

Лазерная абляция и ионизация излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении в масс-спектрометрии органических соединений

А.В.Пенто, С.М.Никифоров, Я.О.Симановский, А.А.Гречников, С.С.Алимпиев

Разработан новый метод масс-спектрометрического анализа органических и биоорганических соединений, основанный на сочетании лазерной абляции с ионизацией ее продуктов излучением лазерной плазмы, который позволяет анализировать газообразные, жидкие и твердые вещества при атмосферном давлении без пробоподготовки. Возможности метода продемонстрированы на примерах быстрого скрининга лекарственных препаратов, анализа состава атмосферы в реальном времени и построения масс-спектрометрических изображений распределения органических соединений в биологических материалах.

Ключевые слова: масс-спектрометрия органических соединений, лазерная абляция, излучение лазерной плазмы.

1. Введение

В настоящее время одним из наиболее важных направлений развития лазерной масс-спектрометрии является разработка методов химического анализа веществ и материалов при атмосферном давлении без предварительной пробоподготовки. Такие методы чрезвычайно актуальны в биологии и медицине для анализа состава биологических тканей и жидкостей, в системах обеспечения безопасности для определения в реальном времени присутствия наркотических и взрывчатых веществ, в фармакологии для идентификации биологически активных компонентов лекарств, в допинг-контроле для проведения контроля в реальном времени.

В большинстве известных методов лазерное излучение используется для абляции анализируемого образца или десорбции соединений, адсорбированных на его поверхности. Для последующей ионизации обычно применяют традиционные методы, в частности электроспрей [1] и химическую ионизацию [2]. Другим вариантом является матрично активированная лазерная десорбция-ионизация (МАЛДИ) при атмосферном давлении [3]. Эти методы ионизации успешно используются для масс-спектрометрического детектирования ионных, полярных и высокоосновных соединений, однако они малоэффективны для ионизации других классов химических соединений.

Более универсальный метод – сочетание лазерной абляции с фотоионизацией жестким УФ излучением [4]. Для ионизации обычно применяются криптоновые УФ лампы, излучающие фотоны с максимальной энергией 10.6 эВ.

Альтернативным подходом может быть использование лазерной плазмы, возникающей вблизи поверхности облучаемой лазером мишени. Хорошо известно, что лазерная плазма является мощным источником жесткого УФ излучения [5]. Спектр излучения плазмы может быть сдвинут в необходимую область выбором материала мишени и параметров лазерного излучения, так, как это делается, например, в фотолитографии при производстве интегральных схем [6]. Коэффициент преобразования энергии лазерного излучения в энергию излучения плазмы может составлять десятки процентов, что позволяет создать мощный источник излучения при использовании достаточно компактных лазеров. Наконец, плазменный источник может быть создан непосредственно в камере ионизации и не требует дополнительных окон, ограничивающих спектральный диапазон излучения.

Таким образом, лазерная плазма должна быть весьма эффективным инструментом для создания ионов органических соединений, находящихся в газовой фазе. Для определения летучих соединений, например различных органических примесей в воздухе, ввод пробы необходимо организовать таким образом, чтобы поток воздуха проходил рядом с мишенью, на которой формируется плазма. При анализе твердых образцов необходимо перевести органические соединения в газовую фазу, например путем лазерной абляции. При этом использование жестко сфокусированного лазерного излучения, испаряющего образец, позволяет получить картину пространственного распределения концентраций соединений в образце и создать масс-спектрометр – микроскоп с пространственным разрешением в десятки микрометров.

Для формирования плазмы лучше всего использовать твердотельные лазеры с оптической накачкой. Они обеспечивают высокую импульсную мощность при длительности импульса менее 1 нс, частоту следования импульсов до нескольких кГц и исключительно высокие стабильность и надежность. При генерации гармоник или параметрическом преобразовании частоты формирование плазмы и испарение (абляция) образца могут осуществляться в широком спектральном диапазоне с использованием одного лазера.

А.В.Пенто, С.М.Никифоров, С.С.Алимпиев. Институт общей физики РАН им. А.М.Прохорова, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: pentan@mail.ru

Я.О.Симановский. ЗАО «НТЦ "Физприбор"», Россия, 11960 Москва, ул. Акад. Анохина, 38, корп. 1; e-mail: yaroslav@kapella.gpi.ru

А.А.Гречников. Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Косыгина, 19; e-mail: agrech@bk.ru

Настоящая работа посвящена исследованию процессов ионизации органических соединений излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении, оценке чувствительности лазерного масс-спектрометра при детектировании органических соединений и реализации масс-спектрометра – микроскопа на основе лазерной абляции твердого органического образца и ионизации продуктов испарения излучением лазерной плазмы.

2. Эксперимент

Схема экспериментальной установки приведена на рис.1. В эксперименте использовался времяпролетный масс-анализатор-рефлектор 1, разработанный в Институте аналитического приборостроения РАН (С.-Петербург), с вводом ионов из области атмосферного давления через газонаполненный транспортный квадруполь. Газодинамический атмосферный ввод обеспечивает поток вводимого газа в масс-анализатор $\sim 2 \text{ см}^3/\text{с}$ при атмосферном давлении. Масс-анализатор имеет разрешение по массе $m/\Delta m \approx 5000$ при точности определения массы $\delta m = 2 \times 10^{-5} m$. Для обработки масс-спектров применялась программа SaldixScore [7], обеспечивающая обработку в реальном времени.

Перед заборником масс-анализатора была установлена герметичная камера образца 2, находящаяся при атмосферном давлении и снабженная окнами для ввода лазерного излучения. Камера продувалась воздухом или чистыми газами (азот и аргон чистотой 99.999) через па-

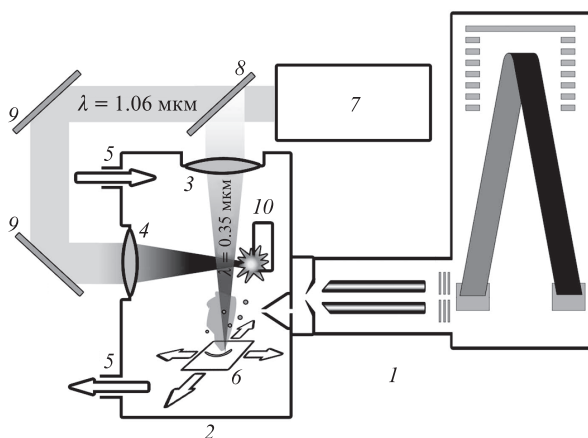


Рис.1. Схема экспериментальной установки для масс-спектрометрического анализа твердых органических образцов без пробоподготовки с применением лазерной абляции и ионизации продуктов абляции излучением лазерной плазмы (обозначения см. в тексте).

трубки 5. Это позволяло избежать появления в масс-спектрах пиков ионов органических соединений, находящихся в следовых концентрациях в атмосферном воздухе. Исследуемый образец был размещен в камере на двухкоординатном столике Thorlabs MTS25-Z8 6, обеспечивающем его перемещение с шагом 2 мкм.

Для испарения образца и создания плазмы применялся твердотельный Nd:YAG-лазер с диодной накачкой и генератором гармоник (7) RL-03/355 (ООО «ЭЛС-94») с длительностью импульсов 0.37 нс и частотой их следования 500 Гц. Для испарения исследуемого образца использовалась третья гармоника лазерного излучения с длиной волны 0.35 мкм и энергией импульса до 80 мкДж. Это излучение с помощью интерференционного зеркала 8 и линзы 3 с фокусным расстоянием 40 мм фокусировалось на поверхность образца в пятно с характерным размером 30 мкм. Излучение на основной частоте с длиной волны 1.06 мкм, для которого зеркало 8 является прозрачным, с помощью зеркал 9 и линзы 4, фокусировалось на металлическую мишень 10, создавая на ней плазму. Мишень 10 выполнена в виде цилиндра диаметром 10 мм и установлена на валу двигателя, обеспечивающего ее вращение. Вращение практически исключает влияние эрозии материала мишени в области формирования плазмы.

3. Результаты и их обсуждение

В первой серии экспериментов определялись механизмы формирования ионов при использовании лазерной плазмы в качестве ионизатора. Лазерная плазма является источником широкополосного УФ излучения со спектром, простирающимся вплоть до области мягкого рентгеновского излучения, что позволяет ионизовать практически любые химические соединения. Тем не менее основным каналом ионизации излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении оказалось присоединение протона H^+ нейтральными молекулами. Можно предположить, что источником протонов в этих условиях являются молекулы воды.

На рис.2,а приведен типичный масс-спектр воздуха в области, соответствующей ионам воды. Видно, что он имеет два основных пика с отношениями массы к заряду $m/z = 18$ и 19 , которые можно интерпретировать как линии молекулярных ионов H_2O^+ и протонированных молекул H_3O^+ . Кроме того, в масс-спектре есть пик с $m/z = 17$, соответствующий ионам OH^+ . Тот же участок масс-спектра, но полученный при добавлении в камеру паров тяжелой воды, представлен на рис.2,б. В спектре наблюдаются новые пики, соответствующие ионам D_3O^+ и D_2O^+ , а также D_2HO^+ , DH_2O^+ , DHO^+ и OD^+ . При этом пики ор-

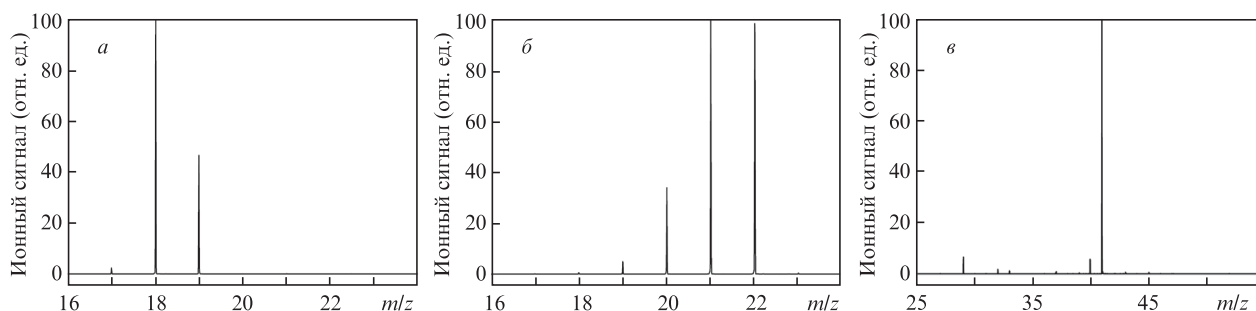


Рис.2. Масс-спектры воздуха, содержащего пары воды (а), и воздуха при добавлении в камеру паров тяжелой воды (б), а также масс-спектр, полученный при напуске аргона в камеру образца (в).

ганических соединений регистрируются как пики дейтерированных молекул. Полученные результаты свидетельствуют о том, что излучение лазерной плазмы обеспечивает однофотонную ионизацию молекул воды, имеющих потенциал ионизации 12.6 эВ [8]. Можно предположить, что образующиеся первичные молекулярные ионы затем вступают в ион-молекулярные реакции с молекулами воды с образованием ионов гидроксония H_3O^+ (энергия сродства к протону 691 кДж/моль [9]), которые, в свою очередь, являются эффективными донорами протонов, обеспечивающими «мягкую» ионизацию органических и биоорганических соединений. Возможна и прямая передача протона от иона молекулы воды H_2O^+ , который является более эффективным донором протона, чем H_3O^+ , из-за меньшей энергии сродства к протону (593 кДж/моль).

Такой канал ионизации – не единственно возможный, о чем свидетельствует масс-спектр на рис.2,в, полученный при напуске в камеру образца аргона. В этом масс-спектре помимо пиков ионов Ar^+ и O_2^+ , образующихся в результате прямой фотоионизации (потенциалы ионизации 15.75 и 14.01 эВ), наблюдается интенсивный пик протонированного аргона ArH^+ с $m/z = 41$, а также пики протонированных молекул азота N_2H^+ с $m/z = 29$ и кислорода O_2H^+ с $m/z = 33$. Энергии сродства к протону аргона, кислорода и азота составляют соответственно 369, 421 и 494 кДж/моль [9]. Это указывает на то, что вторым каналом протонирования может являться присоединение свободных протонов, образующихся в условиях воздействия излучения лазерной плазмы на присутствующие в камере образца пары воды. Следует отметить, что введение в камеру образца паров тяжелой воды приводит к образованию дейтерированных пиков аргона, кислорода и азота. Возможность ионизации путем протонирования молекул и атомов со столь низкими энергиями сродства к протону выгодно отличает разрабатываемый метод от других методов «мягкой» ионизации. Например, метод поверхностно-активированной лазерной десорбции-ионизации с кремниевых поверхностей (SALDI) применим только для ионизации соединений с энергиями сродства к протону более 850 кДж/моль [10]. Химическая ионизация обычно позволяет ионизовать соединения с энергиями сродства к протону более 750–800 кДж/моль [11]. Близкими пороговыми значениями энергии сродства к протону анализируемых соединений характеризуется и метод МАЛДИ [12].

Во второй серии экспериментов проводилась оценка чувствительности разрабатываемого метода при детекти-

ровании органических молекул. Для этого применялся генератор микропотока паров пьезорезонансного типа, обеспечивающий получение контролируемого постоянного сверхмалого потока паров широкого класса химических соединений [13]. Использовался массочувствительный пьезоэлектрический резонатор объемных акустических волн типа «сдвиг по толщине» (АТ-срез кварца) с рабочей частотой 18 МГц. Массовая чувствительность резонатора составляла 5930 Гц/мкг. На электрод резонатора наносилась тонкая пленка вещества, испарение (сублимация) которого приводило к увеличению резонансной частоты массочувствительного резонатора. Измерение частоты позволяет определить поток анализируемых молекул, поступающих в камеру для ввода пробы. В качестве таких молекул был выбран кофеин, давление паров которого при комнатной температуре равно 3×10^{-7} Тор [14]. Низкая скорость его испарения обеспечивает получение стабильного в течение достаточно большого промежутка времени потока вещества при низкой концентрации анализируемых молекул, моделируя условия измерений при лазерном испарении пробы с низким содержанием целевого вещества.

Для увеличения точности определения величины потока молекул кофеина время измерения составляло 10 ч. Изменение частоты резонатора за это время было равно 250 Гц, что соответствует уменьшению массы резонатора, вызванному сублимацией кофеина, примерно на 40 нг. Соответственно средняя величина этого потока за время эксперимента составляла 1.2 пг/с или 3.7×10^9 молек./с. На рис.3 приведены масс-спектры, полученные до и после установки генератора микропотока в камеру образца. Из представленных данных следует, что генерируемый поток молекул кофеина приводит к появлению пика с $m/z = 195$, соответствующего протонированным молекулам кофеина. Интенсивность этого пика по крайней мере в десять раз превышает фоновый сигнал. Отсюда можно сделать вывод, что порог обнаружения паров кофеина в воздухе составляет примерно несколько десятых пикограмма. Хотя достигнутый порог существенно уступает полученному ранее при детектировании потока молекул кофеина в вакууме методом SALDI [15], предлагаемый метод ионизации излучением лазерной плазмы позволяет определять следовые количества органических соединений непосредственно в атмосферном воздухе. Так, с учетом того, что входное устройство масс-анализатора обеспечивает забор атмосферного воздуха $2 \text{ см}^3/\text{с}$, при стандартном времени накопления масс-спектров 1 с прибор в состоя-

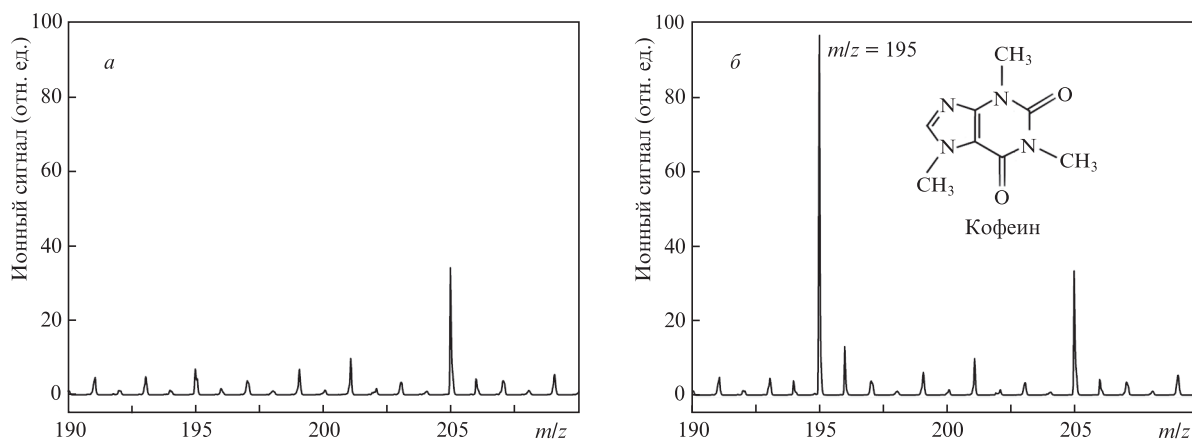


Рис.3. Масс-спектры, полученные до (а) и после (б) установки генератора микропотока с нанесенной пленкой кофеина в камеру образца.

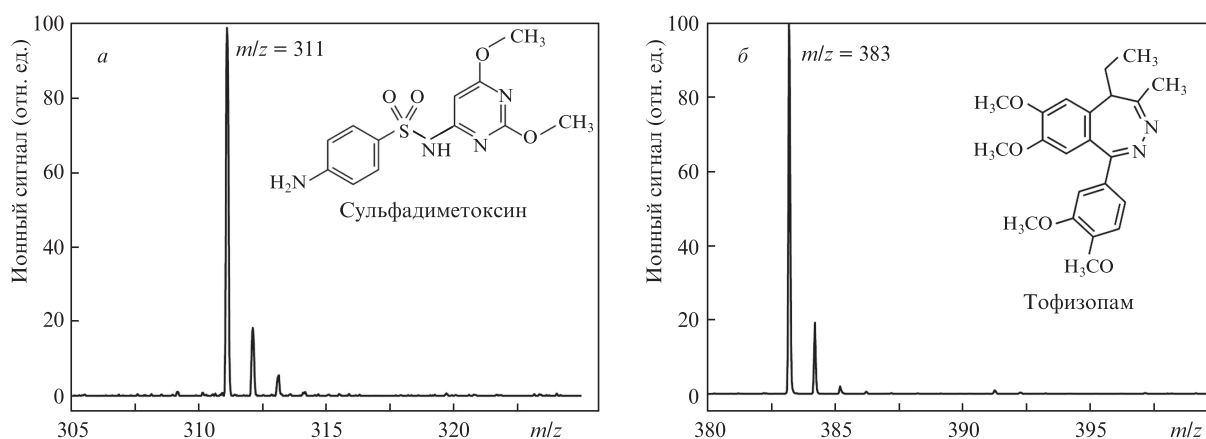


Рис.4. Масс-спектры сульфадиметоксина (а) и тофизопама (б), полученные при лазерном испарении и ионизации продуктов испарения излучением лазерной плазмы.

нии регистрировать пары кофеина в воздухе при относительной концентрации $\sim 3 \times 10^{-11}$ или ~ 30 ppt. Этот вывод подтверждается и тем, что при использовании атмосферного воздуха для продувки камеры образца в масс-спектрах наблюдается целый ряд пиков протонированных органических молекул, содержащихся в следовых концентрациях в лабораторном воздухе.

В третьей серии экспериментов определялись возможности метода для анализа без пробоподготовки твердых образцов, содержащих различные органические соединения. В качестве объектов исследования были выбраны таблетки лекарственных препаратов с известной концентрацией действующих веществ. При лазерном испарении этих таблеток поглощение излучения ближнего УФ диапазона происходит в основном за счет наполнителей, всегда присутствующих в таблетках. Одним из таких веществ является, например, тальк (миннесотаит), сами же органические соединения прозрачны в этой области спектра. Наличие поглощающих наполнителей при воздействии лазерного излучения с длиной волны 355 нм на таблетки лекарственных препаратов обеспечивает абляция ионный режим испарения. На рис.4 приведены масс-спектры, полученные при лазерной абляции таблеток сульфадиметоксина и тофизопама и ионизации продуктов испарения излучением лазерной плазмы. Видно, что в масс-спектрах определяются пики активных лекарственных веществ в виде пиков протонированных молекул.

Эти эксперименты позволяют также провести оценку чувствительности предлагаемого метода анализа. Для этого был измерен кратер, создаваемый лазерным излучением на поверхности таблетки за 1 мин его воздействия. Диаметр кратера составил 55 мкм при его глубине ~ 40 мкм, что соответствует объему кратера 10^{-7} см³. Поток молекул сульфадиметоксина, испаренного лазерным излучением, был равен при этом 1.5×10^{-9} г/с. Поскольку отношение сигнал/шум в регистрируемых спектрах превышает 10^3 (рис.4), можно считать, что детектируемый в эксперименте поток в 300 раз больше порога обнаружения, равного 5 пг/с. Эта величина порогового потока определяемого вещества сравнима с величиной потока молекул кофеина, полученной ранее с использованием генератора микропотока. Однако следует отметить, что выполненная оценка уступает оценке чувствительности с использованием генератора микропотока из-за неточностей в определении потока выносимого вещества по размеру кратера. Известно, что в таком потоке возможно

образование крупных кластеров и наночастиц, которые не могут быть зарегистрированы масс-спектрометром. Это приводит к занижению реальной чувствительности прибора и к неопределенности в оценке чувствительности при лазерной абляции. Следует отметить, что полученные оценки порогов обнаружения незначительно уступают рекордным порогам обнаружения разработанных масс-спектрометрических комплексов на основе ионизации пробы методами электроспрея и МАЛДИ, которые согласно данным [16, 17] лежат в диапазоне 0.2–0.5 пг/с. Вместе с тем хорошо известно, что эти методы требуют весьма сложной и длительной процедуры пробоподготовки.

В четвертой серии экспериментов проводились анализ твердых органических образцов с пространственным разрешением и построение масс-спектрометрического изображения анализируемого объекта. Для исследования возможности получения масс-спектроскопического изображения анализируемого образца и определения пространственного разрешения в режиме сканирования образца в качестве модельного объекта был выбран человеческий волос. Выбор обусловлен тем, что в окрашенных тканях волоса поглощение используемого излучения с длиной волны 355 нм достигает 10^3 см⁻¹ и оказывается достаточным для эффективной абляции. При этом волос является стабильным объектом, сохраняющим свою форму длительное время, его диаметр легко определяется с помощью стандартных измерительных средств.

Волосы состоят на 3% из воды и на 97% из белкового вещества – кератина. Кератин – биополимер, продукт полимеризации серосодержащей аминокислоты цистеина. В случае лазерной абляции волоса в результате нагрева происходит разрушение молекулы биополимера с образованием ряда фрагментов. При ионизации продуктов испарения излучением лазерной плазмы наблюдается характерный масс-спектр, состоящий из более 50 пиков с $m/z = 40$ –250. Для построения изображения был выбран пик с $m/z = 70$, имеющий наибольшую амплитуду и, по видимому, соответствующий основному структурному фрагменту C_3NOH_4 биополимера.

На рис.5,а приведена зависимость амплитуды ионного пика с $m/z = 70$ от поперечного оси волоса смещения столика при шаге сканирования 2 мкм. Круг в центре соответствует оптическому изображению волоса диаметром 60 мкм, полученному традиционными методами. Видно, что масс-спектрометрическое изображение имеет пространственное разрешение ~ 30 мкм, что хорошо кор-

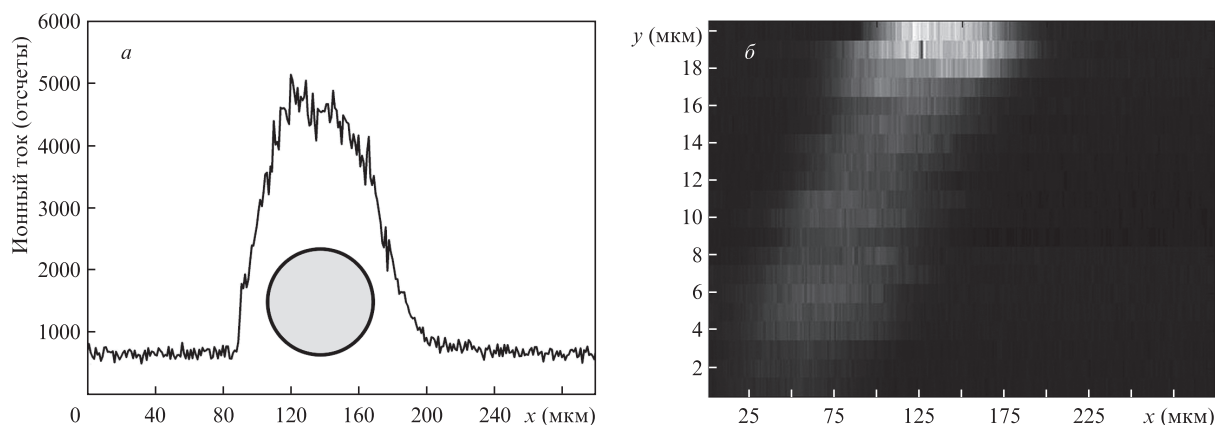


Рис.5. Зависимость амплитуды пика с $m/z = 70$ от поперечного оси волоса смещения столика x (а) и масс-спектрометрическое изображение волоса, полученное при двухкоординатном сканировании столика (б).

релирует с характерным размером пятна испаряющего образец лазерного излучения. На рис.5,б приведено масс-спектрометрическое изображение волоса, полученное при последовательном двухкоординатном сканировании столика с шагом 2 мкм.

Отметим, что описанные эксперименты имеют модельный и демонстрационный характер. Их цель состоит лишь в том, чтобы показать применимость предлагаемого метода для решения чрезвычайно актуальной в настоящее время задачи – построения масс-спектрометрических изображений состава сложных биоорганических объектов. Отметим также, что достигнутое пространственное разрешение далеко от предельного и может быть существенно улучшено при использовании хорошо развитых в настоящее время методов лазерной абляции материалов.

4. Выводы

Разработан новый метод масс-спектрометрического анализа органических и биоорганических образцов, основанный на сочетании лазерной абляции с ионизацией ее продуктов излучением лазерной плазмы, который позволяет анализировать газообразные, жидкие и твердые вещества при атмосферном давлении без пробоподготовки. Определяемые соединения детектируются в виде протонированных молекул. Показана возможность ионизации путем протонирования молекул и атомов с низкими, менее 500 кДж/моль, энергиями сродства к протону. Оценены пороги обнаружения метода при анализе газообразных и твердых проб.

Возможности метода продемонстрированы на примерах быстрого скрининга лекарственных препаратов, анализа состава атмосферы в реальном времени и построения масс-спектрометрических изображений распре-

деления концентраций органических соединений в биологических материалах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (государственный контракт № 16.512.11.2007).

1. Nemes P., Vertes A. *Anal. Chem.*, **79**, 8098 (2007).
2. Galhena A.S., Harris G.A., Nyadong L., Murray K.K., Fernández F.M. *Anal. Chem.*, **82**, 2178 (2010).
3. Laiko V.V., Baldwin M.A., Burlingame A.L. *Anal. Chem.*, **72**, 652 (2000).
4. Vaikkinen A., Shrestha B., Kauppila T.J., Vertes A., Kostianen R. *Anal. Chem.*, **84**, 1630 (2012).
5. Амбарцумян Р.В., Басов Н.Г., Бойко В.А., Зуев В.С., Крохин О.Н., Крюков П.Г., Сенатский Ю.В., Стойлов Ю.Ю. *ЖЭТФ*, **48** (6), 1583 (1965).
6. Harilal S.S., O'Shay B., Tillack M.S., Tao Y., Paguio R., Nikroo A., Back C.A. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **39**, 484 (2006).
7. Пихтелев А.Р., Пенто А.В., Никифоров С.М. *Электромагнитные волны и электронные системы*, **1**, 59 (2012).
8. База данных NIST; <http://webbook.nist.gov>.
9. Hunter E.P., Lias S.G. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **27** (3), 413 (1998).
10. Alimpiev S.S., Grechnikov A.A., Sunner J., Karavanskii V.A., Zhabin S.N., Simanovsky Ya.O., Nikiforov S.M. *J. Chem. Phys.*, **128**, 014711 (2008).
11. Harrison A.G. *Chemical Ionization Mass Spectrometry* (Boca Raton: CRC Press, 1992).
12. Knochenmuss R., Zenobi R. *Chem. Rev.*, **103**, 441 (2003).
13. Гречников А.А., Могилевский А.Н., Алимпиев С.С., Никифоров С.М. Патент РФ № 2280501 (2005).
14. Griesser U.J., Szelagiewicz M., Hofmeier U.Ch., Pitt C., Cianferani S. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **57**, 45 (1999).
15. Жабин С.Н., Пенто А.В., Гречников А.А., Бородков А.С., Сартаков Б.Г., Симановский Я.О., Никифоров С.М., Алимпиев С.С. *Квантовая электроника*, **41**, 9 (2011).
16. Emmett M.R., Caprioli R.M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **5**, 605 (1994).
17. Schuerenberg M., Luebbert C., Eickhoff H., Kalkum M., Lehrach H., Nordhoff E. *Anal. Chem.*, **72**, 3436 (2000).