

Обнаружение малых сигналов в масс-спектрах

© Б.А. Калинин,¹ И.С. Ковалев,¹ О.С. Тания,¹ Д.С. Копчук,^{1,2} Г.В. Зырянов,^{1,2} О.Н. Чухахин^{1,2}¹ Уральский федеральный государственный университет им. Первого президента России Б.Н. Ельцина, 620002 Екатеринбург, Россия² Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620219 Екатеринбург, Россия
e-mail: kalinin@urfu.ru

(Поступило в Редакцию 19 сентября 2016 г.)

Приведены результаты хромато-масс-спектрометрического анализа смеси, содержащей соединение с низкой эффективностью протонирования. Для определения параметров пиков ионов соединения использована программа предварительной обработки масс-спектров. Достоверность результатов обработки подтверждена сравнением с табличными данными масс изотопов и изотопного состава компонента. Проведена расшифровка масс-спектра с вычислением площадей и центроидов пиков с оценкой стандартного отклонения для центра пика. Приведены результаты обработки масс-спектра программой mMass.

DOI: 10.21883/JTF.2017.09.44918.2070

Введение

Настоящая работа посвящена обнаружению малых примесей при проведении хромато-масс-спектрометрического анализа. Обнаружение предполагает расшифровку масс-спектра, заключающуюся в идентификации отдельных пиков, на основе измерения отношения массы ионов к заряду и изотопного распределения. Программное обеспечение серийных масс-спектрометров не позволяет в отдельных случаях обнаруживать малые сигналы и не дает возможности анализировать масс-спектры, полученные на другом приборе. В настоящей работе рассмотрено применение программы предварительной обработки масс-спектров для нахождения параметров слабых сигналов, близких к шумовым. Использование программы целесообразно при обнаружении микропримесей и при подавлении части сигналов протонированных молекул. Проведена расшифровка масс-спектра методом вычисления площадей и центроидов пиков с оценкой стандартного отклонения для центра пика.

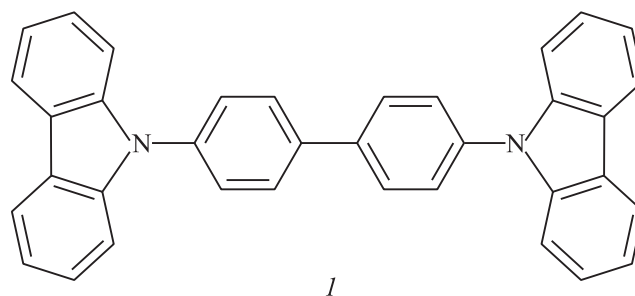
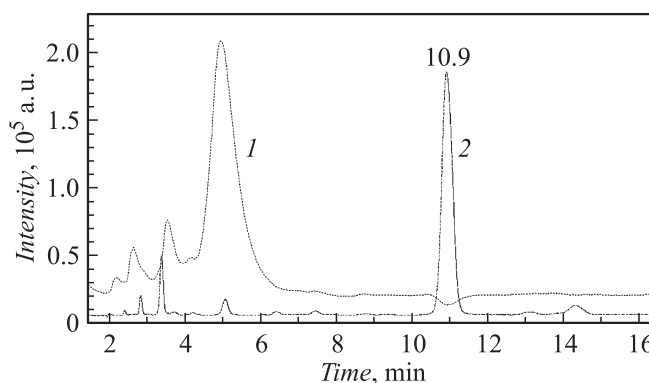
Приведены результаты обработки масс-спектра программой mMass, написанной Мартином Штрохальмом (Martin Strohal) (2005–2013 гг.). Последняя имеет открытый исходный код и представлена в Интернете по адресу www.mmass.org.

При взаимодействии 9-(4-бромифенила)-9*H*-карбазола с *трет*-бутиллитием и CuCl₂ [1] было получено соединение **1** (рис. 1).

Структура соединения **1** подтверждена спектральными данными ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии и элементного анализа, которые не противоречат приписываемому строению.

При проведении хромато-масс-спектрометрического анализа реакционной смеси, содержащей химическое соединение **1** с брутто-формулой C₃₆H₂₄N₂, при совмещении УФ-хроматограммы (пик 10.9 min) указанный

компонент в результатах анализа хроматограммы полного ионного тока с использованием программного обеспечения прибора (Compass DataAnalysis 4.0 by Bruker Daltonics) не был обнаружен, напротив, наблюдалось снижение интенсивности ионного тока ниже базовой линии при выходе хроматографического пика вещества **1** (рис. 2).

Рис. 1. Соединение **1**.Рис. 2. Хроматограмма реакционной массы, содержащей соединение **1**. **1** — хроматограмма полного ионного тока TIC + All MS; **2** — УФ-хроматограмма, 254 nm.

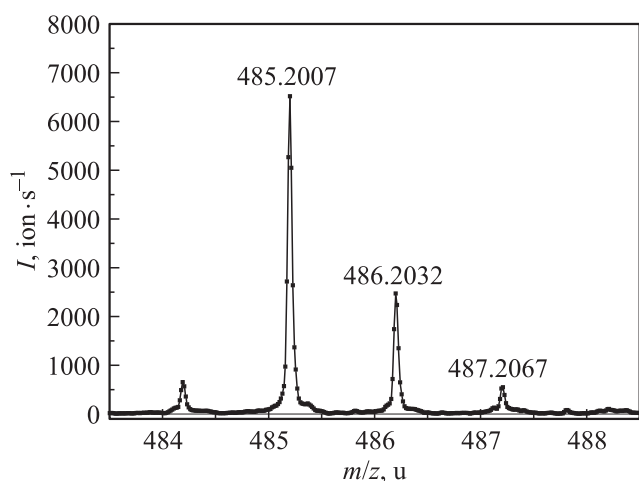


Рис. 3. Участок масс-спектра при прямом вводе анализируемой смеси.

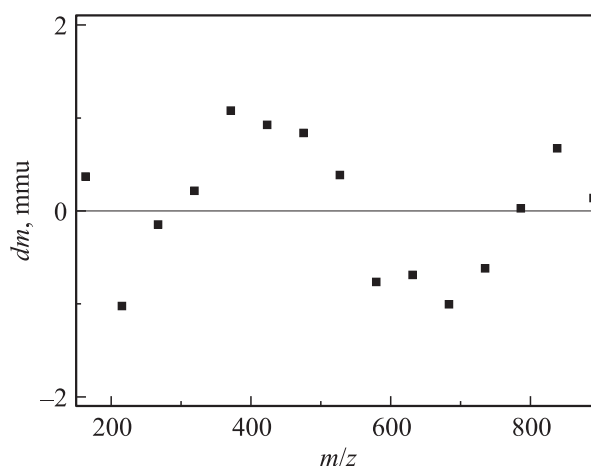


Рис. 4. Калибровочная кривая.

Таблица 1. Параметры расшифровки участка масс-спектра

$m_{\text{tabl}}, \text{u}$	$m_{\text{meas}}, \text{u}$	$B_{\text{meas}}, \text{ion/s}$	I_{tabl}	I_{meas}	dm, mmu
485.2012	485.2007	6516	66.5	68.3	0.5
486.2046	486.2032	2472	27.4	25.9	1.4
487.2079	487.2067	551	5.2	5.8	1.2

В то же время при прямом вводе той же реакционной смеси пики протонированных ионов $[\text{C}_{36}\text{H}_{25}\text{N}_2]^+$ присутствуют в масс-спектре (рис. 3).

Параметры расшифровки участка масс-спектра приведены в табл. 1.

В таблице m_{tabl} — табличное значение массы иона, m_{meas} — измеренное значение (из ReportEngine программы Compass), dm — разность табличных и измеренных значений. Последняя не превышает 1.5 mmu, что согласуется с нижеприведенной оценкой точности калибровки массовой шкалы. B_{meas} — измеренная высота интенсивности изотопных массовых пиков. I_{tabl} , I_{meas} — табличные и измеренные значения изотопного состава (относительные концентрации) соответственно. Расхождение табличных и измеренных значений изотопных распространенностей не превышает 6% rel.

Экспериментальная часть

Масс-спектры высокого разрешения записаны на масс-спектрометре серии micrOTOF-Q II фирмы Bruker Daltonics, оснащенный источником ионизации в электропрее, шестипортовым краном и устройством прямого ввода kd Scientific (скорость потока $180 \mu\text{l/h}$). Номинальное разрешение прибора 17 500. Реальное разрешение изменялось в ходе записи калибровочного спектра от 5 000 до 10 000 (для уровня 50%).

Использован режим регистрации положительно заряженных ионов в диапазоне масс m/z 50–900 u. Внешняя

калибровка шкалы масс прибора была проведена по 15 точкам в интервале масс 163–890 u. В качестве реперных точек использовались пики кластеров формиата лития при введении в прибор 10 mmol/l раствора LiOH в смеси 2-PrOH–0.2% водного раствора HCOOH (1:1 по объему). С помощью программы предварительной обработки масс-спектра, описанной ниже, точность калибровки оценена величиной 0.8 mmu (рис. 4).

Сбор и обработка данных выполнялись с использованием программного обеспечения Compass 1.3 for micrOTOF компании Bruker. В качестве хроматографической части использовался хроматограф Agilent 1200 с диодно-матричным УФ-видимым детектором и оснащенный колонкой 4.6×250 Agilent Zorbax Eclipse XDB C-18. Параметры хроматографического процесса: канал A — 5% деионизированная вода с добавкой 0.1% муравьиной кислоты (5%), канал B — 95% ацетонитрил, скорость потока 0.8 ml/min, изократическое элюирование. Детектирование на длине волны 254 nm.

Результаты и обсуждение

Использование разработанной в нашей лаборатории программы Spectr13 [2] предварительной обработки масс-спектра позволило в автоматическом режиме обнаружить в масс-спектре фрагмента хроматограммы пики с массами 485 и 486 и увидеть вероятное присутствие пика 487 массы (рис. 5).

Программа включает расчет положения, высоты, ширины пиков, уровня фона, а также стандартных отклонений положения и высоты. Суть обработки состоит в автоматическом разбиении всего масс-спектра на зоны пиков и аппроксимации каждого пика функцией Гаусса по методу наименьших квадратов. Масс-спектры для обработки представляются в текстовом формате в виде двух колонок: значения отношений масс к зарядовым числам ионов и интенсивности сигнала детектора. Программа распознает ASCII-II формат $\times.\text{xu}$ без дополни-

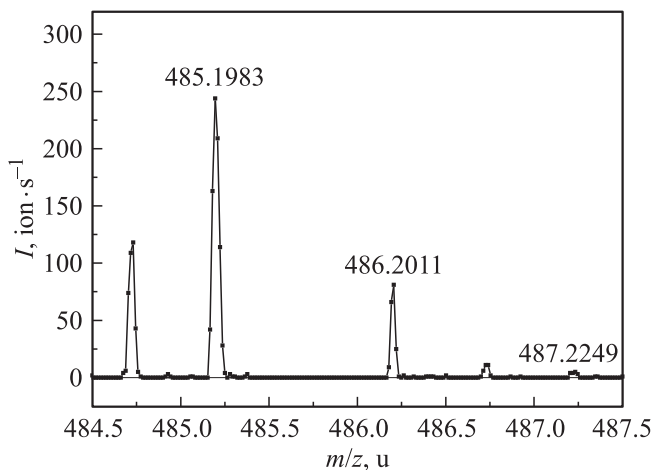
Таблица 2. Параметры расшифровки участка масс-спектра (программа Spectr13)

$m_{\text{tabl}}, \text{u}$	$m_{\text{mean}}, \text{u}$	$\Delta m_{\text{mean}}, \text{u}$	$m_{\text{meas}}, \text{u}$	$\Delta m_{\text{meas}}, \text{mmu}$	$B, \text{ion/s}$	I_{tabl}	I_{meas}	dm, mmu
485.2012	485.1984	1.24	485.1983	0.71	251	66.5	72.7	2.9
486.2046	486.2010	0.99	486.2011	0.45	89	27.5	25.8	3.5
487.2079	487.2273	13.8	487.2249	2.9	5	5.4	1.4	-17

тельных преобразований. Результаты расчета параметров пиков переносятся в программу Microsoft Excel для сортировки пиков по ширине и высоте и последующего отбора пиков для калибровки массовой шкалы. Программа апробирована при анализе масс-спектра метастабильных ионов [3] на масс-спектрометре МИ-1201 АГМ и рассмотрении влияния изотопного состава и ненасыщенности связей на спектр дефектов массы остаточных углеводов [4].

Программа с описанием работы, инструкцией пользователя и масс-спектрами, рассматриваемыми в настоящей работе, представлена в Интернете <http://mp.fizteh.urfu.ru/mass%20spectrometry>.

Основной недостаток программы — невозможность обработки совмещенных пиков. Дополнительно следует отметить неудачную реализацию автоматического разбиения масс-спектра на зоны, размер которых достигает 1 u. Такие размеры зон приводят к занижению величины стандартных отклонений параметров кривых аппроксимации в 4–5 раз, по сравнению с выбором (в „ручном режиме“) ширины зоны, равной ширине пика в его основании. Следует, однако, отметить, что расхождение значений самих параметров для этих двух режимов (ручного и автоматического) не превышает величины стандартного отклонения для ручного режима. Так, например, основной параметр 485 пика: положение вершины пика изменяется при смене варианта обработки на 0.012 mmu. Это оправдывает применение автоматического режима обработки с оценкой погрешности измерений ручного режима.

**Рис. 5.** Участок масс-спектра фрагмента хроматограммы (10.9 min), режим полного ионного тока (8 сканирований).**Таблица 3.** Участки масс-спектров для 8 сканирований

m/z	1	2	3	4	5	6	7	8	Sum
487.1764	0	0	0	0	0	0	0	0	0
487.1905	0	0	0	0	0	0	0	0	0
487.2045	0	0	0	0	1	2	1	0	4
487.2186	0	0	0	0	1	2	1	0	4
487.2327	1	1	0	1	1	1	0	0	5
487.2467	1	1	0	1	0	0	0	0	3
487.2608	0	0	0	0	0	0	0	0	0
487.2749	0	0	0	0	0	0	0	0	0

На рис. 5 представлен результат суммирования восьми последовательных сканирований.

Параметры расшифровки участка масс-спектра с помощью программы Spectr13 представлены в табл. 2.

Расчитанные по отдельным сканированиям значения масс ионов позволяют определить средние значения измеренных масс (m_{mean}) и их стандартные отклонения (Δm_{mean}), рассчитанные по формулам $m_{\text{mean}} = \sum mi/8$; $\Delta m_{\text{mean}} = [\sum(mi - m_{\text{mean}})^2/7]^{1/2}$. Исключение составляют ионы с массой 487.2 u. Их число в отдельных сканированиях равно в среднем двум (см. табл. 3), что потребовало использования для определения величин m_{mean} и Δm_{mean} программы Spectr13 в ручном режиме.

Остальные величины в табл. 2 рассчитаны для суммарного масс-спектра (рис. 5): m_{meas} — измеренное значение массы, Δm_{meas} — стандартное отклонение (рассчитаны из МНК модели программой Spectr13 в ручном режиме), dm — разность табличных и измеренных значений. B — измеренная высота интенсивности изотопных массовых пиков; I_{tabl} , I_{meas} — табличные и измеренные значения изотопного состава (относительные концентрации) соответственно.

Параметры расшифровки участка масс-спектра методом вычисления площадей и центроидов пиков с оценкой стандартного отклонения для центра пика [5] представлены в табл. 4.

В качестве меры интенсивности сигнала взята площадь пика S . Остальные обозначения те же, что и в табл. 2. Расчет среднего значения массы m_{mean} для ионов с массой 487.2 в данном случае не вызвал затруднений. При оценке стандартного отклонения для центра пика Δm_{meas} использован расчет среднеквадратичной ширины пика.

Результаты расшифровки участков масс-спектров для обоих методов согласуются с точностью 0.5 mmu. Рас-

Таблица 4. Параметры расшифровки участка масс-спектра (метод вычисления площадей и центроидов пиков)

$m_{\text{tabl}}, \text{u}$	$m_{\text{mean}}, \text{u}$	$\Delta m_{\text{mean}}, \text{u}$	$m_{\text{meas}}, \text{u}$	$\Delta m_{\text{meas}}, \text{mmu}$	$S, \text{ion/s}$	I_{tabl}	I_{meas}	dm, mmu
485.2012	485.1994	1.54	485.1993	0.61	804	66.5	80.2	1.9
486.2046	486.2013	1.49	486.2013	0.81	182	27.5	18.2	3.3
487.2079	487.2275	13.5	487.2248	3.7	16	5.4	0.5	-16.9

Таблица 5. Сравнение результатов обработки участка спектра программами Spectr13 и mMass

$m_{1\text{meas}}, \text{u}$	$B_1, \text{ion/s}$	$m_{2\text{meas}}, \text{u}$	$B_2, \text{ion/s}$	dm, u	I_1	I_2
485.1983	250.8	485.1996	230.6	-1.3	72.6	74.1
486.2011	89.4	486.2015	76.3	-0.4	25.9	24.5
487.2249	5.1	487.2248	4.4	0.1	1.5	1.4

хождение с табличными данными для масс 485.2 и 486.2 u не превышает величины 3.5 mmu. Табличные и измеренные значения изотопных распространенностей для этих пиков качественно согласуются. Пик ионов с массой 487.2 u имеет демонстрационный характер, не противореча изотопному распределению и, кроме того, показывает преимущества метода вычисления площадей при регистрации предельно малых сигналов.

Участки масс-спектров в диапазоне масс 487.17–487.28 для 8 сканирований и суммарный масс-спектр приведены выше в табл. 3.

Применение программы Spectr13 позволяет обнаруживать пики в автоматическом режиме. При обработке части масс-спектра (прямой напуск) в диапазоне масс 477–490 u программа Spectr13 обнаруживает 27 пиков, тогда как программа Compass приводит данные по 8 пикам. Расхождения в значениях масс для этих пиков не превышают в сравниваемых программах величины 1 mmu.

В табл. 5 приведено сравнение результатов обработки участка масс-спектра фрагмента хроматограммы программами Spectr13 и mMass. Цифры в наименованиях величин обозначают, что эти величины были рассчитаны программами Spectr13 (1) и mMass (2).

В табл. 5 $m_{1\text{meas}}, m_{2\text{meas}}$ — измеренные значения масс ионов, dm — разность измеренных значений; B_1, B_2 — измеренные высоты интенсивности изотопных массовых пиков; I_1, I_2 — измеренные значения изотопного состава.

Измеренные значения масс ионов в пределах погрешности измерений (1 mmu) совпадают. Хорошо согласуются результаты измерения изотопного состава.

Заключение

Применение программы предварительной обработки масс-спектров Spectr13 позволило зарегистрировать присутствие во фрагменте хроматограммы соединения

с низкой эффективностью протонирования. Стандартное программное обеспечение не позволило решить эту задачу. Сравнение возможностей программы Spectr13 и метода обработки масс-спектра по площади пиков обнаружило преимущества последнего при обработке спектров, содержащих в пике менее трех ионов. Результаты применения программ Spectr13 и программы обработки масс-спектров mMass для обработки слабых сигналов согласуются в пределах погрешности измерений.

Список литературы

- [1] Zyryanov G.V., Kovalev I.S., Egorov I.N., Rusinov V.L., Chupakhin O.N. // Chem. Heterocyc. Compd. 2011. Vol. 47. N 5. P. 571–574.
- [2] Соломеин А.А., Калинин Б.А., Александров Л.М. // Аналитика и контроль. 2003. Т. 7. № 1. С. 35–39.
- [3] Казгов М.А., Калинин Б.А., Александров О.Е., Волобуев П.В. // Масс-спектрометрия. 2009. Т. 8. № 1. С. 15–19; J. Anal. Chem. 2011. Vol. 66. N 14.
- [4] Калинин Б.А., Соломеин А.Р., Александров О.Е., Атанов В.Е. // ЖТФ. 2002. Т. 75. Вып. 2. С. 129–130.
- [5] Разников В.В., Пихтелев А.Р., Разникова М.О. // Масс-спектрометрия. 2006. Т. 3. № 2. С. 113–130.