

УДК 543.51

ПРИМЕНЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ В ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ*

Дж. У. А. Милл

Масс-спектрометрия высокого разрешения в настоящее время уступает лишь ядерному магнитному резонансу среди физических методов, находящихся на вооружении химиков-органиков и совершенно ясно, что несмотря на любые трудности, масс-спектрометрия в недалеком будущем займет первое место и что это лишь вопрос времени. Подавляющее преимущество масс-спектрометрии — колоссальная чувствительность, сравнимая лишь с чувствительностью счетчика Гейгера. Объем информации в расчете на микрограмм образца, обеспечиваемый масс-спектрометром, позволяет проводить все исследования на субмиллиграммовом уровне и внедрение этой техники в прикладной органической химии, например в биохимии, очевидно, должно принести большую пользу.

Область масс-спектрометрии высокого разрешения охватывает много дисциплин — от математики до биохимии и, возможно, по этой причине успех в этой области часто бывает обусловлен разрывом с укоренившимися традициями.

Библиография — 82 наименования.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	190
II. Системы ввода пробы	192
III. Конструкция приборов	193
IV. Разрешающая способность	196
V. Соотнесение пиков	197
VI. Автоматическая обработка данных	198
VII. Интерпретация спектров с помощью ЭВМ	203

I. ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальные принципы масс-спектрометрии были установлены в конце прошлого и начале этого столетия в ряде классических экспериментов Вином¹ и Томсоном². Эти исследователи показали, что пучок положительных ионов может быть отклонен электрическим или магнитным полем и что угол отклонения любого данного иона зависит от ряда параметров, один из которых есть масса иона. Томсон^{2,3} сконструировал масс-спектрограф, с помощью которого он показал, что неон дает не одну, а две линии, так как он состоит из двух стабильных изотопов, отличающихся по массе. Улучшенный масс-спектрограф разработал затем Астон⁴ и применил его для проведения подобных изотопных анализов многих элементов⁵. Примерно в это же время Демпстер⁶ опубликовал устройство своего масс-спектрометра, в котором анализируемые ионы фокусировались в точке, а не в плоскости, как в масс-спектрографах. В такой системе ионы обнаруживаются электрометрическим, а не фотографическим способом, и это нововведение, сильно повысившее чувствительность прибора, имело в дальнейшем огромное значение для масс-

* Перев. с англ. Р. В. Кудряцева; Quart. Rev., 22, 75—93 (1968).

спектрометрии высокого разрешения. Таким образом, с самого момента возникновения масс-спектрометрии развивалась в двух направлениях, которые сохранили свою обособленность и в дальнейшем, с развитием новых конструкций приборов. Наиболее сложные современные приборы — прямые преемники масс-спектрографа Астона или масс-спектрометра Демпстера, и в области масс-спектрометрии высокого разрешения, которой будет посвящен данный обзор, никаких фундаментальных изменений или успехов в конструкции этих приборов не было достигнуто.

Первой областью органической химии, в которой была применена масс-спектрометрия, был анализ углеводов⁷ — область, в которой проблемы подготовки образца минимальны, а вещества обычны относительно стабильны и летучи. С этого момента развитие роли масс-спектрометрии в органической химии сильно замедлилось, в ожидании решения двух определенных проблем: 1) проблемы надежного испарения и ионизации нелетучих или нестабильных соединений и 2) проблемы обработки и извлечения всего богатства информации, заключающегося в масс-спектрах.

Большинство систем подготовки образца, применяемых для органических соединений, создано исходя из предположения, что образец должен быть введен в зону ионизации в газообразном состоянии при давлении, не превышающем 10^{-5} мм рт. ст. При таких давлениях средняя длина свободного пробега равна приблизительно пяти метрам и ионно-молекулярными столкновениями можно пренебречь. Первые масс-спектрометры были сконструированы с системами ввода газовой пробы⁸, которые в сороковых годах были приспособлены для ввода летучих органических жидкостей⁹. В 1955 г. была разработана техника прямого ввода образца в зону ионизации^{10, 11}. Прямой ввод образца через вакуумный затвор¹² общепринят в настоящее время, и большинство имеющихся в продаже приборов снабжены такой системой ввода образца, которую, пожалуй, можно считать наиболее широко применяемой в органической химии. Применяя ту или иную из имеющихся систем ввода пробы, химик-органик сможет получить масс-спектры большинства органических соединений. Однако с теми соединениями, которые не удастся перевести в газовую фазу без разложения, нельзя работать подобным образом, и они представляют специальную проблему, которая будет обсуждаться ниже.

Техника извлечения информации из масс-спектров находится в зачаточном состоянии, однако уже вполне ясно, благодаря новаторским работам Бейнона^{13, 14}, Бимана¹⁵, Джерасси¹⁶, Мак-Лафферти¹⁷ и др., что масс-спектрометрия открывает огромные возможности как аналитический метод в органической химии. Уже имеется много эмпирических данных по механизмам фрагментации, разумное применение которых во многих случаях¹⁸ оказало огромную помощь в проблеме определения строения веществ.

С тех пор как Бейнон¹⁴ показал, что с приборами большей разрешающей способности масса иона может быть определена с достаточной точностью, чтобы позволить сделать вывод об атомном составе этого иона, большие усилия и средства были направлены на развитие масс-спектрометрии высокого разрешения. Масс-спектрометры были настолько усовершенствованы, что такая точность стала рутинной. Обработка большого объема данных с помощью вычислительной техники для каждого спектра высокого разрешения стала довольно обычным делом, и изумительная новая область интерпретации масс-спектров с помощью электронных вычислительных машин (ЭВМ) активно разрабатывается в настоящее время.

Настоящий обзор, который не претендует на то, чтобы быть исчерпывающим, посвящен наиболее важным результатам этих работ. Ряд важных областей, таких, как различные методы ионизации, здесь рассмотрен не очень глубоко, а интересующийся читатель может найти детали подобного рода в более подробном обзоре Мак-Лафферти и Пинзелика¹⁹. Цель данного обзора состоит в анализе роли масс-спектрометрии высокого разрешения в органической химии в свете последних ее достижений и будущих перспектив.

II. СИСТЕМЫ ВВОДА ПРОБЫ

Было создано⁸ много различных систем для ввода газовой пробы, в большинстве из которых применяется молекулярное натекание в системе понижения давления, причем во многих системах в качестве запорной жидкости применяется ртуть. Замена^{20, 21} ртути на галлий расширяет температурную область применения этих систем за 300° и позволяют создать систему ввода пробы, которая может быть использована для большого числа неполярных органических молекул²². Для обычной работы с такими веществами очень хороша стеклянно-металлическая система, впервые описанная Бейноном²². Позднее был создан²³ упрощенный вариант этой системы, однако, в отличие от своего предшественника, он не поступал в продажу. Была разработана также цельнометаллическая эмалированная система²⁴.

Прямой ввод пробы в ионный источник при контролируемой температуре был впервые описан около двенадцати лет тому назад^{10, 11, 25}, однако все эти приспособления были неудобны, так как в масс-спектрометре невозможно было сохранить вакуум в момент ввода образца. Эта трудность была преодолена введением вакуумного затвора^{12, 26–29} и созданные системы ввода пробы, имеющиеся в настоящее время в продаже, можно применять для всех термически устойчивых соединений, которые, однако, не отличаются исключительно малой летучестью. Более того, отмечалось, что для соединений, обладающих умеренной термической стабильностью, прямой ввод пробы предпочтительнее старых систем в том отношении, что образец, по существу, мгновенно испаряется, а не нагревается продолжительное время. Для очень летучих веществ был сконструирован криогенно-охлаждаемый дозатор³⁰. Аналогичный, упрощенный дозатор был создан³¹ и для работ при -100° , однако ни одна модель подобного типа в продажу не поступила.

Простая методика применения меченых атомов основана на том, что так называемые «активные атомы водорода» можно заменить на дейтерий, если образец вводят в ионный источник вместе с D₂O либо через дозатор³², либо через систему непрямого ввода³³.

После первой успешной попытки Гольке³⁴ присоединять выход газового хроматографа к ионному источнику масс-спектрометра была проделана большая работа по решению двух основных проблем: 1) уменьшение времени записи масс-спектрометра до 1–10 сек., т. е. времени выхода хроматографического пика и 2) удаление газа-носителя, применяемого в хроматографе. Были введены усовершенствования и в электронику, например магнитное сканирование при высоком разрешении может выполняться со скоростью 10 сек. на декаду масс и приборы с такими возможностями в настоящее время имеются в продаже. Однако значительно более трудным оказалось эффективное удаление газа-носителя без потери образца, и ни один из созданных сепараторов нельзя считать вполне эффективным, хотя громадная чувствительность масс-спектрометра в какой-то степени компенсирует этот недостаток. В продаже

имеются три конструкции сепараторов — Бимана — Ватсона³⁵, который, по-существу, является молекулярным ситом; молекулярный сепаратор Рихаге³⁶, который удаляет молекулы газа-носителя, так как они появляются из сопла со значительно меньшим моментом, чем молекулы анализируемого образца и сепаратор Луэллина с полупроницаемой мембраной³⁷, которая пропускает органические молекулы и задерживает молекулы газа-носителя. Описано применение пористого тефлона³⁸ в качестве сепаратора, но это приспособление было подвергнуто критике по сравнению с сепаратором Бимана — Ватсона³⁹. Капиллярные колонки можно применять без сепаратора⁴⁰. В печати появилось обсуждение общих проблем, встречающихся в хромато-масс-спектрометрии⁴¹.

С большинством органических соединений можно работать, применяя ту или иную из описанных выше систем ввода пробы, однако некоторые сильно-полярные вещества не удастся перевести в газовую фазу без разложения. Для подобных соединений наиболее перспективен перевод их в летучие производные, например в триметилсилильные простые и сложные эфиры.

Вызывают затруднения также соединения, которые, хотя и легко испаряются, однако не дают молекулярного иона. В таких случаях иногда помогает снижение ионизирующего напряжения, а ионизация полем вместо электронного удара открывает большие возможности, несмотря на снижение чувствительности. Однако в настоящее время к этой проблеме относятся терпимо и лишь стремятся извлечь из масс-спектров остальную, имеющуюся в них информацию.

III. КОНСТРУКЦИЯ ПРИБОРОВ

В продаже имеются два типа масс-спектрометров высокого разрешения, пригодных для работы с органическими соединениями: SEC-21-10B (Консолидейтед Электродайнемикс Корпорэйшн, Пасадена, Калифорния) и AEI MS-902 (Ассошиейтед Электрикал Индастриз, Лтд, Манчестер, Англия). Другие, имеющиеся в продаже масс-спектрометры высокого разрешения, не будут здесь рассматриваться, так как все они представляют собой лишь позднейшие добавления к этой области и геометрически подобны либо 21-1101, либо MS-902. Кроме того, имеется сравнительно мало данных относительно качества других приборов при сочленении их с системами автоматической обработки данных.

Как в 21-110B, так и в MS-902, ионы образуются при электронном ударе в близких по конструкции ионных источниках. Ионы затем выбрасываются из ионного источника ускоряющим напряжением, обычно 8 кВ, и фокусируются сначала в электростатическом, а затем в магнитном секторе. Разделенные ионные пучки, каждый из которых гомогенен в смысле отношения массы к заряду*, затем попадают в детектирующую систему.

Прибор MS-902 близок к первоначальному спектрометру Демпстера⁶ в том отношении, что он построен в соответствии с геометрией Нира — Джонсона, изображенной на рис. 1. В этой системе анализируемые ионные пучки фокусируются на сложной конической поверхности. В фокальной точке этой системы помещается выходная щель, за которой находится первый диод электронного умножителя. По мере сканирования магнитного поля, обычно от более высокого поля (больших масс) к низкому, ионы разных масс по очереди один за другим попадают на ум-

* В этом обзоре рассматриваются лишь однозарядные ионы. Поэтому впредь будет употребляться термин «масса», а не «отношение массы к заряду».

ножитель, выходной сигнал усиливается и записывается на шлейфовом осциллографе. Следовательно, масса данного иона может быть определена по времени от начала сканирования до его появления, и если точно известно время для ионов стандарта, то можно вычислить точную массу неизвестного иона.

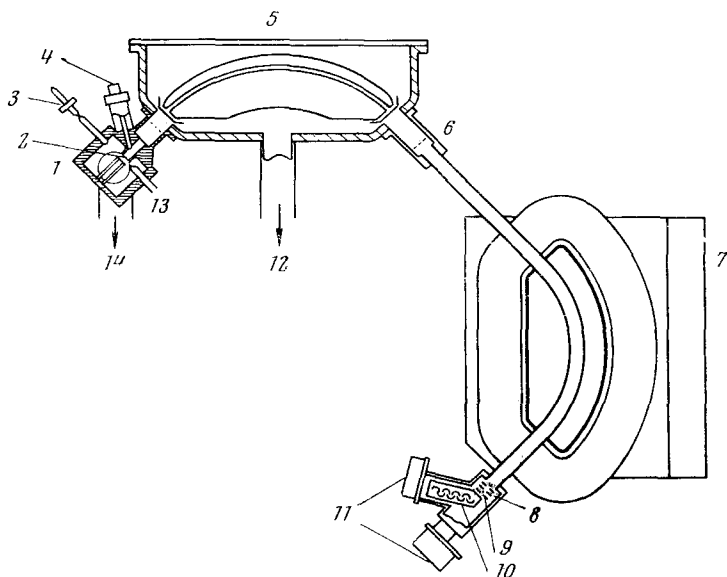


Рис. 1. Схематическое изображение прибора MS-902. Геометрия Нира—Джонсона: 1—ионный источник, 2—регулируемая щель; 3—ввод твердой пробы, 4—вентиль, изолирующий источник, 5—электро-статический анализатор, 6—подвижный коллектор, 7—магнитный анализатор, 8—дополнительный коллектор, 9—регулируемая щель, 10—электронный умножитель, 11—к усилителям и самописцу, 12—система откачки анализатора, 13—ввод газовой пробы, 14—система откачки источника

В противоположность этому геометрия Маттауха — Герцога, примененная в приборе 21-110В и показанная на рис. 2, обеспечивает фокусировку анализируемых ионов на плоскость, в которой обычно помещается фотопластинка. Следовательно, такой «спектрометр» является по-существу «спектрографом», каким был первоначальный прибор Астона⁴. Изображение каждого отдельного иона регистрируется на пластинке и место регистрации зависит от квадратного корня из массы. Плотность линии спектра пропорциональна количеству ионов данной массы. Сканирование магнитного поля не требуется; точное значение массы иона может быть получено при точном измерении положения линии на фотопластинке по отношению к ионам стандарта. Прибор 21-110В снабжен также электрической детектирующей системой, в основе которой лежит электронный умножитель, помещенный в фокальной плоскости у дальнего конца фотопластинки (см. рис. 2). Это устройство представляет собой альтернативу фотопластинки и позволяет записывать масс-спектр при сканировании магнитного поля также как и в приборе MS-902.

Сравнение этих двух спектрометров менее интересно, чем сравнение двух методов записи масс-спектров, т. е. метода фоторегистрации и процедуры сканирования. Статичность фоторегистрации очень удобна, так как автоматическая обработка данных, полученных на фотопластинке, сравнительно несложна: она требует лишь проведения ряда точных из-

мерений положения линий и анализа этих линий с помощью фотоденситометра. Быстрое и воспроизводимое сканирование магнитного поля довольно трудно и электрическая схема этого весьма сложна. Другая серьезная техническая проблема создается требованием определения местоположения центра каждого пика по шкале времени с точностью одна часть на 10^5 .

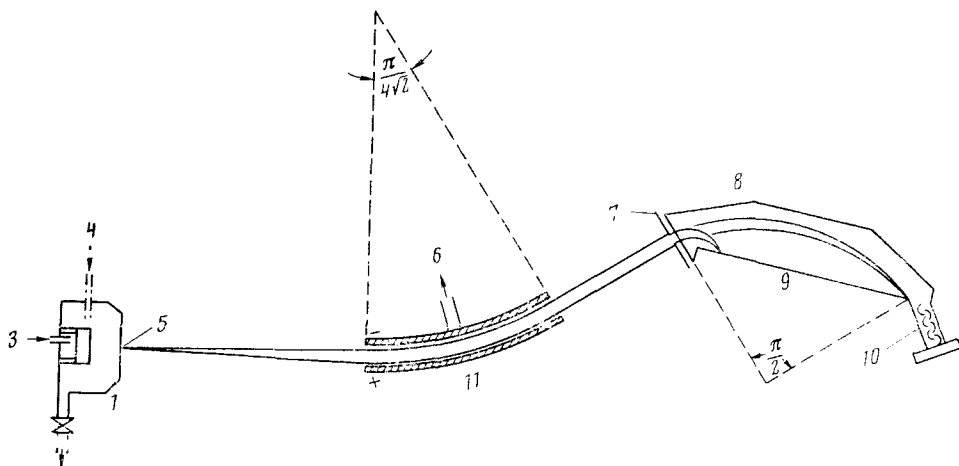


Рис. 2. Схематическое изображение прибора 21-110В. Геометрия Маттауха — Герцога: 1 — ионный источник, 2 — система откачки источника, 3 — ввод газовой пробы, 4 — ввод твердой пробы, 5 — фокусирующая щель, 6 — система откачки анализатора, 7 — электроды, отклоняющие луч, 8 — электромагнитный сектор, 9 — плоскость фокусировки, 10 — электронный умножитель, 11 — электростатический сектор

Прибор 21-110В труднее фокусировать⁴² и, так как он не может усиливать сигнал, регистрируемый на фотопластинке, его чувствительность по отношению к некоторым ионам неизбежно меньше, чем у сканирующего спектрометра, который легко может обнаружить одиночный ион. Более того, применение фотопластинки затрудняет измерение интенсивностей ионов, в то время как запись на фотопластинке представляет собой по существу график масса — интенсивность.

Полный спектр при разрешающей способности в одну часть на 10^4 может быть зарегистрирован любым методом примерно за 10 сек., что позволяет снимать масс-спектры за время выхода пика из газового хроматографа. Соотнесение пиков (см. ниже) возможно на обоих приборах, но в этом отношении MS-902 имеет значительные преимущества. Наконец, метастабильные ионы легче обнаружить с помощью MS-902, чем 21-110В, хотя это и не столь существенно при работе с высоким разрешением, где такие пики редко наблюдаются на любом спектрометре.

Подводя итоги можно сказать, что хотя спор о преимуществе одного спектрометра по сравнению с другим бесцелен, справедливо отметить, что электрическое детектирование, за счет его гораздо более высокой чувствительности и точности, несомненно превосходит метод фоторегистрации, неизбежным и серьезным ограничением которого служит размер зерен на эмульсии фотопластинки. Обработка данных при магнитном сканировании более затруднительна, однако, как будет показано далее, она может быть выполнена на обоих приборах и несомненно окажется в будущем предпочтительным методом записи масс-спектров высокого разрешения.

IV. РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ

Считают, что два пика равной высоты хорошо разрешены, если провал между ними не превышает 10% от высоты пика и разрешающую способность системы в этом случае определяют как разницу в массах двух ионов, например 1 часть на 5000 или 200 *м. д.* Это условие «10%-ной величины провала» для разрешающей способности не является единственным, однако оно применяется гораздо чаще, чем другие, например, «1%-ная величина провала», и мы будем пользоваться им в этом обзоре. Приборы, в которых нельзя легко достичь разрешающей способности в одну часть на 5000, обычно непригодны для измерений масс с точностью, необходимой для определения формул ионов, возникающих из различных органических соединений, за исключением самых простых случаев и поэтому эти приборы не будут здесь рассматриваться.

Разрешающая способность в одну часть на 10 000 часто считается необходимым условием измерения массы с точностью, достаточной для определения формулы, однако это в двух смыслах не вполне правильное обобщение. Пожалуй, более полезно вспомнить правило, основанное на опыте, что, в зависимости от применяемой методики, можно ожидать, что точность измерения масс будет на один или два порядка выше разрешающей способности прибора. Таким образом, разрешающая способность в 1 часть на 10 000 должна позволить измерять массу иона с точностью примерно в 1 часть на 200 000 или 5 *м. д.* Другой аспект проблемы состоит в том, что требуемая точность зависит прежде всего от стоящей задачи. Если неизвестно из каких элементов состоит вещество, то следует стремиться к наивысшей достижимой точности, однако, если эти данные имеются, или, как будет обсуждаться позднее (см. ниже), они могут быть получены из самого спектра, то бессмысленно применять разрешающую способность, которая слишком велика для решения поставленной задачи.

Приведем простой пример. Для ионов с массой 140 (пренебрегая ионами, содержащими ^{13}C и ^2H) в масс-спектре углеводорода можно предположить лишь два возможных состава $\text{C}_{10}\text{H}_{20}^+$ (m/e 140, 1566) * и $\text{C}_{11}\text{H}_8^+$ (m/e 140, 0626). Эти ионы будут полностью разделены при разрешающей способности 671 *м. д.* (1 часть на 1492) и масса каждого иона будет определена с точностью, достаточной для выбора между двумя предполагаемыми составами при разрешающей способности 1 на 1000. На деле эта частная задача столь проста, что ее можно решить при ручном измерении положения пика на осциллограмме⁴³. Углеводороды представляют собой простейший случай и по мере увеличения числа различных элементов в исследуемом веществе, возрастают требования к точности измерения масс для надежного определения формулы иона.

Однако подавляющее большинство органических соединений не содержит других элементов кроме углерода, водорода, кислорода и азота. Наиболее близкими друг к другу окажутся ионы, представляющие простые комбинации этих элементов (опять-таки пренебрегая изотопными пиками, имеющими малую интенсивность) и отличающиеся на 0,0126 а.е.м., что соответствует разнице между массами метиленовой группы и азотом. При массе 500 эти ионы дадут отдельные пики при разрешающей способности 25 *м. д.* (1 часть на 40 000), а измерение масс будет вполне легко провести при разрешающей способности 1 часть на 10 000. Хотя это несколько менее обычно, однако встречаются дубликаты, которые более трудно разделить, например $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ и N_3 , отличающиеся лишь на 0,00135 а. е. м. Введение в рассмотрение серы галоидов или

* По шкале, принятой IUPAC, где $^{12}\text{C} = 12,000\ 000$.

^{13}C делает необходимой еще более высокую точность и, с приборами, имеющимися в настоящее время, спектроскопист скоро окажется между Сциллой высокого разрешения и Харибдой достаточной чувствительности. На практике присутствие серы, хлора или брома может быть немедленно обнаружено по их характерному изотопному распределению, в то время как иод обнаруживается по его большому отрицательному дефекту массы. Обычно считают, что разделение дублетов ^{13}C — ^{12}CH и $^1\text{H}_2$ — ^2H находится вне пределов возможностей современных приборов, так как требует разрешающей способности в 1 часть на 25 000 при массе 100. В настоящее время большинство приборов применяют при разрешающей способности ~ 1 части на 10 000. Хотя и 21-110В, и MS-902 могут втрое превзойти эту величину, приведенная цифра представляет компромисс между чувствительностью и разрешением.

Именно с этого момента область масс-спектрометрии высокого разрешения обособляется от масс-спектрометрии низкого разрешения. Масс-спектрометры низкого разрешения имеют огромную ценность во многих областях, например при анализе следов, изучении кинетики реакций, работе с мечеными атомами и изучении строения, однако именно в этой, последней области, масс-спектрометрия высокого разрешения имеет непревзойденные возможности. Надежное определение формулы каждого типа ионов в спектре и последующее воссоздание на основании этих фрагментов единственно возможной структуры молекулы, имея всего лишь несколько микрограммов вещества — все это чудо, от которого перехватывает дыхание, однако, как мы увидим, в действительности это было сделано всего лишь в нескольких случаях.

В. СООТНЕСЕНИЕ ПИКОВ

В принципе масс-спектрометр мог бы быть прокалиброван и все переменные величины можно было бы контролировать так, что точное измерение массы иона могло бы быть сделано немедленно на основании его положения на фотопластинке или времени его появления в процессе магнитного сканирования. Однако имеется слишком много переменных величин, с которыми надо иметь дело и надежный контроль некоторых из них очень труден. Поэтому обычный метод заключается в непрерывной калибровке стандартными ионами и измерении массы неизвестного иона по отношению к одному или двум стандартным ионам. Это делает необходимым одновременный ввод образца и стандарта. Большинство лабораторий применяют в качестве стандартного вещества либо перфторкеросин (ПФК), либо гептакозафтортрибутиламин. Последний представляет собой индивидуальное вещество, достаточно летучее, чтобы его можно было вводить через систему ввода газовых проб, в то время как ПФК обычно состоит из смеси гомологов и его нужно вводить через нагреваемую систему ввода пробы. Однако ПФК имеет большое преимущество, давая стандартный ион, по крайней мере через каждые 12 а.е.м., в то время как в спектре гептакозафтортрибутиламина имеются большие расстояния между интенсивными ионами и совсем нет ионов выше m/e 614.

Единственным простым методом измерения масс с точностью 10 м. д. является метод соотношения пиков, разработанный Кизенбери, Сколмэном и Ниром ⁴⁴. При сохранении постоянными ускоряющего напряжения электростатического анализатора изменяют магнитное поле так, чтобы сфокусировать стандартный ион меньший по массе, но как можно более близкий к неизвестному иону. Небольшой вспомогательный магнит за-

тем перемещается в обе стороны внутри очень малого диапазона масс вблизи этого иона, например для стандартного иона $C_2F_4^+$ (99,99362) от 99,996 до 99,990, и сигнал регистрируется осциллографом. Ускоряющее напряжение и напряжение электростатического анализатора затем сдвигается в сторону более низких значений до тех пор, пока неизвестный пик не совпадет с пиком стандарта. Когда это произойдет, то отношение более высокого ускоряющего потенциала к более низкому потенциалу может быть непосредственно снято с прибора, и оно равно отношению массы неизвестного пика к массе стандарта. Таким образом, если ион неизвестной массы совпадает со стандартным ионом $C_2H_4^+$ при отношении потенциалов 1,020150, то неизвестная масса может быть вычислена и окажется равной 102,0085. Эта величина имеет практически шесть значащих цифр и поэтому имеет точность 0,001 а.е.м. при m/e ниже 1000. Так как ускоряющее напряжение можно только уменьшать, то для фокусировки меньшей массы нужно изменить магнитное поле, поэтому в качестве стандарта более удобно иметь ион меньшей массы. Максимальное отношение, которым можно пользоваться в оригинальной системе Нира, равно 1,10, т. е. неизвестная масса не должна отличаться больше чем на 10% от массы стандарта. Позднее было разработано⁴⁵ приспособление, изменяющее напряжение для MS-902, расширяющее эту область до 2,00, хотя, по другим причинам, обычно работают в интервале до 1,70. В этих условиях гептакозафтортрибутиламин оказался надежным внутренним стандартом и им часто пользуются для соотнесения пиков при работе с MS-902. Однако для 21-110B система соотнесения пиков имеет предел этого отношения, равный 1,10 и так как в нем применяется электрометр, а не осциллограф, то этим способом трудно пользоваться.

Несмотря на то, что система соотнесения пиков, вероятно, будет со временем вытеснена в ходе борьбы за существование техникой автоматической обработки данных, ее нынешнее состояние имеет огромное значение. Она все еще остается самым быстрым и самым простым способом точно измерять массы ограниченного числа ионов в спектре, таких, как молекулярный ион и основные осколочные ионы. На приборе MS-902 опытный оператор может, пользуясь этим методом, определять точное значение массы одного пика в минуту. Это, пожалуй, в 10—100 раз медленнее по сравнению с непрерывной автоматической системой обработки данных, однако это много дешевле. Между прочим, можно отметить, что Рихаге⁴⁶ приспособил системы соотнесения пиков к масс-спектрометру с простой фокусировкой и сообщил об удивительно точных измерениях масс.

VI. АВТОМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Автоматическая техника обработки необходима для масс-спектрометрии высокого разрешения по двум причинам. Во-первых, объем данных лишь в одном масс-спектре высокого разрешения слишком велик, чтобы его обрабатывать вручную путем соотнесения пиков, и, во-вторых, установление формулы ионов известной массы, хотя оно и может быть выполнено в отдельных случаях с помощью таблиц*, является для большого числа ионов серьезной проблемой, требующей помощи быстрой действующей цифровой ЭВМ.

* Вполне удовлетворительных таблиц нет и не может быть. Наиболее распространенные таблицы Бейнона и Вильямса⁴⁷ содержат лишь комбинации C, H, O и N, в то время как очень дорогой четырехтомник Тунниклифа и др.⁴⁸ «Таблицы масс комбинаций из 16 элементов с приложением» ограничен лишь теми комбинациями, которые содержат более 10 атомов углерода.

Автоматическая обработка данных, полученных на фотопластинке, относительно проста и впервые была выполнена группой Бимана^{49, 50} в 1964 г. Необходимое оборудование состоит в основном из передвижного микроскопа и фотоденситометра. Микроскоп сканирует пластинку и измеряет плотность почернения с интервалами 0,25 мк. Этот отсчет плотности преобразуется в электрический сигнал фотоумножителем и становится У-координатой, которая, вместе с соответствующей Х-координатой (расстояние от начала спектра) подается на вход быстродействующего аналого-цифрового преобразователя. Полученный цифровой сигнал сбрасывается до тех пор, пока У-координата не превысит заранее установленную «пороговую» величину, т. е. пока не появится пик. Как только это произойдет, данные передаются на магнитную ленту. Таким образом, лента не расходует впусую для записи всех точек между пиками. В настоящее время для цифровой ЭВМ составляет сравнительно простую задачу — рассчитать центр каждого пика, опознать пики стандарта, рассчитать точные массы неизвестных пиков, отделить их друг от друга и вычесть пики стандарта из масс-спектра. Результатом этих операций будут данные о точных массах и их интенсивностях для неизвестных ионов в спектре.

Обработка на таком уровне первичных данных, получаемых на приборе MS-902, несколько более сложна, однако она была выполнена^{51, 52, 53}. При быстром сканировании усилительная система должна иметь полосу пропускания по крайней мере 10 кГц и прежде всего в этом отличие MS-902 от его предшественника MS-9. Выходной сигнал при сканировании записывается прямо на магнитную ленту методом частотной модуляции и эта аналоговая запись затем преобразуется в цифровую. Аналогово-цифровое преобразование в этом случае есть операция, в ходе которой ЭВМ измеряет и записывает выходное напряжение через заданные промежутки времени — оптимально каждые 10—15 мксек при полном времени сканирования 10 сек., что даже при замедлении поступления данных с ленты в 32 раза требует быстродействующей вычислительной системы. Затем рассчитывается временной центр каждого пика и полученные цифровые данные зависимости напряжения от времени соответствуют данным измерения зависимости интенсивности от расстояния, получаемым на фотопластинке. Однако в этом последнем случае расстояние соответствует квадратному корню из массы, тогда как соотношение время — масса, при квази-экспонентальном магнитном сканировании, более сложно. На практике было показано, что если имеются три известных иона в диапазоне масс, не превышающем 24 а. е. м., то масса любого иона, появляющегося в пределах 12 а. е. м. от любого конца этой области может быть вычислена с достаточной точностью. Не всякий неизвестный ион может оказаться в пределах этого диапазона, но, если в качестве внутреннего стандарта применяется ПФК, то в этом диапазоне окажется ион стандарта, который будет опознан как таковой. Таким образом, диапазон в 24 а. е. м. может быть сдвинут на 12 а. е. м. в сторону более низких масс и расчет массы неизвестного иона возобновлен. Как и прежде, установленный заранее «пороговый» уровень позволяет исключить большие расстояния между пиками, ионы стандарта опускаются и результирующие цифровые данные масса — интенсивность накапливаются на магнитной ленте.

Последней стадией при создании таблицы масс является проблема цифровой ЭВМ. Каждая масса должна коррелироваться с единственной элементной формулой. Были написаны так называемые программы ELCOMP, которые решают эту задачу разными способами. Простейший и, пожалуй, наиболее обычный из них состоит в вычислении массы каж-

дой возможной комбинации С, Н, О и N и любых других элементов в зависимости от необходимости. Если возможно, то устанавливаются верхний и нижний пределы числа атомов каждого присутствующего элемента. Если они не известны заранее, то ориентировочно их можно определить из молекулярного иона. Каждая вычисленная масса сравнивается с наблюдаемой массой, и, если разница между этими двумя величинами превышает заранее установленную допустимую ошибку, обычно 0,001—0,003 *а. е. м.*, то рассматриваемая формула отбрасывается и рассчитывается следующая. Иногда, для осуществления выбора в трудных случаях, можно применить принцип внутренней согласованности. Например, выбор между $C_{20}H_{37}O_5^+$ и $C_{21}H_{39}O_5^+$ может быть решен в пользу последнего, если во всех остальных ионах отсутствует азот. Для решения этой проблемы были написаны и другие программы⁵⁴ и предложены остроумные решения. Один метод⁵⁵ состоит в том, что все вычисленные массы сохраняются в памяти ЭВМ и в нужный момент осуществляется лишь поиск подходящей массы. Несколько отличается от этого весьма многообещающий метод⁵⁶, при котором все комбинации С, О, N сохраняются в памяти ЭВМ и для получения правильного ответа нужно скомбинировать их с подходящим числом атомов водорода. Была сделана попытка⁵⁷ расчета формулы на основании дефекта массы иона, т. е. разницы между наблюдаемой массой и ближайшей меньшей целочисленной массой. Сообщено⁵⁸ также об остроумном методе, основанном на массовой шкале, где $CH_2 = 14,000\ 000$. Выбор программы зависит от размера и быстродействия имеющейся ЭВМ, причем необходимо каждую массу рассчитывать настолько быстро, чтобы успеть сделать это до появления на ленте следующей массы. Это довольно просто, так как движение ленты может быть замедлено или даже остановлено, но при методе непрерывного расчета результатов по мере их получения, который будет обсуждаться ниже, эта спасительная возможность отсутствует и существующие наиболее быстродействующие ЭВМ оказались лишь едва удовлетворительными.

Как уже упоминалось ранее, определение формулы значительно упрощается, если известен элементный состав молекулы. Один способ получить эти данные состоит в тщательном изучении ионов с m/e ниже 100. По-видимому, можно считать достаточно строгим предположение⁵⁹, что все элементы с атомным весом меньше 100 должны появиться в виде ионов с m/e меньше 100 и так как требования к точности, необходимой для определения формулы в этом низком пределе, значительно ослаблены, то это может открыть путь к простому методу качественного анализа. Вооруженная этими данными ЭВМ с гораздо большей легкостью решит трудные задачи выбора, которые возникают при более высоких массах.

Поиски удовлетворительного внутреннего стандарта продолжаются многими группами в двух различных направлениях. Улучшение вычислительных методов должно в принципе привести к системе, в которой, пожалуй, десяти опорных ионов через каждые 100 *а. е. м.* будет достаточно для измерений масс. С другой стороны, при неудовлетворительном качестве программ, имеющихся в настоящее время, точность могла бы быть значительно повышена, если бы ионы стандарта имелись на каждой единице массы, что возможно в случае применения углеводов с прямой цепочкой в качестве опорного соединения. Это, однако, может привести к наложению углеводородных пиков и пиков исследуемого образца, а что касается дейтероуглеводородов, то они относительно малодоступны, и, во всяком случае, с их помощью нельзя решить проблему из-за плохого разделения дублета 1H_2 — 2H .

Основным достижением, появившимся как побочный результат бурного развития вычислительной техники и ее применения в масс-спектрометрии было создание простой методики построения линейчатых масс-спектров. На вход прибора, строящего линейчатые масс-спектры, обычно подаются данные о массах и интенсивностях ионов, а на выходе получается изящный линейчатый масс-спектр, пригодный для хранения или для публикации. Обычно это делается после снятия масс-спектра, но описано и одновременное построение линейчатого спектра⁶⁰ в момент снятия масс-спектра.

При этом скорость сканирования спектрометра резко снижается из-за малой скорости прибора, строящего линейчатый спектр.

Венкатарагаван, Мак-Лафферти и Эми⁶¹ сообщили о некоторых расчетах с помощью ЭВМ, основанных на данных, получаемых на фотопластинке. В этих расчетах накладывающиеся пики были разрешены математически. В этой работе эффективная разрешающая

способность прибора была увеличена более, чем на 300% — результат, который должен стимулировать большую активность в этом направлении.

Если вычислительная техника имеет достаточное быстродействие, чтобы обрабатывать целый спектр, состоящий из нескольких сотен ионов, меньше, чем за одну минуту, то возникает реальная возможность отказаться от промежуточной записи на магнитную ленту и подавать аналоговый сигнал с масс-спектрометра прямо на ЭВМ. Подобная техника записи «на линии» была разработана для обработки данных магнитного сканирования, а также и данных, получаемых с фотопластинки, хотя гораздо больше попыток было посвящено обработке данных магнитного сканирования^{62, 63, 64}. Не говоря о том, что подобная система производит впечатление весьма хитроумного сооружения, она имеет также и вполне реальные преимущества. Исключается проблема колебаний ленты, экономится очень ценное время ЭВМ, вся система становится единым целым и открываются интересные перспективы обратной связи. Очевидно, это та область, где несколько сближается невероятный разрыв между невежеством программирования и возможностями ЭВМ.

После получения набора ионов, внутренне согласованного с точки зрения их элементного состава и интенсивности, немедленно встает проблема о наилучшем изображении результатов. Первой попыткой решить эту проблему была таблица масс Бимана^{49, 50} и в некоторых отношениях она так и не была усовершенствована в дальнейшем. Достоинством этой таблицы масс, как можно увидеть, является то, что вся информа-

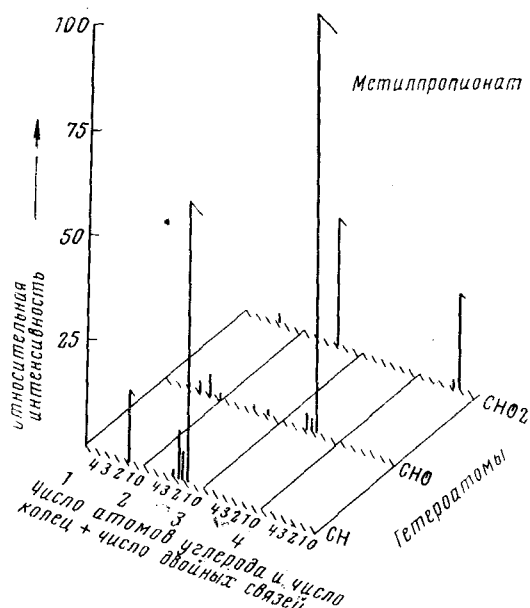


Рис. 3. Таблица масс, предложенная Венкатарагаваном и Мак-Лафферти. Каждое большое деление на оси X представляет число атомов углерода и каждое маленькое деление — целое число колец и двойных связей. По оси Z дано содержание гетероатомов и по оси Y — интенсивность

ция на ней представлена сжато, но довольно ясно. Основные критические замечания относительно таблицы масс Бимана состоят в том, что, будучи цифровой по своей природе, она не столь наглядна, как график, например линейчатый спектр. Пытаясь преодолеть это затруднение, Венкатарагаван и Мак-Лафферти⁶⁵ создали трехмерное изображение, как показано на рис. 3, и встретились с противоположной проблемой. При взгляде на это изображение можно видеть все интенсивности, но не элементный состав. Было создано⁶⁶ и другое изображение, в котором полный линейчатый спектр делается для каждой комбинации гетероатомов, как это показано на рис. 4. Это, до некоторой степени, наиболее ясный способ изображения из всех трех; интенсивности и состав довольно легко можно видеть на таком графике, однако другой график, где гетероатом потерян, что является, в конце концов, вполне обычным типом фрагментации, приводит в неменьшее замешательство, чем мысль о по-

Дезоксигидро-N₆-метиладжмалин

CH	CHO	CHN	CHNO	CHN 2	CHN 10
94		6/8 0****			
95	7/11 *	6/10—0			
98			5/8 1*****		
103	8/7—0***				
106		7/8 0**			
107		7/9—0*			
108		7/10—0***			
110		7/12—0****			
115	9/7—0***				
117		8/7 0**			
118		8/8 0*			
120		8/10 1**			
122		8/12 2*			
123		8/13 2*			
124			7/10 0**		
126			7/12—0'		
127	10/7—0**				
129		9/7 1*			
130		9/8 0***			
131		9/9—0****			
132		9/10—1***			
142		10/8—0*			
143		10/9—0**			
144		10/10—0****			
145		10/11—0***			
152		10/18—0****			
154		10/20—0**			
156		11/10—0*			
157		11/11—0*			
158		11/12 0***	10/8—0**		
159			10/9—0*		
160			10/10—0***		
167		12/9—0*			
168			10/18 0**		
170		12/12 0**			
173			11/11 0**		
181		13/11—0***			
182		13/12—0****	11/20 0*****		
183				12/11 2**	
197				13/13 0****	
213				14/17—0***	
269					17/21 1*
326					21/30—0*

Таблица масс, предложенная Биманом с согр. Первая колонка показывает номинальную массу; вторая — все ионы, содержащие лишь С и Н; третья — ионы, содержащие С, Н и один атом О и т. д. Шифр каждого иона представляет собой число атомов С и Н, отклонение реальной массы в 10^{-3} а. е. м. и относительную интенсивность в логарифмической шкале, выраженную 1—9 звездочками.

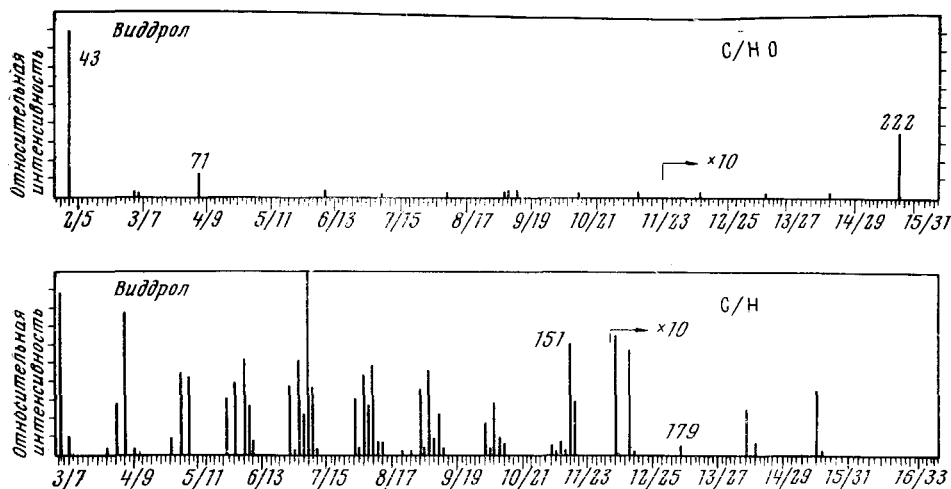


Рис. 4. Таблица масс, предложенная Барлинггеймом и Смитом. На каждом графике даны лишь ионы с тем или иным содержанием гетероатомов. Каждое большое деление на оси X соответствует одной частице CH_2 , оно разделено на 14 малых делений, соответствующих одному атому водорода или одной единице массы

добном способе изображения для соединения, содержащего шесть атомов азота и шесть атомов кислорода.

Вывод, который напрашивается при изучении всех этих сложных попыток, состоит в том, что на нынешней стадии переработка информации не позволяет получить удобоваримые для человека результаты и что продолжение работы в этом направлении следует предоставить ЭВМ. Как это может быть сделано, обсуждается в следующем разделе.

VII. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СПЕКТРОВ С ПОМОЩЬЮ ЭВМ

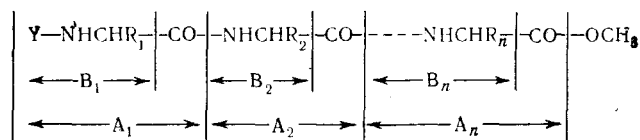
Обработка таблиц масс с помощью ЭВМ — область масс-спектрометрии, возраст которой исчисляется скорее месяцами, чем годами. За исключением одного наглядного и ободряющего успеха, усилия, вложенные в решение этой проблемы, не принесли пока существенных результатов и цель этого раздела состоит прежде всего в обсуждении методов подхода к проблеме. Большая часть этого материала не опубликована и, как и в случае всех неопубликованных работ, упоминаемых в этом обзоре, читатель отсылается к будущим выпускам журнала *Analytical Chemistry*, где ожидается публикация большинства статей.

Даже беглый взгляд на таблицу масс обычно дает какую-то структурную информацию. Например, можно, вероятно, сразу видеть, что молекулярный ион теряет метильную и карбоксильную группы, и поэтому можно предположить, что эти группы имеются в молекуле. Однако подобная информация может быть извлечена, хотя и с меньшей уверенностью, из спектра низкого разрешения и так подходить к таблице масс значит игнорировать большую часть содержащейся в ней информации. С другой стороны, можно ожидать, что серьезное изучение каждого иона в таблице масс позволит понять как его появление, так и его судьбу, как будет показано ниже. Можно надеяться, что такая информация, наряду с данными по элементному составу, позволит определить строение молекулы. Подобного рода детальное изучение таблиц масс требует слишком много времени, чтобы это делать вручную, но это исключитель-

но простая задача даже для примитивной ЭВМ. Существо проблемы состоит в том, чтобы сделать выбор между двумя, обсуждаемыми ниже методами подхода. Первый опирается на существующие знания о путях фрагментации. Второй способ подхода не использует какой бы то ни было априорной информации этого рода. Второй способ может казаться более разумным, однако пока он принес гораздо меньше успеха, чем первый и вполне вероятно, что комбинация этих двух способов подхода окажется лучше, чем любой из них по отдельности.

Некоторое время тому назад было показано^{67, 68}, что в масс-спектрах пептидов наиболее подвержены расщеплению связи CO—N, откуда следует, что масс-спектры должны содержать информацию о последовательности звеньев в молекулах. Это явление было с успехом использовано⁶⁹ в определении последовательности звеньев в фортутине, метилом эфире липидоацилнопептида. Большая часть этой работы была сделана вручную на масс-спектрах низкого разрешения, хотя элементный состав некоторых наиболее важных ионов был подтвержден соотношением пиков.

Две выдающиеся работы, одна группы Мак-Лафферти⁷⁰, а другая группы Бимана⁷¹ являются первыми сообщениями об определении последовательности звеньев в пептидах при интерпретации масс-спектров с помощью ЭВМ. Была получена таблица масс для метилового эфира N-ацилпептида, которая была затем использована для ввода информации на последней стадии обработки данных с помощью ЭВМ. Предполагается, что пептидная цепь разрывается в каждом положении A, а также, менее обычно, в положении B. В спектре прежде всего ищут ион с массой, соответствующей N-ацилглицилу (т. е. A₁; R=H). Если этого иона нет, то ищут ион N-ацилаланила (A₁; R=Me) и т. д., пока этот первый ион не будет идентифицирован. После того, как A₁ найден, из его массы вычитается CO (27, 9949), что даст массу B₁.



После того, как это сделано в A₁, добавляется ряд фрагментов A₂ (R₂=H, Me и т. д.) до тех пор, пока непрерывная проверка не покажет, что найден правильный состав A₂. После этого опять ищут B₂ и весь процесс повторяется, пока не будет найден молекулярный ион. Этот метод, который с небольшими вариациями применяют обе группы, имеет ряд осложнений. Фрагментация боковой цепи, независимая от основных процессов расщепления A и B, может создать дилеммы. Например, перегруппировка и отщепление C₃H₆ от валина может привести к тому, что его нельзя будет отличить от глицина, но если это произойдет, то вряд ли это будет исключительным процессом, и в результате будут обнаружены глицин и валин как следующее аминокислотное звено и выбор в пользу валина в этом случае элементарен. Для того, чтобы пептид был достаточно летуч и мог дать масс-спектр, и аминный и карбоксильный его концы должны быть закрыты соответствующими производными. Карбоксильная часть обычно превращается в метиловый эфир, а лучшими из изученных⁷¹ аминных производных (Y) оказались ацетил-, тридегтероацетил-, трифторацетил- и карбобензокси-производные. Пептиды, содержащие более десяти аминокислот, этим способом не изучались и ре-

зультаты показывают, что верхний предел молекулярного веса должен лежать в этих границах, причем главное ограничение — недостаточная летучесть.

Эти методы, разумеется, сугубо специфичны для пептидов, которые, по крайней мере с точки зрения путей их фрагментации, представляют исключительно простые объекты изучения. Общая проблема создания программ, необходимых для обработки любой молекулы или даже любого класса молекул, а не только пептидов, еще не решена, но работа в этой области уже началась. В одном из предложенных методов⁷² ЭВМ автоматически выполняла операции по расшифровке спектров высокого разрешения, которые обычно выполняет опытный спектроскопист, например, подсчет колец и двойных связей, идентификацию гетероатомов в рамках функциональных групп и поиск гомологического ряда ионов.

Другая очень интересная разработка^{73, 74} дает возможность своего рода диалога, в котором спектроскопист связан с ЭВМ, сообщая ей программу с набором правил фрагментации для изучаемого соединения и затем заставляет ЭВМ применить эти правила для выяснения строения изучаемого соединения на основании его масс-спектра.

Был написан «следопытский» тип программы⁷⁵, в соответствии с которой ЭВМ рассматривает каждый ион по очереди и сравнивает его с таблицей масс до тех пор, пока не находит «первый возможный материнский ион», который должен содержать по крайней мере столь же большое число атомов каждого элемента, как и дочерний ион, от которого он должен отличаться на «допустимый» фрагмент, например H, но не на «недопустимый» фрагмент, такой как H₂ или H₃. Следовательно, C₁₀H₂₂O⁺ может быть материнским ионом для C₁₀H₂₁⁺, но не для C₁₀H₂₄O₂⁺ или C₁₀H₁₉⁺. Таким способом может быть составлена таблица фрагментации, имеющая по меньшей мере ограниченное применение, что помогает иногда получить весьма ценную информацию о строении.

Были созданы программы⁷⁶, позволяющие ЭВМ определить строение алифатических углеводов и жирных кислот на основании их масс-спектров с использованием простых эмпирических правил фрагментации. Они, по-видимому, очень редко дают неточные ответы, но приблизительно в 20% всех случаев вообще не дают ответа.

Об очень интересной работе недавно сообщил Ледерберг⁷⁷ из Стэнфорд Артифишл Интеллидженс Проджект. Эта группа разработала программу, которая создает все возможные структурные изомеры, соответствующие молекулярной формуле. Более того, она может при этом обойти химически абсурдные формулы, содержащие, например, группировки —NH—O—O—H, и может расположить остальные формулы в порядке их наибольшей вероятности. Таким образом, при наличии масс-спектра высокого разрешения, в котором идентифицирован молекулярный ион, создается список формул, в котором затем осуществляется «эвристический» поиск (т. е. не полный поиск, так как это потребовало бы слишком много времени, а поиск в разумно ограниченной области) структуры, согласующейся с масс-спектром. Так называемая программа DENDRAL-64 написана на языке LISP, языке ЭВМ, который гораздо лучше подходит для изображения и оперирования с химическими структурами, чем обычно применяемый язык FORTRAN, и его успех, связанный с отходом от традиций, поучителен. Программы, созданные к настоящему времени, не могут оперировать с циклическими соединениями, но, по имеющимся сведениям, эта проблема в принципе уже решена.

Весьма желательной чертой любой системы обработки данных было бы получение информации, позволяющей сделать определенный вывод, что изучаемая молекула действительно претерпевает распад $A^+ \rightarrow B^+ + C$.

Подобную информацию позволяют получить метастабильные переходы и вполне возможна^{78, 79} их автоматическая запись и интерпретация, однако эти переходы можно наблюдать лишь при низком разрешении, следовательно, необходим второй спектр. Более того, появление метастабильности иона — это вопрос удачи, зависящий от многих переменных, например от совершенно непредсказуемых скоростей реакций фрагментации. Главным образом по этой последней причине метастабильные ионы используются лишь как вспомогательное доказательство и система истолкования результатов, построенная на этих ионах была бы очень ненадежной.

Гораздо более перспективен метод, разработанный Дженнингсом^{80, 81}, который использовал тот факт, что если процесс $M_1^+ \rightarrow M_2^+ + M_3$ происходит вне электрического и магнитного полей, между двумя секторами MS-902, то дочерний ион будет ускорен так же, как и M_1^+ , но отклонится в магнитном поле как M_2^+ . После несложных изменений в электрической схеме прибора оказалось возможным изучать дочерний ион M_2^+ и однозначно идентифицировать его предшественник. Интересным результатом этих работ было открытие, что дочерний ион обычно имеет несколько предшественников. Этот метод был недавно применен при изучении пептидов⁸² и стал в настоящее время полуавтоматическим.

ЛИТЕРАТУРА

1. W. Wien, Ann Physik, **65**, 440 (1898).
2. J. J. Thomson, Phys. Mag., **21**, 225 (1911).
3. J. J. Thomson, Rays of Positive Electricity London Green und Co, London, 1913.
4. F. W. Aston, Phil. Mag., **38**, 707 (1919).
5. F. W. Aston, Isotopes, Edward Arnold 1922, стр. 1924.
6. A. J. Dempster, Phys. Rev., **11**, 316 (1918).
7. H. W. Washburn, H. F. Wiley, S. M. Rock, Ind. Eng. Chem. (Anal.), **15**, 541 (1943).
8. Дж. Бейнон, Масс-спектрометрия и ее применение в органической химии ИЛ, М., 1964, стр. 159.
9. Там же, стр. 167.
10. P. Bradt, F. L. Mohler, Anal. Chem., **27**, 875 (1955).
11. P. De Mayo, R. I. Reed, Chem. and Ind., **1956**, 1481.
12. J. L. Courtney, J. S. Shannon, Tetrahedron Letters, **1963**, 13.
13. J. H. Beynon, Advances in Mass Spectrometry ed. J. Waldron, Pergamon Press, 1959, стр. 328.
14. J. H. Beynon, Advances in Mass Spectrometry ed., Elliott, Там же, 1961, стр. 216; см. так же⁸.
15. K. Biemann, Mass Spectrometry. Organic Chemical Applications, McGraw-Hill, N. Y., 1962.
16. Г. Будзикевич, К. Джерасси, Д. Уильямс, Интерпретация масс-спектров органических соединений, «Мир», 1966.
17. Mass Spectrometry of organic Ions, ed. McLafferty. Academic press, N. Y., 1963.
18. См. напр. K. Biemann в кн. Progress in the Chemistry of organic Natural Products, ed L. Zechmeister, XXIV, 1966.
19. F. W. McLafferty, J. Pinzelik, Anal. Chem., **38**, 350R (1966); см. также³⁹.
20. M. J. O'Neal, T. P. Wier, Anal. Chem., **23**, 830 (1951).
21. M. J. O'Neal, Applied Mass Spectrometry, The Institute of Petroleum, London, 1954, стр. 27.
22. См.⁸, стр. 193.
23. V. J. Coldcourt, Anal. Chem., **27**, 1670 (1955).
24. C. Brunee, Ztschr. Instrumentenk., **73**, 16 (1965).
25. R. I. Reed, J. Chem. Soc., **1958**, 3432.
26. H. C. Hill, R. I. Reed, J. Sci. Instr., **40**, 259 (1963).
27. G. A. Junk, H. J. Svec, Anal. Chem., **37**, 1629 (1965).
28. G. L. Kearns, Там же, **36**, 1402 (1964).
29. M. Barber, T. O. Merren, W. Kelly, Tetrahedron Letters, **1964**, 1063.
30. H. A. McGee, мл, NASA Doc. № 6 323 401 (1963).
31. W. F. Haddon, E. M. Chait, F. W. McLafferty, Anal. Chem., **38**, 1968 (1966).
32. См.¹⁵, стр. 231.
33. J. S. Shannon, Austr. J. Chem., **15**, 265 (1962).

34. R. S. Gohlke, *Anal. Chem.*, **31**, 535 (1959).
35. J. T. Watson, K. Biemann, Там же, **36**, 1135 (1964); **37**, 844 (1965).
36. R. Ryhage, *Anal. Chem.*; **36**, 759 (1964), *Arkiv Kemi*, **26**, 305 (1966).
37. P. M. Llewellyn, D. P. Littlejohn, Pittsburgh Conf. Anal. Chem. App. Spectroscopy, Feb. 1966.
38. S. R. Lipsky, C. G. Horvath, W. J. Murray, *Anal. Chem.*, **38**, 1585 (1966).
39. M. A. Grayson, C. J. Wolf, Там же, **39**, 1438 (1967).
40. D. Henneberg, Там же, **38**, 495 (1966).
41. W. H. McFaddon, E. A. Day, Там же, **36**, 2362 (1964).
42. Р. И. Рид, *Усп. химии*, **36**, 2209 (1967).
43. B. H. Johnson, T. Aczel, *Anal. Chem.*, **39**, 682 (1967).
44. K. S. Quisenberry, T. T. Scolman, A. E. Nier, *Phys. Rev.*, **102**, 1071 (1956).
45. H. M. Fales, R. Binks, M. Elliott, R. Freeman, Proc. of the ASTM, Committee E-14, Dallay, 1966.
46. R. Ryhage, Proc. of the ASTM Committee E-14, Denver, 1967.
47. J. H. Beynon, A. E. Williams, *Mass and Abundance Tables for Use in Mass Spectrometry*, Elsevier Publishing Co., London, 1963.
48. D. D. Tunnicliff, P. A. Wadsworth, D. O. Schissler, 16-Element Mass an abundance Table with Supplement 4 vols, Shell Development Co, Emeryville, California, 1965.
49. K. Biemann, P. Bommer, D. M. DeSiderio, *Tetrahedron Letters*, **1964**, 1725.
50. K. Biemann, Proc. of the ASTM, Committee E-14, St. Louis, 1965.
51. A. J. Campbell, J. S. Halliday, B. M. Green, T. O. Merron, T. G. Murray, Там же.
52. C. Merritt, P. Issenberg, M. K. Bazinet, B. N. Green, T. O. Merron, J. G. Murray, *Anal. Chem.*, **37**, 1037 (1965).
53. W. J. McMurray, B. N. Green, S. R. Lipsky, Там же, **38**, 1194 (1966).
54. D. D. Tunnicliff, P. A. Wadsworth D. O. Schissler, *Anal. Chem.*, **37**, 543 (1965) и работы, цитированные в этой статье.
55. A. L. Burlingame (частное сообщение), 1966.
56. E. Gilbert, (неопубликованная работа).
57. J. Van Katwijk, *Appl. Spectroscopy*, **18**, 102 (1964).
58. E. Kendrick, *Anal. Chem.*, **35**, 2146 (1963).
59. E. Gilbert, H. M. Fales, G. W. A. Milne, (неопубликованная работа).
60. R. N. Stillwell, *Anal. Chem.*, **38**, 940 (1966).
61. R. Venkataraghavan F. W. McLafferty, J. W. Amy, Там же, **39**, 178 (1967).
62. W. J. McMurray, S. R. Lipsky, B. N. Green, см. ⁴⁶.
63. C. Merritt, P. Issenberg, M. L. Bazinet, Там же.
64. A. L. Burlingame, D. H. Smith, R. W. Olsen, *Anal. Chem.*, **40**, 13 (1968).
65. R. Venkataraghavan, F. W. McLafferty, Там же, **39**, 278 (1967).
66. A. L. Burlingame, D. H. Smith, (частное сообщение).
67. K. Heyns, H. F. Grützmaier, *Tetrahedron Letters*, **1963**, 1761.
68. N. S. Wulfson, V. A. Puchkov, B. B. Rozinov, A. M. Zyakun, M. M. Sheamaykin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, V. T. Ivanov, *Tetrahedron Letters*, **1965**, 2793.
69. M. Barber, P. Jolles, E. V. Vilkas, E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **18**, 469 (1965).
70. M. Senn, R. Venkataraghavan, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5593 (1966).
71. K. Biemann, C. Cone, B. R. Webster, G. P. Arsenault, Там же, **88**, 5598 (1966).
72. R. Venkataraghavan, F. W. McLafferty, см. ⁴⁶.
73. A. Mandelbaum, P. V. Fenessey, K. Biemann, см. ⁴⁶.
74. K. Biemann, P. V. Fenessey, *Chimia*, **21**, 225 (1967).
75. H. M. Fales, E. Gilbert, P. G. Gordon, R. J. Highet, G. W. A. Milne, (неопубликованная работа).
76. B. Petterson, R. Ryhage, *Anal. Chem.*, **39**, 790 (1967).
77. J. Lenderberg, NASA, Doc. CR-57029 (1964) CR-68898 (1965); CR-68899 (1966); Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **53**, 134 (1965).
78. R. E. Rhodes, M. Barber, R. L. Anderson, *Anal. Chem.*, **38**, 48 (1966).
79. N. R. Mancuso, S. Tsunakawa, K. Biemann, Там же, **38**, 1775 (1966).
80. K. R. Jennings, *Chem. Comm.*, **1966**, 283.
81. M. Barber, K. R. Jennings, R. E. Rhodes, *Naturforsch.*, **22a**, 15, (1967).
82. M. Barber, W. A. Wolstenholme, K. R. Jennings, *Nature*, **214**, 664 (1967).

Лаборатория метаболизма,
Национальный институт сердечных заболеваний,
Национальная организация здравоохранения, Бетесда, Мэриленд,
США