

Методы
аналитической
химии

Р. А. Хмельницкий
Е. С. Бродский

**Хромато-
масс-
спектрометрия**



Москва издательство «Химия» 1984

Хмельницкий Р. А., Бродский Е. С.

Хромато-масс-спектрометрия (Методы аналитической химии). — М.: Химия, 1984. — 216 с., ил.

Книга посвящена хромато-масс-спектрометрии — одному из наиболее мощных и информативных методов анализа сложных смесей органических соединений различного происхождения.

Рассмотрены физические основы метода и аппаратура, различные способы получения масс-спектров и варианты соединения газового или жидкостного хроматографов с масс-спектрометром. Особое внимание уделено использованию ЭВМ для контроля эксперимента и обработки получаемых данных. Описаны аналитические методы исследования многокомпонентных смесей и определения микропримесей. Приведены многочисленные примеры использования хромато-масс-спектрометрии для исследования различных органических веществ: продуктов нефтепереработки, пищевых продуктов, лекарственных препаратов и их метаболитов и др.

Предназначена для инженерно-технических и научных работников, занимающихся нефтехимией, нефтепереработкой, биохимией, геохимией, клинической химией, а также вопросами охраны окружающей среды. 216 с., 37 рис., 9 табл., список литературы 404 ссылки.

Редакционная коллегия: *Н. Э. Гельман, И. Ф. Долманова, Ю. А. Золотов (председатель), Ю. А. Карпов, Ю. А. Клячко, Н. М. Кузьмин, Л. Н. Овсянникова (ученый секретарь), Н. А. Филиппова.*

Рецензенты: докт. хим. наук **В. Н. БОЧКАРЕВ,**

докт. хим. наук **П. Б. ТЕРЕНТЬЕВ**

X $\frac{1804000000-022}{050(01)-84}$ 22.84.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	4
Глава 1. Аппаратура	6
1.1. Хроматограф	6
1.2. Масс-спектрометр	10
1.3. Соединение газового хроматографа с масс-спектрометром	20
1.4. Соединение жидкостного хроматографа с масс-спектрометром	33
1.5. Соединение с ЭВМ	46
Глава 2. Методы	53
2.1. Ионная масс-хроматография	53
2.2. Хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения	58
2.3. Анализ неразрешенных хроматографических пиков	65
2.4. Получение производных	75
2.5. Качественный анализ и идентификация соединений в смесях	88
2.6. Количественный анализ	99
2.7. Использование ЭВМ для обработки данных	108
2.8. Влияние приборных факторов	123
Глава 3. Применения	128
3.1. Пищевые продукты	128
3.2. Загрязнения окружающей среды	140
3.3. Органическая геохимия и нефтехимия	158
3.4. Лекарственные препараты и их метаболиты	173
3.5. Клиническая химия	186
Литература	201

ПРЕДИСЛОВИЕ

Современный уровень исследования сложных смесей органических соединений требует применения комплексных физических и физико-химических методов. В последние пятнадцать лет особенно большое распространение получила хромато-масс-спектрометрия, сочетающая такой великолепный способ разделения смесей, как хроматография, с одним из наиболее информативных методов определения структуры органических соединений — масс-спектрометрией.

На первом этапе хромато-масс-спектрометрия представляла собой практически механическое соединение двух разных методов: либо хроматограф служил для предварительного «упрощения» и разделения смесей на компоненты, анализировавшиеся затем масс-спектрометром, либо масс-спектрометр использовался просто в качестве селективного хроматографического детектора специфических структурных или функциональных групп. В дальнейшем были созданы приборы и разработаны приемы анализа данных специально для этих методов в комплексе, что обеспечило большую эффективность анализа хроматограмм, регистрировавшихся масс-спектрометром, улучшение разрешения хроматографических пиков на основе масс-спектральной информации и более результативный анализ масс-спектров с учетом хроматографических данных. С помощью метода ионной масс-хроматографии была реализована предельно возможная чувствительность определения следовых компонентов.

В настоящее время хромато-масс-спектрометрия стала обычным методом органического анализа, и почти каждый масс-спектрометр для химического анализа снабжается соответствующими приставками для работы в качестве хромато-масс-спектрометра. В свою очередь развитие электронно-вычислительной техники позволило включить в этот комплекс третий необходимый элемент — ЭВМ. Система обработки данных играет особую роль в хромато-масс-спектрометрии. Ее главной является согласованное управление двумя приборами, прием, накопление и обработка огромного количества информации, поступающей в процессе каждого опыта, как масс-спектрометрической, так и хроматографической, представление получаемых данных в удобном для аналитика виде, количественный и качественный анализ смеси. Использование хромато-масс-спектрометрических систем вызвало к жизни новые методы анализа данных и качественно новый подход к их интерпретации. По существу хромато-масс-спектрометрия стала в настоящее время самостоятельным методом анализа с многочисленными специфическими особенностями приборного и методического плана.

Гибкость хромато-масс-спектрометрического метода обеспечивается возможностью сочетания разных модификаций как хроматографической, так и масс-спектральной части. В хромато-масс-спектрометрии находят применение последние достиже-

ния приборной техники. Современные хромато-масс-спектрометрические системы включают весь богатый арсенал средств газовой и жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии: газохроматографические капиллярные колонки высокого разрешения; жидкостную хроматографию с обращенными фазами, реагентами в виде ионных пар, с буферными растворами; масс-спектрометрию высокого разрешения, методы мягкой ионизации для анализа термически нестабильных и недетучих веществ, масс-спектрометрию положительных и отрицательных ионов; масс-спектрометрию метастабильных ионов. Существенным элементом современной аппаратуры для хромато-масс-спектрометрии является интерфейс — специфический узел, обеспечивающий соединение и совместную работу различных хроматографических и масс-спектрометрических приборов. Этот метод дает исследователю неоценимые возможности при анализе сложных многокомпонентных смесей, определении примесей, проведении скрининговых анализов.

Соединение газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ—МС) уже 20 лет используется в органическом анализе, сейчас это один из самых распространенных аналитических методов. В последнее время все большее применение получает метод, объединяющий жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию (ЖХ—МС), который пока еще находится в периоде становления. Сочетание масс-спектрометрии с другими хроматографическими методами не получило развития, хотя имеются отдельные примеры соединения масс-спектрометрии с тонко-слойной хроматографией и другими хроматографическими методами разделения.

Хромато-масс-спектрометрия (ХМС) в настоящее время внедрилась почти во все области исследования органических веществ синтетического и природного происхождения. Ежегодно публикуется свыше тысячи работ, посвященных этому методу и его использованию. Естественно, авторы не претендуют на полноту охвата всех приложений хромато-масс-спектрометрии, они ставили перед собой задачу познакомить читателя с основами приборной техники и методов хромато-масс-спектрометрии и на примерах из разных областей продемонстрировать аналитические возможности этого метода.

Сведения об аппаратуре и методах хромато-масс-спектрометрии, о применении этого метода содержатся в монографиях [1—10], а также в периодических изданиях и трудах конференций: *Advances in Mass Spectrometry*, V. 1—8; *Gas Chromatography—Mass Spectrometry*, Abstracts/Ed. by C. F. W.; *Brooks*, P. R. M. Science and Technology Agency, London; *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*; *Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography—Mass Spectrometry*, V. 1—7. Marcel-Dekker, New York; *Advances in Organic Geochemistry*; *Mass Spectrometry*, Specialist Periodical Reports. The Chemical Society, London.

АППАРАТУРА

Любой хромато-масс-спектрометр — от самых ранних моделей до современных приборов — включает три основных части: хроматограф (обычно газовый или жидкостный), масс-спектрометр и разделительное устройство — интерфейс.

Хроматограф в этой системе можно рассматривать как одно из устройств ввода образцов в масс-спектрометр, которое позволяет предварительно упростить анализируемую смесь, чтобы обеспечить более благоприятные условия для масс-спектрометрического анализа. С другой стороны, масс-спектрометр можно рассматривать как один из многочисленных видов хроматографических детекторов, обладающий необычайно высокой чувствительностью и селективностью и позволяющий более эффективно, чем другие детекторы, выделять определяемые вещества из сложной смеси и детектировать их на фоне других компонентов.

Как всегда при соединении совершенно несхожих между собой, имеющих разную физическую природу аналитических методов возникают новые, совершенно неожиданные следствия, приводящие к синергизму аналитических возможностей этих методов. Поэтому часто говорят не о простом соединении хроматографа и масс-спектрометра, а об интегрированной системе, представляющей собой одно целое. К этой интегрированной системе следует добавить и ЭВМ, без которой невозможно полностью объединить два разных аналитических метода в один новый и реализовать его потенциальные возможности.

Следует отметить, что новые аналитические возможности связаны большей частью с масс-спектрометрией, что неудивительно, так как львиная доля получаемой информации имеет масс-спектральное представление.

Прежде чем говорить об особенностях интегрированной системы хроматограф—масс-спектрометр — ЭВМ, рассмотрим отдельно характеристики каждой ее части, которые могут оказывать влияние на работу всей системы в целом.

1.1. ХРОМАТОГРАФ

Хроматограф в ХМС системе служит для разделения исследуемой смеси на отдельные компоненты, которые затем анализируют масс-спектрометром. Разделение в хроматографии основано на многократном перераспределении молекул между двумя фазами: подвижной и неподвижной.

Подвижная фаза может представлять собой газ (газовая хроматография) или жидкость (жидкостная хроматография). Промежуточным случаем является газовая фаза, представляющая собой пары, т. е. газ, способный конденсироваться.

В зависимости от природы неподвижной фазы газо-хроматографические методы делятся на газо-жидкостную хроматографию (жидкая неподвижная фаза) и газо-адсорбционную (твердая неподвижная фаза). Методы жидкостной хроматографии включают колоночную (жидкостно-жидкостная, жидкостно-адсорбционная, хроматография на связанной фазе, ионообменная, эксклюзионная — гель-проникающая и гель-фильтрация) и плоскостную (бумажная и тонкослойная).

Газовая хроматография (ГХ) — наиболее распространенный хроматографический метод благодаря чувствительности, экспрессности, универсальности, возможности качественного и количественного анализа. При сравнительно простоте этот метод позволяет разделять смеси соединений разных классов, разного физического состояния, разной молекулярной массы. Можно анализировать соединения с молекулярными массами от 2 до 1500 при температурах от -70 до 500°C . Наиболее существенные ограничения этого метода обычно связаны с недостаточной летучестью и недостаточной стабильностью анализи-

руемых веществ по отношению к температуре, неподвижной фазе и материалам системы ввода, колонки и коммуникаций.

Газохроматографическая система обычно включает колонку с неподвижной фазой, источник газа-носителя, узел ввода образца, термостат колонки, детектор, устройства регулирования температуры и потока газа. Разделение смеси в ГХ происходит в хроматографической колонке, содержащей неподвижную фазу, нанесенную на стенки колонки или на поверхность специального наполнителя. Материалом колонки может быть стекло, металл (чаще всего медь или нержавеющей сталь), полимер. Существует три типа колонок: набивные, микронабивные и капиллярные. Набивные колонки имеют внутренний диаметр 1—6 мм, длину 1—5 м, у микронабивных диаметр 0,5—1 мм. Капиллярные колонки представляют собой стеклянные или металлические трубки длиной от 25 до 100 м и внутренним диаметром 0,1—1 мм. Колонки этого типа трудны в приготовлении (нанесение неподвижной фазы), в них может быть введено очень малое количество образца, они более чувствительны к качеству нанесения неподвижной фазы (равномерное покрытие по всей длине колонки, однородность слоя и т. п.), но они обеспечивают высокую эффективность разделения.

Капиллярные колонки используются во многих хромато-масс-спектрометрических системах. Дезактивация стеклянных капилляров путем силилирования [11] или покрытия слоем BaCO_3 [12] позволяет получать колонки с неполярной фазой с рабочей температурой до 350°C . Капиллярные колонки из плавленого кварца обеспечивают высокую воспроизводимость, имеют инертную поверхность, в то же время они достаточно гибки, что дает им преимущество перед хрупкими стеклянными колонками [13].

Широкое применение нашли два типа капиллярных колонок: 1) классические колонки, в которых жидкая фаза покрывает внутренние стенки колонки в виде тонкой пленки (wall coated open tubular columns, WCOT); 2) капиллярные колонки, в которых разными способами обеспечивается увеличение внутренней поверхности без уменьшения газового объема (химическая обработка внутренней поверхности капилляра для создания пористости, нанесение слоя пористого носителя и т. п.); эти колонки обозначаются общим термином — porous layer open tubular columns (PLOT). Наилучшими являются колонки, внутренняя поверхность которых покрыта частицами пористого носителя размером порядка нескольких мкм с нанесенной на него жидкой фазой (support coated open tubular columns, SCOT). Обычно колонки типа WCOT имеют внутренний диаметр 0,25; 0,50 и 0,75 мм и длину 46 и 92 м. Колонки SCOT изготавливают диаметром 0,50 мм и длиной около 15 м, более длинные колонки собирают из секций по 15 м.

При непрерывном потоке газа-носителя через колонку введенный образец постепенно разделяется на компоненты, передвигающиеся вдоль колонки с разной скоростью. Время прохождения данного вещества через колонку с определенной неподвижной фазой при данных условиях (температура, скорость газа-носителя и т. п.) является характеристикой вещества и может использоваться для его идентификации. Идентификация компонентов смеси производится обычно по временам удерживания или объемам удерживания, характеризующим время или соответствующий объем газа, прошедшего через колонку от момента ввода пробы до максимума хроматографического пика. Для сопоставления данных, полученных на разных колонках в разных условиях, часто используются индексы Ковача:

$$I = 100 \frac{\lg V_x - \lg V_{C_n}}{\lg V_{C_{n+1}} - \lg V_{C_n}} + 100n$$

где V — объем удерживания, C_n — обозначение n -алканов с n атомами углерода.

В качестве газа-носителя в принципе можно использовать любой газ, но на практике к газу-носителю часто предъявляют специальные требования: инертность, совместимость с используемым масс-спектрометром (скорость

откачки, метод ионизации) и сепаратором и т. п. В хромато-масс-спектрометрии значительно большую роль, чем в случае других хроматографических детекторов, играет чистота газа-носителя и не только наличие примесей, но и их химическая природа.

Использование в качестве хроматографического детектора масс-спектрометра ограничивает круг возможных неподвижных фаз по сравнению с другими видами детекторов. В этом случае неподвижные фазы должны обладать пониженной упругостью паров, более высокой термической стабильностью, пониженным содержанием летучих примесей.

Ниже перечислены наиболее употребительные в ГХ — МС жидкие неподвижные фазы и предельные температуры их использования. Масс-спектры некоторых из них показаны на рис. 1-1.

Класс	Марка	$T_{\text{макс}}^{\circ}\text{C}$	Класс	Марка	$T_{\text{макс}}^{\circ}\text{C}$	
Метилсиликоны	OV-1	350	Фторсиликоны	OV-210	275	
	OV-101	350		OF-1	250	
	SE-30	350		SP-2250	300	
	DC-11	300		XE-30	275	
Фенилметилсиликоны	OV-17	300	Цианосиликоны	OV-225	275	
	SP-2250	300		SP-2300	250	
	OV-25	300		Смешанные	Карбовакс 20М	250
					Дексил-300	500
			Апнезон L	300		

При сочетании газовой хроматографии и масс-спектрометрии используются также неподвижные фазы CN-101, SP-2100, SP-2850, Силар 5СР, Силар 10С и SP-2340 [15].

Узел ввода образца в хроматографическую колонку должен быть сконструирован таким образом, чтобы исключить выделение летучих соединений из резиновой мембраны, герметизирующей систему.

Количество вводимого в хроматографическую колонку образца зависит от ее типа: для капиллярной, покрытой пленкой неподвижной жидкой фазы — 0,001—0,5 мкл; для микронабивной диаметром 0,3 см с 2—5% неподвижной фазы — 0,01—5 мкл; для набивной диаметром более 0,6 см с 5—20% неподвижной фазы — 0,1—50 мкл. Для капиллярных колонок количество образца составляет менее 1 мкг для каждого компонента, для набивных соответственно 1—10 мкг. В капиллярных колонках, как правило, используется делитель, позволяющий отобрать в колонку заданную часть введенной пробы (обычно $1:10^2$ — $1:10^4$).

В классической жидкостной хроматографии (ЖХ) при давлении на колонку ниже атмосферного используют короткие колонки большого диаметра (до 125 мм), заполненные частицами размером 100—150 мкм, число теоретических тарелок равно примерно 50, продолжительность разделения несколько часов.

В высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), называемой также ЖХ высокого давления, или высокоскоростной ЖХ, или ЖХ высокого разрешения, используют колонки сравнительно небольших размеров: длина 10—30 см, внутренний диаметр 2—4 мм, размер частиц адсорбента 2—10 мкм. Для создания достаточного потока жидкости через такие плотно упакованные колонки необходимо высокое давление — $(1-40) \cdot 10^6$ Па. Типичные скорости потока в ВЭЖХ 0,5—2 мл/мин, линейная скорость 0,1—5 см/мин. ВЭЖХ обеспечивает высокую разрешительную способность — более 10 000 теоретических тарелок, сравнительно короткое время анализа, измеряемое минутами, и высокую разрешающую способность.

В ВЭЖХ используют два типа неподвижных фаз: 1) пористые материалы (например, SiO_2 , Al_2O_3) с площадью поверхности 50—500 м²/г, объемом пор

0,2—2 см³/г и размером частиц до 50 мкм; 2) пористые активные слои из SiO_2 , Al_2O_3 , ионообменных смол полиамидов и других материалов толщиной 1—3 мкм. Эффективность разделения выше в случае неподвижных фаз с активными слоями.

В последнее время в ВЭЖХ получают все большее распространение микроколонок, или капиллярные колонки, которые могут обеспечить очень высо-

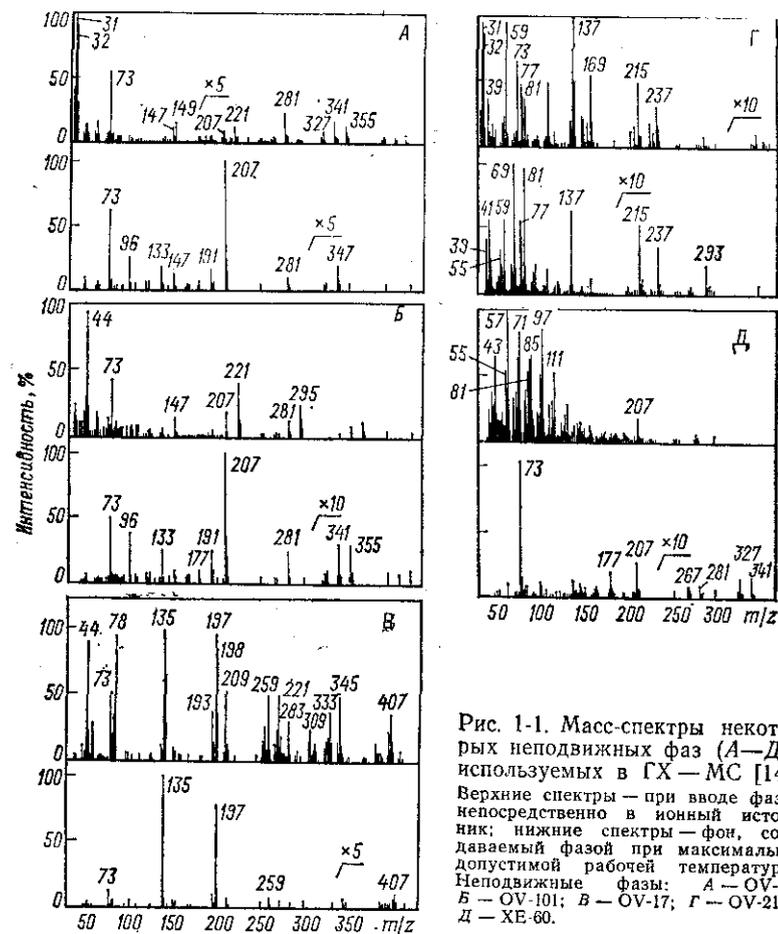


Рис. 1-1. Масс-спектры некоторых неподвижных фаз (А—Д), используемых в ГХ — МС [14]. Верхние спектры — при вводе фазы непосредственно в ионный источник; нижние спектры — фон, создаваемый фазой при максимально допустимой рабочей температуре. Неподвижные фазы: А — OV-1; Б — OV-101; В — OV-17; Г — OV-210; Д — XE-60.

кую эффективность при разделении сложных смесей и значительно сокращают расход подвижной фазы. Существуют три типа таких колонок: микрокапиллярные (внутренний диаметр не более 50 мкм, поток газа-носителя менее 1 мкл/мин); набивные микроколонок (диаметр 70 мкм, поток более 1 мкл/мин) с частицами адсорбента, равномерно распределенными по всему объему колонки, и микроколонок, похожие на обычные колонки для ВЭЖХ, но меньшего диаметра (менее 1 мм), заполненные частицами адсорбента размером 5—20 мкм. Поток газа-носителя через такие набивные микроколонок составляет 40—50 мкл/мин. Разрешающая способность микроколонок достигает нескольких сот тысяч теоретических тарелок, при этом скорости анализа выше, чем на обычных ВЭЖХ колонках [16].

В ВЭЖХ могут применяться как полярные, так и неполярные подвижные фазы. Полярные подвижные фазы (чаще всего смесь метилового спирта или ацетонитрила с водой) обычно используют в сочетании с неполярными или слабополярными неподвижными фазами (обращенная ЖХ, или ЖХ с обращенными фазами). Неподвижной фазой в этом случае обычно служит SiO_2 с привитой фазой, например, при реакции с октадецилсиланами. В качестве покрытия адсорбента используются и некоторые неподвижные фазы, обычно применяемые в ГЖХ, например, полиэтиленгликоли, карбовакс. В ВЭЖХ часто используется градиентное элюирование, когда состав элюента непрерывно меняется, например, в сторону увеличения полярности. Этим достигается уменьшение времени анализа, увеличение чувствительности, улучшение формы пиков.

1.2. МАСС-СПЕКТРОМЕТР

В масс-спектрометре четыре основных узла: система ввода образцов, ионный источник, масс-анализатор и система детектирования ионов, усиления и представления сигнала. Кроме того, имеется система создания и измерения вакуума.

Система ввода образцов. Ввод образцов в масс-спектрометр осуществляется разными способами в зависимости от вида образцов и типа анализа. Образцы для масс-спектрального анализа могут быть газообразными, жидкими и твердыми, для них в современных приборах предусмотрены соответствующие системы ввода. Масс-спектрометр может иметь несколько систем ввода, которые действуют либо по очереди, либо одновременно, например, при вводе анализируемого образца и стандарта или анализируемого вещества и газа-реагента для химической ионизации. Существенным требованием к системам ввода является возможность их быстрой очистки от остатков или продуктов превращения предшествующего образца, химическая инертность и отсутствие дискриминации по отношению к тем или иным компонентам смесей, например, вследствие селективной адсорбции или каталитического разложения.

На рис. 1-2 приведена схема вакуумной системы ионного источника с разными системами ввода образцов.

Одна из систем предназначена для непосредственного ввода твердых образцов в ионный источник и представляет собой длинный зонд, на конце которого расположен небольшой тигель для образца. Тигель в большинстве промышленных приборов может охлаждаться или нагреваться от -20 до 400°C . Зонд вводится в ионный источник через специальный вакуумный шлюз, так что тигель с образцом располагается непосредственно в области высокого вакуума вблизи зоны ионизации.

Система для ввода жидких образцов представляет собой резервуар из нержавеющей стали, стекла или металла, покрытого эмалью для уменьшения возможности химического взаимодействия анализируемого вещества со стенками резервуара нагреваемого до $250-300^\circ\text{C}$.

Для ввода газохроматографических элюатов предназначены две отдельные системы: одна (для набивных колонок) обеспечивает удаление большей части газа-носителя с помощью специального молекулярного сепаратора, другая служит для непосредственного соединения с капиллярными колонками, из которых поток целиком направляется в масс-спектрометр. К этим же вводам в ионный источник присоединяются и колонки жидкостного хроматографа через соответствующий интерфейс. Специальный натекаль служит для напуска вещества-стандарта или газа-реагента при химической ионизации.

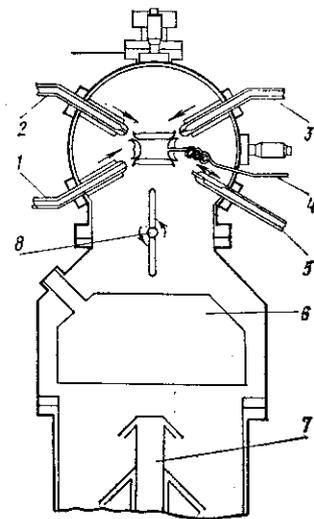
Ионный источник предназначен для генерирования ионов из молекул анализируемых веществ и формирования ионного пучка для последующего анализа ионов по массам. Существуют разные методы ионизации: бомбардировка пучком электронов, ионов или нейтральных атомов, ионно-молекулярные реакции, ионизация в сильно неоднородном электрическом поле, в электрическом разряде, ионизация лазерным пучком, термоионная эмиссия и другие. В ХМС делались попытки применения почти всех этих методов, но наибольшее рас-

пространение получили два из них: электроударная (ЭУ) ионизация и химическая ионизация (ХИ).

Еще 15—20 лет назад положительная ЭУ ионизация безраздельно преобладала в масс-спектрометрии; сейчас этот метод ионизации хотя и сильно потеснен другими, но все же остался одним из наиболее важных. Его достоинства: простота конструкции ионного источника, удобство эксплуатации, лег-

Рис. 1-2. Схема системы ввода образца и вакуумной системы ионного источника для ГХ — МС [4]:

1 — непосредственное присоединение капиллярной хроматографической колонки; 2 — присоединение набивной колонки через молекулярный сепаратор; 3 — ввод образца через резиновую пробку или обогреваемый объем; 4 — ввод газа-реагента для химической ионизации; 5 — непосредственный ввод образца в ионный источник; 6 — охлаждаемая ловушка; 7 — диффузионный вакуумный насос; 8 — изолирующий вентиль.



кость юстировки и управления, высокая эффективность ионизации, воспроизводимость масс-спектров и корреляция их со структурой молекул. Подавляющее большинство масс-спектров в каталогах, используемых для сравнения с анализируемыми масс-спектрами, получено при ЭУ ионизации.

В ионном источнике с ЭУ ионизацией молекулы анализируемого вещества в газовой фазе бомбардируются пучком электронов, испускаемых раскаленным катодом и ускоряемых до заданной энергии. Положительные ионы, образующиеся из молекул при электронном ударе, вытягиваются из зоны ионизации и формируются в пучок, который ускоряется до энергии обычно $1-10$ кэВ и направляется в масс-анализатор.

Большое распространение получили источники типа Нира [17], в которых коллимирование электронных и ионных пучков осуществляется с помощью системы щелей. Область, где непосредственно происходит ионизация, может быть заключена в специальный корпус — камеру ионизации, в которую поступает газообразный образец по подводным трубкам, а щели в корпусе служат для ввода электронного и вывода ионного пучка. Это так называемый источник закрытого типа, в отличие от источника открытого типа, в котором область ионизации не ограждена стенками. Вместо коллимирования с помощью щелей может использоваться электростатическая фокусировка электронных и ионных пучков, которая более стабильна и проста, что особенно ценно при управлении и юстировке с помощью ЭВМ.

Энергия ионизирующих электронов должна быть выше потенциала ионизации, который для большинства органических молекул равен $7-12$ эВ. Если энергия ионизации низка и превышает потенциал ионизации незначительно, масс-спектр содержит, в основном, пики молекулярных ионов. Если же энергия электронов значительно превышает потенциал ионизации молекулы, она получает при ионизации некоторую избыточную энергию (обычно $2-3$ эВ), которая может либо высвободиться путем испускания фотона, либо перейти в энергию колебательного движения. В последнем случае происходит расщепление межатомных связей и образование осколочных ионов (фрагментация). Обычно используется либо близпороговый интервал ($8-15$ эВ), либо энергии порядка $30-70$ эВ.

От энергии ионизации сильно зависит вид масс-спектра. Как правило, при понижении энергий электронов относительная интенсивность пиков молекулярных ионов увеличивается, а интенсивность пиков осколочных ионов умень-

шается. Однако интенсивность некоторых пиков осколочных перегруппировочных ионов может при этом оставаться той же или даже увеличиваться. Эффективность ионизации при высоких энергиях электронов на несколько порядков больше, чем в близпороговой области.

В ХМС обычно регистрируется хроматограмма по полному ионному току. При этом основной вклад вносит газ-носитель, особенно при вводе всего потока из колонки в масс-спектрометр. Поэтому в качестве газа-носителя чаще всего применяют гелий, который имеет высокий потенциал ионизации (около 24 эВ). Фон ионов He можно исключить из полного ионного тока, выбирая энергию ионизирующих электронов около 20 эВ — ниже потенциала ионизации гелия, но достаточно высокую, чтобы эффективность ионизации оставалась достаточно большой.

При химической ионизации ионы образуются в результате ионно-молекулярных реакций между нейтральными молекулами образца и ионной плазмой газа-реагента при давлении в ионном источнике до 130 Па и парциальном давлении образца до 1 Па. Ионы газа-реагента получают при бомбардировке электронами с энергией 100—500 эВ, обеспечивающей проход их через активный объем, при этом в результате ионизации электронным ударом и последующих столкновений ионов с молекулами газа-реагента образуются главным образом четноэлектронные ионы: CH_5^+ , C_2H_5^+ — из метана; C_4H_9^+ — из изобутана, NH_4^+ — из NH_3 . Концентрация этих ионов в активном объеме довольно велика, они реагируют с молекулами образца, обычно протонируя их (ионы MH^+), а иногда образуя ионы-аддукты, например $(\text{M} + \text{NH}_4)^+$ [18]. Химическая ионизация представляет собой гораздо более мягкий процесс, чем ЭУ ионизация. Если молекулярные ионы, образующиеся при ЭУ, могут иметь избыточную энергию 2—3 эВ, то квазимолекулярные ионы, образующиеся при ХИ, имеют избыточную энергию возбуждения порядка 0,25—0,40 эВ [18]. Четноэлектронные ионы более стабильны, чем нечетноэлектронные молекулярные ионы, образующиеся при электронном ударе, т. е. ХИ приводит к меньшему распаду молекул, сохраняя значительную часть квазимолекулярных ионов (протонированных ионов или ионов-аддуктов), характеризующих молекулярные массы.

Для ХИ используются ионные источники закрытого типа, так как в ионизационной камере должно поддерживаться сравнительно высокое давление газа-реагента. Поскольку скорость потока газа-реагента довольно велика (1—10 л/мин), необходима достаточно эффективная система откачки: либо мощный диффузионный насос производительностью 500—1000 л/с, либо турбомолекулярный насос (200 л/с).

Выбор газа-реагента позволяет влиять на вид масс-спектра, селективность и чувствительность анализа [19]. При использовании смеси аргона и воды наряду с квазимолекулярными образуются и характеристические осколочные ионы, так что масс-спектр похож на спектр ЭУ. Оксид дейтерия используется для определения активного водорода; NO и NH_3 — для определения органических функциональных групп; кислород и водород применяют в качестве газов-реагентов для отрицательной ХИ.

В последнее время в МС ХИ появился новый метод — импульсная ионизация с попеременной регистрацией положительных и отрицательных ионов, предложенная Хантом и др. [20]. В этом случае положительные и отрицательные ионы, образующиеся в ионном источнике, попеременными импульсами напряжения разного знака вытягиваются из источника, проходят через квадрупольный масс-анализатор и регистрируются вторичным электронным умножителем с двумя входными диодами (один для положительных, другой для отрицательных ионов). Получение одновременно масс-спектров положительных и отрицательных ионов значительно упрощает определение структуры молекул; кроме того, для некоторых соединений эффективность образования квазимолекулярных отрицательных ионов на 1—3 порядка выше, чем положительных.

Сравнительно новым методом ионизации, который очень перспективен для ХМС, является ионизация при атмосферном давлении (ИАД) [21, 22]. В этом случае ионно-молекулярные реакции проходят в слабоионизованной плазме инертного газа (обычно азота или аргона) при атмосферном давлении вне

вакуумной системы масс-спектрометра. Ионизация этого газа осуществляется обычно β -излучением, испускаемым ^{63}Ni , или в высоковольтном коронном разряде. Газ из источника ионов через отверстие диаметром 25—50 мкм диффундирует в квадрупольный масс-анализатор, при этом ионы должны быть предварительно выделены из общего газового потока и сфокусированы. Этот метод ионизации обеспечивает высокую чувствительность (в режиме селективного детектирования единичных пиков — до $30 \cdot 10^{-15}$ г) благодаря высокой эффективности ионизации. Основное различие между ИАД и ХИ состоит в том, что спектры ИАД отражают концентрации ионов в условиях химического и теплового равновесия, в то время как ХИ и ЭУ — относительные скорости реакций ионизации. Ионы, образующиеся в слабоионизованной плазме инертного газа, часто более характерны для следов примесей, чем для основных компонентов. Так как источник ионов расположен вне масс-спектрометра и работает при атмосферном давлении, нет никаких ограничений для присоединения к нему хроматографических колонок различного типа (ГХ или ЖХ). Источник с ИАД снабжен также катодом в области фокусировки ионов, так что прибор может калиброваться по определенным стандартным веществам в режиме ЭУ ионизации. Этот источник позволяет получать масс-спектры положительных и отрицательных ионов. Существенными недостатками ИАД являются высокая вероятность образования кластерных ионов, ограниченный динамический диапазон, чувствительность к эффектам «памяти», для преодоления которых нужны специальные меры [23].

Большое развитие получили методы ионизации нелетучих или термически нестабильных соединений. Это, главным образом, десорбционные методы, позволяющие осуществлять ионизацию непосредственно из твердой фазы.

При *полевой ионизации* (ПИ) и *полевой десорбции* (ПД) образуются главным образом молекулярные ионы, а степень фрагментации невелика [24, 25]. Эмиттер в ПИ — острое лезвие или тонкий активированный вольфрамовый провод (диаметр 10 мкм) — находится под высоким потенциалом (7—14 кВ); вблизи лезвия или на концах игл активированного эмиттера существует высокий градиент потенциала — 10^7 — 10^8 В/см, благодаря которому вероятность туннелирования электронов из адсорбированных молекул становится достаточно высокой. Избыточная энергия ионов при ПИ того же порядка, как в ХИ, но при ПИ для большинства молекул образуются нечетноэлектронные молекулярные ионы с большей вероятностью, чем квазимолекулярные ионы. Чувствительность при ПИ в 5—10 раз ниже, чем при ЭУ, но ПИ предпочтительнее для соединений, которые не дают молекулярных ионов при ЭУ. Источник ПИ не требует большой системы откачки, как источник ХИ, и часто труднодоступных газов-реагентов.

Полевая десорбция является дальнейшим развитием метода полевой ионизации; в этом случае не требуется, чтобы ионизуемый образец находился в газообразном состоянии. Образец наносится на активированный эмиттер, помещенный в сильное неоднородное электрическое поле. Эмиттер медленно нагревается электрическим током. Ионизация происходит благодаря туннелированию наиболее слабосвязанных электронов в эмиттер, после чего образующиеся молекулярные ионы десорбируются в газовую фазу. Энергия возбуждения молекулярных ионов очень мала, так что для многих веществ в масс-спектрах ПД отсутствуют осколочные ионы.

Одна из наиболее сложных операций в ПД — приготовление эмиттера. Чаще всего используется следующая методика: тонкую вольфрамовую проволоку (толщина около 10 мкм) при температуре 1200 К обрабатывают бензонитрилом, в результате чего эмиттер покрывается слоем плотных сильно разветвленных микроигл пиролитического углерода (30—50 мкм), ионизация происходит на остриях этих микроигл. Образцы наносят на эмиттер разными способами: погружая эмиттер в раствор образца, нанося на него каплю с помощью микрошприца либо методом электропульверизации [26]. Температура эмиттера подбирается такой, чтобы обеспечить максимальную интенсивность пика молекулярного иона при минимальной фрагментации (обычно 300—600 К). Недавно было показано [27], что при прямом нагреве образца на эмиттере с помощью лазера в некоторых случаях оказывается повышенным выход молекулярных ионов: например, для витамина B_{12} этим методом был

получен масс-спектр с интенсивными пиками ионов M^+ и $(M+H)^+$ (m/z 1354 и 1355). Хотя ПД обеспечивает высокую чувствительность, этот метод ионизации не позволяет осуществить непосредственное соединение с ГХ и может быть использован лишь для анализа препаративно выделенных фракций. Не исключена возможность непосредственного сочетания этого метода с ЖХ [28].

С 1973 г. появился и все шире применяется близкий к ПД метод «десорбционной ХИ», называемый также «непосредственной ХИ», «ионизацией в пучке». Нелетучие образцы вводятся с помощью длинного зонда непосредственно в ионизационную камеру ионного источника с ЭУ или ХИ. В случае ЭУ зонд вводится так, что образец располагается на расстоянии 2—3 мм от оси электронного пучка. При этом молекулярные ионы образуют даже те соединения, в масс-спектрах которых, полученных в обычных условиях, эти ионы отсутствуют. Другие варианты этого метода включали нанесение образца на эмиттеры типа применяемых в ПД и проведение анализа в условиях электроударной или химической ионизации без приложения внешнего поля [29]. В настоящее время метод десорбционной химической ионизации (ДХИ) освоен промышленностью, и ряд приборов снабжен источниками ионов, позволяющими осуществить этот способ ионизации. Образец наносится на активированный эмиттер, десорбция осуществляется при программированном повышении температуры эмиттера при пропускании через него электрического тока. Ионизация чаще всего производится в плазме ХИ. Даже молекулы термически нестабильных соединений преимущественно десорбируются без разложения, так что ионы $(M+H)^+$ были получены для многих соединений, которые при обычном вводе непосредственно в ионный источник не образуют молекулярных ионов (гуанозин, диоксатон, углеводы, гидрохлорид аргинина и др.) [30]. Эмиттерами обычно служат активированные бензонитролом вольфрамовые нити или гладкие неактивированные ренийевые проволоки, свернутые в спираль. Фрагментация при ДХИ аналогична фрагментации при ХИ, она обеспечивает получение структурной информации, что, как правило, невозможно в случае полевой десорбции. Однако ПД более полезна в тех случаях, когда другие способы ионизации неэффективны для определения молекулярных масс. ДХИ позволяет проводить анализ образцов, загрязненных ионами щелочных металлов, когда ПД не может дать хороших спектров; это особенно важно при исследовании структуры биологических объектов. Механизм ионизации в ДХИ ближе к химической ионизации, чем к полевой десорбции [31].

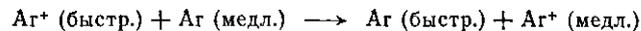
Лазерная десорбционная ионизация имеет перед другими десорбционными методами ряд преимуществ: молекулярные и квазимолекулярные ионы с высокой вероятностью образуются даже из термически лабильных и нелетучих молекул; отрицательные ионы образуются примерно с такой же вероятностью, что и положительные; электрическая проводимость образца не оказывает влияния на эффективность ионизации; не требуется практически подготовка образца для качественного анализа; количество энергии, сообщаемой данному объему ионизируемого образца, можно легко контролировать, регулируя таким образом степень фрагментации. При лазерной десорбции образуются, главным образом, четкоэлектронные квазимолекулярные ионы, в отличие от масс-спектрометрии вторичных ионов, когда наблюдаются, главным образом, молекулярные ионы M^+ [27]. Часто в масс-спектрах лазерной десорбции появляются интенсивные пики, соответствующие присоединению к молекулам ионов щелочных металлов (катионизация). Предел обнаружения составляет около 1 нг/см^2 . Основные трудности при количественном анализе возникают вследствие невозможности масс-спектров, хотя есть примеры использования этого метода для количественного анализа в условиях, моделирующих соединения ЖХ и МС [32]. При уменьшении энергии лазерного излучения вдвое абсолютная интенсивность пиков снижается на порядок. Этим методом были получены масс-спектры для ряда нелетучих веществ, включая углеводы, аминокислоты, пептиды, нуклеозиды и нуклеотиды.

В последнее время получили распространение и другие десорбционные методы ионизации, используемые для анализа нелетучих и термически нестабильных веществ. К ним относятся флеш-десорбция, при которой зонд с нанесенным на него образцом помещают в ионный источник и быстро нагревают.

Скорость нагрева при этом доходит до 1200 К/с . Для уменьшения взаимодействия адсорбированных молекул с поверхностью зонда на нее наносится слой полифторированного полимера. Используется также сочетание электроударной ионизации и десорбции, когда зонд с образцом помещают в непосредственной близости к электронному пучку. Эффективным методом ионизации является плазменная десорбция при бомбардировке фольги с нанесенным на нее образцом продуктами ядерного деления ^{252}Cf .

В молекулярной масс-спектрометрии вторичных ионов (МСВИ) поверхность мишени с образцом бомбардируется пучком первичных ионов (чаще всего Ag^+) с энергией 2—20 кэВ под определенным углом. Вторичные ионы, образующиеся в результате бомбардировки, отбираются под другим углом и направляются в масс-анализатор.

Ионизация бомбардировкой быстрыми атомами сходна с МСВИ, но в этом случае поверхность мишени бомбардируется пучком нейтральных частиц. После ускорения первичный пучок ионов Ag^+ входит в ячейку столкновений с атомами Ag при низком давлении, где происходит резонансная перезарядка:



Пучок быстрых нейтральных атомов Ag , бомбардируя поверхность мишени с образцом, вызывает образование вторичных ионов. При этом очень велика вероятность появления протонированных молекулярных ионов $(M+H)^+$ и присоединения к молекулам образца катионов щелочных металлов (катионизация). Этот метод наиболее эффективен для анализа высокополярных термически нестабильных и нелетучих веществ.

В практической работе часто желательно иметь масс-спектры, полученные при разных методах ионизации, так как они содержат информацию, дополняющую друг друга. Это привело к разработке комбинированных ионных источников. Обычно используются комбинированные ЭУ—ХИ или ЭУ—ПИ—ПД источники, так как методы ХИ и ПИ—ПД дают молекулярные или квазимолекулярные ионы, характеризующие молекулярные массы, а ЭУ—осколочные ионы, необходимые для установления класса соединений и структуры молекул. При ХИ и ПИ—ПД фрагментация невелика, так что трудно калибровать масс-спектрометр по обычным стандартам для калибровки шкалы масс—перфторалканам (обычно перфторкеросин и перфтортрибутиламин). При ПИ и ПД перфторалканы дезактивируют эмиттер, поэтому приходится калибровать прибор и систему обработки данных в режиме ЭУ, а затем переключать его в режим ПИ—ПД.

Комбинированный ЭУ—ХИ источник более сложен, чем источник ЭУ—ПИ—ПД, так как в этом случае необходима автоматическая система удерживания газа, чтобы обеспечить невысокое давление в источнике без дополнительных регулировок при переходе от ЭУ к ХИ. Обратный переход от ХИ к ЭУ также должен быть быстрым и простым и не требовать длительного времени на откачку газа-реагента.

Существует несколько конструкций комбинированных ЭУ—ХИ источников. В системах Varian—MAT и Hewlett—Packard один из элементов источника перемещается рычагом через сильфонное уплотнение таким образом, что либо образует заднюю стенку ионизационной камеры и действует как выталкивающий ионный электрод, либо служит герметизирующим элементом для удерживания газа-реагента [22]. В системе Finnigan 4000 имеется устройство с переменной проводимостью, которое не является фокусирующим элементом ионного источника, но может сдвигаться, менять его проводимость по отношению к потоку газа. В обоих системах переход от ЭУ к ХИ и обратно автоматический приводит в действие разные блоки автоматической настройки источника.

Анализатор. Ионы, образовавшиеся в ионном источнике, ускоряются и фокусируются, после чего ионный пучок поступает в анализатор, где ионы разделяются по величинам m/z , образуя масс-спектр. Характеристики анализатора очень важны для хромато-масс-спектрометра, ибо он определяет такие важные параметры, как диапазон масс, разрешение, скорость сканирования масс-спектров и др. В ХМС системах используются, главным образом, два типа анализаторов: анализаторы с секторным магнитным полем и квадрупольные масс-фильтры.

Наиболее важным параметром анализатора является его разрешающая способность по массам: $R = M/\Delta M$, где M — масса первого из ионов измеряемой пары, ΔM — разность масс двух ионов, имеющих пики примерно одинаковой интенсивности и разделенных минимумом, высота которого не превышает заданной величины (например, 10 % от высоты пиков). Магнитный секторный анализатор с ординарной фокусировкой обеспечивает разрешение 500—3000. В этом анализаторе ионный пучок из ионного источника эхидит в однородное магнитное поле, в котором ионы с разными энергиями описывают разные траектории. Радиус траектории зависит от величины магнитного поля и ускоряющего потенциала. Так как для данного прибора радиус магнитного сектора постоянен, то сканирование ионов разных масс осуществляется изменением магнитного поля или ускоряющего потенциала. Обычно предпочитают первый прием, это позволяет избежать изменения дискриминаций по массам в процессе сканирования масс-спектра.

В ХМС к сканированию предъявляют особые требования. Оно должно быть быстрым и воспроизводимым, обеспечивать регистрацию как полного масс-спектра, так и любого задаваемого его участка или отдельных пиков под управлением системы обработки данных. Поэтому иногда применяют сканирование путем изменения величины ускоряющего потенциала.

Магнитные анализаторы позволяют регистрировать ионы с очень высокими массами (более 3000). Один из наиболее существенных недостатков магнитных секторных анализаторов по сравнению с квадрупольными — более медленная скорость сканирования. Вихревые токи в сердечнике магнита ограничивают скорость сканирования до примерно 0,5 с/декада, кроме того, явления магнитного гистерезиса ограничивают скорость возвращения магнитного поля в исходное положение после окончания цикла сканирования. Этого недостатка лишены современные магниты слоистой структуры («Супраскан»), которые обеспечивают скорость сканирования до 0,1 с/декада, а полное время цикла в интервале масс 50—500, включающего сканирование и возвращение в исходное положение, — менее 0,3 с [33].

Для улучшения фокусировки ионов и получения более высокой разрешающей способности служат анализаторы с двойной фокусировкой. В этом случае к магнитному анализатору добавляется электростатический анализатор, обеспечивающий фокусировку ионов по энергиям. Он представляет собой секторный конденсатор с радиальным электрическим полем. Имеется два основных типа масс-спектрометров с двойной фокусировкой, отличающихся взаимным расположением магнитного и электростатического анализаторов. Геометрия Нира — Джонсона допускает только электрическую регистрацию, при геометрии Маттауха — Герцога возможна как электрическая, так и фотографическая регистрация. Масс-спектрометры с двойной фокусировкой обычно обеспечивают разрешающую способность 10 000—30 000, а приборы наиболее высокого класса — до 100 000. Однако увеличение разрешающей способности сопровождается уменьшением чувствительности.

Квадрупольный анализатор представляет собой систему из четырех стержней-электродов, к которым приложены высокочастотное переменное и постоянное напряжения. Принцип работы этого анализатора заключается в том, что под действием постоянного и переменного электрических полей заряженные частицы с массой M испытывают стабильные колебания и могут пройти через квадрупольный фильтр только при определенных значениях постоянного и переменного напряжения на электродах. Частицы с другими массами при этих значениях напряжений движутся слишком далеко от главной оси системы и, сталкиваясь со стержнями, выбиваются из потока. Для того чтобы ширина масс-спектрального пика для ионов с массой 1000 была не более 0,1 а. е. м., стабильность частоты и значений полей должна быть не хуже 10^{-5} , а механическая точность изготовления и установки стержней около 10^{-4} . Это означает допуск 1 мкм при диаметре стержней около 8 мм. Современные квадрупольные масс-анализаторы обычно имеют диапазон масс от 2 до 1200, минимальная ширина пиков составляет 0,3 а. е. м.

Неправильная установка стержней или неблагоприятные условия входа ионов вызывают искажения формы пиков и даже их расщепление [34]. Для

хорошего разрешения пиков энергия ионов не должна быть слишком велика, обычно она составляет около 10 эВ.

По сравнению с магнитными квадрупольные анализаторы вызывают большую дискриминацию ионов по массам, поэтому ввод ионов должен осуществляться в виде параллельного узкого пучка вдоль главной оси системы; краевые поля анализатора должны быть по возможности малы. Для ионов, селективируемых таким образом, максимальное расстояние от главной оси на выходе фильтра равно:

$$R_1 = 1,8R_0 \sqrt{\frac{M}{\Delta M}}$$

где R_0 — радиус параллельного ионного пучка на входе.

Если в процессе сканирования ширина пиков поддерживается постоянной, то это уравнение дает зависимость размера выходящего пучка от массы ионов. Так, для ионов с массами 69 и 1166 ионные пучки, имеющие на входе в систему диаметр 0,1 мм, на выходе будут иметь диаметры 1,4 и 6 мм, соответственно. Следовательно, радиус свободного пространства недискриминирующей системы стержней должен быть больше максимального радиуса R_1 . Поэтому предпочтительнее стержни гиперболического сечения. Круглые стержни обеспечивают близкое к гиперболическому поле только в центральной части системы, что приводит к уменьшению эффективной площади пропускания ионов по сравнению со свободным пространством. Чувствительность систем с гиперболическими стержнями выше, особенно при высоком разрешении.

Другая причина дискриминации по массам в приборе с квадрупольным анализатором связана с установкой вторичного электронного умножителя. Первый диод умножителя должен быть хорошо защищен от фотонов и возбужденных нейтральных частиц, образующихся главным образом в ионном источнике при больших давлениях газа и проходящих через фильтр. Для этого умножитель смещают в сторону от оси фильтра, а ионы направляют на него высоким потенциалом первого диода. При таком размещении электронного умножителя фоновый сигнал может уменьшиться в 10^4 раз, но одновременно уменьшается коэффициент усиления для ионов с большими массами. В случае магнитных секторных приборов эти эффекты отсутствуют, так как источник ионов и детектор не располагаются на прямой линии.

Современные квадрупольные масс-анализаторы позволяют получать практически недискриминированные масс-спектры до 500 а. е. м., а в отдельных случаях и в большем интервале масс [34].

Наряду с диапазоном масс и разрешающей способностью важной характеристикой масс-анализатора является чувствительность. В режиме селективного детектирования отдельных ионов квадрупольные и магнитные масс-спектрометры достигают предельной чувствительности в несколько пикограммов на 1 мкл образца, введенного в газовый хроматограф. При регистрации полного масс-спектра предел обнаружения составляет несколько сот пикограммов в зависимости от природы образца.

Квадрупольные масс-анализаторы идеально подходят для работы в сочетании с хроматографом благодаря возможности быстрого сканирования и линейной зависимости между массами пропускаемых ионов и напряжением на электродах.

В хромато-масс-спектрометрии чаще всего используются масс-спектрометры низкого разрешения, которые измеряют только номинальные массы ионов. Точное измерение масс возможно либо ручным методом «peak matching» (совмещение на экране осциллографа измеряемого пика и пика стандарта с точно известной массой путем изменения ускоряющего напряжения), либо — для полного масс-спектра — с помощью системы обработки данных на базе ЭВМ [35]. Это возможно, как правило, при среднем или высоком разрешении (≥ 10000), т. е. только при использовании магнитного секторного масс-спектрометра.

Для качественного и количественного анализа в ХМС важна возможность быстрого переключения пиков. В масс-спектрометрах с секторным магнитным полем переключение пиков может осуществляться в пределах

интервала масс от 30 до 40 % от массы одного из них путем переключения ускоряющего напряжения. Квадрупольный масс-фильтр обеспечивает такое переключение во всем диапазоне масс. Для магнитного масс-спектрометра изменение величины магнитного поля не может производиться очень быстро из-за магнитных гистерезисных явлений.

Для ХМС анализа важна еще одна характеристика прибора — возможность цифрового управления, обеспечивающая высокую производительность и автоматизацию работы. В этом отношении квадрупольный масс-фильтр имеет значительные преимущества перед магнитным анализатором благодаря линейной шкале масс и низкому ускоряющему потенциалу (около 10 В по сравнению с несколькими киловольтами в магнитных масс-спектрометрах). Следует также отметить, что квадрупольный масс-фильтр очень удобен для регистрации отрицательных ионов, так как в анализаторе не происходит дискриминации ионов по их полярности.

С другой стороны, более высокая чувствительность и более удобная для количественных измерений форма пиков с плоской вершиной дают некоторое преимущество магнитным приборам с ординарной фокусировкой перед квадрупольными. Однако наиболее полно достоинства магнитных приборов могут быть использованы только при двойной фокусировке благодаря возможности точного измерения масс ионов при быстром сканировании и селективного детектирования ионов с заданными массами.

Детектором ионов обычно служит вторичный электронный умножитель. Положительные ионы с энергией 1—10 кэВ выбивают из первого динода вторичные электроны. Эти электроны ускоряются до энергии около 100 эВ и, ударяясь о поверхность следующего динода, выбивают большее количество электронов по сравнению с падающими на динод. Этот процесс повторяется 10—20 раз, так что общий выход составляет до 10^8 электронов на каждый падающий ион.

Диноды в умножителях либо расположены отдельно друг от друга, либо представляют собой непрерывные электроды типа «каналтруба». Умножители с отдельными динодами отличаются меньшим уровнем шумов и большим динамическим диапазоном (от нескольких ионов в секунду до 10^{10} А входного тока) по сравнению с каналтрубом (максимальный входной ток 10^{11} А) [36]. Максимальное усиление умножителя обычно около 10^6 . Более высокое усиление ухудшает линейность и уменьшает время жизни умножителя).

Реже в ХМС системах находят применение детекторы Фарадея, в которых ионы попадают на электрод, соединенный непосредственно с чувствительным усилителем. Этот детектор предпочтительнее при наиболее точных количественных измерениях. Нижний предел измеряемых ионных токов обычно определяется уровнем шумов входного сопротивления и шириной полосы пропускания усилителя. При входном сопротивлении 100 ГОм и емкости 2 пкф чувствительность равна $1,5 \cdot 10^{-16}$ А, а время возрастания сигнала от 0 до 95 % измеряемой величины — 0,6 с; при 1 ГОм и 2 пкф — чувствительность и время возрастания сигнала равны $1,5 \cdot 10^{-13}$ А и 6 мс, соответственно. Минимальный измеряемый ток для детектора Фарадея и электронного умножителя в отсутствие фона равен $1,4 \cdot 10^{-16}$ А и $1,0 \cdot 10^{-18}$ А, соответственно, при точности измерения до 10 % — $0,7 \cdot 10^{-14}$ А и $1,6 \cdot 10^{-16}$ А, при точности до 1 % — $0,7 \cdot 10^{-13}$ А и $1,6 \cdot 10^{-14}$ А. Таким образом, хотя чувствительность детектора Фарадея при сравнимых постоянных времени меньше, при измерениях с точностью выше 1 % он более предпочтителен, чем умножитель [36].

Для квадрупольного масс-фильтра пропускание в анализатор ионов противоположного знака достигается простым изменением знака ускоряющего напряжения и потенциала ионных линз, при этом, в отличие от магнитных масс-спектрометров, ионы разного знака, но с одинаковыми массами, проходят через квадрупольный фильтр одинаковым образом. Но детектирование отрицательных ионов с помощью электронного умножителя вызывает трудности, так как прошедшие через квадрупольный фильтр ионы имеют кинетическую энергию ниже 20 эВ и не могут возбудить катод умножителя. Было предложено конвертировать отрицательные ионы в положительные, которые детектируются обычным электронным умножителем [37]. В этом случае падающие на конверсионный динод электроны не могут вызвать образования поло-

жительных ионов, что значительно понижает уровень шумов. Зависимость сигнала детектора от массы ионов различна для положительных и отрицательных ионов: для положительных ионов чувствительность уменьшается в области высоких масс, для отрицательных ионов с конверсией — увеличивается. При использовании двух конверсионных динодов противоположной полярности, расположенных у катода электронного умножителя с непрерывными динодами, можно одновременно регистрировать положительные и отрицательные ионы без изменения рабочих напряжений.

При регистрации положительных ионов конверсионный динод позволяет улучшить отношение сигнал/шум в области больших масс; например, для m/z 866 это отношение увеличивается в 4 раза при повышении напряжения конверсионного динода от —1,8 до —3 кВ.

Все ХМС системы, как правило, позволяют осуществить непрерывную регистрацию части ионного пучка с помощью специального электрода, называемого монитором пучка, монитором ПИТ или монитором интегрального спектра, который непосредственно измеряет ионный ток. Этот сигнал служит для регистрации масс-хроматограммы, а также для оценки условий работы и юстировки ионного источника и для фиксации входа в источник элюируемых хроматографических пиков, а в приборах с фоторегистрацией — для определения экспозиции.

В современных приборах используются разные методы регистрации ионного пучка. В одном из ранних методов часть элюата из хроматографической колонки отделялась и направлялась в пламенно-ионизационный детектор, но при малом количестве образца деление элюата нежелательно. Часто для измерения полного ионного тока служит специальный электрод в ионном источнике — последний электрод перед выходной щелью. Большинство масс-спектрометров с двойной фокусировкой имеет монитор пучка между электрическим и магнитным секторами.

Так как потенциал ионизации гелия равен 24 эВ, а ионный источник часто работает при 70 эВ, то гелий, не удаленный сепаратором, дает очень большой сигнал на мониторе ПИТ. Вклад газа-носителя и ПИТ исключают либо электронными методами, компенсируя соответствующий сигнал, либо осуществляя ионизацию электронами с энергией 20 эВ. В некоторых приборах во время прохождения хроматографического пика энергия электронов автоматически переключается на 70 эВ для повышения чувствительности [36].

Монитор пучка не может использоваться при ХИ, так как ионы газа-реагента, образующиеся в ионном источнике, дают слишком большой ионный ток. Сканирование масс-спектра должно начинаться с массы большей, чем масса ионов газа-реагента, чтобы исключить слишком большой ионный ток, который может повредить электронный умножитель. В большинстве случаев при использовании химической ионизации ПИТ записывают не в режиме мониторинга, а получают интегрированием полного сигнала, поступающего на умножитель в процессе сканирования. В квадрупольном анализаторе можно измерять ПИТ, отключая высокий постоянный потенциал на стержнях, что позволяет всем ионам проходить на детектор. Диапазон масс ионов, проходящих через квадрупольный анализатор, определяется амплитудой высокочастотного сигнала на стержнях. Таким образом, при определенной величине высокочастотного сигнала на детектор проходят только ионы с заданной массой. Следовательно, можно начать сканирование с ионов, масса которых больше массы ионов газа-носителя или газа-реагента, с тем, чтобы использовать максимальную чувствительность электронного умножителя, а мониторингирование ПИТ осуществлять при снятии со стержней постоянного потенциала. Недостатком этих методов является трудность абсолютного измерения тока ионного пучка.

Другая система мониторинга ПИТ, реализованная в приборах 112S, SN-7A, 311A (фирма Varian — MAT), включает второй ЭУ источник (расположенный за основным источником), который измеряет часть элюата, поступающую в эту область за счет обратной диффузии. Этот источник работает при 20 эВ и, таким образом, не реагирует на газ-носитель — гелий.

1.3. СОЕДИНЕНИЕ ГАЗОВОГО ХРОМАТОГРАФА С МАСС-СПЕКТРОМЕТРОМ

Соединение хроматографа с масс-спектрометром представляет сложную проблему вследствие несовместимости их рабочих условий: хроматограф работает при давлении атмосферном или выше атмосферного, а масс-спектрометр — в высокомолекулярном вакууме. Поэтому вначале объединение этих методов выглядело так: каждый компонент на выходе хроматографической колонки улавливался, переносился в систему напуска масс-спектрометра и анализировался. Конечно, при этом каждый из приборов мог работать в оптимальных условиях, не оказывая влияния на другой прибор. Однако этот метод имел большие неудобства. Не говоря уже о трудоемкости и длительности улавливания и переноса, скажем, 100 или 200 компонентов, практически невозможно выделить их все в чистом виде и предохранить от возможных загрязнений и изменений вследствие гидролиза, окисления или какого-либо другого вида разложения до получения масс-спектра. Поэтому хромато-масс-спектрометрия в современном варианте заключается в непосредственном соединении этих двух методов.

Соединение газового или жидкостного хроматографа и масс-спектрометра накладывает определенные ограничения на условия работы этих приборов. При независимой работе эти условия сильно различаются:

Параметр	ГХ	ЖХ	МС
Давление (для хроматографов выходное), Па	Атмосферное		10^{-3} — 10^{-6}
Скорость потока газа (в стандартных условиях), мл/мин	1—15	200—1000	0,1—2
Наибольшая температура, °С	300—350	Комнатная	275—325

Масс-спектрометр должен работать в условиях вакуума: анализатор — 10^{-5} — 10^{-7} Па, источник ионов при ЭУ ионизации — 10^{-3} — 10^{-4} Па, при ХИ — 0,1—100 Па. Поступление в ионный источник большой массы газа из хроматографической колонки требует дифференциальной откачки источника и анализатора. Насос, откачивающий ионный источник, должен обладать высокой производительностью. Скорость поступления в ионный источник потока газа (чаще всего гелия) в ГХ — МС равна обычно 0,5—10 мл/мин (при стандартных условиях). Для откачки такого потока используются мощные диффузионные масляные насосы со скоростью откачки 50—1000 л/с или турбомолекулярные насосы. Последние обладают тем преимуществом, что не содержат масла, которое может давать вклад в фоновый масс-спектр. Они не столь чувствительны к разгерметизации вакуумной системы и требуют меньше времени для приведения в рабочее состояние.

Динамический диапазон масс-спектрометра должен быть достаточно велик, чтобы можно было регистрировать сигналы

разной интенсивности, он должен охватывать около 6 порядков величины сигнала. Это означает, что максимальный ионный ток, который может быть зарегистрирован детектором до насыщения, в 10^6 раз больше, чем минимальный ионный ток, который может быть измерен выше уровня шумов.

Ионный источник должен обеспечивать линейность сигнала ионного тока в широких пределах при изменении количества введенного образца. Большую роль играет качество ионной оптики масс-спектрометра, определяющее разрешающую способность и форму пиков в масс-спектре.

Пожалуй, наибольшее значение для нормальной работы комбинированной системы хроматограф — масс-спектрометр имеет скорость сканирования масс-спектров. Для получения представительного масс-спектра, а также информации о чистоте хроматографического пика необходимо регистрировать по крайней мере три спектра в процессе прохождения одного хроматографического пика. Если учесть, что время прохождения узких пиков в капиллярных колонках составляет считанные секунды, то скорость сканирования должна быть не менее 0,5—1 с/декада.

От хроматографа требуется, чтобы разделение было эффективным, т. е. чтобы в масс-спектрометр вводились хорошо разделенные компоненты смесей. Это условие диктует выбор соответствующих колонок, например, для анализа очень сложных смесей нужны капиллярные колонки высокого разрешения. Возможно, необходимо предварительное фракционирование анализируемой смеси для ее упрощения или для отделения следовых компонентов от основных, мешающих их определению.

Неподвижная фаза должна обладать достаточной термической стабильностью, т. е. испарение и разложение, при которых могут выделяться летучие продукты, должны быть сведены к минимуму. Это необходимо для получения стабильной базовой линии и малоинтенсивного фонового масс-спектра. Последнее особенно важно при анализе следовых компонентов. Кроме того, испарение или разложение неподвижной фазы приводит к загрязнению ионного источника и масс-анализатора, к потере чувствительности и разрешающей способности масс-спектрометра.

Большое значение в ХМС имеет природа газа-носителя. В первых, он должен легко отделяться от компонентов смеси, обеспечивая возможность их обогащения (либо за счет большей скорости откачки газа-носителя из ионного источника масс-спектрометра, либо с помощью специальных сепараторов). Вторых, ионы, образующиеся из газа-носителя, не должны мешать анализу компонентов смеси. Поэтому при ЭУ ионизации в качестве газа-носителя в ГХ — МС обычно используют гелий, который откачивается быстрее, чем компоненты анализируемых смесей, и имеет высокий потенциал ионизации. При энергии электронов несколько ниже потенциала ионизации

гелия молекулы анализируемых веществ ионизируются достаточно эффективно, а ионы гелия не создают помех при измерениях. В случае химической ионизации газ-носитель часто служит и газом-реагентом.

В первых системах ГХ—МС использовался, как правило, делитель потока [38, 39]. В масс-спектрометр направлялась только небольшая часть общего потока из хроматографической колонки через игольчатый вентиль или узкий капилляр-натека-тель, так что в ионный источник поступал поток 0,1—4 мл/мин газа-носителя (He). Очевидно, эффективность такой системы была весьма низкой (1—10%), и не происходило обогащения образца. Однако этот способ очень прост, удобен для всех типов колонок, и масс-спектрометр в этом случае не оказывает влияния на работу колонки.

В настоящее время этот способ продолжает применяться, но разработан целый ряд других различных способов соединения ГХ и МС. Существует два основных типа соединительных устройств — интерфейсов: интерфейс с непосредственным соединением и интерфейс — молекулярный сепаратор.

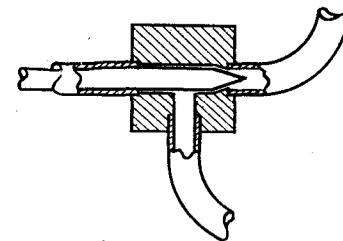
Непосредственное соединение. Системы непосредственного соединения могут использоваться в тех случаях, когда скорость потока через колонку сравнима со скоростью откачки ионного источника (например, капиллярные колонки с минимальным потоком газа-носителя).

Интерфейс выполняет две основные функции: понижение давления от атмосферного на выходе ГХ колонки до 10^{-2} — 10^{-3} Па в ионном источнике масс-спектрометра и удаление избытка газа-носителя. В случаях, когда условия работы прибора позволяют исключить обогащение, соединение хроматографа и масс-спектрометра может быть легко осуществлено с помощью обычного игольчатого вентиля или ограничителя в виде отрезка металлического или стеклянного капилляра. Очевидным преимуществом игольчатого вентиля является возможность регулировки потока, но во многих приложениях, особенно при анализе лабильных биологических соединений, приходится избегать металлических поверхностей. Поэтому иногда предпочтительнее капиллярные ограничители, так как они могут быть изготовлены из химических инертных материалов. Основные сложности при использовании игольчатого вентиля возникают из-за относительно большого мертвого объема, тогда как основной недостаток капиллярного ограничителя связан с трудностью достижения сбалансированного потока.

Размеры капилляра выбирают в соответствии с желаемой величиной потока. Например, в случае H_2 поток газа-носителя CH_4 может быть до 15 мл/мин. Капилляр длиной 30—40 см и внутренним диаметром 0,012 см обеспечивает вязкостный поток желаемой величины. Для потока 1—2 мл/мин внутренний диаметр капиллярного ограничителя должен быть около 0,006 см. Ограничителем может служить и сама капиллярная

колонка. В этом случае колонка соединяется с масс-спектрометром через отрезок капилляра внутренним диаметром 0,03 см, и давление на выходе колонки уменьшается примерно до 100 Па, а на входе равно атмосферному [39]. При этом линейная скорость потока через колонку увеличивается, т. е. могут измениться времена удерживания. Этот способ имеет следующие

Рис. 1-3. Игольчатый вентиль для присоединения ГХ колонки [38].



преимущества: общее количество газа-носителя уменьшается в 2—3 раза и исключается влияние мертвого объема после колонки благодаря высокой эффективности пропускания при низком давлении. Действительно, массовый поток через трубчатую систему определяется выражением

$$Q = P \cdot C$$

Для одного и того же потока при уменьшении давления P от атмосферного до 130 Па пропускание C увеличивается в 760 раз.

Так как откачка мертвого объема (V) происходит по экспоненциальному закону с постоянной времени $\tau = V/C$, то с увеличением пропускания τ соответственно уменьшается почти на три порядка, благодаря этому уменьшается расширение хроматографических пиков, обусловленное наличием мертвого объема, что особенно существенно для капиллярных колонок, для которых длительность пиков составляет всего 6—10 с. Даже небольшой мертвый объем порядка $(2-2) \cdot 10^{-3}$ мл будет вызывать замедление откачки с постоянной времени $\tau = 0,1 \div 0,2$ с.

Игольчатые вентили, как правило, имеют значительные мертвые объемы (до 0,1 мл). Для потока 20 мл/мин и мертвого объема 0,1 мл постоянная времени τ равна 0,3 с, что приемлемо для набивных колонок, но слишком велико для капиллярных. Желательно при использовании вентиля присоединять их так, чтобы пространство возле стебля иголки находилось в области высокого вакуума, где пропускание увеличивается на 2—3 порядка. На рис. 1-3 показана конструкция игольчатого вентиля, практически не имеющего мертвых объемов [38]. Соединительные линии до и после игольчатого вентиля обычно выполнены из остеклованных металлических трубок.

Материалом для капилляра часто служит платина, однако существенным недостатком такого интерфейса является активность платиновой поверхности, которая может зависеть и от условий хроматографического разделения, в частности от вида жидкой фазы на капиллярной колонке.

Широко используется соединение с открытым разделительным устройством [40]. В интерфейсе такого типа постоянный поток элюата из капиллярной колонки вводится в масс-спектрометр, а избыток сбрасывается в атмосферу. Входной линией и ограничителем служит обычно платиновый капилляр, присоединенный к ионному источнику через отрезок тефлоновой

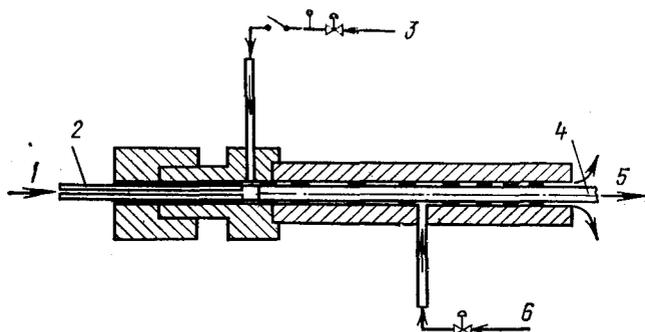


Рис. 1-4. Интерфейс с открытым делителем потока для ГХ—МС [40]:
1 — поток из хроматографической колонки; 2 — остеклованная стальная трубка; 3 — газ для регулирования величины потока в масс-спектрометр (He); 4 — капилляр; 5 — поток в масс-спектрометр; 6 — газ для продувки (He).

трубки. Он отстоит на некотором расстоянии от выхода колонки. Чтобы не допустить попадания кислорода из атмосферы в масс-спектрометр, соединительное устройство заключают в кожух, постоянно продуваемый инертным газом. На рис. 1-4 показан интерфейс с открытым разделительным устройством. Он может работать как с капиллярными, так и с набивными колонками. Разделительное устройство выполнено из двух стеклянных капилляров, концы которых расположены на расстоянии около 2 мм. Ограничительный капилляр имеет длину 27 см и внутренний диаметр 0,57 мм и обеспечивает поток 2,5 мл/мин при комнатной температуре, что эквивалентно 1,5—1,8 мл/мин при рабочей температуре. Для продувки разделительного устройства используется гелий (10—15 мл/мин). Избыток элюата и газ, используемый для продувки, сбрасываются в атмосферу. Для разбавления элюируемых компонентов (например, основных компонентов при анализе примесей) гелий может вводиться и непосредственно в пространство между двумя капиллярами.

Преимуществом такого устройства перед обычным интерфейсом с непосредственным соединением является то, что конец ГХ колонки находится при атмосферном давлении и, таким образом, соединение с масс-спектрометром не влияет на ее рабочие параметры. Не нарушается высокая разделительная способность капиллярных колонок.

Основной недостаток интерфейса с открытым разделительным устройством — большая длина входной и ограничительной

линии, что может приводить к потерям лабильных соединений, особенно в случае металлических капилляров. Это имеет большое значение при анализе микропримесей, особенно если используются силилированные или ацетилированные производные.

Соединение через обогащательные устройства — сепараторы. Значительная часть работ в ГХ—МС выполняется на набивных

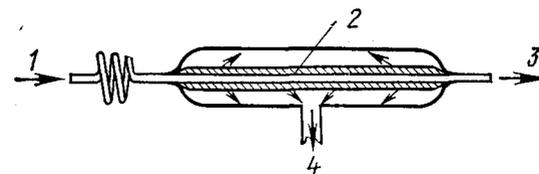


Рис. 1-5. Эффузионный молекулярный сепаратор (одноступенчатый) [38]:
1 — поток из газового хроматографа; 2 — пористая стеклянная трубка; 3 — поток в масс-спектрометр; 4 — откачка.

колонок, поток через которые равен примерно 20 мл/мин. Система откачки масс-спектрометра может справиться с потоками, не превышающими 1 мл/мин (при стандартных условиях). Если в таких случаях подавать поток в масс-спектрометр через простой ограничитель с параллельным (байпасным) отводом, пропускающий только часть потока, допустимую для масс-спектрометра, то эффективность использования образца будет не более 10%. При этом благодаря высокой чувствительности масс-спектрометра общая чувствительность системы достигает 1—10 нг, но если бы образец поступал в масс-спектрометр целиком, чувствительность была бы выше. Были созданы обогащательные системы, в которых значительная часть газа-носителя удаляется и достигается концентрирование образца перед вводом в масс-спектрометр.

В настоящее время предложено много разных типов молекулярных сепараторов, из которых наибольшее распространение получили три системы: эффузионный сепаратор Уотсона — Бимана [41], струйный сепаратор Рихаге [42] и мембранный сепаратор [43].

Эффузионный сепаратор из пористого спекшегося стекла, предложенный Уотсоном и Биманом в 1964 г., был одним из первых обогащательных устройств для ГХ—МС. Благодаря простоте и легкости изготовления эта система через несколько лет стала наиболее распространенной. В этом сепараторе (рис. 1-5) элюат из хроматографической колонки проходит через ограничитель давления в трубку со стенками из спекшейся стеклянной крошки со сверхтонкими пораами (средний размер пор около 10^{-4} см). Эта трубка окружена вакуумной камерой, откачиваемой форвакуумным насосом. Для большего обогащения используется двухступенчатый сепаратор, в котором вторая ступень откачивается диффузионным вакуумным насосом.

Обогащенный поток входит в масс-спектрометр через другой капиллярный ограничитель диаметром около 0,02 см.

В пористой трубке газ может идти в двух направлениях: в масс-спектрометр и через поры в вакуум. Обогащение потока, поступающего в масс-спектрометр, имеет место, если давление в пористой трубке поддерживается в пределах 65—650 Па. При этих давлениях средняя длина свободного пробега молекул составляет около 10^{-3} см, т. е. больше диаметра пор (10^{-4} см). В результате через трубку проходит молекулярный поток (каждая молекула диффундирует через поры независимо от других). Значительная степень обогащения достигается при большом различии молекулярных масс образца (обычно 100—500) и газа-носителя He (4). Через капилляр в масс-спектрометр идет вязкостный поток, так как обычно внутренний диаметр капилляра ($2 \cdot 10^{-2}$ см) больше средней длины свободного пробега, таким образом обеспечивается одинаковая пропускная способность капилляра для всех молекул. Очевидно, что если давление в пористой трубке слишком велико, то поток через поры не будет молекулярным, если же давление слишком низко, поток в масс-спектрометр через ограничитель не будет вязкостным, поток в обоих направлениях будет молекулярным и не будет происходить обогащения.

Рабочие параметры сепаратора можно оценить с помощью таких характеристик, как фактор обогащения N и фактор эффективности Y . Первый определяется как отношение концентрации образца в потоке, поступающем в масс-спектрометр, к концентрации образца в потоке, выходящем из ГХ колонки:

$$N = \frac{C_{MC}}{C_{ГХ}} \quad \text{или} \quad N = \frac{(P_o/P_{He})_{MC}}{(P_o/P_{He})_{ГХ}}$$

где N — фактор обогащения; C_{MC} , $C_{ГХ}$ — концентрации образца; P_o и P_{He} — парциальные давления образца и гелия.

Эффективность интерфейса оценивается величиной Y , представляющей собой часть образца, поступающую в масс-спектрометр:

$$Y = (Q_{MC}/Q_{ГХ}) \cdot 100\%$$

Эта величина связана с фактором обогащения следующим соотношением:

$$N = \frac{Y}{100} \cdot \frac{V_{ГХ}}{V_{MC}}$$

где $V_{ГХ}$ и V_{MC} — потоки газа-носителя, $Q_{ГХ}$ и Q_{MC} — количества образца.

Как показал Мак Фалден [1], эффективность и коэффициент обогащения эффузионного сепаратора определяются следу-

ющими выражениями:

$$Y = \frac{1}{1 + \frac{V_{пор}}{V_{MC}} \sqrt{\frac{M_{He}}{M_o}}}; \quad N = \frac{V_{ГХ}}{V_{MC} + V_{пор} \sqrt{\frac{M_{He}}{M_o}}}$$

где $V_{ГХ}$, $V_{пор}$, V_{MC} — объемы гелия из хроматографической колонки, проходящего через поры и поступающего в масс-спектрометр, соответственно; M_{He} , M_o — молекулярные массы гелия и образца.

Для типичного случая ($M_o = 200$; $V_{ГХ} = 20$ мл/мин; $V_{MC} = 1$ мл/мин; следовательно, $V_{пор} = 19$ мл/мин) коэффициент обогащения равен 5,4, а $Y \approx 27\%$ (при обычном делении потока 20 : 1 $Y = 5\%$). В случае малоэффективной системы оточки ($V_{MC} = 0,2$ мл/мин) $Y = 7\%$ (при простом делении потока — 1 %).

Недостатки эффузионных сепараторов: оптимизация только в узком интервале скоростей потоков; возможность сорбции и разложения нестабильных веществ на пористой поверхности, более низкая эффективность, чем в других типах сепараторов. При работе не в оптимальных условиях эффективность сепаратора уменьшается.

Был разработан ряд модификаций эффузионного сепаратора, свободных от указанных недостатков и имеющих более компактную конструкцию. В частности, стеклянная пористая трубка заменялась в некоторых конструкциях на керамическую, серебряную или из нержавеющей стали. Поверхность металла силанизировали для придания ей инертных свойств. В металлических и керамических пористых элементах размеры пор были от $5 \cdot 10^{-4}$ до 10^{-5} см, что обеспечивало некоторое расширение диапазона проводимости эффузионной части. Другой путь расширения пределов рабочих условий состоял в создании сепаратора со сменными или регулируемым элементами. Так, сепаратор с регулируемой проводимостью может работать в более широком интервале скоростей потока. Эффузия происходит через регулирующую щель между острыми краями двух концентрических колец и накрывающей их пластиной диаметром около 2 см (рис. 1-6). Размер щели может меняться от 0 до $5 \cdot 10^{-3}$ см с помощью микрометрического винта. При полностью закрытой щели весь поток поступает в масс-спектрометр, при полностью открытой щели сепаратор работает как байпасный вентиль, отводящий часть потока. Этот сепаратор может эффективно работать при величине потока от 1 до 50 мл/мин, он легко разбирается для очистки, имеет небольшие размеры, что сводит к минимуму разложение веществ и образование хвостов пиков.

Струйный сепаратор был предложен Рихаге в 1964 г.; его действие основано на различии скоростей диффузии разных газов в расширяющейся со сверхзвуковой скоростью газовой струе, что обеспечивает фракционирование газовой смеси

(рис. 1-7). Элюат из колонки проходит через ограничитель и быстро расширяется в вакуумной камере. В свободно расширяющейся струе устанавливается градиент давления, направленный к середине струи. Скорость диффузии молекул в этой области зависит от их молекулярных масс и пропорциональна коэффициенту диффузии. Таким образом, эффект разделения

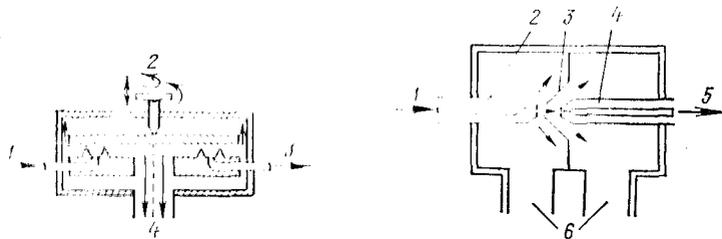


Рис. 1-6. Щелевой молекулярный сепаратор с регулируемой проводимостью [38]:

1 — поток из газового хроматографа; 2 — регулирующий винт; 3 — поток в масс-спектрометр; 4 — откачка.

Рис. 1-7. Струйный молекулярный сепаратор (одноступенчатый) [38]:

1 — поток из газового хроматографа; 2 — выходное сопло; 3 — диафрагма; 4 — входное сопло; 5 — поток в масс-спектрометр; 6 — откачка.

связан с условиями вязкостного потока. Середина струи, обогащенная более тяжелыми компонентами, входит в приемное сопло; периферическая часть струи, обогащенная более легкими компонентами, не попадает в него и откачивается вакуумным насосом. Аналогично происходит обогащение во второй ступени. Первая ступень откачивается форвакуумным насосом, и давление в ней составляет около 10—20 Па, вторая ступень — диффузионным насосом до давления около 0,1 Па. Поступающий на вход сепаратора поток (30 мл/мин) после первой ступени уменьшается до 2—4 мл/мин, после второй — до 0,25 мл/мин. Как показали исследования, такое же уменьшение имеет место и при других начальных величинах потока [39]. В случае метилстеарата через первую ступень проходит 80 % всего количества образца (остальная часть удаляется вместе со сбрасываемым газом-носителем), через вторую — 50 %, таким образом, общая эффективность системы составляет 40 %.

Среднее давление в расширяющейся струе должно быть достаточным для обеспечения условий вязкостного потока в середине струи. Если это условие не соблюдается, разделения компонентов газового потока не происходит. Коэффициент разделения для указанных выше условий равен для первой и второй стадии 12 и 4, соответственно, и 48 — для всей системы. Уменьшение эффективности на второй стадии, по-видимому, связано с падением давления до 65 Па. Для капиллярных ко-

лонок с малыми потоками используется обычно одноступенчатый сепаратор. Струйный сепаратор наиболее эффективен при больших скоростях потока (выше 10 мл/мин); если поток менее 3—4 мл/мин, давление в струе может быть слишком мало для поддержания сверхзвуковой скорости потока, и коэффициент разделения резко уменьшается. В этих случаях смешивают поток с дополнительным количеством газа. Для малых потоков эффективность эффузионного сепаратора сравнима с эффективностью струйного, но при эксплуатации первого исключается возможность внезапного уменьшения эффективности при уменьшении потока.

Струйные сепараторы обычно изготавливают из нержавеющей стали, но для анализа термически нестабильных соединений используются стеклянные сепараторы. Металлические поверхности сепараторов можно силанизировать для уменьшения влияния металлической поверхности. Отсутствие мертвых объемов позволяет избежать расширения хроматографических пиков. Отметим, однако, что для струйного сепаратора весьма важно устройство и расположение сопел, небольшие отклонения от оптимальных размеров могут отрицательно сказаться на эффективности.

Преимущество стекла как материала для струйного сепаратора — его химическая инертность, но трудно обеспечить необходимую точность изготовления. В одном из вариантов стеклянного сепаратора для получения расширительного и приемного сопел вырезают часть стеклянного капилляра, оставшаяся часть образует сопла, расположенные на заданном расстоянии.

Принципиальным недостатком струйного сепаратора является его негибкость. Большинство систем конструируется с фиксированным расширительным соплом для потока до 20 мл/мин при атмосферном давлении; при этом достаточно хорошая эффективность имеет место для потоков 16—24 мл/мин. Было сделано несколько попыток разработать регулируемый струйный сепаратор. Одна из них описана Брэдли и Шэнном [38], которые меняли расстояние между двумя соплами в пределах 0—1,4 мм для оптимизации условий и зависимости от скорости потока и интервала молекулярных масс. Было показано, что для соединений с молекулярными массами около 350 при уменьшении этого расстояния от 0,8 до 0,4 мм эффективность увеличивается от 20 % до 80 %. Однако стоимость такого сепаратора велика, и он не получил большого распространения.

В мембранном сепараторе, предложенном Ливеллином и Литлджоном, камера, в которую вводится поток из хроматографа, отделяется от вакуумной системы масс-спектрометра мембраной из силиконовой резины толщиной 0,025—0,040 мм (рис. 1-8). Газ-носитель и образец, проходящие над мембраной, диффундируют сквозь нее в масс-спектрометр. Проницаемость мембраны для органических веществ в 20—100 раз выше, чем для гелия и других неорганических газов. Обычно степень

обогащения равна 10—20 %, а эффективность 30—90 %. Мембранный сепаратор прост. Он может состоять из одной или двух ступеней. В одноступенчатом сепараторе давление на выходе обычно соответствует атмосферному, в двухступенчатом давление на выходе первой ступени обычно равно атмосферному, на выходе второй ступени создается форвакуум.

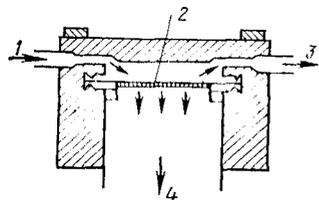


Рис. 1-8. Мембранный молекулярный сепаратор [38]:

1 — поток из газового хроматографа; 2 — мембрана из силиконовой резины; 3 — поток в масс-спектрометре; 4 — откачка.

Было показано [1], что эффективность мембранного сепаратора определяется выражением

$$Y = 1 - \exp \left[- \frac{A}{l} \frac{SD}{V} \right]$$

где A — площадь мембраны; l — толщина мембраны; SD — проницаемость (произведение растворимости S на коэффициент диффузии D); V — поток.

Для мембраны площадью 15 см² и толщиной 0,0025 см при потоке 30 мл/мин поток гелия через мембрану меняется в пределах от 1 до 4 мл/мин при изменении температуры от 50 до 200 °С. Большинство мембранных сепараторов имеет площадь 1—2 см², что позволяет получать поток в масс-спектрометре около 0,3—0,6 мл/мин. Конечно, уменьшение потока гелия сопровождается и уменьшением пропускания образца, и эффективность равна 30—60 % в зависимости от проницаемости мембраны для образца.

Мембранные сепараторы весьма удобны для использования в ГХ—МС. Так как давление в области мембраны равно атмосферному, времена удерживания не искажаются из-за несбалансированного потока, как это может иметь место при капиллярном ограничителе. Выходящий поток, который может содержать 10—50 % образца, можно направить в любой другой газохроматографический детектор. Конструкция сепаратора позволяет избежать больших мертвых объемов (сепаратор имеет мертвый объем менее 0,02 см³). Мембранный сепаратор может работать в большом интервале скоростей потока как при низких (8—10 мл/мин), так и при высоких (60—80 мл/мин) скоростях. Мембранные сепараторы относительно недороги, одноступенчатый сепаратор не требует никакого дополнительного насоса. Однако недостатки мембранных сепараторов также очень серьезны. Основная проблема при работе с ними — оптимизация рабочей температуры. Нижний предел рабочих температур 75—80 °С; верхний 225—230 °С. Необходимость работать при более высоких температурах вызывает значительные

осложнения: срок службы мембраны заметно уменьшается, и может произойти разгерметизация системы. Кроме того, для каждого соединения имеется оптимальная температура, при которой достигается компромисс между растворимостью и диффузией этого вещества в материал мембраны. При слишком высокой температуре мала растворимость, при слишком низкой мала диффузия. Для лучшего приближения к оптимальной температуре сепаратора обычно программируют параллельно программированию температуры колонки. Следует также иметь в виду, что некоторые вещества могут взаимодействовать с материалом мембраны (например, первичные амины). Мембранный сепаратор вызывает также некоторое расширение хроматографических пиков.

Сравнительные характеристики трех основных типов сепараторов приведены в табл. 1-1.

Из других сепараторов назовем *серебряно-палладиевый сепаратор*, предложенный Луцero и Хейли и разработанный Симмондсом и др. [39]. Его действие основано на уникальном свойстве серебряно-палладиевой мембраны — высокой проницаемости для водорода и практически полной непроницаемости для других газов и паров органических соединений при температуре 250 °С. Он представляет собой электролитическую ячейку, состоящую из двух палладиево-серебряных трубок, между которыми находится смесь гидроксидов калия и лития. Внутренняя трубка предназначена для газа-носителя, она служит анодом, внешняя — катодом. В ячейке газ-носитель (H₂) удаляется полностью, а органические соединения и другие газы проходят в масс-спектрометр. Этот сепаратор обладает рядом достоинств: 100 %-ная эффективность; полное удаление газа-носителя; не требуется откачка интерфейса; не происходит расширения пиков; отсутствует эффект памяти. Недостатками его являются ограниченный интервал скоростей потока, зависящий от устройства интерфейса; ограниченный интервал рабочих температур (200—250 °С); возможность химических превращений анализируемых веществ; необходимость использования в качестве газа-носителя только водорода; медленное удаление газа-носителя при загрязнении палладиево-серебряной трубки соединениями серы и иода.

Не получили большого распространения и тефлоновые сепараторы; их действие основано на том, что при температуре выше 250 °С тефлон становится легко проницаемым для гелия. Такой сепаратор, описанный в [1], состоит из тефлонового капилляра (внутренний диаметр 0,025 см, толщина стенок 0,01 см, длина 200 см), помещенного в вакуумную камеру, откачиваемую форвакуумным насосом. Эффективность такого сепаратора достигала 80—90 %, а коэффициент обогащения — до 200, однако возможны дискриминации для разных органических соединений; отмечались также искажения хроматографических пиков и времен удерживания.

Таблица 1-1. Характеристики различных типов ЖХ — МС сепараторов [36]

Тип сепаратора	Эффективность, % $V_{ЖХ} = 20$ мл/мин $V_{МС} = 1$ мл/мин	Обогащение $V_{ЖХ} = 20$ мл/мин $V_{МС} = 1$ мл/мин	Величина потока, мл/мин	Интервал температур	Недостатки
Эфузионный	20—30	4—7	10—30 Для других величин потока необходима рестройка	Пористый нежелательно нагревать выше 225 °С; щелевой из золота, сапфира может работать до 300 °С	Плохое обогащение при низких молекулярных массах; пористый вызывает разложение или адсорбцию
Струйный	30—70 Должна быть обеспечена соосность с высокой точностью, эффективность возрастает с увеличением молекулярной массы	6—14	Для других величин потока необходима рестройка; редко используется при меньших потоках	Для стеклянного до 300 °С; сепаратор из нержавеющей стали может вызвать разложение при температуре выше 260 °С	Плохое обогащение при низких молекулярных массах
Мембранный	30—80 Зависит от проницаемости мембраны для образца, размеры редко оптимизированы для достижения максимальной эффективности	10—30	1—60 Эффективность зависит от величины потока	Желательно поддерживать температуру мембраны ниже 225 °С; при 250—260 °С время жизни сепаратора уменьшается	Обогащение зависит от типа соединений и температуры кипения; требуется оптимизация температуры для каждого соединения (программирование температуры; материал мембраны может реагировать с анализируемыми веществами (например, первичными аминами); мембрана может ломаться (особенно при высокой температуре), требуется обезгаживание

По-видимому, не существует идеального интерфейса, который удовлетворял бы всем требованиям. В каждом отдельном случае необходимо подбирать интерфейс, наиболее подходящий для решения конкретной задачи. Выбор сепаратора определяется обычно его стоимостью, удобством конструкции, эффективностью удаления газа-носителя, гибкостью и рабочими характеристиками.

1.4. СОЕДИНЕНИЕ ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФА С МАСС-СПЕКТРОМЕТРОМ

Соединение жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии было несбыточной мечтой многих исследователей с самого начала работ по хромато-масс-спектрометрии. С одной стороны, ЖХ незаменима при анализе многих биологических объектов, термически нестабильных и нелетучих соединений, которые не разделяются с помощью газовой хроматографии, с другой стороны, обычные детекторы для ЖХ не обладают достаточной гибкостью и универсальностью. Однако непосредственное соединение ЖХ с МС долгое время не удавалось, так как эти методы сочетаются гораздо труднее и возникающие проблемы на несколько порядков сложнее, чем в ГХ—МС. В то же время достаточно хорошие результаты получали при раздельном применении обоих методов с независимым отбором элюируемых фракций из ЖХ колонки, выпариванием растворителя и переносом вещества в систему напуска масс-спектрометра. В этом случае жидкостной хроматограф и масс-спектрометр работают независимо друг от друга в своем оптимальном режиме. Можно использовать любые ЖХ системы с любыми элюентами и специальные методы масс-спектрометрии, разработанные для анализа малолетучих и термически нестабильных веществ, такие как ПД, лазерная десорбция, ДХИ, плазменная десорбция, иницируемая продуктами распада ^{252}Cf , масс-спектрометрия вторичных ионов и др. Отбор фракций и испарение растворителя могут быть автоматизированы; труднее, правда, осуществить автоматический перенос их и ввод в масс-спектрометр [44]. Однако практически невозможно создать коллектор фракций для очень сложных смесей неизвестного состава, таких, как биологические жидкости, природные масла, нефтяные фракции и т. п. Отбор фракций невозможен и в случае быстро элюирующихся пиков, например, на современных колонках для ВЭЖХ с эффективным числом теоретических тарелок до 50000.

Непосредственное соединение ЖХ с МС, аналогичное ГХ—МС, обеспечивает значительное сокращение времени анализа, позволяет осуществлять количественный анализ и селективное детектирование выбранных ионов, использовать математические методы обработки данных для разделения неразрешенных пиков. Поэтому поиск удовлетворительных интерфейсов для непосредственного соединения ЖХ и МС начался еще в 1960-х годах.

В 1968 г. Тальрозе и сотр. [45] показали, что малые количества жидкости из ЖХ колонки можно вводить непосредственно в масс-спектрометр через тонкий капилляр, размеры которого достаточно малы, чтобы обеспечить поток жидкости, соответствующий рабочему потоку газа через масс-спектрометр. Однако в случае источника с ЭУ ионизацией требуется сильное ограничение потока, так что используемая часть образца составляет менее 0,1 %. В дальнейшем был предложен целый ряд различных способов непосредственного соединения ЖХ и МС, некоторые из них были реализованы в промышленных приборах [46].

Соединение ЖХ и МС предъявляет серьезные требования ко всем трем компонентам системы: хроматографу, масс-спектрометру и интерфейсу.

Для нормальной работы жидкостного хроматографа желательно, чтобы соединение его с масс-спектрометром не накладывало слишком сильных ограничений на виды растворителей, применяемых для элюирования, величину потока растворителя, не препятствовало возможности градиентного элюирования, применения летучих и нелетучих буферов, реагентов в виде ионных пар. Для поддержания вакуума в масс-спектрометре поток газа не должен превышать 20 мл/мин; желательно иметь возможность использовать разные методы ионизации, прежде всего ЭУ и ХИ; должна быть обеспечена возможность сканирования полного масс-спектра и непрерывного детектирования выбранных ионов; возможность выбора разных газов-реагентов при ХИ, возможность анализа как положительных, так и отрицательных ионов; для обеспечения высокой чувствительности шумы и фон должны быть минимизированы, а наложения от растворителя и от примесей в нем малы. Интерфейс должен обеспечивать высокую степень обогащения образца по отношению к растворителю, высокую эффективность переноса образца из колонки в ионный источник, отсутствие расширения хроматографических пиков, возможность испарения малолетучих образцов.

Наибольшие трудности возникали из-за сильного разбаланса потоков между элюатом, выходящим из ЖХ колонки (до 2000 мл/мин эквивалентного газа), и газовым потоком в масс-спектрометре, который редко превышает 20 мл/мин (даже при ХИ), а также из-за необходимости испарения труднолетучих и термически нестабильных образцов.

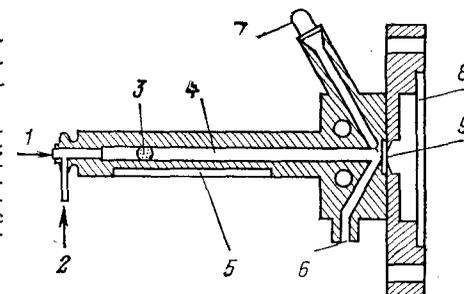
Рассмотрим основные конструкции интерфейсов для ЖХ—МС.

Соединение с источником ИАД. Большой поток через масс-спектрометр трудно осуществить при использовании обычных методов ЭУ или ХИ. Однако ионный источник с ионизацией при атмосферном давлении может работать с потоками газов и паров в несколько сот мл/мин, что сравнимо с потоком элюата через ЖХ колонку. Сочетание ЖХ—МС — ИАД было

осуществлено Хорнингом и др. [47] (рис. 1-9). Элюат из хроматографической колонки поступает в нагреваемую испарительную трубку и в потоке подогретого газа-носителя (азот или гелий) переносится в ионную плазму. Ионизация происходит в коронном разряде при атмосферном давлении в результате ряда

Рис. 1-9. Ионный источник с ионизацией в коронном разряде при атмосферном давлении для ЖХ—МС [47]:

1 — поток из жидкостного хроматографа; 2 — поток нагретого газа-носителя; 3 — фильтр из стекловаты; 4 — испарительная стеклянная трубка; 5 — нагреватель; 6 — выход для паров растворителя; 7 — электрод; 8 — фланец с вакуумным уплотнением; 9 — диафрагма для пропускания паров образца.



ионно-молекулярных реакций. Часть ионов из плазмы отбирается в квадрупольный масс-спектрометр через диафрагму с отверстием 25 мкм. Ионизация осуществлялась также пучком тепловых электронов из радиоактивного источника [44]. Оба метода дают идентичные первичные и вторичные ионы, но такие характеристики, как предел обнаружения и динамический диапазон, различны. При непосредственном соединении колонки с источником ИАД предел обнаружения при анализе дибензальацетона составляет около 1 нг, это на три порядка выше, чем при непосредственном вводе неразделенного образца в источник ИАД. Чувствительность зависит от сродства к протону или для отрицательных ионов — к электрону. Вещества с низкой летучестью не могут анализироваться, так как их трудно перевести в газовую фазу при атмосферном давлении. Кроме того, высокое давление газа в ионном источнике способствует образованию кластерных ионов из молекул полярных растворителей. Эти ионы включают до пяти и более молекул растворителя и сильно затрудняют анализ низкомолекулярных полярных веществ. Этого недостатка лишен интерфейс с распылительной каплеобразующей системой ввода образца в ионный источник с ИАД и специальной камерой диссоциации кластерных ионов [47]. Поток жидкости из хроматографа распылялся ультразвуковым вибратором с частотой 1,7 МГц, образующиеся капли малого размера смешивались с нагретым N_2 (0,7 л/мин) и переносились им в ионный источник с ИАД. Температура источника и коммуникаций поддерживалась равной 150—200 °С. Для получения первичных ионов служил коронный разряд (ток 5 мкА), образующиеся в большом количестве кластерные ионы диссоциировали с образованием протонированных молекулярных ионов в специальной промежуточной

камере, отделенной от источника ионов диафрагмой с отверстием диаметром 0,1 мм и откачиваемой механическим роторным насосом (1200 л/мин) до давления 10—20 Па. Диссоциация происходит в результате возбуждения столкновениями при приложении напряжения дрейфа 50 В между первым и вторым апертурными электродами. Ускоряющий потенциал, приложенный ко второй апертурной диафрагме (0,4 мм), равен 3 кВ. С помощью этой системы были получены масс-спектры различных нелетучих соединений: аминокислот, олигопептидов, антибиотиков, нуклеозидов, витаминов, гликозидов, алкалоидов и показана возможность получения для них молекулярных или квазимолекулярных ионов. В качестве растворителей могут использоваться вода, метиловый спирт, ацетон, которые могут содержать соли с концентрацией до 0,5 М. Протонированные молекулы растворителя служат ионами-реагентами при ИАД.

Интерфейс с полупроницаемой мембраной из диметилсилоксановой резины, аналогичный используемому в ГХ—МС, был применен для ЖХ—МС Джонсом и Янгом [48]. Этот интерфейс представлял собой трехступенчатую систему и предназначался для анализа ароматических углеводородов на колонке с обращенными фазами. Однако он не обеспечивал достаточно высокого обогащения образца и в нем происходило значительное расширение хроматографических пиков. Действительно, если для органических и неорганических газов соотношение проницаемостей мембраны равно (20—100): 1, то для веществ, анализируемых с помощью ЖХ, по отношению к обычным ЖХ растворителям — не более 5:1. Очевидно, что эти мембраны непригодны для универсального ЖХ—МС интерфейса. Следует также иметь в виду, что парциальное давление образца обычно намного ниже, чем у растворителя, и что необходима повышенная рабочая температура.

Интерфейс с непосредственным вводом жидкости (НВЖ) — наиболее простой путь соединения жидкостного хроматографа и масс-спектрометра. Этот метод был впервые предложен Тальрозе с сотр. [45]. В сочетании с ЭУ ионизацией этот метод требует слишком большого деления потока (до 1:10⁴), что уменьшает чувствительность. Недостатками этой системы являются также трудность анализа малолетучих веществ и частое засорение соединительного капилляра. К достоинствам ее относится возможность анализа элюатов, содержащих большое количество воды (до 70 %) [49]. Увеличение эффективности на 1—2 порядка может быть достигнуто при использовании ХИ, когда газ-носитель служит газом-реагентом [38, 50].

Изучение ряда растворителей, обычных для ВЭЖХ, показало, что они вполне приемлемы для использования в ЖХ—МС—ХИ с НВЖ интерфейсом. В число этих растворителей входят *n*-пентан, изоктан, бензол, хлороформ, тетрагидрофуран, ацетонитрил, метанол, вода, буферные растворы [32].

В настоящее время этот тип интерфейса широко используется и реализован в промышленных ЖХ—МС системах.

В интерфейсе с непосредственным вводом элюата в ионный источник фирмы Hewlett—Packard [46] зонд или делитель потока вводится через вакуумный шлюз вплотную к области ионизации. В дополнение к обычному диффузионному насосу использован криогенный насос в самом источнике в виде охлаждаемых жидким азотом медных пальцев. Образец проходит из колонки через сменную диафрагму с отверстием 5—15 мкм, размер отверстия подбирается в зависимости от вязкости растворителя. При использовании обычной ЖХ колонки с потоком 1 мл/мин в источник поступает около 0,3—1 % элюата. Зонд охлаждается водой для предотвращения преждевременного испарения элюата, проходящего через нагретый ионный источник к области ионизации. Этот метод используется для решения различных аналитических задач. Несмотря на то, что в масс-спектрометре поступает лишь небольшая часть элюата, чувствительность находится на нанogramмовом уровне [38].

Хотя такая система сравнительно проста по устройству, для обеспечения оптимальной эффективности должен тщательно контролироваться градиент температуры между интерфейсом и ионным источником. Этот интерфейс может использоваться и с магнитными секторными, и с квадрупольными приборами, хотя модификация для квадрупольных масс-спектрометров обычно проще, так как в этом случае постоянное напряжение в источнике низкое и нет опасности возникновения дугового разряда.

В первых моделях НВЖ интерфейсов ограничителем потока служил длинный узкий капилляр из стекла или металла с малым отверстием со стороны ионного источника или тонкая металлическая проволока, введенная внутрь капилляра для уменьшения потока жидкости [51]. Так как жидкости несжимаемы, давление в них линейно уменьшается внутри трубки от выхода из колонки до входа в ионный источник, где оно равно давлению паров растворителя. Вследствие высокой вязкости жидкостей (по сравнению с газами) и наличия капиллярных сил скорость потока через трубку внутренним диаметром 50 мкм при перепаде давлений от атмосферного до вакуума в источнике не превышает 10 см/с. Нелетучие вещества и примеси в растворителе с большой молекулярной массой накапливаются внутри капилляра и засоряют его. Нагревание конца трубки не дает желаемого результата, так как переходная зона жидкости — газ просто сдвигается вдоль капилляра. Эффективность улучшается, если капиллярную трубку заменить на диафрагму с регулируемой температурой. Интерфейс должен иметь комнатную температуру, чтобы не было перегрева и преждевременного испарения жидкости.

НВЖ интерфейсы были в дальнейшем усовершенствованы: образец в ионный источник вводится в виде струи, состоящей

из отдельных капель жидкости [52]. Распыление струи жидкости на отдельные капли осуществляется при пропускании ее с большой скоростью через капилляр и отверстие в диафрагме, отстоящей на некотором расстоянии от конца капилляра. Испарение растворителя из капель струи происходит в специальной камере, откуда газовая смесь поступает в ионный источник (ХИ). Капли обычно имеют диаметр около 10 мкм, они эжектируются из отверстия в диафрагме с высокой скоростью (около 10 м/с) и сразу же охлаждаются благодаря испарению растворителя в вакууме. При давлении несколько сот паскалей, необходимом для ХИ, капли могут приобретать только небольшую энергию при столкновениях или за счет поглощения излучения. Расчет показывает, что капля чистого метанола диаметром 50 мкм при температуре 300 °С и давлении 133 Па испаряется за 0,5 с, достигая температуры —64 °С. Таким образом, вещество, растворенное в каплях, проходит расстояние около 1 см в очень мягких условиях, перед тем как войти в ионный источник, где происходит его ионизация плазмой.

Этот интерфейс имеет следующие недостатки: чувствительность детектирования положительных ионов достаточно высока только для веществ с молекулярными массами больше 150; он сочетается только с химической ионизацией; для анализа используется только 1—4 % элюата. Однако этот интерфейс прост по устройству, позволяет работать с любыми летучими, а также с труднолетучими и термически нестабильными веществами и растворителями с высоким содержанием воды (до 70 %), не обнаруживает эффектов «памяти» [53]. В случае колонок 5 см × 4,5 мм, работающих при пониженной скорости потока (1 мл/мин), чувствительность равна 50—500 нг при регистрации полного масс-спектра и 2—20 нг при селективном детектировании отдельных ионов. Чувствительность зависит от относительного сродства к протону растворителя и растворенного вещества, формы ЖХ пика, летучести образца.

Струйный интерфейс был предложен для обогащения элюата и удаления избытка растворителя перед вводом в ионный источник с тем, чтобы исправить один из самых серьезных недостатков НВЖ интерфейсов — низкую эффективность использования образца. Струйный сепаратор для ЖХ—МС аналогичен применяемому в ГХ—МС. Такеучи и др. [54] применили такой струйный сепаратор в качестве интерфейса для соединения микрокапиллярной колонки (поток 8 мкл/мин) с масс-спектрометром с химической ионизацией. Для бифенила коэффициент обогащения был равен 8, а эффективность 80 % (растворитель ацетонитрил — вода 70 : 30). При потоках 1—16 мкл/мин получены результаты, сравнимые с результатами для НВЖ интерфейса без обогащения. Однако поскольку количество растворителя, поступающего в ионный источник, оставалось большим, можно было использовать только химическую ионизацию.

В более совершенных системах предприняты попытки увеличить скорость испарения растворителя. Вестал и др. [55] осуществили быстрое испарение растворителя и образца лазерным пучком. Элюат из жидкостного хроматографа поступает в область испарения через капилляр из нержавеющей стали диаметром 0,015 см; струя жидкости, выходящая из капилляра со скоростью 1 мл/мин, пересекается сфокусированным пучком CO₂-лазера мощностью 50 Вт. С помощью линз из селенида цинка с фокусным расстоянием 12,5 см пучок излучения с длиной волны 10,6 мкм фокусируется в пятно диаметром 0,025 см в месте пересечения со струей, что соответствует плотности энергии 10⁵ Вт/см². Эта интенсивность излучения достаточна, если оно полностью поглощается, для испарения воды за ≈ 10⁻⁴ с (время, за которое струя пересекает лазерный пучок).

Быстрое испарение превращает жидкость в струю пара, которая проходит через небольшое отверстие в тонкой молибденовой пластине. Сольватированные нелетучие молекулы увлекаются струей пара. Диафрагма служит как бы соплом для «сверхзвукового» молекулярного пучка. В области между соплом и расширителем пары подвергаются адиабатическому расширению.

В первом варианте этого устройства осуществлялась химическая ионизация пучка в области относительно высокого давления между соплом и расширителем с помощью электронной пушки с дифференциальной откачкой, однако чувствительность была малой из-за неэффективного переноса ионов в анализатор [53]. В более совершенном варианте источник ХИ соединен с распылителем обогреваемой трубкой. Все пары, проходящие через распылитель, поступают в ионный источник при давлении около 133 Па. При работе в режиме ЭУ эта трубка удалялась и получался открытый ионный источник, давление паров в котором составляет 0,1 Па.

Хотя ЖХ—МС интерфейсы с молекулярными пучками и прямым лазерным нагревом обеспечивают возможность работы с водными подвижными фазами, такой нагрев малоэффективен, и необходимо увеличивать либо плотность энергии лазерного пучка (примерно на порядок), либо время контакта струи с пучком [53]. Увеличение эффективности нагрева было достигнуто заменой лазерного нагрева кислородно-водородным пламенем [56].

В этих интерфейсах несмотря на высокую температуру испарителя пиролиз образца практически отсутствует, так как образец находится в зоне высокой температуры очень малое время и защищен от перегрева растворителем. Жидкость, входящая в область высокой температуры, нагревается до температуры испарения за несколько миллисекунд, и пар выходит из этой области не позже чем через 1 мс после его образования. Около 95 % жидкости испаряется, а остаток представляет собой аэрозоль с частицами жидкости массой около 10⁻⁷ г.

При расширении газа эти частицы ускоряются до 10^5 см/с и с большей вероятностью, чем молекулы паров, проходят через диафрагму в ионный источник. Этим достигается высокая эффективность переноса в ионный источник нелетучих соединений, молекулы которых находятся в частицах аэрозоля. Когда частицы сталкиваются с нагретым зондом, они полностью или частично испаряются, и в газовой фазе происходит химическая ионизация. Ионы, образующиеся из молекул растворителя, служат ионами-реагентами. При скорости водных элюентов до 1 мл/мин эффективность переноса в ионный источник составляет 50 % для нелетучих образцов и 5% для растворителя. Прибор может работать в течение нескольких недель без необходимости разборки, чистки и замены деталей. С его помощью было изучено несколько сот биологически важных молекул (аминокислоты, пептиды, нуклеотиды и нуклеозиды) по масс-спектрам положительных и отрицательных ионов [56]. Характеристики аэрозольного интерфейса при различных рабочих параметрах (скорость газа, температура, летучесть анализируемых веществ) изучены в работе [57].

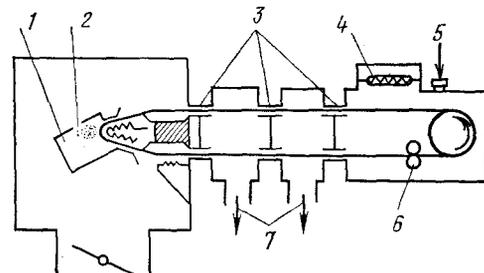
Аналогичная система была предложена Футрелом и др. [58]. Быстрое испарение растворителя достигалось с помощью ультразвукового диспергатора. Хотя степень обогащения в этих системах не очень велика, они обеспечивают достаточное удаление растворителя для работы в режиме ЭУ ионизации, однако чувствительность значительно ниже, чем обычно при химической ионизации.

Интерфейсы с выпариванием растворителя, основанные на преимущественном испарении более легкокипящего растворителя, обеспечивают более высокую степень обогащения элюата, который целиком поступает в масс-спектрометр. В одной из подобных систем [59] интерфейс концентрирует поток жидкости, позволяя ему стекать по нагреваемой электрическим током проволоке переменного сечения, температура которой меняется по ее длине; остаток жидкости поступает в масс-спектрометр через капилляр и игольчатый вентиль. Этот интерфейс обеспечивает испарение около 95 % растворителя, т. е. 20-кратное обогащение при скоростях потока растворителей 3 мл/мин в случае *n*-пентана; 2,8 мл/мин — для 2,2,4-триметилпентана; 1,7 мл/мин — для метанола и 0,7 мл/мин — для смеси метанола и воды (50 : 50). С чистой водой нельзя получить хорошие результаты, так как поверхность провода гидрофобна, что вызывает образование крупных капель. Указанные максимальные скорости потока коррелируют с теплотами испарения, но они зависят также от летучести, вязкости, поверхностного натяжения. Давление в ионном источнике позволяет получать масс-спектры в режиме ХИ и ЭУ. Этот интерфейс использовался при анализе полициклических ароматических углеводородов, определении фенолов в сланцевой смоле [59].

Интерфейс с движущимся транспортером, наряду с НВЖ системами, является в настоящее время одним из основных типов интерфейсов, используемых в ВЭЖХ—МС. Скотт и др. [60] использовали транспортер с движущейся проволокой, проходящей через вакуумный шлюз, для переноса элюата из ЖХ в ионный источник масс-спектрометра, но доля отбираемого

Рис. 1.10. Транспортный интерфейс для ЖХ—МС [46]:

1 — ионизационная камера; 2 — область электронного пучка; 3 — вакуумные уплотнения; 4 — ИК испаритель; 5 — поток из ЖХ колонки; 6 — привод транспортера; 7 — откачка.



элюата составляла только около 1 % потока через ЖХ колонку.

Эти работы были продолжены МакФадденом [38, 46]. Предложенный им ленточный транспортер обеспечивал перенос большого количества элюата. В настоящее время интерфейсы этого типа выпускаются фирмами Finnigan (США), VG Micro-mass (Англия). На рис. 1-10 показана схема интерфейса с движущимся транспортером. Элюат из ЖХ колонки или после прохождения через предварительный детектор наносится на транспортер непосредственно или через делитель потока. Транспортер представляет собой ленту шириной около 0,3 см из металла (обычно нержавеющей стали) или полиимидного полимера — каптона. Транспортер из нержавеющей стали имеет большую емкость, но каптон используется чаще, так как обеспечивает испарение нестабильных соединений при более низкой температуре.

Поток растворителя, который может принять транспортер, зависит от вида растворителя и может достигать до 1,5 мл/мин для летучих неполярных растворителей, а для воды или водных растворов до 0,1—0,2 мл/мин.

Тонкий слой элюата на транспортере проходит через область испарения растворителя, в которой интенсивное излучение, создаваемое инфракрасными лампами, сфокусировано эллиптическим цилиндрическим зеркалом непосредственно на поверхности транспортера. Остатки растворителя и анализируемое вещество через два вакуумных шлюза поступают в вакуумную систему масс-спектрометра. Здесь имеется нагреваемая камера вблизи области ионизации, в которой образец подвергается мгновенному испарению. На выходе из ионного источника предусмотрен нагреватель для удаления остатков вещества, которые могли бы дать ложные пики в масс-спектрах при очеред-

ном возвращении транспортера в ионный источник. Здесь же механическим путем удаляются нелетучие вещества, буферные системы и реагенты с ионными парами.

Количество растворителя, которое попадает в ионный источник, составляет 10^{-7} — 10^{-8} г/с. Это намного меньше, чем обычно используется в случае ХИ (около 10^{-4} г/с), поэтому можно выбрать любой режим ионизации: либо ЭУ, либо ХИ с каким-либо вводимым отдельно реагентом.

Измерение эффективности переноса образца в ионный источник с помощью интерфейса с движущимся транспортером показало, что для большинства веществ интегральный сигнал составляет 30—40 % величины сигнала от такого же количества вещества, введенного непосредственно в ионный источник. Температура системы мгновенного испарения образца в ионном источнике должна устанавливаться в зависимости от природы анализируемого вещества, но для большинства соединений допускается достаточно широкий интервал изменения этой температуры (50—80 °С). Типичные рабочие температуры испарителя: 175—200 °С для простых пептидов, метаболитов; 240—260 °С для полифункциональных стероидов, некоторых антибиотиков; 290—320 °С для порфиринов, триглицеридов. Нижний предел допускаемых температур кипения для летучих соединений 170—180 °С [46].

Интерфейс с ленточным транспортером вызывает минимальное изменение разрешения и формы хроматографических пиков. Так, если высота минимума между двумя соседними пиками, зарегистрированными УФ-детектором, равна 5—7 % от высоты пиков, то при использовании интерфейса с ленточным транспортером она увеличивается до 8—12 % [38]. Применимость этого интерфейса для широкого круга термически нестабильных и нелетучих веществ показана на примерах анализа различных микотоксинов, триглицеридов, восков, порфиринов, антибиотиков, пестицидов, простагландинов, желчных кислот, нуклеозидов, нуклеотидов, дисахаридов и др. [46].

Пожалуй, одним из самых больших достоинств этой системы является возможность соединить ее с методами ионизации, эффективными для нелетучих веществ, такими, как полевая и лазерная десорбция, масс-спектрометрия вторичных ионов и др. Она может служить в этих случаях не только интерфейсом для соединения ЖХ и МС, но и удобной системой ввода нелетучих образцов в масс-спектрометр.

Хардин и Вестал [32] использовали систему с движущимся транспортером для непрерывного ввода образца в масс-спектрометр с лазерной десорбционной ионизацией. Транспортер в виде ленты из нержавеющей стали длиной 150 см, шириной 0,1 см и толщиной 0,005 см приводится в движение двигателем постоянного тока и вводится в вакуумную систему через уплотнения с прокладками. Скорость ленты 10—30 см/мин соответствует 50—150 лазерным импульсам на 1 см ленты при частоте

следования импульсов 25 Гц, это позволяет удалить большую часть образца за один проход ленты. Скорость сканирования масс-спектров обеспечивает примерно 5 импульсов на одну единицу массы. Пучок от перестраиваемого лазера на красителе через линзу с фокусным расстоянием 10 см и пирексовое окно направляется на движущуюся ленту под углом 45° к оси квадрупольного масс-фильтра так, чтобы в точке контакта ось луча была перпендикулярна ленте. Длина волны излучения составляла 483 нм, длительность импульса 5—7 нс, энергия 400 мкДж.

Масс-спектры лазерной десорбционной ионизации были зарегистрированы на этой системе для ряда нелетучих образцов — аминокислот, пептидов, нуклеозидов, сахаридов. В большинстве случаев предел обнаружения составлял 1 нг/см² и менее. Основная трудность при работе с этой системой заключалась в отсутствии воспроизводимости как относительных интенсивностей пиков основных ионов, так и их абсолютных интенсивностей. Главный источник этих изменений — неоднородность покрытия поверхности ленты образцом, примеси и фоновые загрязнения. Непосредственное нанесение раствора образца на ленту с последующим испарением растворителя не дает удовлетворительных результатов, так как степень смачивания ленты и движение жидкости по поверхности влияют на однородность слоя и, как следствие, на форму пиков [61]. Для полного испарения растворителя при ограничении испарения образца необходим тщательный баланс между потоком растворителя и скоростью испарения.

Значительно лучшая воспроизводимость получается при нанесении образца методом электропульверизации [26]. В этом случае получена линейная зависимость величины сигнала от количества нанесенного образца в пределах 10 нг/см²—1 мкг/см²; относительное среднеквадратичное отклонение составляло 5—15 %.

Универсальная установка с интерфейсом с движущимся транспортером, обеспечивающая высокую селективность и чувствительность при разных методах ионизации, описана в работе [62]. Она включала тройной квадрупольный масс-спектрометр с ионным источником для получения масс-спектров вторичных ионов, который позволял также работать в режиме электроударной ионизации и термодесорбции. Использование масс-спектрометрии вторичных ионов в сочетании с ленточным интерфейсом предъявляет ряд требований, отличных от требований к обычным ЖХ—МС приборам. Они заключаются в возможности сохранения образцов для повторного анализа. Основной частью интерфейса является лента шириной 0,63 см, толщиной 0,008 см и длиной 320 см, образующая непрерывную петлю. Было найдено, что приемлемыми механическими свойствами для изготовления ленты обладают высококачественные молибден, никель и платина. Использовалась лента из никеля

99,97 %-ной чистоты. ЖХ элюат наносился на ленту в виде аэрозоля в потоке аргона. Интерфейс имел четыре области дифференциальной откачки и относительно широкие щели ($0,04 \times 0,7$ см) для прохождения транспортера без контакта с какими-либо поверхностями. Максимальный поток при использовании нагревателя 500 Вт мог достигать 10 мл/мин для

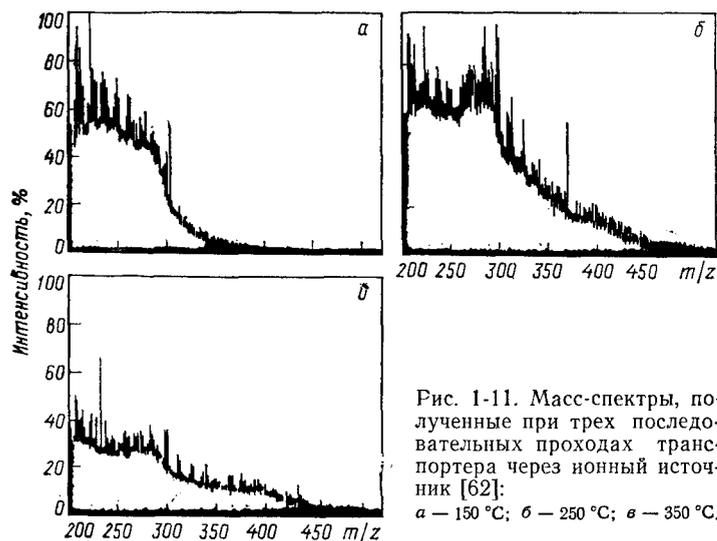


Рис. 1-11. Масс-спектры, полученные при трех последовательных проходах транспортера через ионный источник [62]:
а — 150 °С; б — 250 °С; в — 350 °С.

гексана и метиленхлорида и 4 мл/мин для метанола и пропанола-2. Для воды этот предел составлял 0,5—0,7 мл/мин, но мог быть доведен до 1 мл/мин.

Ухудшение хроматографического разрешения может быть вызвано следующими причинами: течением жидкости на транспортере перед испарением; влиянием щелей; наличием некоторого эффективного участка транспортера, с которого происходит десорбция или ионизация. При аэрозольном способе нанесения образца существенно уменьшается влияние первой причины. При термической десорбции длина нагреваемого участка транспортера около 1 см; в режиме МСВИ детектируются только ионы, образующиеся в области диаметром 0,5 см. Анализ пятен образца, нанесенных на транспортер вручную, показал, что расширения из-за влияния щелей не происходит: таким образом, некоторое ухудшение хроматографического разрешения может быть связано с нанесением образца и с ионизацией [63]. С помощью транспортерного интерфейса можно многократно пропускать хроматографически разделенные вещества через область ионизации, получая масс-спектры в разных условиях. На рис. 1-11 показаны хроматограммы по полному ионному току для сложной смеси (синтетического топлива), полу-

ченные при трех проходах транспортера при температурах нагревателя 150, 250 и 350 °С [62]; скорость транспортера 10 см/мин, время сканирования масс-спектра 10 с.

Специальными опытами при нанесении образцов вручную (от 0,01 нг до 1 мг аргинина) показано, что при количестве образца менее 1 нг (что примерно соответствует одному монослою) зависимость сигнала от количества образца близка к линейной, предел обнаружения менее 10 пкг.

Для очистки транспортера от остатков образца, загрязнений и примесей на поверхность нагретого транспортера наносился слой серебра [62].

Для переноса интерфейсами с движущимся транспортером растворителей, содержащих большое количество воды, понадобился ряд усовершенствований [64]. Размещение дополнительных нагревателей в каждой камере системы дифференциальной откачки позволило увеличить скорость транспортера [65]. Другой подход заключался в добавлении к элюату второго, не смешивающегося с водой, растворителя или в использовании жидкостно-жидкостной экстракции [66]. Эта методика была применена для анализа пестицидов класса карбаматов, элюентом служил неорганический буфер. Анализируемое вещество экстрагировалось метиленхлоридом, экстракт наносился на движущийся транспортер [64]. С помощью этой методики можно получать производные анализируемых веществ после выхода их из хроматографической колонки, например, для модификации веществ с низкой эффективностью экстракции или для увеличения давления паров нелетучих образцов.

Интерфейс, использующий метод образования производных, был применен также Прайвитом и Эрдалом [67]. Элюат переносился перфорированной лентой в реактор через камеру испарения. Анализируемые вещества восстанавливались до углеводородов в атмосфере водорода и затем поступали в интерфейс для ГХ—МС. Преимущество этого метода — возможность анализа нелетучих соединений, но не всегда удается соотнести масс-спектры углеводородов с исходной структурой.

Оба основных интерфейса для соединения ЖХ и МС — движущийся транспортер и НВЖ — нуждаются в делителе потока при работе с обычными ЖХ колонками (внутренний диаметр 4 мм, наполнитель из частиц 5—10 мкм). Однако деление потока приводит к неполному использованию образца, что во многих случаях нежелательно. В некоторой степени потеря образца может быть уменьшена при использовании коаксиального делителя [68], который отбирает для ввода в масс-спектрометр часть элюата из центра колонки. Если колонка прямая и ввод осуществляется аксиально, то степень обогащения может достигать до 2, вследствие более медленного переноса радиальной части потока (20 % образца при отборе 10 % элюата).

Уменьшение потока элюата может быть достигнуто с помощью микронабивных или капиллярных колонок [69]. В микро-

набивных колонках с диаметром 1 мм вместо обычных 4 мм скорость потока составляет 25—40 мкл/мин, при такой скорости можно использовать интерфейс НВЖ. Однако при этом может происходить значительное расширение пиков (влияние системы ввода образца, соединительных узлов и т. п.), что накладывает жесткие ограничения на размеры этих устройств (вклад ионного источника в расширение пиков незначителен, так как он работает при низком давлении).

Следует отметить, что чувствительность методов НВЖ значительно ниже, чем в ГХ—МС [70]. Так, достигнутый уровень чувствительности 0,1—5 мкг недостаточен для анализа объектов окружающей среды, метаболитов лекарственных препаратов и т. п. ЖХ—МС с микроколонками может обеспечить чувствительность, сравнимую с обычной ЖХ—МС, но в некоторых особо трудных случаях дает менее удовлетворительные результаты.

Многие вещества, особенно биологического происхождения, могут вызывать загрязнение ионного источника, что влияет на результаты анализа следующих образцов. Вместе с тем частая очистка источника отрицательно сказывается на производительности прибора. Для предотвращения попадания в ионный источник нежелательных веществ была разработана методика переключения потоков для системы ЖХ—МС с НВЖ интерфейсом [46].

Элюат из колонки подается на отдельный хроматографический детектор, а в масс-спектрометр с ХИ непрерывно подается чистый растворитель до начала выхода из колонки пика, который должен быть проанализирован на масс-спектрометре. Тогда потоки переключаются, и в ионный источник подается элюат из хроматографа. После выхода нужного пика потоки вновь переключаются, так что количество веществ, поступающих в масс-спектрометр, значительно уменьшается. Кроме того, ионный источник может работать в условиях, обеспечивающих получение максимальной чувствительности.

1.5. СОЕДИНЕНИЕ С ЭВМ

Система обработки данных, работающая в соединении с масс-спектрометром, должна обеспечивать ввод данных из масс-спектрометра, их накопление, хранение массивов данных, их преобразование и обработку, а также контроль параметров масс-спектрометра в реальном масштабе времени.

В простейшей системе обработки данных используется один процессор для обслуживания одного прибора или нескольких приборов такого же типа с одинаковыми требованиями к обработке данных. Такие системы называются специализированными. Они особенно удобны для масс-спектрометров с быстрым сканированием, требующих большой скорости ввода данных. На основе специализированных микро- и миникомпьютеров

построено большинство систем обработки данных современных масс-спектрометров.

В системах с разделенными ресурсами, в отличие от специализированных систем, большой центральный компьютер может управлять целым рядом отдельных приборов. Эти приборы могут подсоединяться через специализированные компьютеры меньшего размера, которые накапливают данные для их передачи в центральный компьютер. Это иерархическая система. Раздельные процессоры позволяют заменить аппаратные средства контроля приборов более гибкими программными средствами. Использование отдельных процессоров для накопления данных и управления приборами вместе с центральным миникомпьютером для операций более высокого уровня обеспечивает более гибкий подход к распределению ресурсов.

Аналого-цифровое преобразование. В большинстве систем накопления данных аналого-цифровой преобразователь (АЦП) преобразует входной аналоговый сигнал в серию цифровых сигналов, представляющих профиль входного аналогового сигнала.

Динамический диапазон АЦП является одной из основных характеристик, определяющих эффективность работы всей системы. Динамический диапазон в процессе сканирования масс-спектра может рассматриваться как диапазон между нижним пределом регистрации пика, содержащего такое малое число ионов, чтобы он мог еще регистрироваться как самостоятельный пик, и верхним пределом, соответствующим вводу такого количества образца в ионный источник, что ионный ток стремится к насыщению (приблизительно 10^{-9} А). Амплитуда импульса, соответствующего одному иону, при средних скоростях сканирования эквивалентна примерно $0,5 \cdot 10^{-15}$ А. Таким образом, динамический диапазон должен составлять не менее 10^6 . Так как быстродействующий аналого-цифровой преобразователь не может обеспечить столь большой динамический диапазон, то эффективный диапазон системы увеличивают путем деления выходного сигнала среди ряда усилителей, имеющих разные коэффициенты усиления, и подключения всех этих каналов через мультиплексор. Другой вариант заключается в использовании программируемого усилителя, управляемого системой обработки данных [71].

При определении точных значений масс по измерению положения пиков, обычно по их центроиду, имеется 10—20 цифровых измерений на пик (минимальное число измерений, необходимое для этой цели) [72]. Таким образом, при обычных условиях анализа при экспоненциальной магнитной развертке 10 с/декада и разрешении 10 000 требуется частота выше 30 КГц. При увеличении разрешающей способности или скорости сканирования пропорционально должна увеличиваться скорость преобразования аналогового сигнала в цифровую форму. Критерий, предложенный Пероном и Джонсом [73],

состоит в том, что для адекватного воспроизведения сигнала частота ввода должна быть по крайней мере в 10 раз больше ширины полосы.

Обнаружение пиков. Последовательность цифровых данных от АЦП в режиме сканирования масс-спектра представляет собой совокупность обычных пиков, пиков случайных ионов, пиков, обусловленных шумами, и пиков метастабильных ионов. Наблюдаемая ширина пика случайного иона определяется шириной полосы регистрирующей системы, но она намного меньше ширины истинного пика, который образован не менее чем четырьмя ионами. Пики, обусловленные шумами, имеют разную интенсивность, но они узки по сравнению с истинными пиками. Пики метастабильных ионов и мультиплеты от неразрешенных пиков могут быть отделены от обычных разрешенных пиков по их большей ширине.

Главная задача любой программы обнаружения пиков — это исключение шумов и пиков случайных ионов. Программа может представлять собой простой логический тест, например, наличие ряда последовательных измерений выше порога, чтобы можно было идентифицировать сигнал как пик. Начало пика может быть определено по положительному наклону, превышающему определенную величину. Надежность определения малых пиков может быть увеличена путем цифрового сглаживания сигнала перед сравнением с пороговым значением [74]. Используется также метод кросс-корреляции для выделения формы пиков, аналогичной форме эталонных пиков, на фоне шумов [72].

Мультиплетные пики могут быть определены по положению минимума между соседними пиками, который должен удовлетворять критерию определенной ширины и глубины минимума. Для определения неразрешенных мультиплетов могут быть использованы также отношение высоты пика к ширине или несовпадение положений максимума пика и центроида. Имеются и простые методы разделения мультиплетов в режиме on-line, но достаточно надежное разделение может быть выполнено в режиме off-line с использованием их полного цифрового профиля.

Пики метастабильных ионов осложняют накопление и обработку данных вследствие их малой интенсивности и того, что они обычно не отделены от много более интенсивных обычных пиков. Эта задача может быть решена применением различных способов сканирования масс-спектров метастабильных ионов.

Следующий этап накопления данных состоит в преобразовании цифровых данных в положения и интенсивности каждого из найденных пиков. Имеются два метода определения положения пиков: по положению на шкале времени центроида или по максимуму пика. Центриод обычно используют, когда требуется точное измерение массы. При работе с номинальными массами используют более простую процедуру на основе изме-

рения положений максимумов пиков. Интенсивность пиков определяют как максимальную высоту или площадь пика [71, 72].

Были описаны системы, в которых АЦП работает не в режиме непрерывного поступления сигналов, а периодически, что уменьшает поток данных в компьютер [75]. Сигнал дифференцируется и определяется максимум пика по равенству нулю производной. В момент, когда она проходит через нуль, запускается усилитель для измерения величины пика в максимуме, которая затем измеряется аналого-цифровым преобразователем. Измеряется также положение максимума пика с помощью сигналов времени с частотой 1 МГц.

В другой системе регистрации данных [76] усилитель непрерывно прослеживает величину пика и запоминает ее в момент максимума. Эта величина затем считывается АЦП, запускаемым импульсом от датчика Холла, измеряющего величину магнитного поля. Система настраивается так, что считывание происходит через примерно 0,3 а.е.м. после соответствующего целого значения массы. Эта система измеряет номинальные массы, она отличается простотой и значительно уменьшает объем обрабатываемых данных.

Вместо непрерывного сканирования масс-спектрометр может ступенчато переключаться под управлением ЭВМ непосредственно с одной номинальной массы на другую [77]. Преимуществом этого метода является то, что система обработки данных может быть установлена на интегрирование сигнала в течение времени, необходимого для получения достаточно хорошего отношения сигнал/шум для каждого пика. Кроме того, время сканирования не тратится на интервалы между пиками.

Наиболее плодотворным применением таких ступенчатых систем в ХМС является количественное определение анализируемых соединений с высокой чувствительностью путем циклического ступенчатого перехода между ограниченным числом выбранных ионов (селективное многоионное детектирование) [78]. Весь цикл занимает 0,5—1 с. В приборах с магнитным секторным анализатором многоионное детектирование обычно осуществляется переключением ускоряющего напряжения, хотя в современных приборах оно может осуществляться и переключением магнитного поля [79]. Квадрупольные масс-фильтры более удобны для многоионного детектирования благодаря легкости переключения небольших напряжений на стержнях для пропуска ионов с разными массами.

Метастабильные ионы могут регистрироваться отдельно в магнитных секторных приборах с двойной фокусировкой при специальных режимах сканирования. Например, согласованное изменение магнитного и электрического полей, поддерживающее постоянное отношение между током магнита и напряжением электростатического анализатора (B/E -сканирование) используется для регистрации дочерних ионов, образующихся из выбранных ионов-предшественников, в масс-спектрометрах с двой-

ной фокусировкой и обратной геометрией. Это согласованное сканирование также может быть ступенчатым (для регистрации заданных ионов).

В приборах с геометрией Маттауха — Герцога, имеющих фокальную плоскость, может использоваться фоторегистрация. Информацию о положении и интенсивности пиков масс-спектра получают с помощью автоматического микроденситометра, управляемого системой обработки данных. Более современной системой является микроканальное электронноумножительное устройство, помещаемое в фокальной плоскости вместе с люминесцентным экраном, который преобразует усиленное изображение спектра на канальной пластине в световое изображение. Это световое изображение затем считывается соответствующим регистрирующим устройством, например видиконовой камерой [72].

Преобразование данных, точное измерение масс ионов. Окончательной стадией обработки зарегистрированных данных является преобразование данных о положении пиков в данные по массам ионов. В зависимости от необходимой информации получают либо номинальные, либо точные массы. В первом случае набор пиков ионов с целыми значениями масс служит «отпечатком пальцев» для идентификации данного соединения или для измерения его количества. В режиме точного измерения масс состав ионов соотносится с составом и структурой молекулы.

В режиме измерения номинальных масс для получения значений целых и полужелых масс требуется точность $\pm 0,1$ а. е. м. (± 200 млн. д. для массы 500). В режиме измерения точных масс для определения химического состава ионов требуется точность не менее ± 10 млн. д.

Преобразование данных о положении пиков в данные о массах осуществляется на основании калибровки прибора, заключающейся в определении положений пиков ионов с известными массами для стандартного соединения, например перфторкеросина (ПФК) или гептакозафтортрибутиламина. Для достаточно точной калибровки стандарт вводят одновременно с образцом, обычно в смеси с ним. Для разделения пиков образца и стандарта, которые могут иметь одинаковые номинальные массы, необходима масс-спектрометрия высокого разрешения.

При определении номинальных масс калибровка осуществляется с помощью внешнего стандарта, анализируемого отдельно от образца. При этом значения масс могут быть коррелированы не только с положением пика на шкале времени, но и с другой переменной, например с напряжением на стержнях квадрупольного анализатора или напряжением датчика Холла для приборов с магнитным анализатором.

Определение масс ионов образца осуществляется путем интерполяции между ближайшими к нему ионами стандарта. В случае приборов с магнитным сканированием для этого

служит интерполяционная формула по двум ионам эталона [80]. Позднее была предложена более общая формула интерполирования с помощью метода наименьших квадратов по шести или семи эталонным точкам [72]. Среднеквадратичное отклонение определения положения центра пика равно

$$\sigma = 10^6/R \sqrt{24N}$$

где N — число ионов в пике; R — разрешающая способность.

Например, при разрешающей способности 10 000 и содержании в пике 10 ионов, т. е. вблизи предела обнаружения, $\sigma = 6,4$ млн. д. На точность влияют также статистические вариации положений эталонных пиков, используемых при интерполяции. Другие источники ошибок при измерении точных масс обусловлены, в основном, приборными факторами, такими как колебания электрического питания, механические вибрации приборов и т. п. Чувствительность обратно пропорциональна разрешающей способности, это значит, что $N \sim 1/R^2$, так как не только чувствительность, но и ширина пика уменьшаются обратно пропорционально разрешающей способности. Подставляя это выражение в соотношение для σ , можно видеть, что σ не зависит от разрешающей способности для данного потока образца в ионный источник. Следовательно, измерение масс лучше проводить при низком разрешении, так как при той же точности измерения значительно снижается предел обнаружения. Кроме того, благодаря большей ширине пика требуется меньшая частота отсчетов.

Высокое разрешение при точном измерении масс необходимо, как уже указывалось, для отделения пиков образца от пиков эталона с такой же номинальной массой при точном определении центра пика. Но проблема раздельного измерения пиков образца и стандарта может быть решена и по-другому. В масс-спектрометре с двойным пучком ввод образца и эталона производится одновременно в два отдельных источника ионов. Пучки ионов от этих двух источников проходят через общий анализатор, а затем снова разделяются и регистрируются двумя разными детектирующими системами. Другой метод точного измерения масс в масс-спектрометрах низкого разрешения заключается в предварительной калибровке прибора с помощью внешнего стандарта, например, ПФК, после чего производится сканирование масс-спектра образца в тех же условиях; к образцу добавляют внутренний стандарт, который, в отличие от ПФК, дает мало пиков, и эти пики легко отделяются от пиков образца. Они служат для привязки к получаемому масс-спектру шкалы масс, определенной по масс-спектру внешнего стандарта [81, 82]. Наконец, в квадрупольных масс-спектрометрах, которые являются приборами низкого разрешения, для точного измерения масс часто используется метод

одновременной регистрации масс-спектров положительных и отрицательных ионов. В этом случае один из этих масс-спектров служит эталоном для определения шкалы масс, которая позволяет осуществить точное измерение масс ионов другого масс-спектра.

Свертка данных. При ХМС эксперименте в случае работы в режиме циклического сканирования масс-спектров объем получаемой информации очень велик. Тем не менее этот режим удобен, так как не происходит потери информации. Получаемый полный объем данных об образце позволяет фиксировать все ранее не предполагавшиеся соединения или изменения в масс-спектрах лабильных веществ. Вместе с тем в этом случае появляется необходимость хранения, обработки и представления в удобном для исследователя виде огромного количества данных. В некоторых случаях осуществляется сокращение полученного массива данных для последующего хранения только той информации, которая считается наиболее важной для решаемой задачи. В этом случае, однако, теряется возможность производить последующий поиск новых соединений в смеси.

Из общего массива данных в первую очередь выделяется хроматограмма по ПИТ, дающая общую характеристику смеси. Затем строятся масс-хроматограммы по пикам отдельных ионов, которые могут характеризовать определенные структуры. Масс-хроматограммы могут быть получены не только для отдельных ионов, но также для суммарных интенсивностей пиков нескольких ионов или всего гомологического ряда. Для каждого идентифицированного соединения определяются масс-спектр, время удерживания и предполагаемая структура, так что вместо массива масс-спектров, полученных в определенные моменты времени, выдается список идентифицированных соединений с их временами удерживания, а в случае определения точных масс — список формул элементных составов, соответствующих каждому иону.

Часть данных исключается из хранимого массива, если используется поисковый алгоритм, базирующийся только на нескольких пиках масс-спектра. В этом случае оставляют только наиболее интенсивные или наиболее «значимые» пики масс-спектра. В других методах производится сокращение информации, относящейся к каждому пику; предельным случаем такого подхода является бинарное кодирование, в котором информация об интенсивности сводится только к констатации присутствия или отсутствия пика. В одной из схем сжатия масс-спектральной информации предложено отказаться от указания масс ионов, сравнение масс-спектров производится по оценке расстояния 14-мерного вектора, в виде которого представляется каждый масс-спектр, от эталонного вектора; оценка производится по евклидову расстоянию или по сумме абсолютных величин разностей интенсивностей [82]. Свертка масс-спектров заключается в суммировании интенсивностей пиков в каждом из 14 го-

мологических рядов ионов и в нормализации по каждому из 14 каналов.

Свертка хромато-масс-спектральной информации позволяет реализовать сложные алгоритмы обработки данных в режиме on-line на мини- и даже на микро-ЭВМ.

Глава 2

МЕТОДЫ

2.1. ИОННАЯ МАСС-ХРОМАТОГРАФИЯ

Ионная масс-хроматография (ИМХ) представляет собой метод, в котором масс-спектрометр используется для непрерывного селективного детектирования одного или нескольких ионов с заданными массами. Если известен один или несколько характеристических ионов, специфичных для данного соединения или группы родственных соединений, то селективное ионное детектирование позволяет выделить хроматограмму этих соединений из общей хроматограммы, определить время удерживания каждого компонента, идентифицировать его и провести количественный анализ. Этот метод особенно эффективен для сложных смесей и может дать хорошие результаты даже тогда, когда компоненты не разделяются полностью на хроматографической колонке.

Ионная масс-хроматография осуществляется двумя способами. Первый способ состоит в том, что из всех ионов, образующихся в ионном источнике, на детектор поступают только ионы с одной или несколькими заданными массами. Этот метод получил название *селективного ионного детектирования (СИД)*, а в случае одновременной регистрации нескольких ионов — *многоионного детектирования (МИД)*. В литературе встречаются и другие термины для обозначения этого метода: «масс-фрагментография», «мониторирование выбранных ионов», «получение ионных профилей» и др.

Второй способ ИМХ реализуется с помощью ЭВМ и представляет собой специфическую машинную обработку ГХ—МС информации. Он основан на непрерывном циклическом сканировании полного масс-спектра в процессе всего опыта и построении графика интенсивности любого пика масс-спектра в зависимости от номера спектра (т. е. времени его получения). Это так называемая компьютерная ионная масс-хроматография.

Селективное ионное детектирование обеспечивает значительно большую чувствительность по сравнению с регистрацией полного масс-спектра. При регистрации полного масс-спектра

элюата, выходящего из хроматографической колонки, лишь очень небольшая часть ионов с данной массой, образующихся в ионном источнике и прошедших через анализатор, может быть зарегистрирована детектором в процессе одного цикла сканирования. Например, если сканирование масс-спектра в интервале масс от 400 до 40 осуществляется за 4 с, то в случае линейной развертки на каждый участок масс-спектра, соответствующий 1 а. е. м., приходится всего около 0,01 с [83]. Если учесть, что пики в масс-спектре соответствуют не каждому значению m/z , а также то, что реальная ширина масс-спектрального пика много меньше расстояния между соседними пиками, станет ясно, что лишь небольшая часть общего времени сканирования приходится собственно на регистрацию ионов. При селективном ионном детектировании время регистрации полностью затрачивается на детектирование нужных для анализа характеристических ионов.

В настоящее время МИД на магнитных секторных приборах может осуществляться в интервале масс, ограниченном пределом, равным 1,6 от массы детектируемого иона с наименьшей массой, а число одновременно детектируемых ионов доходит до 20 [84]. Съекист и Ангард [85] показали, что чувствительность масс-спектрометра в режиме МИД сопоставима с чувствительностью электрозахватного детектора.

Уже в начале 70-х годов метод ИМХ широко использовался для анализа природных продуктов, лекарственных препаратов, хлорсодержащих углеводородов и других объектов окружающей среды. Пределы обнаружения различных компонентов в анализируемых смесях составляют от 10^{-9} до 10^{-12} г в зависимости от типа соединений и характера анализа [86]. В работе Козлова и др. [87] при определении пентафторацетилпроизводных норэфедрина и допамина была достигнута чувствительность 0,5 пмоль.

Естественно, что при использовании метода ИМХ резко повышается чувствительность обнаружения веществ, которые имеют характеристические ионы в масс-спектре. Дальнейшее увеличение чувствительности возможно за счет применения осциллографического детектора с более низкой частотной характеристикой, так как быстрая развертка в этом случае становится ненужной. Более низкая частотная характеристика позволяет работать с электронным умножителем при более высоком сопротивлении и тем самым повысить коэффициент усиления.

Милдледич и Дезидерио [88] определили, что селективное ионное детектирование примерно на два порядка чувствительнее, чем измерение полного ионного тока, а последнее имеет чувствительность на порядок выше, чем детектирование с помощью пламенно-ионизационного детектора [83].

Селективное детектирование ионов при отрицательной ионизации путем захвата электронов обеспечивает получение ионных токов в 100—1000 раз больших, чем в случае положительных

ионов, и высокую чувствительность определения многих органических веществ. По теоретическим оценкам эта чувствительность в 10—100 раз превышает чувствительность электрозахватного детектора, используемого в ГХ, на практике же она повышается только в 10 раз. Предел обнаружения таких веществ, как амфетамин, допамин и т. п., достигает 10^{-18} г [89].

Благодаря высокой специфичности метод СИД незаменим при анализе примесей, поскольку удается выделять их пики даже на фоне больших соседних хроматографических пиков.

Основные принципы ионной масс-хроматографии были разработаны В. Л. Тальрозе и сотр. [90, 91] Суть предложенного ими метода заключалась в том, что напряженность магнитного поля и ускоряющее напряжение подбираются таким образом, что на коллектор попадают и регистрируются только ионы с заданными массами. С помощью двухщелевого коллектора одновременно регистрировались два иона с близкими массами, например 43 и 41. Идентификация пиков на масс-хроматограммах осуществлялась по характеристическим отношениям интенсивностей пиков выбранных ионов, а количественный анализ — по площадям хроматографических пиков на ионных масс-хроматограммах.

Хеммер [92] в 1968 г. использовал метод ИМХ, который он назвал «масс-фрагментографией», для определения лекарственного препарата хлорпромазина в плазме крови человека. Для того, чтобы достичь предела обнаружения на уровне 1 пкг, было использовано устройство, позволяющее быстро переключать и устанавливать ускоряющее напряжение на три иона с разными массами, различающимися в пределах 10 %, в данном случае от 160 до 176 а. е. м. В дальнейшем этот интервал удалось расширить до 20 % от наименьшего значения массы. Используя этот метод, Бонелли [93] смог количественно определить ДДЕ (метаболит ДДТ) на уровне нанogramмовых количеств в присутствии мешающих полихлордифенилов, регистрируя пик иона с массой 246. Вольф и др. [94] получили предел чувствительности определения хромтрифторацетиллактона, равный 5 пкг; пять опытов при вводе в колонку 20 пкг вещества дали относительное стандартное отклонение 6,2 %. Стронг и Эткинсон [95] использовали метод ИМХ для изучения лидокаина и его деэтилированных метаболитов. Они сделали вывод, что квадрупольный масс-спектрометр обладает определенными преимуществами для реализации ИМХ, так как в этом случае нет ограничений по интервалу масс одновременно регистрируемых ионов.

Квадрупольный масс-спектрометр имеет и другие преимущества при использовании его в ХМС. Если к основной рабочей частоте добавляется переменный потенциал, то ионы будут резонировать в дополнительном поле, увеличивая амплитуду колебаний, и исчезать при контакте с электродами. Центр отсекаемого таким образом интервала масс определяется часто-

той добавочного резонансного поля, а также частотой и амплитудой основного высокочастотного поля квадрупольного фильтра. Такой «фильтр отсечки» при определенных условиях может работать при токе пропускания вплоть до 1 мА, что в 10^6 раз больше, чем ионные токи при обычных условиях работы квадрупольного масс-фильтра [96]. Квадрупольный сепараторный анализатор позволяет увеличить напуск образца.

Масс-спектрометр с сепараторным анализатором содержит два квадрупольных фильтра, расположенных коаксиально; один из них работает в режиме фильтра отсечки, удаляющего нежелательные ионы и не пропускающего их во второй квадрупольный фильтр, работающий в режиме обычного масс-анализатора. Проверка работоспособности этой системы на примере анализа остаточных газов показала, что эффективность удаления ионов с массами 28 и 32 составляет около 99 %, при этом не затрагиваются другие ионы. Для одноатомных ионов с массами 14 и 16 эффективность удаления равна 95 %, при этом теряется около 20 % ионов других типов. При удалении более широкой полосы ионов, содержащей ионы с массами 28 и 32, эффективность равна 99,9 % и отсутствует какое-либо влияние на пики других ионов. Такой сепараторный фильтр позволяет удалять ионы газа-носителя при вводе всего элюата из газового хроматографа. Он может быть применен и для анализа элюатов ВЭЖХ, при этом резонансное поле может быть использовано для удаления ионов, образующихся преимущественно из растворителя и имеющих массы ниже 100—200 а. е. м. [96].

Еще большая селективность была достигнута при использовании нового метода ИМХ — селективного детектирования метастабильных ионов [97].

Селективное детектирование дочерних ионов, образованных при распаде метастабильных ионов в первом бесполовом пространстве перед электростатическим спектром, осуществляемое при постоянном отношении E/V и постоянном ускоряющем напряжении, обеспечивает высокую чувствительность и селективность при анализе биологических соединений в физиологических жидкостях (предел обнаружения порядка пикомолей) [98]. Это достигается благодаря тому, что ионы, обусловленные загрязнениями из колонки, не проходят через электрический сектор. Способ сканирования при постоянном отношении E/V наиболее приемлем для количественного анализа, так как при этом нет ограничений по величине M_2/M_1 (M_1 — масса дочерних ионов, M_2 — масса ионов-предшественников). Для осуществления этого метода система сканирования масс-спектрометра VGMM 70-70F была модифицирована так, что позволяла осуществлять регистрацию при двух разных отношениях E/V и тем самым регистрировать дочерние ионы от анализируемого вещества и внутреннего стандарта, представлявшего собой то же вещество, меченное стабильным изотопом. На точность количе-

ственных определений влияют уширение метастабильных пиков и их наложение, разная вероятность распада метастабильных ионов в отсутствие активации столкновениями.

Селективное ионное детектирование является наиболее чувствительным и селективным методом анализа в ХМС. Однако этот метод применим, если заранее известны характеристические пики анализируемых соединений. Компьютерная ИМХ — более гибкий метод. Он был впервые предложен Бимапом с сотр. [99, 100] и непрерывно совершенствовался. Он широко используется в настоящее время, являясь обязательным компонентом математического обеспечения всех систем обработки данных и интегрированных систем ГХ—МС—ЭВМ. Метод позволяет получать ионные масс-хроматограммы по любому выбранному иону, производить предварительное вычитание фона, применять специальные методы обработки данных, улучшающие селективность и разрешение хроматограмм. Правда, по сравнению с селективным ионным детектированием этот метод обладает значительно меньшей чувствительностью, так как требует регистрации полных масс-спектров, а также наличия системы обработки данных с достаточным объемом памяти для хранения всего массива получаемых масс-спектров.

Фуи с соавт. [101] предложили метод, который для частного случая анализа следовых количеств примесей в воздухе объединил специфичность и чувствительность селективного ионного детектирования с возможностью получения полного масс-спектра. Этот метод, названный «обзорной ионной масс-хроматографией», состоит в получении полного набора ионных масс-хроматограмм для всех массовых чисел (в данном случае от 11 до 100). При этом в каждой серии анализов записываются масс-хроматограммы для 6 разных ионов. Эталоном является пик иона с массой 85, регистрируемый в каждой серии с пятью другими ионами. Например, в первой серии детектировались ионы с массами 11, 12, 13, 14, 15 и 85, в следующей — 16, 17, 18, 19, 20 и 85 и т. д. Каждая серия снималась при последовательном вводе небольшого объема воздуха в криогенную ловушку ионного источника с ХИ. Масс-спектры компонентов могли быть реконструированы по тем пикам, которые отвечали одним и тем же временам удерживания. Таким образом, этот метод наряду с чувствительностью и специфичностью ИМХ обеспечивает обзор, детектирование и надежную интерпретацию всех следовых компонентов по полным масс-спектрам.

В работе [102] описан другой метод повышения чувствительности компьютерной ИМХ, основанный на суммировании интенсивных характеристических пиков. Он заключается в построении профиля суммарных интенсивностей пиков выбранных характеристических ионов в зависимости от номера масс-спектра после окончания опыта с циклическим сканированием. Этот метод дал хорошие результаты при анализе различных загрязнений окружающей среды, включая пестициды, хлориро-

важные промышленные продукты, полициклические ароматические углеводороды. Математическое обеспечение позволяет оператору задавать массы ионов и интервал рассматриваемых масс-спектров. ЭВМ отбирает только те масс-спектры, в которых есть все заданные ионы, и суммирует интенсивности их пиков. Этот метод повышает селективность детектирования соединений и специфичность идентификации. Так, в масс-спектре диэльдрина (хлорсодержащий пестицид) относительная интенсивность всех пиков ионов с массами более 150 составляет меньше 20 %, а картина фрагментации столь сложна, что отдельных групп хлорсодержащих ионов разного изотопного состава недостаточно для идентификации этого соединения. Только объединение четырех характеристических групп ионов с массами 261—265, 275—279, 343—347 и 378—384 позволяет получить один острый пик на масс-хроматограмме, для которого легко определяется время удерживания. В среднем увеличение чувствительности при анализе различных полихлорсодержащих ароматических соединений составляет 3,4—7,5; при этом не происходит ухудшения хроматографического разрешения.

2.2. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Использование масс-спектрометра как детектора газового или жидкостного хроматографа неизмеримо увеличило возможности идентификации неизвестных соединений в сложных смесях. Однако по мере развития этого метода и привлечения его для анализа все более сложных смесей появилась необходимость применения более мощных средств из арсенала масс-спектрометрических методов, среди которых на первом месте по объему информации и аналитическим возможностям находится масс-спектрометрия высокого разрешения (МСВР).

Сочетание МСВР с хроматографическим разделением является весьма перспективным и позволяет получать информацию двойного рода. Во-первых, это полные масс-спектры высокого разрешения за время выхода хроматографических пиков, причем точное измерение масс ионов позволяет установить элементный состав каждого иона в масс-спектре [72]. Такой подход обеспечивает максимально возможную структурную информацию, которую только можно получить из масс-спектра: набор данных о точном элементном составе ионов и относительной интенсивности их пиков. Во-вторых, использование масс-спектрометра высокого разрешения как хроматографического детектора с очень высокой специфичностью для непрерывного детектирования заданных ионов с точной массой позволяет отстроиться от других ионов с той же номинальной массой, но иным элементным составом. Таким образом, увеличивается селективность детектирования по отношению к другим веществам,

элюируемым вместе с данным компонентом, фону прибора, парам неподвижной фазы и т. п.

Главными параметрами при получении спектров ионов с точным элементным составом являются точность измерения масс (способность точно определить истинную массу) и динамическое разрешение по массам (степень разрешения по массам в условиях магнитного сканирования). Так как абсолютно точное измерение масс практически неосуществимо, то для каждой измеряемой массы рассчитывается набор возможных комбинаций элементного состава, точные массы которых попадают в заданное «окно» вокруг измеренной массы. Для того, чтобы ограничить число возможных элементных формул до приемлемого количества, требуется выбрать типы и максимальные количества атомов каждого элемента, входящих в молекулу.

Выбор ширины окна играет большую роль. Если она слишком мала, то правильная формула может быть не включена в список, если она больше, чем нужно, набор возможных формул становится слишком большим, чтобы его можно было оценить. Выбор ширины окна зависит от точности измерения масс, обычно ширина окна не более 20 млн. д.

Возможность точного измерения масс ионов зависит от многих факторов, таких, как адекватное определение реальной формы пика, отсутствие пиков с аномальной формой, точность определения функции масса — время, качество алгоритма для расчета масс, разрешающая способность по массам. Зависимость от последнего фактора связана с наличием неразрешенных дублетов или мультиплетов, для таких пиков определение положения центра тяжести по общему профилю пика неточно и приводит к неточному определению массы. Улучшение точности измерения масс может быть достигнуто при усреднении измерений по нескольким спектрам, это уменьшает влияние случайных ошибок и позволяет использовать более узкое окно при расчете возможных элементных формул ионов. При этом точность измерения масс должна увеличиваться на величину $\sqrt{\bar{n}}$ где \bar{n} — число измерений.

Существует ряд способов измерения точных масс: обработка измерений на фотопластинке при фоторегистрации; определение положения центра пика при магнитной развертке с электрической регистрацией; совмещение пиков определяемого иона и эталона путем изменения ускоряющего напряжения (peak matching).

Регистрация на фотопластинке осуществляется на масс-спектрометрах с геометрией Маттауха — Герцога. В первой работе Уотсона и Бимана [103] измерение масс 22 ионов в интервале 56—179 было осуществлено с ошибкой $20 \cdot 10^{-3}$ для ионов с массами выше 100 а. е. м. и $1,5 \cdot 10^{-3}$ — для ионов с массами ниже 100 а. е. м. В следующей работе [104] при измерении смеси метиловых эфиров жирных кислот с содержанием отдельных компонентов 2—4 мкг, выходящих из колон-

ки с интервалом 20—30 с, была получена точность измерения масс $\leq 5,3 \cdot 10^{-4} \%$.

Хебфист [105], используя метод фоторегистрации при разрешении 15 000—40 000 для определения метилстеаратов, вводимых в хроматографическую колонку в количествах 5—200 нг, измерял массы ионов с точностью от $1,2 \cdot 10^{-3}$ (16 пиков при 25 нг введенного вещества) до $2 \cdot 10^{-3}$ (8 пиков для 8 нг введенного вещества).

Мак-Мюррей и др. [106] при анализе метилпальмитата на приборе с геометрией Нира—Джонсона (разрешающая способность 10 000, скорость сканирования масс-спектра 8 с/декада, электрическая регистрация) измерили массы ионов с точностью $3 \cdot 10^{-3}$ а. е. м., или $1 \cdot 10^{-3} \%$. Кимбл [72] изучил возможность точного измерения масс при электрической регистрации в реальном масштабе времени. Первоначальные исследования осуществлялись на масс-спектрометре СЕС 21-110 с разрешением 20 000 [107]. При анализе *n*-октадекана для шести измерений 16 разных ионов с массами от 43 до 254 получено среднеквадратичное отклонение в пределах $(2,5—6,5) \cdot 10^{-4} \%$. Для малоинтенсивных пиков ошибки были гораздо больше. При анализе перхлорбутадиена (разрешение 25 000, скорость сканирования 35 с/декада, 9 повторных измерений масс-спектра) для 70 % пиков из общего числа 266 с относительной интенсивностью от 2 до 100 % массы ионов в интервале 100—266 были измерены с относительной ошибкой не более $2 \cdot 10^{-4} \%$ [108].

Точность измерения масс зависит от интенсивности пиков масс-спектра. При вводе в колонку 1 мкг ДДТ для четырех пиков с интенсивностью 1—1,2 % от максимального средняя ошибка измерения массы составила $3,3 \cdot 10^{-3}$ а. е. м. ($1 \cdot 10^{-3} \%$). Для двух наиболее интенсивных пиков средняя ошибка измерения масс соответствующих ионов была равна $1,9 \cdot 10^{-3}$ ($7 \cdot 10^{-4} \%$) при введении 100 нг вещества.

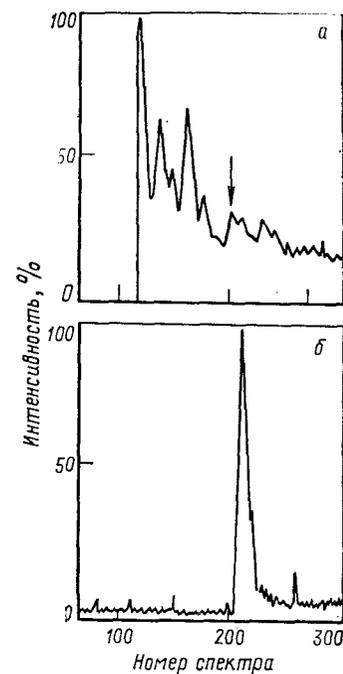
Масс-хроматограммы, получаемые по ионам с точными массами, более просты, чем хроматограммы по ПИТ или по ионам с номинальными массами. Они содержат меньше пиков, которые лучше разрешены, и позволяют более точно определять времена удерживания компонентов. Для регистрации таких масс-хроматограмм задается точная масса прослеживаемого иона и окно масс, определяемое точностью измерения массы. При каждом сканировании масс-спектра интенсивность пика иона, попадающего в это окно масс, регистрируется как функция номера соответствующего масс-спектра, образуя масс-хроматограмму высокого разрешения.

При анализе нитрозаминов в объектах окружающей среды и метаболитах (масс-спектрометр MS-50 фирмы Kratos, стеклянная капиллярная колонка WCOT длиной 40 м с неподвижной фазой SP-1000) было показано, что регистрация масс-хроматограмм высокого разрешения значительно увеличивает

чувствительность детектирования этих соединений благодаря устранению пиков ионов с близкими массами.

На рис. 2-1 показаны масс-хроматограммы конденсата табачного дыма с добавлением 100 пкг N-нитрозодиметиламина [109]:

Рис. 2-1. Масс-хроматограммы конденсата табачного дыма с добавлением 100 пкг N-нитрозодиметиламина [109]:
а — m/z 74 при разрешении 800, б — m/z 74,0480 при разрешении 10 000.



иона с массой 74,0480 при разрешении 10 000. Предел обнаружения при использовании МСВР увеличивается не менее, чем на порядок и может быть доведен до 1 пкг [109]. Работа в режиме высокого разрешения требует более длительного времени регистрации, но современные приборы обеспечивают высокую скорость сканирования и в этом режиме. Так, масс-спектрометр MS-50 может работать со скоростью 3 с/декада при динамическом разрешении более 5000.

На основании данных о точных массах ионов могут генерироваться и обычные масс-спектры низкого разрешения, и масс-хроматограммы. В этом случае интенсивности пиков всех ионов, массы которых находятся в интервале от $X,0000—0,4000$ до $X,0000 + 0,60000$ а. е. м., суммируются для получения интенсивности пика, соответствующего номинальной массе X.

Чувствительность в ГХ—МСВР определяется не только возможностью детектирования пиков в масс-спектре данного вещества, введенного в ионный источник, но также и количеством вещества, достаточным для точного измерения масс ионов. Последний критерий более жесткий, что приводит к несколько меньшей чувствительности по сравнению с масс-спектрометрией низкого разрешения, так как для надежного определения центра тяжести или центроида пика профиль пика должен быть определен достаточно хорошо. Как показали измерения, для разрешения 10 000 точность определения масс в пределах 30 млн. д. требует по крайней мере 10—15 ионов на пик [110].

Так как время сканирования масс-спектра в случае ГХ—МСВР составляет примерно половину ширины хроматографи-

ческого пика, то сдвигая начало сканирования относительно начала элюирования этого пика, можно изменить вдвое величину этого пика, регистрируемого по масс-хроматограмме.

Математическое обеспечение системы обработки данных ГХ — МСВР должно включать программы для быстрого определения набора элементарных формул, ограниченного выбранными критериями. Возможность учета функциональных и структурных групп (например, C_6H_5 , $COOCH_3$, $COOH$ и др.) как входной информации при генерировании набора элементарных формул значительно облегчает интерпретацию данных и позволяет генерировать самосогласованный ряд формул элементарного состава для всего масс-спектра высокого разрешения. Можно использовать также и элементарные составы разностей масс ионов, учитывая, что число различных вариантов при генерировании формул элементарного состава для относительно малых разностей масс ионов значительно меньше, чем для самих ионов.

Трудности точного измерения масс возникают из-за короткого времени пребывания каждого элюируемого компонента в ионном источнике. Время сканирования масс-спектра высокого разрешения — порядка 10 с. В работе [111] на масс-спектрометре MS-902 при разрешении около 10 000 наибольшая надежно обеспечиваемая скорость сканирования была 6 с/декада. При более высоких скоростях, например 5 с/декада, экспоненциальная функция сканирования искажается, что приводит к потере разрешения и точности измерения масс. Таким образом, для получения хотя бы одного полного масс-спектра высокого разрешения в процессе элюирования ГХ пика данного компонента ширина пика должна быть порядка 15—20 с. В принципе желательно, чтобы за время элюирования пика масс-спектр был зарегистрирован по крайней мере дважды. Рабочие условия обычной капиллярной ГХ, однако, обеспечивают ширину хроматографических пиков всего в несколько секунд, поэтому условия хроматографического разделения, используемые в ГХ — МСВР, должны отличаться от обычных. В частности, используют длинные капиллярные колонки, работающие при пониженных скоростях потока и пониженных температурах элюирования, увеличивая, таким образом, продольную диффузию в процессе разделения. При этом не происходит существенной потери эффективности разделения, но значительно увеличивается общее время анализа.

Накопление и обработка масс-спектральных данных высокого разрешения при циклическом сканировании в реальном масштабе времени связаны с передачей и хранением больших массивов информации. Поскольку для каждого компонента будет зарегистрирован только один или два достаточно интенсивных масс-спектра, то нет возможности использовать усредненные масс-спектры для повышения точности измерений масс. Таким образом, необходимо, чтобы высокая точность измерения

масс реально обеспечивалась для каждого отдельного масс-спектра.

Число рассчитываемых формул элементарного состава становится слишком большим при окне масс больше ± 15 млн. д., особенно для сложных молекул, содержащих много разных элементов, например, ^{13}C , ^{12}C , H, N, O, S, Cl, F и др. Большие ошибки измерения масс затрудняют также построение ионных масс-хроматограмм по точным массам, так как распределение измерений данной массы может перекрываться с таким же распределением измерений другой массы. Важно знать также минимальную абсолютную интенсивность пика, при которой масса иона может быть измерена с заданной точностью. Наконец, точное измерение масс может быть осуществлено только для пиков правильной формы. Искажения формы пиков, вызванные, например, неразрешенными дублетами, должны исправляться.

Когда необходимо регистрировать только один или два пика, электронные блоки устройств для peak matching могут быть модифицированы так, чтобы осуществлять селективное ионное детектирование обоих пиков путем последовательного переключения ускоряющего напряжения между вершинами этих пиков. В существующих коммерческих масс-спектрометрах высокого разрешения это осуществляется разведением сканирующих катушек этих устройств [112]. Можно производить и сканирование внутри узкого интервала масс, но чувствительность при этом понижается по сравнению с селективным ионным детектированием. Преимуществом последнего метода, правда, является то, что информация о профиле пика получается в процессе всего эксперимента. Например, при анализе афлатоксинов производилось сканирование в пределах 0,3 а. е. м. для каждого пика при разрешении 7000. Управление электрического сектора с помощью ЭВМ обеспечивает дополнительные выгоды по сравнению с чисто схемным решением: число каналов масс может быть увеличено и может меняться в процессе анализа; доля времени регистрации каждого иона также может меняться в зависимости от ожидаемой интенсивности соответствующих пиков; система при соответствующем программировании может сканировать небольшой участок масс, обеспечивая информацию о профиле пика, которая может использоваться как для оценки степени наложения со стороны изобарных ионов, так и для осуществления периодической регулировки ускоряющего напряжения для компенсации дрейфа.

Стабильность электронных блоков, необходимая для количественного анализа, зависит от требуемой точности и выбранной разрешающей способности. Эту величину можно оценить, исходя из гауссовой кривой, изображающей форму масс-спектрального пика [112.] Определение разрешения по 10 %-ной долине соответствует величине ординаты на расстоянии

2,44 σ от центра пика (5 % от максимальной высоты), где σ — среднеквадратичное отклонение:

$$S = (\sigma_x/2,44) \cdot (10^6/R)$$

где σ_x — число стандартных отклонений до ординаты указанной величины при требуемой точности, R — разрешение $M/\Delta M$.

Значения стабильности, рассчитанные по этому уравнению для заданных уровней точности измерения хроматографических пиков методом селективного ионного детектирования при высоком разрешении, приведены ниже:

Разрешение	Стабильность параметров (в млн. д.) для уровней точности (%)				Разрешение	Стабильность параметров (в млн. д.) для уровней точности (%)			
	99	95	90	80		99	95	90	80
3 000	16,0	45,0	61,0	89,0	15 000	3,3	9,0	12,0	18,0
5 000	9,8	27,0	36,0	53,0	20 000	2,4	6,7	9,2	13,0
10 000	4,9	13,0	18,0	26,0	50 000	1,0	2,7	3,6	5,3

Точность, соответствующая 90 % или больше, достигается на большинстве коммерческих масс-спектрометров, предназначенных для точного измерения масс.

Было осуществлено также соединение капиллярной ГХ с масс-спектрометром высокого разрешения ионного циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием [113]. Струйный интерфейс обеспечивал давление в ионном источнике $6 \cdot 10^{-6}$ Па; при этом достигалось разрешение порядка 20 000 (на полувысоте пика) в области m/z 156. Хотя экспериментально невозможно получить полный масс-спектр высокого разрешения из-за слишком большого объема и скорости передачи информации в этих условиях (в соответствии с теоремой Хайквиста, устанавливающей необходимую скорость передачи данных), этот метод может использоваться в режиме селективного ионного детектирования, с переключением регистрируемых ионов в диапазоне более 80 а. е. м. за время 300 мс при разрешении 20 000. Этого достаточно для воспроизведения профиля пиков при использовании капиллярных колонок.

Отметим, что точное определение масс ионов может быть достигнуто и при низком разрешении на двухлучевом масс-спектрометре для ГХ—МС анализа [72]. В этом приборе стандартное вещество для калибровки шкалы масс и образец анализируются одновременно с помощью двух разных источников ионов, работающих в одинаковых условиях, общего масс-анализатора и двух отдельных детекторов. На двухлучевом масс-спектрометре MS-30 при разрешении 1000 и скорости сканирования 10 с/декада ошибка в определении масс была равна $(2-4) \cdot 10^{-3}$ а. е. м., или $(6,7-15,7) \cdot 10^{-4}$ % в интервале масс 143—298 при введении в колонку до 100 нг метилстеарата

и метилпальмитата. При использовании двухлучевого прибора точность и чувствительность были выше при анализе 50 нг дихлорбензола при разрешении 1500, чем при анализе 250 нг этого вещества с помощью однолучевого метода при разрешении 10 000 [110]. Однако в этом случае трудно определить, является ли данный пик синглетом или мультиплетом.

Другой метод точного измерения масс в ГХ—МС при низком разрешении основан на использовании квадрупольного масс-спектрометра для «одновременного» получения масс-спектров положительных и отрицательных ионов. Было показано [114], что точность измерения масс лучше 10 млн. д. при скоростях сканирования, сравнимых с обычно используемыми в ГХ—МС (5 с на цикл), может быть обеспечена при одновременной регистрации масс-спектров стандартного вещества (ПФК) и образца в режиме положительной и отрицательной ионизации, соответственно. Отрицательный ионный ток от ПФК в 600 раз больше соответствующего положительного ионного тока. Таким образом, регистрируя масс-спектры образца и следовых количеств ПФК, можно получить спектры, в которых ионы стандарта имеются только в спектре отрицательных ионов, а спектр положительных ионов состоит только из пиков ионов образца. Точное измерение масс положительных ионов осуществлялось путем одновременной обработки данных от умножителей, регистрирующих положительные и отрицательные ионы, определения центроидов пиков и расчета точных масс в спектре положительных ионов на основании их положений на временной шкале, измеренных по пикам стандартных ионов в масс-спектре отрицательных ионов. При анализе этим методом кокаина с усреднением данных пяти последовательных сканирований для ионов $(M + H)^+$ с массой 304,155 измеренная величина отличалась от истинной не более чем на $3 \cdot 10^{-3}$ а. е. м. (10 млн. д.).

2.3. АНАЛИЗ НЕРАЗРЕШЕННЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПИКОВ

При ХМС анализе идентификация компонентов анализируемых смесей осуществляется обычно по характеристическим ионам в масс-спектрах и относительным индексам удерживания. Получение и того и другого вида данных сильно затрудняется, а часто становится вообще невозможным, если хроматографические пики анализируемых компонентов не разделены. Однако многомерный характер информации ХМС благодаря многоканальному детектированию дает возможность оценивать наличие нескольких компонентов в одном хроматографическом пике и осуществлять их отдельное определение (как качественное, так и количественное) не только в случае неполного разделения, но иногда и в случае полного перекрытия. Если в масс-спектрах неразделенных компонентов имеются специфические пики, характеризующие каждый из компонентов и отсутствующие

(или незначительные) в спектрах других компонентов, то ионные масс-хроматограммы по каждому из этих характеристических пиков показывают элюирование каждого из соответствующих им компонентов независимо от того, перекрываются ли хроматограммы по ПИТ. На рис. 2-2 [115] показана часть масс-хроматограммы по ПИТ и три ионных масс-хроматограммы по пикам

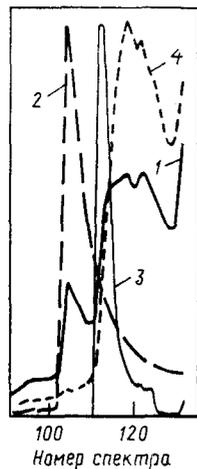


Рис. 2-2. Часть масс-хроматограмм сложной смеси [115]:

1 — ПИТ; 2 — m/z 179; 3 — m/z 256; 4 — m/z 310.

отдельных ионов, которые дают возможность разделить частично перекрывающиеся компоненты. Хроматограммы по пикам отдельных ионов дают истинный профиль элюирования отдельных компонентов независимо друг от друга.

Таким образом, разделение перекрывающихся хроматографических пиков может быть осуществлено с помощью селективного ионного детектирования. Но в этом случае требуется определенная предварительная информация о характеристических пиках в масс-спектрах анализируемых компонентов, которая далеко не всегда имеется

при анализе неизвестных соединений.

Компьютерное построение ионных масс-хроматограмм позволяет получить профили элюирования всех хроматографических пиков с помощью математических методов разделения перекрывающихся пиков. Анализ данных в этом случае заключается в основном в определении характера изменения масс-спектральной картины в процессе элюирования хроматографического пика [116]. Один из таких методов состоит в том, что в области перекрывания хроматографических пиков выделяют масс-спектральный пик, характерный только для одного из компонентов. Обычно это один из пиков с наиболее узким «временным окном». Идентифицированные таким образом по этим пикам «чистые» масс-хроматограммы используются затем как эталон для сравнения с другими хроматограммами, из которых затем с помощью корреляционного анализа выделяются спектры анализируемых компонентов. После вычитания первого компонента из набора данных процедура повторяется для идентификации следующих компонентов. Основным недостатком этого метода является необходимость наличия характеристических ионов для идентификации каждого соединения, что особенно трудно выполнить при анализе соединений со сходной структурой, для которых, как правило, хроматографическое и спектральное перекрывание наиболее вероятно.

Другой метод разделения перекрывающихся хроматографических пиков в ГХ—МС основан на библиотечном поиске масс-спектров. В библиотечном файле выбираются масс-спектры, которые взяты вместе, образовали бы масс-спектр, идентичный анализируемому. Пределы применимости этого метода ограничиваются размерами библиотеки; сравнение спектров должно выполняться с помощью высокоэффективного алгоритма, иначе затраты машинного времени будут очень велики. Кроме того, корреляция между библиотечными и анализируемыми спектрами может быть не очень хорошей из-за влияния на вид масс-спектров условий их получения.

Этим методом можно идентифицировать даже небольшие примеси при вычитании эталонного масс-спектра, наиболее близкого к анализируемому (т. е. соответствующего основному компоненту смеси), из анализируемого масс-спектра. Интенсивности пиков эталонного масс-спектра при этом умножаются на коэффициент, определяемый отношением величин выбранных пиков в этих масс-спектрах [117]. Результирующий масс-спектр вновь может быть подвергнут процедуре поиска.

Компьютерная ГХ—МС с циклическим сканированием масс-спектров при продолжительности цикла менее ширины хроматографического пика и с хранением в памяти ЭВМ всех зарегистрированных масс-спектров открывает принципиально новые возможности обработки данных. Они основаны, с одной стороны на многоканальности детектирования хроматограмм, обеспечиваемой масс-спектрометром, и, с другой стороны, на селективности детектирования по каждому каналу. Различия во временных зависимостях сигналов в каждом канале позволяют осуществить «реконструирование» получаемых масс-спектральных и хроматографических данных с целью выделить и усилить наиболее значимую информацию. В частности, таким образом можно увеличить разрешение получаемых масс-хроматограмм и получить «чистые» масс-спектры компонентов, свободные от наложения фона, соседних и перекрывающихся компонентов [115].

Очевидно, что в точке максимума хроматографического пика все масс-спектральные пики, соответствующие данному компоненту, будут иметь максимальную величину. Следовательно, если взять только те пики в масс-спектре смеси, величины которых имеют максимум при определенном номере спектра, то можно «реконструировать» масс-спектр данного компонента таким образом, что он будет свободен от наложения со стороны других компонентов. Для этого вначале из первичных масс-спектрометрических данных, зарегистрированных в процессе опыта, получают все масс-спектры и все масс-хроматограммы для каждого иона во всем диапазоне масс. Затем осуществляется анализ профилей хроматографических пиков в каждой масс-хроматограмме для обнаружения положений всех спектров, в которых масс-хроматограмма по какому-нибудь

иону имеет максимум. Используемый алгоритм аналогичен тому, который служит для обнаружения центра пика в масс-спектрах при первоначальной обработке масс-спектральных данных. Абсолютные интенсивности пиков, имеющих максимумы, связываются с номерами соответствующих спектров. Таким образом, получаемый набор данных представляет собой для каждого номера масс-спектра совокупность масс ионов и интенсивностей соответствующих пиков, масс-хроматограммы которых имеют максимум в этом спектре. Нормализованный гра-

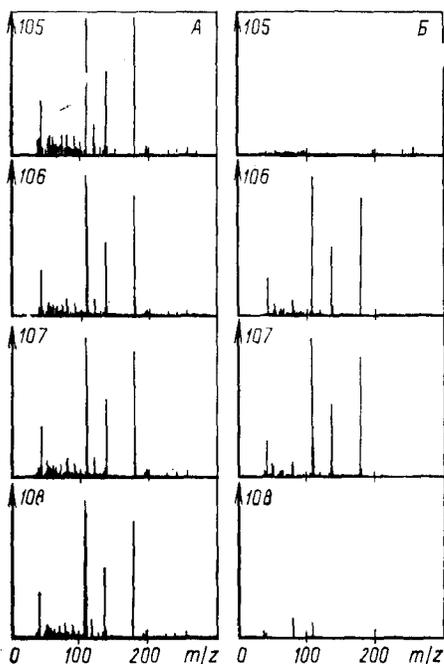


Рис. 2-3. Исходные (А) и реконструированные (Б) масс-спектры ацетилфенетидина [115].

Цифры 105—108 означают номера масс-спектров, зарегистрированных в процессе опыта.

фик этих данных, соответствующий масс-спектру чистого соединения, называется «реконструированным масс-спектром» (рис. 2-3). Все области фронта и хвоста хроматографического пика, где последовательные компоненты перекрываются, не будут иметь максимумов в этой области масс-хроматограмм, и реконструированные масс-спектры будут иметь вид малоинтенсивного шума.

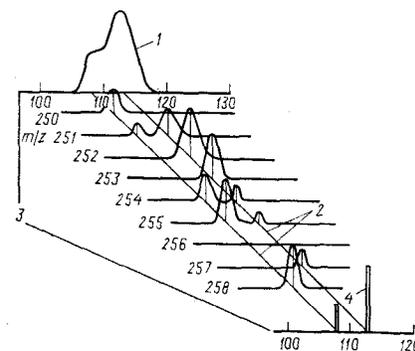
График суммированных интенсивностей пиков, имеющих максимум в данном спектре, представляет собой масс-хроматограмму по «полному ионному току максимальных пиков», в которой каждый хроматографический пик имеет ширину, равную одному периоду сканирования.

Эта хроматограмма получила название «реконструированной масс-хроматограммы» (рис. 2-4). Так как разрешение по абсциссе масс-хроматограммы не может быть лучше, чем один период сканирования (например, в работе [115] — 4 с), то максимум пика может перейти в соседний спектр; например, на быстро возрастающей части ГХ пика максимум масс-спектральных пиков для ионов с большими массами будет иметь место на один период сканирования раньше, чем для ионов с малыми массами. Поэтому обычно суммируют реконструированные масс-спектры с соседними номерами (n и $n + 1$).

Реконструированная хроматограмма имеет гораздо большее разрешение, чем экспериментальная хроматограмма по ПИТ, ионная масс-хроматограмма или обычная хроматограмма, зарегистрированная каким-либо другим хроматографическим детектором (рис. 2-5). Реконструированные масс-спектры в ряде случаев более пригодны для анализа с помощью автоматических методов, например библиотечного поиска, чем исходные масс-спектры, поскольку в них исключен вклад других компонентов.

Рис. 2-4. Принцип построения реконструированных масс-хроматограмм [115].

1 — исходная масс-хроматограмма; 2 — реконструированные масс-спектры; 3 — номер спектра; 4 — реконструированная масс-хроматограмма.



Масс-спектры хроматографических пиков, регистрируемые в процессе ХМС анализа, часто заметно отличаются от масс-спектров соответствующих чистых веществ. Это может быть вызвано наложением масс-спектров неразрешенных соседних компонентов, наличием длинных хвостов хроматографических пиков с большой интенсивностью, фоном хроматографической колонки, обусловленным летучими компонентами неподвижной фазы и резиновой пробки системы ввода в газовый хроматограф, или же растворителя в жидкостном хроматографе. Вследствие этого может не только искажаться относительная интенсивность пиков ионов в масс-спектрах, но и появляться лишние пики, не характерные для анализируемых веществ. Фактически каждый хроматографический пик, даже хорошо разрешенный, следует рассматривать как сложный, включающий помимо соответствующего компонента смеси вклад фона колонки и возможный вклад пиков других компонентов или их хвостов. Между тем одной из задач ХМС анализа является не только определение положений на хроматограмме всех пиков компонентов, но и получение их масс-спектров, которые могли бы быть использованы для их надежной идентификации. Следует также отметить, что во многих случаях анализируемые вещества имеются в столь малых количествах, что не могут быть выделены в чистом виде и изучаются только в смеси, так что их масс-спектры для корреляции со структурой или для занесения в библиотеку спектров могут быть получены только из данных ГХ — МС или ЖХ — МС. Поэтому необходимыми этапами работы системы обработки ХМС данных являются: обнаружение хроматографических пиков, определение точных времен удерживания каждого компонента и

разделение перекрывающихся пиков, коррекция масс-спектров для учета вклада фона и других компонентов. Использование интегрированной системы хроматограф — масс-спектрометр — ЭВМ с полностью автоматической обработкой данных позволяет определять положения хроматографических пиков даже при их неполном разделении и выделять масс-спектры чистых компонентов.

Задача обнаружения хроматографических пиков на масс-хроматограммах включает поиск положения пика каждого ком-

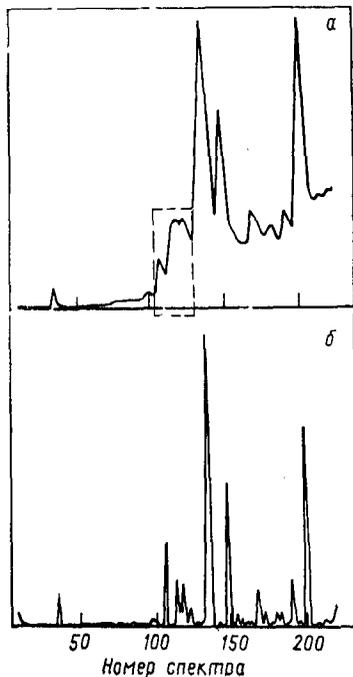


Рис. 2-5. Исходная масс-хроматограмма по ПИТ (а) и соответствующая реконструированная масс-хроматограмма (б) [115].

понента смеси, даже если на хроматограмме по ПИТ не имеется соответствующего ему максимума. В идеальном случае масс-хроматограммы всех пиков ионов, соответствующих данному компоненту, будут иметь максимумы, соответствующие одному и тому же времени удерживания, на практике это имеет место только для очень хорошо разделенных веществ. Для частично разделенных смесей такие факторы, как перекрывание пиков и вклад фона, могут сильно менять положения максимумов пиков соседних компонентов. Надежная информация о положении каждого пика может быть получена из масс-хроматограмм ионов, характерных только для данного вещества и не содержащихся в спектрах соседних компонентов.

Для детектирования хроматографических пиков был предложен метод, заключающийся в расчете двух гистограмм возможных положений синглетных пиков и определении их максимумов [118]. Первая гистограмма измеряет число синглетных профилей масс-хроматограмм, которые имеют максимум в каждом интервале времени. Вторая гистограмма измеряет общую интенсивность пиков синглетных ионов в этих максимумах выше уровня фона. Эти две гистограммы дают взаимно дополняющую информацию для определения положений хроматографических пиков. Для данного времени удерживания гистограммы содержат максимумы пиков на масс-хроматограммах для всех масс в семи спектрах. Положение каждого максимума определяется параболической интерполяцией по методу наименьших квадратов через верхние пять точек. Если интенсив-

ности в пяти точках, образующих максимум, обозначить Y_{-2} , Y_{-1} , Y_0 , Y_1 и Y_2 , то выражение для положения максимума будет иметь вид:

$$t = \frac{7(2Y_{-2} + Y_{-1} - Y_1 - 2Y_2)}{10(2Y_{-2} - Y_{-1} - 2Y_0 - Y_1 + 2Y_2)}$$

Временные координаты максимумов оцениваются с точностью до $1/3$ времени получения одного спектра, следовательно, в расчете может учитываться временной сдвиг ионов с более тяжелыми массами. Пики, являющиеся очевидными мультиплетами (имеющие много максимумов), не включаются в гистограммы, а оставляются для последующей обработки. После построения всех гистограмм определяются компоненты в тех местах, где гистограммы имеют максимум выше определенного порога. Этот статистический подход поиска «кластеров» пиков масс-хроматограмм в гистограммах зависит не от точного отнесения каждого пика, а скорее от всех данных в целом. С его помощью нельзя разделить пики, расположенные близко друг к другу и не имеющие достаточно явно различимых масс-спектральных характеристик. Вообще же этот метод позволяет обнаруживать и выделять пики, разделенные всего полутора циклами сканирования (два цикла обычно соответствуют 25% ширины хроматографического пика). Столь близкие пики часто не дают много максимумов на профилях масс-спектрограмм ионов, общих для спектров обоих компонентов, и никак не могут быть разделены визуальным способом. Если же расстояние между пиками меньше 1,5 циклов сканирования, то разделение менее надежно.

Определив положение хроматографических пиков, находят масс-спектры каждого компонента. В простом случае хорошо разделенных пиков, т. е. не имеющих максимумов на гистограммах на расстоянии трех или четырех циклов сканирования с каждой стороны пика, профиль каждой масс-хроматограммы будет содержать только фон и пик данного компонента. Вклад фона (включающий как вклад хроматографической фазы, так и возможный хвост от других пиков) исключается исходя из более медленного изменения его интенсивности во времени по сравнению с интенсивностью хроматографического пика. При этом предполагается, что в пределах данного хроматографического пика фон меняется линейно.

Для определения истинных интенсивностей хроматографических пиков по масс-хроматограммам применяют моделирование пиков. Простые модели не адекватно описывают все возможные формы пиков, а сложные модели требуют проведения больших объемов расчетов для определения их параметров. В работе [118] использованы табличные модели, которые получают из самих обрабатываемых массивов данных. В качестве модельных выбираются синглетные пики с минимальным фоном и достаточно высокой интенсивностью.

Синглетные пики отделяют от дублетных или фоновых пиков по признаку относительной остроты.

После определения табличной модели по тем масс-хроматограммам, на которых пики хорошо разделены, остальные масс-хроматограммы корректируются для учета фона и определения истинных интенсивностей масс-спектральных пиков. Для этого все они приводятся к общему началу (чтобы исключить сдвиг во времени между ионами с большими и меньшими массами), затем методом наименьших квадратов оценивается фон и определяется интенсивность соответствующих масс-спектральных пиков. Такой расчет производится для масс-хроматограмм с максимумом, удаленным не более чем на $\frac{2}{3}$ цикла сканирования от установленного максимума хроматографического пика. В случае плохо разделенных хроматографических пиков интервал времен удерживания, в котором строится модель, расширяется, методом наименьших квадратов выделяются отдельные нормализованные модельные хроматографические пики и определяются параметры фона и интенсивности масс-спектральных пиков. Используемая модель для разложения сложного пика на масс-хроматограмме предполагает наличие двух перекрывающихся пиков и линейного фона. В случае трех пиков используется эта же модель для двух пиков, а вклад третьего пика учитывается в предположении линейного изменения его величины в пределах области перекрывания.

Когда давление паров компонента в ионном источнике настолько велико, что ионные токи одного или более масс-спектральных пиков перегружают аналого-цифровой преобразователь, имеет место насыщение. Такие пики определяются по характерным плоским вершинам, амплитуда которых соответствует предельной нагрузке АЦП. Реконструкция их осуществляется методом наименьших квадратов, а мода определяется по другим пикам, по которым нет насыщения.

Описанная программа была реализована на ЭВМ PDP 11/45 (объем памяти около 28 К-слов). Для обработки исходного массива 600 масс-спектров от 40 до 450 а. е. м. требуется около 8 мин. Большая часть этого времени затрачивается на чтение исходных данных с дисков и операции ввода — вывода. Программа преобразует массив исходных данных из 600 масс-спектров в массив, содержащий около 60 спектров разрешенных хроматографических пиков, которые затем сравниваются с библиотекой спектров. Весь процесс занимает 20 мин, идентифицированные компоненты выдаются в виде списка, а остальные затем идентифицируются специалистом или интерпретирующей программой ДЕНДРАЛ.

Малоинтенсивные пики, включая и изотопные, не включаются в реконструированные масс-спектры, поэтому не все компоненты могут быть обнаружены в смеси этим методом. Другая трудность состоит в том, что хроматографические пики, близко расположенные друг к другу, не разделяются. В этом случае реконструированные масс-спектры представляют собой масс-спектры не чистых компонентов, а смесей.

Для определения числа компонентов в неразрешенных или частично разрешенных хроматографических пиках использовались также специальные математические методы обработки больших массивов данных: метод главных компонент, факторный анализ и другие [119—125]. В работе [123] изучена возможность использования метода главных компонент для анализа модельных данных с целью подбора объективного критерия оценки собственных значений и предела обнаружения примесей в основном хроматографическом пике в зависимости от степени разрешения пиков. Предполагалось, что хроматографические пики имеют гауссову форму, к сигналу добавлялись случайные шумы (0,1 % от интенсивности максимального пика в масс-спектре). Анализировавшиеся масс-спектры были взяты из библиотеки масс-спектров и включали 4 соединения, для двух из которых масс-спектры содержали разные ионы в области высоких массовых чисел, а два других — ионы с одинаковыми массами, но с разной интенсивностью пиков. Ширина гауссового пика 4σ соответствовала 21 циклу сканирования. Было показано, что в отсутствие шумов предел обнаружения примеси составлял 1 %, даже если пик примеси полностью находился под пиком основного компонента. В присутствии шумов предел обнаружения повышался до 2—8 % для частично разделенных пиков и до 4—10 % для полностью неразделенных пиков. Для оценки числа компонентов в хроматографическом пике было предложено использовать в качестве критерия отношения последовательных собственных значений, граничным было выбрано эмпирическое оптимальное отношение, равное 7.

В работе [124] с помощью факторного анализа не только определялось число компонентов в неразделенных хроматографических пиках, но и осуществлялось построение масс-спектров этих компонентов. Для этого строилась область неотрицательных значений векторов — масс-спектров, являющихся линейными комбинациями собственных векторов, на границах этой области определялись искомые масс-спектры. Отбрасывание незначимых пиков с интенсивностью менее 1 % обеспечивало улучшение результатов благодаря уменьшению шумов. Для двухкомпонентных смесей получены хорошие результаты, для трехкомпонентных смесей результаты менее удовлетворительны, хотя разрешенные масс-спектры вполне распознаваемы. Очевидно, что этот метод может дать хорошие результаты только в случае, если масс-спектры анализируемых компонентов содержат специфические характеристические ионы. Он дает информацию о минимальном количестве неразделенных компонентов, но действительное их количество остается неизвестным. Реконструированные масс-спектры не всегда достаточно похожи на действительные масс-спектры компонентов.

Дроме и др. [118] использовали этот метод для получения масс-спектров отдельных компонентов. Он имеет те же ограни-

чения, что и предыдущий, хотя в удачных случаях можно получить масс-спектры чистых компонентов.

Метод, описанный в работе [116], позволяет определить число компонентов, их масс-спектры, относительное содержание и разделенные масс-хроматограммы. Матрица данных D , представляющая собой совокупность сигналов, измеренных для каждого значения m/z в каждом из циклов сканирования, выражается в виде произведения трех матриц:

$$D = AQC$$

где A — матрица нормализованных масс-спектров компонентов; Q — диагональная матрица концентраций компонентов; C — матрица нормализованных хроматограмм компонентов.

Для разделения смеси необходимо разложить матрицу данных на эти три матрицы и таким образом определить масс-спектры, концентрации и хроматограммы компонентов. Для осуществления этого разложения хроматограммы компонентов, выражаемые строками матрицы C , моделируют гауссовыми функциями, учитывая при этом форму пиков и хвосты пиков других компонентов, выражаемые экспоненциальными функциями, параметры которых измеряются по спектрам чистых компонентов. Таким образом, матрица C зависит только от одного параметра для каждого компонента — от времени удерживания. Оптимальный набор времен удерживания определяется путем минимизации функции ошибок χ^2 . Эта процедура минимизации повторяется при постепенно увеличивающемся числе компонентов n , при этом минимальное значение χ^2 будет уменьшаться, пока число n меньше действительного числа компонентов (табл. 2.1). После определения матрицы C находят матрицы A и Q .

Как показывают данные, приведенные в таблице, этот метод правильно определяет число компонентов n , так как величина χ^2 быстро убывает при приближении к правильному числу n , дальнейшее увеличение n не дает улучшения χ^2 . На рис. 2-6 приведен пример разложения неразделенного хроматографического пика на спектры отдельных компонентов этим методом, а на рис. 2-7 сопоставляются масс-спектр одного из ком-

Таблица 2.1. Пример определения числа компонентов минимизацией величины χ^2 при последовательном увеличении числа компонентов n [116]

Компоненты смеси	n реальное	Относительные величины χ^2 при разных n			
		2	3	4	5
Нафталины	3	9,45	3,78	1,00	1,14
Нафталины	2	1,58	1,00	1,04	1,02
Спирты, кетоны	3	20,77	2,31	1,00	1,00

понентов, полученный из этих данных, и масс-спектр чистого соединения [116].

Наряду с методами разделения неразрешенных хроматографических пиков с помощью ЭВМ был предложен метод определения числа плохо разделенных компонентов в хроматографическом пике и их молекулярных масс путем кратковременной ХИ молекул анализируемых соединений набегающими импульсами веществ-инициаторов, вводимых в соответствующий

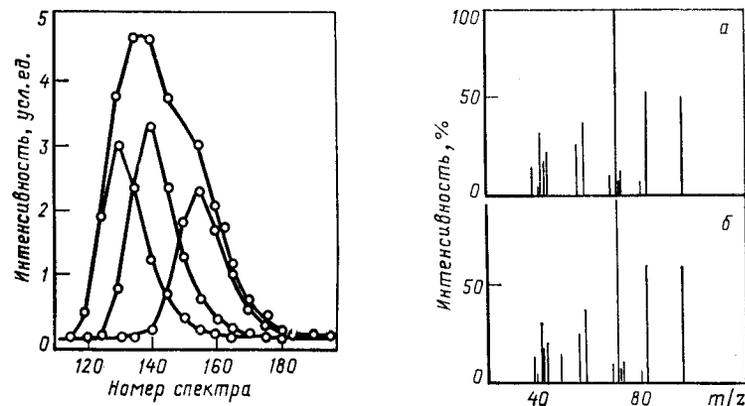


Рис. 2-6. Разложение на составляющие неразделенного хроматографического пика смеси нафталинов [116].

Рис. 2-7. Масс-спектр 3-метилциклогексанола [116]:

a — табличный; b — полученный из масс-спектров, соответствующих неразделенному хроматографическому пику.

момент в хроматограф [126]. Например, при разделении ванилина и 2-метоксинафталина в качестве инициатора вводили этанол. После кратковременной ХИ производится анализ ионных масс-хроматограмм, соответствующих парам ионов с массами X и $X+1$ (X — предполагаемая масса молекулярного иона). Интенсивность квазимолекулярных пиков возрастает на один-два порядка по сравнению с их интенсивностями в момент, предшествующий ХИ.

2.4. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ

Как и для любого инструментального метода, для ХМС важную роль играет подготовка образца к анализу, одним из существенных моментов которой является получение производных анализируемых веществ. Чаще всего этот прием нужен для повышения летучести и стабильности анализируемых веществ. Во многих случаях для анализа производных требуется меньше времени и, кроме того, при этом улучшается хроматографическое разрешение. Иногда перевод некоторых компонентов смеси в производные позволяет отделить их от остальных веществ (предварительно или в процессе самого анализа) и тем самым

Типы производных	Исходные соединения	Вводимая группа	Название производных	Сдвиг массы
Ацильные	Спирты (ROH)	HCO	Формил	28
	Фенолы (ArOH)	CH ₃ CO, CD ₃ CO	Ацетил, тридейтероацетил	42, 45
	Енолы $\left(\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \right) \text{C}=\overset{\text{I}}{\text{C}}-\text{OH}$	CF ₃ CO	Трифторацетил	96
	Амины (RNH ₂ , RR'NH)	C ₂ F ₅ CO, C ₃ F ₇ CO	Пентафторацетил, гептафтор-бутирил	146
	Оксимы (RR'NOH)	C ₆ F ₅ CO	Пентафторбензоил	194
Алкильные и силильные	Соединения, образующие простые эфиры	CH ₃ CD ₃ C ₂ H ₅	Метил Тридейтерометил Этил	14 17 28
	Карбоновые кислоты, образующие сложные эфиры	C ₆ F ₅ Si(CH ₃) ₃ Si(CD ₃) ₃ Si(CH ₃) ₂ - <i>tert</i> -C ₄ H ₉ Si(CH ₃) ₂ CH ₂ Cl Si(CH ₃) ₂ CH ₂ Br Si(CH ₃) ₂ CH ₂ I Si(CH ₃) ₂ C ₆ F ₅	Пентафторфенил Триметилсилил (<i>d</i> ₉ -Триметилсилил <i>tert</i> -Бутилдиметилсилил Хлорметилдиметилсилил Бромметилдиметилсилил Иодметилдиметилсилил «Флофемезил»	166 72 81 114 106, 108 150, 152 198 224
Производные первичных аминов	Первичные амины (RNH ₂)	=C(CH ₃) ₂	Шиффово основание ацетона	40
Производные карбонильных соединений	Альдегиды, кетоны	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}(\text{CH}_2)_3$	Шиффово основание циклобутанона	52
		$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}(\text{CH}_2)_4$	Шиффово основание циклопентанона	66
		$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}(\text{CH}_2)_5$	Шиффово основание циклогексанона	90
		$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{CHN}(\text{CH}_3)_2$	Диметиламинометилен	55
		$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}=\text{S}$	Изотиоцианат	42
		CH ₃ NO C ₂ H ₅ NO <i>втор</i> -C ₄ H ₉ NO <i>изо</i> -C ₅ H ₁₁ NO CH ₂ C ₆ H ₅ NO CH ₂ C ₆ F ₅ NO Si(CH ₃) ₃ NO NN(CH ₃) ₂ —CH ₂ —CH ₂ —	Метилоксим Этилоксим <i>втор</i> -Бутилоксим <i>изо</i> -Пентилоксим Бензилоксим Пентафторбензилоксим Триметилсилилоксим Диметилгидразон Этиленацеталь	29 43 71 85 105 195 87 42 44
Производные бифункциональных соединений	Диолы (1,2 или 1,3), гидроксимины, гидроксикислоты и др.	CH ₃ B <i>n</i> -C ₄ H ₉ B <i>tert</i> -C ₄ H ₉ B C ₆ H ₁₁ B C ₆ H ₅ B	Метилборат <i>n</i> -Бутилборат <i>tert</i> -Бутилборат Циклогексилборат Фенилборат	24 66 66 92 86
	Диолы-1,2 и гидроксимины	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{CH}_2$	Метилиден	12

Типы производных	Исходные соединения	Высшая группа	Название производных	Сдвиг массы
Производные бифункциональных соединений	Диолы-1,2 и гидроксимины	$\begin{array}{c} \diagup \text{CHCH}_3 \\ \diagdown \end{array}$ $\begin{array}{c} \diagup \text{C}(\text{CH}_3)_2 \\ \diagdown \end{array}$	Этилден Изопропилден	26 40
	Диолы-1,2	$\begin{array}{c} \diagup \text{CHC}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \end{array}$ $\begin{array}{c} \diagup \text{Si}(\text{CH}_3)_2 \\ \diagdown \end{array}$	Бензилден Диметилсилилден	88 56
Смешанные производные бифункциональных соединений	γ-Гидроксикислоты; γ-Аминокислоты	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2-\text{X} \\ (\text{X} = \text{O} \text{ или } \text{NH}) \end{array}$	Лактон Лактам	—18 —18
	Диолы	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{O} \\ \\ \text{R}-\text{O} \end{array}$	Оксид	—18
	α-Аминокислоты	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{NR}'-\text{C}=\text{S} \\ \\ \text{R}-\text{CH}-\text{NH} \\ (\text{R}' = \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5) \end{array}$	Метилгидантоин Фенилгидантоин	55 117

упростить состав анализируемой смеси. Наконец, введение новых структурных групп в молекулы анализируемых веществ может изменить их масс-спектральные характеристики (интенсивность пиков молекулярных и характеристических осколочных ионов, направление и селективность распада, вероятность захвата электронов или сродство к протону и др.), вследствие чего повышается специфичность и чувствительность анализа.

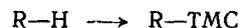
Однако, с другой стороны, получение производных — это дополнительная операция, усложняющая общую схему анализа. Для ХМС очень важен также правильный выбор производных и методов их получения, так как степень превращения разных компонентов может быть различной. В оптимальном случае реакция, используемая для получения производных, должна быть достаточно простой, селективной и приводить к количественному блокированию функциональных групп. Получаемые производные должны обладать меньшей адсорбционной способностью и большей термостабильностью по сравнению с исходными веществами, хорошей стабильностью в растворителях, стойкостью к гидролизу. И, наконец, их масс-спектральные характеристики должны быть не хуже характеристик исходных веществ, обеспечивая необходимую чувствительность и селективность определения анализируемых соединений.

Методам получения производных для ХМС анализа различных органических соединений был посвящен ряд обзоров [127—130]; поиск новых производных продолжается, хотя в последние годы количество работ, посвященных этому вопросу, несколько уменьшилось. В монографии Кнепа [131] рассмотрены вопросы получения производных и их масс-спектральные характеристики. Два обзора Никольсона [132, 133] посвящены получению и использованию производных в количественном ГХ анализе в фармацевтической химии. Вопросы выбора соответствующих производных в ГХ — МС анализе липидов были рассмотрены в работе [134].

Для получения производных в качестве реагентов используется большая группа соединений. Наиболее распространенные реагенты и основные типы реакций, связанные с получением производных, перечислены в табл. 2-2.

Пожалуй, одним из наиболее эффективных методов получения производных для ГХ — МС является силилирование. Широкое распространение получили триметилсилильные производные (ТМС). Введение триметилсилильных групп значительно повышает летучесть исследуемых соединений, получаемые производные обладают прекрасными газохроматографическими свойствами. В масс-спектрах веществ, содержащих ТМС-группу, наблюдается триплет пиков в области молекулярных ионов, обусловленный наличием у кремния изотопов ^{29}Si и ^{30}Si (распространенность 4,7 и 3,1 % соответственно). Кроме того, для ТМС-производных характерно отщепление частиц CH_3 и

$(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ (15 и 73 а. е. м. соответственно) от молекулярного иона. ТМС-производные образуются для большого числа функциональных групп: $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $-\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ и др. в соответствии с реакцией



Одним из первых силилирующих реагентов был гексаметилдисилазан, который затем был заменен бис(триметилсилил)ацетамидом и бис(триметилсилил)трифторацетамидом, представляющими собой очень хорошие растворители. Реакции с этими реагентами, протекающие, как правило, количественно, очень часто применяются для получения ТМС-производных сложных смесей органических соединений, выделяемых из биологических объектов.

Одно из основных достоинств силилпроизводных — простота проведения реакции. По убыванию «силильной донорной активности» ТМС-реагенты могут быть представлены следующим рядом [129]:

триметилсилилимидазол (ТМСИМ),
N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА),
N,O-бис(триметилсилил)ацетамид (БСА),
N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид (МСТФА),
N-триметилсилилдиэтиламин (ТМСДЭА),
N-метил-N-триметилсилацетамид (МСТА),
триметилхлорсилан (ТМСХ) в присутствии основания,
гексаметилдисилазан (ГМДС).

Отметим некоторые особенности реагентов. Так, ТМСИМ не реагирует с амино-группами, он может быть использован для получения ТМС-производных в водном растворе. Реагенты БСТФА и БСА могут быть выбраны для получения N-ТМС-производных, причем первый образует летучие побочные продукты, не мешающие ГХ анализу низкомолекулярных соединений. Реагент ТМХС является наиболее слабым силилирующим агентом, если использовать его в отсутствие основания (пиридин, диэтиламин). Кроме того, он вызывает изомеризацию незащищенных кетонных групп. На практике в 95 % случаев введение ТМС-группы осуществляется с помощью двух реагентов — ТМСИМ и БСТФА с использованием, когда это необходимо, ТМХС в качестве катализатора.

Органические функциональные группы можно расположить в следующий ряд по уменьшению «силильной акцепторной способности»: спирты > фенолы > карбоновые кислоты > амины > амиды. Для любой из этих групп характерна закономерность: наиболее активна первичная группа, наименее активна третичная.

Основное ограничение при использовании ТМС-эфиров в анализе связано с их недостаточной устойчивостью к гидролизу в условиях хроматографического разделения. Поэтому были начаты поиски более стабильных блокирующих реагентов, с по-

мощью которых можно было бы получать алкил- и триалкилсилиловые эфиры в более мягких условиях, с более высокой гидролитической стабильностью и в ряде случаев лучше разделяемые на хроматографической колонке. При одинаковых с ТМС-эфирами летучести и термостабильности они отличаются большей селективностью масс-спектральных характеристик [136]. Кори и соавт. [127, 128] показали, что *изо*-пропилдиметилсилилловый эфир (ИПДМС) и *трет*-бутилдиметилсилилловый эфир (ТБДМС), которые с успехом могут быть использованы при анализе простагландинов, в 10^2 — 10^4 раза более стабильны, чем ТМС- эфиры. Триалкилсилиловые эфиры с успехом используются в качестве реагентов при разделении сложных биологических смесей на набивных хроматографических колонках с невысокой разделяющей способностью [137]. Были получены масс-спектры триалкилсилиловых эфиров спиртов, стероидов, дифенилпропаноидов и каннабиноидов [138, 139]. В большинстве случаев пик молекулярного иона был малоинтенсивным или отсутствовал. Наиболее интенсивные пики соответствовали ионам, образующимся при разрыве связи кремний — алкильная группа. Относительно интенсивные пики отвечали ионам, образованным при элиминировании частиц C_nH_{2n} из алкильной группы, связанной с кремнием. Ионы $(\text{M} - \text{R})^+$ распадались с элиминированием диалкилдисилаанола R_2HSiOH . Для триалкилсилиловых эфиров этот путь распада был преобладающим, тогда как для ТМС-эфиров наиболее характерно удаление триметилсилаанола $(\text{CH}_3)_3\text{SiOH}$.

Метод ХМС широко используется для идентификации жирных кислот в биологических объектах. Чаще всего кислоты для анализа переводятся в метиловые эфиры. Однако масс-спектры этих производных кислот характеризуются интенсивными пиками в области низких массовых чисел, отражая, как правило, сложноэфирную группировку, а не структуру кислотного радикала, поэтому они не обеспечивают надежной идентификации и достаточной чувствительности определения. Было предложено использовать ТБДМС- эфиры жирных кислот, которые обладают лучшими хроматографическими и масс-спектральными характеристиками [140]. Почти во всех масс-спектрах этих производных максимальный пик отвечал иону $(\text{M} - \text{C}_4\text{H}_9)^+$, интенсивность этого пика была особенно высока в масс-спектрах производных моно-, ди- и триненасыщенных органических кислот. При анализе методом ИМХ предел обнаружения находится на уровне ниже нанограммового.

В качестве блокирующих агентов при анализе стероидов были предложены этилдиметилсилиловый (ЭДМС) и пропилдиметилсилиловый (ПДМС) эфиры [141]. Для этой цели использовались также ТБДМС и аллилдиметилсилиловый эфир (АДМС) [129]. Последний образует более стабильные производные по сравнению с ТМС и более летучие по сравнению с ТБДМС. Аллилдиметилсилилимидазол также обладает гораздо

большей реакционной способностью по сравнению с *трет*-бутилдиметилсилилимидазолом, его реакционная способность меньше зависит от стерических факторов.

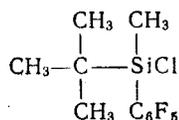
Масс-спектры алкилдиметилсилильных производных стероидов имеют слабый пик молекулярных ионов и интенсивные пики ионов ($M - R$)+, образующихся при отрыве от атома кремния алкильной группы. Пики этих ионов могут служить аналитическими характеристиками при количественном анализе методом СИД.

Галогенметилдиметилсилиловые эфиры, получившие широкое «признание» в ГХ, применяют для тех же целей и в ГХ — МС. Эти производные получают с количественным выходом для спиртов и стероидов, желчных кислот, простагландинов, различных инсектицидов, карбоновых кислот, гидроксистероидов, углеводов. Масс-спектры этих производных лучше отражают стереохимию исходных соединений, чем спектры ТМС-производных. Относительная интенсивность пиков ионов ($M - CH_2Cl$)+ в масс-спектрах этих производных стероидов достаточно высока, что позволяет использовать для их анализа метод СИД.

В последние годы заметное распространение получили пентафторфенилдиметилсилиловые эфиры в качестве производных при анализе карбоновых кислот, фенолов, аминов, спиртов, стероидов, хлоргидринов [142]. Для удобства пентафторфенилдиметилсилильный радикал принято называть «флофемезил» (flopemesil), причем это сокращение принято для обозначения этого радикала как в реагентах, так и в производных. Были изучены масс-спектры различных флофемезильных производных и рассмотрена относительная реакционная способность реагентов при взаимодействии с разными функциональными группами [129]. Так, для стероидов «силильная донорная способность» в растворе пиридина характеризуется следующим рядом (в порядке убывания): флофемезиламин > флофемезилхлорид > флофемезилдиэтиламин > флофемезилдиметилсилазан > флофемезилимидазол.

Флофемезилпроизводные могут быть обнаружены с помощью электроннозахватного детектора на уровне пикограммовых и фемтограммовых количеств ($10^{-12} - 10^{-15}$ г). Не меньшую чувствительность обеспечивает и детектирование отрицательных ионов в ГХ — МС.

Для получения летучих производных спиртов, фенолкарбоновых кислот, тиолов и аминов был синтезирован и опробован новый силилирующий агент — *трет*-бутилпентафторфенилметилхлорсилан (*трет*-бутилфлофемезилхлорид) [143]. Этот агент



имеет повышенную гидролитическую стабильность по сравнению с флофемезилом, а масс-спектры получаемых с его помощью производных обладают высокой характеристичностью.

Ацилирование — простейший и один из самых известных методов получения производных. Такие соединения, как амины, фенолы и спирты, могут быть превращены в ацильные производные реакцией с ацилхлоридами или ангидридами кислот. Эти производные, образующиеся с количественным выходом, обладают великолепными хроматографическими характеристиками [132]. В ранних исследованиях получали обычно ацилпроизводные, так как введение в молекулу исходного вещества более крупных остатков приводило к резкому увеличению молекулярной массы и снижению летучести производных, а значит, и к увеличению времени удерживания. При введении галогенированных, в частности фторированных, остатков получают производные с большей летучестью, чем при реакциях с негалогенированными реагентами. Одним из наиболее распространенных реагентов стал ангидрид гептафтормасляной кислоты. В последнее время получили распространение ацилимидазолы (где ацил = ацетил, трифторацетил, гептафторбутил, пентафторбензоил и пентафторпропионил), которые образуются в мягких условиях и в то же время не дают кислых побочных продуктов, возникающих при реакциях ангидридов и хлорангидридов. Побочные продукты, образующиеся в реакциях с ацетилимидазолами, инертны и не взаимодействуют с образующимися производными, однако эти производные менее летучи по сравнению с производными фторангидридов.

В настоящее время широко используются так называемые бис(ациламинды): *N*-метилбис(трифторацетамид) и бис(трифторацетамид) [132]. С их помощью осуществляют трифторацетилирование в мягких условиях и получают легколетучие производные, при этом высокой летучестью обладают и побочные продукты.

Говоря об ацилпроизводных, необходимо отметить их относительную нестабильность, которая может в некоторых случаях проявиться в их разложении в растворах и при вводе в хроматографическую колонку.

Многие органические соединения, содержащие активный атом водорода, реагируют с соединениями, легко отщепляющими алкильную группу, в присутствии основного катализатора, образуя алкилпроизводные. В качестве таких реагентов ранее чаще всего использовались диметилсульфат и алкилгалогениды. Продукты метилирования (алкилирования) обычно стабильны и имеют хорошие хроматографические характеристики. В настоящее время в качестве метилирующего агента обычно используется диазометан, реакция с которым осуществляется с количественным выходом в мягких условиях, без нежелательного повышения температуры. Кроме того, избыток реагента легко удаляется. С помощью этого реагента получают метильные

производные кислот и некоторых спиртов. Легче всего образуются эфиры кислот. При метилировании соединений, содержащих несколько функциональных групп, возможно образование набора производных. Широкое распространение получил процесс перметилирования при анализе углеводов, пептидов, пуринов и пиримидинов.

Получение стабильных производных оксимов связано с блокированием кетогруппы для предотвращения ее енолизации в последующих реакциях. (Так, в случае гидроксистероидов [133] блокирование дает возможность проводить последующее алкилирование гидроксильных групп.) Получение производных осуществляется растворением кетона в подходящем растворителе и добавлением соответствующего замещенного гидроксиламмонийхлорида. В некоторых случаях реакцию проводят при комнатной температуре, но иногда и в более жестких условиях. Часто используются метоксим и О-бензоилоксимы. С фторсодержащими аналогами (например, О-2, 3, 4, 5, 6-пентафторбензоилоксимом) получают производные, обладающие большим сродством к электрону, а значит, весьма удобные для масс-спектрометрии отрицательных ионов.

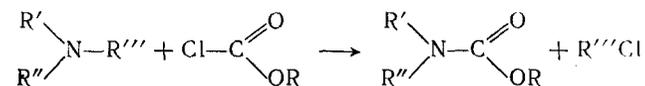
Введение в молекулу атома азота также облегчает детектирование в ряде случаев. Так, для анализа альдегидов в образцах воздуха в присутствии углеводородов был предложен метод получения производных для последующего анализа ГХ — МС — ХИ с газом-реагентом NH_3 . Производные получали при взаимодействии альдегидов с гидрохлоридом бензоилоксимамина или с гидрохлоридом метилоксимамина. Масс-спектры химической ионизации О-бензоилоксим-производных альдегидов оказались достаточно характеристичными для идентификации, а применение селективного детектирования позволило осуществить количественный анализ на уровне $4 \cdot 10^{-6} \%$ [144].

Амины, играющие важную роль в структурных и биохимических исследованиях, анализировались в виде ацетил-, триметилсилил-, трифторацетил-, пентафторпропионил- и гептафторбутирильных производных. Первичные амины часто анализировались в виде изотиоцианатных производных [145], которые обычно получают термическим разложением карбалкокситиокарбаматов.

Недавно был предложен новый метод получения производных первичных и вторичных аминов при взаимодействии их с этиловыми эфирами дитиокарбаминовой кислоты [145]. Образующиеся производные первичных аминов разлагаются при пиролизе в инжекторе хроматографа (в то время как более устойчивые производные вторичных аминов остаются без изменения) и анализируются на ГХ колонке высокого разрешения, соединенной с масс-спектрометром.

В случае третичных аминов можно получить N, N'-дизамещенные карбаматы, действуя на амины эфиром хлормуравьи-

ной кислоты в присутствии основного катализатора



Большую роль в получении производных для ХМС играет метод смешанного блокирования различных функциональных групп разными остатками. В этом случае правильный подбор возможных блокирующих групп часто позволяет увеличить стабильность производных и повысить специфичность распада при диссоциативной ионизации. Так, при изучении биологически активных катехоламинов были предложены следующие реакции получения производных: перфторацелирование, триметилсилилирование, N-трифторацетил-О-триметилсилилирование (ТФА — ТМС) и пентафторбензилимидо-О-триметилсилилирование [146]. ХМС анализ катехоламинов чаще всего осуществляют в виде их трифторацетатов и пентафторпропионатов, при этом достигается полное разделение норэпинефрина и 6-гидроксидофа-амина. Однако затем было показано, что эти производные малостабильны в органических растворителях. Предложенные впоследствии ТФА — ТМС-производные характеризовались хорошим хроматографическим разделением и стабильностью, но при их получении образуются следовые количества неидентифицированных побочных продуктов.

Миасаки с соавт. [146] недавно предложили новый метод получения смешанных производных при ХМС анализе 3-метокситирамина, дофа-амина, норэпинефрина и 6-гидроксидофа-амина. Действуя на них трифторуксусным ангидридом, метанолом и диметил-n-пропилсилилимидазолом, получали N-трифторацетил-О-диметил-n-пропилсилиловые эфиры и 2-О-метил-N-трифторацетил-О-диметил-n-пропилсилиловые эфиры.

На рис. 2-8 сопоставляется стабильность полученных этим методом производных и использовавшихся ранее ТФА — ТМС-производных. Видно, что стабильность новых производных гораздо выше. Получаемые этим методом производные полностью разделяются на неполярной жидкой фазе, например OV-101. Масс-спектры, полученные при ХИ (газ-реагент NH_3), характеризуются интенсивными пиками квазимолекулярных ионов, что позволило получить для допамина предел обнаружения 2 пкг при отношении сигнал/шум 2 : 1.

В табл. 2-3 приведены масс-спектральные характеристики полученных производных катехоламинов.

Для анализа бифункциональных производных широкое распространение получили замещенные борные кислоты: метил-, бутил-, трет-бутил-, циклогексил- и фенилборная [147]. Они вступают в реакцию со многими полярными функциональными группами в мягких условиях, образуют стабильные производные

с хорошими хроматографическими и масс-спектральными характеристиками. Боратные соединения могут быть получены для соединений с двумя разными функциональными группами, например для алкилзамещенных 1,2-, 1,3- и 1,4-диолов, 1,2- и 1,3-гидроксикислот, 1,2- и 1,3-гидроксиаминов, ароматических соединений с аминными, карбоксильными, орто-замещенными

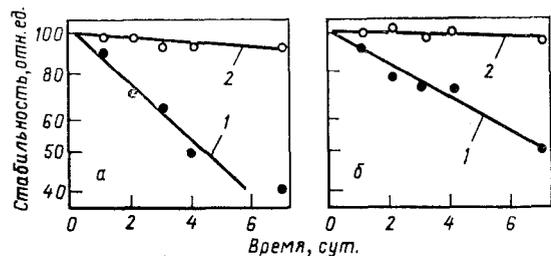


Рис. 2-8. Стабильность ТФА — ТМС-производных (1) и ТФА — ДМПС-производных (2) норэпинефрина [146];

а — при хранении в бензоле; б — при хранении в этилацетате.

фенильными группами (табл. 2-4). Многие бифункциональные соединения с такой структурой встречаются среди физиологически важных классов соединений, например стероидов, углеводов, нуклеозидов, липидов, катехоламинов, простагландинов и т. д.

Масс-спектры ХИ боратных производных характеризуются наличием интенсивных пиков молекулярных или квазимолекулярных ионов. Атом бора оказывает определяющее влияние на направления распада, так что наиболее интенсивные пики в масс-спектрах относятся к исходной молекуле, а не к блокирующей группе. Наличие двух природных изотопов бора ($^{10}\text{B} : ^{11}\text{B} = 1 : 4,2$) облегчает идентификацию даже при низком разрешении.

Таблица 2-3. Масс-спектральные характеристики ТФА-ДМПС-производных [146]

Исходный катехоламин	M	Максимальный пик	Другие ионы *
3-Метокситирамин	363	(M-43) ⁺ 320	126 (42), 178 (65), 192 (58), 273 (28), 363 (23)
Дофа-амин	449	M ⁺ 449	193 (20), 323 (58), 324 (20), 336 (10), 406 (60)
Норэпинефрин	479	(M-126) ⁺ 335	479 (2)
Эпинефрин	493	(M-140) ⁺ 353	493 (1)
6-Гидроксидофа-амин	565	M ⁺ 565	309 (31), 397 (16), 439 (72), 452 (4), 522 (6)

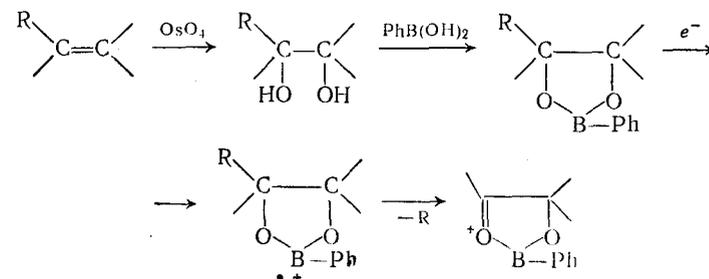
* Цифры в скобках — интенсивности пиков.

Таблица 2-4. Некоторые боратные производные для ГХ — МС [147]

Типичные соединения	Боратные производные
$\text{HO}-\text{C}-\text{C}-\text{OH}$ (диолы, сахара)	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{O}-\text{BR} \\ \\ -\text{C}-\text{O} \\ \end{array}$
$\text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{OH}$ (бензойн)	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{O}-\text{BR} \\ \\ -\text{C}-\text{O} \\ \end{array}$
$\text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{OH}$ (салициловая кислота, миндальная кислота)	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{O}-\text{BR} \\ \\ \text{O}=\text{C}-\text{O} \\ \end{array}$
$\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$ (фенилпировиноградная кислота)	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{O}-\text{BR} \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{O} \\ \\ \text{O}=\text{C}-\text{O} \\ \end{array}$
$\text{HO}-\text{C}-\text{C}-\text{NH}_2$ (этанол амины)	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{NH}-\text{BR} \\ \\ -\text{C}-\text{O} \\ \end{array}$
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}=\text{O}$ (антрапиловая кислота)	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{NH}-\text{BR} \\ \\ \text{O}=\text{C}-\text{O} \\ \end{array}$

Производные диолов и кетонов имеют хорошие хроматографические характеристики; этот факт может быть использован при анализе алкенов, которые селективно окисляются OsO_4 в *цис*-диолы. Последующее превращение их в фенилборатные производные и анализ с помощью ГХ — МС с электроударной или химической ионизацией позволяет установить положение двойной связи в исходных алкенах [147].

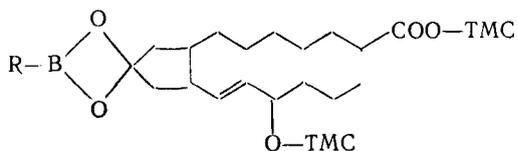
α -Распад производных при электронном ударе приводит к образованию характеристических ионов (M-R)⁺:



Аналогичным образом можно анализировать метиловые эфиры ненасыщенных жирных кислот после селективного окисления и получения фенолборатных и бутилборонатных производных.

Боратные производные широко используются для стабилизации углеводов. Особо следует сказать о смешанных борат-ТМС-производных, дающих весьма характерные масс-спектры, на основании которых удается определять число атомов углерода (пентоза или гексоза), размер кольца (фураноза или пираноза) и стереохимию гидроксильных групп.

Для анализа таких многофункциональных соединений, как простагландины, готовят тризамещенные производные, содержащие, например, циклическую боратную, ТМС-эфирную и ТМС-сложноэфирную группы:



Различные борные кислоты используют для получения хорошо разделяющихся полизамещенных производных простагландинов $F_{1\alpha}$, $F_{2\alpha}$ и $F_{3\alpha}$. Метод ХИ позволяет определять простагландины F_{α} по ионам $(M-RBO_2H_2-TMS-O)^+$, которые для разных простагландинов имеют разные массы. ЭУ масс-спектры производных простагландинов $F_{2\alpha}$ характеризуются максимальным пиком иона $(M-71)^+$, имеющим такую же массу, как соответствующий ион $(M-69)^+$ в спектре $F_{3\alpha}$. Эти ионы (m/z 393) часто используются для определения простагландинов методом СИД [147].

Циклические боратные производные получают также для анализа липидов, гидроксиламинов, гидроксикислот, катехоламинов.

2.5. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ В СМЕСЯХ

При обычном масс-спектральном анализе условно считают, что качественный анализ заключается в установлении состава двух- или многокомпонентных смесей и приближенной оценке их состава [148]. Под идентификацией можно понимать отношение данного вещества к весьма узкому типу известных веществ. Если идентифицируемое вещество ранее не было исследовано, то возникает необходимость установления его структуры с той или иной степенью приближения.

Идентификация соединений и качественный анализ смесей являются важнейшей целью ХМС анализа. Этот метод позволяет охарактеризовать вещество, не выделяя его из смеси, часто весьма сложной. Он дает информацию о физико-химических

характеристиках вещества, таких как температура кипения, полярность и т. п. (по хроматографическим данным), а также о молекулярной массе и химической структуре (по масс-спектральным данным). Если учесть, что этот уникальный по эффективности метод позволяет анализировать ничтожно малые количества вещества, то неудивительно, что он находит широкое применение для решения самых сложных задач качественного анализа в биохимии, химии природных соединений, охране окружающей среды и других областях.

Для качественного анализа и установления структуры смесей ХМС дает различные возможности. Во-первых, это полные масс-спектры компонентов, являющиеся как бы «отпечатками пальцев» молекулярной структуры и характеризующие молекулярную массу и массы основных структурных фрагментов, по которым можно установить их состав и наличие определенных функциональных групп. Масс-спектры высокого разрешения позволяют с большой точностью установить элементный состав молекулярного и осколочных ионов, а значит, и структуру исходной молекулы. Во-вторых, масс-хроматограммы дают возможность определить времена удерживания (или индексы удерживания) для всех разделенных компонентов, причем благодаря селективному ионному детектированию и специальным методам обработки данных степень разделения масс-хроматограмм, как правило, значительно выше, чем обычных хроматограмм, регистрируемых другими хроматографическими детекторами. Селективный характер детектирования с помощью масс-спектрометра позволяет выделить определенные классы веществ из сложной и даже неразделенной хроматограммы. В-третьих, разные методы ионизации обладают селективностью по отношению к некоторым структурным или функциональным особенностям анализируемых молекул. Выбирая соответствующий способ ионизации, можно осуществить селективный анализ определенных типов структур или удостовериться в наличии определенных функциональных групп.

Полезными при идентификации оказываются и данные других методов анализа и априорные сведения об анализируемом веществе (метод синтеза, указывающий на возможные побочные продукты или примеси, возможные метаболические пути, поведение при хроматографическом разделении на фазах различной полярности и др.), которые могут помочь при выборе масс ионов для селективного ионного детектирования, сузить круг возможных структур и т. п.

Располагая этой информацией, аналитик может достаточно надежно идентифицировать большую часть компонентов даже в самых сложных смесях, а в случаях, когда это невозможно, дать хотя бы приблизительную характеристику молекулы ее молекулярную массу, некоторые структурные фрагменты или функциональные группы. Эта задача облегчается эффективными методами обработки ХМС информации с помощью ЭВМ

Идентификация соединений по масс-спектрам осуществляется сравнением полного масс-спектра анализируемого вещества или отдельных пиков в нем с масс-спектрами эталонных соединений либо интерпретацией анализируемого масс-спектра на основании спектро-структурных корреляций. Пики ионов для анализа измеряются либо путем регистрации полных масс-спектров компонентов хроматограммы, либо непрерывной регистрацией небольшого набора пиков методом селективного ионного детектирования. Этот метод, основанный на регистрации лишь заранее выбранных специфических ионов, гораздо более чувствителен, чем метод ионной масс-хроматографии, осуществляемый с помощью ЭВМ и масс-спектрометра, работающего в режиме циклической развертки.

Ситуация довольно проста в том случае, когда массы ионов, выбранных для анализа, достаточно характеристичны и отличаются от масс ионов остальных компонентов смеси. В противном случае имеет место наложение на характеристические ионы данного компонента со стороны других компонентов смеси. Одним из способов уменьшения этого наложения является использование масс-спектрометра с высокой разрешающей способностью. В этом случае могут быть разделены ионы, имеющие одинаковые номинальные массы, но разные элементные составы. Например, если масса характеристического иона равна 114, а элементный состав отвечает формуле $C_5H_{10}N_2O$, то для исключения наложения иона C_3H_{18} с такой же номинальной массой необходима разрешающая способность 2000, так как разность масс этих ионов составляет 0,06 а. е. м.

При идентификации веществ, присутствующих в малых количествах, всегда необходимо учитывать возможность наложения ионов компонентов, присутствующих в больших концентрациях. Это может, в частности, привести к «переоткрыванию» примеси. Так, при анализе нитрозаминов в конине были обнаружены только диметилнитрозамин и диэтилнитрозамин [39]. Чтобы различить диметилнитрозамин ($M = 74,048$) и два триметилсилильных иона, содержащих атомы ^{29}Si и ^{13}C , массы которых отличаются от массы анализируемого иона соответственно на 0,0011 и 0,0027 а. е. м., необходима разрешающая способность около 60 000.

На рис. 2-9 приведена часть масс-спектра, полученного при разрешении 70 000, соответствующая номинальной массе 74. Первый пик относится к перфторкеросину, второй пик — к примеси кремнийсодержащих ионов из триметилсилил-производного с массой 74,0469 и элементным составом $^{12}C_3H_9^{29}Si$. Третий пик образован за счет молекулярного иона диметилнитрозамина $C_2H_5N_2O$ с массой 74,048. Четвертый пик является изотопным пиком триметилсилильного иона $^{12}C_2^{13}CH_3^{29}Si$ с массой 74,0507.

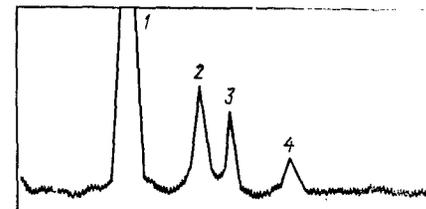
Идентификация облегчается в том случае, когда исследуемая смесь состоит из соединений одного класса с разными хро-

матографическими характеристиками, которые известны исследователю. На рис. 2-10 приведена масс-хроматограмма по полному ионному току, а также некоторые ионные масс-хроматограммы концентрата летучих соединений, выделенного из бобов. Эти бобы, используемые в кондитерской промышленности, иногда приобретают интенсивную окраску, которая, как

Рис. 2-9. Профиль пика m/z 74 при разрешении 70 000 при анализе компонентов, определяющих запах жареного мяса [39]:

1 — ПФК; 2 — $C_3H_9^{29}Si$ (74,0469);

3 — $C_2H_5N_2O$ (74,0480); 4 — $C_2^{13}CH_3^{29}Si$ (74,0507)



предполагают, может быть вызвана хлоранизолами. Для идентификации этих соединений был применен метод МИД с регистрацией пиков ионов с массами 210, 212 для трихлоранисолов и 244, 246 для тетрахлоранисолов. Этим методом удалось обнаружить следовые количества двух трихлоранисолов и двух тетрахлоранисолов с соответствующими временами удерживания.

В этом примере рассматривались хлорсодержащие соединения, чьи характеристические ионы имеют массы, отличающиеся от масс других компонентов смеси. Затруднения в идентификации возникают тогда, когда массы ионов анализируемых соединений не являются характеристичными (такая ситуация имеет место при определении нитрозаминов в табачном дыме или пищевых продуктах). При анализе табачного дыма с помощью системы ГХ—МС—ЭВМ [39] образец вводили в капиллярную колонку (150 м) с неподвижной фазой Усоп В. Масс-хроматограммы строились по ПИТ и по характеристическим ионам нитрозопиперидина (m/z 30, 42, 55, 56, 114). Ни один из этих ионов не был специфическим, например ион с массой 30 подвергался изотопному наложению со стороны иона с массой 29.

Согласно данным по времени удерживания нитрозопиперидина, максимумы на масс-хроматограммах для всех пяти ионов соответствуют этому соединению, подтверждая присутствие нитрозопиперидина в смеси. Однако вывод, полученный на основании только этой информации, весьма ненадежен. Для того чтобы оценить надежность полученной информации, необходимо рассмотреть полный масс-спектр этого соединения. Этот масс-спектр (рис. 2-11а) содержит большое число пиков, на фоне которых теряются пики молекулярного и характеристических осколочных ионов нитрозопиперидина. Операция вычитания фона позволяет получить более четкий масс-спектр (рис. 2-11б), который хорошо совпадает с масс-спектром эталонного нитрозопиперидина.

В большинстве случаев исследователю приходится анализировать смеси, для которых известен лишь приближенный качественный состав. При этом чаще всего этот состав определен с точностью до принадлежности к какой-либо узкой группе соединений и редко — с точностью до изомерной структуры. Естественно, времена удерживания только с определенным приближе-

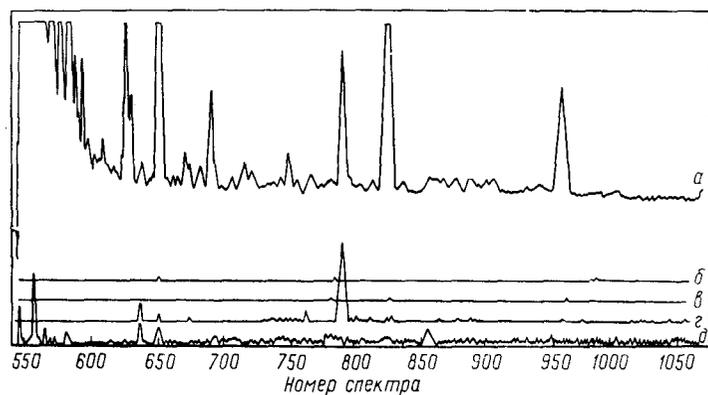


Рис 2-10. Хроматограмма экстракта белых бобов по ПИТ (а) и масс-хроматограммы ионов:

б — m/z 210; б' — m/z 212; б'' — m/z 214; б''' — m/z 246.

нием отвечают экспериментальным результатам, а имеющиеся в литературе масс-спектры предполагаемых компонентов также могут значительно отличаться от экспериментальных. Кроме того, могут встречаться и не известные ранее компоненты.

В работе [149] была решена задача идентификации соединений, содержащихся в экстрактах из тканей мертвых баклаанов, найденных в поле. Хроматограмма по ПИТ, полученная при циклической развертке масс-спектров, отражала сложный характер смеси. Многие компоненты экстракта были идентифицированы как полихлордифенилы (ПХД). Однако в некоторых масс-спектрах соотношение изотопов хлора в отдельных ионах (группы пиков в области масс 376, 341, 306) отвечало неизвестному соединению. В то же время ионы с массами 290 и 220 в этих же масс-спектрах являются характеристическими для ПХД. Для того чтобы найти точное положение на хроматограмме, отвечающее неизвестному соединению, и получить его масс-спектр с помощью ЭВМ после вычитания пиков ионов, соответствовавших ПХД, были построены масс-хроматограммы по ионам с массами 376, 341 и 306. Все они имели одинаковый характер, что подтвердило вывод об их принадлежности одному и тому же соединению. Для получения масс-спектра этого соединения без наложения ПХД с молекулярной массой 290 из экспериментального масс-спектра был вычтен соседний масс-

спектр, не содержащий пиков ионов неизвестного соединения. В результате это соединение было идентифицировано как окта-хлорстирол.

Естественно было проверить наличие в экстракте гепта-хлорстирола, для которого можно достаточно легко установить априори массы характеристических ионов. Эти ионы были об-

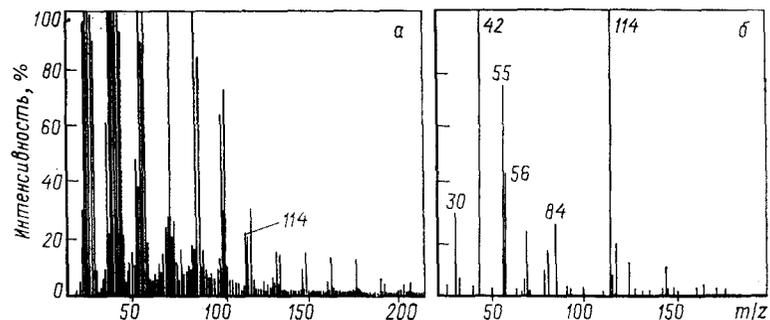


Рис. 2-11. Масс-спектры нитрозопиперидина, содержащегося в экстракте сигаретного дыма [39]:

а — до вычитания фона; б — после вычитания фона.

наружены в двух точках масс-хроматограммы, что свидетельствовало о наличии двух изомеров гептахлорстирола. Эти два соединения не были обнаружены при рассмотрении полных масс-спектров, так как пики их характеристических ионов были закрыты пиками ионов, образующихся при распаде ПХД.

Даже при неполном разделении компонентов, когда каждый хроматографический пик содержит несколько соединений, анализ масс-спектров компонентов позволяет идентифицировать их. Так, ГХ—МС XI была использована для детальной характеристики триглицеридов (ТГ) с числом атомов углерода до 62 в образцах арахисового, рапсового и горчичного масел [150]. Хроматограммы ТГ, выделенных из указанных масел, имеют широкие пики сложной формы, каждый из которых соответствует ТГ с данным числом атомов С. Масс-спектры XI (газ-реагент — изобутан) также не содержат пиков молекулярных ионов, а из осколочных ионов максимальную интенсивность имеют пики ионов $(MH - RCO_2H)^+$. При использовании газа-реагента NH_3 интенсивность пиков квазимолекулярных ионов $(M + NH_4)^+$ в 20 раз выше, чем при ЭУ; из пиков осколочных ионов присутствуют только пики ионов $(MH - RCO_2H)^+$, которые являются максимальными в масс-спектрах. Использовался хромато-масс-спектрометр ЛКВ 9000 с ионным источником с ЭУ и XI. Условия анализа: колонка 0,35 м × 3 мм, запечатанная 1% OV-1 на Хромосорбе W (80—100 меш); программированное повышение температуры от 220 до 335 °С со скоростью 4 °С/мин и изотермический режим при 335 °С до регистрации

последнего хроматографического пика; температура инжектора и сепаратора 350 °С, газ-носитель гелий (45 мл/мин); температура ионного источника в случае ХИ 220 °С, давление 120 Па, в случае ЭУ — 310 °С, энергия электронов 20 эВ.

Осколочные ионы ($\text{MH} - \text{RCO}_2\text{H}$)⁺ служили для установления типов ТГ: распределения в них жирных кислот по числу атомов углерода и числу двойных связей.

Для типа ТГ 18 : 22 : 22, соответствующего основному компоненту в группе молекулярных ионов ТГ C_{62} , масса квазимолекулярного иона 1014 указывает на наличие трех двойных связей в молекуле. Максимальные интенсивности пиков ионов ($\text{MH} - \text{RCO}_2\text{H}$)⁺ соответствуют ионам с массами 715 и 659, образовавшимся при отщеплении групп $\text{C}_{18}(1-)$ и $\text{C}_{20}(1-)$. Возможны 24 комбинации для ТГ 18 : 22 : 22 с разной степенью ненасыщенности, из них наиболее вероятна 18 : 1 — 22 : 1 — 22 : 1 и, в меньшей степени, 18 : 2 — 22 : 1 — 22 : 1. Для типа ТГ 20—20—22 имеется 17 возможных комбинаций, из которых наиболее вероятна 20 : 1 — 20 : 1 — 22 : 1. Аналогично были определены возможные комбинации для остальных типов ТГ [150].

ГХ—МС ХИ дает большую информацию по сравнению с ЭУ благодаря большей интенсивности пиков молекулярных ионов, позволяющей обеспечить более точное и детальное определение молекулярной структуры. В данном случае хроматограф фактически использовался только для разделения групп ТГ по числу атомов С в молекуле, анализ состава и структуры ТГ в этих группах производился на основании масс-спектров.

Более детальная информация о структуре ТГ была получена с помощью ионной масс-хроматографии. Для этого осуществлялась циклическая непрерывная регистрация масс-спектров с накоплением данных в памяти ЭВМ, из них затем реконструировались ионные масс-хроматограммы для любого иона. Масс-хроматограммы по пикам квазимолекулярных ионов ТГ с 48, 50, 52 и 54 атомами С в молекуле, выделенных из молочного жира, были зарегистрированы в виде четырех пиков, каждый из которых соответствовал группе ТГ с одинаковым числом атомов углерода в молекуле. Ионные масс-хроматограммы показывают, что времена удерживания в некоторой степени зависят от числа двойных связей: время удерживания увеличивается в ряду 2—1—0—4—3—5 для ТГ C_{54} и в ряду 2—1—0—3 для других ТГ. Аналогичные зависимости были получены для пиков ионов RCO^+ по данным ГХ—МС—ЭУ.

Во многих приложениях ХМС важной задачей является определение отдельных изомеров. Так, канцерогенная активность полициклических ароматических углеводородов сильно зависит от структуры молекул: из пяти структурных изомеров тетрациклических ароматических систем с молекулярной массой 228 бенз[а]антрацен является сильным канцерогеном, хризен и бенз[с] фенантрен обладают слабой канцерогенностью, а два других соединения не обнаруживают канцерогенной активности.

Анализ изомеров затруднен из-за близости их хроматографических и масс-спектральных характеристик. Естественно, подбор оптимальных условий анализа с варьированием, например, различных методов ионизации и различных условий разделения, значительно повышает вероятность разделения изомеров. Немаловажную роль играет правильный выбор производных анализируемых компонентов со специфическими направлениями диссоциативной ионизации. Так, при ХИ со смесью газов-реагентов (5—10 % CH_4 в аргоне) разные изомеры полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) давали различные масс-спектры [151]. Специфичность ХИ была использована [152] для идентификации изомеров ПАУ, обнаруженных в воздухе. Метод позволил достаточно хорошо разделить метилантрацены и метилфенантрены, а также метилфлуорантены, метилпирены и бензфлуорены; однако положение метильных групп в кольце не было установлено с достаточной надежностью.

При анализе стереоизомеров с помощью ГХ—МС существенную роль играет газохроматографическая информация. Это обусловлено тем, что чисто масс-спектрометрический анализ стереоизомеров имеет ограниченную область применения, хотя в ряде случаев различие масс-спектрометрических характеристик обеспечивает достаточно надежное определение стереоизомерных форм.

Как правило, ГХ анализ оптически активных соединений из биологических образцов может быть осуществлен двумя путями: получением производных чистого энантиомера реакцией с оптически активным реагентом и последующим разделением образующихся диастереоизомеров на нехиральной неподвижной фазе либо непосредственным разделением энантиомеров на хиральной неподвижной фазе [153].

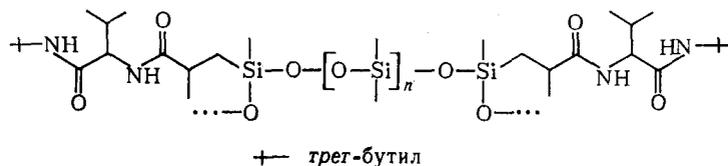
Анализ диастереоизомеров характеризуется четырьмя принципиальными недостатками: выбор реагентов для получения производных ограничен требованиями к оптической активности; реагент для получения производных должен быть оптически чистым; кинетика реакций получения производных для двух энантиомеров различна, что приводит к систематическим ошибкам в количественном анализе; вероятность рацемизации одного из асимметрических атомов углерода во время получения производных увеличивает ошибку количественного анализа.

Непосредственное разделение энантиомеров на хиральной неподвижной фазе имеет то преимущество, что для анализа могут быть использованы реагенты, обычно применяемые в ГХ анализе для получения производных. Разделяемые энантиомеры взаимодействуют с хиральной неподвижной фазой с образованием диастереомерных комплексов за счет водородных связей; разница в энтальпии сольватации достигает нескольких сот джоулей на моль [153].

Большинство известных до сих пор хиральных соединений, которые могли бы быть использованы в качестве неподвижных

фаз для анализа стереоизомеров, обладало низкой термической стабильностью и имело температуры плавления 80—100 °С. Естественно, такие фазы нельзя было использовать в колонках, соединяемых с масс-спектрометром.

Создание новой фазы [153], обладающей малой летучестью и высокой стабильностью, открыло новые возможности для использования ГХ—МС для анализа энантиомеров. Эта фаза была создана на основе *L*-валин-трет-бутиламида и сополимера диметилсилоксана и карбоксиалкилтриметилсилоксана с заданными вязкостью и молекулярной массой; структура этой фазы приведена ниже:



Здесь *L*-валин-трет-бутиламид связан с полисилоксаном через высокостабильные карбоксамидные группы. Каждая хиральная часть отделена от другой приблизительно 7 диметилсилоксановыми единицами, что препятствует взаимодействию между соседними остатками валина за счет водородных связей. Это, вероятно, и является основным фактором, обуславливающим высокую разделяющую способность и термическую стабильность. Предложенная фаза может использоваться в интервале температур 70—230 °С, а в течение небольшого времени даже при 250 °С.

В работе [154] проведено сравнение результатов анализа *N*-трифторацетил-*L*-пролилхлорид-производных амфетамина с помощью ГХ—МС на колонках с хиральной и ахиральной неподвижными фазами. Анализ проводили на масс-спектрометре Varian MAT 112, температура источника ионов 200 °С, энергия электронов 70 эВ, колонки стеклянные (25 м × 0,3 мм) и кварцевые (25 м × 0,2 мм) с программированным повышением температуры от 100 до 220 °С (10 °С/мин) и от 150 до 180 °С (5 °С/мин) при скорости потока гелия 28 и 44 мл/мин соответственно. Результаты показали, что как хиральная, так и ахиральная неподвижные фазы могут быть использованы для определения энантиомеров. Преимуществом хиральной фазы является возможность разделения всех изомеров, т. е. непосредственный анализ состава смеси, однако в случае образцов с большим количеством примесей хроматографические пики могут перекрываться. При разделении на ахиральных фазах необходима коррекция результатов на совместное элюирование энантиомеров.

Использование разных методов ионизации дает дополнительную возможность для получения структурной информации. Чаще всего в ХМС применяется ХИ. Процессы ионизации в

случае ХИ совершенно отличны от ЭУ ионизации и происходят в результате химических реакций между первичными ионами (ионами-реагентами) и молекулами образца. Выбором соответствующего газа-реагента можно контролировать энергетику протекающих процессов, а следовательно, и тип получаемой структурной информации. Разные ионы-реагенты вступают в разные ионно-молекулярные реакции, каждая из которых дает определенную структурную информацию об образце.

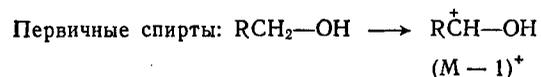
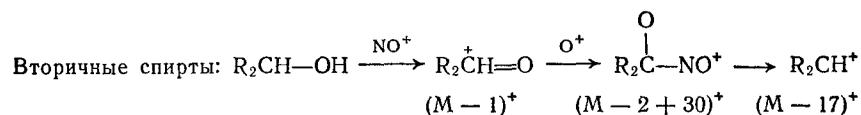
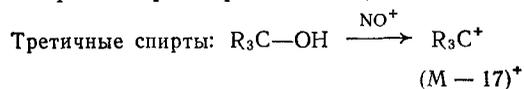
Были найдены ионно-молекулярные реакции для идентификации разных органических функциональных групп: первичных, вторичных и третичных спиртов, первичных, вторичных и третичных аминов, циклических алканов и олефинов, ароматических соединений, содержащих и не содержащих серу; в некоторых случаях удается различать окисленное состояние гетероатомов в полиароматических соединениях и даже стереоизомеры (с оптически активными газами-реагентами) [114, 143].

При использовании смеси аргон—вода в качестве газа-реагента получаемые масс-спектры содержат как ионы, характеризующие молекулярные массы, так и осколочные ионы, характеризующие структуру молекул образца. Такие спектры очень полезны, когда необходимо получить максимум структурной информации при малом количестве образца. Аналогичные масс-спектры получаются при использовании в качестве газа-реагента смеси азот—вода.

При ХИ оксидом дейтерия D₂O все активные атомы водорода, присоединенные к атомам N, S и O в органических молекулах, обмениваются на D в ионном источнике масс-спектрометра. Если молекулярная масса образца известна, то число активных атомов водорода может быть рассчитано по пикам в области молекулярных масс масс-спектра. Таким образом можно дифференцировать первичные, вторичные и третичные амины. В случае ХИ с использованием NH₃ альдегиды, кетоны, сложные эфиры и кислоты, которые недостаточно основны, чтобы присоединить протон от NH₄⁺, образуют ионы, соответствующие электрофильному присоединению NH₄⁺ к молекуле. Ионы NH₄⁺ могут использоваться также как стереохимический зонд для органических соединений. Простые спирты не ионизируются NH₄⁺, однако ионизация диолов, в которых две OH-группы могут одновременно участвовать в образовании внутримолекулярной водородной связи с NH₄⁺, имеет место. Этим методом легко различаются диаксиальные и диэкваториальные и аксиально-экваториальные диолы [114]. Реакции с ионами-реагентами, образующимися из метиламина, чувствительны к пространственному окружению карбонильных групп.

Использование в качестве газа-реагента NO также позволяет идентифицировать функциональные группы, дифференцировать олефины и циклоалканы, различать первичные, вторичные и третичные спирты. Масс-спектры третичных спиртов при

ХИ (NO) содержат только ионы $(M - 17)^+$, образующиеся при отщеплении OH. Спектры вторичных спиртов содержат пики трех типов ионов: $(M - 1)^+$, соответствующие протонированным кетонам; $(M - 17)^+$ и $(M - 2 + 30)^+$. Для первичных спиртов характерны ионы $(M - 1)^+$.

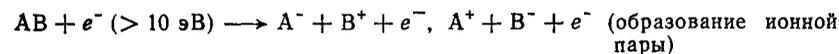
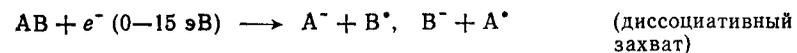


Дифференциация олефинов и циклоалканов осуществляется на основании того, что циклоалканы образуют только ионы $(M - 1)^+$, а олефины — ионы $(M - 1)^+$ и $(M + 30)^+$ [155]. Последние образуются при электрофильном присоединении NO^+ по двойной связи. Масс-спектры ХИ (NO) углеводородов похожи на спектры полевой ионизации. Свыше 80 % ионного тока обусловлено ионами $(M - 1)^+$, что сильно отличает их от спектров ЭУ и ХИ (CH_4), для которых характерна интенсивная фрагментация.

Масс-спектры ХИ (NO) могут быть использованы также для идентификации многих других функциональных групп. Спектры кислот, альдегидов, кетонов содержат, соответственно, пики ионов $(M + 30)^+$, $(M - 17)^+$; $(M + 30)^+$, $(M - 1)^+$; $(M + 30)^+$, что дает возможность идентифицировать эти классы соединений.

Масс-спектры отрицательных ионов дают информацию, дополняющую масс-спектры положительных ионов, так как структурные характеристики, обуславливающие стабилизацию ионов, различны для положительных и отрицательных ионов [156].

Отрицательные ионы в газовой фазе образуются по следующим трем механизмам в зависимости от энергии электронов:



При обычных условиях ХИ большая часть ионов образуется в результате второго и третьего процессов, и ионный ток обусловлен в основном осколочными ионами с малыми массами типа O^- , NO^- , Cl^- , CN^- , которые дают мало структурной информации. При достижении электронами термического равнове-

сия, для чего требуется время порядка долей микросекунды, в присутствии газов (например CH_4 или изобутан) преобладает резонансный захват. В этом случае спектры ХИ содержат интенсивные пики молекулярных анионов M^- .

МСХИ отрицательных ионов (МСХИ ОИ) может стать эффективным методом количественного анализа органических соединений в сложных смесях с помощью ГХ — МС. В анализируемые молекулы можно вводить функциональные группы, при этом повышается вероятность образования отрицательных ионов M^- и исключаются нежелательные направления распада. Предварительные исследования показали, что реагентами для этой цели могут служить пентафторбензальдегид и пентафторбензоилхлорид [114]. Реакции их с первичными аминами и фенолами с последующим анализом производных методом ГХ — МСХИ — ОИ позволяют детектировать эти соединения на уровне фемтограммов (10^{-15} г).

При использовании в качестве газа-реагента Ag или N_2 масс-спектры ХИ положительных ионов очень похожи на спектры ЭУ. С помощью импульсной техники можно одновременно регистрировать спектры положительных ионов, похожие на спектры ЭУ, и спектры отрицательных ионов, образующиеся в результате резонансного электронного захвата. Это позволяет получать взаимно дополняющую структурную информацию.

2.6. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Количественный анализ в ХМС осуществляют, как правило, с помощью метода ИМХ и различных его модификаций. Этот метод непрерывного детектирования характеристических ионов, как было показано выше, обеспечивает возможность наилучшего сочетания селективности и чувствительности хроматографии и масс-спектрометрии.

Метод селективного ионного детектирования незаменим в тех случаях, когда необходимо надежное количественное определение одного или нескольких следовых компонентов в сложных смесях. При циклическом сканировании масс-спектров может быть обеспечено количественное определение всех главных компонентов путем реконструкции масс-хроматограмм после анализа. Хотя преимущества этого метода для многокомпонентного анализа очевидны, он менее чувствителен по сравнению с СИД; обычно не достигается и высокая точность, хотя для большинства приложений она достаточна.

Метод СИД при высокой селективности детектирования часто не дает достаточной информации для идентификации соединений, так как регистрируется только небольшая часть масс-спектра.

Количественный анализ требует предварительной идентификации компонентов анализируемой смеси и выбора характеристических ионов. В оптимальном случае для анализа следует

выбирать ионы, которые образуются только за счет диссоциативной ионизации анализируемых соединений. Если пики характеристических ионов не являются чистыми (т. е. имеются наложения), то добиться надежного количественного определения не удастся. Вклад в интенсивность пиков характеристических ионов фона или пиков ионов других компонентов приводит к завышенным результатам при определении концентрации анализируемого вещества. При этом необходимо учитывать, что величина наложения может быть велика, если оно обусловлено компонентами, присутствующими в смеси в значительно больших количествах, чем анализируемые.

Для получения пиков аналитических ионов, свободных от наложения, вычитание пиков ионов налагающихся компонентов осуществляют с помощью ЭВМ. В случаях, когда это не удается, приходится прибегать к масс-спектрометрии высокого разрешения либо к методам, «сдвигающим» аналитические пики в иную область массовых чисел, например к другим методам ионизации или к получению производных, для которых массы характеристических ионов анализируемых соединений имеют другие значения. Часто бывает, что эти методы, повышая селективность, увеличивают и чувствительность определения вследствие возрастания интенсивности пиков характеристических ионов.

Селективность при СИД зависит от выбора характеристических ионов. Обычно считается, что ионы с более тяжелыми массами более характеристичны, чем ионы с малыми массами, которые имеют много источников образования. Ионы, представляющие целую молекулу, наиболее характеристичны, получение таких ионов может быть осуществлено ионизацией электронами низких энергий или методами «мягкой» ионизации, например ХИ. Последняя имеет дополнительное преимущество — возможность выбора газа-реагента для селективной ионизации определенных компонентов в сложной смеси. Таким образом, вместо одинаковой общей ионизации всех летучих молекул смеси, как при ЭУ, могут быть подобраны условия для ионизации только выбранных типов соединений.

Получение аналитических пиков, свободных от наложений, может осуществляться как хроматографическими, так и масс-спектральными методами. Иногда при получении производных удается добиться их лучшего хроматографического разделения. Так, ТМС-производные 5 α - и 5 β -холестан-3-олов имеют близкие времена удерживания и их масс-спектры содержат один и тот же характеристический ион с массой 370. Однако при превращении этих холестанолов в соответствующие 5 α - и 5 β -холестан-3-оны достигается лучшее хроматографическое разрешение, и при использовании в качестве внутреннего стандарта меченных дейтерием аналогов может быть получена линейная калибровочная зависимость и точность измерения концентраций около 2% [157].

В некоторых случаях повышение селективности достигается путем изменения метода ионизации. Так, с помощью МС ЭУ не удастся дифференцировать изомеры метилированных альдитолацетатов полисахаридов, а многие из этих изомеров не могут быть разделены на хроматографической колонке. Для их анализа была использована ХИ с ионизацией изобутаном и МИД по пикам ионов $(M+1)^+$, $(M+1-32)^+$ и $(M+1-60)^+$, характерным для этих соединений и отражающим структуру изомеров [158]. При исследовании образцов метилированных альдитолацетатов, представляющих собой смесь метилированных гекситолацетатов, полученных из концевой глюкозы и концевой маннозы, с помощью ГХ—МС ХИ регистрировались масс-хроматограммы пиков ионов с массами 324, 292 и 264. Эти массовые числа отвечают ионам $(M+1)^+$, $(M+1-32)^+$ и $(M+1-60)^+$, образующимся при диссоциативной ионизации концевых альдогексапиранозных производных. Интегрировались начало, середина и хвост каждого хроматографического пика. Площади пиков ионов с массами 324 и 292 нормировались к значению площади пиков ионов с массой 254. Результаты показали, что начало хроматографического пика представлено большей частью производным концевой глюкозы, в то время как хвост обогащен производным концевой маннозы.

Быстро развивающиеся методы МСХИ—ОИ позволяют проводить анализ с высокой чувствительностью и специфичностью. Этим методом была проанализирована смесь углеводов при использовании в качестве газа-реагента смеси метиленилхлорида и O_2 , при этом имела место высокая эффективность ионизации окислительных и алкилирующих агентов, тогда как нейтральные углеводороды и липиды были «прозрачны» [159]. Существенное увеличение селективности достигается при увеличении масс-спектрального разрешения для детектирования ионов только с определенным элементным составом. Этот метод широко используется в настоящее время в биохимическом анализе и анализе объектов окружающей среды. Очевидно, увеличение разрешения приводит к уменьшению интенсивности сигнала, но при анализе сложных смесей полезная чувствительность тем не менее увеличивается благодаря значительному уменьшению вклада в сигнал фона и компонентов матрицы.

Комбинация ГХ с МС ХИ открывает возможность получения дополнительной информации путем непрерывного детектирования ионов-реагентов. Получаемые при этом кривые очень похожи на график ПИТ. Этот метод был использован для селективного детектирования различных типов соединений путем выбора ионов-реагентов, которые быстро реагируют с определенными классами соединений и медленно — с другими [160]. Селективные ионы-реагенты CH_3^+ и $C_2H_5^+$ (газ-реагент CH_4) при фиксированных условиях позволяют оценить относительные

константы скорости ионно-молекулярных реакций, которые являются в этом случае относительными коэффициентами чувствительности соединений. Полуколичественный анализ можно осуществить без калибровочных коэффициентов для индивидуальных компонентов, так как относительные коэффициенты чувствительности на грамм вещества для многих органических соединений одинаковы в пределах точности $\pm 20\%$. Количественный анализ многокомпонентных смесей с использованием экспериментально определенных коэффициентов обеспечивает точность 3—8%. Предел обнаружения равен 5 нг/с [161].

В тех случаях, когда это возможно, проверка изотопного соотношения может служить методом выявления наложений. Для анализа винилхлорида в воде на уровне концентраций $10^{-7}\%$ предложен метод ИМХ при непосредственном вводе образца воды в хромато-масс-спектрометр Finnigan 3300F (колонка $600\text{ см} \times 2\text{ мм}$, SE-30); для предварительного разделения (удаления воды) служила колонка, заполненная 10% диглицерина на Хромосорбе GNAW (60—80 меш) [162]. Определение винилхлорида проводили следующим образом: образец воды в количестве от 100 до 1000 мкл вводили с помощью шприца, идентификация осуществлялась не только на основании времени удерживания, но и с помощью метода СИД. В качестве характеристических использовали ионы $\text{CHCl}=\text{CH}_2^+$. Так как соотношение изотопов $^{35}\text{Cl}:^{37}\text{Cl}$ равно 3:1, то интенсивности пиков ионов с массами 62 и 64 должны иметь такое же соотношение, нарушение его означает наличие наложений. Проверка соотношения интенсивностей изотопных пиков показала отсутствие наложений. Количественный анализ проводился по площадям хроматографических пиков.

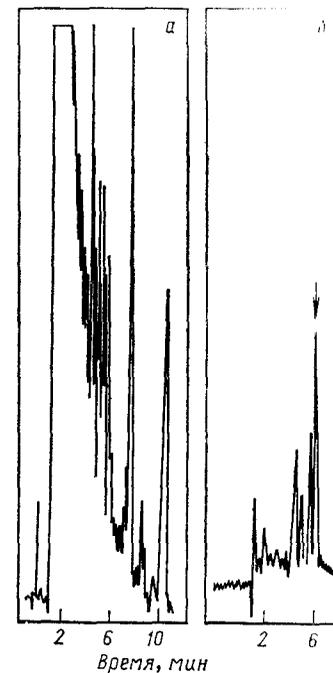
Исследования показали, что при вводе 1000 мкл воды интенсивность пика иона с массой 62 при отношении сигнал/шум 15:1 позволяет надежно обнаруживать $1 \cdot 10^{-8}\%$ винилхлорида. Калибровочная зависимость по площади пика линейна в пределах от $1 \cdot 10^{-8}$ до $1 \cdot 10^{-5}\%$ винилхлорида. Среднеквадратичное отклонение для образцов с концентрацией $1 \cdot 10^{-8}\%$, $1 \cdot 10^{-7}\%$ и $1 \cdot 10^{-6}\%$ равно 12, 6 и 6% соответственно [162].

Данные о структуре ионов могут быть получены при непосредственном детектировании нейтральных осколков при фрагментации выбранных молекулярных ионов, осуществляемом методом спектроскопии кинетических энергий разделенных по массам ионов или согласованного сканирования электрического и магнитного полей [159]. Как и при использовании МСВР, уменьшение интенсивности сигнала компенсируется устранением мешающих наложений. На рис. 2-12 приведены результаты ГХ—МС анализа фракции, экстрагированной из плазмы крови в виде трет-бутилдиметилсилильных производных (ТБДМС). Анализ проводился путем селективного детектирования ионов m/z 271 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9-\text{H}-(\text{CH}_3)_2\text{SiOH}]^+$ для ТБДМС-эфиров андростанола, образованных в ионном источнике. Эти ионы

получались при фрагментации метастабильных ионов m/z 347 в первом бесполом пространстве масс-спектрометра с двойной фокусировкой VG Micromass 70—70F, соединенного со стеклянной колонкой $20\text{ м} \times 0,33\text{ мм}$ (неподвижная фаза OV 1, изменение температуры от 225 до 260°C со скоростью 6°C/мин) [159]. Однако для большей надежности анализ метастабильных

Рис. 2-12. Масс-хроматограммы фракции гель-хроматографического разделения экстракта плазмы крови [159]:

а — масс-хроматограмма для иона m/z 271, полученного методом СИД; б — масс-хроматограммы для иона m/z 271, полученного при фрагментации метастабильного иона m/z 347 в первом бесполом пространстве масс-спектрометра с двойной фокусировкой. Стрелкой указан пик, соответствующий трет-бутил-ТМС-производному 5 α -дигидротестостерона; другие пики соответствуют изомерным андростанолам.



ионов должен дополняться масс-спектрами высокого разрешения и масс-спектрами меченых соединений [163].

Современные масс-спектрометры могут обеспечить сканирование полного масс-спектра для количества вещества на уровне 10^{-10} г (100 пкг); в режиме СИД увеличивается время измерения соответствующих пиков и, следовательно, понижается теоретический предел обнаружения от 100 до 1000 раз. Благодаря этому этот метод наиболее удобен для количественного определения отдельных компонентов или ограниченного числа компонентов смесей.

Теоретический предел обнаружения в режимах СИД и сканирования полного спектра может быть определен следующим образом. Предположим, что при вводе образца имеет место приблизительно треугольный профиль концентрации в течение 10 с. В режиме СИД период ввода образца 0,1 с обеспечивает достаточное количество данных для определения профиля каждого из ограниченного числа детектируемых ионов. Для достоверного детектирования профиля необходимо, чтобы сигнал содержал не менее четырех ионов. В этом случае весь профиль хроматограммы содержит около 2000 ионов. Для прибора с чувствительностью 10^{-9} Кл/мкг при низком разрешении предел обнаружения должен составлять $3,2 \cdot 10^{-13}$ г. При времени сканирования 1 с ширина масс-спектрального пика составляет около 1 мс, эта скорость достаточна для регистрации профиля хроматограммы введенного образца. Таким образом, предел обнару-

жения на два порядка хуже, чем в случае СИД, из-за уменьшения времени измерения масс-спектрального пика от 0,1 с до 1 мс. На практике пределы обнаружения в режиме СИД при низком разрешении определяются уровнем фона в масс-спектрометре и часто могут быть на один или два порядка хуже, чем следует из теории [71].

Измерение площади пика должно давать более точные результаты, чем измерение высоты пиков, однако для количественного анализа часто используют высоту хроматографических пиков. Трудности при измерении площади пика состоят в неопределенности положения ее границ в присутствии неразрешенных компонентов или шумов. Более высокую точность дает измерение так называемой центральной площади между координатами пика, соответствующими полувысоте [71].

При работе в режиме МИД чувствительность повышается с увеличением времени интегрирования. Однако время интегрирования нельзя увеличивать бесконечно, так как необходимо обеспечить достаточное число измерений для определения профилей всех регистрируемых хроматографических пиков. Чем больше число измеряемых ионов, тем меньше время интегрирования, и для того чтобы это время было сравнимо с продолжительностью хроматографического пика, приходится сильно уменьшать его при работе с капиллярной колонкой, чтобы успеть за время прохождения хроматографического пика просмотреть все регистрируемые ионы.

Существуют два метода селективного многоионного детектирования. Один состоит в сканировании всех выбранных ионов в процессе всего опыта. Этот метод не может дать большого выигрыша в чувствительности, так как в ходе элюирования каждого компонента определенное время тратится на сканирование ионов, специфичных не для данного, а для других компонентов. Другая возможность реализована в системе обработки данных SIDAR: программирование до 15 групп разных ионов, которые переключаются автоматически через заданное время. Например, при анализе хлорсодержащих пестицидов при изотермической выдержке при 180 °С в течение 4 мин детектируются ионы с массами 180, 250 и 284, соответствующие изомерам тетра-, пента- и гексахлорбензолов; затем вместо них регистрируются пики ионов с массами 263 и 353, соответствующих альдрину и гептахлорэпоксиду, элюируемым при 6 мин 15 с и 7 мин 50 с соответственно. Этот способ позволяет программировать временные интервалы по 200 мс для каждого иона, в то время как при измерении пяти специфических ионов в течение всего опыта время интегрирования для каждого иона сокращается примерно до 100 мс.

В работе [164] для анализа алканов в восках использован метод СИД молекулярных ионов, обеспечивающий наибольшую чувствительность, так как другим способом трудно измерять малоинтенсивные пики этих ионов. После регистрации молекуляр-

ного иона очередного компонента масс-спектрометр вручную перестраивался на регистрацию следующего гомолога. Этим методом в природных восках определены соединения, содержащие более 60 атомов углерода.

Количественный анализ в ХМС обычно проводят с использованием внутреннего стандарта (или нескольких стандартов). Измеряется отношение площадей профилей пиков ионов на масс-хроматограммах анализируемого соединения и стандарта. Путем анализа искусственных смесей получают зависимость этого отношения от концентрации анализируемого соединения (калибровочные зависимости). Иногда при расчете используют не отношение площадей, а отношение интенсивностей пиков на масс-хроматограммах ионов анализируемого вещества и эталона.

При количественном анализе соединений в ИМХ обычно используют три типа внутренних стандартов: аналоги, меченные стабильными изотопами; гомологи, характеризующиеся ионами с тем же составом, что и анализируемые соединения, но с другим временем удерживания; соединения, которые распадаются с образованием иных ионов, но обладают сходными хроматографическими характеристиками. Основное преимущество меченых соединений — их сходство с анализируемыми соединениями, они дают ионы того же состава, но с другой массой, что обеспечивает наибольшую чувствительность регистрации этих ионов. Так, аллобарбитол может быть количественно проанализирован при содержании 100 пкг с коэффициентом вариации 15,3 % при использовании в качестве внутреннего стандарта его меченого аналога. Когда же в качестве дополнительного стандарта добавляется гомолог, введенное меченое соединение действует как носитель, в этом случае коэффициент вариации уменьшается до 2 % [159].

Применение в качестве внутреннего стандарта гомолога, образующего такой же ион, как и анализируемое вещество, но имеющего другое время удерживания, имеет то преимущество, что этот метод может быть реализован на любом масс-спектрометре, даже не снабженном приставкой для изменения ускоряющего напряжения. В некоторой степени снижение селективности, связанное с наложениями со стороны других соединений, компенсируется повышением чувствительности и точности за счет использования метода СИД. Эти наложения могут быть уменьшены выбором для СИД ионов с максимально возможными массами. В работе [165] при определении пропанолола в качестве внутреннего стандарта применяли оксипропанол. Как анализируемое вещество, так и стандарт были в виде производных, полученных при реакции с трифторуксусным ангидридом. Так как оба эти соединения имеют одинаковые боковые цепи, то они оба при диссоциативной ионизации образовывали ион с массой 308, пик которого измерялся в процессе анализа. Пропанолол мог быть определен в количестве менее 1 нг в 1 мл

плазмы, а его 4-гидрокси-метаболит — в количестве менее 5 нг/мл.

Применение в качестве внутреннего стандарта соединений, меченных стабильными изотопами, является, пожалуй, наиболее эффективным и универсальным приемом количественного анализа в ХМС. В работе [165] был описан метод определения метаболитов, меченных ^{13}C ; элюат из газового хроматографа подвергался каталитическому сожжению в ячейке, соединенной с масс-спектрометром. Регистрировалась величина отношения $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$, предел обнаружения составлял 5 нг меченого бензоата при отношении сигнал/шум 12:1. Был разработан также метод ГХ—МС ХИ для определения 5-метил-*L*-цистеина в гемоглобине в режиме МИД с использованием в качестве внутреннего стандарта дейтерированного соединения. В дальнейшем чувствительность этого метода была повышена путем детектирования по одному иону с использованием в качестве внутреннего стандарта не существующего в природе *D*-энантиомера *S*-метилцистеина, который отделялся от *L*-энантиомера на капиллярной колонке с хиральной фазой Hirasil-Wol [166]. *D*-энантиомер *S*-метилцистеина добавлялся до гидролиза белка, а частичная очистка гидролизата осуществлялась на ионообменной колонке. Энантиомеры *S*-метилцистеина разделялись в виде производных — *N*-трифторацетил-*n*-бутиловых эфиров. Анализ проводили методом МС ХИ с газом-реагентом изобутаном, в этом случае максимальным пиком в масс-спектре был пик иона $(\text{M} + \text{H})^+$ с массой 288, для которого и получали масс-хроматограмму. В случае СИД чувствительность определения была втрое выше, чем для метода МИД, что позволило определять *S*-метилцистеин на уровне концентраций ниже 0,1 нмоль/г белка с высокой точностью. Однако в процессе работы происходит рацемизация образца, которую следует учитывать при количественном анализе.

Синтезируемые меченые соединения, используемые в качестве внутренних стандартов, не всегда имеют высокую изотопную чистоту, что может приводить к ошибкам при количественном анализе. Эти ошибки вызываются двумя причинами: 1) наложением пиков образца на пики характеристических ионов стандарта, в этом случае обычная прямолинейная калибровочная зависимость приводит к ошибкам в определении концентрации; 2) наложением пиков стандарта на пики характеристических ионов анализируемых соединений. Пусть количества образца и стандарта равны A и B , а интенсивности пиков характеристических ионов, выбранных для образца и стандарта, равны a_1 и a_2 в масс-спектре образца и b_1 и b_2 в масс-спектре стандарта. Тогда измеряемое отношение количеств образца и стандарта равно:

$$R = \frac{a_1 A + b_1 B}{a_2 A + b_2 B}$$

Если наложение со стороны образца на пики характеристических ионов стандарта мало, т. е. $a_2 A \ll b_2 B$, и им можно пренебречь, то калибровочная зависимость представляет собой прямую:

$$R = \frac{a_1}{b_2 B} A + \frac{b_1}{b_2}$$

Однако если стандарт не очень чистый, то величина b_2 уменьшается, и если произведением $a_2 A$ нельзя пренебречь, то калибровочная зависимость становится нелинейной. При определении тестостерона в интервале концентраций 0,375–2,000 мкг на 100 мл плазмы максимальная ошибка за счет нелинейности равна 2,7%, если же калибровочную прямую эвентуально раполлировать в область более высоких концентраций (0,375–5,500 мкг на 100 мл плазмы), то максимальная ошибка возрастает до 48% [167]. Корректировка на нелинейность позволяет свести эту ошибку до 3,6%.

В работе [168] была проведена оценка важнейших аналитических параметров (точность, предел обнаружения, выбор стандартов) количественного анализа методом МИД с использованием квадрупольного масс-спектрометра и ЭУ ионизации. В качестве внутренних стандартов использовались как аналоги, так и дейтерированные соединения. Анализировались полициклические ароматические углеводороды на набивной колонке с фазой OV-1 (3%) на Газхроме Q (100–120 меш), газ-носитель гелий (25 мл/мин), программированное повышение температуры от 150 до 290°C со скоростью 6°C/мин. Относительное стандартное отклонение отношения площадей пиков для пяти измерений составило около 3%, при этом отмечено, что величина отношения площадей пиков зависит от параметров ионного источника. Отношения площадей пиков, измеренных при программировании температуры, нельзя сопоставлять с величинами, полученными при изотермических условиях.

Иногда удается осуществить количественные измерения и не прибегая к стандартам. При анализе образцов Арохлор с помощью ГХ—МС—ХИ [169] было показано, что этот метод может использоваться для идентификации и количественного анализа компонентов в смесях полихлорированных дифенилов без стандартных образцов. Анализ проводили на хромато-масс-спектрометре Finnigan 3300; стеклянная колонка 152,5 см \times 2 мм, 5% OV-101 на Хромосорбе W, газ-носитель и газ-реагент — бутан (30 мл/мин), температура колонки около 190°C. Анализ масс-спектров ряда хлорированных бифенилов показал, что максимальную интенсивность имеют пики квазимолекулярных ионов независимо от степени хлорирования. Фрагментация незначительна, интенсивность пиков ионов, соответствующих отщеплению HCl, которые могут совпадать по массе с низшими гомологами, составляет всего 2–3% от интенсивности пиков квазимолекулярных ионов и не вносит больших оши-

бок в результаты анализа. В отличие от других методов анализа этих соединений, например электрозахватной ионизации, чувствительность которых может сильно различаться для разных изомеров и молекул с разным содержанием атомов хлора, в МС ХИ обнаруживается лишь незначительное снижение чувствительности с увеличением молекулярной массы. Различия в коэффициентах чувствительности могут быть исключены путем определения профиля молекулярно-массового распределения внутри достаточно узких групп молекулярных ионов. Для этих групп коэффициенты чувствительности одинаковы в пределах $\pm 5\%$, следовательно, внутри каждой такой группы один из членов может служить внутренним стандартом для количественного расчета содержания остальных членов группы. Таким образом были построены стандартные калибровочные зависимости для моно-, ди-, три-, тетра- пента- и гексахлорбифенилов. Точность анализа равна $\pm 5\%$, чувствительность определения 10^{-9} .

2.7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭВМ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ

Успехи хромато-масс-спектрометрии как аналитического метода в значительной степени связаны с использованием ЭВМ для обработки данных эксперимента. Во-первых, без ЭВМ практически невозможно не только обработать, но даже просто накопить и обозреть полученную информацию во всем ее многообразии. Поэтому накопление и обработка ХМС данных представляет не менее важную задачу, чем их получение, и является равноправным звеном эксперимента, и если это звено будет слабым, обесценивается быстродействие и совершенство остальных частей системы. ЭВМ в составе интегрированной системы ГХ—МС—ЭВМ (или ЖХ—МС—ЭВМ) позволяет в полной мере реализовать аналитический потенциал ХМС.

Во-вторых, многофакторный характер и большой объем ХМС информации позволяют повысить информативность и надежность аналитических признаков за счет определенных видов преобразования массива данных, улучшить разрешение хроматограмм и качество получаемых масс-спектров.

В-третьих, ЭВМ обеспечивает обработку полученных первичных данных ХМС эксперимента, а именно идентификацию компонентов смесей, определение их содержания и данных для паспортизации (масс-спектров и хроматографических индексов удерживания для занесения в библиотеку). Идентификация неизвестных веществ может осуществляться как путем сравнения полученных экспериментальных масс-спектров этих веществ с библиотекой масс-спектров, так и с помощью методов интерпретации масс-спектров, позволяющих оценить структурные характеристики молекул, спектры которых отсутствуют в библиотеке.

Наконец, с помощью ЭВМ осуществляется полная автоматизация ХМС эксперимента, включая юстировку прибора и контроль рабочих параметров, калибровку по массам и интенсивностям пиков, обнаружение хроматографических пиков и определение их времен и индексов удерживания, вычитание фона и разделение неразрешенных компонентов, характеристику компонентов по хроматографическим и масс-спектральным данным, идентификацию и количественный анализ.

Определение индексов удерживания. Для эффективного использования данных по хроматографическим индексам удерживания в сочетании с масс-спектральными данными их необходимо получать и обрабатывать одновременно. Это требует, во-первых, однозначной идентификации стандартных соединений в смеси, относительно которых рассчитываются индексы; во-вторых, определения с помощью ЭВМ шкалы индексов удерживания, с тем чтобы приписать соответствующий индекс удерживания каждому из сотен компонентов, элюируемых в процессе опыта, а также каждому из неполностью разрешенных компонентов, разделяемых при обработке данных.

Для автоматического определения индексов удерживания всех компонентов вместе с образцом вводятся три стандартных соединения. Обычно в качестве стандартов используют *n*-алканы. При анализе смесей углеводородов многие соединения могут иметь такие же характеристические пики в масс-спектрах, как *n*-алканы, поэтому в качестве стандартов можно выбрать другие гомологические ряды соединений, например фенилалканы или дейтероуглеводороды. ЭВМ идентифицирует эти соединения по их масс-спектральным характеристикам и использует положения их пиков для определения индексов удерживания для всей хроматограммы. Предварительно получают калибровочную зависимость для индексов удерживания путем анализа смеси *n*-алканов с 10—30, 32, 34, 36, 38, 40 атомами углерода в молекуле в таких же условиях. Логарифмическое соотношение между временами элюирования *n*-алканов и числом атомов С в молекуле, которое имеет место в изотермической ГХ, превращается в приблизительно линейное при программировании температуры [170] и в ограниченном интервале времен элюирования позволяет осуществлять линейную интерполяцию.

Компьютерная программа для определения индексов удерживания отыскивает стандарты, введенные вместе с образцом, используя поисковое окно, равное обычно 60 циклам сканирования (± 30 от определенного номера спектра). Масс-спектр наиболее близкий к спектру стандартного соединения, выбирается путем сравнения интенсивностей пиков характеристических ионов стандарта (например, m/z 41, 43, 55, 57, 71, 83, 95, 113, 127 в случае *n*-алканов) с интенсивностями соответствующих пиков в каждом из этих 60 масс-спектров. Для уверенной идентификации центра хроматографического пика стандартного соединения выбирается положение максимума интенсивностей пиков стандартного соединения.

теристических ионов. В случаях, когда условия хроматографирования не меняются и используемые стандарты хорошо известны, поиск стандартов может осуществляться просто по максимуму пиков характеристических ионов в заданном окне. После определения положений стандартов ЭВМ с помощью калибровочной зависимости рассчитывает гипотетические положения

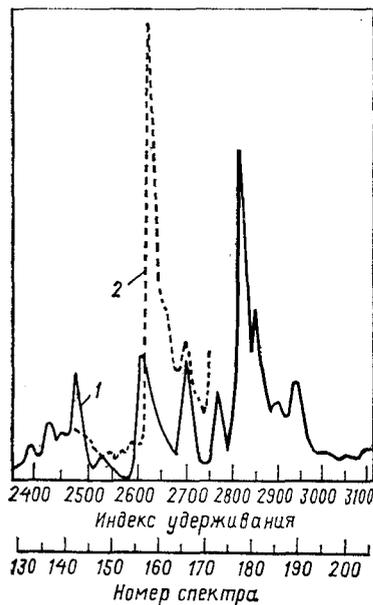


Рис. 2-13. Часть хроматограммы продуктов гидролиза эйкозапептида [170]:
1 — по ПИТ; 2 — по иону m/z 114 (лизин).

всех *n*-алканов, т. е. номера циклов сканирования, соответствующих индексам удерживания 1200, 1300, ..., 4000. Индексы в промежутке между двумя последовательными *n*-алканами линейно интерполируются. После этого строится зависимость полного ионного тока от индексов удерживания.

Индексы удерживания одних и тех же соединений в образцах различного происхождения, определенные в разных условиях хроматографического разделения, находятся в достаточно узком интервале, что позволяет выбирать узкое окно при автоматической

идентификации органических соединений с помощью ЭВМ.

По индексам удерживания можно быстро и надежно определять метаболиты, отличающиеся от исходных веществ заместителями или другими структурными признаками. Они дают дополнительную информацию для идентификации соединений с близкими масс-спектрами, например с теми, которые имеют несколько очень интенсивных пиков, преобладающих в масс-спектре и характеризующих какую-либо простую часть молекулы [например, m/z 58, $(\text{CH}_3)_2\text{N}^+ = \text{CH}_2$, преобладающий в масс-спектрах многих транквилизаторов и антигистаминов].

Использование масс-спектральных данных, в частности масс-хроматограмм, позволяет точно определить положения хроматографических пиков всех компонентов даже очень сложных смесей с неполностью разделенными хроматографическими пиками. На рис. 2-13 приведена масс-хроматограмма по иону m/z 114 (лизин в пептидных производных) вместе с частью хроматограммы по ПИТ, которая позволяет определить лизин на хвосте пика гораздо более интенсивного компонента.

При автоматической идентификации соединений по индексам удерживания и масс-спектрам ЭВМ сначала определяет индексы удерживания для каждого компонента и его положение (т. е. номер спектра) на кривой ПИТ. Эти соединения затем идентифицируются по их масс-спектральным характеристикам с учетом индексов удерживания. При идентификации аминокислот в смесях производных продуктов гидролиза полипептидов и белков [170] этот метод позволил значительно сократить время поиска благодаря возможности анализа для каждого идентифицируемого соединения только небольшого участка на хроматограмме; повысилась надежность идентификации, поскольку компоненты смеси, находящиеся вне окна индексов удерживания, не могут мешать, даже если они имеют близкие масс-спектральные характеристики.

В работе [171] описано дальнейшее развитие автоматических методов совместной обработки хроматографической и масс-спектральной информации. Осуществляется сравнение индексов удерживания и масс-спектров компонентов с данными, имеющимися в библиотеке, но не для отдельных хроматографических пиков, а целиком для сложных профилей ГХ — МС опытов с архивной библиотекой таких профилей. Таким путем можно определять новые компоненты или аномальные концентрации ранее установленных соединений. Эта система работает следующим образом: вначале осуществляется вычитание фона и разделение перекрывающихся компонентов, затем определяются относительные индексы удерживания для каждого компонента и рассчитываются относительные концентрации на основании одного или нескольких внутренних стандартов. После этого производится поиск каждого масс-спектра в библиотеке и, наконец, из этих данных строится ГХ — МС профиль, который сравнивается с библиотекой таких профилей для ранее проанализированных смесей. ГХ — МС профиль определяется как совокупность данных, состоящих из следующих частей: а) ненормализованный масс-спектр каждого компонента после обнаружения хроматографических пиков, вычитания фона и разделения перекрывающихся компонентов; б) индексы удерживания каждого компонента; в) относительные концентрации всех компонентов; г) название каждого компонента, которое может быть просто кодовым или предположительным, приписанным компоненту в результате обычного библиотечного поиска. Пример такого ГХ — МС профиля показан на рис. 2-14. Относительные концентрации компонентов представлены вертикальными линиями в соответствующих положениях, наложенными на обычный график ПИТ в зависимости от относительных индексов удерживания. Высота каждой линии соответствует площади пика на графике ПИТ или относительной концентрации.

Этот метод может использоваться для детального сравнения сложных смесей, например в медицинской диагностике. Кроме того, масс-спектры одних и тех же соединений в архивной биб-

лиотеке усредняются, что уменьшает статистические вариации и улучшает качество масс-спектров. Включение относительных индексов удерживания в ГХ—МС профиль увеличивает надежность идентификации при сравнении с библиотекой.

Библиотечный поиск — один из наиболее широко используемых методов идентификации масс-спектров благодаря универ-

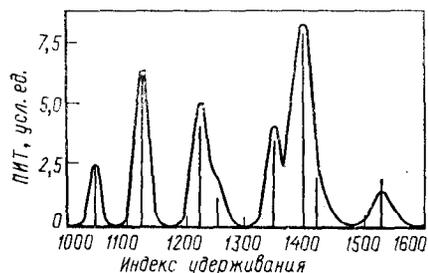


Рис. 2-14. Схематическое изображение ГХ—МС-профиля [171].

сальности, относительно низкой стоимости, наличию больших библиотек масс-спектров. Существуют два метода библиотечного поиска: прямой, когда анализируемый спектр последователь-

но сравнивается с каждым спектром библиотеки, и обратный, когда спектры библиотеки последовательно сравниваются с анализируемым спектром. Преимуществом обратного поиска является эффективность идентификации даже в случае искажений анализируемого спектра вследствие наличия фона или примесей; это особенно ценно при идентификации компонентов смесей, анализируемых с помощью ХМС, когда имеется фон, обусловленный вылетом неподвижной фазы или неполным разделением. Можно использовать и комбинированный прямой-обратный поиск, объединяющий сильные стороны обоих методов [172].

Выбор и кодирование определенных пиков или характеристик масс-спектров сокращают как объем, так и время работы поисковой системы. Запись полных спектров, включая интенсивности пиков, требует большого объема памяти ЭВМ для их хранения и поиска и осуществляется либо при использовании больших ЭВМ, либо очень малых специализированных библиотек спектров. Например, если на диске емкостью 2М слов можно разместить около 4000 полных масс-спектров, то при выборе удачного метода кодирования спектров их число может быть увеличено в 10 раз [172]. Кроме того, сокращение спектров позволяет размещать библиотеку спектров в оперативной памяти ЭВМ для работы в реальном масштабе времени.

Сокращение масс-спектров преследует и другую важную цель — улучшение эффективности поиска путем минимизации вариаций анализируемого спектра. Установление порога минимальной интенсивности пиков, оставляемых в сокращенном спектре, и отбрасывание малоинтенсивных пиков, имеющих недостаточную воспроизводимость и сомнительную ценность для идентификации, повышает информативность сокращенного масс-спектра. Поскольку большая часть масс-спектров низкого

разрешения переопределена, т. е. содержит больше информации, чем это необходимо для однозначной идентификации соединения, то может быть произведено сокращение информации без ущерба для эффективности поиска, а при определенных условиях эффективность даже может быть повышена.

Существуют три основные системы кодирования: а) регистрация интенсивностей ограниченного числа пиков; б) преобразование спектра в «характеристики», например отношения интенсивностей определенных пиков или определенных нейтральных осколков; в) расчет математической функции по всему спектру. Чаще всего применяется первый метод, он дает хорошие результаты как при прямом поиске, так и при выявлении аналогов при отсутствии анализируемого спектра в библиотеке. Эта способность выявлять структурноподобные аналоги может быть усилена кодированием структурнозначимых характеристик с учетом процессов фрагментации.

Распространенные методы сокращения полных масс-спектров заключаются в отборе n наиболее интенсивных пиков: $n = 5$ [173]; 6 [174]; 8, 10, 20 [175]; 25 [176]. Было показано, что при использовании для поиска сокращенных спектров с $n = 8$ и $n = 20$ [177] или $n = 10$ и $n = 20$ получались примерно одинаковые результаты, при этом с увеличением молекулярной массы анализируемых соединений несколько уменьшалась надежность идентификации. Предпринимались попытки менять количество отбираемых пиков в сокращенном масс-спектре в зависимости от молекулярной массы соединений, например 6 наиболее интенсивных пиков для соединений с молекулярной массой до 200 и 10 пиков — для соединений с $M > 200$ [174].

Более плодотворными оказались способы, заключающиеся в отборе n наиболее интенсивных пиков в каждом интервале массовых чисел длиной m единиц. В разных вариантах таких методов $n = 2$, $m = 14$ [178]; $n = 3$, $m = 20$; $n = 3$, $m = 46$; $n = 6$, $m = 40$ [175]; $n = 1$, $m = 14$ [179] и т. д. Наиболее широко используется вариант, предложенный Биманом [178], заключающийся в отборе двух наиболее интенсивных пиков в каждом интервале из 14 а. е. м. Этот выбор пиков по крайней мере частично преодолевает ограничения, свойственные выбору наиболее интенсивных пиков в масс-спектре. Во-первых, наиболее интенсивные пики анализируемого масс-спектра часто являются наиболее общими для многих соединений и находятся в области низких массовых чисел, это уменьшает селективность по сравнению с использованием менее интенсивных пиков ионов в области высоких масс, которые обладают большей специфичностью. Выбор двух наиболее интенсивных пиков в каждом интервале 14 а. е. м. позволяет использовать пики ионов во всем диапазоне масс. Во-вторых, экспериментальные артефакты, такие как дискриминации ионов по массам или изменение концентрации образца в процессе прохождения хроматографиче-

ского пика, часто искажают относительные интенсивности пиков ионов масс-спектра, но даже при сильном изменении абсолютной величины пики, имеющие наибольшую относительную интенсивность в данном интервале, остаются в нем максимальными.

Однако поскольку статистическая вероятность появления ионов с малыми и большими массами неодинакова для большого массива масс-спектров, то, по-видимому, нецелесообразно использовать одинаковое число пиков на разных участках масс-спектра. В работе [180] предложено выбирать в каждом из интервалов длиной 14 а. е. м. три наиболее интенсивных пика в области низких масс, два — в средней и один — в области высоких массовых чисел. Этот метод учитывает информационную значимость области массовых чисел.

Другой подход [181], реализованный на примере анализа каталога, содержащего 6652 масс-спектра, заключался в том, что в качестве наиболее значимых для идентификации признаков были взяты не интенсивности отдельных пиков, а попарные их комбинации, вероятность появления которых составляет около $1/2$. Такой способ сокращения полных масс-спектров позволил уменьшить размерность масс-спектров в каталоге от 352 до 46 позиций.

В работе [182] был использован список из 120 минимально коррелированных значений m/z в интервале от 14 до 262 а. е. м., отобранных по максимуму следующего критерия:

$$I_k \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^{k-1} |\rho_{ki}|}{k-1} \right)$$

где i — индекс пика, I_k — информативность (информационная энтропия), $|\rho_{ki}|$ — абсолютное значение коэффициента корреляции двух пиков k и i .

Информативность этого списка с учетом корреляционных связей между различными пиками составляет около 40 бит и обеспечивает теоретическую возможность идентификации любого соединения среди $2^{40} \approx 10^{12}$ различных соединений каталога. Но с учетом ошибок, связанных с измерением, регистрацией, представлением интенсивностей пиков, информативность этого списка уменьшается до 11—12 бит [183].

Значительно сокращает время поиска спектров в банке данных упорядочение файла масс-спектральных данных на основании их статистической значимости [184]. Этот метод позволяет проводить поиск в реальном масштабе времени в процессе ХМС анализа. Массы и интенсивности пиков «взвешиваются» в масштабе $\lg 2$ в соответствии с их статистической распространенностью в большом банке данных, в каждом спектре выбирается 15—27 (в зависимости от молекулярной массы) наиболее значимых ионов с наибольшей суммой весов для масс ионов и интенсивностей пиков. Каждый такой сокращенный масс-

спектр располагается в файле в соответствии с величинами m/z наиболее значимых пиков, т. е. таких, интенсивность которых больше 9%, а m/z больше 50. При поиске рассматриваются только те спектры библиотеки, для которых массы наиболее значимых ионов соответствуют наиболее значимым ионам в анализируемом спектре. Система позволяет осуществлять поиск до 6 спектров в минуту в процессе ГХ — МС эксперимента.

Использование хроматографических индексов удерживания в качестве фильтра предварительного отбора, который может быть проведен намного быстрее, чем полное сравнение спектров, позволяет отбросить на первом этапе большую часть спектров, сильно отличающихся от анализируемого. Преимуществами предварительного отбора являются увеличение скорости поиска и возможность более надежной идентификации отфильтрованных «спектров-кандидатов». Однако если условия предварительного отбора выбрать слишком жесткими, то может случиться, что спектр истинного соединения или, что более вероятно, спектры родственных соединений будут исключены из списка спектров-кандидатов. Это условие менее жестко в случае обратного поиска. Например, при обратном поиске можно использовать ограничения по временам удерживания, а при прямом поиске — нет. Однако и в случае прямого поиска полученные результаты могут затем интерпретироваться с использованием хроматографических или других данных. Предварительный поиск можно также проводить путем сравнения небольшого количества основных пиков, молекулярных масс и других характеристик.

Программы сравнения полных спектров используют следующие принципы: а) логический оператор сходства или различия сокращенных спектров; б) сравнение на основе относительных интенсивностей пиков или «рангов»; в) сравнение на основе абсолютных интенсивностей пиков.

Три поисковые системы получили широкое распространение: РЕАК — диалоговая версия поисковой системы [185]; КВ — система, разработанная Биманом и др. [178], выбирающая по два пика из каждого интервала 14 а. е. м. в масс-спектре; РВМ — вероятностная поисковая система [186], разработанная вначале для идентификации соединений в реальном масштабе времени и расширенная затем на большой объем данных.

Система РЕАК осуществляет поиск по нижней и верхней границам интенсивностей пиков в анализируемом масс-спектре. Сначала проводится проверка по первому пику; все масс-спектры, удовлетворяющие этому условию, затем проверяются по второму пику и т. д. Таким образом, на каждом этапе уменьшается число сравниваемых масс-спектров. Например, первый запрос для пика иона m/z 283 с интенсивностью 10—40% дает 139 спектров, которые удовлетворяют этому критерию. Сравнение этих спектров по второму пику m/z 301 умень-

шает список до 40 спектров. После сравнения по третьему пику m/z 245 он уменьшается до одного спектра, который и дает правильный ответ — 17-гидрокси-16- α -метилпрегнен-4-дион-3,20 [185].

В системе КВ рассчитывается «индекс сходства» при сравнении анализируемого спектра с каждым из спектров библиотечного файла (все спектры сокращены, как указано выше) и выдается список спектров с наибольшими значениями этого индекса.

В системе РВМ (Probability Based Matching) реализован статистический метод отбора масс-спектральных признаков для поиска. Основное положение, на котором базируется эта система: для идентификации соединений более значимы те пики, которые реже встречаются в масс-спектрах библиотеки. Например, так как большие молекулярные фрагменты имеют тенденцию распадаться на более мелкие, ионы с большими массами реже встречаются в масс-спектрах, чем ионы с малыми массами, вероятность наличия ионов с данной массой в масс-спектре уменьшается вдвое примерно через каждые 130 а. е. м. [186]. Отбор таких пиков осуществляется с помощью двух факторов — U и A , характеризующих значимость массового числа иона и интенсивности его пика соответственно. Значения фактора U рассчитываются на основе выражения $P_M = (1/2)^U$, где P_M — вероятность появления в спектрах библиотеки пика иона с массой M . Используются целочисленные значения U . Например, пикам ионов с массами 27, 29, 41 приписываются значения $U = 0$ ($P_M = 1$), а пикам ионов с массами 100—110 значения $U = 2$ ($P_M = 1/4$). Значения фактора A рассчитываются на основе аналогичного выражения $P_I = (1/2)^A$, где P_I — вероятность появления в спектрах библиотеки пика с данным значением интенсивности. Используются целочисленные значения фактора A — 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответствующие шести интервалам значений интенсивности: 1—3,3; 3,4—9; 9—19; 19—38; 38—73 и 73—100 %.

Для представления спектров в каталоге выбираются 15 пиков, имеющих наибольшие значения суммы факторов $U + A$. Такой способ сокращения масс-спектральных данных позволяет на основе достаточно строгого статистического подхода отбирать наиболее интенсивные пики для сравнения при идентификации и при этом учитывать частоты появления ионов с данными массами в библиотеке масс-спектров.

Вторая особенность системы РВМ — применение обратного поиска, что особенно важно при идентификации соединений в смесях. Система проверяет, присутствуют ли пики библиотечных спектров в спектре анализируемого соединения. Таким образом, игнорируются пики анализируемого соединения, которых нет в сравниваемом спектре, так как они могут быть обусловлены другими компонентами смеси. Проверка этой системы на более чем 800 масс-спектрах, взятых из большой библиотеки спектров [186], показала, что даже при анализе чистых

соединений ее эффективность превосходит возможности системы КВ, не говоря уже о системах, использующих только наиболее интенсивные пики в масс-спектрах. Для смесей система РВМ, реализующая метод обратного поиска, дает значительно лучшие результаты по сравнению с другими системами.

Позднее была показана возможность еще большего повышения эффективности системы РВМ путем вычитания библиотечного спектра идентифицированного соединения из анализируемого спектра смеси. В результате получается остаток анализируемого спектра, по которому легче идентифицировать оставшиеся компоненты. При использовании этого метода ЭВМ автоматически вычитает наиболее подходящие по близости библиотечные спектры из анализируемого, предъявляя пользователю каждый значительный оставшийся пик, и по команде пользователя производит поиск для остаточного спектра. Естественно, что для компонентов, присутствующих в смеси в меньшем количестве, надежность идентификации меньше; поэтому, вычитая вклад наиболее значимых компонентов, можно улучшить надежность идентификации остальных компонентов смеси.

Принципы системы РВМ были использованы для идентификации числа атомов хлора и брома в осколочных ионах по интенсивности изотопных пиков путем определения сходства интенсивностей пиков в группах пиков в масс-спектре с величинами, рассчитываемыми для разных комбинаций атомов Cl и Br. При проверке более 1000 масс-спектров, взятых из большой библиотеки данных, ответы программы РВМ были правильны в 90 % случаев, а большая часть неправильных ответов была вызвана неточностью входных данных [187].

Вероятностный принцип отбора спектральных характеристик реализован и в информационно-поисковой системе для определения структуры органических соединений по масс-спектрам низкого разрешения, разработанной в Новосибирском институте органической химии СО АН СССР [180, 188—190]. Эта система также производит сравнение анализируемого спектра с библиотекой спектров. Вначале она базировалась на каталоге масс-спектров, содержащих 8 наиболее интенсивных пиков. Однако они не всегда могут достаточно точно охарактеризовать структурные признаки анализируемого соединения, особенно для сложных молекул. Вместе с тем непосредственная работа системы с массивами, содержащими полную спектральную информацию, требует слишком больших затрат машинного времени и большого объема памяти ЭВМ. Был разработан способ сокращения масс-спектров путем исключения малоинформативных пиков и сохранения спектральных признаков, отражающих структуру органических соединений. Этот способ использует вероятности появления масс-спектральных пиков в определенных интервалах масс и интенсивностей. Статистический анализ, проведенный на массиве полных масс-спектров, показал, что средняя вероятность появления любых ионов в

интервале массовых чисел от 20 до 117 (область низких масс) и имеющих интенсивность пиков менее 1 %, составляет $(1/2)^2$, для интервала 118—187 (область средних масс) — $(1/2)^4$, для интервала 188—705 (область высоких масс) — $(1/2)^8$. Поэтому в каждом интервале из 14 а. е. м. при сокращении спектров сохранялись три пика в области низких масс, два — в области средних масс и один — в области высоких масс. При оценке близости спектров используются как массы ионов и интенсивности пиков, так и информация об отщепляемых нейтральных осколках. Для сокращения границ поиска служит дополнительная информация (если она имеется): молекулярная масса или ее верхняя и нижняя границы, брутто-формула, наличие в составе неизвестного соединения определенных элементов с указанием минимального и (или) максимального числа их атомов. Величина молекулярной массы используется для предварительного отбора спектров. На основании статистической обработки массива из 23 000 масс-спектров определены средние вероятности появления ионов в разных интервалах массовых чисел и пиков в разных интервалах интенсивностей. Эти вероятности служат весами при вычислении критериев близости анализируемого спектра и спектров сравнения.

Даже тогда, когда в библиотеке отсутствует спектр, соответствующий неизвестному соединению, поисковые системы дают полезную информацию, обнаруживая спектры, наиболее близкие к анализируемому, которые соответствуют веществам, близким по структуре к неизвестному соединению. Однако для подобных случаев более эффективны **интерпретирующие системы**, которые дают более определенную структурную информацию, чем поисковые системы.

Ледерберг, Джерасси и др. [191] применили для интерпретации масс-спектров методы так называемого «искусственного интеллекта», позволяющие распознавать типы соединений или отдельные структурные группы. Программа, получившая название «эвристический ДЕНДРАЛ», генерирует все возможные молекулярные структуры с учетом заданных ограничений; для этих структур предсказываются (моделируются) масс-спектры по эмпирическим корреляционным правилам и осуществляется проверка соответствия этих структур исходным масс-спектральным данным. Эти правила можно получать с помощью специальной программы «Мета-ДЕНДРАЛ» [192], которая содержит алгоритм для получения правил фрагментации молекул на основании эмпирических данных для известных соединений. В этой программе генератор структур использует набор полученных структурных фрагментов, называемых «суператомами» (структурные фрагменты могут быть получены не только из масс-спектральных данных, но и из других источников), и отдельных атомов, которые вместе образуют элементный состав молекулы. Структурные фрагменты постепенно уточняются до их полной идентификации и включаются в генерируемые струк-

туры. Как генерация промежуточных структур, так и составление из них полной структуры молекулы могут быть ограничены путем задания желательных или нежелательных структурных фрагментов. Программа имеет диалоговый характер, что дает пользователю возможность включаться и корректировать решение задачи на уровне генерирования промежуточных структур. Это особенно важно, так как отклонение нескольких промежуточных структур может исключить большое число окончательных вариантов.

В настоящее время полные программы искусственного интеллекта имеются только для небольшого набора отдельных классов соединений, например для эстрогенных стероидов [193]. Эти программы сложны и требуют большого объема памяти ЭВМ, но они доступны для большого числа пользователей по телефонным линиям, соединенным с ЭВМ.

Самообучающаяся интерпретирующая и поисковая система STIRS (Self Training Interpretive and Retrieval System) является наиболее общей интерпретирующей системой, пригодной для анализа большинства классов органических соединений [194]. Она получила широкое распространение, поскольку не требует предварительного обучения на распознавание каких-либо определенных структурных особенностей (в отличие от систем, основанных на методах распознавания образов или методах искусственного интеллекта). В этой программе используются 15 классов масс-спектральных данных, которые являются индикаторами разных типов соединений или структурных групп, но без обозначения, каким именно структурным группам они соответствуют. Программа сама обучается интерпретировать масс-спектры анализируемых соединений путем сравнения признаков каждого из этих классов с соответствующими данными для всех библиотечных спектров. Предполагается, что если определенные структурные группы или типы соединений с большой вероятностью встречаются среди структур, соответствующих масс-спектрам, наиболее близким к анализируемому, то соответственно высока вероятность наличия этих групп в молекуле анализируемого вещества или принадлежности его к данному типу.

Таким образом, система STIRS не может идентифицировать какие-либо структурные группы, которых нет в соединениях, содержащихся в библиотечном файле. Наличие данной структурной характеристики в нескольких выбранных системой соединениях из библиотеки свидетельствует о том, что она может с определенной вероятностью быть в структуре анализируемого соединения; отсутствие же в выборке этой структурной характеристики не является надежным показателем того, что она отсутствует и в молекуле анализируемого соединения. Необходимо отметить, что система STIRS не заменяет интерпретацию, осуществляемую аналитиком, но делает эту интерпретацию более полной и эффективной. Основным принципом использования

STIRS — выявление наиболее близких к анализируемому соединений по каждому классу данных и по «общему фактору совпадения» (взвешенной комбинации факторов совпадения по всем классам) с целью обнаружить общие структурные особенности. Например, если один класс данных показывает наличие в выбранном списке значительного числа соединений с изоксазольным кольцом, а другой класс — наличие ацетокси-соединений, для интерпретатора это важные сведения при построении общей молекулярной структуры анализируемого соединения.

В усовершенствованном варианте системы STIRS разработана программа, предсказывающая вероятность присутствия в молекуле различных структурных фрагментов из списка, содержащего 179 структурных групп [195]. Для этого в каждом из 15 классов масс-спектральных признаков выбирают по 15 соединений, наиболее близких к анализируемому спектру, и проверяют их на присутствие каждой из 179 структурных групп. В дальнейшем этот список подструктур был расширен до 190, а число классов масс-спектральных данных — до 16, что позволило повысить вероятность правильных ответов на 20 % и на столько же уменьшить вероятность выдачи неправильных структур.

В первоначальном варианте STIRS существенным ограничением было то, что требовалось знать априори молекулярную массу анализируемого соединения. Впоследствии был разработан алгоритм определения молекулярной массы, который сначала выделяет 15 соединений со спектрами, наиболее близкими к анализируемому по всем классам критериев, кроме информации о нейтральных осколках. Затем производится сравнение масс-спектров этих выбранных соединений с банком данных по признакам, включающим информацию о нейтральных осколках; те нейтральные осколки, для которых вероятность наличия в этих спектрах оказалась выше или ниже средней вероятности по всему банку данных, имеют, соответственно, большую или меньшую вероятность присутствия в молекуле анализируемого соединения. Эти вероятности по разным признакам служат для определения общих вероятностей различных возможных значений молекулярной массы. Проверка этого алгоритма с использованием 122 случайно выбранных масс-спектров показала, что в первом выборе (т. е. на первом месте в списке) правильными были 83 % ответов, во втором — 9 %; для 38 масс-спектров, которые не содержали пиков молекулярных ионов, первый выбор дал 71 % правильных ответов, второй — 16 %, третий — 5 % [195].

Описанные выше поисковые и интерпретирующие системы входят в состав математического обеспечения ряда систем обработки масс-спектральных данных. Существуют две международные системы; одна из них, MSSS/MSDC (Центр масс-спектрометрической информации в Олдермастоне, Англия, и Национальный институт здравоохранения Агентства по охране ок-

ружающей среды, США), включает программы диалогового поиска PEAK, поисковую систему KB, системы PBM и STIRS, банк данных содержит свыше 30 000 масс-спектров. Другая система, TYMNET (Корнельский университет, США), использует алгоритмы PBM и STIRS, банк данных этой системы содержит 41 429 масс-спектров 32 403 разных соединений.

В СССР информационно-поисковая система для определения структуры органических соединений по масс-спектрам создана в Информационно-вычислительном центре молекулярной спектроскопии СО АН СССР [180, 188—190]. Эта система располагает алгоритмами поиска спектров в библиотеке, использующими методы вероятностного поиска, а также алгоритмами, позволяющими при отсутствии в библиотеке соответствующего спектра получать определенную информацию о структуре анализируемого соединения, выделяя крупные структурные фрагменты. В этой системе предусматривается анализ комплекса спектральных признаков и используется статистический подход к оценке меры близости сравниваемых спектров. Проверка системы путем анализа 67 «неизвестных» масс-спектров показала, что вероятность распознавания больших структурных фрагментов (50—100 % от молекулярной массы) составляет 60—80 % в зависимости от их размеров, а надежность распознавания составляет 98 %.

Описанные выше системы реализованы на достаточно больших ЭВМ и работают в режиме off-line. Однако специализированные мини-ЭВМ, работающие в сочетании с хромато-масс-спектрометрами, также имеют математическое обеспечение, позволяющее применять эти или аналогичные алгоритмы, в том числе и в реальном масштабе времени. Система, работающая в реальном масштабе времени, должна при анализе смесей выдавать не масс-спектральные данные, а информацию об идентифицированных компонентах смесей. Одна из таких систем, основанная на микрокомпьютерной технике, работает с квадрупольным масс-спектрометром, управляемым микрокомпьютером, и использует алгоритм PBM. После ввода образца в ГХ колонку анализ проводится под полным контролем микрокомпьютера. В момент, соответствующий времени удерживания определенного компонента, включается PBM-алгоритм для поиска этого компонента; при этом микрокомпьютер настраивает масс-спектрометр на измерение пиков, выбранных по этому алгоритму. Даже при неполном разделении хроматографических пиков этот метод позволяет осуществить полный анализ хроматографического пика за время порядка 1 с [196]. Производительность системы определяется скоростью хроматографического разделения, в среднем она составляет от 5 до 10 образцов в час. Для идентификации в реальном масштабе времени может быть использован и метод многоионного селективного детектирования. Точность идентификации значительно увеличивается, если библиотечный файл получен на том же приборе.

Наряду с поисковыми и интерпретирующими системами, основанными на использовании библиотечных масс-спектров, существуют системы для идентификации соединений, базирующиеся на методах обработки многомерной информации. В отличие от «индивидуальной» идентификации они позволяют выявить общие групповые характеристики классов и групп соединений. К ним относятся методы распознавания образов, кластерного и факторного анализа. В этом случае масс-спектры обычно представляются в виде точек в многомерном пространстве с числом измерений, равным числу масс-спектральных характеристик в полном или сокращенном масс-спектре. Значения этих характеристик являются координатами точки в многомерном пространстве, так что чем больше сходство между масс-спектрами, тем ближе расположены друг к другу соответствующие им точки в пространстве. Если заранее задается свойство или структурная характеристика, по которой судят о близости анализируемых объектов, то путем «обучения» системы на массиве масс-спектров известных соединений определяются границы областей в пространстве (кластеров), в которые попадают соединения с данным признаком. К таким методам, называемым обучением с учителем, относятся расчет расстояний от среднего масс-спектра каждого класса соединений, метод обучающихся машин и метод ближайших соседей. Если же это классифицирующее свойство точно не известно или примеров для обучения не имеется, то используются методы распознавания образов без обучения или кластерный анализ [71].

Метод классификации по расстоянию от средних спектров применим, когда каждый класс соединений может быть представлен одной точкой в пространстве или набором точек, вокруг которых группируются все точки, соответствующие соединениям этого класса, образуя кластер. Классификация производится по минимальному расстоянию до центра (или границы) соответствующего кластера точки, отвечающей анализируемому спектру. Эффективность этого метода зависит от плотности группировки точек в пространстве вокруг среднего положения кластера и степени перекрытия разных кластеров. Многие кластеры простых алифатических соединений, содержащих функциональные группы, например кето-группу, хорошо определены и четко отделены от других кластеров; во многих других случаях кластеризация намечается слабо, в этих случаях лучше использовать другие методы распознавания образов, например метод обучающихся машин или метод K -ближайших соседей (КБС).

Нильссон [197] определил обучающиеся машины как любое устройство, которое действует под влиянием опыта. При реализации метода обучающихся машин ЭВМ на основе заданной обучающей выборки формирует решающее правило для распознавания спектров, принадлежащих разным классам соединений. Чаще всего применяется адаптивный бинарный класси-

фактор с линейной или нелинейной разделяющей функцией. Эффективность этих методов определяется объемом и качеством обучающей выборки, эффективностью классификатора и выбором признаков. Характер исходных данных может быть изменен различными методами, такими, как преобразование, нормировка или введение весов; в некоторых случаях это улучшает эффективность классификации [198].

В методе КБС анализируемый объект классифицируется в соответствии с классом, к которому принадлежат K ближайших объектов в имеющемся наборе исходных данных. Если $K > 1$, то классификация производится по большинству ближайших соседей. Сопоставление методов обучающихся машин и КБС с использованием одних и тех же наборов данных и линейно сепарабельных признаков было выполнено Вармузой [199]. Было показано, что увеличение числа соседей до $K = 6$ дает заметное увеличение эффективности. Для предсказания наличия в молекуле атома кислорода было получено 99 % правильных ответов, для кето-группы — 86 %. Простейший вариант этого метода для одного соседа ($K = 1$) обычно рекомендуется как начальное приближение. Джустис и Айзенауэр [198], сравнив методы обучающихся машин, ближайшего соседа и расстояния от средних спектров, пришли к выводу, что наибольшую вероятность правильного предсказания структуры обеспечивал второй метод.

Кластерный анализ заключается в группировке объектов, объединении их в конечное число групп — кластеров, причем все объекты в одном кластере обладают заданным общим свойством. Число кластеров может задаваться либо выявляться в процессе разбиения всей совокупности объектов. Классификация производится по попаданию (или близости) анализируемого объекта в определенный кластер.

Важным общим методом преобразования данных, который может обеспечить классификацию, является факторный анализ — многовариантный статистический метод. Он может быть использован для более компактного представления масс-спектров путем удаления избыточной информации и шумов [200, 201]. Получающиеся факторы — линейные комбинации исходных признаков — могут быть использованы для разделения соединений на структурные классы. Этот метод был применен для анализа масс-спектров простых ароматических углеводородов и позволил определить ионы, которые характеризуют определенные структурные группы.

2.8. ВЛИЯНИЕ ПРИБОРНЫХ ФАКТОРОВ

В хромато-масс-спектрометрии получаемая информация имеет такую же форму, как и в каждом из этих методов по отдельности: это хроматограммы, т. е. зависимость сигнала детектора (в данном случае интенсивности пика или ПИТ) от времени, и масс-спектры компонентов. Рассмотрим, как влияет соедине-

ние хроматографа и масс-спектрометра на работу каждого из этих приборов.

Разрешение хроматографической колонки зависит от вида неподвижной фазы, скорости газа-носителя и давления. В зависимости от типа соединения хроматографической колонки с масс-спектрометром и условий масс-спектрометрического анализа условия хроматографического разделения не всегда могут быть оптимальными, что приводит к некоторому ухудшению разрешения. Для ионных масс-хроматограмм и хроматограмм по ПИТ разрешение может быть хуже, чем в обычных хроматограммах, также из-за влияния фона. Как правило, это не очень важно, так как потеря информации из-за ухудшения разрешения компенсируется многоканальным детектированием; кроме того, существует возможность улучшения разрешения хроматограмм с помощью специальных методов обработки данных. Во многих случаях соединение ГХ—МС позволяет обеспечивать оптимальные условия работы обоих приборов, в этом случае разрешение масс-хроматограмм по сравнению с обычными хроматограммами зависит только от величины мертвых объемов и адсорбционных эффектов в интерфейсе, коммуникациях и ионном источнике. Открытый разделительный интерфейс позволяет работать с высокоэффективными стеклянными капиллярными колонками, обеспечивая высокую разрешающую способность. Как правило, непосредственное соединение в случае как ГХ, так и ЖХ обеспечивает несколько лучшее хроматографическое разрешение, чем при вводе через сепараторный интерфейс.

Форма хроматографических пиков. В ХМС получают хроматограммы трех видов: хроматограммы по ПИТ, регистрируемые обычно специальным детектором непрерывно в течение всего опыта; ионные масс-хроматограммы, регистрируемые в режиме СИД путем непрерывного измерения ионного тока, соответствующего определенному иону; реконструированные ионные масс-хроматограммы, построенные по интенсивностям определенных пиков в масс-спектрах, регистрируемых дискретно через определенные промежутки времени. Ионные масс-хроматограммы, полученные в режиме МИД, имеют промежуточный характер, так как получаются по дискретным измерениям, но выполненным в течение более длительного времени и с большей частотой, чем при регистрации полных масс-спектров.

Ионные масс-хроматограммы, полученные в режиме СИД, практически ничем не отличаются от обычных хроматограмм, так как в этом режиме масс-спектрометр работает как специфический хроматографический детектор. Ионные масс-хроматограммы, реконструированные по полному масс-спектру, получены из дискретных данных, что приводит к некоторым искажениям формы пиков и к дополнительным ошибкам в определении времен удерживания и интенсивности в максимуме хроматографических пиков.

Относительная величина хроматографических пиков в ионных масс-хроматограммах и хроматограммах по ПИТ может заметно отличаться от наблюдаемой в обычных хроматограммах, зарегистрированных пламенно-ионизационным или другим детектором. Величина пиков определяется количеством соответствующего компонента и сечением ионизации, которое зависит от атомного состава и структуры молекул. Кроме того, относительная величина пиков на ионных масс-хроматограммах зависит и от относительной интенсивности пика соответствующего иона в масс-спектре компонента. Предельным случаем является полное отсутствие в масс-спектре компонента пика регистрируемого иона, тогда на ионной масс-хроматограмме отсутствует хроматографический пик, соответствующий этому компоненту.

Относительная величина пиков в масс-спектре определяется вероятностью соответствующих направлений распада и изменением концентрации образца в ионном источнике в процессе съемки масс-спектра. Однако если время сканирования значительно меньше ширины хроматографического пика, это изменение не очень велико; кроме того, математическое обеспечение системы обработки данных позволяет корректировать относительные интенсивности масс-спектральных пиков в соответствии с изменением ПИТ.

Разрешающая способность по массам. При непосредственном соединении хроматографической колонки и масс-спектрометра, когда весь поток или значительная его часть направляются в ионный источник, давление в нем может быть несколько выше оптимального, и это может привести к некоторому ухудшению разрешения по массам. Тем не менее современные ХМС системы обеспечивают достаточно высокое разрешение, в том числе и возможность работы в режиме МСВР. Следует отметить, однако, что работа в режиме МСВР приводит к уменьшению чувствительности, так как в ХМС время регистрации масс-спектра ограничено временем прохождения хроматографического пика, поэтому разрешающая способность в ХМС редко превышает 10 000.

Фоновый масс-спектр представляет одну из серьезных проблем в ХМС. Он может возникать, помимо обычных причин, из-за выноса из колонки неподвижной фазы, ее термической деструкции, а также как результат каталитических превращений анализируемых веществ при контакте с системой ввода вещества в хроматографическую колонку, с самой колонкой или интерфейсом. Причиной возникновения фонового масс-спектра может быть также адсорбция веществ на коммуникациях, интерфейсе (особенно диффузионного типа в ГХ—МС или транспортного типа в ЖХ—МС) и ионном источнике.

Проведенное исследование причин появления фона в масс-спектрах при определении микропримесей на уровне пикограммов с помощью ГХ—МС [202] показало, что в области масс

ниже 150 фон обусловлен остаточным воздухом, водой и парами масла форвакуумного насоса. Для уменьшения фона было предложено помещать ловушки с молекулярными ситами между диффузионным и форвакуумным насосами. При этом эффективно удаляется фон от трубопроводов, соединяющих диффузионный и механический насосы (фталаты, m/z 149). Остающийся фоновый спектр от масла диффузионных насосов — полифениловых эфиров и примеси моноклорфенилового эфира (m/z 296) в этом масле — может быть уменьшен путем промывки внутренней поверхности анализатора метиловым спиртом и прогревом при температуре 90 °С.

Другой вид загрязнений обусловлен образованием оксидов при окислении катода, что вызывает общую потерю чувствительности; от него избавляются чисткой и полировкой поверхности.

Для исключения фона от резиновой пробки системы ввода в газовый хроматограф рекомендуется предварительно выдерживать ее при 300 °С в течение 4—6 ч и использовать при температуре не выше 200 °С. Величину фона часто можно уменьшить понижением ионизирующего напряжения.

Работа масс-спектрометра в сочетании с хроматографом накладывает определенные ограничения на выбор рабочих условий получения масс-спектров по сравнению с другими системами ввода образцов: 1) необходимость наличия сепаратора для отделения газа-носителя или достаточно мощной откачки ионного источника; 2) необходимость быстрой развертки масс-спектра, чтобы иметь возможность зарегистрировать масс-спектр компонента несколько раз в процессе элюирования хроматографического пика; 3) наличие соответствующих систем для проведения измерений в режиме СИД или МИД; 4) специального детектора для непрерывной регистрации ПИТ.

Комбинация хроматографии и масс-спектрометрии накладывает ограничения и на условия работы хроматографической части системы. Выбор неподвижной фазы в ГХ—МС играет очень большую роль: помимо ее разделительной способности необходимо принимать во внимание такие факторы, как вынос фазы и ее разложение с образованием летучих продуктов, которые, попадая в масс-спектрометр, образуют фоновый масс-спектр, мешающий идентификации компонентов анализируемой смеси. По этой же причине температура работы колонки в ГХ—МС обычно выбирается ниже, чем в обычной ГХ с той же неподвижной фазой.

Выбор газа-носителя определяется следующими соображениями: возможность его удаления молекулярным сепаратором, скорость откачки из ионизационной камеры и соединительных линий, возможность использования в качестве газа-реагента для ХИ при непосредственном соединении колонки с масс-спектрометром. Чаще всего газом-носителем в ГХ—МС с ионизацией ЭУ служит гелий, который легко удаляется молекулярными се-

параторами, быстро откачивается, и, кроме того, имеет высокий потенциал ионизации (ионизируются только молекулы анализируемых веществ). В случае ХИ газом-носителем иногда служит метан или изобутан, которые одновременно являются и газами-реагентами. При этом возможно изменение времени удерживания и эффективности разделения.

При количественном ГХ анализе оптимальной формой хроматографического пика является кривая Гаусса с шириной, приблизительно равной половине его высоты. Площадь такого пика может быть измерена с максимальной точностью. В случае ГХ—МС анализа для достижения максимальной чувствительности требуются острые пики, а для получения наиболее достоверной спектральной информации необходимо иметь широкие пики, так как при этом удается получить несколько спектров в процессе элюирования пика, а концентрация образца в ионном источнике сравнительно медленно меняется во время сканирования масс-спектра. Минимально допустимая ширина хроматографического пика определяется скоростью сканирования масс-спектра.

Масс-спектры компонентов смесей, получаемые в условиях ХМС, могут отличаться от спектров, полученных при анализе соответствующих чистых соединений на аналитическом масс-спектрометре. На вид масс-спектров влияют следующие факторы: 1) температура хроматографической колонки, интерфейса и соединительных линий, которая определяет возможность разложения или термических превращений анализируемых веществ; 2) температура ионного источника оказывает наибольшее влияние на вид масс-спектров, вызывая изменение вероятности различных путей распада; влияние температуры особенно заметно при ХИ, повышение температуры ионного источника уменьшает относительное количество ионов с большими массами; 3) условия ионизации, которые часто отличаются от принятых в аналитической масс-спектрометрии; например, в ГХ—МС ионизация осуществляется электронами с энергиями порядка 15—20 эВ, тогда как в обычной масс-спектрометрической аналитической практике — либо электронами высоких энергий (50—70 эВ), либо в близпороговой области (8—12 эВ); 4) давление в ионном источнике может быть выше оптимального, что приводит к увеличению вклада продуктов ионно-молекулярных реакций даже при ЭУ ионизации; следует иметь в виду, что, несмотря на большую скорость сканирования, давление в ионном источнике изменяется за время элюирования хроматографического пика, это приводит к изменению относительных интенсивностей регистрируемых пиков по сравнению с пиками в обычном масс-спектре.

Количество образца, вводимого в хроматографическую колонку и поступающего затем в масс-спектрометр, выбирается таким, чтобы, с одной стороны, все хроматографические пики имели достаточно большую интенсивность, а с другой стороны,

не было перегрузки колонки и системы регистрации масс-спектрометра. Обычно в ГХ—МС оно составляет 10—100 нг и зависит от структуры компонентов (определяющей вид масс-спектров), количества компонентов в смеси, вида анализа (определение основных компонентов или примесей), способа детектирования (детектор Фарадея или электронный умножитель) и т. д. Так, для полихлорбензолов при отрицательной ХИ предел обнаружения выше, чем при положительной ХИ, однако в первом случае предельное количество вводимого образца составляет 10 нг, а во втором — 100 нг [203].

Глава 3

ПРИМЕНЕНИЯ

3.1. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ

При исследовании пищевых продуктов с помощью ГХ—МС метода обычно решаются следующие задачи:

- 1) идентификация компонентов, определяющих вкусовые характеристики продуктов и их запах;
- 2) установление путей изменения исходных компонентов, определяющих изменение вкуса и запаха продуктов, и идентификация новообразованных компонентов во время хранения и в процессе термического воздействия, связанного с приготовлением пищи;
- 3) идентификация токсичных компонентов, возникающих или привнесенных в пищевые продукты; установление путей их возникновения и изменения в результате хранения и термического воздействия.

Идентификация компонентов, ответственных за специфический запах и вкус пищевых продуктов. Современные направления контроля за составом пищи, ее вкусом и питательностью и особый интерес к механизмам восприятия вкуса и запаха основаны на исследовании химической природы запахов и вкуса пищи. Вкус пищи сложен, и запах часто является одной из главных составляющих его восприятия. В пище обычно присутствуют летучие компоненты, ответственные за запах, и в этом случае ГХ—МС служит великолепным методом для изучения химии запахов.

Концентрация важных вкусовых компонентов в пище составляет 10^{-4} % или менее, и подчас необходимо подвергнуть экстракции тонны пищевого материала, чтобы получить несколько миллиграммов масла или экстракта. Эти экстракты представляют собой сложные смеси, содержащие обычно более 200 сое-

динений, и часто два или три компонента, фактически не представляющие интереса для анализа, составляют 90 % общего количества. Поэтому физико-химическое и (или) химическое исследование летучих вкусовых компонентов включает разделение исследуемого материала и анализ малых количеств выделенных компонентов (часто менее микрограмма) высокочувствительными инструментальными методами.

Анализ летучих компонентов пищи усложняется тем, что порог обоняния для разных соединений различается на 6—8 порядков. Поэтому необходимо определять все компоненты без исключения, так как каждый из них может играть важную роль в создании специфического запаха и вкуса. В этом отношении метод ГХ—МС представляется наиболее перспективным, поскольку он сочетает высокую чувствительность и селективность с возможностью анализа компонентов в широком интервале концентраций.

Как правило, первым этапом ГХ—МС исследования является качественный анализ экстрактов с расшифровкой масс-хроматограмм по полным масс-спектрам элюируемых из хроматографа пиков с применением чаще всего ЭУ ионизации.

Мак-Леод и Коппок [295] изучали летучие продукты, выделенные из образцов мяса экстракцией с последующим низкотемпературным фракционированием в высоком вакууме. Выделенные продукты разделялись хроматографически, а затем анализировались методом ХМС. Исследовалась связь между составом летучих продуктов и типом пищевого продукта (вареное и жареное мясо), способом приготовления (обычная обработка или нагрев с помощью тока высокой частоты), время приготовления, наличие или отсутствие воды. Авторы делают вывод, что запах жареного мяса обусловлен рядом карбонильных соединений (особенно 3-метилбутаналем), сульфидами, пирролами и пиридинами. По всей видимости, показателем хорошо приготовленного вареного мяса является наличие в летучей фракции бензеноидов и фуранов.

Летучие компоненты ростбифа были выделены с помощью специальной аппаратуры и разделены на кислую, основную и нейтральную фракции. Последняя с помощью ГХ на двух неподвижных фазах была разделена на более узкие фракции, подвергнутые далее ХМС анализу [296]. Идентификация 20 алкилбензолов была осуществлена сопоставлением экспериментально полученных масс-спектров и времен удерживания с данными по анализу эталонных образцов. В исследуемых фракциях обнаружены: бензол, толуол, этилбензол, стирол, *o*-, *m*- и *p*-ксилолы, 1,2,4- и 1,3,5-триметилбензолы, 1-метил-2-этилбензол, 1,2,3,5- и 1,2,4,5-тетраметилбензолы, *n*-алкилбензолы. Большинство идентифицированных алкилбензолов прежде не были обнаружены среди летучих компонентов ростбифа. Авторы предполагают, что эти алкилбензолы образуются из

длинноцепочечных ненасыщенных соединений в процессе окислительной деструкции.

Для идентификации следовых количеств летучих компонентов сыра разных сортов Слот и Харкес [297] использовали методы ГХ и ХМС. Экстракт летучих компонентов сыра содержит, как правило, большое количество жирных кислот и малое количество веществ неокислотного характера. С помощью ХМС метода в различных типах сыров идентифицировано большое число нейтральных компонентов, причем наблюдалась значительная разница как в качественном, так и количественном составе летучих компонентов сыров разного типа. Исследованию подвергались различные фракции, полученные после предварительного разделения экстракта на ионно-обменной колонке (Амберлит ХАД-2). Было показано, что одна из фракций с наиболее сильным запахом содержит бис(метилтио)метан. Другие фракции, наряду со сложными эфирами и метилкетонами, содержали ряд алкилпиперазинов. Был обнаружен также 2-метокси-1-пропенилбензол. Авторы делают вывод, что основными агентами, «ответственными» за запах этого типа сыра, являются бис(метилтио)-метан и 2-метокси-1-пропенилбензол.

Летучие компоненты эментальского сыра были предметом ряда исследований. Было показано, что большая их часть представлена жирными кислотами, а также сложной смесью небольших количеств соединений неокислотного характера. Большинство полученных соединений изучены хромато-масс-спектрометрическим методом Ланглером [298]. Ней и Виротама [299] идентифицировали моноамины, выделенные в виде производных из основной фракции. Слот и Хофман [300] с помощью вакуумной дегазации при 50 °С выделили летучие компоненты, которые были затем разделены на полярную и неполярную часть. Основная фракция полярных соединений была изучена методом ХМС. Для полученного концентрата основных соединений характерен резкий запах. Анализ концентрата показал, что наряду с известными спиртами он содержит 2,5- или 2,6-диметилпиперазин, 5- или 6-метил-2-этилпиперазин, триметилпиперазин, 2,5- или 2,6-диметил-3-этилпиперазин, тетраметилпиперазин, триметилэтилпиперазин, которые являются одними из основных компонентов запаха эментальского сыра.

Изучение летучих компонентов овечьего жира было принято с целью выявления соединений, определяющих характерный запах баранины [301]. Выделенные перегонкой с водяным паром летучие продукты были расфракционированы на нейтральную, кислую и основную фракции. Предварительное исследование с помощью хроматографического и других методов показало, что основная часть летучих продуктов содержится в нейтральной фракции, которая была подвергнута анализу с помощью ГХ—МС с ЭУ ионизацией. Идентификация осуществлялась путем сравнения экспериментально полученных масс-спектров и библиотечных данных, а также сравнением

экспериментальных времен удерживания с приведенными в литературе. В нейтральной фракции был идентифицирован 51 компонент: 26 альдегидов, 12 кетонов, 6 лактонов, 4 спирта и 3 циклических соединения; в летучей фракции бараньего жира впервые обнаружены 39 соединений, причем 14 из них могут быть ответственны за характерный запах баранины.

При изучении летучих компонентов розовых яблок, произрастающих в Вест-Индии и Южной Флориде [302], было идентифицировано 17 основных компонентов (12 спиртов, 2 альдегида, 2 циклических простых эфира и 1 кетон). Идентификация осуществлялась путем сопоставления масс-спектров и времен удерживания анализируемых компонентов с эталонными. В летучих компонентах отсутствуют сложные эфиры. Основную часть летучей фракции составляют спирты, среди которых наиболее представительным является *цис*-гексин-3-ол-1; в меньшей концентрации присутствуют гексанол, линалоол, 3-фенилпропанол-1 и коричный спирт. Два альдегида — гексаналь и коричный альдегид — присутствуют лишь в следовых количествах. Запах розы, присущий этому сорту яблок, вызван, вероятно, двумя изомерами: *Z*- и *E*-2-винил-2-метил-5-(1-гидрокси-1-метилэтил)тетрагидрофуранами и линалоолом, а также 3-фенилпропанолом.

Летучие компоненты свежих плодов папайи были выделены различными методами. Концентраты исследовали методом ХМС [303]. Всего идентифицировано 106 соединений, из них 30 спиртов. Линалоол является наиболее представительным компонентом, за ним следуют два тетрагидрофураниллиналоолоксида. Общее количество всех спиртов (за исключением линалоола) составляет 2 %, содержание карбонильных компонентов относительно мало: из 9 соединений (сумма 0,1 %) наиболее вероятным одорантом является β-ионон. Среди летучих продуктов обнаружено 32 сложных эфира (сумма 0,87 %), причем относительная концентрация лактонов достаточно высока.

Нагретые бобы какао обладают приятным ароматом, и хотя в настоящее время в их летучей фракции идентифицировано несколько сот соединений, еще не имеется точных данных о том, какие именно компоненты ответственны за этот аромат. Интересные результаты по изучению состава летучих продуктов были получены с применением методов ГХ и ХМС. Вицтум и соавт. [304] использовали модифицированный метод выделения с помощью CO₂ и последующим хромато-масс-спектрометрическим анализом липофильной фракции. Идентификация соединений проводилась сопоставлением экспериментально полученных масс-спектров с масс-спектрами, опубликованными в литературе и имеющимися у авторов. Из идентифицированных компонентов ранее не были обнаружены алкилоказолы, пиридин, метил-, ацетил- и фенилпиридины, циклоалкил- и метилпиперазины.

Высушенные бобы фасоли с запахом сусли были обработаны водяным паром; из полученного летучего масла удаляли ароматические соединения и углеводороды (колонка с силикагелем), кислородсодержащие соединения концентрировали и затем разделяли на капиллярной колонке, соединенной через силиконовую мембрану с модифицированным масс-спектрометром (СЕС 21-620). Согласно результатам исследования причиной запаха является жесмин (*транс*-1,10-диметил-*транс*-9-декалол). Его концентрация в фасоли составляет $\approx 1 \cdot 10^{-7}$ %.

Изомеры моно-, ди- и триалкил-1,3-тиазолов могут быть достаточно надежно идентифицированы по масс-спектрам ЭУ. Основным критерием могут служить характеристические ионы, в частности молекулярные ионы, ионы $(M-1)^+$, тиазол-диметилкарбокатионы и ионы с тиазиновой структурой, образующиеся при расширении цикла; определенную роль при идентификации играют также ионы, образующиеся при элиминировании из молекулярного иона молекул нитрилов с сокращением цикла. Используя эти закономерности распада, авторы [305] осуществили идентификацию 22 тиазольных соединений с целью установления состава ароматических компонентов кофе.

Летучее масло из артишоков [306] хроматографически разделяли на двух капиллярных колонках, соединенных через накататель из силиконовой резины с масс-спектрометром циклоидального типа. Было идентифицировано 32 соединения и определен количественный состав масла. Основными компонентами оказались β -селинен (40 %) и кариофиллен (19 %). Более 10 летучих кислородсодержащих сесквитерпеноидов было обнаружено в малых концентрациях, но осуществить идентификацию их по масс-спектрам не удалось.

Летучие компоненты, выделенные перегонкой с водяным паром из лука-порея, изучались методом ГХ — МС — ЭУ [306]. Было идентифицировано 67 соединений, из них 57 впервые. Было получено 5 ароматограмм, каждая из которых составлялась на основании данных от трех дегустаторов, характеризующих запах, соответствующий каждому пику на хроматограмме. Сопоставление усредненной ароматограммы с данными ХМС анализа позволило сделать вывод, что компонентами, обуславливающими специфический запах лука-порея, являются пропантиол, а также дисульфиды (метилаллил-, метилпропил-, дипропил-) и метилпропилтрисульфид.

Летучие компоненты были выделены из вареной спаржи [306] с помощью жидкостной экстракции при различных рН и разделены на фракции с разной полярностью с помощью адсорбционной хроматографии. Эти фракции были далее разделены на препаративных колонках и, наконец, на капиллярной колонке газового хроматографа, соединенного с масс-спектрометром. Были идентифицированы и количественно определены 116 компонентов: сульфиды, тиоспирты, тиофены, дитиоланы,

тиазолы, пирролы, пиридины, пиазины, фураны, альдегиды, кетоны, спирты, фенолы, лактоны, кислоты. Концентрации компонентов образуют довольно широкий интервал: от $< 1 \cdot 10^{-7}$ до $8,4 \cdot 10^{-4}$ %. На основании полученных данных и сопоставления с литературными данными авторы делают заключение о термическом превращении ряда компонентов спаржи в процессе ее приготовления.

Автоокисление ненасыщенных жирных кислот снижает биологическую усвояемость этих важных компонентов растительных масел, является причиной неприятного запаха и потенциально токсичных продуктов. Целью исследования, осуществленного Франколем и соавт. [307], было изучение изомерного распределения аллилгидропероксидов и некоторых вторичных продуктов, которые могут служить нелетучими предшественниками летучих отдушек. В качестве основного аналитического метода был использован хромато-масс-спектральный метод. Исследование различных образцов олеатов, подвергнутых окислению в широком интервале температур, показало, что содержание 8- и 11-гидроксиизомеров выше, чем 9- и 10-гидроксиизомеров, причем разница эта наибольшая при 40 °С и наименьшая при 80 °С и при высокой степени автоокисления. Полученные данные не укладываются в принятую схему автоокисления олеатов.

Был определен состав минорных компонентов в окисленных и затем восстановленных олеатах, которые включают аллильные енолы, эпоксиоктадеканаты (8,9-, 9,10-, 10,11-), дигидроксиоктадеканаты (8,9-, 9,10-, 10,11-) и дигидроксиоктадеканаты (8,9-, 8,10-, 8,11-, 9,10-, 9,11-, 10,11-). Был сделан вывод, что аллильные енолы могут быть образованы при дегидрировании гидропероксидов. Эпокси- и дигидроксизамещенные сложные эфиры могли образоваться либо при реакции между олеатом и гидропероксидом, либо из самих гидропероксидов. В первом случае единственными продуктами должны быть 9,10-изомеры. Полученные данные о наличии других изомеров показывают, что эпоксипроизводные сложных эфиров также образуются из гидропероксидов. Вицинальные дигидроксизамещенные сложные эфиры могут получаться из изомерных эпоксизамещенных сложных эфиров, а 1,3-дигидроксизамещенные сложные эфиры — из дигидроксипероксидов.

Образцы арахисового масла (содержащие триглицериды с числом атомов углерода до 60) и образцы рапсового масла (содержащие триглицериды с числом атомов углерода выше 62) анализировали с помощью ГХ—МС—ХИ метода [150]. Была получена детальная информация о структуре ТГ. Масс-хроматографическое исследование триглицеридов молочного жира подтвердило присутствие ТГ с нечетным числом атомов углерода. Основным компонентом ТГ с 53 атомами углерода были ТГ типа 18—18—17; для ТГ C_{51} — 18—18—15 и для ТГ C_{49} — 17—18—13 и 18—16—15.

Количественный анализ остаточных количеств октахлорстирола и других хлорсодержащих соединений — изомерных гептахлор-, гексахлор- и пентахлорстиролов, гексахлор-, пентахлор-, тетрахлор- и трихлорбензолов и гексахлорбутадиена, содержащихся в рыбе, выловленной в Великих Озерах (Канада), осуществлен методом ГХ—МС с селективным ионным детектированием на хромато-масс-спектрометре фирмы Finnigan (модель 4000). Использовалась капиллярная колонка 15 м × 0,25 мм с SE-30 с температурой, изменяющейся от 60 до 120 °С (3 °С/мин) и от 120 до 250 °С (10 °С/мин), скорость потока гелия 30 мл/мин; энергия ионизирующих электронов 70 эВ, время сканирования полного масс-спектра 1 с. Содержание октахлорстирола в рыбе из Верхних Озер было менее 5 нг/г, в рыбе из нижних озер оно достигало 400 нг/г [308].

Анализ токсичных компонентов. Из большого числа аналитических методов, используемых для идентификации и количественной оценки следовых количеств N-нитрозаминов в рыбных и мясных продуктах, наибольшую ценность представляет хромато-масс-спектрометрия.

Необходимость идентификации N-нитрозаминов и измерения их концентраций в пищевых продуктах диктуется двумя факторами. Во-первых, из всех изученных нитрозаминов только N-нитроамины обладают канцерогенной активностью по отношению к живым существам. Во-вторых, N-нитроамины образуются при взаимодействии соответствующих вторичных аминов и нитрит-ионов. В настоящее время установлено, что N-нитрозосоединения образуются также, хотя и с меньшей легкостью, из первичных и третичных аминов и даже из четвертичных аммониевых солей [309].

Фонг и Чэн [310], анализируя образцы рыбы методом ХМС, осуществляли детектирование молекулярного иона с массой 74 и иона с массой 30 для анализа N-нитрозодиметиламина (НДМА). Концентрацию НДМА определяли по площади пика молекулярного иона на хроматограмме. В работе [311] для обнаружения НДМА в рыбе использовали квадрупольный масс-спектрометр, соединенный с колонкой с программированным нагревом в интервале температур 80—180 °С. Регистрировались пики ионов с массами 74, 42 и 30. Полученные данные были подтверждены при анализе этих образцов методом ГХ—МС—ХИ и регистрации пика ионов с массой 75. При определении N-нитрозодиметиламина и N-нитрозопирролидина в беконе и других мясных продуктах, а также в сосисках предел обнаружения был равен 10 мкг/кг [312].

При анализе пищевых продуктов с использованием высокоэффективной колонки и масс-спектрометра низкого разрешения [313] N-нитроамины после разделения на первой колонке собирали в ловушки. Содержимое ловушки подавали во вторую колонку (обычно капиллярную), которая соединялась с помощью эффузионного сепаратора с масс-спектрометром фирмы

Hitachi RMU-7. Записывали полный ионный ток, а соединения с близкими временами удерживания анализировали методом СИД; детектировались ионы с массами 74, 42 и 30. Концентрирование образца в ловушке значительно повысило чувствительность, а также исключило наложение мешающих примесей на масс-спектры нитрозаминов.

Фазио и соавт. [314] использовали набивную колонку, соединенную с мембранным сепаратором через трехходовой кран. Для каждого хроматографического пика регистрировался полный масс-спектр. При анализе N-нитрозодиметиламина в рыбе этим методом был достигнут предел обнаружения 10 нг на 1 мкл введенного материала. Методика была распространена на определение гетероциклических N-нитрозаминов и N-нитрозодиаalkиламинов в мясных продуктах; всего удалось определить 14 N-нитроаминов при введении 20 мкл образца. Метод простого ионного детектирования был применен для обнаружения триметилсилилпроизводных N-нитроаминокислот.

Масс-спектрометрия низкого разрешения при регистрации полных спектров или метод СИД дают удовлетворительные результаты при анализе малокомпонентных смесей, но в случае многокомпонентных образцов этих методов недостаточно для получения правильных результатов. Для таких сложных смесей, как пищевые продукты, даже предварительная очистка образца и анализ на капиллярных колонках высокого разрешения не всегда позволяют отделить другие компоненты от N-нитроаминов. В этих случаях должна использоваться масс-спектрометрия высокого разрешения.

Первое сообщение об определении N-нитроаминов в пищевых продуктах методом МСВР было сделано на конференции по анализу нитрозосоединений в 1971 г. Масс-спектрометр с разрешением 10 000 позволил выделить молекулярные ионы N-нитроаминов [309]; разрешающая способность 15 000 была достаточной для детектирования ионов NO⁺ [315]. Методика, предложенная Теллингом и соавт. [316], включала разделение на набивной колонке (полярная фаза), соединенной с масс-спектрометром высокого разрешения (фирма AEI, MS-902) через сепаратор со стеклянной крошкой. Разрешение 15 000 обеспечивало разделение ионов NO⁺ и других ионов с номинальной массой 30, за исключением C¹⁸O⁺, при удовлетворительной чувствительности. Дополнительное доказательство наличия N-нитроаминов было получено на основании полных масс-спектров низкого разрешения. Этим методом нитроамины в ряде мясных продуктов были определены с пределом обнаружения 25 мкг на 1 кг образца [317—319].

Стефани и соавт. [320] методом СИД на масс-спектрометре высокого разрешения провели анализ продуктов разделения, полученных на двух капиллярных колонках (с полярной и неполярной фазами) в изотермическом режиме. Этим методом, в отличие от СИД и МИД на масс-спектрометре с низким

разрешением, в различных мясных продуктах были обнаружены добавленные туда N-нитрозодиметиламин и N-нитрозодиэтиламин, N-нитрозо-*n*-бутиламин, N-нитрозопирролидин, N-нитрозопиперидон. Предел обнаружения оказался равным $(1-2)10^{-8}$ %. Этот метод был использован для контроля наличия перечисленных нитрозаминов в 9 различных образцах мяса.

Определению в пищевых продуктах нитратов и нитритов и особенно нитрозаминов в последнее время уделяется большое внимание, так как некоторые овощи, как, например, шпинат и свекла, могут аккумулировать нитраты, которые могут восстанавливаться до нитритов во время хранения и приготовления. Превращения нитритов и вторичных аминов в условиях хранения могут привести к образованию нитроаминов.

Хейслер и сотр. [321] исследовали большое число образцов свеклы и шпината, подвергнутых различной обработке и хранению, с целью обнаружения нитроаминов, в частности метил-, этил- и метилэтилнитроаминов, нитрозопирролидина, нитрозо-морфолина, нитрозопиперидина. Проводя анализ масс-хроматограмм по пикам молекулярных ионов, авторы показали, что в условиях хранения не происходит образования указанных нитроаминов.

Авторы работы [322] показали возможность разделения дансиламидов, полученных из ациклических и циклических N-нитроаминов, методом газо-жидкостной хроматографии и предложили хромато-масс-спектрометрический метод анализа смесей N-нитроаминов в виде соответствующих дансиламидов.

0,5—1,0 мкл анализируемого экстракта вводили при помощи микрошприца в инжектор хроматографа. Хроматограммы регистрировали в сканирующем режиме масс-спектрометра по полному ионному току в интервале массовых чисел 40—400. С помощью ЭВМ получали реконструированные масс-хроматограммы по характеристическим ионам индивидуальных дансиламидов. Определяли времена удерживания хроматографических пиков и соотношения интенсивностей пиков характеристических ионов в масс-спектрах, зарегистрированных в максимумах хроматографических пиков; эти параметры использовали для идентификации определяемых веществ. Регистрировались также масс-хроматограммы методом МИД одновременно по четырем пикам.

Метод МИД оказался более чувствительным, чем анализ по полному ионному току, но в обоих случаях возможно определение нитроаминов в смесях в количествах 1 нг/мкл.

Количественное определение проводили по величинам площадей пиков, зарегистрированных по пику иона $(\text{CH}_3)_2\text{NC}_{10}\text{H}_7^+$ (масса 171), максимальному в спектрах всех дансиламидов. Метод пригоден для количественного определения нитроаминов в смесях при содержании 3 нг и более. Относительное стандартное отклонение составляет 0,127—0,128. С помощью

предлагаемого метода проведено определение нитроаминов в семи различных образцах окорока «Московский» [322]. В исследованных образцах окорока содержание диметил-, диэтил- и дипропилнитроаминов, нитрозопиперидина, нитрозопирролидина не превышало 3,0; 1,8; 1,5; 3,3 и 2,5 мкг/кг соответственно.

Для анализа следовых количеств летучих N-нитрозо соединений Крейтторн и соавт. [323] описали метод ГХ—МСВР с использованием эталонных нитроаминов, представлявших собой изомеры анализируемых нитроаминов. Газовый хроматограф Perkin—Elmer (модель F11) соединялся через сепаратор Уотсона—Бимана с масс-спектрометром с двойной фокусировкой, разрешение 10 000 (фирма Perkin—Elmer—Hitachi, модель RMU-7L). При анализе диметиламина, диэтиламина, ди-*n*-пропиламина, ди-*n*-бутиламина, метилэтиламина, пирролидина и пиперидина выбрали следующие изомеры для калибровки: метилмочевина, гидразид масляной кислоты, N-(2-аминоэтил)морфолин, 3-*n*-бутиламин, этилмочевина, гидразид циклопропанкарбоновой кислоты и 1-пиперазинкарбоксальдегид соответственно. Предел обнаружения для каждого нитроамина равен ≈ 1 нг/мкл.

Для изучения образования N-нитроаминов из N-нитроаминокислот при тепловой обработке пищи Эйзенбрандт и соавт. [324] разработали метод анализа следовых количеств N-нитроаминокислот. В качестве моделей были выбраны N-нитропроизводные саркозина, пролина и 2-гидроксипролина, часто встречающиеся в пищевых продуктах. Триметилсилильные производные этих соединений исследовались методом СИД. Характеристические осколочные ионы в их масс-спектрах приведены в табл. 3-1. ТМС-производные легко детектируются в количестве, соответствующем 2 нг N-нитроаминокислот.

Таблица 3-1. Массы и интенсивности пиков характеристических ионов ТМС-производных N-нитроаминокислот [324]
I — нитрозосаркозин; II — нитрозопролин; III — нитрозо-2-гидроксипролин

Ионы	I		II		III	
	<i>m/z</i>	<i>I</i> _{отн.} %	<i>m/z</i>	<i>I</i> _{отн.} %	<i>m/z</i>	<i>I</i> _{отн.} %
M ⁺	190	1,4	216	1,6	304	0,4
(M—CH ₃) ⁺	175	5,5	201	3,5	289	4,8
(M—NO) ⁺	160	4,7			274	1,3
(M—CH ₃ —CO ₂) ⁺	131	8,1	157	2,6	245	12,4
[M—COOSi(CH ₃) ₃] ⁺			99	10,3	187	4,1
[M—OSi(CH ₃) ₃] ⁺	101	11,4				
[Si(CH ₃) ₃ —C ₄ H ₇ N] ⁺			142	8,9		
[Si(CH ₃) ₂ —O—C ₄ H ₆ N] ⁺					142	9,5
[COO—Si(CH ₃) ₂] ⁺					102	3,8
[HO—Si(CH ₃) ₂] ⁺	75	18,9	75	18,3	75	21,2
[Si(CH ₃) ₃] ⁺	73	100	73	100	73	100

Было показано, что в интервале 1—10 нг наблюдается линейная зависимость между высотой пика и количеством ТМС-производных. Возможно количественное определение N-нитрозаминокислот в пищевых продуктах на уровне 10^{-7} %.

Соединения с молекулярной массой менее 500 были выделены из полихлоридных смол, употребляемых для упаковки пищевых продуктов, путем экстракции эфиром с последующим фракционированием на сефадексе. Предварительный анализ производился с помощью ГХ: набивные колонки, НФ с 3 % OV-1 и 3 % Дексил-300, температура соответственно 130—300 и 150—400 °С (8 °С/мин). Идентификация проводилась с помощью ГХ—МС, при этом газовый хроматограф Карло Эрба 4160 (колонка 20 м × 0,3 мм с OV-101, температура 75 °С в течение 2 мин и нагревание до 240 °С со скоростью 5 °С/мин) непосредственно соединялся с масс-спектрометром VG 70-70, работающим при температуре источника 200 °С, разрешении 1000, энергии электронов 70 эВ, скорости сканирования масс-спектров от 500 до 25 а. е. м. 0,7 с/декада. Измерение точных масс ионов производили с помощью внутреннего стандарта $C_{21}I_4$ при разрешении 2000 и скорости сканирования 1,5 с/декада. Результаты анализа экстрактов до и после гидрогенизации показали присутствие олигомеров винилхлорида от тримера до гексамера (возможно, до октамера). Каждый олигомер представлен рядом структурных изомеров, содержащих циклы или двойные связи. Другие идентифицированные компоненты включают смесь фталатов, алканов, нонилфенолов, а также ундеканат (образуется из инициатора лаурилпероксида [325]).

Янцовский и соавт. [326] исследовали возможность образования в пищевых продуктах N-нитрозо-3-гидроксипирролидина (НГП), который в условиях модельных опытов получался при термическом декарбоксилировании N-нитрозогидроксипролина.

Для определения НГП в мясных продуктах водно-метанольные экстракты анализировались методом ГХ—МСВР с предварительным получением трифторацетильных производных анализируемых соединений. Внутренним стандартом служил N-нитрозо-4-гидроксипиперидин (НГПП), близкий по своим физическим и химическим свойствам к НГП.

Масс-спектрометр (Varian MAT 311) был соединен с газовым хроматографом (Pye Unicam) через щелевой сепаратор. В качестве аналитического был выбран молекулярный пик трифторацетильного производного НГП, регистрируемый при разрешении 10 000. Для разделения применялась стандартная набивная колонка (1,2 м × 2,0 мм) с 3 % OV-17 на Газхроме Q (100—120 меш). Были изучены 33 образца: бекон (10), ветчина (10) и сосиски (13), в 9 образцах были обнаружены концентрации нитрозамина от $1 \cdot 10^{-7}$ до $7 \cdot 10^{-7}$ %.

Дей и соавт. [84] описали метод определения диэтилстильбэстрола в говяжьей печени, а Хёллерер и Яр [327] определили эстрогенные анаболиты в говяжьей печени, используя ГХ—

МС анализ ТМС-производных этих препаратов. Предел обнаружения для производных стильбена был равен $4 \cdot 10^{-7}$ — $4 \cdot 10^{-6}$ %. В работе [84] было описано исследование остатков анаболических препаратов в мясе на уровне 10^{-7} %. Использовался квадрупольный масс-спектрометр фирмы Finnigan (модель 4000) с компьютером Incos 2300. Ионный источник мог работать в режиме как ЭУ, так и ХИ. Масс-спектрометр соединялся с газовым хроматографом Finnigan (модель 9610) с помощью цельностеклянного интерфейса с открытым делителем. В процессе хроматографирования осуществлялось непрерывное сканирование со временем развертки 0,5 или 1 с для интервала масс от 50 до 600 а. е. м. По окончании съемки полученные данные обрабатывались на ЭВМ с использованием различных программ библиотечного поиска и построения масс-хроматограмм. Осуществлялась также регистрация методом МИД 20 различных ионов с временем цикла 0,9 с. В табл. 3-2 приведены массы ионов, которые детектировались методом МИД при анализе ТМС-производных эстрогенных анаболитов, а также ионов внутреннего стандарта додецилгаллата. Предел обнаружения стильбенов равен $1 \cdot 10^{-7}$ %.

Количественное определение следов компонентов в биологических образцах с помощью ГХ—МС—задача достаточно сложная. Вероятно, для количественного определения одиночного соединения наилучшим является метод изотопного разбавления; при этом исследователь должен иметь в своем распоряжении дейтерированные лекарственные препараты и (или) их метаболиты с достаточно высокой изотопной чистотой. Следует отметить, что дейтерированные анаболические препараты недоступны и, с другой стороны, метод изотопного разбавления не всегда применим для анализа большого числа следовых компонентов. В этих случаях имеет смысл выбирать в качестве внутреннего стандарта соединения, характеризующиеся хорошими масс-спектральными характеристиками и удобным для анализа временем удерживания. В работе [84] в качестве внутреннего

Таблица 3-2. Характеристические ионы, используемые при анализе ТМС-производных анаболитов [84]

(В скобках указаны относительные интенсивности пиков)

	M ⁺	(M-15) ⁺	Другие ионы
Этинилэстрадиол	440 (40)	425 (100)	300 (43), 285 (62)
Диэтилстильбэстрол	412 (100)	397 (15)	383 (16)
Динэстрол	410 (90)	395 (51)	381 (15)
Гексэстрол	414 (1)	399 (2)	207 (100)
17β-Эстрадиол	416 (100)	401 (8)	285 (67)
Зеранол	538 (13)	523 (13)	433 (70), 335 (27)
Додецилгаллат	554 (100)	539 (4)	307 (37) 281 (42), 369 (15)

стандарта был выбран додецилгаллат. Пик молекулярного иона с массой 554 является наиболее интенсивным в его масс-спектре, это соединение элюируется непосредственно за последним анаболическим препаратом. В зависимости от отношения сигнал/шум количественное определение может быть осуществлено на уровне $(1-2) \cdot 10^{-6} \%$.

Было проведено сопоставление метода изотопного разбавления с методом ГС—МС ХИ [84]. Анализировались различные производные этих соединений, включая ТМС-эфиры и гептафторбутираты. Оказалось, что метод ХИ при ионизации с помощью газов-реагентов метана и изобутана уступает методу ЭУ по эффективности ионизации. Таким образом, при ЭУ ионизации могут быть достигнуты более низкие пределы обнаружения.

3.2. ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

В настоящее время практически невозможно ограничить круг веществ, представляющих фактическую или потенциальную опасность для нашей биосферы. Проблема изучения влияния различных веществ осложняется тем, что сейчас можно лишь приблизительно говорить о необходимых пределах обнаружения различных соединений. Например, порог обнаружения 2-метокси-3-изобутилпиразина по запаху равен $2 \cdot 10^{-12}$. Только лучшие образцы современного поколения масс-спектрометров могут конкурировать с обонянием человека в данном случае, тем не менее масс-спектрометрии и ХМС принадлежит сейчас главенствующая роль в этой области.

Освальд и соавт. [86] опубликовали обзор, содержащий свыше 300 ссылок и посвященный применению ХМС с электроударной и химической ионизацией для изучения окружающей среды.

Вопросы отбора образцов обсуждены Берчем и соавт. [328], которые использовали капиллярные колонки при ХМС исследовании воздуха, промышленных и городских районов; ими было идентифицировано примерно 100 компонентов, большинство которых принадлежит к классу алканов и алкилбензолов.

Монография [10] посвящена определению загрязнений в воздухе ХМС методом. Догерти [329] опубликовал обзор, рассматривающий масс-спектроскопическое определение ксенобиотических химикатов при анализе окружающей среды. Применению ГХ—МС в области промышленной гигиены посвящена работа [330].

Было проведено [86] широкое исследование потенциально опасных загрязнений окружающей среды с помощью ГХ—МС метода. При этом особое внимание обращалось на выбор характеристических масс-спектральных пиков и оптимизацию хромато-масс-спектральных параметров для обеспечения идентификации и качественного анализа. Использовался метод получения полного масс-спектра в различных точках хроматографи-

ческих пиков. Наряду с этим для каждого типа соединений получали реконструированные ионные масс-хроматограммы, построенные по выбранным характеристическим пикам. Особое внимание было уделено сопоставлению масс-спектров, полученных при ионизации ЭУ и ХИ с различными газами-реагентами.

В группе загрязнений окружающей среды, вызванных деятельностью человека, одними из наиболее важных являются хлорсодержащие углеводороды, в том числе ДДТ, его метаболиты и родственные соединения, хлорсодержащие полициклодиеновые пестициды, полихлорбифенилы, гексахлорциклогексан, гексахлорбензол, хлорированные дибензодиоксины и дибензофураны, пластификаторы, добавки к медицинским и пищевым препаратам и металлоорганические соединения.

В группе загрязнений, вызванных природными процессами, можно выделить липиды, компоненты нефти, амины и производные аминокислот, нитрозосоединения, пиперидин и пирролидин [86].

Применению ХМС метода для анализа окружающей среды посвящено множество работ, несмотря на сравнительно недавнее внедрение метода в эту область. ХМС исследованию подвергались почти все известные типы загрязнений и почти все типы объектов, связанные с развитием современной цивилизации. Авторы решили ограничиться примерами анализа двух наиболее распространенных объектов — воздуха и воды — и двух наиболее изученных типов загрязнений — полихлорсодержащих соединений и некоторых пестицидов.

Определение загрязнений в образцах воздуха. Подробные сведения о составе микропримесей атмосферного воздуха, содержащего сотни органических веществ с концентрациями порядка нескольких миллиграммов на тысячу кубометров, необходимы в связи с проблемами экологии и охраны внешней среды, но получение их представляет сложную аналитическую задачу. В этом случае ГХ—МС метод может быть применен лишь при условии предварительного концентрирования проб. Связанные с этим процедуры обычно включают экстракцию [331], конденсацию в охлаждаемых ловушках [332] или поглощение адсорбентами [333]. Каждый из этих приемов имеет свои недостатки. Так, в случае экстракции необходимо последующее концентрирование раствора, что обычно осуществляется испарением. Этот процесс может привести к потере значительного количества летучих компонентов. Концентрирование в охлаждаемых ловушках летучих органических компонентов из воздуха обычно сопровождается концентрированием водяных паров, которые мешают при последующем анализе.

Для количественного улавливания органических соединений из воздуха могут быть использованы различные адсорбенты. Однако полностью снять эти компоненты с адсорбентов часто бывает невозможно. В ряде случаев адсорбенты катализируют реакции между адсорбированными соединениями [101].

Несмотря на недостатки, присущие последнему методу, наиболее оптимальным вариантом анализа образцов воздуха представляется сочетание ХМС с эффективным предварительным аналитическим концентрированием на специальных сорбентах. И в этом случае основная трудность при концентрировании органических микропримесей для последующего ХМС анализа состоит в необходимости отделения воды, присутствующей в атмосфере в количествах, на три-четыре порядка превышающих суммарное содержание сотен органических соединений, подлежащих идентификации и количественному определению. Предварительное высушивание атмосферного воздуха до сорбции загрязнений может привести к искажению соотношения компонентов даже при использовании осушителей, обычно считающихся вполне индифферентными [334].

Раймонд и Гуночон [335, 336] применили графитизированный уголь в качестве адсорбента для улавливания большого числа органических соединений из воздуха, которые затем анализировались на хромато-масс-спектрометре. В результате удалось идентифицировать более 70 компонентов в воздухе Парижа. Эти соединения представляли собой преимущественно алифатические и ароматические углеводороды с числом атомов углерода от 8 до 18.

Эффективное концентрирование органических компонентов атмосферных загрязнений было достигнуто с помощью сорбента Тенакс GC — пористого полимера 2,4-дифенил-*n*-фениленоксида [337]. Этот сорбент гидрофобен, так что концентрирование водяных паров минимально. Патроны с сорбентом после отбора образцов могут храниться при температуре 0 °С в течение 4 недель без значительных изменений. Сорбированные соединения вводили в хроматографическую колонку путем термической десорбции. Аналитическая система для определения в атмосфере полициклических ароматических углеводородов, полихлорнафталинов и полибромбифенилов представляла собой капиллярную хроматографическую колонку SCOT, 100 м, соединенную с масс-спектрометром через стеклянный струйный сепаратор. Интерпретация данных осуществлялась методом реконструированных масс-хроматограмм и сравнением масс-спектров компонентов со спектрами библиотеки с помощью поисковой системы [337].

Эффективность другого адсорбента — полисорбимида [334] — иллюстрируется количеством летучих органических веществ, поглощенных 0,6 г этого сорбента из 10-литровой пробы воздуха, отобранной на одной из улиц Ленинграда. Перечень идентифицированных соединений включает около 60 наименований (главным образом, углеводородов нефтяного происхождения). Этими же авторами [338] в воздухе 9 крупных городов СССР было идентифицировано около 150 органических соединений, в основном нефтяных углеводородов. Обычно примерно половину из них составляют парафины, около трети — гомологи

бензола и 10—20 % — углеводороды с одной двойной связью. Для 66 наиболее характерных соединений определены концентрации (0,001—0,7 мг/м³). Одним из критериев обнаружения наиболее вероятных источников загрязнения атмосферы может служить отношение суммарного содержания ароматических углеводородов к сумме алканов, что позволяет непосредственно сопоставлять состав загрязнений, вызванных нефтепродуктами, выхлопными газами автомобильного транспорта и другими атмосферными примесями. Показано, что одним из важных источников попадания углеводородов в атмосферу является прямое испарение автомобильного топлива.

Для метана — единственного углеводорода, образующегося в природе естественным путем, — фоновые концентрации в атмосфере составляют $(1,3—1,4) \cdot 10^{-4}$ % [335]. Другие присутствующие в воздухе углеводороды образуются из различных источников, причем основными являются нефтяные и нефтеперерабатывающие заводы, химические производства, биологические процессы, сельскохозяйственное производство, сжигание древесины. Интересно отметить, что в некоторых лесных массивах в атмосферу попадают терпены, выделяемые растениями.

Концентрация углеводородов порядка 10^{-7} % относительно безвредна для млекопитающих, а это именно те пределы, которые характеризуют содержание углеводородов в атмосфере [335]. Однако было показано, что этилен в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ %, а другие углеводороды даже в меньшей концентрации, характеризуются подавляющим действием на различные виды растений. Еще более серьезную проблему представляет собой так называемый фотохимический смог, который возникает при определенных метеорологических условиях вследствие реакций оксидов азота с различными примесями в воздухе, включая углеводороды. Эти реакции приводят к образованию таких соединений, как альдегиды, пероксиацилнитраты, алкилнитраты.

Основным методом анализа, используемым для обнаружения и оценки концентрации углеводородов в воздухе, был хроматографический метод. В последнее время наряду с этим все шире применяется метод ГХ—МС. Преимущества метода ГХ—МС перед газовой хроматографией становятся очевидными в случае необходимости анализа сложных смесей высокомолекулярных углеводородов. Так, если для анализа углеводородов C₁—C₅ вполне удовлетворительны, как правило, ГХ методы, то при переходе к более сложным смесям (углеводороды C₆—C₂₀) одного этого метода явно недостаточно. Было показано [239], что высокомолекулярные углеводороды в атмосфере представлены множеством (до сотен) соединений. В этом случае метод ГХ—МС с применением высокоэффективных хроматографических колонок позволяет осуществлять анализ этих соединений на уровне нанogramмовых количеств. В результате проведенных работ [335, 339] удалось идентифицировать 108 ле-

тухих органических соединений с числом углеродных атомов от 6 до 10, принадлежащих в основном к алифатическим или ароматическим углеводородам.

На основе хромато-масс-спектрометрии были разработаны чувствительные аналитические методы количественного определения в атмосфере галогенуглеводородов на уровне концентраций 10^{-12} . Селективное ионное детектирование позволило идентифицировать 11 галогенуглеводородов: CCl_2F_2 , CH_3Cl , CCl_3F , CHCl_2F , CH_2Cl_2 , CCl_4 , CHCl_3 , $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{F}_4$, $\text{C}_2\text{Cl}_3\text{F}_3$, CH_3CCl_3 , $\text{CHCl}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ пределы обнаружения составляют $(4-20) \cdot 10^{-12}$ (по объему) [340].

Хромато-масс-спектрометрическая система состояла из газового хроматографа (модель 5700) фирмы Hewlett-Packard [колонка из нержавеющей стали ($6 \text{ м} \times 1,6 \text{ мм}$), неподвижная фаза Дюрапак (*n*-октан), газ-носитель гелий (12 мл/мин)], непосредственно соединенного с квадрупольным масс-спектрометром той же фирмы (модель 5930). Ввод всего элюента в ионный источник обеспечивает большую чувствительность по сравнению с системой, снабженной сепаратором.

ГХ—МС позволила решить проблему измерения концентрации дихлорфторметана в верхних слоях атмосферы, которая может служить показателем степени разложения трифторхлорметана, сопровождающегося изменением концентрации озона в атмосфере [341—344]. Для этого необходимо было измерить фоновое содержание дихлорфторметана и пределы изменения его концентрации в атмосфере. Эти измерения были проведены на ХМС системе, состоящей из газового хроматографа Hewlett-Packard 5710 (колонка длиной 3 м с фазой OV-101, температура 30°C , газ-носитель гелий), соединенного через молекулярный сепаратор с масс-спектрометром MM 16 С. Количественный анализ осуществляли по пикам ионов с массами 67, 69 и 102, но в большинстве случаев ввиду низкой концентрации дихлорфторметана для увеличения чувствительности регистрировалась только масс-хроматограмма по пику иона с массой 67. Внутренним стандартом служил COS. Содержание дихлорфторметана менялось в пределах от $1 \cdot 10^{-11}$ до $2,5 \cdot 10^{-10} \%$.

С помощью ИМХ в атмосферных аэрозолях и газофазных образцах были определены 60 органических примесей, представленные алифатическими и полициклическими ароматическими углеводородами и карбоновыми кислотами [345]. Хромато-масс-спектрометр, соединенный с микропроцессором, позволяет детектировать все соединения в процессе одного хроматографического разделения без участия оператора. Чувствительность метода ИМХ слишком мала для прямого обнаружения формальдегида в образцах воздуха при его концентрации менее $10^{-7} \%$. Кроме того при анализе формальдегида определенную ошибку вносят присутствующие в воздухе пары воды. Была предложена [346] чувствительная методика определения формальдегида в воздухе с помощью

ГХ—МС метода с предварительным концентрированием с помощью молекулярных сит (13X). Образец затем термически десорбируется в стеклянную хроматографическую колонку ($185 \text{ см} \times 2 \text{ мм}$), заполненную Порапаком Т ($80-100$ меш). Десорбция образца с адсорбента проводилась в течение 2 мин при температуре 240°C в токе газа-носителя (гелий высокой чистоты, скорость 20 мл/мин). Хроматографическая колонка работала в режиме программирования температуры 16°C/мин в интервале $30-150^\circ\text{C}$. Получали ионные масс-хроматограммы по пикам ионов с массами 29 и 30. Концентрация формальдегида в образце определялась по высоте пика масс-хроматограммы с помощью калибровочной кривой, полученной для стандартных растворов. Калибровочная кривая была линейной в пределах $0-50 \text{ нг}$. Уровень обнаружения равен $3 \cdot 10^{-8} \%$ при отношении сигнал/шум более 3.

Для определения альдегидов в образцах воздуха в присутствии углеводородов после их улавливания получали о-бензоил-оксимпроизводные и анализировали методом ГС—МС—ХИ (газ-реагент NH_3) [144]. Для исключения стадии предварительного концентрирования можно вводить очень малые объемы воздуха непосредственно в криогенный газовый хроматограф, соединенный с масс-спектрометром [101]. Однако в этом случае пределы обнаружения метода, основанного на получении полных масс-спектров, могут оказаться недостаточными. Метод ИМХ позволяет понизить предел обнаружения и улучшить газохроматографическое разрешение, но если состав образца неизвестен, необходимо исследование всего масс-спектра.

Метод обзорной ионной масс-хроматографии, заключающийся в многократном повторении ИМХ анализа образца с регистрацией масс-хроматограмм для разных ионов, позволил объединить эти требования. Этот метод был применен для анализа образцов воздуха на улицах Токио. Большинство идентифицированных соединений являются компонентами автомобильных выхлопных газов, однако были обнаружены также различные кислород-, галоген- и серусодержащие соединения. Концентрации бензола, толуола и ксилолов были оценены в $3,0 \cdot 10^{-6}$; $5,3 \cdot 10^{-6}$ и $4,9 \cdot 10^{-6} \%$. Определение проводили с калибровкой прибора по известным количествам эталонных соединений.

Методом ХМС были идентифицированы 20 компонентов в образцах воздуха во Франкфурте-на-Майне [347]: ацетон, нормальные алканы $\text{C}_5 - \text{C}_{11}$, моноароматические углеводороды и хлорзамещенные метаны, этилены и бензолы. В образцах, отобранных в квартирах, были идентифицированы метанол, ацетон, диэтиловый эфир, метилацетат, хлорэтилен, гексан и моноароматические углеводороды.

Предел обнаружения для бисхлорметилового эфира в образце воздуха 1 л составил $1 \cdot 10^{-7}$ по объему при детектировании иона $\text{C}_2\text{H}_4\text{OCl}^+$ с массой 78,9950 масс-спектрометром высокого разрешения.

С помощью ГМ—МС метода был проведен анализ образцов воздуха с целью выяснения причин появления «кошачьего запаха» в ряде жилых массивов Западной Голландии [348]. Для анализа использовался масс-спектрометр фирмы Varian MAT (модель СН4) с временем развертки полного диапазона масс 2 с; одновременно записывался полный ионный ток. Идентификация проводилась как по полным масс-спектрам, так и методом МИД [348]. Было показано, что основным компонентом, вызывающим «кошачий запах», является 4-меркапто-4-метилпентанон-2. В образцах воды из реки, протекающей в этом районе, обнаружены также мезитилоксид, 2,6-диметилгептанон-4,2,6-диметилгепта-2,5-диенон-4, *n*-крезол, метилбензальдегид, дифенил и дифениловый эфир.

Для детального исследования летучих органических веществ, выделяемых растениями, был применен ХМС анализ с предварительным концентрированием на гидрофобных сорбентах [349]. Концентрирование осуществляли пропуском 0,5—1 л воздуха, содержащего летучие выделения листьев растений, через стеклянные трубки 25 см × 6 мм, заполненные 0,5—0,7 г Карбохрома или Тенакса GC, со скоростью 0,25 л/мин. Десорбцию проводили при 300 °С в течение 30 мин непосредственно в стальную капиллярную колонку с динонилфталатом, начальный участок которой охлаждали жидким азотом, температуру колонки программировали со скоростью 3 °С/мин в интервале от 40 до 130 °С. Колонка через сепаратор соединялась с масс-спектрометром LKB-2091, масс-спектры получали при энергии электронов 70 эВ. Полученные масс-спектры сравнивались со спектрами каталога. При изучении состава летучих выделений листья 14 видов древесных растений обнаружено более 50 разных соединений: парафиновые и непредельные углеводороды, спирты, сложные эфиры, карбонильные соединения, фуран и его производные, большое число монотерпеновых углеводородов и их производных. Общим для всех растений является выделение изопрена и ацетона.

В последнее время уделяется большое внимание определению в различных объектах полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), обладающих канцерогенной активностью. В течение ряда лет качественный и количественный анализ ПАУ осуществлялся с помощью различных методов, в основном хроматографических. Впоследствии основным методом анализа ПАУ в воздухе, в конденсатах сигаретного дыма и продуктах горения синтетических и природных материалов стал метод ХМС [350]. Полициклические ароматические углеводороды, образующиеся при сжигании угля, дерева и керосина, идентифицировались с помощью капиллярной ХМС и сравнивались с ПАУ, обнаруженными в образцах воздуха [351]. В работе [352] образцы воздуха анализировались с помощью комплекса методов: ГХ, ГХ—МС, ЖХ—УФ; большая часть работы проделана с помощью ГХ—МС метода; исследовались предваритель-

но хроматографически разделенные фракции. Работа проводилась на хромато-масс-спектрометре фирмы Finnigan (модель 4000) с системой обработки данных Incos 2300. Ионизация осуществлялась электронами с энергией 70 эВ, развертка в интервале 50—400 а. е. м. через каждые 2 с, стеклянная капиллярная колонка (30 м × 0,3 мм), заполненная SF-96, соединялась с масс-спектрометром через струйный сепаратор; газ-носитель гелий.

Идентификация осуществлялась по пикам молекулярных ионов, которые в спектрах ПАУ очень интенсивны. Пики наиболее интенсивных осколочных ионов выдавались системой обработки данных после вычитания фона и возможных наложений. Полученные таким образом масс-спектры сопоставлялись с библиотечными эталонными спектрами. В образцах воздуха, отобранных в 14 районах США, было обнаружено свыше трех десятков ПАУ. Во всех образцах были обнаружены фенантрен, флуорантен, пирен, трифенилен, хризен, бенз[а]антрацен, бенз[*j*]флуорантен, бенз[*e*]пирен, бенз[*b*]флуорантен, бенз[*k*]флуорантен, бенз[*a*]пирен, дибенз[*a, h*]антрацен, бенз[*g, h, i*]перилен, индено(1,2,3-[*e, d*])пирен, коронен.

Применение ГХ—МС—ЭВМ системы позволило идентифицировать в образцах воздуха, отобранных в производственных помещениях коксового и алюминиевого заводов, 114 индивидуальных ПАУ [353]. Использовался хроматограф фирмы Carlo Erba Fractovar 2101 (капиллярная колонка 50 м × 0,34 мм SE-54), соединенный (непосредственный ввод) с масс-спектрометром Varian MAT 112. Масс-спектры регистрировались в циклическом режиме (массы 50—500, 1 с/декада); спектры (2500 при каждом анализе) хранились на магнитных дисках. Из 114 соединений, идентифицированных в образцах, только 30 были ранее установлены с помощью ГХ метода. Предельный уровень обнаружения составляет $5 \cdot 10^{-5}$ % в конечном экстракте. Этим методом удалось отдельно определить большое число изомеров (например, бенз[*a*]флуорен и бенз[*b*]флуорен, бенз[*e*]пирен и бенз[*a*]пирен). Наряду с углеводородами идентифицированы азотсодержащие соединения (хинолин, бензхинолин, акридин, фенантридин, карбазол, бензкарбазол, бензфенантридин и алкилзамещенные этих соединений), серусодержащие (дибензтиофен, бензтиофен) и кислородсодержащие (дибензофуран, метоксифлуорен, фенилбензальдегид, бензатрон).

В работе [350] этот анализ проводили с помощью ГХ—МС системы, состоящей из газового хроматографа HP 5170A, соединенного с помощью интерфейса (силиконовая мембрана) с масс-спектрометром HP 5930A и системой обработки данных HP 5933A. Для предварительного разделения применяли жидкостную хроматографию высокого давления. Масс-спектры, получаемые в процессе опыта, регистрировались на магнитных дисках, по ним затем строили масс-хроматограммы по ПИТ и отдельным пикам, а также масс-спектры каждого отдельного

хроматографического пика после вычитания фона и вклада других пиков. Эти масс-спектры сравнивались со спектрами каталога для идентификации компонентов смеси. Количественный анализ осуществлялся стандартными хроматографическими методами. С помощью этой системы анализировались образцы, полученные при сжигании образцов поливинилхлорида. Метод достаточно прост, точен, и, по сравнению с другими известными методами, обладает большей производительностью.

Идентификация следовых соединений в воде. В настоящее время придается большое значение изучению природных и синтетических органических соединений в водах, особенно в питьевых [354]. Решение этой проблемы во многом облегчается благодаря применению ГХ—МС метода для разделения и идентификации компонентов весьма сложных смесей. Шейкельфорд и Кейт [355] в 1976 г., используя ГХ—МС метод, идентифицировали сотни соединений на уровне концентраций 10^{-5} % и меньше, и список этих соединений непрерывно пополняется. Обзор ГХ—МС методов определения углеводов в воде приведен в работе [356]. Эти методы, реализуемые на хромато-масс-спектрометрах с эффективными капиллярными колонками и системами обработки данных на базе ЭВМ, позволяющими выделять ионные масс-хроматограммы и масс-спектры компонентов на фоне шумов и реализовать различные алгоритмы библиотечного поиска и идентификации соединений, обеспечивают определение летучих соединений в образцах природной и питьевой воды на уровне концентраций менее 1 мкг в 1 л воды. Методы количественного определения основаны, как правило, на многоионном детектировании и получении масс-хроматограмм по полному ионному току и отдельным пикам, а также на использовании внутренних стандартов. С помощью ХМС достигается предел обнаружения углеводов в образцах воды 1 нг/л для каждого соединения.

Кейт и сотр. [356] исследовали состав органических веществ в образцах питьевой воды в 13 городах США, используя ГХ—МС с набивными и капиллярными колонками, методы химической ионизации, а также масс-спектрометрию высокого разрешения.

Образцы готовили следующим образом: фильтрация 1 л воды через уголь, экстракция хлороформом, концентрирование до 1 мкл. Было идентифицировано 109 различных соединений, в том числе пестициды, гербициды, алифатические и ароматические углеводороды, галогенсодержащие алифатические углеводороды, хлорзамещенные ароматические соединения, пластификаторы.

Органические соединения, идентифицированные в питьевой воде многих городов, определялись большей частью путем анализа выборочных образцов в различное время года. Сафферт и соавт. [357], используя ХМС, провели систематическое исследование примесей органических соединений в питьевой воде в

районе города Филадельфия в образцах, отобранных за период с февраля 1975 г. по январь 1977 г. Исследовались неполярные органические соединения, выкипающие в пределах 35—440 °С. Предварительно выделяли пять общих классов соединений, которые анализировали с помощью ГХ—МС метода. Качественный анализ проводили путем сопоставления времен удерживания исследуемых соединений и их масс-спектров с соответствующими параметрами эталонных соединений. Установлено присутствие 146 органических соединений: галогенсодержащие углеводороды, ароматические соединения, алифатические соединения, эфиры фталевых кислот и другие типы соединений, включающие алкены, спирты, фосфаты и т. д. Концентрация большинства органических соединений ниже 1 мкг/л.

Незначительные количества органических соединений могут быть причиной неприятного запаха и вкуса воды; и, кроме того, эти загрязнители потенциально токсичны. Работа [358] включала разработку метода количественного улавливания следовых количеств органических соединений на сорбенте с последующей селективной десорбцией с помощью соответствующих элюентов. Этим методом были идентифицированы органические соединения, экстрагированные из колодезной воды. Идентификация большинства примесей, основанная на масс-спектральных данных, была подтверждена данными других методов: ГХ, УФ-, ИК-, ПМР-спектроскопии, а также масс-спектрами эталонных образцов. В работе использован хромато-масс-спектрометр фирмы Perkin—Elmer [270]. В образцах воды на уровне 10^{-7} — 10^{-4} % были идентифицированы аценафтилен, 1-метилнафталин, метилиден (2 изомера), инден, аценафтен, бензтиофен, изопропилбензол, этилбензол, нафталин, 2,3-дигидроинден, алкилзамещенные бензолы, бензтиофены, нафталины.

Для определения низких концентраций пентахлорфенола в воде был предложен масс-спектрометрический метод изотопного разбавления с использованием в качестве эталона меченого по кислороду пентахлорфенола [359]. Известное количество меченого соединения добавляли к измеренному объему воды, затем экстрагировали меченое и немеченое соединения. Эфирные производные анализируемых веществ получали, действуя на экстракт избытком эфирного раствора диазометана. Количество пентахлорфенола определялось методом ХМС путем измерения интенсивностей пиков ионов в интервале масс 278—290. Предел обнаружения равен $2 \cdot 10^{-9}$ г, относительное стандартное отклонение 8 %. Авторы считают, что этот метод более надежен, чем другие методы, в частности, известный метод определения пентахлорфенола в воде с помощью метода СИД по пику ионов с массой 280. Анализ проводили на хроматографе фирмы Varian Aerograf, модель 2740 (колонка из нержавеющей стали, 1,5 м × 3 мм, 3 % Дексил-300 на Хромосорбе WAW; температура инжектора, колонки, детектора и сепаратора соответственно 235, 210, 235 и 250 °С; газ-носитель гелий, 30 мл/мин) и

масс-спектрометре фирмы Du Pont 21-490 G (энергия ионизирующих электронов 70 эВ, температура ионного источника 250 °С).

С помощью хромато-масс-спектрометра LKB-2091 с системой обработки данных LKB-2130 был идентифицирован ряд токсичных веществ в воде [360]. Хроматографическое разделение в течение первых 5 мин проводили при комнатной температуре, затем температуру колонки программировали со скоростью 5 °С/мин до 150 °С. Продолжительность хроматографического анализа 30—35 мин. Масс-спектры, по которым идентифицировали обнаруженные вещества, получали при следующих условиях: ионизирующее напряжение в момент записи хроматограммы 20 эВ, в момент съемки спектра 70 эВ, ускоряющее напряжение 350 В; температура ионного источника и сепаратора соответственно 270 и 200 °С; данные записывали на магнитные диски системы обработки данных LKB-2130. По окончании хроматографического разделения из массива записанных масс-спектров (более 2000) формировали реконструированную хроматограмму, по которой идентифицировали вещества. Для идентификации использовали библиотеку масс-спектров и данные о хроматографических параметрах удерживания. По показателям интенсивности максимальных ионов и по относительной эффективности ионизации определяли количества извлеченных веществ и их концентрации в воде. С помощью разработанной методики в водопроводной воде были идентифицированы галогенсодержащие соединения, ароматические углеводороды, альдегиды, кетоны, спирты, эфиры, терпены, предельные углеводороды (всего более 70 веществ).

Методом ГХ—МС—ЭВМ определяли содержание гербицида оксадиазона в природных поверхностных водах и в водопроводной питьевой воде некоторых районов Японии [361], анализируя гексановые экстракты образцов воды.

Для количественного определения в воде растворенных примесей винилхлорида (на уровне концентраций 10^{-7} %) образец воды вводили непосредственно в хромато-масс-спектрометр без предварительного разделения. Анализ проводили методом ИМХ, что обеспечило максимальную чувствительность и специфичность детектирования. Для достижения низкого предела обнаружения вводили большое количество образца (1000 мкл) с помощью шприца [362]. Вода удалялась при пропуске образца через предварительную колонку (10 % глицерина на Хромосорбе GWAW, 60—80 меш). Основная колонка (6 м × 2 мм, SE-30 на Хромосорбе WAW DMCS, 60—80 меш) соединялась с квадрупольным масс-спектрометром Finnigan (модель 3300) через стеклянный диффузионный сепаратор.

Винилхлорид идентифицировали по ионным масс-хроматограммам, регистрируемым для характеристических ионов $\text{C}_2\text{H}^{35}\text{Cl}=\text{CH}_2^+$ и $\text{C}_2\text{H}^{37}\text{Cl}=\text{CH}_2^+$ с массами 62 и 64 и соотношением интенсивностей 3:1. Проверка соотношения интенсивностей этих пиков позволяла установить отсутствие наложения.

Количественный анализ проводили по площадям хроматографических пиков на масс-хроматограммах [162].

Для образца воды 1000 мкл при количественном определении по пику иона с массой 62 наименьшая определяемая концентрация винилхлорида равна $1 \cdot 10^{-8}$ % (отношение сигнал/шум 15:1). Калибровочная зависимость для площади хроматографического пика линейна в пределах от $1 \cdot 10^{-8}$ % до $1 \cdot 10^{-5}$ % винилхлорида, относительное среднее квадратичное отклонение при анализе образцов с концентрациями винилхлорида $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ % равно 12, 6 и 6 % соответственно.

При анализе этим методом водопроводной воды в пяти районах Токио винилхлорид не был обнаружен ни в одном из образцов. В образце речной воды было обнаружено менее $1 \cdot 10^{-8}$ % винилхлорида.

Для определения в питьевой воде органических примесей успешно использовался также метод ЖХ-МС, в частности, при количественном анализе пестицида ротенона, применяемого для контроля размножения рыб. По имеющимся в литературе данным все обычные методы анализа этого пестицида имеют ограниченную область применения либо связаны с трудоемкими операциями получения производных. Метод ЖХ—МС—ХИ обеспечивает быстрое, селективное и количественное определение ротенона. Одновременно можно анализировать и другие ротеноиды — дегуелин и эллиптон. С помощью этого метода можно определять нанограммовые количества ротенона по пику иона $(M+1)^+$ с массой 395 [362].

При исследовании хлороформенного экстракта из питьевой воды (Новый Орлеан) в нем были идентифицированы атразин и два фталата [362]. Для идентификации использовались молекулярные и осколочные ионы, образованные при ионизации ЭУ. Для образца сточных вод спектры ХИ получали, используя элюент в качестве газа-реагента. Были определены следующие компоненты: *o*-крезол, диметилфенолы, хлорметилфенолы, триметилфенолы и фенантрен.

Наряду с анализом питьевой воды ХМС метод широко применяется и при определении органических микропримесей в реках, озерах и различных образцах промышленных вод.

В образцах воды из реки Томагава Ривер (Япония) с помощью ХМС были идентифицированы различные органические соединения (алифатические и ароматические углеводороды, жирные кислоты, фталаты и другие) [363]. В промышленных водах идентифицированы загрязнения, возникшие в результате вымывания из полимерных труб пластификаторов и других компонентов полимерных материалов [364].

Метод ХМС, включающий разделение на стеклянных капиллярных колонках и анализ с помощью МСВР, был применен для исследования сложных смесей органических соединений, выделенных из вторичных вод водоочистительных сооружений.

а также образцов воды, отобранных на различных стадиях очистки сточных вод в нефтяной промышленности [347]. Благодаря возможности точного измерения масс удалось идентифицировать большую часть компонентов (насыщенные жирные кислоты, нормальные алканы, алкилбензолы и другие ароматические углеводороды), а также изучить влияние хлорирования на органические компоненты сточных вод.

Хайтс и Биман [365] применили ГХ—МС для качественного анализа органических загрязнений в образцах воды, отобранной в бассейне реки Чарлз Ривер (Бостон). Использовались селективное ионное детектирование, а также анализ полных или частичных масс-спектров элюатов.

По масс-хроматограмме пиков ионов с массой 99 ($C_7H_{15}^+$) идентифицировались алканы путем анализа полных масс-спектров, зарегистрированных на вершинах хроматографических пиков. Масс-хроматограммы, зарегистрированные по другим характеристическим ионам, служили для идентификации других классов соединений. В исследованных образцах были найдены *n*-алканы C_{15} — C_{31} , алкилнафталины, алкилантрацены или фенантроны, пирен, флуорантен, различные фталаты. Концентрации этих соединений находились в пределах от $5 \cdot 10^{-9}$ % для пирена до $1 \cdot 10^{-7}$ % для фталатов. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что источники загрязнений воды в речном бассейне имеют как природное, так и промышленное происхождение (предприятия нефтехимического синтеза, нефтеперерабатывающие заводы, автомобильные выхлопные газы).

Ингредиентом многих пестицидов является кептон (дека-хлороктагидро-1,3,4-метено-2*H*-циклобута [*c, d*(*g*)]пентален-2-он). В последнее время этот один из часто встречающихся компонентов загрязнений окружающей среды является предметом детальных исследований. Среди методов идентификации и количественного анализа кепона в последнее время важное место заняла хромато-масс-спектрометрия. Де Леон и соавт. [366] применили для анализа кепона в природных водах ГХ высокого разрешения в сочетании с МС. Образцы экстрактов воды, где обнаруживалось присутствие хлорсодержащих соединений с временем удерживания близки к кепону, передавались в дальнейшем на ГХ-МС анализ для подтверждения наличия или отсутствия и оценки его количества. Анализ проводили на ХМС системах Du Pont 21-491 либо Varian MAT 311A. Стеклоянная капиллярная колонка высокого разрешения с фазой SE-52 (метилфенилсиликон) работала при программировании температуры в интервале от 130 до 240 °С со скоростью нагрева 8 °С/мин, газ-носитель гелий (2 мл/мин). Масс-спектр записывался непрерывно в режиме циклической развертки в интервале масс от 200 до 600. Масс-спектральные данные регистрировались на магнитных дисках. Обработка данных проводилась на компьютере HP-5982A. Авторы пока-

зали, что только применение метода ГХ—МС позволило надежно установить присутствие в воде кепона, тогда как метод ГХ не давал точных результатов. Было показано также, что экстракция кепона при содержании его на уровне нескольких нанogramмов в 1 л воды требует весьма тщательного подбора растворителей. При применении набивных колонок возможны нежелательные превращения кепона во время разделения. Этот метод позволяет надежно определять кепон в окружающей среде на уровне ниже 10^{-12} .

Этилацетатные экстракты образцов речной воды, осадков, бытовых и промышленных сбросов в районе Токио анализировались на присутствие сквалана ГХ—МС методами, включающими предварительное разделение на колонках с силикагелем. Сквалан идентифицирован во всех образцах. Идентификацию осуществляли сопоставлением времени удерживания и масс-спектра определяемого компонента с эталоном. Количественное определение проводилось по высоте пика в ионной масс-хроматограмме. Согласно результатам этого исследования, сквалан является основным компонентом углеводородной фракции, его концентрация в исследованных образцах воды составляет от 0,46 до 1,7 мкг/л в зависимости от места отбора проб. В образцах речных осадков концентрация сквалана составляла 0,86—15 мкг/г. Было показано, что наличие сквалана в воде и осадках связано не с природными факторами, а с человеческой деятельностью [367].

Одним из компонентов загрязнений окружающей среды являются алкилбензолсульфонаты, входящие в состав синтетических моющих средств. ГХ-МС использовали для установления присутствия линейных алкилбензолсульфонатов в образцах природных вод [368]. Было показано, что содержание этих соединений в воде составляет от $4 \cdot 10^{-6}$ до $8,6 \cdot 10^{-4}$ % в зависимости от места отбора проб (река, устья, заливы).

Полигалоидные соединения и некоторые пестициды. Среди загрязнений, появление которых обусловлено воздействием человека на природу, прежде всего следует назвать хлорированные углеводороды, представителями которых являются ДДТ и его метаболиты. ДДТ — один из «старейших» хлоруглеводородных пестицидов, который до сих пор еще используется в некоторых странах, а его дегидрохлорированный продукт (ДДЕ) в 70-х годах считался наиболее распространенным хлоруглеводородом, встречающимся в окружающей среде. Весьма важной группой загрязнений являются также полихлорированные дифенилы.

Анализ полихлорированных дифенилов (ПХД) раньше чаще всего осуществлялся методом ГХ с электроннозахватным детектированием. Однако этот высокочувствительный метод детектирования не позволяет достаточно надежно идентифицировать разделенные соединения, так как при анализе сложных смесей, какими являются образцы окружающей среды, одних

только времен удерживания явно недостаточно для идентификации.

Метод ГХ—МС с отрицательной химической ионизацией был применен для быстрой предварительной оценки, или скрининга, токсичных остатков, образующихся при применении хлорированных ароматических пестицидов [369]. При использовании кислорода в качестве газа-реагента этот метод обеспечивает надежное и чувствительное определение дибензо-*п*-диоксинов.

Тиндал и Уинигер [370] с помощью системы ГХ—МС—ЭВМ осуществили качественное и количественное определение индивидуальных ПХД в смесях. Этот метод пригоден также и для скрининга образцов окружающей среды на присутствие ПХД. Метод основан на использовании групп пиков молекулярных ионов на масс-хроматограммах, отвечающих отдельным группам ПХД. Индивидуальные ПХД в каждой группе определяют по соотношению интенсивностей пиков молекулярных ионов в заданном интервале времен удерживания, а концентрации компонентов — по площади соответствующих хроматографических пиков на масс-хроматограммах. Применение внутреннего стандарта повышает точность анализа. Метод позволяет определить индивидуальные ПХД в концентрациях 10—200 мкг/л.

Метод МС—ОХИ был применен Хэссом и соавт. [371] для количественного определения диоксинов в биологических образцах. Очень высокая чувствительность была достигнута при работе с газом-реагентом метаном. Добавление к метану кислорода, практически не снижая чувствительности, увеличивает фрагментацию и резко повышает структурную информативность масс-спектров; в случае лишь одного кислорода чувствительность определения снижается.

Еще одним путем увеличения селективности определения хлорированных ароматических соединений является применение ионного источника с ионизацией при атмосферном давлении. Было показано, что эти соединения эффективно ионизируются в присутствии азота, содержащего $5 \cdot 10^{-5}$ % кислорода [369]. При этом хлорбензолы и *о*-дихлорбензолы образуют только хлорид-ионы, тогда как бензолы с более высокой степенью хлорирования образуют феноксид-ионы. По пикам этих ионов методом селективного ионного детектирования удалось осуществить определение 2,3,4,5,6-пентахлордифенила на уровне ниже пикограммов.

Рассмотренные работы свидетельствуют о том, что метод ХИ—МС—ОИ является чрезвычайно перспективным для анализа объектов окружающей среды, особенно для обнаружения и идентификации на пикограммовом уровне хлорированных ароматических углеводородов. Развитию этого метода для анализа ПХД и сопоставлению различных его модификаций была посвящена работа Кроу и соавт. [369]. Они получали масс-

спектры положительной и отрицательной химической ионизации при использовании разных газов-реагентов: метана — для положительной ХИ; метана, смеси метана с дихлорметаном и смеси метана с кислородом — для отрицательной ХИ. В последнем случае чувствительность была более высокой (в 10—50 раз) по сравнению с методом ХИ положительных ионов, а селективность масс-спектров наибольшей по сравнению со всеми другими методами.

Все рассмотренные выше методы были использованы при анализе двух представительных смесей ПХД — стандартных образцов Арохлор 1242 и Арохлор 1268. В колонку вводили около 50 нг образца, что составляет, в расчете на 20 хроматографических пиков, примерно 2,5 нг на каждый пик. При анализе Арохлора 1242 было получено 35 хроматографических пиков, а при анализе Арохлора 1268 — 18 пиков. Было показано, что чувствительность метода в случае положительных ионов резко падает с увеличением числа атомов хлора в молекуле; в этом случае пентахлор- и гексахлор-изомеры не обнаруживаются в Арохлоре 1242. ХИ с отрицательными ионами (газ-носитель метан с примесью кислорода) резко повышает чувствительность (до 100 раз) и позволяет регистрировать пентахлор- и гексахлор-изомеры, не детектируемые методом МС—ХИ положительных ионов (газ-носитель бутан).

Было отмечено, что в последнем случае вид масс-спектров меняется с изменением числа атомов хлора в ПХД. Так, для трихлордифенила максимальным является пик ионов Cl^- , образованных при диссоциативном электронном захвате; образуется также малоинтенсивный пик (10 %) ионов $(\text{M}-\text{H})^-$. С увеличением числа атомов хлора в молекуле возрастает вероятность появления ионов, образованных за счет обмена хлора на кислород (фенольные анионы). Так, для иона хлордифенила максимальный пик отвечает иону $(\text{M}-19)^-$, а пик ионов Cl^- равен 50 % от максимального.

Этот же метод является, как показывают экспериментальные данные, наиболее выигрышным для анализа так называемых «хлоралкенов 12» и 1,2,3,4-тетрахлордибензо-*п*-диоксинов [369].

Таким образом, сопоставление различных методов ХИ показывает, что для анализа нанограммовых количеств ПХБ, ПХД и диоксинов наиболее чувствительным и информативным методом определения является метод МС—ОХИ (CH_3/O_2).

Для анализа полихлорированных нафталинов, используемых в качестве присадок к моторным топливам, их концентрировали на пенополиуретане, который предварительно тщательно очищали многократной экстракцией, чтобы уменьшить уровень фона. Анализ проводили на колонке (180 см \times 3 мм) с 2 % OV-101 при программировании температуры от 150 до 220 °C со скоростью 8 °C/мин. Масс-спектрометр работал в режиме

МИД на 9 каналах, настроенных на ионы каждого кластера молекулярных ионов.

Бромнафталины (1—5 атомов Вг), используемые как огнезащитные добавки для полимеров, тканей и других материалов, анализировались методом ГХ—МС. Смесь разделяли на набивной колонке (0,5 м × 3 мм) с 2 % OV-101, температура 150—300 °С, скорость нагрева 12 °С/мин, выдержка при 300 °С до полного элюирования всех компонентов. Использовался метод МИД с внешним стандартом — октахлорнафталином. Полибромнафталины Вг₆—Вг₁₀ анализировались на той же колонке, но при меньшей скорости гелия и при программировании температуры от 220 до 300 °С со скоростью 12 °С/мин. Общее количество бромнафталинов в атмосфере не превышало 860 мкг/мл, при этом преобладали более высокобромированные соединения. В более концентрированных образцах методом ГХ—МС были обнаружены также полибромированные дифениловые эфиры и другие бромированные ароматические соединения. Этим методом были изучены также образцы почв, воды, воздуха, тканей и осадков.

Анализ полихлорированных ароматических углеводов, хлорированных дибензо-*n*-диоксинов в рамках скрининга осуществлялся с помощью метода ЖХ—МС [356].

Масс-спектрометрия уже достаточно давно используется для идентификации пестицидов и остатков пестицидов, причем метод ХМС постепенно вытесняет остальные масс-спектральные методы. В подавляющем большинстве случаев используется ХМС—ЭУ—ПИ, однако все большее применение начинают приобретать методы ХМС—ХИ и ХМС—ЭУ—ОИ. Последний имеет ряд преимуществ по сравнению с ХМС—ЭУ—ПИ при анализе хлорсодержащих пестицидов [372].

Хлорфеноксигербициды были обнаружены в воздухе с помощью ХМС—ЭУ—ПИ метода при детектировании методом СИД. Этим же методом были проанализированы остатки карбофурана и его метаболитов в зерне [373]. Гербицид паракват был количественно определен в крови человека. Остатки фосфорорганических пестицидов в пищевых продуктах анализировали методом ХМС (набивные колонки) с пределом обнаружения 10⁻⁷ %. Детектирование этих пестицидов в крови и моче сельскохозяйственных рабочих было осуществлено методом СИД [208].

Метод ИМХ был использован для анализа ряда фосфорорганических инсектицидов [83]. Установка состояла из масс-спектрометра фирмы Du Pont (модель 21-490), соединенного с газовым хроматографом фирмы Varian 27-40 с помощью стеклянного струйного сепаратора. Стеклянная колонка (1,3 м × 3 мм) с 3 % Дексил GC-300 на Анахром ABS (80—90 меш); газ-носитель гелий (30 мл/мин); температура инжектора 245 °С; молекулярного сепаратора 250 °С; ионного источника 290 °С; энергия электронов 70 эВ; температура колонки 140, 200,

210 и 225 °С. Была разработана методика количественного определения диазинона, сумитиона, мелатиона на нанограммовом уровне.

Было проведено исследование 23 фосфорорганических инсектицидов ХМС методом при выдерживании температуры в течение 4 мин при 120 °С и последующем ее повышении до 220 °С со скоростью 4 °С/мин; капиллярная колонка (20 м × 0,3 мм), SE-54; температура испарителя 235 °С; скорость гелия 2,8 мл/мин, давление атмосферное, химическая ионизация, газы-реагенты изобутан, метан и метиловый спирт [374].

При исследовании гомогенизированных тканей бакланов, найденных мертвыми в поле, были получены данные, указывающие на присутствие гексахлорбензола, октахлорстирола, *n,n'*-ДДЭ и гептахлордифенила. Пестициды и их метаболиты, а также полихлордифенильные соединения часто обнаруживаются в объектах окружающей среды, однако присутствие октахлорстирола является неожиданным фактом [149].

Количественный анализ хлорсодержащих пестицидов и полихлордифенилов выполнен на хромато-масс-спектрометре фирмы Ribermag модель R1010, связанном с компьютером SIDAR; капиллярная колонка типа WCOT CP-STL (25 м × 0,25 мм), газ-носитель гелий (давление 0,09 Па); программирование температуры в интервале 180—210 °С, температура инжектора 260 °С; масс-спектрометр с ЭУ ионизацией, энергия ионизирующих электронов 70 эВ; запись масс-спектра со скоростью 1 мс/а. е. м.; интервал массовых чисел 40—400, регистрация по методу МИД 200 мс/ион [375].

Были получены также калибровочные кривые для количественного определения пестицидов в растворах с концентрацией от 5 до 200 пг/мкл; внутренний стандарт — альдрин или эндрин. Предложенная методика позволяет анализировать пента- и гексахлорбензол, гептахлорпероксид, диэльдрин, ДДД, ДДЕ, арохлор 1254 и другие пестициды этого типа.

Применение метода ЖХ-МС в сочетании с ГХ—МС и различными методами ионизации (ЭУ, положительная и отрицательная ХИ, полевая десорбция) расширило представления о структуре продуктов метаболизма пестицидов [376]. По этой методике изучались продукты метаболизма в растениях и животных одного из карбаматных гербицидов — хлорофамы. Экстракты из растений и мочи животных исследовались методом ПД, а затем ЖХ—МС. В результате для большого числа метаболитов удалось установить структуры, которые были подтверждены встречным синтезом.

Количественное определение пестицида карбофурана (2,3-дигидро-2,2-диметил-7-бензофуранилметилкарбаминат) было выполнено методом ГХ—МС—ЭУ. Разделение проводили на стеклянной силанизированной колонке (1,22 м × 2 мм), заполненной Тенаксом, скорость газа-носителя (гелий) 20 мл/мин; температура инжектора 260 °С.

Широко используемые пестициды карбаматного типа термически лабильны и не всегда могут быть проанализированы с помощью ГХ—МС. Методом ЖХ—МС при использовании интерфейса с движущимся транспортером был исследован метаболизм хлорпропама в тканях крыс и в растениях риса [376]; получали масс-спектры при электроноударной и химической ионизации.

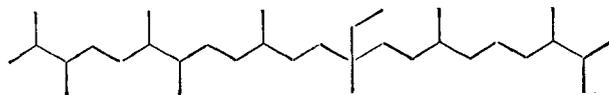
3.3. ОРГАНИЧЕСКАЯ ГЕОХИМИЯ И НЕФТЕХИМИЯ

Хромато-масс-спектрометрия в последнее время приобрела большое значение в органической геохимии. Этот метод используется для определения состава органического вещества осадков и его изменения под влиянием различных факторов: биологической активности, катализируемых минералами молекулярных превращений, температуры и давления. Состав органического вещества осадков часто может служить показателем условий седиментации.

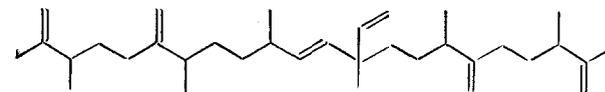
В анализе геохимических объектов ГХ—МС получила значительно большее распространение, чем обычные аналитические методы молекулярной масс-спектрометрии. Это объясняется тем, что этот метод позволяет определять индивидуальные соединения вплоть до стереоизомеров. Эти данные, особенно для некоторых соединений, являющихся биологическими метками, имеют особую важность, так как дают представление о происхождении и превращениях органического материала в процессе осадкообразования, а также о его последующих трансформациях.

Биологические метки в нефтях являются предметом тщательного анализа в геохимии нефти, поскольку они могут рассматриваться как показатели происхождения, миграции и созревания нефтей. Обычными биологическими метками служат *n*-алканы, изопреноидные алканы, например пристан и фитан, а также полициклические стерановые и тритерпановые углеводороды [377].

Кроме обычных изопреноидных алканов, которые, как считается, сохраняют черты строения исходных биологических веществ, в ряде нефтей Восточной Сибири с помощью ГХ—МС обнаружены новые реликтовые алканы [378]. Все они представляют собой монометилзамещенные алканы, причем каждый хроматографический пик представлен практически эквимолярной смесью изомеров двух гомологических рядов 11- и 12-метилзамещенных алканов C₁₉—C₃₀. В работе [377] описан еще один характеристический углеводород — ботриококкан



характеризуемый ионами с массами 450 (M⁺), 294, 238, образующимися при расщеплении цепи у четвертичного атома углерода. Этот углеводород обнаружен в значительном количестве в некоторых нефтях на Суматре (0,9 и 1,4 %) [377]. Биологический предшественник ботриококкана — ботриококкен



найден в водорослях свежих и «стареющих» вод *Botryococcus braunii*. Высокая концентрация ботриококкана в нефтях может служить показателем того, что это соединение образуется в основном из органического материала вод.

Методом ГХ—МС были изучены состав и структура стеранов и тритерпанов нефтей различных месторождений Советского Союза. Было показано, что представителями основных тритерпанов нефтей являются углеводороды ряда гопана C₂₇—C₃₅ [379]. Гопаны, выделенные из природных соединений, характеризуются *транс*-сочленением всех колец. В отличие от природных гопанов, соединения этого типа, встречающиеся в рассеянном органическом веществе и в ископаемых топливах, часто имеют стереохимически преобразованную структуру: *транс*-сочленение колец A/B, B/C, C/D, но *цис*-сочленение колец D/E (конфигурация 17 α H, 21 β H — так называемые «нефтяные» гопаны). Вид конфигурации легко устанавливается по масс-спектрам: относительная интенсивность пиков ионов, образующихся из двух фрагментов молекулы при ее расщеплении по кольцу C, зависит от конфигурации. Аналогично нефтяные стераны имеют *транс*-сочленение циклов A/B и *цис*-сочленение циклов C/D. Таким образом, стереохимические особенности соединений ряда гопана и стерана могут служить для оценки степени катагенетической преобразованности органического вещества осадков и ископаемых топлив.

Методом ХМС с регистрацией масс-спектров в максимуме хроматографических пиков были идентифицированы во фракции, выделенной из нефти Анастасьевско-Троицкого месторождения, два сесквитерпановых бициклических углеводорода C₁₅H₂₈ (суммарная концентрация этих углеводородов в нефти достигает 0,9 %) [380]. В сочетании с данными ЯМР ¹³C была установлена структура этих соединений — *транс*-2,3,3,7,7-пентаметил-*транс*-бицикло[4.4.0]декан и 3,2,2,7,7-пентаметил-*транс*-бицикло[4.4.0]декан. Анализ проводили на приборе ЛКВ 2091 с капиллярной колонкой (неподвижная фаза Апиэзон L). Масс-спектры получали при энергии электронов 70 эВ и температуре ионного источника 250 °С.

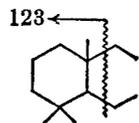
В нафтенной нефти месторождения Грязевая сопка методом ГХ—МС были идентифицированы трицикло[6.3.0.0^{1,5}]-, трицикло[5.3.1.0^{1,5}]- и трицикло[5.3.1.0^{3,8}]ундеканы; трицикло-

[6.3.1.0^{1,5}]-, трицикло[6.3.1.0^{1,6}]-, трицикло[7.2.1.0^{1,6}]- и трицикло[5.3.1.1^{4,11}]додеканы, тетрацикло[6.3.1.0^{2,6}0^{5,10}]додекан и его метильные гомологи, тетрацикло[6.3.1.1^{6,10}0^{2,6}]тридекан [381].

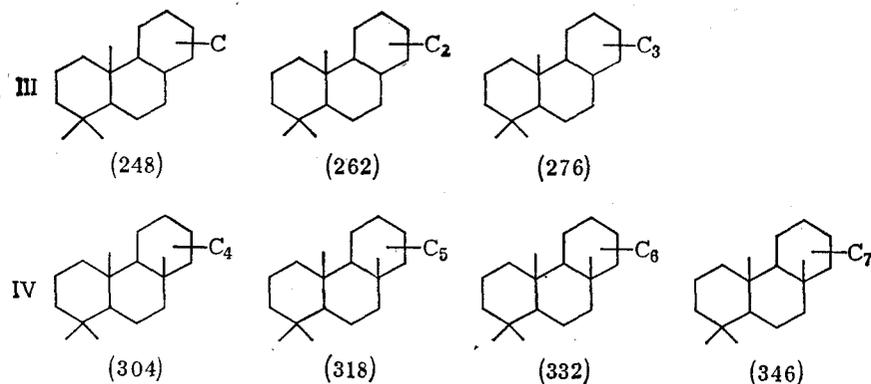
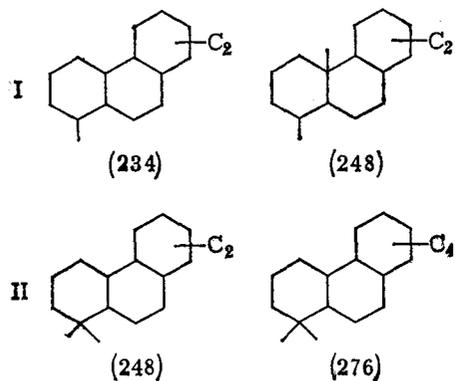
С помощью ГХ—МС был проведен анализ насыщенной фракции третичной нефти, образовавшейся преимущественно из континентального органического вещества, с целью поиска специфических соединений, которые могли бы быть использованы в качестве индикатора континентального происхождения нефти [382]. Использовалась капиллярная колонка из плавленого кварца 60 м × 0,25 мм (SE-54), присоединенная непосредственно к масс-спектрометру Kratos MS-25. Температура колонки программировалась в интервале 40 до 300 °С (4°/мин), сканирование осуществлялось со скоростью 1 с/декада, масс-спектры получали при ионизации электронами с энергией 35 эВ.

Предполагалось, что бициклические углеводороды, которые могли бы служить биологическими метками, наиболее вероятно, являются продуктами циклизации терпенов или термических превращений высших терпанов, образованных первоначально в результате ферментативной деструкции пента- и тетрациклических терпанов.

Для обнаружения возможного присутствия бициклических терпанов использовалась масс-хроматограмма по пику иона с массой 123, соответствующего структурному фрагменту



Были обнаружены два изомера бициклических терпанов с молекулярной массой 208 и два изомера с молекулярной массой 222, а также 11 трициклических терпанов с разным типом углеводородного скелета:



Только три из этих четырех типов скелета трициклических терпанов (I—III) можно считать индикаторами континентального происхождения, поскольку они могут образовываться из соединений, характерных для высших растений, таких как абиетиновая или пимаровая кислоты. Структурный тип IV может возникать в результате циклизации сквалана или подобных ему терпеноидов, характерных для большинства живых организмов [382].

Из нефти Анастасьевско-Троицкого месторождения (фракция с температурой кипения выше 420 °С) выделен ряд моноароматических углеводородов, принадлежащих к двум различным группам: с тремя и с четырьмя нафтеновыми кольцами [383]. Хромато-масс-спектрометрическое исследование выделенных углеводородов доказало их генетическую связь с углеводородами ряда гопана.

Методами ГЖХ и ГХ—МС обнаружен также гомологический ряд моноароматических стеранов C₂₇—C₂₉ и показана их генетическая связь с насыщенными углеводородами ряда стеранов [384]. Процесс ароматизации исходных биоорганических соединений начинается преимущественно с кольца C и сопровождается внутримолекулярной перегруппировкой метильных радикалов из положений 10 и 13 в положения 5 и 12. При этом образуются диастереомеры 17 α H, 20R; 17 α H, 20S; 17 β H, 20R; 17 β H, 20S с *цис*-сочленением колец A/B [384].

В экстрактах и дистиллятах горючих сланцев Доттерхаузенской формации, содержащих 10—17 % органического вещества и отличающихся относительно большим содержанием низкомолекулярных углеводородов, были обнаружены четыре группы углеводородов: *n*-алканы C₁₀—C₂₆ с максимумом распределения в области C₁₅—C₁₉ (преобладания углеводородов с нечетным числом атомов C, как в более поздних новых осадках, не обнаружено); изопреноидные алканы; низкомолекулярные циклоалканы, такие как диметилциклогексан, метилэтилциклопентан, триметилциклогексан, 1-метил-4-этилциклогексан; арома-

тические углеводороды, представленные алкилбензолами, алкилнафталинами и диметилдекагидронафталином [385]. Эти результаты показали сильное влияние диагенетических процессов на превращения органических компонентов горючих сланцев. Анализ проводился на хромато-масс-спектрометре Hewlett-Packard 5980A, идентификация соединений производилась по масс-спектрам.

Анализ биологических меток в органическом веществе осадков — стерановых и тритерпановых углеводородов, экстрагированных из горных пород, — осуществляли селективным ионным детектированием пиков ионов m/z 191 и 217 [386]. Соотношение стеранов C_{27}/C_{29} характерно для образцов разного геологического возраста и может служить показателем геотермической активности области [386].

Методом ГХ—МС с использованием ЭУ (70 эВ) и ХИ (газ-реагент CH_4) было исследовано органическое вещество, выделенное экстракцией (*n*-гексан) из горючих сланцев предгорий Альп (возраст 100—150 млн. лет) [387]. Масс-спектры ЭУ содержали большое число пиков осколочных ионов, масс-спектры ХИ — интенсивные пики квазимолекулярных ионов, а также осколочных ионов, дающих необходимую структурную информацию. В экстрактах были обнаружены *n*-алканы с максимумом распределения в области C_{16} , изопреноидные алканы с максимумом распределения, соответствующим пристану, и ароматические углеводороды, содержание которых было менее 5%. Эти данные позволили сделать вывод о морском происхождении осадков.

Селективное детектирование ионов m/z 149 было использовано для обнаружения и количественного определения алкилфталатов в осадках [388]. Методика анализа включала экстракцию осадков растворителем под воздействием ультразвука с последующим центрифугированием и сушкой в токе азота. Хроматографическое разделение осуществлялось на высокоэффективной стеклянной капиллярной колонке. Алкилфталатные эфиры идентифицировали по временам удерживания и относительным интенсивностям пиков трех ионов, селективно детектируемых для каждого соединения.

Корреляции в органической геохимии базируются, в основном, на идентификации и количественном определении характеристических биологических меток — насыщенных тетра- и пентациклических углеводородов (стераны и тритерпаны) или изопренанов, но иногда концентрации их слишком малы, чтобы можно было использовать их в качестве корреляционных параметров (например, в очень старых или подвергшихся сильной термической дегградации нефтях). В этих случаях корреляционные параметры могут быть получены при анализе легких фракций или ароматических углеводородов [389].

Для анализа фракций ароматических углеводородов была использована ГХ—МС при низких энергиях электронов на масс-

спектрометре с двойным ионным пучком Kratos MS 3074, соединенном с газовым хроматографом Pye 104 через стеклянный одноступенчатый струйный сепаратор. Разделение проводили на стеклянной капиллярной колонке 10 м × 2 мм с 3% OV-17, газ-носитель гелий (20 мл/мин). Температуру колонки повышали от 100 до 180 °С со скоростью 8°/мин; температура источника ионов 220 °С, интерфейса — 260 °С; энергия ионизующих электронов 12 эВ; разрешение около 1000. Второй канал использовался для измерения стандарта — перфторкеросина (энергия электронов 70 эВ). Производилось непрерывное циклическое сканирование масс-спектров от 30 до 600 а. е. м. со скоростью 3 с/декада (всего получали около 500 масс-спектров). Данные обрабатывались методом кластерного анализа. Иерархическую классификацию осуществляли путем расчета коэффициентов корреляции и построения матрицы близости, по которой строилась дендрограмма [389].

На масс-хроматограмме ПИТ выбирали около 350 масс-спектров, содержащих большую часть ароматических углеводородов с массами от 150 до 350. Абсолютные интенсивности пиков, соответствующих данному иону во всех 350 спектрах, суммировались, полученный средний спектр использовался для расчета относительных интенсивностей пиков молекулярных ионов. Интенсивности пиков молекулярных ионов группировались в 7 гомологических рядов, для каждого ряда строилась кривая распределения интенсивностей пиков. Эти кривые использовались для визуального сравнения разных образцов. Для расчета коэффициентов корреляции и построения дендрограмм выбирались 70 наиболее интенсивных пиков молекулярных ионов.

Были получены кривые распределения интенсивностей пиков молекулярных ионов для конденсата и нефти из одной и той же скважины. Скопление углеводородов, из которых образовались нефть и конденсат, разделены большой толщей осадочной породы, состоящей из карбонатов и сланцев. Тем не менее все кривые для нефти и конденсата оказались очень близки друг к другу как по величине пиков, так и по форме кривых. Это означает, что несмотря на большое расстояние между резервуарами по вертикали состав ароматических углеводородов не претерпел изменений из-за различий в пути миграции и возможных различий в условиях созревания в резервуарах при разной температуре, что приводит к заключению об общем происхождении нефти и конденсата.

Аналогичные кривые были получены для нефти и конденсата другой скважины. Эти образцы образовались из близко расположенных резервуаров и считались сходными на основании сравнения распределений *n*-алканов. Однако кривые распределения пиков молекулярных ионов обнаруживают значительные различия, особенно очевидные для ряда нафталинов — дибензтиофенов (m/z $156 \pm 14n$). Кривая для этого ряда имеет

Анализ кислот в нефтяных фракциях представляет собой трудную задачу. Метод ГХ не позволяет осуществить количественное определение даже на колонках, способных разделять свободные кислоты в водных растворах [395]. Например, на масс-хроматограмме депарафинизированной нефтяной фракции 205—427 °С, содержащей около 1% олеиновой кислоты (30-метровая капиллярная стеклянная колонка WCOT с SP-1000), олеиновая кислота наблюдается в виде небольшого неразрешенного пика на «горбе». После омыления и метилирования этого образца метилолеат легко идентифицируется при тех же условиях; количественный анализ может быть проведен с использованием метода СИД по молекулярному иону, свободному от наложений. Этот метод очень производительен: анализ одного образца занимает около 2 мин [395].

В связи с разработкой методов идентификации происхождения разных образцов нефтей была предпринята попытка характеристики нефтей Аляски с использованием капиллярной ГХ — МС [396]. Образцы сырой нефти разбавляли ксилолом или гексаном (50:50) и анализировали на ГХ—МС—ЭВМ системе Finnigan 3300 (30-метровая стеклянная капиллярная колонка, SP-2100). Регистрировались данные для хроматографических пиков, элюируемых между *n*-алканами C₁₂ и C₂₀ в течение 15 мин при программированном нагреве от 130 до 230 °С (8 °С/мин). Для сравнения разных образцов нефтей использовали реконструированные ЭВМ масс-хроматограммы.

Количественное сравнение образцов проводили по отношению интенсивностей отдельных пар пиков, соответствующих соседним нормальным и изоалканам. Было изучено более 28 образцов аляскинских нефтей, характеризующихся отношениями C₁₂/C_{13-изо}, C₁₄/C_{15-изо}, C₁₇/C_{19-изо} и т. д. Воспроизводимость измерения этих отношений составляла 10%. По реконструированным масс-хроматограммам для пиков ионов *m/z* 57, 156 и 170 удается отличать аляскинские нефти от нефтей других месторождений.

Большую сложность представляет анализ состава битумов. Даже в случае самых простых фракций выделенных из битумов углеводородов (например, циклоалканов и ароматических углеводородов), содержащих многие сотни соединений в интервале C₁₃—C₅₀, обычные методы газовой хроматографии и масс-спектрометрии не дают удовлетворительных результатов. В масс-спектрометрии с электроударной ионизацией имеет место интенсивная фрагментация, вследствие чего масс-спектры содержат интенсивные пики осколочных ионов и малоинтенсивные пики молекулярных ионов, что затрудняет детальное определение состава сложных смесей. При химической ионизации — более мягком методе ионизации — молекулярные ионы не претерпевают заметной фрагментации. Однако коэффициенты чувствительности углеводородов при ХИ сильно зависят от моле-

кулярной структуры. В работе [397] для анализа высококипящих фракций нефтей и битумов применено сочетание ГХ с масс-спектрометрией с полевой ионизацией. Анализ проводили на хроматографической колонке 2,5 м × 3 мм из нержавеющей стали с 3% OV-17 на Хромосорбе W (100—120 меш); газ-носитель гелий (45 мл/мин); температуру повышали от 60 до 300 °С со скоростью 2 °С/мин. Колонка присоединялась через керамический сепаратор Watson — Viemann к модифицированному масс-спектрометру AEI MS-9 с источником ионов с полевой ионизацией. Масс-спектры сканировались в интервале масс от 700 до 28 со скоростью 5 с/декада при продолжительности цикла сканирования 11 с. Эмиттером служили углеродистые иглы на вольфрамовой проволоке.

Преимущества этого метода при анализе высокомолекулярных фракций нефтей и битумов: возможность различать изомеры с одинаковыми молекулярными массами, разделяемые на хроматографической колонке, без наложений со стороны соединений с большими молекулярными массами; возможность разделять разные ряды гомологов с одинаковыми номинальными массами гомологических рядов молекулярных ионов (например, C_{*n*}H_{2*n*}, C_{*n*}H_{2*n*-14} и C_{*n*}H_{2*n*-28} или C_{*n*}H_{2*n*-20} и C_{*n*}H_{2*n*-10S}); возможность легко различать осколочные ионы и использовать их для структурных и количественных определений; возможность количественного анализа без калибровки по индивидуальным соединениям.

Хроматограмма по полному ионному току содержит ряд разрешенных пиков, но по мере повышения температур кипения компонентов появляется неразрешенный «горб». Масс-хроматограммы по отдельным пикам и суммарным интенсивностям нескольких пиков дают возможность разделить на общей хроматограмме и идентифицировать большое число компонентов. Для эффективного использования информации, заключенной в масс-спектрах ПИ, были применены различные формы представления ГХ—МС данных. Один из них заключался в суммировании интенсивностей пиков всех молекулярных ионов с определенной молекулярной формулой. Например, нафталины (C_{*n*}H_{2*n*-12}) дают гомологический ряд молекулярных ионов с массами 128, 142, 156 и т. д. Масс-хроматограмма для суммы пиков этих ионов представлена на рис. 3-2а. Это соответствует тому, что все соединения C_{*n*}H_{2*n*-12} (и другие, имеющие такие же номинальные массы молекулярных ионов) как бы отделены от остальных компонентов смеси. Для данных ГХ—МС с ЭУ ионизацией такое представление невозможно из-за сложности масс-спектра и взаимных наложений пиков молекулярных и осколочных ионов.

Другой метод представления этих же данных показан на рис. 3-2б, на котором приведены масс-хроматограммы для отдельных молекулярных ионов. На них можно разделить изомеры, имеющие одинаковые молекулярные массы. По этим же

масс-хроматограммам можно различить соединения, принадлежащие к разным гомологическим рядам, но имеющие одинаковые молекулярные массы, если они различаются по временам удерживания, например, нафталины и дибензтиофены. Аналогично на масс-хроматограммах соединений, соответствующих

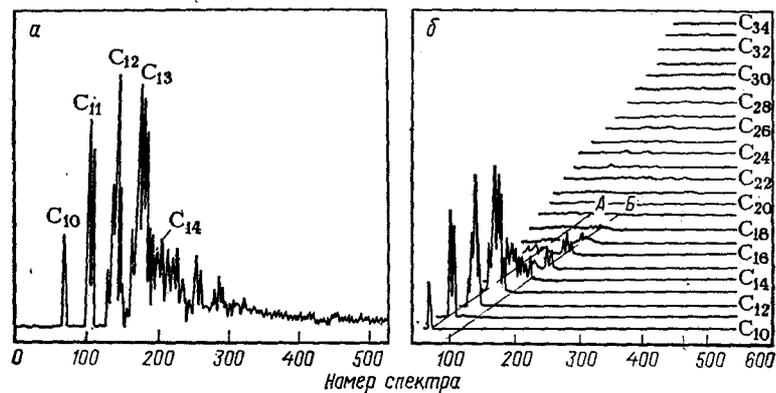


Рис. 3-2. Масс-хроматограммы суммарной интенсивности пиков ионов C_nH_{2n-12} (а) и отдельных ионов C_nH_{2n-12} (б):
А — алкилнафталины; Б — дибензтиофены.

формуле C_nH_{2n-20} , можно различить ряды алкилбензолов, бензтиофенов и соединений C_nH_{2n-20} (рис. 3-3).

Еще один метод представления данных заключается в суммировании интенсивностей пиков всех ионов для каждой масс-хроматограммы, соответствующей данному числу атомов С. Это дает кривую распределения для каждого гомологического ряда в соответствии с числом атомов С в молекуле. На рис. 3-4 показано такое представление для рядов C_nH_{2n-6} и C_nH_{2n-8} во фракциях насыщенных углеводородов, образующих и не образующих аддукты с тиомочевинной, а на рис. 3-5 — исходные масс-хроматограммы для этих фракций по каждому молекулярному иону трициклических углеводородов. Ряд интенсивных острых хроматографических пиков в области C_{20} — C_{30} на масс-хроматограммах фракции, не образующей аддукты с тиомочевинной, соответствует трициклическим терпанам.

При анализе насыщенной части нефтяных фракций с помощью масс-спектрометрии с ЭУ ионизацией обычно встречаются трудности в определении молекулярно-массового распределения. ГХ—МС с полевой ионизацией позволяет осуществить это определение, а кроме того, получить дополнительную информацию для идентификации изомерных соединений. В отличие от ароматических соединений, у которых фрагментация незначительна, алканы дают сравнительно много осколочных ионов. Интен-

сивность фрагментации увеличивается с ростом числа атомов С в данном гомологическом ряду, а также при повышении температуры источника ионов и эмиттера. Разветвления алкановой цепи способствуют фрагментации. Интенсивность пиков осколочных ионов составляет от 0,1 до 10 % от величины пиков молекулярных ионов. При различиях в степени фрагментации сум-

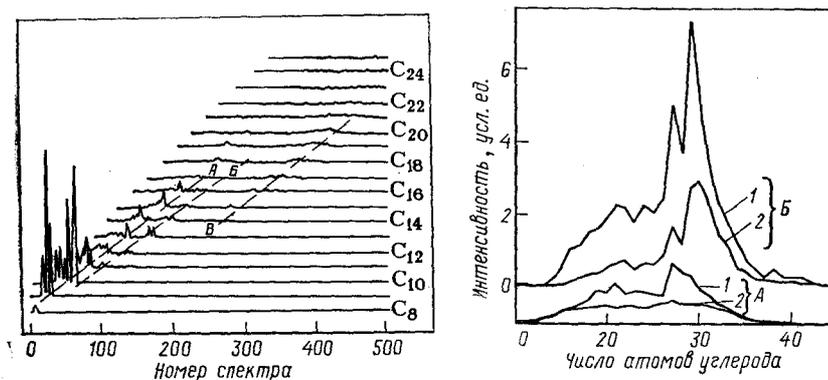


Рис. 3-3. Масс-хроматограммы для отдельных ионов C_nH_{2n-6} .
А — алкилбензолы C_nH_{2n-6} ; Б — бензтиофены C_nH_{2n-10S} ; В — соединения C_nH_{2n-20} .

Рис. 3-4. Распределение по числу углеродных атомов n для соединений C_nH_{2n-6} (1) и C_nH_{2n-8} (2) во фракциях насыщенных углеводородов, образующих (А) и не образующих (Б) аддукты с тиомочевинной.

ма интенсивностей пиков молекулярных и осколочных ионов остается постоянной в пределах экспериментальной ошибки. Неразветвленные алканы дают обычно интенсивный пик иона с массой 29, изоалканы — 43, антеизоалканы — 57. Поэтому масс-хроматограммы по этим ионам позволяют определить структуру цепей. По масс-хроматограммам характеристических осколочных ионов можно идентифицировать изопренаны, стераны, тритерпаны.

По сравнению с ГХ—МС—ЭУ хромато-масс-спектрометрия с ПИ позволяет идентифицировать большее число изомеров и легче проводить количественный анализ.

Большая часть рассеянного органического вещества представляет собой кероген, нерастворимый в обычных органических растворителях. Это сложное гетерогенное вещество может быть охарактеризовано элементным составом и продуктами, образующимися при деструкции. Для анализа керогенов используется ГХ—МС в сочетании с деструкцией под действием нагрева или лазерного облучения. Получаемые пирограммы могут интерпретироваться по методу «отпечатков пальцев», они показывают, как меняется структура керогена в процессах седиментации и последующих превращений и могут использоваться для классификации осадков или керогенов.

Галлегос [398] идентифицировал ряд стеранов и тритерпанов в керогене горючего сланца Грин Ривер путем селективного детектирования пиков ионов m/z 217 и 191 при пиролизе. Пиролиз в точке Кюри, протекающий очень быстро и дающий преимущественно продукты первичной деструкции без существенного вклада продуктов вторичных реакций, обеспечивает высо-

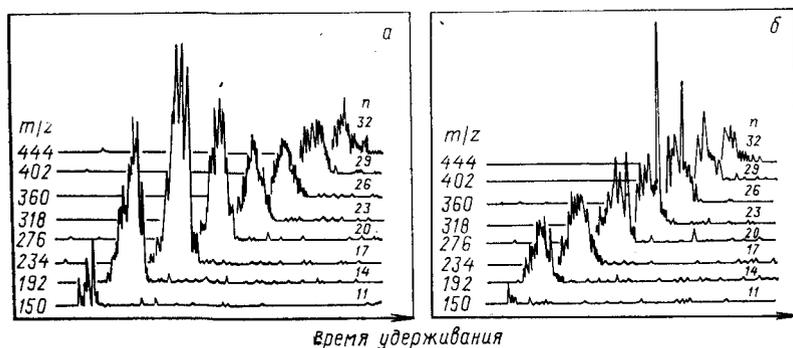


Рис. 3-5. Масс-хроматограммы для отдельных молекулярных ионов трициклических углеводородов во фракциях насыщенных углеводородов, образующих (а) и не образующих (б) аддукты с тиомочевинной:

n — число углеродных атомов.

кую воспроизводимость результатов, не требует предварительной обработки образца [399]. В работе [391] изучены алкилбензолные и алкилнафталиновые углеводороды, выделяющиеся при пиролизе керогенов. Микропиролизер был непосредственно присоединен к стеклянной капиллярной колонке $20 \text{ м} \times 0,3 \text{ мм}$ с OV-101, колонка соединялась с ионным источником масс-спектрометра VG Micromass 12 В, работающего при энергии ионизирующих электронов 70 эВ. Несколько миллиграммов керогена пиролизовали при 600°C до прекращения выделения летучих продуктов; регистрировали пиетрограммы по ионам m/z 91, 105, 141, характеризующим, соответственно, моно- и дзамещенные алкилбензолы и алкилнафталины. Масс-хроматограммы показали наличие гомологических рядов моно- и полизамещенных алкилбензолов и алкилзамещенных нафталинов. Вид и относительная интенсивность этих хроматограмм могут служить «отпечатками пальцев» и использоваться для характеристики типа керогена. В частности, 17α -, 21β -гопаны, обнаруживаемые этим методом, являются индикаторами нефти [391].

С помощью пиролитической ГХ и пиролитической ГХ—МС были изучены 20 керогенов и возможных предшественников керогенов [400]. Результаты пиролитической ГХ—МС обеспечили базу для интерпретации и сравнения пиролитических газовых хроматограмм. ГХ—МС анализ проводился на колонке

WCOT $100 \text{ м} \times 0,25 \text{ мм}$ (SP-2100), непосредственно соединенной с масс-спектрометром Du Pont 21-491-2. Воспроизводимость пиетрограмм была в пределах обычной воспроизводимости хроматографического анализа.

При пиролизе образовывалось три вида продуктов: 1) летучие продукты, которые регистрировались пламенно-ионизационным хроматографическим детектором; количество их составляло 5—10% от исходного образца; 2) относительно нелетучие продукты (40—50%) — конденсат, растворимый в смеси метиленахлорида и метанола, образующийся на стенках пиролизной трубки (анализ их с помощью масс-спектрометрии не удался, но ясно, что это полярные соединения); 3) остаток черного цвета на пиролизной проволоке. Наиболее представительными продуктами в пиролизате являлись: алкилбензолы, алкены-1, n -алканы, алкилфенолы, разветвленные алкены и алканы; в небольших количествах были обнаружены метоксифенолы, алифатические альдегиды и кетоны, инданы, алкилнафталины, гетероатомные соединения, такие как тиофены, фураны, пирролы, индолы; большие количества газообразных продуктов (CH_4 , CO_2 , H_2S , SO_2). Показано, что керогены, образовавшиеся из морских организмов, дают, главным образом, алифатические структуры с относительно короткими углеродными цепями. Разветвленные цепи в продуктах пиролиза таких керогенов встречаются в большем количестве, чем в керогенах других типов. Керогены, образовавшиеся из наземных высших растений, образуют алкилфенолы и метоксифенолы в значительно больших количествах, чем другие керогены. Воска высших растений проявляются в пиролизатах в виде длинноцепочечных алканов и алкенов, среди которых преобладают цепи с нечетным и четным числом атомов углерода, соответственно.

Этот метод в высшей степени чувствителен к состоянию диагенеза керогена. Кероген может классифицироваться на три группы: морского, континентального и смешанного происхождения.

Относительный выход алканов и алкенов нормального строения увеличивается, а фенолов уменьшается с увеличением геологического возраста, однако кратковременное влияние диагенеза на структуру не отражается в пиетрограммах. Только сильные катагенетические изменения оказывают влияние на пиетрограммы: сильно измененные керогены дают мало летучих продуктов пиролиза.

Лазерный пиролиз в сочетании с ГХ—МС анализом выделяющихся летучих продуктов был использован для характеристики органического вещества в геологических образцах методом «отпечатков пальцев» [401]. В основном образовывались низкомолекулярные продукты с молекулярной массой до 150. При лазерном пиролизе образец помещался в цилиндрическую кварцевую камеру, через которую пропускался поток газоносителя в хроматографическую колонку. Высокоэнергетический

лазерный пиролиз позволил изучать свободнорадикальные реакции, протекающие при контролируемых условиях.

Пиролитическая ГХ—МС может быть использована для получения информации о структуре углей и о продуктах, которые могут содержаться в продуктах их ожигения. Угли содержат ряд компонентов (витринит, альгинит, споринит и другие), которые соответствуют исходному растительному материалу, ответственному за образование угля, характеристики его отложения и зрелость образца. Пирограммы имеют очень сложный характер, но метод ГХ—МС позволяет качественно и полуколичественно оценивать и классифицировать различные угли по содержанию в них основных компонентов. Был осуществлен пиролиз серии гумусовых углей разных марок и анализ продуктов с помощью ГХ—МС с целью найти корреляцию пирограмм с процессом углефикации и оценить возможность дифференцирования углей. Данные, полученные при пиролизе четырех относительно чистых компонентов, обрабатывались методом факторного анализа [402]. Результаты показали, что с различиями в процессе углефикации сильнее всего связаны инданы, бензофураны и различные фенольные соединения. Различия в содержании основных компонентов характеризовались фактором, связанным со специфичными ионами для бензолов и нафталинов.

Галлегос [403] изучил пять углей с разной геологической историей методом пиролитической ГХ—МС, а также с помощью сочетания термогравиметрии с масс-спектрометрией. Графическое представление полученных данных показало простую связь между геохимической историей угля и соединениями — биологическими метками, обнаруженными в продуктах пиролиза углей. Соотношение количеств $17\beta\text{H}$ -гопанов и $17\alpha\text{H}$ -гопанов служит мерой термического созревания угля. Природные $17\beta\text{H}$ -гопаны термически нестабильны, тогда как $17\alpha\text{H}$ -гопаны более стабильны. Пирограммы показали, что отношение $17\beta\text{H}/17\alpha\text{H}$ уменьшается с увеличением степени термического воздействия на уголь в пласте. Аналогичная закономерность наблюдается при анализе экстрактов из углей. Галлегос показал также, что изменения выхода кислородсодержащих компонентов, образующихся при пиролизе, связаны с графитизацией органического остатка после созревания. Концентрация терпанов уменьшается при увеличении степени созревания, в частности, два компонента — кадален и копаен — обнаружены только в трех молодых углях. При исследовании ряда американских углей Галлегос обнаружил семь гомологических рядов алкилбензолов C_{10} — C_{35} , образовавшихся, вероятно, из каротенов в исходных растительных материалах. Концентрация их уменьшается с увеличением зрелости угля, что является признаком для определения его возраста [403].

Система ГХ—МС, вследствие гибкости и чувствительности этого метода, была выбрана для поиска органических соединений на планете Марс [404] во время полета американской меж-

планетной станции «Викинг» (1976 г.). Прибор включал три небольшие печи, в которых измельченный образец, взятый с поверхности планеты (размер частиц менее 300 мкм) нагревался в течение 30 с до заданной температуры (200, 350 или 500 °С). Выделившиеся летучие вещества или продукты пиролиза направлялись в хроматографическую колонку потоком $^{13}\text{CO}_2$ и элюировались газом-носителем (H_2). Температура колонки поддерживалась равной 50 °С в течение 10 мин, затем линейно повышалась до 200 °С за 18 мин и колонка выдерживалась при этой температуре заданное время (18, 36 или 54 мин) по команде с Земли. Газ-носитель удалялся через палладиевый сепаратор, и разделенные компоненты вводились в масс-спектрометр. Колонка заполнялась адсорбентом Тенакс GC (поли-2,6-дифенил-*n*-фениленоксид) с полиметафеноксиленовым покрытием. Этот адсорбент характеризуется достаточной термостабильностью и механической прочностью в условиях космического полета и позволяет отделить H_2O и CO_2 от органических соединений. Использование меченого CO_2 позволяло легко отличить его от CO_2 , выделившегося из образца, и детектировать возможное включение CO_2 в органические соединения в процессе нагрева или пиролиза. Для защиты масс-спектрометра от избытка выделяющихся газов был предусмотрен автоматический делитель потока.

Масс-спектры сканировались от 12 до 200 а. е. м. за 10 с при динамическом диапазоне $1 : 10^7$. Все спектры регистрировались в виде 3840 цифровых точек, каждая из которых представляла величину ионного тока, закодированную 9 бит в логарифмической шкале. Все эти данные вместе с рабочими параметрами телеметрировались на Землю [около $(1,4—1,8) \cdot 10^7$ бит за эксперимент].

Ни в одном из проанализированных образцов не было обнаружено органических соединений, но при нагревании до 350 или 500 °С выделилось от 0,1 до 1 % воды. Эта вода, по-видимому, выделяется при разложении гидратов минералов. Пределы обнаружения низкомолекулярных органических веществ, таких как пропан или метанол, были на уровне 10^{-5} , для более сложных органических веществ — 10^{-9} . Эти результаты позволяют исключить вклад любых современных процессов, приводящих к эффективному образованию органических соединений, а также длительных малоэффективных процессов, которые могли бы привести к медленному аккумулярованию органических соединений, стабильных в марсианских условиях.

3.4. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ИХ МЕТАБОЛИТЫ

Хромато-масс-спектрометрия достаточно широко используется при решении проблем, так или иначе связанных с медициной, но, пожалуй, наиболее значителен вклад этого метода в изучение лекарственных препаратов и их биотрансформации в организмах [204, 205].

Хромато-масс-спектрометрия стала самым мощным средством исследования распределения, метаболизма и выведения лекарственных препаратов (ЛП), поскольку этот метод позволяет получать максимальную информацию о структуре при использовании минимальных количеств образца, что очень важно при исследовании метаболитов, извлекаемых обычно в микрограммовых количествах.

Метод ГС—МС при исследовании ЛП и метаболитов позволяет осуществить 1) идентификацию неизвестных соединений, присутствующих в малых концентрациях в сложных смесях биологического происхождения; для идентификации достаточно иметь 10—100 нг исследуемого вещества (в зависимости от его химических свойств); 2) качественное определение известных соединений; предел обнаружения составляет 1—100 пг; 3) количественное определение идентифицированных соединений; в зависимости от их химической природы предел обнаружения равен 5—100 пг.

Как правило, масс-спектральное количественное определение или исследование ЛП и их метаболитов осуществляют методом СИД. Однако в тех случаях, когда для анализа располагают достаточным количеством вещества, применяют метод циклического сканирования полного масс-спектра или его части в определенном диапазоне масс [206].

В фармакологических исследованиях, как и в общем случае, используются, главным образом, два типа внутренних стандартов: аналоги, меченные стабильными изотопами, и структурные аналоги [207], однако первые более предпочтительны. Меченые соединения в качестве внутренних стандартов применялись при исследовании пропенола, беклофена, норэтилдрона, 1- α -ацетилметадона и его основных метаболитов, амитриптилина и его основных метаболитов, берберина, пропентелинбромида, сульфодиметоксина [208]. В большинстве случаев для анализа меченых ЛП и метаболитов меткой служит дейтерий благодаря его относительно невысокой стоимости и высокой степени обогащенности широкого набора препаратов. Иногда в качестве метки применяют и другие стабильные изотопы. Так, при анализе клоназепам и его метаболитов методом ГХ—МС—ХИ внутренним стандартом служил меченый аналог, содержащий один атом ^{15}N [209], а Хори и Бэбе для этой цели использовали аналог с одним атомом ^{13}C [210]. Аналоги, меченные по кислороду, обычно не встречаются, однако Герланд и соавт. [211] в методе ГХ—МС—ХИ с отрицательными ионами выбрали в качестве внутреннего стандарта клоназепам, меченный как по кислороду, так и по азоту.

Внутренние стандарты с применением радиоактивных изотопов чрезвычайно редко применяются в исследованиях ЛП и их метаболитов; в качестве примера можно привести тритиевые производные этофина, которые служили внутренним стандартом при ГХ—МС анализе этофина в моче [212].

Структурные аналоги в качестве внутреннего стандарта в ХМС методе использовались при анализе большого числа ЛП; среди них бромкриптин, лидокаин и его дезэтилированные метаболиты, амфетамин, лоразепам и оксазепам, карбамазепин, имипрамин, дезипромин, кломипромин с N-дезметилкломипромином, тербутолин, никотин, виразол, преднизон и преднизолон и галоперидол [208].

Специфичность детектирования увеличивается при повышении разрешающей способности масс-спектрометра. Так, Гаскелл и соавт. [213] модернизировали метод СИД в ГХ—МС, применив масс-спектрометр с разрешающей способностью 8500 при изучении антиэстрогенного агента тамоксифена с целью исключения наложения со стороны компонентов экстракта, элюируемых вместе с ЛП и внутренним стандартом.

Масс-спектрометрия с химической ионизацией стала обычным методом при изучении ЛП и метаболитов, хотя ЭУ пока остается преобладающим методом ионизации.

Как правило, при исследовании ЛП задача обычно предельно конкретна: с возможно большей точностью и чувствительностью определить концентрацию заданного соединения. Необходимость определения структуры и идентификации возникает лишь при установлении состава примесей.

При исследовании метаболитов и путей метаболизма ситуация мало меняется, хотя задача, стоящая перед исследователем, естественно, усложняется. Обычно и в этом случае вопросы, связанные с определением структуры, возникают редко, так как в процессе метаболизма ЛП структура исходного соединения, масс-спектр которого известен экспериментатору, изменяется незначительно.

Следует подчеркнуть, что при исследовании метаболитов часто повышаются требования к чувствительности, например, при фармакинетических исследованиях, когда исследователь располагает малыми количествами тканей и биологических жидкостей.

Широкое внедрение ХМС метода в практику исследования ЛП и их метаболитов было обусловлено и тем, что к моменту его развития был накоплен значительный опыт по хроматографическому разделению жидкостей и экстрактов. Однако при работе со сложными биологическими объектами обычно требуется специальная подготовка образца к ХМС анализу, и эта проблема до настоящего времени полностью не решена. Правда, от этого недостатка не свободен ни один из современных методов исследования ЛП. Естественно, мы не можем здесь, даже кратко, описать все приемы предварительной подготовки образца к ГХ—МС анализу. Отметим лишь, что в последние годы в практику вошли методы предварительной очистки исследуемых экстрактов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на сефадексах.

Одним из многочисленных направлений применения метода ГХ—МС в изучении ЛП и их метаболитов является идентификация примесей. Известно, что многие лекарственные препараты содержат довольно значительные количества примесей, которые могут быть ошибочно приняты за метаболиты и могут появиться как при синтезе ЛП, так и в процессе разложения во время хранения.

Хроматографическое исследование транквилизатора этхлорвинола (1-хлор-3-этилпентен-1-ин-4-ол-3) обнаружило наличие в препарате нескольких примесей, идентификация которых была осуществлена с помощью метода ХМС [214]. Использовали хромато-масс-спектрометр фирмы Finnigan (модель 3200), соединенный с вычислительным устройством (модель 6100). Хроматографирование образцов осуществлялось на колонке (1,5 м × 2 мм) с 3% OV-17 на Газхроме Q (80—100 меш); температура колонки 90 °С, газ-носитель гелий (20 мл/мин). Регистрировались полные масс-спектры, полученные при ЭУ и ХИ (газ-реагент метан). Были идентифицированы следующие примеси: 1-хлор-3-метилпентен-1-ин-4-ол-3; 2-хлор-3-пропилпентен-1-ин-4-ол-3; пентанон-3; 1,1- или 1,2-дихлор-3-этилпентен-1-ин-4-ол-3.

Исследовались образцы кокаина, применяемого в медицине, и кокаина, продающегося в США на черном рынке [215]. Анализ осуществлялся на хромато-масс-спектрометре LKB 9000 с записью полных масс-спектров, полученных при энергии электронов 70 эВ. Результаты исследования проданного на черном рынке кокаина показали, что он содержит значительную примесь другого вещества, которое, согласно его масс-спектру, было идентифицировано, как лигнокаин. Хроматографический количественный анализ примеси показал, что в этом кокаине содержится до 37% лигнокаина.

Конъюгированные и этерифицированные эстрогены используются как ЛП при климаксе и других состояниях, связанных с эстрогенной недостаточностью. Препарат, обычно выделяемый из экстрактов мочи беременных кономаток, содержит ряд родственных эстрогенных соединений: эстрон (I), эквилин (II), эквилинин (III), 17 α -эстрадиол (IVa), 17 β -эстрадиол (IVb), 17 α -дигидроэквилин (Va), 17 β -дигидроэквилин (Vb), 17 α -дигидроэквилинин (VIa) и 17 β -дигидроэквилинин (VIb). Поэтому возникает необходимость качественного и количественного определения этих компонентов в ЛП.

Многочисленные попытки разделить хроматографически свободные эстроны и эквилин как на полярных, так и на неполярных фазах не увенчались успехом [216]. Было осуществлено разделение некоторых эстрогенов в виде ТМС-производных на колонке с 3% OV-225, однако основные компоненты — эстрон и эквилин — удалось разделить лишь частично в виде ТФА-производных. На рис. 3-6 приведены масс-хроматограммы по полному ионному току смеси производных эстрогенов с примени-

ем ХИ ионизации (газ-реагент метан). Из рисунка видно, что оптимальные результаты получены при использовании ТФА-производных. На основании этих масс-спектров были выбраны характеристические ионы для количественного анализа методом СИД. Так, в случае эстрогенных кетонов (I, II, III) наиболее интенсивный пик соответствует протонированному молекуляр-

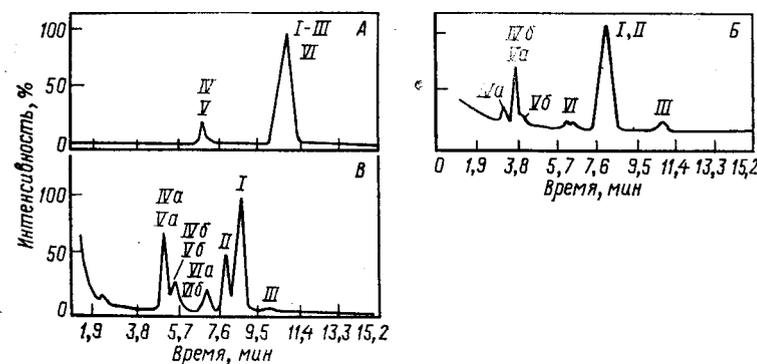


Рис. 3-6. Масс-хроматограммы по ПИТ смеси эстрогенов [216]:

A — исходные эстрогены; B — ТМС-производные; B — ТФА-производные: I — эстрон, II — эквилин, III — эквилинин, IVa — 17 α -эстрадиол; IVb — 17 β -эстрадиол; Va — 17 α -дигидроэквилин; Vb — 17 β -дигидроэквилин; VIa — 17 α -дигидроэквилинин; VIb — 17 β -дигидроэквилинин.

ному иону, а ионы с массами 367, 365 и 363 могут быть использованы для количественного анализа. В случае эстрогенных диолов (IV, V и VI) наиболее интенсивные пики ионов отвечают фрагментам, образующимся при отрыве гидроксилсодержащей группы ТФА от протонированного молекулярного иона (массы 347, 349 и 351); в этом случае ион (MH)⁺ также имеется в масс-спектре, но отвечает менее интенсивному пику. В результате селективное детектирование не представляет особых затруднений. Полученные калибровочные кривые позволили определять указанные соединения с пределом обнаружения 0,010—0,074 мг в одной таблетке.

1,4-Бенздиазепины — активные психотропные препараты; наибольшее распространение получили пивооксазепам (I) и 2'-хлорпивооксазепам (II). Санчес и соавт. [217] предложили метод, заключающийся в экстракции I и II из крови и мочи и последующем гидролизе сильной кислотой до соответствующих 2-амино-5-хлор- и 2-амино-5,2'-дихлорбензофенонов. Трифторацетилпроизводные обоих бензофенонов (соответственно III и IV) имеют хорошие хроматографические характеристики, легко разделяются на OV-17 и регистрируются электронозахватным детектором. Исследование масс-спектров соединений III и IV показало, что они характеризуются весьма интенсивными пиками молекулярных ионов, которые в режиме МИД могут

регистрироваться с большей специфичностью, чем в случае простого хроматографического анализа. В результате порог чувствительности обнаружения III и IV в образцах крови с применением ХМС метода может быть снижен до 0,5—0,8 нг/мл по сравнению с хроматографическим методом (5—10 нг/мл). Разработанная методика позволила исследовать кинетику уменьшения

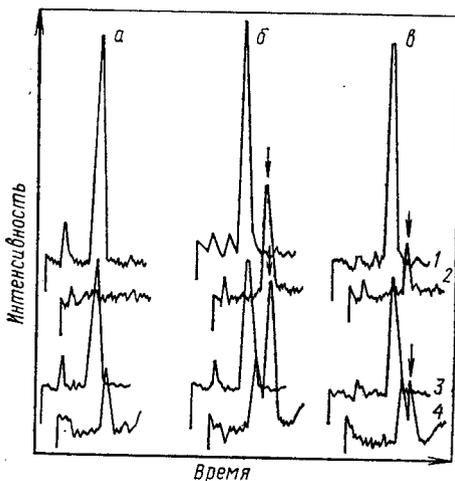


Рис. 3-7. Ионные масс-хроматограммы образца сыворотки крови [218]:

а — в момент введения препарата; б — через 30 мин после введения; в — через 180 мин после введения; 1 — m/z 448; 2 — m/z 442; 3 — m/z 432; 4 — m/z 426.

концентрации I и II после их введения в организм различными способами.

Обычные методы анализа тербуталина — 1-(3',5'-дигидроксифенол)-2-(трет-бутиламино)этанол — непригодны из-за низких концентраций в сыворотке крови и моче. Лишь с помощью

ионной масс-хроматографии удалось разработать метод количественного определения этого препарата в различных биологических объектах. Исследование ТМС-производного тербуталина методом ХМС с ЭУ ионизацией показало, что введение 100 нг образца достаточно для получения интенсивных пиков, однако аналитические пики выбрать не удалось ввиду наложения на них фоновых пиков колонки и пиков биологических примесей [218]. Гораздо более характерным является масс-спектр, получаемый при использовании источника с ХИ (газ-реагент метан).

Идентификацию тербуталина в образце проводили по трем параметрам: время удерживания, ионы $(M+H)^+$ и $(M-CH_3)^+$ с массами 442 и 426 и соотношение интенсивностей пиков этих ионов, которое оставалось постоянным в широком интервале концентраций. Для точного количественного определения измеряли также и отношение интенсивностей пиков в масс-спектре гексадейтеросодержащего тербуталина (массы 448 и 432). Для получения калибровочных кривых к образцам сыворотки крови добавляли 1, 2, 5, 10 и 20 нг тербуталина вместе с одним и тем же количеством d_6 -тербуталина. Чувствительность метода составляла 1 нг/мл.

Разработанный метод был использован для определения содержания тербуталина в сыворотке и моче больных, получавших препарат внутрь или в виде инъекций, через различные промежутки времени после введения препарата. На рис. 3-7

приведена ионная масс-хроматограмма сыворотки крови, взятой у одного из больных в момент введения препарата, а также через 30 и 180 мин после введения. Стрелкой указаны линии в масс-спектре тербуталина (время выхода 5 мин 11 с). Ко всем образцам перед введением в прибор добавляли 20 нг/мл внутреннего стандарта (гексадейтеротербуталин, время выхода 5 мин 7 с).

ГХ и ЖХ методы оказались недостаточно чувствительными для определения метимазола (1-метил-имидазол-2-тиол) в моче крыс и плазме крови. Был предложен метод [219], включающий экстракцию и бензилирование метимазола и последующий анализ ГХ—МС с ЭУ ионизацией. Внутренним стандартом служил меченный дейтерием аналог — 1,3-дейтерометиламидазол-2-тиол. Бензил- и пентафторбензил-производные элюировались соответственно через 4,2 и 6,2 мин. Регистрировались молекулярные ионы этих соединений и внутреннего стандарта с массами 204/207 и 294/297, соответственно.

Были построены калибровочные кривые, позволяющие проводить количественный анализ по соотношению высот пиков анализируемого вещества и стандарта. Точность метода при содержании 5 нг метимазола в 1 мл плазмы оказалась равной 6 %.

Для анализа следовых количеств обезболяющего препарата фентанила с помощью ЖХ—МС—ХИ методов (CH_3CN/H_2O 40:60, 8 мкл/мин) осуществлялось селективное детектирование по пикам квазимолекулярных ионов $(M+1)^+$ с массой 337 и характеристического осколочного иона с массой 150, соответствующего внутримолекулярному переносу протона к N-пропионил-N-фенильному фрагменту.

Некоторые сульфаниламидные препараты могут анализироваться методом ГХ—МС только в виде производных, тогда как с помощью ЖХ—МС—ХИ возможно их непосредственное определение. Так, анализ сульфадиметоксина без перевода в производные был осуществлен с помощью ЖХ—МС—ХИ метода: 3,5 нг вещества вводили в колонку и получали полный масс-спектр, содержащий пики квазимолекулярных и характеристических осколочных ионов, позволяющих идентифицировать это соединение и обнаружить примеси в сульфадиметоксине.

Для выявления антидепрессанта имипрамина и его метаболитов в различных биологических жидкостях использовались разные методы [221], однако все они оказались недостаточно селективными и чувствительными. Вместе с тем все трициклические антидепрессанты, к которым относится и имипрамин, фармакологически активны при очень низких концентрациях, так что для количественного определения имипрамина в крови необходим высокочувствительный метод анализа, такой как ГХ—МС.

В случае применения набивной колонки (длина 2 м, 3 % OV-17) полный масс-спектр удается получить при введении 10 нг имипрамина, при работе с капиллярной колонкой

(25 мм × 0,25 мм с OV-17) полный масс-спектр был получен при введении 200 пг вещества [222].

Для количественного анализа методом ИМХ была использована набивная колонка и в качестве аналитического был выбран пик молекулярного иона и пик осколочного иона с массой 234, вероятно, отвечающий структуре



При количественном анализе имипрамина в качестве внутреннего стандарта использовали дейтерированный имипрамин в растворе пиридина. Количество введенного в колонку имипрамина определяли по соотношению площадей пиков имипрамина и пиков дейтероимипрамина.

Основным фактором, ограничивающим чувствительность определения, являются мешающие эндогенные соединения, обладающие сходными экстрактивными и аналитическими характеристиками, вследствие чего пределы обнаружения лекарственного препарата в плазме крови на несколько порядков выше предела обнаружения индивидуального соединения. Например, если методом ХМС удастся обнаружить 5 пг ТМС-производного индивидуального вещества, то при введении этого же соединения в плазму крови предел обнаружения возрастал до 1 нг.

Для количественных определений ЛП применяют различные методы: ГЖХ [223], тонкослойную хроматографию [224], ХМС [225, 226], однако в лучшем случае они позволяют определять количества 100—500 пг/мл с пределом обнаружения 100—200 пг. В 1980 г. Харвей и соавт. [227] предложили для этой цели регистрировать пики метастабильных ионов в процессе ГХ—МС эксперимента. В качестве внутреннего стандарта использовался (1',1',2',2'-D₄) каннабинол. Анализ проводили с ТМС-производными. Разработанный метод был с успехом применен для фармакокинетических исследований.

Применение ионной масс-хроматографии низкого разрешения для непосредственного анализа экстрактов из исходной плазмы крови осложняется в ряде случаев из-за присутствия мешающих примесей (плазма, растворители, используемые реагенты и др.). Поэтому для определения нанogramмовых количеств сверхчувствительными методами требуется предварительная очистка образца. Для большинства ЛП процедура очистки сырого экстракта обычно связана с экстракцией кислыми растворителями и последующим удалением липидов путем отмывания неполярными растворителями. Такая очистка, как правило, весьма трудоемка и продолжительна, что затрудняет автоматизацию процесса подготовки образца и анализа, и в итоге не позволяет проводить массовые клинические анализы.

Риддер и соавт. [228] предложили для предварительной очистки образцов плазмы крови метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Очистке и анализу подвергался антидепрессант хлоргидрат миансерина — хлоргидрат 1,2,3,4,10,14b-гексагидро-2-метилдибензо[с, f]пиазино[1,2-a]азепина. В качестве внутреннего стандарта использовался 10,10-D₂аналог.

Был проведен [229] количественный анализ большого числа искусственных смесей и клинических образцов. Полученные данные свидетельствуют о надежном измерении с чувствительностью 1 нг/мл и точностью 0,01 нг/мл. Высокая скорость проведения анализа позволяет анализировать около 60 образцов в день.

Был предложен чувствительный и специфический метод для количественного анализа противовоспалительного препарата 6,11-дигидро-11-оксидибенз[b, e]оксепин-3-уксусной кислоты (оксепинак) в плазме крови человека, моче и слюне [230]. Использовали масс-спектрометр фирмы Hitachi (модель RMU-6MG), снабженный газовым хроматографом со стеклянной колонкой (1 м × 3 мм), содержащей 2% OV-17 на Газхроме Q (80—100 меш), газ-носитель гелий, скорость 30 мл/мин; анализ проводился в режиме МИД. Регистрировались пики следующих ионов: *m/z* 310 для производного оксепинака (*n*-пропиловый эфир) и *m/z* 324 для внутреннего стандарта [2(6,11-дигидро-11-оксидибенз[b, e]оксепин-3-ил)пропионовая кислота]. Точность метода в пределах концентраций от 100 мкг/мл до 1 нг/мл была не хуже 7%.

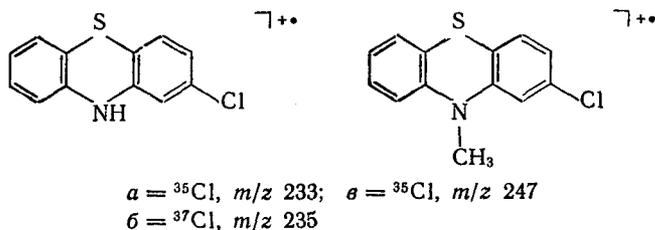
Применимость метода была доказана с помощью клинических экспериментов при приеме одной или более доз оксепинака. Среднее значение содержания оксепинака в плазме крови для 5 человек было при этом равно 2,31 мкг/мл, среднее содержание оксепинака в моче через 24 ч после приема лекарства было равно 6,01 мг. Среднее количество оксепинака в слюне для 5 человек было равно 25,8 нг/мл.

Мур [231] предложил метод количественного определения доксапрама — препарата, стимулирующего центральную нервную систему — на уровне концентрации в крови и плазме 0,01—0,75 мкг/100 мл с помощью ГХ—МС с применением ХИ и метода МИД. При анализе использовались протонированные молекулярные ионы доксапрама (масса 379) и декстроморамида (масса 393), вводимого в качестве внутреннего стандарта. Концентрация определялась путем измерения соотношений площадей пиков. Предел количественного определения доксапрама этим методом в крови и плазме равен 10 нг, в моче 500 нг; коэффициенты вариации соответственно равны 6,37, 1,72 и 2,31%.

Выше были описаны некоторые примеры использования метода ГХ—МС для анализа собственно лекарственных препара-

тов. Следует отметить, что этот метод с еще большим успехом применялся и для изучения метаболизма ЛП [232].

Хаммер и Холмстед [92] впервые исследовали этим методом метаболизм хлорпромазина в организме человека. Основываясь на известных путях распада хлорпромазина и производных хлорфенотиазина, авторы [233] зарегистрировали изменение интенсивностей пиков ионов, отвечающих структурам *a*, *b*, *c*:

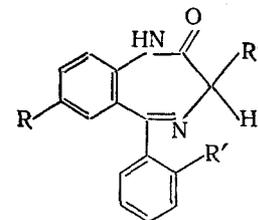


По временам удерживания и относительной интенсивности пиков указанных трех ионов были идентифицированы два метаболита хлорпромазина: десметил- и дидесметилхлорпромазин. Селективность определения удалось увеличить при переходе к регистрации ионов, характеризующих трифторацетильные боковые цепи десметил- и дидесметилхлорпромазина (массы 168 и 154), а также молекулярных ионов, содержащих изотоп ${}^{37}\text{Cl}$.

Для изучения клоназепама и его метаболитов необходим высокочувствительный метод, так как данный антиэпилептический препарат применяется в малых дозах. В то же время аналитический метод должен отличаться высокой специфичностью вследствие сложного состава и сложных путей метаболизма клоназепама. Основным метаболитом клоназепама (I) является его аминопроизводное (II), образующееся в результате восстановления нитрогруппы. При кислотном гидролизе соединений I и II получают замещенные бензофеноны, которые дают на хроматограмме четкие пики. Однако результаты исследования, полученные с применением этого метода, могут быть ошибочными, ввиду того, что соединение III — известный метаболит клоназепама — образует такой же бензофенон, как и сам клоназепам. Кроме того, два других метаболита — IV и V — образуют такие же бензофеноны, как и соединение II.

Мин и Герланд [234] определяли клоназепам в крови и плазме методом ГХ—МС с химической ионизацией (газ-реагент NH_3), обеспечив селективное детектирование самого клоназепама и его 7-аминометаболита по ионной масс-хроматограмме пика иона NH_3^+ . Высокая точность и чувствительность были получены за счет использования в качестве внутреннего стандарта меченных по азоту аналогов соединений I и II. Чувствительность обнаружения (1 нг/мл для соединения I и 2 нг/мл для соединения II) вполне достаточна для измере-

ния I и II в большинстве, если не во всех случаях длительного применения препарата, и в большинстве случаев разового его использования. В качестве примера на рис. 3-8 приведен график изменения концентрации I и II в крови у больного, получившего 2 мг препарата.



Соединение	R	R'	R''	$\text{MH}^+ (m/z)$
I	NO_2	Cl	H	316
II	NO_2	Cl	H	286
III	NO_2	Cl	OH	332
IV	NH_2	Cl	OH	302
V	$\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$	Cl	H	328
VI	NO_2	H	H	282
VII	NH_2	H	H	252

С помощью ИМХ метода определяли этоин и его метаболиты в моче больных после лечения указанным антиэпилептическим препаратом. Этоин и его метаболиты выделяли из подкисленной мочи экстрагированием этилацетатом, силилировали и затем анализировали с помощью ГХ—МС [221].

С помощью ХМС метода, УФ-спектроскопии и сопоставления характеристик определяемых веществ и эталонов, полученных встречным синтезом, были идентифицированы два метаболита деалкилированного этоина (5-фенилгидантоина) и *n*-гидроксиэтоина 3-этил-5-(*n*-гидроксифенил)гидантоина. Количественный анализ проводили на основании определенной заранее зависимости от концентрации отношения интенсивностей аналитического пика данного соединения на масс-хроматограмме и пика внутреннего стандарта (мефенитоин). Было показано, что чувствительность метода во много раз выше, чем это необходимо для анализа этоина и его метаболитов в моче больных после лечения этим препаратом.

Хаегеле и др. [235] разработали метод определения в крови гипотензивного препарата — гидралазина (1-гидразинофталазина) и изучали его метаболизм. Исследование проводили с применением комбинированной системы хроматограф — масс-спектрометр — ЭВМ фирмы Hewlett — Packard (модели 5110A, 5980A и 5933A). Разделение осуществлялось на стеклянной колонке (0,9 м × 4 мм), заполненной 3% OV-17 на Хромо-

сорбе W (80—100 меш), газ-носитель гелий (40 мл/мин), температура программировалась в интервале 170—240 °С со скоростью 4 °С/мин, температура испарителя 250 °С. Хроматограф был соединен с масс-спектрометром через мембранный сепаратор. Температура ионного источника 210 °С, энергия ионизирующих электронов 25 эВ.

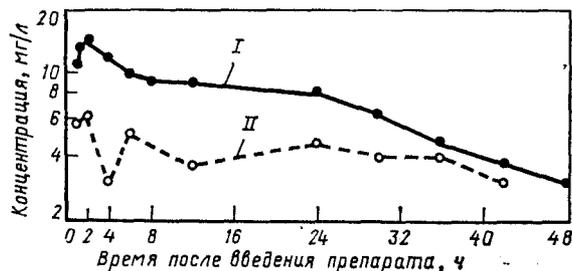


Рис. 3-8. Изменение концентрации клоназепам (I) и его метаболита (II) в крови [234].

Метаболизм гидралазина изучался *in vivo* и *in vitro*. В первом случае ХМС исследованию подвергались экстракты, выделенные из мочи крыс, во втором — изучались экстракты из печени крыс. На основании полных масс-спектров синтезированных эталонных соединений были выбраны пики для анализа методом селективного ионного детектирования. Полученные данные дали возможность установить схему метаболизма гидралазина.

Изучение метаболизма [236] гипотензивного ЛП — дебрисоцинсульфата показало, что основным метаболитом является его 4-гидроксипроизводное. Это соединение также обладает определенной активностью, поэтому было необходимо совместно определять в плазме крови как ЛП, так и его метаболит. Анализ проводили с помощью метода [237], основанного на экстракции с последующим получением производных гексафторацетилацетона и исследованием этих производных с помощью ГХ—МС метода с ЭУ ионизацией в режиме МИД. Ионы с массами 344, 347 и 356 детектировали четырехканальным автоматическим селектором пиков (ширина каналов 0,5 а. е. м., время измерения 10 мс/канал).

Использование в качестве внутреннего стандарта d_{10} -дебрисокинсульфата позволило получить линейные калибровочные кривые. Нижний предел количественного определения оказался равным для дебрисокина 1 нг/мл плазмы и его метаболита — 5 нг/мл. Возможно снижение уровня обнаружения, однако при этом точность определения меньше.

С помощью этого метода авторы [237] определяли содержание препарата и его метаболита в плазме крови больных, полу-

чавших терапевтические дозы ЛП. Анализ кривых изменения концентрации ЛП и его метаболита в плазме после приема одной дозы ЛП *per os* показал, что, хотя 4-гидроксидебрисокин присутствует в больших количествах, чем основной препарат, он выводится гораздо быстрее и не обнаруживается уже через 24 ч.

Был предложен метод количественного определения примидона (I) и его метаболитов [238], фенобарбитала (II), фенилэтилмалондиамида (III) и гидроксифенобарбитала (IV) в сыворотке крови, моче, слюне, грудном молоке и тканях. После прибавления метильных аналогов I—III (внутренние стандарты) и насыщения сульфатом аммония образцы (5—100 мкл) экстрагировали дважды смесью этилацетат — бензол (20:80). Экстракты делили на две равные порции: одну порцию этилировали по методу Грили для анализа I, II и IV, в то время как другую порцию триметилсилилировали для анализа I и III. Образцы анализировали с помощью ГХ—МС методом МИД. Нижний предел обнаружения составляет 1,4—3,7 нг/мл; относительное стандартное отклонение 3,2—5,9 %.

Карбамазипин (5*H*-дibenzo [*b, f*]азепин-5-карбоксаимид) является эффективным средством против эпилепсии. Более половины метаболитов долго время не удавалось идентифицировать, так как они практически не разделяются на набивных колонках и интенсивно перегруппировываются в иминостильбен и производные акридина в процессе ГХ анализа. Однако мягкие условия разделения, характерные для ВЭЖХ, в значительной степени облегчают решение данной аналитической проблемы. В работе [239] был использован метод ВЭЖХ с обращенной фазой для выделения и разделения метаболитов карбамазипина из мочи крыс с последующим ГХ и ГХ—МС анализом. Было идентифицировано 2 метаболита карбамазипина — его *цис*-10,11-дигидродиол- и *O*-метилкатехин-производные.

Как уже упоминалось, пожалуй, единственным серьезным недостатком ГХ—МС метода является невозможность анализа труднолетучих соединений. Один из путей преодоления этого связан с введением в аналитическую схему пиролитической установки [240].

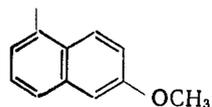
Рой и Шинаи [241] применили пиролитическую хромато-масс-спектрометрию (ПХМС) при исследовании 14 пенициллинов и кефалоспоринов; анализируя распад соответствующих амидов при электронном ударе, они получили данные о типе заместителей в ядрах. Более того, была показана возможность количественного анализа: калибровочная зависимость была линейной в интервале 10 нг — 10 мкг.

Пиролиз в точке Кюри и хромато-масс-спектрометрия были применены Ирвином и соавт. [242] для установления структуры некоторых сульфамидных ЛП. При этом оказалось, что большинство изученных ЛП этого типа распадалось с выделением

сульфонамидной группы и образованием характеристического гетероциклического амина и анилина, который обнаруживался на всех пирограммах и мог быть использован в качестве внутреннего стандарта. Показано, что с помощью ПХМС можно быстро и точно идентифицировать сульфонамиды. Предложенная методика оказалась приемлемой для анализа смесей сульфамидных ЛП в присутствии других ЛП. В дальнейшем этот метод использовали Слек и Ирвин [243] для анализа производных пропионовой кислоты, применяемых в качестве болеутоляющих и жаропонижающих средств. Эти препараты отвечают формуле



R: $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (ибупрофен); $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OC}_6\text{H}_5$ (фенопрофен)



(напроксен) $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(\text{O})-\text{C}_6\text{H}_5$ (кетопрофен)

При их пиролизе (770°C) образуются два компонента (RCH_2CH_3 и $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}_2$), определение которых не представляет затруднений. Разработанная методика была далее использована для расшифровки метаболитов болеутоляющих препаратов.

3.5. КЛИНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Хромато-масс-спектрометрия позволяет получать ценную информацию в следующих областях клинической химии:

- 1) идентификация токсичных и вредных соединений и определение их концентраций в сыворотке крови и в моче;
- 2) диагностика врожденных нарушений обмена веществ; большое число таких заболеваний может быть диагностировано методом ХМС, и поэтому системы скрининга, используемые при диагностике, должны быть дополнены или даже полностью заменены методом ГХ—МС;
- 3) рутинный анализ микроколичеств соединений;
- 4) обнаружение нарушений обмена веществ на основании результатов ХМС анализов аномальных метаболитов.

Одно из положений современной биомедицины гласит, что многие, если не все, заболевания вызваны в определенной степени отклонением от нормального течения некоторых из десятков тысяч химических реакций, протекающих в клетках и тканях организма [244]. Для диагностики заболеваний необходимо однозначно установить связь между всеми известными заболеваниями и характеристическими изменениями биохимического состава клеток и физиологических жидкостей. Один из шагов в этом направлении — детальный анализ характерных многокомпонентных смесей физиологических жидкостей. Основным методом такого анализа стал ХМС метод, который практически

вытеснил ранее применявшуюся для этой цели ГХ. Профильный анализ применим для определения различных классов биологически важных соединений, и для его осуществления требуются лишь микролитры физиологической жидкости.

Методы регистрации профилей метаболитов рассмотрены в обзоре [245]. Хроматографические методы, которые применялись ранее, последовательно заменяются методом ГХ—МС и, в конечном счете, методом ГХ—МС—ЭВМ. Профили для большого числа метаболитов были определены при анализе мочи с применением методов ГХ—МС—ЭУ и ГХ—МС—ХИ [246].

Описанная в работе [247] система ГХ—МС—ЭВМ позволяет получить информацию о 500—800 метаболитах в образцах, выделенных из сыворотки крови и мочи. Эта скрининговая система служит для определения профилей метаболитов. В основе лежит использование 8 различных ГХ систем, обеспечивающих разделение смеси на 600—800 хроматографических пиков, анализируемых масс-спектрометром, соединенным с компьютером, в памяти которого хранится более 25 000 спектров, причем время выбора полного аутентичного масс-спектра составляет 7 с. Разработанная система позволяет определять около 40 известных врожденных нарушений обмена. Некоторые из них были открыты с помощью данной системы и затем подтверждены клиническими методами (табл. 3-3).

Существенным недостатком применения ГХ—МС метода для профильного анализа является невозможность анализа малолетучих соединений, которые составляют более 75 % всех веществ, присутствующих в физиологических средах (белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, нуклеозиды и др.). Большие перспективы для анализа этих веществ связаны с сочетанием ВЭЖХ с масс-спектрометрией.

Стероиды, стерины и желчные кислоты. В обзоре [248] рассматриваются вопросы применения масс-спектрометрии в клинической эндокринологии, в том числе при изучении стероидных гормонов с помощью метода СИД.

Метаболизм стероидов у новорожденных исследовался в ряде работ. В частности, с помощью ХМС метода были установлены количественные и качественные различия в характере метаболизма кортикостерона в организме новорожденных и взрослых [249]. Дёркс и Драйер [250] обнаружили в моче новорожденных полярные кортистероидные метаболиты, гидроксированные по положению 6; сопоставление ХМС характеристических метаболитов с синтезированными эталонными соединениями позволило идентифицировать их как 6α -гидрокситетрагидрокортизон, 6α -гидрокси- 20α -кортолон и 6α -гидрокси- 20β -кортолон.

ГХ—МС метод с разделением на стеклянных капиллярных колонках применялся для анализа профилей стероидных метаболитов при патологических изменениях в организме [251]. Методом жидкостной гель-хроматографии в сочетании

Т а б л и ц а 3-3. Врожденные нарушения обмена, обнаруженные методом ГХ — МС — ЭВМ [247]

Заболевание	Специфические метаболиты
Алкаптонурия	Гомогентизовая кислота
Карнозинемия	Карнозин
Лактоацидоз	Молочная кислота
Цистатининурия	Цистатинин
Цистинурия	Цистин
Сахарный диабет	Глюкоза; β -гидроксимасляная и ацетоуксусная кислоты
Эссенциальная левулезурия	Фруктоза
Эссенциальная пентозурия	L-Ксилоза
Галактоземия	Галактоза, аминокислоты
Болезнь Хартнупа	Нейтральные аминокислоты
Гистидинемия	Гистидин, имидазолуксусная кислота
Гомоцистинемия	Гомоцистин, метионин
β -Гидроксизовалериановая ацидурия и β -метилкротонилглицинурия	β -Гидроксизовалериановая кислота, β -метилкротонилглицин
Гидроксиллизинурия	Гидроксиллизин
Гидроксипролинемия	Гидроксипролин
Гипер- β -аланинемия	β -Аланин; β -аминоизомасляная и γ -аминомасляная кислоты
Гиперлизинемия	Лизин
Гиперметионинемия	Метионин, α -кето- γ -метиолмасляная кислота
Гипероксалурия	Щавелевая, гликолевая и глиоксилотная кислоты
Гиперпролинемия	Пролин
Гиперсаркозинемия	Саркозин
Гипертриптофанемия	Триптофан
Гипервалинемия	Валин
Изовалериановая ацидемия	Изовалериановая и β -гидроксизовалериановая кислоты, изовалерилглицин
Заболевание со специфическим сгущением мочи	Валин, лейцин, изолейцин; α -кетоизовалериановая, α -кетоизокaproновая и α -кето- β -метилвалериановая кислоты
Метилмалоновая ацидемия	Метилмалоновая кислота
Ацетотиновая гиперглицинемия	Глицин
Заболевание со специфическим изменением мочи	α -Гидроксимасляная кислота
Орнитинемия	Орнитин
Оротацидурия	Оротовая кислота
Фенилкетонурия	Фенилаланин; фенилпировиноградная, фенилмолочная и о-гидроксибензилуксусная кислоты
Пропионовая ацидемия	Пропионовая кислота
Пироглутаминовая ацидурия	Пироглутаминовая (пирролидон-2-карбоновая) кислота
Болезнь Рефсама	Фитановая кислота
Почечная гликозурия	Глюкоза
Повышение уровня в крови жирных кислот с короткой цепью	Масляная и капроновая кислоты
Тирозиноз	Тирозин; <i>n</i> -гидроксифенилпировиноградная и <i>n</i> -гидроксифенилмолочная кислоты

с последующим ГХ—МС анализом получены данные о полном профиле эстрогенов в моче, а также идентифицирован 4-гидроксистероид в моче беременных женщин. Были также получены данные о профиле метаболитов стероидов для мужчин и женщин [248]. В процессе исследования стероидов применялись также методы выделения индивидуальных нейтральных стероидов мочи с последующим ГХ—МС анализом [252].

Определение стероидных гормонов (эстрадиол, эстроил, тестостерон, прогестерон, альдостерон и кортизол), основанное на методе изотопного разбавления и ГХ—МС анализе, рассмотрено в обзоре Сикмена [253]. В частности, метод СИД с меченым соединением в качестве внутреннего стандарта применен для количественного определения сывороточного холестерина.

С помощью ХМС метода и изотопного разбавления измеряли содержание прогестерона в моче; аналитической характеристикой служил пик молекулярного иона с массой 460, относящийся к 3-енолпентафторпропионил-производному прогестерона, количественный анализ проводился методом СИД. Внутренним стандартом служил дидейтерированный прогестерон. Количественный ХМС анализ с меченым дейтерием аналогом в качестве внутреннего стандарта был применен при анализе тетрагидродезоксикортикостерона [254]. Эстрадиол сыворотки также определяли с помощью метода СИД, причем внутренним стандартом служил эстрадиол, меченный дейтерием в положениях 2, 4, 16, 16 [255]. В работе [256] были показаны большие возможности ионной масс-хроматографии с МСВР при изучении стероидов.

Метод ГХ—МС сыграл очень важную роль в исследовании метаболизма желчной кислоты в организме человека. Он использовался для установления различных стадий болезни, связанных со специфическими нарушениями в путях биосинтеза желчной кислоты или ее метаболизма [257]. При этом в ряде случаев наряду с методом ЭУ применяли метод ХИ, например при изучении продуктов метаболизма 3- α -сульфата литохоловой кислоты (газ-реагент и газ-носитель метан) [258]. При исследовании желчных кислот методом СИД анализировали диметилэтилсилиловые эфиры изучаемых желчных кислот [259]. При этом сравнивались данные, полученные при обследовании больных с гиперлипипротенемией, и при обследовании контрольной группы [260].

Простагландины и родственные соединения. Простагландины, патологические изменения их содержания и особенно их роль в воспалительных процессах были предметом многих исследований, особенно после того, как было показано, что противовоспалительные ЛП оказывают ингибирующее действие на синтез простагландинов [261]. Хемберг и Самуэлсон [262] показали, что основным метаболитом простагландинов PGE-1 и PGE-2 в моче человека является 7- α -гидрокси-5,11-дикетотетранорпростан-1,16-диовая кислота (I). Было показано [261,

263], что терапевтические дозы таких лекарств, как индометацин и аспирин в значительной степени снижают концентрацию этого метаболита в моче. По всей видимости, это связано с ингибированием биосинтеза PGE-1 и PGE-2. В работах [261, 263] этот метаболит определяли с помощью ГХ—МС метода, используя в качестве внутреннего стандарта его дейтерированное производное. Уолкер и соавт. [264] модифицировали этот метод для определения метаболита (I) в моче больного ревматоидным артритом, подвергнутого лечению индометацином. Внутренний стандарт содержал тритий для контроля за выделением метаболита и дейтерий для изменения его молекулярной массы. Для анализа использовали смешанное диметил-оксимтриметилсилил-производное. Анализ проводили на хромато-масс-спектрометре фирмы Finnigan (модель 3200). В случае ЭУ ионизации образец разделяли на стеклянной капиллярной колонке (10 м × 0,25 мм) с SE-30 и вводили в масс-спектрометр без деления потока (температура колонки 230 °С; газ-носитель гелий, 2 мл/мин, энергия ионизирующих электронов 70 эВ). В случае ХИ использовали колонку длиной 1,5 м с 3% OV-17 (температура колонки 260 °С, температура инжектора 270 °С, скорость газа-носителя 15 мл/мин, газ-реагент метан, давление в источнике около 100 Па). Данные МИД обрабатывали с помощью компьютера. В случае ЭУ регистрировался пик иона $[M - (90 + 31)]^+$, а в случае ХИ — пик иона MH^+ . Предел обнаружения для этого метода равен 0,5 нг/мл моче.

Изменение состава простагландинов при различных заболеваниях было изучено методом ГХ—МС с применением изотопного разбавления [265].

Хенсби, Дэллери и сотр. [266] использовали метод изотопного разбавления и ГХ—МС для измерения концентраций 6-оксо-PGF_{1α} в образцах крови, взятых одновременно у пяти больных из легочной артерии и левого желудочка сердца. Во всех случаях полученные данные свидетельствовали о том, что концентрация анализируемого соединения значительно выше в левом желудочке сердца (207 ± 33 пг/мл) по сравнению с легочной артерией (131 ± 13 пг/мл). Эти результаты доказывают, что PGI₂ (простаглицлин) высвобождается в процессе прохождения крови через легкие. Дальнейшее исследование показало, что концентрация 6-оксо-PGF_{2α} в крови 16 мужчин с диабетом была значительно ниже (среднее 98,8 пг/мл), чем у здоровых (132,9 пг/мл), что указывало на недостаточное образование PGI₂ при диабете.

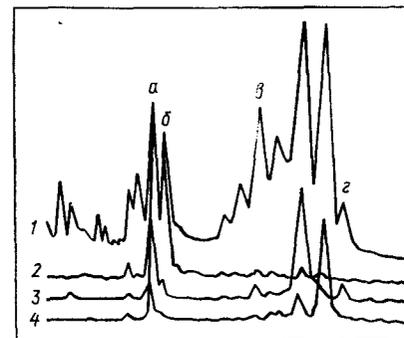
Стимулирование метаболизма арахидоновой кислоты в коже человека под воздействием ультрафиолетового облучения (100—290 нм) изучали Грейс и соавт. [267], которые использовали ХМС метод с изотопным разбавлением для количественного определения арахидоновой кислоты, PGE₂ и PGF_{2α} в коже (в норме и после облучения). Содержание всех трех соединений повышалось после облучения, однако предварительный

(до облучения) прием индометацина полностью подавлял образование PGE₂ и PGF_{2α}.

Профильный анализ простагландинов в семенной жидкости осуществляли методами МИД и циклической развертки (m/z 40—800 каждые 12 с) [268]. В последнем случае использовали хромато-масс-спектрометр LKB 9000 S с капиллярной колонкой

Рис. 3-9. Масс-хроматограммы ТМС-производных простагландинов в семенной жидкости [268]:

1 — ПИТ; 2 — m/z 225; 3 — m/z 353; 4 — m/z 424; а — PGE₂; б — PGF_{1α}; в — 19-OH-PGE₁.



WCOT (25 м × 0,35 мм с OV-101). Простагландины анализировали в виде смешанных метилоксимтриметилсилильных или метилоксимсложноэфирных триметилсилильных производных. Масс-хроматограммы получали с помощью ЭВМ по полному ионному току и по характеристическим ионам. На рис. 3-9 приведена масс-хроматограмма одного из образцов экстракта семенной жидкости. Сопоставление методов МИД и циклической развертки показывает, что в последнем случае удается более полно выявить специфические особенности смеси, однако чувствительность метода МИД выше. В случае циклической развертки предел обнаружения простагландинов был 50 нг.

Сейберт и сотр. [269] использовали метод СИД для анализа PGF_{2α} и 7-α-гидрокси-5,11-диоксотетранорпростан-1,16-диоловой кислоты в моче человека. Было показано, что капиллярные колонки обеспечивают лучшее разделение, чувствительность и специфичность по сравнению с набивными.

Чувствительность определения простагландина PGF_{2α} была на уровне 50 фемтограмм (5 · 10⁻¹⁴ г). Простагландины PGF_{2α} и PGE₂ определяли при анализе 1 мл плазмы крови, сыворотки, спинномозговой жидкости, экссудатов на ГХ—МС системе с масс-спектрометром MAT 311A и цельностеклянной колонкой со специальной набивкой, обеспечивающей минимальные хвосты хроматографических пиков и малые времена удерживания. Анализ проводили по методу МИД или СИД, так, PGF_{2α} анализировали по пику ионов с массой 423.

Органические кислоты. Среди большого числа характеристических соединений важную роль играют органические кислоты, определению которых в физиологических жидкостях методом ХМС посвящено значительное число работ. Так называемая фракция органических кислот физиологических жидкостей содержит моно- и поликарбоновые кислоты, моно- и полигидроксикислоты, кетокислоты, фенолы, гидроксibenзолкарбоновые

Т а б л и ц а 3-4. **Нарушения метаболизма, обнаруженные с помощью хромато-масс-спектрометрического метода [244]**

Заболевание	Специфические метаболиты
Метилмалоновая ацидурия Тип I	Метилмалоновая и пропионовая кислоты
Тип II Метилмалоновая и 3-гидрокси- <i>n</i> -валериановая ацидемия	Гомоцистин; метиллимонная кислота Метилмалоновая, пропионовая, 3-гидрокси- <i>n</i> -валериановая кислоты; жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода
Пропионовая ацидемия Тип I биотиннечувствительная	Пропионовая, 3-гидроксипропионовая, метиллимонная кислоты
Тип II биотинчувствительная	3-Гидрокси-3-метилглутаровая и 3-гидроксимасляная кислоты; пропионилглицин
3-Метилкротонил-СоА-карбоксилазная недостаточность Тип I биотиннечувствительная	3-Метилкротонилглицин; 3-гидроксиизовалериановая кислота
Тип II биотинчувствительная	3-Метилкротонилглицин, триглицин; 3-гидроксиизовалериановая и 3-метилкротоновая кислоты
Тип III	2-Оксоглутаровая и 3-гидроксиизовалериановая кислоты (отсутствует 3-метилкротонилглицин)
Ацил-СоА-дегидрогеназная недостаточность (конгенитальная дикарбоксильная ацидурия)	Насыщенные C ₈ —C ₁₄ дикарбоновые кислоты; C ₁₀ —C ₁₄ <i>цис</i> -5-мононенасыщенные и C ₁₀ и C ₁₂ <i>транс</i> -3-мононенасыщенные дикарбоновые кислоты
2-Метилацетоуксусная и 2-метил-3-гидроксимасляная ацидурия	2-Метилацетоуксусная, 2-метил-3-гидроксимасляная кислоты; тиоглицин
D-Глицериновая ацидемия Тип I	D-Глицериновая кислота, глицин
Тип II	D-Глицериновая кислота
2-Кетoadипиновая ацидурия	2-Кетoadипиновая, 2-гидроксиадипиновая и 2-аминоадипиновая кислоты
Глутаровая ацидурия Тип I	Глутаровая, 2-гидроксиглутаровая и глутаконовая кислоты
Тип II	Глутаровая (отсутствует глутаконовая), изовалериановая, пропионовая, 2-метилмасляная, этилмалоновая и 3-гидроксимасляная кислоты и несколько метаболитов, связанных с ацидозами
Карнитиновая недостаточность	Адипиновая, пимелиновая и субериновая кислоты
3-Гидрокси-3-метилглутаровая ацидурия	3-Гидрокси-3-метилглутаровая, 3-метилглутаконовая, 3-гидроксиизовалериановая и 3-метилглутаровая кислоты (отсутствует 3-метилкротоновая)
Глицеринурия	Глицерин

кислоты и конъюгаты органических кислот, в частности, с глицином. ГХ—МС анализу этих соединений обычно предшествует получение производных при взаимодействии их с донорами метил- и алкилсилильных групп, diaзометаном и другими метилирующими агентами. Благодаря профильному анализу с использованием ХМС метода до начала 1977 г. было открыто 23 новых заболевания. В табл. 3-4 перечислены некоторые вновь обнаруженные нарушения обмена и специфические для них характеристические соединения.

Гейтс и соавт. [270] осуществили количественный анализ 134 органических кислот в моче 9 взрослых и 5 детей с нейробластомой, а также контрольной группы (5 человек); было идентифицировано 60 новых эндогенных органических кислот, а также подтверждено наличие еще 81 соединения. При сопоставительном исследовании здоровых людей и пациентов с нарушениями обмена ХМС методом были идентифицированы циннамоилглицин и ацетилтрибутилцитрат, которые ранее не обнаруживались.

Специальная компьютерная программа была разработана и применена для сопоставительного анализа профилей органических кислот, выделенных из мочи с помощью ионообмена и экстракции растворителями. В этом исследовании использовали ГХ высокого разрешения с МСВР. Результаты показали высокую эффективность такого подхода.

О-Триметилсилилхиноксаинолпроизводные использовали при ГХ—МС анализе α -оксокислот. Удалось осуществить количественное определение разветвленных α -оксокислот из различных физиологических сред [271] и β -фенилвиноградную кислоту в спинномозговой жидкости [272]. Метод СИД применяли для количественной оценки ТМС-производных адипиновой, пробковой и себаценовой кислот в сыворотке крови и моче (внутренний стандарт — 3,3-диэтилглутаровая кислота).

Сочетание ГХ высокого разрешения с МС позволило впервые идентифицировать гидроксигексановую кислоту в моче. В моче детей с нарушением обмена веществ впервые идентифицированы ХМС методом 3',4'-дезоксинорлауданозинкарбоновая кислота [273] и 2-дезоксид-эритропентоновая кислота, 2-дезоксид-трео-пентоно-1,5-лактон и 2-дезоксид-эритропентоно-1,4-лактон, *цис*-3,4-метилгександионовая кислота [274].

Биогенные амины и родственные соединения. Большинство масс-спектрометрических работ, посвященных исследованию биогенных аминов и родственных соединений, связано с применением для количественных определений метода СИД, который позволяет изучать метаболизм биогенных аминов в физиологических жидкостях. Здесь особую роль сыграли высокочувствительные методы с использованием ХИ [275]. С помощью этого метода были измерены концентрации мелатонина, индолалкиламинов в пробах крови человека на уровне 1 пг/мл.

Методом СИД был проведен анализ стабильных спироциклических производных, образующихся при обработке мелатонина пентафторпропионовым ангидридом (внутренний стандарт — тетрадеутерированный мелатонин). Сопоставление методов ХИ и ЭУ показало, что в данном случае чувствительность метода ХИ (газ-реагент и газ-носитель метан) в 150 раз выше по сравнению с методом ЭУ. Метод СИД при ЭУ ионизации был применен также для определения мелатонина и 5-метокситриптофала в плазме крови человека [276].

Метод ХМС был также использован для количественного определения в сыворотке крови человека эндогенных индолов — триптофана, N-ацетилтриптофана и кинуренина [277].

Синтез серотонина в мозге зависит от количества триптофана в нем и регулируется уровнем свободного триптофана в плазме крови. В ряде работ было показано, что содержание свободного триптофана в плазме крови понижено при депрессиях. Сравнительное изучение выделения кинуренина у здоровых людей и больных с депрессией показало, что у последних относительно повышено выделение метаболита кинуренина. Это свидетельствует о том, что пониженный уровень триптофана у больных с депрессией связан с повышением активности триптофанпирролазы.

Согласно другой гипотезе, шизофрения является также результатом нарушения нормального пути превращения триптофана в ниацин. С этих позиций измерение активности триптофанпирролазы *in vivo*, осуществляемое с помощью ГХ—МС, представляет значительный интерес. Косвенным методом, также осуществляемым *in vivo*, может быть введение больным дейтерированного L-триптофана с последующим измерением образующегося кинуренина и остаточного L-триптофана в сыворотке (метод СИД). С этой целью был предложен специфический метод определения дейтерированного и недеутерированного N-ацетилтриптофана, триптофана и кинуренина в сыворотке крови и моче с использованием ИМХ метода. N-Ацетилтриптофан анализировался в виде N-триметилсилилового эфира, триптофан и кинуренин — в виде N-пентафторпропионилметилового эфира (внутренние стандарты N-ацетил-DL-триптофан- d_{11} , триптофан- d_8 и кинуренин- d_2).

При анализе производного триптофана в качестве аналитического был выбран пик молекулярного иона с массой 364 (8% от полного ионного тока), хотя по интенсивности он уступает пику иона с массой 130 (индольный радикал), являющемуся максимальным в спектре. В масс-спектре дейтерированного производного ацетилтриптофана лишь молекулярные ионы содержали все введенные атомы дейтерия. Поэтому для анализа использовались также пики ионов $(M-CH_2OH)^+$ с массой 332. Такие же ионы с массой 482 были выбраны для характеристики производного кинуренина, пики этих ионов имели интенсивность 2% от полного ионного тока. Результаты иссле-

дования показали, что с помощью предложенного метода можно определять относительную величину активности триптофанпирролазы, выражая ее в виде соотношения концентраций дейтерированных триптофана и кинуренина.

При помощи метода ГХ—МС были подтверждены результаты ГХ исследования N,N-диметилтриптамина и N-монометилтриптамина в моче [278]. Для определения элементного состава ионов MH^+ трифторацетильного производного N,N-диметилтриптамина, образующегося при химической ионизации, был применен метод СИД (масс-спектрометр с разрешающей силой 6000).

С помощью ГХ—МС—ХИ (газ-реагент изобутан) методом СИД был проведен анализ эpineфрина, норэpineфрина и допамина в образцах мозга человека; в качестве внутреннего стандарта был взят α -метилдопамин. Меченные дейтерием внутренние стандарты применялись при анализе 5-гидрокситриптофана в спинномозговой жидкости человека [279] и 5-метоксииндол-3-уксусной кислоты в моче [280].

Катехин и его метаболиты в моче были проанализированы с помощью ХМС метода изотопного разбавления. Широкое использование меченых соединений при анализе катехоламинов потребовало тщательной разработки методов синтеза дейтерированных катехоламинов, метаболитов катехоламинов и метаболитов триптофана [281, 282].

Одна из проблем изучения нарушений психики связана с сопоставлением концентраций нейротрансмиттеров и их метаболитов в биологических жидкостях нормальных и психически неустойчивых субъектов. Так, в работах [283, 284] концентрации 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты (I), гомованильевой кислоты (II) и 3-метокси-4-гидроксифенилэтиленгликоля (III) — основных метаболитов серотонина, допамина, норэpineфрина, соответственно — были измерены в моче и спинномозговой жидкости с целью описания нейрохимических отклонений, которые могут возникнуть в процессе развития психического заболевания. Был разработан метод измерения концентраций I, II, III, 3,4-дигидроксибензилуксусной кислоты (IV) и *n*-(ди-*n*-пропилсульфамил)бензойной кислоты (V) в малых количествах спинномозговой жидкости [285]. Соединения I—V одновременно экстрагировались этилацетатом из подкисленной водной фазы и одновременно превращались в пентафторпропионильные эфиры реакцией с пентафторпропионовым ангидридом и пентафторпропанолом. В дальнейшем эти образцы анализировали методом ГХ—МС с использованием в качестве внутреннего стандарта дейтерированных соединений в случае метаболитов и химического аналога в случае соединения V. Анализ проводили на хромато-масс-спектрометре фирмы Finnigan (модель 3200). Параметры источника устанавливали по максимуму сигнала иона с массой 464, образованного при диссоциации калибровочного газа (перфтортри-*n*-бутиламин). Пределы обнаружения и

количественного анализа для различных соединений составляют 4—100 нмоль.

Количественное определение адреналина и норадреналина в плазме крови необходимо для решения ряда вопросов клинической химии. Уонг и соавт. [286] применили метод ИМХ с масс-спектрометром низкого разрешения при анализе их пертрифтор-

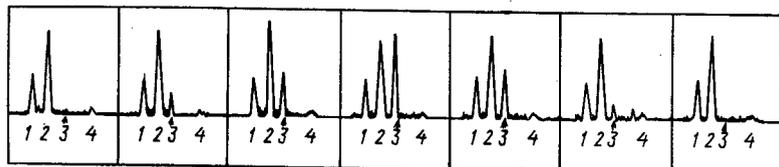


Рис. 3-0. Часть масс-спектра N-ТФА — О-ТМС-производных катехоламинов в плазме крови [287].

Стрелкой указано положение пика иона $C_{16}H_{31}O_3N_3$ (m/z 355, 1568); 1 — m/z 354, 9726; 2 — m/z 355,0683; 3 — m/z 355,1568; 4 — m/z 355,3272.

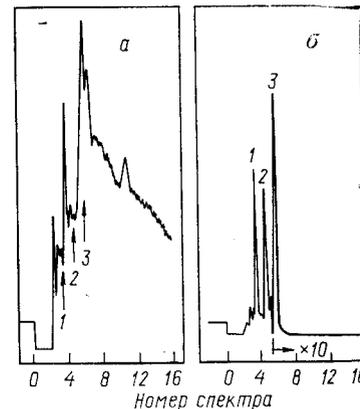
ацетильных производных. Недостатком метода, помимо необходимости анализа в области низких масс, была нестабильность, связанная с плохим разделением производных на хроматографе. Якоб и соавт. [287] разработали метод анализа катехоламинов с применением ИМХ—МСВР, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью. Метод был применен для одновременного определения адреналина и норадреналина в плазме крови. Исследуемые катехоламины выделяли адсорбцией на оксиде алюминия и превращали в соответствующие N-трифторацетил-О-триметилсилилпроизводные. Анализ проводили на масс-спектрометре с двойной фокусировкой (MAT 311A), который был соединен с газовым хроматографом фирмы Varian 1440 через интерфейс — одноступенчатый стеклянный диффузионный сепаратор. Между хроматографической колонкой и сепаратором имелось устройство для удаления больших количеств растворителя. Устройство peak matching обеспечивало точное измерение масс при использовании ПФК в качестве внутреннего стандарта. Колонка (2 м × 2 мм) содержала 4 % OV-17 на Хромосорбе WAW DMCS; газ-носитель гелий (30 мл/мин); температура инжектора 250 °С, колонки 200 °С, сепаратора 250 °С, ионного источника 160 °С; энергия электронов 70 эВ; разрешающая способность 5000; детектируемая масса 355,1563.

Масс-спектры изученных производных катехоламина имели слабый пик молекулярного иона; максимальный пик в спектре соответствовал бензильным фрагментам с массой 355 и использовался для анализа методом ИМХ. Этот ион являлся общим для обоих катехоламинов и для внутреннего стандарта изопреналина.

Детектирование бензильных фрагментов при низком разрешении оказалось невозможным ввиду наличия многих ионов с одной и той же номинальной массой. На рис. 3-10 приведена часть масс-спектра, полученного при разрешающей способности около 5000, в интервале масс от 354,5 до 355,5. В этом интервале наряду с пиком бензильного фрагмента внутреннего стан-

Рис. 3-11. Масс-хроматограммы плазмы крови при низком (а) и высоком (б) разрешении [287]:

а — $R = 1000$, m/z 355; б — $R = 5000$, m/z 355,1568; 1 — норадреналин; 2 — адреналин; 3 — изопреналин.



дарта изопреналина ($C_{16}H_{31}O_3Si_3$, m/z 355,1568) находятся и другие пики, связанные с биологическим материалом и силиконовой фазой колонки.

Сопоставление результатов анализа одной и той же пробы плазмы крови с помощью ИМХ низкого разрешения (рис. 3-11а) и ИМХ высокого разрешения (рис. 3-11б) свидетельствует о превосходстве последнего метода. Следует особо подчеркнуть, что ИМХ низкого разрешения в этом случае дает совершенно неверные данные для соотношения интенсивностей пиков. Предел определения равен 2 пг введенного чистого образца. Коэффициент вариации равен 16 % при содержании катехоламина 0,2—0,7 нг/мл плазмы [287].

Аминокислоты. Имеется множество методов для выделения и анализа аминокислот в физиологических жидкостях. Эти методики используют метод ТСХ, высокоэффективную жидкостную хроматографию, хроматографию на бумаге и газовую хроматографию. Основным недостатком анализа аминокислот с помощью ГХ—МС является необходимость их выделения из биологических жидкостей для последующего анализа в газовой фазе. Чаще всего для этой цели применяют ионообменную хроматографию. Однако меченые аминокислоты могут потерять изотопную метку при долговременном пребывании в водных растворах при низких значениях рН, что является необходимым условием ионообменной процедуры.

Авторы работы [288] предложили новый метод выделения аминокислот из биологических жидкостей, свободный от недостатков ионообменной очистки. Метод быстр, удобен при анализе большого количества образцов и позволяет получить аминокислоты в форме, удобной для последующего ГХ и ГХ—МС анализа. Физиологическая жидкость (например, плазма) подкисляется до рН = 2 и экстрагируется диэтиловым эфиром для

удаления органических кислот и нейтральных соединений. После осаждения белков (трихлоруксусная кислота) водная плазма высушивается и обрабатывается для получения ТМС-производных. Органические соединения типа сахаров и аминокислот растворяются в петролейном эфире и отделяются от неорганических солей. Отделение сахаров от аминокислот достигается гидролизом водой, скорость которого различна для разных ТМС-производных. Смешиванием экстрактов петролейного эфира с малым количеством воды получают две фазы. Слой петролейного эфира содержит ТМС-производные сахаров плазмы, а водный слой характеризуется наличием свободных аминокислот и аминов.

ГХ—МС анализ фракций, полученных по схеме, предложенный авторами [288], осуществляли на газовом хроматографе фирмы Finnigan 9500, связанном через интерфейс (цельностеклянный диффузионный сепаратор) с квадрупольным масс-спектрометром фирмы Finnigan 3200. Масс-спектральные данные вводились для последующего анализа в систему обработки данных (Finnigan 6000), которая осуществляла также и контроль за проведением анализа. Разделение осуществляли на колонке с фазой 3 % SE-30 на Супелькопорте (100—120 меш); газ-носитель гелий (30 мл/мин). Инжектор, сепаратор и трубопроводы имели температуру 250 °С. Все масс-спектры были получены методом ионизации ЭУ с энергией электронов 70 эВ.

Количественный анализ тиразина, дофа и 3-О-метилдофа был проведен в изотермических условиях при 210 °С методом МИД. В качестве внутренних стандартов использовали ($^{18}\text{O}_2$) L-дофа, ($^{18}\text{O}_2$) 3-О-метилдофа, ($^{18}\text{O}_2$) тиразин [288]. Ионные масс-хроматограммы получали для пика иона с массой 218 для меченных дофа, 3-О-метилдофа и тиразина, так как этот ион является общим для всех трех аминокислот; для меченых соединений регистрировали пик иона с массой 222. Масс-спектрометр, управляемый ЭВМ, регистрировал эти масс-хроматограммы во время элюирования компонентов из газового хроматографа. После окончания анализа компьютер интегрировал площади каждого хроматографического пика, идентифицировал их, сопоставляя с известными временами удерживания; соотношения площадей пиков сравнивались с данными калибровки, полученными при анализе известных количеств каждой из аминокислот. Масс-спектральный анализ каждого образца плазмы завершался в течение 5 мин. Аналогичная процедура применялась для количественного определения в плазме ароматических аминокислот с той лишь разницей, что в этом случае в качестве внутренних стандартов были взяты меченные дейтерием L-дофа, тиразин и 3-О-метилдофа. Ионные масс-хроматограммы получали для ионов с массами 179, 181 и 182. ТМС-производные были относительно стабильны к водному гидролизу в процессе очистки аминокислот. Компоненты идентифицировали по их масс-спектрам. Основные компоненты представлены сахарами и

лимонной кислотой. Только при использовании масс-спектральной информации оказалось возможным определить, что тиразин элюируется вместе с гексозами. После водной экстракции в петролейном эфире единственными компонентами из смеси были сахара и лимонная кислота. Обнаружить аминокислоты не удалось даже в тех случаях, когда ионные масс-хроматограммы пытались получить по характеристическим ионам. Амины также удаляли из петролейного эфира водным гидролизом и экстракцией водой. В водной фракции не обнаружено сахаров; и аминокислоты, и амины были свободны от этих примесей. Эта методика использовалась для определения изменения во времени концентрации дофа, производных дофа и триптофана в плазме крови у больных, подверженных болезни Паркинсона и принимающих L-дофа в течение одного дня; пробы крови отбирали каждые 30 мин.

Вольфенсбергер и соавт. [289] разработали прямой метод определения глутаминов в виде производного 1,1,1,3,3,3-гексафторизопранола и пентафторпропионового ангидрида с помощью ИМХ при электроударной и химической ионизации. Анализ проводили на хроматографе Carlo Erba Fractovar 2101 AC, стеклянная колонка (50 см \times 2 мм) с 3 % QF-1 на Хромосорбе W (80—100 меш) присоединялась к масс-спектрометру Micromass 16F через одноступенчатый струйный сепаратор с температурой 250 °С. При работе в режиме ЭУ ионизации температура ионного источника 220°; ток эмиссии 50 мкА; энергия электронов 20 эВ; при работе в режиме ХИ газ-реагент изобутан, давление 10^{-3} Па; ток эмиссии 100 мкА; энергия электронов 50 эВ. При ХИ масс-хроматограмму регистрировали по пику иона с массой 426, при ЭУ ионизации — по пику иона с массой 230, чувствительность в этом случае была в 10 раз больше, чем при ХИ: предел обнаружения 0,3 и 3 пмоль соответственно. Этот метод оказался достаточно чувствительным и специфичным для изучения метаболизма глутамин и глутаминовой кислоты в тканях мозга.

В работе [290] дана оценка необходимой степени обогащения аминокислот, меченных ^{15}N , ^{13}C , ^{18}O , ^2H , при анализе методом СИД. Анализировались N-ацетил-n-пропиловые эфиры аминокислот, которые в случае ХИ (газ-реагент метан) образуют интенсивный пик иона MH^+ . Результаты исследования свидетельствуют, что для определения аминокислот в образце сыворотки крови объемом 100 мкл изотопный избыток ^{15}N должен быть не менее 0,08 % (ат.) В работе [291] было показано, что количественный анализ аминокислот, меченных ^{15}N с избытком 0,1 % (ат.) можно проводить методом СИД при ГХ—МС ХИ на уровне концентраций 0,1 нмоль.

Кингстон и Даффилд [292] сообщают об определении шестнадцати α -аминокислот в плазме крови методом СИД при выборе в качестве внутреннего стандарта аминокислот, меченных ^{13}C .

В организме человека часто обнаруживаются малые количества алкилирующих агентов, и многие из них являются канцерогенными. Для оценки степени проявления таких канцерогенов был предложен ряд методов, позволяющих определять количество производных S-алкилцистеина и N-алкилгистидина в гемоглобине. Например, Геллиман и соавт. [166], которые раз-

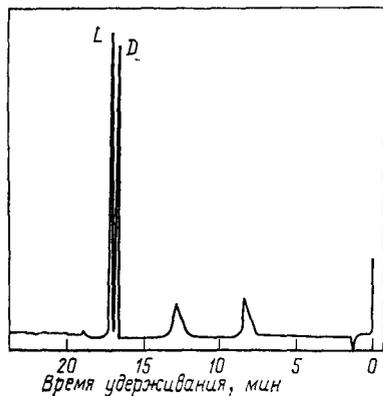


Рис. 3-12. Масс-хроматограмма иона m/z 288 экстракта гемоглобина морской свинки [166].

работали ГХ—МС метод количественного определения 3-(2-гидроксиэтил)гистидина в гемоглобине, нашли, что концентрация алкилированной аминокислоты составляла 0,4—13,5 нмоль на 1 г белка. Для количественной оценки такой концентрации с достаточной надежностью был разработан метод ГХ—МС—ХИ, ко-

торый в режиме МИД позволил определять S-метил-L-цистеин в гемоглобине при использовании дейтерированного соединения в качестве внутреннего стандарта. В дальнейшем удалось повысить чувствительность метода, работая в режиме СИД и применяя в качестве внутреннего стандарта D-Энантиомер S-метилцистеина, отсутствующий в природе, который отделялся от L-энантиомера на капиллярной колонке с хиральной фазой Хиразил-Вол [293, 294]. Внутренний стандарт добавлялся к образцу до гидролиза, частичная очистка гидролизата производилась на ионообменной колонке. Энантиомеры S-метилцистеина анализировались на капиллярной колонке в виде N-трифторацетил-n-бутиловых эфиров (рис. 3-12). Хроматографическая колонка соединялась через остеклованную трубку из нержавеющей стали с масс-спектрометром с двойной фокусировкой VG Micromass 70-70. При электроноударной ионизации масс-спектры производных S-метилцистеина оказались нехарактеристичными, поэтому для анализа была применена химическая ионизация с изобутаном в качестве газа-реагента. Максимальным пиком в масс-спектре был пик иона MH^+ с массой 328.

Метод селективного ионного детектирования по одному иону позволил в три раза увеличить чувствительность определения по сравнению с методом МИД и определять содержание S-метилцистеина на уровне концентраций ниже 0,1 нмоль/г. Недостатком метода является необходимость коррекции высот пиков на хроматограммах для учета возможной рацемизации в процессе подготовки образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *McFadden W.* Techniques of Combined Gas Chromatography — Mass Spectrometry. Applications in Organic Analysis. New York. J. Wiley and Sons, 1973.
2. *Millard B. J.* Quantitative Mass Spectrometry. London, Heyden and Son, 1979.
3. Quantitative Mass Spectrometry in Life Science/Ed by A. P. Leenheev, R. R. Ronoucci. Amsterdam etc., Elsevier, 1977.
4. *Budde W. L., Eichelberger J. W.* — Ann. Arbur Sci., Mich., 1979, p. 138.
5. *Gudzinowicz B. J., Gudzinowicz M. J.* Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography — Mass Spectrometry. V. 4. New York, Marcel Dekker, 1979.
6. Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine/Ed by A. Frigerio. New York, Plenum Press. v. 1, 1978, v. 2, 1979.
7. *Goodman S. I., Markey S. P.* Diagnosis of Organic Acidemias by GC — MS. Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine. V. 6. New York, A. R. Liss, 1981.
8. *Middledich B. S., Missler S. R., Hinds H. B.* Mass Spectrometry of Priority Pollutants. New York, Plenum Press, 1981.
9. Mass Spectrometry in the Environmental Science/Ed. by S. Safe, F. Karasek, O. Hutzinger. Oxford, Pergamon Press, 1982.
10. *Исидоров В. А., Зенкевич И. Г.* Хромато-масс-спектрометрическое определение следов органических веществ в атмосфере. Л., Химия, 1982.
11. *Shackleton C. H. L.* — GC — MS News, 1981, v. 9, p. 58.
12. *Grob K., Grob G., Grob K. Jr.* — J. High Res. Chromatogr. and Chromatogr. Commun., 1979, v. 1, p. 31.
13. *Brooks C. J. W., Edmonds C. G.* — In: Practical Mass Spectrometry/Ed. by B. S. Middledich. New York, Plenum Press 1979, p. 57.
14. *Pudde W. L., Eichelberger G. W.* Organic Analysis Using Gas-Chromatography/Mass Spectrometry. Ann Arbor Ann Arbor Science, 1979.
15. *Liebrand R. J.* — J. Chromatogr. Sci., 1975, v. 13, p. 556.
16. *Novotny M.* — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 1294A.
17. *Сысоев А. А., Чупахин М. С.* Введение в масс-спектрометрию. М., Атомиздат, 1977.
18. *Munson B.* — Anal. Chem., 1971, v. 43, p. 28A.
19. *Hunt D. F.* — Finnigan Spectra, 1976, v. 6, p. 1.
20. *Hunt D. F., Stafford G. C., Crow F. W. e. a.* — Anal. Chem., 1976, v. 48, p. 2098.
21. *Carroll D. I., Dzidic I., Horning E. C.* — Applied spectrosc. Rev, 1981, v. 17, p. 337.
22. *Milberg R. M., Carter C. J.* — J. Chromatogr. Sci., 1979, v. 17, p. 17.
23. *Lane D. A., Thomson B. A., Lovett A. M. e. a.* — In: Advances in Mass Spectrometry. V. 8B. London, Heyden and Son. 1980, p. 1480.
24. *Beckey H. D.* Principles of Field Ionisation and Field Desorption, Oxford etc., Pergamon Press, 1977.
25. *Король Э. Н., Лобанов В. В., Назаренко В. А., Покровский В. А.* — Физические основы полевой масс-спектрометрии. Киев, Наукова думка, 1978.
26. *Murphy R. C., Clay K. L., Mathews W.* — Anal. Chem., 1982, v. 54, p. 336.
27. *Heinen H. J., Meler S., Vogt H. e. a.* — Fresenius Z. Anal. Chem., 1981, v. 308, p. 290.
28. *Milberg R. M., Cook J. C.* — J. Chromatogr. Sci., 1979, v. 17, p. 43.
29. *Cotter R. J.* — Anal. Chem., 1980, v. 52, p. 1589A.
30. *Jennigs K. R.* — Anal. Proc., 1980, v. 52, p. 1589.
31. *Rapp U., Dielman G., Games D. E. e. a.* — In: Advances in Mass Spectrometry. V. 8B, London, Heyden and Son, 1980, p. 1660.
32. *Hardin E. D., Vestal M. L.* — Anal. Chem., 1981, v. 13, p. 1492.
33. *Green B. N., Kemp T. R., Wallington M. J.* — Pittsburgh Conf. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc., 1981, N 885.
34. *Feser K., Kögler W.* — J. Chromatogr. Sci., 1979, v. 17, p. 57
35. *Harvan D. J., Hass J. R., Wood D.* — Anal. Chem., 1982, v. 54, p. 332

86. Craig R. D. — Phil. Trans. R. Soc. (London), 1979, v. A293, p. 135.
87. Stafford G. C. — In: Mass Spectrometry. Part B. New York — Basel, 1980, p. 359.
88. McFadden W. H. — J. Chromatogr. Sci., 1979, v. 17, p. 2.
89. Ten Noever de Braw — J. Chromatogr., 1979, v. 165, p. 207.
90. Stan H.-J., Abraham B. — Anal. Chem., 1978, v. 50, p. 2166.
91. Watson J. T., Biemann K. — Anal. Chem., 1964, v. 36, p. 1135.
92. Ryhage R. — Anal. Chem., 1964, v. 36, p. 759.
93. Llewellyn P. M., Littlejohn D. P. — Pittsburgh Conf. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc., 1967.
94. Guichon G., Apfino P. J. — Anal. Chem., 1979, v. 51, p. 682A.
95. Тальрозе В. Л., Карнов Г. В., Городецкий И. Г., Скурат Б. Е. — ЖФХ, 1968, т. 42, с. 1658.
96. McFadden W. H. — J. Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, p. 97.
97. Caroll D. I., Dzidic I., Stillwell R. N. e. a. — Anal. Chem., 1975, v. 47, p. 2369.
98. Blackley C. R., Vestal M. L. — Anal. Chem., 1983, v. 55, p. 750.
99. Games D. E. — Anal. Proc., 1980, v. 17, p. 110.
100. Arpino P. S., Balduin M. A., McLafferty F. W. — Biomed. Mass Spectrom., 1974, v. 1, p. 80.
101. Tsude S., Hirata Y., Takeuchi T. — Anal. Chem., 1979, v. 51, p. 166.
102. Melera A. — In: Advances in Mass Spectrometry. V. 8B. London, Heyden and Son, 1980, p. 1597.
103. Blakley C. R., McAdams M. J., Vestal M. L. — Ibid., p. 1616.
104. Takeuchi T., Hirata Y., Ohumura Y. — Anal. Chem., 1978, v. 50, p. 660.
105. Blakley C. R., McAdams M. J., Vestal M. L. — J. Chromatogr., 1978, v. 158, p. 261.
106. Blakley C. R., Carmody J. J., Vestal M. L. — Anal. Chem., 1980, v. 52, p. 1636.
107. Tsude S., Yoshida Y., Takeuchi T. e. a. — Chem. Biomed. a. Envir. Instrum., 1980, v. 10, p. 405.
108. Kenndler E., Schmid E. R. — In: Instrumentation for High performance Liquid Chromatography/Ed. by J. R. K. Huber. Amsterdam, Elsevier, 1978, p. 163.
109. Christensen R. G., Tertz H. S., Melseiman S. — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 171.
110. Scott R. P. W., Scott C. G., Munroe M. e. a. — J. Chromatogr., 1974, v. 99, p. 395.
111. Jennings K. R. — Anal. Chem., 1980, v. 17, p. 320.
112. Smith R. D., Burger J. E., Johnson A. L. — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 1603.
113. Smith R. D., Johnson A. L. — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 739.
114. Games D. E. — Anal. Proc., 1980, v. 17, p. 322.
115. McFadden W. H., Schwartz H. L., Evans S. — J. Chromatogr., 1976, v. 12, p. 389.
116. Karger B. L., Kirby D. P., Vouras P. e. a. — Anal. Chem., 1979, v. 51, p. 2324.
117. Erdahl W. L., Privett O. S. — Lipids, 1977, v. 2, p. 797.
118. Braithwaite A. — Lab. Equipment Digest, 1980, p. 97.
119. Krien P., Devant G., Hardy M. — J. Chromatogr., 1982, v. 251, p. 129.
120. Arpino P. J., Guiochon G. — Anal. Chem., 1979, v. 51, p. 682A.
121. Chapman J. R. — J. Phys., 1980, v. E13, p. 365.
122. Kimble B. J. — In: High Performance Mass Spectrometry/Ed. by M. L. Gross. Washington, Amer. chem. soc., 1978, p. 120.
123. Perone S. P., Jones D. O. Digital Computers in Scientific Instruments. New York, McGraw-Hill, 1973.
124. Hites R. A., Biemann K. — Anal. Chem., 1967, v. 39, p. 965.
125. Carrick A. — Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 1969, v. 2, p. 333.
126. Hedfjall B., Ryhage R., Akerlind A. — In: Advances in Mass Spectrometry. V. 6/Ed. by A. R. West. Applied Sci. London Publ., 1974, p. 1043.
127. Caprioli R. M., Fies W. F., Story M. S. — Anal. Chem., 1974, v. 46, p. 453A,
128. Sweeley C. C., Elliott W. H., Fries I., Ryhage R. — Anal. Chem., 1966, v. 38, p. 1549.
129. Young N. D., Holland J. F., Gerber J. N., Sweeley C. C. — Anal. Chem., 1975, v. 47, p. 2373.
130. McMurrey W. J. — In: Biochemical Applications of Mass Spectrometry/Ed. by J. Chichester. New York, Wiley, 1972, p. 70.
131. Edser R. J., Glower J. L., Risbidger G. D. — Chromatogr. and Chromatogr. Commun. 1981, v. 4, p. 453.
132. Rasmussen G. T., Marshall J. C., Isenhour T. L. — Pittsburgh Conf. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc., 1981, N 105.
133. Rosen J. D., Pareles S. R. — In: Mass Spectrometry and NMR Spectroscopy in Pesticide Chemistry/Ed. by R. Haque. F. J. Biros. New York, Plenum Press, 1974, p. 91.
134. Stan H.-J., Abraham B. — J. Chromatogr., 1980, v. 195, p. 231.
135. Sjoquist B., Anggard E. — Anal. Chem., 1972, v. 44, p. 2297.
136. Oswald E. O., Albro P. W., McKinney J. D. — J. Chromatogr., 1974, v. 98, p. 363.
137. Koslow S. H., Cattabeni F., Costa E. — Science, 1972, v. 176, p. 177.
138. Middleditch B. S., Desiderio D. M. — Anal. Chem., 1973, v. 45, p. 806.
139. Hunt D. F., Crow F. W. — NBS Special Publ. 519, 1979.
140. Тальрозе В. Л., Разников В. В., Танцырев Г. Д. — ДАН СССР, 1964, т. 159, с. 182.
141. Тальрозе В. Л., Танцырев Г. Д., Гориков В. И., Кубалко Л. А., Бюлл. изобрет., 1965, № 6, с. 72.
142. Hammer C. G., Holmstedt B., Ryhage R. — Anal. Biochem., 1968, v. 25, p. 532.
143. Bonelli E. J. — Anal. Chem., 1972, v. 44, p. 603.
144. Wolf W. R., Taylor M. L., Hughes B. M. e. a. — Anal. Chem., 1972, v. 44, p. 616.
145. Strong J. M., Atkinson A. J. — Anal. Chem., 1972, v. 44, p. 2287.
146. Reinsfelder R. E., Denton M. B. — Int. J. Mass Spectrom. and Ion Phys., 1981, v. 37, p. 241.
147. Gaskell S. J., Millington D. S. — Biomed. Mass Spectrom., 1978, v. 5, p. 557.
148. Durden D. A. — Anal. Chem., 1982, v. 54, p. 666.
149. Hites R. A., Biemann K. — Anal. Chem., 1968, v. 40, p. 1217.
150. Hites R. A., Biemann K. — Anal. Chem., 1970, v. 42, p. 855.
151. Fujii T., Yokouchi Y., Ambe Y. — J. Chromatogr., 1979, v. 176, p. 165.
152. Kuehl D. W. — Anal. Chem., 1977, v. 49, p. 521.
153. Wartson J. T., Biemann K. In: 12 th Annual Conf. on Mass Spectrom. and Allied Topics, Montreal, Amer. Chem. Soc., 1964, p. 438.
154. Watson J. T., Biemann K. — Anal. Chem., 1965, v. 37, p. 844.
155. Habfast K., Maurer K. H., Hoffman G. — In: Applications in Organic Analysis/Ed. by W. H. McFadden. New York, Wiley, 1973, p. 408.
156. McMurray W. J., Greene B. N., Lipsky S. R. — Anal. Chem., 1966, v. 38, p. 1194.
157. Burlingame A. L., Smith D. H., Olsen R. W. — Anal. Chem., 1968, v. 40, p. 13.
158. Burlingame A. L., Smith D. H., Merren T. O., Olsen R. W. — In: Computers in Analytical Chemistry/Ed. by C. H. Orr, A. Norris. New York Plenum Press, 1970, p. 17.
159. Garrick A., Gough T. A., Hazelby D., Webb K. S. — In: 2nd Int. Symp. Quant. Mass Spectrom. Life Sci., Amsterdam, Elsevier, 1978, p. 439.
160. Kimble B. J., Cox R. E., McPherron R. V. e. a. — J. Chromatogr. Sci., 1974, v. 12, p. 647.
161. Meili J., Walls F. C., McPherron R., Burlingame A. L. — J. Chromatogr. Sci., 1979, v. 17, p. 29.
162. Haddol W. F. — In: High Performance Mass Spectrometry/Ed. by M. L. Gross. Washington, Amer. Chem. Soc., 1978, p. 97.
163. White R., Ghadery S., Ledford E. B. e. a. — Pittsburgh Conf. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc., Monroeville, Pa., 1981, N 722.

114. *Hunt D. F., Sethi S. K.* High Performance Mass Spectrom., 1978, Washington, Amer. Chem. Soc., p. 150.
115. *Biller J. E., Biemann K.* — Anal. Lett., 1974, v. 7, p. 515.
116. *Knorr F. J., Thoesheim H. R., Harris J. M.* — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 821.
117. *Altwater B. L., Venkataraghavan R., McLafferty F. W.* — Anal. Chem., 1979, v. 51, p. 1945.
118. *Dromey R. G., Stefic M. J., Rindfleisch T. C., Duffild A. M.* — Anal. Chem., 1976, v. 48, p. 1368.
119. *Davis E., Shepard A., Stanford N., Rogers L. B.* — Anal. Chem., 1974, v. 46, p. 821.
120. *Ritter L., Lowry S. R., Iserhour T. L., Wilkins C. L.* — Anal. Chem., 1976, v. 48, p. 591.
121. *Malinowski E. R., McCue M.* — Anal. Chem., 1977, v. 49, p. 284.
122. *Tway P. C., Cline Love L. J.* — Anal. chim. acta, 1980, v. 117, p. 45.
123. *Woodruff H. B., Tway P. C., Cline Love L. J.* — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 81.
124. *Chen J.-H., Hwang L.-P.* — Anal. chim. acta, 1981, v. 133, p. 271.
125. *Sharaf M. A., Kowalski B. R.* — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 518.
126. *Богданов В. А., Савельев Ю. И., Щелоков Р. Н., Сакодынкий К. И.* — ЖФХ, 1981, № 5, с. 1315.
127. *VandenHeuvel W. J. A., Smith J. L., Albers-Schonberg G. e. a.* — In: Modern Methods of Steroid Analysis/Ed. by E. Heftmann. New York, Acad. Press, 1973, p. 199.
128. *Pierse A. E.* Silylation of Organic Compounds. Rockford, Pierse Chemical Company, III, 1968.
129. *Poole C. F., Zlatkis A.* — J. Chromatogr. Sci., 1979, v. 17, p. 115.
130. *Poole C. F.* — In: Handbook of Derivatives for Chromatography/Ed. by K. Blau, G. S. King. London, Heyden and Son, 1977, p. 152.
131. *Knapp D. R.* Handbook of Analytical Derivatization Reactions. New York, Wiley Interscience, 1979, p. 741.
132. *Nicholson J. D.* — Analyst, 1978, v. 103, p. 1.
133. *Nicholson J. D.* — Analyst, 1978, v. 103, p. 193.
134. *Brooks C. K. W., Edmonds C. G., Gaskell S. J., Smith A. G.* — Chem. Phys. Lipids, 1978, v. 21, p. 403.
135. *Brooks C. J. W., Edmonds C. G.* — In: Practical Mass Spectrometry. A contemporary introduction/Ed. by B. S. Middleditch. N4-L, New York, Plenum Press, 1979, p. 387.
136. *Quilliam M. A., Westmore B.* — Anal. Chem., 1978, v. 50, p. 59.
137. *Harvey D. J.* — J. Pharm. Pharmacol., 1976, v. 28, p. 280.
138. *Parvey D. J.* — Org. Mass Spectrom., 1977, v. 12, p. 473.
139. *Harvey D. J.* — J. Chromatogr., 1975, v. 110, p. 91.
140. *Phillipou G., Bigham D. A., Seamark R. F.* — Lipids, 1975, v. 10, p. 714.
141. *Miyazaki H., Ishibashi M., Iton M. e. a.* — J. Chromatogr., 1977, v. 133, p. 311.
142. *Gilbert J., Startin J. R.* — J. Chromatogr., 1980, v. 189, p. 86.
143. *Poole C. F., Singhawangcha S., Chen Hu L.-E. e. a.* — J. Chromatogr., 1980, v. 187, p. 331.
144. *Levine S. P., Harvey T. M., Waeghe T. J., Shapiro R. H.* — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 805.
145. *Blotny G.* — J. Chromatogr., 1980, v. 193, p. 61.
146. *Miyazaki H., Ishibashi M., Yamashida K., Yakushiji M.* — Chem. Pharm. Bull., 1981, v. 29, p. 796.
147. *Poole C. F., Zlatkis A.* — J. Chromatogr., 1980, v. 184, p. 99.
148. *Полякова А. А., Хмельницкий П. А.* Масс-спектрометрия в органической химии. Л., Химия, 1972.
149. *ten Noever de Braw M. C., Koeman J. H.* — Sci. Total Environ., 1972/73, v. 126, p. 1.
150. *Murata T.* — Anal. Chem., 1977, v. 49, p. 2209.
151. *Lee M. L., Vassilaros D. L., Ripkin W. S., Sorensen W. L.* — NBS Publ. Gaithersburg, 1979, p. 731.
152. *Lee M. L., Hites R. A.* — J. Am. Chem. Soc., 1977, v. 99, p. 2008.
153. *Frank H., Nicholson G. G., Bayer E.* — J. Chromatogr., 1978, v. 146, p. 197.
154. *Lin J. H., Ku W. W.* — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 2180.
155. *Hunt D. F.* — In: Advances in Mass Spectrometry. V. 6/Ed. by A. R. West. London, Appl. Sci., 1974, p. 517.
156. *Хвостенко В. И.* — Масс-спектрометрия отрицательных ионов в органической химии. М., Наука, 1981.
157. *Tohma M., Nakata Y., Kurosawa T.* — J. Chromatogr., 1979, v. 171, p. 469.
158. *McNeil M., Albersheim P.* — Carbohydr. Res., 1977, v. 56, p. 239.
159. *Gaskell S. J.* — Trends in Anal. Chem., 1982, v. , p. 110.
160. *Hatch F., Munson B.* — Anal. Chem., 1977, v. 49, p. 731.
161. *Polley C. W., Munson B.* — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 308.
162. *Fujii T.* — Anal. Chem., 1977, v. 49, p. 1985.
163. *Pose M. E.* — Org. Mass Spectrom., 1981, v. 16, p. 323.
164. *Dielman G., Meier S., Rapp U.* — HRC a. CC, 1979, v. 2, p. 343.
165. *Draffan G. H., Clure R. A., Goodwin B. L. e. a.* — In: Advances in Mass Spectrometry. V. 6/Ed. by R. West. London, Appl. Sci. Publ., 1974, p. 245.
166. *Bailey E., Farmer P. B., Lamb J. H.* — J. Chromatogr., 1980, v. 200, p. 145.
167. *Chapman J. R., Bailey E.* — J. Chromatogr., 1974, v. 89, p. 215.
168. *Van Baeck L., Van Cauwenberghe K.* — Anal. Lett., 1977, v. 10(6), p. 467.
169. *Calrns T., Slegmund E. G.* — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 1599.
170. *Nau H., Biemann K.* — Anal. Chem., 1974, v. 46, p. 426.
171. *Smith D. H., Achenbach M., Yeager W. J. e. a.* — Anal. Chem., 1977, v. 49, p. 1623.
172. *Kwiatkowski J., Riepe W.* — Anal. chim. acta, 1979, v. 112, p. 219.
173. *Abrahamson S. A.* — Sci. Tools, 1967, v. 14, p. 29.
174. *Petterson B., Rihage R.* — Ark. Kemi, 1967, v. 26, p. 293.
175. *Knock B. A., Smith I. C.* — Anal. Chem., 1970, v. 42, p. 1516.
176. *Farbman S., Reed R. I., Robertson D. H., Silva M. E. F.* — Int. J. Mass Spectrom. and Ion Phys., 1973, v. 12, p. 123.
177. *Grotch S. L.* — Anal. Chem., 1971, v. 43, p. 1362.
178. *Hartz H. S., Hites R. A., Biemann K.* — Anal. Chem., 1971, v. 43, p. 681.
179. *Grotch S. L.* — Anal. Chem., 1973, v. 45, p. 2.
180. *Лебедев К. С., Тормышев В. М., Дерендяев Б. Г.* — Изв. СО АН СССР, 1980, № 2, с. 61.
181. *Wangen L. E., Woodward W. S., Isenkour T. L.* — Anal. Chem., 1971, v. 43, p. 1605.
182. *Van Marlen G., Dijkstra A.* — Anal. Chem., 1976, v. 48, p. 595.
183. *Van Marlen G., Dijkstra A., Van't Klooster H. A.* — Anal. Chem., 1979, v. 51, p. 420.
184. *Mun In Ki Bartholomew D. R., Stauffer D. B., McLafferty F. W.* — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 1938.
185. *Heller S. R., Milne G. W. A., Feldmann R. J.* — Science, 1977, v. 195, p. 253.
186. *McLafferty F. W., Hertel R. H., Villwock R. D.* — Org. Mass Spectrom., 1974, v. 9, p. 690.
187. *Mun I. K., Venkataraghavan R., McLafferty F. W.* — Anal. Chem., 1977, v. 49, p. 23.
188. *Лебедев К. С., Тормышев В. М., Шаранова О. Н. и др.* — Изв. СО АН СССР, 1980, № 4, с. 54.
189. *Lebedev K. S., Tormyshev V. M., Derendyaev V. G., Koptug V. A.*, Anal. chim. acta, 1981, v. 233, p. 577.
190. *Дерендяев Б. Г., Коптюг В. А., Лебедев К. С., Шаранова О. Н.* — Автометрия, 1979, № 4, с. 3.
191. *Pesyna G. M., McLafferty F. W.* — In: Determination of Organic Structures by Phys. Methods. V. 6/Ed. by F. C. Nachld, J. J. Zuckermann, E. W. Raudall. New York, Academic Press, 1976, p. 91.
192. *Buchanan B. G., Smith D. H., White W. C. e. a.* — J. Am. Chem. Soc., 1976, v. 98, p. 6168.
193. *Smith D. H., Buchanan B. G., Engelmores R. S. e. a.* — J. Am. Chem. Soc., 1972, v. 94, p. 5962.

194. Dayringer H. E., McLafferty F. W. — *Org. Mass Spectrom.*, 1977, v. 12, p. 53.
195. Dayringer H. E., Pesyna G. M., Venkataraghavan R., McLafferty F. W. — *Org. Mass Spectrom.*, 1976, v. 11, p. 543.
196. McLafferty F. W., Venkataraghavan R. — *J. Chromatogr. Sci.*, 1979, v. 17, p. 24.
197. Нилсон Н. Обучающиеся машины. Пер. с англ. М., Мир, 1967.
198. Джурс П., Айзенauer Т. Распознавание образов в химии. Пер. с англ. М., Мир, 1977.
199. Varmuza K. — *Z. Anal. Chem.*, 1974, v. 268, p. 352.
200. Rozett R. W., Petersen E. M. — *Anal. Chem.*, 1975, v. 47, p. 1301.
201. Justice J. B., Isenhour T. L. — *Anal. Chem.*, 1975, v. 47, p. 2286.
202. Wells D. E. — In: *Dynamic Mass Spectrometry*. V. 5, London, Heyden and Sons 1976, p. 89.
203. Knapp T., Bennett R. — *Anal. Chem.*, 1981, v. 53, p. 619.
204. Zacchei A. G., VandenHewvel W. J. A. In: *Practical Mass Spectrometry*. Ed. by B. S. Middleditch. New York, Plenum Press, 1979, p. 387.
205. Анисимова О. С., Линберг Л. Ф., Шейнкер Ю. Н. Масс-спектрометрия в исследовании метаболизма лекарственных препаратов. М., Медицина, 1978.
206. Mulphy R. C., Hattox S. E., Helbig H. R. — *Biomed. Mass Spectrom.*, 1978, v. 5, p. 444.
207. Millare B. J. — In: *Quantitative Mass Spectrometry*. London, Heyden and Sons, 1978, p. 91.
208. Burlingame A. L., Baillie T. A., Derrick P. J. — *Anal. Chem.*, 1980, v. 52, p. 214R.
209. Min B. H., Garland W. A., Khoo K.-C. e. a. — *Biomed. Mass Spectrom.*, 1978, v. 5, p. 692.
210. Horie M., Baba S. — *Chem. Pharm. Bull. Tokyo*, 1978, v. 26, p. 1009.
211. Garland W. A., Min B. H. — *J. Chromatogr.*, 1979, v. 172, p. 279.
212. Jindal S. P., Vestergaard P. — *J. Pharm. Sci.* 1978, v. 67, p. 260.
213. Gaskell S. J., Brooks C. J. W., Matin S. B. — *Biomed. Mass Spectrom.*, 1978, v. 5, p. 260.
214. Kochhar M. M., Needham L. L. — *J. Chromatogr.*, 1976, v. 118, p. 418.
215. Jindal S. P., Lutz Th., Vestergaard P. — *J. Chromatogr.*, 1979, v. 179, p. 357.
216. Calrns T., Siegmund E. G., Rader B. — *Anal. Chem.*, 1981, v. 53, p. 1217.
217. Sánchez M. C., Colomé J. — *J. Chromatogr.*, 1976, v. 126, p. 601.
218. Leferink J. G., Wagemaker-Engels I., Maes R. A. A. e. a. — *J. Chromatogr.*, 1977, v. 143, p. 299.
219. Floberg S., Lanbeck K., Lindström B. — *J. Chromatogr.*, 1980, v. 182, p. 63.
220. Henion J. D. — *J. Chromatogr. Sci.*, 1981, v. 19, p. 57.
221. Naestoft J., Larsen N.-E. — *J. Chromatogr.*, 1977, v. 143, p. 161.
222. Ribermag GC — *MS News*, 1978, N 24.
223. Bachmann E. W., Hofmann A. A., Waser P. G. — *J. Chromatogr.*, 1979, v. 178, p. 320.
224. Vinson J. A., Patel D. D., Patel A. H. — *Anal. Chem.*, 1977, v. 49, p. 163.
225. Agurell S., Lindgren J.-E., Ohlsson A. — In: *Marihuana: Biological Effects*/Ed. by G. G. Nanas, W. D. M. Paton. Oxford etc., Pergamon Press, 1979, p. 3.
226. Rosenthal D., Harvey T. M., Bursley J. T. e. a. — *Biomed. Mass Spectrom.*, 1978, v. 5, p. 312.
227. Harvey D. J., Leuschner J. T. A., Paton W. D. M. — *J. Chromatogr.*, 1980, v. 202, p. 83.
228. De Ridder J. J., Koppens P. C. J. M., Van Hal H. J. M. — *J. Chromatogr.*, 1977, v. 143, p. 281.
229. De Ridder J. J., Koppens P. C. J. M., Van Hal H. J. M. — *Ibid.*, p. 289.
230. Hakusui H., Suzuki W., Sano M. — *J. Chromatogr.*, 1980, v. 182, p. 47.
231. Nichol H., Vine J., Thomas J., Moore R. G. — *J. Chromatogr.*, 1980, v. 182, p. 191.
232. Gilpin R. K. — *Anal. Chem.*, 1979, v. 51, p. 257R.
233. Grostic M. F. — In: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*/Ed. by G. R. Waller. New York, Wiley Interscience, 1980, p. 574.
234. Min B. H., Garland W. A. — *J. Chromatogr.*, 1977, v. 139, p. 121.
235. Haegele K. D., Skrdlant H. B., Robie W. e. a. — *J. Chromatogr.*, 1976, v. 126, p. 517.
236. Allen J. G., East P. B., Francis R. J., Haigh J. L. — *Drug Metab. Dispos.*, 1975, v. 3, p. 332.
237. Malcolm S. L., Marten T. R. — *Anal. Chem.*, 1976, v. 48, p. 807.
238. Nau H., Jesdinsky D., Wittfoht W. — *J. Chromatogr.*, 1980, v. 182, p. 71.
239. Horning M. G., Lertratanangkoon K. — *J. Chromatogr.*, 1980, v. 181, p. 59.
240. Хмельницкий Р. А., Лукашенко И. М., Бродский Е. С. Пиролитическая масс-спектрометрия высокомолекулярных соединений. М., Химия, 1980.
241. Roy T. A., Szinai S. S. — *J. Chromatogr. Sci.*, 1976, v. 14, p. 580.
242. Irwin W. J., Slack J. A. — In: *Analytical Pyrolysis*/Ed. by C. E. R. Jones, C. A. Cramers. Amstrdam, Elsevier, 1977, p. 107.
243. Slack J. A., Irwin W. J. — *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, 1977, v. 14(8), p. 215.
244. Jellum E. — *J. Chromatogr.*, 1977, v. 143, p. 427.
245. Gates S. C., Sweeley C. C. — *Clin. Chem.*, 1978, v. 24, p. 1663.
246. Schoots A. C., Mikkers F. E. P., Cramers C. A. M. G., Ringoir S. J. — *J. Chromatogr.*, 1979, v. 164, p. 1.
247. Eldjarn L., Jellum E., Stokke O. — *J. Chromatogr.*, 1974, v. 91, p. 353.
248. Pfaffenberger C. D., Horning E. C. — *Anal. Biochem.*, 1978, v. 88, p. 689.
249. Honour J. W., Schackleton C. H. L. — *Biochem. Soc. Trans.*, 1978, v. 6, p. 775.
250. Derks H. J. G. M., Drayer N. M. — *Steroids*, 1978, v. 31, p. 289.
251. Ulick S., Levine L. S., Gunczler P. e. a. — *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1979, v. 49, 757.
252. Sayegh J. F., Mowat J. H., Veatergard P. — *Acta Endocrinol.*, 1978, v. 5, p. 132.
253. Sickmann L. — *J. Steroid Biochem.*, 1979, v. 11, p. 117.
254. Shackleton C. H. L., Hirota H., Honour J. W. — In: *Stable Isotopes; Proceedings of the 3rd Int. Conf.*/Ed. by E. R. Klein, P. D. Klein. New York Academic Press, 1979, p. 37.
255. Zamecnik J., Armstrong D. T., Green K. — *Clin. Chem.*, 1978, v. 24, p. 627.
256. Millington D., Jenner D. A., Jones T., Griffiths K. — *Biochem. J.*, 1974, v. 139, p. 473.
257. Hanson R. F., Szczepanik-Van Leenwen P. A., Williams G. C. e. a. — *Science*, 1979, v. 203, p. 1107.
258. Kelsey M. J., Muschik G. M., Sexton S. A. — *Lipids*, 1978, v. 13, p. 152.
259. Nishikawa Y., Yamashita K., Ishibashi M., Miyazaki H. — *Chem. Pharm. Bull.*, 1978, v. 26, p. 2922.
260. Angelin B., Bjökhem I., Einarsson K. — *J. Lipid Res.*, 1978, v. 19, p. 527.
261. Hamberg M. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 49, p. 720.
262. Hamberg M., Samuelsson B. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, v. 91, p. 2177.
263. Seyberth H., Serge G. V., Morgan J. C. e. a. — *New Engl. J. Med.*, 1975, v. 293, p. 1278.
264. Walker R. W., Gruber V. F., Pile J. e. a. — *J. Chromatogr.*, 1980, v. 181, p. 85.
255. Oates J. A., Sayberth H. W., Frölich J. C. e. a. — In: *Stable Isotopes: Applications in Pharmacology, Toxicology and Clinical Chemistry*/Ed. by T. A. Baille. Macmillan, 1978, p. 281.
266. Derks H. J. G. M., Drayer N. M. — *Steroids*, 1978, v. 31, p. 9.
267. Adlercreutz H., Martin F., Lindström B. — *J. Steroid Biochem.*, 1978, v. 9, p. 1197.
268. Halket J. McK, Albers H.-K., Lisboa B. P. — *Frezenius Z. Anal. Chem.*, 1978, v. 290, p. 124.
269. Erlenmaler T., Müller H., Seyberth H. W. — *J. Chromatogr.*, 1979, v. 163, p. 289.
270. Gates S. C., Sweeley C. C., Krivit W. — *Clin. Chem.*, 1978, v. 24, p. 1680.

271. Cree T. C., Hutson S. M., Harper E. A. — *Anal. Biochem.*, 1979, v. 92, p. 156.
272. Langenbeck U., Mench-Hoinowski A., Rod-Urban I. — *J. Chromatogr.*, 1978, v. 146, p. 213.
273. Lasala J. M., Coscia C. J. — *Science*, 1979, v. 203, p. 283.
274. Hoskins J. A., Pollitt R. J. — In: *Stable Isotopes: Applications in Pharmacology, Toxicology and Clinical Research*/Ed. by T. A. Baillie. Macmillan, 1978, p. 253.
275. Lewy A. J., Markey S. P. — *Science*, 1978, v. 201, p. 741.
276. Compennolle F., Van Hees G. P., Blauckaert N., Heirwegh K. P. M. — *Biochem. J.*, 1978, v. 171, p. 185.
277. Wegmann H., Curtius H.-Ch., Redweik U. — *J. Chromatogr.*, 1978, v. 158, p. 305.
278. Oon M. C. H., Rodnight R. — *Biochem. Med.*, 1977, v. 18, p. 410.
279. Takahashi S., Godse D. D., Nagvi A. e. a. — *Clin. chim. acta*, 1978, v. 84, p. 55.
280. Hoskins J. A., Pollitt R. J., Evans S. — *J. Chromatogr.*, 1978, v. 145, p. 285.
281. Faulk K. F., Anderson P. J., Barchas J. D., Berger P. A. — *J. Chromatogr.*, 1979, v. 163, p. 337.
282. Muskiet F. A. J., Jeurung H. J., Thomasson C. G. e. a. — *J. Labelled Compds Radiopharmac.* 1978, v. 14, p. 497.
283. Goodwin F. K., Post R. M. — In: *Neuroregulators and Psychiatric disorders*/Ed. by E. Usdin, D. A. Hamburg, J. D. Barchas. Oxford University Press, 1977, p. 135.
284. Goodwin F. K., Post R. M. — In: *Biology of the Major Psychoses*/Ed. by D. X. Freedman. Raven Press, 1975, p. 299.
285. Foulk K. F., Anderson P. J., Barchas J. D., Berger Ph. A. — *J. Chromatogr.*, 1979, v. 163, p. 337.
286. Wang M.-T., Imai K., Yochioka M., Tamura Z. — *Clin. chim. acta*, 1975, v. 63, p. 13.
287. Jacob K., Vogt W., Knedel M., Schwertfeger G. — *J. Chromatogr.*, 1978, v. 146, p. 221.
288. Clag K. L., Murphy R. C. — *J. Chromatogr.*, 1979, v. 164, p. 417.
289. Wolfensberger M., Redweik U., Curtius H.-Ch. — *J. Chromatogr.*, 1979, v. 172, p. 471.
290. Matthews D. E., Ben-Galim E., Bier D. M. — *Anal. Chem.*, 1979, v. 51, p. 80.
291. Robinson J. R., Starratt A. N., Schlaetka E. E. — *Biomed. Mass Spectrom.*, 1978, v. 5, p. 648.
292. Kingston E. E., Duffield A. M. — *Biomed. Mass Spectrom.*, 1978, v. 5, p. 621.
293. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E. — *J. Chromatogr. Sci.*, 1977, v. 15, p. 174.
294. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E. — *J. Chromatogr.*, 1978, v. 167, p. 187.
295. MacLeod G., Coppock B. M. — *J. Agric. Food Chem.*, 1976, v. 24, p. 835.
296. Min D. B. S., Ina K., Peterson R. J., Chang S. S. — *J. Food Sci.*, 1977, v. 42, p. 503.
297. Sloat D., Harkes P. D. — *J. Agric. Food Chem.*, 1975, v. 23, p. 356.
298. Langler J. E., Libbey L. M., Day E. A. — *J. Agric. Food Chem.*, 1967, v. 15, p. 386.
299. Neu K. H., Wirotama I. P. G. — *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1972, v. 149, p. 347.
300. Sloat D., Nofman H. J. — *J. Agric. Food Chem.*, 1975, v. 23, p. 358.
301. Caporaso F., Sink J. D., Dimick P. S. e. a. — *J. Agric. Food Chem.*, 1977, v. 25, p. 1230.
302. Lee P. L., Swords G., Hunter G. L. K. — *J. Food Sci.*, 1975, v. 40, p. 421.
303. Flath R. A., Forrey R. R. — *J. Agric. Food Chem.*, 1977, v. 25, p. 103.
304. Vitzthum O. G., Werkhoff P., Hubert P. — *J. Food. Sci.*, 1975, v. 40, p. 911.
305. Haag A., Werkhoff P. — *Org. Mass Spectrom.*, 1976, v. 11, p. 511.
306. Buttery R. G., Guadagni D. G., Ling L. C. — *J. Agric. Food Chem.*, 1978, v. 26, p. 791.
307. Frankel E. N., Neff W. E., Rohwedder W. K. — *Lipids*, 1977, v. 12, p. 901.
308. Kuehl D. W. e. a. — *J. Great Lakes Res.*, 1981, v. 7, p. 330.
309. Gough T. A. — *Analyst*, 1978, v. 103, p. 785.
310. Fong Y. Y., Chan W. C. — *Food Cosmet. Toxic.*, 1973, v. 11, p. 841.
311. Gadbois D. F., Ravesi E. M., Lundstrom R. C., Maney R. S. — *J. Agric. Food Chem.*, 1975, v. 23, p. 665.
312. Wasserman A. E., Fiddler W., Doerr R. C. e. a. — *Food Cosmet. Toxic.*, 1972, v. 10, p. 681.
313. Essigmann J. M., Issenberg P. — *J. Food Sci.*, 1972, v. 37, p. 684.
314. Fazio T., Damico J. N., Howard J. W. e. a. — *J. Agric. Food Chem.*, 1971, v. 19, p. 250.
315. Osborne D. R. — In: *N-Nitroso Compounds: Analysis and Formation*/Ed. by P. Bogovsky, R. Preussmann, E. A. Walker. IARC Scientific Publ. N 3, 1972, p. 43.
316. Telling G. M., Bryce T. A., Althorpe J. — *J. Agric. Food Chem.*, 1971, v. 19, p. 937.
317. Gough T. A., Webb K. S. — *J. Chromatogr.*, 1972, v. 64, p. 201.
318. Crosby N. T., Foreman J. K., Palframan J. F., Sawyer R. — *Nature*, 1972, v. 238, p. 342.
319. Heyns K., Röper H., Koch H. — *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1974, v. 154, p. 193.
320. Stephany R. W., Freudenthal J., Egmond E. e. a. — *J. Agric. Food Chem.*, 1976, v. 24, p. 536.
321. Heisler E. G., Siciliano J., Krrulick S. e. a. — *J. Agric. Food Chem.*, 1979, v. 22, p. 1029.
322. Покровский А. А., Медведев Ф. А., Меламед Д. Б., Костюковский Я. Л. — *ЖАХ*, 1978, т. 33, с. 1396.
323. Crathorne B., Edwards M. W., Jones N. R. e. a. — *J. Chromatogr.*, 1975, v. 115, p. 213.
324. Eisenbrand G., Janzowski C., Preussmann R. — *J. Chromatogr.*, 1975, v. 115, p. 602.
325. Gilbert J., Shepherd M. J., Startin J. R., Wallwork M. A. — *J. Chromatogr.*, 1982, v. 237, p. 249.
326. Janzowski C., Eisenbrand G., Preussmann R. — *J. Chromatogr.*, 1978, v. 150, p. 216.
327. Höllerer G., Jahr D. — *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1975, v. 157, p. 65.
328. Bertsch W., Chang R. C., Zlatkis A. — *J. Chromatogr. Sci.*, 1974, v. 12, p. 175.
329. Dougherty R. C. — In: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry. First Supplementary Volume*/Ed. by G. R. Waßer, O. C. Dermer. New York, Wiley Interscience, 1980.
330. Chouchary G., Cooper C. V. — *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1979, v. 40, p. 39.
331. Casselman A. A., Gibson N. C. C., Bannard P. A. B. — *J. Chromatogr.*, 1973, v. 78, p. 317.
332. Tyson B. J., Carle C. — *Anal. Chem.*, 1974, v. 46, p. 610.
333. Rasmussen R. A., Westberg H. H., Holdren M. — *J. Chromatogr. Sci.*, 1974, v. 12, p. 80.
334. Исидоров В. А., Зенкевич И. Г., Иоффе Б. В. — *ДАН СССР*, 1977, т. 235, с. 618.
335. Leinster P., Perry R., Young R. J. — *Talanta Rev.*, 1977, v. 24, p. 205.
336. Raymond A., Guiochon G. — *Environ. Sci. Technol.*, 1974, v. 8, p. 143.
337. Byrsey J. T., Erickson M. D., Michael L. C. e. a. — *AICHE Symp. Ser.*, 1980, v. 76, p. 338.
338. Исидоров В. А., Зенкевич И. Г., Иоффе Б. В. В кн.: 4-я Всес. конф. по анал. химии орган. соед., Москва, 1980. М., Наука, 1981, с. 182.
339. Grob K., Grob G. — *J. Chromatogr.*, 1971, v. 62, p. 1.
340. Cronn D. R., Harsch D. E. — *Anal. Lett.*, 1979, v. 12(B14), p. 1489.
341. Rasmussen R. A., Penkett S. A., Prosser N. — *Nature*, 1979, v. 277, p. 549.

342. Singh H. B., Salas L., Chigeishi H., Crawford A. — Atmos. Environ., 1977, v. 11, p. 819.
343. Singh H. B., Salas L., Shigeishi H., Scribner E. — Science, 1979, v. 203, p. 899.
344. Penkett S. A., Khalil M. A. K. — Nature, 1980, v. 286, p. 793.
345. Van Vaeck L., Van Conwenberghe K. — In: 8th Int. Mass Spectrom. Conf., Oslo, Norway, August 12—18, 1979. Abstracts. Symp 10, p. 8.
346. Yokouchi Y., Jujii T., Ambe Y., Fuwa K. — J. Chromatogr., 1979, v. 180, p. 133.
347. Burlingame A. L., Kimble B. J., Derrick P. J. — Anal. Chem., 1976, v. 48, p. 368R.
348. Maarse H., ten Noever de Brauw M. C. — Chem. Weekblad, 1972, № 11.
349. Исидоров В. А., Зенкевич И. Г., Иоффе Б. В. — ДАН СССР, 1982, т. 263, с. 893.
350. Liao J. C., Browner R. F. — Anal. Chem., 1978, v. 50, p. 1683.
351. Lee M. L., Prado G. P., Howard J. B., Hites R. A. — Biomed. Mass Spectrom., 1977, v. 4, p. 182.
352. Choudhury D. R., Bush B. — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 1351.
353. Bjorseth A., Eklund G. — Anal. chim. acta, 1979, v. 105, p. 119.
354. Thomas Q. V., Stork J. R., Lammer S. L. — J. Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, p. 583.
355. Shackelford W. M., Keith L. H. — Frequency of Organic Compounds in Water. EPA-600/4-76-062, 1976.
356. Law R. Oily Water Discharges: Regul. Tech. and Sci. Considerat. Pros. Semon. Edinburgh, 1978, London, 1980, p. 167.
357. Suffet I. H., Brenner L., Cairo P. R. — Water Res., 1980, v. 14, p. 853.
358. Burnham A. K., Calder G. V., Fritz J. S. e. a. — Anal. Chem., 1972, v. 44, p. 139.
359. Ingram L. L., Jr., McGinnis G. D., Parlich V. — Anal. Chem., 1979, v. 51, p. 1077.
360. Дмитриев М. Т. и др. — Гигиена и санитария, 1981, № 5, с. 34.
361. Yamato Y., Suzuki M. — Water Res., 1980, v. 14, p. 1435.
362. McAdams M. J., Vestal M. L. — J. Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, p. 110.
363. Ishiwatari R., Hanya T. — In: Advances in Organic Geochemistry/Ed. by B. Tissot, F. Bienner. Paris, Editions Technip., 1973, p. 1051.
364. Junk G. A., Svec H. J., Vick R. D., Avery M. J. — Environ. Sci. Technol., 1974, v. 8, p. 1100.
365. Hites R. A., Biemann K. — Science, 1972, v. 178, p. 158.
366. De Leon I. R., Remele P. C., Miles S. K., Laster J. L. — Anal. Lett., 1980, v. 13(A6), p. 503.
367. Matsumoto G., Hanya T. — J. Chromatogr., 1980, v. 194, p. 199.
368. Hon-nami H., Hanya T. — Water Res., 1980, v. 14, p. 1251.
369. Crow F. W., Bjorseth A., Knapp K. T., Bennett R. — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 619.
370. Tindall G. W., Wininger P. E. — J. Chromatogr., 1980, v. 196, p. 109.
371. Hass J. R., Friesen M. D., Harvan D. J., Parker C. — Anal. Chem. 1978, v. 50, p. 1474.
372. Sphon J. A., Brumley W. C. — In: Biochemical Applications of mass spectrometry/Ed. by G. R. Waller, O. C. Dermer. Wiley Interscience. 1980, p. 307.
373. Takahashi S., Yoshioka M., Yoshiue S., Tamura Z. — J. Chromatogr., 1978, v. 145, p. 1.
374. Stan H.-J. — J. Anal. Chem., 1977, v. 287, p. 104.
375. Ribermag GC—MS News, 1980, N25.
376. James D. E., Eckers C., Lewis E. e. a. — In: 8th Int. Mass Spectrom. Conf., Oslo, Norway, August 12—18, 1979. Abstracts. Symp. 10, p. 8.
377. Moldovan J. M., Seifert W. K. — J. C. S. Chem. Commun., 1980, p. 914.
378. Макушина В. М. и др. — Нефтехимия, 1979, т. 18, с. 847.
379. Петров А. А. и др. — Там же, 1976, т. 16, с. 411.
380. Каграманова Г. Р. и др. — Там же, с. 18.
381. Воробьева Н. С. и др. — Там же, 1979, т. 19, с. 8.

382. Richardson J. S., Miller D. E. — Anal. Chem., 1982, v. 54, p. 765.
383. Зубенко В. Г. и др. — Нефтехимия, 1979, т. 19, с. 833.
384. Зубенко В. Г. и др. — Там же, 1980, т. 20, с. 490.
385. Heller W., Schallies M., Schmidt K. — J. Chromatogr., 1979, v. 186, p. 843.
386. Bjoroy M., Brooks P., Hall K. — In: Advanced Mass Spectrometry v. 8B. London, Heyden and Sons, 1980, p. 1391.
387. Bayer W., Bayer E., Heller W., Schmidt K.-H. — Frezenius Z. Anal. Chem., 1981, v. 305, p. 15.
388. Peterson J. C., Freeman D. H. — Pittsburgh Conf. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc., Pittsburgh Pa, 1980, p. 223.
389. Rullkötter J., Wette D. H. — Phys. and Chem. Earth, 1979, v. 12, p. 93.
390. Larter S. R., Douglas A. G. — In: Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology/Ed. by W. E. Krumbein. Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, 1978, p. 373.
391. Larter S. R., Solli H., Douglas A. G. — J. Chromatogr., 1978, v. 167, p. 421.
392. Rubinstein I., Strausz O. P. — Geochimica et Cosmochimica, 1979, v. 43, p. 1387.
393. Novotny M., Kump R., Merli F., Todd L. J. — Anal. Chem., 1980, v. 52, p. 401.
394. Schmitter J.-M., Colin H., Excoffler J.-L. e. a. — Anal. Chem., 1982, v. 54, p. 769.
395. Chen J. — Anal. Chem., 1981, v. 53, p. 475.
396. Hood L. V. S., Erikson C. M. — Pittsburgh Conf. of Anal. Chem. and Appl. Spectrosc., 1979, N 293.
397. Strausz O. P., Rubinstein I., Hogg A. M., Payzant J. D. — In: Atom. and Nucl. Meth. Tossil Energy Res. Proc. Amer. Nucl. Soc. Conf. Mayaqucz, Dec. 1—4, 1980, № 4, London, 1982, p. 409.
398. Gallegos E. J. — Anal. Chem., 1975, v. 47, p. 1524.
399. Maters W. L., Meent D. V. D., Schuyt P. J. W. e. a. — In: Analytical Pyrolysis/Ed. by E. S. R. Jones, C. A. Cramers. Amsterdam, Elsevier, 1977, p. 203.
400. Van de Meent D., Brown S. C., Philp R. P., Simoneit B. R. T. — Geochim. cosmochim. acta, 1980, v. 44, p. 999.
401. Jones C. E. R., Vanderborgh N. E. — J. Chromatogr., 1979, v. 186, p. 831.
402. Philp R. P. — TrAC Trans Anal. Chem., 1982, v. 1, p. 237.
403. Gallegos E. J. — J. Chromatogr. Sci., 1981, v. 19, p. 177.
404. Dickson L. C., Clement R. E., Betty K. R., Karasek F. W. — J. Chromatogr., 1980, v. 190, p. 311.

Юрик Аркадьевич Хмельницкий
Ефим Соломонович Бродский

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Редактор *Г. Н. Гостеева*
Художественный редактор *Н. В. Носов*
Художник *А. Я. Михайлов*
Технический редактор *О. В. Тюрина*
Корректор *В. М. Беляева*

ИБ № 1276

Сдано в наб. 14.12.83. Подп. в печ. 27.03.84. Т-07647. Формат
бумаги 60×90^{1/8}. Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная.
Печать высокая. Усл.-печ. л. 13,5. Усл. кр.-отт. 13,75.
Уч.-изд. л. 15,68. Тираж 5000 экз. Зак. № 892. Цена 2 р. 40 к.
Изд. № 2169.

Ордена „Знак Почета“ издательство „Химия“.
107076, Москва, Стрмынка, 13.

Ленинградская типография № 2 головное предприятие ордена
Трудового Красного Знамени Ленинградского объединения
„Техническая книга“ им. Евгении Соколовой Союзполиграф-
прома при Государственном комитете СССР по делам
издательства, полиграфии и книжной торговли.
198052, г. Ленинград, Л-52, Измайловский проспект, 29,

**Московский магазин № 8
предлагает книгу
издательства «Химия»,
вышедшую в серии
«Методы аналитической химии»:**

Лопатин Б. А. Высокочастотное титрование с многозвенными
ячейками. М., 1980, 10 л., 1 р. 50 к.

В книге рассмотрены теория и практика нового метода вы-
сокочастотного титрования с использованием многозвенных кон-
дуктометрических ячеек. Описаны конструкции и свойства ячеек
различного типа, а также методы определения их параметров.
Изложены методы практического применения многозвенных
ячеек в высокочастотной кондуктометрии и диэлектрометрии с
использованием реакций нейтрализации, осаждения, комплексо-
образования и окисления — восстановления. Приведены принци-
пальные схемы устройств и приборов.

Для научных и инженерно-технических работников, занимаю-
щихся применением и разработкой высокочастотных методов для
анализа, физико-химических исследований и для контроля техно-
логических процессов.

Книга может быть выслана наложенным платежом. Адрес
магазина:

103031, Москва,
ул. Петровка, д. 15
магазин № 8 «Техника»
Отдел «Книга — почтой»

Издательство «Химия»