

УДК 543.51

## ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ИОНИЗАЦИИ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИРОДНЫХ ВОД ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЕМ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ИОННО-ЦИКЛОТРОННОГО РЕЗОНАНСА С ПРЕОБРАЗОВАНИЕМ ФУРЬЕ

Э.В. Куненков, А.С. Кононихин\*, И. В. Перминова, А.В. Гармаш, И.А. Попов\*,  
Е.Н. Николаев\*

(кафедра аналитической химии, кафедра органической химии;  
e-mail: iperm@org.chem.msu.ru)

Предложен способ оптимизации условий регистрации масс-спектров ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье при ионизации электрораспылением (ЭР ИЦР ПФ). С помощью предложенного подхода изучено влияние состава раствора и потенциала электрораспыления на интенсивность пиков в масс-спектрах ЭР ИЦР ПФ гуминовых веществ природных вод. Наивысшая суммарная интенсивность выбранных пиков была достигнута при анализе раствора, содержащего 110 мг/л образца в ацетонитриле при потенциале электрораспыления 3,0 кВ. Найденные условия позволили увеличить число ионов, брутто-формулы которых удается идентифицировать по масс-спектру ЭР ИЦР ПФ, включая двухзарядные ионы.

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия с преобразованием Фурье, электрораспыление, ионно-циклотронный резонанс, гуминовые вещества, природные воды.

### Введение

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой природные высокомолекулярные соединения нерегулярного строения и переменного состава, образующиеся в процессе постмортальных превращений из органических остатков растительного и животного происхождения [1]. Интерес к исследованию ГВ обусловлен их детоксицирующими свойствами по отношению к антропогенным загрязняющим веществам, а также способностью к накоплению микроэлементов в доступной для растений форме [2]. ГВ как продукты стохастического синтеза имеют нестехиометрический элементный состав, нерегулярную структуру, высокую гетерогенность и высокую полидисперсность молекулярных масс. Вследствие этого они по сложности строения занимают одну из самых высоких ступеней в иерархии природных органических соединений, превосходя нефти, лигнины, танины, хитозаны и т.д. [1].

Существенный прогресс в области понимания молекулярного строения ГВ достигнут в последнее время благодаря применению метода масс-спектромет-

рии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ МС) [3]. Высокая разрешающая способность, достигающая более ста тысяч в диапазоне масс <1000 Да, и малые погрешности измерения масс <0,5 м.д. позволяют определять брутто-формулы органических веществ по значению массы единичного пика [4] даже в сложных смесях с большим числом различных по химическому составу веществ при идентичной номинальной массе [5–8]. Это определяет перспективность применения ИЦР ПФ МС для анализа ГВ на молекулярном уровне, особенно в сочетании с “мягким” методом ионизации электрораспылением (ЭР) [7–10]. Ионизация ЭР обладает тем достоинством, что в условиях невысоких напряжений, прилагаемых к капилляру (до 40 В), фрагментации ГВ не наблюдается [11]. Однако высокая гетерогенность ГВ (в масс-спектре ЭР ИЦР ПФ образца фульвокислот идентифицировано около пяти тысяч веществ с разными брутто-формулами [8]) приводит к тому, что вклад ионов каждого вещества в формирующийся на детекторе сигнал очень мал, вследствие чего отно-

\*Институт биохимической физики Российской академии наук, Москва.

шение сигнал/шум для большинства пиков невелико. Это затрудняет определение ионов с большими массами и модулем заряда больше единицы на фоне более интенсивных пиков однозарядных ионов с меньшими массами и не позволяет делать выводы о молекулярно-массовом распределении ГВ по данным ЭР ИЦР ПФ МС. Для улучшения отношения сигнал/шум при получении масс-спектров ГВ проводят накопление сигнала в течение длительного времени (до 22000 сканирований [9]). Повышение эффективности ионизации также может способствовать повышению отношения сигнал/шум и вероятности детектирования ионов, доля которых в растворах ГВ невелика. Наиболее существенное влияние на эффективность ионизации ЭР оказывают выбор растворителя, концентрация анализируемого вещества, потенциал ЭР и потенциал на выходе капилляра. Перечисленные условия существенно различаются в работах разных авторов [7, 9, 12], исследовавших ГВ природных вод методом ЭР ИЦР ПФ МС, однако ни в одной из работ не приводится описания процедуры оптимизации условий анализа. Цель настоящей работы состояла в оптимизации условий регистрации масс-спектров ГВ для достижения высокой эффективности ионизации, улучшения отношения сигнал/шум и сокращения времени проведения анализа.

### Экспериментальная часть

В качестве объекта анализа использовали стандартный образец (1R101N) растворенного органического вещества Международного гуминового общества (IHSS), выделенный из речных вод (*Suwannee River*). Образец содержит нефракционированную смесь гуминовых и фульвокислот. Для подготовки пробы к анализу навеску образца (1 мг) растворяли в 1 мл дистиллированной воды (*“Milli-Q”*). Полученный раствор сразу же разбавляли до концентрации 20–200 мкг/мл, используя в качестве разбавителя водно-метанольную смесь (1:3 по объему), а также метанол или ацетонитрил.

Для регистрации масс-спектров ЭР ИЦР ПФ использовали гибридный масс-спектрометр *“LTQ FT”* (*“Thermo Electron Corp.”*, Германия), оборудованный сверхпроводящим магнитом с напряженностью магнитного поля 7 Тесла и электрораспылителем *“Ion Max”* (*“Thermo Electron Corp.”*, Германия)\*. Анализируемый раствор распыляли со скоростью 1 мкл/мин

в отсутствие осушающего газа в режиме отрицательных ионов. Детектирование проводили в режиме широкополосного сканирования в диапазоне значений  $m/z$  от 300 до 800 Да с разрешающей силой  $R = 400000$  при величине  $m/z = 400$ . Запись спектра производили путем усреднения результатов 50-ти сканирований. Внешнее накопление ионов осуществляли в режиме автоматической регулировки уровня сигнала (APU). APU настраивали на накопление в линейной квадрупольной ионной ловушке  $10^6$  зарядов, которые затем переносились в ячейку ИЦР. Выбор оптимального потенциала ЭР осуществляли вручную для каждого состава раствора. Оптимизацию потенциала на выходе капилляра и параметров ионной оптики осуществляли автоматически средствами программы *“Tune Plus”* (*“Thermo Electron Corp.”*, Германия) по интенсивности пика при  $m/z = 399,1$ . Масс-спектрометр калибровали с использованием стандартной калибровочной смеси LTQ FT. Для обработки масс-спектров ИЦР использовали программное обеспечение *“Xcalibur 1.4”* (*“Thermo Electron Corp.”*, Германия). Дальнейшую обработку спектров для присвоения пикам молекулярных формул осуществляли с помощью оригинального программного обеспечения *“FIRAN”* [13]. Внутреннюю калибровку проводили средствами программы *“Recalibrate Offline”* из пакета *“FT Tools”* (*“Thermo Electron Corp.”*, Германия).

### Результаты и их обсуждение

Типичные масс-спектры ГВ содержат тысячи пиков [8, 12–15], наиболее интенсивные из которых соответствуют однозарядным ионам и находятся в диапазоне масс 300–800 Да [8, 12]. Полученные в настоящей работе спектры содержали до 9618 пиков в этом диапазоне (рис. 1). Следует особо отметить высокую плотность пиков: при каждой номинальной массе наблюдается несколько пиков [8, 9, 12], соответствующих ионам с различным элементным составом (рис. 2).

Значения абсолютной и относительной интенсивности пиков зависят от множества факторов. В настоящей работе исследовали влияние используемого растворителя, потенциала ЭР и концентрации определяемого вещества. В качестве критерия оптимизации предложено использовать суммарную интенсивность

\*Регистрацию спектров проводили в Институте биохимической физики РАН.

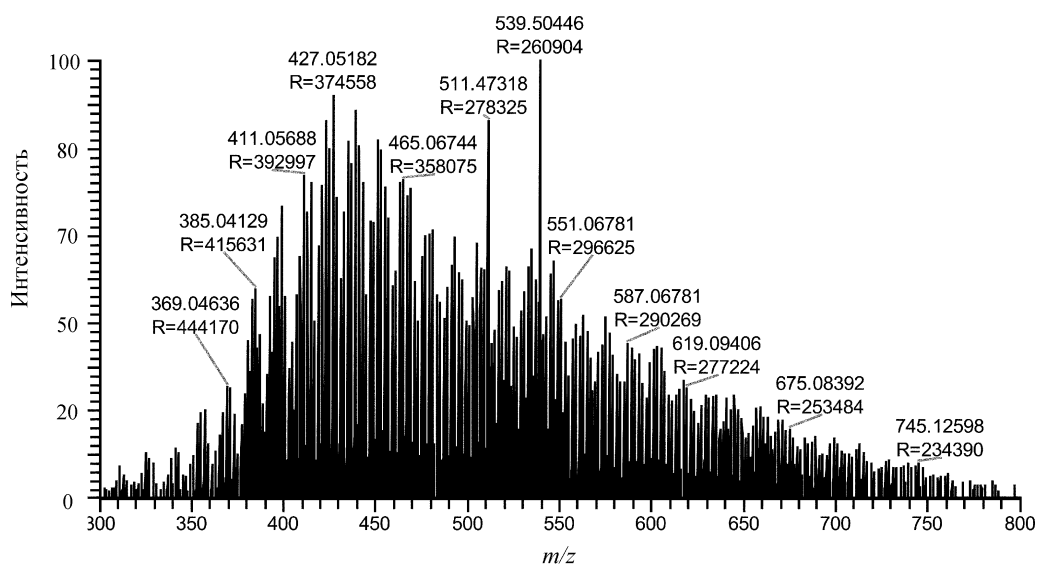


Рис. 1. Масс-спектр образца ГВ природных вод 1R101N. Растворитель – ацетонитрил, концентрация 120 мг/л, потенциал ЭР 3,2 кВ

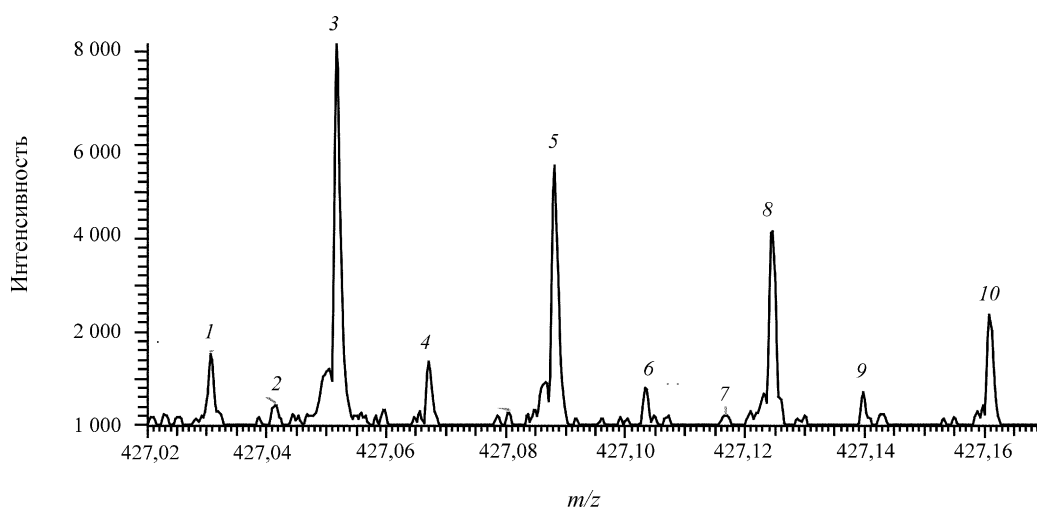


Рис. 2. Фрагмент масс-спектра образца ГВ природных вод 1R101N в диапазоне масс 427,02000–427,17000 а.е.м. Растворитель – ацетонитрил, концентрация 120 мг/л, потенциал ЭР 3,2 кВ

шести высокоинтенсивных пиков при трех разных значениях номинальной массы. Критерии выбора таких пиков были следующими: 1) пик должен обладать высокой относительной интенсивностью, чтобы его можно было зарегистрировать даже в неоптимальных условиях ионизации; 2) выбор трех разных значений номинальной массы обеспечивает большую представительность в пределах исследуемого диапазона масс; 3) выбор пары наиболее интенсивных пиков при каждой номинальной массе обеспечивает уменьшение

вклада случайной погрешности в получаемые результаты. Выбранные с использованием приведенных выше критериев пики представлены в таблице.

#### *Влияние потенциала ЭР и растворителя*

При увеличении потенциала ЭР в диапазоне 2,0–3,2 кВ наблюдалось существенное возрастание интенсивности сигнала. Однако повышение потенциала сверх определенной критической величины сопровождалось спадом сигнала (рис. 3) и появлением ко-

**Шесть интенсивных пиков в масс-спектрах образца ГВ природных вод 1R101N, использовавшихся для оценки влияния условий эксперимента на получаемый масс-спектр**

Масса	Формула	Интенсивность относительно максимального пика в спектре, % (рис. 1)
399,05690	$C_{16}H_{15}O_{12}^-$	66,11
399,09329	$C_{17}H_{19}O_{11}^-$	37,29
427,05181	$C_{17}H_{15}O_{13}^-$	91,46
427,08820	$C_{18}H_{19}O_{12}^-$	61,84
451,05181	$C_{19}H_{15}O_{13}^-$	83,04
451,08820	$C_{20}H_{19}O_{12}^-$	55,02

ронного разряда. Появление разряда фиксировали как визуально (с помощью камеры, передающей увеличенное изображение наконечника распылителя на монитор), так и по резкому росту величины измеряемого ионного тока (от 0,12–0,25 до 0,5–2,0 мкА) в отсутствие разряда. Наблюдаемые критические значения потенциала электрораспыления зависели от растворителя и возрастали в ряду: водно-метанольная смесь < метанол < ацетонитрил. В том же порядке возрастала и суммарная интенсивность выбранных пиков при одинаковом значении потенциала ЭР. При этом максимальная интенсивность наблюдалась для растворов образца в ацетонитриле. Таким образом, ацетонитрил проявил себя как оптимальный растворитель для получения масс-спектров

ЭР ИЦР ПФ гуминовых веществ природных вод. В свою очередь метанол оказался предпочтительнее водно-метанольной смеси, использовавшейся другими авторами [7, 9, 12].

**Влияние концентрации образца**

Диапазон концентрации анализируемого образца в работах разных авторов очень широк: от 16 [12] до 1250 [9] мг/л. В настоящей работе влияние концентрации анализируемого образца в ацетонитрильном растворе изучали при потенциале электрораспыления 3 кВ в диапазоне концентраций 20–200 мг/л. Если концентрация образца в растворе превышает 200 мг/л, происходит нарушение стабильности электрораспыления. Это зафиксировано с помощью камеры, передающей увеличенное изображение наконечника распылителя на монитор. Установлено, что суммарная интенсивность выбранных пиков равномерно возрастает более чем в четыре раза при повышении концентрации образца от 20 до 110 мг/л. Дальнейший рост концентрации приводит к незначительному равномерному снижению суммарной интенсивности выбранных пиков. Так, при концентрации образца 200 мг/л суммарная интенсивность выбранных пиков составляла около 80% от максимальной суммарной интенсивности, наблюдавшейся при 110 мг/л.

**Анализ образца ГВ природных вод в оптимизированных условиях**

В оптимизированных условиях был зарегистрирован масс-спектр ЭР ИЦР ПФ образца ГВ природных вод 1R101N с усреднением результатов 1000 сканирований для улучшения отношения сигнал/шум. Этот спектр подвергали дальнейшей обработке для

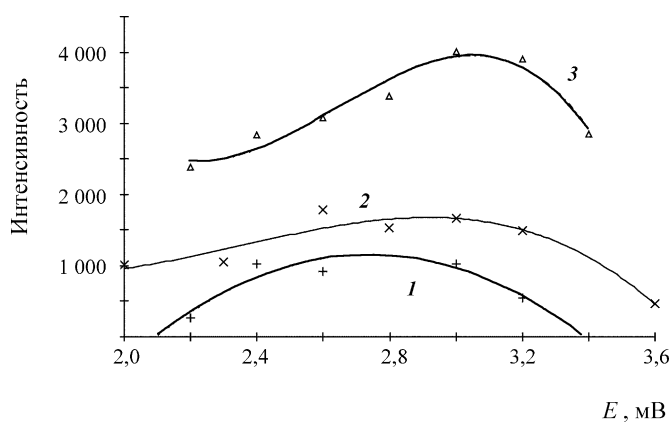


Рис. 3. Зависимость суммарной интенсивности реперных пиков образца ГВ природных вод (1R101N) от растворителя и потенциала электрораспыления. Концентрация образца 50 мг/л. 1 – водно-метанольная смесь (1:3); 2 – метанол; 3 – ацетонитрил

определения молекулярных формул содержащихся в составе образца веществ. Полученные данные сопоставляли с результатами обработки спектра, полученного нами в контрольных условиях, аналогичных приведенным в работе [12] (водно-метанольная смесь 30:70, концентрация 20 мг/л, потенциал ЭР 2,2 кВ, остальные условия были идентичны использованным в настоящей работе). Число определенных

нами формул возросло с 1731 в контрольных условиях до 2703 в оптимизированных условиях. Это связано с регистрацией ионов, в том числе двухзарядных, интенсивность пиков которых обычно мала (в оптимизированных условиях было обнаружено и идентифицировано 300 пиков с зарядовым состоянием  $-2$ , тогда как при условиях, использованных в работе [12] – только 12 пиков).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ CRDF № 09-03-92500-ИК.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М., 1990.
2. Chaney K., Swift R.S. // J. Soil Sci. 1984. **35**. P. 223.
3. Marshall A.G., Hendrickson C.L., Jackson G.S. // Mass Spectrometry Reviews. 1998. **17**. P. 1.
4. Meija J. // Anal. and Bioanal. Chem. 2006. **385**. P. 486.
5. Hughey C.A., Rodgers R. P., Marshall A. G., Qian K., Robbins W. K. // Org. Geochem. 2002. **33**. P. 743.
6. Rodgers R., Marshall A. Asphaltenes, Heavy Oils and Petroleomics. N.Y., 2007. P. 63.
7. Stenson A.C., Landing W. M., Marshall A.G., Cooper W.T. // Anal. Chem. 2002. **74**. P. 4397.
8. Stenson A.C., Marshall A. G., Cooper W.T. // Anal. Chem. 2003. **75**. P. 1275.
9. Kujawinski E.B., Hatcher P.G., Freitas M. A. // Anal. Chem. 2002. **74**. P. 413.
10. Kujawinski E.B., Behn M.D. // Anal. Chem. 2006. **78**. P. 4363.
11. These A., Reemtsma T. // Anal. Chem. 2003. **75**. P. 6275.
12. Kim S., Kramer R.W., Hatcher P.G. // Anal. Chem. 2003. **75**. P. 5336.
13. Kunenkov E.V., Kononikhin A.S., Perminova I.V., Hertkorn N., Gaspar A., Schmitt-Kopplin Ph., Popov I.A., Garmash A.V., Nikolaev E.N. // Anal. Chem. 2009. **81(24)**. P. 10106.
14. Brown T.L., Rice J.A. // Anal. Chem. 2000. **72**. P. 384.
15. Fievre A., Solouki T., Marshall A.G., Cooper W.T. // Energy Fuels. 1997. **11**. P. 554.

Поступила в редакцию 02.10.08.

### OPTIMIZATION OF IONIZATION CONDITIONS FOR ANALYSIS OF HUMIC SUBSTANCES FROM NATURAL WATERS USING ELECTROSPRAY IONIZATION FOURIER TRANSFORM ION CYCLOTRON RESONANCE MASS SPECTROMETRY (ESI FTICR MS)

E.V. Kunenkov, A.S. Kononikhin, I.V. Perminova, A.V. Garmash, I.A. Popov, E.N. Nikolaev

(Division of Analytical Chemistry, Division of Organic Chemistry)

An approach to optimizing conditions of acquiring Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance mass spectra (ESI FTICR MS) was suggested. This method was employed to study the influence of cone voltage and the composition of the solution on peak intensity in ESI FTICR mass spectra of natural water humic substances. A presence of water in methanol solution was shown to reduce signal intensity significantly. The highest integral intensity of peaks selected was reached on 110 mg/l sample solution in acetonitrile and cone voltage 3.0 kV. The number of peaks to which molecular formulas were assigned, including doubly-charged peaks, was increased using these conditions.

**Key words:** *fourier transform mass spectrometry, electrospray ionization, ion cyclotron resonance, humic substances, natural waters.*

**Сведения об авторах:** Куненков Эраст Владимирович – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (erast@mail.sponge.org); Кононихин Алексей Сергеевич – ст. науч. сотр. лаборатории ионной и молекулярной физики Института энергетических проблем химической физики РАН, канд. физ.-матем. наук (konoleha@yandex.ru); Перминова Ирина Васильевна – вед. науч. сотр. кафедры органической химии химического факультета МГУ, профессор, докт. хим. наук (irperm@org.chem.msu.ru); Гармаш Андрей Викторович – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (garmash@analyt.chem.msu.ru); Попов Игорь Алексеевич – науч. сотр. лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул Института биохимической физики им. Эмануэля РАН, канд. физ.-матем. наук (icrms@yandex.ru); Николаев Евгений Николаевич – профессор, заведующий лабораторией масс-спектрометрии биомакромолекул Института биохимической физики им. Эмануэля РАН, заведующий лабораторией ионной и молекулярной физики Института энергетических проблем химической физики РАН, докт. физ.-матем. наук (ennikolaev@rambler.ru).