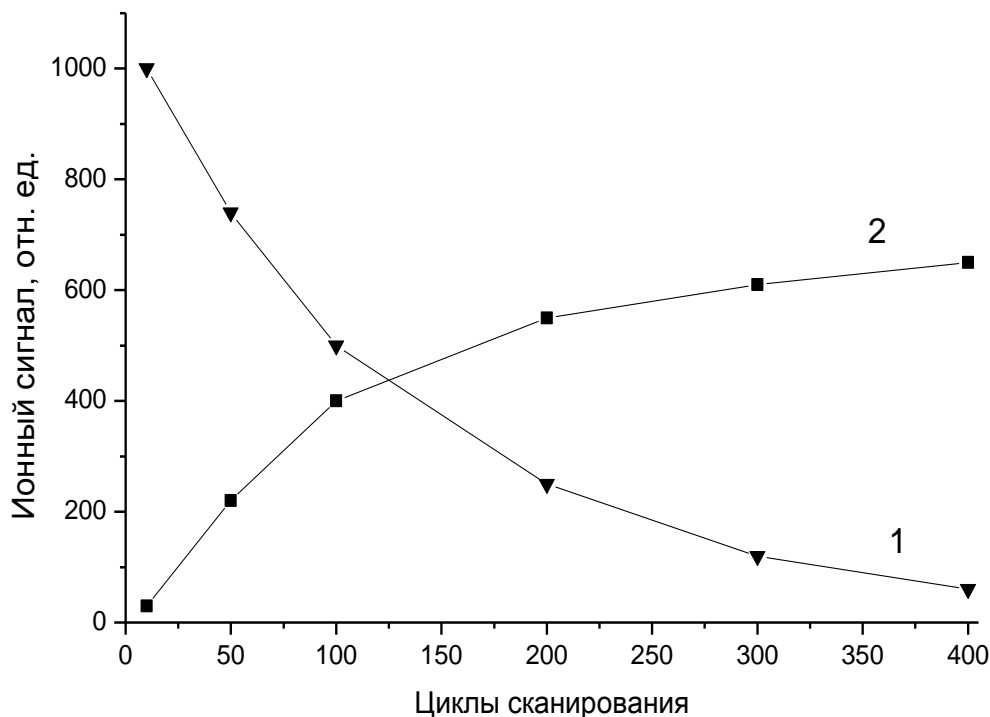


Рис. 2.11. Зависимость величины выхода ионов йода Г (1) и протонированных молекул триэтиламина (2) от времени воздействия лазерным излучением на свежеприготовленную подложку пористого кремния, полученного анодированием в йодсодержащем электролите. Плотность энергии излучения  $20 \text{ мДж/см}^2$ , давление паров воды в камере масс-спектрометра –  $10^{-6} \text{ мм.рт.ст.}$

Приведенные результаты позволяют сделать вывод, что лазерно-индуцированная активация пористого кремния, в процессе которой выход протонированных молекул определяемых соединений увеличивается более чем на два порядка величины, заключается в формировании на его поверхности силанольных SiOH-групп. Можно предположить, что именно эти группы являются центрами адсорбции и последующей ионизации с переносом протона в процессе SALDI.

### ***2.2.2. Влияние структуры поверхности на эффективность лазерной десорбции/ионизации***

Не только химический состав, но и структура поверхностного слоя кремниевой подложки относится к факторам, определяющим аналитические характеристики метода. Как показали эксперименты, эффективность лазерной

десорбции/ионизации на поверхности монокристаллического кремния в условиях газофазного ввода пробы близка к нулю, что соответствует литературным данным с нанесением жидких проб. Обработка монокристаллической пластины шлифовальным порошком уже позволяет использовать такую «шероховатую» подложку в качестве эмиттера ионов в процессе SALDI, однако величина выхода ионов остается низкой. Эффективность ионизации можно значительно (до двух-трех порядков величины) увеличить путем лазерной модификации подложки. В отличие от лазерно-индуцированной химической активации, лазерная модификация проводится при интенсивностях излучения, превышающих порог появления кремния в масс-спектрах, и имеет своим следствием изменение структуры поверхности. Пример такой реструктуризации приведён на рис. 2.12, где представлены изображения шлифованных кремниевых поверхностей до и после модификации. Длительное (более  $10^3$  импульсов в одно и то же место) воздействие лазерного излучения с плотностью энергии примерно  $50 \text{ мДж/см}^2$  приводит к образованию наноструктурных неоднородностей. При этом неоднородности формируются преимущественно в областях, где нарушена правильная структура в процессе шлифовки.

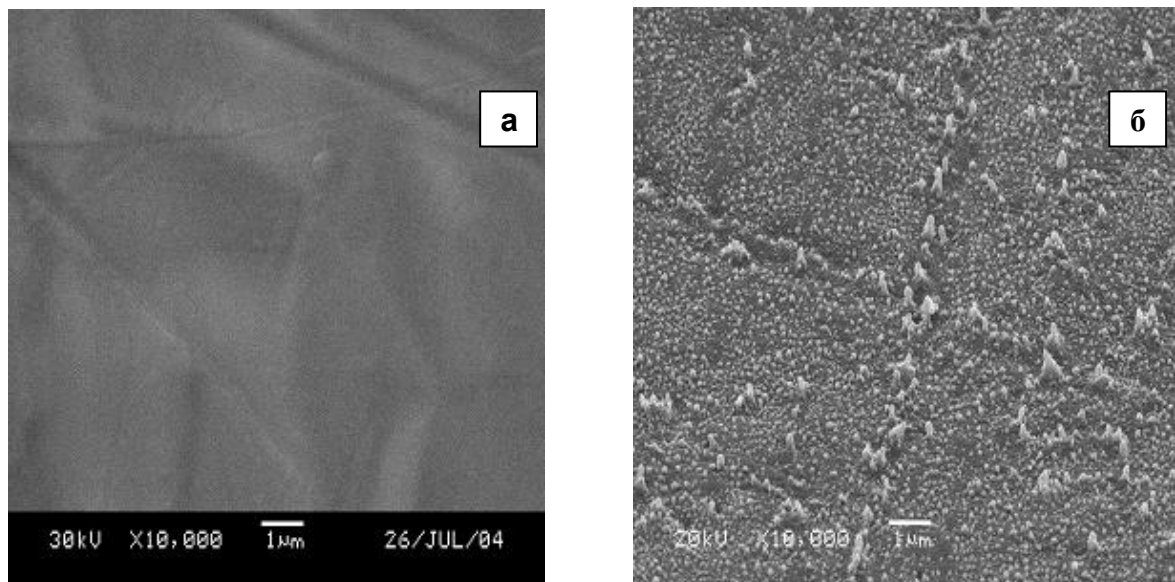


Рис. 2.12. Электронные микрофотографии шлифованных кремниевых поверхностей, полученные до (а) и после (б) лазерной модификации.

Таким образом, изменение структуры приповерхностного слоя может кардинальным образом менять величину выхода ионов. Известные в литературе подходы к описанию процесса SALDI под структурой подразумевают геометрическую структуру – морфологию поверхностного слоя.

Следует отметить один общий для эффективных кремниевых эмиттеров ионов признак: все они принадлежат к классу сильно неупорядоченных полупроводниковых материалов. Электрохимическое травление, обработка подложки лазерным излучением с высокой плотностью энергии, бомбардировка поверхности атомами или ионами, а также другие известные способы формирования SALDI-активного слоя приводят, в конечном счете, к образованию приповерхностного слоя с нарушенной структурой. Морфология такого слоя может быть самой разнообразной, но общим свойством является высокая плотностью структурных дефектов.

Примером неупорядоченного полупроводникового материала является аморфный кремний  $\alpha$ -Si, который обычно получают радиочастотным распылением монокристаллического кремния в атмосфере аргона при давлении  $10^{-2} \div 10^{-3}$  мм.рт.ст. Структура аморфного кремния характеризуется отсутствием дальнего порядка и часто описывается как случайная решётка из четырёх-координированных атомов [241]. Длина связей в  $\alpha$ -Si немного больше чем в кристаллическом кремнии, а разброс величин углов между связями и тетраэдрическим углом ( $\sim 109^\circ$ ) лежит в диапазоне приблизительно от  $-10^\circ$  до  $+10^\circ$ . Большое напряжение в решётке аморфного кремния способствует образованию структурных дефектов. Один из основных типов дефектов – оборванная связь, формирующаяся на трёх-координированных атомах кремния. Оборванные связи формируют сильно локализованные состояния примерно в середине запрещённой зоны<sup>1</sup> [242, 243]. Наличие неспаренных электронов, локализованных на оборванных связях, регистрируется методом электронного парамагнитного резонанса [244]. Оборванные связи распределены примерно равномерно в объёме аморфного материала, полученного радиочастотным распылением, и их плотность оценивается

---

<sup>1</sup> Вид зависимости плотности состояний аморфного кремния количественно отличается от того, который характерен для кристаллического кремния, но, тем не менее, сохраняет с ним качественное сходство [247], что позволяет описывать электронные свойства материала в терминах зонной теории.

на уровне  $10^{20}$  см<sup>-3</sup>. Таким образом, аморфный кремний как эмиттер ионов дает хорошую возможность проверить предположение о важной роли структурных дефектов в процессе SALDI.

В исследованиях использовали аморфный кремний  $\alpha$ -Si, сформированный стандартным методом радиочастотного распыления монокристаллического кремния марки КЭС при давлении  $10^{-3}$  мм.рт.ст. в атмосфере аргона. Пленки  $\alpha$ -Si наносили на подложки из монокристаллического кремния марки КЭС. Толщину аморфного слоя варьировали в диапазоне от 0.1÷0.5 мкм, меняя длительность процесса распыления. Толщину нанесенных слоев контролировали с помощью массочувствительных пьезоэлектрических резонаторов объемных акустических волн (собственная частота колебаний 16.5 МГц).

На рис. 2.13 представлен масс-спектр кофеина, полученный в условиях лазерной десорбции/ионизации с поверхности свежеприготовленного аморфного кремния. Поток аналита на поверхность подложки был таким же, как и на рис. 2.6. Видно, что масс-спектр содержит два основных пика с  $m/z$  195 и  $m/z$  138, которые соответствуют протонированным молекулам и фрагментным ионам аналита.

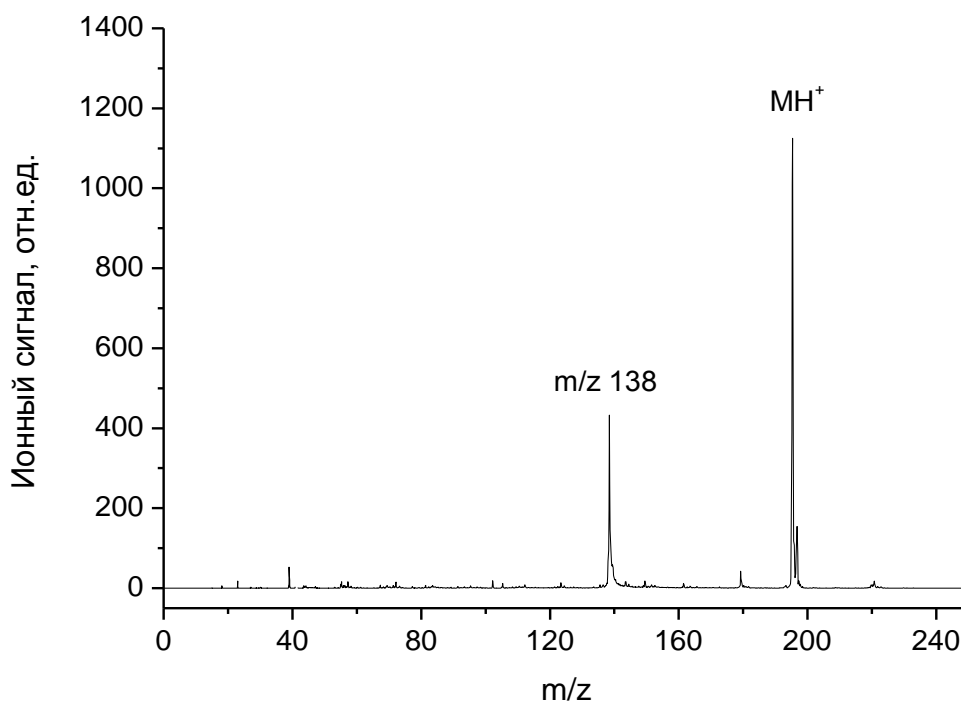


Рис. 2.13. Масс-спектр кофеина, полученный при использовании в качестве эмиттера ионов аморфного кремния  $\alpha$ -Si.



Сравнение спектров, приведенных на рис. 2.13 и 2.6б, показывает, что ионные сигналы кофеина, зарегистрированные с подложек аморфного и пористого кремния, близки по величине. Вместе с тем, подложки принципиально отличаются морфологией поверхностного слоя. Изображения поверхностей исследованных кремниевых подложек приведены на рисунке 2.14. Видно, что поверхность аморфного кремния является гладкой и практически не содержит шероховатостей, в то время как пористый кремний представляет собой набор нанокристаллитов, разделённых развитой системой пор.

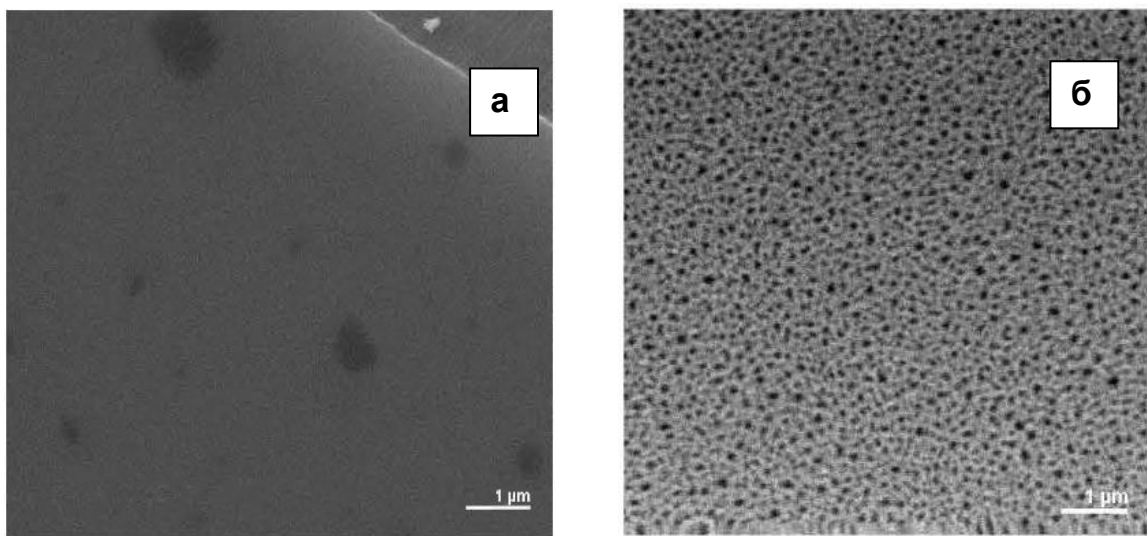


Рис. 2.14. Электронные микрофотографии поверхностей: (а) – аморфного кремния  $\alpha$ -Si, полученного радиочастотным распылением, (б) – пористого кремния.

Обратным примером может служить сравнение аморфного и монокристаллического кремния. И тот и другой материал характеризуются «гладкой» поверхностью, однако кардинально отличаются по степени ионизации. Таким образом, геометрическая структура кремниевой поверхности не относится к факторам, определяющим эффективность процесса SALDI.

Как отмечено выше, и пористый, и аморфный кремний являются материалами с сильно неупорядоченной структурой. Кроме того, оба материала характеризуются высокой плотностью электрически активных дефектов и связанных с ними локализованных состояний. Можно предположить, что именно эти факторы делают кремниевые подложки эффективными эмиттерами ионов. Для

выяснения того, какой фактор важен для процесса SALDI, были проведены сравнительные исследования двух видов кремния: аморфного  $\alpha$ -Si и аморфного гидрогенизированного  $\alpha$ -Si:H.

Одна из важных особенностей состояний, образованных дефектами типа оборванных связей - их способность захватывать неравновесные носители заряда. Характерное время жизни фотоиндуцированных носителей в  $\alpha$ -Si составляет величину порядка  $10^{-12}$  с [245], что создает серьезную проблему для использования  $\alpha$ -Si в качестве полупроводникового материала. Для решения этой проблемы предложено пассивировать оборванные связи атомами водорода в процессе осаждения аморфного слоя [244]. Встраивание водорода с образованием в объёме материала SiH-групп позволяет значительно, до уровня  $10^{14}$  см<sup>-3</sup> [246], уменьшить плотность состояний, соответствующих оборванным связям. Такой пассивированный водородом материал известен как аморфный гидрогенизированный кремний  $\alpha$ -Si:H. Как и  $\alpha$ -Si,  $\alpha$ -Si:H характеризуется высокой степенью структурной разупорядоченности, существенными внутренними напряжениями и искажениями длин связи и углов между связями. Оптические и теплофизические свойства этих аморфных материалов близки друг к другу. Основное отличие заключается в плотности электронных состояний, образованных оборванными связями. Поэтому представляло особый интерес сравнить два материала в качестве эмиттеров ионов в SALDI.

Использованный в исследованиях  $\alpha$ -Si:H получали стандартным методом радиочастотного распыления монокристаллического кремния марки КЭС при давлении  $10^{-3}$  мм.рт.ст. в атмосфере аргона и водорода H<sub>2</sub>.

На рис. 2.15 приведены два масс-спектра триэтиламина, зарегистрированных в одинаковых условиях с подложек  $\alpha$ -Si и  $\alpha$ -Si:H. Масс-спектр с поверхности  $\alpha$ -Si содержит интенсивный пик с  $m/z$  102, соответствующий протонированным молекулам триэтиламина, в то время как ионный сигнал аналита с  $\alpha$ -Si:H отсутствует. Аналогичный результат получен при детектировании других исследованных в работе аналитов. Таким образом, пассивация оборванных связей в аморфном кремнии приводит практически к полной потере чувствительности, что говорит о том, что именно локализованные состояния, образуемые оборванными связями, играют важную роль в процессе SALDI с переносом протона.

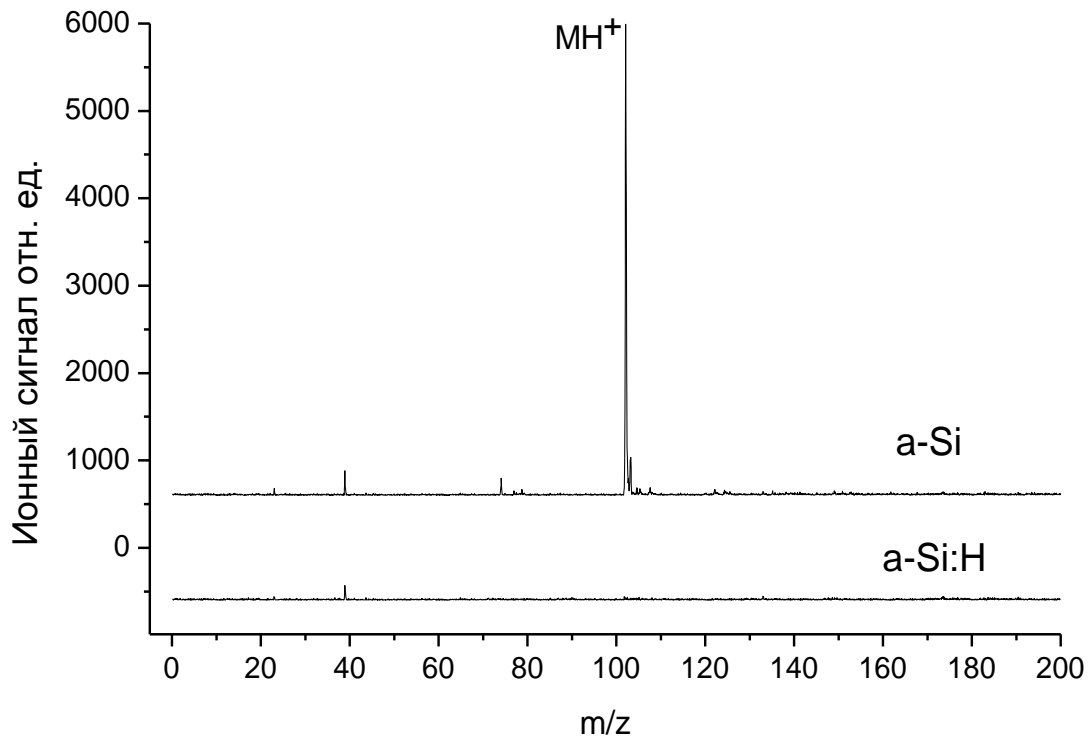


Рис. 2.15. Масс-спектры триэтиламина, полученные в одинаковых условиях при использовании в качестве эмиттеров ионов аморфного кремния  $\alpha$ -Si и гидrogenизированного аморфного кремния  $\alpha$ -Si:H.

Дефектам структуры типа оборванных связей соответствуют глубокие энергетические уровни. Представляет интерес также вопрос о влиянии на эффективность ионизации дефектов, соответствующих мелким энергетическим уровням. Для ответа на этот вопрос проведено сравнение подложек из пористого кремния, полученных в результате электрохимического травления кремниевых пластин, отличающихся кристаллографической ориентацией ((111) или (100)), степенью легирования (концентрацией легирующей примеси) и типом проводимости. В экспериментах использовали пластины p- и n-типа проводимости (марки КДБ и КЭС) с удельным сопротивлением от  $0.01 \Omega \times \text{см}$  до  $5 \Omega \times \text{см}$ . Сравнительные исследования показали, что концентрация мелкоуровневых дефектов в кремнии и их тип не влияют на эффективность лазерной десорбции/ионизации.

Таким образом, говоря о роли структуры кремниевых подложек в процессе SALDI, следует иметь в виду электронную структуру материала. Эффективные

эмиттеры ионов характеризуются высокой плотностью структурных дефектов, образующих глубокие уровни в запрещенной зоне.

### ***2.2.3. Влияние природы материала подложки на эффективность лазерной десорбции/ионизации***

По сравнению с электрохимическим травлением, способы получения кремниевых эмиттеров ионов в SALDI путем напыления тонких пленок имеют ряд преимуществ, в частности:

- обеспечивают возможность формирования однородного активного слоя на большой площади;
- обеспечивают высокую воспроизводимость физико-химических свойств эмиттера ионов;
- характеризуются низким уровнем фонового сигнала. Это, например, видно при сравнении масс-спектров на рис. 2.6б и рис. 2.13, полученных с пористого и аморфного  $\alpha$ -Si кремния;
- пленки могут быть нанесены на различные конструкционные материалы.

Дополнительным преимуществом способа формирования активного слоя путем напыления пленок является его универсальность. Технология распыления может быть использована для формирования пленок различных полупроводниковых материалов. Этот факт использован для получения различных материалов и последующего сравнения их ионизационных свойств в процессе лазерной десорбции/ионизации с переносом протона.

Методом радиочастотного распыления были получены и исследованы пленки следующих материалов: германия  $\alpha$ -Ge, оксида цинка ZnO и гидrogenизированного оксида цинка ZnO:H, оксида титана TiO<sub>2</sub>, оксида вольфрама WO<sub>3</sub>, оксида молибдена MoO<sub>3</sub>, оксида тантала Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и оксида ниобия Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Кроме того, были исследованы в качестве материалов эмиттера ионов вольфрам, серебро, нержавеющая сталь и графит. Как показано в главе 1, большинство из этих материалов в виде наночастиц или твердотельных подложек используются для анализа растворов нелетучих соединений методом SALDI. Электронные микрофотографии поверхностей некоторых из исследованных эмиттеров ионов приведены на рис. 2.16.

Как показано в разделе 2.3, величина ионного сигнала зависит от плотности энергии лазерного излучения. Кроме того, материалы имеют различные оптические и теплофизические свойства. Поэтому на предварительном этапе были изучены зависимости ионного сигнала тестовых аналитов от плотности энергии излучения, а сравнение ионизационных свойств подложек проводили при интенсивности излучения, соответствующей максимальному сигналу (если он существовал). Перед проведением измерений подложки обрабатывали лазерным излучением в течение 30 с для очистки поверхности от адсорбированных молекул. В качестве тестовых соединений были использованы: 1-фенилэтиламин, триэтиламин, кофеин и б-аланин.

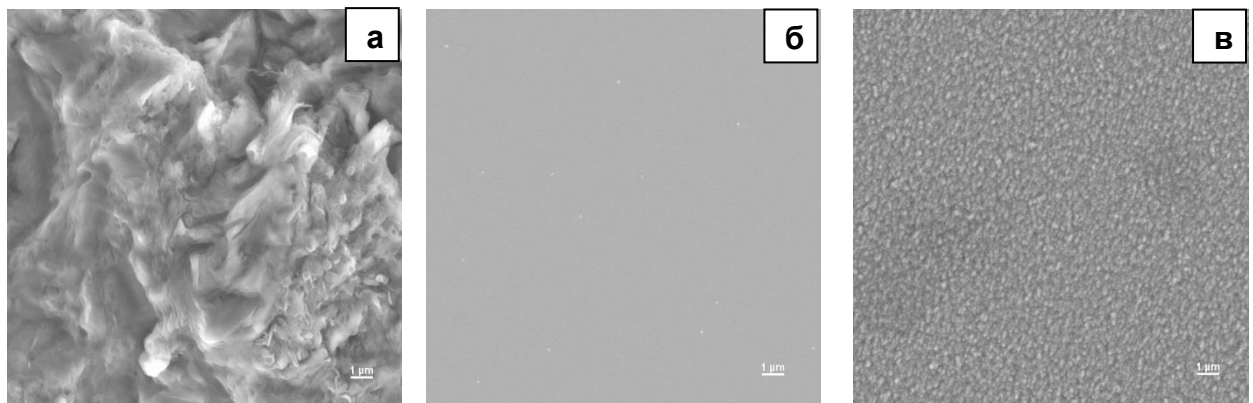


Рис. 2.16. Электронные микрофотографии поверхностей исследованных материалов: (а) – графит; (б) – оксид титана  $\text{TiO}_2$ ; (в) – оксид цинка  $\text{ZnO}$ .

В результате проведенных экспериментов установлено, что металлические подложки, а также оксиды  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  и  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  не дают ионного сигнала. С учетом диапазона использованных концентраций аналитов это означает, что эффективность ионизации на поверхности этих материалов, по крайней мере, на пять порядков величины ниже, чем на поверхности  $\alpha\text{-Si}$ .

В табл. 2.1 на примере определения кофеина приведены значения относительной эффективности лазерной десорбции/ионизации аналита на поверхности тех материалов, для которых удалось зарегистрировать ионный сигнал. За единицу принята эффективность ионизации на поверхности графита. Результаты сравнения подтверждают, что аморфный кремний обладает лучшими

ионизационными свойствами. Для лазерной десорбции/ионизации летучих соединений можно также использовать пленки оксида цинка, однако эффективность ионизации на поверхности ZnO более чем на два порядка величины ниже, чем на поверхности  $\alpha$ -Si. Еще меньшая величина чувствительности получена при использовании TiO<sub>2</sub>. Как следует из данных табл. 2.1, остальные исследованные материалы, хотя и позволяют получать ионный сигнал соединения, однако характеризуются низкой эффективностью ионизации.

Таблица 2.1. Сравнение ионизационных свойств поверхностей эмиттеров ионов при определении кофеина.

Материал подложки – эмиттера ионов	Относительная эффективность ионизации
пиролитический графит	1
аморфный германий $\alpha$ -Ge	3
гидрогенизированный оксид цинка ZnO:H	12
оксид вольфрама WO <sub>3</sub>	30
оксид титана TiO <sub>2</sub>	10 <sup>2</sup>
оксид цинка ZnO	2×10 <sup>2</sup>
аморфный кремний $\alpha$ -Si	5×10 <sup>4</sup>

### 2.3. Исследование роли лазерного излучения

Основными варьируемыми параметрами использованного в работе импульсного лазерного излучения, определяющими степень воздействия на кремниевые подложки, являются плотность энергии излучения и длина волны. Для выяснения роли излучения в процессах ионизации и десорбции были экспериментально исследованы зависимости величины выхода ионов в процессе SALDI от этих параметров.

### ***2.3.1. Зависимость эффективности ионизации от плотности энергии лазерного излучения***

На рис. 2.17 представлены характерные зависимости величины ионного сигнала с поверхности аморфного кремния от плотности энергии лазерного излучения (длина волны 355 нм, длительность импульса 0.35 нс) на примере детектирования морфолина, б-аланина и триоксиламина. Каждая точка на приведенных графиках представляет собой среднее значение ионного сигнала соединения в трех последовательных экспериментах. Видно, что зависимости содержат три различных участка. Начальные участки (примерно до  $20 \div 25$  мДж/см<sup>2</sup>) характеризуются экспоненциальным ростом величины выхода ионов при увеличении плотности энергии лазерного излучения. В интервале интенсивностей лазерного излучения  $25 \div 40$  мДж/см<sup>2</sup> ионный сигнал слабо зависит от плотности энергии. Следует отметить, что насыщение ионного тока наблюдалось при различных количествах адсорбированного аналита. Это свидетельствует о том, что насыщение ионного сигнала не связано с насыщением детектора ионов или перегрузками электронного тракта, а обусловлено десорбцией с поверхности всех молекул определяемых соединений. Дальнейшее увеличение плотности энергии излучения до величин, превышающих  $40$  мДж/см<sup>2</sup>, приводит к падению сигнала. При этом в масс-спектрах регистрируются пики кремнийсодержащих ионов, аналогичные приведенным на рис. 2.9а.

Такие же зависимости величины ионного сигнала от плотности энергии лазерного излучения получены для всех исследованных в режиме газовой фазы пробы аналитов. Небольшие различия наблюдались только в угле наклона кривых на первом участке, а также в значениях плотности энергии излучения, соответствующих насыщению сигнала. Кроме того, аналогичные зависимости регистрировались и для других кремниевых эмиттеров ионов. Отличие заключалось лишь в значениях плотности энергии излучения, характерных для каждого участка. Например, для образцов пористого кремния, полученных по стандартной методике электрохимического травления, выход на насыщение ионного сигнала наблюдался уже при значениях плотности лазерной энергии  $15 \div 17$  мДж/см<sup>2</sup>, а появление кремнийсодержащих пиков – при  $30$  мДж/см<sup>2</sup> (именно в этом режиме зарегистрированы масс-спектры, приведенные на рис. 2.9).

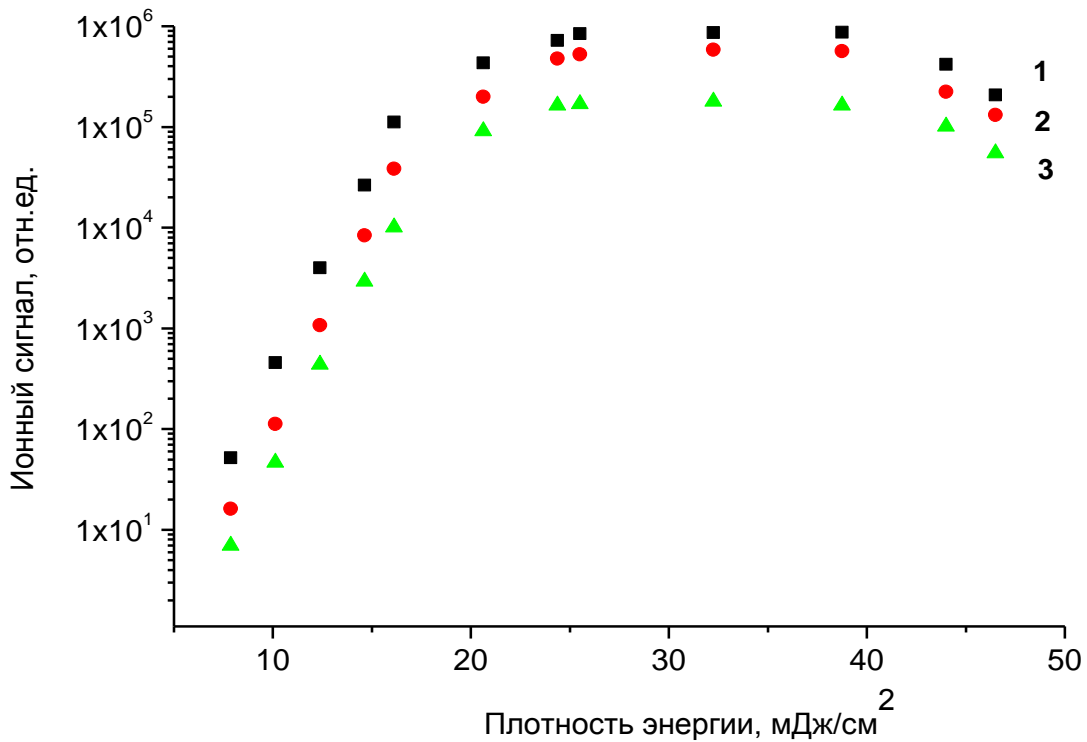


Рис. 2.17. Зависимости ионного сигнала с аморфного кремния  $\alpha$ -Si от плотности энергии лазерного излучения, полученные для: 1 – морфолина, 2 – b-аланина, 3 – триоктиламина. Длина волны излучения 355 нм.

На первом участке зависимостей даже небольшие изменения интенсивности излучения приводят к значительным изменениям величины сигнала. На третьем участке происходит разрушение активного поверхностного слоя. Очевидно, что детектирование химических соединений методом SALDI при газофазном вводе пробы следует проводить при плотности энергии лазерного излучения, лежащей на втором участке зависимостей на рис. 2.17. Таким образом, оптимальная величина плотности энергии лазерного излучения при использовании  $\alpha$ -Si лежит в диапазоне  $25 \div 35$  мДж/см<sup>2</sup>, а пористого кремния  $15 \div 25$  мДж/см<sup>2</sup>. При таких интенсивностях лазерного воздействия обеспечивается полная десорбция ионов и максимально высокая чувствительность анализа, а ионный сигнал остается стабильным при флуктуациях плотности лазерной энергии. Не менее важно, что многократное облучение поверхности не меняет ее ионизационных свойств, что создает предпосылки для проведения количественного анализа.



SALDI масс-спектры большинства исследованных аналитов содержат наряду с пиками протонированных молекул также один или несколько пиков фрагментных ионов, образующихся в результате распада протонированных молекул соединения. Как показали эксперименты, степень фрагментации зависит от плотности энергии лазерного излучения. Рис. 2.18 на примере кофеина иллюстрирует такую зависимость. В условиях лазерной десорбции/ионизации с переносом протона кофеин ионизуется с образованием одного фрагментного иона с  $m/z$  138 (см. рис. 2.6б и рис. 2.13). На рис. 2.18 показана зависимость относительной доли протонированных молекул и фрагментных ионов в общем ионном сигнале от плотности энергии лазерного излучения. Видно, что степень фрагментации возрастает при увеличении интенсивности излучения, причем заметный рост наблюдается в диапазоне значений плотности энергии  $5 \div 25$  мДж/см<sup>2</sup> (в этом же диапазоне быстро возрастает и сам ионный сигнал) Дальнейшее увеличение плотности энергии уже слабо влияет на степень фрагментации.

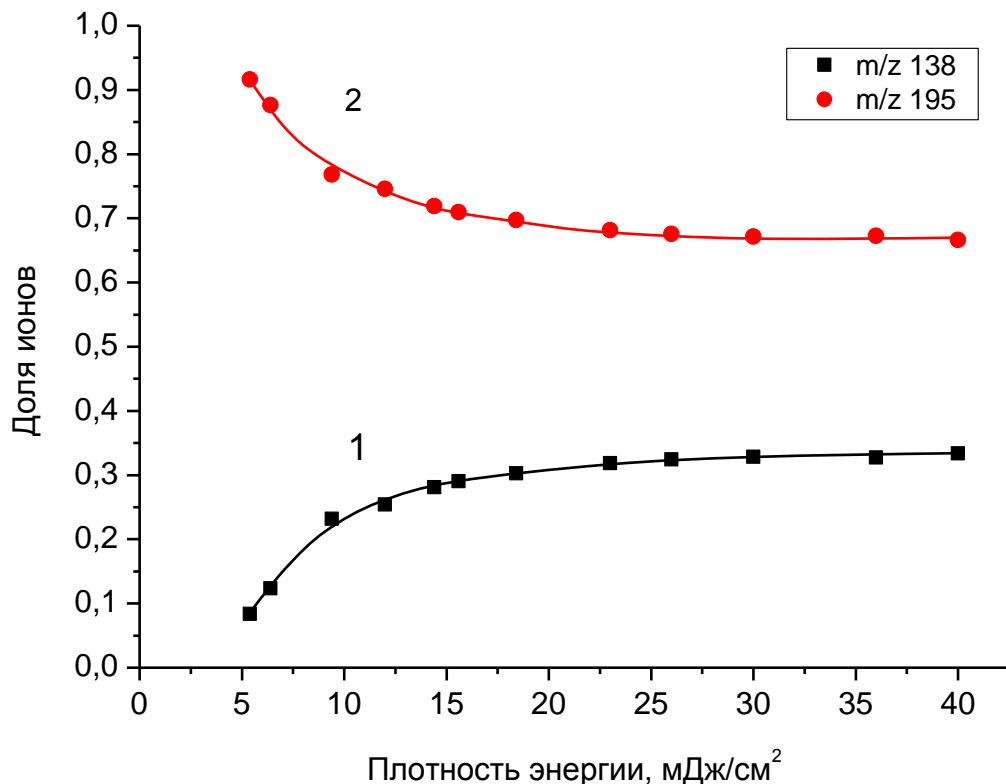


Рис. 2.18. Зависимость степени фрагментации ионов кофеина от плотности энергии лазерного излучения: 1 – доля протонированных молекул с  $m/z$  195, 2 – доля фрагментных ионов с  $m/z$  138.

Более сложным образом меняются соотношения между интенсивностями пиков соединений, которые ионизируются с образованием двух и большего числа типов фрагментных ионов. В качестве примера на рис. 2.19 приведена зависимость доли протонированных молекул N,N-диметилбензиламина ( $m/z$  136) и основных фрагментных ионов ( $m/z$  44 и  $m/z$  91) от плотности энергии лазерного излучения. Видно, что степень фрагментации возрастет с увеличением интенсивности излучения примерно до  $22 \text{ мДж/см}^2$ , после чего меняется мало. При этом фрагментные ионы ведут себя по-разному: доля ионов с  $m/z$  91 вначале быстро растет с ростом плотности энергии излучения, а затем остается неизменной, в то время как доля ионов с  $m/z$  44 медленно растет во всем диапазоне значений плотности энергии. Такое различие может быть связано с различием механизмов образования ионов. Как показано в главе 4, ионы с  $m/z$  91 получаются при разрыве C–N связи, в то время как ионы с  $m/z$  44 образуются в результате перестройки структуры протонированной молекулы.

На рис. 2.19 также приведены два масс-спектра N,N-диметилбензиламина, зарегистрированные при различных значениях плотности лазерной энергии. Видно, что при низких значениях интенсивности лазерного излучения, вблизи порога выхода ионов, в масс-спектре доминирует пик с  $m/z$  136, соответствующий протонированным молекулам. При относительно высоких значениях плотности лазерной энергии, на участке насыщения ионного сигнала, основным пиком в масс-спектре становится пик фрагментных ионов с  $m/z$  91.

Таким образом, степень фрагментации ионов определяемых соединений можно непрерывно изменять в процессе SALDI путем изменения плотности энергии лазерного излучения, воздействующего на эмиттер ионов. Возможность контроля степени фрагментации представляет интерес на практике масс-спектрометрического анализа, особенно при использовании относительно простых масс-анализаторов. Применение низкой интенсивности излучения, при которой в масс-спектре присутствуют преимущественно протонированные молекулы, значительно упрощает анализ сложных многокомпонентных проб. Использование высоких значений плотности лазерной энергии, при которых высока относительная доля диагностически значимых фрагментных ионов в общем ионном сигнале, позволяет получить информацию о структуре молекул аналитов.

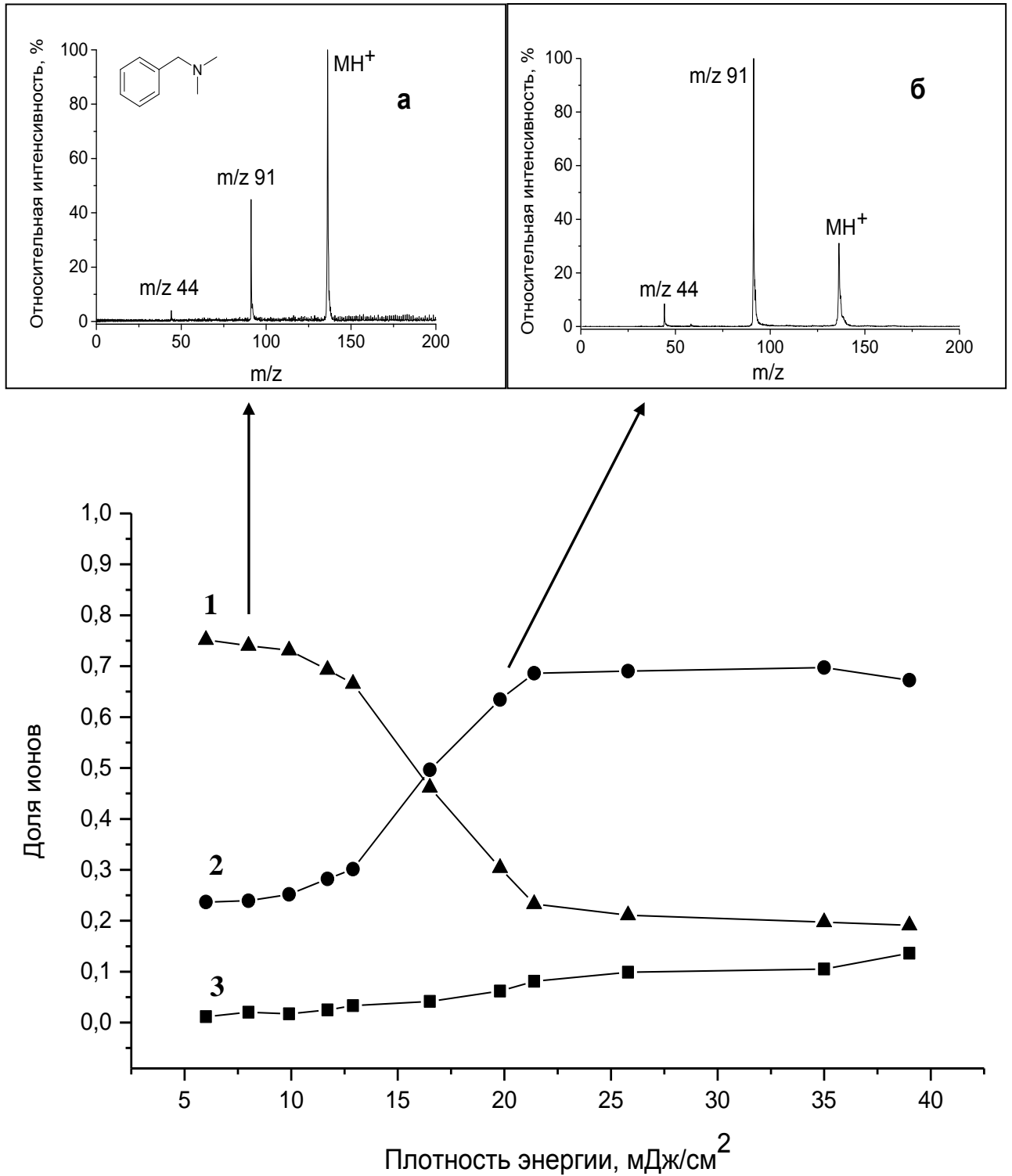


Рис. 2.19. Зависимость степени фрагментации N,N-диметилбензиламина от плотности энергии лазерного излучения: 1 – доля протонированных молекул с  $m/z$  136; 2 – доля фрагментных ионов с  $m/z$  91; 3 – доля фрагментных ионов с  $m/z$  44. На вставке приведены масс-спектры соединения при значениях плотности энергии излучения: (а) – 8 мДж/см<sup>2</sup>; (б) – 20 мДж/см<sup>2</sup>.

### ***2.3.2. Зависимость эффективности ионизации от длины волны лазерного излучения***

В экспериментах по исследованию влияния длины волны лазерного излучения на эффективность ионизации использовались первые три гармоники излучения Nd:YAG лазера с длинами волн 1064 нм, 532 нм и 355 нм. Как показали исследования, ионный сигнал всех тестовых аналитов может быть получен при воздействии на подложку как УФ-, так и видимого излучения, причем зависимости величины выхода ионов от плотности энергии лазерного излучения с длиной волны 532 нм аналогичны приведенным на рис. 2.17.

Сравнение двух длин волн на примере определения пиридина представлено на рис. 2.20 (приведены начальные участки зависимостей). Плотности энергии импульса лазерного излучения определяли по максимуму распределения, как показано в разделе 2.1.2. В качестве эмиттера ионов использовали  $\alpha$ -Si. Видно, что обе зависимости характеризуются экспоненциальным ростом величины выхода ионов при увеличении плотности лазерной энергии, однако при равных значениях плотности энергии величины ионных сигналов при одинаковых количествах введенного в прибор аналита отличаются для двух различных длин волн более чем в 30 раз.

Найденное значение эффективности ионизации при использовании ИК-излучения более чем на четыре порядка величины ниже, чем для УФ-излучения. Ионный сигнал с аморфного кремния может быть получен только при очень высоких концентрациях аналита, что не позволяет корректно провести определение зависимости выхода ионов от плотности лазерной энергии.

Снижение эффективности ионизации с увеличением длины волны излучения наблюдалось как для аморфного, так и пористого кремния и, очевидно, обусловлено уменьшением коэффициента поглощения излучения материалом подложки [247]. Наибольшая эффективность ионизации получена для УФ-излучения, которому соответствует самый высокий коэффициент поглощения в кремниевой подложке. Следует отметить, что при равных значениях плотности лазерной энергии и длительности лазерного импульса коэффициент поглощения определяет температуру, до которой может быть разогрета поверхность подложки под действием излучения.

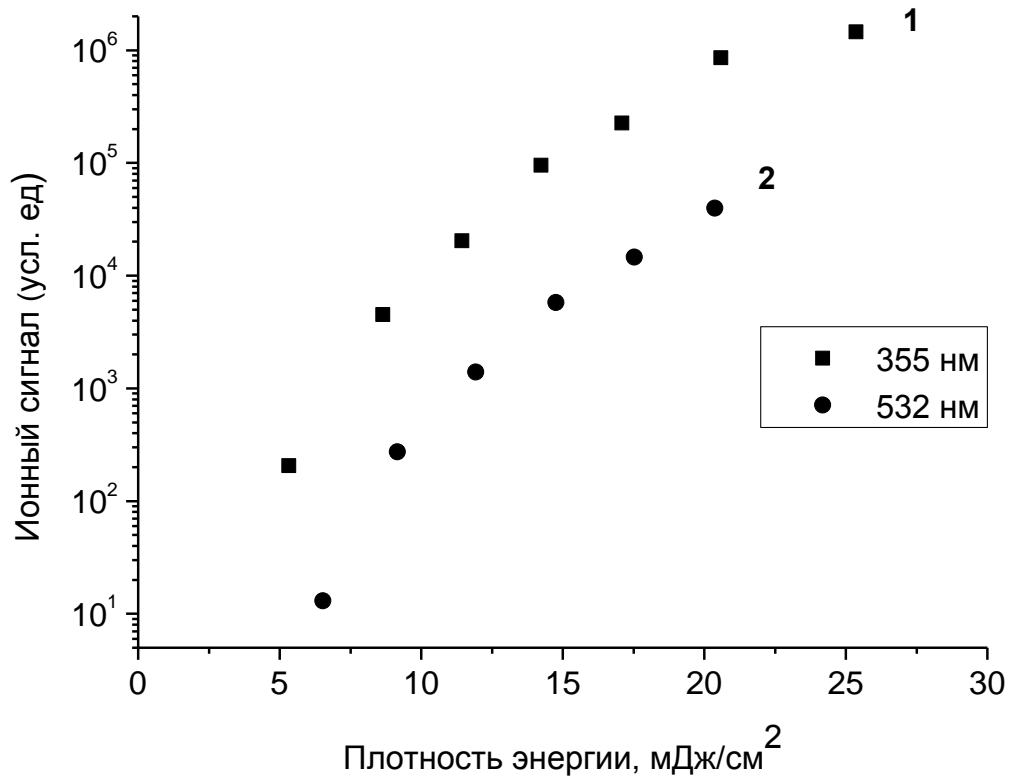


Рис. 2.20. Зависимости величины выхода протонированных молекул пиридина с поверхности  $\alpha$ -Si от плотности энергии лазерного излучения для двух длин волн: 1 – 355 нм, 2 – 532 нм.

#### 2.4. Влияние паров воды на эффективность лазерной десорбции/ионизации

Важным фактором, определяющим эффективность ионизации в условиях газофазного ввода пробы, является давление паров воды в вакуумной камере (ионном источнике) масс-спектрометра. В разделе 2.2.1 показано, что молекулы воды участвуют в процессе лазерно-индуцированной активации – формирования активной поверхности свежеприготовленного пористого кремния. Вода играет важную роль также и в процессе лазерно-индуцированной ионизации, в том числе при использовании в качестве эмиттера ионов кремниевых материалов, не требующих предварительной активации поверхности, например, аморфного кремния  $\alpha$ -Si.

Типичная зависимость ионного сигнала определяемых соединений с поверхности  $\alpha$ -Si от давления паров воды приведена на рис. 2.21 на примере

определения кофеина. Видно, что на начальном участке зависимости (в диапазоне  $10^{-7} \div 10^{-6}$  мм.рт.ст.) выход ионов прямо пропорционален концентрации паров воды, а при значениях давления, превышающих  $10^{-6}$  мм.рт.ст., ионный сигнал выходит на насыщение.

Полученный результат доказывает, что для реализации процесса SALDI при газофазном вводе пробы необходимо подавать молекулы воды в ионный источник масс-спектрометра. При этом оптимальная величина давления составляет примерно  $10^{-6}$  мм.рт.ст. Поскольку длительность одного цикла сканирования в экспериментах составляла 1 с, это значение соответствует дозе паров воды за время между двумя последовательными лазерными импульсами, приходящимися на один и тот же участок поверхности, равной 1 Ленгмюру ( $10^{-6}$  мм.рт.ст.×сек). При меньших значениях давления снижается эффективность ионизации. При больших значениях растет шум и ухудшается разрешение, в то время как значение самого ионного сигнала уже слабо зависит от давления.

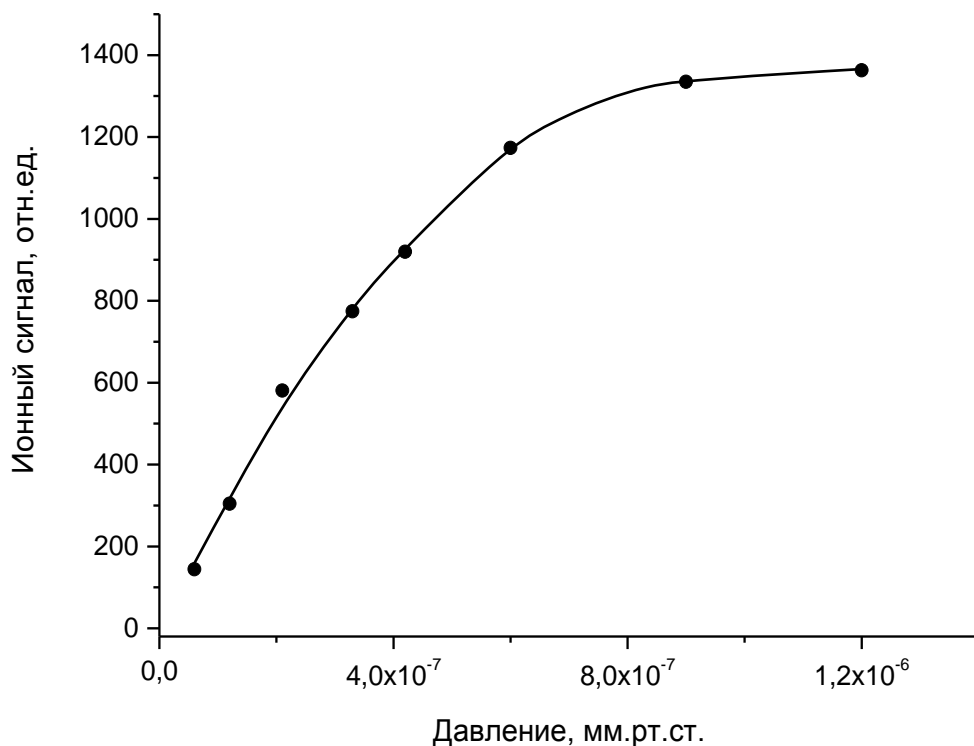


Рис. 2.21. Зависимость величины выхода протонированных молекул кофеина с поверхности аморфного кремния  $\alpha$ -Si от давления паров воды в камере масс-спектрометра.

Как и в случае лазерно-индуцированной активации пористого кремния, вместо воды в процессе SALDI могут быть использованы спирты, карбоновые кислоты и ряд других соединений. Однако, в отличие от воды, применение органических соединений приводит к постепенной деградации ионизационных свойств эмиттера ионов. Снижение эффективности ионизации связано с изменением химического состава поверхности, о чем, в частности, свидетельствуют результаты анализа элементного состава поверхности методом Оже-спектроскопии.

Оже-спектр поверхности пористого кремния, полученный после длительного воздействия лазерным излучением в присутствии паров уксусной кислоты, приведен на рис. 2.22. Сравнение данных рис. 2.8 и рис. 2.22 показывает, что применение паров уксусной кислоты приводит к появлению в спектре интенсивной линии углерода. Такой же результат получен и при замене уксусной кислоты на метанол. Можно предположить, что при воздействии на кремниевую поверхность кислородсодержащих органических соединений происходит накопление продуктов диссоциации их молекул, приводящее к постепенной пассивации поверхности.

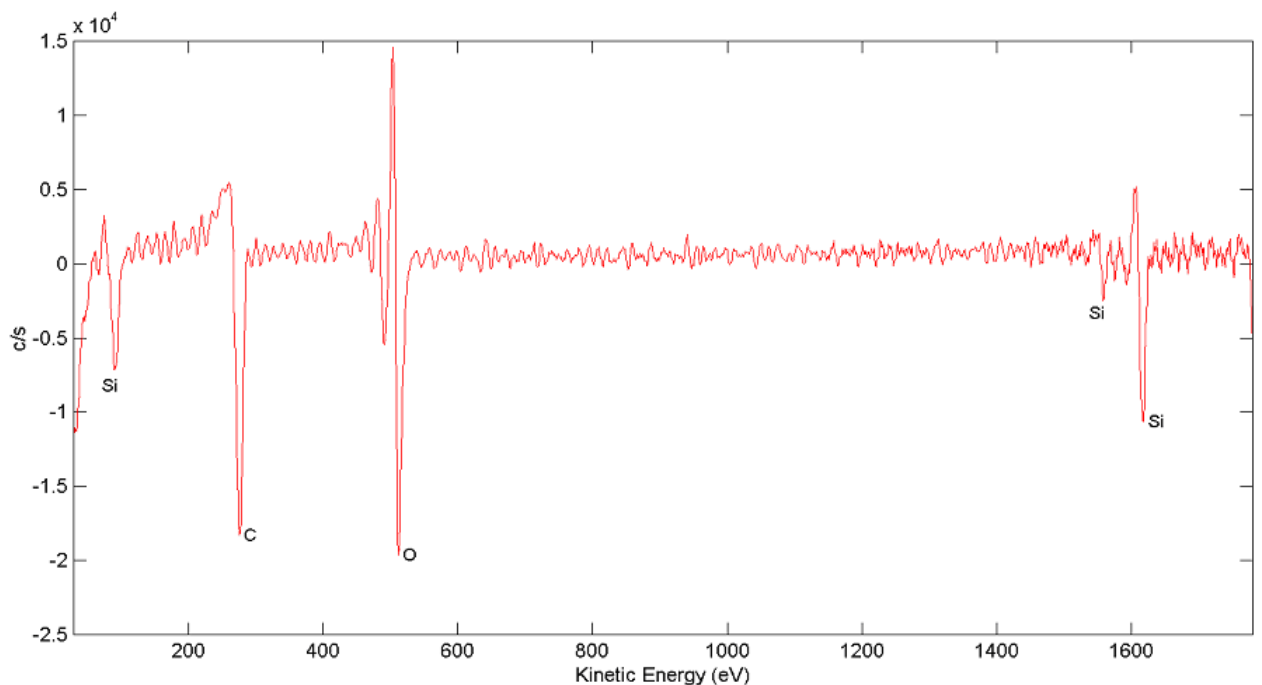


Рис. 2.22. Оже-спектр поверхности пористого кремния, зарегистрированный после воздействия лазерным излучением в присутствии паров уксусной кислоты.

## 2.5. Влияние свойств определяемых соединений на эффективность лазерной десорбции/ионизации

### 2.5.1. Зависимость эффективности ионизации от величины основности соединения в газовой фазе

Очевидно, что в процессе лазерной десорбции/ионизации с переносом протона вероятность ионизации должна зависеть от протонноакцепторных свойств определяемых соединений. Для выяснения характера этой зависимости проведена серия экспериментов с органическими соединениями, отличающимися величинами сродства к протону и основности в газовой фазе. Газофазный ввод пробы в сочетании с использованием в качестве эмиттера ионов  $\alpha$ -Si позволяет обеспечить достаточно высокую воспроизводимость результатов анализа.

На первом этапе исследований были проведены квантово-химические расчеты величин энергии сродства к протону (РА) и основности в газовой фазе (GB) различных химических соединений. Сродство к протону и основность в газовой фазе соединения А определяются как взятые с обратным знаком, соответственно, изменение энтальпии  $\Delta H^\circ$  и изменение энергии Гиббса  $\Delta G^\circ$  гипотетической реакции протонирования  $A + H^+ \rightarrow AH^+$ , проходящей в газовой фазе в стандартных условиях [248]:

$$PA = \Delta H^\circ_A + \Delta H^\circ_{H^+} - \Delta H^\circ_{AH^+} \quad (2.1),$$

$$GB = \Delta G^\circ_A + \Delta G^\circ_{H^+} - \Delta G^\circ_{AH^+} = PA + T \cdot (S^\circ_{AH^+} - S^\circ_A - S^\circ_{H^+}) \quad (2.2).$$

Экспериментальное определение этих термодинамических параметров – весьма сложная и трудоемкая задача, поэтому в последние годы она все чаще решается путем теоретических расчетов с использованием современных квантово-химических методов. Возможности быстро развивающейся вычислительной техники позволяют проводить расчеты различных термодинамических свойств газообразных веществ с точностью, сравнимой с погрешностями эксперимента [249]. Существует несколько программных пакетов для квантово-химических расчетов, дающих близкие результаты. Среди них одним из наиболее удачных и доступных является программный пакет Firefly [250], который и был использован в работе.



На начальном этапе расчетов была проведена оптимизация структур нейтральных и протонированных молекул всех исследованных соединений. Оптимизация заключалась в поиске конформера с минимальной энергией и проводилась в базисе 3-21G методом RHF (Restricted Hartree-Fock). Для соединений, имеющих более одного центра протонирования, проводили оптимизацию каждой возможной структуры протонированных молекул. Полученные в результате расчетов структуры в дальнейшем оптимизировали уже в базисе 6-311++G(3df,3pd) методом DFT (Density Functional Theory).

На втором этапе рассчитывали значения стандартных энтальпий  $\Delta H^\circ$  и энтропий  $S^\circ$  образования нейтральных и протонированных молекул с оптимизированными структурами с использованием программного пакета Firefly. Для протона использовали следующие значения:

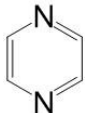
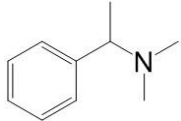
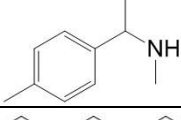
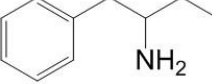
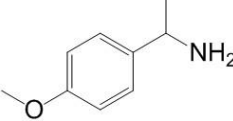
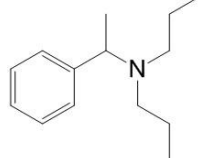
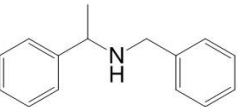
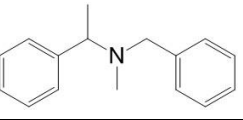
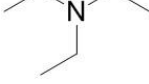
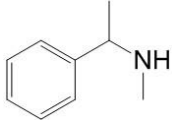
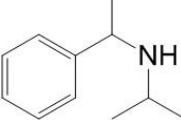
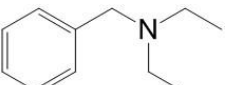
$$\Delta H^\circ_{\text{H}^+} = 5/2RT = 6.2 \text{ кДж/моль}, S^\circ_{\text{H}^+} = 108.9 \text{ Дж/(моль}\cdot\text{K)} [251].$$

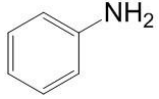

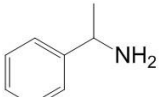
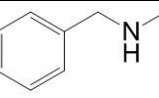
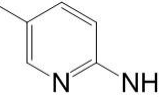
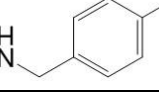

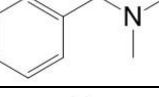
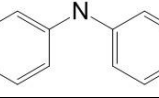
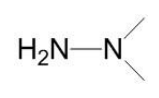
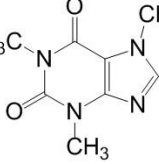
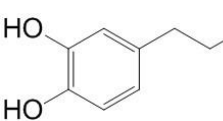
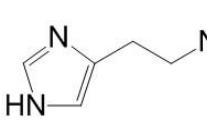
На заключительном этапе на основе данных по оптимизации структур и в соответствии с формулами 2.1 и 2.2 были рассчитаны значения сродства к протону и основности в газовой фазе исследованных соединений. Полученные результаты приведены в таблице 2.2 (для соединений с несколькими центрами протонирования приведены максимальные значения). Видно, что диапазон варьирования величин PA и GB исследованных соединений составлял примерно 130 кДж/моль. Для семи соединений представлены известные значения PA и GB, полученные экспериментально [252]. Сравнение приведенных данных подтверждает хорошее согласие экспериментальных и рассчитанных величин.

В табл. 2.2 также приведены экспериментально найденные для каждого соединения значения относительной эффективности лазерной десорбции/ионизации на поверхности аморфного кремния. За единицу принята эффективность ионизации пиразина, обладающего минимальными значениями PA и GB среди исследованных соединений. Эффективность ионизации для каждого соединения находили как среднее для трех последовательных измерений чувствительности.

На основе данных таблицы 2.2 построена зависимость относительной эффективности ионизации от рассчитанной величины газофазной основности соединения. Полученная зависимость приведена на рис. 2.23.

Таблица 2.2. Рассчитанные значения термодинамических параметров и экспериментально найденные значения относительной эффективности ионизации исследованных соединений.

Соединение	Структура	РА, кДж/моль	GB, кДж/моль	Эффективность ионизации
Пиразин		881.9 (877.1)*	847.1 (847.0)*	1
N,N-диметил-1-фенилэтиламин		979.7	946.5	$7.8 \times 10^2$
N-метил-1-(4-метилфенил)этиламин		974.7	941.7	$2.4 \times 10^2$
1-бензил-пропиламин		951.4	918.6	$1.0 \times 10^2$
1-(4-метоксифенил)-этиламин		950.5	917.0	$1.5 \times 10^2$
N,N-дипропил-1-фенилэтиламин		1008.2	976.8	$1.8 \times 10^3$
N-бензил-1-фенилэтиламин		978.4	945.1	$5.1 \times 10^2$
N-бензил,N-метил-1-фенилэтиламин		998.9	964.9	$2.2 \times 10^3$
Триэтиламин		978.2 (981.8)*	948.2 (951)*	$4.6 \times 10^2$
N-метил-1-фенилэтиламин		967.3	934.0	$8.9 \times 10^1$
N-изопропил-1-фенилэтиламин		973.5	941.1	$2.0 \times 10^2$
N,N-диэтилбензиламин		989.3	956.3	$6.1 \times 10^2$

Соединение	Структура	РА, кДж/моль	GB, кДж/моль	Эффективность ионизации
Анилин		878.4 (882.5)*	845.1 (850.6)*	3
Морфолин		928.1 (924.3)*	895.1 (891.2)*	8
1-фенилэтиламин		936.2	903.3	$2.3 \times 10^1$
N-метил-бензиламин		956.9	923.7	$5.6 \times 10^1$
2-амино-5-пиколин		970.6	936.0	$1.1 \times 10^2$
N-метил-4-метилбензиламин		964.3	931.4	$6.2 \times 10^1$
Пиридин		937.1 (930)*	904.2 (898.1)*	$7.5 \times 10^1$
N,N-диметил-бензиламин		974.0 (968.4)*	940.7 (937.4)*	$5.1 \times 10^2$
Дифениламин		899.7	867.9	10
N,N-диметил-гидразин		922.2 (927.1)*	888.5 (894.7)*	6
Кофеин		933.4	899.8	$6.8 \times 10^1$
Допамин		943.1	911.5	$7.0 \times 10^1$
Гистамин		1009.1	977.4	$1.9 \times 10^3$

\* Значения РА и GB, определенные экспериментально [252].

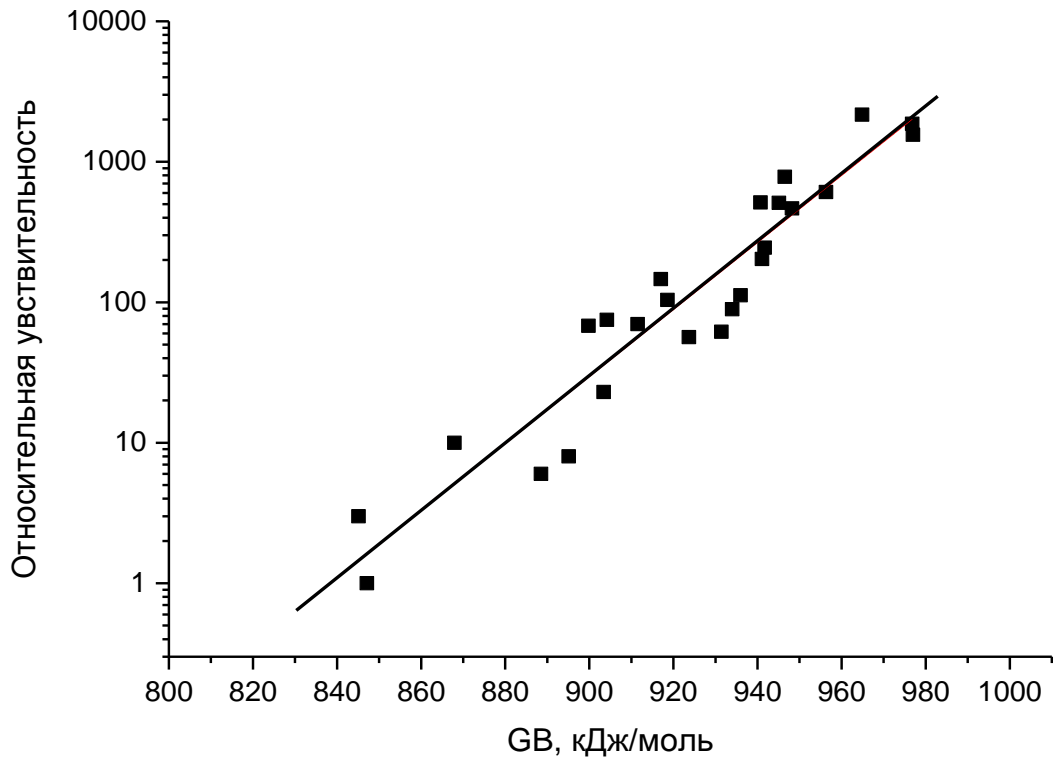


Рис. 2.23. Зависимость относительной эффективности ионизации от величины основности в газовой фазе исследованных соединений.

Из приведенных в табл. 2.2 и на рис. 2.23 данных следует, что эффективность ионизации в процессе SALDI экспоненциально возрастает с увеличением основности в газовой фазе и сродства к протону определяемого соединения в исследованном диапазоне величин GB и PA.

Как показано в главе 4, разработанные методы и подходы к лазерной десорбции/ионизации летучих соединений, отличаются относительно высокой воспроизводимостью результатов определения. Стандартное отклонение аналитического сигнала при детектировании чистых соединений обычно не превышает 0.05. Поэтому наблюдаемый на рис. 2.23 заметный разброс данных не связан с погрешностью измерений, а вызван другими факторами. В условиях газо-фазного ввода проб эффективность ионизации, очевидно, представляет собой произведение вероятностей трех процессов: вероятности адсорбции нейтральной молекулы при столкновении с поверхностью, вероятности ее ионизации и вероятности десорбции в виде протонированной молекулы. Как показано выше, в условиях экспериментов обеспечивалась полная десорбция определяемых

соединений при лазерном воздействии. Следует предположить, что разброс данных на рис. 2.23 связан с различием вероятности адсорбции молекул аналитов, которая определяется коэффициентом прилипания и средним временем жизни молекулы на поверхности.

Можно также отметить, что экспоненциальная зависимость величины выхода ионов  $Y$  от энергии Гиббса  $\Delta G^\circ_{\text{реак}}$  реакции протонирования:



характерна для другого масс-спектрометрического метода – химической ионизации, и для положительных значений  $\Delta G^\circ_{\text{реак}}$  (более 1.5 ккал/моль [253]) описывается выражением:

$$Y = \exp(-\Delta G^\circ_{\text{реак}}/RT) \quad (2.4).$$

Поскольку для реакции (2.3)

$$\Delta G^\circ_{\text{реак}} = \Delta G^\circ_{\text{В}} + \Delta G^\circ_{\text{АН}^+} - \Delta G^\circ_{\text{ВН}^+} - \Delta G^\circ_{\text{А}} = \text{GB}(\text{В}) - \text{GB}(\text{А}), \quad (2.5)$$

$$\text{то } Y = K \cdot \exp(\text{GB}(\text{А})/RT), \quad (2.6)$$

где  $K = \exp(-\text{GB}(\text{В})/RT)$  – постоянная величина для используемого газа-реагента В.

Аналогичная зависимость наблюдается и для лазерной десорбции/ионизации на кремниевых эмиттерах ионов. Важным отличием, однако, является то, что реакция протонирования в SALDI протекает на поверхности.

Полученные результаты показывают, что в процессе лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на кремниевых поверхностях эффективно ионизируются только соединения с относительно высокими значениями основности в газовой фазе (превышающими 820 кДж/моль). Этот факт, с одной стороны, ограничивает круг определяемых соединений, но с другой стороны, позволяет реализовать высокую селективность ионизации и низкий уровень фонового сигнала. В частности, большинство используемых в аналитической практике растворителей имеют величину  $\text{GB}$  существенно ниже 820 кДж/моль [252], поэтому, даже взятые в избытке, растворители не дают вклада в ионный сигнал. Один из важных структурно-химических “индикаторов” возможности эффективного детектирования соединения методом SALDI с переносом протона – наличие в молекуле восстановленного атома азота, неподеленная пара электронов которого служит центром протонирования молекулы.

Представленные результаты имеют прогностическую ценность, позволяя делать оценки предполагаемой эффективности ионизации и, следовательно, чувствительности анализа по известным или рассчитанным значениям PA и GB определяемых соединений.

### ***2.5.2. Влияние молекулярной массы соединения на величину выхода ионов***

При детектировании нелетучих соединений, кроме величины основности, важным становится другое ограничение, связанное с молекулярной массой аналита. При определении соединений с относительно высокой молекулярной массой величина выхода ионов лимитируется не стадией ионизации, а стадией десорбции. Как показали эксперименты с определением различных пептидов, это ограничение начинает сказываться на величине выхода ионов с кремниевых поверхностей при молекулярных массах соединений, превышающих 700 г/моль. При молекулярных массах, больших 1500 г/моль, эффективность лазерной десорбции/ионизации быстро падает, а ионный сигнал соединений с молекулярными массами, превышающими 4000 г/моль, зарегистрировать не удалось. В результате проведенных исследований с использованием стандартных смесей пептидов, можно сделать вывод, что в диапазоне молекулярных масс 1000÷1500 г/моль методы SALDI и MALDI сравнимы по чувствительности. При определении соединений с молекулярными массами свыше 1500 г/моль, MALDI значительно превосходит SALDI, а при массах, меньших 1000 г/моль, более чувствительным является метод SALDI.

Иллюстрацией уменьшения чувствительности SALDI с ростом молекулярной массы является рис. 2.24, на котором приведены два масс-спектра, полученные на одном приборе («UltrafleXtreme», Bruker Daltonics Inc.) при анализе одного и того же количества (5 мкл раствора с концентрацией 1 нмоль/мл) стандартной пептидной смеси методами MALDI и SALDI. В диапазоне  $m/z$  1000÷1500 оба масс-спектра содержат пики, соответствующие протонированным молекулам ангиотензина-II ( $m/z$  1046), ангиотензина-I ( $m/z$  1296), вещества P ( $m/z$  1347) и бомбезина ( $m/z$  1619). Сравнение масс-спектров показывает, что отношение пиков пептидов с максимальным и минимальным значением  $m/z$  примерно в пять раз выше в MALDI-спектре, чем в SALDI-спектре.

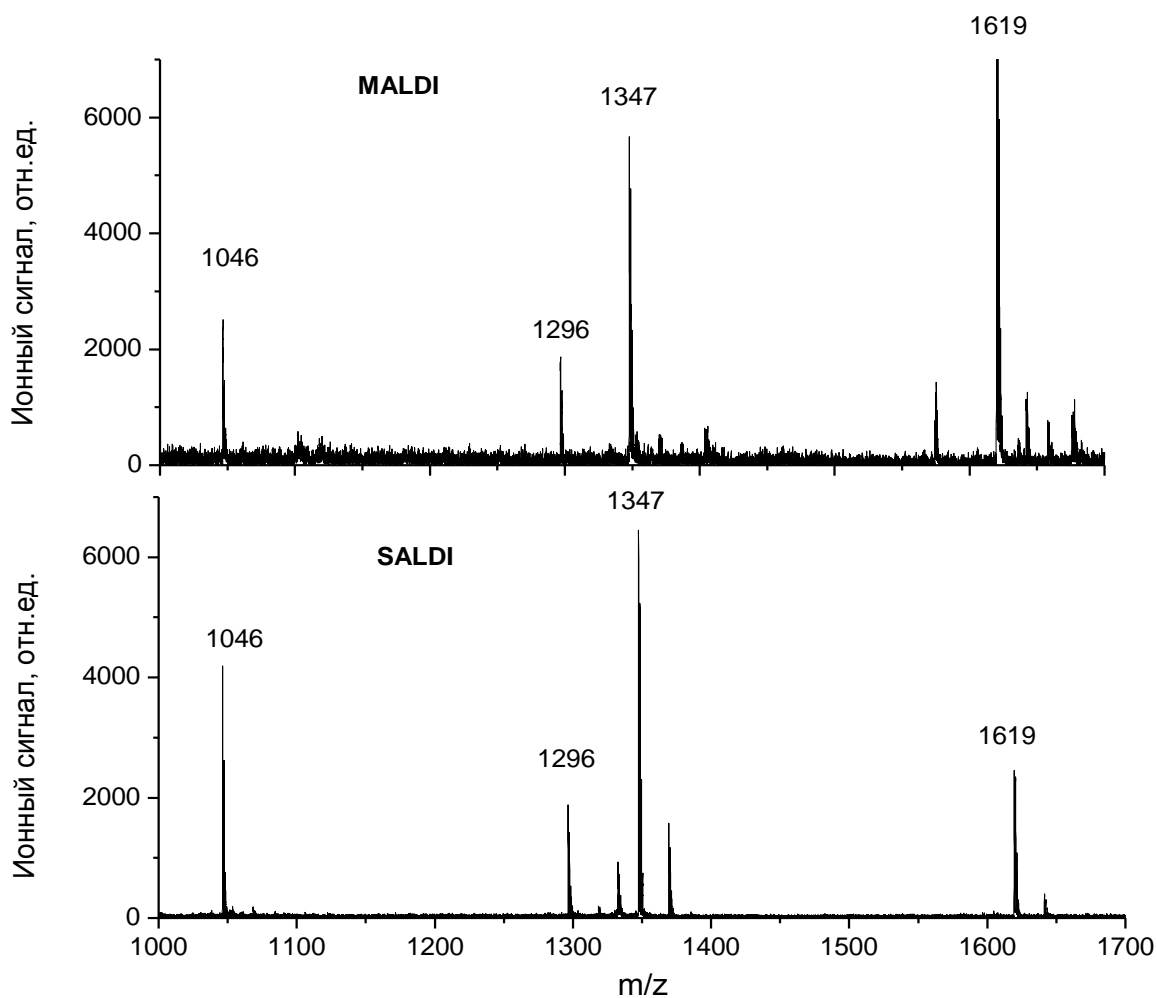


Рис. 2.24. Масс-спектры пептидной смеси (ангиотензин II, ангиотензин I, вещество P и бомбезин), полученные в одинаковых условиях методами MALDI и SALDI. Матрица для MALDI –  $\alpha$ -HCCA, эмиттер ионов для SALDI – аморфный кремний  $\alpha$ -Si.

## 2.6. Заключение

Проведены исследования основных факторов, определяющих эффективность лазерной десорбции/ионизации с переносом протона: физико-химических свойств материала эмиттера ионов, параметров лазерного излучения и протоноакцепторных свойств определяемых соединений. В качестве эмиттеров ионов получены и изучены кремниевые поверхности с различной структурой поверхностного слоя. Исследования проводили в условиях газофазного ввода пробы в масс-спектрометр.

Установлено, что изменение химического состава поверхности кремниевой подложки «отражается» в изменении ионного сигнала. Найдено, что окисление

поверхностных атомов пористого кремния с образованием поверхностных силанольных SiOH-групп позволяет увеличить чувствительность анализа более чем на два порядка величины. Показано, что такой процесс реализуется при обработке поверхности лазерным излучением низкой интенсивности в вакууме в присутствии паров воды.

Для того чтобы подложка кремниевого материала приобрела свойства эмиттера ионов химических соединений в процессе SALDI, необходимо сформировать активный слой на ее поверхности. Показано, что морфология такого слоя может быть самой разнообразной, но общим свойством является высокая плотность структурных дефектов. При этом на эффективность ионизации влияют те дефекты, которым соответствуют глубокие энергетические уровни и которые являются ловушками неравновесных носителей заряда.

Предложен принципиально новый эмиттер ионов для SALDI, представляющий собой пленку аморфного кремния  $\alpha$ -Si с высокой плотностью структурных дефектов типа оборванных связей. Показано, что по эффективности ионизации летучих соединений аморфный кремний не уступает пористому кремнию и значительно (более чем на два порядка величины) превосходит такие часто используемые в SALDI материалы, как графит, оксид титана, а также аморфный германий и оксид цинка.

Исследовано влияние длины волны и плотности энергии лазерного излучения на эффективность SALDI. Установлено, что максимальная чувствительность достигается при использовании УФ-излучения, которому при одинаковой интенсивности соответствует самый высокий коэффициент поглощения в кремниевой подложке и самая высокая температура разогрева поверхности. Найдено, что зависимости величин выхода ионов от плотности энергии лазерного излучения для всех исследованных соединений характеризуются начальным участком экспоненциального роста ионного сигнала с последующим выходом на насыщение. Показано, что степень фрагментации ионов можно непрерывно изменять путем изменения плотности энергии излучения.

Для реализации процесса ионизации с переносом протона необходимо подавать в ионный источник масс-спектрометра пары воды. Найдено, что



оптимальным является поток молекул воды на поверхность эмиттера ионов, соответствующий величине давления паров воды примерно  $10^{-6}$  мм.рт.ст.

Изучена зависимость эффективности лазерной десорбции/ионизации с поверхности аморфного кремния от величин PA и GB определяемых соединений. В качестве аналитов исследованы 25 соединений, значения GB которых лежат в диапазоне от 845 до 977 кДж/моль. Величины GB и PA получены на основе квантово-химических расчетов методом дифференцированного функционала плотности в модели B3LYP с базисом 6-311++G(3df,3pd). Найдено, что эффективность ионизации экспоненциально возрастает с увеличением значений GB и PA соединений.

Установлено, что при молекулярных массах, больших 1500 г/моль, эффективность лазерной десорбции/ионизации быстро падает, а ионный сигнал соединений с молекулярными массами, превышающими 4000 г/моль, зарегистрировать не удастся.

### ГЛАВА 3. Исследование механизма лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на поверхности кремниевых материалов

Анализ результатов, представленных в главе 2, позволяют сделать вывод, что традиционные подходы к описанию механизма лазерной десорбции/ионизации путем переноса протона не согласуются с полученными экспериментальными данными. Как показано в главе 1, важная роль в известных моделях SALDI отводится структуре материала. Например, в моделях, описывающих SALDI как специфический вариант MALDI, необходимым условием образования ионов является пористая структура материала (позволяющая удерживать растворитель в условиях вакуума) [209]. В модели, представляющей SALDI как вариант полевой ионизации, особую роль играют наноразмерные поверхностные структуры (острия), которые обеспечивают разделение противоположно заряженных ионов в условиях приложенного электростатического поля и лазерного воздействия [97]. Рассмотренный в главе 2 новый эмиттер ионов для SALDI, представляющий собой пленку аморфного кремния, не уступает по эффективности ионизации пористому кремнию, однако не содержит пор и острий.

Большое значение в известных моделях имеет растворитель, в качестве которого обычно рассматривают воду. В моделях, описывающих SALDI как вариант MALDI, растворитель выполняет функцию, аналогичную функции матрицы в методе MALDI, обеспечивая десорбцию и последующую ионизацию молекул определяемых соединений путем протонирования над поверхностью эмиттера ионов, в «факеле». В модели специфической «полевой ионизации» предполагается, что образование ионов обусловлено диссоциацией молекул в растворителе, а наноразмерные поверхностные структуры способствуют разделению противоположно заряженных ионов. В рамках этой модели, при использовании в качестве растворителя воды вероятность протонирования молекул анализа определяется константой его диссоциации и количественно описывается показателем основности соединения  $pK_b$  или показателем кислотности сопряженной с ним кислоты  $pK_a$ .

Сама возможность эффективной ионизации молекул соединений, адсорбированных на поверхности в условиях газозафазного ввода пробы, не

предусмотрена в моделях, отводящих существенную роль растворителю в процессе образования ионов. Следует отдельно отметить, что в SALDI масс-спектрах не наблюдаются ни положительные, ни отрицательные ионы воды или другого растворителя, которые должны регистрироваться, если процесс ионизации протекает в газовой фазе, а растворитель выполняет функцию, аналогичную матрице в MALDI. Масс-спектры содержат только протонированные молекулы аналитов (см., например, рис. 2.13 и рис. 2.15).

Весьма показательным также является сравнение величин эффективности ионизации в ряду соединений с инверсией основности в газовой фазе и в воде. В таблице 3.1 приведены экспериментальные данные при определении соединений одного из таких рядов: аммиак-анилин-дифениламин. Видно, что изменение эффективности ионизации в этом ряду противоположно изменению водного  $pK_{\alpha}$  соединений. Так, основность анилина в воде ( $pK_{\alpha}=4.63$ ) на четыре порядка величины выше основности дифениламина ( $pK_{\alpha}=0.79$ ), однако эффективность ионизации анилина в 3 раза ниже. В свою очередь, аммиак, характеризующийся высоким значением основности в воде ( $pK_{\alpha}=9.25$ ), очень слабо ионизируется в процессе SALDI. В газовой фазе наблюдается инверсия основности – в ряду аммиак-анилин-дифениламин величина  $GB$  возрастает, и соответственно увеличивается эффективность ионизации.

Таблица 3.1. Относительная эффективность ионизации в ряду аммиак-анилин-дифениламин. Эмиттер ионов –  $\alpha$ -Si.

Соединение	$pK_{\alpha}$ [254]	$GB$ , кДж/моль [255]	Относительная эффективность ионизации
Аммиак	9.25	819.0	$5 \times 10^{-3}$
Анилин	4.63	850.6	0.3
Дифениламин	0.79	$867.9^2$	1

<sup>2</sup> Получено в результате квантово-химических расчетов.

Аналогичные результаты получены и при исследовании других соединений, имеющих существенные различия в протоноакцепторных свойствах в газовой и конденсированной фазах. Например, в ряду первичный-вторичный-третичный амин эффективность ионизации монотонно возрастает в соответствии с ростом величины  $GB$ , в то время как величина  $pK_a$  у третичных аминов в этом ряду минимальна. Таким образом, параметр  $pK_a$ , определяемый равновесной концентрацией протонированных молекул в водной среде, не может быть использован для характеристики способности того или иного основного соединения ионизоваться в условиях SALDI.

Недостаточно выясненным также остается механизм десорбции. В модели «полевой ионизации» предполагается, что важную роль в процессах десорбции ионов могут играть полевые эффекты, причем с шероховатой поверхности десорбируются уже образованные ионы. В модели SALDI, как варианта MALDI, десорбция рассматривается как взрывное испарение совместно адсорбированных молекул растворителя и аналита в результате лазерного воздействия, причем десорбируются нейтральные молекулы аналита. В другой модели предполагается, что движущей силой процесса десорбции является плавление или разрушение поверхности эмиттера ионов: поглощение излучения приводит к плавлению материала эмиттера ионов, выносу вещества в газовую фазу и ионизации в «факеле» [214-216]. Однако экспериментальные данные, например, возможность многократного использования эмиттера ионов без существенного изменения его ионизационных свойств в условиях газофазного ввода пробы, противоречат этим предположениям.

Следует отметить еще ряд проблем в традиционных подходах к описанию процесса SALDI. Оставаясь в рамках известных моделей, трудно объяснить кардинальное различие эффективностей ионизации на поверхности близких по химическим, структурным и теплофизическим свойствам материалов, например,  $\alpha$ -Si и  $\alpha$ -Si:H. Неясно, как связан химический состав поверхности кремниевых эмиттеров ионов с чувствительностью анализа. Не согласуются с известными моделями наблюдаемые эффекты химической активации поверхности пористого кремния под действием лазерного излучения, а также возможность изменения

степени фрагментации ионов аналитов путем варьирования интенсивности излучения.

В целом, из представленных в главе 2 результатов анализа факторов, определяющих эффективность лазерной десорбции/ионизации с переносом протона, следует, что для корректного описания механизма SALDI нужно использовать принципиально другие подходы.

### **3.1. Расчет температуры поверхности эмиттеров ионов при воздействии импульсным лазерным излучением**

Важной информацией для понимания процессов, происходящих на поверхности подложки эмиттера ионов под действием импульсного лазерного излучения, является динамика изменения температуры поверхности во времени. Вследствие небольшого размера разогретой области и малого времени существования состояния с высокой температурой при лазерном воздействии, определение температуры поверхности подложки с субнаносекундным разрешением экспериментальными методами является сложной и трудоемкой задачей, требующей соответствующего специализированного оборудования [256, 257]. Поэтому в последние годы эта проблема все чаще решается более доступным способом, который заключается в численном расчёте для задачи теплопроводности с распределённым в пространстве и времени источником тепла. Эффективные эмиттеры ионов в методе SALDI относятся к хорошо изученным материалам, для которых известны оптические и теплофизические параметры. На основе этих данных можно сформулировать условия для решения нестационарной задачи теплопроводности.

В общем виде, задача расчета температуры поверхности эмиттеров ионов представляет собой численное моделирование температуры поверхности при воздействии импульсного лазерного излучения на плоскую поверхность подложки. В ходе расчетов исследовалась динамика изменения температуры поверхности различных материалов в зависимости от параметров лазерного импульса. При построении вычислительной модели принимали во внимание геометрические особенности экспериментальной установки и предварительно измеренные параметры пространственного распределения плотности энергии лазерного

импульса на поверхности подложки (см. раздел 2.1). Моделирование проводили для двух значений длины волн излучения  $\lambda$  – 355 нм и 532 нм, и для длительности лазерного импульса 0.35 нс. Угол падения излучения на поверхность подложки составлял  $45^\circ$ , излучение поляризовано в плоскости падения (p-поляризация). Для расчёта температуры на поверхности эмиттеров ионов, полученных путем напыления пленок (в частности, аморфного кремния и оксида цинка), использовали двухслойную модель, описывающую материалы с толщиной пленки, равной толщине нанесенного слоя.

Все исследованные подложки хорошо поглощают лазерное излучение (высокий коэффициент поглощения излучения материалом эмиттера ионов является общим требованием для всех вариантов метода SALDI). Например, для кремния коэффициент поглощения излучения составляет величину порядка  $10^6 \text{ см}^{-1}$  при длине волны  $\lambda=355 \text{ нм}$  и порядка  $10^5 \text{ см}^{-1}$  при  $\lambda=532 \text{ нм}$  (таблица 3.2). Из данных рис. 2.3 видно, что характерный линейный размер пятна лазерного излучения составляет величину порядка  $10^{-2} \text{ см}$ . Это означает, что глубина поглощения лазерного излучения в материале подложки много меньше, чем линейные поперечные размеры фокального пятна излучения, сфокусированного на поверхность подложки, т.е. выполняется условие:

$$a \gg \sqrt{\chi\tau} \quad (3.1),$$

где  $\chi$  – температуропроводность материала эмиттера ионов,  $a$  – характерный размер пятна лазерного излучения,  $\tau$  – длительность импульса. Поэтому в расчётах температуры поверхности использовалось приближение одномерной задачи тепловых потоков. Математической моделью такого процесса служит одномерная нестационарная задача теплопроводности с распределенным в толщине подложки источником тепла, который определяется длительностью лазерного импульса и распределением плотности энергии излучения по поверхности. В расчетах учитывалась зависимость тепловых параметров материала от температуры, а также предполагалось, что теплообмен подложки с окружающей средой отсутствует. Нестационарное уравнение теплопроводности в рамках такой модели имеет вид:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left( K \frac{\partial T}{\partial x} \right) + Q(x,t) \quad (3.2),$$

где  $T$  – температура;  $x$  – координата по оси, нормальной к поверхности, направленной вглубь материала;  $\rho$  – плотность материала;  $C_p$  – теплоёмкость при постоянном давлении;  $K$  – теплопроводность; функция  $Q(x,t)$  описывает тепловой источник.

Численное решение задачи проводили с использованием программного пакета SLIM [258]. Необходимые для проведения расчётов параметры определялись следующим образом.

Амплитудный коэффициент  $r_{\parallel}$  отражения излучения находили по формулам Френеля [259]. В условиях эксперимента угол падения излучения составлял  $45^\circ$ , излучение было линейно поляризовано в плоскости, перпендикулярной поверхности подложки, поэтому величина  $r_{\parallel}$  определялась следующей формулой:

$$r_{\parallel} = \frac{(n - i\kappa)^2 - \sqrt{2(n - i\kappa)^2 - 1}}{(n - i\kappa)^2 + \sqrt{2(n - i\kappa)^2 - 1}}, \quad (3.3),$$

где  $n$  и  $\kappa$  – действительная и мнимая части показателя преломления кремния,  $i$  – мнимая единица.

Коэффициент отражения по интенсивности  $R_{\parallel}$  находили как:

$$R_{\parallel} = r_{\parallel} \cdot r_{\parallel}^* \quad (3.4).$$

В расчетах предполагалось, что поглощение излучения материалом подложки описывается законом Бугера,

$$I(x) = I_0 \exp(-\alpha x), \quad (3.5),$$

где  $I_0$  – интенсивность падающего излучения на границе среды,  $x$  – координата;  $\alpha$  – коэффициент поглощения излучения. Величину  $\alpha$  определяли через мнимую часть  $\kappa$  показателя преломления [259]:

$$\alpha = \frac{4\pi}{\lambda} \kappa \quad (3.6).$$

Тогда функция  $Q(x,t)$  в формуле (3.2) имеет вид:

$$Q(x,t) = I(t) \cdot (1 - R_{\parallel}) \cdot \exp(-\alpha \cdot x) \quad (3.7),$$

где  $I(t)$  описывает изменение во времени интенсивности падающего излучения. В расчётах зависимость интенсивности излучения от времени моделировалась гауссовой функцией с длительностью импульса по полувысоте  $\tau$ :

$$I(t) = I_0 \cdot \exp\left(-4 \frac{(t - \tau)^2}{\ln 2 \cdot \tau^2}\right), \quad t \in (0, 2\tau) \quad (3.8).$$

Очевидно, интеграл интенсивности по времени действия импульса определяет полную энергию  $E$  на единицу площади в импульсе. Интегрирование выражения (3.8) даёт следующую связь нормировочного коэффициента  $I_0$ , энергии в импульсе и длительности импульса:

$$I_0 = \frac{E}{\tau \cdot 1.2277} \quad (3.9).$$

Вид использованной в расчетах зависимости  $I(t)$  для  $\tau=0.35$  нс приведен на рис. 3.1 (б).

В таблице 3.2. приведены значения оптических параметров, использованных для расчёта динамики изменения температуры поверхности двух различных кремниевых материалов - монокристаллического и аморфного кремния. Коэффициент теплопроводности и теплоемкость для монокристаллического кремния, а также их зависимости от температуры были определены на основе литературных данных [260, 261]. Для аморфного кремния величина коэффициента теплопроводности принималась постоянной и равной 0.022 Вт/(К×см), в соответствии с данными работы [262]. Теплоёмкость аморфного кремния и ее зависимость от температуры принимались такими же, как у монокристаллического кремния [263, 264].

Таблица 3.2. Оптические параметры монокристаллического и аморфного кремния, использованные для расчета зависимости температуры поверхности от плотности энергии излучения.

Оптический параметр	Монокристаллический кремний		Аморфный кремний	
	$\lambda=355$ нм	$\lambda=532$ нм	$\lambda=355$ нм	$\lambda=532$ нм
$n$	5.41	4.32	3.76	4.42
$k$	2.72	0.74	2.76	0.86
$R_{//}$ [%]	43.33	27.33	37.93	29.42
$\alpha$ [см <sup>-1</sup> ]	$9.63 \times 10^5$	$1.75 \times 10^5$	$9.77 \times 10^5$	$2.03 \times 10^5$



Для жидкой фазы кремния использовали следующие параметры:  $R_{\parallel} = 72\%$  [263],  $\alpha = 8 \times 10^5 \text{ см}^{-1}$  [264], теплоёмкость  $C_p = 2.29 \text{ Дж}/(\text{К} \times \text{см}^3)$  [260], теплопроводность  $K = 0.62 \text{ Вт}/(\text{К} \times \text{см})$  [265].

Полученные в результате расчётов зависимости температуры поверхности монокристаллического кремния от времени при различных значениях плотности энергии лазерного излучения с длиной волны 355 нм представлены на рис. 3.1.

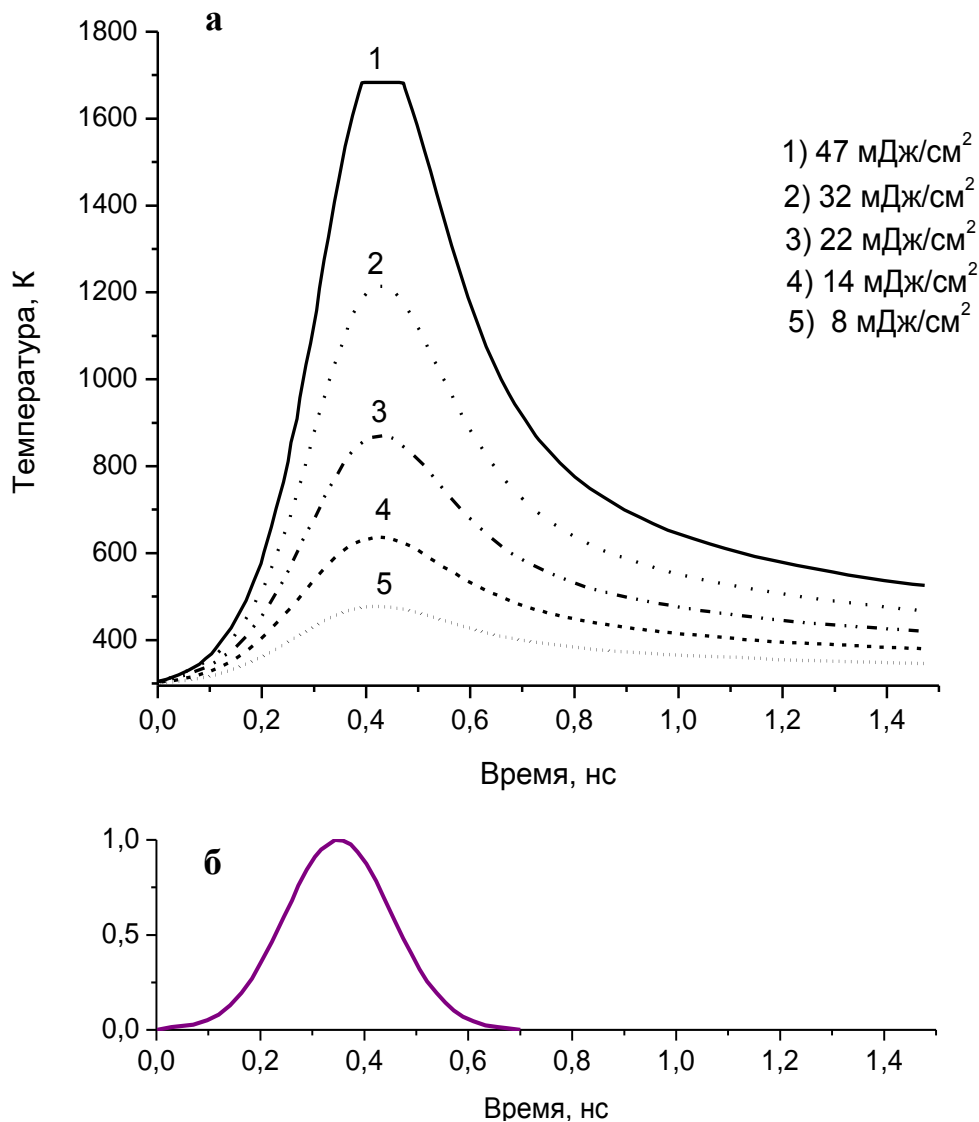


Рис. 3.1. Расчётные зависимости температуры поверхности монокристаллического кремния от времени при воздействии импульсным лазерным излучением различной плотности энергии с длиной волны  $\lambda = 355 \text{ нм}$  (а); использованная в расчетах зависимость плотности мощности лазерного импульса от времени в импульсе (б).

Видно, что температура поверхности достигает своего максимума примерно к концу лазерного импульса, за время, примерно равное 0.4 нс. Высокая температура поверхности поддерживается в течение промежутка времени, сравнимого с длительностью лазерного импульса. Из полученных в расчетах данных также следует, что при плотности энергии примерно  $45 \text{ мДж/см}^2$  температура поверхности подложки достигает температуры плавления кремния (1683K). При дальнейшем увеличении плотности энергии максимальная температура поверхности меняется незначительно, изменяется лишь глубина расплавленного слоя. Вся поступающая энергия излучения затрачивается на плавление материала подложки. В соответствии с результатами расчетов, дальнейший рост температуры поверхности наблюдается уже при значениях плотности лазерной энергии, превышающих  $85 \text{ мДж/см}^2$  (этот участок на рисунке не представлен).

Одним из индикаторов плавления поверхностного слоя кремния при воздействии импульсным лазерным излучением может служить образование поверхностных периодических структур. Возникновение периодических структур на поверхности твердых тел при лазерном облучении представляет собой универсальное явление [266] и обусловлено интерференцией падающей лазерной волны с поверхностными электромагнитными волнами [267, 268]. В образующемся интерференционном поле происходит неоднородный разогрев среды, и как следствие, формируется «резонансный» рельеф. Многократное лазерное воздействие на материал приводит к росту рельефа, который, в свою очередь, определяет эффективность возбуждения поверхностных электромагнитных волн. Вследствие быстрого остывания поверхностного слоя после окончания лазерного воздействия, образованный рельеф остается в виде поверхностных периодических структур и может быть зарегистрирован, например, с использованием электронной микроскопии.

На рис. 3.2 приведено изображение поверхности подложки монокристаллического кремния, полученное методом сканирующей электронной микроскопии после воздействия на подложку лазерным излучением с длиной волны 355 нм и плотностью энергии излучения  $60 \text{ мДж/см}^2$ . На электронной микрофотографии хорошо видны поверхностные периодические структуры. Как показали эксперименты, такого рода структуры начинают отчетливо проявляться

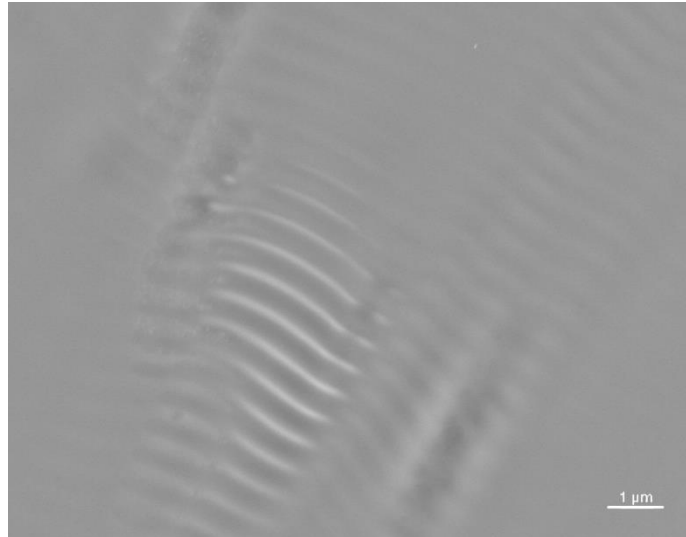


Рис. 3.2. Электронная микрофотография кремниевой поверхности, полученная после лазерного воздействия с плотностью энергии излучения  $60 \text{ мДж/см}^2$  в течение 10 с.

на кремниевой подложке при плотности энергии, превышающей  $50 \text{ мДж/см}^2$ , что соответствует результатам проведенных расчетов.

На рис. 3.3 представлены зависимости температуры поверхности от времени при различных значениях плотности энергии лазерного излучения с длиной волны 355 нм, рассчитанные для материала, представляющего собой кремневую подложку с напыленным слоем аморфного кремния  $\alpha\text{-Si}$ . Из результатов расчетов следует, что динамика изменения температуры поверхности  $\alpha\text{-Si}$  после воздействия лазерного импульса аналогична приведенной на рис. 3.1 для монокристаллического кремния.

Результаты аналогичных расчетов, но выполненных для длины волны излучения 532 нм, представлены на рис. 3.4. Сравнение двух длин волн показывает, что при равных значениях плотности лазерной энергии максимальная температура, достигаемая при нагреве материала, а также скорость его остывания выше для длины волны  $\lambda=355 \text{ нм}$  по сравнению с  $\lambda=532 \text{ нм}$ . Например, излучение видимого диапазона приводит к началу плавления  $\alpha\text{-Si}$  при плотности лазерной энергии, превышающей  $50 \text{ мДж/см}^2$ , в то время как УФ-излучение – при  $30 \text{ мДж/см}^2$  (температура плавления  $\alpha\text{-Si}$  составляет 1420К).

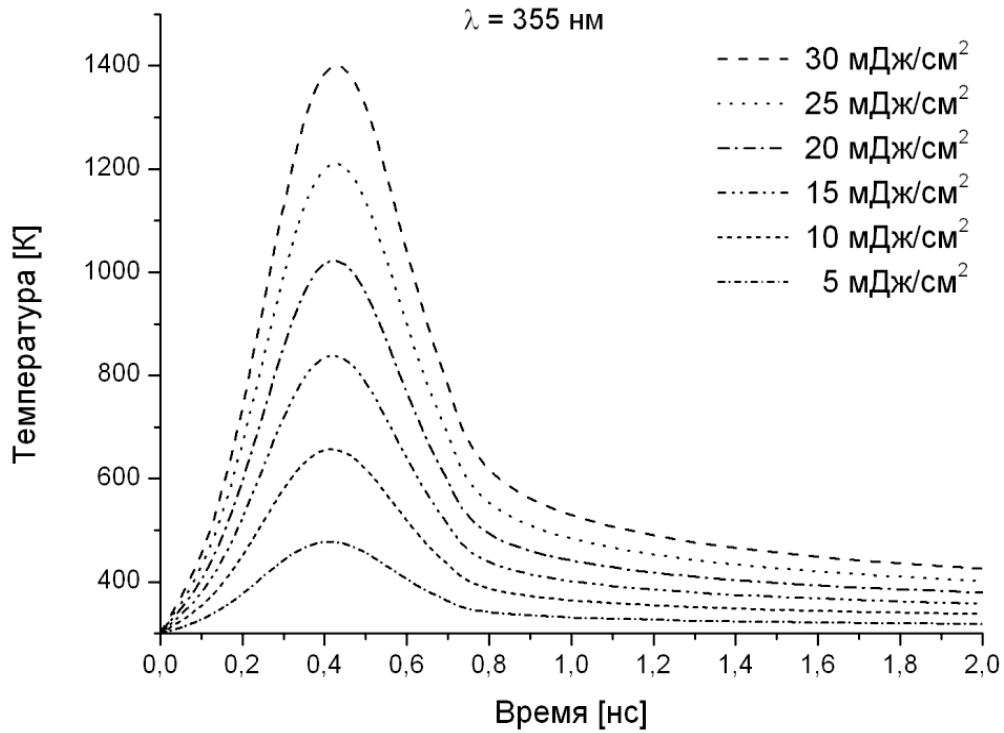


Рис. 3.3. Расчётные зависимости температуры поверхности слоя аморфного кремния от времени при воздействии лазерным излучением различной плотности энергии с длиной волны  $\lambda=355 \text{ nm}$ .

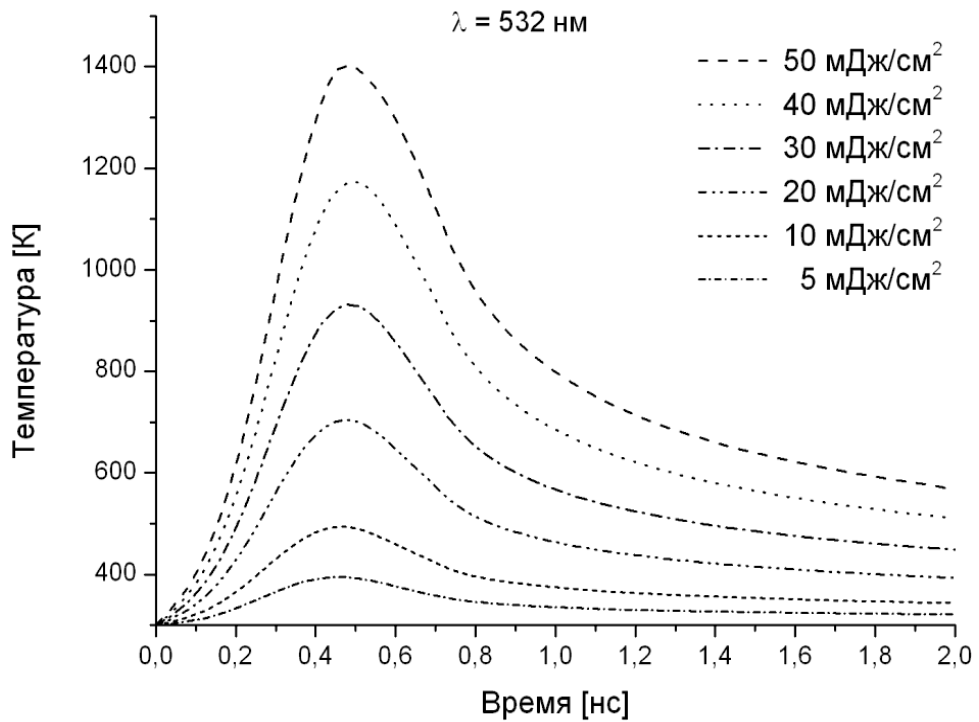


Рис. 3.4. Расчётные зависимости температуры поверхности слоя аморфного кремния от времени при воздействии лазерным излучением различной плотности энергии с длиной волны  $\lambda=532 \text{ nm}$ .

Следует отметить особенность лазерно-индуцированного нагрева кремниевых эмиттеров ионов, важную для совмещения метода ионизации SALDI с времяпролетным масс-анализатором. Малое время существования состояния с высокой температурой поверхности обуславливает малое время эмиссии ионов. Поскольку образованные в процессе SALDI ионы стартуют с одной и той же поверхности, положение которой в пространстве хорошо определено, а время выхода ионов мало, то использование даже сравнительно простого линейного времяпролетного масс-спектрометра позволяет достигать достаточно высокого разрешения по массам.

Для выяснения механизма лазерной десорбции/ионизации представляется важным сравнить динамику изменения температуры поверхности при воздействии одного и того же лазерного импульса на различные материалы. С этой целью были проведены расчеты температуры поверхности при лазерном воздействии на подложки из графита и оксид цинка – материалов, которые исследованы в качестве эмиттеров ионов летучих соединений в главе 2 (см. табл.2.1). Используемые в расчете оптические и теплофизические параметры материалов определены по литературным данным: параметры графита взяты из работ [262, 269], оксида цинка – из работ [270-273].

Зависимости температуры поверхности от времени при различных значениях плотности энергии излучения, полученные для графита, приведены на рис. 3.5. Аналогичные зависимости для оксида цинка представлены на рис. 3.6. Видно, что исследованные материалы, включая кремний, характеризуются схожими зависимостями температуры от времени. Отличия заключаются, главным образом, в значениях плотности лазерной энергии, необходимой для нагрева поверхности до одной и той же температуры.

Согласно результатам расчетов, все исследованные в качестве эмиттеров ионов подложки позволяют эффективно и быстро преобразовать энергию излучения в тепловую энергию материала. Вместе с тем, они кардинально отличаются по эффективности лазерной десорбции/ионизации летучих соединений. Даже при равных значениях максимальной температуры поверхности (найденной в результате расчетов) величины выхода ионов с различных эмиттеров отличается более чем на четыре порядка величины.

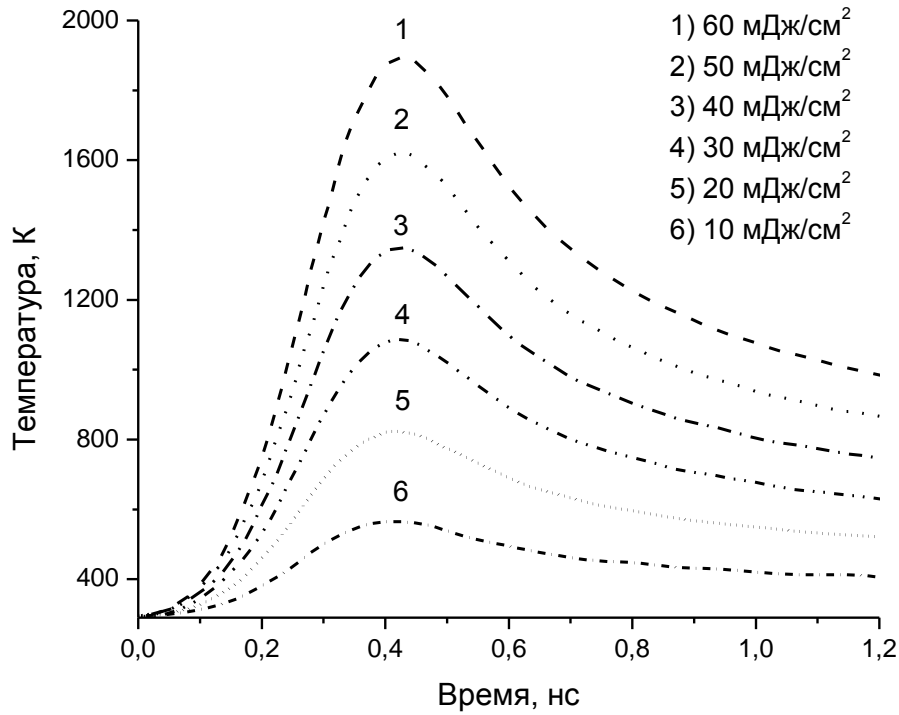


Рис. 3.5. Расчётные зависимости температуры поверхности графита от времени при воздействии лазерным излучением различной плотности энергии с  $\lambda=355$  нм.

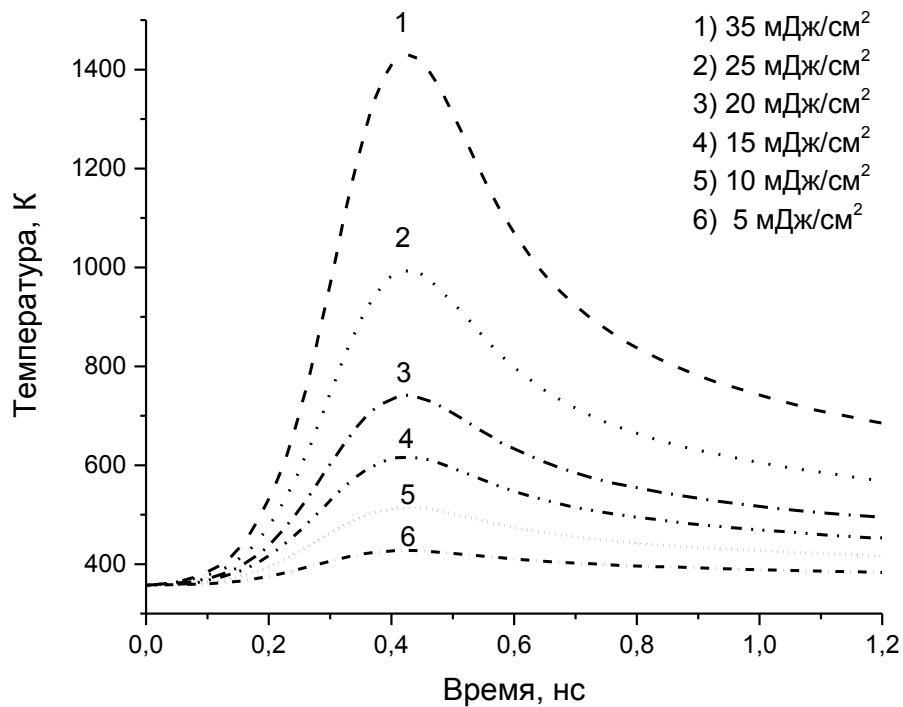


Рис. 3.6. Расчётные зависимости температуры поверхности оксида цинка от времени при воздействии лазерным излучением различной плотности энергии с  $\lambda=355$  нм.

Высокий коэффициент поглощения лазерного излучения важен для эффективной десорбции, поэтому использование в качестве эмиттеров ионов материалов, хорошо поглощающих излучение, является общим условием для всех методов, основанных на лазерной десорбции/ионизации. Большинство известных по литературным данным моделей SALDI рассматривают быстрый локальный нагрев поверхности материала эмиттера ионов как необходимое условие лазерной десорбции/ионизации. Приведенные выше результаты показывают, что это условие не является достаточным для метода SALDI.

Для того чтобы подложка являлась эффективным эмиттером ионов химических соединений, материал подложки должен удовлетворять дополнительным специфическим требованиям. Результаты экспериментов с лазерно-индуцированной активацией пористого кремния позволяют предположить, что подложка принимает активное участие не только в процессе десорбции нанесенных на его поверхность соединений, но и в их ионизации путем переноса протона (а при детектировании летучих соединений – и их адсорбции из газовой фазы). Поскольку основным каналом ионизации является протонирование, то важным для понимания механизма ионизации является вопрос о химической природе донора и источника протонов для реакции протонирования.

### **3.2. Вода – источник протонов в процессе SALDI**

Основным активным компонентом газовой фазы в ионном источнике масс-спектрометра в условиях экспериментов по определению летучих химических соединений является вода. Полученные в главе 2 результаты исследования влияния паров воды на процесс химической активации пористого кремния и на величину ионного сигнала определяемых соединений позволяют предположить, что именно вода является источником протонов в процессе ионизации аналита.

Подтверждением этому предположению могут служить эксперименты с вводом в ионный источник масс-спектрометра паров дейтерированной воды. В таких условиях был зарегистрирован масс-спектр триэтиламина ( $m/z$  102), представленный на рис. 3.7. Сравнение со спектром на рис. 2.15 показывает, что при замене паров обычной воды на тяжелую воду пик протонированных молекул смещается на единицу  $m/z$  в сторону больших масс. Это свидетельствует о том, что

протон, участвовавший в ионизации молекулы аналита, был получен от введенной в прибор молекулы воды. Вместе с тем, предположение о том, что вода является непосредственным донором протона, не подтверждается экспериментальными данными.

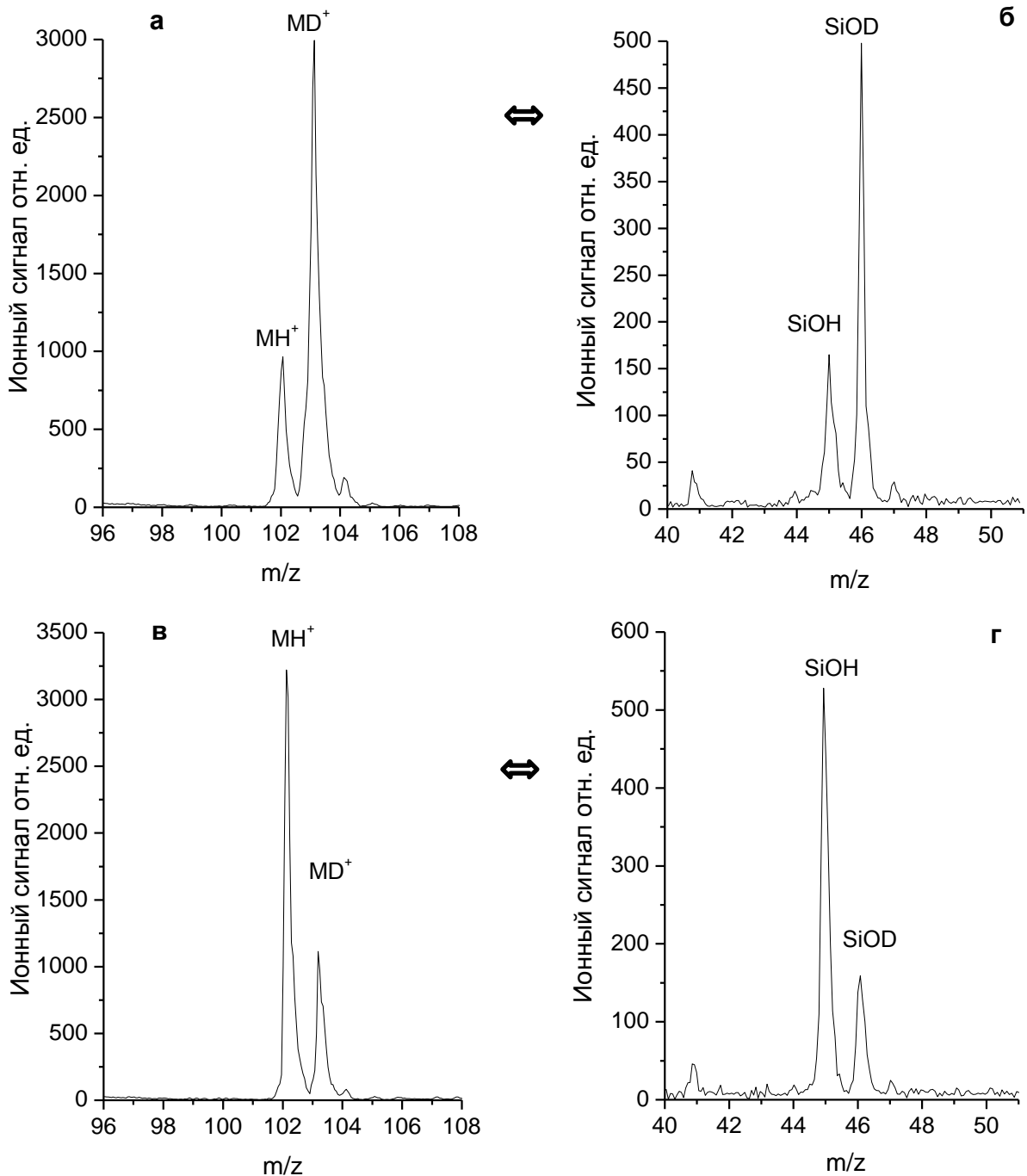


Рис. 3.7. Масс-спектры в области, соответствующей протонированным молекулам триэтиламина и ионам силанольной группы: (а) и (б) зарегистрированы в конце процесса ввода в ионный источник масс-спектрометра дейтерированной воды, (в) и (г) – в начале этого процесса.



Как уже отмечено выше, эффективность ионизации молекул аналитов коррелирует не с параметром  $pK_a$  (который определяется взаимодействием аналита с водой), а основностью соединения в газовой фазе. Следует также отметить, что давление паров воды в масс-спектрометре соответствует дозе за время между двумя последовательными лазерными импульсами, приходящимися на один и тот же участок поверхности, меньшей 1 Ленгмюра. В соответствии с экспериментальными и расчетными данными (см. рис. 3.3), температура поверхности в результате лазерного воздействия при оптимальных условиях анализа достигает 1000 К. Это означает, что даже если коэффициент прилипания молекул воды принимает максимальную величину, равную единице, за время между лазерными импульсами вода на поверхности присутствует в количестве меньше одного монослоя. При этом ионный сигнал аналита может быть получен и при много меньших концентрациях паров воды.

Еще более важен тот факт, что в SALDI масс-спектрах при любых значениях плотности лазерного излучения не регистрируются ионы, показывающие, что донором протонов являются молекулы воды, например, ионы вида  $H_3O^+$ ,  $H_2O^+$  или  $OH$ . Этот факт свидетельствует, что, во-первых, функциональная группа, являющаяся донором протонов, прочно связана с поверхностью эмиттера ионов и не десорбируется даже при температурах кремниевой поверхности, близких к температуре плавления, и во-вторых, реакция ионизации молекул аналита протекает на поверхности подложки.

Анализ масс-спектров на рис. 2.9, характеризующих химический состав поверхности, показывает, что в присутствии остаточных паров воды при лазерном воздействии на поверхности пористого кремния образуются SiOH-группы в результате диссоциативной адсорбции молекул воды на очищенных лазером кремниевых поверхностях. Можно предположить, что именно эти группы являются центрами адсорбции и последующей ионизации с переносом протона в процессе SALDI. Дополнительным подтверждением этому служат масс-спектры, полученные при вводе в ионный источник паров дейтерированной воды. Как отмечено в главе 2, в процессе напуска тяжелой воды пики, соответствующие ионам  $SiOH^+$ , замещаются на пики  $SiOD^+$ , что иллюстрируют масс-спектры, приведенные на рис 3.7 (б и г). Вместе с этим, наблюдается и замещение пика  $MH^+$ ,

соответствующего протонированным молекулам, на пик дейтерированных молекул  $MD^+$ , что видно на рис 3.7 (а и в). Индикатором появления в спектре пика дейтерированных молекул аналита служит появление пика дейтерированных силанольных групп, а динамика роста интенсивности пика  $MD^+$  совпадает с динамикой роста интенсивности пика  $SiOD^+$ .

### 3.3. Модификация поверхности эмиттера ионов полимерными кислотами

$SiOH$ -группа является слабой кислотой в газовой фазе. На первый взгляд, более эффективное протонирование молекул аналитов можно осуществить, используя более сильные кислоты, например, содержащие карбоксильную группу. Для сравнения, кислотность в газовой фазе (изменение энергии Гиббса  $\Delta G^\circ$  гипотетической реакции депротонирования соединения  $A \rightarrow (A-H)^- + H^+$ , проходящей в газовой фазе в стандартных условиях) уксусной кислоты  $CH_3COOH$  на 44 кДж/моль ниже, чем силанола  $H_3SiOH$  [274, 275].

Для проверки этого предположения были проведены эксперименты по модификации поверхности пористого кремния сорбционными покрытиями на основе органических полимерных веществ, содержащих карбоксильные функциональные группы. В ходе исследований изучены полимерные карбоновые кислоты, предложенные ранее в качестве чувствительных покрытий пьезорезонансных сенсоров аммиака, гидразинов и аминов [276]. Сорбционное связывание аналитов основано на взаимодействии неподелённой пары электронов азота с протонами кислот по реакции:



К достоинствами таких чувствительных покрытий следует отнести:

- способность сорбента образовывать тонкие, однородные по толщине пленки на поверхности твердотельных подложек, которые сохраняют морфологию поверхности;
- хорошая адгезия к кремниевым материалам;
- стабильность;
- широкие возможности структурного дизайна для создания при необходимости сорбентов с требуемым набором аналитических и структурно-химических характеристик.

Среди изученных полимерных карбоновых кислот лучшими сорбционными свойствами при определении основных соединений обладают полиакриловая (ПАК) и полималеиновая (ПМК) кислоты.

Полиакриловую кислоту  $\left[ \text{CH}_2 - \underset{\text{COOH}}{\text{CH}} \right]_n$  получали радикальной полимеризацией свежеперегнанной акриловой кислоты по методике [277]. Синтез полималеиновой кислоты  $\left[ \underset{\text{COOH}}{\text{CH}} - \text{CH} - \underset{\text{COOH}}{\text{CH}} \right]_n$  осуществляли гидролизом полималеинового ангидрида, полученного радикальной полимеризацией малеинового ангидрида по методике [278]. Полимерные вещества синтезированы в Институте нефтехимического синтеза РАН им. В. А. Топчиева.

Синтезированные полимерные сорбенты растворяли в воде и наносили на поверхность пористого кремния с помощью микродозатора. Для оценки массы и толщины сорбционного покрытия такое же количество раствора наносили на поверхность электродов пьезоэлектрических резонаторов (кварцевых микровесов). В исследованиях использовали кварцевые пьезоэлектрические резонаторы объемных акустических волн типа "сдвиг по толщине" (АТ-срез кварца), работающие на первой механической гармонике. Принцип их действия основан на изменении собственной частоты колебаний резонатора при изменении массы вещества на его электродах (вследствие, например, нанесения сорбента или сорбции на нем химических соединений). Зависимость изменения частоты пьезоэлектрического резонатора объемных акустических волн от массы сорбируемого вещества при небольших массовых нагрузках описывается уравнением [279]:

$$\Delta f = - \frac{f_0^2}{\rho \cdot N} \cdot \frac{\Delta M}{A} \quad (3.11),$$

где  $\Delta M$  - изменение массы чувствительного слоя,  $\Delta f$  - вызванное этим изменение частоты,  $N = f_0 \cdot d$  - частотный коэффициент,  $d$  - резонансный размер (толщина),  $A$  - площадь, занимаемая нанесенным на электроды покрытием,  $\rho$  - плотность пьезоматериала (кварца),  $f_0$  - рабочая частота резонатора. Для резонаторов, использованных в работе:

$$\Delta f [\text{Гц}] = - 2.38 \cdot \Delta M [\text{нг}] \quad (3.12).$$

Как следует из формулы (3.12), массовая чувствительность резонаторов составляет 2.38 Гц/нг. Согласно результатам измерений, уровень шума в условиях термостатирования резонатора не превышает 0.3 Гц, что позволяет надежно «взвешивать» изменение массы, соответствующее нанесению на гладкую поверхность 0.1 монослоя вещества и ниже.

Полимерные карбоновые кислоты являются эффективными сорбентами основных соединений. В качестве примера на рис. 3.8 приведена типичная зависимость изменения частоты резонатора с нанесенным слоем ПМК от времени воздействия аммиака с концентрацией 1 нг/см<sup>3</sup>. Высокая поверхностная плотность карбоксильных групп обеспечивает высокую чувствительность при определении аммиака, аминов и других соединений с высокой величиной основности. Схожими динамическими характеристиками, но несколько меньшей чувствительностью характеризуется ПАК.

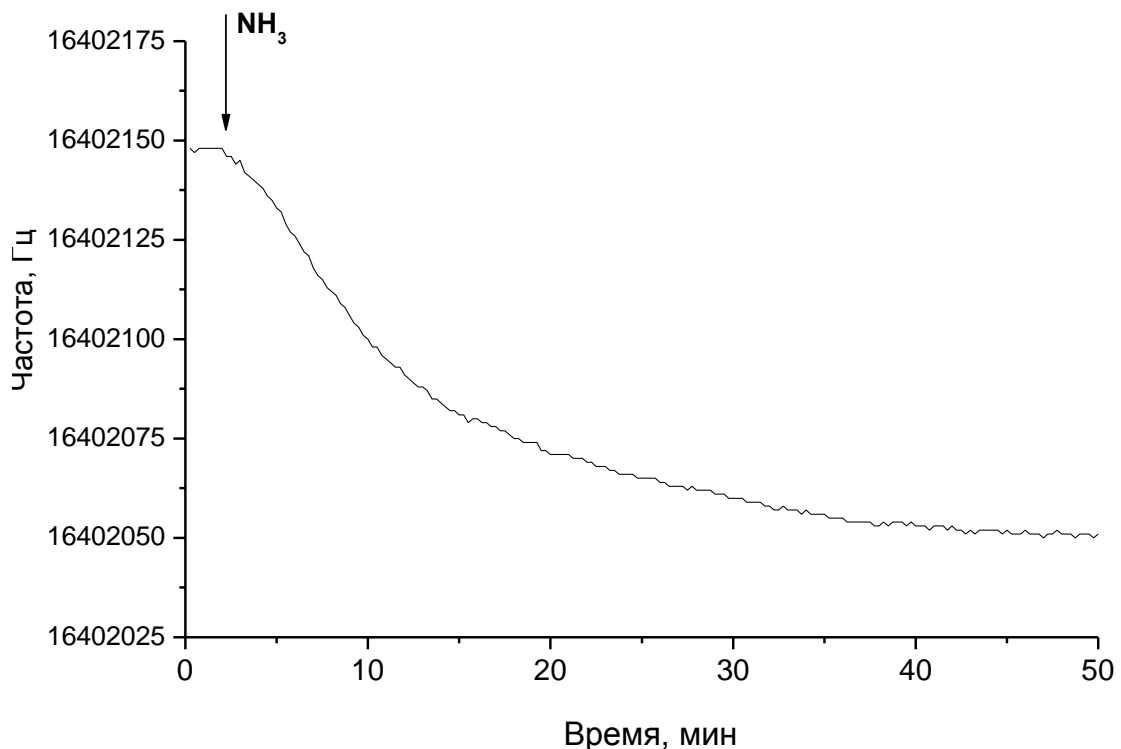


Рис. 3.8. Кинетическая зависимость сорбции аммиака полималеиновой кислотой. Концентрация аммиака в воздухе 1 нг/см<sup>3</sup>, масса нанесенного на резонатор сорбента 5.2 мкг.

Нанесение ПАК и ПМК на поверхность как аморфного кремния, так и активированного пористого кремния, приводило к уменьшению ионного сигнала, а при количестве нанесенной поликислоты, примерно соответствующей нескольким монослоям сорбента, ионный сигнал снижался до нуля. Принципиально другая ситуация наблюдалась при исследовании аморфного кремния в качестве чувствительного покрытия резонатора. Слой  $\alpha$ -Si, напыленный на электроды резонатора, показал крайне низкую чувствительность при определении аммиака и аминов. Но при последующем нанесении на его поверхность ПАК и ПМК чувствительность возрастала с увеличением количества нанесенной поликислоты.

Таким образом, несмотря на то, что карбоксильные группы обладают более сильными кислотными свойствами и являются более эффективными сорбентами основных соединений, чем силанольные группы, модификация кремниевой поверхности эмиттера ионов путем нанесения полимерных карбоновых кислот снижает эффективность ионизации.

#### 3.4. Лазерно-индуцированная ионизация

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на кремниевых материалах реализуется механизм, который существенно увеличивает кислотность поверхностных протонодонорных групп. Действительно, в нормальных условиях энергия протонирования (изменение энергии Гиббса) соединений, хорошо ионизирующихся в процессе SALDI, не превышает величину 1000 кДж/моль (см. данные табл. 2.), а, например, энергия депротонирования  $\text{H}_3\text{Si-OH}$  составляет 1473 кДж/моль [275]. Даже с учетом того, что энергия депротонирования  $\equiv\text{SiOH}$ -групп может быть несколько ниже из-за делокализации и стабилизации отрицательного заряда, протолитическая реакция  $\equiv\text{SiOH} + \text{M} \leftrightarrow \equiv\text{SiO}^- + \text{MH}^+$  почти целиком смещена влево. Очевидно, что при такой разности энергий существенно сместить равновесие путем нагрева поверхности невозможно. Следует также исключить вероятность увеличения основности аналитов в результате фотовозбуждения молекул, поскольку почти все исследованные определяемые соединения не поглощают лазерное излучение на длине волны 355 нм, и кроме того, ионизация происходит и при воздействии на подложку видимым излучением.

Для понимания механизма, обеспечивающего перенос протона от силанольной группы к молекуле аналита, представляются важными результаты, полученные при исследовании влияния структуры поверхностного слоя кремниевой подложки на степень ионизации. Как показано в главе 2, эффективные эмиттеры ионов характеризуются высокой плотностью электрически активных структурных дефектов, образующих глубокие уровни в запрещённой зоне. Для  $\alpha$ -Si основными структурными дефектами являются оборванные связи. Для пористого кремния, на первый взгляд, ситуация иная, поскольку электрически активные поверхностные центры у свежеприготовленного пористого кремния, очевидно, пассивированы. Известно, однако, что на начальной стадии окисления кремния, до образования пленки оксида кремния  $\text{SiO}_2$ , в поверхностной области подложки генерируется большое число оборванных связей кремния [280]. Поскольку лазерная обработка пористого кремния в присутствии паров воды приводит к частичному окислению кремния, то в ее процессе (процессе активации) формируется поверхностный слой, который с учетом большой величины удельной поверхности характеризуется высокой плотностью оборванных связей. Кроме того, пористый кремний представляет собой нанокристаллический материал и характеризуется высокой плотностью электронных состояний, соответствующих границам трехмерной периодической структуры. Известно, что значительное число таких состояний располагаются внутри запрещённой зоны полупроводника [281]. В результате лазерной активации эти центры становятся электрически активными и могут эффективно захватывать неравновесные носители заряда.

Рассматривая особенности взаимодействия лазерного излучения с кремниевыми материалами, необходимо выделять не только быстрый локальный нагрев, но и другой аспект – электронное возбуждение материала. Как известно, поглощение электромагнитного излучения с энергией кванта, большей ширины запрещенной зоны (или щели подвижности) полупроводника, приводит к генерации неравновесных носителей заряда: электронов в зоне проводимости и дырок в валентной зоне. И упорядоченные (монокристаллические), и разупорядоченные кремниевые материалы с высокой плотностью дефектов эффективно поглощают УФ-излучение. Кардинальное их различие проявляется в процессах рекомбинации неравновесных носителей и обусловлено различием электронных структур,

главным образом, плотностью центров, являющихся эффективными ловушками носителей заряда.

Для объяснения процесса переноса протона к молекуле аналита, адсорбированной на поверхности кремниевых эмиттеров ионов, следует предположить, что при лазерном воздействии в условиях высокой плотности глубоководных центров происходит разделение генерированных излучением зарядов с последующим захватом неравновесных дырок ловушками вблизи или на поверхностном SiOH-центре, являющемся донором протона. Очевидно, что такая локализация положительного заряда должна существенно снижать энергию депротонирования силанольной группы.

Для оценки величины эффекта влияния локализации положительного заряда на протекание реакции протонирования были проведены квантово-химические расчеты, моделирующие процесс переноса протона от кислорода SiOH-группы к азоту адсорбированной молекулы аналита. Поверхностный адсорбционный центр моделировали кластером, состоящим из 31 атома кремния и представляющим собой фрагмент кубической гранецентрированной решетки типа алмаза. Поверхностные связи кремния пассивированы атомами водорода. Один из атомов кремния образует поверхностный SiOH-центр. В качестве тестовых соединений использовали пиридин и анилин.

Расчёты проводились в программном пакете Firefly [250] методом RHF с использованием поляризационного базисного набора 6-31G\*\* функций. Такой базисный набор наиболее точно описывает связи между атомами, имеющими валентные орбитали s- и p-типа, а также между этими атомами и водородом (особенно, когда атом водорода является мостиковым). На первом этапе вычислений проводили расчет равновесной геометрии нейтрального кластера, исходя из структуры, взятой из кристаллографических баз данных. Затем на поверхностную SiOH-группу кластера помещали нейтральную молекулу аналита и проводили полную оптимизацию геометрической структуры, соответствующей минимальной энергии системы при адсорбции молекулы. На рис. 3.9 представлена рассчитанная структура нейтрального комплекса, состоящего из кластера кремния и связанной с ней молекулы пиридина.

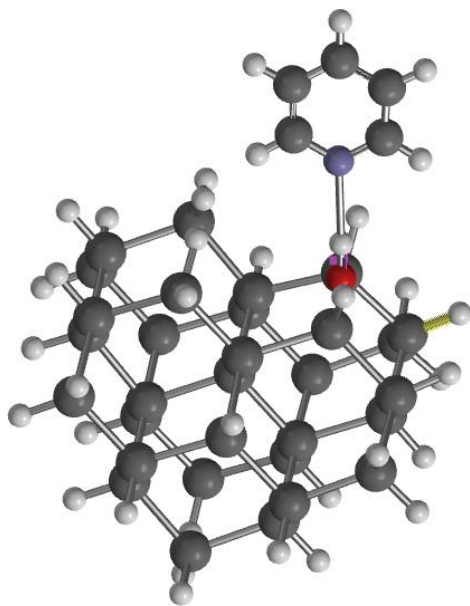


Рис. 3.9. Рассчитанная структурная формула нейтрального кластера кремния состава  $\text{Si}_{31}\text{H}_{34}\text{OH}$  с адсорбированной молекулой пиридина.

Для моделирования локализации положительного заряда в системе на соседнем с SiOH-группой поверхностном атоме кремния создавали оборванную связь, удаляли с нее электрон и опять проводили оптимизацию геометрической структуры. Для нейтрального и заряженного комплексов были проведены расчёты колебательного спектра, представляющие собой вычисление матрицы вторых производных энергии системы по координатам ядер атомов. Расчет основан на модели нормальных колебаний, в соответствие с которой частоты колебаний ядер вычислялись через собственные значения матрицы вторых производных, а колебательные моды – через собственные вектора. Найдено, что в спектре колебаний и заряженного, и нейтрального комплексов имеет место нормальная колебательная мода, представленная смещением протона группы SiOH в направлении от кислорода к азоту адсорбированной молекулы, причем ядро, соответствующее протону SiOH-группы, является практически единственным ядром со значительной амплитудой колебаний.

Далее проводили моделирование процесса переноса протона путем расчётов изменения энергии системы «нейтральный кластер кремния – адсорбированная молекула» при изменении геометрической конфигурации вдоль координаты колебательной моды. В ходе расчетов варьировали с шагом  $0.1 \text{ \AA}$  два параметра – расстояние между атомами кислорода и азота и расстояние между атомом азота и протоном. Полученная в результате моделирования поверхность потенциальной



энергии реакции протонирования анилина приведена на рис. 3.10. За нулевой уровень выбрано значение энергии комплекса при нулевом значении величины смещения ядер от положения оптимальной геометрической конфигурации. На основе полученных данных можно определить путь реакции переноса протона от атома кислорода SiOH-группы к атому азота анилина и найти изменение энергии системы в этом процессе. Процесс переноса протона можно разделить на три последовательных стадии. На первой стадии расстояния между атомами O и N уменьшается с 2.9 Å до 2.4 Å. При этом расстояние между атомами O и H практически не меняется. Энергия системы на первой стадии возрастает примерно на 28 кДж/моль. На второй стадии происходит перенос протона к атому азота, а расстояние между атомами O и N практически не меняется. Энергия системы на второй стадии увеличивается до 122 кДж/моль. На третьей стадии расстояние между атомами O и N возрастает, а между атомами N и H не меняется. Эта стадия

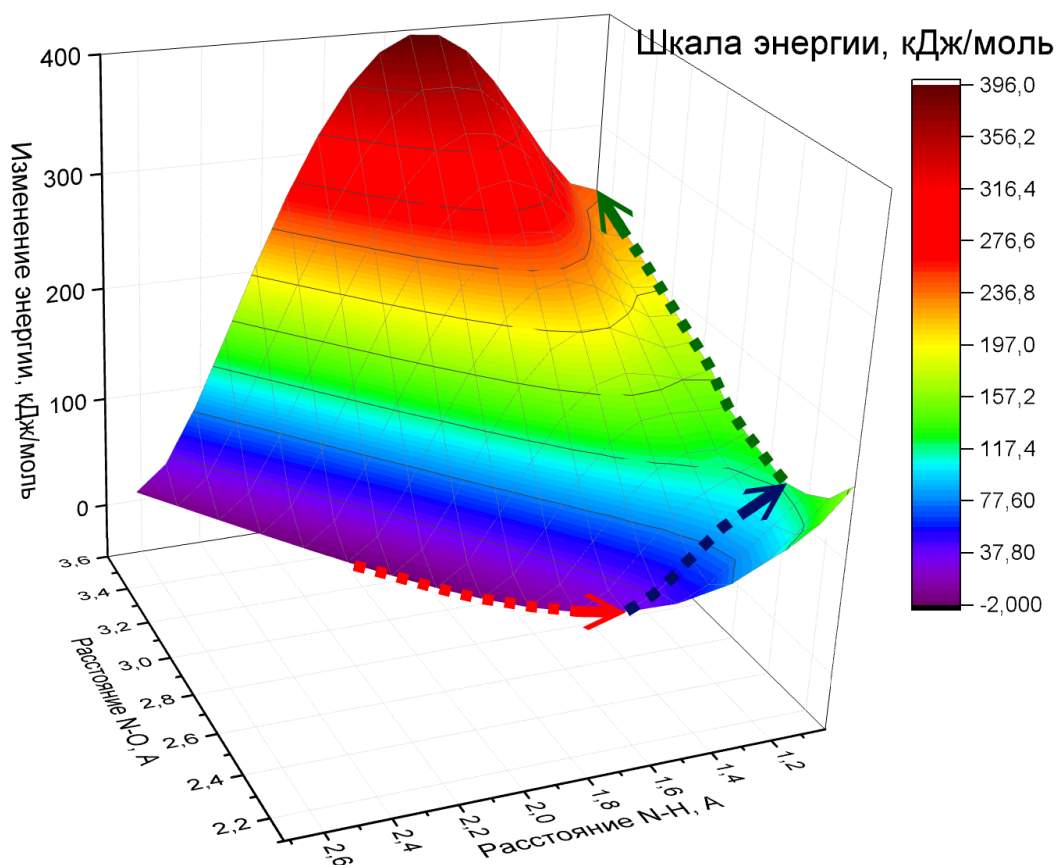


Рис. 3.10. Поверхность потенциальной энергии реакции протонирования анилина, рассчитанная для нейтрального кремниевого кластера. Путь реакции протонирования отмечен точками на поверхности.

соответствует началу процесса десорбции протонированной молекулы анилина. Энергия системы монотонно увеличивается до 250 кДж/моль при расстоянии между атомами O и N, равном 3.6 Å. Путь реакции протонирования анилина приведен на рис. 3.10.

Аналогичным образом проводили моделирование процесса переноса протона для положительно заряженного кластера кремния. На первом этапе находили геометрические структуры комплексов, представляющих собой заряженный кластер с адсорбированной молекулой. Рассчитанные структуры схожи со структурами нейтрального кластера (см. рис. 3.9) и отличаются только меньшим расстоянием между атомами кислорода и азота. В частности, для анилина это расстояние составляет 2.5 Å по сравнению с 2.9 Å для нейтрального кластера.

На втором этапе рассчитывали изменение энергии системы в процессе переноса протона на заряженном кластере. На рис. 3.11 приведена рассчитанная поверхность потенциальной энергии реакции протонирования анилина. Видно, что локализация положительного заряда на оборванной связи кардинальным образом влияет на процесс переноса протона. В отличие от нейтрального кластера, поверхность потенциальной энергии реакции для заряженной системы содержит два локальных минимума. Первый из них соответствует состоянию с адсорбированной нейтральной молекулой, а второй, с меньшей энергией – состоянию с адсорбированной протонированной молекулой. Эти два состояния разделены относительно невысоким, менее 10 кДж/моль, энергетическим барьером. Процесс переноса протона через барьер протекает в одну стадию. При этом изменяется не только расстояние между атомами N и H, но и между O и N, которое увеличивается до 2.7 Å. Энергия системы в результате протонирования уменьшается примерно на 30 кДж/моль.

Приведённые результаты свидетельствуют о том, что локализация положительного заряда вблизи поверхностной SiOH-группы является необходимым условием формирования протонированных молекул соединения, адсорбированных на кремниевом кластере. Для нейтрального комплекса состояние, в котором протон локализован возле атома азота адсорбированной молекулы, является неустойчивым. При этом барьер переноса протона на нейтральном комплексе более чем на  $10^2$  кДж/моль выше, чем на заряженном комплексе.

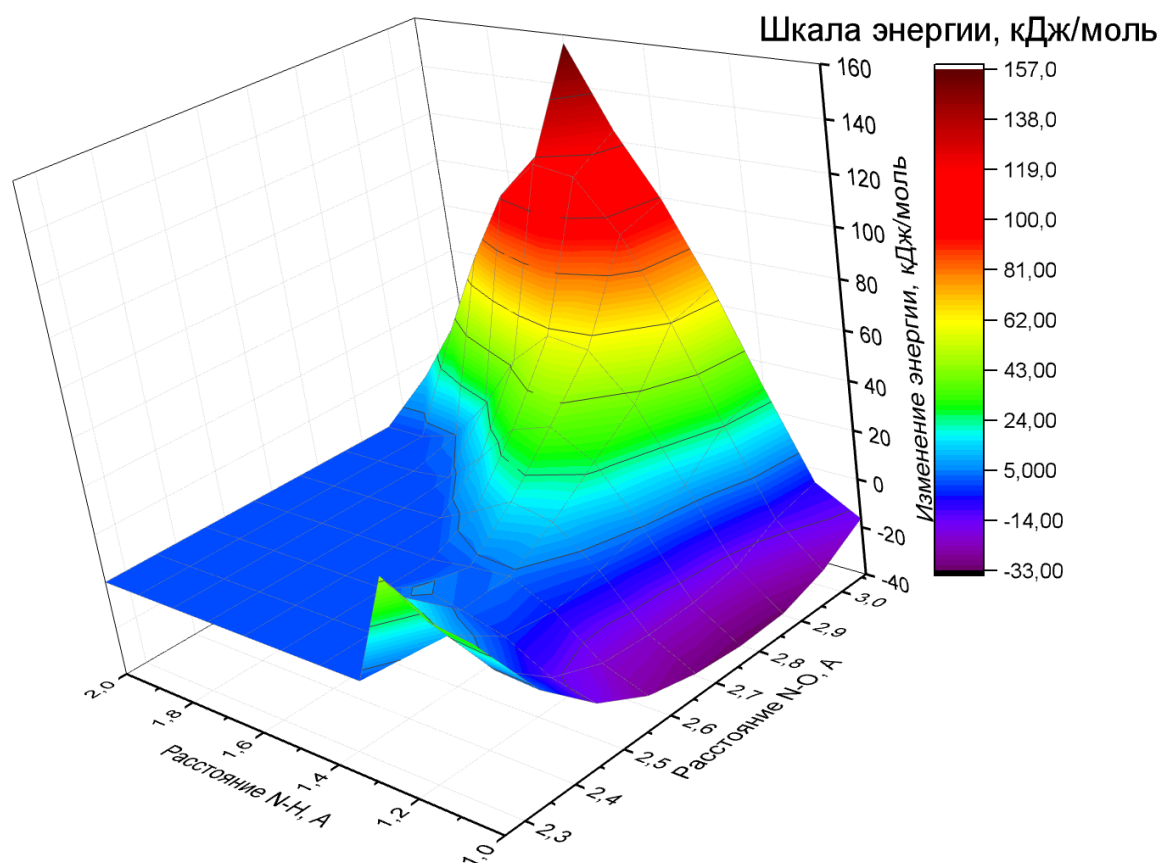


Рис. 3.11. Поверхность потенциальной энергии реакции протонирования анилина, рассчитанная для заряженного кремниевого кластера.

### 3.5. Лазерно-индуцированная десорбция

Согласно предложенному механизму, реакция ионизации идет на поверхности кремниевой подложки. Очевидно, что одной из стадий SALDI является десорбция образовавшихся ионов в газовую фазу. Прояснить вопрос о механизме десорбции в SALDI могут представленные в главе 2 результаты экспериментального определения зависимости ионного сигнала от плотности лазерной энергии для разных длин волн и рассмотренные выше в главе 3 расчёты теплового воздействия лазерного излучения на материал эмиттера ионов. На основе этих данных можно определить зависимости ионного сигнала от температуры поверхности.

На рис. 3.12 приведены зависимости ионного сигнала протонированных молекул пиридина от величины, обратной максимальной температуре поверхности аморфного кремния. Зависимости получены на основе экспериментальных кривых на рис. 2.20 и результатов расчета температуры поверхности (рис. 3.3 и рис. 3.4) для

двух различных длин волн. Из данных на рис. 2.20 следует, что при равных значениях плотности лазерной энергии величины ионных сигналов при одинаковых количествах введенного в прибор анализа отличаются для двух длин волн более чем в 30 раз. По-другому выглядят зависимости ионного сигнала от температуры. Видно, что зависимости, построенные для  $\lambda=355$  нм и  $\lambda=532$  нм, практически совпадают. Аналогичные результаты были получены и для других исследованных анализов.

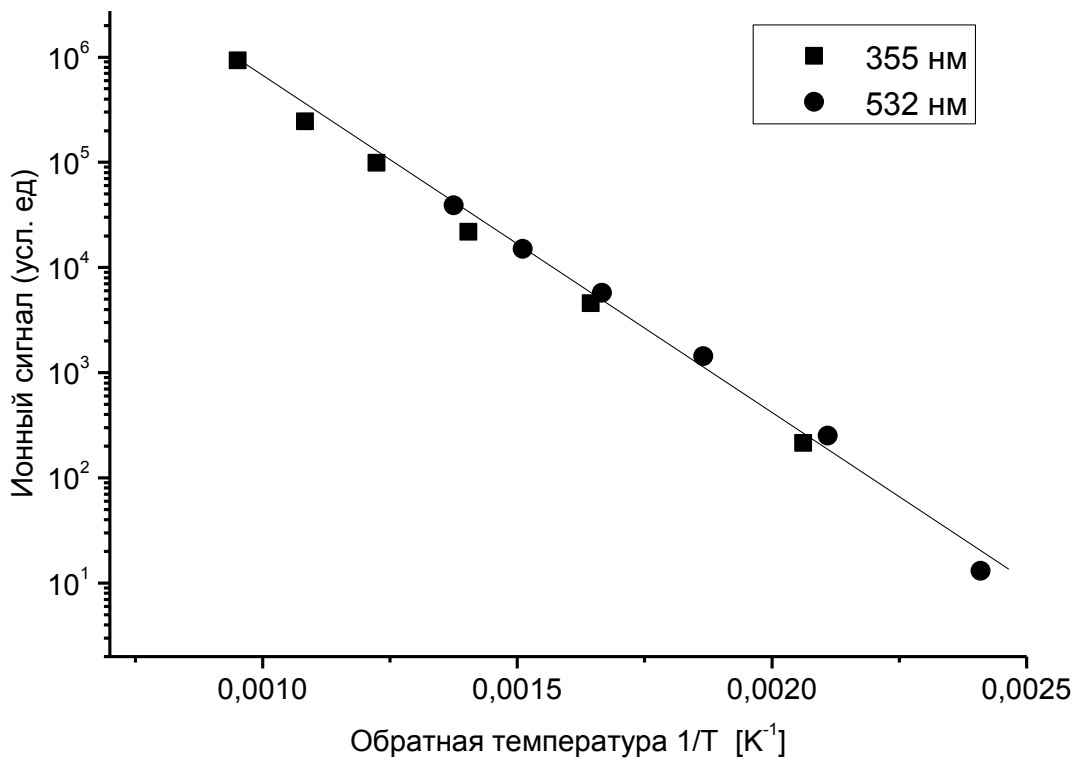


Рис. 3.12. Зависимости величины выхода протонированных молекул пиридина с поверхности  $\alpha$ -Si от величины, обратной рассчитанной максимальной температуре поверхности для двух длин волн: 355 нм и 532 нм.

Приведенные данные свидетельствуют, что различие в длине волны лазерного излучения проявляется только в термическом воздействии излучения на материал эмиттера ионов. Важно отметить, что излучение как видимого, так и УФ-диапазона способно эффективно генерировать в кремниевых материалах неравновесные носители заряда, которые играют важную роль в процессе ионизации

адсорбированных на поверхности молекул. Различие в длине волны излучения влияет, главным образом, на эффективность десорбции ионов.

Из приведенных на рис. 3.3 и рис. 3.4 данных также следует, что рассчитанная максимальная температура поверхности растет линейно при увеличении плотности энергии излучения до  $25 \text{ мДж/см}^2$ , в то время как на этом же участке ионный сигнал возрастает экспоненциально (см. рис. 2.20). Экспоненциальный вид зависимости выхода ионов от температуры свидетельствует в пользу модели термической десорбции ионов, предварительно образующихся на поверхности эмиттера ионов. Предполагая, что процесс термодесорбции ионов примерно изотермичен (поскольку большинство ионов десорбируются в небольшом диапазоне температур вблизи максимума) и что он описывается кинетикой первого порядка, можно оценить энергию активации десорбции. Тогда общее число десорбированных ионов  $N_{tot}$ , можно аппроксимировать уравнением Аррениуса:

$$N_{tot} = A \cdot \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right), \quad (3.13),$$

где  $E_d$  – энергия активации десорбции, которая определяется энергией связи иона с поверхностью,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – максимальная температура поверхности при заданном значении плотности лазерной энергии.

Из приведенной на рис. 3.12 зависимости легко определить величину  $E_d$  по тангенсу угла наклона прямой. Для пиридина эта величина составляет  $62 \text{ кДж/моль}$ . Близкие значения энергии активации десорбции получены и для других исследованных в работе летучих соединений. Например, для N,N-диметил-1-фенилэтиламина величина  $E_d = 65 \text{ кДж/моль}$ .

Для теоретической оценки полученного значения энергии активации десорбции были проведены квантово-химические расчеты, моделирующие процесс десорбции протонированных молекул аналита с кремниевой поверхности. Поверхность моделировали тем же кластером, который использовали в расчетах процесса протонирования. Аналитами являлись пиридин и N,N-диметил-1-фенилэтиламин. Для моделирования процесса отрыва заряженной молекулы от нейтрального кластера увеличивали расстояние между кластером и протонированной молекулой аналита с шагом от  $0.1 \text{ \AA}$ . На каждом шаге производили оптимизацию геометрии системы и вычисляли ее полную энергию. На

основе расчетов находили зависимость полной энергии системы от расстояния между ионом и кластером.

Как показали результаты расчетов, энергия системы монотонно возрастает, выходя на насыщение при расстоянии примерно 8 Å. Энергия, которую необходимо затратить, чтобы удалить протонированную молекулу аналита  $[MH]^+$  на это расстояние можно определить как энергию десорбции иона  $E_d$ . Рассчитанные величины  $E_d$  составили: 68 кДж/моль для пиридина и 75 кДж/моль для N,N-диметил-1-фенилэтиламина, что хорошо согласуется с экспериментальными данными, полученными из рис. 3.12.

Следует отдельно отметить важный аспект зависимости ионного сигнала от плотности энергии лазерного излучения – выход ионного сигнала на насыщение, который соответствует десорбции всех ионов и молекул аналита с поверхности кремниевой подложки в области воздействия импульса лазерного излучения. Для исследованных аналитов насыщение ионного сигнала достигается при температурах поверхности аморфного кремния 1000–1200 К, что существенно меньше температуры плавления  $\alpha$ -Si. Этот факт противоречит модели, предполагающей, что десорбция в процессе SALDI обусловлена плавлением или разрушением поверхности эмиттера ионов [214-216].

### 3.6. Заключение

Проведено численное моделирование температуры поверхности эмиттеров ионов при воздействии импульсного лазерного излучения. На основе расчетов найдены зависимости изменения температуры от времени для монокристаллического и аморфного кремния, а также оксида цинка и графита. Установлено, что для разных длин волн (355 нм и 532 нм) ионный сигнал одинаковым образом зависит от максимальной температуры поверхности.

Показано, что модификация кремниевой поверхности эмиттера ионов путем нанесения тонких слоев полимерных карбоновых кислот приводит к снижению эффективности ионизации с переносом протона.

Проведены квантово-механические расчёты, моделирующие процессы переноса протона к молекуле, адсорбированной на кремниевой поверхности и последующей десорбции образующихся ионов. Показано, что условием эффективного протекания реакций протонирования является локализация

положительного заряда вблизи протонодонорного центра. Найденные в расчетах величины энергии десорбции ионов хорошо согласуются с экспериментальными данными.

На основе экспериментальных и теоретических исследований предложена модель лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых эмиттеров ионов, согласно которой основными стадиями процесса SALDI являются следующие:

- лазерная очистка подложки, обеспечивающая десорбцию органических загрязнений с ее поверхности;

- формирование поверхностных протонодонорных групп, например, путем диссоциативной адсорбции молекул воды с образованием на поверхности силанольных SiOH-групп;

- адсорбция молекул определяемых химических соединений на поверхностных протонодонорных группах;

- фотогенерация неравновесных носителей заряда, их разделение в условиях высокой плотности структурных дефектов и локализация дырок вблизи поверхностных протонодонорных групп;

- протонирование адсорбированных молекул. Как показали квантово-химические расчеты, локализация положительного заряда снижает энергетический барьер реакции передачи протона от поверхностных SiOH-групп на величину более  $10^2$  кДж/моль, тем самым обеспечивая эффективный перенос протона к адсорбированным на них молекулам;

- десорбция ионов, которая протекает по тепловому механизму при температурах, существенно меньших, чем температура плавления материала подложки и обусловлена быстрым локальным нагревом поверхности под действием лазерного излучения.

#### **ГЛАВА 4. Лазерная десорбция/ионизация для количественного определения летучих соединений**

Несмотря на относительно долгую историю, методы лазерной десорбции/ионизации развивались преимущественно в одном направлении – качественный или полуколичественный анализ проб, содержащих нелетучие (в том числе, высокомолекулярные) соединения. В полной мере это относится и к методу лазерной десорбции/ионизации, активированной поверхностью. Как показано в главе 1, основные варианты SALDI разрабатывались для определения нелетучих аналитов, а задача определения летучих соединений методом SALDI не только не решалась, но даже и не ставилась. Среди ряда причин этому можно выделить следующие:

- конкуренция со стороны других методов ионизации. Масс-спектрометрия летучих органических соединений получила широкое распространение во многом благодаря развитию метода электронной ионизации в сочетании с газовой хроматографией. Достигнутые успехи этого и других методов обуславливали низкую мотивацию проведения исследований по применению SALDI для анализа газовой фазы;

- SALDI в том виде, в котором он представлен в большинстве опубликованных работ, является методом качественного анализа. В то же время наиболее актуальные и важные проблемы газового анализа требуют проведения количественного определения содержания веществ. Трудность количественного анализа связана, в первую очередь, с тем, что эффективность ионизации в SALDI критическим образом зависит от физико-химического состава поверхности эмиттера ионов. Неоднородность ионизационных свойств эмиттеров ионов, полученных традиционными способами, «от точки к точке» и «от подложки к подложке», изменение химического состава поверхности эмиттера ионов при хранении, отсутствие контроля состава поверхности при нанесении пробы и проведении ее анализа делают проблему воспроизводимости результатов анализа одной из наиболее сложных в методе SALDI;

- проблема приборной реализации метода. Уже с начальных этапов развитие SALDI базировалось, в основном, на применении серийных лазерных масс-



спектрометров, оборудованных ионным источником MALDI. Обычно анализ проб методом SALDI включает нанесение раствора, содержащего определяемые соединения, на активную поверхность эмиттера ионов, установку эмиттера ионов в ионный источник масс-спектрометра (после испарения растворителя), воздействие на поверхность лазерным излучением и регистрацию масс-спектров. Очевидно, такой способ ввода пробы мало пригоден для определения содержания летучих соединений. Широкое распространение MALDI масс-спектрометров, с одной стороны, способствовало развитию метода SALDI, но, с другой стороны, во многом предопределило основное направление этого развития – определение нелетучих органических и биоорганических соединений.

Результаты, представленные в главе 2, показывают, что лазерная десорбция/ионизация с кремниевых поверхностей обладает высоким потенциалом для использования в области количественного определения летучих соединений. Однако для реализации этого потенциала необходимо решить проблему низкой воспроизводимости результатов анализа, а также разработать принципиально новые варианты инструментальной реализации метода.

#### **4.1. Разработка способов формирования активной поверхности кремниевых эмиттеров ионов**

В самом общем виде, основные требования к эмиттеру ионов в SALDI с переносом протона определяются особенностями механизма ионизации: эмиттер должен обеспечивать эффективный перенос протона к молекуле, адсорбированной на ее поверхности, а также должен обладать способностью быстро преобразовать энергию лазерного излучения в тепловую энергию адсорбированных частиц. В главе 1 показано, что второе требование может быть обеспечено, например, путем использования наночастиц различной природы, в частности, наночастиц кремния. Такие наночастицы обладают высокой поглощающей способностью в области лазерного излучения и могут использоваться как в качестве адсорбентов в твердофазной экстракции, так и в качестве эффективных «передатчиков» поглощенной энергии находящимся на их поверхности молекулам аналита. Однако такой вариант эмиттеров ионов не позволяет решить проблему низкой воспроизводимости, и как следствие, не может быть использован для проведения количественного анализа. Кроме того, технология получения наночастиц

достаточно сложна, а методика их применения для лазерной масс-спектрометрии обычно предполагает использование суспензий, что не подходит для анализа газовой фазы.

Другой вариант – применение в качестве эмиттеров ионов твердотельных подложек со специально созданным активным поверхностным слоем, представляется предпочтительным по ряду причин:

- технологии обработки поверхности гораздо проще, надежней, а также более экспрессны, чем технологии получения наночастиц;

- в качестве твердотельных материалов могут быть использованы подложки высокой чистоты, что решает проблему фоновых ионных сигналов от возможных примесных компонентов;

- возможность формирования активного слоя на большой площади. В отличие от ионных источников, например, с электронной или химической ионизацией, при анализе летучих соединений методом SALDI молекулы определяемых соединений адсорбируются и накапливаются на поверхности эмиттера ионов, поэтому ионный сигнал пропорционален облучаемой площади;

- в отличие от наночастиц, подложка может быть использована многократно при условии, что плотность энергии лазерного излучения, используемого для ионизации и последующей десорбции иона, ниже порога разрушения поверхностного активного слоя. Как уже было отмечено, это свойство эмиттера ионов является необходимым условием для проведения количественного анализа химических соединений.

Как показано в главе 1, известные способы создания активного слоя кремниевых подложек имеют ряд принципиальных недостатков, поэтому в ходе исследований были разработаны новые способы формирования эмиттера ионов для SALDI. При их разработке предполагалось, что способ должен обеспечить такие характеристики, как:

- высокую эффективность ионизации с переносом протона;
- однородность ионизационных свойств эмиттера ионов на площади, не меньшей, чем площадь сканирования поверхности лазерным лучом;
- высокую воспроизводимость физико-химических свойств поверхности эмиттера ионов «от подложки к подложке»;

- быть сравнительно простой и доступной,
- иметь возможность многократного использования.

Разработано три способа создания активного слоя, которые базируются на трех различных методах воздействия на кремниевые подложки: химическом травлении, распылении и лазерной обработке.

#### ***4.1.1. Способ получения пористого кремния***

Недостатком стандартного способа формирования кремниевых подложек с пористой структурой путем электрохимического травления монокристаллического кремния в растворе, содержащем HF, является низкая стабильность физико-химических свойств поверхности получаемого пористого слоя. В частности, при контакте с воздухом происходит быстрое образование оксидного слоя, приводящее к уменьшению величины выходы ионов при использовании такой поверхности в качестве эмиттера ионов. Другим недостатком является неоднородность структуры, которая применительно к лазерной десорбции/ионизации проявляется в неравномерном распределении локальной чувствительности (эффективности ионизации) по поверхности. Кроме того, в процессе электрохимического травления происходит загрязнение кремниевой подложки химическими веществами, в частности щелочными металлами, поэтому масс-спектры, получаемые при применении таких подложек в качестве эмиттеров ионов, характеризуются значительной величиной фонового сигнала.

В главе 2 приведена методика получения пористого кремния, отличающаяся от стандартной тем, что электрохимическое травление ведут в электролите, дополнительно содержащем  $I_2$ . Как показали исследования, йод пассивирует поверхность пористого слоя и препятствует его окислению. Эта функция йода, а также его окислительная способность легли в основу разработки другого способа формирования пористого кремния. Способ основан на газофазном травлении подложки монокристаллического кремния в парах йода и фтористоводородной кислоты. Один из примеров реализации способа заключается в следующем. На дно тефлонового стакана объемом 100 мл помещают две емкости объемом 15 мл каждая. Первую емкость заполняют водным раствором фтористоводородной кислоты (49%), вторую – кристаллическим йодом. Тефлоновый стакан накрывают пластиной монокристаллического кремния на расстоянии 2 см над поверхностями

фтористоводородной кислоты и йода. В объеме тефлонового стакана, свободном от двух помещенных емкостей, образуются насыщенные пары йода и равновесные пары фтористоводородной кислоты, которые взаимодействуют с кремниевой подложкой. В результате такого взаимодействия за несколько часов формируется слой пористого кремния, толщина которого определяется продолжительностью процесса травления.

Разработанный способ отличается простотой реализации, не требует создания электрического контакта с кремниевой подложкой и использования электрохимического оборудования. Способ позволяет получать пористый кремний с высокой степенью однородности физико-химических свойств поверхности, сохраняющий стабильность этих свойств при длительном хранении в естественных условиях. На рис. 4.1. приведены результаты ИК-спектрометрического сравнения химического состава поверхности пористого кремния, полученного стандартным способом и травлением в парах йода и фтористоводородной кислоты. ИК-спектры поглощения регистрировали после 10 дней хранения подложек на воздухе. Приведенные спектры показывают, что поверхность подложки, полученной электрохимическим травлением, окислена, о чем свидетельствуют линии Si-OH и Si-O-Si (пики 1 и 2, соответственно, на рис. 4.1a). В то же время в ИК-спектре поверхности пористого кремния, полученного газофазным травлением, эти линии отсутствуют (рис. 4.1б). Другое отличие химического состава подложек связано с образованием групп Si-H<sub>n</sub> (n=1-3). Видно, что пики 3-5, соответствующие триплету Si-H, Si-H<sub>2</sub>, Si-H<sub>3</sub>, наблюдаются на рис. 4.1a и отсутствуют на рис. 4.1б.

Недостатком газофазного травления является относительно высокая длительность процесса. Так, для формирования эффективного эмиттера ионов требуется не менее 10 часов. Уменьшить длительность процесса травления можно путем добавления в систему азотной кислоты, однако при этом снижается степень однородности поверхности.

При использовании пористого кремния, полученного разработанным способом, в качестве эмиттера ионов необходимо предварительно провести лазерно-индуцированную активацию его поверхности, как это показано в главе 2. Активация приводит к удалению йода, пассивирующего поверхность, и последующему образованию протонодонорных групп. Следует отметить, что после

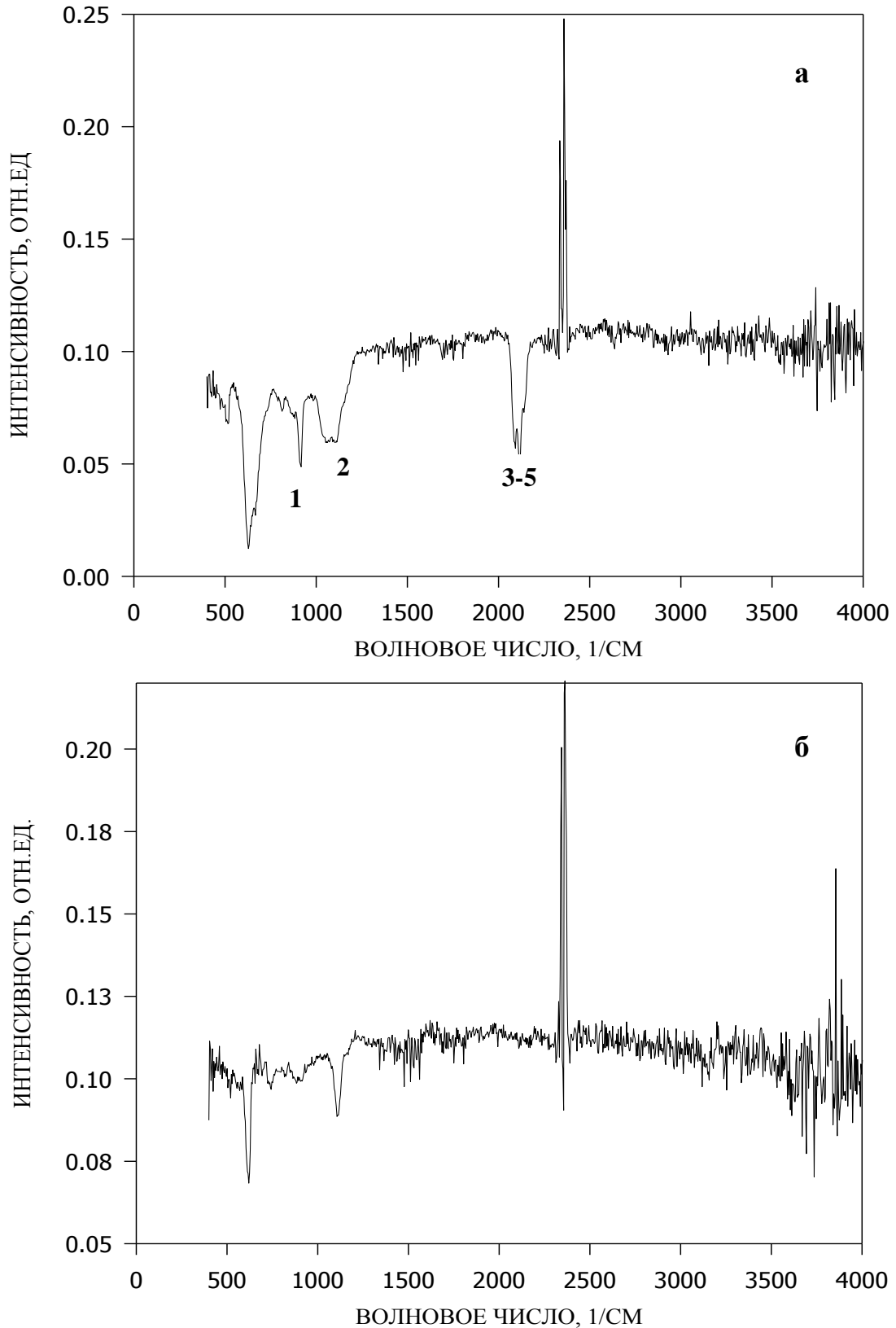


Рис. 4.1. ИК-спектры поверхности пористого кремния, полученные через 10 дней после его изготовления: (а) – стандартным способом электрохимического травления; (б) – травлением в парах йода и фтористоводородной кислоты. Пики 1, 2, 3-5 соответствуют группам Si-OH, Si-O-Si и Si-H<sub>n</sub> (n=1-3), соответственно.

активации пористый кремний уже не обладает способностью сохранять свои ионизационные свойства при длительном хранении в естественных условиях.

К достоинствам пористого кремния относится высокая сорбционная емкость. Применительно к анализу газовой фазы это свойство может быть использовано для накопления аналита на поверхности в условиях постоянного потока аналита на эмиттер ионов. Разработанный способ позволяет получать пористые слои с высокой степенью однородности ионизационных свойств «от точки к точке» на поверхности, однако характеризуется относительно низкой воспроизводимостью ионизационных свойств «от подложки к подложке». Кроме того, при длительном использовании одного и того же эмиттера ионов наблюдается постепенное уменьшение эффективности ионизации, обусловленное, по-видимому, постепенным окислением или накоплением на его поверхности нелетучих соединений, которые трудно десорбировать лазерным излучением без разрушения пористого слоя.

#### ***4.1.2. Аморфный кремний как эмиттер ионов***

Важным следствием представленных в главе 2 результатов исследования факторов, определяющих эффективность процесса SALDI, является принципиально новый эмиттер ионов – аморфный кремний  $\alpha$ -Si. Аморфный кремний может быть получен аморфизацией кристаллической структуры (например, путем воздействия на подложку частицами, ионами или излучением) или напылением тонких пленок на материал. В данной работе использовали метод радиочастотного распыления кремния. К преимуществам такого метода следует отнести:

- высокую воспроизводимость ионизационных свойств эмиттера ионов «от подложки к подложке»;
- однородность ионизационных свойств эмиттера ионов на большой площади;
- возможность нанесения пленок аморфного кремния на различные конструкционные материалы;
- химическая чистота формируемого эмиттера ионов, и, следовательно, низкий уровень фонового сигнала;
- метод радиочастотного распыления хорошо разработан, автоматизирован и контролируем.

К недостаткам метода радиочастотного распыления следует отнести необходимость использования сложного и специализированного оборудования для получения эмиттеров ионов.

По сравнению с пористым кремнием,  $\alpha$ -Si характеризуется существенно меньшей сорбционной емкостью. При этом для десорбции аналита, нанесенного на аморфный и пористый кремний, требуется различное число лазерных импульсов на одну и ту же площадь поверхности. Это различие особенно существенно при жидкофазном вводе проб. В качестве примера на рис. 4.2 приведены типичные зависимости относительного ионного сигнала от количества циклов сканирования, полученные с аморфного и пористого кремния. На поверхность эмиттеров ионов было нанесено одно и то же количество раствора аналита. Видно, что полная десорбция молекул аналита с  $\alpha$ -Si происходит примерно за два цикла сканирования, в то время как для пористого кремния требуется не менее семи циклов.

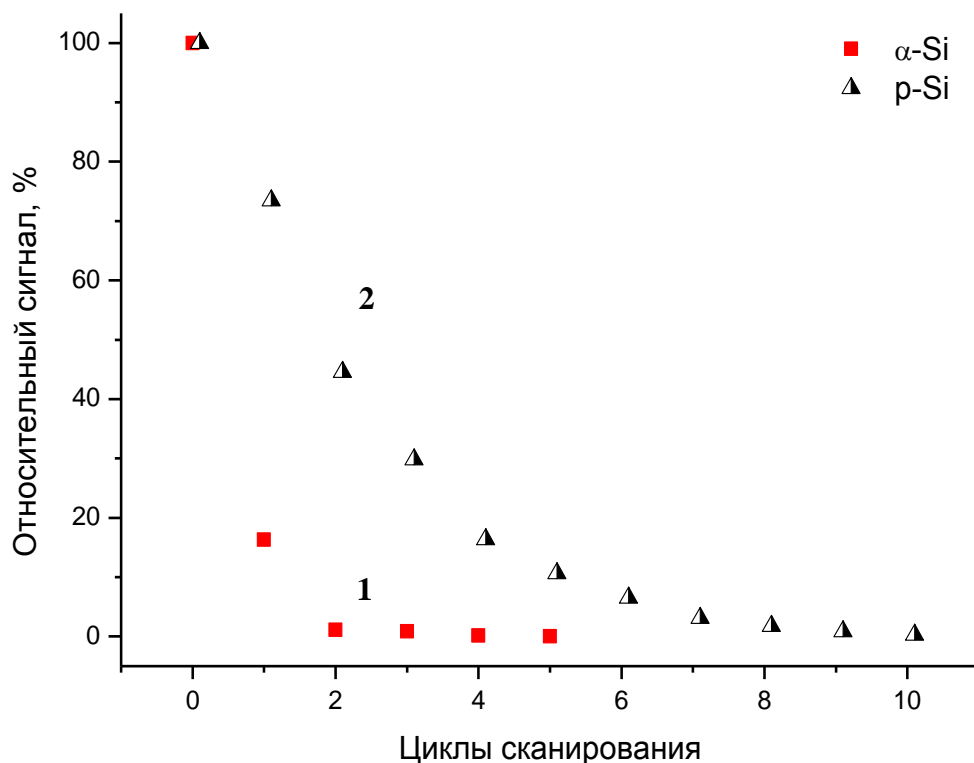


Рис. 4.2. Изменение относительного ионного сигнала во времени при лазерной десорбции/ионизации одного и того же количества аналита, нанесенного на поверхность аморфного (1) и пористого (2) кремния.

$\alpha$ -Si предпочтительнее пористого кремния в условиях импульсного ввода пробы, например при сочетании масс-спектрометрии SALDI с хроматографией, когда важно обеспечить полную десорбцию одного компонента до выхода из хроматографической колонки следующего компонента пробы. Кроме того, образцы свежеприготовленного  $\alpha$ -Si не требуют предварительной лазерно-индуцированной активации.

Основной недостаток аморфного кремния как эмиттера ионов для SALDI – это относительно быстрая деградация его ионизационных свойств при хранении и эксплуатации. Как показали эксперименты с импульсным вводом пробы через прогреваемый капилляр, уменьшение ионного сигнала аналита отмечалось уже после нескольких десятков инъекций пробы, а примерно после 200 инъекций эффективность ионизации уменьшалась в 2 раза.

#### ***4.1.3. Способ лазерно-индуцированного формирования активного слоя***

Активный поверхностный слой с высокой плотностью дефектов может быть создан и путем лазерной обработки кремниевых подложек. В главе 2 было показано, что лазерная модификация шлифованных кремниевых поверхностей при интенсивностях излучения, превышающих порог появления кремния в масс-спектрах, приводит увеличению эффективности ионизации до трех порядков величины. Методы лазерной обработки в ряду других методов получения эмиттеров ионов представляются наиболее перспективными в силу сочетания ряда важных свойств, в частности:

- для создания активной поверхности эмиттера ионов не требуется дополнительное оборудование и может быть использована лазерная система, входящая в состав лазерного масс-спектрометра;

- активная поверхность может быть получена непосредственно перед проведением масс-спектрометрического анализа, что позволяет исключить погрешности анализа, связанные с деградацией ионизационных свойств при хранении подложки;

- использование технологии сканирования поверхности эмиттера ионов лазерным лучом создает предпосылки для создания однородного по физико-химическим свойствам активного слоя на большой площади;



- лазерная обработка легко сочетается с другими технологиями обработки поверхности;

- варьируя интенсивность лазерного излучения, можно проводить как очистку подложки путем термодесорбции органических загрязнений с ее поверхности, так и модификацию самого материала подложки.

С учетом этих преимуществ технологии лазерной обработки легли в основу нового способа формирования активных поверхностей кремниевых эмиттеров ионов для SALDI. Способ включает две последовательные стадии и базируется на сочетании лазерной модификации с лазерно-индуцированной активацией. Для формирования активной поверхности эмиттера ионов используют подложку монокристаллического кремния. Предварительно подложку обрабатывают фтористоводородной кислотой для удаления оксидного слоя (например, помещая в раствор 49% HF), после чего промывают изопропиловым спиртом. Затем подложку помещают в ионный источник масс-спектрометра для лазерной обработки. Воздействие излучением проводят в два этапа.

На первом этапе подложку обрабатывают излучением с интенсивностью, большей порога плавления кремния. Индикатором выбора величины плотности энергии излучения может служить появление в масс-спектре кремнийсодержащих пиков: энергию излучения выбирают таким образом, чтобы интенсивность пиков ионов  $\text{Si}^+$  в масс-спектре превышала фоновый сигнал не менее чем на два порядка величины. При выбранной плотности лазерной энергии подложку обрабатывают в течение  $50 \div 70$  циклов сканирования ( $50 \div 70$  лазерных импульсов на каждый обрабатываемый участок поверхности). В результате такого воздействия достигается плавление материала, что было показано в главе 2. Поскольку жидкая фаза образуется только в тонком приповерхностном слое, а длительность лазерного импульса мала, то при остывании расплава атомы не успевают выстроиться в правильную структуру с дальним порядком, и формируется слой с высокой степенью разупорядочения.

На втором этапе формирования эмиттера ионов в ионный источник масс-спектрометра подают пары воды (при давлении  $10^{-6}$  мм.рт.ст.), после чего кремниевую подложку подвергают повторному воздействию излучением с интенсивностью, меньшей порога плавления кремния. Плотность энергии

излучения выбирают вблизи порога появления в масс-спектре ионов  $\text{Si}^+$ , и обрабатывают подложку в течение 500÷700 циклов сканирования. На втором этапе происходит формирование на поверхности протонодорных групп и, по-видимому, накопление неравновесных носителей заряда вблизи или на поверхности вследствие захвата неравновесных дырок ловушками.

Следует отметить, что выбором соответствующей плотности энергии лазерного излучения можно достигнуть не только плавления полупроводникового материала, но и полной десорбции нелетучих соединений, находящихся на его поверхности. Это приводит к тому, что каждый раз после воздействия на полупроводниковый материал импульсным лазерным излучением с интенсивностью, большей порога плавления используемого материала, поверхность полностью очищается от адсорбированных на ней химических соединений, в том числе и от нанесенных с предыдущей пробой.

Разработанный способ отличается высокой воспроизводимостью. Этот факт иллюстрирует рис. 4.3, на котором показано, как изменяется ионный ток протонированных молекул  $\beta$ -аланина в трех последовательных процедурах формирования активного слоя. Поток молекул  $\beta$ -аланина на поверхность кремниевой подложки создавали с помощью ячейки Кнудсена, и величина потока оставалась постоянной во всем интервале времени. Начальный участок приведенной зависимости (первые 50 с) соответствует воздействию лазерным излучением на монокристаллическую подложку. Отсутствие сигнала подтверждает тот факт, что монокристаллический кремний характеризуется низкой степенью ионизации. Следующие 50 с соответствуют первому этапу формирования эмиттера ионов – обработке подложки излучением с интенсивностью, большей порога плавления кремния. Второй этап (с 100 по 700 с) характеризуется ростом и последующим выходом ионного сигнала на насыщение. Как показали эксперименты, достигнутая величина эффективности ионизации сохраняется длительное время. Однако при долговременном использовании полученного эмиттера ионов наблюдается постепенная деградация его ионизационных свойств (аналогично пористому кремнию). Повторное применение разработанного способа позволяет полностью восстановить ионизационные свойства подложки, как это следует из данных, приведенных на рис. 4.3.

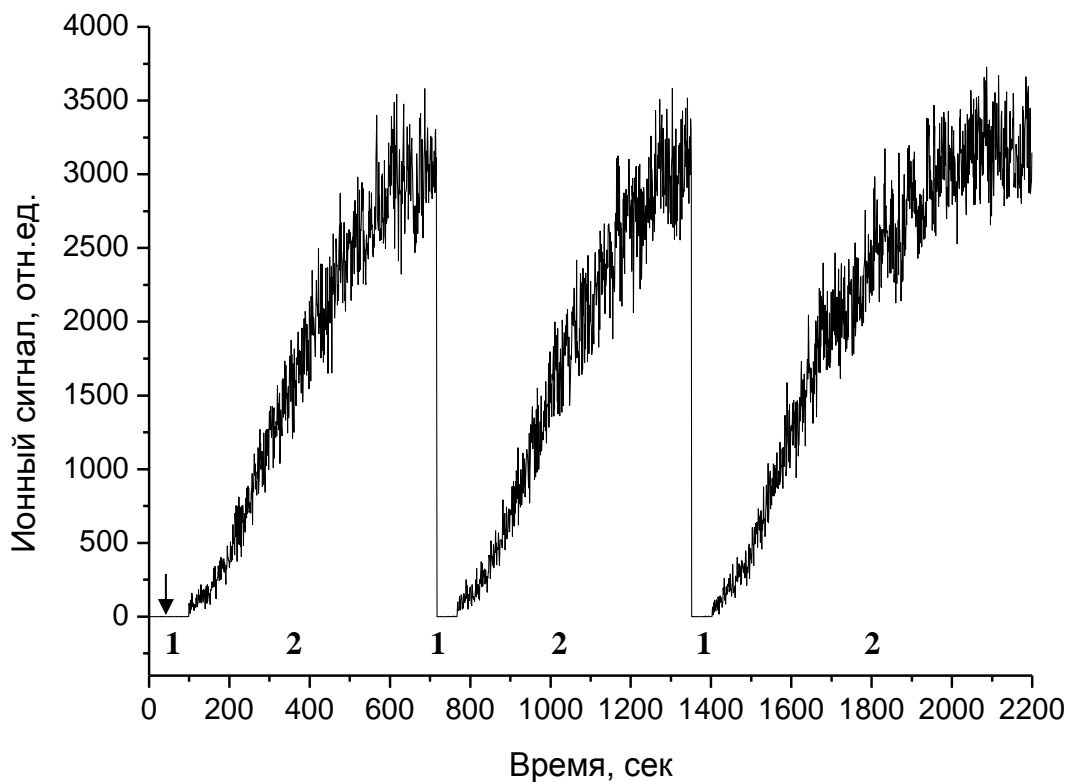


Рис. 4.3. Зависимости ионного сигнала б-аланина в трех последовательных процедурах формирования активного слоя на кремниевой подложке. Начальный участок зависимостей (1) соответствует первой стадии, следующий участок (2) – второй стадии лазерной обработки. Величина потока молекул б-аланина постоянна во всем интервале времени.

Сравнение величин эффективности ионизации различных соединений на поверхностях подложек, приготовленных тремя разработанными способами, показало, что все подложки дают близкие по величине ионные сигналы. Но наиболее удобными в работе при определении летучих соединений являются эмиттеры ионов, полученные лазерной обработкой.

#### ***4.2. Сочетание лазерной десорбции/ионизации с термодесорбционным методом***

Как уже было отмечено, серийные масс-спектрометры, оборудованные ионным источником на основе лазерной десорбции/ионизации, мало пригодны для определения содержания аналита, находящегося в газовой фазе. Для решения

проблемы количественного анализа летучих соединений были разработаны новые варианты инструментальной реализации метода SALDI.

Первый вариант основан на сочетании SALDI с термодесорбционным методом. В условиях термодесорбционной масс-спектрометрии анализируемый образец помещают в прогреваемую микрокювету, откуда происходит разделительное испарение компонентов пробы под действием программируемых градиентов температуры. Традиционный подход основан на ионизации в газовой фазе десорбированных компонентов пробы методом электронной ионизации. В условиях SALDI термодесорбционный ввод пробы используется для нанесения молекул аналита на поверхность эмиттера ионов. С этой целью в качестве микрокюветы удобно использовать эффузионную ячейку Кнудсена, которую успешно применяли при исследовании основных факторов, определяющих эффективность SALDI.

#### ***4.2.1. Узел термодесорбционного ввода пробы***

На рис. 4.4 приведена схема узла термодесорбционного ввода пробы в масс-спектрометр с ионным источником SALDI. Используемая в работе ячейка Кнудсена представляет собой цилиндрический резервуар с круглым выходным отверстием диаметром 2.0 мм и с внутренним объемом примерно 7 мкл. Ячейка оборудована датчиком температуры и резистивным нагревателем, позволяющим нагревать ее в соответствии с заданной программой до температуры 200 °С. Перед ячейкой располагается заслонка, позволяющая перекрывать при необходимости прямой поток молекул на подложку. Расстояние между выходным отверстием ячейки и поверхностью эмиттера ионов можно варьировать в диапазоне 2÷4 см, угол между нормалью к поверхности и осью ячейки составляет 45°. Очевидно, что для обеспечения максимального значения геометрического фактора при нанесении анализируемой пробы необходимо подвести выходное отверстие ячейки вплотную к рабочей поверхности эмиттера ионов. Однако, как показали эксперименты, это приводит к значительному искажению или даже исчезновению масс-спектров вследствие изменения однородности ускоряющего электростатического поля в ионном источнике. Поэтому минимальное расстояние между эффузионной ячейкой и подложкой составляло 2 см.

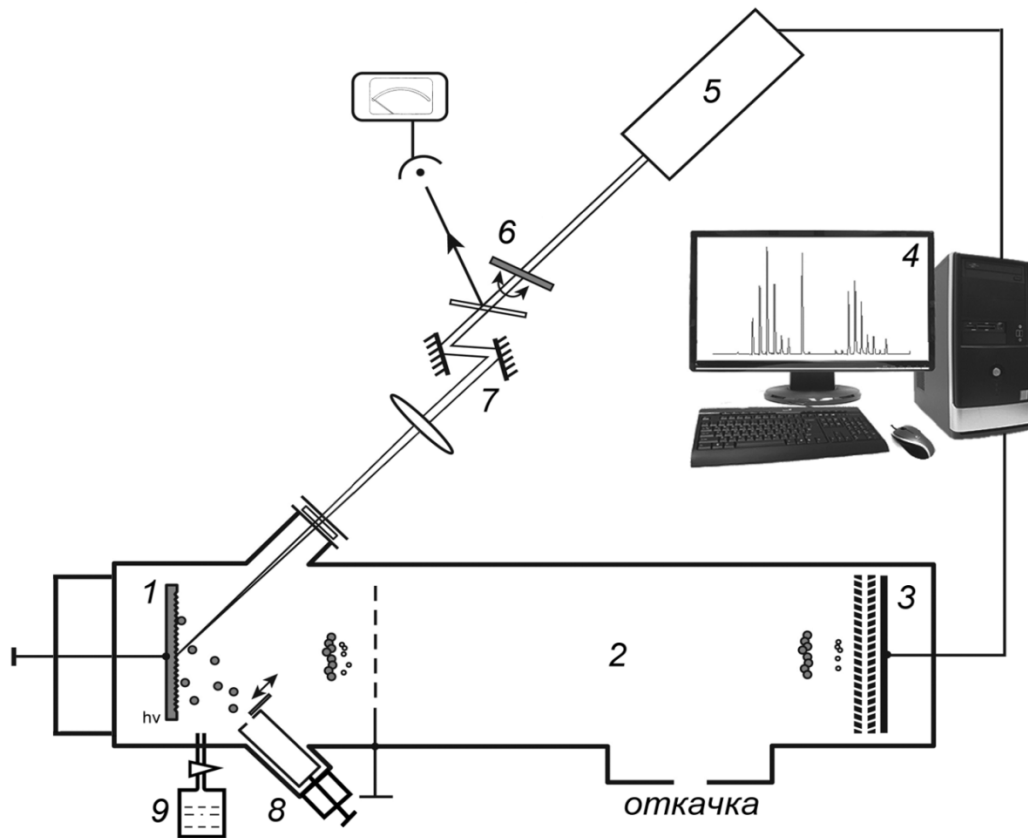


Рис. 4.4. Схема узла термодесорбционного ввода пробы. *1* – подложка – эмиттер ионов; *2* – вакуумная камера времяпролетного масс-спектрометра; *3* – детектор ионов; *4* – система регистрации и обработки сигнала; *5* – лазер Nd:YAG с генератором гармоник; *6* – аттенуатор с блоком контроля мощности излучения; *7* – двузеркальное устройство сканирования; *8* – микроювета на основе ячейки Кнудсена, оборудованная системой программируемого нагрева; *9* – устройство подачи паров воды в вакуумную камеру.

#### 4.2.2. Определение эффективности ионизации химических соединений

Эффективность ионизации является одним из важнейших параметров, определяющих аналитические возможности любого масс-спектрометрического метода анализа. Эффузионная ячейка Кнудсена дает возможность оценить этот параметр при определении летучих соединений методом SALDI.

Количество молекул химического соединения, попадающих за единицу времени на облучаемую лазером поверхность эмиттера ионов, можно оценить следующим образом. Пусть внутри эффузионной ячейки Кнудсена при

температуре  $T$  находится химическое соединение, молярная масса которого равна  $\mu$ , давление насыщенных паров соединения при этой температуре равно  $P$ . Если ячейка имеет круглое выходное отверстие, диаметр которого равен  $d$ , то количество молекул, покидающих ячейку в единицу времени  $\dot{N}_0$ , выражается формулой Герца-Кнудсена:

$$\dot{N}_0 = \frac{\pi d^2}{4} P \frac{N_A}{\sqrt{2\pi\mu RT}} \quad (4.1)$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $N_A$  – число Авогадро.

Хорошо известно, что угловое распределение молекул, покидающих ячейку Кнудсена, описывается "законом косинуса", т.е. выражением:

$$I = I_0 \cdot \cos\theta \quad (4.2),$$

где  $I_0$  – и плотность потока молекул по нормали к площадке выходного отверстия;  $I$  – плотность потока молекул под углом  $\theta$  к нормали. Подложка находится на большом расстоянии  $r$  от выходного отверстия ячейки Кнудсена относительно ее диаметра  $d$ , т.е.  $r \gg d$ . Нормаль к подложке ориентирована под углом  $\alpha=45^\circ$  к направлению на отверстие ячейки Кнудсена. Учитывая геометрию расположения облучаемой лазером площадки  $S$ , долю молекул, попадающих на ее поверхность, в общем количестве молекул, покидающих ячейку, можно оценить как  $(S/2\pi r^2)\cos\alpha$ . Тогда число молекул тестового соединения, попадающего на эмиттер ионов в единицу времени,  $\dot{N}$  равно:

$$\dot{N} = \frac{1}{2\pi} \frac{S}{r^2} \cos\alpha \dot{N}_0 = \frac{1}{8} P \frac{N_A}{\sqrt{2\pi\mu RT}} \frac{Sd^2}{r^2} \cos\alpha \quad (4.3)$$

Система регистрации ионов в использованной экспериментальной установке обеспечивает надёжное обнаружение сигнала единичного иона: одному зарегистрированному иону соответствуют пять отсчётов АЦП. Соответственно, ионный сигнал химического соединения, представляющий собой сумму площадей под пиками протонированных молекул и всех фрагментных ионов, однозначно связан с количеством зарегистрированных ионов. Для исключения влияния рассеянного потока аналита ионный сигнал определялся как разность ионных токов, зарегистрированных при открытой и закрытой заслонке, расположенной перед отверстием ячейки Кнудсена.

Таким образом, для определения эффективности ионизации соединения как отношения количества образующихся в процессе SALDI ионов к количеству молекул аналита, нанесенных на облучаемую лазером поверхность эмиттера ионов, необходимо знать только давление насыщенного пара соединения при заданной температуре. Примером может служить определение эффективности ионизации а-аланина. Ионный сигнал этой аминокислоты регистрируется при нагреве ячейки Кнудсена до температуры примерно 355 К. Найденные в литературе данные по экспериментальному определению давления насыщенного пара а-аланина получены в диапазоне температур 453÷469 К [282] и 397÷419 К [283]. Поток молекул соединения на поверхность эмиттера ионов при таких температурах ячейки Кнудсена значительно выше величины, соответствующей верхнему пределу диапазона линейности градуировочных кривых аналита. Для корректной оценки эффективности ионизации необходимо детектировать ионный ток вдали от его насыщения. Поэтому эксперименты проводили в диапазоне температур ячейки 360÷380 К, а значения давления паров аланина получали путем экстраполяции данных работ [282, 283]. Для этого известные данные аппроксимировали уравнением Антуана:

$$\lg P = A - \frac{B}{T + C} \quad (4.4)$$

где  $P$  – давление насыщенного пара химического соединения [мм.рт.ст];  $T$  – температура [К];  $A$ ,  $B$  и  $C$  – константы, специфичные для каждого соединения.

На рис. 4.5 представлен результат аппроксимации, из которого следует, что константы в уравнении 4.4 принимают следующие значения:  $A = 9.774$ ,  $B = 3708$ ,  $C = -111.2$ . Тогда при температуре 360 К давление насыщенного пара а-аланина составляет  $7.4 \times 10^{-6}$  мм.рт.ст. При расстоянии  $r = 25$  мм и облучаемой лазером площади  $S = 1$  мм<sup>2</sup> число молекул а-аланина, попадающих на площадку сканирования за секунду составляет  $1.7 \times 10^8$  молекул/с. Этому потоку соответствует ионный сигнал, соответствующий  $1.4 \times 10^4$  ионам соединения в секунду. Масс-спектр а-аланина содержит пик протонированных молекул аналита с  $m/z$  90 и пик фрагментных ионов с  $m/z$  32. Поэтому ионный сигнал а-аланина представляет собой сумму зарегистрированных ионов, соответствующих этим двум пикам. Из приведенных данных следует, что эффективность лазерной десорбции/ионизации а-аланина с кремниевых поверхностей составляет  $8 \times 10^{-5}$ .

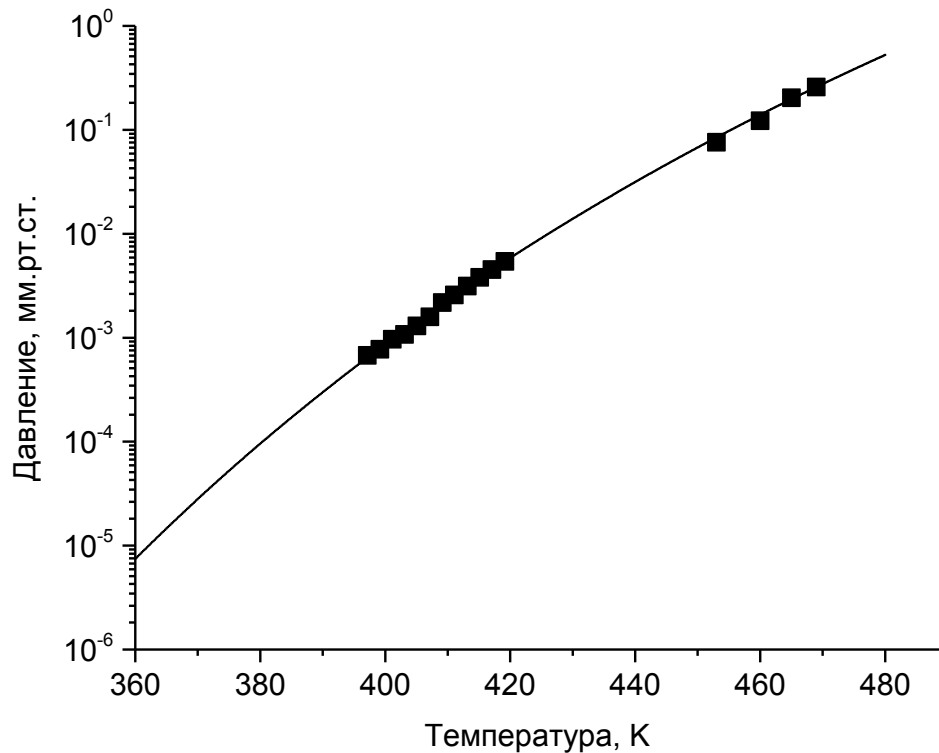


Рис. 4.5. Определение зависимости давления насыщенного пара  $\alpha$ -аланина путем аппроксимация данных работ [282, 283] уравнением Антуана.

Аналогичным образом была найдена эффективность ионизации кофеина. На основе зарегистрированного ионного сигнала и литературных данных об упругости пара соединения [284] эффективность лазерной десорбции/ионизации кофеина с кремниевых поверхностей оценена как  $8 \times 10^{-4}$ .

Полученные результаты означают, что метод SALDI позволяет обеспечить детектирование соединений с относительно высокой основностью на уровне аттомоль ( $10^{-18}$  моль) вещества, попадающего на облучаемую лазером поверхность. Это свидетельствует об уникальных возможностях метода SALDI по чувствительности анализа. Например, простые оценки показывают, что для регистрации одного иона в секунду в условиях описанных экспериментов (площади облучаемой лазером поверхности эмиттера ионов  $1 \text{ мм}^2$  и времени между десорбирующими импульсами, приходящими на одну и ту область поверхности, равном 1 с достаточно присутствия в камере масс-спектрометра паров кофеина с концентрацией  $20 \text{ молекул/см}^3$ , что соответствует его парциальному давлению порядка  $10^{-15}$  мм.рт.ст.



Следует также отметить возможность концентрирования на подложке молекул аналита, что позволяет снизить предел обнаружения за счет увеличения длительности накопления определяемых соединений на активной поверхности.

На основе найденных значений эффективности ионизации кофеина и данных табл. 2.2 можно определить эффективность ионизации других органических соединений, приведенных в табл. 2.2. Для исследованных соединений эффективность ионизации варьируется в диапазоне от  $10^{-6}$  до  $2 \times 10^{-2}$  в зависимости от величины основности в газовой фазе GB.

Как уже было отмечено, одна из основных проблем количественного анализа методом SALDI обусловлена сложностью контроля физико-химического состава поверхности эмиттера ионов и, следовательно, его ионизационных свойств. Способность ячейки Кнудсена создавать постоянный и хорошо контролируемый поток химического соединения, величину которого легко менять в широких пределах путем нагрева, позволяет решить эту проблему. Формируя малый поток соединения, свойства которого хорошо известны, и регистрируя его масс-спектр, можно непрерывно контролировать ионизационные свойства эмиттера ионов. При этом само характеристическое соединение может быть использовано в качестве внешнего стандарта при определении содержания летучих целевых компонентов в процессе масс-спектрометрического анализа проб методом SALDI.

#### ***4.2.3. Определение лекарственных соединений с использованием программируемой термодесорбции***

При анализе образцов с использованием программируемой термодесорбции в микрокювету, выполненную на основе ячейки Кнудсена, помещают пробу в виде порошка или раствора. После испарения растворителя микрокювету вводят в масс-анализатор и нагревают в соответствии с заданной программой. Летучие соединения попадают на поверхность эмиттера ионов, на которой они ионизируются и десорбируются в процессе SALDI, а образующиеся ионы детектируются в масс-анализаторе. Такой подход позволяет детектировать широкий круг химических соединений со средней и низкой летучестью, которые могут быть переведены в газовую фазу без разложения путем нагрева. В частности, подход был апробирован для определения органических лекарственных соединений.

Для решения задачи быстрого скрининга лекарственных препаратов, например, с целью выявления фальсифицированной продукции, небольшое количество пробы (менее 1 мкг твердого образца или 1 мкл раствора) помещают в микрокювету. Микрокювету вводят в масс-анализатор и быстро нагревают. По положению пиков в зарегистрированных масс-спектрах идентифицируют действующие вещества лекарства, а по интегральной интенсивности спектральных пиков путем сравнения с ионным сигналом соединения, выбранного в качестве внешнего стандарта, оценивают их содержание в пробе. Общая продолжительность процедуры скрининга не превышает 1 мин.

В качестве примера на рис. 4.6 приведен масс-спектр, полученный при анализе раствора для инъекций «Лидокаин» (производства ОАО «Биосинтез») - широко используемого лекарственного препарата с выраженным местноанестезирующим и антиаритмическим действием.

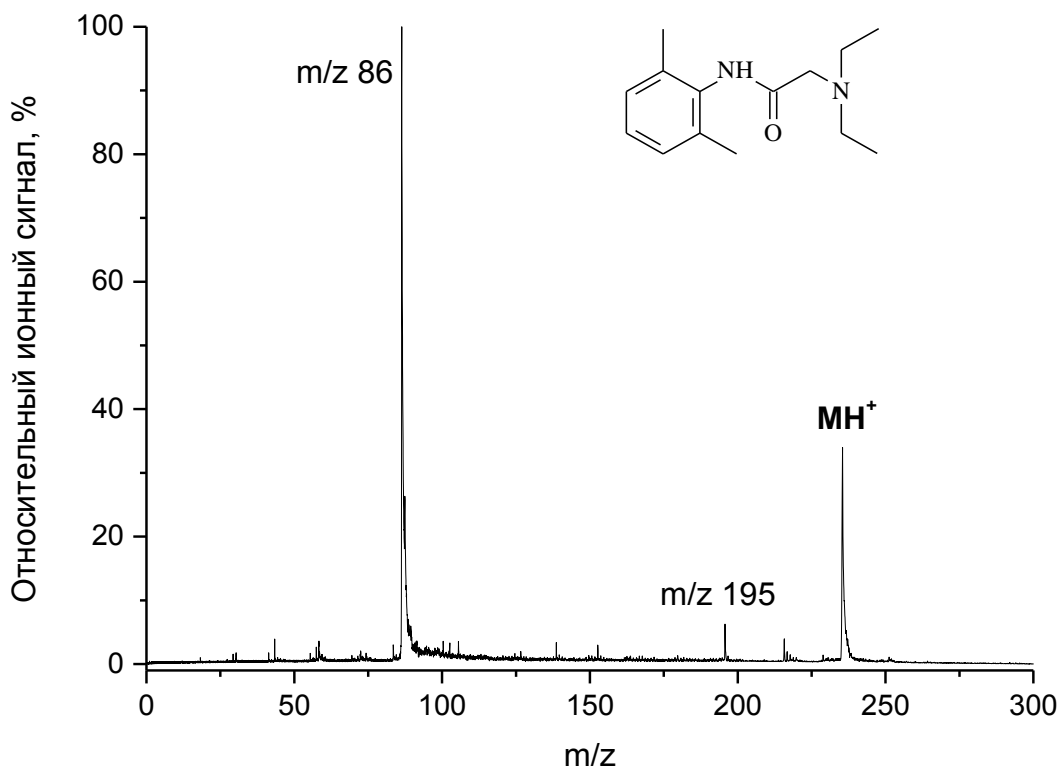


Рис. 4.6. Масс-спектр лидокаина, зарегистрированный при анализе лекарственного препарата. Пик с  $m/z$  195 соответствует протонированным молекулам кофеина, который может быть использован в качестве внешнего стандарта.

Масс-спектр лидокаина содержит два пика, соответствующих протонированным молекулам с  $m/z$  235 и фрагментным ионам с  $m/z$  86. Пик с  $m/z$  195 на рис. 4.6 относится к кофеину, использованному в качестве внешнего стандарта. Интегрируя пики лидокаина по полному ионному току и зная эффективность ионизации лидокаина по отношению к кофеину, можно оценить количество введенного в ячейку аналита, и следовательно, его содержание в пробе.

Для правильной идентификации необходимо предварительно записать характеристический масс-спектр индивидуального соединения. Используемые в исследованиях чистые лекарственные соединения в большинстве случаев получали из лекарственных препаратов путем экстракции аналитов в соответствующий органический растворитель, выбранный на основе литературных данных. Для этого твердые препараты предварительно измельчали, помещали в дистиллированную воду, подщелачивали гидроксидом натрия NaOH и подвергали экстракции. Например, верапамил, выделенный из лекарственного препарата «Финоптин» (производства «Orion Pharma», таблетки), подщелачивали до  $pH = 14$  и подвергали трехкратной экстракции диметиловым эфиром. После расслоения из раствора отбирали верхний эфирный слой с экстрагированным аналитом. Растворитель выпаривали с использованием роторного испарителя. Оставшийся после упаривания осадок чистого соединения растворяли в метаноле и использовали в экспериментах. Аналогичным образом получали аналиты и из жидких лекарственных препаратов. Например, допамин выделяли из лекарственного препарата «Дофамин» (производства «Бинергия», раствор для инъекций) предварительно подщелачивая раствор до  $pH$  8.5 и затем экстрагируя допамин в смесь хлороформ : изопропанол (6:1).

Программируемая термодесорбция позволяет не только наносить на активную поверхность подложки адсорбцией из газовой фазы определяемые соединения, но также их предварительно разделять в соответствии с летучестью. Такую возможность иллюстрирует рис. 4.7, на котором представлены результаты анализа раствора, содержащего метопролол и пиндолол – широко используемых в медицине  $\beta$ -адреноблокаторов, обладающих антиангинальным, гипотензивным и антиаритмическим эффектами, а также аминокислоту  $\nu$ -аланин.

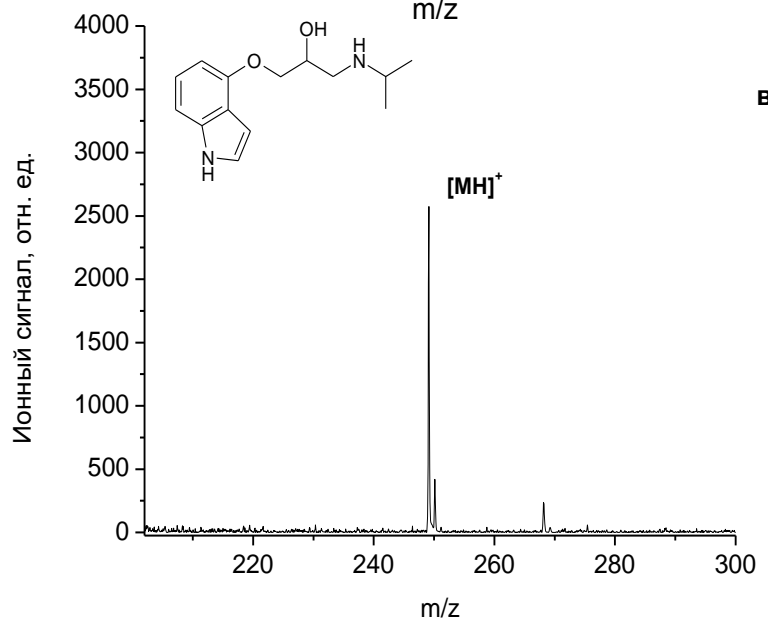
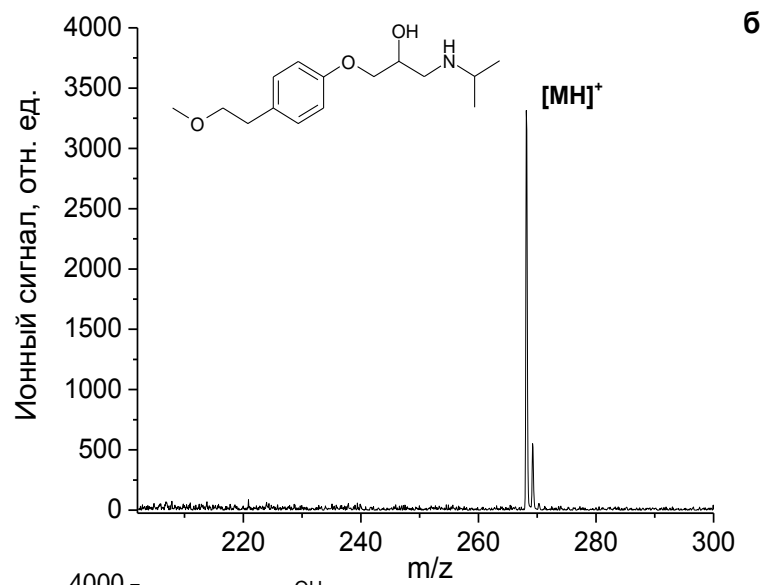
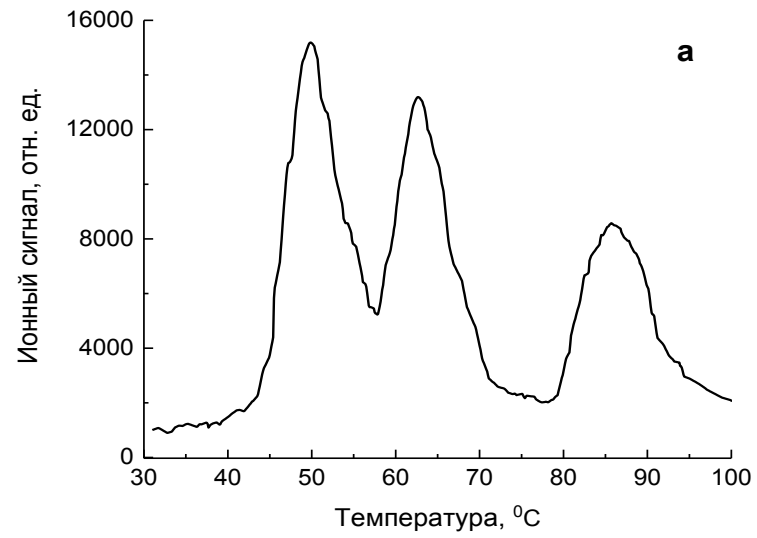


Рис. 4.7. Зависимость полного ионного тока от температуры при определении метопролола, пиндолола и  $\beta$ -аланина (а); масс-спектр при температуре 50 °C (б); масс-спектр при температуре 65 °C (в).

В микрокювету вводили 5 мкл раствора в смеси метанол-вода (1:1) трех компонентов – метопролола и пиндолола с концентрацией каждого 10 нг/мл и б-аланина с концентрацией 200 нг/мл. После испарения растворителя микрокювету помещали в масс-спектрометр и нагревали с постоянной скоростью, равной 10°C/мин. На рис. 4.7а представлена полученная зависимость полного ионного тока от температуры. Видно, что зависимость состоит из трех пиков, соответствующих последовательному выходу трех соединений. На рис. 4.7б и рис. 4.7в приведены масс-спектры, зарегистрированные, соответственно, при температурах микрокюветы 50 °С и 65 °С. Пики в масс-спектрах легко идентифицировать как пики протонированных молекул метопролола и пиндолола (структурные формулы соединений приведены на рисунках). Третий пик на рис. 4.7а, который начинает регистрироваться при температуре около 80 °С, обусловлен выходом б-аланина. Из приведенных данных видно, что сравнительно простой вариант использования термодесорбционного ввода проб позволяет разделять близкие по химическим свойствам соединения. Схожесть свойств метопролола и пиндолола предполагает также возможность использования этих соединений как дополнительных друг к другу в качестве внутренних стандартов при анализе образцов, требующих предварительной пробоподготовки. В ряде задач для этой цели может быть также использован б-аланин.

#### ***4.2.4. Аналитические характеристики***

На рис. 4.8 на примере определения лидокаина и атенолола представлены градуировочные зависимости в виде величины ионного тока (с учетом пиков протонированных молекул и фрагментного пика) как функции от количества введенного в микрокювету определяемого соединения. Полученные зависимости типичны для сочетания SALDI с термодесорбционным методом. Видно, что концентрационные характеристики остаются линейными в диапазоне до четырех порядков величины, после чего выходят на насыщение. Коэффициент чувствительности на линейном участке зависимостей определяется, очевидно, эффективностью ионизации соединения и геометрическим фактором – долей вещества, попадающего на облучаемую лазером поверхность. Для лидокаина коэффициент чувствительности составляет примерно  $1.2 \times 10^3$  ионов/фемтомоль, для атенолола – в 2 раза меньше.

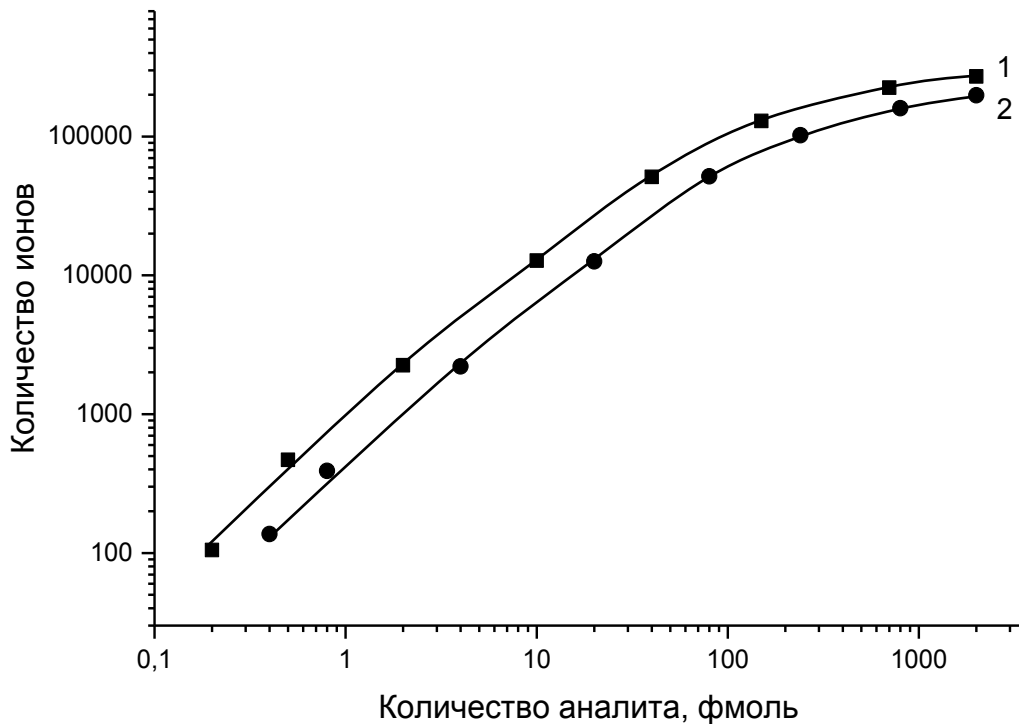


Рис. 4.8. Градуировочные зависимости при определении содержания лидокаина (1) и атенолола (2) в условиях термодесорбционного ввода пробы.

Линейность градуировочной зависимости предполагает возможность использования стандартного метода добавок для количественного определения содержания лекарственных соединений. В методе добавок сначала измеряют ионный сигнал, полученный при анализе пробы с неизвестной концентрацией определяемого соединения. Затем в эту же пробу дополнительно вводят добавку с известным содержанием аналита и снова измеряют значение величины ионного сигнала. Неизвестную концентрацию определяемого соединения находят расчетным путем.

Следует отметить, что выход на насыщение зависимостей на рис. 4.8 обусловлен особенностями системы регистрации ионов. Динамический диапазон системы регистрации в пределах одного лазерного импульса определяется динамическим диапазоном ионного детектора (не превышающим в использованной масс-спектрометрической установке на рис. 4.4 величину  $10^3$  ионов за один лазерный импульс в одном пике масс-спектра) и динамическим диапазоном АЦП, который составлял 8 бит (256 уровней). Так как ширина пика в масс-спектре значительно (до порядка величины) превышает шаг дискретизации АЦП, основным

ограничением является динамический диапазон детектора. Поскольку лазерный луч разворачивается в кадр, состоящий из 300 точек, то соответственно расширяется и динамический диапазон за счет суммирования ионного сигнала от 300 последовательных лазерных импульсов. Кроме того, аналит поступает на подложку в течение определенного времени, что, например, видно из рис. 4.7а. Продолжительность выхода соединения зависит от выбранных условий нагрева микрокюветы и обычно превышает 10 с. Дополнительное суммирование в пределах выхода соединения соответствующим образом увеличивает динамический диапазон.

Из данных рис. 4.8 также следует, что степень заполнения поверхности на участке насыщения градуировочных зависимостей не превышает сотой доли монослоя. Действительно, насыщение достигается при количестве введенного в прибор аналита порядка 1 пмоль. С учетом геометрического фактора этому количеству соответствует менее  $10^9$  молекул, попадающих на облучаемую лазером поверхность эмиттера ионов в течение выхода соединения.

Предел обнаружения химических соединений, в соответствии с  $3\sigma$ -критерием, определяется коэффициентом чувствительности и стандартным отклонением холостого опыта  $\sigma$ . Как показали исследования, величина  $\sigma$  в зависимости от условий анализа может варьироваться в достаточно широких пределах. При анализе растворов чистых соединений стандартное отклонение холостого опыта определяется, главным образом, шумами системы детектирования ионов и, как правило, не превышает величины, соответствующей нескольким (менее десяти) ионам соединения. При этом предел обнаружения высокоосновных соединений находится на субфемтомольном уровне. Например, пределы обнаружения лидокаина, атенолола и кофеина, оцененные по наиболее интенсивным пикам каждого из соединений, составляют 0.03, 0.04 и 0.25 фемтомоль, соответственно. Учитывая, что объем введенного в микрокювету раствора аналита составлял 5 мкл, этим количествам вещества соответствуют концентрации 1.4 пг/мл лидокаина, 2.1 пг/мл атенолола и 9.8 пг/мл кофеина. При анализе образцов сложного состава и в условиях больших потоков вещества в ионный источник масс-анализатора сигнал холостого опыта и его стандартное отклонение определяется, в большей степени, химическим шумом, который образуют рассеянные ионы соединений. В этих

случаях величина  $\sigma$  и, следовательно, предел обнаружения соединения обычно заметно выше по сравнению с анализом чистых растворов.

В табл. 4.1 представлены данные, иллюстрирующие воспроизводимость результатов анализа при термодесорбционном вводе проб. На примере определения атенолола, лидокаина и б-аланина приведены доверительные интервалы среднего значения аналитического сигнала (с вероятностью  $P=0.95$ ), а также величины относительного стандартного отклонения  $s_r$ , рассчитанные для серии из семи последовательных анализов одного и того же раствора аналита. Аналитический сигнал определялся как отношение ионного сигнала соединения к ионному сигналу кофеина, выбранному в качестве стандартного образца. Видно, что значения  $s_r$  этих соединений не превышают 0.04. Близкие значения получены и для других исследованных соединений: величины  $s_r$  лежат в диапазоне  $0.030 \div 0.042\%$ .

Таблица 4.1. Воспроизводимость результатов анализа.

Соединение	Концентрация, нг/мл	Доверительный интервал среднего (N=7, P=0.95)	Относительное стандартное отклонение $s_r$
Атенолол	2	$22.5 \pm 1.8$	0.031
Лидокаин	2	$37.4 \pm 3.7$	0.038
б-аланин	40	$15.1 \pm 1.4$	0.036

#### ***4.2.5. Определение лекарственных соединений в моче без пробоподготовки***

Одна из наиболее важных задач в области анализа лекарственных препаратов – это определение содержания лекарственных соединений в биологических жидкостях. Вследствие сложного состава образцов почти все инструментальные методы анализа требуют проведения процедуры пробоподготовки, обычно включающей в себе многостадийную экстракцию, а иногда и химическую модификацию аналита. Разработанный метод, основанный на сочетании SALDI с термодесорбционным методом был апробирован для прямого определения лекарственных препаратов в моче без предварительной пробоподготовки.



В исследованиях использовали предоставленные ИППИ РАН образцы мочи здоровых генетически близких мышей. В анализируемые образцы добавляли растворы лекарственных соединений известной концентрации. При анализе без предварительной пробоподготовки таких сложных многокомпонентных объектов, как биологические жидкости, особое значение приобретает разрешающая способность масс-спектрометра. Эксперименты проводили с использованием времяпролётного масс-анализатора, выполненного по схеме «рефлектрон». По сравнению с линейной схемой, рефлектрон обеспечивает более высокое разрешение и, следовательно, более высокое качество масс-спектров. Конструктивно ионный источник соответствовал приведенному на рис. 4.4. Расстояние между выходным отверстием ячейки и поверхностью эмиттера в экспериментах составляло 2.5 см.

На рис. 4.9 приведен типичный масс-спектр образца мочи, содержащей атенолол с концентрацией 1 нг/мл. Спектр зарегистрирован при температуре микрокуветы 55°C. Видно, что в масс-спектре регистрируется пик протонированного атенолола с  $m/z$  267.

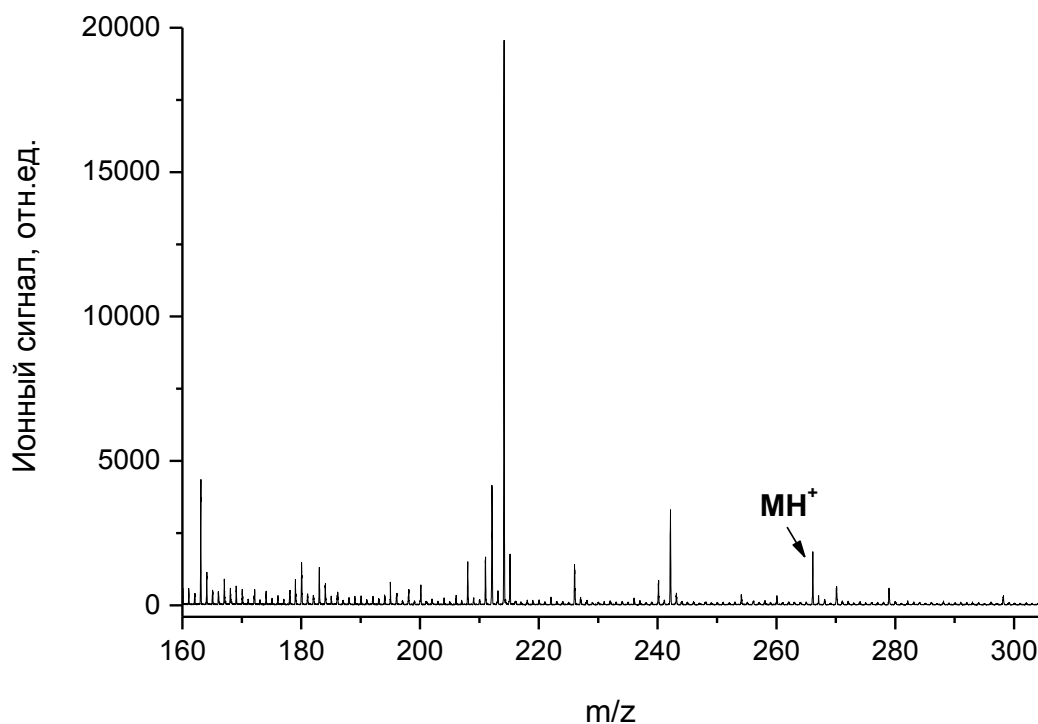


Рис. 4.9. Масс-спектр образца мочи, содержащей атенолол с концентрацией 1 нг/мл. Спектр зарегистрирован при температуре микрокуветы 55°C.

В табл. 4.2 представлены пределы обнаружения ряда лекарственных соединений в моче, определенные по наиболее интенсивным пикам в их масс-спектрах. Пределы обнаружения варьируются в зависимости от величины газофазной основности соединения от 0.12 нг/мл для кофеина до 0.015 нг/мл для лидокаина. Найденные значения на порядок величины выше пределов обнаружения, которые получены при анализе чистых растворов этих же соединений на установке, приведенной на рис. 4.4, главным образом, вследствие большой величины стандартного отклонения холостого опыта.

Градуировочные зависимости, построенные при определении лекарственных соединений в моче, аналогичны приведенным на рис. 4.8, за исключением того, что насыщение ионного сигнала соединения наблюдалось при меньших количествах введенного в прибор аналита. В целом, можно сделать вывод, что высокая селективность метода ионизации в сочетании с возможностью разделения компонентов с разной летучестью обеспечивают возможность количественного анализа образцов мочи методом SALDI без пробоподготовки.

Аналогичные исследования, проведенные с плазмой и сывороткой крови, показали, что, в отличие от образцов мочи, количественное определение содержания лекарственных соединений методом SALDI требует стадии предварительной пробоподготовки. Для этой цели могут быть использованы стандартные методики, основанные на жидкостной экстракции аналитов.

Таблица 4.2. Пределы обнаружения некоторых лекарственных соединений в образцах мочи.

Соединение	Молекулярная масса, а.е.м.	m/z наиболее интенсивного пика	Предел обнаружения, нг/мл
Атенолол	266	267	0.02
Лидокаин	234	86	0.015
Кофеин	194	195	0.12
Димедрол	255	166	0.02

### ***4.3. Сочетание лазерной десорбции/ионизации с газовой хроматографией***

Второй вариант инструментальной реализации метода SALDI, разработанный для количественного определения летучих соединений, основан на сочетании лазерной десорбции десорбции/ионизации с газо-хроматографическим способом ввода пробы. Газовая хроматография (ГХ) – универсальный метод разделения смесей разнообразных веществ, которые можно перевести в газовую фазу без разложения. Сочетание ГХ с SALDI масс-спектрометрией (ГХ/SALDI) представляется наиболее перспективным для анализа сложных многокомпонентных смесей химических соединений с высокой и средней летучестью.

#### ***4.3.1 Узел сопряжения газового хроматографа с времяпролетным масс-спектрометром***

Конструкция узла сопряжения ГХ с ионным источником масс-анализатора является одним из важнейших факторов, определяющих параметры хромото-масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией. Такой узел должен с одной стороны обеспечить эффективный подвод определяемых соединений к ионному источнику масс-спектрометра, с другой стороны – не влиять на качество получаемых масс-спектров. Схема разработанного узла сопряжения представлена на рис. 4.10. Для обеспечения транспортных функций капиллярную колонку хроматографа соединяли с кварцевым капилляром, который вводили во времяпролетный масс-спектрометр через прогреваемую промежуточную камеру. Ось капилляра расположена под углом  $45^\circ$  к нормали поверхности подложки, расположенной в ионном источнике. Внутри масс-спектрометра кварцевый капилляр помещен в прогреваемую трубку, выполненную из нержавеющей стали. Разработанная конструкция позволяет регулировать температуру капилляра в диапазоне от комнатной до  $250\text{ }^\circ\text{C}$ .

Очевидно, что для обеспечения максимальной величины геометрического фактора необходимо подвести капилляр вплотную к поверхности эмиттера ионов. Однако, как и при использовании ячейки Кнудсена, это приводит к искажению ускоряющего электростатического поля в ионном источнике. Поэтому расстояние между капилляром и поверхностью подложки составляло 2 см. Такое геометрическое расположение обеспечивало прямой поток газа на поверхность

эмиттера ионов и не приводило к искажению ускоряющего поля в ионном источнике.

В работе использовали стандартный газовый хроматограф (ThermoQuest, GC8000 Series, Италия). В большинстве экспериментов применяли капиллярную хроматографическую колонку Restek (Rtx-5MS) длиной 15 м, с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0.25 мкм, являющуюся эффективным средством для разделения азотсодержащих соединений с высокой величиной основности. Объем вводимой в хроматограф пробы варьировали в диапазоне 0.1÷1 мкл. В качестве газа-носителя применяли азот при постоянной скорости потока 1 мл/мин.

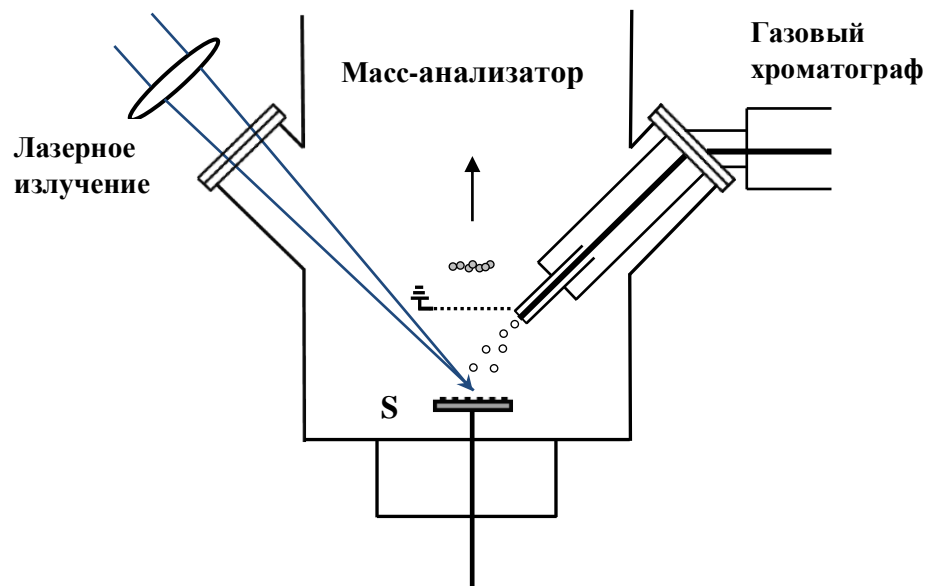


Рис. 4.10. Схема узла газо-хроматографического ввода пробы в ионный источник с лазерной десорбцией/ионизацией.

С использованием ГХ/SALDI масс-спектрометра был исследован широкий круг химических соединений. Наиболее показательны результаты, полученные при определении фенилалкиламинов и их производных. Фенилалкиламины и их производные относятся к группе биологически активных соединений. На их основе разработаны многочисленные лекарственные препараты, которые широко используются в терапевтической практике в качестве нейростимуляторов, медиаторов, антидепрессантов и сосудорасширяющих средств [285].

Производными фенилалкиламинов являются также и некоторые синтетические наркотики, распространение которых становится в последние годы серьезной социальной проблемой. Таким образом, фенилалкиламины имеют большое практическое значение, обладают близкими химическими свойствами и поэтому могут служить хорошими индикаторами применимости метода ГХ/SALDI масс-спектрометрии для высокочувствительного и селективного анализа растворов сложного состава.

#### 4.3.2. Определение соединений группы фенилалкиламинов

Исследованные в работе фенилалкиламины общей формулы  $R_1C_6H_4(CH_2)_nCHR_2NR_3R_4$  приведены в табл. 4.3 (далее в тексте определяемые соединения представлены в соответствии с их номером в таблице).

Соединения **1, 2, 5, 9, 10, 11, 13, 14** и **15** производства фирмы Sigma-Aldrich использовали без дальнейшей очистки.

Вторичные амины **3, 7, 8** и **16** получены метилированием соответствующих им первичных аминов путем нагрева первичных аминов в избытке муравьиной кислоты HCOOH и последующего восстановления алюмогидридом лития  $LiAlH_4$ .

Соединение **12** получено ацилированием соединения **2** хлорангидридом пропионовой кислоты  $CH_3CH_2COCl$  с последующим восстановлением полученного амида алюмогидридом лития  $LiAlH_4$ .

Соединение **4**, являющееся диметилпроизводным соединения **2**, синтезировано по методике [286] в реакции соединения **2** с муравьиной кислотой и формальдегидом.

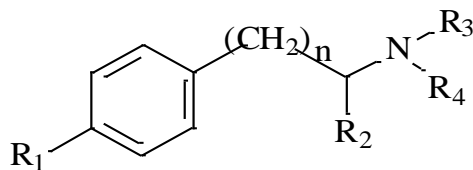
Соединение **6** (10) синтезировано по методике [287] при взаимодействии соединения **2** и ацетона.

Чистоту всех синтезированных соединений контролировали методом тонкослойной хроматографии, а их структура была подтверждена методами ЯМР- $^1H$  и масс-спектрометрии. В качестве примера ниже приведен  $^1H$ -ЯМР-спектр N-метил-(4-метилбензил)амин (**12**):

ЯМР  $^1H$  (400 МГц,  $CDCl_3$ , TMC)  $\delta$  м.д.: 3.69 с ( $CH_2-NMeH$ , 2H), 2.43 с (N- $CH_3$ , 3H), 1.34 ушир (NH, 1H), 7.13-7.18 м (аром. 4H), 2.33 с (п- $CH_3$ , 3H).

В качестве растворителя фенилалкиламинов использовали метанол производства фирмы Merck.

Таблица 4.3. Исследованные фенилалкиламины.



№	n	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Систематическое название
1	0	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	N,N-диметилбензиламин
2	0	H	CH <sub>3</sub>	H	H	1-фенилэтиламин
3	0	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	N-метил-1-фенилэтиламин
4	0	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	N,N-диметил-1-фенилэтиламин
5	0	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	1-фенилпропиламин
6	0	H	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	N-изопропил-1-фенилэтиламин
7	0	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	N-метил-4-метилбензиламин
8	0	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	N-метил-1-(4-метилфенил)этиламин
9	1	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	1-бензилпропиламин
10	0	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	1-(4-этилфенил)этиламин
11	0	CH <sub>3</sub> O	CH <sub>3</sub>	H	H	1-(4-метоксифенил)этиламин
12	0	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	N,N-дипропил-1-фенилэтиламин
13	0	H	H	CH <sub>3</sub>	H	N-метилбензиламин
14	0	H	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	N,N-диэтилбензиламин
15	0	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	H	N-бензил-1-фенилэтиламин
16	0	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	N-бензил-N-метил-1-фенилэтиламин

На предварительном этапе исследований были найдены температурные режимы хроматографа, обеспечивающие разделение компонентов пробы на выходе колонки. При найденных режимах получены масс-хроматограммы растворов аналитов. На рис. 4.11 приведена типичная масс-хроматограмма по полному

ионному току, зарегистрированная при вводе в прибор 1 мкл раствора, содержащего 12 химических соединений, приведенных в табл. 4.3. Величина полного ионного тока представляет собой сумму ионных сигналов 300 индивидуальных масс-спектров в диапазоне масс  $1 \div 250$  а.е.м, полученных с различных точек поверхности за один цикл сканирования. Температуру инжектора хроматографа поддерживали постоянной и равной  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , температуру термостата хроматографа увеличивали от  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , затем – до  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Режим ввода пробы - splitless без деления потока. Концентрации различных соединений в растворе выбраны таким образом, чтобы количество инжектированного в хроматограф вещества составляло:  $0.03\text{ }\mu\text{моль}$  ( $1.8 \times 10^{10}$  молекул) соединения **12**;  $0.1\text{ }\mu\text{моль}$  ( $6 \times 10^{10}$  молекул) соединений **1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11**; и по  $0.3\text{ }\mu\text{моль}$  ( $1.8 \times 10^{11}$  молекул) соединений **2, 5, 10**. Различие в выбранных концентрациях связано с тем, что исследованные соединения характеризуются различными значениями эффективности ионизации в SALDI.

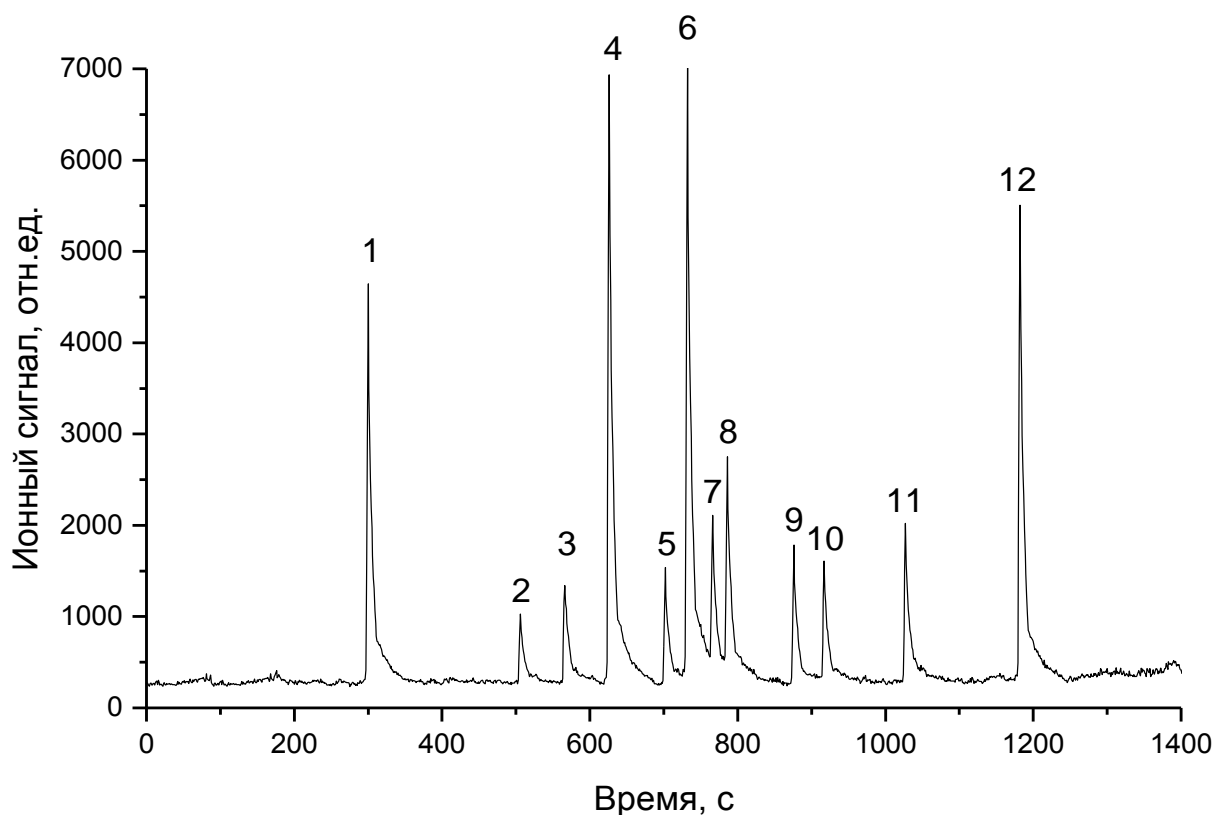


Рис. 4.11. Масс-хроматограмма смеси двенадцати фенилалкиламинов, представленных в табл. 4.3. Порядок выхода соединений соответствует их номеру в табл. 4.3.

В табл. 4.4 представлены средние значения времени удерживания аналитов при найденном температурном режиме работы хроматографа. Труднее всего разделяются фенилалкиламины с одинаковой структурой углеводородного скелета, но отличающиеся заместителями при азоте. Вместе с тем, времена удерживания соединений, различающихся только заместителем в ароматическом кольце, сильно различаются. В целом, введение заместителя в ароматическое кольцо приводит к значительному увеличению времени удерживания соединения в хроматографической колонке.

Таблица 4.4. Средние значения времени удерживания аналитов.

№	Соединение	Введено, пмоль	Время удерживания, с
1	N,N-диметилбензиламин	0.1	297
2	1-фенилэтиламин	0.3	503
3	N-метил-1-фенилэтиламин	0.1	563
4	N,N-диметил-1-фенилэтиламин	0.1	621
5	1-фенилпропиламин	0.3	696
6	N-изопропил-1-фенилэтиламин	0.1	727
7	N-метил-4-метилбензиламин	0.1	761
8	N-метил-1-(4-метилфенил)этиламин	0.1	774
9	1-бензилпропиламин	0.1	871
10	1-(4-этилфенил)этиламин	0.3	912
11	1-(4-метоксифенил)этиламин	0.1	1024
12	N,N-дипропил-1-фенилэтиламин	0.03	1179
13	N-метилбензиламин	0.3	217
14	N,N-диэтил-бензиламин	0.1	784
15	N-бензил-1-фенилэтиламин	0.1	1625
16	N-бензил-N-метил-1-фенилэтиламин	0.03	1702



Представленные на рис. 4.11 и в табл. 4.4 данные доказывают, что использованный интерфейс сопряжения масс-спектрометра и газового хроматографа при найденных температурных режимах хроматографа обеспечивает эффективное разделение близких по химическим свойствам компонентов анализируемой смеси.

В ряде случаев, в частности, в условиях высоких значений фоновых сигналов, лучше проводить ГХ/SALDI анализ сложных смесей, используя масс-хроматограммы по характеристическим пикам соединений. Например, при определении фенилэтиламинов, которые не содержат заместителей в ароматическом кольце, целесообразно использовать масс-хроматограмму по фрагментным пикам с  $m/z$  105, которые являются наиболее интенсивными пиками таких соединений. Полученная в условиях рис. 4.11 масс-хроматограмма по пику с  $m/z$  105 представлена на рис. 4.12. Хроматографические пики соответствуют выходу соединений **2**, **3**, **4** и **12**.

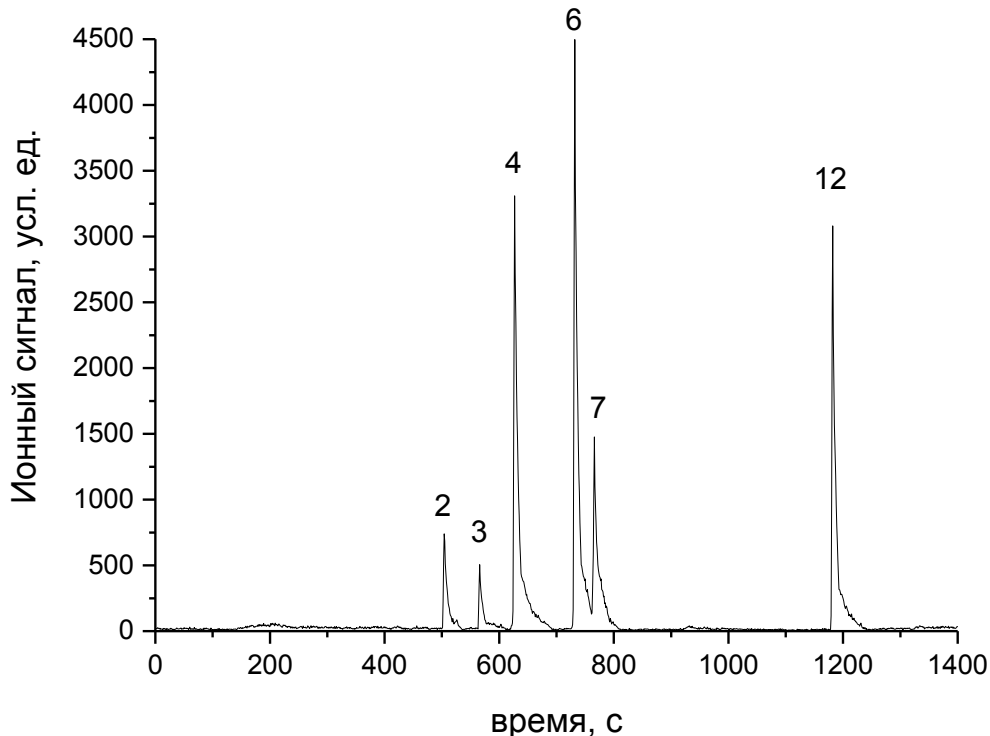


Рис. 4.12. Масс-хроматограмма по пику с  $m/z$  105, зарегистрированная при анализе раствора в условиях эксперимента на рис. 4.11. Соединения соответствуют их номеру в таблицах 4.3 и 4.4.

Следует отметить, что в условиях хроматографического ввода многокомпонентных проб важным фактором является частота следования лазерных импульсов: высокочастотные лазеры имеют преимущество, поскольку обеспечивают более высокое качество хроматограммы и более высокую чувствительность анализа за счет увеличения облучаемой площади. В этом отношении Nd:YAG лазеры обычно превосходят азотные лазеры. Например, частота следования лазерных импульсов использованного в работе Nd:YAG лазера составляла 300 Гц, а лазерный луч разворачивался в кадр, состоящий из 300 точек. Таким образом, хроматографический пик регистрировался с временным разрешением 1 с, что при полуширине пиков порядка 10 с обеспечивало достаточно высокое качество масс-хроматограмм. В то же время, максимальная частота следования импульсов использованного в исследованиях азотного лазера не превышала 50 Гц. Чтобы сохранить разрешение хроматографического пика на уровне 1 с при использовании такого лазера, необходимо уменьшить облучаемую площадь эмиттера ионов в 6 раз. Примерно в это же число раз уменьшается чувствительность анализа.

#### ***4.3.3. Аналитические характеристики***

Сочетание SALDI с ГХ, также как и сочетание с термодесорбционным вводом пробы, позволяет проводить количественный анализ проб, содержащих летучие компоненты. Геометрия интерфейса сопряжения газового хроматографа с масс-спектрометром в использованной в работе экспериментальной установке аналогична геометрии расположения микрокюветы для термодесорбции, поэтому значения геометрического фактора (при одинаковом расстоянии до подложки) и эффективности ионизации одних и тех же соединений близки для обоих вариантов. Небольшое различие связано с тем, что в отличие от выражения (4.2), угловое распределение потока газа, истекающего из хроматографической колонки в вакуум, описывается, согласно данным работы [288], приблизительно как «квадрат косинуса», т.е. выражением:

$$I = I_0 \cdot \cos^2 \theta, \quad (4.5),$$

где  $I_0$  – и плотность потока молекул по нормали к площадке (в направлении оси капилляра);  $I$  – плотность потока молекул под углом  $\theta$  к нормали.

Градуировочные зависимости, полученные при определении фенилалкиламинов и их производных в режиме ГХ/SALDI, аналогичны приведенным на рис. 4.8. Как и при термодесорбционном вводе пробы, концентрационные характеристики остаются линейными в диапазоне до четырех порядков величины, после чего выходят на насыщение.

Газохроматографический ввод пробы в вакуумную камеру масс-спектрометра неизбежно приводит к увеличению давления в ионном источнике вследствие потока газа-носителя. Так, при выбранных режимах работы хроматографа ввод пробы приводит к росту давления в ионном источнике, по крайней мере, на порядок величины. Поэтому в условиях ГХ/SALDI сигнал холостого опыта и его стандартное отклонение определяются химическим шумом даже при анализе чистых растворов. Свой вклад в сигнал холостого опыта вносит и капиллярная колонка ГХ, о чем свидетельствует тот факт, что величина  $\sigma$  возрастает с увеличением температуры колонки.

При оценке пределов обнаружения фенилалкиламинов предварительно проводили пять последовательных холостых опытов для определения величины  $\sigma$ . В ГХ вводили 1 мкл метанола и регистрировали масс-хроматограммы в условиях эксперимента на рис. 4.11. На основе полученных данных определяли величины ионного сигнала и его стандартного отклонения в областях масс-спектра, соответствующих наиболее интенсивным пикам каждого из соединений. Выбор единственного пика для оценки предела обнаружения обусловлен тем, что, при найденных режимах достигается полное хроматографическое разделение фенилалкиламинов (очевидно, что в условиях недостаточного разделения предел обнаружения необходимо оценивать по наименее интенсивному характеристическому пику).

В табл. 4.5 приведены пределы обнаружения фенилалкиламинов, найденные с учетом полученных значений  $\sigma$  и коэффициентов чувствительности. Видно, что чувствительность и предел обнаружения фенилалкиламинов в значительной степени определяется природой заместителей при атоме азота. Например, сравнивая соединения **2**, **3** и **4**, представляющие собой первичный, вторичный и третичный амины с одинаковой структурой углеводородного скелета, можно заметить, что чувствительность к третичному амину, соответственно, в 4.7 и 16.5

раза выше, чем к вторичному и первичному амину. Такая же зависимость прослеживается для пар соединений **4** и **12**, а также **3** и **6**.

Из-за различия величин газовой фазной основности пределы обнаружения исследованных соединений варьируются в достаточно широких пределах. Однако даже для фенилалкиламинов с относительно низкими значениями GB предел обнаружения не превышает 0.4 нг/мл, что позволяет проводить определение аналитов на уровне единиц фмоль вещества, введенного в прибор, и ниже. В качестве примера на рис. 4.13 приведен масс-спектр, зарегистрированный при вводе в ГХ раствора N-изопропил-1-фенилэтиламина с концентрацией 0.5 нг/мл.

Таблица 4.5. Основные масс-спектрометрические пики и пределы обнаружения исследованных фенилалкиламинов. Номер соединения соответствует его номеру в таблицах 4.3 и 4.4.

№	Молекулярная масса, а.е.м.	m/z основных пиков	m/z самого интенсивного пика	Предел обнаружения, нг/мл
1	135	136, 91, 44	91	0.03
2	121	122, 120, 105, 18	105	0.39
3	135	136, 134, 105, 32	105	0.12
4	149	150, 148, 105, 46	105	0.02
5	135	136, 134, 119, 91, 18	91	0.25
6	163	164, 105, 60	105	0.07
7	135	136, 134, 105, 30	105	0.15
8	149	150, 148, 119, 32	119	0.04
9	149	148, 119, 105, 91, 18	91	0.14
10	149	150, 148, 133, 18	133	0.14
11	151	152, 150, 135, 18	135	0.06
12	205	206, 105, 102	105	0.01
13	121	122, 120, 91, 30	91	0.2
14	163	164, 91, 72	91	0.02
15	211	212, 210, 108, 105, 91	105	0.04
16	225	226, 122, 105, 91	105	0.01

Масс-спектр получен в режиме «splitless» при интегрировании хроматографического пика, соответствующего выходу этого соединения. N-изопропил-1-фенилэтиламин ионизуется в процессе SALDI с образованием трех основных пиков: протонированных молекул с  $m/z$  164 и фрагментных пиков с  $m/z$  105 и  $m/z$  60. Если использовать все три масс-спектрометрических пика для идентификации и определения соединения, то предел обнаружения определяется по наименее интенсивному из них, т.е. по пику с  $m/z$  60. В этом случае предел обнаружения примерно равен 0.25 пг введенного в прибор аналита. Если проводить определение по одному пику с  $m/z$  105, то предел обнаружения N-изопропил-1-фенилэтиламина составляет 0.07 пг или 0.4 фмоль аналита.

По сравнению с термодесорбционным вводом пробы, сочетание с газовой хроматографией характеризуется несколько более высокими пределами обнаружения вследствие большей величины фонового сигнала. Также более высокие значения получены для относительного стандартного отклонения сигнала.

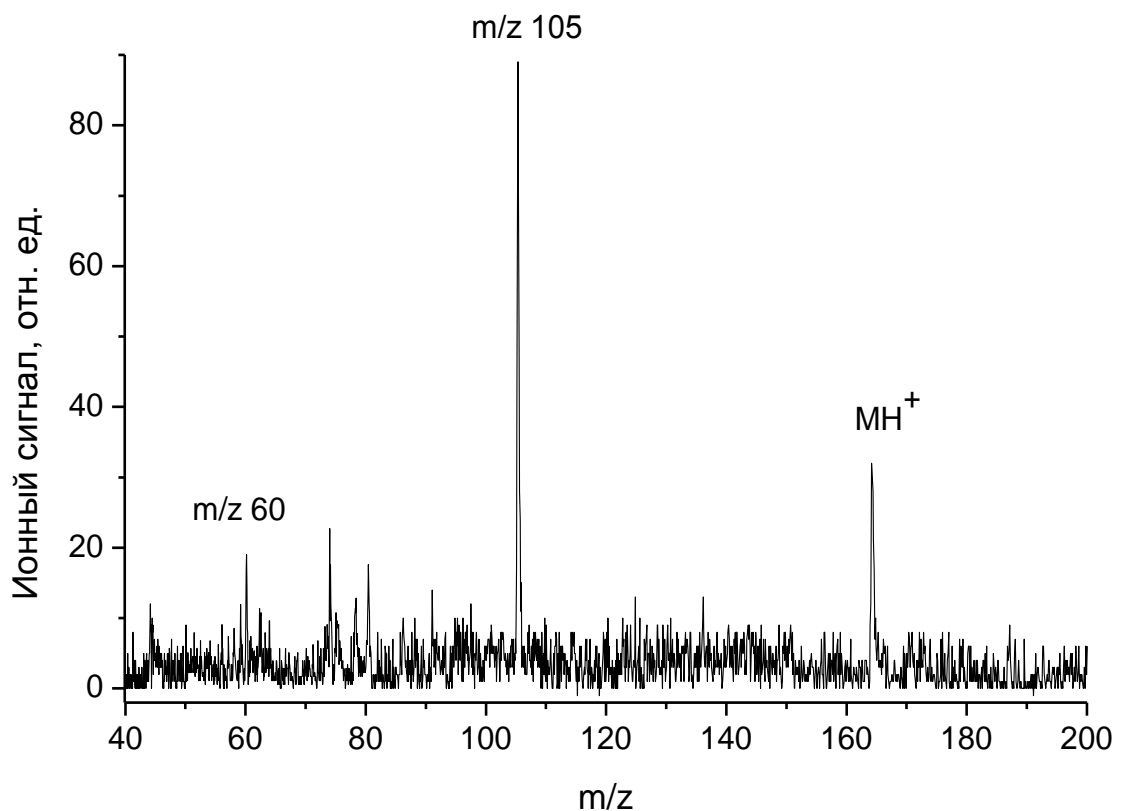


Рис. 4.13. Масс-спектр N-изопропил-1-фенилэтиламина, зарегистрированный при вводе в прибор 1 мкл раствора аналита с концентрацией 0.5 нг/мл.

Например, в условиях эксперимента на рис. 4.11 величины  $s_r$ , рассчитанные для серии из семи последовательных анализов одного и того же раствора, лежат в диапазоне  $0.048 \div 0.056$ .

Следует отметить, что в пределах промежутка времени, соответствующего одной масс-хроматограмме, ионизационные свойства кремниевой подложки практически не меняются. Однако при длительной эксплуатации эмиттера ионов или при длительном промежутке времени между анализами ионизационные свойства необходимо контролировать, чтобы избежать погрешности измерений, связанных с изменением коэффициента чувствительности. С этой целью использовали ячейку Кнудсена, которая обеспечивала постоянный поток на поверхность подложки тестового соединения, выбранного в качестве внешнего стандарта. В качестве тестового соединения при определении фенилалкиламинов применяли кофеин. Экспериментальная установка оснащена двумя окнами, расположенными симметрично относительно подложки и предназначенными для ввода химических соединений в ионный источник масс-спектрометра, что позволяло использовать одновременно ячейку Кнудсена и газовый хроматограф. В том случае, когда наблюдалось существенное изменение ионизационных свойств подложки, активный слой формировали заново в соответствии с методикой, описанной в разделе 4.1.3. Возможность полного восстановления ионизационных свойств выгодно отличает эмиттеры ионов, полученные лазерной обработкой, от других кремниевых материалов. Постепенная деградация активного слоя, которая проявляется в последовательном уменьшении величины сигнала при длительном использовании эмиттера ионов, наблюдалась для всех типов кремниевых подложек. Наиболее сильно этот эффект выражен у аморфного кремния: при использовании  $\alpha$ -Si коэффициент чувствительности падает в два раза примерно после 200 инъекций пробы. При этом величины  $s_r$ , рассчитанные в условиях, аналогичным на рис. 4.11, составляют  $0.052 \div 0.070$ . Более стабильными являются подложки из пористого кремния, которые выдерживают в несколько раз большее количество вводов пробы без значительного снижения чувствительности. Однако воспроизводимость результатов анализа хуже:  $s_r$  для всех аналитов превышает 0.07. На практике необходимо заменять подложки из аморфного и пористого кремния после определенного числа вводов пробы.

Сочетание SALDI с системой, обеспечивающей разделение определяемых компонентов, характеризуется высокой селективностью анализа. К дополнительным факторам, определяющим селективность, можно отнести следующие:

- селективность ионизации. Как показано в главе 2, в процессе лазерной десорбции/ионизации путем протонирования аналитов на поверхности кремниевых материалов эффективно ионизируются только соединения с относительно высокой основностью в газовой фазе (свыше 820 кДж/моль). Этот факт, с одной стороны, ограничивает круг определяемых соединений, но с другой стороны, позволяет избежать влияния мешающих компонентов и растворителей при анализе проб сложного состава;

- селективность самого масс-анализатора. Как отмечено в главе 3, малое время эмиссии ионов, а также тот факт, что все ионы стартуют с одной и той же поверхности, позволяет достичь относительно высокого разрешения по массам при использовании линейных времяпролетных масс-анализаторов. Например, на масс-спектрометрической установке, представленной на рис. 4.4, пик протонированного кофеина регистрируется с разрешением более 700;

- лазерная десорбция/ионизация с переносом протона относится к методам “мягкой” ионизации и характеризуется относительно низкой степенью фрагментации образующихся ионов. Почти все зарегистрированные масс-спектры органических соединений содержат пик протонированных молекул аналита. Кроме того, как показано в главе 2, степень фрагментации соединения можно менять, варьируя интенсивность лазерного воздействия на подложку. Наличие пика, определяющего молекулярную массу соединения, а также пиков диагностически значимых фрагментных ионов, характеризующих структуру молекулы, значительно упрощает идентификацию сложных органических соединений по зарегистрированным масс-спектрам.

#### ***4.3.4. Определение фенилалкиламинов в плазме крови***

Несмотря на высокую селективность сочетания SALDI с ГХ, при определении биологически активных соединений (в том числе фенилалкиламинов) в плазме крови необходимо проводить предварительную пробоподготовку. В крови биологически активные соединения обычно связываются белками и не проходят

через колонку. Кроме того, прямой ввод плазмы крови в ГХ приводит к быстрому выходу капиллярной колонки из строя. Наконец, высокая концентрация мешающих компонентов в пробе влияет как на эффективность ионизации вследствие пассивации активной поверхности эмиттера ионов, так и на качество регистрируемых масс-спектров из-за увеличения фонового сигнала и снижения разрешения по массам.

Известно большое число различных вариантов пробоподготовки для определения лекарственных соединений в крови методами ГХ/МС. Большинство из них основано на жидкость-жидкостной или твердофазной экстракции. В исследованиях применяли стандартную универсальную методику пробоподготовки для масс-спектрометрического определения аминов, основанную на жидкость-жидкостной экстракции аналита в систему хлороформ:гептан:изопропанол (60:26:14) с добавлением 10% по объему насыщенного раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [289]. Хлорид аммония применяется для увеличения ионной силы раствора с целью отделения летучих соединений от белков. Методика заключается в следующем: к 1 мл плазмы крови добавляли 10 мкл раствора определяемых соединений в метаноле и перемешивали на встряхивателе в течение 2 минут. Далее отбирали 200 мкл раствора и добавляли 1 мл приготовленной заранее экстрагирующей смеси. Затем образцы перемешивали на встряхивателе в течение 1 мин, центрифугировали при скорости 3000 об/мин в течение 1 мин, отбирали органическую фракцию и проводили ее анализ методом ГХ/SALDI. Полученные ионные сигналы сравнивали с сигналами из модельных растворов определяемых соединений.

В табл. 4.6 представлены результаты сравнения метрологических параметров на примере определения трех фенилалкиламинов в водном растворе и в плазме крови. Оба раствора содержали одинаковую концентрацию аналита и параллельно обрабатывались с использованием стандартной экстрагирующей системы. Из приведенных данных видно, что величина выхода соединений в органический растворитель составляет примерно 90%. Используемая методика пробоподготовки отличается простотой и позволяет надежно определять фенилалкиламины в плазме крови. Рассчитанные значения относительного стандартного отклонения  $s_r$  выше, чем при анализе модельных растворов, однако для всех исследованных аналитов не превышают 0.072.



Таблица 4.6. Метрологические параметры при определении фенилалкиламинов в модельном растворе и в плазме крови ( $N = 7$ ,  $P = 0.95$ ).

Номер соединения	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл			
		в модельном растворе	$s_r$	в плазме крови	$s_r$
N-изопропил-1-фенилэтиламин	1.0	0.99	0.050	0.89	0.067
N,N-диметил-1-фенилэтиламин	1.0	0.99	0.048	0.91	0.064
N,N-дипропил-1-фенилэтиламин	1.0	1.0	0.051	0.88	0.068

В процессе пробоподготовки происходит разбавление пробы в пять раз, что, соответственно, увеличивает минимальную определяемую концентрацию аналита при том же объеме вводимого в ГХ раствора. Предел обнаружения можно снизить, добавив стадию концентрирования, например, путем испарения растворителя в токе сухого воздуха. Как показали эксперименты, таким образом можно снизить предел обнаружения фенилалкиламинов в плазме крови до 10 раз. Однако при этом увеличивается длительность пробоподготовки, а величина  $s_r$  возрастает до 0.10.

Аналогичная методика может быть использована для определения аминов и других основных соединений при анализе методом ГХ/SALDI других биологических жидкостей, в частности, мочи и слюны.

#### 4.4. Исследование закономерностей фрагментации ионов в условиях лазерной десорбции/ионизации с переносом протона

«Мягкие» условия ионизации с переносом протона предполагают низкую степень фрагментации образующихся ионов. Действительно, SALDI масс-спектры многих соединений содержат единственный пик, соответствующий протонированным молекулам, даже при относительно высоких значениях плотности лазерной энергии. К таким соединениям относятся, например, пиридин, морфолин, аминопиколлин, атенолол и другие адrenoблокаторы, алкиламины с длиной углеводородной цепи, не превышающей шесть атомов углерода, никотин, анилин и целый ряд других. Однако масс-спектры большинства исследованных

соединений содержат один или несколько пиков фрагментных ионов. Как показано в главе 3, очевидной причиной фрагментации в условиях SALDI является нагрев поверхности эмиттера ионов, который обеспечивает передачу тепловой энергии десорбированным ионам. Поскольку набор регистрируемых в спектре фрагментных ионов напрямую связан со структурой химического соединения, то для правильной интерпретации масс-спектров важно знать основные направления фрагментации протонированных молекул. Фенилалкиламины и их производные являются удобным объектом для такого рода исследований.

При изучении закономерностей фрагментации важную информацию дают эксперименты с ионизацией дейтерированных молекул аналита. Для получения таких соединений можно использовать их растворы, в которых растворителем является тяжелая вода  $D_2O$ . Другой вариант заключается в замене  $H_2O$  на  $D_2O$  в устройстве подачи паров воды в масс-спектрометрическую установку. При вводе паров тяжелой воды происходит постепенное замещение  $H_2O$  на  $D_2O$  в вакуумной камере прибора. Это, в свою очередь, вызывает процессы изотопного обмена в адсорбированных молекулах соединений, а именно, замене подвижных атомов водорода на атомы дейтерия. Как результат, в масс-спектре растут пики ионов, обогащенных дейтерием. Для того чтобы этот процесс протекал эффективно, давление паров  $D_2O$  должно составлять величину порядка  $10^{-5}$  мм.рт.ст., что более чем в 10 раз превышает приведенные в главе 2 оптимальные для ионизации значения. Важно отметить, что в изотопный обмен не вступают атомы водорода, связанные с атомами углерода. Индикатором процесса дейтерирования могут служить масс-спектры иона аммония, регистрируемые при вводе в прибор аммиака. В качестве примера на рис. 4.14 приведен SALDI масс-спектр аммиака, полученный после воздействия на кремниевую подложку паров тяжелой воды при давлении  $10^{-5}$  мм.рт.ст. Видно, что изотопное распределение смещено в сторону дейтерированных ионов аммония: минимальную интенсивность имеет пик  $NH_4^+$ , а максимальную – пик  $ND_4^+$ .

На основе анализа полученных масс-спектров фенилалкиламинов и других исследованных соединений можно выделить четыре наиболее часто встречающихся направления фрагментации протонированных молекул. Эти направления можно описать представленными ниже схемами 4.1-4.4.

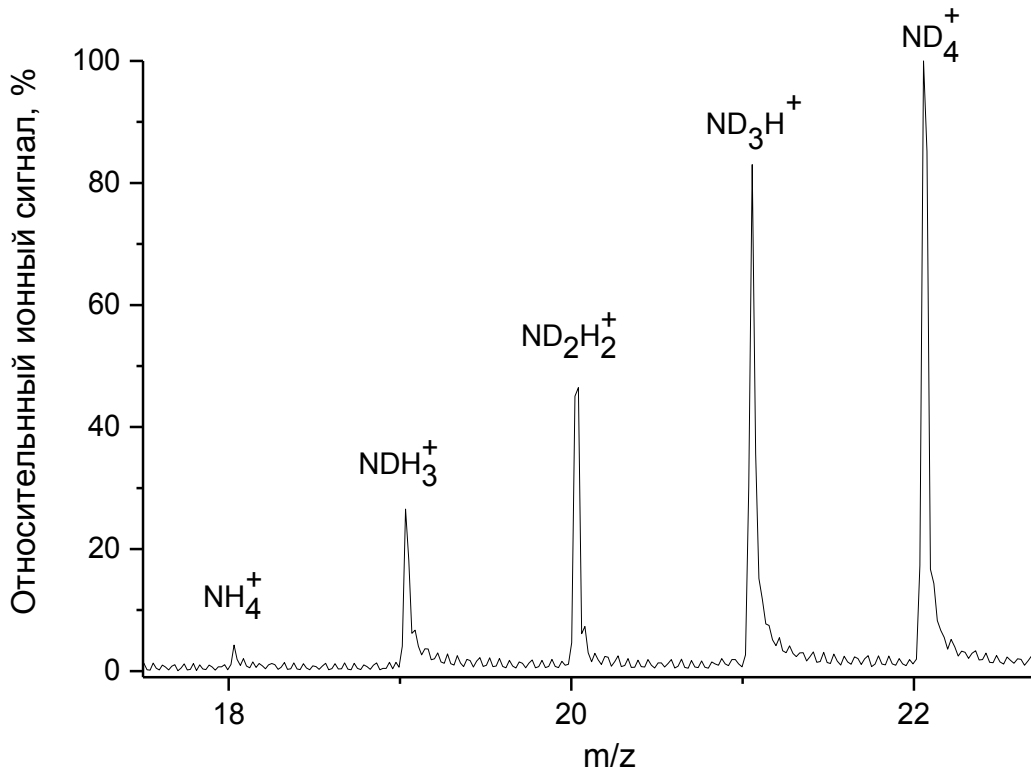


Рис. 4.14. Масс-спектр аммиака, зарегистрированный при вводе в масс-спектрометр паров тяжелой воды  $D_2O$ .

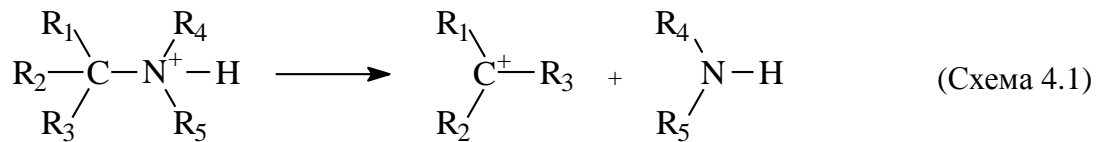


Схема 4.1 иллюстрирует фрагментацию с элиминированием амина  $HNR_4R_5$  и образованием осколочного иона. Примером фрагментации по этому каналу может служить пик с  $m/z$  137 в масс-спектре дофамина (рис. 4.15). Другими примерами могут служить пик с  $m/z$  91 на рис. 2.19, пики с  $m/z$  105 на рис. 4.13, рис. 4.17 и рис. 4.20 и пик с  $m/z$  95 на рис. 4.18б.

Фрагментация по схеме 4.1 наблюдалась для всех исследованных фенилалкиламинов и их производных. При выбранных значениях плотности лазерной энергии этому каналу соответствуют наиболее интенсивные пики в масс-спектрах (см. табл. 4.5). Фрагментация по схеме 4.1 обусловлена  $\alpha$ -разрывом C–N связи с образованием карбокатиона и нейтральной молекулы амина, а образующиеся при такой фрагментации ионы характеризуют состав углеводородной группы в исследованных соединениях.

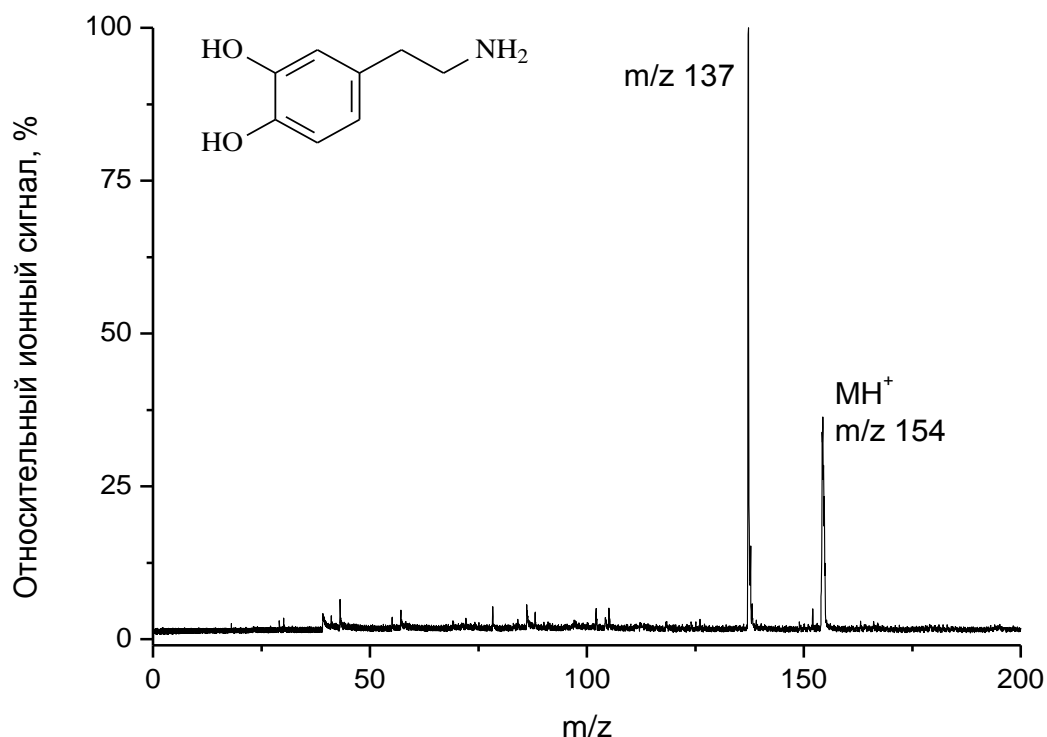
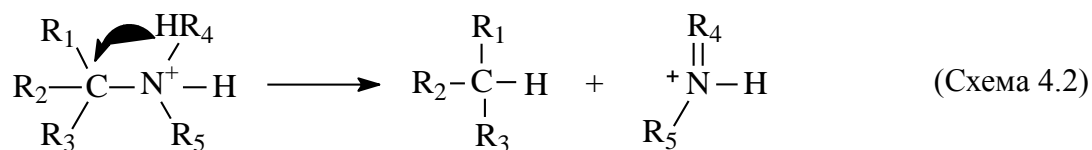


Рис. 4.15. Масс-спектр дофамина. Пик с  $m/z$  137 соответствует ионам, которые образуются при фрагментации протонированных молекул с  $m/z$  154 по схеме 4.1.

Другой канал фрагментации включает внутримолекулярный перенос атома водорода от заряженного центра и приводит к образованию перестроенного иона, отличительной особенностью которого является наличие двойной  $C=N$  связи. Это направление иллюстрируется схемой 4.2.



Среди исследованных фенилалкиламинов такой процесс характерен для бензиламинов, содержащих вторичную или третичную аминогруппу. Фрагментация сопровождается элиминированием молекулы ароматического углеводорода, а образующийся ион характеризует состав аминогруппы. Фрагментации по схеме 4.2 соответствуют пик с  $m/z$  44 на рис. 2.19, а также пики с  $m/z$  30 (соединения **7** и **13**) и с  $m/z$  72 (соединение **14**) в табл. 4.5.

Подтверждением предложенной схемы могут служить масс-спектры b-аланина, представленные на рис. 4.16. Масс-спектры зарегистрированы при подаче

в ионный источник масс-спектрометра паров  $\text{H}_2\text{O}$  (рис. 4.16а) и  $\text{D}_2\text{O}$  (рис. 4.16б). В протонированной молекуле  $\beta$ -аланина содержится четыре атома водорода, способных вступить в реакцию изотопного обмена: три из них связаны с атомом азота (в том числе и полученный в результате реакции ионизации), а четвертый – с

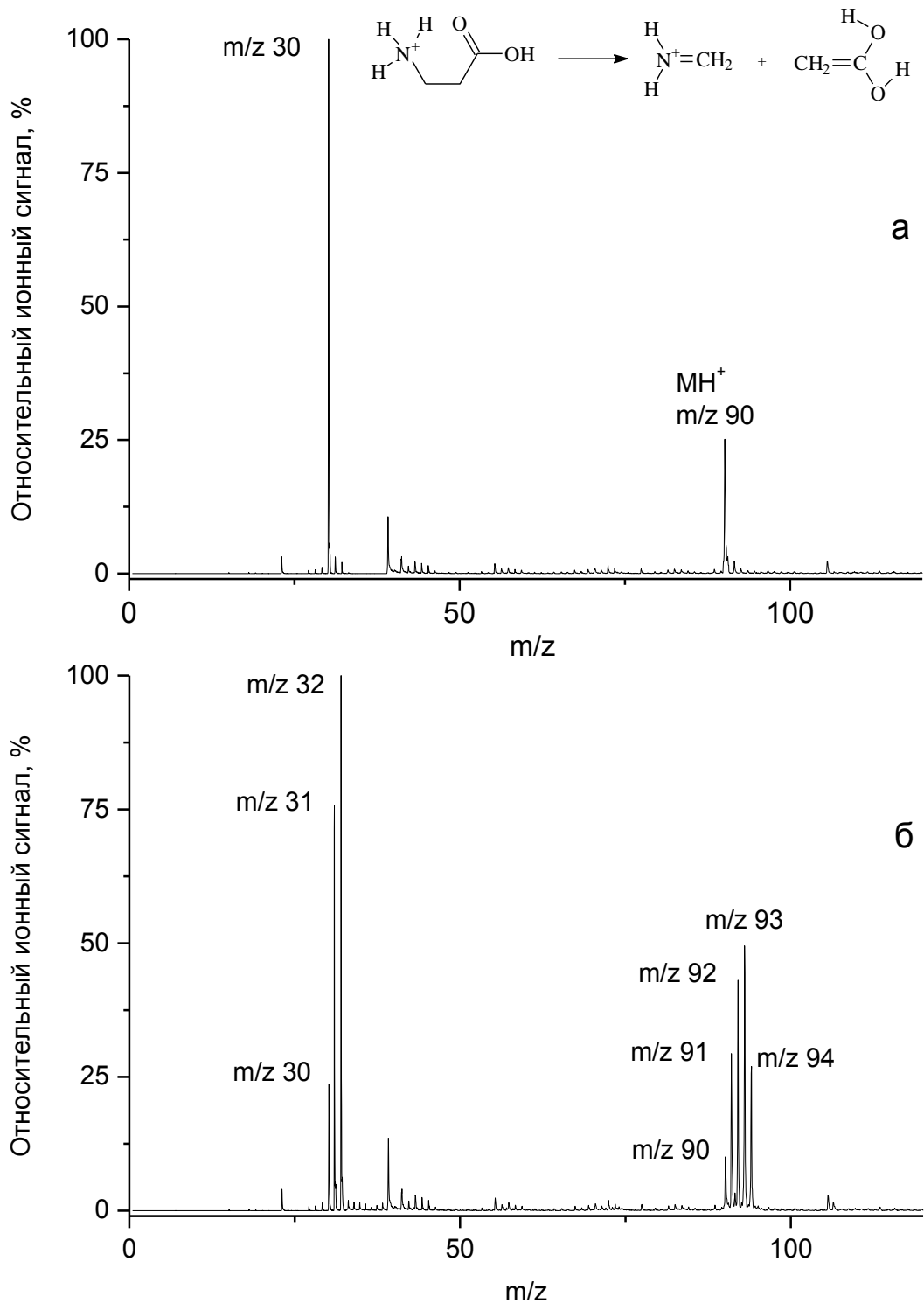
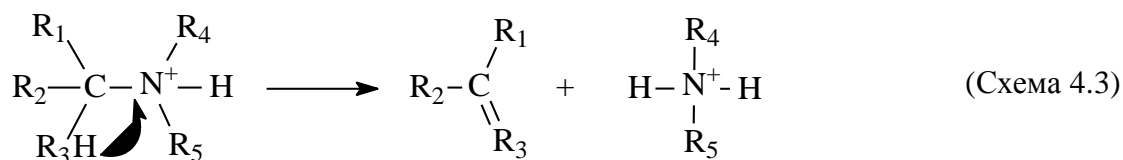


Рис. 4.16. Масс-спектры  $\beta$ -аланина, полученные при подаче в ионный источник масс-спектрометра обычной (а) и тяжелой (б) воды.

атомом кислорода. Поэтому при подаче паров тяжелой воды в масс-спектре должны регистрироваться пики с  $m/z$  от 90 до 94. Именно такая картина и наблюдается на рис. 4.16б. Пик с  $m/z$  30 расщепляется на три пика с  $m/z$  от 30 до 32, что свидетельствует о том, что в образовавшийся фрагментный ион содержит только два атома водорода, способных вступить в изотопный обмен. Это возможно только в результате внутримолекулярного переноса атома водорода от протонированной аминогруппы к другой функциональной группе с последующим образованием фрагментного иона  $\text{CH}_2\text{NH}_2^+$ . Этот факт подтверждает образование иона с  $m/z$  30 по схеме 4.2. Можно предположить, что атом водорода переносится к одному из атомов кислорода с образованием нейтрального гем-диола. Схема 4.2 для фрагментации  $\beta$ -аланина представлена на вставке к рис. 4.16а. Следует отметить, что диолы с двумя гидрокси-группами у одного атома углерода, как правило, неустойчивы и легко отщепляют воду, превращаясь в соответствующие карбонильные соединения – альдегиды и кетоны.

Внутримолекулярный перенос атома водорода возможен и в обратном направлении – к заряженному центру. Такое направление фрагментации описывается схемой 4.3:



Для исследованных фенилалкиламинов фрагментация по схеме 4.3 характерна для соединений, имеющих разветвленный углеводородный скелет между ароматическим кольцом и аминогруппой. В табл. 4.5 фрагментации по такому каналу соответствуют пики с  $m/z$  18 (соединения **2**, **5**, **9**, **10**, **11**), с  $m/z$  32 (соединения **3**, **8**), с  $m/z$  46 (соединение **4**),  $m/z$  60 (соединение **6**), с  $m/z$  102 (соединение **12**), с  $m/z$  108 (соединение **15**) и с  $m/z$  122 (соединение **16**). Поскольку заряд остается на центре протонирования (с элиминированием молекулы арилалкена), то образующиеся фрагментные ионы также характеризуют состав аминогруппы фенилалкиламинов.

Для подтверждения предложенной схемы фрагментации были получены масс-спектры соединений в условиях подачи в ионный источник паров обычной и

тяжелой воды. В качестве примера на рис. 4.17а и 4.17б приведены масс-спектры N,N-диметил-1-фенилэтиламина. Все атомы водорода в молекуле этого соединения связаны с атомами углерода, поэтому в реакцию изотопного обмена может вступать только водород, полученный в результате протонирования. Тогда появление дейтерированного пика свидетельствует о том, что ион содержит протон, полученный в процессе ионизации молекул.

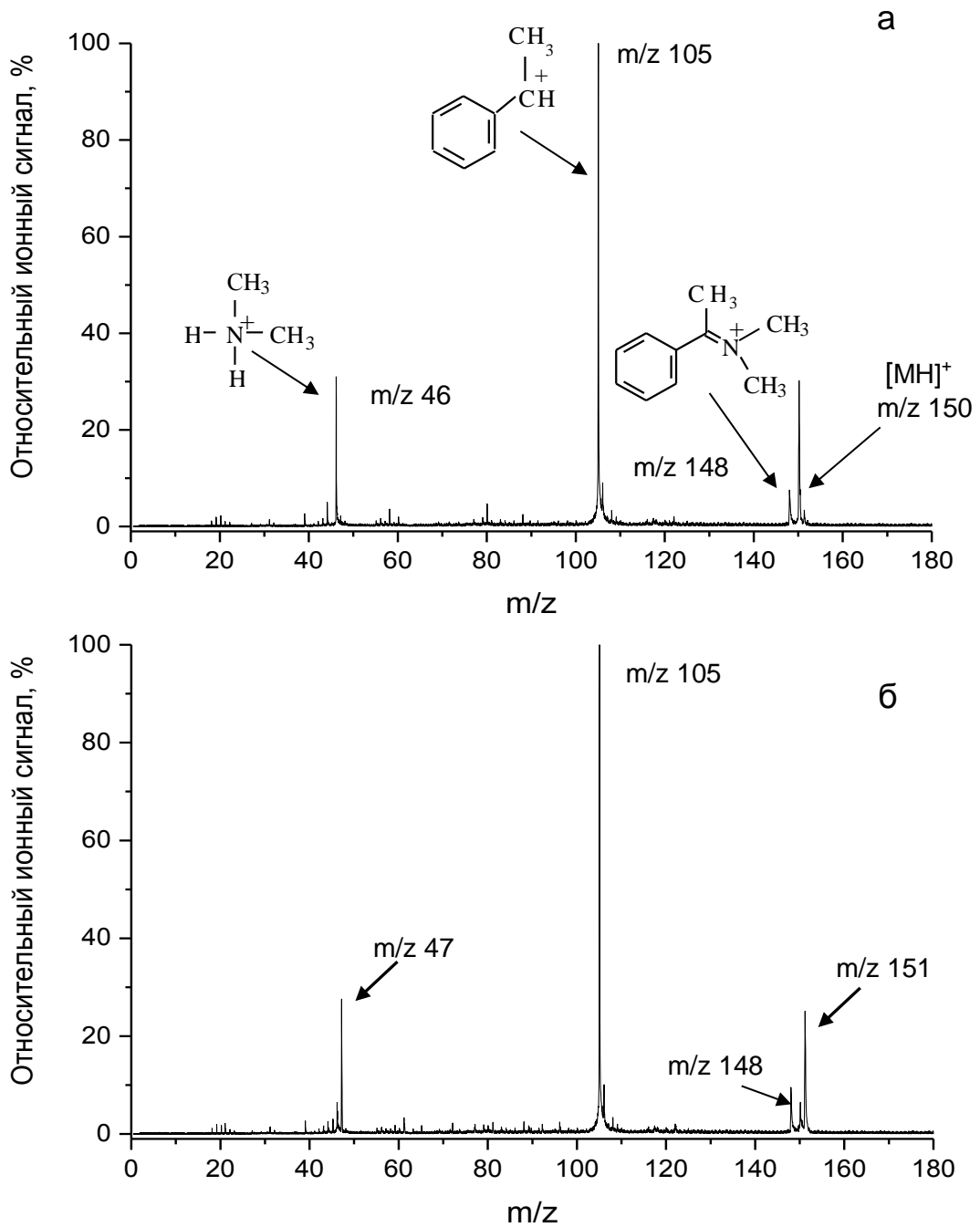
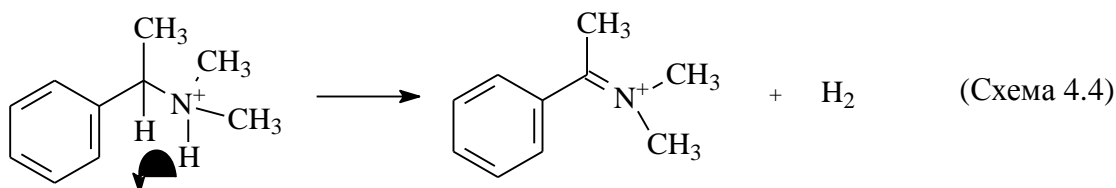


Рис. 4.17. Масс-спектры N,N-диметил-1-фенилэтиламина, полученные при вводе в ионный источник масс-спектрометра паров H<sub>2</sub>O (а) и D<sub>2</sub>O (б).

На рис. 4.17а фрагментации протонированного N,N-диметил-1-фенилэтиламина по схеме 4.3 соответствует пик с  $m/z$  46, который образуют ионы состава  $[(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2]^+$ . Из данных рис. 4.17б следует, что добавление в ионный источник паров  $\text{D}_2\text{O}$  приводило к смещению пика с  $m/z$  46 до  $m/z$  47. На первый взгляд, исходя из структуры иона  $[(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2]^+$ , можно было ожидать появление в масс-спектре также пика с  $m/z$  48, поскольку с атомом азота связаны два атома водорода, и оба могут замещаться на дейтерий. Однако, в масс-спектре на рис. 4.17б отсутствует пик с  $m/z$  48. Этот факт можно объяснить тем, что один из этих атомов водорода не участвовал в изотопном обмене и, значит, находился при атоме углерода. Для N,N-диметил-1-фенилэтиламина, как следует из схемы 4.3, это – атом водорода метильной группы, образовавший связь с атомом азота в результате внутримолекулярного переноса водорода. Отсутствие в спектре пика с  $m/z$  48 свидетельствует также о том, что образование перестроенного иона  $[(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2]^+$  происходит после десорбции протонированной молекулы соединения с кремниевой подложки. То, что атом водорода переносится с метильной группы, подтверждается отсутствием ионов, образованных по схеме 4.3, в масс-спектрах фенилалкиламинов с линейной углеводородной цепочкой между аминогруппой и бензольным кольцом (например, N,N-диметилбензиламина на рис. 2.19).

Два других фрагментных пика на рис. 4.17а не меняют своего положения при вводе в прибор тяжелой воды. Пик с  $m/z$  105, как отмечено выше, соответствует ионам, полученным по схеме 4.1. Тот факт, что ионы не содержат в своем составе присоединенных протонов, может служить дополнительным подтверждением образования пика с  $m/z$  105 по предложенной схеме.

Пик с  $m/z$  148 соответствует ионам вида  $[\text{M}-\text{H}]^+$ , которые образуются при фрагментации протонированных молекул с элиминированием молекулы водорода по схеме 4.4:



Такой канал фрагментации наблюдался для большинства исследованных фенилалкиламинов (см. табл. 4.5). Следует отметить, что ионы  $[\text{M}-\text{H}]^+$



характеризуются высокой величиной порога появления и регистрируются только при относительно высоких значениях плотности энергии лазерного излучения.

Схемы фрагментации 4.1-4.4 характерны для соединений, содержащих в своем составе аминогруппу. Среди исследованных соединений реализуются и другие каналы фрагментации. Например, фрагментный пик кофеина с  $m/z$  138 образуется при потере  $\text{CONCH}_3$  группы в результате разрыва шестичленного цикла кофеина (см. рис. 2.13). В спектрах некоторых соединений присутствуют пики, свидетельствующие о разрыве С-С связи (например, пик с  $m/z$  105 1-бензилпропиламина в табл. 4.5 или пик с  $m/z$  58 хлоропирамина на рис. 5.14, обусловленные  $\beta$ -разрывом по отношению к азоту). Однако в целом, рассмотренные направления фрагментации весьма показательны и иллюстрируют тот факт, что в SALDI масс-спектрах пик с максимальным значением  $m/z$  определяет молекулярную массу соединения, а фрагментные пики дают информацию о структуре молекулы.

#### **4.5. Сравнение с электронной и химической ионизацией**

Для оценки конкурентоспособности разработанного метода определения летучих органических соединений представляется важным сравнить полученные аналитические характеристики со стандартными методами ионизации таких соединений, и прежде всего, с электронной ионизацией (ЭИ). Метод ЭИ основан на воздействии пучком электронов с энергиями порядка 70 эВ на молекулы определяемых соединений, приводящем к образованию молекулярных ионов  $\text{M}^+$ . Метод ЭИ в сочетании с ГХ до настоящего времени остается наиболее распространённым в масс-спектрометрии летучих соединений благодаря универсальности, хорошей воспроизводимости масс-спектров, а также сравнительно простой и надежной приборной реализации. Другим распространённым методом является химическая ионизация (ХИ). В рамках ХИ предварительно ионизируют молекулы газа-реагента воздействием пучка электронов, после чего полученные первичные ионы используют для ионизации молекул аналита. Основным каналом ионизации в положительном ионизационном режиме является образование протонированных молекул  $\text{MH}^+$ . Определению различных фенилалкиламинов посвящено большое число работ, что позволяет на примере этих соединений сравнить характеристики трех методов ионизации.

Анализ опубликованных масс-спектров показывает, что применительно к детектированию фенилалкиламинов, метод ЭИ характеризуется сильной фрагментацией ионов, и во многих случаях, отсутствием молекулярных. В качестве иллюстрации на рис. 4.18 приведены два масс-спектра гистамина, полученные методом ЭИ (спектр взят из библиотеки NIST-05, а также доступен в базе данных [290]) и методом SALDI в сочетании с термодесорбционным вводом пробы.

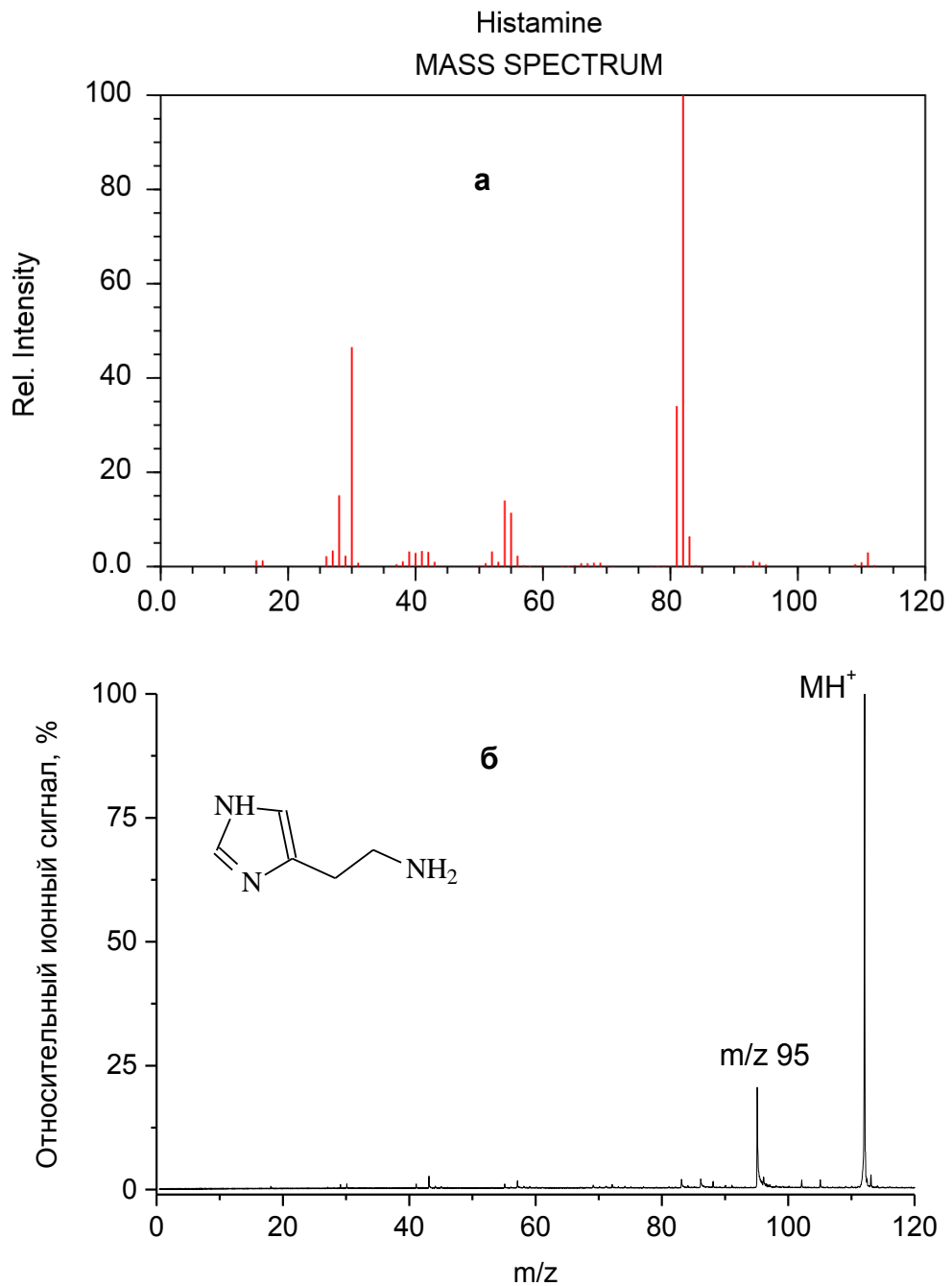


Рис. 4.18. Масс-спектры гистамина, полученные методами: (а) – электронной ионизации; (б) – лазерной десорбции/ионизации с кремниевой поверхности.

Видно, что SALDI выгодно отличается от ЭИ наличием в масс-спектре пика, характеризующего молекулярную массу соединения (пик протонированных молекул с  $m/z$  112), что существенно упрощает идентификацию и определение соединений в сложных смесях.

Существенно меньше отличий наблюдается при сравнении масс-спектров SALDI и ХИ. Оба метода основаны на «мягкой» ионизации с переносом протона и дают похожие масс-спектры с ограниченным набором весьма специфичных линий. Степень фрагментации в условиях ХИ зависит от используемого газа-реагента, но она почти всегда ниже, чем в условиях SALDI. Иллюстрацией этому может служить приведенный на рис. 4.19 масс-спектр химической ионизации метамфетамина – ближайшего гомолога N-метил-1-фенилэтиламина и изомера N,N-диметил-1-фенилэтиламина (см. рис. 4.17). В масс-спектре доминирует пик протонированных молекул метамфетамина, а также регистрируются фрагментные пики относительно низкой интенсивности, обусловленные разрывом C–N и C–C связей соединения. Для сравнения на рис. 4.20 представлен масс-спектр N-метил-1-фенилэтиламина, полученный методом SALDI.

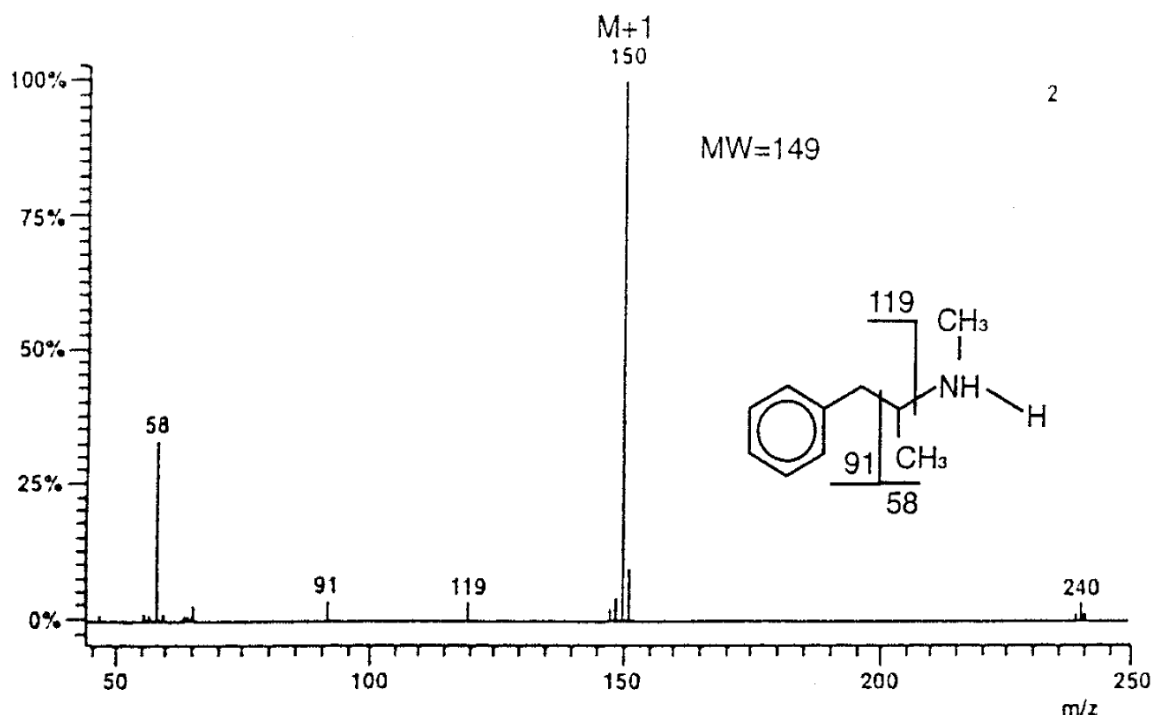


Рис. 4.19. Масс-спектр метамфетамина, полученный методом химической ионизации [291]. Газ-реагент – метанол.

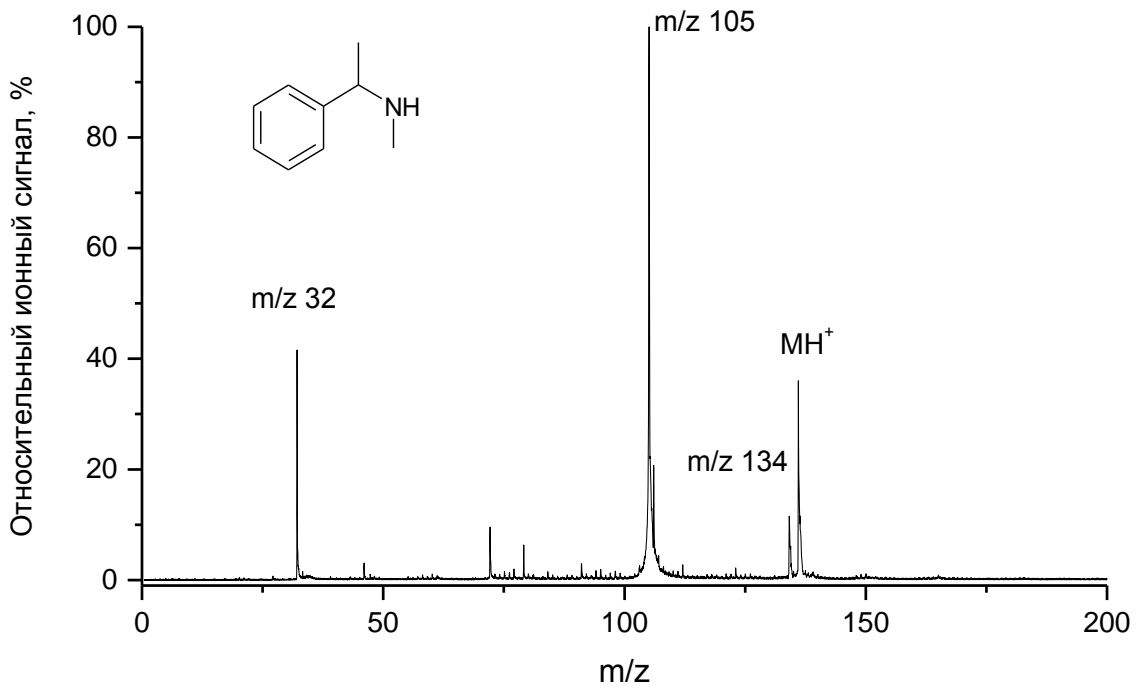


Рис. 4.20. Масс-спектр N-метил-1-фенилэтиламина, полученный методом лазерной десорбции/ионизации с кремниевой поверхности.

Одно из важных отличий масс-спектров органических соединений, полученных методами SALDI и ХИ, заключается в том, что в условиях ХИ регистрируется фоновый сигнал высокой интенсивности в области малых (обычно до 50 а.е.м.) масс, который создается ионами газа-реагента. На этом фоне часто сложно выделить фрагментные ионы в области низких масс. В методе SALDI таких ограничений нет.

Весьма показательно и сравнение чувствительности трех методов ионизации. Анализ литературных данных по определению фенилалкиламинов в биологических образцах методами ЭИ и ХИ показывает, что значения пределов обнаружения этих соединений в условиях сочетания ГХ/МС с предварительной экстракцией (и, в ряде случаев, дериватизацией) составляют величину порядка нескольких единиц нг/мл. Типичным примером могут служить данные по достигнутым пределам обнаружения при определении метамфетамина, приведенные в табл. 4.7. Близкие результаты получены и при определении других биологически активных фенилалкиламинов, включая амфетамин, гистамин, 3,4-метилendioкси-N-метамфетамин и ряд других.

Таблица 4.7. Пределы обнаружения метамфетамина методами ЭИ и ХИ: ТФЭ – твердофазная экстракция, ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция.

Образец	Способ экстракции	Метод ионизации	Предел обнаружения, нг/мл	Ссылка
Моча	ТФЭ	ЭИ	2.4	[292]
Кровь	ТФЭ	ЭИ	10	[293]
Моча	ЖЖЭ	ЭИ	5	[294]
Кровь	ЖЖЭ	ЭИ	5	[295]
Моча	ЖЖЭ	ЭИ	9.5	[296]
Моча	ТФЭ	ЭИ	10	[297]
Слюна	ЖЖЭ	ЭИ	10	[298]
Слюна	ТФЭ	ЭИ	5	[299]
Моча	ТФЭ	ХИ	2.4	[300]
Моча	ЖЖЭ	ХИ	5	[301]

При использовании метода SALDI пределы обнаружения фенилалкиламинов в биологических жидкостях варьируются в диапазоне  $6 \div 300$  нг/мл, что от одного до трех порядков величины ниже, чем в традиционных методах ионизации. Чувствительность анализа в условиях сочетания SALDI как с газохроматографическим, так и с термодесорбционным вводом пробы, может быть значительно увеличена (теоретически, до трех порядков величины) путем увеличения коэффициента использования потока молекул аналита на поверхность эмиттера ионов. Низкая степень фрагментации, высокая эффективность ионизации вместе с отсутствием необходимости дериватизации молекул аналита выделяют преимущества SALDI перед ЭИ. Вместе с тем, при сравнении методов SALDI и ЭИ следует учитывать зависимость эффективности лазерной десорбции/ионизации с переносом протона от величины основности аналита (рис. 2.23). Существенное превосходство SALDI по чувствительности имеет место только для соединений с относительно высокой основностью. При определении соединений с величинами  $GB$ , меньшими 870 кДж/моль, более чувствительным является метод ЭИ.

#### 4.6. Заключение

Разработаны новые способы формирования кремниевых эмиттеров ионов с активным поверхностным слоем. Первый из них основан на газофазном травлении подложки монокристаллического кремния в парах  $I_2$  и HF и позволяет формировать пористый кремний, сохраняющий стабильность ионизационных свойства при длительном хранении в естественных условиях. Второй способ представляет собой напыление тонких пленок аморфного кремния. Третий способ базируется на лазерной обработке подложки монокристаллического кремния и обеспечивает получение высокой воспроизводимости ионизационных свойств одного и того же эмиттера ионов при многократном его использовании. Все разработанные способы обеспечивают высокую чувствительность анализа.

Предложены принципиально новые варианты инструментальной реализации метода SALDI для определения летучих соединений. Первый вариант основан на сочетании лазерной десорбции/ионизации с термодесорбционным методом, второй – на сочетании с газовой хроматографией. На этой основе разработаны методы высокочувствительного количественного определения органических соединений, которые могут быть переведены в газовую фазу без разложения путем нагрева. Определены основные аналитические параметры разработанных методов при определении фенилалкиламинов и ряда лекарственных соединений – эффективность ионизации, чувствительность, предел обнаружения, динамический диапазон. Изучены закономерности фрагментации на примере фенилалкиламинов. Показано, что фрагментация однозначно определяется структурой молекулы аналита, что позволяет достоверно идентифицировать определяемые соединения при анализе проб сложного состава.

Продемонстрирована возможность прямого определения содержания лекарств в моче без предварительной пробоподготовки методом SALDI в сочетании с термодесорбционным вводом проб. Предложена методика определения соединений в плазме крови методом ГХ/SALDI. Достигнутые пределы обнаружения варьируются для различных исследованных соединений от 2 до 400 пг/мл, что до трех порядков величины ниже, чем при использовании стандартных масс-спектрометрических методов с электронной и химической ионизацией.

## **ГЛАВА 5. Лазерная десорбция/ионизация с нанесением пробы при атмосферном давлении для анализа атмосферы и для определения нелетучих соединений**

Рассмотренные в главе 4 новые варианты SALDI, основанные на сочетании лазерной десорбции/ионизации с ГХ и термодесорбционным методом, являются эффективными средствами для анализа твердых проб и растворов, содержащих соединения со средней и высокой летучестью. Вместе с тем, разработанные подходы остаются малоэффективными для решения такой важной проблемы газоанализа, как on-line анализ газовых сред, и в частности, контроль состояния атмосферного воздуха в реальном времени. Для непрерывного анализа атмосферы необходимо использовать другие способы ввода пробы в ионный источник масс-спектрометра.

Применение перспективного на первый взгляд капиллярного ввода газовой пробы ограничено объемом пробы, который может быть введен в масс-спектрометр без существенного нарушения условия сохранения вакуума в приборе. Например, для поддержания вакуума в приборе на уровне  $10^{-5}$  мм.рт.ст. при потоке анализируемого газа  $0.1 \text{ см}^3/\text{с}$  необходимо использовать систему откачки со скоростью  $10^5$  л/с, что более чем на два порядка величины выше производительности стандартных компактных вакуумных систем. Это делает капиллярный ввод газовой пробы малоперспективным. Другой вариант может быть основан на предварительном концентрировании определяемых соединений на специальном сорбенте, через который продувается воздух из исследуемого объема. После окончания процедуры накопления сорбент переносится в вакуумную камеру масс-спектрометра и нагревается для десорбции молекул аналита с целью их нанесения на активную поверхность эмиттера ионов. Очевидно, этот вариант неприменим для работы в реальном времени, что особенно важно при анализе такой подвижной среды, как атмосфера.

Важная особенность SALDI, которая отличает этот метод от таких традиционных методов ионизации летучих соединений, как ЭИ и ХИ, заключается в том, что в условиях лазерной десорбции/ионизации молекулы аналита сорбируются на активной поверхности подложки, и в случае соединений, имеющих значительную энергию связи с поверхностью, могут находиться на ней длительное

время. Это позволяет разделить процессы сорбции и лазерной десорбции/ионизации в пространстве, обеспечив перемещение подложки с нанесенным на ее поверхность анализом из камеры нанесения пробы в ионный источник масс-спектрометра. Такая особенность лазерной десорбции/ионизации легла в основу нового варианта SALDI, использующего способ ввода пробы в масс-спектрометр, схематично представленный на рис. 5.1. Несколько SALDI-активных подложек устанавливают симметрично на вакуумно плотном узле вращения, выполненном в виде вращающегося шара. Одна из подложек находится вне масс-спектрометра, и на нее наносят пробу. В это же время противоположная ей подложка находится в ионном источнике и облучается лазерным излучением, а десорбированные ионы детектируются. Затем шар поворачивается (на  $180^\circ$  при использовании двух подложек или  $90^\circ$  при использовании четырех подложек), и процесс повторяется.

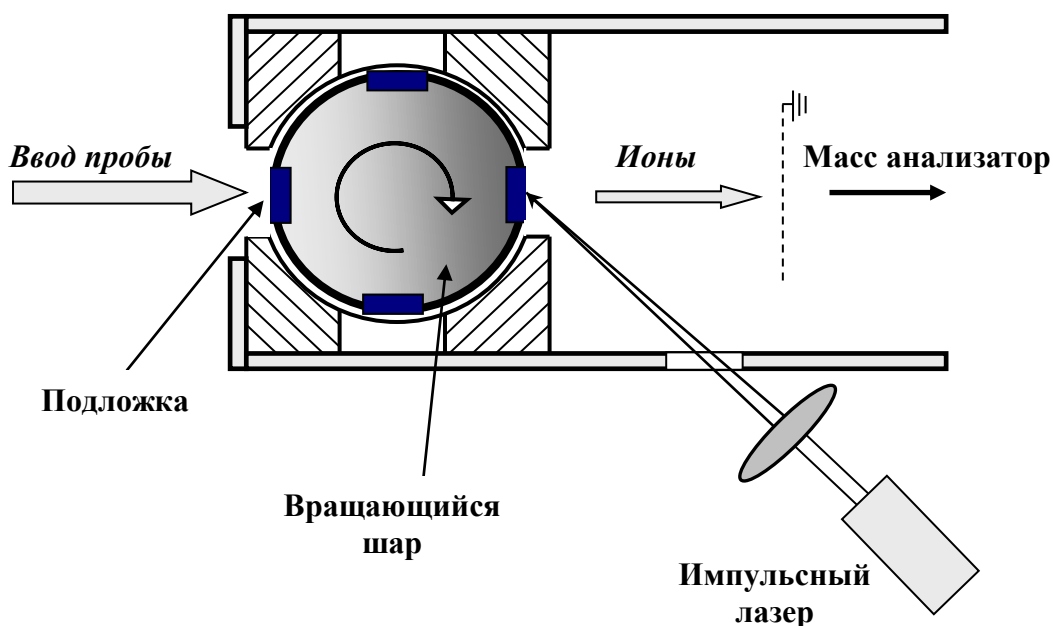


Рис. 5.1. Схема узла ввода пробы на основе вращающегося шара.

Ввод пробы на основе вращающегося шара для MALDI был предложен в работах [302, 303]. Применительно к SALDI шаровой интерфейс разработан и создан в лаборатории лазерной диагностики ИОФ РАН. Использование вращающегося шара дает возможность реализовать проведение анализа газовых сред в реальном времени. Кроме того, такое решение открывает дополнительные возможности для детектирования нелетучих соединений, позволяя использовать



различные варианты нанесения на подложку анализируемых растворов. При этом не требуется мощная система откачки, характерная для масс-спектрометров с ионизацией при атмосферном давлении.

В данной главе рассмотрены новые подходы к использованию лазерной десорбции/ионизации для анализа атмосферы и для определения нелетучих соединений в растворах.

## **5.1. Лазерная десорбция/ионизация для анализа атмосферы**

### ***5.1.1. Масс-спектрометрическая установка с узлом ввода пробы на основе вращающегося шара***

Схема установки с лазерной десорбцией/ионизацией для анализа газовых сред приведена на рис. 5.2. Установка разработана в лаборатории лазерной диагностики ИОФ РАН и включает времяпролётный масс-спектрометр, систему ввода проб на основе вращающегося шара, оптическую систему и систему регистрации и обработки масс-спектрометрических данных.

В качестве масс-спектрометра используется времяпролётный масс-анализатор, собранный по линейной схеме, с длиной свободного пролёта 0.6 м. Интерфейс ввода пробы в масс-анализатор состоит из шара **1** с установленными в его углублениях подложками, который вращается в вакуумных уплотнениях **2**. Шар приводится в движение шаговым двигателем **3**. При вращении шара подложка с нанесённой пробой перемещается из области атмосферного давления через камеру промежуточной откачки **4** с давлением примерно 0.05 мм.рт.ст. в камеру масс-анализатора **5** с давлением порядка  $10^{-7}$  мм.рт.ст. Камеры масс-анализатора и предварительной откачки откачиваются турбомолекулярным насосом **10**. Отличительная особенность прибора – бессеточная конструкция ионного источника и наличие лайнера. Для ускорения и фокусировки десорбированных лазерным излучением **6** ионов используется система линз **7** и лайнер **8**, что обеспечивает близкий к 100% коэффициент пропускания масс-спектрометра, а также позволяет легко переключать полярность источников питания для регистрации как положительных, так и отрицательных ионов. Детекторам ионов является вторично-электронный умножитель (ВЭУ) (ETP Pty Ltd., Австралия, модель 14882) с временным разрешением 2 нс. Применение ВЭУ вместо обычно

используемых МКП позволяет регистрировать большие, чем в случае МКП, ионные токи при сохранении линейности сигнала, что особенно важно при анализе проб, нанесенных при атмосферном давлении. Сигнал с детектора ионов усиливается и подается для обработки на плату сбора данных, которая полностью аналогична описанной в разделе 2.1.1.

В качестве источника лазерного излучения используется Nd:YAG-лазер с диодной накачкой и генератором гармоник (E.L.S. Co., Москва, модель РЛ-02.355), работающий с частотой повторения 300 Гц при длительности импульса 0.37 нс. Излучение лазера фокусируется на поверхность подложки линзой с фокусным расстоянием 15 см и регулируется в широком диапазоне при помощи аттенюатора, выполненного в виде поворотного многослойного диэлектрического зеркала. Для увеличения облучаемой площади используется двузеркальное электромеханическое устройство сканирования поверхности подложки лазерным лучом, идентичное описанному в разделе 2.1.2.

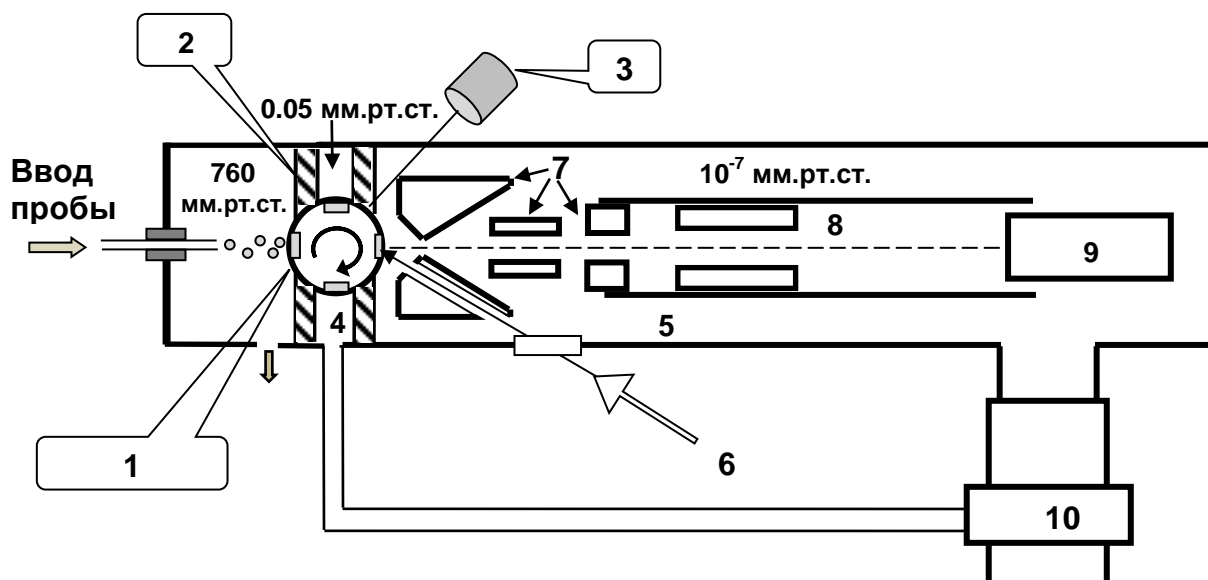


Рис. 5.2. Схема масс-спектрометрической установки для анализа газовых сред: 1 - шар с установленными в его углублениях кремниевыми подложками, 2 - вакуумные уплотнения, 3 - шаговый двигатель, приводящий в движение шар, 4 - камера промежуточной откачки, 5 - камера масс-анализатора, 6 - лазерное излучение, 7 - линзы ионного источника, 8 - лайнер, 9 - детектор ионов, 10 - турбомолекулярный насос.

Шаровой интерфейс, предназначенный для перемещения подложки из камеры нанесения пробы в вакуумную камеру масс-спектрометра, состоит из полированного шара из нержавеющей стали диаметром 40 мм, вакуумных уплотнений и механического привода с шаговым двигателем. Шар имеет четыре углубления для установки подложек и зафиксирован между двумя сферическими вакуумными уплотнениями, выполненными из тефлона. Внешний вид шара представлен на рис. 5.2. Расстояние между активной поверхностью подложек и тефлоновыми уплотнениями составляет величину примерно 0.3 мм, поэтому при повороте шара поверхности не соприкасаются, что исключает загрязнение эмиттера ионов. Между тефлоновыми уплотнениями и обоймой существует кольцевой зазор, формирующий канал промежуточной откачки газа. Зазор между уплотнениями откачивается при поступлении подложки в камеру промежуточной откачки. Такая конструкция позволяет кардинально снизить количество вносимого из камеры нанесения пробы газа, находящегося в объеме над подложкой, и обеспечивает устойчивую работу вакуумной системы масс-спектрометра при давлении  $1 \times 10^{-7} \div 5 \times 10^{-7}$  мм.рт.ст.

Шар приводится в движение шаговым двигателем RS 440-442 через вакуумный ввод вращения. Положение шара контролируется оптическим датчиком, сигнал с которого поступает на микропроцессорный блок управления узлом ввода. Программа управления интерфейсом обеспечивает последовательные повороты шара на  $90^\circ$  и заданное время экспозиции подложки в камере нанесения пробы и в камере масс спектрометра. Точность установки шара составляет  $\pm 2$  мин. Контроллер интерфейса связан с контроллерами лазера и сканирующего устройства, что позволяет менять время и параметры облучения подложки лазером.



Рис. 5.3. Внешний вид вращающегося шара и сферических уплотнений.

Минимальное время, необходимое для смены одной подложки (поворот шара на  $90^\circ$ ), определяется скоростью промежуточной откачки и составляет примерно 1 с. Во время нанесения пробы и облучения поверхности подложки лазером шар остается неподвижным. Время нахождения подложки в фиксированном положении выбиралось исходя из условий анализа и в большинстве экспериментов составляло  $1 \div 10$  с.

При анализе атмосферы воздух подавали в камеру нанесения пробы через прогреваемый капилляр диаметром 2 мм, конец которого устанавливали на расстоянии примерно 3 мм от поверхности подложки. Поток воздуха создавали с помощью перистальтического или мембранного насосов.

### ***5.1.2. Генератор микропотока паров органических соединений на основе массочувствительных пьезопреобразователей***

Одна из важных задач, которую необходимо было решить в процессе развития метода SALDI для анализа атмосферы, заключалась в разработке способа и устройства, позволяющего создавать и регулировать малые потоки паров определяемых соединений известной концентрации и состава. Для создания дозированной концентрации паров веществ, в частности, для калибровки газоанализаторов, широко используются способы, принцип действия которых основан на термической десорбции или сублимации вещества. Известны, например, устройства для создания микропотока паров органических соединений, в которых вещество предварительно наносят на поверхность твердой подложки, после чего подложку помещают в камеру и нагревают до заданной температуры [304]. В результате десорбции и сублимации нанесенного вещества в камере через определенное время устанавливается равновесное состояние, соответствующее концентрации насыщенных паров вещества при заданной температуре. После достижения равновесного состояния через камеру импульсно пропускают определенный объем чистого воздуха, получая таким образом определенную концентрацию паров вещества на выходе камеры. Концентрацию паров вещества рассчитывают исходя из измеренных величин потока воздуха на входе в камеру, длительности импульса сжатого воздуха и известной для данной температуры концентрации насыщенных паров. Такие устройства для создания микропотока паров веществ имеют ряд недостатков, в частности:

- работают только в дискретном режиме, что не позволяет создавать постоянные в длительном временном промежутке потоки паров вещества;
- применимы только для весьма ограниченного класса химических соединений, в частности, не позволяют создавать малые потоки паров соединений с высокой летучестью;
- отсутствует возможность непосредственно определять количество десорбированного вещества.

Для калибровки масс-спектрометров ионной подвижности предложено использовать источники паров веществ, принцип действия которых основан на диффузии паров вещества в капилляре [305]. Система на основе такого источника включает камеру, в которой размещен капилляр с открытым концом. На дно трубки помещают исходное химическое соединение. Камеру помещают в прогреваемый блок и термостатируют. Открытый конец стеклянной трубки выводят в газовый тракт, через который можно прокачивать газ-носитель. Создаваемый в результате диффузии поток паров вещества через открытый конец трубки рассчитывают исходя из измеренных величин длины и внутреннего диаметра трубки, а также известной для данной температуры концентрации насыщенных паров. Изменяя геометрические размеры трубки и температуру термостатирования, можно создавать потоки паров твердых веществ с относительно высокой упругостью пара. Последнее, однако, ограничено возможностью создания и использования капилляров с требуемым высоким значением отношения длины к внутреннему диаметру. Кроме того, хотя такая система позволяет генерировать непрерывные потоки паров органических соединений, она характеризуется высокой погрешностью, особенно при создании малых потоков вещества. Например, относительное стандартное отклонение величины генерируемого потока для 1,3,5-тринитро-1,3,5-триазадициклогексана составляет 25% [305].

Высокая чувствительность метода SALDI предполагает, что генератор микропотока паров веществ должен иметь возможность создавать контролируемые сверхмалые (менее 10 пг/с) потоки аналитов, в том числе, паров соединений с высокой летучестью (например, жидких). Известные простые способы и устройства создания микропотоков веществ такой возможностью не обладают. Для

решения задачи получения контролируемого постоянного малого потока паров широкого класса химических соединений создан генератор микропотока паров веществ, основанный на использовании массочувствительных пьезопреобразователей резонансного типа (резонаторов объемных акустических волн или линий задержки на поверхностных акустических волнах).

#### ***5.1.2.1. Принцип действия генератора микропотока***

В общем виде, принцип действия разработанного генератора микропотока заключается в следующем. Пьезопреобразователь с нанесенным на его рабочую поверхность источником микропотока вещества, помещают в камеру, через которую можно продувать газ-носитель, и подключают к неинвертирующему усилителю таким образом, чтобы выход усилителя был соединен с его же входом через пьезопреобразователь. Такое подключение образует положительную обратную связь (для резонатора - на частоте последовательного резонанса, для линии задержки - на частоте, величина периода которой равна времени задержки). В результате неинвертирующий усилитель работает как электронный генератор переменного напряжения с частотой, определяемой параметрами резонатора или линии задержки.

Источник микропотока представляет собой пленочное покрытие из самого вещества, поток паров которого требуется создать, или композиционный материал, содержащий в своем составе такое вещество. Переход соединения в газовую фазу в процессе десорбции приводит к уменьшению массы вещества, нанесенного на рабочую поверхность массочувствительного пьезопреобразователя, и, следовательно, к увеличению частоты резонанса пьезопреобразователя. Соответственно увеличивается частота электронного генератора переменного напряжения, которую определяют с помощью стандартного измерителя, например электронно-счётного частотомера. Возможность измерения скорости десорбции вещества основана на известной зависимости (3.11) между изменением массы вещества  $\Delta M$  и соответствующим изменением частоты резонанса  $\Delta f$ . По результатам измерения скорости изменения частоты  $\Delta f/\Delta t$  с учетом известных параметров массочувствительного пьезопреобразователя можно в любой момент времени определить величину создаваемого потока вещества  $\Delta M/\Delta t$ . Изменение

потока вещества осуществляют путем нагрева или охлаждения поверхности массочувствительного пьезопреобразователя или самой камеры с помощью устройства для изменения и регулировки температуры.

В качестве массочувствительных пьезопреобразователей были исследованы пьезоэлектрические резонаторы объемных акустических волн типа "сдвиг по толщине" с частотами 14 МГц, 16.5 МГц и 21 МГц и линия задержки на поверхностных акустических волнах с частотой 330 МГц. Как следует из формулы (3.11), величина массовой чувствительности резонаторов пропорциональна квадрату частоты резонанса. Аналогичная зависимость справедлива и для линий задержки [306]. Поэтому можно предположить, что в генераторе микропотока предпочтительнее использовать высокочастотные пьезопреобразователи. Однако проведенные эксперименты показали, что величина отношения сигнал/шум выше при использовании резонаторов с частотами 14 МГц и 16.5 МГц. Основным фактором, ограничивающим возможность улучшения параметров генератора микропотока за счет увеличения частоты пьезопреобразователя, является быстрый рост частотного шума и снижение допустимой массовой нагрузки пьезопреобразователя – максимальной толщины покрытия для источника микропотока, при которой еще возможно обеспечить режим автоколебаний в электронном генераторе. Рост частотного шума обусловлен рядом факторов, среди которых наиболее важными являются: снижение добротности резонансной системы, рост шумов, вызванных воздействием внешних параметров, главным образом, температуры, и увеличение вклада модуля потерь в массовую чувствительность пьезопреобразователя. При работе с вязко-упругими покрытиями потери энергии колебаний для высокочастотных пьезопреобразователей становятся преобладающими, что значительно снижает диапазон массовой нагрузки и ограничивает возможность создания постоянного в течение длительного промежутка времени потока вещества.

В разработанном генераторе потока использовали два вида пьезоэлектрических кварцевых (АТ-срез кварца) резонаторов, работающих на первой механической гармонике с рабочими частотами 14 МГц и 16.5 МГц. Резонатор на 14 МГц (разработка ИФТТ БАН и ГЕОХИ РАН) оборудован пленочными металлическими нагревателями, которые выполнены в виде золотых

полосок, нанесенных на поверхность кварцевого диска вне электрода. Внешний вид резонатора приведен на рис. 5.4.

Высокочастотный электронный генератор, обеспечивающий работу резонаторов в колебательном режиме, выполнен по схеме емкостной трехточки на СВЧ-транзисторах [307]. Частоту генератора измеряли с помощью серийного электронно-счетного частотомера типа РЧЗ-07-0002. Время счета частотомера выбирали равным 1 с (частота измерялась с погрешностью до 1 Гц) или 10 с (частота измерялась с погрешностью до 0.1 Гц). Измеренные частоты вносились в память компьютера. Контроллер ввода-вывода цифровой информации, осуществляющий сопряжение компьютера с электронно-счетным частотомером, конструктивно выполнен в виде отдельной платы, которая включалась в разъем для внешних периферийных устройств непосредственно на плате компьютера.

Встроенные пленочные микронагреватели применяли как для изменения температуры поверхности резонаторов с рабочей частотой 14 МГц, так и для ее стабилизации на заданном уровне. Система стабилизации основана на использовании сопротивления микронагревателей в качестве датчика температуры. Диапазон изменения температуры поверхности составляет  $20 \div 150^\circ\text{C}$ . Регулирование температуры поверхности резонаторов с рабочей частотой 16.5 МГц проводили с помощью внешнего нагрева камеры генератора микропотока паров вещества. С этой целью применяли резистивный нагреватель, представляющий собой нихромовую проволоку, находящуюся в контакте с камерой. Температуру поверхности камеры контролировали в диапазоне  $20 \div 200^\circ\text{C}$  с использованием термопары типа хромель-алюмель.

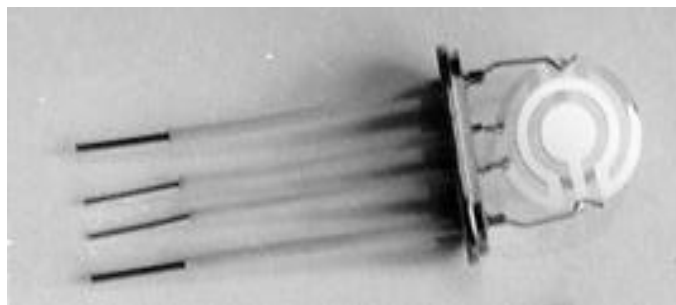


Рис. 5.4. Внешний вид пьезоэлектрического резонатора с пленочными нагревателями (рабочая частота 14 МГц).



### 5.1.2.2. Источник микропотока паров вещества

Источник микропотока паров вещества наносили на электроды резонаторов путем осаждения из раствора. Нанесенный раствор высушивали в атмосфере до полного удаления растворителя. В частном случае, при создании потока паров твердых соединений с низкой летучестью, наносили раствор самого вещества. Для таких веществ величина потока определяется скоростью их сублимации. В качестве примера на рис. 5.5 представлена зависимость массы кофеина, поступившего в газовую фазу при температуре 25°C, от времени в процессе сублимации в отсутствие потока газа-носителя через камеру. Изменение массы определяли по изменению частоты резонатора по формуле (3.12). Из приведенных данных видно, что зависимость близка к линейной, и следовательно, средняя величина потока кофеина остается постоянной в течение всего времени измерения. За время 10 часов уменьшение массы резонатора, вызванное сублимацией кофеина, составило величину примерно 40 нг. Соответственно, средняя величина потока кофеина при комнатной температуре составляет 1.2 нг/с или  $3.7 \times 10^9$  молекул/с. Изменяя температуру поверхности резонатора, а также величину расхода газа-

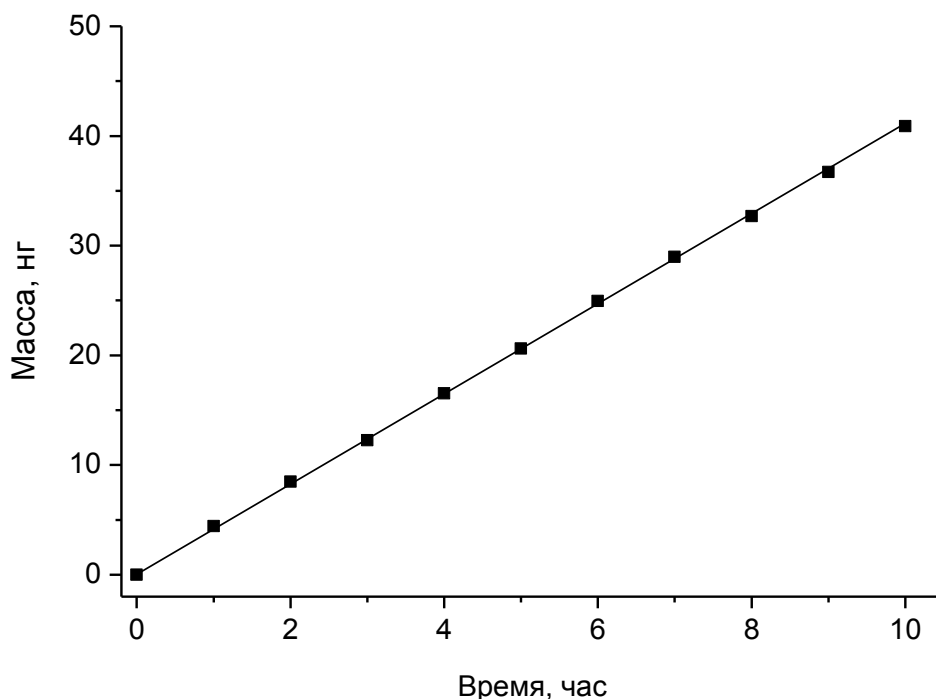


Рис. 5.5. Зависимость массы кофеина, поступившего в газовую фазу в процессе сублимации, от времени. Масса кофеина, нанесенного на резонатор, составляла 17 мкг.

носителя, можно менять концентрацию кофеина в газе на выходе генератора микропотока в диапазоне до четырех порядков величины.

Очевидно, что использование чистых веществ с целью создания потока их паров возможно только для ограниченного числа химических соединений с низкой летучестью. Для решения проблемы создания малых потоков паров высоколетучих соединений предложено использовать в качестве источника микропотока композиционный материал, представляющий собой инертную нелетучую матрицу с введенным в нее веществом, поток паров которого требуется создать. При таком решении снимаются ограничения на агрегатное состояние – в матрицу можно ввести не только жидкие, но и газообразные вещества. Введенное в матрицу вещество диффундирует к границе раздела фаз «матрица – воздух» и испаряется, создавая таким образом поток вещества с поверхности, который определяется по изменению частоты массочувствительного пьезопреобразователя.

Для создания длительных во времени и малых по величине потоков вещества матрица должна обладать высокой сорбционной емкостью и относительно высокой энергией связи молекул матрицы с молекулами вещества. Кроме того, при выборе материала для матрицы необходимо учитывать ряд дополнительных требований, обусловленных особенностями работы массочувствительного преобразователя. Можно выделить следующие требования:

- высокий модуль упругости нанесенного на пьезопреобразователь слоя;
- хорошая адгезия к материалу рабочей поверхности преобразователя;
- однородность сорбционного слоя по толщине;
- растворимость матрицы в каком-либо летучем растворителе;
- стабильность нанесенного слоя в атмосфере и при нагреве.

Поиск материалов, удовлетворяющих этим требованиям, был проведен среди органических полимерных веществ, являющихся эффективными сорбентами аммиака, гидразина, аминов и других высокоосновных азотсодержащих соединений. Одна из характерных особенностей химического поведения таких соединений – это комплексообразующие свойства, которые объясняются способностью атомов азота выступать в качестве донорных лигандов и образовывать координационные связи с ионами металлов. Другая химическая особенность – это способность вступать в кислотно-основное взаимодействие с

веществами, обладающими кислотными свойствами. Поэтому в качестве матрицы были исследованы представители двух различных классов полимерных веществ: комплексы полиэтилениминов, модифицированных различными акрилатами, с хлоридами меди, кобальта и палладия и полимерные карбоновые кислоты с разной степенью внутримолекулярной ассоциации карбоксильных групп. Изученные соединения являются эффективными сорбентами и разрабатывались в качестве чувствительных покрытий пьезорезонансных сенсоров для определения аммиака и несимметричного гидразина.

В результате сравнительных исследований установлено, что лучшими свойствами для использования в качестве матрицы в источнике микропотока паров веществ с высокой летучестью обладает ПМК. К достоинствам ПМК можно отнести высокую допустимую массовую нагрузку резонатора (до 100 мкг сорбента) и высокую сорбционную емкость (до 50% по аммиаку). Вследствие высоких значений энергии связи высокоосновных соединений с кислотными карбоксильными группами ПМК десорбция введенных в матрицу веществ протекает при комнатной температуре сравнительно медленно, что позволяет создавать малые потоки в течение длительного времени.

Иллюстрацией этому может служить приведенная на рис. 5.6 зависимость массы N,N-диметилгидразина, поступившего в газовую фазу, от времени при использовании матрицы из ПМК. Сорбент наносили на резонатор путем осаждения из 1% раствора в воде. Затем резонатор с нанесенным сорбентом выдерживали в насыщенных парах N,N-диметилгидразина, вводя таким образом вещество в матрицу. (Можно использовать и другой вариант – вводить вещество в раствор поликислоты и затем осаждать раствор на рабочую поверхность резонатора). По изменению рабочей частоты резонатора определяется как масса нанесенного слоя ПМК, так и масса сорбента с N,N-диметилгидразином.

Десорбция введенного в матрицу вещества приводит к изменению частоты резонатора. Из приведенной на рис. 5.6 зависимости видно, что в условиях эксперимента средняя величина потока N,N-диметилгидразина с резонатора в начальные моменты времени составляет 1.4 нг/с. Скорость десорбции уменьшается со временем, что может быть использовано для создания меньших по величине потоков вещества. Варьируя расход газа-носителя, а также применяя его

разбавление чистым воздухом, можно создавать потоки с концентрацией N,N-диметилгидразина до 0.1 ppb.

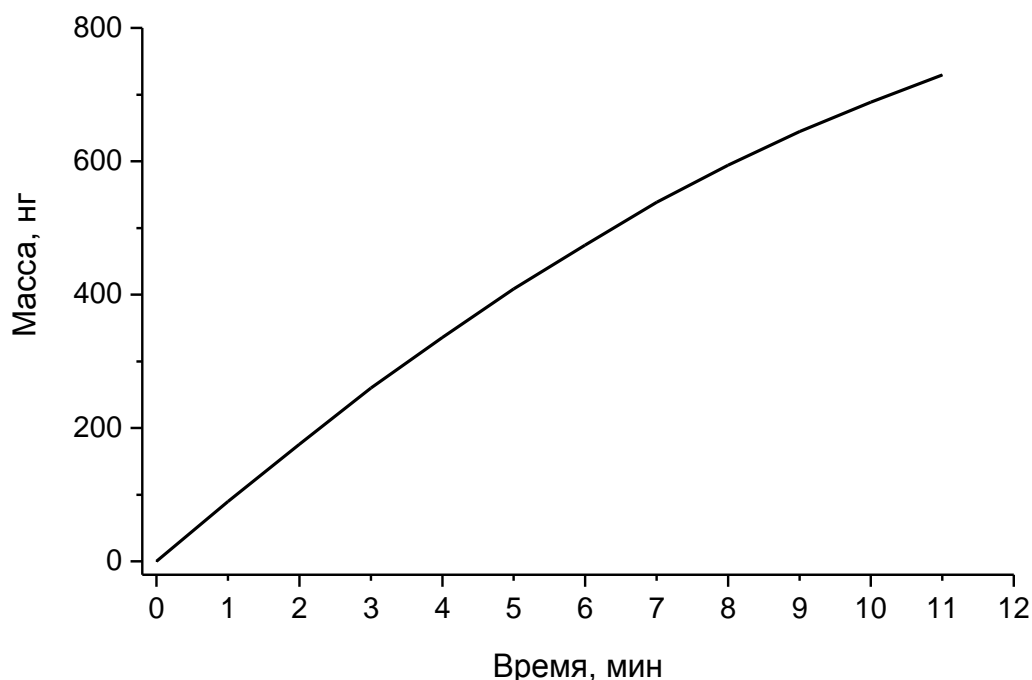


Рис. 5.6. Зависимость изменения массы резонатора от времени в процессе десорбции N,N-диметилгидразина из матрицы на основе ПМК. Масса введенного в матрицу N,N-диметилгидразина составляла 4.3 мкг.

Близкими к ПМК характеристиками обладает и ПАК. Основное различие связано с меньшей сорбционной емкостью ПАК и большей скоростью десорбции введенных в нее веществ по сравнению с ПМК. Поэтому матрицу на основе ПАК целесообразно использовать для создания потока веществ с меньшей летучестью. Для соединений с низкой летучестью эффективны также матрицы на основе поли[-N-2-*n*-децил-оксикарбонилэтил]этиленimina (пДКЭЭИ) с хлоридом меди (II) состава  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{пДКЭЭИ}$ .

Такие свойства, как возможность создания и измерения сверхмалых потоков вещества, низкая погрешность определяемой величины потока, широкий круг веществ (в том числе жидких и газообразных), а также малые размеры, выделяют преимущества разработанного генератора микропотока перед известными устройствами и системами. Низкая величина погрешности создания микропотока

обусловлена возможностью быстрого и точного определения величины изменения массы вещества, нанесенного на рабочую поверхность пьезопреобразователя. Например, для использованных в работе резонаторов типичный уровень частотного шума составляет величину порядка 1 Гц, что позволяет определять изменение массы с точностью до 1 нг и ниже. Величина потока вещества находится из средней скорости изменения частоты резонатора, и при длительном (более 1000 с) непрерывном измерении частоты величина потока может быть определена с точностью до 1 пг/с. Непрерывное измерение скорости изменения частоты позволяет также контролировать в каждый момент времени величину создаваемого потока и, в соответствии с измеренными значениями скорости изменения частоты, регулировать поток в нужных пределах путем нагрева или изменения расхода газ-носителя. Прямой и непрерывный контроль величины потока позволяет избежать ошибок, неизбежных в тех случаях, когда поток вещества рассчитывают по косвенным данным.

При проведении анализа газовых сред методом SALDI с нанесением пробы на эмиттер ионов при атмосферном давлении разработанный генератор микропотока паров вещества выполняет роль, аналогичную эффузионной ячейке Кнудсена при нанесении пробы в вакууме. Формируя малый поток хорошо изученного соединения с известной концентрацией и регистрируя его масс-спектр, можно непрерывно контролировать ионизационные свойства эмиттера ионов, что является важным условием для проведения количественного анализа методом SALDI. Само соединение, поток которого создается, может быть использовано в качестве внешнего стандарта при определении содержания целевых компонентов в атмосфере.

### ***5.1.3. Определение содержания паров органических соединений в атмосферном воздухе***

#### ***5.1.3.1. Выбор подложки - эмиттера ионов***

Рассмотренные в главе 4 способы получения кремниевых эмиттеров ионов разрабатывались, прежде всего, для формирования подложек, которые используются в условиях высокого вакуума. Поэтому на предварительном этапе была изучена возможность применения таких подложек для анализа атмосферы. В

условиях выноса подложки на воздух степень химического воздействия на активную поверхность много больше, чем в вакууме, и, следовательно, значительно более высокими величинами характеризуются фоновые ионные сигналы. Это, например, хорошо видно при сравнении масс-спектра на рис. 2.15 и масс-спектра на рис. 5.7, зарегистрированного после экспонирования в атмосфере лабораторного помещения в течение 20 с подложки, полученной лазерной обработкой кремния.

Поскольку аморфный кремний  $\alpha$ -Si, пористый кремний, полученный травлением в парах  $I_2$  и HF, и кремний, полученный лазерной обработкой, характеризуются близкими значениями эффективности ионизации одних и тех же соединений, особое значение приобретают такие свойства, как стабильность ионизационных свойств эмиттера ионов в процессе эксплуатации, а также высокая сорбционная емкость. В этом отношении  $\alpha$ -Si уступает другим подложкам. Как показали исследования, для анализа атмосферы лучше использовать пористый кремний и кремний, полученный лазерной обработкой.

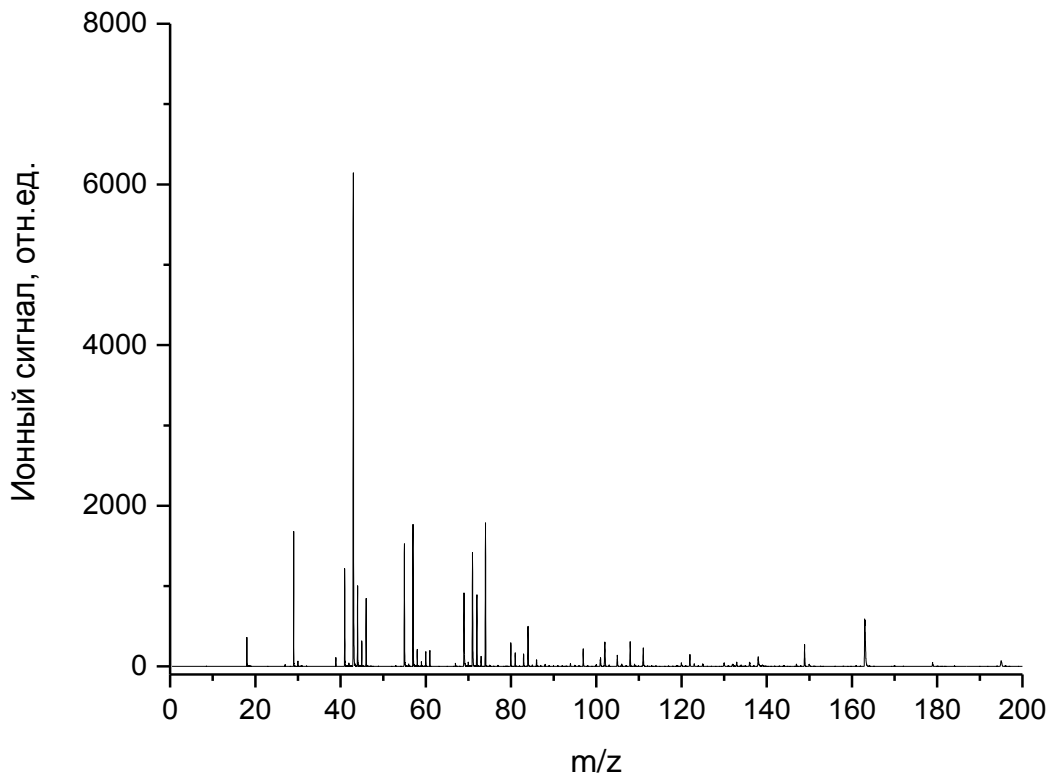


Рис. 5.7. Масс-спектр пробы атмосферного воздуха в лабораторном помещении. Время экспонирования подложки 20 с.

К достоинствам пористого кремния относится его высокая сорбционная емкость, которая позволяет обеспечить широкий диапазон определяемых содержаний аналита. Кроме того, это свойство может быть использовано для концентрирования аналита на поверхности при длительном экспонировании подложки в потоке анализируемого воздуха. Поэтому подложки пористого кремния, полученного травлением в парах  $I_2$  и  $HF$ , целесообразно применять (после проведения лазерно индуцированной активации) для определения следовых количеств паров аналитов с использованием накопления молекул определяемых соединений на его поверхности. Основной недостаток пористого кремния – постепенное необратимое ухудшение ионизационных свойств, обусловленное, в частности, окислением его поверхности, а также накоплением на ней малолетучих соединений (например, компонентов вакуумного масла). Порог разрушения пористого слоя при лазерном воздействии может быть ниже порога десорбции некоторых соединений, присутствующих в воздухе. Существенное (более чем в два раза) уменьшение ионного сигнала аналита отмечалось после  $10^3 \div 10^4$  циклов «нанесение пробы – десорбция ионов».

Постепенная деградация ионизационных свойств наблюдалась и у кремниевых подложек, сформированных лазерной обработкой. Однако, в отличие от других способов получения эмиттеров ионов, повторная двухстадийная лазерная обработка дает возможность восстановить ионизационные свойства поверхности, как это показано в главе 4. При анализе атмосферы происходит относительно быстрое окисление активной поверхности, поэтому в разработанный способ необходимо ввести дополнительную стадию для удаления оксидного слоя. С этой целью может быть использована предварительная обработка поверхности фтористоводородной кислотой. Другой вариант – удаление оксидного слоя путем лазерной абляции. В этом случае формирование активной поверхности при воздействии лазерного излучения проводят в три стадии. На первой стадии на подложку воздействуют излучением с плотностью энергии, достаточной для абляции верхнего слоя (свыше  $100 \text{ мДж/см}^2$ ). Такая обработка позволяет удалить не только оксидный слой, но и адсорбированные на нем высокомолекулярные соединения. Затем формируют активный слой в две стадии по способу, рассмотренному в разделе 4.3.1. Такой трехстадийный процесс лазерной обработки

можно повторять многократно с целью воспроизводимого получения активных поверхностей кремниевых эмиттеров ионов для анализа атмосферы методом SALDI.

### ***5.1.3.2. Аналитические характеристики***

Рис. 5.8 иллюстрирует работу системы ввода проб на основе вращающегося шара на примере определения триэтиламина в воздухе. В условиях эксперимента использовали две кремниевые подложки, полученные лазерной обработкой. Подложки устанавливали симметрично по диаметру шара. На одну из них подавали поток воздуха, а вторая в это время находилась в ионном источнике и облучалась лазером. Затем шар поворачивали на пол-оборота, и процесс повторялся. Время экспозиции подложки и, соответственно, время воздействия излучением составляло 10 с.

На рис. 5.8а приведена зависимость ионного сигнала в области масс-спектра, соответствующей протонированным молекулам триэтиламина, от времени при последовательном проведении нескольких циклов вращения шара. Первые семь циклов соответствуют экспозиции в потоке воздуха лаборатории, не содержащего аналит, следующие семь циклов – воздействию потока воздуха с концентрацией триэтиламина  $0.2 \text{ мкг/м}^3$  (80 ppt), и последние пять циклов – вновь воздействию потока воздуха лаборатории. Концентрацию аналита находили по показаниям генератора микропотока и расходомера (Mass-view, Bronkhorst, Нидерланды).

На рис. 5.8б и 5.8в представлены масс-спектры, зарегистрированные, соответственно, в холостом (контрольном) опыте и при вводе пробы. Видно, что добавление в пробу воздуха паров триэтиламина сразу приводит к появлению в масс-спектрах интенсивного пика с  $m/z$  102, соответствующего протонированным молекулам соединения. Важно также, что ионный сигнал аналита не регистрируется в последних пяти циклах на рис. 5.8а, т.е. в холостых опытах, проведенных сразу после ввода пробы с аналитом (за исключением первого из них, в котором регистрировался остаточный сигнал низкой интенсивности). Этот факт свидетельствует о том, что использование ввода пробы на основе вращающегося шара дает возможность отслеживать изменение концентрации определяемых соединений в воздухе. Приведенные на рис. 5.8а данные позволяют также оценить воспроизводимость результатов анализа в условиях эксперимента. Относительное



стандартное отклонение ионного сигнала триэтиламина в эксперименте ( $N=7$ ) составило примерно 0.04. Близкие значения получены и для других исследованных соединений.

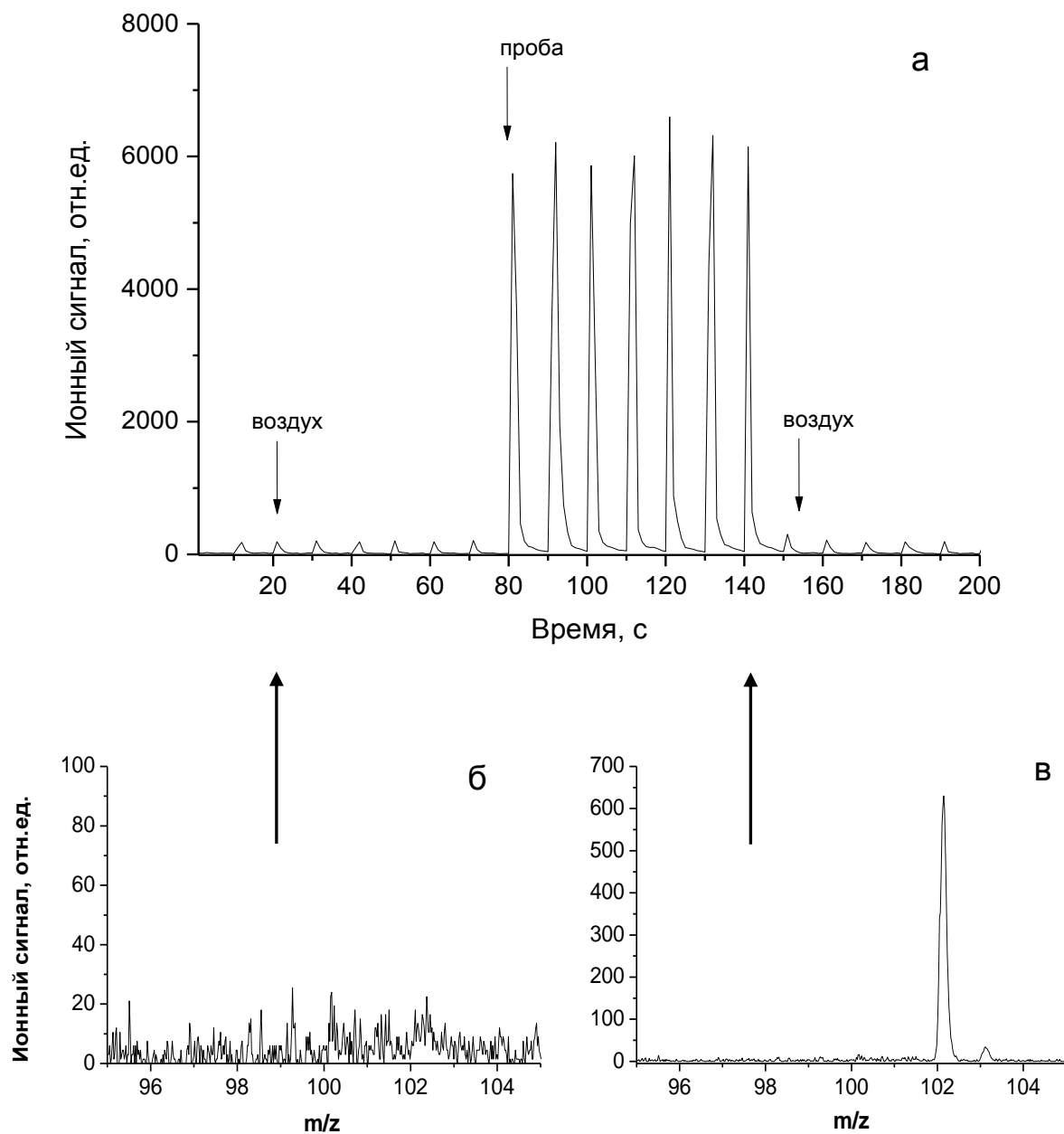


Рис. 5.8. Зависимость ионного тока в области протонированных молекул триэтиламина от времени при анализе воздуха с использованием вращающегося шара (а); масс-спектр, зарегистрированный в холостом (контрольном) опыте (б); масс-спектр, зарегистрированный после воздействия на подложку в течение 10 с потоком воздуха с концентрацией триэтиламина  $0.2 \text{ мкг/м}^3$ .

Анализ масс-спектров, зарегистрированных в условиях нанесения пробы при атмосферном давлении, не выявил значительных отличий по сравнению со спектрами этих же соединений, полученных при газо-хроматографическом вводе пробы. Основное различие проявляется при исследовании других аналитических параметров – чувствительности и диапазона определяемых концентраций. При анализе атмосферы коэффициенты чувствительности соединений обычно в несколько раз ниже и, кроме того, могут меняться во времени в зависимости от химического состава атмосферы. Диапазон линейности градуировочных зависимостей аналитов также значительно меньше в условиях нанесения пробы при атмосферном давлении.

Очевидной причиной ухудшения аналитических характеристик является влияние «матричных эффектов» на результаты определения аналитов. Как показали эксперименты, наиболее существенное влияние на чувствительность оказывают присутствующие в воздухе пары органических соединений с низкой летучестью, например, компоненты вакуумного масла или пластификаторы, которые входят в состав ряда материалов, часто используемых в масс-спектрометрических устройствах. Негативное воздействие такого рода мешающих компонентов связано с пассивацией активной поверхности эмиттера ионов в результате их сорбции на подложке. Как следствие, снижается чувствительность по отношению к аналиту и уменьшается диапазон определяемых концентраций. Кроме этого, специфичного для SALDI «матричного эффекта», на чувствительность анализа может влиять и эффект «подавления ионизации», который проявляется при анализе воздуха, содержащего несколько высокоосновных компонентов с высокими концентрациями. «Подавление ионизации» обусловлено различием величин энергии сродства к протону у различных соединений, что приводит к перераспределению заряда между ними в плотном облаке десорбированных частиц. В условиях высоких концентраций мешающих соединений и в отсутствие систем, обеспечивающих разделение компонентов при on-line анализе атмосферы, ионы аналита могут быть частично нейтрализованы в результате реакции переноса протона при взаимодействии с высокоосновными компонентами. Такой эффект также проявляется в снижении чувствительности по отношению к аналиту.

Можно выделить несколько способов, позволяющих уменьшить или учесть влияние «матричных эффектов» на результаты анализа:

- правильный выбор конструкционных материалов и, в частности, уплотнительных элементов, при разработке масс-спектрометрической установки для on-line анализа газовых сред;

- использование камеры, заполненной инертным газом (например, азотом) для ввода пробы. При таком решении на активную поверхность подложки будут сорбироваться, в основном, только компоненты самой пробы, которая подается через прогреваемый капилляр;

- применение генератора микропотока паров соединения, характеристики которого в условиях SALDI хорошо известны, для непрерывного контроля ионизационных свойств эмиттера ионов и в качестве внешнего стандарта при определении аналитов. В роли характеристического соединения оптимально, по-видимому, использовать изотопно-меченые аналоги аналитов, которые позволяют наиболее корректно учесть «матричные эффекты». Однако для большинства задач достаточно применять соединения с близкими химическими свойствами.

- регулярное восстановление ионизационных свойств поверхности кремниевых подложек путем лазерной обработки. Индикатором деградации эмиттера ионов может служить изменение ионного сигнала тестового вещества, подаваемого на подложку с помощью генератора микропотока.

В целом, шаровой интерфейс ввода проб в сочетании с разработанными способами формирования эмиттера ионов, а также со способами уменьшения и учета «матричных эффектов» дают возможность проводить количественный анализ и осуществлять непрерывный контроль химического состава атмосферы.

## **5.2. Лазерная десорбция/ионизация для определения нелетучих соединений**

Система ввода проб на основе вращающегося шара в сочетании с масс-спектрометрической установкой на рис. 5.2 может быть использована для анализа не только газообразных, но и жидких образцов – растворов нелетучих соединений. Основное различие между этими видами анализа заключается в способе нанесения определяемых соединений на поверхность кремниевой подложки. Вариант,

который используется в большинстве работ по применению кремниевых подложек для SALDI, – это капельное нанесение раствора на поверхность эмиттера ионов. Требуемый объем раствора аналита отбирают дозатором и переносят на подложку. После испарения растворителя подложку перемещают в ионный источник и проводят анализ пробы. Достоинством способа является простота исполнения. Кроме того, малый объем наносимой пробы предполагает возможность концентрирования аналита, например, концентрирования в каплю. К недостатками способа следует отнести неоднородное распределение молекул определяемых соединений по поверхности эмиттера ионов, а также необходимость длительного выдерживания подложки в воздухе для полного испарения растворителя, т.к. растворитель, оставшийся на поверхности подложки, влияет на чувствительность и воспроизводимость анализа.

Более эффективным способом нанесения пробы представляется распыление анализируемых растворов и, в частности, применение стандартного метода электрораспыления при атмосферном давлении.

### ***5.2.1. Нанесение проб электрораспылением***

Метод электрораспыления растворов при атмосферном давлении известен давно, а в масс-спектрометрии он широко используется как способ ионизации химических соединений (электроспрей). Электрораспыление растворов для нанесения аналита на эмиттер ионов в методе SALDI предложено в работе [221]. Преимуществами электрораспыления по сравнению с капельным способом являются равномерность, стабильность и более высокая воспроизводимость нанесения пробы. Немаловажным фактором является также то, что в процессе электрораспыления растворитель эффективно испаряется, и большая его часть на подложку не попадает.

Для проведения экспериментов по определению нелетучих соединений масс-спектрометрическую установку на рис. 5.2 оборудовали системой электрораспыления на основе шприцевого насоса KDS-100-CE (KD Scientific). Игла электроспрейного распылителя располагалась на расстоянии 0.7 см от поверхности подложки, установленной на вращающемся шаре. Нанесение пробы проводили при атмосферном давлении при выносе подложки на воздух.

На предварительном этапе исследований были найдены оптимальные условия нанесения аналита из растворов. К основным факторам, определяющим процесс электрораспыления, относятся: расход пробы, напряжение на игле электрораспылителя и химический состав раствора. Установлено, что наиболее стабильные и устойчивые условия распыления достигаются при напряжении на игле электрораспылителя  $2.8 \div 3$  кВ, а оптимальное значение расхода (скорости подачи раствора) при нанесении пробы составляет величину  $100 \div 120$  мкл/час. При больших значениях скорости ухудшается воспроизводимость и равномерность нанесения, а также увеличивается количество растворителя, попадающего на подложку. При меньших значениях скорости уменьшается количество аналита, поступающего в масс-анализатор в единицу времени, а при значениях расхода менее 60 мкл/час быстро теряется стабильность и устойчивость электрораспыления. При постоянной величине расхода количество нанесённого на подложку аналита можно варьировать, изменяя его концентрацию в растворе и время распыления. Рис. 5.9 на примере определения резерпина иллюстрирует типичную зависимость ионного сигнала аналита от времени электрораспыления (нанесения пробы) при величине расхода 120 мкл/час и концентрации резерпина 20 нг/мл. Видно, что в диапазоне времени  $3 \div 30$  с ионный сигнал линейно возрастает с увеличением длительности процесса распыления пробы.

Важный фактор, влияющий на эффективность электрораспыления – это состав растворителя. Выбор растворителя определяется, главным образом, природой самого аналита, а также условиями предварительной пробоподготовки, обычно включающей стадию экстракции. Кроме того, ввиду специфики применения, растворитель должен быть достаточно летучим. Однако не все растворители могут быть использованы для нанесения пробы. Например, процесс электрораспыления не протекает в чистом хлороформе. В этих случаях для нанесения пробы необходимо использовать смеси растворителей. В частности, для эффективного электрораспыления растворов аналита в хлороформе можно добавлять в растворитель метанол или ацетонитрил. Уже при составе смеси хлороформ:метанол 9:1 процесс распыления становится стабильным. В качестве растворителей в работе использовали метанол, воду, ацетонитрил, хлороформ и их смеси с различными соотношениями компонентов.

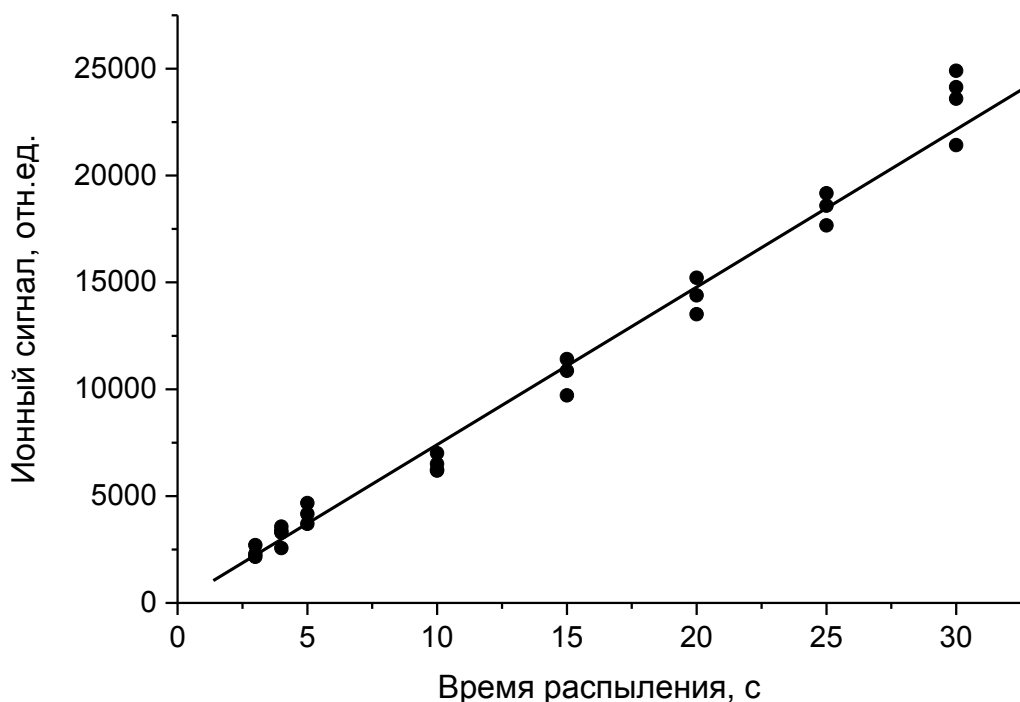


Рис. 5.9. Зависимость величины ионного сигнала резерпина от длительности нанесения пробы (времени распыления). Концентрация резерпина 20 нг/мл, растворитель – хлороформ+ацетонитрил (9:1). Подложка –  $\alpha$ -Si.

Состав растворителя влияет также на угол расходимости распыления, и следовательно, на размер пятна, занимаемого нанесенным на поверхность подложки аналитом. При длительном распылении размер пятен можно наблюдать визуально под микроскопом. Найденные таким образом величины диаметра пятен аналита в условиях эксперимента (расход раствора 120 мкл/час, расстояние между иглой и подложкой 7 мм) составили: 2.5 мм при использовании смеси хлороформ+ацетонитрил (9:1), 3 мм – ацетонитрила и 5 мм – смеси метанол+вода (9:1). Для этих же растворителей величины тока распыления составили, соответственно, 1, 3 и 50 пА. Близкие результаты по определению размера пятен были получены и при построении масс-спектрометрических изображений пятен путем сканирования подложек лазерным лучом.

Зная длительность электрораспыления, расход пробы, диаметр пятна на поверхности и размер кадра сканирования, можно найти количество аналита, нанесенного на подложку и на площадь, облучаемую лазером.

Другим вопросом является влияние растворителя на эффективность ионизации в условиях нанесения растворов на поверхность эмиттера ионов. Как отмечено в главе 1, в известных моделях процесса SALDI растворителю отводилась важная роль. Результаты анализа проб с одинаковой концентрацией аналита в различных растворителях показали, что в условиях нанесения растворов электрораспылением эффективность ионизации не зависит от того, какие растворители применяются. Например, эффективность ионизации не меняется при замене протонного растворителя метанол+вода на апротонный ацетонитрил. Этот факт является дополнительным свидетельством в пользу предложенного в главе 3 механизма SALDI на кремниевых поверхностях.

### ***5.2.2. Аналитические характеристики***

Воспроизводимость ионного сигнала в условиях нанесения растворов методом электрораспыления иллюстрирует рис. 5.10, на котором приведена зависимость ионного тока протонированных молекул аргинина ( $m/z$  175) от времени при последовательном проведении нескольких циклов вращения шара. В эксперименте использовали одну подложку пористого кремния, предварительно активированного лазерным излучением. Первые два цикла пробу не наносили, следующие семь циклов соответствуют нанесению пробы в течение 5 с путем электрораспыления раствора аргинина с концентрацией 18 нг/мл в смеси метанол+вода (9:1), следующие три цикла пробу не наносили, и заключительные три цикла снова соответствуют нанесению пробы. Видно, что вид зависимости аналогичен той, которая получена при анализе воздуха на рис. 5.8а. В каждом цикле нанесения пробы максимум ионного сигнала регистрируется в первом скане при сканировании поверхности лазерным излучением. Затем сигнал аналита быстро уменьшается, что соответствует десорбции с подложки определяемого соединения. В эксперименте, представленном на рис. 5.10, аргинин не наносили во время циклов 10-12, однако в цикле 10 наблюдается небольшой остаточный сигнал аналита. Этот факт можно объяснить диффузией аргинина из глубины пористой структуры и, возможно, с периферии облученной области. При возобновлении распыления раствора аргинина в цикле 13 ионный сигнал аналита восстанавливается на прежнем уровне.

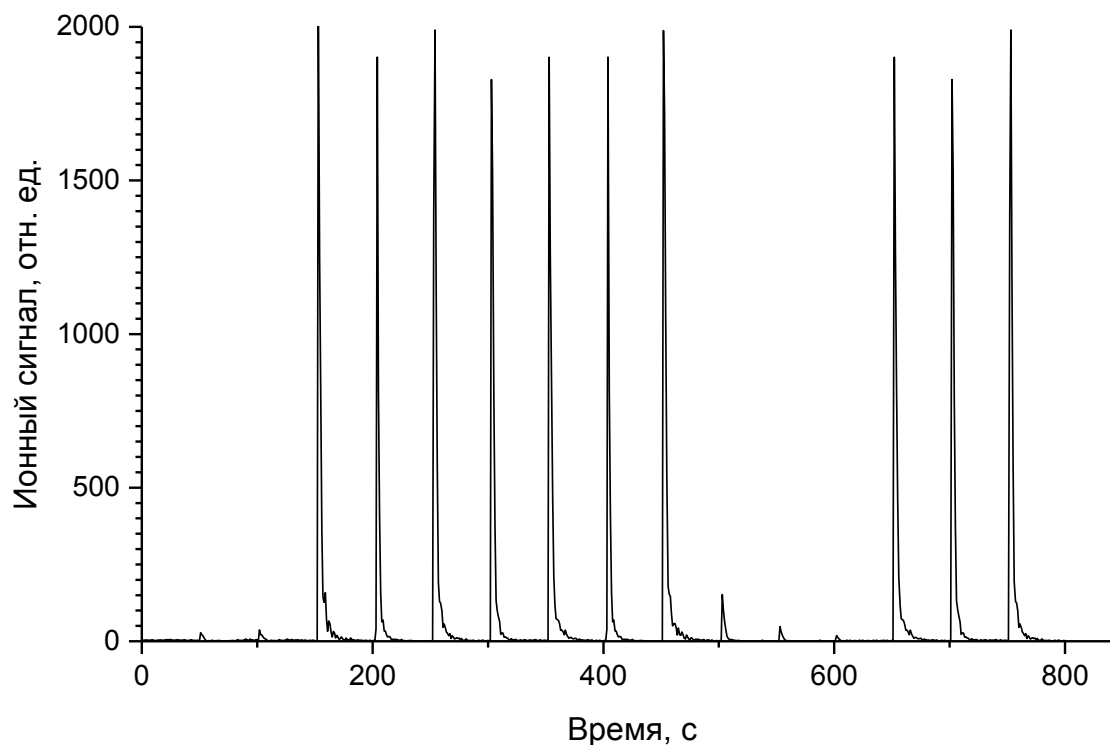


Рис. 5.10. Зависимость ионного тока аргинина от времени в 15 последовательных циклах вращения шара. Пробу наносили электрораспылением в циклах 3-9 и 13-15. Концентрация аргинина в смеси метанол:вода (9:1) – 18 нг/мл, длительность одного цикла распыления – 5 с, подложка – активированный пористый кремний.

Нанесение растворов нелетучих соединений методом электрораспыления в сочетании с системой ввода проб на основе вращающегося шара обеспечивает высокую воспроизводимость результатов анализа. Например, относительное стандартное отклонение ионного сигнала аргинина в эксперименте на рис. 5.10 составляет величину менее 0.04. Близкие значения получены и для других аналитов и других растворителей. При анализе различных проб, проведенных в различные дни, воспроизводимость результатов хуже, поскольку на результаты анализа влияют дополнительные факторы, в частности, погрешность приготовления пробы, погрешность формирования активной поверхности, «матричные эффекты». Здесь лучшие результаты достигнуты с использованием кремниевых подложек, полученных лазерной обработкой: относительное стандартное отклонение для всех исследованных аналитов не превышало 0.10. Полученные результаты



свидетельствуют о том, что разработанный способ анализа и его приборная реализация позволяют проводить количественное определение нелетучих соединений в растворах. Однако для обеспечения точности при анализе реальных проб во многих случаях необходимо использовать внутренние стандарты, среди которых лучшими являются изотопно-меченые аналоги определяемых соединений.

Разработанная технология была апробирована для определения лекарственных и других биологически активных веществ. Как и в условиях газофазного ввода пробы, «мягкие» условия ионизации сохраняются в SALDI и при нанесении растворов электрораспылением. Масс-спектры многих исследованных соединений содержат единственный пик, соответствующий протонированным молекулам аналита. В качестве примера на рис. 5.11 представлен масс-спектр одного из таких соединений – дротаверина (действующего вещества лекарственного препарата «Но-Шпа»).

Масс-спектры других исследованных соединений обычно содержат один или несколько пиков фрагментных ионов. Анализ масс-спектров таких аналитов позволяет сделать вывод, что основные направления фрагментации определяются

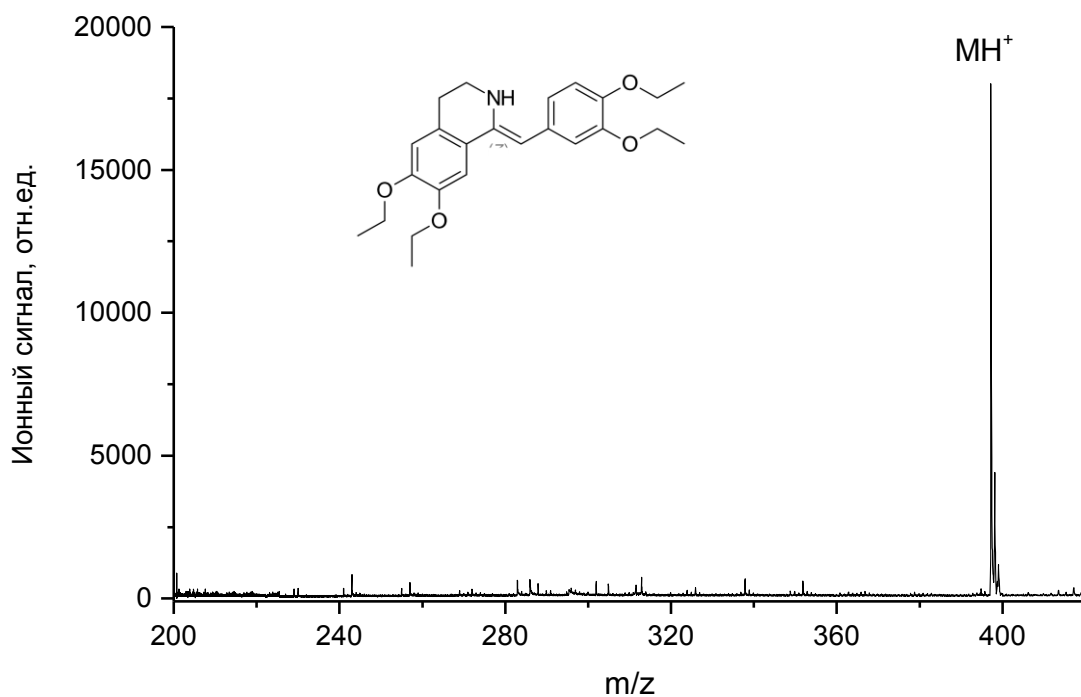


Рис. 5.11. Масс-спектр дротаверина, зарегистрированный при анализе раствора соединения в смеси метанол:вода (1:1). Подложка – кремний, полученный лазерной обработкой.

структурой протонированных молекул нелетучих соединений и соответствуют схемам, предложенным в главе 4 для описания фрагментации близких по химическим свойствам летучих соединений с меньшими молекулярными массами. Хорошей иллюстрацией является рис. 5.12а, на котором приведен масс-спектр верапамила. Масс-спектр содержит три основных пика, которые соответствуют протонированным молекулам верапамила с  $m/z$  455, а также фрагментным ионам с  $m/z$  165 и  $m/z$  303. Формирование иона с  $m/z$  165 описывается схемой 4.1 и обусловлено  $\alpha$ -разрывом C–N связи с образованием карбокатиона и нейтральной молекулы амина. Как отмечено в главе 4, при оптимальных значениях плотности лазерной энергии этому каналу обычно соответствуют наиболее интенсивные пики фрагментных ионов в масс-спектрах. Ионы с  $m/z$  303 образуются при фрагментации протонированных молекул верапамила по схеме 4.2, которая описывает внутримолекулярный перенос атома водорода от заряженного центра (протонированного азота аминогруппы) и образование перестроенного иона с двойной C=N связью.

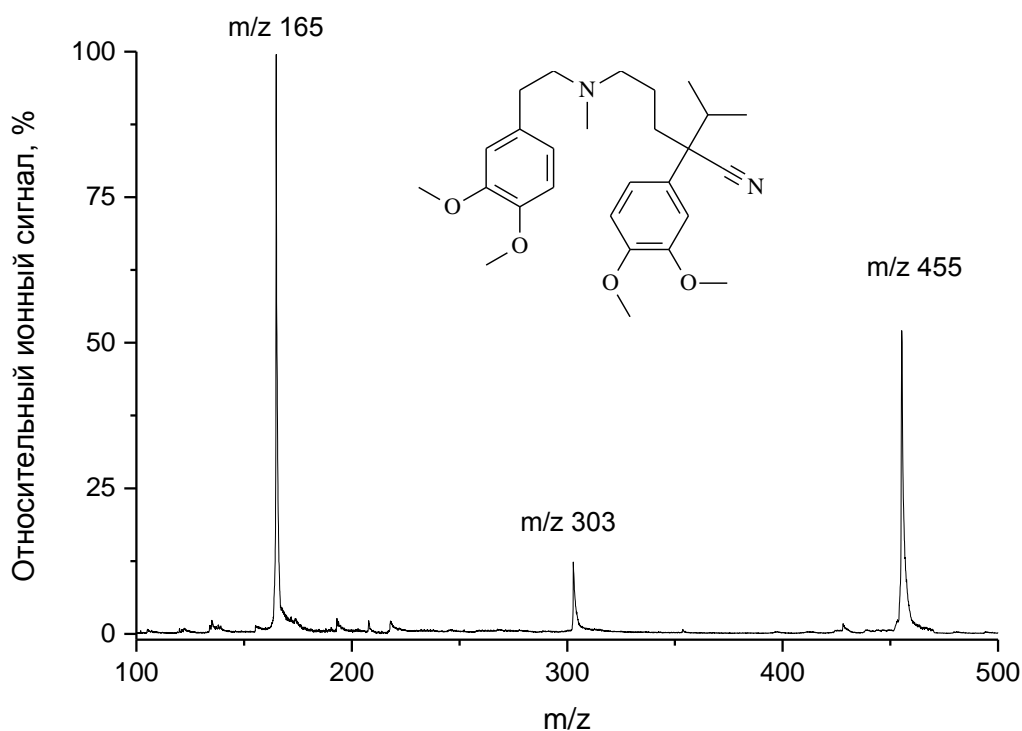


Рис. 5.12. Масс-спектр верапамила, зарегистрированный при анализе раствора соединения в смеси метанол:вода (1:1). Подложка – кремний, полученный лазерной обработкой, плотность энергии лазерного излучения 20 мДж/см<sup>2</sup>.

На рис. 5.13 представлена зависимость степени фрагментации верапамила от плотности энергии излучения. Характер зависимости аналогичен кривым, полученным при детектировании летучих соединений (например, на рис. 2.19): степень фрагментации возрастает при увеличении интенсивности излучения, причем заметный рост наблюдается примерно до 30 мДж/см<sup>2</sup>. Кроме того, доля ионов, образующихся по различным каналам фрагментации, также зависит от плотности энергии.

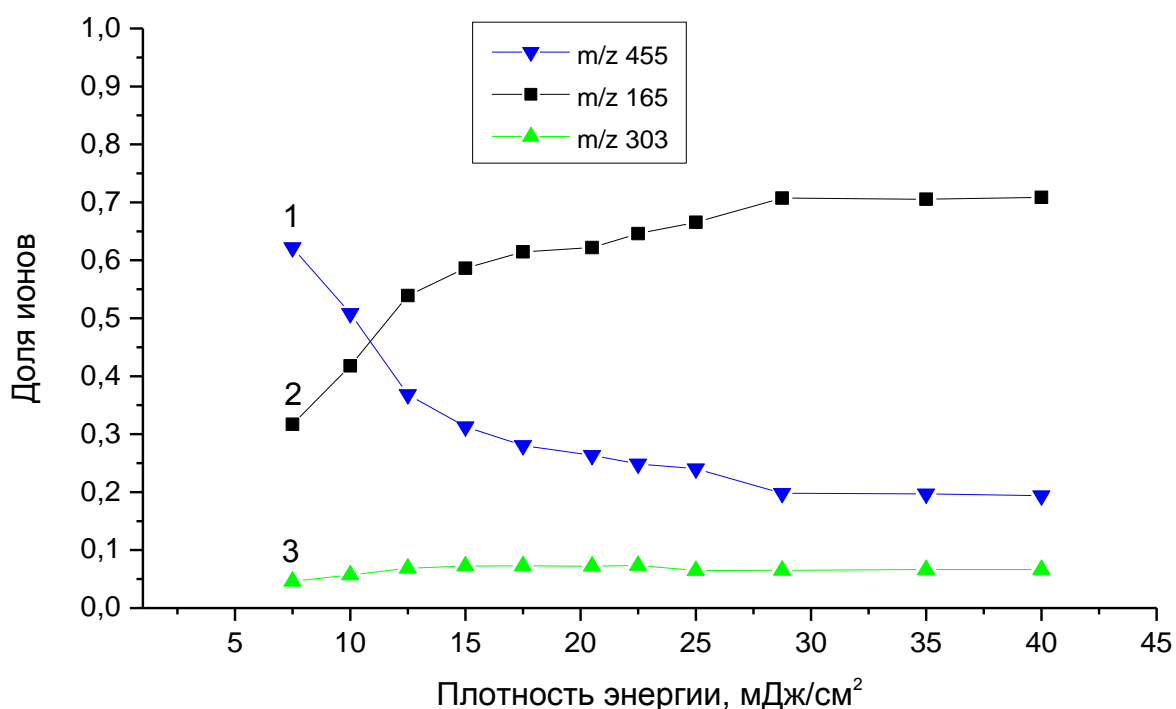


Рис. 5.13. Зависимость степени фрагментации верапамила от плотности энергии лазерного излучения: (1) – доля протонированных молекул с  $m/z$  455; (2) – доля фрагментных ионов с  $m/z$  165; (3) – доля фрагментных ионов с  $m/z$  303. Подложка – кремний, полученный лазерной обработкой.

Другим примером нелетучего соединения, протонированные молекулы которого фрагментируют в условиях SALDI, может служить хлоропирамин (действующее вещество лекарственного препарата «Супрастин»). Масс-спектр соединения, зарегистрированный при плотности энергии излучения 30 мДж/см<sup>2</sup>, приведен на рис. 5.14. Молекулы хлоропирамина содержат в своем составе атомы

хлора, характерное изотопное распределение которого значительно упрощает интерпретацию спектров. Видно, что кроме пика протонированных молекул аналита, в масс-спектре регистрируются также четыре интенсивных пика фрагментных ионов. Основные каналы образования фрагментных ионов соответствуют схемам 4.1 и 4.2 (пути фрагментации показаны на вставке к рис. 5.14). Большое число фрагментов по сравнению, например, с верапамилом, обусловлено особенностью молекулы хлоропирамина, которая содержит два центра протонирования с близкими значениями энергии сродства к протону. Существенно, что регистрируемые пики фрагментных ионов дают полезную информацию о структуре молекул определяемых соединений.

Как отмечено выше, электрораспыление широко используется для ионизации химических соединений, поэтому при определении эффективности ионизации и чувствительности метода представлялось важным оценить возможный вклад в ионный сигнал SALDI процесса электрораспыления. Весьма показательными в этом отношении являются эксперименты с изменением полярности напряжения на

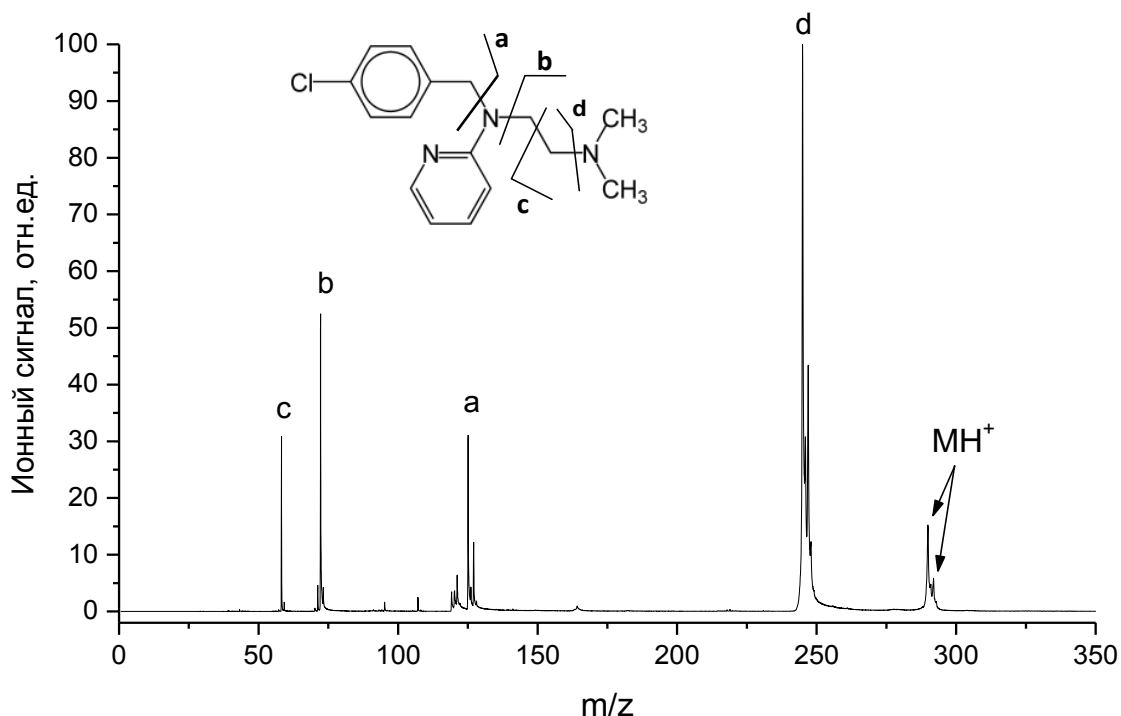


Рис. 5.14. Масс-спектр хлоропирамина (супрастина). Подложка – аморфный кремний  $\alpha$ -Si. На вставке показана структурная формула соединения и основные пути фрагментации.

игле электрораспылителя. Изменение положительного потенциала на противоположный приводит к изменению режима регистрации ионов в методе электрораспыления с положительного на отрицательный. Сравнение ионных сигналов SALDI показало, что для всех исследованных аналитов не наблюдается существенных различий в величинах выхода протонированных молекул при изменении полярности потенциала при электрораспылении. Этот факт свидетельствует о том, что практически все ионы, регистрируемые в масс-спектрах, образуются в процессе SALDI.

Для каждого определяемого соединения были построены градуировочные кривые в виде зависимости ионного сигнала от концентрации аналита в растворе. На рис. 5.15 приведена градуировочная зависимость, полученная при определении резерпина. Каждая точка на кривой представляет собой среднее значение ионного сигнала соединения, нанесенного на подложку в результате трех последовательных процедур электрораспыления раствора с соответствующей концентрацией. Продолжительность распыления во всех случаях составляла 10 с.

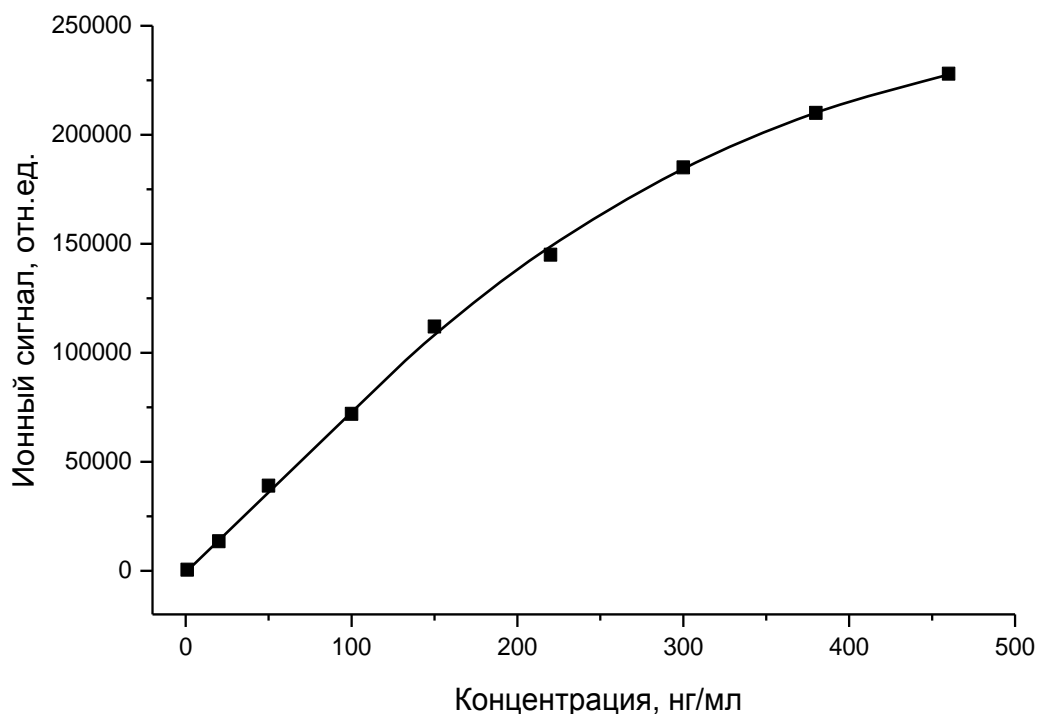


Рис. 5.15. Градуировочная зависимость при определении содержания резерпина. Продолжительность электрораспыления 10 с. Подложка — кремний, полученный лазерной обработкой.

Аналогичными зависимостями характеризуются и другие исследованные анализы. Диапазон линейности градуировочных кривых составляет до трех порядков величины, после чего сигнал выходит на насыщение. Как и для других вариантов SALDI, коэффициент чувствительности на линейном участке зависимостей определяется основностью соединения, и в зависимости от величины GB анализа меняется в широких пределах. Для высокоосновных соединений, например, верапамила, резерпина, тофизопама, хлоропирамина и других, коэффициенты чувствительности превышают  $10^3$  ион/фмоль, что позволяет надежно детектировать эти соединения на субфемтомольном уровне. Вместе с тем, при оценке пределов обнаружения необходимо учитывать, что стандартное отклонение холостого опыта  $\sigma$ , а также коэффициенты чувствительности соединений могут варьироваться в достаточно широких пределах. Причиной этому являются рассмотренные выше «матричные эффекты», которые проявляются в условиях нанесения пробы при атмосферном давлении.

На практике лучшие результаты получены при анализе чистых растворов анализа с применением способов уменьшения и учета «матричных эффектов». При этом достигается относительно высокая воспроизводимость результатов анализа ( $s_r$  менее 0.10 для  $N = 5$ ) и низкий предел обнаружения. Например, предел обнаружения хлоропирамина составляет примерно 10 фг анализа, нанесенного на подложку. Для проведения количественного анализа образцов сложного состава особое значение приобретает пробоподготовка, которая должна обеспечить селективное выделение определяемого компонента.

### ***5.2.3. Сочетание ионного источника SALDI с масс-анализатором Q-TOF***

Достоинством линейного времяпролетного масс-анализатора является близкий к 100% коэффициент пропускания масс-спектрометра, и, как следствие, высокий коэффициент сбора ионов и высокая чувствительность. Это преимущество имеет принципиальное значение при детектировании летучих соединений в условиях сочетания SALDI с газовой хроматографией или термодесорбционным методом. Однако при анализе растворов, когда эмиттер ионов выносится в область атмосферного давления, становятся существенными недостатки линейного времяпролетного масс-анализатора. В частности, это – относительно низкий динамический диапазон измерений. Как показано в разделе 5.1.3, активная

поверхность эмиттера ионов является эффективным сорбентом, и вместе с аналитом в масс-спектрометр вносится большое количество адсорбированного вещества. Поэтому плотность облака десорбированных молекул и ионов после лазерного воздействия существенно выше, чем при газофазном вводе пробы. В условиях высоких ионных потоков их обработка в масс-анализаторе ограничена током детектора и влиянием объемного заряда. Как следствие, ухудшаются аналитические параметры.

Для решения этой проблемы были исследованы варианты сочетания ионного источника SALDI с другими масс-анализаторами. Первый вариант основан на использовании времяпролётных масс-анализаторов типа рефлектрон с ортогональным вводом ионов через транспортный квадруполь (Q-TOF). Приборы типа Q-TOF широко используются в комбинации с методом электрораспыления при атмосферном давлении, поскольку позволяют согласовать импульсный масс-анализатор с непрерывным ионным потоком, который создается в процессе электрораспыления.

#### ***5.2.3.1. Масс-спектрометрическая установка***

Принципиальная схема масс-спектрометрической установки с ионным источником SALDI приведена на рис. 5.16. В качестве масс-анализатора используется времяпролётный рефлектрон MX-5311 (производства ИАП РАН, Санкт-Петербург) с длиной свободного пролета 0.9 м и с ортогональным вводом ионов через высокочастотный транспортный квадруполь (3 МГц, 1 кВ). Система ввода ионов включает квадруполь с давлением  $5 \times 10^{-3}$  мм.рт.ст. и транспортную ионно-оптическую систему с давлением  $10^{-5}$  мм.рт.ст. Сформированный транспортирующей системой ионный пучок поступает в рефлектрон, находящийся при давлении  $10^{-7}$  мм.рт.ст. В качестве детектора ионов используется ВЭУ «ETP 14882» (ETP Pty Ltd) с временным разрешением лучше 2 нс. Сигнал с детектора ионов усиливается и подается для обработки на плату сбора данных на основе высокоскоростного суммирующего АЦП (AgilentU1081A, AcqirisAP100) с частотой дискретизации 1 ГГц и полосой пропускания 500 МГц, установленную в компьютере. Суммирование масс-спектров платой производится с частотой 10 кГц. Оптическая система с лазерным блоком полностью аналогична рассмотренной в разделе 5.1.1.

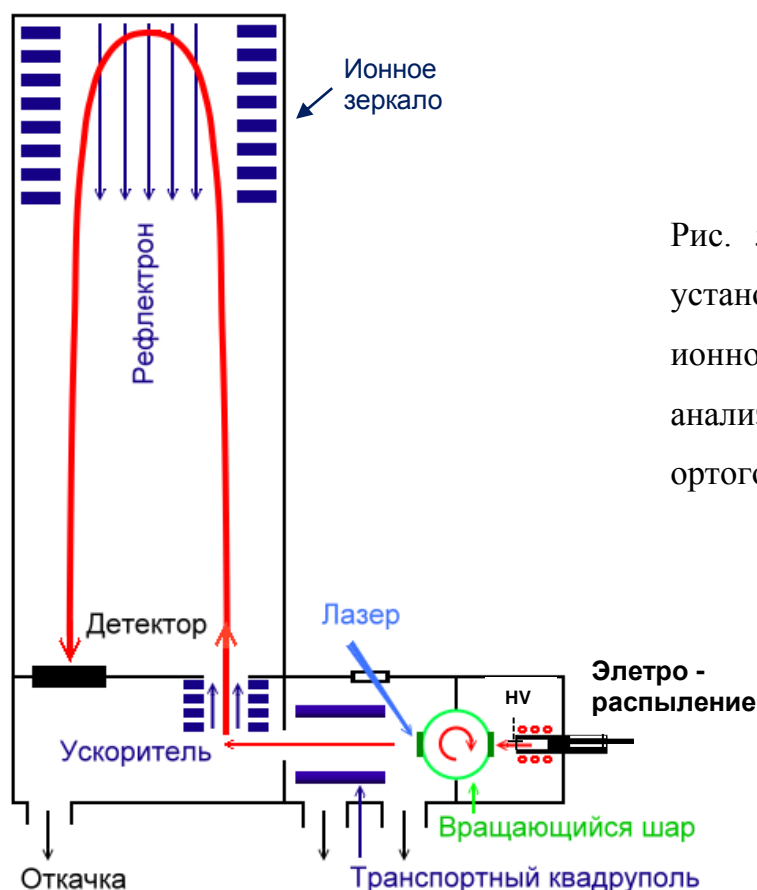


Рис. 5.16. Принципиальная схема установки, реализующей сочетание ионного источника SALDI с масс-анализатором рефлектрон с ортогональным вводом ионов.

Аналогичен также и интерфейс ввода пробы в масс-спектрометр, основанный на системе вращающегося шара. Корпус интерфейса ввода пробы сконструирован таким образом, чтобы внесенная в камеру кремниевая подложка, закреплённая в углублении шара, располагалась на оси транспортного квадруполь на расстоянии примерно 8 мм. В экспериментах обычно использовали две подложки, установленные на шаре. Прибор разработан и создан в лаборатории лазерной диагностики ИОФ РАН при участии ИАП РАН, ГЕОХИ РАН и ООО «НЭТ».

Масс-спектрометрическая установка была апробирована для определения и исследования фармакокинетики лекарственных соединений группы производных бензодиазепина, блокаторов кальциевых каналов, антиаритмических препаратов и ряда других в пробах плазмы крови, мочи и слюны. В исследованиях применяли стандартную методику пробоподготовки для масс-спектрометрического определения аминов, основанную на жидкость-жидкостной экстракции аналита в систему хлороформ:гептан:изопропанол (60:26:14) с добавлением 10% по объему насыщенного раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (см. раздел 4.3.4).



Исследования показали, что масс-анализатор типа Q-TOF обеспечивает высокое качество масс-спектров при анализе растворов, полученных после экстракции лекарственных соединений из плазмы крови и других биологических жидкостей. Несмотря на то, что в прибор вносится достаточно большое количества органического вещества, разрешение по массам протонированных молекул исследованных аналитов (ширина пика на его полувысоте) составляет величину  $3200 \div 3600$ . Этот факт можно объяснить тем, что транспортный квадруполь позволяет преобразовать импульсный ионный пучок десорбированных с подложки ионов, характеризующийся высокой плотностью заряда, в квазинепрерывный поток ионов с существенно меньшей плотностью заряда. Период следования выталкивающих импульсов, направляющих ионы в рефлектрон, много больше длительности ионного импульса после прохождения квадруполя, что обеспечивает снижение ионного тока в рефлектроне более чем на порядок величины в каждом импульсе анализатора. Кроме того, транспортный квадруполь выполняет термализующую функцию, позволяя уменьшить первоначальный разброс ионов по энергиям. Т.к. квадруполь заполнен газом при давлении  $5 \times 10^{-3}$  мм.рт.ст., то при движении в области переменного электрического поля ионы вынуждены совершать колебания около оси пучка, испытывая при этом множество столкновений с молекулами газа. Эти столкновения уменьшают среднюю энергию ионов до энергии молекул газа, а ионы стягиваются к области оси пучка.

Вместе с тем, по чувствительности анализа масс-анализатор типа Q-TOF с ионным источником SALDI значительно уступает линейному времяпролетному масс-анализатору с тем же ионным источником вследствие потерь десорбированных ионов на пути от подложки до детектора ионов. Коэффициенты чувствительности при анализе одних и тех же растворов на двух различных приборах отличаются более чем на порядок величины. Однако высокая эффективность ионизации исследованных лекарственных соединений позволяет детектировать большинство исследованных аналитов с использованием масс-анализатора типа Q-TOF на уровне 1 пг вещества, введенного в прибор.

Для оценки конкурентоспособности разработанного варианта важным представляется сравнение аналитических параметров SALDI с традиционными для этой области масс-спектрометрии методами. В настоящее время для определения

лекарственных соединений в жидких биологических пробах наиболее часто применяется метод электрораспыления. Масс-спектрометрическая установка на рис. 5.16 позволяет проводить анализ растворов как в режиме SALDI с использованием вращающегося шара, так и в режиме ионизации электрораспылением с газодинамическим вводом ионов из области атмосферного давления. Замена одного ионного источника на другой не меняет принципиально конструкцию транспортной и пролётной частей масс-анализатора (необходимо только дополнительно установить турбомолекулярный насос на камеру транспортного квадруполя), что позволяет провести корректное сравнение аналитических характеристик двух методов ионизации на одном приборе.

При проведении сравнительных исследований использовали одинаковые условия ввода пробы: концентрации аналитов, состав растворителей, расход растворов и длительность распыления. Сравнение аналитических параметров показало, что по чувствительности метод SALDI не уступает, а для большинства исследованных аналитов – превосходит метод ионизации электрораспылением при сравнимых величинах разрешения по массам. Например, чувствительности при определении резерпина близки для обоих методов, чувствительность SALDI выше при определении димедрола примерно в два раза, верапамила – в три раза, лидокаина – в шесть раз, хлоропирамина – в 10 раз.

Следует отметить еще одно преимущество SALDI – возможность накопления молекул аналита на поверхности эмиттера ионов путем увеличения длительности процесса распыления пробы, как это следует из данных на рис. 5.9. Концентрирование аналита на подложке позволяет снизить предел обнаружения за счет увеличения времени нанесения пробы, что невозможно для метода ионизации электрораспылением, который основан на получении непрерывного ионного потока.

#### ***5.2.3.2. Сочетание с термодесорбционным способом ввода пробы***

Интерфейс на основе вращающегося шара в сочетании с масс-анализатором Q-TOF совместим с различными способами ввода пробы. Кроме электрораспыления был также исследован способ, основанный на программируемой термодесорбции. В исследованиях использовали масс-спектрометрическую установку, представленную на рис. 5.16, в которой система

электрораспыления была заменена на микроювету, аналогичную описанной в разделе 4.2.1. Микроювету размещали в камере нанесения пробы таким образом, чтобы ее выходное отверстие располагалось на расстоянии примерно 3 мм от поверхности эмиттера ионов, установленного на вращающемся шаре. Для более эффективного переноса определяемых соединений из микроюветы на поверхность подложки необходимо использовать режим свободно-молекулярного течения, когда длина пробега молекулы превышает расстояние от микроюветы до подложки. С этой целью в камере нанесения пробы поддерживали давление на уровне  $10^{-3}$  мм.рт.ст.

Как и в варианте сочетания лазерной десорбции/ионизации с термодесорбционным методом, рассмотренном в главе 4, в ходе анализа в микроювету помещают раствор аналита, и после испарения растворителя нагревают в соответствии с заданной программой. В процессе термодесорбции молекулы аналита переносятся на подложку, закрепленную на шаре. При вращении шара подложка периодически вносится в ионный источник, где нанесенные соединения ионизируются при лазерном воздействии, десорбируются и детектируются.

Зависимости ионного тока определяемого соединения от времени, описывающие выход аналита при нагреве микроюветы, имеют характерный для шарового интерфейса вид, который на примере протонированных молекул пропранолола приведен на рис. 5.17. Видно, что пропранолол десорбируется в относительно узком температурном диапазоне, и ионный сигнал соединения имеет хорошо разрешенный максимум.

По сравнению с конструкцией на рис. 4.4, термодесорбционный ввод с использованием вращающегося шара позволяет значительно улучшить геометрический фактор при нанесении пробы на подложку. Эксперименты с анализом одних и тех же модельных растворов показали, что, несмотря на различие коэффициентов пропускания приборов, разработанное сочетание термодесорбционного ввода пробы с масс-спектрометром Q-TOF обеспечивает до пяти раз более высокую чувствительность анализа по сравнению с вариантом на рис. 4.4, использующим линейный времяпролетный масс-анализатор.

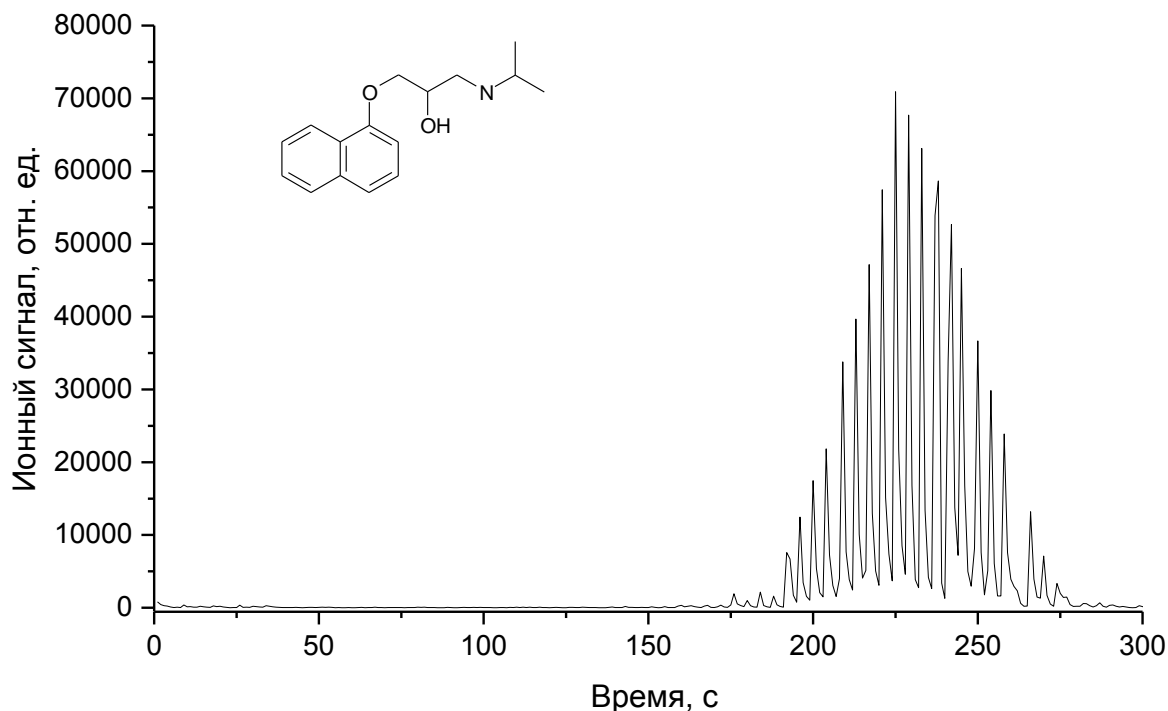


Рис. 5.17. Зависимость ионного тока протонированных молекул пропранолола в условиях термодесорбционного ввода пробы. Скорость нагрева микроюветы  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

Вместе с тем, преимущества Q-TOF проявляются, в основном, при анализе чистых растворов аналитов. В тех случаях, когда проба содержит мешающие компоненты с высокими концентрациями, например, при прямом анализе образцов мочи без пробоподготовки, увеличение коэффициентов использования потока молекул аналита при нанесении пробы означает также и увеличение потока мешающих компонентов, и как следствие, увеличение негативного влияния «матричных эффектов». Как показали эксперименты, возможности термодесорбционной системы разделять компоненты в соответствии с их летучестью недостаточны для проведения количественного анализа проб сложного состава с использованием масс-спектрометрической установки на рис. 5.16. Определение содержания аналитов в таких пробах требует стадии предварительной пробоподготовки. В частности, для определения лекарственных соединений в жидких биологических образцах могут быть использованы стандартные методики, основанные на селективной жидкостной экстракции аналитов.

#### 5.2.4. Сочетание ионного источника SALDI с масс-анализатором «Orbitrap»

Второй исследованный вариант основан на использовании в качестве масс-анализатора орбитальной ионной ловушкой «Orbitrap» [308]. Высокий динамический диапазон измерений (до  $10^6$  ионов) вместе с исключительно высоким разрешением по массам и возможностью точного определения масс выделяют основные преимущества Orbitrap перед времяпролетными масс-анализаторами [309]. Серийные приборы с орбитальной ионной ловушкой обычно оборудованы ионным источником электроспрей с непрерывным вводом пробы. Как следствие, ионный тракт масс-анализатора включает газовый интерфейс с мощной дифференциальной откачкой и дополнительный накопитель ионов, например типа C-trap. После накопления в квадрупольной радиочастотной ионной ловушке происходит выключение радиочастотного напряжения и импульсное включение постоянного напряжения, выталкивающее ионы в радиальном направлении в последующую линзовую систему и далее – в анализатор Orbitrap. Для сочетания с импульсным ионным источником SALDI была использована другая конструкция прибора, использующая импульсный прямой ввод ионов в Orbitrap. Преимуществом такой конструкции является простота ионного тракта и, как следствие, высокий коэффициент пропускания ионной оптики.

Схема экспериментальной лазерной масс-спектрометрической установки с прямым вводом ионов приведена на рис. 5.18. Установка разработана и собрана на основе прототипа прибора LTQ Orbitrap Classic в «ThermoFisher Scientific», (Бремен, Германия). Инфраструктура прибора использовалась только для обеспечения высоких напряжений и детектирования ионов. Масс-анализатор Orbitrap, снабженный вакуумной камерой для ввода пробы, был установлен на специальной подставке и не соединялся со штатной системой транспорта ионов на базе LTQ.

В экспериментах использовали капельное нанесение пробы ( $2\div 5$  мкл раствора). После испарения растворителя подложку с нанесенными на ее поверхность определяемыми соединениями загружали с помощью штока через камеру предварительной откачки в ионный источник. Излучение Nd:YAG лазера (длина волны 355 нм) передавалось через оптическое волокно диаметром 0.4 мм и

фокусировалось линзой (фокусное расстояние 160 мм) на поверхность эмиттера ионов в пятно диаметром около 0.5 мм. Синхронизация осуществлялась с помощью генератора Digital Delay Generator DG535 (Stanford Research Systems Inc., США), причём лазер запускался от стартового импульса с LTQ, а система детектирования LTQ Orbitrap – от лазерного импульса. Ионы, образованные в результате лазерной десорбции/ионизации, ускорялись в линзовой системе и поступали в масс-анализатор Orbitrap. Сканирование поверхности эмиттера ионов осуществляли путем перемещения подложки без изменения положения лазерного луча относительно ионного источника масс-спектрометра. Для перемещения подложки использовали двухкоординатный столик от источника ионов AP/MALDI, управляемый стандартной программой «Target» (Version 6.0).

Иллюстрацией преимуществ Orbitrap перед времяпролетным масс-анализатором могут служить приведенные на рис. 5.19 данные, полученные при исследовании комплексных соединений осмия с 8-меркаптохинолином. (Возможность применения лазерной десорбции/ионизации для определения комплексных соединений металлов рассмотрена подробнее в главе 6).

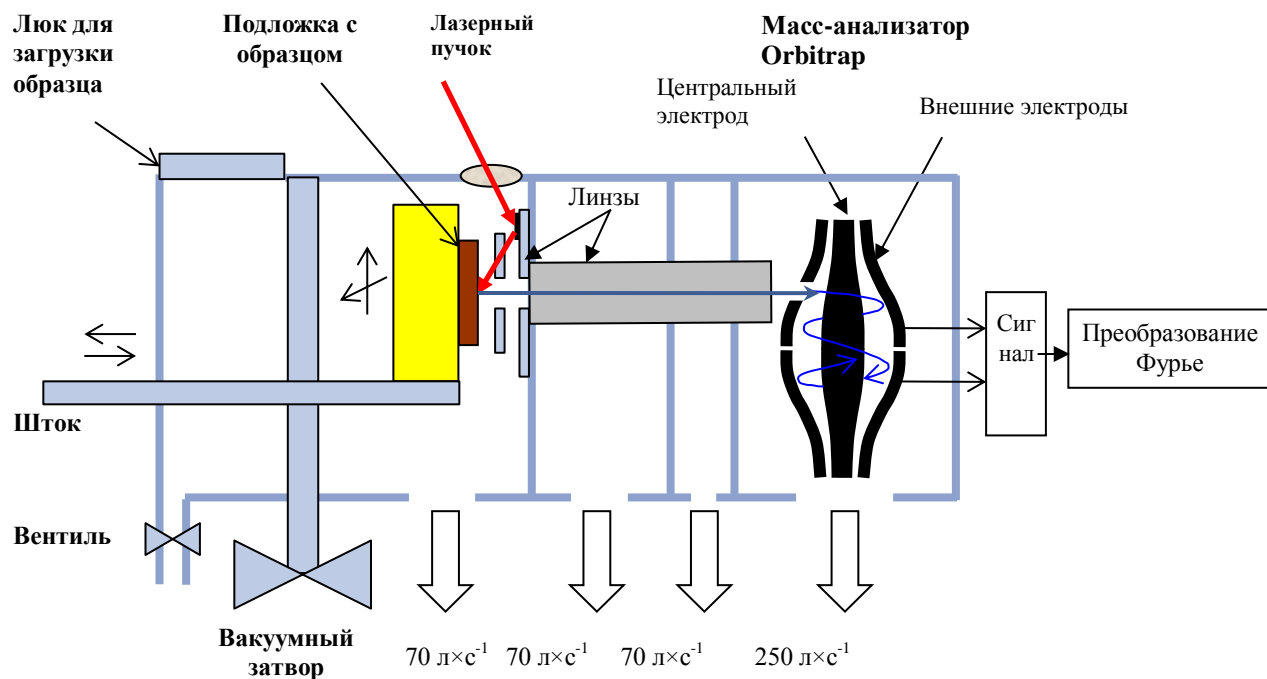


Рис. 5.18. Схема экспериментальной установки, реализующей сочетание ионного источника SALDI с масс-анализатором Orbitrap с прямым вводом ионов.

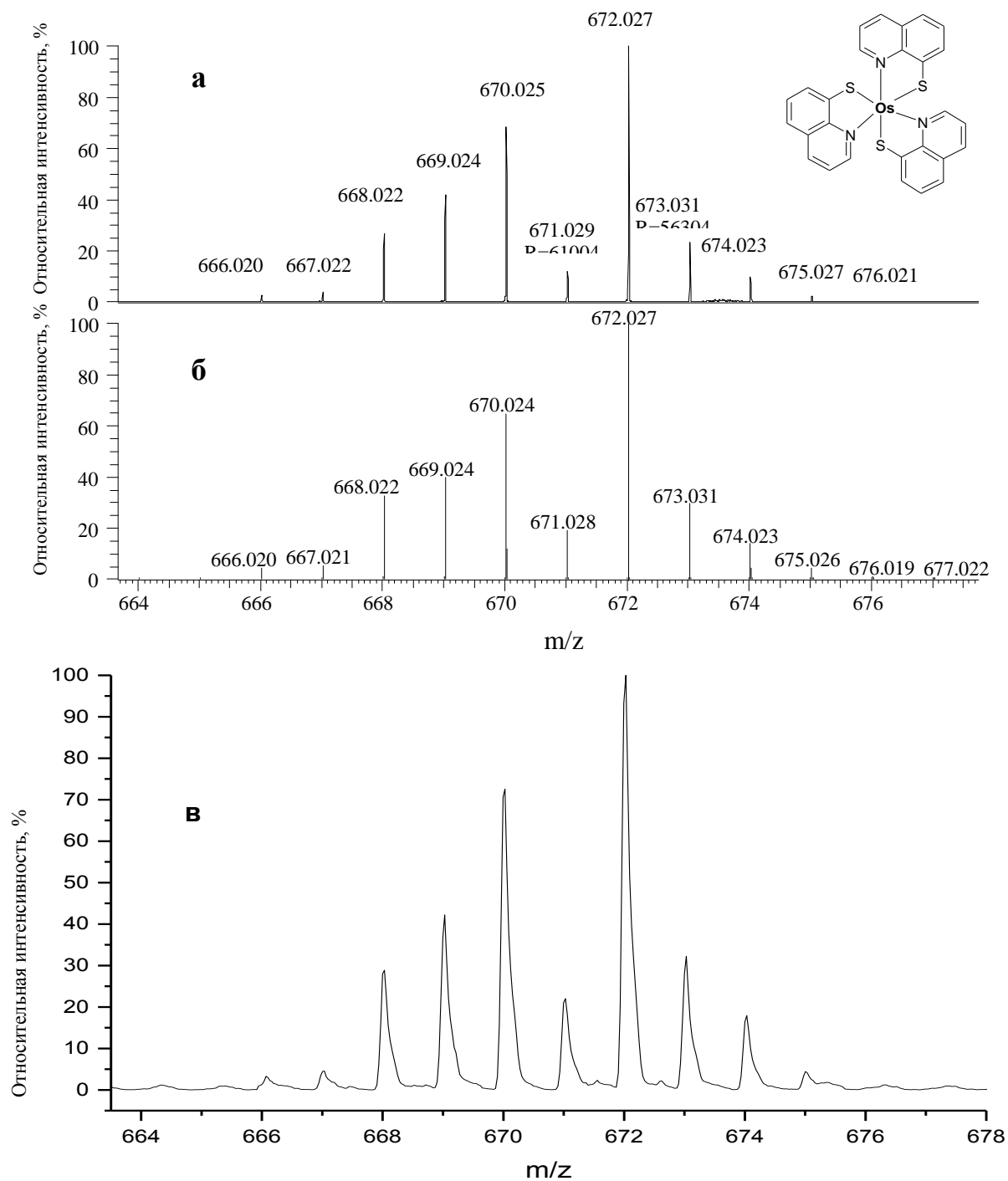


Рис. 5.19. Масс-спектры соединения  $\text{OsC}_{27}\text{N}_3\text{S}_3\text{H}_{18}$ : (а) - зарегистрированный в масс-анализаторе Orbitrap; (б) - теоретически рассчитанный; (в) - зарегистрированный во времяпролетном масс-анализаторе Q-TOF.

На рис. 5.19а представлен масс-спектр комплекса осмия, зарегистрированный в масс-анализаторе Orbitrap в области изотопного кластера, соответствующего молекулярным ионам. Масс-спектр получен в условиях, когда общее число ионов, одновременно находящихся в масс-анализаторе, составляло примерно  $4 \times 10^4$ .

Количество ионов находили по известной методике [310, 311] путем суммирования числа ионов в каждом зарегистрированном пике. При длительности детектирования 0.76 секунды пики регистрируются с разрешением 56000. На рис. 5.19б приведено рассчитанное изотопное распределение для соединения  $\text{OsL}_3$ , где лиганд L – меркаптохинолин без водорода ( $\text{C}_9\text{NSH}_6$ ). Видно, что наблюдаемое изотопное распределение с хорошей точностью совпадает с рассчитанным. Таким образом, масс-анализатор Orbitrap позволяет обрабатывать ионные потоки с высокой плотностью заряда, обеспечивая при этом высокое разрешение и точность определения масс.

Тот же раствор с концентрацией  $\text{OsL}_3$  примерно 1 мкг/мл проанализирован в близких по параметрам лазерного излучения условиях с использованием масс-анализатора Q-TOF. Полученный масс-спектр соединения приведен на рис. 5.19в. Пики ионов регистрировались с разрешением примерно 3500. Сравнение экспериментальных данных показало, что отношение сигнал/шум при детектировании ионов в масс-анализаторе Orbitrap на порядок величины выше.

В наиболее простом варианте ввода пробы, основанном на капельном нанесении раствора, масс-спектрометрическая установка на рис. 5.18 может быть использована для идентификации соединений и их полуколичественного анализа. Однако ее модификация, например, путем сочетания с газовой хроматографией или шаровым интерфейсом, представляется исключительно перспективным направлением для определения органических соединений с высоким разрешением, точностью определения масс и динамическим диапазоном.

#### 5.4. Заключение

Разработан новый подход к высокочувствительному определению органических соединений в воздухе методом SALDI, применимый для анализа атмосферного воздуха и других газовых сред в реальном времени. Подход базируется на использовании системы ввода пробы на основе вращающегося шара, позволяющей согласовать импульсный режим лазерной десорбции/ионизации с непрерывным отбором пробы из газовой фазы без существенной потери чувствительности и быстродействия. Показано, что шаровой интерфейс в сочетании с разработанными способами формирования эмиттера ионов дают возможность проводить определение высокоосновных соединений в воздухе на



уровне 100 ppt и ниже, а также осуществлять непрерывный контроль химического состава атмосферы.

Разработан генератор микропотока паров химических соединений, создающий малый (до 0,01 нг/с) поток паров различных веществ. Источником потока вещества является пленочное покрытие, нанесенное на поверхность электродов массочувствительных кварцевых пьезорезонаторов. Величина создаваемого потока контролируется путем изменения температуры рабочей поверхности резонатора и определяется по скорости изменения частоты резонанса. Создаваемый генератором микропоток паров веществ может быть использован для градуировки масс-спектрометра, а также в качестве внешнего стандарта при on-line анализе воздуха.

Разработан способ определения нелетучих соединений методом SALDI, включающий нанесение аналита на подложку путем электрораспыления анализируемого раствора, быстрое перемещение подложки с нанесенной пробой в вакуумную камеру масс-анализатора с использованием шарового интерфейса и лазерную десорбцию/ионизацию определяемых соединений. Оптимизированы условия нанесения пробы, найдены основные аналитические параметры метода при определении ряда лекарственных веществ. Показано, что разработанный способ позволяет проводить количественный анализ растворов нелетучих соединений.

Исследованы новые варианты инструментальной реализации метода SALDI. Первый из них представляет собой сочетание ионного источника SALDI с масс-анализатором Q-TOF и системой ввода пробы с вращающимся шаром. На основе этого варианта разработаны способы определения нелетучих лекарственных соединений в биологических образцах на уровне 1 пг вещества, введенного в прибор. С использованием одного и того же масс-анализатора проведены сравнительные исследования аналитических параметров двух методов ионизации, которые показали, что по чувствительности метод SALDI не уступает, а для большинства исследованных аналитов – превосходит метод ионизации электрораспылением. Второй вариант – это сочетание ионного источника SALDI с масс-анализатором Orbitrap при использовании прямого ввода ионов. Показано, что такое сочетание характеризуется исключительно высоким разрешением и точностью определения масс, а его дальнейшее развитие является перспективным направлением для улучшения аналитических параметров SALDI.

## Глава 6. Лазерная десорбция/ионизация для определения химических соединений с низкой величиной основности

Высокая эффективность ионизации основных соединений, значительно превышающая эффективность традиционных методов ионизации; мягкие условия ионизации; простота исполнения; возможность сочетания с системами, обеспечивающими разделение определяемых компонентов, характеризуют лазерную десорбцию/ионизацию на поверхности кремниевых материалов как исключительно перспективный метод масс-спектрометрии. Разработанные способы приборной реализации SALDI, представленные в главах 4 и 5, потенциально могут быть использованы для решения самых различных задач в таких областях, как медицинская диагностика, фармакология, экология, обеспечение безопасности и многих других. Вместе с тем, основной вариант SALDI, базирующийся на использовании реакции протонирования молекул на поверхности кремниевых эмиттеров ионов, ограничивает область применения метода только определением соединений с относительно высокой величиной основности. Поэтому одно из наиболее важных направлений дальнейшего развития метода заключается в расширении круга химических соединений, которые можно ионизовать путем лазерной десорбции/ионизации, и, в частности, во введении соединений с низкой величиной основности в сферу задач, решаемых с помощью SALDI.

Можно выделить два основных подхода к решению данной проблемы: химическая модификация молекул аналита с целью их перевода в форму, удобную для лазерной десорбции/ионизации и использование других механизмов лазерно-индуцированной ионизации на поверхности эмиттера ионов. В данной главе рассмотрены некоторые перспективные варианты, реализующие оба подхода. Это – дериватизация молекул соединений с низкой величиной основности, а также образующихся в процессе SALDI ионов; лазерная десорбция/ионизация в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов; инициированная лазерным излучением ионизация путем переноса электрона. Предложенные варианты открывают перспективы для значительного расширения круга соединений, определяемых методом SALDI, а также улучшения метрологических характеристик метода.

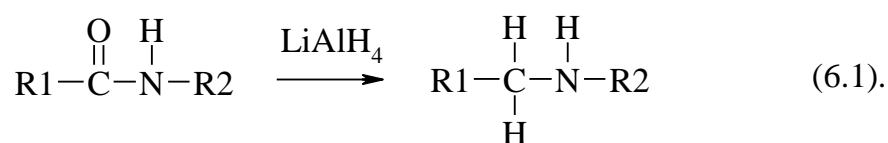
## 6.1. Дериватизация определяемых соединений для улучшения метрологических характеристик лазерной десорбции/ионизации

Дериватизация или химическая модификация достаточно давно и широко используется в масс-спектрометрии как способ получения производных определяемых соединений с лучшими аналитическими свойствами. В сочетании ГХ/МС с электронной ионизацией дериватизация чаще всего используется в процессе пробоподготовки для увеличения летучести аналита или его термостабильности. Многие из разработанных с этой целью способов могут быть использованы и для ГХ/SALDI анализа. Специфичным для SALDI является дериватизация молекул аналита на стадии пробоподготовки для увеличения его основности. Другой вариант – это дериватизация ионов аналита, образующихся в процессе SALDI. Как показано ниже, второй вариант может быть использован для увеличения надежности идентификации соединений.

### 6.1.1. Дериватизация молекул аналита для увеличения эффективности ионизации

Как отмечено в главе 2, основность соединения в газовой фазе является одним из ключевых параметров, определяющих эффективность лазерной десорбции/ионизации с переносом протона. Даже относительно небольшое увеличение основности аналита в результате дериватизации приводит к значительному увеличению чувствительности анализа. Способы химической модификации для увеличения основности соединений весьма разнообразны, и применение конкретных методик зависит от состава молекул и химических свойств соединения.

Возможность использования дериватизации для увеличения эффективности лазерной десорбции/ионизации можно проиллюстрировать на примере применения хорошо известной реакции восстановления амидной группы до аминогруппы под действием алюмогидрида лития  $\text{LiAlH}_4$  в тетрагидрофуране по схеме:



Амидная группа входит в состав многих биомолекул, лекарственных препаратов и других биологически активных соединений. Вследствие относительно низкой основности GB амидной группы ее протонирование в условиях SALDI на кремниевых поверхностях протекает с низкой эффективностью. В свою очередь, аминогруппа характеризуется более высокой величиной GB. Например, GB ацетамида составляет 832.6 кДж/моль, а GB этиламина – 878 кДж/моль [255], т.е. восстановление ацетамида до этиламина увеличивает основность аналита на 45 кДж/моль.

Способ дериватизации с использованием реакции (6.1) был апробирован при определении лекарственных соединений фенобарбитала (5-этил-5-фенилбарбитуровой кислоты) и карбамазепина (бензо[b][1]бензазепин-11-карбоксамид) в водных растворах и в моче. Методика дериватизации заключается в следующем. На первом этапе пробоподготовки проводили жидкость-жидкостную экстракцию по методике, описанной в главе 4. Отобранную после проведения экстракции органическую фракцию упаривали досуха и растворяли в 10 мл безводного (абсолютного) тетрагидрофурана. В 0.25-литровую трехгорлую колбу, снабженную магнитной мешалкой, капельной воронкой и обратным холодильником, помещали 25 мл абсолютного тетрагидрофурана и добавляли при перемешивании на магнитной мешалке 350 мг алюмогидрида лития. В капельную воронку помещали 10 мл анализируемого раствора в тетрагидрофуране, после чего его по каплям прибавляли к постоянно перемешивающейся суспензии алюмогидрида лития в тетрагидрофуране. Кипятили раствор с обратным холодильником в течение 30 мин. Затем аккуратно по каплям прибавляли 0.35 мл дистиллированной воды, затем 0.35 мл насыщенного раствора NaOH в дистиллированной воде, и затем еще 1 мл дистиллированной воды. Все операции проводили в постоянном токе сухого газа. Осадок отфильтровывали на воронке Бюхнера, жидкость собирали, тетрагидрофуран отгоняли. Оставшееся в колбе вещество растворяли в смеси хлороформ:ацетонитрил и наносили на эмиттер ионов с помощью электрораспыления.

На рис. 6.1 представлен масс-спектр, полученный после проведения процедуры дериватизации раствора карбамазепина с концентрацией 5 нг/мл. Концентрация аналита в исходном растворе ниже предела обнаружения

карбамазепина, и в масс-спектре исходного раствора отсутствует сигнал соединения. Из приведенных на рис. 6.1 данных видно, что после дериватизации в масс-спектре регистрируется интенсивный ионный сигнал. Доминирующим пиком в спектре является пик с  $m/z$  194, соответствующий ионам состава  $C_{14}H_{11}NH$ . Можно предположить, что после проведения дериватизации карбамазепина по реакции 6.1 в масс-спектре детектируется дибензазепин в виде протонированных молекул с  $m/z$  194. Структурная формула соединения приведена на вставке к рис. 6.1. Интересно, что масс-спектр содержит также пик с  $m/z$  193. Дибензазепин характеризуется высоким коэффициентом поглощения излучения на длине волны 355 нм, что обуславливает возможность фотоионизации соединения на поверхности подложки. Поэтому пик с  $m/z$  193 можно интерпретировать как соответствующий молекулярным ионам дибензазепина.

Из полученных данных следует, что восстановление имидной группы карбамазепина позволяет снизить предел обнаружения соединения на два порядка величины. Близкий по величине эффект увеличения чувствительности получен и при определении фенобарбитала с использованием дериватизации соединения по реакции 6.1.

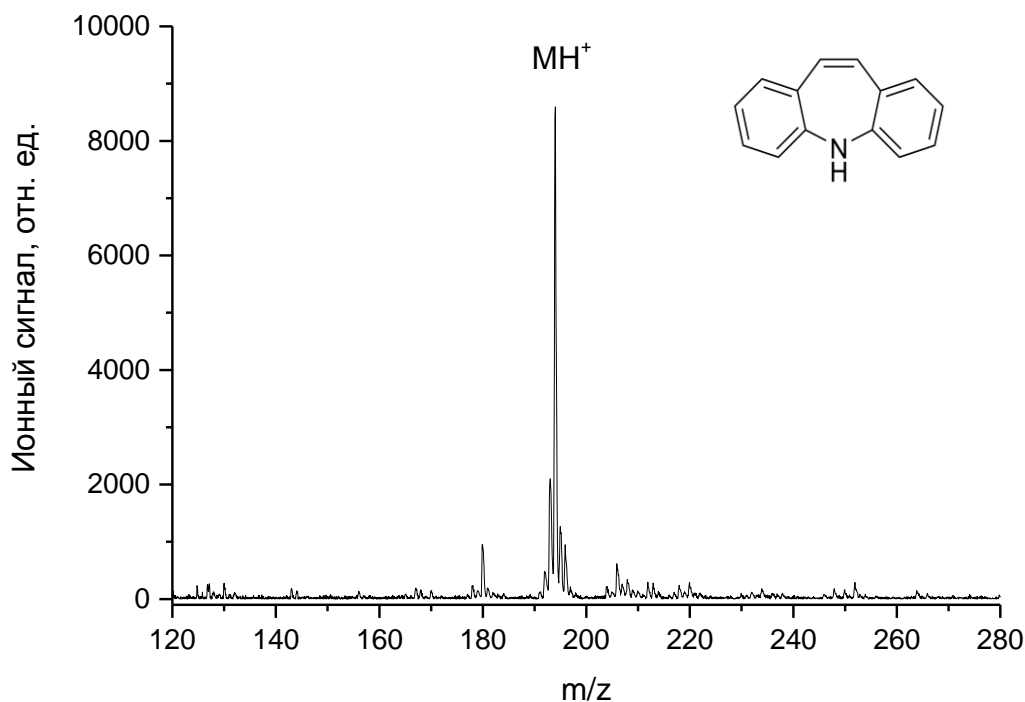


Рис. 6.1. Масс-спектр, зарегистрированный после дериватизации карбамазепина. Подложка – кремний, полученный лазерной обработкой.

Очевидный недостаток подхода, основанного на дериватизации аналита на стадии пробоподготовки, - это необходимость разрабатывать отдельные методики для каждого химического класса соединений. Кроме того, применение дериватизации значительно усложняет анализ и увеличивает его продолжительность. Однако в целом, дериватизация определяемых соединений с целью увеличения их основности является эффективным инструментом, который позволяет ввести в сферу задач, решаемых методом SALDI, широкий круг соединений с низкой величиной основности. Следует также отметить, что для расширения числа соединений, детектируемых в условиях SALDI, могут быть использованы и другие варианты дериватизации. Например, дериватизация, основанная на способах деградации (пиролиз, гидролиз и др.), может быть использована для определения соединений с высокими молекулярными массами.

#### ***6.1.2. Дериватизация ионов аналита***

Как показано в главе 2, для реализации процесса SALDI при определении летучих соединений необходимо подавать в ионный источник пары воды. Подача паров воды также нужна для формирования активных кремниевых поверхностей путем лазерной обработки. Поэтому экспериментальная установка оборудована системой регулируемого ввода паров жидкостей. Эта система была использована в экспериментах по исследованию влияния различных органических соединений на процессы лазерной десорбции/ионизации. Результаты исследований показали, что ввод в ионный источник паров некоторых растворителей или других органических соединений в процессе лазерной десорбции/ионизации приводит к изменению масс-спектров аналитов, обусловленному химическим взаимодействием десорбированных ионов с молекулами введенного в прибор соединения. На этой основе предложен простой способ дериватизации ионов аналита, который может быть использован для повышения достоверности и надежности идентификации химических соединений.

Проблема однозначной идентификации определяемых соединений часто возникает в условиях нанесения пробы при атмосферном давлении. Активированная лазерным излучением поверхность кремниевых эмиттеров ионов является эффективным сорбентом. Как отмечено в главе 5, масс-спектры, зарегистрированные в условиях нанесения пробы на воздухе, обычно

характеризуются высокими значениями фоновых сигналов, которые создаются ионами присутствующих в атмосфере воздуха органических соединений. При использовании масс-анализатора с относительно низкой разрешающей способностью такая ситуация часто приводит к проблеме однозначной идентификации определяемых соединений вследствие интерференции пиков целевых и мешающих компонентов пробы. В ряде случаев идентификацию затрудняет сильная фрагментация ионов аналитов и, соответственно, низкая интенсивность ионов протонированных молекул, характеризующих массу соединения.

В традиционном варианте SALDI ионы, образующиеся в процессе лазерной десорбции-ионизации, сразу детектируются в масс-анализаторе. В разработанном способе ионы вначале вступают в реакции с молекулами реагента, после чего детектируются в масс-анализаторе, например, типа Q-TOF. В результате реакции, в масс-анализатор вводятся ионы, характеризующие аналит, но имеющие другую массу, чем протонированные молекулы, и обладающие другими химическими свойствами. Для химической модификации ионов могут быть использованы различные реакции и различные реагенты. Как показали эксперименты, весьма эффективна реакция метилирования, протекающая при взаимодействии протонированных молекул  $(MH)^+$  с молекулами метанола:



С целью выбора оптимальных условий анализа на предварительном этапе было изучено влияние давления паров спирта на выход ионов метилированных молекул определяемых соединений. Реакция (6.2) протекает, по-видимому, сразу после десорбции, в облаке десорбированных частиц, которое имеет высокую плотность и температуру. Для реализации процесса метилирования необходимо создать поток молекул метанола на поверхность эмиттера ионов. Очевидно, что увеличение потока реагента увеличивает вероятность его взаимодействия с десорбированными ионами вследствие роста числа столкновений в единицу времени и следовательно, увеличивает выход реакции метилирования. С другой стороны, рост давления в ионном источнике ухудшает качество масс-спектров. Выбор оптимальной величины потока реагента определяется как химическими свойствами аналита и реагента, так и типом масс-анализатора. В экспериментах,

выполненных на установке, представленной на рис. 5.2 с использованием спиртов в качестве реагентов, допустимое давление в ионном источнике составляло величину порядка  $10^{-5}$  мм.рт.ст. При больших значениях давления быстро растет шум и ухудшается разрешение. В процессе проведения анализа поток реагента поддерживали постоянным.

Иллюстрацией процесса метилирования ионов по реакции (6.2) служит представленный на рис. 6.2 масс-спектр кофеина, зарегистрированный при давлении метанола в ионном источнике  $10^{-5}$  мм.рт.ст. Сравнивая с масс-спектром на рис. 2.13, можно видеть, что при подаче в ионный источник паров  $\text{CH}_3\text{OH}$  в масс-спектре появляется пик относительно высокой интенсивности с  $m/z$  209, соответствующий ионам соединения  $[\text{M}+\text{CH}_3]^+$ . Подтверждением этому может служить тот факт, что замена метанола  $\text{CH}_3\text{OH}$  на дейтерированный метанол  $\text{CD}_3\text{OD}$  приводит к смещению пика с  $m/z$  209 до  $m/z$  212 с образованием ионов состава  $[\text{M}+\text{CD}_3]^+$ .

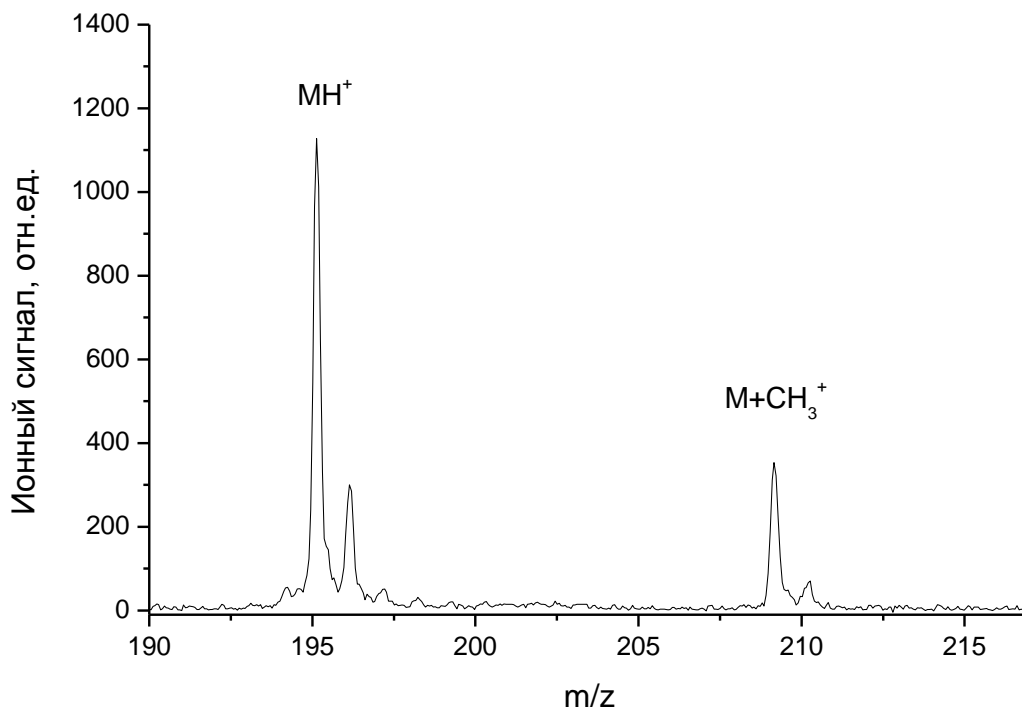


Рис. 6.2. Масс-спектр кофеина, зарегистрированный после подачи паров метанола в ионный источник масс-спектрометра. Подложка – кремний, полученный лазерной обработкой. Давление паров метанола  $10^{-5}$  мм.рт.ст.



Применение предложенного способа дериватизации ионов отличается простотой, не влияет существенно на длительность анализа и позволяет во многих случаях улучшить аналитические характеристики метода лазерной десорбции/ионизации, что показано ниже на примерах определения соединений в условиях интерференции пиков аналита и мешающих соединений, а также при сильной фрагментации протонированных молекул аналита.

В результате дериватизации в масс-анализатор вводятся ионы, характеризующие аналит, но имеющие другое значение  $m/z$ , чем протонированные молекулы, что позволяет избежать интерференции пиков ионов аналита с пиками ионов мешающих компонентов или ионов подложки. Рис. 6.3 иллюстрирует пример использования реакции (6.2) для детектирования паров пирролидина в лабораторном воздухе. Подложку пористого кремния выводили из вакуумной камеры масс-спектрометра при помощи шарового устройства и помещали в лабораторный воздух на 5 сек. После этого подложку снова перемещали в вакуумную камеру масс-спектрометра и проводили анализ методом SALDI. Зарегистрированный в контрольном (холостом) опыте масс-спектр приведен на рис. 6.3а. Видно, что в масс-спектре присутствует ряд пиков, которые могут мешать определению и идентификации аналитов. В частности, в масс-спектре регистрируется пик с  $m/z$  72, который имеет такое же значение  $m/z$  (с точностью до единиц а.е.м.), как и протонированные молекулы пирролидина, и, следовательно, интерферирует с пиком аналита при использовании масс-анализатора с недостаточно высоким разрешением. Интенсивность пика в холостом опыте зависит от состояния атмосферы и может меняться во времени, искажая результаты анализа. Из данных рис. 6.3а также следует, что в области масс-спектра, соответствующей пикам метилированного пирролидина  $[M+CH_3]^+$  с  $m/z$  86, отсутствуют пики мешающих компонентов. Как показали дополнительные исследования, большинство пиков на рис. 6.3а принадлежат фрагментным ионам более тяжелых соединений, в частности, компонентов вакуумного масла. Подача в ионный источник паров метанола и этанола не приводит к изменению масс-спектра на рис. 6.3а в области  $m/z$  ионов метилированного и этилированного пирролидина, что позволяет использовать пары спиртов для дериватизации протонированных молекул этого соединения.

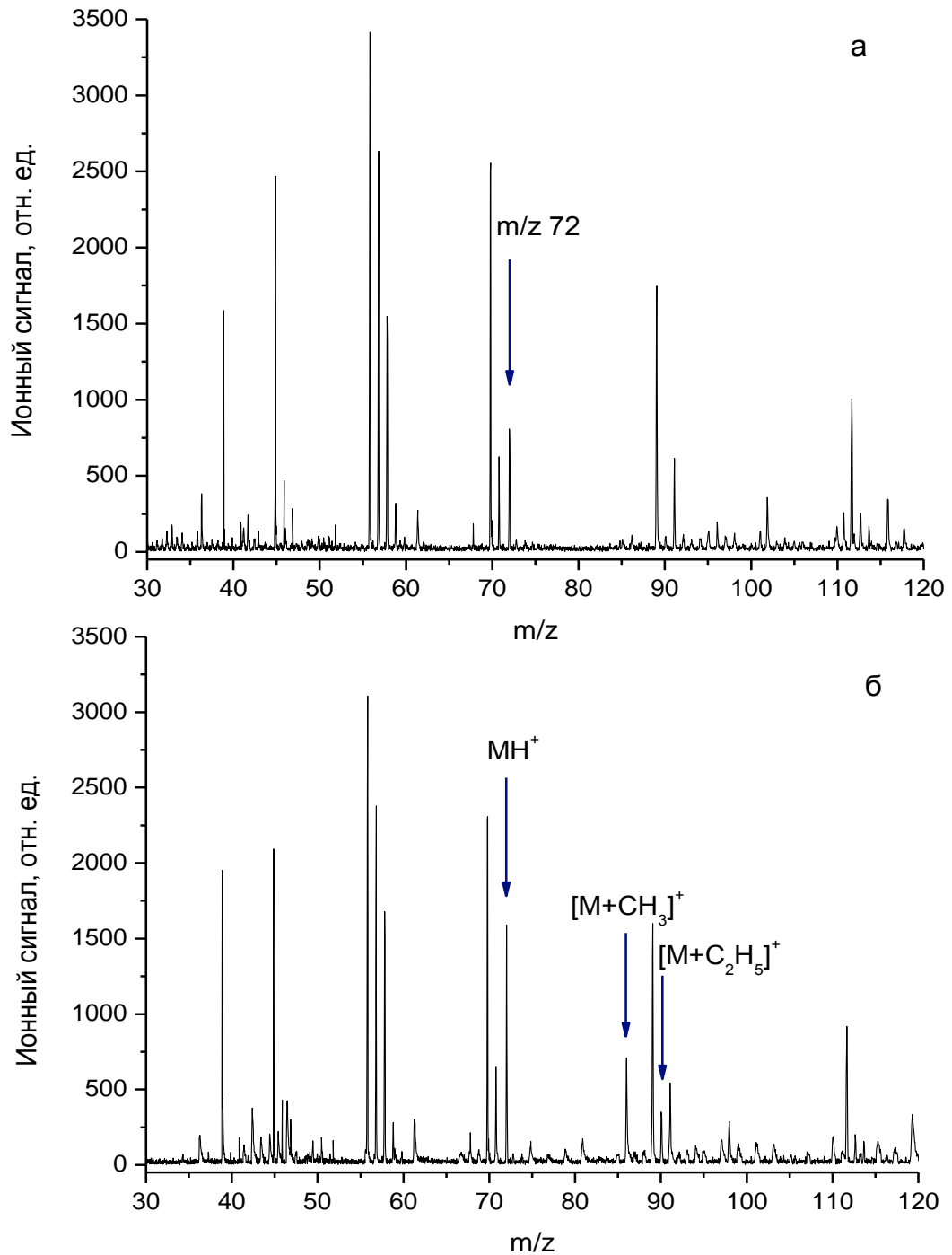


Рис. 6.3. (а) – Масс-спектр атмосферного воздуха, зарегистрированный в контрольном опыте. (б) – Масс-спектр атмосферного воздуха, содержащего пары пирролидина, зарегистрированный при подаче в ионный источник паров метанола и этанола. Подложка – пористый кремний.

После проведения холостого опыта подложку снова выводили из вакуумной камеры и воздействовали в течение 5 сек потоком лабораторного воздуха, содержащего пары пирролидина. Затем подложку перемещали в вакуумную камеру

и проводили анализ методом SALDI. Для лазерной-десорбции ионизации использовали те же параметры, что и в холостом опыте, но дополнительно вводили в ионный источник метанол и этанол. Давление, создаваемое парами спиртов, составляло  $10^{-5}$  мм.рт.ст., метанол и этанол брали в равных концентрациях. Полученный масс-спектр приведен на рис. 6.3б. Видно, что интенсивность пика с  $m/z$  72 возрастает вследствие вклада в ионный сигнал протонированных молекул пирролидина. Кроме того, в масс-спектре регистрируются дополнительно два новых пика, соответствующих метилированным  $[M+CH_3]^+$  и этилированным  $[M+C_2H_5]^+$  ионам пирролидина. Как отмечено выше, пик  $[M+CH_3]^+$  с  $m/z$  86 находится в области масс-спектра, свободной от интерференции. Исследования показали, что при постоянном давлении реагента в вакуумной камере масс-спектрометра величина выхода модифицированных ионов аналита линейно зависит от концентрации введенного в прибор соединения, что позволяет проводить количественный анализ, используя пик этих ионов. Следует также отметить, что спирты имеют величину  $GB$  существенно ниже 820 кДж/моль [255], поэтому, даже взятые в избытке, не дают вклада в фоновый ионный сигнал.

Из данных рис. 6.3б следует, что для дериватизации ионов может быть использован не только метанол, но и этанол. Меняя реагент в ряду спиртов, а также используя изотопно обогащенные реагенты, можно выбирать для детектирования аналита участок в масс-спектре, свободный от интерференционных наложений. Однако, как показали эксперименты, вероятность образования ионов  $[M+C_nH_{2n+1}]^+$  при взаимодействии протонированных молекул аналита с молекулами спиртов  $C_nH_{2n+1}OH$  быстро уменьшается с ростом величины  $n$ , что ограничивает ряд спиртов, подходящих для дериватизации. На практике целесообразно использовать спирты с величиной  $n$ , не превышающей 4. Следует отметить, что для метилирования могут быть использованы и другие реагенты. Например, метилирование ряда соединений наблюдалось также при вводе в прибор паров ацетонитрила, однако выход метилированных соединений был меньше, чем при использовании метанола.

Другим фактором, затрудняющим идентификацию определяемого соединения, является сильная фрагментация ионов. Присутствие в масс-спектре пика, характеризующего молекулярную массу химического соединения, важно для

правильной идентификации соединения, поскольку позволяет установить его брутто-формулу. В целом, сильная фрагментация нетипична для SALDI, однако некоторые соединения дают масс-спектры, в которых практически отсутствует пик протонированных молекул. Примером такого соединения служит дифенгидрамин – действующий компонент лекарственного препарата «Димедрол». Масс-спектр дифенгидрамина приведен на вставке к рис. 6.4а. Видно, что протонированный дифенгидрамин является нестабильным ионом: при оптимальных значениях плотности энергии лазерного излучения степень его фрагментации превышает 95%. Дериватизация с использованием реакции (6.2) позволяет увеличить стабильность ионов, характеризующих молекулярную массу соединения.

На рис. 6.4а и рис. 6.4б представлены масс-спектры дифенгидрамина в области протонированных молекул, зарегистрированные до и после подачи в ионный источник метанола. Давление паров метанола составляло  $10^{-5}$  мм.рт.ст. Спектры сняты при одинаковой плотности энергии лазерного излучения и при равных количествах нанесенного на подложку аналита. Масс-спектр на рис. 6.4а содержит единственный пик с  $m/z$  256, соответствующий протонированным молекулам дифенгидрамина. Интенсивность пика мала и близка к фоновому сигналу, а при меньших концентрациях аналита в пробе пик не регистрируется. Из данных рис. 6.4б следует, что ввод в ионный источник паров метанола приводит к появлению в масс-спектре нового пика с  $m/z$  270, который соответствует метилированным молекулам дифенгидрамина и однозначно характеризует молекулярную массу аналита. Интенсивность этого пика превышает фоновый сигнал примерно в 20 раз. Таким образом, применение предложенного способа дериватизации ионов позволяет снизить более чем на порядок величины концентрацию дифенгидрамина, при которой еще возможна его надежная идентификация методом SALDI.

Для того чтобы лучше понять причины сильной фрагментации протонированных молекул и ее отсутствие у метилированных молекул дифенгидрамина, было проведено квантово-химическое моделирование процесса образования фрагментных ионов. В расчетах использовали программный пакет Firefly. Квантово-химические расчеты проводились методом Хартри-Фока с использованием базисного набора 6-311+G\*\*. Согласно полученным результатам,

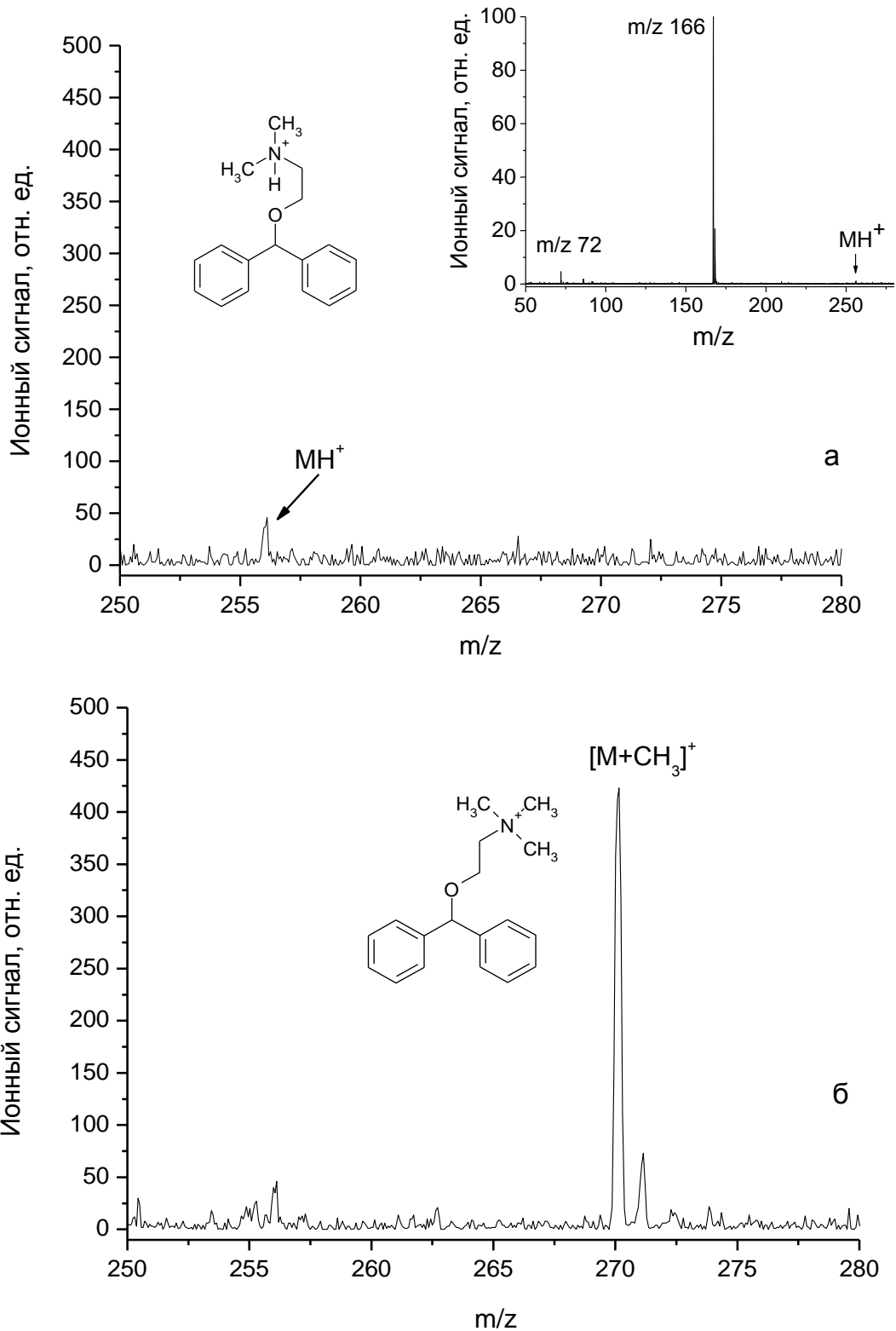
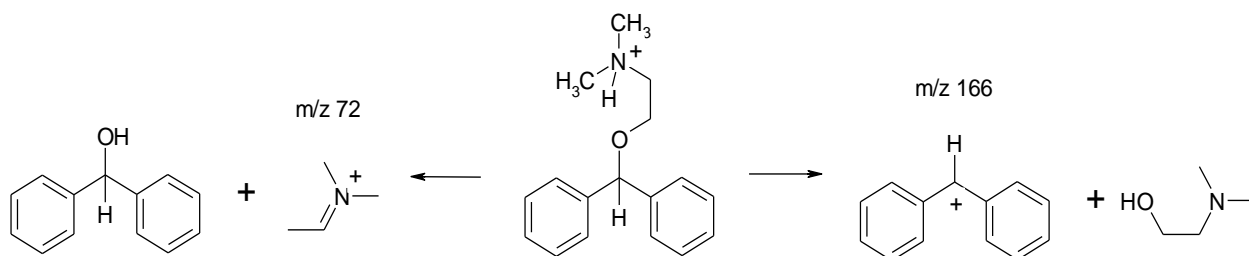


Рис. 6.4. Масс-спектр дифенгидрамина в области протонированных молекул, зарегистрированный: (а) до подачи в ионный источник паров метанола; (б) после подачи паров метанола. Подложка – кремний, полученный лазерной обработкой. Плотность энергии лазерного излучения 25 мДж/см<sup>2</sup>.

причина сильной фрагментации протонированного дифенгидрамина обусловлена особенностью структуры протонированной молекулы соединения: после присоединения протона структура дифенгидрамина стабилизируется путем частичного переноса протона к электроотрицательному атому кислорода (структура иона приведена на рис. 6.4а). Расстояние между кислородом и водородом в ионе составляет 0.22 нм. Перенос заряда приводит к ослаблению связи С–О и значительному понижению энергии ее диссоциации что, в свою очередь, приводит к интенсивной фрагментации при нагреве. В зависимости от места разрыва, образуются ионы с  $m/z$  166 или  $m/z$  72. При этом, как следует из данных на рис. 6.4а, вероятность образования ионов с  $m/z$  166 существенно выше. Фрагментацию можно описать следующей схемой (аналогичной схеме 4.2):



Ион метилированного дифенгидрамина, образующийся в результате взаимодействия с метанолом, является устойчивым соединением. Очевидно, что при замещении атома водорода в протонированной аминогруппе на метильную группу образуется ион, в котором процесс внутримолекулярного переноса водорода уже невозможен (структура иона приведена на рис. 6.4б). Поэтому метилирование ионов дифенгидрамина и аналогичных ему соединений обеспечивает их устойчивость.

## 6.2. Режим регистрации отрицательно заряженных ионов

Как показано в главе 1, лазерная десорбция/ионизация на кремниевых материалах обычно используется для получения положительных ионов. Режим регистрации отрицательных ионов применяется сравнительно редко. Ионизация в этом режиме чаще всего основана на депротонировании молекул аналита, поэтому большинство известных из литературных данных получено при определении органических и биоорганических кислот или соединений, содержащих в своем составе группы с кислотными свойствами. Эффективность ионизации таких

соединений обычно ниже по сравнению с ионизацией путем протонирования аналитов с основными свойствами.

Характерным примером могут служить результаты экспериментов по сравнению ионных сигналов  $\beta$ -аланина в режимах регистрации отрицательных и положительных ионов.  $\beta$ -аланин содержит в своем составе основную аминогруппу и кислотную карбоксильную группу, и может ионизоваться в условиях SALDI путем как протонирования, так и депротонирования молекул. В экспериментах использовалась эффузионная ячейка Кнудсена для создания постоянного потока аналита. Экспериментальная установка позволяет быстро переключать режимы регистрации ионов, что дает возможность провести корректное сравнение аналитических параметров в одинаковых условиях. На рис. 6.5 приведены зависимости ионных сигналов положительных и отрицательных ионов  $\beta$ -аланина от плотности лазерной энергии. Видно, что характер зависимостей одинаков в обоих режимах.

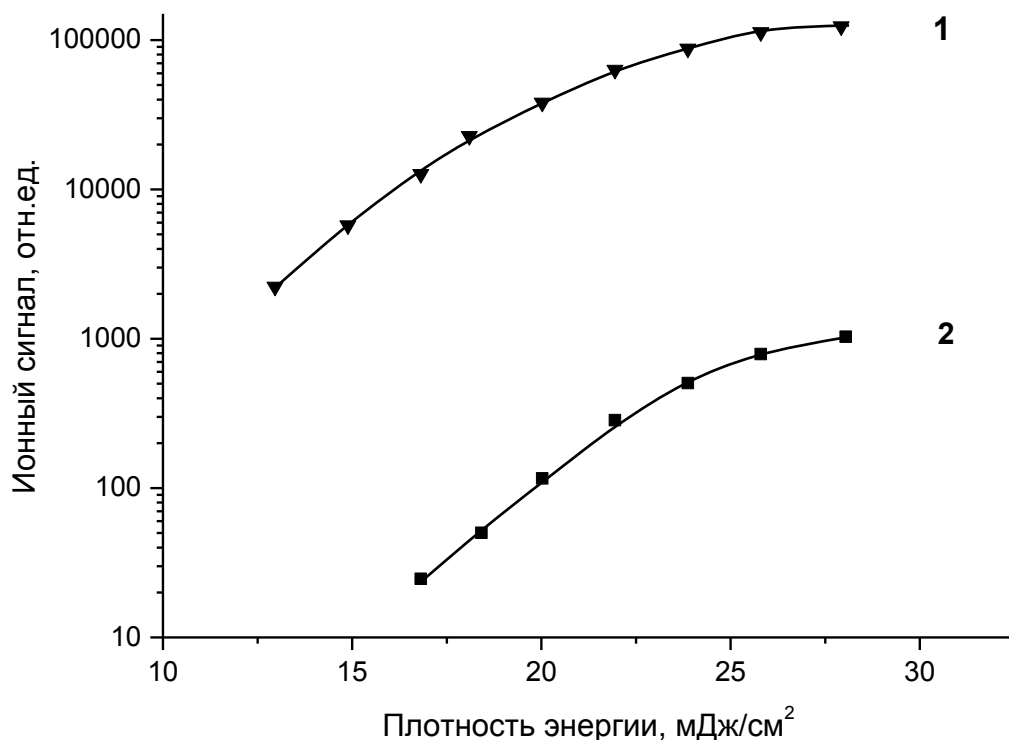


Рис. 6.5. Зависимости ионного сигнала  $\beta$ -аланина от плотности энергии лазерного излучения: 1 – режим регистрации положительных ионов, 2 – режим регистрации отрицательных ионов. Подложка – кремний, полученный лазерной обработкой.

Сравнение ионных сигналов показывает, что в одних и тех же условиях (при равных значениях плотности лазерной энергии, температуры и потока молекул аналита) эффективность ионизации путем депротонирования более чем на два порядка величины ниже, чем путем протонирования на том же эмиттере ионов, и составляет  $4 \times 10^{-7}$ . Близкие значения эффективностей ионизации получены и при определении других аминокислот – глицина и валина. Для исследованных пептидов, которые наносили на подложку электрораспылением, величины эффективности ионизации не превышают  $10^{-7}$ .

Значительно более высокая чувствительность SALDI обнаружена при изучении нитроароматических соединений: 2,4,6-тринитротолуола, 2,4,6-тринитрофенола (пикриновой кислоты) и 2,4,6-тринитрофенил,N-метилнитрамина (тетрила). Эксперименты проводили с использованием двух приборов, представленных на рис. 2.1 и рис. 5.2. Поток аналита на поверхность эмиттера ионов создавали с помощью эффузионной ячейки или генератора микропотока. В качестве эмиттеров ионов использовали пористый кремний и кремний, полученный лазерной обработкой. Условия проведения анализа были аналогичны условиям в режиме регистрации положительных ионов, за исключением того, что в ионный источник масс-спектрометра не подавали пары воды.

На рис. 6.6 приведены масс-спектры 2,4,6-тринитротолуола и 2,4,6-тринитрофенола, полученные с поверхности пористого кремния. Оба соединения ионизируются с образованием депротонированных молекул  $[M-H]^-$  и характерного набора фрагментных ионов. В масс-спектрах обоих соединений регистрируются интенсивные пики, соответствующие фрагментным ионам  $[M-OH]^-$ , а также пик с  $m/z$  46, который дают ионы  $[NO_2]^-$ . Кроме того, спектр 2,4,6-тринитротолуола содержит пики относительно низкой интенсивности с  $m/z$  194 и  $m/z$  197, которые можно интерпретировать как принадлежащие ионам  $[M-OH-O]^-$  и  $[M-NO]^-$ . В свою очередь, масс-спектр 2,4,6-тринитрофенола дополнительно содержит фрагментные пики низкой интенсивности с  $m/z$  198 (ионы  $[M-NOH]^-$ ),  $m/z$  196 ( $[M-O_2H]^-$ ),  $m/z$  182 ( $[M-NO_2H]^-$ ) и  $m/z$  136 ( $[M-NO_2-NO_2H]^-$ ).

Масс-спектр тетрила представлен на рис. 6.7. Видно, что в масс-спектре отсутствует пик депротонированных молекул с  $m/z$  288, и регистрируются только пики фрагментных ионов. Наиболее интенсивными среди них являются: пик с  $m/z$



207, который можно соотнести с ионами состава  $[M-H_2NO_4]^-$ , а также общий для всех исследованных нитроароматических соединений пик с  $m/z$  46, соответствующий ионам нитрогруппы  $[NO_2]^-$ . Кроме того, масс-спектр тетрила содержит ряд пиков низкой интенсивности, в частности, с  $m/z$  241 (ионы  $[M-NO_2]^-$ ),  $m/z$  161 ( $[M-H_2NO_4-NO_2]^-$ ) и  $m/z$  115 ( $[M-H_2NO_4-(NO_2)_2]^-$ ).

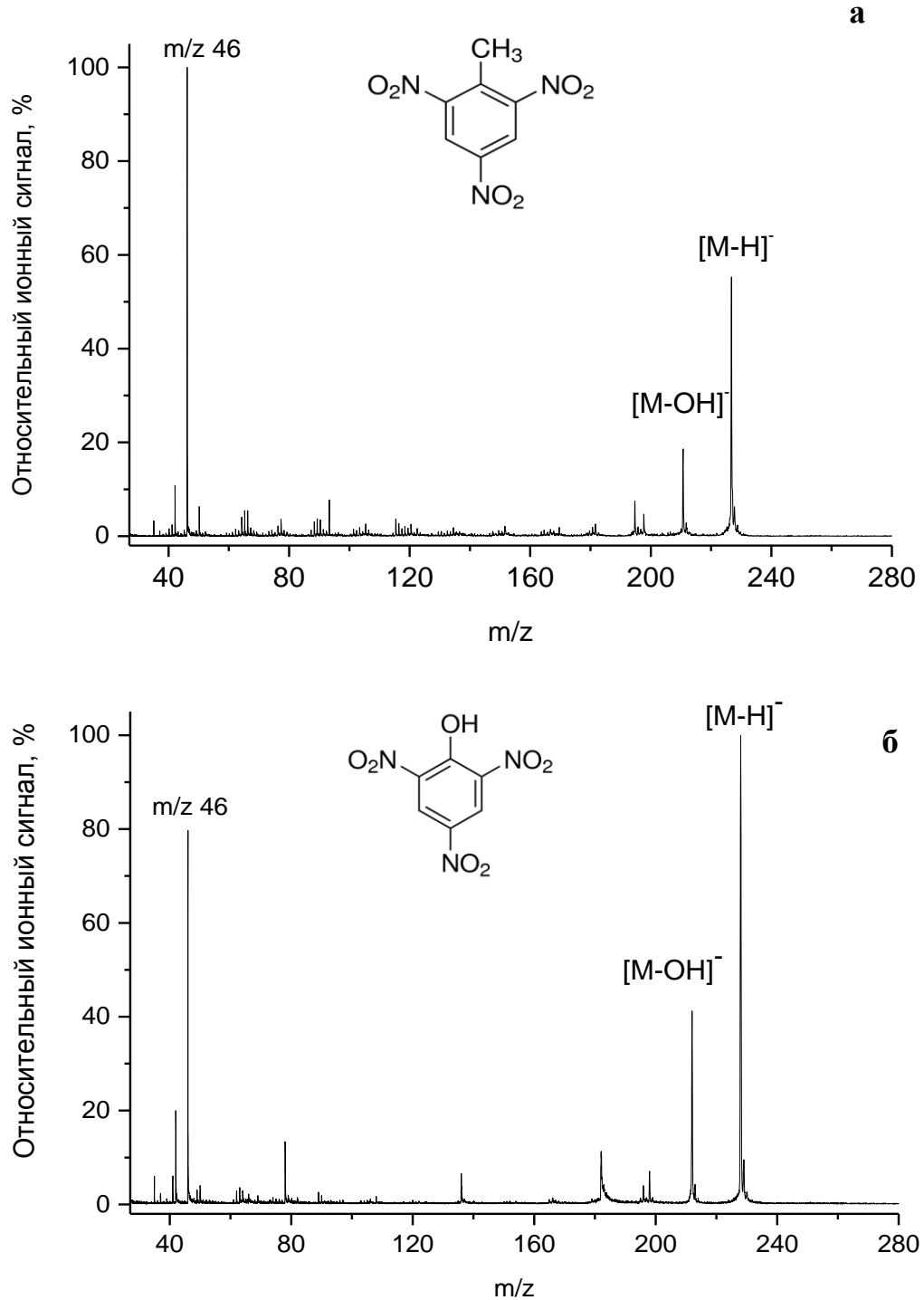


Рис. 6.6. Масс-спектры 2,4,6-тринитротолуола (а) и 2,4,6-тринитрофенола (б).

Подложка – пористый кремний.

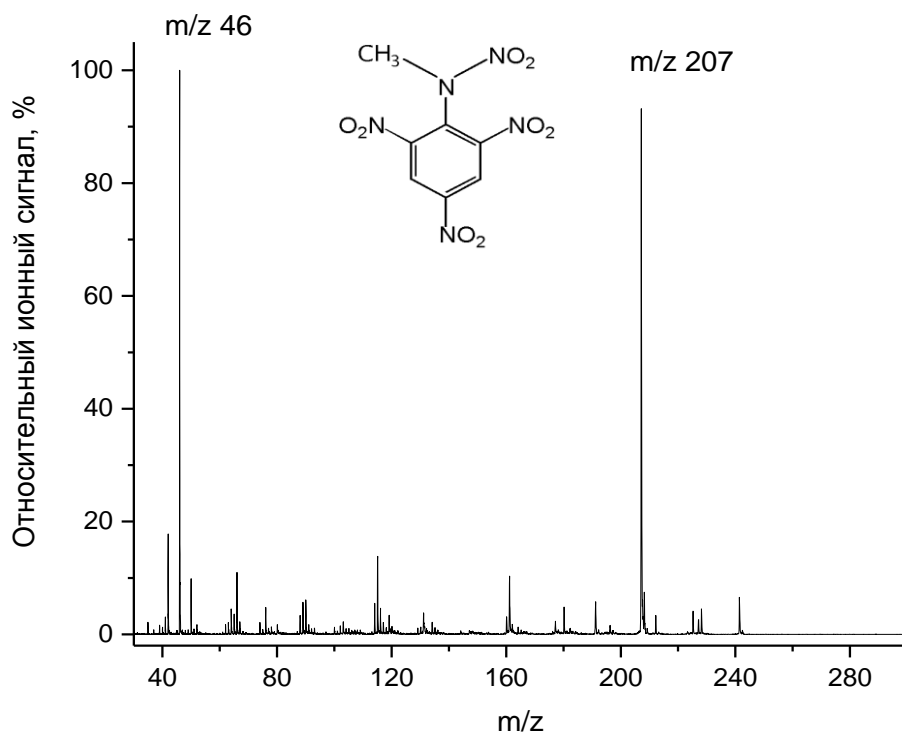


Рис. 6.7. Масс-спектр 2,4,6-тринитрофенил,N-метилнитрамина (тетрила). Подложка – пористый кремний.

Интересно, что в ряду фрагментных пиков тетрила наблюдаются пики, полностью соответствующие 2,4,6-тринитрофенолу. Интенсивности этих пиков возрастают при длительной эксплуатации ячейки Кнудсена в условиях повышенной температуры. Этот факт подтверждает предположение о том, что одним из продуктов термического разложения тетрила является пикриновая кислота [312]. Пики 2,4,6-тринитрофенола регистрировались также в масс-спектрах тетрила, полученных методами электрораспыления [313] и DART [314].

Как и для положительных ионов, степень фрагментации, а также соотношения между значениями интенсивностей фрагментных пиков при регистрации отрицательных ионов зависит от плотности энергии лазерного излучения. Следует также отметить, что степень фрагментации при использовании пористого кремния ниже по сравнению с кремнием, полученным лазерной обработкой.

В табл. 6.1 приведены результаты оценки значений эффективности ионизации нитроароматических соединений. Эксперименты проводили с использованием эффузионной ячейки Кнудсена, аналогично исследованиям в режиме регистрации положительных ионов, рассмотренным в разделе 4.2.2. Значения упругости пара

соединений взяты из работы [315]. На основе этих значений и с учетом геометрических параметров эффузионной ячейки находили величины потока молекул аналита на облучаемую лазером поверхность эмиттера ионов, которые приведены в табл. 6.1. В качестве ионного сигнала использовали суммарный ионный ток соединения, включающий ионный ток депротонированных молекул и основных фрагментных ионов.

Таблица 6.1. Эффективности ионизации нитроароматических соединений в режиме регистрации отрицательных ионов.

Соединение	Давление пара, мм.рт.ст., (температура, К)	Поток, молекул/с	Эффективность ионизации
2,4,6-тринитротолуол	$5.5 \times 10^{-6}$ (298)	$2.4 \times 10^7$	$4 \times 10^{-4}$
2,4,6-тринитрофенол	$7.5 \times 10^{-7}$ (298)	$2.6 \times 10^6$	$5 \times 10^{-3}$
2,4,6-тринитрофенил,N-метилнитрамин	$4.2 \times 10^{-7}$ (323)	$1.3 \times 10^6$	$10^{-3}$

Из полученных результатов следует, что значения эффективности ионизации исследованных нитроароматических соединений более чем на три порядка величины выше, чем аминокислот. Высокую чувствительность определения нитроароматических соединений можно объяснить «орто-эффектом» - специфичным влиянием заместителей, находящихся в орто-положении, на химические свойства аренов. Применительно к исследованным соединениям, «орто-эффект» проявляется, в частности, во внутримолекулярном переносе водорода с Н-содержащего заместителя (например, метильной группы для тринитротолуола) на расположенную в орто-позиции относительно этого заместителя нитрогруппу. Именно о таком процессе свидетельствуют регистрируемые в масс-спектрах тринитротолуола, а также, по-видимому, тринитрофенола пики, соответствующие фрагментным ионам состава  $[M-OH]^+$ .

Важное для ионизации путем депротонирования следствие «орто-эффекта» – это значительное увеличение кислотности соединения в газовой фазе GA. Для тринитротолуола количественная оценка увеличения кислотности дана в работе [316], в которой на основе экспериментально найденных констант равновесия

«2,4,6-тринитро-эффект» оценен в 273.2 кДж/моль, а найденная величина ГА 2,4,6-тринитротолуола составила 1293 кДж/моль. Для сравнения, значение ГА аланина составляет 1401 кДж/моль [317]. Величина кислотности в газовой фазе пикриновой кислоты оценена как 1266 кДж/моль [316], что примерно равно ГА такой сильной кислоты как  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [318].

Как следует из данных табл. 6.1, по параметру эффективности ионизации и, следовательно, чувствительности, исследованные нитроароматические соединения близки к высокоосновным соединениям в режиме регистрации положительных ионов. Вследствие высокой селективности ионизации в режиме регистрации отрицательных ионов вклад химического шума в фоновый сигнал близок к нулю, что позволяет проводить масс-спектрометрическое определение нитроароматических соединений по единственному характеристическому пику. Для 2,4,6-тринитротолуола и 2,4,6-тринитрофенола это – пики, соответствующие депротонированным молекулам ( $m/z$  226 и 228, соответственно), для тетрила – пик с  $m/z$  207. При использовании термодесорбционного ввода проб пределы обнаружения составили 68 пг/мл 2,4,6-тринитротолуола, 23 пг/мл 2,4,6-тринитрофенил,N-метилнитрамина и 5 пг/мл 2,4,6-тринитрофенола или, соответственно, 1.5, 0.4 и 0.1 фемтомоль определяемого соединения, помещенного в микрокювету и введенного в прибор.

Для оценки аналитических возможностей метода SALDI при определении нитроароматических соединений показательно сравнение чувствительности с другими масс-спектрометрическими методами. Анализ литературных данных показывает, что типичные значения пределов обнаружения этих соединений традиционными методами ионизации составляют  $0.1 \div 1$  нг аналита, введенного в масс-спектрометр. В качестве примера в табл. 6.2 представлены некоторые данные по достигнутым пределам обнаружения 2,4,6-тринитротолуола при использовании различных методов ионизации. Из приведенных данных следует, что по сравнению с традиционными методами масс-спектрометрии предел обнаружения 2,4,6-тринитротолуола методом SALDI до трех порядков величины ниже. Пример определения нитроароматических соединений показывает, что режим регистрации отрицательных ионов может быть эффективным инструментом для детектирования некоторых органических соединений с низкой величиной основности.

Таблица 6.2. Пределы обнаружения при определении 2,4,6-тринитротолуола различными масс-спектрометрическими методами.

Метод ионизации	Предел обнаружения, нг	Ссылка
Термораспыление	0.3	[319]
Термораспыление	0.35	[320]
Термораспыление	0.2	[321]
ХИ	4	[322]
ХИ	1	[314]
Электронный захват	0.12	[323]
DART	0.25	[314]

### 6.3. Лазерная десорбция/ионизация с переносом электрона

Рассмотренные способы расширения круга соединений, определяемых методом SALDI, базируются на использовании кислотно-основного взаимодействия. Ионизация с переносом протона традиционно рассматривается в литературе как основной механизм лазерной десорбции/ионизации на кремниевых материалах. Однако, в рамках метода возможна реализация и другого механизма, основанного на инициированной лазерным излучением ионизации путем переноса электрона. Этот вариант SALDI можно обозначить как LETDI (Laser-induced Electron Transfer Desorption/Ionization). Поскольку эффективность LETDI не зависит от величины основности определяемых соединений, такой вариант открывает новые возможности для определения химических соединений с низкой величиной основности методом лазерной десорбции/ионизации. В данном разделе рассмотрены некоторые результаты применения LETDI для детектирования и идентификации комплексных соединений металлов. В настоящее время соединения этого класса находят широкое применение в биотехнологии, аналитической химии, солнечной энергетике, фармакологии и других областях. Вместе с тем масс-спектрометрическое определение многих координационных соединений с использованием традиционных методов ионизации – MALDI и электрораспыления, вызывает значительные трудности вследствие низкой эффективности ионизации или неустойчивости комплексов в условиях ионизации. Поэтому разработка новых

методов, позволяющих реализовать «мягкую» ионизацию таких соединений остается сложной и важной задачей современной органической масс-спектрометрии.

### ***6.3.1. Исследованные комплексные соединений металлов***

Среди большого числа координационных соединений для исследований выбраны комплексные соединения металлов с органическими аналитическими реагентами – соединениями разных химических классов, служащими для качественного или количественного определения элементов, а также для разделения, концентрирования и других операций на стадии пробоподготовки. Комплексы с органическими реагентами имеют большое практическое значение в аналитической химии многих металлов. В настоящее время эта область аналитической химии базируется в большей степени на использовании спектрофотометрических и каталитических методов, которые имеют сравнительно низкую чувствительность и обычно не применимы при анализе проб сложного состава. Важно также, что условия получения комплексов, методики их синтеза, а также параметры, характеризующие степень извлечения и концентрирования элементов с использованием органических реагентов, хорошо известны.

Использованные в работе комплексные соединения металлов с дитизоном получали в соответствии с методикой [324]. Комплексные соединения металлов с реагентами 4-(2'-тиазолилазо)-резорцин (ТАР) и 1-(2'-пиридилазо)-2-нафтол (ПАН) и 1-(2'-хинолиназо)-5-диэтиламинофенол (хинолиназо-ДАФ) получали по методикам [325]. Комплексы металлов с 8-меркаптохинолином готовили в соответствии с методиками [326, 327].

Комплексные соединения рения с производными 2-меркаптофенола получали, используя 0.1 М раствора  $\text{HReO}_4$  в дистиллированной воде. К перренат-иону в кислом растворе (HCl) добавляли хлороформный 0.1 М раствор реагента при встряхивании. По окончании реакции хлороформную фракцию отбирали и использовали для анализа.

Комплексы металлов с тетраметилтиурамдисульфидом (тиурамом) получали, добавляя к рабочему раствору солей металлов хлороформный 0.01 М раствор реагента. Полученный раствор встряхивали в течение 5 мин, и отбирали хлороформную фракцию. pH рабочего раствора золота устанавливали в диапазоне

0÷1, рабочего раствора меди – 2÷3.

Комплекс осмия с 8-меркаптохинолином получали по оригинальной методике путем взаимодействия  $\text{Na}_2\text{OsO}_4$  с 8-меркаптохинолином с использованием микроволновой системы Discover SP-D (СЕМ, США). Аликвоту раствора соли  $\text{Na}_2\text{OsO}_4$ , содержащую 10 мкг Os, разбавляли дистиллированной водой до объема 10 мл, добавляли 0.5 мл насыщенного раствора 8-меркаптохинолина в этаноле и доводили значение рН до 3.4. Затем реакционную смесь нагревали в микроволновой системе до 80°C и выдерживали при этой температуре 5 мин. После этого раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли 2 мл хлороформа, встряхивали в течение 2 минут и отбирали хлороформную фракцию.

Кроме комплексов металлов с органическими реагентами были также изучены биологически активные комплексные соединения, в том числе, цисплатин и хлорофилл. Раствор цисплатина (комплекса цис-диаминдихлорплатина) готовили разбавлением товарного лекарственного препарата, раствора для инъекций «Цисплатин-Тева» (Тева, Израиль), в смеси метанол:вода (1:1). Хлорофилл А (комплекс магния с тетрапирролом) получали экстракцией из листьев растений по методике [328].

Исследования проводили с использованием трех различных масс-спектрометрических установок, оборудованных ионным источником лазерной десорбции/ионизации:

- времяпролетного рефлектрона типа Q-TOF, оборудованного системой ввода проб на основе вращающегося шара;
- масс-анализатора Orbitrap с прямым вводом ионов;
- серийного масс-спектрометра «UltrafleXtreme» (Bruker Daltonics Inc., Германия), выполненного по схеме времяпролетного рефлектрона, и оборудованного ионным источником MALDI.

Во всех приборах для лазерной десорбции/ионизации использовали третью гармонику основного излучения Nd:YAG лазера с длиной волны 355 нм. Эмиттерами ионов являлись кремниевые подложки, полученные обработкой монокристаллических подложек лазерным излучением. Растворы комплексов наносили капельным методом или электрораспылением.

### 6.3.2. Выбор интенсивности лазерного излучения

Как и в других вариантах SALDI, одним из основных факторов, определяющих эффективность ионизации в LETDI, является лазерное излучение. Поэтому для проведения анализа необходимо знать его оптимальные параметры.

На рис. 6.8 представлена типичная зависимость величины ионного сигнала от плотности энергии лазерного излучения в режиме регистрации положительных ионов, полученная на примере определения комплекса платины с 8-меркаптохинолином. Сравнение с данными, приведенными на рис. 2.17 и рис. 6.5, показывает, что выход молекулярных ионов характеризуется такими же зависимостями, как и выход протонированных и депротонированных молекул. На начальном участке зависимости ионный сигнал экспоненциально возрастает при увеличении плотности лазерной энергии, после чего выходит на насыщение. Именно на участке насыщения ионного сигнала следует проводить детектирование комплексов. Дальнейшее увеличение плотности энергии приводит к уменьшению выхода ионов, которое, как показано в главе 2, связано с разрушением активного поверхностного слоя подложки.

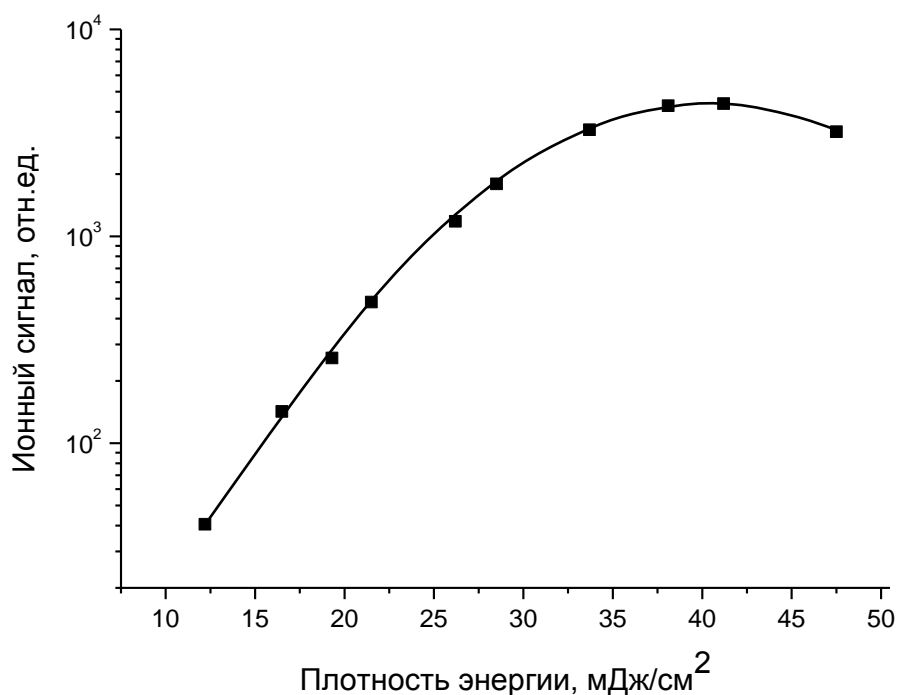


Рис. 6.8. Зависимость величины ионного сигнала комплекса платины с 8-меркаптохинолином от плотности энергии лазерного излучения. Длина волны излучения 355 нм, подложка – кремний, полученный лазерной обработкой.



### **6.3.3. Масс-спектры комплексных соединений металлов в условиях ионизации с переносом электрона**

Все исследованные комплексные соединения металлов дают в режиме регистрации положительных ионов простые масс-спектры, состоящие, главным образом, из пиков молекулярных ионов. В качестве иллюстрации на рис. 6.9 представлены масс-спектры некоторых комплексов с гетероциклическими азосоединениями, зарегистрированные на масс-анализаторе Q-TOF. Основным пик в спектре комплекса Mn с хинолиназо-ДАФ образуют ионы с  $m/z$  693.2 (рис. 6.9а). Измеренные значения  $m/z$  позволяют сделать вывод, что состав комплекса описывается соотношением металл:лиганд 1:2, где лигандом является хинолиназо-ДАФ без водорода. Аналогичные результаты получены для комплексного соединения La с ТАР, масс-спектр которого приведен на рис. 6.9б. Основным пик в спектре образуют ионы с  $m/z$  578.9, которые можно идентифицировать как молекулярные ионы комплекса состава металл:лиганд 1:2, где лиганд – ТАР без водорода.

Дополнительные возможности по идентификации комплексных соединений многих металлов дает наблюдение изотопного состава пиков. Например, природный палладий состоит из шести стабильных изотопов, имеющих весьма характерное распределение. Соответствующее распределение по величине  $m/z$  имеют и молекулярные ионы комплексов этого металла. На рис. 6.9в представлен масс-спектр Pd с ПАН. Анализ масс-спектра позволяет сделать вывод, что группа с характерным изотопным распределением пиков, максимальную интенсивность среди которых имеет пик с  $m/z$  354.0, соответствует молекулярным ионам комплекса состава металл:лиганд 1:1, где лиганд – ПАН без водорода.

На основе полученных масс-спектрометрических данных проведено квантово-химическое моделирование структур молекул и молекулярных ионов исследованных комплексных соединений. В расчетах использовали программный пакет Firefly. На первом этапе проводили поиск конформеров с минимальной энергией с использованием полуэмпирической модели PM3. Полученные пространственные структуры затем оптимизировали методом DFT в базисном наборе 6-31+G\*. Согласно полученным масс-спектрометрическим данным, связывание металла исследованными реагентами происходит путем замещения им

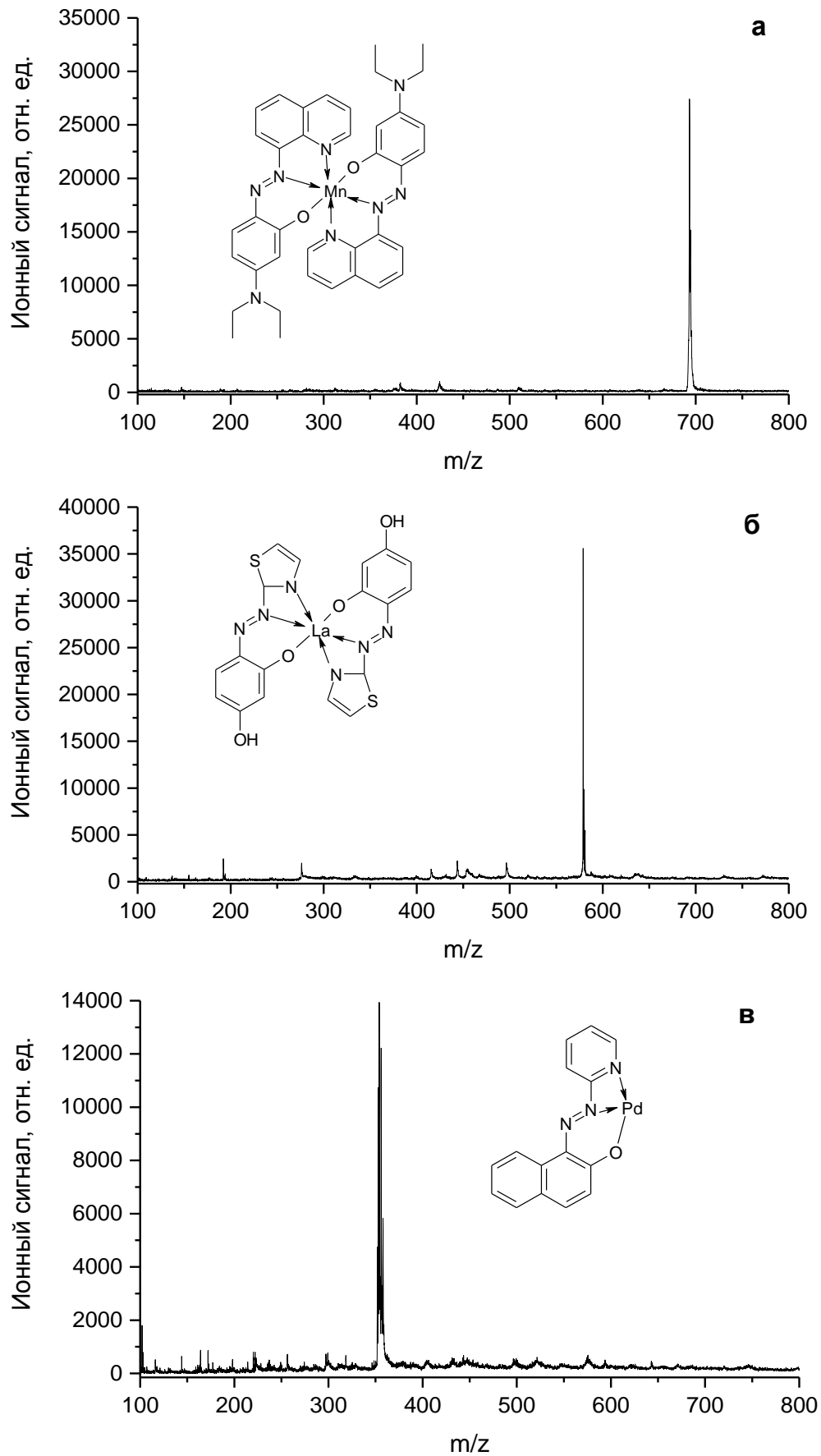


Рис. 6.9. Масс-спектры комплекса Mn с хинолиназо-ДАФ (а), комплекса Ln с ТАР (б) и комплекса Pd с ПАН (в). Масс-анализатор – Q-TOF.

атома водорода. Очевидно, это – атом водорода в гидроксигруппе. В результате расчетов установлено, что ион элемента взаимодействует не только с кислородом, но и с атомами азота, один из которых находится в азогруппе, а второй – в гетероцикле. Найденные структуры комплексов представлены на рисунках с масс-спектрами соответствующих соединений.

Для комплексов с хинолиназо-ДАФ найдено, что длины всех трех связей с ионами металлов лежат в диапазоне 1.9÷2.2 Å, а сам органический лиганд характеризуется практически плоской структурой. В случае комплекса Pd с ПАН расчеты показывают, что длина связи Pd–N(гетероциклический) несколько увеличивается, а сама молекула перестает быть плоской. Наблюдаемый эффект связан с тем, что реагент ПАН содержит пиридиновую группу, которая вследствие своего малого размера создает пространственное затруднение для координации иона металла. Также интерес представляют результаты расчета структуры комплекса La с ТАР. Этот реагент содержит в своем составе триазол, и следовательно, координация металла может идти как по атому серы, так по атому азота триазольной группы. Расчеты показали, что энергия комплекса, в котором La координирован атомом азота, примерно на 32 кДж/моль ниже, т.е. координация идет именно по атому азота. Триазольная группа имеет еще меньший размер, чем пиридиновая. Это приводит к тому, что длина связи между атомом металла и гетероциклическим атомом азота составляет уже 3 Å.

При идентификации координационных соединений большое значение имеют высокое разрешение, динамический диапазон и точность определения масс. Как показано в главе 5, по совокупности этих параметров лучшим является сочетание ионного источника SALDI с масс-анализатором Orbitrap. На рис. 6.10а представлен масс-спектр комплекса рения с 8-меркаптохинолином, зарегистрированный в области молекулярных ионов на масс-анализаторе Orbitrap, а на рис. 6.10б – рассчитанное изотопное распределение для соединения  $\text{ReO}(\text{C}_9\text{NSH}_6)_2$ . Видно, что наблюдаемое изотопное распределение с хорошей точностью совпадает с рассчитанным, из чего следует, что состав комплекса описывается формулой  $\text{ReOL}_2$ , где L – 8-меркаптохинолин без водорода. Кроме того, совпадение расчетного и экспериментального масс-спектров показывает, что поток десорбированных с поверхности ионов аналита не содержит протонированных

молекул, поэтому основной и единственный канал ионизации обусловлен процессом переноса электрона с определяемой молекулы.

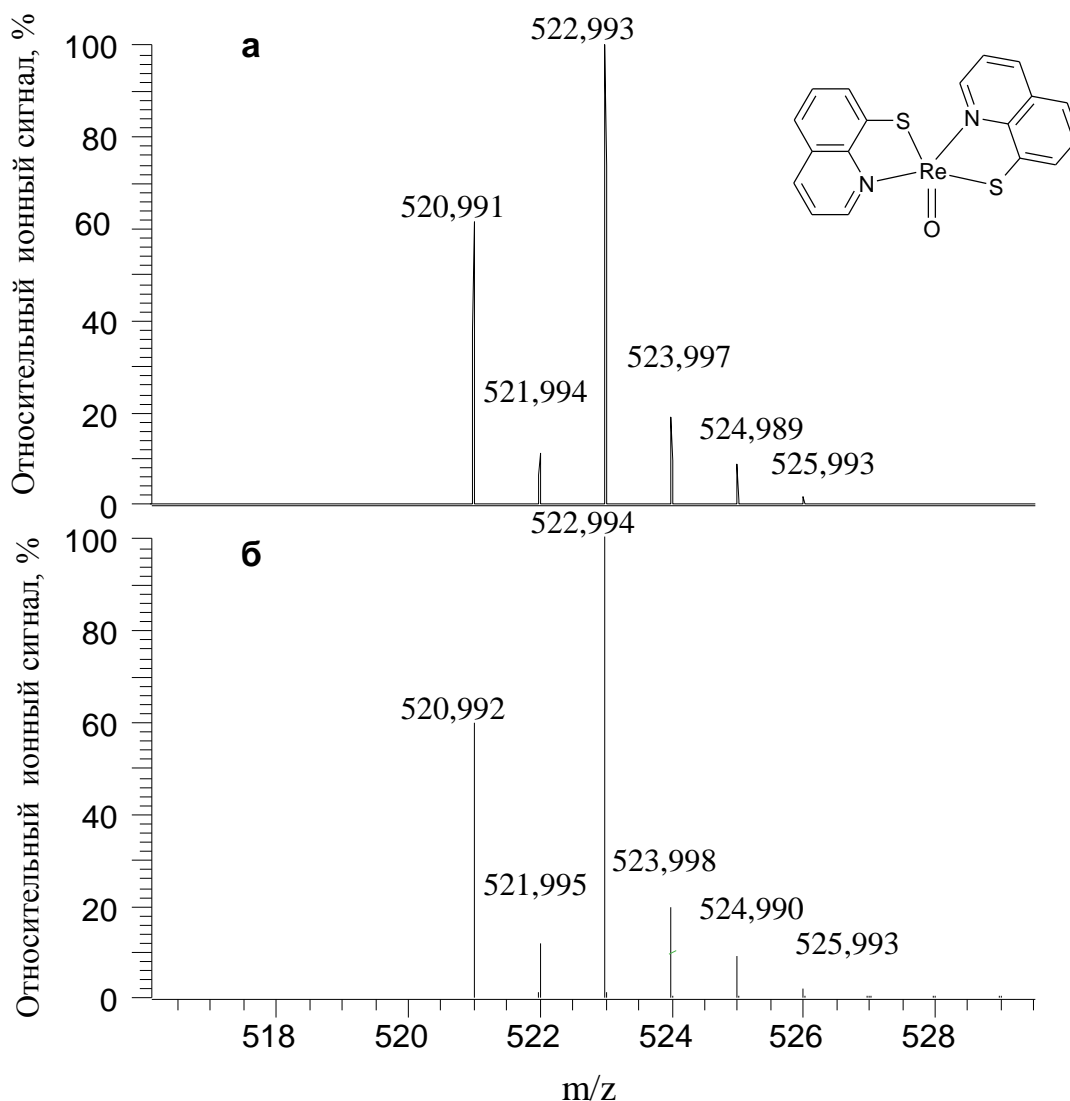


Рис. 6.10. Масс-спектр комплекса рения с 8-меркаптохинолином, зарегистрированный на масс-анализатор Orbitrap с прямым вводом ионов (а); рассчитанное изотопное распределение для соединения  $\text{ReO}(\text{C}_9\text{NSH}_6)_2$  (б).

Следует отметить, что в качестве эмиттеров ионов для LETDI в режиме регистрации положительных ионов могут быть использованы и другие материалы. В частности, как показали эксперименты, высокой эффективностью ионизации комплексных соединений металлов характеризуются также пленки оксида титана. Вместе с тем, кремний является более универсальным материалом, позволяющим ионизовать более широкий класс химических соединений.

В рамках LETDI с использованием кремниевых подложек может быть реализована ионизация комплексных соединений металлов путем переноса электрона на молекулу аналита. Иллюстрацией такого процесса являются приведенные на рис. 6.11 масс-спектры, снятые в режиме регистрации отрицательных ионов.

Масс-спектр на рис. 6.11а получен при определении комплекса рения с 3-трет-бутил-2-меркапто-фенолом. Видно, что максимальной интенсивностью характеризуется группа изотопных пиков с величинами отношения массы к заряду  $m/z$  от 725 до 730, где наибольшую интенсивность имеет пик с  $m/z$  727. Измеренные значения  $m/z$ , а также наблюдаемое соотношение изотопных пиков позволяет идентифицировать эту группу пиков как соответствующих отрицательно заряженным молекулярным ионам комплекса рения  $[\text{Re}(\text{C}_6\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{SO})_3]^-$ . Масс-спектр также содержит два интенсивных пика с  $m/z$  181 и 359. Можно предположить, что первый из них соответствует депротонированным молекулам органического реагента  $[\text{C}_6\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{SHO}]^-$ . Для проверки этого предположения были проведены масс-спектрометрические исследования чистого раствора реагента, которые подтвердили, что 3-трет-бутил-2-меркапто-фенол ионизируется с образованием ионов  $[\text{C}_6\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{SHO}]^-$ . Отдельный интерес представляет пик с  $m/z$  359. В процессе образования комплекса происходит восстановление рения (VII) до рения (VI), причем восстановителем является сам органический реагент. Поэтому в процессе синтеза комплексного соединения возможно протекание реакции с образованием дисульфида, имеющего молекулярную массу 360 а.е.м и состав  $\text{C}_6\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{OHS}-\text{SC}_6\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$ . Именно это соединение регистрируется в виде пиков депротонированных молекул с  $m/z$  359.

К другим исследованным координационным соединениям, которые лучше ионизируются с образованием отрицательно заряженных ионов, относятся комплексы металлов с дитизоном (дифенилтиокарбазоном,  $\text{H}_2\text{Dz}$ ). Примером может служить масс-спектр дитизоната платины, приведенный на рис. 6.11б. Наибольшую интенсивность в масс-спектре имеет изотопный кластер, соответствующий молекулярным ионам дитизоната платины состава  $[\text{Pt}(\text{HDz})_2]^-$ . Характерное для платины изотопное распределение имеет также группа пиков, наиболее интенсивным среди которых является пик с  $m/z$  508. Этот изотопный кластер

соответствует фрагментным ионам состава  $[\text{Pt}(\text{HDz})\text{SCN}]^-$ . Кроме того, масс-спектр содержит пики с  $m/z$  58 и 255. Эти два пика регистрировались в масс-спектрах всех исследованных комплексов металлов с дитизоном и соответствуют ионам органического реагента: пик с  $m/z$  58 – депротонированным молекулам дитизона  $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{S}]^-$ , пик с  $m/z$  255 – фрагментным ионам состава  $[\text{SCN}]^-$ .

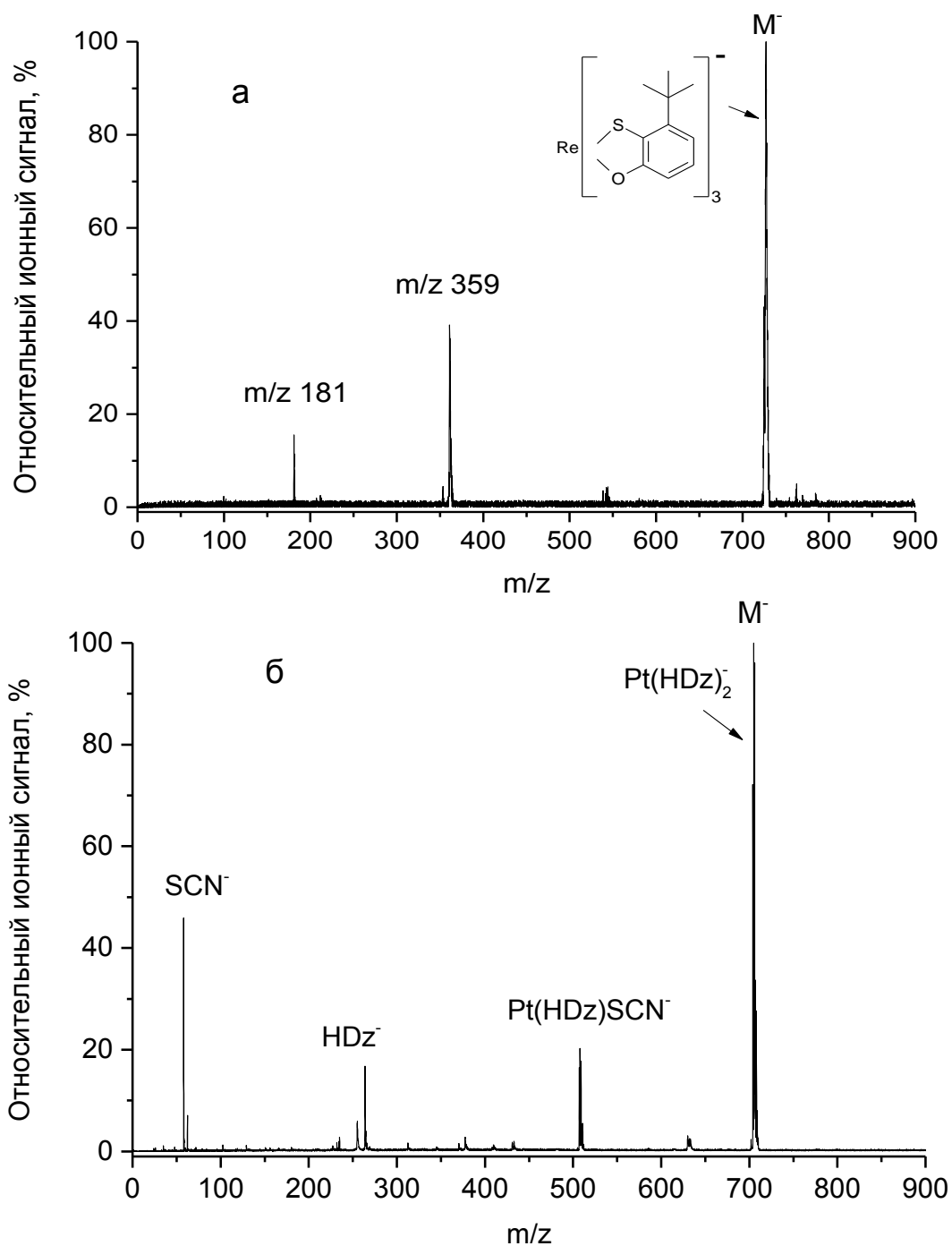


Рис. 6.11. Масс спектры комплекса рения с 3-трет-бутил-2-меркапто-фенолом (а) и комплекса платины с дитизоном (б).

Еще одним примером является масс-спектр противоопухолевого препарата цис-диаминдихлорплатины (цисплатина), приведенный на рис. 6.12. Масс-спектр зарегистрирован после нанесения электрораспылением на кремниевую подложку раствора для инъекций «Цисплатин», разбавленного в  $5 \times 10^3$  раз смесью метанол:вода (1:1) (масса нанесенного аналита составила 0.2 нг). Видно, что масс-спектр содержит набор трех различных платино-содержащих кластеров, отличающихся количеством атомов хлора. Первый кластер соответствует молекулярным ионам комплекса (рассчитанное изотопное распределение приведено на вставке к рис. 6.12), два других – ионам состава  $[M-Cl]^-$  и  $[M+Cl]^-$ .

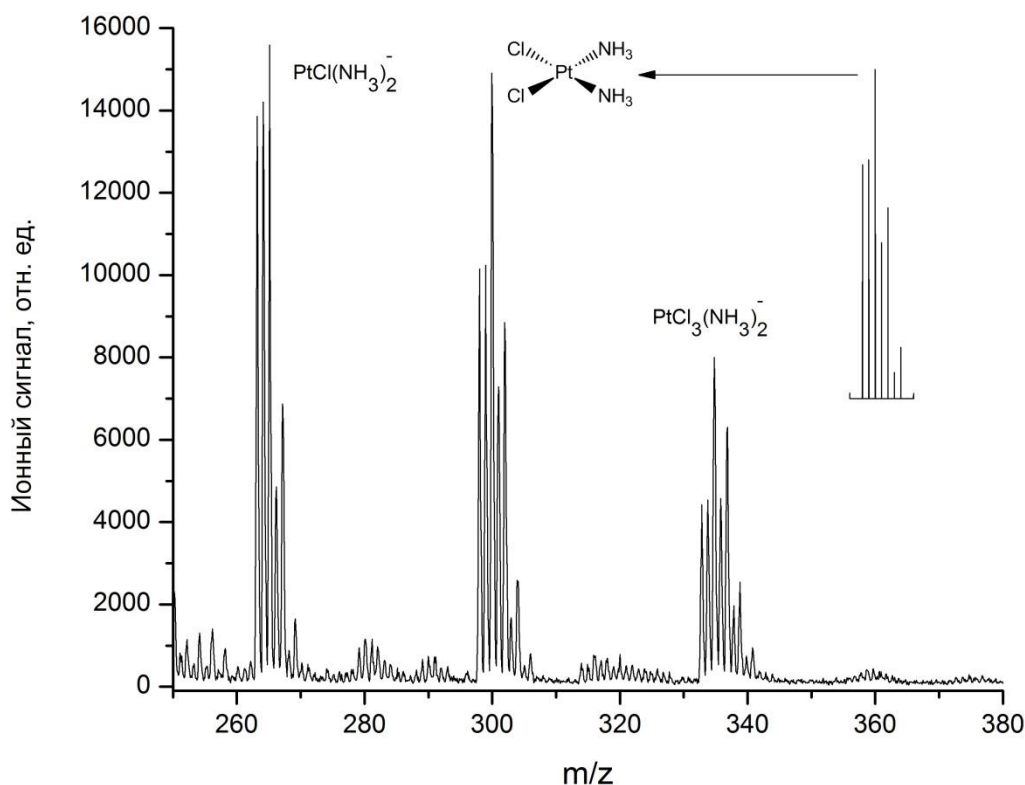


Рис. 6.12. Масс-спектр цис-диаминдихлорплатины (цисплатина). На вставке приведено рассчитанное изотопное распределение для цис-диаминдихлорплатины.

Анализ полученных масс-спектров показывает, что LETDI, как и другие варианты SALDI, относится к методам «мягкой» ионизации. В масс-спектрах обычно доминируют пики молекулярных ионов, а степень фрагментации образующихся ионов мала.

### 6.3.4. Сравнение характеристик LETDI с методами MALDI, LDI и электрораспыления

Найденные значения эффективности ионизации исследованных комплексных соединений варьируются в зависимости от природы металла и лигандов в диапазоне величин  $10^{-5} \div 10^{-8}$ . Полученные значения значительно уступают эффективности лазерной десорбции/ионизации высокоосновных соединений путем переноса протона. Для того чтобы более ясно представлять конкурентоспособность и аналитические возможности LETDI, было проведено сравнение чувствительности четырех методов – LDI, MALDI, LETDI и электроспрея, при анализе одних и тех же растворов комплексных соединений металлов.

Сравнительные исследования методов лазерной десорбции/ионизации проводили с использованием установки на рис. 2.1 и серийного масс-спектрометра UltrafleXtreme, выполненного по схеме времяпролетного рефлектрона и оборудованного ионным источником MALDI. В качестве материалов подложек для LDI применяли нержавеющую сталь, для LETDI – кремний, модифицированный лазерным излучением. Для детектирования комплексов методом MALDI использовали матрицы DHB и  $\alpha$ -HCCA. Масс-спектры снимали при найденных на предварительном этапе исследований для каждого метода оптимальных параметрах излучения.

Характерный пример, иллюстрирующий различие в чувствительности методов лазерной десорбции/ионизации координационных соединений, представлен на рис. 6.13, на котором приведены масс-спектры комплекса платины с 8-меркаптохинолином  $Pt(C_9H_6NS)_2$ . Масса введенного в прибор анализа во всех случаях составляла 5 нг. Видно, что все использованные методы позволяют ионизировать определяемое соединение, причем основным каналом ионизации является образование молекулярных ионов комплекса  $M^+$ . Однако величины ионных сигналов комплекса существенно различны. Из данных рис. 6.13 следует, что минимальной эффективностью ионизации характеризуется метод LDI, а максимальной – LETDI. Ионный сигнал в ряду LDI, MALDI и LETDI возрастает примерно в соотношении 1:5:120. MALDI масс-спектр на рис. 6.13б зарегистрирован с матрицей  $\alpha$ -HCCA. При использовании матрицы DHB эффективность ионизации комплекса ниже, по крайней мере, в пять раз.



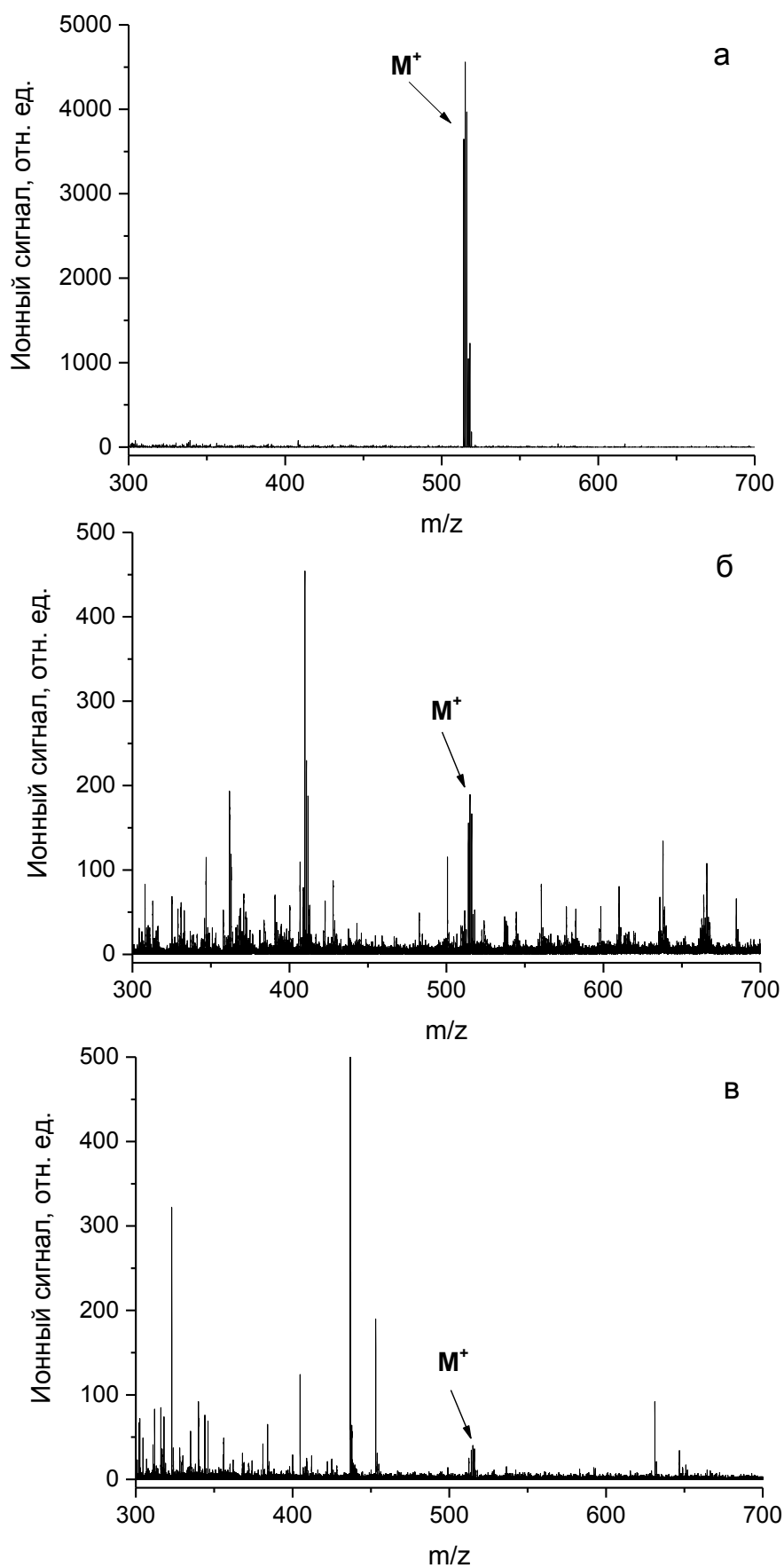


Рис. 6.13. Масс-спектры комплекса платины с 8-меркаптохинолином, полученные: (а) методом LETDI, (б) методом MALDI, (в) методом LDI.

Другим наглядным примером отличия чувствительности различных методов лазерной десорбции/ионизации является рис. 6.14, на котором представлены два масс-спектра комплекса золота с тиурамом (тетраметилтиурамдисульфидом) в области молекулярных ионов. Первый масс-спектр получен методом LETDI, второй - методом MALDI. Количество введенного в прибор анализа одинаково для обоих методов. Из приведенных данных следует, что эффективность LETDI более чем на два порядка величины выше.

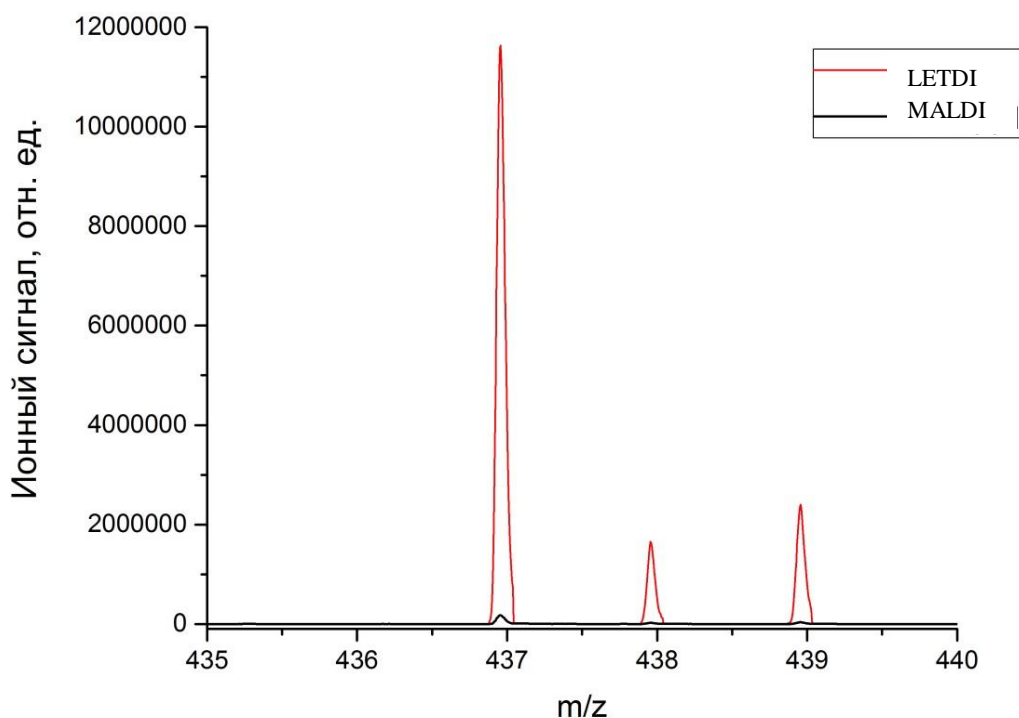


Рис. 6.14. Масс-спектры в области молекулярных ионов комплекса золота с тиурамом, полученные методами LETDI и MALDI. Масса введенного в прибор анализа равна 1 нг. Масс-спектрометр – UltrafleXtreme.

Аналогичные результаты получены при сравнительном исследовании других комплексных соединений металлов, включая комплексы с дитизоном, азосоединениями, тиокарбаматами, а также хлорофилл. По сравнению с MALDI, во всех случаях чувствительность LETDI выше от одного до трех порядков величины. В свою очередь, эффективность ионизации комплексов методом MALDI в несколько раз выше, чем методом LDI.

Исследованные комплексные соединения характеризуются относительно низкими значениями коэффициентов поглощения лазерного излучения на длине волны 355 нм. Например, спектр поглощения комплекса золота с тиурамом в диапазоне длин волн 260÷450 нм показан на рис. 6.15. Спектр зарегистрирован на спектрофотометре UV 1700 (Shimadzu, Япония) при фотометрировании в кювете длиной 10 мм раствора комплекса в хлороформе с концентрацией 2 мкг/мл на фоне чистого растворителя. Видно, что интенсивное поглощение излучения наблюдается при длинах волн, меньших 350 нм, а оптическая плотность раствора на длине волны лазерного излучения не превышает  $10^{-2}$ .

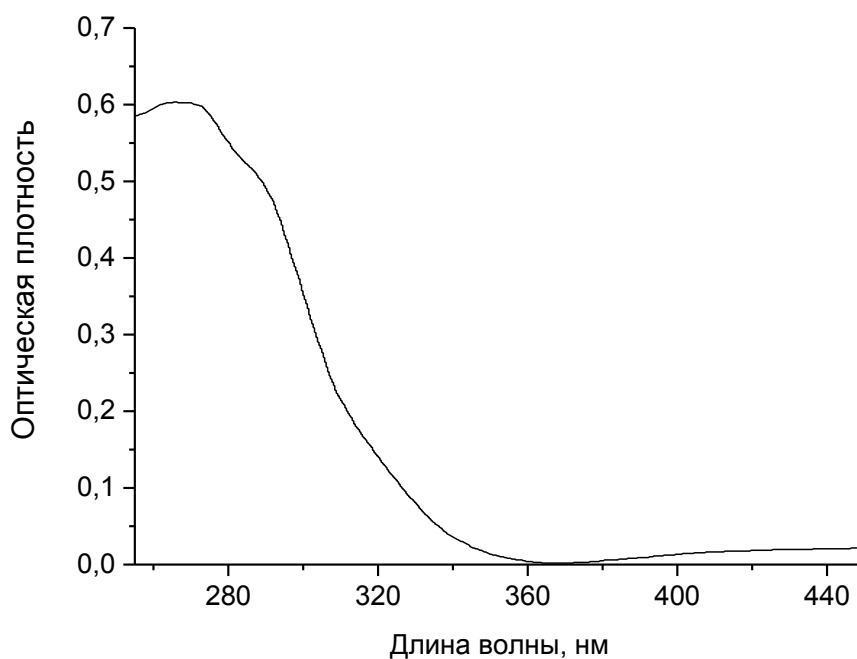


Рис. 6.15. Спектр поглощения комплекса золота с тиурамом. Растворитель — хлороформ, концентрация комплекса 2 мкг/мл.

Представляет интерес сравнение методов лазерной десорбции/ионизации при определении соединений с высоким коэффициентом поглощения лазерного излучения. Исследования показали, что такие соединения детектируются методами MALDI, LETDI и LDI с близкими значениями эффективности ионизации. Характерным примером могут служить результаты масс-спектрометрического определения родамина 6G, спектр поглощения которого характеризуется локальным максимумом вблизи длины волны 350 нм. Все использованные методы

дают схожие масс-спектры родамина, в которых основной пик соответствует ионам состава  $[C_{28}H_{30}N_2O_3H]^+$ . Величина ионного сигнала в ряду MALDI, LETDI и LDI меняется мало, возрастая в соотношении примерно 1:1.5:3.

Полученные данные позволяют предположить, что ионизация комплексных соединений с низкой величиной сродства к протону обусловлена двумя различными процессами. Для соединений с высоким коэффициентом поглощения лазерного излучения преобладает процесс фотоионизации, эффективность которого определяется взаимодействием адсорбированных молекул аналита с излучением, а подложка (или матрица) нужна для перевода ионов в газовую фазу. Для соединений с низким коэффициентом поглощения преобладает ионизация, обусловленная процессами переноса электронов между подложкой и адсорбированными на ее поверхности молекулами аналитов, а эффективность такой ионизации определяется свойствами соединений и подложки.

Сравнение характеристик методов LETDI и электрораспыления проводили на масс-спектрометрической установке типа Q-TOF (рис. 5.16), которая позволяет проводить анализ растворов как в режиме SALDI с использованием вращающегося шара, так и в режиме ионизации электрораспылением. Исследования показали, что по эффективности ионизации комплексных соединений с низкой величиной сродства к протону электроспрей значительно уступает LETDI. Например, предел обнаружения комплекса золота с тиурамом при ионизации электрораспылением выше в  $2 \times 10^3$  раз. Для других исследованных соединений найдено, что чувствительность LETDI выше чувствительности метода электрораспыления от  $3 \times 10^2$  до  $2 \times 10^4$  раз.

#### 6.4. Заключение

Рассмотрены подходы к определению органических соединений с низкой величиной основности методом лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов.

Первый подход базируется на химической модификации молекул аналита на стадии пробоподготовки с целью увеличения его основности в газовой фазе. На примере использования реакции восстановления амидной группы до аминогруппы под действием алюмогидрида лития показано, что предложенный подход позволяет

значительно увеличить чувствительность определения соединений с относительно низкой основностью. Применение такой дериватизации при анализе растворов карбомазепина и фенобарбитала позволяет снизить пределы обнаружения соединений на два порядка величины.

Предложен способ дериватизации протонированных молекул в условиях лазерной десорбции/ионизации, основанный на взаимодействии десорбированных ионов с молекулами спиртов. Способ отличается простотой, не влияет на длительность анализа и позволяет улучшить аналитические характеристики метода SALDI при проведении анализа в условиях интерференции пиков и при сильной фрагментации протонированных молекул аналита.

Второй подход основан на использовании режима регистрации отрицательных ионов. Установлено, что SALDI является высокочувствительным методом определения нитроароматических соединений. Получены масс-спектры 2,4,6-тринитротолуола, 2,4,6-тринитрофенола и 2,4,6-тринитрофенил,N-метилнитрамина, изучены особенности фрагментации ионов, определены значения эффективности ионизации. Найдено, что пределы обнаружения исследованных соединений до трех порядков величины ниже, чем при использовании традиционных масс-спектрометрических методов.

Третий подход основан на использовании нового варианта лазерной десорбции/ионизации – инициированной лазерным излучением ионизации с переносом электрона (LETDI). Представлены результаты по применению LETDI для определения и идентификации комплексных соединений металлов. Показано, что LETDI, как и другие варианты SALDI, характеризуется «мягкой» ионизацией, приводящей к образованию молекулярных ионов. Сравнение различных методов ионизации показало, что по эффективности ионизации исследованных комплексных соединений металлов LETDI превосходит MALDI до трех порядков величины, электрораспыление – до четырех порядков величины.

Предложенные подходы перспективны для дальнейшего развития лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов и позволяют улучшить метрологические характеристики и расширить число классов химических соединений, которые можно детектировать этим методом с высокой чувствительностью.

## ВЫВОДЫ

1. Определена роль факторов, влияющих на протекание процессов лазерной десорбции/ионизации на поверхности кремниевых материалов: морфологии и структуры поверхностного слоя, химического состава поверхности, лазерного излучения, давления паров воды, основности аналита. Установлены зависимости эффективности ионизации от параметров этих факторов и найдены оптимальные значения параметров для определения летучих органических соединений. Показано, что общим свойством эффективных кремниевых эмиттеров ионов является высокая плотность структурных дефектов, которым соответствуют глубокие энергетические уровни. Найдено, что эффективность ионизации экспоненциально зависит от основности определяемых соединений в газовой фазе.

2. Предложена модель лазерной десорбции/ионизации с переносом протона на поверхности кремниевых материалов. На основе полученных экспериментальных данных, численного моделирования температуры поверхности при лазерном воздействии и квантово-химических расчётов показано, что реакция протонирования протекает на поверхности и инициируется локализацией фотоиндуцированных носителей положительного заряда вблизи протонодонорного центра. Десорбция ионов протекает по тепловому механизму при температурах, существенно меньших, чем температура плавления материала подложки и обусловлена быстрым локальным нагревом поверхности под действием лазерного излучения.

3. Предложены новые кремниевые материалы для использования в качестве эмиттеров ионов в условиях лазерной десорбции/ионизации органических соединений. Разработаны простые способы формирования активной поверхности эмиттеров ионов, обеспечивающие высокую воспроизводимость ионизационных свойств материала, а также высокую чувствительность анализа.

4. Разработана технология и созданы методы масс-спектрометрического определения летучих органических соединений, основанные на сочетании SALDI с термодесорбционным методом и газовой хроматографией. Найдены значения эффективности ионизации органических соединений. На примере фенилалкиламинов изучены закономерности фрагментации ионов. Показано, что

фрагментация однозначно определяется структурой молекул аналитов, что позволяет достоверно идентифицировать определяемые соединения при анализе проб сложного состава.

5. Разработаны способы определения лекарственных соединений в моче и плазме крови. Продемонстрирована возможность прямого определения содержания лекарств в моче без предварительной пробоподготовки при использовании сочетания SALDI с термодесорбционным вводом проб. Предложена методика определения соединений в плазме крови на основе сочетания SALDI с газовой хроматографией. Определены основные аналитические параметры разработанных методов при определении фенилалкиламинов и лекарственных соединений – чувствительность, воспроизводимость, предел обнаружения, динамический диапазон. Достигнутые пределы обнаружения варьируются для различных соединений от 2 до 400 пг/мл, что до трех порядков величины ниже, чем при использовании стандартных масс-спектрометрических методов с электронной и химической ионизацией.

6. Предложен подход к on-line анализу газовых сред, основанный на сочетании ионного источника SALDI и системы ввода проб с вращающимся шаром. Разработан метод определения органических соединений в атмосферном воздухе, позволяющий проводить детектирование высокоосновных соединений в воздухе на уровне 100 ppt и ниже, а также осуществлять непрерывный контроль химического состава атмосферы. Создан генератор микропотока на основе массочувствительных кварцевых пьезорезонаторов для непрерывного контроля ионизационных свойств эмиттера ионов и в качестве внешнего стандарта при анализе воздуха.

7. Расширены возможности метода SALDI для анализа растворов нелетучих органических соединений. Разработан способ определения нелетучих соединений, основанный на использовании электрораспыления при атмосферном давлении для нанесения пробы на кремниевый эмиттер ионов и системы с вращающимся шаром для ввода пробы в масс-спектрометр. Оптимизированы условия нанесения и анализа пробы, найдены основные аналитические характеристики при определении ряда лекарственных веществ. Установлено, что

по чувствительности анализа разработанный способ не уступает, а для большинства исследованных соединений – превосходит стандартный метод ионизации электрораспылением. Показано, что метод SALDI совместим с масс-анализатором сверхвысокого разрешения «Orbitrap» с прямым вводом ионов.

8. Предложены подходы к дальнейшему развитию SALDI, позволяющие улучшить метрологические характеристики метода и расширить число классов химических соединений, которые можно детектировать с высокой чувствительностью: дериватизация молекул соединений с низкой величиной основности и дериватизация образующихся в процессе SALDI ионов; лазерная десорбция/ионизация в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов; инициированная лазерным излучением ионизация путем переноса электрона.

9. Установлено, что в режиме регистрации отрицательных ионов SALDI является высокочувствительным методом определения нитроароматических соединений с пределами обнаружения аналитов до трех порядков величины ниже, чем при использовании традиционных масс-спектрометрических методов. На примере использования реакции восстановления амидной группы до аминогруппы показано, что дериватизация позволяет снизить предел обнаружения соединений с амидной группой на два порядка величины. Показано, что разработанный вариант SALDI – лазерно-индуцированная десорбция/ионизация с переносом электрона (LETDI), применим для масс-спектрометрического определения комплексных соединений металлов, в том числе, комплексов с органическими реагентами, лекарственных препаратов с противоопухолевой активностью и комплексов с биолигандами. Показано, что по эффективности ионизации комплексных соединений металлов метод LETDI превосходит стандартные масс-спектрометрические методы MALDI и электрораспыления от одного до трех порядков величины.



**Список условных обозначений и сокращений**

- АЦП – аналого-цифровой преобразователь;  
ВЭУ – вторично-электронный умножитель;  
ГХ – газовая хроматография;  
ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция;  
ИК – инфракрасный;  
МКП – микроканальные пластины;  
МС – масс-спектрометрия;  
ПАК – полиакриловая кислота;  
ПАН – 1-(2'-пиридилазо)-2-нафтол;  
пДКЭЭИ – поли[-N-2-н-децил-оксикарбонилэтил]этиленимин;  
ПМК – полималеиновая кислота;  
ТАР – 4-(2'-тиазолилазо)-резорцин;  
ТФЭ – твердофазная экстракция;  
УФ – ультрафиолетовый;  
ХИ – химическая ионизация;  
Хинолиназо-ДАФ – 1-(2'-хинолиназо)-5-диэтиламинофенол;  
ЭИ – электронная ионизация;  
ЯМР – ядерный магнитный резонанс;  
 $\alpha$ -НССА –  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота;  
DART – прямой анализ в режиме реального времени;  
DHB – 2,5-дигидроксибензойная кислота;  
DIOS – десорбция/ионизация на пористом кремнии;  
DFT – метод функционала плотности;  
GA – кислотность в газовой фазе;  
GB – основность в газовой фазе;  
LETDI – лазерно-индуцированная десорбции/ионизации с переносом электрона;  
LDI – лазерная десорбция/ионизация;  
MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация;  
PA – сродство к протону;  
Q-TOF – комбинация квадруполь - времяпролетный рефлектор;  
RHF – ограниченный метод Хартри-Фока;  
SALDI – лазерная десорбция/ионизация, активируемая поверхностью;  
SEAC – усиленный поверхностью аффинный захват;  
SELDI – лазерная десорбция/ионизация, усиленная поверхностью;  
SEND – усиленная поверхностью прямая десорбция;

### Список литературы

1. Honig R.E., Woolston J.R. Laser induced emission of electrons, ions, and neutral atoms from solid surfaces // *Appl. Phys. Lett.* — 1963. — V. 2, № 7. — P. 138-139.
2. Карлов Н.В., Крынецкий Б.В., Мишин В.А., Прохоров А.М. Селективная фотоионизация атомов и ее применение для разделения изотопов и спектроскопии // *УФН.* — 1979. — Т. 127, № 4. — С. 593-620.
3. Амбарцумян Р.В., Калинин В.П., Летохов В.С. Двухступенчатая селективная фотоионизация атомов рубидия лазерным излучением // *Письма в ЖЭТФ.* — 1971. — Т. 13. — С. 305-307.
4. Летохов В.С. Нелинейные селективные фотопроцессы в атомах и молекулах / В.С. Летохов. — М.: Наука, 1983. — 408 с.4. Амбарцумян Р.В., Калинин В.П., Летохов В.С. Двухступенчатая селективная фотоионизация атомов рубидия лазерным излучением // *Письма в ЖЭТФ.* — 1971. — Т. 13. — С. 305-307.
5. Hurst G.S., Nayfeh M.H., Young J.P. A demonstration of one-atom detection // *Appl. Phys. Lett.* — 1977. V. 30, № 5. — P. 229-231.
6. Hillenkamp F., Unsöld E., Kaufmann R., Nitsche R. A high-sensitivity laser microprobe mass analyzer // *Appl. Phys.* — 1975. — V. 8, № 4. — P. 341-348.
7. Vogt H., Heinen H.J., Meier S., Wechsung R. LAMMA 500 principle and technical description of the instrument // *Fresenius Z. Anal. Chem.* — 1981. — V. 308, № 3. — P. 195-200.
8. Мамырин Б.А., Каратаев В.И., Шмикк Д.В., Загулин В.А. Масс-рефлектрон. Новый безмагнитный времяпролётный масспектрометр с высокой разрешающей способностью // *ЖЭТФ.* — 1973. — Т. 64, № 1. — С. 82-89.
9. Posthumus M.A., Kistemaker P.G., Meuzelaar H.L.C., Ten Noever de Brauw M.C. Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules // *Anal. Chem.* — 1978. — V. 50, № 7. — P. 985-991.
10. Hardin E.D., Vestal M.L. Laser ionization mass spectrometry of nonvolatile samples // *Anal. Chem.* — 1981. — V. 53, № 9. — P. 1492-1497.
11. Jones R.M., Lamb J.H., Lim C.K. Urinary porphyrin profiles by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry without the use of classical matrices // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1995. — V. 9, № 10. — P. 921-923.

12. Xu H., Yu D., Que G. Characterization of petroporphyrins in Gudao residue by ultraviolet-visible spectrophotometry and laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *Fuel*. — 2005. — V. 84, № 6. — P. 647-652.
13. Calvano C.D., Palmisano F., Zambonin C.G. Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of triacylglycerols in oils // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2005. — V. 19, № 10. — P. 1315-1320.
14. Ramsey B.G., Bier M.E. A laser desorption ionization mass spectrometry investigation of triarylboranes and tri-9-anthrylborane photolysis products // *J. Organomet. Chem.* — 2005. — V. 690, № 4. — P. 962-971.
15. Srzić D., Martinović S., Tolić L.P., Kezele N., Shevchenko S. M.Klasinc L. Laser desorption Fourier-transform mass spectrometry of lignins // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1995. — V. 9, № 3. — P. 245-249.
16. Bayerbach R., Nguyen V.D., Schurr U., Meier D. Characterization of the water-insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin): Part III. Molar mass characteristics by SEC, MALDI-TOF-MS, LDI-TOF-MS, and Py-FIMS // *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. — 2006. — V. 77, № 2. — P. 95-101.
17. Apicella B., Millan M., Herod A.A., Carpentieri A., Pucci P., Ciajolo A. Separation and measurement of flame-formed high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by size-exclusion chromatography and laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2006. — V. 20, № 7. — P. 1104-1108.
18. Chevrier M.R., Ryan A.E., Lee D.Y., Zhongze M., Wu-Yan Z., Via C.S. *Boswellia carterii* extract inhibits TH1 cytokines and promotes TH2 cytokines in vitro // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2005. — V. 12, № 5. — P. 575-580.
19. Spačil Z., Shariatgorji M., Amini N., Solich P., Ilag L.L. Matrix-less laser desorption/ionisation mass spectrometry of polyphenols in red wine // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 23, № 12. — P. 1834–1840.
20. Haddrell A.E., Feng X., Nassar R., Bogan M.J., Agnes G.R. Off-line LDI-TOF-MS monitoring of simultaneous inorganic and organic reactions on particles levitated in a laboratory environment // *J. Aerosol Sci.* — 2005. — V. 36, № 4. — P. 521–533.
21. Seydel U., Lindner B., Wollenweber H.W., Rietschel E.T. Structural studies on the lipid A component of enterobacterial lipopolysaccharides by laser desorption mass spectrometry. Location of acyl groups at the lipid A backbone // *Eur. J. Biochem.* — 1984. — V. 145, № 3. — P. 505-509.

22. Hsu N.Y., Tseng S.Y., Wu C.Y., Ren C.T., Lee Y.C., Wong C.H., Chen C.H. Desorption ionization of biomolecules on metals // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80, № 13. — P. 5203-5210.
23. Hunsucker S.W., Watson R.C., Tissue B.M. Characterization of inorganic coordination complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2001. — V. 15, № 15. — P. 1334-1340.
24. Vladimirova K.G., Freidzon A.Y., Kotova O.V., Vaschenko A.A., Lepnev L.S., Bagatur'yants A.A., Vitukhnovskiy A.G., Stepanov N.F., Alfimov M.V. Theoretical Study of Structure and Electronic Absorption Spectra of Some Schiff Bases and Their Zinc Complexes // *Inorg. Chem.* — 2009. — V. 48, № 23. — P. 11123-11130.
25. Ham J.E., Durham B., Scott J.R. Comparison of laser desorption and matrix-assisted laser desorption/ionization for ruthenium and osmium trisbipyridine complexes using Fourier transform mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2003. — V. 14, № 4. — P. 393-400.
26. Petroselli G., Mandal M.K., Chen L.C., Ruiz G.T., Wolcan E., Hiraoka K., Nonami H., Erra-Balsells R. Mass spectrometry of rhenium complexes: a comparative study by using LDI-MS, MALDI-MS, PESI-MS and ESI-MS // *J. Mass Spectrom.* — 2012. — V. 47, № 3. — P. 313-321.
27. Damnjanović B., Kamčeva T., Petrović B., Bugarčić Ž.D., Petković M. Laser desorption and ionization time-of-flight versus matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry of Pt (II) and Ru (III) metal complexes // *Anal. Methods.* — 2011. — V. 2, № 3. — P. 400-407.
28. Benazouz M., Hakim B., Debrun J.L. Influence of the substrate on the ion yield in direct laser desorption-ionization for thin organic layers // *Int. J. Mass Spectrom.* — 1998. — V. 177, № 2-3. — P. 217-223.
29. Le Pogam P., Schinkovitz A., Legouin B., Le Lamer A.C., Boustie J., Richomme P. Matrix-free UV-laser desorption ionization mass spectrometry as a versatile approach for accelerating dereplication studies on lichens // *Anal. Chem.* — 2015. — V. 87, № 20. — P. 10421-10428.
30. Tanaka K. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture) // *Angew Chem. Int. Ed.* — 2003. — V. 42, № 33. — P. 3860-3870.
31. Tanaka K., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry // *Second Japan-China*

joint symposium on mass spectrometry. — Osaka, Japan: Bando Press, 1987. — P. 185-188.

32. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Matsuo T. Protein and polymer analysis up to  $m/z$  100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1988. — V. 2, № 8. — P. 151-153.

33. Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules // *Anal. Chem.* — 1985. — V. 57, № 14. — P. 2935-2939.

34. Hillenkamp F. Laser desorption mass spectrometry. A review // *Secondary Ion Mass Spectrometry SIMS V* / A. Benninghoven, R.J. Colton, D.S. Simons, H.W. Werner. — Springer, Berlin, Heidelberg, 1986. — P. 471-475.

35. Karas M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons // *Anal. Chem.* — 1988. — V. 60, № 20. — P. 2299-2301.

36. Karas M., Bahr U., Hillenkamp F. UV laser matrix desorption/ionization mass spectrometry of proteins in the 100,000 dalton range // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — 1989. — V. 92. — P. 231-242.

37. Hillenkamp F., Karas M. The MALDI process and method // *MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods and applications* / F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic. — Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. — P. 1-28.

38. Harvey D. J. Quantitative aspects of the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1993. — V. 7, № 7. — P. 614-619.

39. Knochenmuss R., Lehmann E., Zenobi R. Polymer Cationization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization // *Eur. J. Mass Spectrom.* — 1998. — V. 4, № 6. — P. 421-427.

40. Cohen L., Go E.P., Siuzdak G. Small-molecule desorption/ionization mass analysis // *MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods and applications* / F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic. — Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. — P. 299-337.

41. Beavis R.C., Bridson J.N. Epitaxial protein inclusion in sinapic acid crystals // *J. Phys. D: Appl. Phys.* — 1993. — V. 26, № 3. — P. 442-447.

42. Strupat K., Karas M., Hillenkamp F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — 1991. — V. 111. — P. 89-102.

43. Beavis R.C., Chaudhary T., Chait B.T.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* — 1992. — V. 27, № 2. — P. 156-158.

44. Stübiger G., Belgacem O. Analysis of lipids using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as a matrix for MALDI mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, № 8. — P. 3206-3213.

45. Jones R.M., Lamb J.H., Lim C.K. 5,10,15,20-meso-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin as a matrix for the analysis of low molecular weights compounds by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1995. — V. 9, № 10. — P. 968-969.

46. Ayorinde F.O., Hambright P., Porter T.N., Keith Q.L. Use of meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1999. — V. 13, № 24. — P. 2474-2479.

47. Brinkmalm G., Håkansson P., Kjellberg J., Demirev P., Sundqvist B.U.R., Eng W. A plasma desorption time-of-flight mass spectrometer with a single-stage ion mirror: improved resolution and calibration procedure // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — 1992. — V. 114, № 3. — P. 183-207.

48. Petković M., Petrović B., Savić J., Bugarčić Ž.D., Dimitrić-Marković J., Momić T., Vasić V. Flavonoids as matrices for MALDI-TOF mass spectrometric analysis of transition metal complexes // *Int. J. Mass Spectrom.* — 2010. — V. 290, № 1. — P. 39-46.

49. Lorkiewicz P., Yappert M.C. 2-(2-Aminoethylamino)-5-nitropyridine as a basic matrix for negative-mode matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of phospholipids // *J. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 44, № 1. — P. 137-143.

50. Teuber K., Schiller J., Fuchs B., Karas M., Jaskolla T.W. Significant sensitivity improvements by matrix optimization: a MALDI-TOF mass spectrometric study of lipids from hen egg yolk // *Chem. Phys. Lipids.* — 2010. — V. 163, № 6. — P. 552-560.

51. Skelton R., Dubois F., Zenobi R. A MALDI sample preparation method suitable for insoluble polymers // *Anal. Chem.* — 2000. — V. 72, № 7. — P. 1707-1710.

52. Knochenmuss R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI // *Analyst.* — 2006. — V. 131, № 9. — P. 966-986.
53. Gabelica V., Schulz E., Karas M. Internal energy build-up in matrix-assisted laser desorption/ionization // *J. Mass Spectrom.* — 2004. — V. 39, № 6. — P. 579-593.
54. Knochenmuss R., Zhigilei L.V. Molecular dynamics model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including ionization processes // *J. Phys. Chem. B.* — 2005. — V. 109, № 48. — P. 22947-22957.
55. Hillenkamp F., Karas M. The MALDI process and method. MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications / Eds. Hillenkamp F., Peter-Katalinic J. — John Wiley & Sons, 2013.
56. Karas M., Glückmann M., Schäfer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors // *J. Mass Spectrom.* — 2000. — V. 35, № 1. — P. 1-12.
57. Karas M., Krüger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism // *Chem. Rev.* — 2003. — V. 103, № 2. — P. 427-440.
58. Jaskolla T.W., Karas M. Compelling evidence for lucky survivor and gas phase protonation: the unified MALDI analyte protonation mechanism // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2011. — V. 22, № 6. — P. 976-988.
59. Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — 1987. — V. 78. — P. 53-68.
60. Gimon M.E., Preston L.M., Solouki T., White M.A. Russell D.H. Are proton transfer reactions of excited states involved in UV laser desorption ionization? // *J. Mass Spectrom.* — 1992. — V. 27, № 7. — P. 827-830.
61. Chiarelli M.P., Sharkey A.G., Hercules D.M. Excited-state proton transfer in laser mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 1993. — V. 65, № 3. — P. 307-311.
62. Zenobi R., Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry // *Mass. Spectrom. Rev.* — 1998. — V. 17, № 5. — P. 337-366.
63. Carroll J. A. Chen X., Beavis R. C. Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 1998. — V. 9, № 9. — P. 885-891.
64. Knochenmuss R. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization // *J. Mass Spectrom.* — 2002. — V. 37, № 8. — P. 867-877.

65. Mowry C.D., Johnston M.V. Simultaneous detection of ions and neutrals produced by matrix-assisted laser desorption // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1993. — V. 7, № 7. — P. 569-575.
66. Dreisewerd K., Schürenberg M., Karas M., Hillenkamp F. Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — 1995. — V. 141, № 2. — P. 127-148.
67. Knochenmuss R., Zenobi R. MALDI ionization: the role of in-plume processes // *Chem. Rev.* — 2003. — V. 103, № 2. — P. 441-452.
68. Knochenmuss R. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including analyte ion generation // *Anal. Chem.* — 2003. — V. 75, № 10. — P. 2199-2207.
69. McCarley T.D., McCarley R.L., Limbach P.A. Electron-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 1998. — V. 70, № 20. — P. 4376-4379.
70. Colby S.M., King T.B., Reilly J.P., Lubman D.M. Improving the resolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by exploiting the correlation between ion position and velocity // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1994. — V. 8, № 11. — P. 865-868.
71. Muddiman D.C., Gusev A.I., Hercules D.M. Application of secondary ion and matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for the quantitative analysis of biological molecules // *Mass Spectrom. Rev.* — 1995. — V. 14, № 6. — P. 383-429.
72. Liao W.L., Turko I.V. Strategy combining separation of isotope-labeled unfolded proteins and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis enables quantification of a wide range of serum proteins // *Anal. Biochem.* — 2008. — V. 377, № 1. — P. 55-61.
73. Park K.M., Bae Y.J., Ahn S.H., Kim M.S. A simple method for quantification of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2012. — V. 84, № 23. — P. 10332-10337.
74. Hutchens T.W., Yip T.T. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1993. — V. 7, № 7. — P. 576-580.



75. Lin Y.S., Chen Y.C. Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on sol-gel-derived 2,5-dihydroxybenzoic acid film // *Anal. Chem.* — 2002. — V. 74, № 22. — P. 5793-5798.

76. Weinberger S.R., Lomas L., Fung E., Enderwick C. Surface-enhanced laser desorption/ionization protein biochip technology for proteomics research and assay development // *Spectral techniques in proteomics / Sem D.S.* — Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2007. — P. 101-132.

77. Li X., Wu X., Kim J.M., Kim S.S., Jin M., Li D. MALDI-TOF-MS analysis of small molecules using modified mesoporous material SBA-15 as assisted matrix // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 20, № 11. — P. 2167–2173.

78. Su X., Zhou H.Y., Chen F.C., Gao B.X., Liu Z.W., Zhang Y.H., Liu F., Liu F., Li Z.R., Gao Z.X. Modified SBA-15 matrices for high-throughput screening of melamine in milk samples by MALDI-TOF MS // *Int. J. Mass Spectrom.* — 2013. — V. 338. — P. 39-44.

79. Hinshelwood J., Spencer D.I., Edwards Y.J., Perkins S.J. Identification of the C3b binding site in a recombinant vWF-A domain of complement factor B by surface-enhanced laser desorption-ionisation affinity mass spectrometry and homology modelling: implications for the activity of factor B // *J. Mol. Biol.* — 1999. — V. 294, № 2. — P. 587-599.

80. Seibert V., Wiesner A., Buschmann T., Meuer J. Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip technology in proteomics research // *Pathol. Res. Pract.* — 2004. — V. 200, № 2. — P. 83-94.

81. Peng J., Stanley A.J., Cairns D., Selby P.J., Banks R.E. Using the protein chip interface with quadrupole time-of-flight mass spectrometry to directly identify peaks in SELDI profiles—initial evaluation using low molecular weight serum peaks // *Proteomics.* — 2009. — V. 9, № 2. — P. 492-498.

82. Han K.Q., Huang G., Gao C.F., Wang X.L., Ma B., Sun L.Q., Wei Z.J. Identification of lung cancer patients by serum protein profiling using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Am. J. Clin. Oncol.* — 2008. — V. 31, № 2. — P. 133-139.

83. Song Q.B., Hu W.G., Wang P., Yao Y., Zeng H.Z. Identification of serum biomarkers for lung cancer using magnetic bead-based SELDI-TOF-MS // *Acta Pharmacol. Sin.* — 2011. — V. 32, № 12. — P. 1537-1542.

84. Li J., Zhang Z., Rosenzweig J., Wang Y.Y., Chan D.W. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer // *Clin. Chem.* — 2002. — V. 48, № 8. — P. 1296-1304.

85. Fan Y., Wang J., Yang Y., Liu Q., Fan Y., Yu J., Zheng S., Li M., Wang J. Detection and identification of potential biomarkers of breast cancer // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* — 2010. — V. 136, № 8. — P. 1243-1254.

86. Kohli M., Siegel E., Bhattacharya S., Khan M.A., Shah R., Suva L.J. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) for determining prognosis in advanced stage hormone relapsing prostate cancer // *Cancer Biomark.* — 2006. — V. 2, № 6. — P. 249-258.

87. Zhu X.D., Su F., Liang Z.G., Li L., Qu S., Liang X., Wang Q., Liang S.X., Chen L. Identification of patients with nasopharyngeal carcinoma by serum protein profiling using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Int. J. Clin. Oncol.* — 2014. — V. 19, № 4. — P. 579-585.

88. Liu J.Y., Jin L., Zhao M.Y., Zhang X., Liu C.B., Zhang Y.X., Li F.J., Zhou J.M., Wang H.J. Li J.C. New serum biomarkers for detection of tuberculosis using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2011. — V. 49, № 10. — P. 1727-1733.

89. Ryu O.H., Atkinson J.C., Hoehn G.T., Illei G.G., Hart T.C. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis // *Rheumatology.* — 2006. — V. 45, № 9. — P. 1077-1086.

90. Carrette O., Demalte I., Scherl A., Yalkinoglu O., Corthals G., Burkhard P., Hochstrasser D.F., Sanchez J.C. A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease // *Proteomics.* — 2003. — V. 3, № 8. — P. 1486-1494.

91. Tang N., Tornatore P., Weinberger S.R. Current developments in SELDI affinity technology // *Mass Spectrom. Rev.* — 2004. — V. 23, № 1. — P. 34-44.

92. Lin S., Viner R., Kitagawa N., Chang D., Tang N., Weinberger S. New surface enhanced neat desorption SELDI protein biochip arrays for evaluating the low molecular weight proteome // *Proceedings: 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 8-12, 2003, Montréal, Canada.*

93. Murray K.K., Boyd R.K., Eberlin M.N., Langley G.J., Li L., Naito Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013) // *Pure Appl. Chem.* — 2013. — V. 85, № 7. — P. 1515-1609.
94. Sunner J., Dratz E., Chen Y.C. Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions // *Anal. Chem.* — 1995. — V. 67, № 23. — P. 4335-4342.
95. Kraft P., Alimpiev S., Dratz E., Sunner J. Infrared, surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry on frozen aqueous solutions of proteins and peptides using suspensions of organic solids // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 1998. — V. 9, № 9. — P. 912-924.
96. Kim H.J., Lee J.K., Park S.J., Ro H.W., Yoo D.Y., Yoon D.Y. Observation of low molecular weight poly(methylsilsesquioxane)s by graphite plate laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2000. — V. 72, № 22. — P. 5673-5678.
97. Alimpiev S., Nikiforov S., Karavanskii V., Minton T., Sunner J. On the mechanism of laser-induced desorption-ionization of organic compounds from etched silicon and carbon surfaces // *J. Chem. Phys.* — 2001. — V. 115, № 4. — P. 1891-1901.
98. Wei J., Buriak J.M., Siuzdak G. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon // *Nature.* — 1999. — V. 399, № 6733. — P. 243-246.
99. McLean J.A., Stumpo K.A., Russell D.H. Size-selected (2-10 nm) gold nanoparticles for matrix assisted laser desorption ionization of peptides // *J. Am. Chem. Soc.* — 2005. — V. 127, № 15. — P. 5304-5305.
100. Huang Y.F., Chang H.T. Nile red-adsorbed gold nanoparticle matrixes for determining aminothiols through surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2006. — V. 78, № 5. — P. 1485-1493.
101. Su C.L., Tseng W.L. Gold nanoparticles as assisted matrix for determining neutral small carbohydrates through laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, № 4. — P. 1626-1633.
102. Duan J., Linman M.J., Chen C.Y., Cheng Q.J. CHCA-modified Au nanoparticles for laser desorption ionization mass spectrometric analysis of peptides // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 20, № 8. — P. 1530-1539.
103. Castellana E.T., Russell D.H. Tailoring nanoparticle surface chemistry to enhance laser desorption ionization of peptides and proteins // *Nano Lett.* — 2007. — V. 7, № 10. — P. 3023-3025.

104. Huang Y.F., Chang H.T. Analysis of adenosine triphosphate and glutathione through gold nanoparticles assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, № 13. — P. 4852-4859.
105. Hinman S.S., Chen C.Y., Duan J., Cheng Q. Calcinated gold nanoparticle arrays for on-chip, multiplexed and matrix-free mass spectrometric analysis of peptides and small molecules // *Nanoscale.* — 2016. — V. 8, № 3. — P. 1665-1675.
106. Chen L.C., Yonehama J., Ueda T., Hori H., Hiraoka K. Visible-laser desorption/ionization on gold nanostructures // *J. Mass Spectrom.* — 2007. — V. 42, № 3. — P. 346-353.
107. Spencer M.T., Furutani H., Oldenburg S.J., Darlington T.K., Prather K.A. Gold nanoparticles as a matrix for visible-wavelength single-particle matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of small biomolecules // *J. Phys. Chem. C.* — 2008. — V. 112, № 11. — P. 4083-4090.
108. Castellana E.T., Gamez R.C., Gomez M.E., Russell D.H. Longitudinal surface plasmon resonance based gold nanorod biosensors for mass spectrometry // *Langmuir.* — 2010. — V. 26, № 8. — P. 6066-6070.
109. Shrivastava K., Agrawal K., Wu H.F. Application of platinum nanoparticles as affinity probe and matrix for direct analysis of small biomolecules and microwave digested proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Analyst.* — 2011. — V. 136, № 13. — P. 2852-2857.
110. Kawasaki H., Yonezawa T., Watanabe T., Arakawa R. Platinum nanoflowers for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules // *J. Phys. Chem. C.* — 2007. — V. 111, № 44. — P. 16278-16283.
111. Kawasaki H., Yao T., Sugauma T., Okumura K., Iwaki Y., Yonezawa T., Kikuchi T., Arakawa R. Platinum nanoflowers on scratched silicon by galvanic displacement for an effective SALDI substrate // *Chem. Eur. J.* — 2010. — V. 16, № 35. — P. 10832-10843.
112. Nitta S., Kawasaki H., Sugauma T., Shigeri Y., Arakawa R. Desorption/ionization efficiency of common amino acids in surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) with nanostructured platinum // *J. Phys. Chem. C.* — 2013. — V. 117, № 1. — P. 238-245.
113. Cueto M., Piedrahita M., Caro C., Martínez-Haya B., Sanz M., Oujja M., Castillejo M. Platinum nanoparticles as photoactive substrates for mass spectrometry and spectroscopy sensors // *J. Phys. Chem. C.* — 2014. — V. 118, № 21. — P. 11432-11439.

114. Hua L., Chen J., Ge L., Tan S.N. Silver nanoparticles as matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides // *J. Nanopart. Res.* — 2007. — V. 9, № 6. — P. 1133-1138.

115. Chiu T.C., Chang L.C., Chiang C.K., Chang H.T. Determining estrogens using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with silver nanoparticles as the matrix // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2008. — V. 19, № 9. — P. 1343-1346.

116. Sherrod S.D., Diaz A.J., Russell W.K., Cremer P.S., Russell D.H. Silver nanoparticles as selective ionization probe for analysis of olefins by mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80, № 17. — P. 6796-6799.

117. Shrivastava K., Wu H.F. Applications of silver nanoparticles capped with different functional groups as the matrix and affinity probes in surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization ion trap mass spectrometry for rapid analysis of sulfur drugs and biothiols in human urine // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2008. — V. 22, № 18. — P. 2863-2872.

118. Wang M.T., Liu M.H., Wang C.R.C., Chang S.Y. Silver-coated gold nanoparticles as concentrating probes and matrices for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of aminoglycosides // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 20, № 10. — P. 1925-1932.

119. Lee K.H., Chiang C.K., Lin Z.H., Chang H.T. Determining enediol compounds in tea using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with titanium dioxide nanoparticle matrices // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2007. — V. 21, № 13. — P. 2023-2030.

120. Watanabe T., Okumura K., Nozaki K., Kawasaki H., Arakawa R. Selective photocatalytic degradation of poly-(ethylene glycol) additives using TiO<sub>2</sub> surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 23, № 23. — P. 3886-3890.

121. Gholipour Y., Giudicessi S.L., Nonami H., Erra-Balsells R. Diamond, titanium dioxide, titanium silicon oxide, and barium strontium titanium oxide nanoparticles as matrices for direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis of carbohydrates in plant tissues // *Anal. Chem.* — 2010. — V. 82, № 13. — P. 5518-5526.

122. Watanabe T., Kawasaki H., Yonezawa T., Arakawa R. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic

compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles // *J. Mass Spectrom.* — 2008. — V. 43, № 8. — P. 1063-1071.

123. Shin W.J., Shin J.H., Song J.Y., Han S.Y. Effects of ZnO nanowire length on surface-assisted laser desorption/ionization of small molecules // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2010. — V. 21, № 6. — P. 989-992.

124. Kim K., Um K., Yoon C., Ryoo W.S., Lee K. Wafer-level detection of organic contamination by ZnO-rGO hybrid-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Talanta.* — 2018. — V. 182. — P. 273-278.

125. Kailasa S.K., Wu H.F. Multifunctional ZrO<sub>2</sub> nanoparticles and ZrO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> nanorods for improved MALDI-MS analysis of cyclodextrins, peptides, and phosphoproteins // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2010. — V. 396, № 3. — P. 1115-1125.

126. Bernier M.C., Wysocki V.H., Dagan S. Laser desorption ionization of small molecules assisted by tungsten oxide and rhenium oxide particles // *J. Mass Spectrom.* — 2015. — V. 50, № 7. — P. 891-898.

127. McAlpin C.R., Voorhees K.J., Corpuz A.R., Richards R.M. Analysis of lipids: metal oxide laser ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2012. — V. 84, № 18. — P. 7677-7683.

128. Ma Y.R., Zhang X.L., Zeng T., Cao D., Zhou Z., Li W.H., Niu H., Cai Y.Q. Polydopamine-coated magnetic nanoparticles for enrichment and direct detection of small molecule pollutants coupled with MALDI-TOF-MS // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2013. — V. 5, № 3. — P. 1024-1030.

129. Chen C.T., Chen Y.C. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> core/shell nanoparticles as affinity probes for the analysis of phosphopeptides using TiO<sub>2</sub> surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2005. — V. 77, № 18. — P. 5912-5919.

130. Liang Q., Macher T., Xu Y., Bao Y., Cassady C.J. MALDI MS in-source decay of glycans using a glutathione-capped iron oxide nanoparticle matrix // *Anal. Chem.* — 2014. — V. 86, № 16. — P. 8496-8503.

131. Taira S., Sahashi Y., Shimma S., Hiroki T., Ichiyanagi Y. Nanotrap and mass analysis of aromatic molecules by phenyl group-modified nanoparticle // *Anal. Chem.* — 2011. — V. 83, № 4. — P. 1370-1374.

132. Gopal J., Abdelhamid H.N., Hua P.Y., Wu H.F. Chitosan nanomagnets for effective extraction and sensitive mass spectrometric detection of pathogenic bacterial endotoxin from human urine // *J. Mater. Chem. B.* — 2013. — V. 1, № 19. — P. 2463-2475.

133. Dale M.J., Knochenmuss R., Zenobi R. Graphite/liquid mixed matrixes for laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 1996. — V. 68, № 19. — P. 3321-3329.
134. Cha S., Zhang H., Ilarslan H.I., Wurtele E.S., Brachova L., Nikolau B.J., Yeung E.S. Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // *Plant J.* — 2008. — V. 55, № 2. — P. 348-360.
135. Chen Y.C., Wu J.Y. Analysis of small organics on planar silica surfaces using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2001. — V. 15, № 20. — P. 1899-1903.
136. Black C., Poile C., Langley J., Herniman J. The use of pencil lead as a matrix and calibrant for matrix-assisted laser desorption/ionisation // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2006. — V. 20, № 7. — P. 1053-1060.
137. Shariatgorji M., Amini N., Thorsen G., Crescenzi C., Ilag L.L. m-Trap for the SALDI-MS screening of organic compounds prior to LC/MS analysis // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80, № 14. — P. 5515-5523.
138. Amini N., Shariatgorji M., Thorsen G. SALDI-MS signal enhancement using oxidized graphitized carbon black nanoparticles // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 20, № 6. — P. 1207-1213.
139. Han M., Sunner J. An activated carbon substrate surface for laser desorption mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2000. — V. 11, № 7. — P. 644-649.
140. Guild G.E., Lenehan C.E., Walker G.S. Surface-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry with an activated carbon surface for the rapid detection of underivatized steroids // *Int. J. Mass Spectrom.* — 2010. — V. 294, № 1. — P. 16-22.
141. Xu S., Li Y., Zou H., Qiu J., Guo Z., Guo B. Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2003. — V. 75, № 22. — P. 6191-6195.
142. Pan C., Xu S., Zou H., Guo Z., Zhang Y., Guo B. Carbon nanotubes as adsorbent of solid-phase extraction and matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2005. — V. 16, № 2. — P. 263-270.
143. Pan C., Xu S., Hu L., Su X., Ou J., Zou H., Guo Z., Zhang Y., Guo B. Using oxidized carbon nanotubes as matrix for analysis of small molecules by MALDI-TOF MS // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2005. — V. 16, № 6. — P. 883-892.

144. Wang C.H., Li J., Yao S.J., Guo Y.L., Xia X.H. High-sensitivity matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry analyses of small carbohydrates and amino acids using oxidized carbon nanotubes prepared by chemical vapor deposition as matrix // *Anal. Chim. Acta.* — 2007. — V. 604, № 2. — P. 158-164.

145. Ren S.F., Guo Y.L. Oxidized carbon nanotubes as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of biomolecules // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2005. — V. 19, № 2. — P. 255-260.

146. Hu L., Jiang G., Xu S., Pan C., Zou H. Monitoring enzyme reaction and screening enzyme inhibitor based on MALDI-TOF-MS platform with a matrix of oxidized carbon nanotubes // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2006. — V. 17, № 11. — P. 1616-1619.

147. Dong X., Cheng J., Li J., Wang Y. Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS // *Anal. Chem.* — 2010. — V. 82, № 14. — P. 6208-6214.

148. Liu C.W., Chien M.W., Su C.Y., Chen H.Y., Li L.J., Lai C.C. Analysis of flavonoids by graphene-based surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Analyst.* — 2012. — V. 137, № 24. — P. 5809-5816.

149. Zhou X., Wei Y., He Q., Boey F., Zhang Q., Zhang H. Reduced graphene oxide films used as matrix of MALDI-TOF-MS for detection of octachlorodibenzo-p-dioxin // *Chem. Commun.* — 2010. — V. 46, № 37. — P. 6974-6976.

150. Lu M., Lai Y., Chen G., Cai Z. Matrix interference-free method for the analysis of small molecules by using negative ion laser desorption/ionization on graphene flakes // *Anal. Chem.* — 2011. — V. 83, № 8. — P. 3161-3169.

151. Hua P.Y., Manikandan M., Abdelhamid H.N., Wu H.F. Graphene nanoflakes as an efficient ionizing matrix for MALDI-MS based lipidomics of cancer cells and cancer stem cells // *J. Mater. Chem. B.* — 2014. — V. 2, № 42. — P. 7334-7343.

152. Ma N., Bian W., Li R., Geng H., Zhang J., Dong C., Shuang S., Cai Z. Quantitative analysis of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM<sub>2.5</sub> samples with graphene as a matrix by MALDI-TOF MS // *Anal. Methods.* — 2015. — V. 7, № 9. — P. 3967-3971.

153. Shi C., Meng J., Deng C. Enrichment and detection of small molecules using magnetic graphene as an adsorbent and a novel matrix of MALDI-TOF-MS // *Chem. Commun.* — 2012. — V. 48, № 18. — P. 2418-2420.



154. Shiea J., Huan J.P., Teng C.F., Jeng J., Wang L.Y., Chiang L.Y. Use of a water-soluble fullerene derivative as precipitating reagent and matrix-assisted laser desorption/ionization matrix to selectively detect charged species in aqueous solutions // *Anal. Chem.* — 2003. — V. 75, № 14. — P. 3587-3595.

155. Deacon G.B., Field L.D., Fisher K., Jaroschik F., Kay D.L., Maschmeyer T., Masters A.F. Fullerene matrices in the MALDI-TOF mass spectroscopic characterisation of organometallic compounds // *J. Organomet. Chem.* — 2014. — V. 751. — P. 482-492.

156. Kong X.L., Huang L.C.L., Hsu C.M., Chen W.H., Han C.C., Chang H.C. High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis // *Anal. Chem.* — 2005. — V. 77, № 1. — P. 259-265.

157. Chen S., Zheng H., Wang J., Hou J., He Q., Liu H., Xiong C., Kong X., Nie Z. Carbon nanodots as a matrix for the analysis of low-molecular-weight molecules in both positive-and negative-ion matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and quantification of glucose and uric acid in real samples // *Anal. Chem.* — 2013. — V. 85, № 14. — P. 6646-6652.

158. Wen X., Dagan S., Wysocki V.H. Small-molecule analysis with silicon-nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, № 2. — P. 434-444.

159. Hagan N.A., Cornish T.J., Pilato R.S., Van Houten K.A., Antoine M.D., Lippa T.P., Becknell A.F., Demirev P.A. Detection and identification of immobilized low-volatility organophosphates by desorption ionization mass spectrometry // *Int. J. Mass Spectrom.* — 2008. — V. 278, № 2-3. — P. 158-165.

160. Kailasa S.K., Kiran K., Wu H.F. Comparison of ZnS semiconductor nanoparticles capped with various functional groups as the matrix and affinity probes for rapid analysis of cyclodextrins and proteins in surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80, № 24. — P. 9681-9688.

161. Shrivastava K., Kailasa S.K., Wu H.F. Quantum dots laser desorption/ionization MS: multifunctional CdSe quantum dots as the matrix, concentrating probes and acceleration for microwave enzymatic digestion for peptide analysis and high resolution detection of proteins in a linear MALDI-TOF MS // *Proteomics.* — 2009. — V. 9, № 10. — P. 2656-2667.

162. Bibi A., Ju H. Quantum dots assisted laser desorption/ionization mass spectrometric detection of carbohydrates: qualitative and quantitative analysis // *J. Mass Spectrom.* — 2016. — V. 51, № 4. — P. 291-297.

163. Vidová V., Novák P., Strohalm M., Pól J., Havlíček V., Volný M. Laser desorption-ionization of lipid transfers: tissue mass spectrometry imaging without MALDI matrix // *Anal. Chem.* — 2010. — V. 82, № 12. — P. 4994-4997.

164. Kawasaki H., Ozawa T., Hisatomi H., Arakawa R. Platinum vapor deposition surface-assisted laser desorption/ionization for imaging mass spectrometry of small molecules // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2012. — V. 26, № 16. — P. 1849-1858.

165. Taira S., Sugiura Y., Moritake S., Shimma S., Ichiyanagi Y., Setou M. Nanoparticle-assisted laser desorption/ionization based mass imaging with cellular resolution // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80, № 12. — P. 4761-4766.

166. Shrivastava K., Hayasaka T., Sugiura Y., Setou M. Method for simultaneous imaging of endogenous low molecular weight metabolites in mouse brain using TiO<sub>2</sub> nanoparticles in nanoparticle-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2011. — V. 83, № 19. — P. 7283-7289.

167. Hayasaka T., Goto-Inoue N., Zaima N., Shrivastava K., Kashiwagi Y., Yamamoto M., Nakamoto M., Setou M. Imaging mass spectrometry with silver nanoparticles reveals the distribution of fatty acids in mouse retinal sections // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2010. — V. 21, № 8. — P. 1446-1454.

168. Cha S., Song Z., Nikolau B.J., Yeung E.S. Direct profiling and imaging of epicuticular waxes on *Arabidopsis thaliana* by laser desorption/ionization mass spectrometry using silver colloid as a matrix // *Anal. Chem.* — 2009. — V. 81, № 8. — P. 2991-3000.

169. Zhang H., Cha S., Yeung E.S. Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization MS and MS<sup>n</sup> of small molecules. 2. Direct profiling and MS imaging of small metabolites from fruits // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, № 17. — P. 6575-6584.

170. Rowell F., Hudson K., Seviour J. Detection of drugs and their metabolites in dusted latent fingerprints by mass spectrometry // *Analyst.* — 2009. — V. 134, № 4. — P. 701-707.

171. Benton M., Chua M.J., Gu F., Rowell F., Ma J. Environmental nicotine contamination in latent fingerprints from smoker contacts and passive smoking //

Forensic Sci. Int. — 2010. — V. 200, № 1-3. — P. 28-34.

172. Walton B.L., Verbeck G.F. Soft-landing ion mobility of silver clusters for small-molecule matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and imaging of latent fingerprints // *Anal. Chem.* — 2014. — V. 86, № 16. — P. 8114-8120.

173. Cheng Y.H., Zhang Y., Chau S.L., Lai S.K., Tang H.W., Ng K.M. Enhancement of Image Contrast, Stability, and SALDI-MS Detection Sensitivity for Latent Fingerprint Analysis by Tuning the Composition of Silver-Gold Nanoalloys // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2016. — V. 8, № 43. — P. 29668-29675.

174. Chen W.T., Chiang C.K., Lin Y.W., Chang H.T. Quantification of captopril in urine through surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using 4-mercapto-benzoic acid-capped gold nanoparticles as an internal standard // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2010. — V. 21, № 5. — P. 864-867.

175. Chiang C.K., Chiang N.C., Lin Z.H., Lan G.Y., Lin Y.W., Chang H.T. Nanomaterial-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides and proteins // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2010. — V. 21, № 7. — P. 1204-1207.

176. Lo C.Y., Chen W.Y., Chen C.T., Chen Y.C. Rapid enrichment of phosphopeptides from tryptic digests of proteins using iron oxide nanocomposites of magnetic particles coated with zirconia as the concentrating probes // *J. Proteome Res.* — 2007. — V. 6, № 2. — P. 887-893.

177. Lin Z., Zheng J., Lin G., Tang Z., Yang X., Cai Z. Negative ion laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of small molecules using graphitic carbon nitride nanosheet matrix // *Anal. Chem.* — 2015. — V. 87, № 15. — P. 8005-8012.

178. Chiang C.K., Yang Z., Lin Y.W., Chen W.T., Lin, H.J., Chang H.T. Detection of proteins and protein-ligand complexes using HgTe nanostructure matrixes in surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2010. — V. 82, № 11. — P. 4543-4550.

179. Park K.H., Kim H.J. Analysis of fatty acids by graphite plate laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2001. — V. 15, № 16. — P. 1494-1499.

180. Kim J., Paek K., Kang W. Visible surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of small macromolecules deposited on the graphite plate // *Bull. Korean Chem. Soc.* — 2002. — V. 23, № 2. — P. 315-319.

181. Chen C.T., Chen Y.C. Desorption/ionization mass spectrometry on nanocrystalline titania sol-gel-deposited films // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2004. — V. 18, № 17. — P. 1956-1964.

182. Chen C.T., Chen Y.C. Molecularly imprinted TiO<sub>2</sub>-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for selectively detecting  $\alpha$ -cyclodextrin // *Anal. Chem.* — 2004. — V. 76, № 5. — P. 1453-1457.

183. Фесенко Т.В., Косевич М.В., Суровцева Н.И., Покровский В.А., Еременко А.М., Смирнова Н.П. Масс-спектрометрия с лазерной десорбцией/ионизацией красителя метиленового голубого с поверхности мезопористых тонких пленок TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> и SiO<sub>2</sub> // *Масс-спектрометрия.* — 2007. — Т. 4, № 4. — С. 289-296.

184. Lo C.Y., Lin J.Y., Chen W.Y., Chen C.T., Chen Y.C. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry on titania nanotube arrays // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2008. — V. 19, № 7. — P. 1014-1020.

185. Piret G., Kim D., Drobecq H., Coffinier Y., Melnyk O., Schmuki P., Boukherroub R. Surface-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry on titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanotube layers // *Analyst.* — 2012. — V. 137, № 13. — P. 3058-3063.

186. Sonderegger H., Rameshan C., Lorenz H., Klauser F., Klerks M., Rainer M., Bakry R., Huck C.W., Bonn G.K. Surface-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry using TiO<sub>2</sub>-coated steel targets for the analysis of small molecules // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2011. — V. 401, № 6. — P. 1963-1974.

187. Seino T., Sato H., Yamamoto A., Nemoto A., Torimura M., Tao H. Matrix-free laser desorption/ionization-mass spectrometry using self-assembled germanium nanodots // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, № 13. — P. 4827-4832.

188. Grechnikov A.A., Georgieva V.B., Alimpiev S.S., Borodkov A.S., Nikiforov S.M, Simanovsky Ya.O, Dimova-Malinovska D., Angelov O.I. Investigation of thin ZnO layers in view of laser desorption-ionization layers in view of laser desorption-ionization // *J. Phys. Conf. Ser.* — 2010. — V. 223, № 1. — P. 012038-012042.

189. Shan Z., Han L., Yuan M., Deng C., Zhao D., Tu B., Yang P. Mesoporous tungsten titanate as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of biomolecules // *Anal. Chim. Acta.* — 2007. — V. 593, № 1. — P. 13-19.

190. López de Laorden C., Beloqui A., Yate L., Calvo J., Puigivila M., Llop J., Reichardt N.C. Nanostructured indium tin oxide slides for small-molecule profiling and

imaging mass spectrometry of metabolites by surface-assisted laser desorption ionization MS // *Anal. Chem.* — 2015. — V. 87, № 1. — P. 431-440.

191. Bisi O., Ossicini S., Pavesi L. Porous silicon: a quantum sponge structure for silicon based optoelectronics // *Surf. Sci. Rep.* — 2000. — V. 38, № 1-3. — P. 1-126.

192. Koshida N., Koyama H., Suda Y., Yamamoto Y., Araki M., Saito T., Sato K., Sata N., Shin S. Optical characterization of porous silicon by synchrotron radiation reflectance spectra analyses // *Appl. Phys. Lett.* — 1993. — V. 63, № 20. — P. 2774-2776.

193. Gesele G., Linsmeier J., Drach V., Fricke J., Arens-Fischer R. Temperature-dependent thermal conductivity of porous silicon // *J. Phys. D: Appl. Phys.* — 1997. — V. 30, № 21. — P. 2911-2916.

194. Lee C.S., Kim E.M., Lee S.H., Kim M.S., Kim Y.K., Kim B.G. Enhancement of Analyte Ionization in Desorption/Ionization on Porous Silicon (DIOS)-Mass Spectrometry (MS) // *Biotech. and bioprocess engin.* — 2005. — V. 10, № 3. — P. 212-217.

195. Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Гречников А.А., Караванский В.А., Саннер Ж. Способ формирования шероховатой поверхности кремниевых подложек и электролит для анодного травления кремниевых подложек. Патент РФ № 2217840. Заявка 2003101425/28 от 21.01.2003, опубл. 27.11.2003, бюл. № 33.

196. Li J., Lu C., Hu X.K., Yang X., Loboda A.V., Lipson R.H. Nanostructured porous silicon by laser assisted electrochemical etching // *Int. J. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 285, № 3. — P. 137-142.

197. Li X., Bohn P.W. Metal-assisted chemical etching in HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produces porous silicon // *Appl. Phys. Lett.* — 2000. — V. 77, № 16. — P. 2572-2574.

198. Kruse R.A., Li X., Bohn P.W., Sweedler J.V. Experimental Factors Controlling Analyte Ion Generation in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry on Porous Silicon // *Anal. Chem.* — 2001. — V. 73, № 15. — P. 3639-3645.

199. Tsao C.W., Kumar P., Liu J., DeVoe D.L. Dynamic electrowetting on nanofilament silicon for matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80, № 8. — P. 2973-2981.

200. Piret G., Drobecq H., Coffinier Y., Melnyk O., Boukherroub R. Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry on silicon nanowire arrays prepared by chemical etching of crystalline silicon // *Langmuir.* — 2010. — V. 26, № 2. — P. 1354-1361.

201. Saadoun M., Mliki N., Kaabi H., Daoudi K., Bessais B., Ezzaouia H., Bennaceur R. Vapour-etching-based porous silicon: a new approach // *Thin Solid Films*. — 2002. — V. 405, № 1-2. — P. 29-34.
202. Singh R., Bezuidenhout L.W., Jemere A., Wang Z., Brett M., Harrison D.J. Engineering matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry using glancing angle deposition films // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2017. — V. 31, № 7. — P. 631-638.
203. Cuiffi J.D., Hayes D.J., Fonash S.J., Brown K.N., Jones A.D. Desorption-ionization mass spectrometry using deposited nanostructured silicon films // *Anal. Chem.* — 2001. — V. 73, № 6. — P. 1292-1295.
204. Kalkan A.K., Henry M.R., Li H., Cuiffi J.D., Hayes D.J., Palmer C., Fonash S.J. Biomedical/analytical applications of deposited nanostructured Si films // *Nanotechnology*. — 2005. — V. 16, № 8. — P. 1383-1391.
205. Finkel N.H., Prevo B.G., Velez O.D., He L. Ordered silicon nanocavity arrays in surface-assisted desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2005. — V. 77, № 4. — P. 1088-1095.
206. Xiao Y., Retterer S.T., Thomas D.K., Tao J.Y., He L. Impacts of surface morphology on ion desorption and ionization in Desorption Ionization on Porous Silicon (DIOS) mass spectrometry // *J. Phys. Chem. C*. — 2009. — V. 113, № 8. — P. 3076-3083.
207. Go E.P., Apon J.V., Luo G., Saghatelian A., Daniels R.H., Sahi V., Dubrow R., Cravatt B.F., Vertes A., Siuzdak G. Desorption/ionization on silicon nanowires // *Anal. Chem.* — 2005. — V. 77, № 6. — P. 1641-1646.
208. Luo G., Chen Y., Daniels H., Dubrow R., Vertes A. Internal energy transfer in laser desorption/ionization from silicon nanowires // *J. Phys. Chem. B*. — 2006. — V. 110, № 27. — P. 13381-13386.
209. Chen Y., Vertes A. Adjustable fragmentation in laser desorption/ionization from laser-induced silicon microcolumn arrays // *Anal. Chem.* — 2006. — V. 78, № 16. — P. 5835-5844.
210. Shen Z., Thomas J.J., Averbuj C., Broo K.M., Engelhard M., Crowell J.E., Finn M.G., Siuzdak G. Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2001. — V. 73, № 3. — P. 612-619.
211. Tuomikoski S., Huikko K., Grigoras K., Östman P., Kostianen R., Baumann M., Abian J., Kotiaho T., Franssila S. Preparation of porous n-type silicon sample plates for

desorption/ionization on silicon mass spectrometry (DIOS-MS) // *Lab on a Chip*. — 2002. — V. 2, № 4. — P. 247-253.

212. Shmigol I.V., Alekseev S.A., Lavrynenko O.Yu., Vasylieva N.S., Zaitsev V.N., Barbier D., Pokrovsky V.A. Chemically modified porous silicon for laser desorption/ionization mass spectrometry of ionic dyes // *J. Mass. Spectrom.* — 2009. — V. 44, № 8. — P. 1234-1240.

213. Luo G., Chen Y., Siuzdak G., Vertes A. Surface modification and laser pulse length effects on internal energy transfer in DIOS // *J. Phys. Chem. B*. — 2005. — V. 109, № 51. — P. 24450-24456.

214. Silina Y.E., Koch M., Volmer D.A. Influence of surface melting effects and availability of reagent ions on LDI-MS efficiency after UV laser irradiation of Pd nanostructures // *J. Mass Spectrom.* — 2015. — V. 50, № 3. — P. 578-585.

215. Ng K.M., Chau S.L., Tang H.W., Wei X.G., Lau K.C., Ye F., Ng A.M.C. Ion-desorption efficiency and internal-energy transfer in surface-assisted laser desorption/ionization: More Implication(s) for the thermal-driven and phase-transition-driven desorption process // *J. Phys. Chem. C*. — 2015. — V. 119, № 41. — P. 23708-23720.

216. Lai S.K.M., Tang H.W., Lau K.C., Ng K.M. Nanosecond UV Laser Ablation of Gold Nanoparticles: Enhancement of Ion Desorption by Thermal-Driven Desorption, Vaporization, or Phase Explosion // *J. Phys. Chem. C*. — 2016. — V. 120, № 36. — P. 20368-20377.

217. Wada Y., Yanagishita T., Masuda H. Ordered porous alumina geometries and surface metals for surface-assisted laser desorption/ionization of biomolecules: possible mechanistic implications of metal surface melting // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, № 23. — P. 9122-9127.

218. Tang H.W., Ng K.M., Lu W., Che C.M. Ion desorption efficiency and internal energy transfer in carbon-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Desorption mechanism(s) and the design of SALDI substrates // *Anal. Chem.* — 2009. — V. 81, № 12. — P. 4720-4729.

219. Northen T.R., Woo H.K., Northen M.T., Nordstrom A., Uritboonthail W., Turner K.L., Siuzdak G. High surface area of porous silicon drives desorption of intact molecules // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2007. — V. 18, № 11. — P. 1945-1949.

220. Law K.P. Laser desorption/ionization mass spectrometry on nanostructured semiconductor substrates: DIOS™ and QuickMass™ // *Int. J. Mass Spectrom.* — 2010.

— V. 290, № 2-3. — P. 72-84.

221. Go E.P., Shen Z., Harris K., Siuzdak G. Quantitative analysis with desorption/ionization on silicon mass spectrometry using electrospray deposition // *Anal. Chem.* — 2003. — V. 75, № 20. — P. 5475-5479.

222. Lewis W.G., Shen Z., Finn M.G., Siuzdak G. Desorption/ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry: background and applications // *Int. J. Mass Spectrom.* — 2003. — V. 226, № 1. — P. 107-116.

223. Laiko V.V., Taranenko N.I., Berkout V.D., Musselman B.D., Doroshenko V.M. Atmospheric pressure laser desorption/ionization on porous silicon // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2002. — V. 16, № 18. — P. 1737-1742.

224. Kinumi T., Shimomae Y., Arakawa R., Tatsu Y., Shigeri Y., Yumoto N., Niki E. Effective detection of peptides containing cysteine sulfonic acid using matrix-assisted laser desorption/ionization and laser desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* — 2006. — V. 41, № 1. — P. 103-112.

225. Dupré M., Coffinier Y., Boukherroub R., Cantel S., Martinez J., Enjalbal C. Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates // *J. Proteomics.* — 2012. — V. 75, № 7. — P. 1973-1990.

226. Thomas J.J., Shen Z., Crowell J.E., Finn M.G., Siuzdak G. Desorption/ionization on silicon (DIOS): a diverse mass spectrometry platform for protein characterization // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2001. — V. 98, № 9. — P. 4932-4937.

227. Xu S., Pan C., Hu L., Zhang Y., Guo Z., Li X., Zou H. Enzymatic reaction of the immobilized enzyme on porous silicon studied by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry // *Electrophoresis.* — 2004. — V. 25, № 21-22. — P. 3669-3676.

228. Vaidyanathan S., Jones D., Broadhurst D.I., Ellis J., Jenkins T., Dunn W.B., Hayes A., Burton N., Oliver S.G., Kell D.B., Goodacre R. A laser desorption ionisation mass spectrometry approach for high throughput metabolomics // *Metabolomics.* — 2005. — V. 1, № 3. — P. 243-250.

229. Amantonico A., Flamigni L., Glaus R., Zenobi R. Negative mode nanostructure-initiator mass spectrometry for detection of phosphorylated metabolites // *Metabolomics.* — 2009. — V. 5, № 3. — P. 346-353.

230. Korte A.R., Stopka S.A., Morris N., Razunguzwa T., Vertes A. Large-scale metabolite analysis of standards and human serum by laser desorption ionization mass



spectrometry from silicon nanopost arrays // *Anal. Chem.* — 2016. — V. 88, № 18. — P. 8989-8996.

231. Kraj A., Świst M., Strugala A., Parczewski A., Silberring J. Fingerprinting of 3,4-methylenedioxymethamphetamine markers by desorption/ionization on porous silicon // *Eur. J. Mass Spectrom.* — 2006. — V. 12, № 4. — P. 253-259.

232. Pihlainen K., Grigoras K., Franssila S., Ketola R., Kotiaho T., Kostianen R. Analysis of amphetamines and fentanyl by atmospheric pressure desorption/ionization on silicon mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and its application to forensic analysis of drug seizures // *J. Mass Spectrom.* — 2005. — V. 40, № 4. — P. 539-545.

233. Lowe R.D., Guild G.E., Harpas P., Kirkbride P., Hoffmann P., Voelcker N.H., Kobus H. Rapid drug detection in oral samples by porous silicon assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 23, № 22. — P. 3543-3548.

234. Guinan T., Ronci M., Kobus H., Voelcker N.H. Rapid detection of illicit drugs in neat saliva using desorption/ionization on porous silicon // *Talanta.* — 2012. — V. 99. — P. 791-798.

235. Daniels R.H., Dikler S., Li E., Stacey C. Break free of the matrix: sensitive and rapid analysis of small molecules using nanostructured surfaces and LDI-TOF mass spectrometry // *J. Assoc. Lab. Autom.* — 2008. — V. 13, № 6. — P. 314-321.

236. Cheng Y.C., Chen K.H., Wang J.S., Hsu W.L., Chien C.C., Chen W.Y., Tsao C.W. Rapid analysis of abused drugs using nanostructured silicon surface assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Analyst.* — 2012. — V. 137, № 3. — P. 654-661.

237. Kraj A., Jarzebinska J., Gorecka-Drzazga A., Dziuban J., Silberring J. Identification of catecholamines in the immune system by desorption/ionization on silicon // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2006. — V. 20, № 13. — P. 1969-1972.

238. Okuno S., Wada Y. Measurement of serum salicylate levels by solid-phase extraction and desorption/ionization on silicon mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* — 2005. — V. 40, № 8. — P. 1000-1004.

239. Guinan T.M., Neldner D., Stockham P., Kobus H., Della Vedova C.B., Voelcker N.H. Porous silicon mass spectrometry as an alternative confirmatory assay for compliance testing of methadone // *Drug Test. Anal.* — 2017. — V. 9, № 5. — P. 769-777.

240. Разников В.В., Пихтелев А.Р., Разникова М.О. Анализ не полностью разрешённых масс-спектрометрических данных // Масс-спектрометрия. — 2006. — Т. 3, № 2. — С. 113-130.
241. Hydrogenated Amorphous Silicon / Street R.A. — Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1991. — 417 pp.
242. Biswas R., Wang C.Z., Chan C.T., Ho K.M., Soukoulis C.M. Electronic structure of dangling and floating bonds in amorphous silicon // Phys. Rev. Lett. — 1989. — V. 63, № 14. — P. 1491-1494.
243. Лифшиц И.М. О структуре энергетического спектра и квантовых состояний неупорядоченных конденсированных систем // Успехи физ. наук. — 1964. — Т. 83, № 8. — С. 617-663.
244. Brodsky M.H., Title R.S. Electron spin resonance in amorphous silicon, germanium, and silicon carbide // Phys. Rev. Lett. — 1969. — V. 23, № 11. — P. 581-586.
245. Lui K.P.H., Hegmann F.A. Fluence- and temperature-dependent studies of carrier dynamics in radiation-damaged silicon-on-sapphire and amorphous silicon // J. Appl. Phys. — 2003. — V. 93, № 11. — P. 9012-9018.
246. Matsuda A. Recent understanding of the growth process of amorphous silicon from a silane glow-discharge plasma // Plasma Phys. Control. Fusion. — 1997. — V. 39, № 5A. — P. 431-436.
247. Kovalev D., Polisski G., BenChorin M., Diener J., Koch F. The temperature dependence of the absorption coefficient of porous silicon // J. Appl. Phys. — 1996. — V. 80, № 10. — P. 5978-5983.
248. Compendium of Chemical Terminology: IUPAC Recommendations / McNaught A.D., Wilkinson A. — Oxford, UK: Blackwell Science Inc., 1997. — 464 pp.
249. Chandra A.K., Goursot A. Calculation of proton affinities using density functional procedures: A critical study // J. Phys. Chem. — 1996. — V. 100, № 28. — P. 11596-11599.
250. Granovsky A.A. Firefly version 7.1.G, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>. (Дата обращения 15.01.012 г.)
251. Bartmess J.E. Thermodynamics of the electron and the proton // J. Phys. Chem. — 1994. — V. 98, № 25. — P. 6420-6424.
252. Hunter E.P., Lias S.G. Proton Affinity Evaluation NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database / Eds. Linstrom P.J., Mallard W.G. (National

Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 2005).  
<http://webbook.nist.gov>. (Дата обращения 10.06.2009 г.)

253. Bohme D.K., Mackay G.I., Schiff H.I. Determination of proton affinities from the kinetics of proton-transfer reactions. VII. The proton affinities of O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, Kr, O, N<sub>2</sub>, Xe, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, and CO // *J. Chem. Phys.* — 1980. — V. 73, № 10. — P. 4976-4986.

254. Ю.Ю. Лурье Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье. — 6-е изд., перераб. и доп. — М.: Химия, 1989. — 446 с.

255. Hunter E.P.L., Lias S.G. Evaluated gas phase basicities and proton affinities of molecules: An update // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* — 1998. — V. 27, № 3. — P. 413-656.

256. Boneberg J., Bischof J., Leiderer P. Nanosecond time-resolved reflectivity determination of the melting of metals upon pulsed laser annealing // *Opt. Commun.* — 2000. — V. 174, № 1-4. — P. 145-149.

257. Freeman R.K., Rigby F.A., Morley N. Temperature-dependent reflectance of plated metals and composite materials under laser irradiation // *J. Thermophys. Heat Transf.* — 2000. — V. 14, № 3. — P. 305-312.

258. Viatella J. Singh R. S.L.I.M. Simulation of Laser Interactions with Materials, University of Florida: Gainesville, FL, USA. 2006.

259. Ландсберг Г.С. Оптика: учеб. пособие для вузов / Г.С. Ландсберг. — 6-ое изд., стереот. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. — 848 с.

260. Охотин А.С., Теплофизические свойства полупроводников / А.С. Охотин, А.С. Пушкарский, В.В. Горбачев. — М.: Атомиздат, 1972. — 200 с.

261. Lampert M.O., Koebel J.M., Siffert P. Temperature dependence of the reflectance of solid and liquid silicon // *J. Appl. Phys.* — 1981. — V. 52, № 8. — P. 4975-4976.

262. Чиркин В.С. Теплофизические свойства материалов ядерной техники: справочник / В.С. Чиркин. — М.: Атомиздат, 1967. — 484 с.

263. Nagai H., Nakata Y., Tsurue T., Minagawa H., Kamada K., Gustafsson S.E., Okutani T. Thermal conductivity measurement of molten silicon by a hot-disk method in short-duration microgravity environments // *Jpn. J. Appl. Phys.* — 2000. — V. 39, Part 1, № 3A. — P. 1405-1408.

264. Volz S., Feng X., Fuentes C., Guerin P., Jaouen M. Thermal conductivity measurements of thin amorphous silicon films by scanning thermal microscopy // *Int. J.*

Thermophys. — 2002. — V. 23, № 6. — P. 1645-1657.

265. Kobatake H., Fukuyama H., Minato I., Tsukada T., Awaji S., Noncontact measurement of thermal conductivity of liquid silicon in a static magnetic field // *Appl. Phys. Lett.* — 2007. — V. 90, № 9. — 094102.

266. van Driel H.M., Sipe J.E., Young J.F. Laser-induced periodic surface structure on solids: A universal phenomenon // *Phys. Rev. Lett.* — 1982. — V. 49, № 26. — P. 1955-1958.

267. Sipe J.E., Young J.F., Preston J.S., van Driel H.M. Laser-induced periodic surface structure. I. Theory // *Phys. Rev. B.* — 1983. — V. 27, № 2. — P. 1141-1154.

268. Ахманов С.А., Емельянов В.И., Коротеев Н.И., Семиногов В.Н. Воздействие мощного лазерного излучения на поверхность полупроводников и металлов: нелинейно-оптические эффекты и нелинейно-оптическая диагностика // *Успехи физ. наук.* — 1985. — Т. 147, № 12. — С. 675-745.

269. Шелудяк Ю.Е. Теплофизические свойства компонентов горючих систем: справочник / Ю.Е. Шелудяк, Л.Я. Кашпоров, Л.А. Малинин, В.Н. Цалков. — М.: НПО «Информ ТЭИ», 1992. — 184 с.

270. Dai Z.H., Zhang R.J., Shao J., Chen Y.M., Zheng Y.X., Wu J.D., Chen L.Y. Optical properties of zinc-oxide films determined using spectroscopic ellipsometry with various dispersion models // *J. Korean Phys. Soc.* — 2009. — V. 55, № 3. — P. 1227-1232.

271. Kim J.E., Bae S.M., Yang, H.S., Hwang J.H. Electrical and optical properties of zinc oxide thin films deposited using atomic layer deposition // *J. Korean Ceram. Soc.* — 2010. — V. 47, № 4. — P. 353-356.

272. Ghodsi F.E., Absalan H. Comparative Study of ZnO Thin Films Prepared by Different Sol-Gel Route // *Acta Phys. Pol. A.* — 2010. — V. 118, № 4. — P. 659-664.

273. Jain A., Johari M., Jain A., Pandey P.K., Agrawal R. Modification in optical properties of ZnO thin film by annealing // *Int. J. Innovative Res. Sci. Eng. Technol.* — 2013. — V. 2, № 7. — P. 3144-3148.

274. Cumming J.B., Kebarle P. Summary of gas-phase acidity measurements involving acids AH - entropy changes in proton-transfer reactions involving negative-ions - bond-dissociation energies D(A-H) and electron-affinities EA(A) // *Can. J. Chem.* — 1978. — V. 56, № 1. — P. 1-9.

275. Damrauer R., Simon R., Krempp M. Effect of substituents on the gas-phase acidity of silanols // *J. Am. Chem. Soc.* — 1991. — V. 113, № 12. — P. 4431-4435.

276. Гречников А. А. Дис. ... канд. хим. наук. Москва: ГЕОХИ РАН, 2000. 183 с.
277. Eisenberg A., Yokoyama T., Sambalido E. Dehydration kinetics and glass transition of poly(acrylic acid) // *J. Polym. Sci. A.* — 1969. — V. 7, № 7. — P. 1717-1728.
278. Лебедева Т.Л., Алиева Е.Д., Трухманова Н.И., Ледина Л.Е., Гречников А.А., Перченко В.Н., Платэ Н.А. Взаимодействие твердых полимерных карбоновых кислот с парами N,N-диметилгидразина // *Высокомолек. соед. А.* — 1998. — Т. 40, № 10. — С. 1554-1563.
279. Sauerbrey G.Z The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing // *Z. Phys.* — 1959. — V. 155, № 2. — P. 206-222.
280. Киселёв В.Ф. Электронные явления в адсорбции и катализе на полупроводниках и диэлектриках / В.Ф. Киселёв, О.В. Крылов. — М.: Наука, 1979. — 236 с.
281. Дэвисон С. Поверхностные (гаммовские) состояния / С. Дэвисон, Дж. Леви. — М.: Мир, 1973. — 232 с.
282. da Silva M.A.V., da Silva M.M.C., Santos A.F.L., Roux M.V., Foces-Foces C., Notario R., Guzman-Mejia R., Juaristi E. Experimental and computational thermochemical study of  $\alpha$ -alanine (DL) and  $\beta$ -alanine // *J. Phys. Chem. B.* — 2010. — V. 114, № 49. — P. 16471-16480.
283. Svec H.J., Clyde D.D. Vapor pressures of some  $\alpha$ -amino acids // *J. Chem. Eng. Data.* — 1965. — V. 10, № 2. — P. 151-152.
284. Griesser U.J., Szlagiewicz M., Hofmeier U.C., Pitt C., Cianferani S. Vapor pressure and heat of sublimation of crystal polymorphs // *J. Therm. Anal. Calorim.* — 1999. — V. 57, № 1. — P. 45-60.
285. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2-х т. / М.Д. Машковский. — 14-е изд., перераб., испр. и доп. — М.: Новая волна, 2002. — 1148 с.
286. Дунина В.В. Получение и исследование оптически активных веществ: учебное пособие / В.В. Дунина, Е.Г. Рухадзе, В.М. Потапов. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979. — 328 с.
287. Paquette L.A., Freeman J.P., Maiorana S. Asymmetric induction in the sulfene-amine condensation reaction: The transition state geometry of such (2+2) cycloadditions // *Tetrahedron.* — 1971. — V. 27, № 13. — P. 2599-2607.
288. Colby S.M., Stewart M., Reilly J.P. Laser ionization gas chromatography/mass spectrometry of tetraethyltin // *Anal. Chem.* — 1990. — V. 62, № 21. — P. 2400-2403.

289. Tracqui A., Kintz P., Mangin P. Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD // *J. Forensic Sci.* — 1995. — V. 40, № 2. — P. 254-262.
290. <https://webbook.nist.gov/chemistry>. (Дата обращения 16.10.2016 г.)
291. Pellegrini M., Rosati F., Pacifici R., Zuccaro P., Romolo F.S., Lopez A. Rapid screening method for determination of Ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography–chemical ionisation mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* — 2002. — V. 769, № 2. — P. 243–251.
292. Wu A.H., Onigbinde T.A., Wong S.S., Johnson K.G. Evaluation of full-scanning GC/ion trap MS analysis of NIDA drugs-of-abuse urine testing in urine // *J. Anal. Toxicol.* — 1992. — V. 16, № 3. — P. 202-206.
293. Nagasawa N., Yashiki M., Iwasaki Y., Hara K., Kojima T. Rapid analysis of amphetamines in blood using head space-solid phase microextraction and selected ion monitoring // *Forensic Sci. Int.* — 1996. — V. 78, № 2. — P. 95-102.
294. Meatherall R. Rapid GC-MS confirmation of urinary amphetamine and methamphetamine as their propylchloroformate derivatives // *J. Anal. Toxicol.* — 1995. — V. 19, № 5. — P. 316-322.
295. Hidvegi E., Fabian P., Hideg Z., Somogyi G. GC-MS determination of amphetamines in serum using on-line trifluoroacetylation // *Forensic Sci. Int.* — 2006. — V. 161, № 2-3. — P. 119-123.
296. Lim H.K., Zeng S., Chei D.M., Foltz R.L. Comparative investigation of disposition of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine (MDMA) in the rat and the mouse by a capillary gas chromatography-mass spectrometry assay based on perfluorotributylamine-enhanced ammonia positive ion chemical ionization // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 1992. — V. 10, № 9. — P. 657-665.
297. Jurado C., Gimenez M.P., Soriano T., Menendez M., Repetto M. Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by GC-MS // *J. Anal. Toxicol.* — 2000. — V. 24, № 1. — P. 11-16.
298. Meng P.J., Wang Y.Y. Small volume liquid extraction of amphetamines in saliva // *Forensic Sci. Int.* — 2010. — V. 197, № 1-3. — P. 80-84.
299. Scheidweiler K.B., Huestis M.A. A validated gas chromatographic-electron impact ionization mass spectrometric method for methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamine and metabolites in oral fluid // *J. Chromatogr. B.* — 2006. — V. 835, № 1-2. — P. 90-99.

300. Wu A.H., Onigbinde T.A., Wong S.S., Johnson K.G. Identification of methamphetamines and over-the-counter sympathomimetic amines by full-scan GC-ion trap MS with electron impact and chemical ionization // *J. Anal. Toxicol.* — 1992. — V. 16, № 2. — P. 137-141.
301. Lim H.K., Su Z., Foltz R.L. Stereoselective disposition: enantioselective quantitation of 3,4-(methylenedioxy) methamphetamine and three of its metabolites by gas chromatography/electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry // *Biol. Mass Spectrom.* — 1993. — V. 22, № 7. — P. 403-411.
302. Orsnes H., Graf T., Degn H., Murray K.K. A rotating ball inlet for on-line MALDI mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 2000. — V. 72, № 1. — P. 251-254.
303. Musyimi H.K., Narcisse D.A., Zhang X., Stryjewski W., Soper S.A., Murray K.K. Online CE-MALDI-TOF MS using a rotating ball interface // *Anal. Chem.* — 2004. — V. 76, № 19. — P. 5968-5973.
304. Davies J.P. Larson R.A. Goodrich L.D. Hall H.J. Stoddard B.D. Davis S.G. Kaser T.G. Conrad F.J. Calibrated vapor generator source. 1995. US Patent №5452600.
305. Eiceman G.A., Preston D., Tiano G., Rodriguez J., Parmeter J.E. Quantitative calibration of vapor levels of TNT, RDX, and PETN using a diffusion generator with gravimetry and ion mobility spectrometry // *Talanta.* — 1997. — V. 45, № 1. — P. 57-74.
306. Wohltjen H. Mechanism of operation and design considerations for surface acoustic wave devices for chemical analysis // *Sensors and Actuators.* — 1984. — V. 5, № 4. — P. 307-325.
307. Малов В.В. Пьезорезонансные датчики / В.В. Малов. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Энергоатомиздат, 1989. — 272 с.
308. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis // *Anal. Chem.* — 2000. — V. 72, № 6. — P. 1156-1162.
309. Makarov A., Denisov E., Lange O., Horning S. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2006. — V. 17, № 7. — P. 977-982.
310. Rose R.J., Damoc E., Denisov E., Makarov A., Heck A.J. High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies // *Nat. Methods.* — 2012. — V. 9, № 11. — P. 1084-1086.
311. Makarov A., Denisov E. Dynamics of ions of intact proteins in the Orbitrap mass analyzer // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2009. — V. 20, № 8. — P. 1486-1495.

312. Bhasu V.C.J., Chaudhri M.M., Housden J. Rapid mass-spectrometric analysis of fragments of trinitrotoluene, picric acid and tetryl generated by laser irradiation // *J. Mater. Sci.* — 1991. — V. 26, № 8. — P. 2199-2207.

313. Hubert C., Dossmann H., Machuron - Mandard X., Tabet J.C. ESI formation of a Meisenheimer complex from tetryl and its unusual dissociation // *J. Mass Spectrom.* — 2013. — V. 48, № 3. — P. 306-311.

314. Sisco E., Dake J., Bridge C. Screening for trace explosives by AccuTOF<sup>TM</sup>-DART®: An in-depth validation study // *Forensic Sci. Int.* — 2013. — V. 232, № 1-3. — P. 160-168.

315. Ostmark H., Wallin S., Ang H.G. Vapor Pressure of Explosives: A Critical Review // *Propellants Explos. Pyrotech.* — 2012. — V. 37, № 1. — P. 12-23.

316. Koppel I.A., Taft R.W., Anvia F., Zhu S.Z., Hu L.Q., Sung K.S., DesMarteau D.D., Yagupolskii L.M., Yagupolskii Y.L., Ignat'ev N.V., Kondratenko N.V., Volkonskii A.Y., Vlasov V.M., Notario R., Maria P.C. The Gas-Phase Acidities of Very Strong Neutral Bronsted Acids // *J. Am. Chem. Soc.* — 1994. — V. 116, № 7. — P. 3047-3057.

317. Jones C.M., Bernier M., Carson E., Colyer K.E., Metz R., Pawlow A., Wischow E.D., Webb I., Andriole E.J., Poutsma J.C. Gas-phase acidities of the 20 protein amino acids // *Int. J. Mass Spectrom.* — 2007. — V. 267, № 1-3. — P. 54-62.

318. Viggiano A.A., Henchman M.J., Dale F., Deakyne C.A., Paulson J.F. Gas-phase reactions of weak Broensted bases  $\Gamma^-$ ,  $\text{PO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{FSO}_3^-$ , and  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$  with strong Broensted acids  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{FSO}_3\text{H}$ , and  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ . A quantitative intrinsic superacidity scale for the sulfonic acids  $\text{XSO}_3\text{H}$  ( $\text{X} = \text{HO}$ ,  $\text{F}$ , and  $\text{CF}_3$ ) // *J. Am. Chem. Soc.* — 1992. — V. 114, № 11. — P. 4299-4306.

319. Astratov M., Preiß A., Levsen K., Wunsch G. Identification of pollutants in ammunition hazardous waste sites by thermospray HPLC/MS // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — 1997. — V. 167-168. — P. 481-502.

320. Verweij A.M.A., De Bruyn P.C., Choufoer C., Lipman P.J.L. Liquid chromatographic, thermospray/negative ion, tandem mass spectrometric (LC/TSP/MS/MS) analysis of some explosives // *Forensic Sci. Int.* — 1993. — V. 60, № 1-2. — P. 7-13.

321. Voyksner R.D., Yinon E. Trace analysis of explosives by thermospray high-performance liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* — 1986. — V. 354. — P. 393-405.



322. Holmgren E., Carlsson H., Goede P., Crescenzi C. Determination and characterization of organic explosives using porous graphitic carbon and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* — 2005. — V. 1099, № 1-2. — P. 127-135.

323. Cappiello A., Famigliani G., Lombardozzi A., Massari A., Vadala G.G. Electron capture ionization of explosives with a microflow rate particle beam interface // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 1996. — V. 7, № 8. — P. 753-758.

324. Иванчев Г. Дитизон и его применение / Г. Иванчев. — М.: Изд. Ин. Лит., 1961. — 450 с.

325. Иванов В.М. Гетероциклические азотсодержащие азосоединения / В.М. Иванов. — М.: Наука, 1982. — 230 с.

326. Банковский Ю.А. 8-меркаптохинолин и его производные: Химия хелатных соединений / Ю.А. Банковский. — М.: Наука, 1973. — 488 с.

327. Борисова Л.В. Аналитическая химия рения. Серия: «Аналитическая химия элементов» / Л.В. Борисова, А.Н. Ермаков. — М.: Наука, 1974. — 319 с.

328. Hu X., Tanaka A., Tanaka R. Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples // *Plant methods.* — 2013. — V. 9, № 1. — P. 19-32.

**Список публикаций по теме диссертации**

1. Лебедева Т.Л., Алиева Е.Д., Трухманова Н.И., Ледина Л.Е., Гречников А.А., Перченко В.Н., Платэ Н.А. Взаимодействие твердых полимерных карбоновых кислот с парами N,N-диметилгидразина // *Высокомолек. соед. А.* — 1998. — Т. 40, № 10. — С. 1554-1563.
2. Могилевский А.Н., Гречников А.А., Калашникова И.С., Перченко В.Н. Измерение концентраций паров несимметричного диметилгидразина в воздухе с использованием массочувствительных пьезорезонансных сенсоров // *Журн. аналит. химии.* — 1999. — Т. 54, № 9. — С. 985-990.
3. Гречников А.А., Могилевский А.Н., Галкина И.П., Мясоедов Б.Ф., Алиева Е.Д., Трухманова Н.И., Лебедева Т.Л., Платэ Н.А. Пьезорезонансный сенсор аммиака с полималеиновой кислотой в качестве чувствительного покрытия // *Журн. аналит. химии.* — 2000. — Т. 55, № 6. — С. 664-671.
4. Калашникова И.С., Лебедева Т.Л., Гречников А.А., Платэ Н.А., Мясоедов Б.Ф. Механизм взаимодействия паров несимметричного диметилгидразина с комплексами поли-(N-2-алкоксикарбонилэтил)-этилениминов с хлоридами меди(II) и палладия(II) // *Журн. аналит. химии.* — 2002. — Т. 57, № 5. — С. 482-489.
5. Alimpiev S.S., Nikiforov S.M., Karavansky V.A, Grechnikov A.A, Sunner J.A. Laser desorption of ions from microscopically rough surfaces. Novel technique for ultrahigh sensitivity detection of organic and bioorganic compounds // *Proc. SPIE.* — 2004. — V. 5506. — P. 95-106.
6. Alimpiev S.S., Nikiforov S.M., Grechnikov A.A., Sunner J.A. Novel technique for ultra sensitive detection of organic compounds // *Kluwer Academic Publishers, Series II: Mathematics, Physics and Chemistry – V.157 “Vapour and Trace Detection of Explosives for Anti-Terrorism Purposes”.* 2004. P.101-112.
7. Alimpiev S.S., Grechnikov A.A., Sunner J., Karavanskii V.A., Simanovsky Ya.O, Zhabin S.N., Nikiforov S.M. On the role of defects and surface chemistry for surface-assisted laser desorption ionization from silicon // *J. Chem. Phys.* — 2008. — V. 128, № 1. — P. 014711(19).
8. Alimpiev S.S., Grechnikov A.A., Sunner J., Borodkov A.S., Karavanskii V.A., Simanovsky Ya.O., Nikiforov S.M. Gas Chromatography/Surface-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Amphetamine-like Compounds // *Anal. Chem.* — 2009. — V. 81, № 3. — P. 1255-1261.

9. Гречников А.А., Бородков А.С., Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Симановский Я.О., Караванский В.А. Определение соединений группы фенилалкиламинов методом поверхностно активированной лазерной десорбции-ионизации с аморфного кремния // Масс-спектрометрия. — 2010. — Т. 7, № 1. — С. 53-59.
10. Grechnikov A.A., Georgieva V.B., Alimpiev S.S., Borodkov A.S., Nikiforov S.M., Simanovsky Ya.O, Dimova-Malinovska D., Angelov O.I. Investigation of thin ZnO layers in view of laser desorption-ionization layers in view of laser desorption-ionization // J. Phys. Conf. Ser. — 2010. — V. 223, № 1. — P. 012038-012042.
11. Alimpiev S.S., Grechnikov A.A., Sunner J., Karavanskii V.A., Simanovsky Ya.O., Nikiforov S.M. Surface-assisted laser desorption ionization (SALDI) mass spectrometry with a rotating ball interface // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 2011. — V. 25, № 1. — P. 140–146.
12. Жабин С.Н., Пенто А.В., Гречников А.А., Никифоров С.М., Алимпиев С.С. Исследование процесса лазерной десорбции ионов b-аланина с поверхности аморфного кремния методом задержанной экстракции // Электромагнитные волны и электронные системы. — 2011. — Т. 16, №4. — С. 56-60.
13. Жабин С.Н., Пенто А.В., Гречников А.А., Бородков А.С., Сартаков С.Б. Никифоров С.М., Алимпиев С.С. О роли лазерного излучения в процессах лазерной десорбции-ионизации с кремниевых поверхностей // Квант. электрон. — 2011. — Т. 41, № 9. — С. 835-842.
14. Никифоров С.М., Симановский Я.О., Гречников А.А., Пенто А.В., Алимпиев С.С. Лазерный масс-спектрометр для анализа биологических жидкостей // Электромагнитные волны и электронные системы. — 2012. — Т. 17, № 4. — С. 39-44.
15. Кубасов А.Е., Бородков А.С., Гречников А.А., Алимпиев С.С. Исследование процессов фрагментации биогенных аминов при лазерной десорбции-ионизации с поверхности // Электромагнитные волны и электронные системы. — 2012. — Т. 17, № 10. — С. 60-65.
16. Grechnikov A.A, Kubasov A.E, Georgieva V.B, Borodkov A.S, Nikiforov S.M, Simanovsky Ya.O, Alimpiev S.S. Rapid screening of pharmaceutical drugs using thermal desorption – SALDI mass spectrometry // J. Phys.: Conf. Ser. — 2012. — V. 398, № 1. — P. 012033(6).
17. Georgieva V., Donkov N., Stefanov P., Sendova-Vassileva M., Grechnikov A., Gadjanova V. NO<sub>2</sub> sensing properties of amorphous silicon films // J. Phys.: Conf. Ser. — 2012. — V. 356, № 1. — P. 012027(4).

18. Гречников А.А., Бородков А.С., Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Симановский Я.О. Основность в газовой фазе - параметр, определяющий эффективность лазерной десорбции-ионизации с кремниевых поверхностей // Журн. аналит. химии. — 2013. — Т. 68, № 1. — С. 22-30.
19. Никифоров С.М., Симановский Я.О., Гречников А.А., Пенто А.В., Алимпиев С.С. Экспресс-анализ лекарственных препаратов методом лазерной масс-спектрометрии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2013. — Т. 11, № 2. — С. 21-25.
20. Макаров А.А., Гречников А.А., Никифоров С.М., Тютюнник О.А., Денисов Э.В. Масс анализатор Orbitrap с прямым вводом ионов в сочетании с лазерной десорбцией/ионизацией // Масс-спектрометрия. — 2013. — Т. 10, № 2. — С. 77-82.
21. Борисова Л.В., Бородков А.С., Гречников А.А., Уголкова Е.А., Минин В.В. Состав и строение комплексов Re(VI) по данным ЭПР и лазерной масс-спектрометрии // Журн. неорган. химии. — 2013. — Т. 58, № 8. — С. 1056-1060.
22. Grechnikov A., Nikiforov S., Strupat K., Makarov A. Determination of rhenium and osmium complexes by surface-assisted laser desorption/ionization coupled to Orbitrap mass analyzer // Anal. Bioanal. Chem. — 2014. — V. 406, № 13. — P. 3019-3023.
23. Гречников А.А., Бородков А.С., Жабин С.Н., Алимпиев С.С. О механизме десорбции ионов в условиях лазерной десорбции/ионизации с кремниевых поверхностей // Масс-спектрометрия. — 2014. — Т. 11, № 2. — С. 71-76.
24. Grechnikov A.A., Georgieva V., Borodkov A. S., Nikiforov S.M., Raicheva Z., Lazarov J., Donkov N. Laser-induced electron transfer desorption/ionization of metal complexes on TiO<sub>2</sub> films // J. Phys.: Conf. Ser. — 2014. — V. 558, № 1. — P. 012035(6).
25. Алимпиев С.С., Гречников А.А., Никифоров С.М. Новые подходы в лазерной масс-спектрометрии органических объектов // Успехи физ. наук. — 2015. — Т. 185, № 2. — С. 207-212.
26. Гречников А.А. Аналитические возможности метода лазерной десорбции-ионизации, активируемой поверхностью, при определении низкомолекулярных летучих соединений // Журн. аналит. химии. — 2015. — Т. 70, № 9. — С. 916-924.
27. Grechnikov A.A., Georgieva V., Donkov N., Borodkov A.S., Pento A.V., Raicheva Z., Yordanov Ts.A. Comparison of different substrates for laser-induced electron transfer desorption/ionization of metal complexes // J. Phys.: Conf. Ser. — 2016. — V. 700, № 1. — P. 012025(6).

28. Гречников А.А., Бородков А.С., Никифоров С.М., Кузьмин И.И. Лазерная десорбция/ионизация с переносом электрона для высокочувствительного масс-спектрометрического определения комплексных соединений металлов // *Технология живых систем*. — 2016. — Т. 13, № 3. — С. 66-74.
29. Гречников А.А., Бородков А.С., Симакина Я.И., Арабова З.М., Михайлова А.В., Кузьмин И.И., Дедков Ю.М., Минин В.В. Комплексообразование гетероциклических азосоединений с ионами переходных металлов по данным метода лазерно-индуцированной десорбции/ионизации // *Известия РАН. Сер. хим.* — 2016. — № 12. — С. 2789-2794.
30. Бородков А.С., Кузьмин И.И., Гречников А.А., Симановский Я.О. Определение комплексных соединений металлов методом лазерной десорбции/ионизации с переносом электрона в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов // *Биомедицинская радиоэлектроника*. — 2016. — № 10. — С. 53-59.
31. Grechnikov A.A., Borodkov A.S., Pento A.V., Polyakov N.B., Kuzmin I.I. New approaches to laser desorption/ionization of chemical compounds for geochemical studies // *Geochemistry International*. — 2017. — V. 55, № 1. — P. 19-26.
32. Borodkov A.S., Kuz'min I.I., Polyakov N.B., Grechnikov A.A., Alimpiev S.S. Comparison of the laser desorption/ionization methods for detecting complex metal compounds // *Phys. Wave Phenom.* — 2017. — V. 25, № 4. — P. 243-248.
33. Гречников А.А., Бородков А.С., Никифоров С.М. Дериватизация ионов в условиях лазерной десорбции/ионизации, активируемой поверхностью // *Журн. аналит. химии*. — 2019. — Т. 73, № 3. (*в печати*).
34. Могилевский А.Н., Гречников А.А., Строганова Н.С., Галкина И.П., Мясоедов Б.Ф., Перченко В.Н., Калашникова И.С., Ледина Л.Е., Баранов В.В., Платэ Н.А. Сенсор паров аммиака. Патент РФ № 2110061. Заявка 97106354/25 от 28.04.1997, опубл. 27.04.1998.
35. Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Гречников А.А., Караванский В.А., Саннер Ж. Способ формирования шероховатой поверхности кремниевых подложек и электролит для анодного травления кремниевых подложек. Патент РФ № 2217840. Заявка 2003101425/28 от 21.01.2003, опубл. 27.11.2003, бюл. № 33.
36. Гречников А.А., Могилевский А.Н., Алимпиев С.С., Никифоров С.М. Генератор микропотока паров веществ. Патент РФ № 2280501. Заявка 2005113964/15 от 12.05.2005, опубл. 27.07.2006, бюл. № 21.
37. Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Гречников А.А., Караванский В.А., Симановский Я.О. Способ десорбции-ионизации химических соединений.

- Патент РФ № 2285253. Заявка 2005141027/28 от 28.12.2005, опубл. 10.10.2006, бюл. № 28.
38. Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Симановский Я.О., Гречников А.А. Способ доставки анализируемого вещества в систему регистрации и устройство для его осуществления. Патент РФ № 2327244. Заявка 2006131356/28 от 31.08.2006, опубл. 20.06.2008, бюл. № 17.
39. Гречников А.А., Алимпиев С.С., Караванский В.А., Никифоров С.М., Симановский Я.О. Способ получения наноструктурированных кремниевых подложек. Патент РФ № 2364983. Заявка 2007144944/28 от 05.12.2007, опубл. 20.08.2009, бюл. № 23.
40. Гречников А.А., Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Симановский Я.О. Способ формирования эмиттера ионов для лазерной десорбции-ионизации химических соединений. Патент РФ № 2426191. Заявка 2010121208/28 от 26.05.2010, опубл. 10.08.2011, бюл. № 22.
41. Grechnikov A., Alimpiev S., Nikiforov S., Simanovskiy Ya. Method for designing ion emitters for laser desorption and ionisation of chemical compounds. European Patent Application EP2395537 A1. 14.12.2011.
42. Гречников А.А., Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Симановский Я.О., Бородков А.С. Способ определения металлов и комплексных соединений металлов. Патент РФ № 2531762. Заявка 2013122031/28 от 14.05.2013, опубл. 27.10.2014, бюл. № 30.
43. Гречников А.А., Бородков А.С., Никифоров С.М., Симановский Я.О., Алимпиев С.С. Способ масс-спектрометрического определения химических соединений. Патент РФ № 2599330. Заявка 2015120408/28 от 29.05.2015, опубл. 10.10.2016, бюл. № 28.
44. Гречников А.А., Бородков А.С., Никифоров С.М., Симановский Я.О., Алимпиев С.С. Установка для масс-спектрометрического определения химических соединений. Патент РФ на полезную модель № 160431. Заявка 2015120409/28 от 29.05.2015, опубл. 20.03.2016, бюл. № 8.