

УДК 543.51

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО СОСТАВА ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ
УГЛЯ И ТОРФА ПРИ ПОМОЩИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО
РАЗРЕШЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ОПТИМАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ**

© 2017 г. А.С. КОНОНИХИН^{1,3}, А.Я. ЖЕРЕБКЕР^{1,2}, М.А. КАЗАЧКОВ², А.С. ГРИГОРЬЕВ³,
Ю.И. КОСТЮКЕВИЧ^{1,3}, С.И. ПЕКОВ^{1,3}, К.В. БОЧАРОВ^{1,3}, И.А. ПОПОВ^{1,3,4},
И.В. ПЕРМИНОВА¹, Е.Н. НИКОЛАЕВ^{1,3,4}

¹ *Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе
Российской академии наук, Москва*

² *Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

³ *Московский физико-технический институт (государственный университет),
Московская обл., г. Долгопрудный*

⁴ *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва
E-mail: ennikolaev@rambler.ru, iperm@org.chem.msu.ru*

Прогресс в области понимания молекулярного разнообразия в строении органического вещества в природе достигнут в последнее время благодаря применению масс-спектрометрии высокого разрешения, а именно, метода масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье в комбинации с ионизацией электрораспылением. Получение достоверной информации о молекулярном составе органического вещества ископаемых углей и торфа исключительно важно для решения задач, стоящих перед угольной отраслью, по поиску новых технологий переработки и способам нетопливного использования углей, в частности, для высокотехнологичной переработки в химикаты, новые материалы и полимеры. В работе проведен подбор оптимальных условий для регистрации масс-спектров высокого разрешения гуминовых веществ, выделенных из твердых горючих ископаемых – угля и торфа. Исследование молекулярного пространства гуминовых веществ торфа и угля в оптимальных условиях позволило впервые зафиксировать присутствие плохо ионизируемых углеводных и низкоокисленных насыщенных углеводородов.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, уголь, торф, гуминовые вещества.

**THE STUDY OF THE MOLECULAR COMPOSITION OF HUMIC SUBSTANCES
OF COAL AND PEAT BY HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY
WITH OPTIMAL ELECTROSPRAY CONDITIONS**

A.S. KONONIKHIN^{1,3}, A.YA. ZHEREBKER^{1,2}, M.A. KAZACHKOV², A.S. GRIGORIEV³,
Y.I. KOSTYUKEVICH^{1,3}, S.I. PEKOV^{1,3}, K.V. BOCHAROV^{1,3}, I.A. POPOV^{1,3,4},
I.V. PERMINOVA^{2*}, E.N. NIKOLAEV^{1,3,4}

¹ *Institute for Energy Problems of Chemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow*

² *Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow*

³ *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyi, Moscow Region*

⁴ *Emanuel Institute for Biochemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow*

Significant progress in the understanding of molecular diversity in the structure of organic matter in nature has been achieved recently through the use of high resolution mass spectrometry, namely, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTI-CR MS) in combination with electrospray ionization. Obtaining reliable information about the molecular composition of the organic matter of fossil coal and peat is essential to meet the new challenges facing the coal industry aimed at posh new technologies for processing and method for non-fuel use of coal, in particular, with a view to their processing in high-tech chemicals, new materials and polymers. The optimal conditions were found for high resolution mass spectrometry analysis of humic substances isolated from solid fuels – coal and peat. The study of the molecular space of humic substances from peat and coal in the selected optimal conditions allowed us to record the presence of poorly ionized carbohydrate and saturated hydrocarbons.

Key words: Mass-spectrometry, humic substances, coal, peat.

ВВЕДЕНИЕ

Гуминовые вещества (ГВ) – это основная органическая составляющая каустобиолитов угольного ряда, к которым относятся ископаемые угли, торфа, горючие сланцы и сапропели [1–3]. В отличие от органических компонентов каустобиолитов нефтяного ряда (асфальты, воски, нефть), в составе которых преобладают насыщенные и непредельные углеводороды, ГВ твердых горючих ископаемых обогащены кислородными функциональными группами, что определяет их кислотный характер. Как следствие, по сложности химического строения ГВ превосходят органическое вещество нефти и характеризуются экстремально высокой структурной гетерогенностью. Прогресс в определении молекулярного строения ГВ достигнут благодаря применению метода масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦР ПФ) в комбинации с ионизацией электрораспылением (ЭР) [4–9]. Однако высокомолекулярные и конденсированные компоненты ГВ (углеводы и полиароматические соединения) характеризуются низкой эффективностью ионизации в электроспрее, что затрудняет их анализ методом МС ИЦР ПФ, применяемой при анализе жидких ископаемых топлив. Несмотря на то, что изучение индивидуальных компонентов ГВ природных вод, представляющих собой низкомолекулярные высокоокисленные компоненты, методом МС ИЦР ПФ ЭР стало обычной процедурой [10, 11], получение масс-спектров высокого разрешения для ГВ твердых горючих ископаемых представляет собой не решенную методическую проблему. Это связано с высоким содержанием в составе ГВ из данных источников высокомолекулярных компонентов и неионогенных веществ, таких как углеводы и конденсированные ароматические соединения [12]. Получение достоверной информация о молекулярном составе органического вещества ископаемых углей и торфа исключительно важно для решения задач, стоящих перед угольной отраслью по поиску новых технологий переработки и способов нетопливного использования углей, в частности, для их высокотехнологичной переработки в химикаты, новые материалы и полимеры.

Ранее авторами было показано, что изменение условий ионизации, включая использование разных растворителей, может влиять на эффективность ионизации ГВ водного происхождения [13]. Задача данной работы – оптимизация условий ионизации электрораспылением для анализа ГВ, выделенных из торфа и угля, для получения максимально информативного масс-спектра ИЦР ПФ за сравнительно небольшое время анализа.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовались фульвокислоты верхового торфа PFA (Тверская обл.) и гуминовые кислоты бурого угля СНР (Powhumus, Germany), выделенные по стандартной методике Международного Гуминового общества (IHSS) для терригенных источников [2, 3]. Для подготовки проб к анализу навеска образца (1 мг) растворялась в 1 мл 10% раствора аммиака в дистиллированной воде (Milli-Q). Полученный раствор разбавлялся до концентрации 200 мкг/мл с использованием в качестве растворителя метанол или ацетонитрил.

Для регистрации масс-спектров ИЦР ПФ ЭР использовался гибридный масс-спектрометр LTQ FT (Thermo Electron Corp., Bremen, Germany), оборудованный сверхпроводящим магнитом с напряженностью магнитного поля 7 Т и электрораспылителем Ion Max (Thermo Electron Corp., Bremen, Germany), расположенный в Центре коллективного пользования Института биохимической физики РАН имени Н.М. Эмануэля. Анализируемый раствор распылялся со скоростью 1 мкл/мин в отсутствие осушающего газа в режиме отрицательных ионов. Детектирование проводилось в режиме полного сканирования в диапазоне масс 200–800 Да с разрешающей силой 400 000 при величине $m/z = 400$. Запись спектра производилась усреднением результатов 50 сканирований при подборе параметров съемки и 500 сканирований для анализа образцов. Автоматическая регулировка уровня сигнала (APU) настраивалась на накопление в линейной ионной ловушке 106 зарядов, которые затем переносились в ячейку ИЦР. Потенциал ЭР изменялся в диапазоне от $-2,4$ до $-3,9$ кВ с шагом 0,2 кВ. Оптимизация величины потенциала на выходе капилляра и параметров ионной оптики осуществлялась автоматически средствами программы Tune Plus (Thermo Electron Corp., Bremen, Germany) по интенсивности пика при $m/z = 389,1$. Масс-спектрометр калибровался с использованием стандартной калибровочной смеси LTQ FT. Масс-спектр ИЦР обрабатывался с использованием программного обеспечения Xcalibur 1.4 (Thermo Electron Corp., Bremen, Germany) для преобразования в масс-лист, который сохранялся в виде текстового файла. Обработка спектров для присвоения пикам молекулярных формул осуществлялась с помощью программного обеспечения Transhumus, разработанного А. Григорьевым, основанного на алгоритме статистике разности масс [14].

Результаты и обсуждение

Оптимизация интенсивности пиков в масс-спектрах ГВ торфа и угля проводилась путем подбора растворителя и увеличения напряжения на капилляре. Авторы предполагали, что увеличению интенсивности пиков высокомолекулярных компонентов ГВ будет способствовать выбор растворителя, обеспечивающий максимальную растворимость анализируемых проб, тогда как напряжение на капилляре электрораспыления будет влиять на полноту ионизации компонентов анализируемой смеси.

Основные растворители, которые используются для МС ИЦР ПФ, – метанол, ацетонитрил и водно-органические смеси на их основе [15–17]. ГВ торфа и угля, как правило, не растворяются в чистых органических растворителях, поэтому сначала их растворяют в щелочных водных растворах, а затем разбавляют нужным органическим растворителем. В работе авторы использовали смеси: вода:метанол (1:4), вода:метанол (1:3) и вода:ацетонитрил (1:4). При оптимизации учитывался тот факт, что интенсивность сигнала в масс-спектре – есть величина, которая отражает эффективность ионизации электрораспылением [15]. Поэтому в качестве оптимизируемого критерия рассчитывалась суммарная интенсивность шести пиков, воспроизводимого регистрируемых в спектрах ГВ, полученных в каждом из растворителей, обладающих достаточно высокой интенсивностью, чтобы быть зафиксированными даже в неоптимальных условиях. Для всех выбранных растворителей регистрировались спектры при различном напряжении на капилляре электрораспыления. Оптимизация параметров электрораспыления проводилась путем подбора растворителя и увеличения напряжения на капилляре.

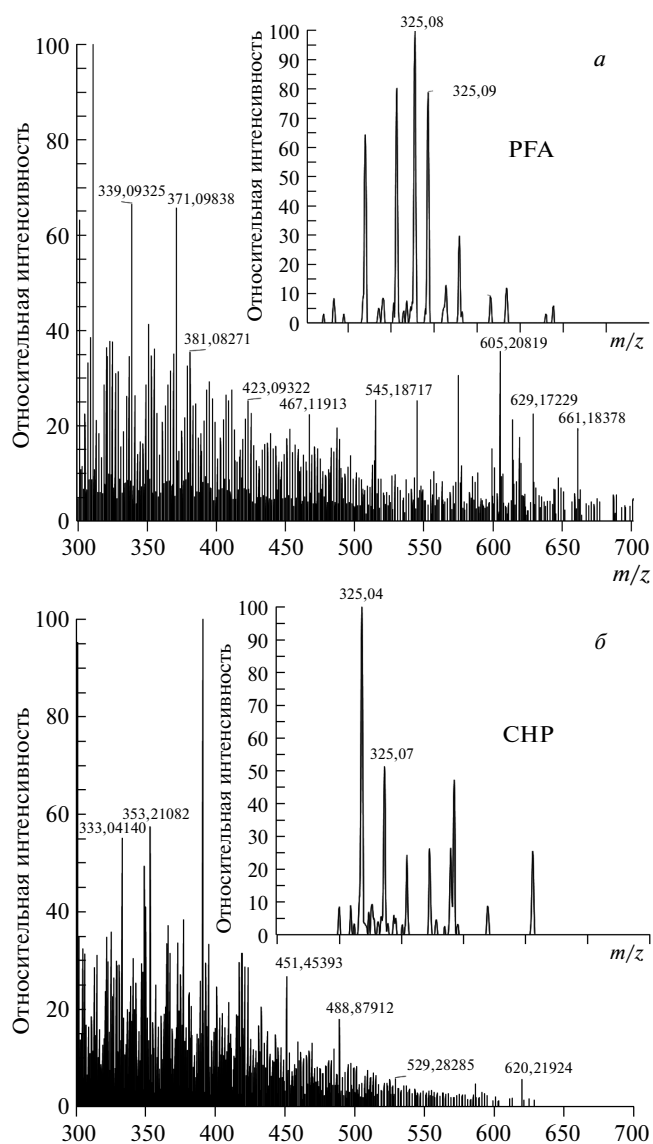


Рис. 1. Масс-спектры ИЦР ПФ образцов гуминовых веществ торфа PFA (а) и угля СНА (б) с выделенными фрагментами с примером реперных пиков.

трораспыления оценивалась по суммарной интенсивности шести пиков высокой интенсивности при трех значениях номинальных масс.

Критериями выбора таких реперных пиков было следующее:

- 1) пик должен обладать достаточно высокой относительной интенсивностью, чтобы его можно было зарегистрировать даже в неоптимальных условиях ионизации;
- 2) выбор трех различных значений номинальных масс обеспечивал большую представимость в пределах исследуемого диапазона масс;
- 3) выбор пары наиболее интенсивных пиков при каждой номинальной массе должен обеспечивать уменьшение вклада случайной погрешности в получаемые результаты;

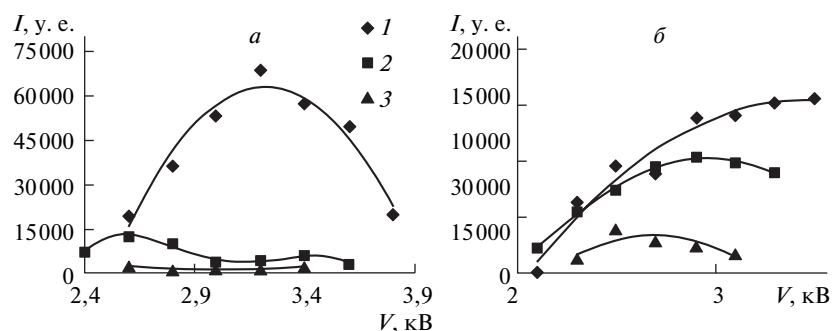


Рис. 2. Зависимость суммарной интенсивности шести реперных пиков для образцов фульвокислот торфа PFA-T7 (а) и гуминовых кислот угля SHP-09 (б): 1 – MeCN · H₂O (80:20); 2 – MeOH · H₂O (80:20); 3 – MeOH · H₂O (70:30)

4) пик не должен быть одиночным, так как для ГВ характерно распределение интенсивностей в масс-спектре.

На рис. 1 представлены типичные масс-спектры ИЦР ПФ для ГВ торфа и угля (PFA и SHP, соответственно), полученные усреднением 50 сканирований из различных растворителей с напряжением на капилляре –3 кВ. По приведенным критериям были выбраны пики со значениями m/z 325,08; 325,09; 337,02; 337,06; 599,14; 599,16 – для PFA и 325,04; 325,07; 337,04; 337,07; 599,12; 599,16 – для SHP. Эти пики воспроизводились во всех растворителях в широком диапазоне напряжений. Зависимости сумм интенсивностей выбранных пиков от напряжения на капилляре для различных растворителей приведены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, зависимость суммарной интенсивности шести реперных пиков в спектре ГВ от потенциала ЭР в диапазоне от –2 до –4 кВ имела экстремальный характер: сначала наблюдался рост интенсивности по мере возрастания потенциала ЭР, затем – снижение при увеличении потенциала сверх критической величины, когда наблюдалось появление коронного разряда и спад сигнала. Появление разряда фиксировалось визуально (с помощью камеры, передающей увеличенное изображение наконечника распылителя на монитор) и по резкому росту измеряемого значения ионного тока в отсутствие разряда, находящемуся в пределах 0,12–0,25 мкА. Было показано, что суммарная интенсивность выбранных пиков при одинаковом значении потенциала ЭР возрастает в ряду водно-метанольная смесь (1:3), водно-метанольная смесь (1:4) и водно-ацетонитрильная смесь (1:4).

В результате проведенных экспериментов было установлено, что водно-ацетонитрильная смесь (1:4) является оптимальным растворителем для регистрации масс-спектров ИЦР ПФ ЭР гуминовых веществ торфа и угля, а оптимальное напряжение ЭР на капилляре составляет –3,2 кВ – величина, значительно превышающая таковую для типичных условий получения спектров водных ГВ.

Исследование молекулярного пространства гуминовых веществ

При исследовании молекулярного состава ГВ торфа и угля были зарегистрированы спектры в оптимальных условиях с усреднением 500 сканирований для увеличения отношения сигнал-шум. Масс-спектры ИЦР ПФ характеризуются сверхвысоким разрешением, которое позволяет идентифицировать формулы индивидуальных соединений в сложной многокомпонентной системе [16, 18]. В то же время мягкий метод ионизации ЭР позволяет избежать фрагментации, в результате этого полученные спектры содержат только молекулярные ионы. Масс-спектры образцов PFA и SHP состояли из 12393 и 20521 пиков, соответственно, представленных в основном одноза-

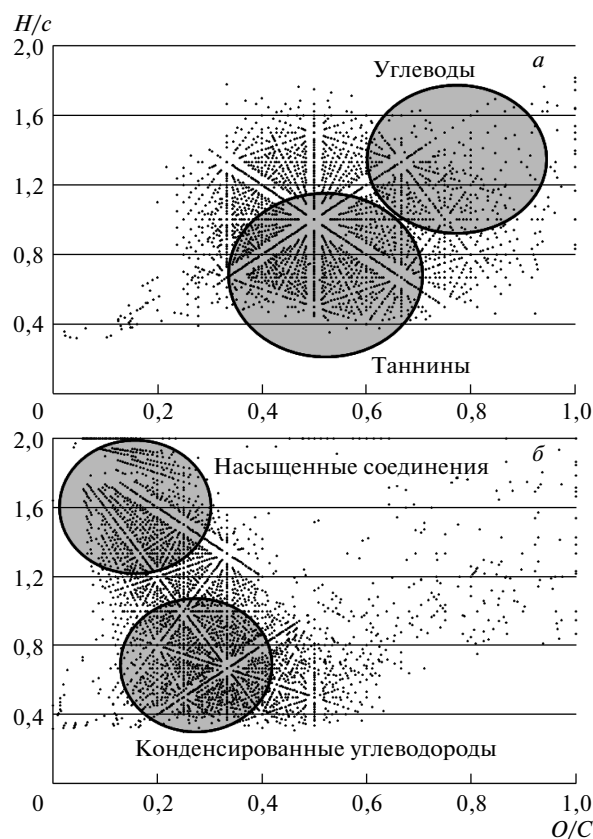


Рис. 3. Диаграммы Ван Кревелена, построенные для СНО-идентификаций из спектров МСИЦР ПФ для образцов ГВ торфа PFA (а) и угля СНР (б).

рядными ионами. Преобладание однозарядных ионов типично для ГВ [19]. Из полученных масс-спектров было идентифицировано 2843 и 3515 СНО формул для PFA и СНР соответственно. Соединения, содержащие другие гетероатомы, так как содержание кислорода на порядок превосходит содержание других гетероатомов (азота и серы) в составе ГВ, не рассматривались. Из полученных брутто-формул рассчитывались атомные соотношения H/C и O/C для каждого молекулярного компонента и строились диаграммы Ван Кревелена, которые представляют собой двумерное корреляционное поле с координатами H/C (ось Y) и O/C (ось X). Диаграмма была предложена для графической интерпретации данных по генезису углей. В 2003 г. авторы [20] предложили использовать этот способ для визуализации данных МС ИЦР ПФ, и с тех пор она является общепринятым способом графического представления данных МС ИЦР ПФ. Достоинство диаграмм Ван Кревелена – возможность разбиения всего поля на области, которые соответствуют основным предшественникам ГВ, таким как лигнины, таннины, терпеноиды, пептиды, карбогидраты и т.п. [21, 22], что позволяет сравнивать препараты по их компонентному составу. Диаграммы Ван Кревелена для двух исследуемых образцов приведены на рис. 3.

Диаграммы Ван Кревелена можно рассматривать как двумерную проекцию молекулярного пространства, занимаемого компонентами сложных смесей. Для молекулярного пространства двух исследуемых образцов ГВ, выделенных из твердых горючих ископаемых – торфа и угля, наблюдается ряд отличий от ГВ природных вод. Для об-

разца ГВ торфа (PFA) виден кластер углеводов, которые вносят существенный вклад в состав ГВ торфа, но характеризуются низкой эффективностью ионизации из-за отсутствия кислотных групп. Этот кластер, расположенный в области значений Н/С от 1 до 2 и О/С — от 0,6 до 1,0, отсутствует на диаграмме ГВ угля (СНР). Для этого образца характерна высокая заселенность области низкоокисленных насыщенных и конденсированных углеводов (О/С < 0,5), характеризующихся низким содержанием кислотных групп. Подобный низкоокисленный молекулярный состав отмечался для образцов нефти [5]. Таким образом, использование оптимальных условий ионизации позволяет исследовать на молекулярном уровне высокомолекулярную углеводную компоненту ГВ торфа и обедненные кислородом компоненты ГВ угля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе выполнен подбор оптимальных условий для регистрации масс-спектров высокого разрешения гуминовых веществ, выделенных из твердых горючих ископаемых — угля и торфа. Показано, что оптимальным растворителем является смесь ацетонитрил–вода, оптимальное напряжение на капилляре составляет –3,2 кВ. Данное значение потенциала ЭР превышает стандартное напряжения, используемые для анализа ГВ из других источников (например, природных вод). Исследование молекулярного пространства ГВ торфа и угля в подобранных оптимальных условиях позволило зафиксировать присутствие плохо ионизируемых углеводных компонентов в составе ГВ торфа и низкоокисленных насыщенных углеводов в составе ГВ угля.

Работа поддержана Российским научным фондом: гранты 14-24-000114 (оптимизация методики распыления и получения данных МСИЦР ПФ, А.С. Кононихин, Ю.И. Костюкевич, С.И. Пеков, И.А. Попов, Е.Н. Николаев) и 16-14-00167 (выделение гуминовых веществ и интерпретация данных МСИЦР ПФ, А.Я. Жеребкер, И.В. Перминова).

ЛИТЕРАТУРА

1. Орлов Д.С. Свойства и функции гуминовых веществ // Гуминовые вещества в биосфере. М.: Наука, 1993. С. 16–27.
2. Clapp C.E., Hayes M.H.B., Swift R.S. Isolation, fractionation, functionalities, and concepts of structures of soil organic macromolecules // Spec. Publ. Soc. Chem. Royal Society of Chemistry. 1993. V. 135. № 1. P. 31.
3. Swift R.S. Organic matter characterization // Methods soil Anal. Part 3. Chem. methods / Ed. D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnson, M.E.S. Madison // WI: SSSA Book. Ser. 5. SSSA. 1996. P. 1036.
4. Hertkorn N. et al. High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems // Anal. Bioanal. Chem. 2007. V. 389. № 5. P. 1311–1327.
5. Kostyukevich Y. et al. Enumeration of labile hydrogens in natural organic matter by use of hydrogen/deuterium exchange Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. // Anal. Chem. American Chemical Society, 2013. V. 85. № 22. P. 11007–11013.
6. Kostyukevich Y. et al. Enumeration of non-labile oxygen atoms in dissolved organic matter by use of $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ exchange and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. № 26. P. 6655–6664.
7. Zhrebker A.Y. et al. Synthesis of model humic substances: a mechanistic study using controllable H/D exchange and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // Analyst. The Royal Society of Chemistry. 2015. V. 140. № 13. P. 4708–4719.
8. Hughey C.A. et al. Identification of acidic NSO compounds in crude oils of different geochemical origins by negative ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // Org. Geochem. 2002. V. 33. № 7. P. 743–759.

9. *Marshall A.G., Hendrickson C.L., Jackson G.S.* Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer // *Mass Spectrom. Rev.* Wiley Subscription Services, Inc. A Wiley Company. 1998. V. 17. № 1. P. 1–35.
10. *Hertkorn N. et al.* Natural organic matter and the event horizon of mass spectrometry // *Anal. Chem.* ACS Publications. 2008. V. 80. № 23. P. 8908–8919.
11. *Stenson A.C., Marshall A.G., Cooper W.T.* Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. № 6. P. 1275–1284.
12. *Ковалевский Д.В. и др.* Количественное определение обменных и скелетных протонов гумусовых кислот с помощью спектроскопии ПМР // *Вестник МГУ.* 1999. Т. 2. С. 375–380.
13. *Куненков Э.В. и др.* Выбор оптимальных условий ионизации гуминовых веществ природных вод электрораспылением для анализа методом масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье // *Вестник МГУ.* 2010. Т. 51. № 5. С. 364–368.
14. *Kunenkov E.V. et al.* Total Mass Difference Statistics Algorithm: A New Approach to Identification of High-Mass Building Blocks in Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry Data of Natural Organic Matter // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. № 24. P. 10106–10115.
15. *Sleighter R.L., Hatcher P.G.* The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter // *J. Mass Spectrom.* 2007. V. 42. № 5. P. 559–574.
16. *Kujawinski E.B., Hatcher P.G., Freitas M.A.* High-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Humic and Fulvic Acids: Improvements and Comparisons // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. № 2. P. 413–419.
17. *Bossio R.E., Marshall A.G.* Baseline resolution of isobaric phosphorylated and sulfated peptides and nucleotides by electrospray ionization FTICR ms: another step toward mass spectrometry-based proteomics // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. № 7. P. 1674–1679.
18. *Wu Z. et al.* Resolution of 10000 Compositionally Distinct Components in Polar Coal Extracts by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry // *Energy & Fuels.* 2003. V. 17. № 4. P. 946–953.
19. *Gaspar A. et al.* Combined utilization of ion mobility and ultra-high-resolution mass spectrometry to identify multiply charged constituents in natural organic matter // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009. V. 23. № 5. P. 683–688.
20. *Kim S., Kramer R.W., Hatcher P.G.* Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the van Krevelen diagram // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. № 20. P. 5336–5344.
21. *Kujawinski E.B., Behn M.D.* Automated analysis of electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra of natural organic matter // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. № 13. P. 4363–4373.
22. *Tfaily M.M. et al.* Comparison of dialysis and solid-phase extraction for isolation and concentration of dissolved organic matter prior to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 404. № 2. P. 447–457.

Поступила в редакцию
25.VI.2016