

Севастьянов В.С.

**Изотопная
масс-спектрометрия
легких
газообразующих
элементов**



МОСКВА
ФИЗМАТЛИТ ®

УДК 543
ББК 24.4
С 28



*Издание осуществлено при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
по проектам 10-03-07029*

Составитель Т. 15

доктор технических наук *В.С. Севастьянов*

Рецензенты:

доктор химических наук *Б.А. Руденко*
доктор технических наук *Б.К. Зуев*

Проблемы аналитической химии // Отделение химии и наук
о материалах РАН. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2011.

Т. 15: Изотопная масс-спектрометрия легких газообразующих эле-
ментов / Под ред. В.С. Севастьянова; Ин-т геохимии и аналити-
ческой химии им. В.И. Вернадского РАН. — 2011. — 240 с. —
ISBN 978-5-9221-1344-1.

Книга посвящена рассмотрению сущности, особенностей и возможностей масс-
спектрометрии изотопных отношений для определения изотопного состава легких эле-
ментов неорганических и органических соединений разных классов с исключительно
высокой точностью и воспроизводимостью результатов. Специфичность метода заклю-
чается в том, что он позволяет выявлять фундаментальные процессы, происходящие в
биологических, экологических и геологических системах, раскрывать тонкие особенности
протекания многих физико-химических процессов и химических превращений. Часто
информация на основе определения изотопного состава легких элементов не может быть
получена с помощью других методов. Масс-спектрометрия изотопных отношений нашла
широкое применение в биологии, экологии, медицине, криминалистике, археологии,
геохимии, геологии и в оценке качества пищевых продуктов.

Для химиков-аналитиков, биохимиков и геохимиков.

ISBN 978-5-9221-1344-1

- © Российская академия наук и изда-
тельство «Наука», продолжающееся
издание «Проблемы аналитической
химии» (разработка, художественное
оформление), 1970 (год основания),
2010
- © Институт геохимии и аналитической
химии им. В.И. Вернадского РАН, 2010
- © Севастьянов В.С., составление, 2011
- © ФИЗМАТЛИТ, 2011

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	6
Глава 1. Масс-спектрометрия изотопных отношений: приборы, методики, применение (<i>В. С. Севастьянов</i>)	10
Глава 2. Универсальный метод подготовки жидких, твердых и газообразных проб для определения изотопного состава углерода (<i>Т.А. Веливецкая, А.В. Игнатьев, С.И. Кияшко</i>)	126
Глава 3. Использование изотопной масс-спектрометрии для оценки метаболического потенциала почвенной микробиоты (<i>А. М. Зякун, О. Дилли</i>)	141
Глава 4. Исследование изотопного состава нормальных алканов континентальной растительности (<i>Н. А. Педенчук</i>)	168
Глава 5. Использование масс-спектрометрии изотопных отношений для анализа табака (<i>А. Б. Урюпин</i>)	188
Глава 6. Применение изотопной масс-спектрометрии углерода в допинговом контроле (<i>Т.Г. Соболевский, И.С. Прасолов, Г. М. Родченков</i>)	193
Глава 7. Методы выделения в изотопной геохимии благородных газов (<i>А. И. Буйкин</i>)	210
Глава 8. Применение лазерной спектроскопии для измерения отношений стабильных изотопов (<i>В. С. Севастьянов</i>)	219

ПРЕДИСЛОВИЕ

В предлагаемой вниманию читателей книге собраны 8 обзоров, посвященных последним достижениям в области масс-спектрометрии изотопных отношений. Подробно описано применение этого важного аналитического метода в различных областях науки: геологии, геохимии, биологии, микробиологии, археологии, криминалистике. В основном, в книге идет речь об изотопных отношениях легких стабильных элементов (H, C, N, O, S). Детально обсуждаются преимущества и недостатки различных методов масс-спектрометрии при проведении изотопного анализа, в том числе искровая масс-спектрометрия (ИМС), масс-спектрометрия вторичных ионов (МСВИ), лазерная масс-спектрометрия (ЛМС), масс-спектрометрия тлеющего разряда (МСТР), масс-спектрометрия стабильных изотопов (IRMS). Особенно важным является разработка локального изотопного масс-спектрометрического анализа с использованием лазеров (в том числе эксимерных) и ионных пушек.

Уже в 1926 г. В.И. Вернадский указал на изотопию как на область, требующую самого пристального внимания ученых. Аналитические методы определения стабильных изотопов начали разрабатываться после открытия дейтерия в 1934 г. Х. Юри, за которое он получил Нобелевскую премию. После создания масс-спектрометра А. Ниром в 40-х годах прошлого века началось широкое применение изотопной масс-спектрометрии в научных исследованиях. Однако в то время пробоподготовка занимала много времени, требовалось применять довольно большие навески анализируемых образцов — 10–100 мкг, а разработанные методики имели относительно плохую воспроизводимость и правильность результатов анализа. В дальнейшем были предприняты многочисленные попытки упростить методики анализа и улучшить точность изотопного анализа. В настоящее время правильность анализа обеспечивается использованием международных стандартных образцов. Современные приборы позволяют анализировать очень маленькие навески (10–100 нг) органических и неорганических веществ в режиме постоянного потока (CF). Кроме того, в режиме онлайн стало возможным проводить комбинированный анализ изотопов в единичной пробе. Для этого магнитное поле масс-анализатора быстро изменяется при переходе от регистрации одного отношения m/z к другому. При этом происходит измерение пиков от образца и от стандарта, измерение фона и компьютерная обработка результатов.

Следует отметить, что в последнее время появилось много работ российских ученых, посвященных практическому применению масс-

спектрометрии изотопных отношений и созданию новых систем пробоподготовки для изотопного анализа. Большой вклад в развитие теоретических и экспериментальных основ изотопии легких элементов в нашей стране внес академик Э. М. Галимов.

Современных масс-спектрометров изотопных отношений в России очень мало. Поэтому актуальна задача не только демонстрации достижений того или иного авторского коллектива в области масс-спектрометрии изотопных отношений, но и систематизации последних достижений в данной области и оценки перспектив их внедрения в аналитическую практику для более широкого использования масс-спектрометрии изотопных отношений. В книге широко представлены новые системы пробоподготовки, разработанные масс-спектрометрические методики для определения изотопного состава легких элементов в сложных органических и неорганических соединениях. Проведенные исследования имеют важное практическое применение. Подробно описаны наиболее важные результаты, полученные при изотопном анализе объектов окружающей среды, в биологических, геохимических, археологических исследованиях, в криминалистике и допинговом контроле. Все затронутые аспекты в области масс-спектрометрии изотопных отношений позволяют создать полную картину развития данной области.

Книга включает предисловие и 7 глав. В *первой главе* (В. С. Севастьянов «Масс-спектрометрия изотопных отношений: приборы, методики, применение») обобщены и систематизированы предложенные в последние годы подходы и приемы, позволяющие проводить определение изотопного состава легких элементов (H, C, N, O) в твердых, жидких и газообразных пробах органических и неорганических веществ. Описаны конструкции современных изотопных масс-спектрометров и систем пробоподготовки. Сравниваются различные масс-спектрометрические подходы для определения изотопного состава легких элементов. Подробно описаны разработанные автором новые подходы и методики при проведении изотопного анализа с использованием систем пробоподготовки на основе твердых электролитов. Приведены примеры использования масс-спектрометрии изотопных отношений для изучения фракционирования изотопов при органическом синтезе, для изучения изотопного состава наноалмазов в метеоритах и в коллагене костей древних захоронений, для определения изотопного состава легких элементов в нефтях и природных газах, для выявления источников происхождения спиртных напитков, других наркотических средств и взрывчатых веществ.

Во *второй главе* (Т. А. Веливецкая, А. В. Игнатъев, С. И. Кияшко «Универсальный метод подготовки жидких, твердых и газообразных проб для определения изотопного состава углерода») предложен универсальный, экономичный, простой и экспрессный метод пробоподготовки органических веществ для измерения изотопного состава углерода. Рассматриваются его преимущества и оцениваются его аналитиче-

ские характеристики. Метод может быть использован для изотопного анализа твердых, жидких и газообразных веществ. Он является хорошей альтернативой классическому методу сжигания образцов в кварцевых ампулах.

В *третьей главе* (А. М. Зякун, О. Дилли «Использование изотопной масс-спектрометрии для оценки метаболического потенциала почвенной микробиоты») рассматриваются вопросы использования масс-спектрометрии изотопных отношений при определении микробной минерализации почвенного органического вещества и органических продуктов, попадающих в почву, и степени воздействия экзогенных субстратов на экологическую устойчивость почвы и окружающую среду. Показано, что изотопный состав углерода метаболического углекислого газа является наиболее чувствительным параметром, отражающим степень и продолжительность влияния субстрата на геохимические и биологические процессы в почве.

В *четвертой главе* (Н. А. Педенчук «Исследование изотопного состава нормальных алканов континентальной растительности») рассмотрен новый подход к использованию изотопного состава н-алканов из листьев континентальной растительности с целью изучения палеоклимата и физиологии растений. Предложенный метод дает уникальную информацию, недоступную при использовании других методов. Обсуждены самые последние результаты работы автора и его коллег в США и в некоторых странах Западной Европы с целью определения влияния климатических условий и физиологии растений на изотопный состав водорода и углерода органических соединений из листьев современных цветковых и хвойных растений.

В *пятой главе* (А. Б. Урюпин «Использование масс-спектрометрии изотопных отношений для анализа табака») систематизированы подходы к идентификации ареалов происхождения табака и табачных изделий на основе данных об изотопном составе легких элементов. Обсуждаются исследования изотопного состава не только никотина, но и соединений других классов, входящих в состав табачного листа (оксикислоты, сахара, целлюлоза, оптически активные вещества).

В *шестой главе* (Т. Г. Соболевский, И. С. Прасолов, Г. М. Родченков «Применение изотопной масс-спектрометрии углерода в допинговом контроле») обсуждаются методы выявления случаев употребления допинговых препаратов, являющихся близкими аналогами гормонов, вырабатываемых в организме человека, или их предшественниками (тестостерон, дегидроэпиандростерон, андростендион, андростендиолы и т. д.), а также предлагаются новые внутрилабораторные критерии оценки результатов анализа, основанные на определении референтных интервалов для пар эндогенных маркеров.

Седьмая глава (А. И. Буйкин «Методы выделения в изотопной геохимии благородных газов») посвящена обзору методов выделения газов из включений горных пород и минералов для дальнейшего проведения

изотопного масс-спектрометрического анализа. Рассмотрены преимущества и недостатки различных методов и даны рекомендации для их использования.

В *восьмой главе* (В. С. Севастьянов «Применение лазерной спектроскопии для измерения отношений стабильных изотопов») рассматриваются перспективы использования изотопных оптических анализаторов для определения изотопного состава водорода и кислорода воды и изотопного состава углерода CO_2 . Несмотря на то что масс-спектрометрия изотопных отношений (IRMS) является в настоящее время хорошо развитым изотопным методом, для определения изотопного состава парниковых газов в атмосфере более предпочтительно применение абсорбционной инфракрасной спектроскопии, которая за последнее время достигла больших успехов. Оптические изотопные анализаторы значительно компактней, дешевле и легче в управлении, чем масс-спектрометры изотопных отношений. Для инфракрасной спектроскопии изотопных отношений не столько важна чувствительность, сколько большой линейный диапазон и высокое соотношение сигнал–шум. Благодаря высокоточному контролю температуры и давления в оптической кювете, а также строгому контролю длины волны перестраиваемого лазера удалось значительно уменьшить дрейф системы. Это позволяет проводить градуировку оптического анализатора всего один раз в течение нескольких дней.

Авторы выражают большую признательность рецензентам д.х.н. Б. А. Руденко и д.т.н. Б. К. Зуеву за внимательное прочтение рукописи и за ценные советы по ее представлению.

В. С. Севастьянов

Глава 1

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ИЗОТОПНЫХ ОТНОШЕНИЙ: ПРИБОРЫ, МЕТОДИКИ, ПРИМЕНЕНИЕ

В. С. Севастьянов

Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского, РАН,
Москва

Общая характеристика масс-спектрометрических методов определения изотопного состава легких элементов

Лазерная ионизационная масс-спектрометрия (ЛИМС). Наибольшее распространение при работе с лазерными источниками ионов получили масс-спектрометры с двойной фокусировкой, построенные по ионно-оптической схеме Маттауха–Герцога. Основным достоинством этой системы является одновременная регистрация ионов в широком диапазоне масс. Для детектирования ионов применяется фотопластинка, что ограничивает точность изотопных измерений. Соответствующая погрешность обычно составляет несколько процентов. В работе [1] приведены результаты определения на магнитном масс-спектрометре с лазерным источником ионов изотопных отношений $^{18}\text{O}/^{17}\text{O}$ и $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ в образцах UO_2 при послойном анализе с погрешностью 10%.

Область применения лазерных масс-спектрометров (ЛИМС) с двойной фокусировкой примерно та же, что и искровой масс-спектрометрии (ИМС) — это многоэлементный анализ с высокой точностью. Дополнительным преимуществом лазерного метода является локальность (до 1 мкм), что позволяет анализировать отдельные включения в геологических образцах без специальной пробоподготовки. Правильность изотопных отношений, полученных методом ЛИМС, значительно лучше, чем при определении концентрации элементов тем же методом. Это связано с тем, что дискриминационные эффекты различного рода во время процесса ионизации значительно меньше для изотопов, чем для элементов с различными физическими и химическими свойствами. Поэтому главными факторами, влияющими на точность изотопного анализа методом ЛИМС, являются погрешности,

возникающие при детектировании и регистрации ионов. Лазерная масс-спектрометрия значительно уступает в точности определения изотопных отношений другим масс-спектрометрическим методам изотопного анализа твердых тел, например масс-спектрометрии вторичных ионов (МСВИ) [2].

Искровая масс-спектрометрия (ИМС). Аналитические возможности искровой масс-спектрометрии рассмотрены в работах [3, 4]. В отличие от элементного анализа изотопный анализ методом искровой масс-спектрометрии не нашел широкого применения [3]. Это связано прежде всего с тем, что данный метод обладает довольно большой относительной погрешностью (более 3–4%) измерения ионных токов из-за фотографической регистрации ионов, применяемой в ИМС. Изотопный анализ целесообразно проводить только тогда, когда изотопные отношения определяемых элементов существенно (более чем на 10%) отличаются от природных, причем необходима информация сразу по нескольким элементам.

Использование электрической регистрации (режим переключения пиков или позиционно-чувствительные детекторы на основе микроканальных пластин) значительно повышает точность измерения токов, но при этом практически исключает возможность одновременной регистрации всех изотопов, что при импульсном характере искрового разряда является важным. Более того, при отсутствии возможности одновременной регистрации ионов применение ИМС вообще теряет всякий смысл.

Масс-спектрометрия тлеющего разряда (МСТР). Известно довольно мало работ, посвященных определению изотопных отношений с использованием одноколлекторной МСТР. Практически все работы касаются определения изотопных отношений элементов Li, B, S, Sr, Nd, Tl, Pb, U. В работе [5] изучали изотопный состав кислорода в образцах оксида урана. Воспроизводимость определения изотопного состава была достаточно низкой, 0,5–4%.

Во многих случаях для элементного и изотопного анализа используются лучше разработанные и более надежные аналитические методы, такие как МСВИ или ЛА-ИСП-МС.

Масс-спектрометрия вторичных ионов (МСВИ). Масс-спектрометрия вторичных ионов позволяет проводить высокоточный изотопный анализ с разрешением 10–30 мкм как стабильных изотопов (H, C, N, O, S), так и порообразующих элементов (Li, B, Mg, Si). Электроположительные элементы (металлы) анализируются в виде положительных ионов при использовании первичного ионного пучка O^+ . В то же время электроотрицательные элементы (неметаллы) определяются в виде отрицательных ионов при использовании первичного ионного пучка Cs^+ .

В работе [6] было показано, что для H, C, O выход отрицательных ионов превышает выход положительных в 10–1000 раз (азот, напро-

тив, имеет аномально низкий выход). Изотопные отношения элементов в пучке вторичных ионов обогащены легкими изотопами относительно изотопного состава элементов мишени [7]. Природа такого обогащения до сих пор не изучена.

Известно, что матрица образца, его структура и угловое распределение распыленных ионов с разной массой влияют на изотопное фракционирование. Поэтому измерение изотопного состава легких элементов проводят относительно стандартного образца того же состава, с известной распространенностью изотопов. При проведении изотопного анализа инструментальные параметры должны быть неизменными. В работе [8], были проведены обширные исследования влияния матрицы на изотопный состав кислорода в 40 образцах силикатов, фосфатных минералов и стекол. Была найдена корреляция со средним атомным номером мишени, катионным составом в оливинах и стеклах и со структурой минералов. Трещины, несовершенства структуры и посторонние включения также влияют на изотопное фракционирование.

Нестабильность первичного пучка непосредственно сказывается на стабильности вторичного пучка, что может приводить к изотопному фракционированию. Этот процесс также является функцией энергии вторичных ионов и зависит от ширины и положения энергетической щели [9]. Изменение на 10 эВ энергии вторичных ионов в низкоэнергетической области вызывает изменение фракционирования на 7‰, в то время как сдвиг в высокоэнергетической области практически на фракционировании не сказывается.

Таким образом, условия с низким разрешением по массе и с пропуском высокоэнергетических вторичных ионов являются наилучшими для стабильности инструментального изотопного фракционирования. Следующим источником нестабильности является компенсация заряда на поверхности образца при травлении ее пучком ионов Cs^+ . По этой причине компенсирующий электронный пучок должен быть хорошо стабилизированным.

Масс-спектрометры вторичных ионов Cameca ims-nf ($n = 3, 4, 5, 6$) позволяют с помощью диафрагмы выделять вторичные ионы из центральной части кратера, чтобы, например, исключать попадание ионов OH^- , образующихся на краю пятна в результате миграции воды по поверхности образца. Масс-спектрометр Cameca ims 1270 обладает большей чувствительностью и более высоким разрешением по массе. Использование многоколлекторной системы позволяет проводить высокоточный изотопный анализ кислорода и серы. Недавно был разработан новый прибор Cameca nanoSIMS с двойной фокусировкой ионов по геометрии Маттауха–Герцога, позволяющий одновременно регистрировать широкий диапазон масс. В этом приборе используется узкий первичный пучок ионов размером 50 нм, он имеет улучшенную эффективность экстракции вторичных ионов. Микрозонд SHRIMP очень удобен для изотопного анализа. Он обладает улучшенной экстракционной систе-

мой по сравнению с приборами фирмы Cameca, но в нем отсутствует энергетическая фильтрация. Прибор Isolab 54 является микрозондом с аналитическими характеристиками, подобными SHRIMP [2].

Основной трудностью при измерении изотопного состава кислорода является наложение молекулярного иона $^{16}\text{OH}^-$ на пик $^{17}\text{O}^-$. В основном кислород определяется в виде отрицательного иона при бомбардировке Cs^+ . При этом скопление заряда на поверхности образца компенсируется зарядом электронов от электронной пушки. Результаты изотопного анализа кислорода с помощью прибора Cameca ims 1270 хорошо согласуются в пределах промилле с результатами метода фторирования. Коррекция на матричный эффект также не превышает 1‰ [10]. Недавно [11] с помощью многоколлекторного прибора Cameca ims 1270 был проведен изотопный анализ кислорода циркона с возрастом 4,3 миллиарда лет из Австралии. Точность измерения изотопных отношений кислорода составила 0,1–0,2‰. При этом $\delta^{18}\text{O}$ изменялась от 5,4 до 7,7‰ для различных зерен.

Изотопный состав углерода определяется при измерении отрицательных вторичных ионов углерода при бомбардировке образца первичными ионами Cs^+ . При этом, чтобы разделить ионы $^{12}\text{CN}^-$ и $^{13}\text{C}^-$, необходимо разрешение по массе 3500. Азот является трудным элементом для анализа МСВИ, так как не образует отрицательных ионов, однако в присутствии углерода образуется очень интенсивный пучок ионов CN^- . Это делает удобным измерение изотопного состава углерода и азота в биологических объектах [12]. Правильность измерения $\delta^{13}\text{C}$ составила 1‰. В работах [13–15] изучали распределение изотопов углерода и азота в алмазах. При использовании первичного ионного пучка Cs^+ на микрозонде Cameca 6f [14] была получена воспроизводимость результатов определения $\delta^{13}\text{C}$ — 0,3‰, а $\delta^{15}\text{N}$ — 1‰. Локальность метода составляла 25 мкм. Это позволило изучить распределение изотопного состава углерода и азота по объему в единичном алмазе из кимберлитовой трубки «Мир» [15].

Таким образом, МСВИ является наилучшим локальным методом для измерения изотопных отношений элементов в гетерогенных образцах.

Масс-спектрометрия изотопных отношений (IRMS). Изотопная масс-спектрометрия легких элементов является важным методом аналитической химии, обладающим исключительно высокой чувствительностью и точностью измерения изотопных отношений. Она широко используется в многочисленных областях науки: в химии, экологии, физике, биологии, медицине, фармакологии, геологии, археологии, криминалистике, помогает идентифицировать компоненты продуктов питания и находить подделки [16].

Изотопный состав легких элементов может изменяться в результате фракционирования изотопов в ходе природных химических и физических процессов. Эти изменения пропорциональны разнице масс изотопов. Так, например, испарение воды приводит к ее обогащению изо-

топами ^{18}O и ^2D . Изотопный состав кислорода и водорода в снегах, осажденных в полярных районах и в горах на значительной высоте над уровнем моря, определяется главным образом температурой. По этой причине данные систематического изучения изотопных вариаций водорода и кислорода могут быть использованы для изучения процессов таяния ледников, скорости накопления снега и климатических изменений за последние 100 тыс. лет [17]. Другой интересной областью применения исследований изотопных вариаций является метод расчета палеотемператур древних океанов путем измерения изотопного состава кислорода в карбонатах кальция и в воде, предложенный в работе [18]. При осаждении в условиях равновесия изотопный состав кислорода в карбонате кальция отличается от изотопного состава кислорода в воде. Различие обусловлено реакцией изотопного обмена между карбонатом кальция и водой, на протекание которой оказывает влияние температура воды. Таким образом, измеряя изотопные вариации кислорода в карбонате кальция, можно оценить температуру воды в момент его образования [17].

Углерод — один из наиболее распространенных элементов во Вселенной. Он находится в коре и мантии Земли, в атмосфере и в гидросфере. В органических соединениях и в угле углерод присутствует в восстановленной форме, а в окисленном состоянии встречается главным образом в виде диоксида углерода, карбонатных ионов в водных растворах и в виде карбонатных минералов. В различных природных процессах, включая фотосинтез и реакции изотопного обмена между соединениями углерода, происходит фракционирование изотопов. Фотосинтез приводит к обогащению синтезированных органических соединений изотопом ^{12}C . С другой стороны, реакции изотопного обмена между газообразным CO_2 и растворенными в воде карбонатами приводят к обогащению карбонатов изотопом ^{13}C . В результате этого распространенность изотопа ^{13}C в углероде на поверхности Земли варьирует в пределах 100‰ [19].

Метод IRMS позволяет получать количественную информацию о метаболизме в биологических и экологических системах не доступную для других аналитических методов. Изотопный состав выдыхаемых газов может служить показателем процессов, происходящих в организме, если предварительно в организм были введены изотопные метки. Измерения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в выдыхаемом CO_2 служат средством прямого определения расстройств метаболизма, эффектов аномальной сорбции, позволяют исследовать состояние больных диабетом. Фармакология широко использует данные изотопного анализа при введении в организм изотопных меток, главным образом с целью идентификации метаболитов, для количественного анализа методом изотопного разбавления, для изучения усвояемости лекарств. Метод изотопных меток применяют для контроля процесса биосинтеза антибиотиков, изучения фармакокинетических свойств анальгезирующих и анестезирующих препаратов, различных лекарственных средств [19].

Изотопы легких элементов участвуют в химических, биологических и физических процессах с различной скоростью, поэтому изотопный состав элемента, входящего в состав данного соединения, зависит от истории и происхождения образца. Следовательно, метод IRMS может быть использован также для установления места производства лекарств, наркотиков и взрывчатых веществ по их изотопному составу [16].

В настоящее время основным производителем является «Thermo Fisher Scientific» (Бремен, Германия). Масс-спектрометры имеют близкие аналитические характеристики и обладают большим числом устройств для пробоподготовки (рис. 1.1). Изотопные масс-спектрометры снабжают специальными системами пробоподготовки, для перевода твердых и жидких проб в газообразное состояние, с образованием простых газов H_2 , CO_2 , N_2 , NO_x , H_2O .

Существует два типа подачи газовой пробы в ионный источник масс-спектрометра: система двойного напуска газа (Dual Inlet) и система измерения в постоянном потоке газа-носителя гелия (Continuous Flow, рис. 1.1). На рисунке использованы следующие обозначения: Trace GC/Agilent GC — газовые хроматографы марки Trace и Agilent; GC/C/TC — газовый хроматограф, соединенный с окислительным реактором и пиролизатором; GC/GP — газовый хроматограф, соединенный с другими устройствами пробоподготовки; PreCon — прибор для концентрирования газовых примесей; Gasbench — универсальный прибор для подготовки и ввода газовых проб в изотопный масс-спектрометр; EA, TC/EA — элементный анализатор и пиролизатор; ConFlo — интерфейсный блок для соединения приборов с изотопным масс-спектрометром; Microvolume — приспособление для концентрирования CO_2 и N_2 на охлаждаемой ловушке; Multiport — многопортовая система напуска газов; Tube Cracker — приспособление для вскрытия ампул; Multiport Extention — многопортовая система с возможностью уменьшения количества анализируемого газа; HDO Equilibrator — изотопный эквilibратор для воды; Kiel Carbonate Device — прибор для разложения карбонатов; H-device — устройство для выделения водорода из воды; H/D Collector Dual Inlet — коллекторы для регистрации ионов водорода в режиме двойного напуска газов; H/D Collector Continuous Flow — коллекторы для регистрации ионов водорода в режиме постоянного потока газа-носителя; Universal 3(6) — количество универсальных коллекторов; MEMCO 6 — система из 6 коллекторов для регистрации ионов различных элементов. Схема установки с системой двойного напуска (DI-IRMS) представлена на рис. 1.2.

В систему двойного напуска чистые газы могут поступать из стеклянных ампул после их разрушения; H_2 , или CO_2 могут подаваться из эквilibратора после изотопного уравнивания с водой; CO_2 может поступать из прибора для разложения карбонатов; H_2 из прибора HD-Device после разложения воды. Изотопный состав легких элементов в образце измеряется относительно стандартного газа с известным

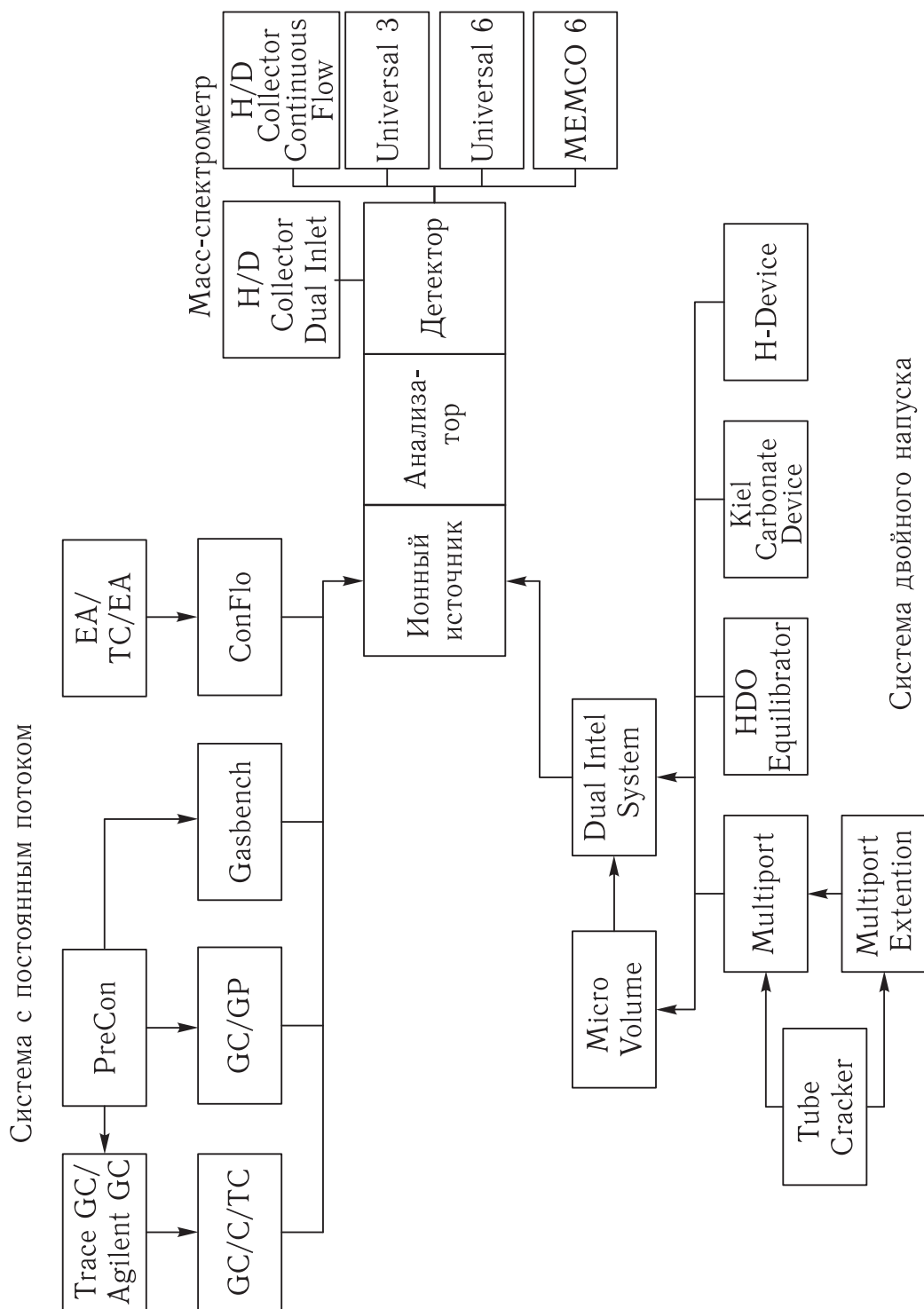


Рис. 1.1. Схема изотопного масс-спектрометра с двумя системами напуска газа

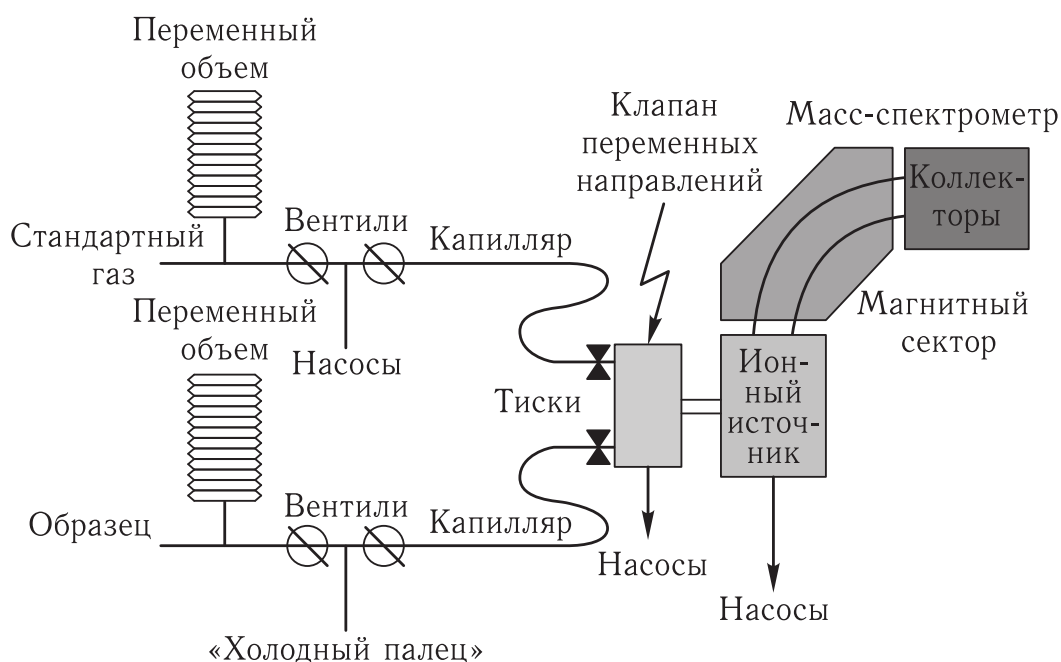


Рис. 1.2. Схема изотопного масс-спектрометра с системой двойного напуска

изотопным составом. Давление газов регулируется путем сжатия или расширения емкостей переменного объема, выполненных в виде сильфонов, в которых находятся газы. Из сильфонов газы подаются через стальной капилляр длиной около 1 м с пережатым концом перед входом в ионный источник масс-спектрометра, находящийся в области высокого вакуума. Сужение капилляра необходимо, чтобы уменьшить газовый поток в вакуум, обеспечить вязкостное течение потока в капилляре и тем самым предотвратить фракционирование газов при их натекании в ионный источник.

Поступившие в ионный источник газы ионизируются под действием электронного пучка, затем ионы фокусируются в пучок, ускоряются и попадают в сильное магнитное поле, где происходит его разделение на отдельные пучки согласно отношению массы к заряду. Более легкие ионы отклоняются в магнитном поле сильнее, чем тяжелые. Сформировавшиеся пучки попадают на соответствующие коллекторы (цилиндры Фарадея) и образуют коллекторные токи, которые, проходя через высокоомные резисторы, преобразуются в напряжение. Благодаря одновременности регистрации ионных токов удается с высокой правильностью и воспроизводимостью измерять изотопные отношения на природном уровне.

Масс-спектрометры с системой постоянного потока (Continuous Flow) разработаны около 30 лет назад. Эти приборы произвели революцию в изотопных исследованиях [20]. Схема изотопного масс-спектрометра с системой Continuous Flow представлена на рис. 1.3.

Исследуемый газ вводится в поток гелия, очищается в газовом хроматографе и непосредственно поступает в ионный источник масс-спектрометра. Первоначально газовый хроматограф служил только для

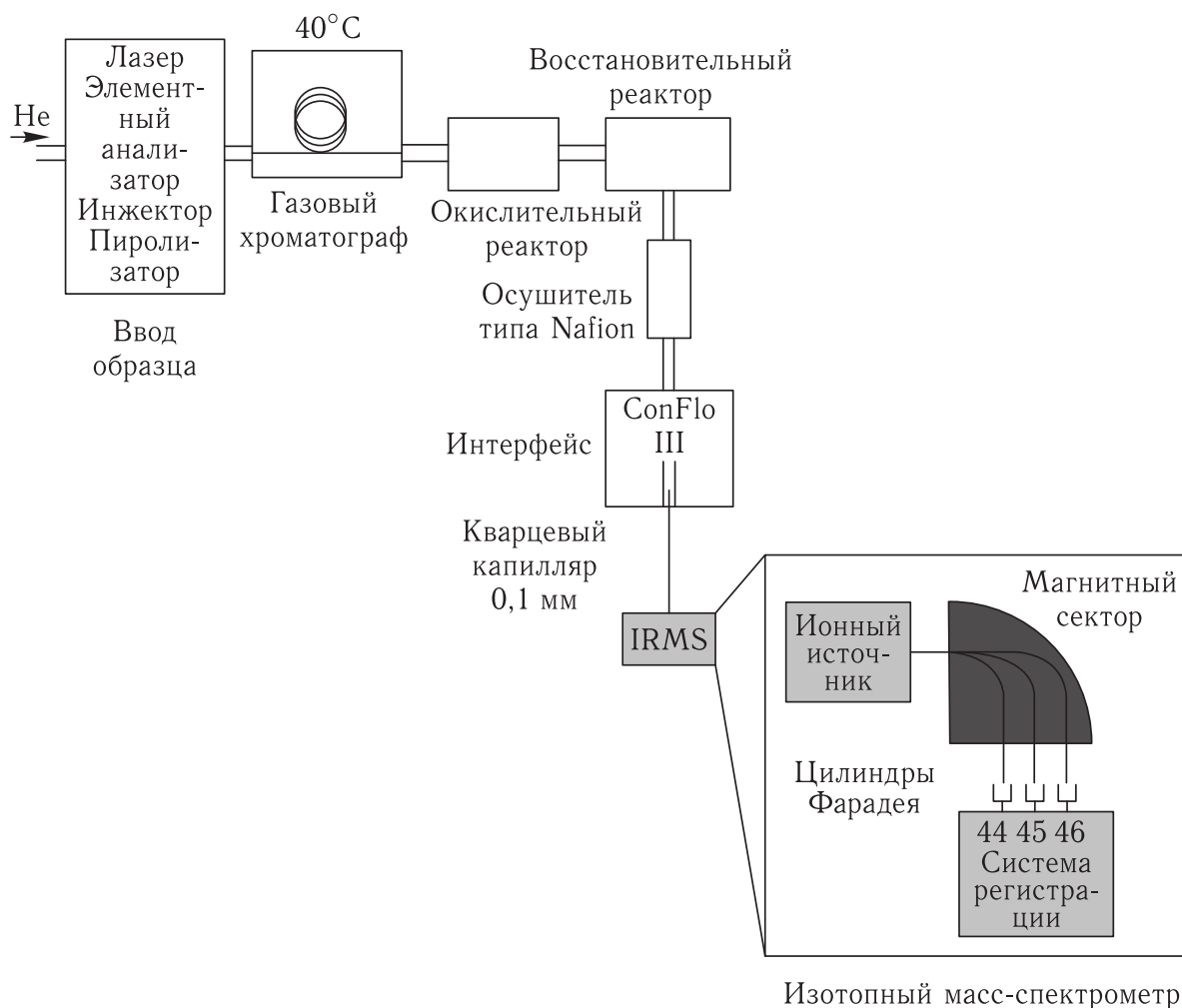


Рис. 1.3. Схема изотопного масс-спектрометра с системой постоянного потока

очистки газа, затем стал использоваться для быстрого выделения индивидуальных соединений с последующим их окислением и, если необходимо, восстановлением оксидов азота [21]. Концентрация анализируемых образцов уменьшилась на несколько порядков. Однако это привело к ухудшению точности изотопных измерений.

В настоящее время к системе Continuous Flow может быть присоединен газовый хроматограф (метод GC-C-IRMS), жидкостной хроматограф (метод LC-ISOLINK-IRMS), элементный анализатор (метод EA-IRMS), пиролизатор (метод TC/EA-IRMS), установка для разложения карбонатов (Gas Bench) или газовый хроматограф, совмещенный с пиролизатором (метод GC-TC-IRMS).

Так как относительный изотопный состав может быть измерен с большей точностью, чем абсолютный изотопный состав, то в 1950 г. для представления относительного изотопного состава легких элементов была введена величина δ (дельта), которая вычисляется по следующей формуле [22]:

$$\delta = \left(\frac{R_x - R_{\text{std}}}{R_{\text{std}}} \right) \cdot 1000, \quad (1.1)$$

где R — отношение распространенностей тяжелого изотопа к легкому изотопу, x — индекс, обозначающий измеряемый образец, std — индекс, обозначающий стандартный образец. Величина R для стабильных изотопов водорода записывается как D/H, для изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, для изотопов азота $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, для изотопов кислорода $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ и т. д. Величина δ выражается в тысячных долях (per mil), которые обозначаются значком ‰. Положительная величина δ означает, что отношение тяжелого изотопа к легкому в анализируемом образце больше, чем в стандартном образце.

Величина δ вычисляется на основе измерения интенсивностей ионных сигналов в изотопном масс-спектрометре и записывается, например, для углерода, как $\delta^{13}\text{C}$. Обычно для чистых газов воспроизводимость результатов изотопного анализа составляет $\pm 0,01\text{‰}$ и лучше.

Основные газы, измеряемые в методе IRMS, и массы их изотопологов представлены в табл. 1.1. Например, для газа CO_2 измеряют четыре изотополога с массами m/z 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ и $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$), 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$). Изотопное отношение кислорода вычисляется исходя из соотношения 46/44. В табл. 1.2 приведены международные стандартные образцы, применяемые в изотопной масс-спектрометрии, и их изотопный состав [22].

Таблица 1.1

Основные газы, используемые в IRMS

Элемент	Газ	Массы изотопологов
Водород	H_2	2, 3 (интерференция от H_3^+)
Углерод	CO_2	44, 45, 46
Азот	N_2	28, 29, (30)
Кислород	CO_2	44, 45, 46
	O_2 (фторирование)	32, (33), 34
	CO (пиролиз)	28, 30
Сера	SO_2	64, 66
	SF_6	146, (147), 148, (150)

Используя формулу (1.1), например, можно оценить погрешность определения абсолютного изотопного состава кислорода $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ в образце при погрешности измерения относительного изотопного состава $0,01\text{‰}$ по отношению к стандартному образцу VSMOW или погрешность определения абсолютного изотопного состава углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ по отношению к PDB. Эта погрешность составляет для кислорода величину $2 \cdot 10^{-8}$, а для углерода $1 \cdot 10^{-7}$.

Для проведения текущих изотопных измерений часто используют лабораторные стандартные образцы, аттестованные по отношению к международным стандартным образцам, выпускаемым Международным Агентством по атомной энергии (IAEA) или Национальным Институтом стандартов и технологий (NIST, США). Стоимость между-

Таблица 1.2

Изотопный состав международных стандартных образцов

№	Название	Изотопы	Изотопное отношение	Воспроизводи- мость ($\alpha = 0,95$)	Атомный состав
1	Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW)	$^2\text{H}/^1\text{H}$	0,00015576	$\pm 0,00000010$	0,000155736
2	Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW)	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,00200520	$\pm 0,00000043$	0,002000443
3	Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW)	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,000373	$\pm 0,000015$	0,000372115
4	Standard Light Antarctic Precipitation (SLAP)	$^2\text{H}/^1\text{H}$	0,00008909		0,000089082
5	Standard Light Antarctic Precipitation (SLAP)	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,00189391		
6	Pee Dee Belemnite (PDB)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0,0112372	$\pm 0,0000090$	0,011112329
7	Pee Dee Belemnite (PDB)	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,0020671	$\pm 0,0000021$	
8	Atmospheric nitrogen	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	0,0036765	$\pm 0,0000081$	0,003663033
9	Canion Diablo Troilite meteorite	$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	0,0450045		

народных стандартных образцов достаточно высокая, а количество их ограничено. Чтобы рассчитать величину δ образца X, измеренную по отношению к лабораторному стандартному образцу A, по отношению к международному стандартному образцу B, используют следующую формулу [23]:

$$\delta_{X-B} = \delta_{X-A} + \delta_{A-B} + 0,001 \delta_{X-A} \delta_{A-B}. \quad (1.2)$$

В настоящее время изотопные масс-спектрометры имеют многоколлекторную систему для одновременного и раздельного измерения интенсивности тока ионов с различными массами. Воспроизводимость результатов изотопного анализа улучшилась, но химическая пробоподготовка и процесс выделения индивидуальных соединений вносят существенный вклад в общую погрешность анализа. Основными преимуществами современных изотопных масс-спектрометров являются легкость в управлении прибором, анализ образцов с меньшей массой, уменьшение затрат времени на обработку результатов анализа.

Минимальное количество водорода, необходимое для измерения, составляет 20 мкмоль, углерода — 0,13 мкмоль, азота — 0,5 мкмоль.

Для чистых газов в методе двойного напуска газа (Dual Inlet) изотопные отношения $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ и $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ могут быть измерены с относительными стандартными отклонениями 0,001, 0,001, 0,002, 0,003% соответственно [24].

Таблица 1.3

Воспроизводимость результатов изотопного анализа ($n = 10$)

Метод	Образец	Навеска	Стандартное откл. δ , ‰					
			^2H	^{13}C	^{15}N	^{18}O		
DI-IRMS	Газ CO_2	Сигнал 3 В	0,50	0,06	0,06	0,15		
	Газ N_2	Сигнал 3 В						
	Газ CO	Сигнал 3 В						
	Газ H_2	Сигнал 5 В						
EA-IRMS	Мочевина	50 мкг С, N	2	0,15	0,15	0,2		
TC/EA-IRMS	Бензойная кислота	50 мкг О		0,2	0,4			
		25 мкг Н		0,2	0,5			
TC/EA-IRMS	Вода	0,5 мкл						
GC-C-IRMS	Смесь в изооктане	0,03% <i>n</i> -C14, <i>n</i> -C15, <i>n</i> -C16, 0,8 нмоль С	3,0		0,8			
		GC-C-IRMS				Кофеин	200 нг, 1,5 нмоль N	
GC-TC-IRMS	Ванилин	200 нг, 5 нмоль О				0,8		
		GC-TC-IRMS						Смесь в изооктане

В табл. 1.3 показана воспроизводимость результатов изотопного анализа различных элементов при использовании интерфейса ConFlo III [www.thermo.com].

Сравнение аналитических характеристик масс-спектрометрических методов определения изотопного состава легких элементов. В настоящее время для определения изотопного состава легких элементов в основном используют два метода: МСВИ и IRMS. В зависимости от поставленной задачи применяют тот или иной метод. Если главной задачей является измерение изотопного состава легких элементов в локальной области размером 10–30 мкм, то применяют метод МСВИ. Если необходимо достигнуть высокой точности анализа, используют метод IRMS с сопутствующей обширной системой пробоподготовки.

Главной задачей при изотопном анализе стабильных элементов методом МСВИ является достижение стабильных аналитических условий и стабильной зависимости изотопного фракционирования от массы в стандартном и исследуемом образцах. При этом точность изотопного анализа не превышает 1‰. Масс-спектрометры вторичных ионов являются очень сложными дорогостоящими приборами, доступными ограниченному числу потребителей. В то же время масс-спектрометры стабильных изотопов более дешевы и широко используются в различных научно-исследовательских лабораториях и университетах.

Несмотря на выдающиеся аналитические характеристики масс-спектрометров стабильных изотопов, их можно еще улучшить путем совершенствования системы пробоподготовки и разработки новых, более совершенных методик анализа. Кроме того, необходимость создания новых методик изотопного анализа связана с расширением числа объектов анализа, с использованием IRMS в современных, быстро развивающихся областях науки.

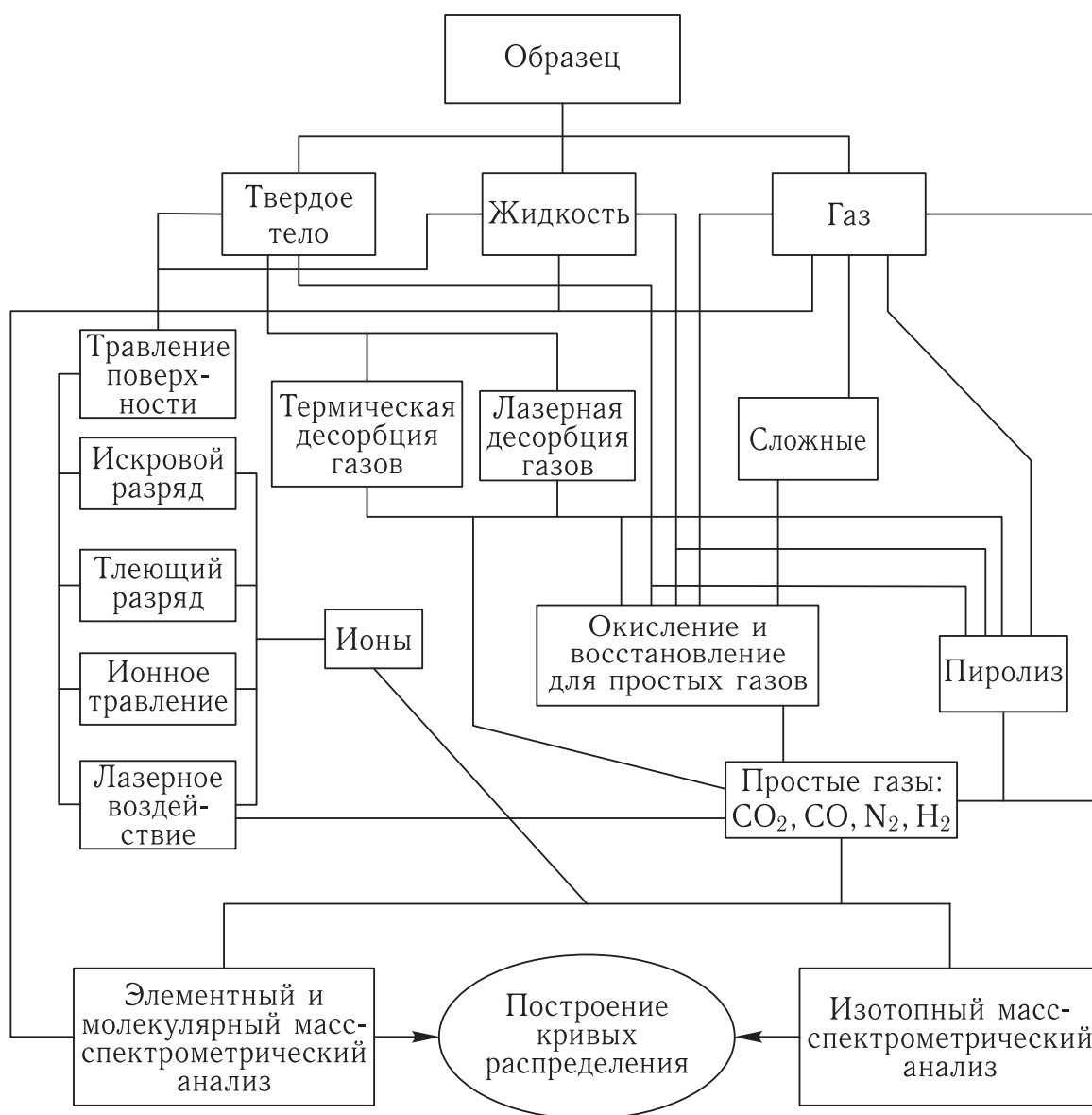


Рис. 1.4. Основная схема проведения масс-спектрометрического анализа легких элементов

На рис. 1.4 приведена основная схема проведения масс-спектрометрического анализа легких элементов. Она включает как изотопный, так и элементный анализ легких элементов твердых и жидких образцов, а также газов. Жидкие образцы и газы в результате пиролиза или окисления (с последующим восстановлением оксидов азота) превращаются в простые газы CO_2 , CO , N_2 , H_2 , а затем анализируются с помощью изотопных или элементных масс-спектрометров. Твердые образцы мо-

гут быть также подвергнуты сжиганию или пиролизу. Кроме того, при термическом или лазерном воздействии на образец можно десорбировать с поверхности сорбированные газы, а при травлении поверхности с помощью ионных или лазерных пучков, искрового или плазменного воздействия образуются вторичные ионы легких элементов, которые затем регистрируются масс-анализаторами. Ниже подробно описаны процессы, происходящие с образцами в ходе пробоподготовки и масс-спектрометрического определения изотопного состава легких элементов.

Усовершенствование аппаратуры для определения изотопных отношений легких элементов

Эксперименты проводились на модернизированной установке с изотопным масс-спектрометром DELTA Plus («Thermo Fisher Scientific»), блок-схема которого изображена на рис. 1.5.

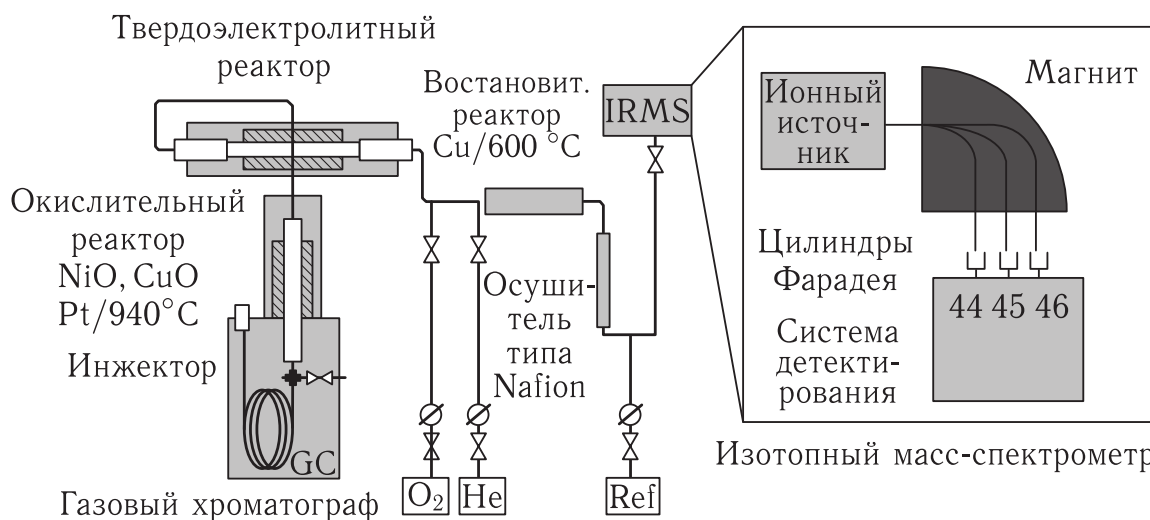


Рис. 1.5. Блок-схема модернизированного изотопного масс-спектрометра DELTA Plus

Установка также включала в себя газовый хроматограф HP 6890 для разделения органических соединений в газовой смеси, стандартный окислительный реактор, стандартный восстановительный реактор, высокотемпературный твердоэлектролитный реактор (ТЭР), ловушку для воды типа «Nafion». Изготовленный твердоэлектролитный реактор, как видно на рис. 1.5, располагали между стандартными окислительным и восстановительным реакторами и соединяли с ними кварцевым капилляром с внешним диаметром 0,5 мм и внутренним диаметром 0,32 мм. Высокотемпературный твердоэлектролитный реактор (рис. 1.6) был изготовлен на основе стабилизированного диоксида циркония ($0,9\text{ZrO}_2 \cdot 0,1\text{Y}_2\text{O}_3$) в виде тонкой керамической трубки с внутренним диаметром 1 мм и длиной 10–12 см. Рабочая зона реактора составляла 6 см. Для создания рабочих платиновых электродов внутренняя и внешняя поверхности трубки были покрыты платиновой пастой

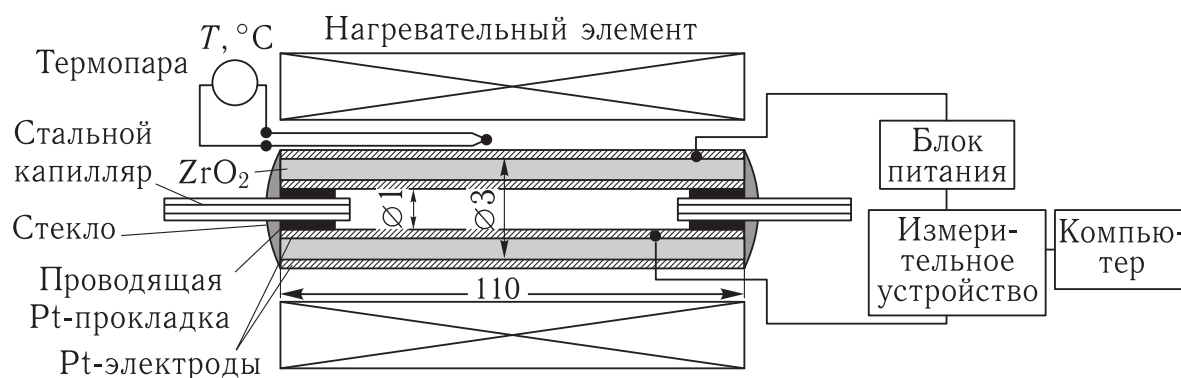


Рис. 1.6. Принципиальная схема высокотемпературного твердоэлектrolитного реактора

(Platinum INK 6082, Engelhard) и подвергнуты отжигу на воздухе при температуре 900°C . Металлические газовые капилляры и электрические токоподводы ТЭР были герметизированы специальным стеклом и проверены на вакуумную плотность. Электрический ток, проходящий через ТЭР, задавали источником постоянного тока Б5-43А. Изменение электрического тока регистрировали с помощью мультиметра «Metra Hit 28S» (Gossen Metrawatt) и записывали в память компьютера для демонстрации полученного спектра на экране монитора и последующей его математической обработки.

Фотографии твердоэлектrolитного реактора, расположенного над хроматографом, показаны на рис. 1.7.

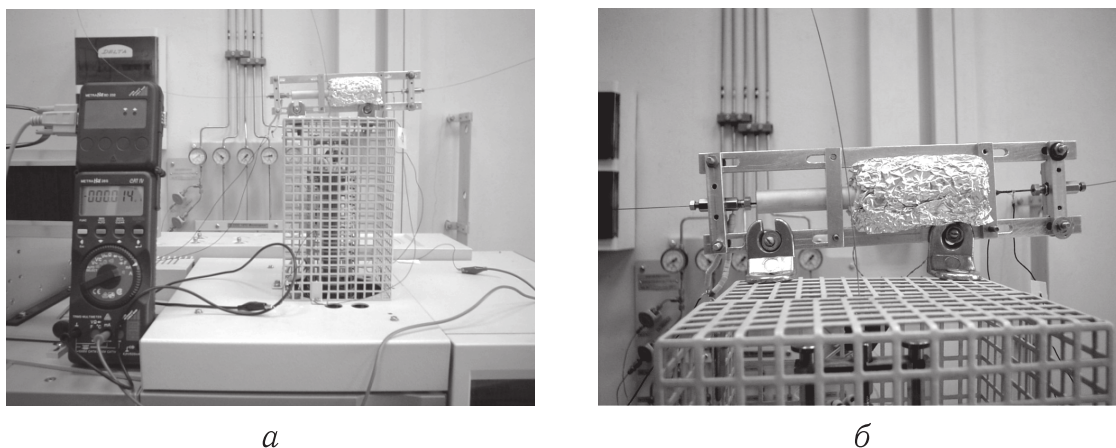


Рис. 1.7. Фотографии твердоэлектrolитного реактора, расположенного над хроматографом: а — общий вид; б — увеличенный размер реактора

Через ТЭР и капилляры протекал высокочистый газ-носитель гелий марки 60 со скоростью 2 мл/мин. Использование двух окислительных реакторов позволяло проводить окисление органических соединений в двух режимах и сравнивать полученные результаты. В первом режиме был включен стандартный окислительный реактор, а ТЭР был выключен, во втором режиме стандартный окислительный реактор был выключен, а ТЭР, нагретый до рабочей температуры и обеспечивающий необходимый напуск кислорода в поток гелия, использовался в качестве окислительного реактора. Стандартный окислительный реактор

представляет собой тонкую керамическую трубку на основе Al_2O_3 длиной 32 см и внутренним диаметром 0,5 мм, внутри которой вставлены три проволоки (оксидов металлов Cu, Ni, Pt). При температуре 950°C на поверхности CuO и NiO происходит окисление органических соединений, Pt служит в качестве катализатора.

На рис. 1.8 изображен общий вид экспериментальной конструкции для разложения воды с целью получения водорода и определения его изотопного анализа. Сущность явления состоит в каталитическом разложении воды на платине, не приводящем к существенному фракционированию изотопов водорода, и выведении кислорода через твердоэлектролитную ячейку в атмосферу. Установка содержит проводящую ионы кислорода керамическую пробирку, выполненную из стабилизированного диоксида циркония. На внешнюю и внутреннюю поверхность пробирки нанесены платиновые электроды. От них к контактным площадкам, находящимся в охлажденной части керамической пробирки, идут токопроводящие дорожки. К контактным дорожкам приложено напряжение от источника постоянного тока. Последовательно с источником включен прибор для измерения электрического тока. Часть пробирки с электродами находится в нагревательной печи при температуре примерно 800°C . Температура внутри печи измеряется с помощью термопары. Внутри пробирки вставлен керамический стержень (оксид алюминия) с двумя каналами. Стержень идет от дна пробирки и выходит наружу на 2 см. Щель между краем пробирки и стержнем заклеивается термостойким герметиком. Наружная часть стержня вставляется в тефлоновый вкладыш, который закрепляется в стальном держателе. Для фиксации стержня в держателе используются 2 винта, не показанные на рис. 1.8. Термостойкая резиновая прокладка прижимается к торцевой части стержня с помощью металлического фланца с двумя отверстиями, расположенными против двух каналов в стержне. Фланец притягивается к стальному держателю четырьмя болтами. В первый канал стержня через резиновую прокладку вводится стальной капилляр, соединенный через вентиль с изотопным масс-спектрометром DELTA Plus. Через этот капилляр производится откачка керамической пробирки до вакуума 50 мкбар. Во второй канал при помощи шприца через резиновую прокладку в пробирку вводится проба воды объемом 1 мкл. При температуре 800°C происходит каталитическое разложение воды: $2\text{H}_2\text{O} = 2\text{H}_2 + \text{O}_2$. Кислород в виде иона O^{2-} переносится через керамику, расположенную между двумя электродами, от катода (отрицательный электрод) к аноду (положительный электрод). Таким образом, во внешней цепи электрохимической ячейки возникает электрический ток. Напряжение между электродами составляет 1,4 В.

В процессе проведенных исследований была усовершенствована конструкция ТЭЯ для разложения воды. В этом узле герметизация твердоэлектролитной керамики, как и на рис. 1.8, происходит за счет термокомпенсационной глазури. Для герметизации фланцев используется

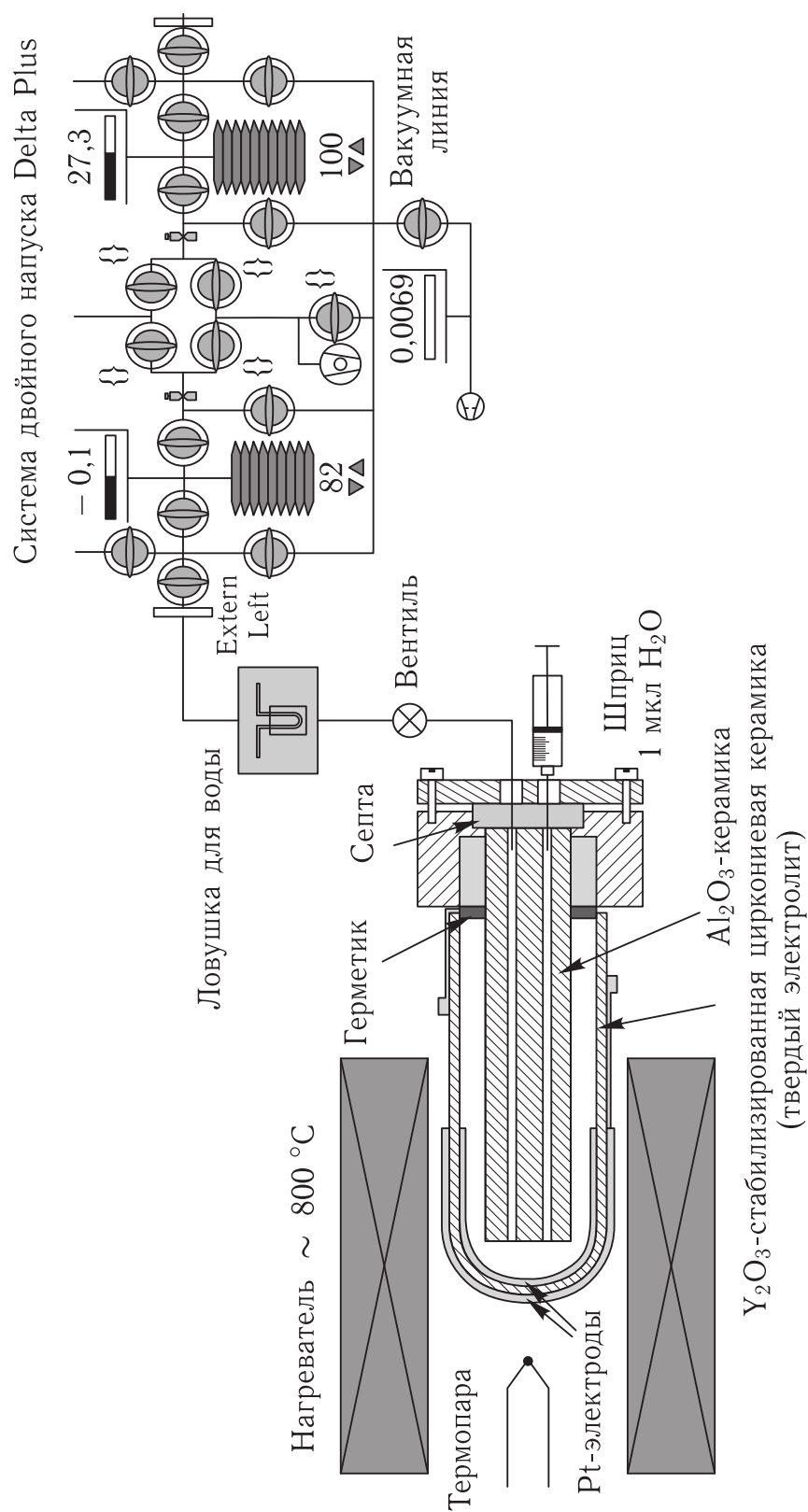


Рис. 1.8. Блок-схема высокотемпературного твердоэлектродного реактора для разложения воды, соединенного с системой двойного напуска изотопного масс-спектрометра DELTA Plus

круглая витоновая прокладка. Все фланцы стягиваются с помощью болтов. Проба воды с помощью шприца через резиновую прокладку вводится в тонкий центральный канал, по которому она поступает в нагретую зону ТЭЯ (800°C) и разлагается на платиновом электроде. Водород после разложения воды в ячейке поступает в изотопный масс-спектрометр по каналу между металлической вставкой и керамической ячейкой. Через этот же канал происходит вакуумирование (50 мкбар) ТЭЯ перед введением пробы воды (1 мкл).

Градуировка изотопных масс-спектрометров. Градуировку изотопных масс-спектрометров проводили по стандартным образцам и лабораторным образцам сравнения известного изотопного состава. Список этих образцов приведен в табл. 1.4.

Для проверки работы изотопного масс-спектрометра и его системы пробоподготовки применяли стандартные образцы в жидком, твердом

Таблица 1.4

Международные стандартные образцы, используемые для градуировки газовых изотопных масс-спектрометров

Название	Материал	$\delta\text{D}_{\text{VSMOW}}, \text{‰}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}, \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}, \text{‰}$
VSMOW	Вода	0			0
SLAP	Вода	-428,0			-55,5
GISP	Вода	$-189,5 \pm 1,2$			$-24,8 \pm 0,1$
IAEA-OH-1	Вода	$-3,9 \pm 1,3$			$-0,1 \pm 0,2$
IAEA-OH-2	Вода	$-30,8 \pm 1,1$			$-3,3 \pm 0,2$
IAEA-OH-3	Вода	$-61,3 \pm 1,4$			$-8,7 \pm 0,2$
IAEA-OH-4	Вода	$-109,4 \pm 1,4$			$-15,3 \pm 0,2$
IAEA-CH-6	Сахароза		$-10,4 \pm 0,2$		$(+36,4 \pm 0,6)$
IAEA-CO-8	Кальцит		$-5,8 \pm 0,1$		$-22,7 \pm 0,2$ (PDB)
USGS 24	Графит		$-16,0 \pm 0,1$		
IAEA-N-1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			$+0,4 \pm 0,2$	$(+12,9)$
IAEA-N-2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			$+20,3 \pm 0,2$	$(+12,3)$
IAEA-NO-3	KNO_3			$+4,7 \pm 0,2$	$(+25,3 \pm 0,7)$
IAEA-C-3	Целлюлоза		$-24,9 \pm 0,5$		
NBS 22	Масло	$-118,5 \pm 2,8$	$-29,7 \pm 0,2$		
Oztech	Газ CO_2		-3,64		-24,97
TEX-892C					
Oztech	Газ CO_2		-40,79		+10,39
TEX-843C					
Oztech	Газ N_2			0,67	
Oztech	Газ H_2	-2,59			
TEX-840H					

и газообразном состоянии. Для расчета изотопного состава легких элементов анализируемых образцов в любом агрегатном состоянии после их преобразования в простые газы использовались стандартные газы H_2 , N_2 , CO , CO_2 известного изотопного состава. Схема ввода стандартных образцов в ионный источник масс-спектрометра показана на рис. 1.9.

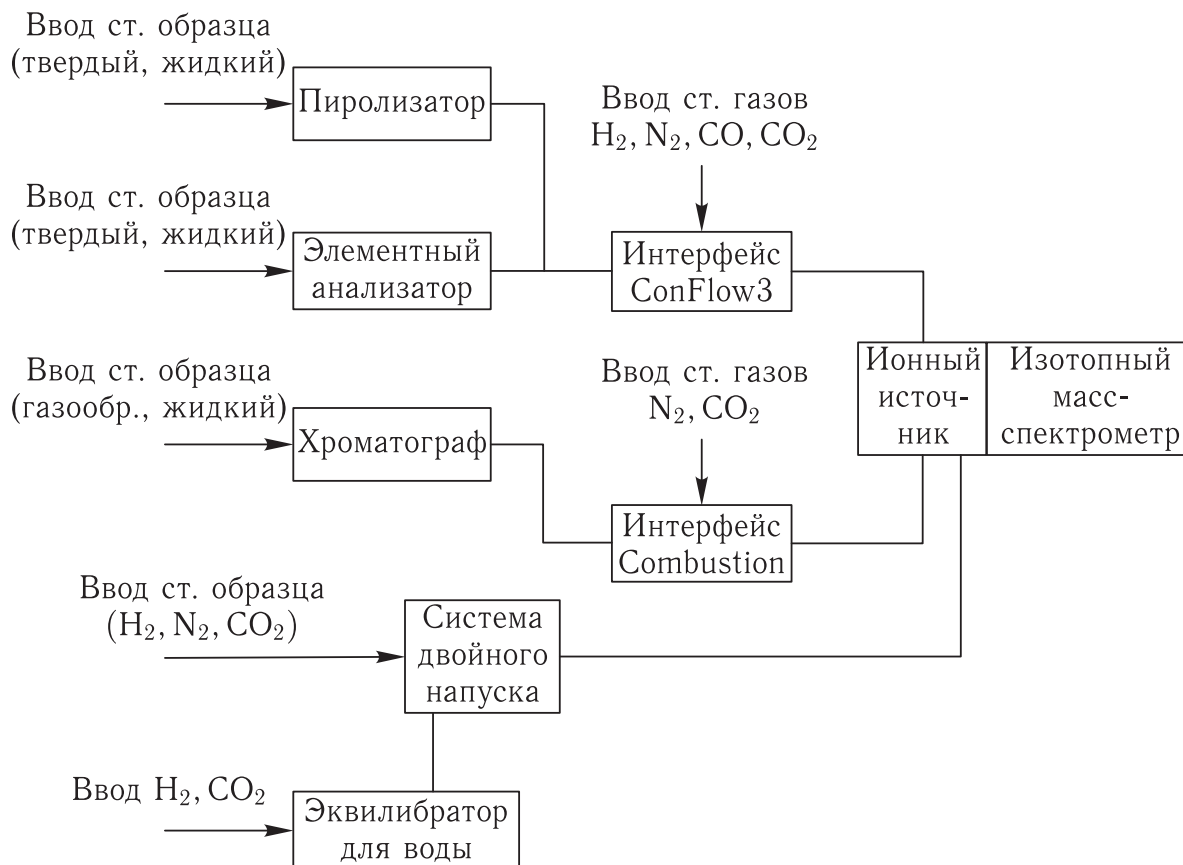


Рис. 1.9. Схема ввода стандартных образцов в ионный источник изотопного масс-спектрометра

Перед проведением изотопного анализа в ионный источник масс-спектрометра импульсно вводили порции стандартных газов, содержащих легкие элементы, которые затем измерялись в анализируемом образце. При этом происходила стабилизация параметров ионного источника и проверка воспроизводимости результатов изотопного анализа. Обычно воспроизводимость оказывалась не хуже 0,1‰. В процессе анализа непосредственно перед регистрацией пика анализируемого образца и после его окончания в ионный источник импульсно вводили порцию стандартного газа, используемого для расчета изотопного состава пробы и контроля стабильности условий проведения анализа. Типичный хроматографический спектр воды по ионному току m/z 28, 29, 30 приведен на рис. 1.10. Стандартный газ вводят в ионный источник через интерфейс ConFlow 3. Пик стандартного газа на хроматограмме имеет прямоугольную форму.

Градуировочная прямая для определения изотопного состава углерода, построенная по международным стандартным образцам различ-

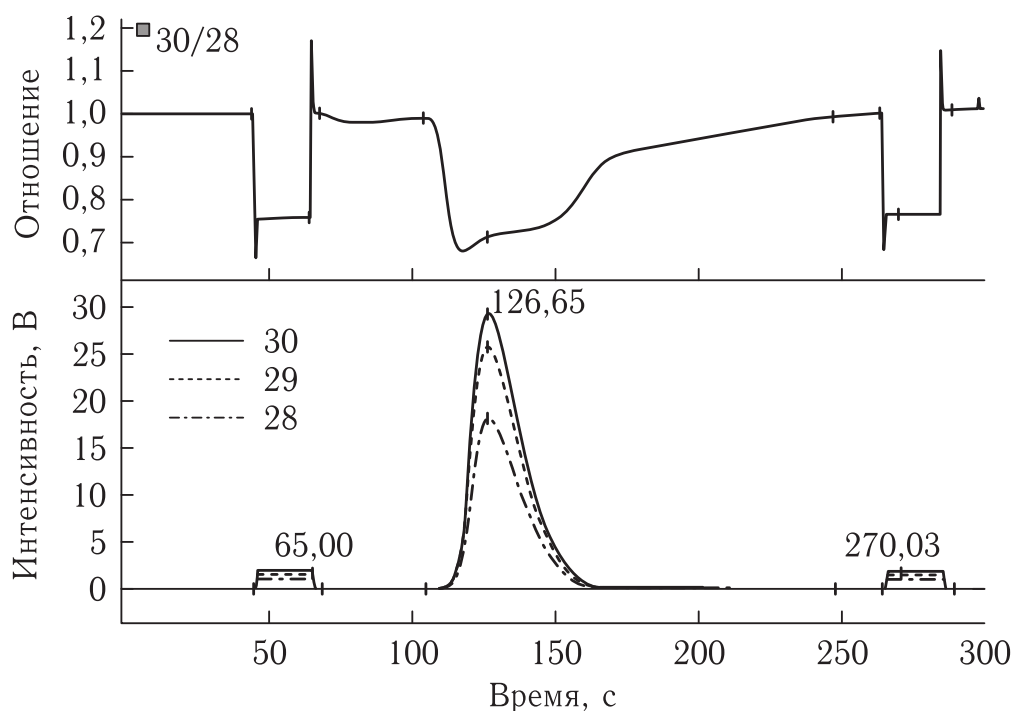


Рис. 1.10. Хроматограмма воды, построенная по ионному току m/z 28, 29, 30, при использовании пиролизатора, соединенного с изотопным масс-спектрометром (метод TC/EA-IRMS)

ного состава (NBS 22 — масло, Oil-V — масло, USGS 24 — графит, IAEA-C-3 — целлюлоза, IAEA-CH-7 — сахароза), при использовании элементного анализатора, соединенного с изотопным масс-спектрометром, показана на рис. 1.11. Она представляет собой прямую линию с коэффициентом корреляции, равным 0,999.

Видно, что вне зависимости от материала образца при полном его сгорании в окислительном реакторе элементного анализатора, при правильной юстировке ионной оптики и при отсутствии загрязнения изотопного масс-спектрометра, при правильном значении изотопного состава градуировочного газа систематическая погрешность измерения изотопного состава углерода анализируемого вещества практически отсутствует.

Аналогичные выводы можно сделать для градуировочного графика, полученного при определении изотопного состава кислорода в образцах методом TC/EA-IRMS (пиролизатор, соединенный с масс-спектрометром). Этот градуировочный график изображен на рис. 1.12. Для построения прямой использовали стандартную воду, целлюлозу и соединение KNO_3 . Градуировочный график имеет тангенс угла наклона близкий к единице, и коэффициент корреляции равен 0,994.

Градуировочный график для определения изотопного состава кислорода воды, полученный методом уравнивания со стандартным газом, представлен на рис. 1.13. Этот график имеет коэффициент корреляции 0,999 и тангенс угла наклона 0,96, близкий к единице. Уравнивание изотопного состава кислорода воды с изотопным составом кислорода стандартного газа CO_2 происходило в течение 16 ч в сосудах

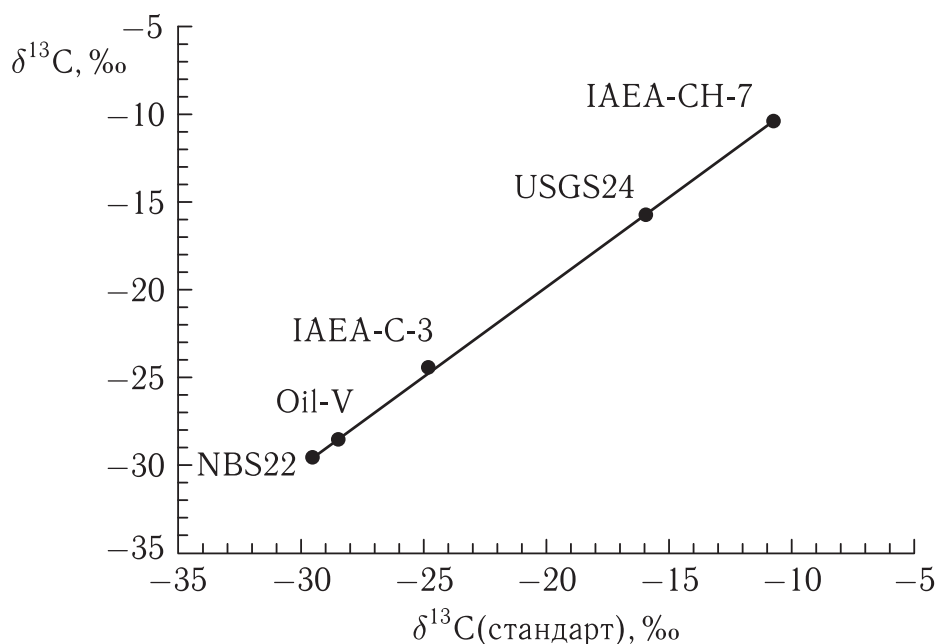


Рис. 1.11. Градуировочный график для определения изотопного состава углерода твердых и жидких веществ при анализе образцов методом EA-IRMS (элементный анализатор, соединенный с масс-спектрометром)

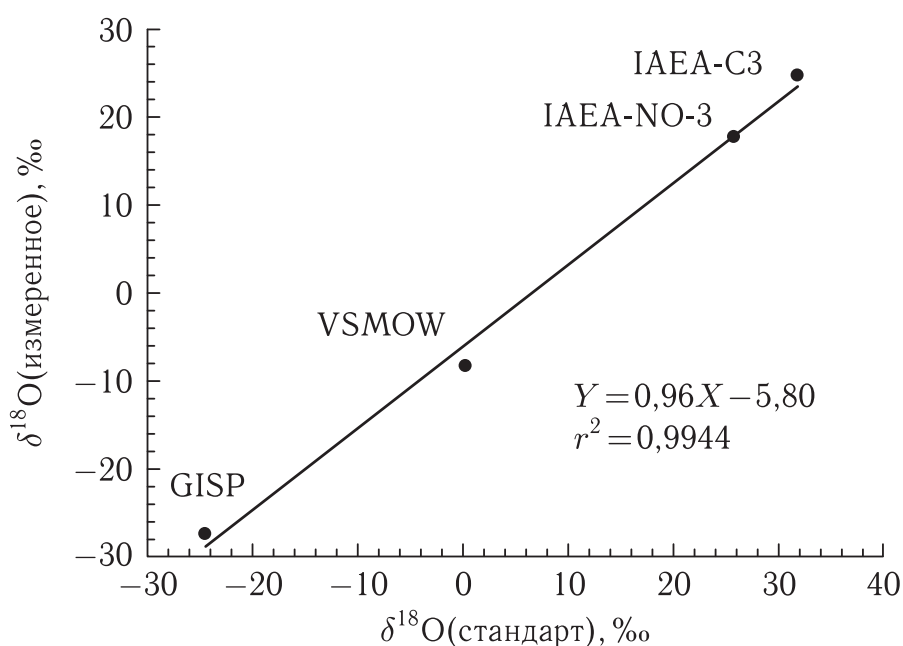
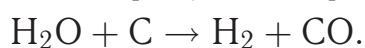


Рис. 1.12. Градуировочный график для определения изотопного состава кислорода в твердых и жидких веществах при анализе образцов методом TC/EA-IRMS (пиролизатор, соединенный с масс-спектрометром)

(бутылочках) с водой, помещенных в термостат с температурой 25 °С. Вода в сосудах перемешивалась на качалке с частотой 1,5 Гц.

Изотопный состав кислорода и водорода воды может быть установлен при пиролитическом разложении воды в реакторе при температуре 1450 °С. Пиролиз происходит на поверхности стеклоуглеродного реактора или на стеклоуглеродных гранулах по реакции [25]



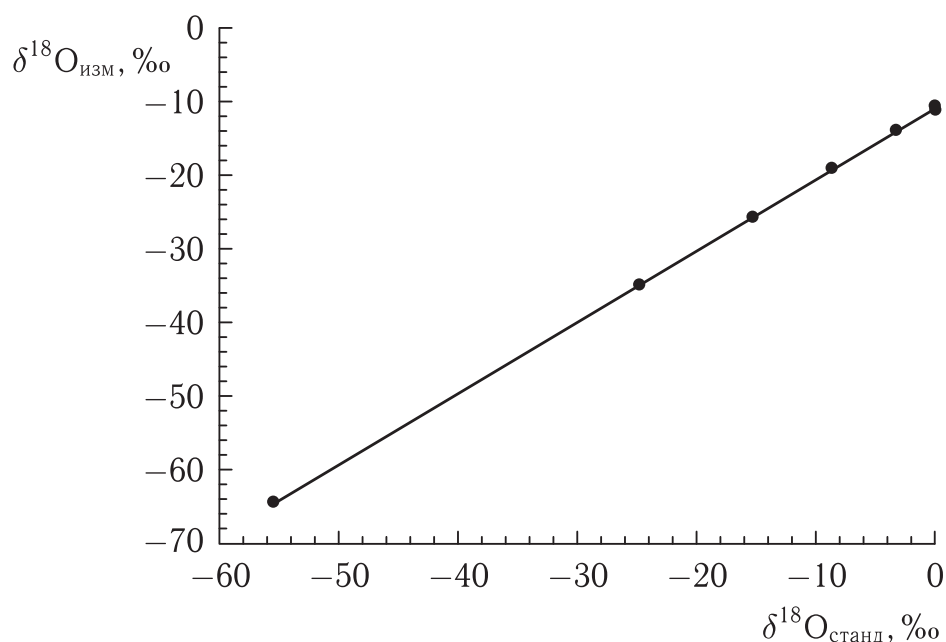


Рис. 1.13. Градуировочный график, построенный для определения изотопного состава кислорода воды, полученный методом уравнивания изотопного состава кислорода стандартного газа CO_2 и воды

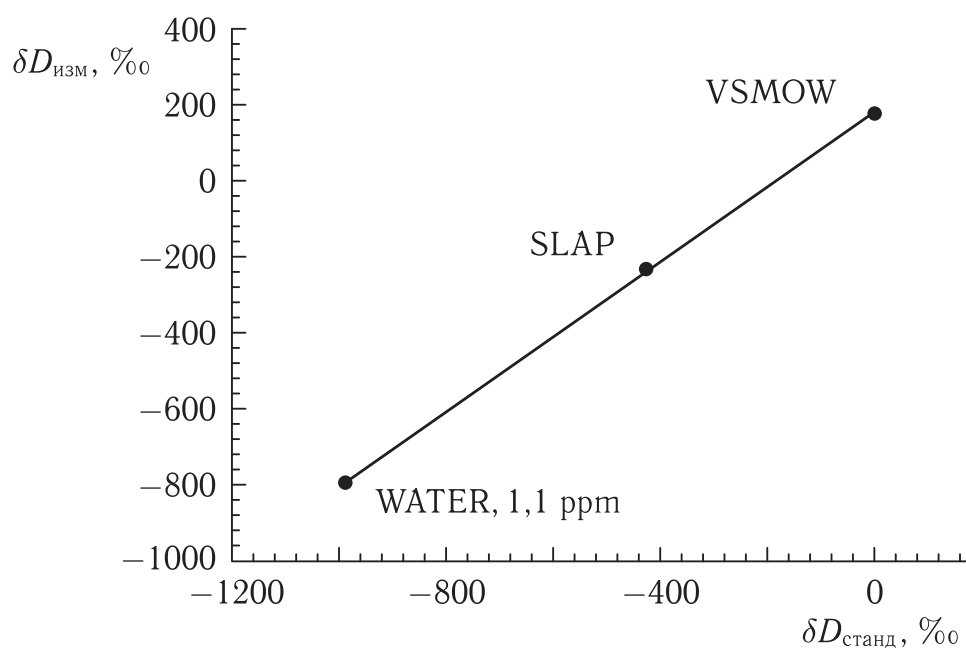


Рис. 1.14. Градуировочная характеристика, построенная для определения изотопного состава водорода воды (получена методом пиролиза воды, TC/EA-IRMS)

Разделение продуктов реакции осуществляется на хроматографической колонке. Градуировочная характеристика для определения изотопного состава водорода воды, показанная на рис. 1.14, представляет собой прямую линию в широком диапазоне изотопного состава водорода, практически от -990‰ (суперлегкая вода) до 0‰ . Для продолжения этой прямой в область положительных δD необходимо иметь стандартные образцы тяжелой воды. Тангенс угла наклона графика близок к единице, коэффициент корреляции составляет 0,999.

Для более точного построения градуировочной прямой в широком диапазоне изотопного состава водорода и отработки методики изотопного разбавления в ОАО «Тонкие технологии» (Москва) была изготовлена серия образцов с различным содержанием дейтерия. Для этого использовали очень легкую воду с известным содержанием дейтерия ($C_D = 1,1$ ppm). Согласно формуле (1.3), можно рассчитать изотопный состав водорода этой воды, который равен $\delta D = -992,9\text{‰}$:

$$\delta_{\text{обр}} = \frac{100 \cdot R_{\text{станд}} - C(1 + R_{\text{станд}})}{R_{\text{станд}} \cdot \frac{1}{100} \cdot (C - 100)}, \quad (1.3)$$

где $R_{\text{станд}}$ — отношение распространенностей тяжелого изотопа к легкому изотопу, C — концентрация тяжелого изотопа в ат.%, $\delta_{\text{обр}}$ — относительный изотопный состав образца.

Легкую воду разбавляли дистиллированной водой, изотопный состав водорода которой определяли по градуировочному графику, построенному по международным стандартным образцам VSMOW, GISP, SLAP. По изотопному составу водорода легкой и дистиллированной воды рассчитывали концентрацию дейтерия во всех промежуточных образцах. Разбавленные образцы воды выдерживали 1 неделю при комнатной температуре с периодическим перемешиванием. Полученная градуировочная характеристика представлена на рис. 1.15. Коэффициент корреляции экспериментальных данных составляет 0,999.

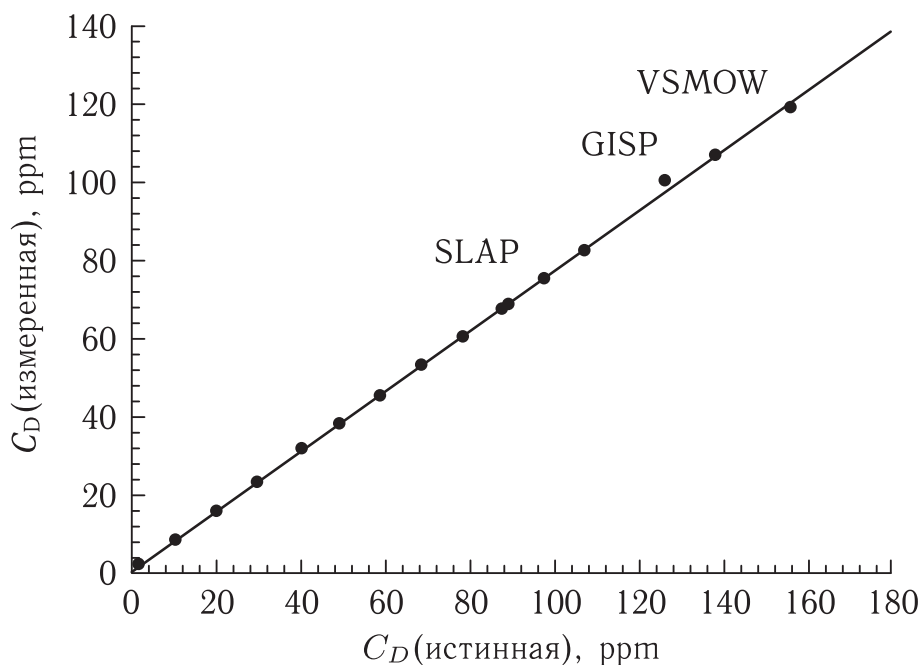


Рис. 1.15. Градуировочная характеристика, построенная для определения изотопного состава водорода воды (получена методом пиролиза воды с изотопным разбавлением, TC/EA-IRMS)

Таким образом, было показано, что для создания лабораторных стандартных образцов воды с известным изотопным составом можно применять метод изотопного разбавления.

На основании анализа градуировочных графиков, построенных для определения концентрации и изотопного состава легких элементов, можно сделать вывод, что все они обладают линейной областью с различной степенью протяженности, зависящей от конкретных условий проведения анализа и от используемой аппаратуры. Кроме того, было показано, что для построения градуировочных графиков можно использовать жидкие и твердые стандартные образцы органического и неорганического происхождения.

Масс-спектрометрические методики определения изотопного состава легких элементов

Для определения изотопного состава легких элементов широко используются системы пробоподготовки (элементный анализатор ЕА, газовый хроматограф GC, пиролизатор ТС/ЕА, система двойного напуска газов, эквilibратор для воды EQ), соединяемые через соответствующие интерфейсы с изотопным масс-спектрометром. Масс-спектрометрические методики определения изотопного состава легких элементов были созданы для масс-спектрометров DELTA Plus и DELTA PLUS XP «Thermo Fisher Scientific». Перед проведением изотопного анализа необходимо убедиться в правильности настройки прибора. Для этого необходимо провести следующие процедуры:

- 1) проверить фоновый спектр и убедиться в отсутствии течи;
- 2) провести процедуру определения центра пика;
- 3) осуществить автофокусировку ионного источника;
- 4) провести тест на воспроизводимость результатов измерения;
- 5) проверить линейность результатов изотопных измерений.

1. *Тест на наличие течи.* Основные линии фонового спектра образованы остаточными газами в вакуумной системе: H_2O , N_2 , O_2 , Ar, CO_2 . Большие величины пиков N_2 и O_2 указывают на натекание воздуха в систему. Обычно высокий фон воды наблюдается в спектре в течение 2 дней после запуска масс-спектрометра, если до этого система была разгерметизирована. При наличии течи подозрительные места обдувают аргонном и регистрируют величину пика с массой m/z 40. Течь находят в тех местах, при обдувании которых резко возрастает величина пика аргона.

2. *Нахождение центра пика стандартного газа.* Центр пика стандартного газа CO_2 определяли на среднем детекторе (цилиндр Фарадея), на котором регистрируются ионы с m/z 45, путем изменения величины ускоряющего высокого напряжения ионного источника. Оптимальное значение высокого напряжения фиксируется в программе и далее используется в качестве экспериментального параметра.

3. *Автофокусировка ионного источника.* Автофокусировка ионного источника является стандартной функцией масс-спектрометра. Проведение этой процедуры обеспечивает увеличение интенсивности

ионного пучка и более высокую правильность определения изотопного состава легких элементов. Кроме того, настройку ионного источника можно проводить в ручном режиме. Полученные параметры записывают в таблицу под названием «конфигурация газа».

4. *Проверка стабильности проведения изотопного анализа.* Проверку стабильности проведения изотопного анализа осуществляли путем многократного импульсного напуска порции стандартного газа в ионный источник (режим ON–OFF) и оценки воспроизводимости результатов изотопного анализа. Серия импульсных напусков стандартного газа азота показана на рис. 1.16.

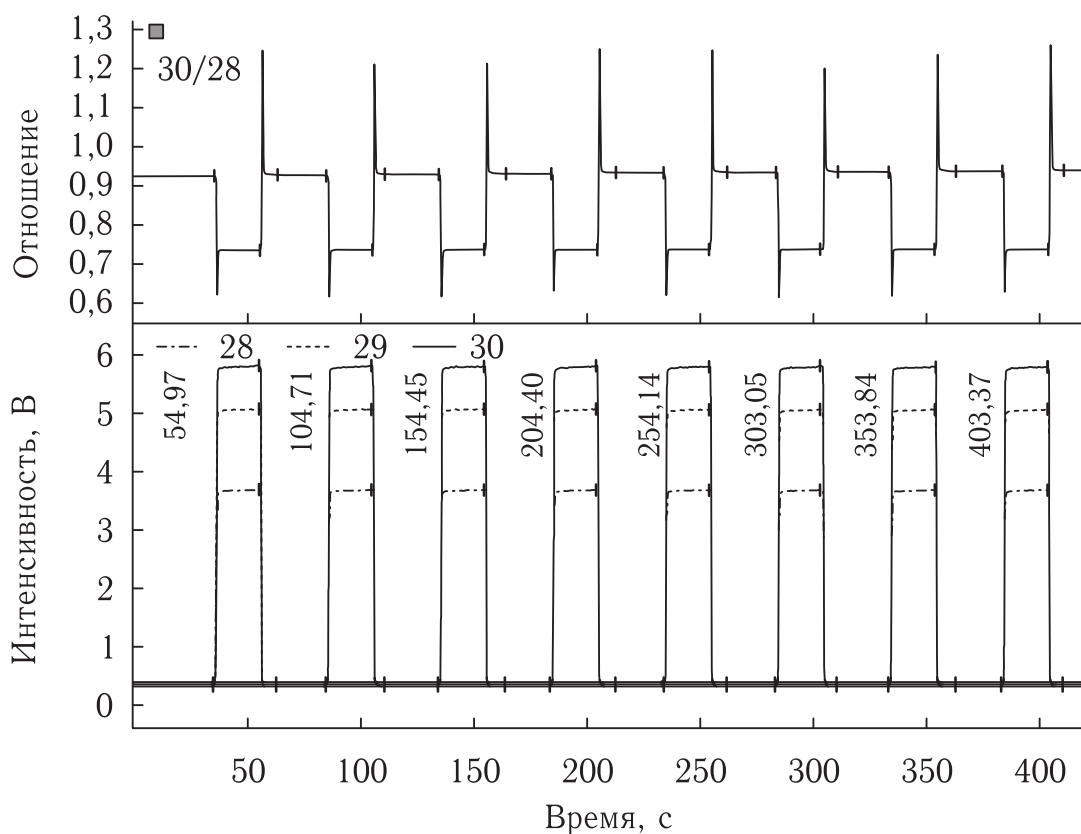


Рис. 1.16. Хроматограмма, зарегистрированная по ионному току с m/z 28, 29, 30, в режиме многократного напуска стандартного газа N_2 при одинаковом давлении в ионный источник масс-спектрометра (оценка воспроизводимости)

В результате напуска газа в масс-спектрометр на хроматограмме образуется пик с плоской вершиной, имеющий вид прямоугольника. Длительность импульса напуска газа обычно составляет 20 с. Высота прямоугольника зависит от давления стандартного газа, подаваемого в ионный источник. Чем выше давление газа, тем больше высота прямоугольника. Таким образом, регулируя давление газа, можно изменять высоту прямоугольников h и изучать влияние этой высоты (амплитуды пика) на результаты измерений изотопного состава стандартного газа (δ). Обычно прямоугольники имеют высоту $h = 3\text{--}6$ В. Одному из последних прямоугольников присваивают известное значение изотопного отношения δ легкого элемента стандартного газа. Далее по отношению

к этой величине рассчитывают изотопное отношение данного элемента для других прямоугольных импульсов. Существует режим напуска газа ON-OFF с одинаковой амплитудой (высотой) сигналов — (режим 1, рис. 1.16) и с разной амплитудой — (режим 2, рис. 1.17).

Режим ON-OFF-1 применяется для контроля стабильности работы изотопного масс-спектрометра, и для оценки воспроизводимости результатов измерений изотопного отношения стандартного газа. Многократное повторение этого режима позволяет стабилизировать условия анализа, при этом улучшается воспроизводимость. Для величин $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ и $\delta^{15}\text{N}$ воспроизводимость результатов изотопного анализа обычно не хуже 0,05‰.

5. *Проверка линейности результатов изотопного анализа.* Под линейностью результатов изотопного анализа подразумевается зависимость результатов определения изотопного состава от амплитуды сигнала. Для этого вручную увеличивают амплитуду сигнала от минимальной до максимальной путем увеличения давления газа в системе напуска в конце каждого импульса. Таким образом получают импульсы стандартного газа различной амплитуды, как показано на рис. 1.17. Обычно наблюдают линейность изменения результатов измерения изотопного состава, равную 0,06‰/В, т.е. при изменении амплитуды сигналов на 1 В изотопные соотношения изменятся на 0,06‰. Для методов EA-IRMS и TC/EA-IRMS при определении линейности более правильно использовать реальные образцы с различной массой.

При определении изотопного соотношения водорода $\delta^2\text{H}$ необходимо сначала определить H_3^+ -фактор, при помощи которого делается поправка на линейность. H_3^+ -фактор определяли экспериментально ежедневно перед проведением изотопных анализов водорода. В ионном источнике ионы водорода реагируют с молекулярным водородом и образуют ионы H_3^+ и атом водорода. Вклад H_3^+ в ионный ток с массой 3, обычно составляющий 5 ppm/nA, количественно корректировали с помощью H_3^+ -фактора.

Для проведения изотопных анализов необходимы лабораторные стандартные газы H_2 , N_2 , CO , CO_2 , которые мы аттестовали по стандартным газам при использовании метода двойного напуска газов. Расчет изотопного состава легких элементов проводили по программе ISODAT NT 2.0 относительно изотопного состава легких элементов лабораторных стандартных газов. Кроме того, периодически анализировались твердые, жидкие и газообразные стандартные образцы, которые проходили ту же методическую процедуру, что и анализируемые образцы. Это необходимо делать периодически для подтверждения правильности полученных результатов. Для определения изотопного состава $\delta^2\text{H}$ и $\delta^{18}\text{O}$ с помощью пиролизатора строится градуировочный график по изотопному составу водорода или кислорода на основе результатов изотопного анализа стандартных образцов воды VSMOW, GISP, SLAP или других стандартов.

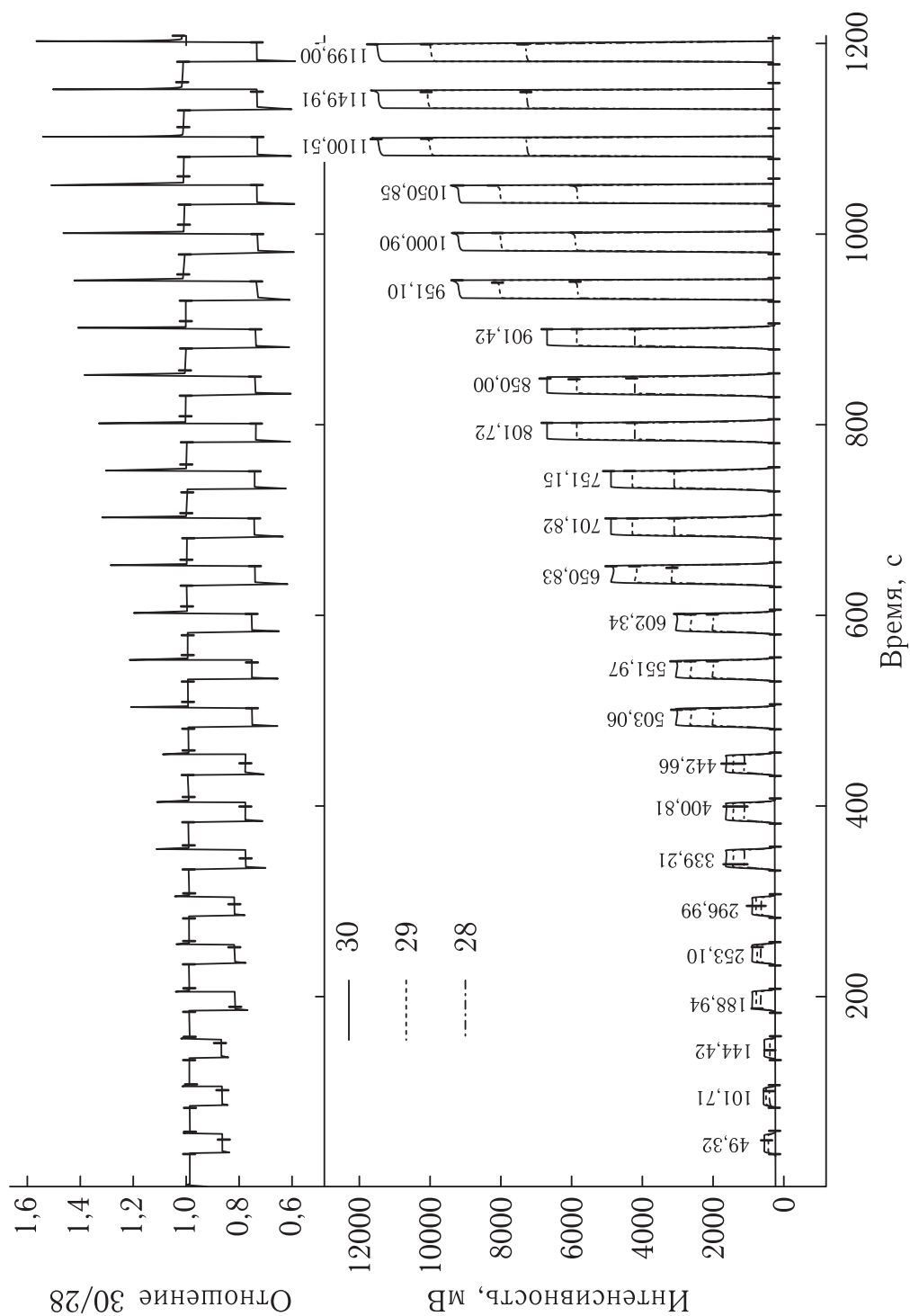


Рис. 1.17. Хромотограмма, зарегистрированная по ионному току с m/z 28, 29, 30, в режиме многократного напуска стандартного газа N_2 при различном давлении в ионный источник масс-спектрометра (оценка линейности)

1. *Метод двойного напуска газа (DI-IRMS)*. На рис. 1.2 представлена схема системы двойного напуска. Анализируемый газ и стандартный газовый образец поочередно поступают в ионный источник масс-спектрометра из сильфонов переменного объема через стальные капилляры, которые перед входом в ионный источник механически сжаты для обеспечения вязкостного режима натекания газов в вакуум. Кроме того, добиваются, чтобы скорости потоков газов были практически одинаковые. При этом с течением времени разность давлений газов в двух сильфонах будет оставаться постоянной.

Газ в систему двойного напуска подается из емкости с газом через входной фланец, уплотненный круглой витоновой прокладкой. Предварительно все коммуникации откачиваются до давления $3 \cdot 10^{-3}$ мбар. Кроме того, анализируемый газ может подаваться из системы сильфонных ампулодавителей либо из разработанного устройства, использующего надламывание одного из концов ампулы.

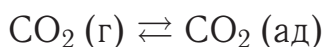
При вязкостном режиме натекания газа в ионный источник длина свободного пробега молекул не превышает $1/10$ внутреннего диаметра капилляра (0,1 мм), поэтому минимальное давление в сильфоне должно быть 15–20 мбар. Минимальный объем сильфона составляет 40 мкл, а максимальный 250 мл. Минимальное количество газа, которое может быть проанализировано, составляет примерно 5 бар · мкл или 220 нмоль чистого газа. При проведении измерений обычно сжимают сильфон до давления 30–50 мбар, чтобы получить сигнал газа, равный 3–5 V.

Попеременное измерение сигналов двух газов позволяет компенсировать влияние изменения чувствительности ионного источника и напряженности магнитного поля, компенсировать влияние температуры на работу электронных блоков и влияние инструментального дрейфа на результаты определения изотопного состава легких элементов. Воспроизводимость результатов измерения изотопного состава углерода при соблюдении всех указанных выше условий не хуже 0,1‰.

2. *Метод изотопного уравнивания стандартного газа и воды (EQ-IRMS)*. Изотопное уравнивание газа с известным изотопным составом кислорода или водорода и водой осуществляли в эквilibраторе, позволяющем поддерживать постоянную температуру проб воды, а также встряхивать их с частотой 1–3 Гц. Пробы воды наливали в 24 специальных сосуда, которые помещали в эквilibратор. Воду доставляли в емкостях из боросиликатного стекла с закручивающейся крышкой, с силиконовой прокладкой и с минимальным количеством воздуха в них.

Измерение изотопного состава кислорода воды. Для изотопного анализа отбирали примерно 5 мл воды и помещали в сосуды специальной формы, имеющие объем 20 мл. Затем эти сосуды помещали в блок эквilibратора, температуру в котором поддерживали равной 25 °С или больше с точностью 0,05 °С. Воздух из сосудов откачивали форвакуумным насосом и заполняли их газом CO_2 с известным

изотопным составом кислорода $\delta^{18}\text{O}$ до давления $\sim 0,4$ бар. Сосуды закрывали и выдерживали вместе со стандартным газом примерно 20 ч. При уравнивании происходят следующие реакции:



(обмен CO_2 между газовой фазой и водой),



(растворенный CO_2 реагирует с водой с образованием угольной кислоты).

Для построения градуировочного графика одновременно с пробами анализировали стандартные образцы. Хотя существует изотопное фракционирование между CO_2 в газовой фазе ($\text{CO}_2(\text{г})$) и растворенным CO_2 ($\text{CO}_2(\text{ад.})$), а также между растворенным CO_2 и H_2CO_3 , этот процесс будет одинаковым для всех образцов. Поэтому при расчете изотопного состава $\delta^{18}\text{O}$ эффект фракционирования можно не учитывать. После изотопного уравнивания газ через ловушку для воды (-70°C , сухой лед в этаноле) поступает в систему двойного напуска для измерения изотопного состава.

Измерение изотопного состава водорода воды. При измерении изотопного состава водорода воды H_2 уравнивается с водой при температуре 25°C , поддерживаемой с точностью $0,05^\circ\text{C}$, в течение 1–2 ч. При этом в воду погружают пластиковый стержень с платиновыми вкраплениями, служащими катализатором изотопного обмена. Изотопный обмен происходит в присутствии платины на поверхности стержня. Для построения градуировочного графика одновременно с пробами анализируют стандартные образцы. Воспроизводимость результатов изотопного анализа составляет $0,5\text{‰}$ и $0,04\text{‰}$ для ^2H и ^{18}O соответственно.

3. Метод изотопного анализа с использованием элементного анализатора (EA-IRMS). Метод EA-IRMS используется для определения изотопного состава углерода и азота в твердых и жидких веществах. Образцы массой от 0,1 до 3 мг помещали в оловянные капсулы размером 9×5 мм. Если твердые образцы являлись неомогенными, их высушивали при температуре 60°C в течение 48 ч с последующим измельчением на шаровой мельнице в течение 10 мин. Если образцы содержали неорганический углерод в виде карбонатов, который мешает определению изотопного состава органического углерода, то эти образцы обрабатывали парами соляной кислоты, а затем тщательно промывали водой. Оптимальная навеска образцов для проведения изотопного анализа углерода с необходимой точностью должна содержать 200–600 мкг углерода. Содержание углерода не должно превышать 5 мг углерода, так как большую массу образца трудно упаковать и полностью сжечь. Минимальная навеска образцов могла быть на порядок величины меньше. Оптимальная навеска образцов для проведения изотопного анализа азота с необходимой точностью должна содержать 100 мкг азота.

Упакованные в оловянные капсулы образцы помещали в устройство автоматического ввода проб (автосамплер) элементного анализатора, и оттуда по команде компьютера эти пробы сбрасывались в окислительный реактор. Одновременно в поток гелия 90–120 мл/мин подавали чистый кислород. Капсулы с образцом мгновенно сгорали, причем температура локально повышалась до 1800 °С. Далее продукты сгорания доокислялись в окислительном реакторе, нагретом до температуры 1020 °С и заполненном реактивами Cr_2O_3 и посеребренными гранулами Co_3O_4 . Из окислительного реактора, полученные чистые газы N_2 , CO_2 , оксиды азота и H_2O попадают в восстановительный реактор, нагретый до температуры 650 °С и содержащий металлическую медь и оксид меди. В этом реакторе оксиды азота восстанавливались до молекулярного азота, и поглощался оставшийся кислород. Воду удаляли из потока газа-носителя He путем улавливания в ловушке с перхлоратом магния. Далее азот и диоксид углерода разделяли на капиллярной колонке PoraPlot Q при температуре 50 °С. Разделенные газы через устройство ConFlo 2 вводили в ионный источник изотопного масс-спектрометра для проведения изотопного анализа. Полученные сигналы N_2 и CO_2 должны быть не меньше 1000 мВ и не более 9000 мВ. Для получения хороших фоновых спектров необходимо предварительно открыть игольчатый натекаль для подачи гелия по кварцевому капилляру из ConFlo 2 в ионный источник и продувать его в течение 12 ч. В окислительный реактор помещают кварцевую вставку для сбора золы (шлака), образующейся из минеральной составляющей образцов. Шлак необходимо удалять после анализа 50 образцов, так как он мешает проведению дальнейших анализов. Для этого температуру реактора понижают до 400–500 °С, вскрывают окислительный реактор и пинцетом вынимают вставку со шлаком.

Перед проведением изотопного анализа необходимо также провести холостой опыт и определить пик холостого опыта, который следует вычитать из площади пика образца. Затем необходимо подобрать стандартный образец или лабораторный стандартный образец, имеющий состав, близкий к анализируемому материалу, и убедиться в правильном определении его изотопного состава.

Обычно результат первого изотопного анализа отбрасывают, проводят дополнительно еще два-три параллельных анализа и сравнивают полученные результаты, которые должны быть близки по своему значению. После каждых 5–10 анализов исследуемых образцов анализируют стандартный образец для контроля неизменности качества анализа. Перед проведением анализов необходимо сгруппировать образцы с одинаковыми свойствами, так как при переходе к другим образцам в зависимости от величины навески может возникать незначительный эффект памяти (менее 0,2‰).

В процессе многочисленных анализов окислители теряют свои окислительные и каталитические свойства, а восстановительный реактор пере-

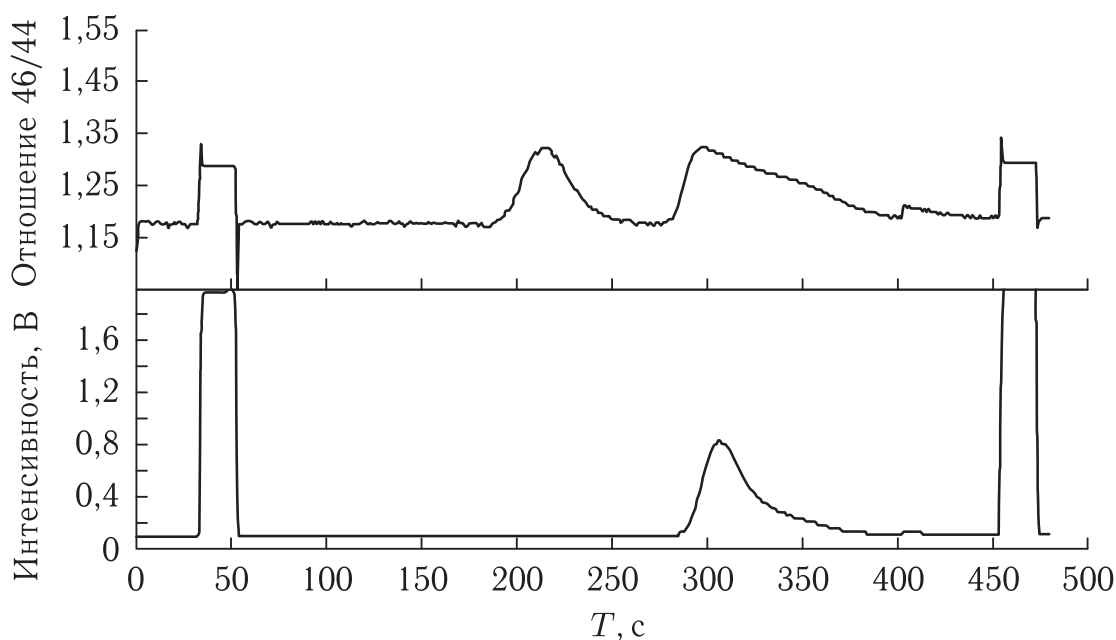


Рис. 1.18. Хроматограмма продуктов сгорания органического вещества, построенная по ионному току с m/z 44, при загрязненном окислительном реакторе

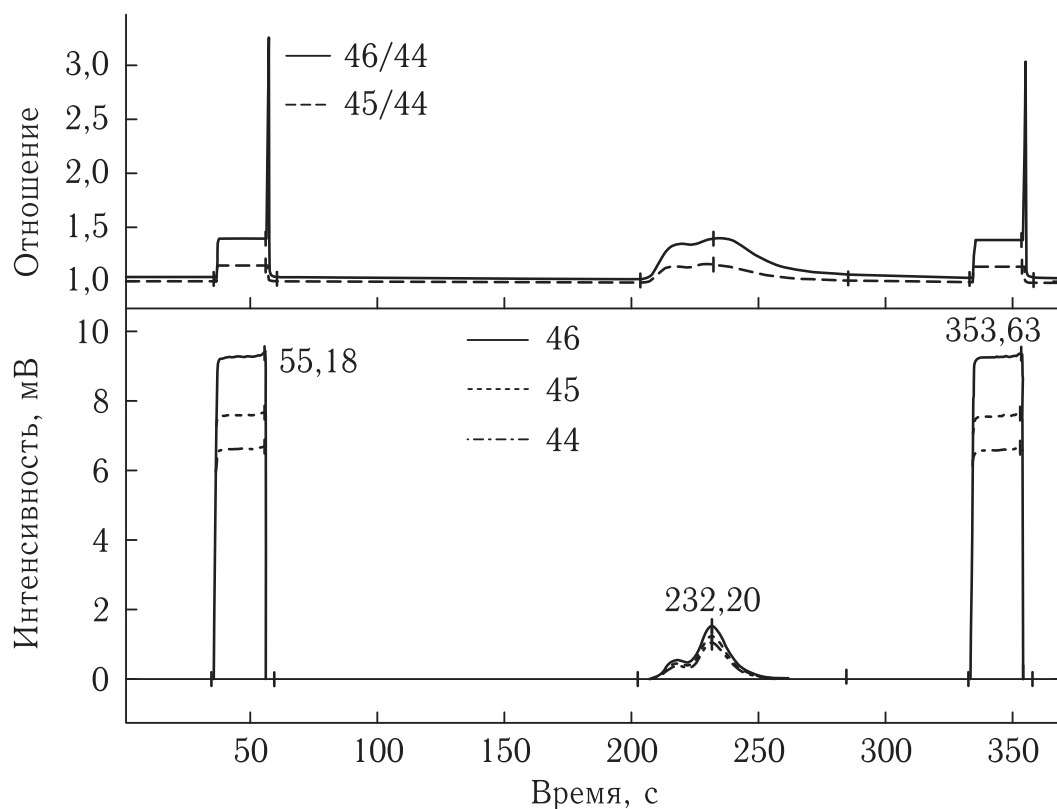


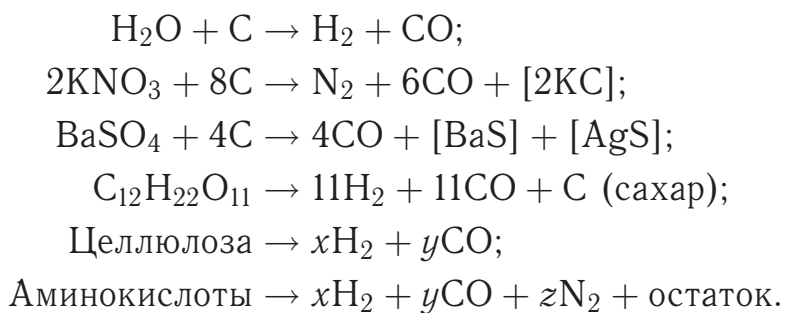
Рис. 1.19. Хроматограмма продуктов неполного сгорания органического вещества, построенная по ионному току с m/z 44, 45, 46

стает функционировать. Измеренное значение изотопного состава легких элементов стандартных образцов перестает соответствовать своему истинному значению. Следовательно, реакторы должны быть заменены.

При загрязнении реактивов соединениями серы и хлора в ионной хроматограмме появляются посторонние пики (рис. 1.18), которые хоро-

шо видны на графике отношения ионных токов с массами m/z 45 (46) и m/z 44. Особенно быстро реактивы загрязняются и выходят из строя при анализе морских осадков, обработанных парами соляной кислоты. На рис. 1.19 показано, как ухудшение окислительных свойств реактивов окислительного реактора приводит к расщеплению аналитического пика, что приводит к искажению результатов изотопного анализа.

4. *Метод изотопного анализа с использованием высокотемпературного пиролизатора (ТС/ЕА-IRMS)*. Этот метод основан на пиролитическом разложении органических и некоторых неорганических соединений при высокой температуре (1450°C) на поверхности стеклоглеродного реактора и стеклоглеродных гранул. Образцы могут быть твердыми, жидкими и газообразными. Так как для разложения веществ не требуется присутствия в системе газообразного кислорода и кислородных окислителей, этот метод имеет большие возможности для изотопного анализа водорода, кислорода и азота. Преимуществом данной системы является малая навеска образцов, что, однако, требует хорошей их гомогенности. При традиционном отдельном разложении веществ навеска образцов берется значительно больше. В этом случае явление негетомогенности играет существенно меньшую роль. Небольшая газо-хроматографическая колонка Poraplot Q (Chrompack), установленная после пиролитического реактора, позволяет разделять образовавшиеся газы: H_2 , N_2 , CO . Пиролиз некоторых простых соединений представлен на следующей схеме:



Внизу пиролитического реактора помещают серебряную проволоку, позволяющую удалять серу из потока газа-носителя гелия (гелий марки 60). Твердые образцы заворачивают в серебряные капсулы (4×6) и устанавливают в устройство автоматического ввода проб. Обычно при проведении изотопного анализа влиянием кислорода оксидной пленки Ag можно пренебречь. Жидкие и газообразные пробы вводят с помощью шприца через резиновую прокладку непосредственно в реактор (0,3–1 мкл). Игла шприца должна оставаться в нагретой зоне реактора в течение 10–16 с для полного испарения пробы из полости иглы. Величина аналитического сигнала должна превышать 2000 мВ. Температуру пиролитического реактора поднимают до рабочей температуры 1450°C или понижают до температуры ждущего режима 950°C со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Со временем наблюдается увеличение уровня фоновой линии CO^+ , так как кислород из внешней керамической трубки (Al_2O_3) проникает на поверхность внутренней стеклоуглеродной трубки и взаимодействует с углеродом. После пиролизатора продукты пиролиза в потоке гелия (90 мл/мин) направляются через хроматографическую колонку (90 °C) в интерфейс ConFlo3 и далее в ионный источник масс-спектрометра, давление в котором составляет $2 \cdot 10^{-6}$ мбар. Для улучшения воспроизводимости результатов изотопных измерений в поток газа-носителя добавляли 2% водорода, чтобы сохранять восстановительные свойства системы.

Ионные токи с массами m/z 2 и 3 при измерении изотопного состава водорода и ионные токи с массами m/z 28, 29, 30 (в виде CO^+) для расчета изотопного состава кислорода регистрируются с использованием программы ISODAT NT 2.0. При этом рассчитывается изотопный состав легких элементов относительно стандартных газов. При определении изотопного состава кислорода требуется, чтобы образец содержал 2-6 мкмоль кислорода (O). Воспроизводимость результатов изотопного анализа водорода составляет 1–2‰, кислорода 0,3–0,5‰. После анализа 150 образцов необходимо извлечь из реактора, скопившиеся в нем остатки серебряных капсул. После анализа 300 образцов необходимо очистить поверхность стеклоуглеродной трубки от образовавшихся загрязнений и заменить гранулы, а после проведения 2000 анализов пиролитическая трубка и гранулы подлежат замене.

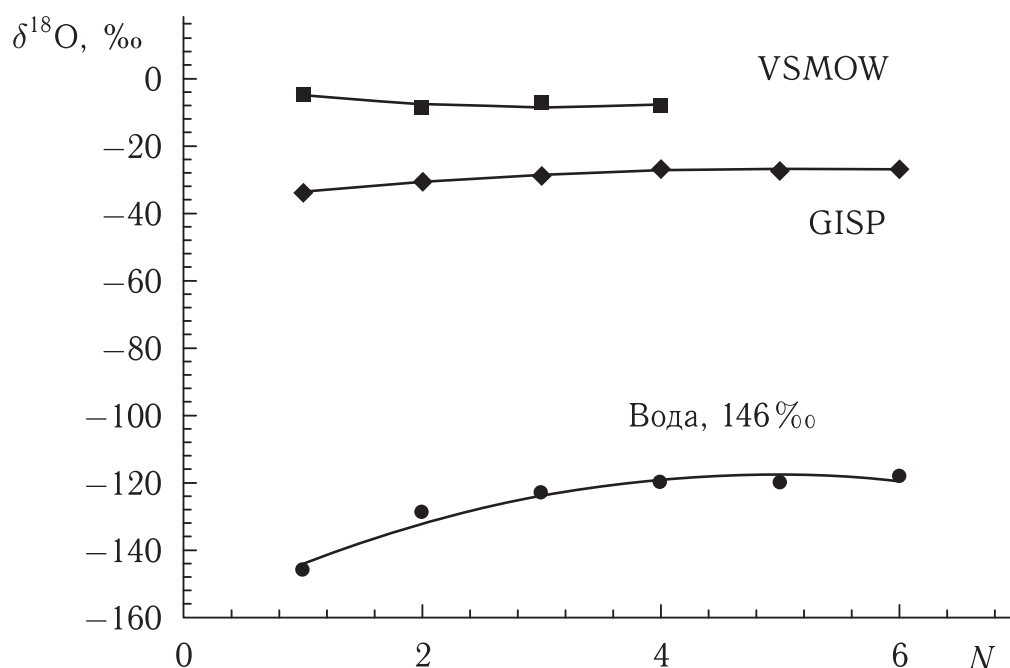


Рис. 1.20. Эффект памяти пиролитического реактора. Изменение изотопного состава кислорода $\delta^{18}\text{O}$ в зависимости от числа ввода проб воды N

Основные погрешности при определении изотопного состава водорода и кислорода в образцах возникают в результате наличия в них влаги и воздуха, а также присутствия оксидного слоя на поверхности

Ag-капсул, в которых образцы вводятся в систему. Кроме того, возможен изотопный обмен кислорода между СО и оксидами металлов [26]. Каждый день после проведения анализов хроматографическую колонку прогревали при температуре 150 °С в течение ночи. Перед проведением анализа образцы должны быть высушены при температуре 40 °С для удаления влаги, изотопный состав кислорода и водорода которой может исказить результаты изотопного анализа образцов. Длительность одного определения изотопного состава составляет примерно 400 с. Измерения одного образца повторяли 3–4 раза.

К сожалению, было найдено, что при изотопном анализе водорода и кислорода наблюдается эффект памяти пиролизатора при переходе к образцу с другим изотопным составом. Поэтому, как показано на рис. 1.20, два первых измерения последующего образца могут быть искажены из-за наличия эффекта памяти, связанного с изотопным анализом предыдущего образца.

5. *Метод изотопного анализа с использованием капиллярного хроматографа (GC-C-IRMS)*. Сущность этого метода заключается в превращении сложных по составу газовых смесей в простые, хорошо разделенные газы, необходимые для проведения изотопного анализа легких элементов. Для этого газовый хроматограф с капиллярной колонкой присоединяется посредством интерфейсного блока Combustion 3 к изотопному масс-спектрометру. Разделенные в хроматографе соединения в окислительном реакторе конвертируются в простые газы CO_2 , N_2 , оксиды азота и H_2O при температуре 940 °С на поверхности платиновой проволоки, переплетенной с окисленными металлическими проволоками Cu, Ni. Оксиды азота восстанавливаются в восстановительном реакторе при температуре 600 °С на поверхности медной проволоки. Образовавшаяся вода выводится из потока газа-носителя гелия (марка 60, чистота 99,9999%) через полупроницаемую мембрану «Nafion». Поток газа-носителя составляет 1–2 мл/мин. Через интерфейс (открытая щель) газы попадают в ионный источник масс-спектрометра, где ионизируются. Далее ионы, разделенные по массе (m/z) в магнитном поле анализатора, регистрируются на трех цилиндрах Фарадея, настроенных на определенную массу. Например, для молекулярного иона CO_2^+ регистрируют изотопологи m/z 44, 45, 46, а для иона N_2^+ изотопы с m/z 28, 29, 30. На основании полученных величин ионных токов рассчитывают изотопный состав углерода в CO_2 и азота в N_2 . Преимущество данной установки перед другими приборами заключается в том, что появляется возможность определять изотопный состав элементов в каждом компоненте сложной смеси газов.

Для разделения сложных смесей органических соединений в хроматографе HP 6890 использовали две капиллярные колонки PoraPlot Q (фирма «Chrompack») длиной 25 м и DB-5 (фирма «J&W Scientific») длиной 30 м и диаметром 0,32 мм. Условия работы хроматографа были следующими.

Условия	Анализ газов	Анализ растворов
Колонка	PoraPlot Q	DB-5
Темп. узла ввода проб	100 °C	250 °C
Начальн. темп. термостата	40 °C	150 °C
Конечн. темп. термостата	180 °C	320 °C
Скорость нагрева	5 °C/мин	10 °C/мин

Анализ проводили при включенном нагреве источника ионов и игольчатого натекавателя. Образцы в виде жидкости или газа вводили в хроматограф с помощью шприца либо в ручном, либо в автоматическом режиме при использовании устройства автоматического ввода проб CTC A200S. Объем жидкой пробы составлял не более 1 мкл. Методом GC-C-IRMS можно регистрировать 3–5 нмоль углерода. Величины аналитических сигналов должны быть больше 2000 мВ. Объем газовой пробы составлял не более 300 мкл. При определении изотопного состава минорных компонентов газовой смеси хроматограф переводится в режим обратной продувки (backflush) на период времени выхода из колонки компонентов с высокой концентрацией. Это делается для того, чтобы не допустить прохождения макрокомпонентов через окислительный и восстановительный реакторы и попадания большого количества продуктов окисления в ионный источник масс-спектрометра, что вызывает перегрузку электронных усилителей. Перегрузка окислительного реактора ведет к быстрому его истощению и к возможному появлению эффекта памяти, проявляющегося в неправильном определении изотопного состава последующих компонентов газовой смеси.

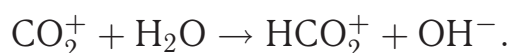
После изотопного анализа 100 образцов необходимо доокислить газообразным кислородом медь окислительного реактора в течение 12 ч при температуре 500–600 °C. При осаждении на поверхности меди продуктов пиролиза органических соединений использование кислорода для регенерации окислительного реактора приводит к образованию на поверхности меди соединения Cu_2O (закиси меди), а не CuO . Когда образуется достаточное количество Cu_2O , эффективность окислительного реактора снижается и возникает необходимость его замены. Деградацию окислительного реактора может вызвать также образование на поверхности меди соединений с серой и хлором. Например, реактор может выйти из строя после 15 анализов смеси, содержащей сернистые соединения [27]. Если в потоке газа-носителя гелия содержатся пары воды, образовавшиеся в процессе сгорания органических соединений, они могут вызвать протонирование молекул газа CO_2 и привести к сдвигу в результатах изотопного анализа углерода. Поэтому ловушка для воды, выполненная в виде трубки с мембраной «Nafion», не должна быть загрязнена продуктами пиролиза и остатками растворителей, вызывающих ее деградацию вплоть до образования разрывов [27].

Метрологические особенности масс-спектрометрии изотопных отношений

Влияние величины аналитического сигнала на результаты измерения изотопного состава легких элементов

Цель исследований заключалась в изучении влияния амплитуды аналитического сигнала на результаты измерения изотопного состава легких элементов при использовании различных систем пробоподготовки и напуска газов в изотопные масс-спектрометры. Всесторонне этот эффект до сих пор не изучался. В литературе имеются упоминания о том, что при малых величинах сигналов происходит неправильное измерение изотопного состава легких элементов [28]. Причины такого явления изучены недостаточно, поэтому мы решили подробно изучить влияние различных факторов на изменение результатов измерений изотопных отношений легких элементов.

Присутствие паров воды в ионном источнике изотопного масс-спектрометра приводит к ошибке в измерении изотопного состава углерода из-за протекания химической реакции между ионами диоксида углерода и молекулами воды [28]:



Пары воды вызывают изменение отношений ионных токов изотопологов с m/z 45 и 44 (45/44) и m/z 46 и 44 (46/44), так как сигнал ионов $\text{H}^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$ дает вклад в основной сигнал ионов с массой m/z 45, а сигнал ионов $\text{H}^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$ в сигнал с массой m/z 46 [23, 29]. Подобные реакции протонирования возможны и для других газов, приводя к образованию ионов H_3^+ или N_2H^+ [23]. В зависимости от соотношения сигналов от образца и стандартного газа сдвиг изотопного состава углерода образца может быть как положительным, так и отрицательным. Влияние паров воды можно уменьшить путем понижения потенциала экстракционных линз ионного источника. Однако это сопровождается одновременным ухудшением чувствительности метода [28].

Эксперименты проводились на двух газовых изотопных масс-спектрометрах DELTA Plus и DELTA Plus XP при использовании системы двойного напуска газов, элементного анализатора (ЕА) и пиролизатора (ТС/ЕА), а также при использовании различных систем напуска газов в масс-спектрометр — через газовые интерфейсы Combustion 3, ConFlo 2, ConFlo 3. Для изучения аналитических характеристик данных систем использовали стандартные газы CO , N_2 , CO_2 с известным изотопным составом.

При проведении изотопного анализа легких элементов важное значение имеет степень откачки и состав остаточных газов в вакуумной системе масс-спектрометра. В табл. 1.5 приведены интенсивности пиков остаточных газов в вакуумной системе масс-спектрометра DELTA Plus. Наиболее интенсивной линией является пик воды (m/z 18).

Таблица 1.5

Интенсивности линий остаточных газов в вакуумной системе масс-спектрометра DELTA Plus (детектор 3)

Давление, мбар	Масса иона m/z , а.е.м.	18	28	32	44
$7,4 \cdot 10^{-9}$	Сигнал, мВ (без напуска гелия)	503	133	307	166
$1,8 \cdot 10^{-6}$	Сигнал, мВ (при напуске гелия через хроматограф)	2137	694	1360	514

При напуске гелия через хроматограф НР 6890 посредством системы Combustion 3 в ионный источник масс-спектрометра интенсивности всех линий остаточных газов возрастают в 3–5 раз. В этих условиях влияние кислорода и паров воды на результаты измерения изотопного состава образца должно возрасти. Образовавшиеся в ионном источнике ионы, содержащие изотопологи CO_2 , N_2 , CO и др., под действием магнитного поля разделяются и попадают в зависимости от отношения массы к заряду на один из трех детекторов, известных под названием «цилиндр Фарадея». Ионы, попавшие в детектор, вызывают электронный ток, который усиливается с помощью электронного усилителя и преобразуется в напряжение на высокоомном резисторе. Характеристики высокоточных высокоомных резисторов и конденсаторов приведены в табл. 1.6.

Таблица 1.6

Характеристики резисторов и конденсаторов, используемых в электронных усилителях детекторов ионов, при определении изотопологов CO_2

Газ	m/z	Сопротивление, Ом	Емкость конденсатора, пФ
CO_2	44	$3 \cdot 10^8$	470
	45	$3 \cdot 10^{10}$	5
	46	$1 \cdot 10^{11}$	2

Таким образом, при регистрации ионов изотопологов CO_2 детектор 3 регистрирует ионы с m/z 46 с чувствительностью в $3,3 \cdot 10^2$ и в 3,3 большей, чем детектор 1 (m/z 44) и детектор 2 (m/z 45) соответственно. Это позволяет получать близкие по величине аналитические сигналы и тем самым уменьшать погрешность измерения изотопных отношений.

Система двойного напуска (DELTA Plus). Изучение аналитических характеристик системы двойного напуска проводили на примере стандартного газа CO_2 с различным изотопным составом в условиях напуска потока гелия в ионный источник масс-спектрометра через хроматограф НР 6890 и интерфейс Combustion 3 или без напуска гелия (в этом случае вентиль напуска газов в масс-спектрометр был закрыт). Это позволяло, с одной стороны, изучить влияние общего давления

в ионном источнике на результаты изотопного анализа, а с другой стороны — изучать влияние повышенного парциального давления паров воды, которые могут проникать в масс-спектрометр с потоком гелия или являются микропримесью стандартного газа CO_2 .

В табл. 1.7 представлены результаты влияния напуска гелия ($P = 1,8 \cdot 10^{-6}$ мбар) в ионный источник масс-спектрометра на результаты определения изотопного состава углерода в образце CO_2 . При этом измерения проводили в режиме двойного напуска газов, когда один и тот же газ используется в качестве образца и стандарта. Ионные токи образца и стандарта были одинаковыми $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$).

Таблица 1.7

Результаты измерения изотопного состава углерода образца CO_2 в зависимости от величины ионного тока $I(m/z 44)$ (при напуске гелия в ионный источник масс-спектрометра, $P = 1,8 \cdot 10^{-6}$ мбар), $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$; $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$

Напуск гелия	Сигнал $I(m/z 44)$, В	Сигнал $I(m/z 18)$, мВ/детектор 3	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰	S , ‰
Нет	3,8	490	0,01	0,02
Есть	3,8	2920	0,02	0,03
Есть	0,586	1791	0,04	0,05
Есть	0,265	1183	0,20	0,12
Есть	0,057	940	1,65	0,40

Δ — разность изотопных отношений между стандартным газом и образцом, S — стандартное отклонение.

Как видно из табл. 1.7, при условии напуска гелия и при одновременном уменьшении интенсивности сигналов образца и стандартного газа происходит уменьшение фона паров воды $I(m/z 18)$. При этом при интенсивности сигнала $I(m/z 44) < 265$ мВ возрастает разность изотопных отношений $\Delta^{13}\text{C} > 0,2\text{‰}$, а стандартное отклонение S начинает превышать $0,1\text{‰}$. По нашему мнению, это обусловлено взаимодействием CO_2 с парами воды в ионном источнике масс-спектрометра, количество которых может возрастать при напуске газов (табл. 1.7). В связи с тем, что при малых значениях сигналов величины $I_{\text{обр}}$ и $I_{\text{станд}}$ после автоматического выравнивания сигналов могут различаться довольно значительно (до 20% и более), то условия изотопного анализа будут неодинаковыми. Кроме того, геометрические параметры капилляров диаметром 0,1 мм, по которым происходит натекание газов и которые сжаты на концах перед источником ионов, могут также быть неодинаковыми, что может способствовать фракционированию изотопов [23].

Полученные результаты по измерению изотопного состава углерода CO_2 при проведении измерений в режиме двойного напуска при натекании гелия в ионный источник масс-спектрометра сравнивались с результатами, полученными при анализе в стандартных условиях без

Таблица 1.8

Результаты измерения изотопного состава углерода образца CO_2 в зависимости от ионного тока $I(m/z\ 44)$ (без напуска гелия в ионный источник масс-спектрометра), $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$; $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$

№	Сигнал $I(m/z\ 44)$, В	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰	S, ‰
1	4,0	0,05	0,19
2	2,2	0,06	0,08
3	1,0	0,04	0,08
4	0,57	0,01	0,10
5	0,50	-0,11	0,14
6	0,30	-0,19	0,13
7	0,26	0,15	0,19

Δ — разность изотопных отношений между стандартным газом и образцом.

напуска гелия (таблицы 1.7 и 1.8). Было установлено, что при условии $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$ и $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$ напуск гелия в ионный источник масс-спектрометра не приводит к существенному изменению зависимости измеренного изотопного состава углерода от величины аналитического сигнала.

В случае, когда в качестве образца используется газ CO_2 с большим содержанием тяжелых изотопов углерода ($\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = -3,64\text{‰}$), измеренный изотопный состав углерода будет завышенным при больших сигналах и заниженным при малых, вне зависимости от давления гелия в ионном источнике масс-спектрометра (табл. 1.9). Это можно объяснить протеканием двух конкурирующих процессов.

Таблица 1.9

Результаты измерения изотопного состава углерода образца CO_2 в зависимости от величины ионного тока $I(m/z\ 44)$ (при напуске гелия в ионный источник масс-спектрометра, $P = 1,8 \cdot 10^{-6}$ мбар), $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}} = 3960$ мВ; $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = -3,64\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$

№	Сигнал образца $I(m/z\ 44)$, мВ	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰ ($\delta_1 - \delta_i$)	S, ‰
1	3806	-3,53	0	0,06
2	2148	-3,40	-0,13	0,06
3	870	-3,33	-0,20	0,08
4	390	-3,22	-0,31	0,08
5	175	-4,68	1,15	0,20
6	77	-7,24	3,71	0,67

$\Delta = \delta_1 - \delta_i$ — разность изотопных отношений между стандартным газом и образцом.

Один процесс связан с взаимодействием пробы с остаточными парами воды в вакуумной системе масс-спектрометра, что вызывает протонирование изотопологов и увеличение $\delta^{13}\text{C}$. Другой процесс обусловлен отклонением (относительно исходных значений) геометрических параметров системы двойного напуска, что может приводить к уменьшению величин изотопных отношений в образце CO_2 .

При проведении изотопного анализа углерода CO_2 , когда сигналы образца и стандартного газа различаются ($I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}}$), разность изотопных отношений превышает $|\Delta^{13}\text{C}| > 0,2$ уже при сигнале $I(m/z\ 44) = 870$ В (табл. 1.9).

Полученные данные по измерению изотопных отношений углерода образца CO_2 и изменению стандартного отклонения в зависимости от величины сигнала образца в режиме двойного напуска газов показаны на рисунках 1.21 и 1.22. Результаты измерений изотопного состава углерода образца CO_2 в зависимости от величины сигнала в стандартных условиях двойного напуска и при отсутствии напуска гелия показаны на рис. 1.23. Как видно из рис. 1.23, при отсутствии напуска гелия в ионный источник результаты измерения изотопного состава углерода практически не зависят от условий анализа: $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}}$ или $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$, когда $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = -3,64\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$.

Однако из сравнения результатов изотопного анализа углерода CO_2 , представленных в таблицах 1.7 и 1.10, следует, что при условии

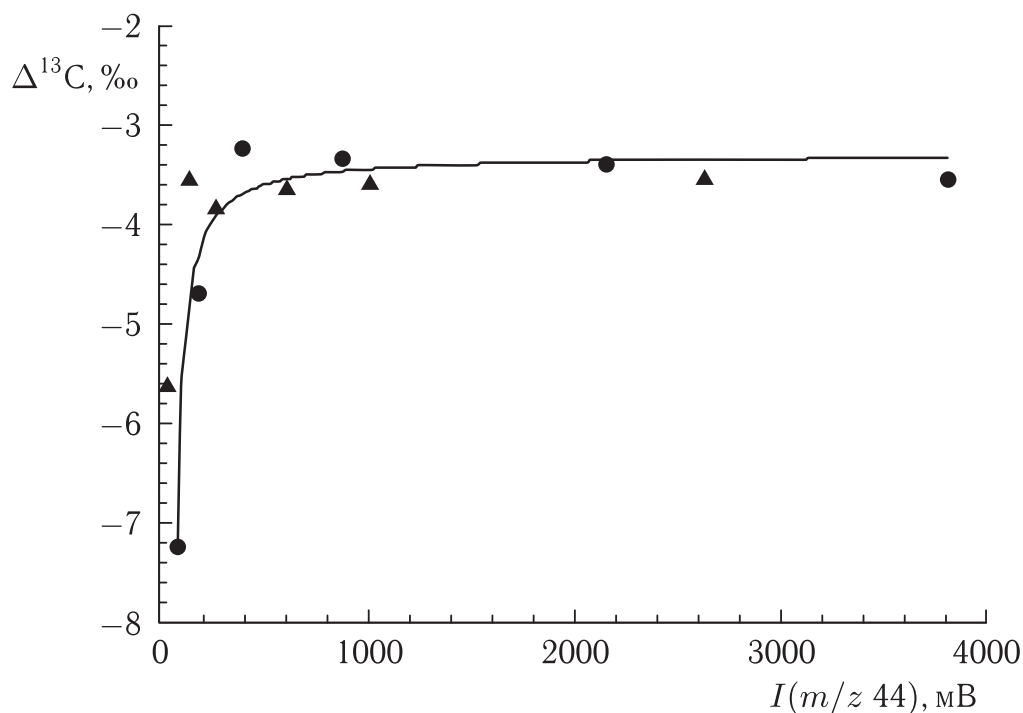


Рис. 1.21. Зависимость результатов измерения изотопного состава углерода CO_2 от величины ионного тока $I(m/z\ 44)$ (при напуске гелия в ионный источник масс-спектрометра, $P = 1,8 \cdot 10^{-6}$ мбар), $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$, $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$ (▲); $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = -3,64\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$, $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}}$ (табл. 1.9) (●)

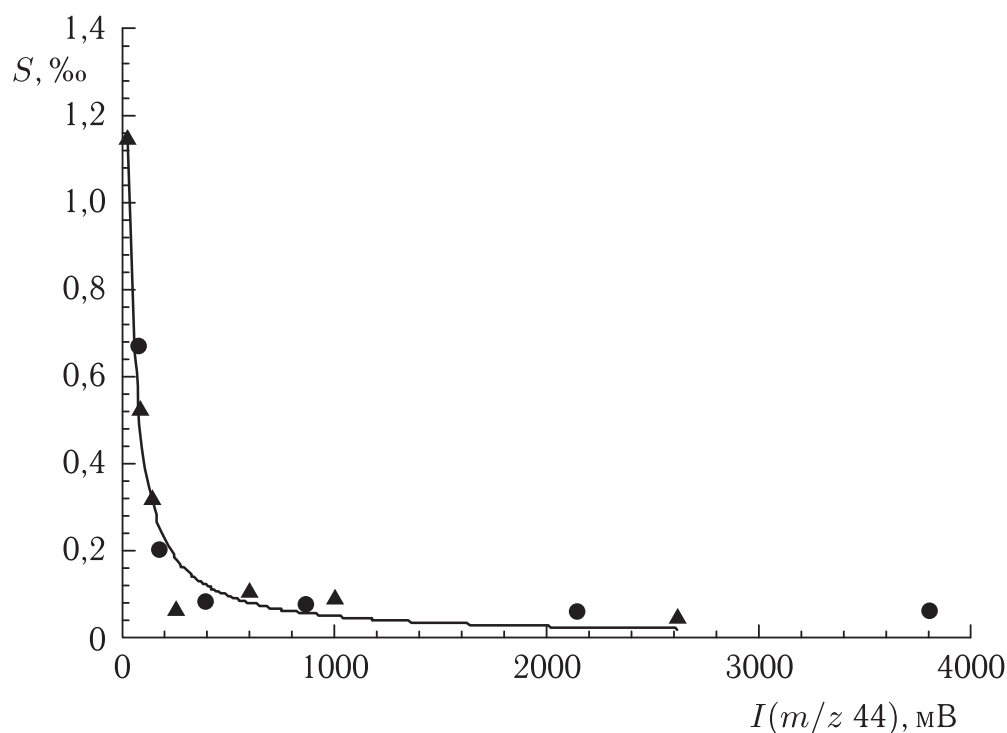


Рис. 1.22. Зависимость стандартного отклонения результатов измерения изотопного состава углерода образца CO_2 от величины ионного тока $I(m/z\ 44)$ (при напуске гелия в ионный источник масс-спектрометра, $P = 1,8 \cdot 10^{-6}$ мбар), $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$, $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$ (▲); $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = -3,64\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$, $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}}$ (табл. 1.9) (●)

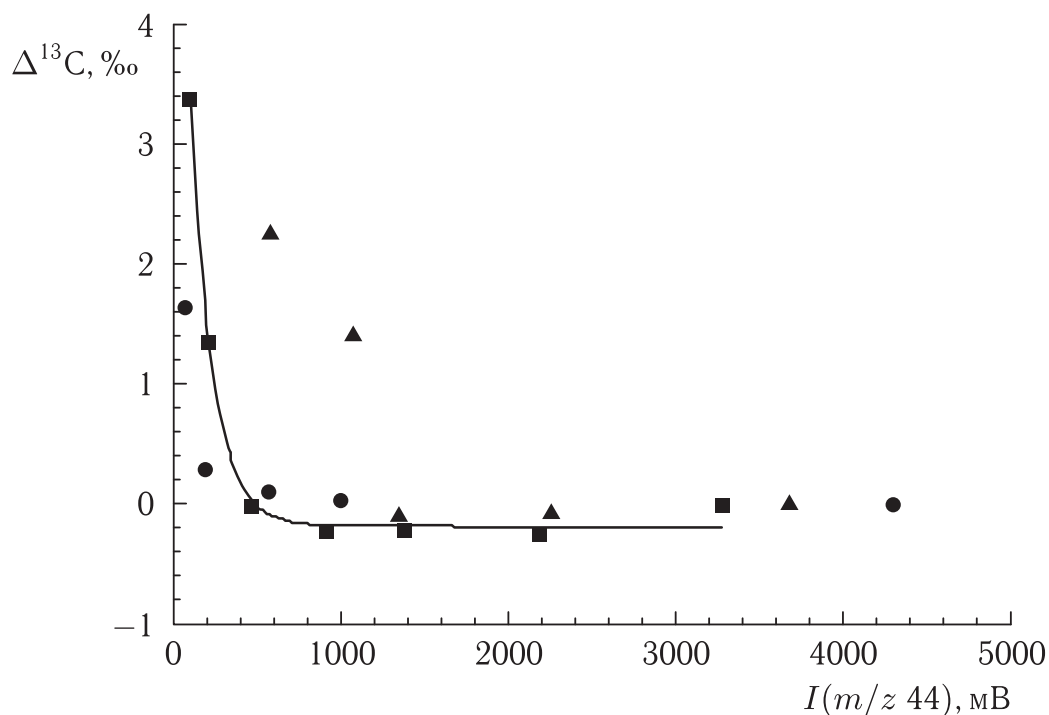


Рис. 1.23. Зависимость результатов измерения изотопного состава углерода CO_2 от величины ионного тока $I(m/z\ 44)$ (без напуска гелия в ионный источник масс-спектрометра), $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$, $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}}$ (▲); $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = -3,64\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$, $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$ (●); $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = -3,64\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$, $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}}$ (табл. 10) (■)

Таблица 1.10

Результаты измерения изотопного состава углерода образца CO_2 в зависимости от величины ионного тока $I(m/z\ 44)$ (без напуска гелия в ионный источник масс-спектрометра), $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}} = 3430$ мВ; $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$

№	Сигнал образца $I(m/z\ 44)$, мВ	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰ ($\delta_1 - \delta_i$)	S, ‰
1	3284	-3,72	0	0,01
2	2189	-3,47	-0,25	0,03
3	1381	-3,52	-0,20	0,04
4	912	-3,50	-0,22	0,07
5	495	-3,71	-0,01	0,08
6	210	-5,07	1,35	0,15
7	95	-7,11	3,38	0,29

$I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}}$ для образца с низкой величиной $\delta^{13}\text{C}_{\text{станд}} = -50,14\text{‰}$ наблюдается более сильная зависимость результатов изотопного анализа от величины аналитического сигнала при отсутствии напуска гелия в ионный источник. Эта зависимость также представлена на рис. 1.23.

По-видимому, присутствие гелия играет роль буфера, уменьшающего число столкновений молекул газа образца с катодом ионного реактора и тем самым уменьшающего количество побочных реакций в ионном источнике масс-спектрометра. При более высокой величине $\delta^{13}\text{C}$ образца зависимость $\Delta^{13}\text{C}$ от амплитуды сигнала уменьшается.

Система элементный анализатор — изотопный масс-спектрометр (EA-IRMS). На рис. 1.24 представлен градуировочный график, построенный по 5 стандартным образцам разного состава (NBS 22 — масло, Oil-V — масло, USGS 24 — графит, IAEA-C-3 — целлюлоза, IAEA-CH-7 — сахароза). Этот градуировочный график представляет собой прямую линию с коэффициентом корреляции, равным 0,999. Таким образом, вне зависимости от материала образца, при полном его сгорании в окислительном реакторе элементного анализатора, при правильной юстировке ионного источника и отсутствии загрязнений изотопного масс-спектрометра систематическая погрешность измерения изотопного состава углерода анализируемого вещества практически отсутствует.

В табл. 1.11 приведены размеры кварцевых капилляров, через которые газы подаются в ионный источник масс-спектрометра. Из табл. 1.11 видно, что образец и стандартный газ подаются в масс-спектрометр через интерфейсы Combustion 3 и ConFlo 3 по капиллярам различного диаметра. В интерфейсе ConFlo 2 используется один капилляр длиной примерно 1 м. Один конец капилляров находится при атмосферном давлении, а другой при давлении $1,8 \cdot 10^{-6}$ мбар. Так как диаметры кварцевых капилляров в интерфейсах Combustion 3 и ConFlo 3 разные, потоки газов, которые проходят через них, также будут существенно различными.

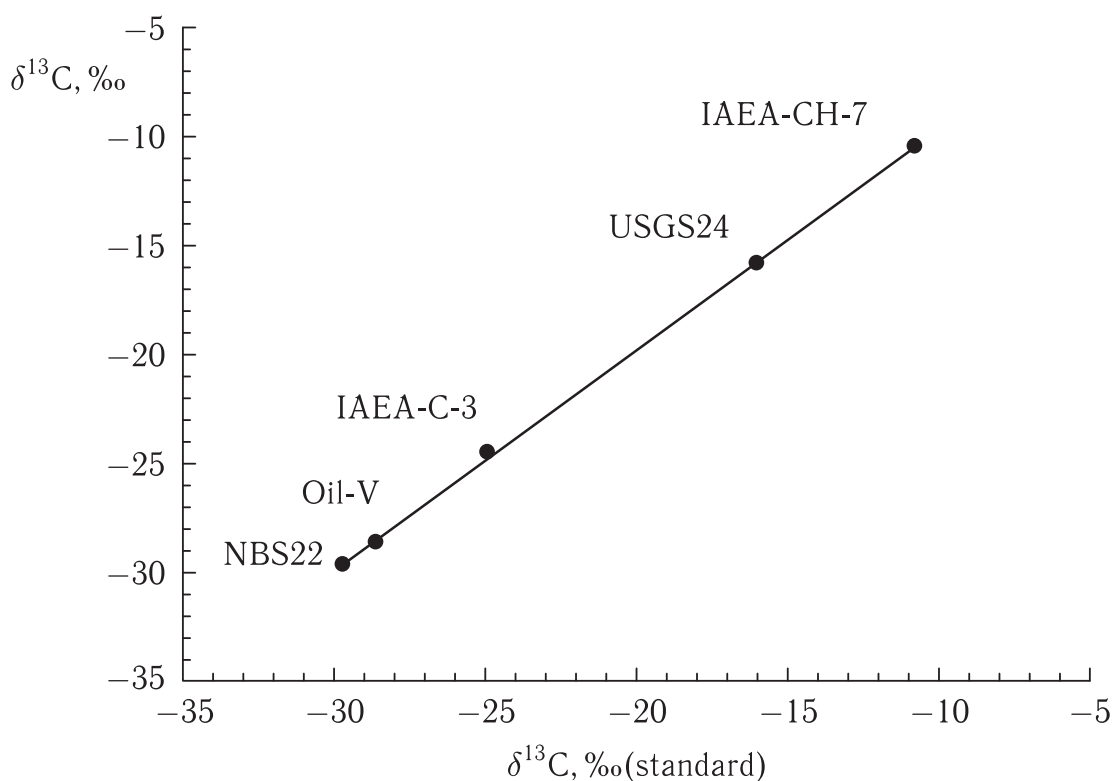


Рис. 1.24. Градуировочный график зависимости измеренного изотопного состава углерода стандартных образцов от истинного значения $\delta^{13}\text{C}(\text{standard})$ при использовании элементного анализатора, соединенного с изотопным масс-спектрометром (EA-IRMS)

Таблица 1.11

Размеры капилляров для подачи стандартного газа и образца в ионный источник изотопного масс-спектрометра

Масс-спектрометр	Интерфейс	Диаметр капилляра, мм
DELTA Plus	Combustion 3	0,05 — стандартный газ 0,10 — образец
DELTA Plus	ConFlo 2	0,10 — образец или стандартный газ
DELTA Plus XP	ConFlo 3	0,05 — стандартный газ 0,10 — образец

В табл. 1.12 приведены результаты сравнения изотопного состава углерода масла oil-V, полученные при различных соотношениях между сигналами образца $I_{\text{обр}}$ и стандартного газа $I_{\text{станд}}$. Как видно из табл. 1.12, результаты измерения изотопного состава масла изменяются при уменьшении сигнала образца. При сигнале, меньшем 653 мВ, начинается расхождение между результатами изотопного анализа $\delta^{13}\text{C}(1)$ и $\delta^{13}\text{C}(2)$, полученными при соотношении между сигналами $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$ и $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}} = 3$ В соответственно. При условии $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}}$ изменение наблюдаемых величин $\delta^{13}\text{C}$ происходит сильнее, чем при равенстве сигналов $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$.

Таблица 1.12

Результаты измерения изотопного состава углерода масла в зависимости от условий анализа методом EA-IRMS: $\delta^{13}\text{C}(1)$ получено при $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$; $\delta^{13}\text{C}(2)$ — при $I_{\text{обр}} \leq I_{\text{станд}} = 3 \text{ В}$

№	Сигнал образца $I(m/z \ 44)$, мВ	$\delta^{13}\text{C}(1)$, ‰	$\delta^{13}\text{C}(2)$, ‰	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰
1	3031	−28,46	−28,46	0
2	2426	−28,05	−28,05	0
3	2438	−27,92	−27,92	0
4	1138	−27,16	−27,16	0
5	724	−28,53	−28,53	0
6	653	−27,42	−26,68	0,74
7	521	−29,43	−29,63	−0,20
8	227	−25,82	−24,22	1,60
9	115	−18,49	−17,98	0,51

$$\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}(2) - \delta^{13}\text{C}(1).$$

Таким образом, при проведении изотопного анализа необходимо стремиться к тому, чтобы сигнал стандартного газа был примерно равен сигналу образца. Полного равенства сигналов достичь невозможно, так как технически трудно отобрать навеску образца необходимой массы с точностью до 1 мкг.

В следующей табл. 1.13 показана необходимость корректного выбора границ аналитического пика, так как от выбранной ширины пика (у основания) зависит правильное определение изотопного состава. При расширении границ определяемого пика результаты измерения изотопного состава стремятся к величине, соответствующей заданному изотопному отношению. Следовательно, корректное определение границ пика является необходимой процедурой при математической обработке близко стоящих пиков. Частичное наложение пиков приводит к неправильному определению границ пика и, следовательно, к неверному определению изотопного состава, что будет показано ниже.

Таблица 1.13

Зависимость результатов измерения изотопного состава углерода масла от ширины области обработки пика (при стандартных условиях математической обработки спектра: ширина пика — 80 с, $\delta^{13}\text{C} = -30,0\text{‰}$)

Ширина пика, с	11	16	27	47	90	130	154	163
$\Delta^{13}\text{C}$, ‰	−30,7	−31,5	−32,0	−30,5	−29,7	−29,9	−30,0	−30,0

В табл. 1.14 показано, что результаты измерений изотопного состава масла изменяются с увеличением фона CO_2 , над которым расположен

Таблица 1.14

Зависимость результатов измерения изотопного состава углерода масла от величины $I(m/z\ 44)$ фона CO_2 под аналитическим пиком

Фон $I(m/z\ 44)$, мВ	11	181	547	1189	3300	5900
$\delta^{13}\text{C}$, ‰	−28,12	−28,25	−28,58	−28,72	−29,17	−29,99
$\Delta^{13}\text{C}$, ‰	0	0,13	0,46	0,60	1,05	1,87

$\Delta = \delta_1 - \delta_i$ — разность изотопных соотношений между первым и последующими определениями.

пик CO_2 , образованный при сгорании масла. По нашему мнению, этот эффект обусловлен наличием паров воды в составе газа CO_2 , из которого формируется фон под аналитическим пиком. На рис. 1.25 представлен график зависимости величины сигнала паров воды $I(m/z\ 18)$ (детектор 3) от величины сигнала $I(m/z\ 44)$, образованного при напуске стандартного газа CO_2 через ConFlo 3 в ионный источник масс-спектрометра. Этот график представляет собой прямую линию. С увеличением потока напуска стандартного газа растет величина сигнала $I(m/z\ 44)$ и сигнала $I(m/z\ 18)$, т. е. увеличивается парциальное давление паров воды в ионном источнике масс-спектрометра.

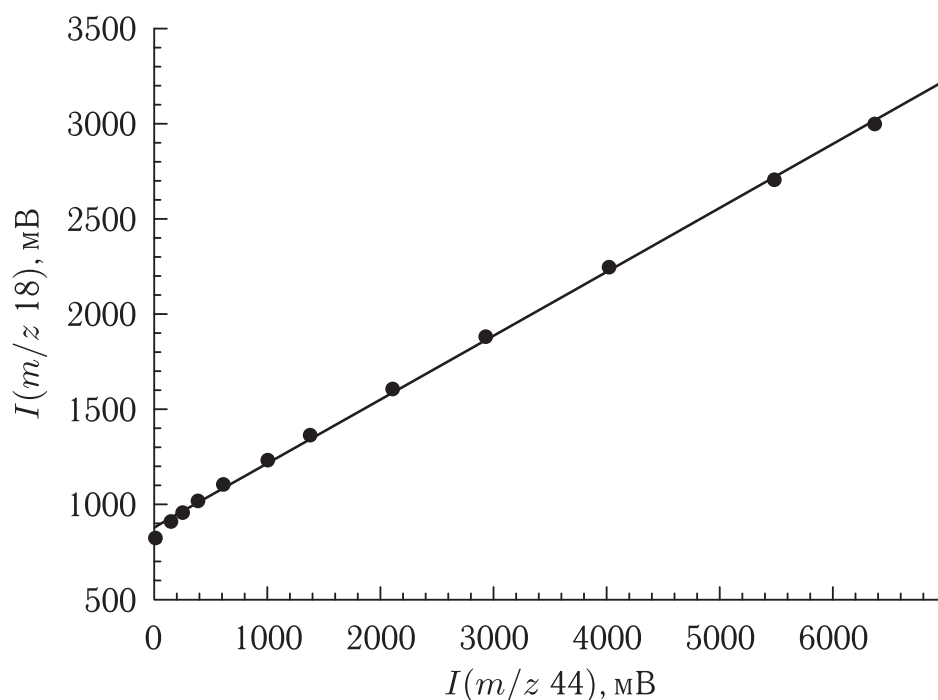


Рис. 1.25. График зависимости величины сигнала паров воды $I(m/z\ 18)$ (детектор 3) от величины сигнала $I(m/z\ 44)$, образованного при напуске стандартного газа CO_2 через ConFlo 3 в ионный источник масс-спектрометра

На рисунках 1.26 и 1.27 показано изменение результатов измерений изотопного состава углерода образца байкальского ила БИЛ-1 и кислорода образца кодеина в зависимости от величины сигнала $I(m/z\ 44)$ и $I(m/z\ 28)$ соответственно.

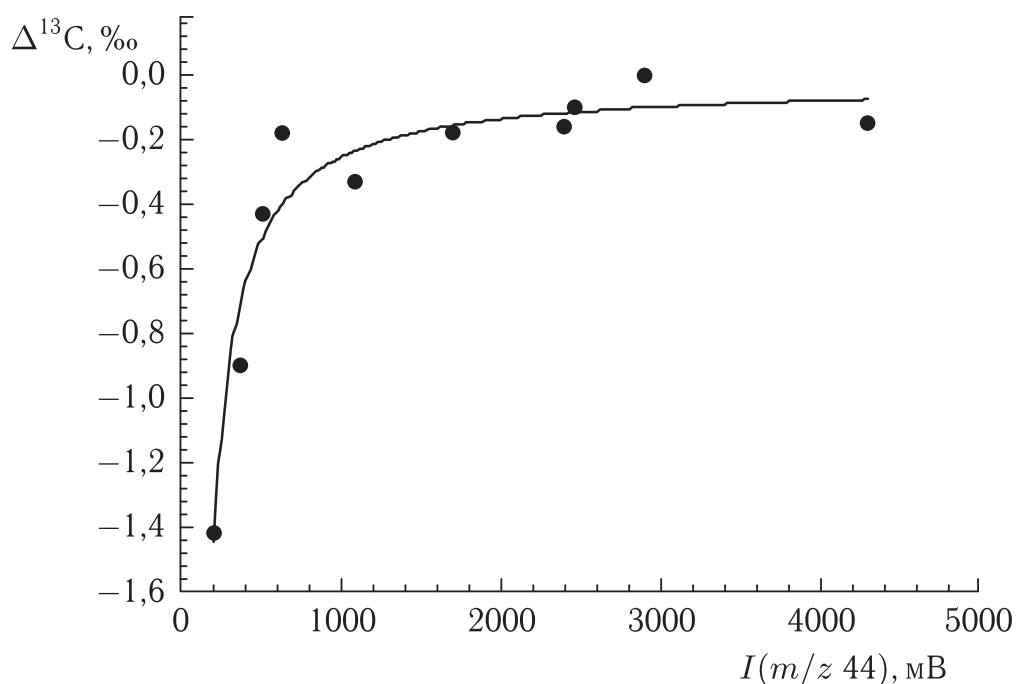


Рис. 1.26. Зависимость результатов измерения изотопного состава углерода ($\delta^{13}\text{C} = -27,42\text{‰}$) стандартного образца байкальского ила БИЛ-1 от величины сигнала $I(m/z 44)$

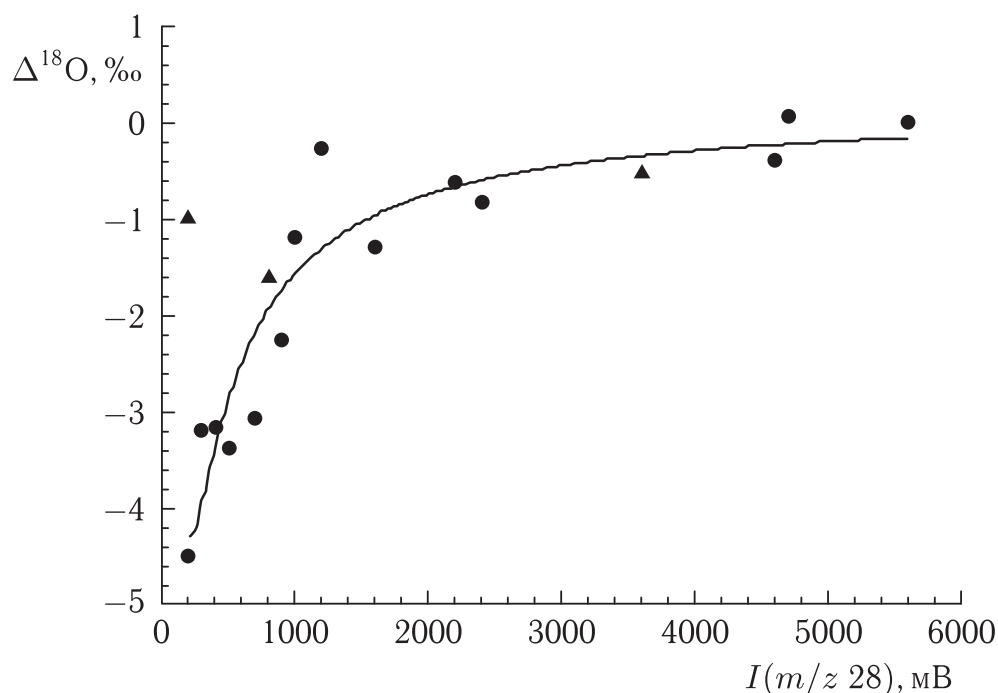


Рис. 1.27. Зависимость результатов измерений изотопного состава кислорода образца кодеина ($\delta^{18}\text{O} = 24,108\text{‰}$) от величины сигнала $I(m/z 28)$: ● — $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$; ▲ — $I_{\text{обр}} < I_{\text{станд}}$

Как видно из рис. 1.26, результаты измерений изотопного состава углерода начинают существенно изменяться ($\Delta^{13}\text{C} = 0,2\text{‰}$) при величине сигнала меньше 1000–1500 мВ, а результаты измерений изотопного состава кислорода (рис. 1.27) — при величине сигнала меньше 2000 мВ.

Изотопный состав кислорода определяли при разложении органического вещества с помощью пиролизатора ТС/ЕА при температуре 1450 °С, а изотопный состав углерода — при сжигании с помощью элементного анализатора ЕА. Таким образом, область аналитических сигналов $\Delta I = 0 - I_{\Delta}$ (I_{Δ} — граница линейности), в которой происходит значительное изменение изотопного состава легких элементов $\Delta^{13}\text{C}$, зависит от условий проведения анализа и от определяемого элемента.

Система газовый хроматограф — изотопный масс-спектрометр (GC-C-IRMS). Результаты определения изотопного состава углерода углеводородных газов и CO_2 при использовании масс-спектрометра DELTA Plus и интерфейса Combustion 3 показали, что изотопный состав углерода остается постоянной величиной в диапазоне изменения аналитического сигнала $I(m/z\ 44)$ от 0,5 до 9 В. При большей величине сигнала $I(m\ 44)$ происходит искажение изотопного состава углерода, усилитель переходит в область насыщения. Максимальный допустимый сигнал составляет 13 В. При меньшей величине сигнала $I(m/z\ 44)$ на результаты изотопного анализа начинают влиять процессы, происходящие в ионном источнике. Кроме того, было показано, что при небольшом делении газового потока (1 : 4) и использовании шприца с малым объемом (10 мкл, ILS, Германия, внутренний диаметр иглы 0,13 мм) изотопный состав углерода всех анализируемых газов плохо воспроизводится и может быть изменен на величину 3 ‰. Возможным объяснением этого явления является фракционирование изотопов в тонкой игле шприца и фракционирование при небольшом делении газового потока.

Изучение изотопных эффектов в режиме ON-OFF. Как было сказано ранее, режим ON-OFF представляет собой режим многократного импульсного напуска стандартного газа через интерфейс в ионный источник масс-спектрометра в течение некоторого времени, обычно составляющего 20 с (см. рис. 1.16).

При проведении режима ON-OFF-1 изучалось влияние напуска других газов на результаты измерений изотопного состава стандартного газа, пики которого формируются при совместном напуске стандартного и постороннего (примесного) газов. Результаты этих исследований приведены в табл. 1.15.

Как видно из табл. 1.15, влияние азота на результаты измерений изотопного состава углерода $\delta^{13}\text{C}$ незначительно. Интенсивности пиков $I(m/z\ 44)$, $I(m/z\ 45)$ и $I(m/z\ 46)$ уменьшились в результате рассеяния ионов на молекулах азота. Влияние CO_2 на результаты измерения изотопного состава азота $\delta^{15}\text{N}$ более значительно и может достигать 30–60 ‰. Интенсивности пиков $I(m/z\ 28)$, $I(m/z\ 29)$ немного увеличились. Возможно, это связано с образованием в ионном источнике ионов CO^+ по реакции



В результате этого цилиндры Фарадея одновременно регистрируют два различных иона с одинаковой массой, CO^+ и N_2^+ .

Таблица 1.15
Влияние напуска примесных газов в режиме ON-OFF-1 на результаты изотопных измерений

Основной газ N ₂		Примесн. газ CO ₂	$\Delta^{15}\text{N}$, ‰	Основной газ CO ₂			Примесн. газ N ₂	$\Delta^{13}\text{C}$, ‰
$I(m/z28)$, В	$I(m/z29)$, В	$I(m/z44)$, В		$I(m/z44)$, В	$I(m/z45)$, В	$I(m/z46)$, В	$I(m/z28)$, В	
3,6	2,7	0	—	2,99	3,44	4,19	0	—
3,8	2,9	3,0	30–60	2,92	3,36	4,08	3,6	0,13

На рис. 1.28 показан пик стандартного газа в форме прямоугольника, расположенный на ниспадающем фоне предыдущего большего пика. Начало переднего фронта стандартного пика оказалось приподнятым на 800 мВ по отношению к заднему фронту. В результате этого был некорректно определен фон под стандартным пиком и было получено неправильное изотопное отношение углерода $\delta^{13}\text{C} = -49,19\text{‰}$ вместо известной величины $-49,88\text{‰}$.

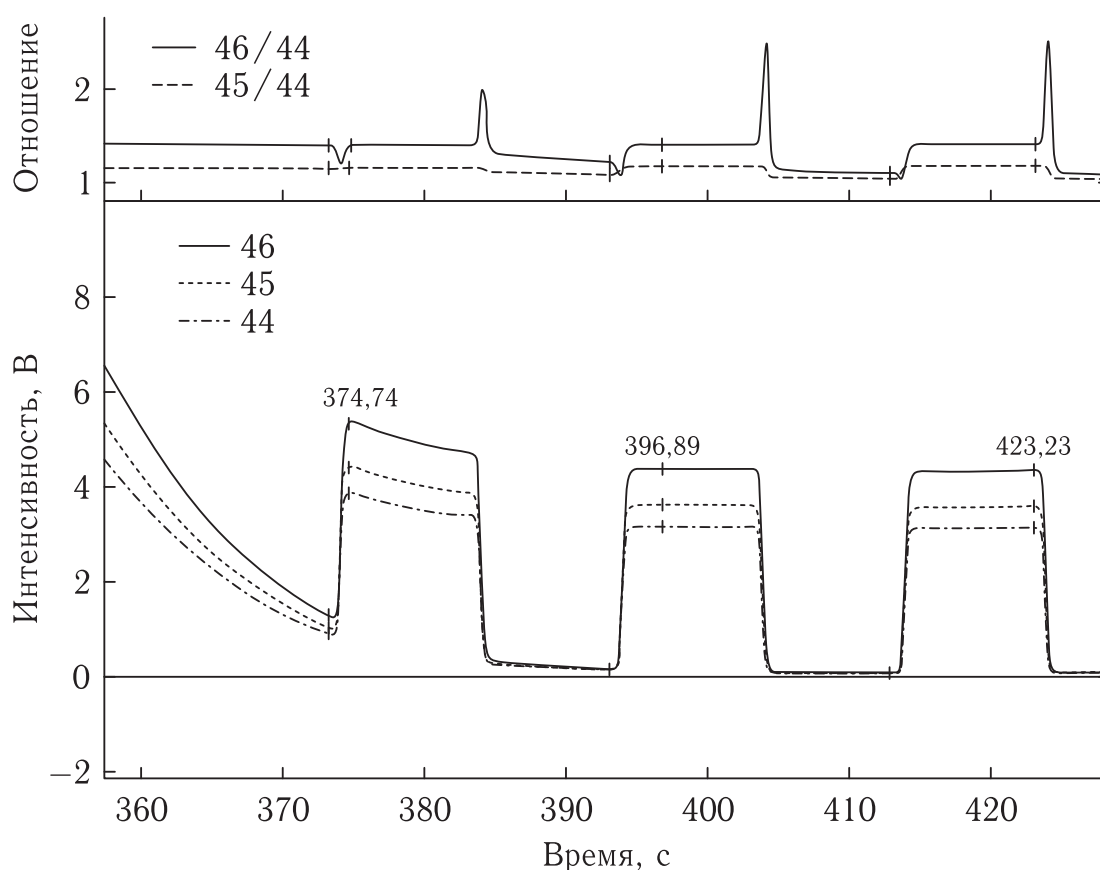


Рис. 1.28. Хроматограмма, зарегистрированная по ионному току с m/z 44, 45, 46, в режиме EA-IRMS

Таким образом, для правильного определения изотопного отношения пика необходимо иметь достаточно ровный фон под аналитическим пиком. Кроме того, на результаты измерений изотопного отношения

влияет место определения фона, с учетом которого рассчитывается площадь аналитического пика, как это показано на рис. 1.29 (масло, $\delta^{13}\text{C} = -28,6\text{‰}$). В данном случае правильно определить фон из-за его сложной формы не удалось. В прикладной программе заложено, что площадь фоновых сигнала под пиком равняется площади прямоугольника, одна сторона которого равняется ширине пика, а другая величине фона, определенного на ровном участке спектра перед (или после) аналитическим пиком [30, 31].

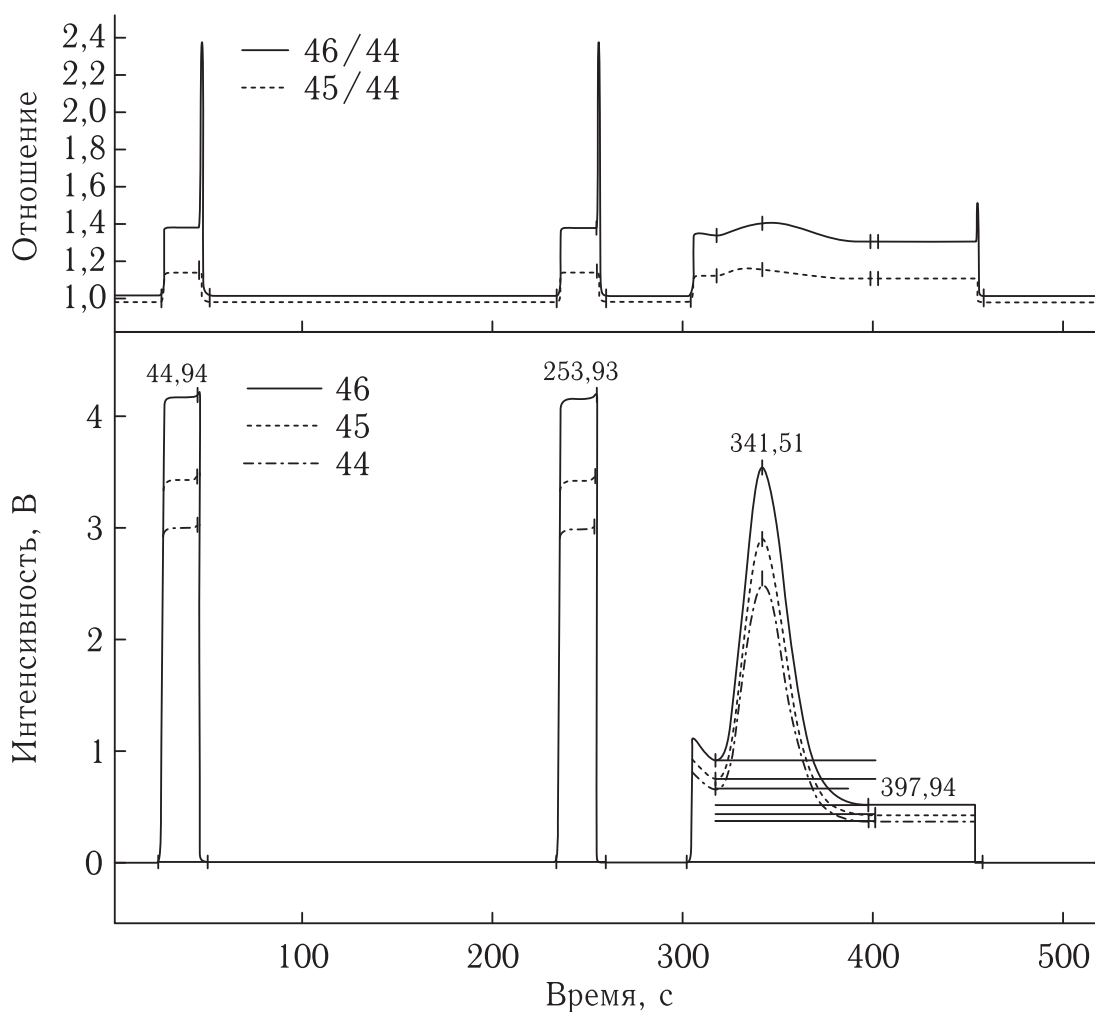


Рис. 1.29. Хроматограмма масла, зарегистрированная по ионному току с m/z 44, 45, 46, в режиме EA-IRMS

Если для расчета использовать ровный фон после второго пика от стандартного газа CO_2 , тогда получается $\delta^{13}\text{C} = -36,23\text{‰}$. Если для расчета использовать значение фона непосредственно перед аналитическим пиком, тогда будет $\delta^{13}\text{C} = -82,50\text{‰}$. А если использовать значение фона непосредственно после аналитического пика, тогда будет $\delta^{13}\text{C} = -29,27\text{‰}$.

Таким образом, получить правильное изотопное отношение $\delta^{13}\text{C}$ для масла не удалось из-за сложного фона под аналитическим пиком.

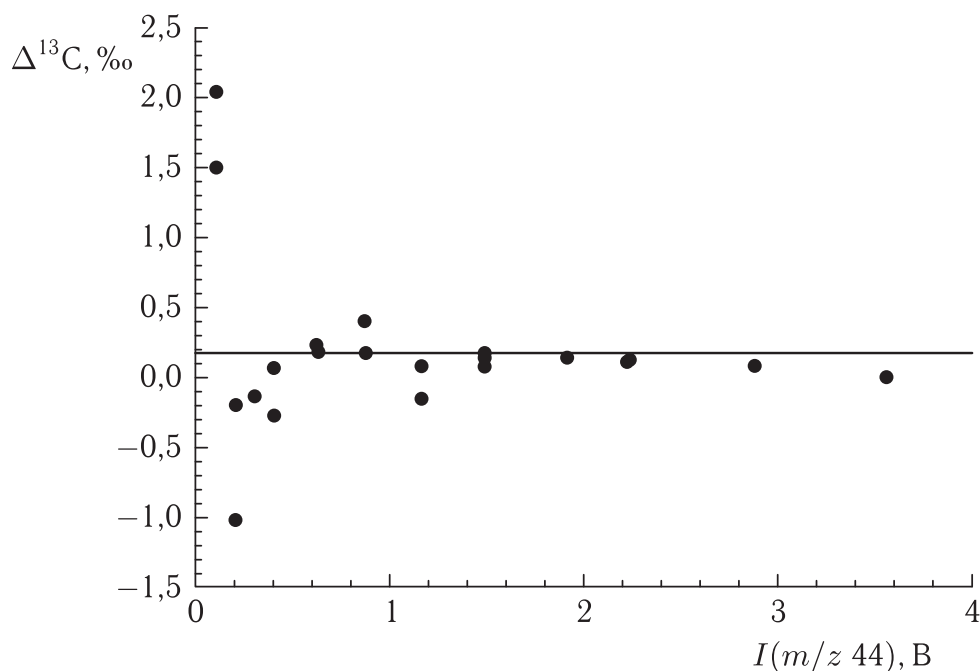


Рис. 1.30. Зависимость результатов измерений изотопного состава углерода стандартного газа CO_2 ($\delta^{13}C = -50,26 ‰$) от величины аналитического сигнала (газ CO_2 напускается в ионный источник масс-спектрометра через интерфейс Combustion 3)

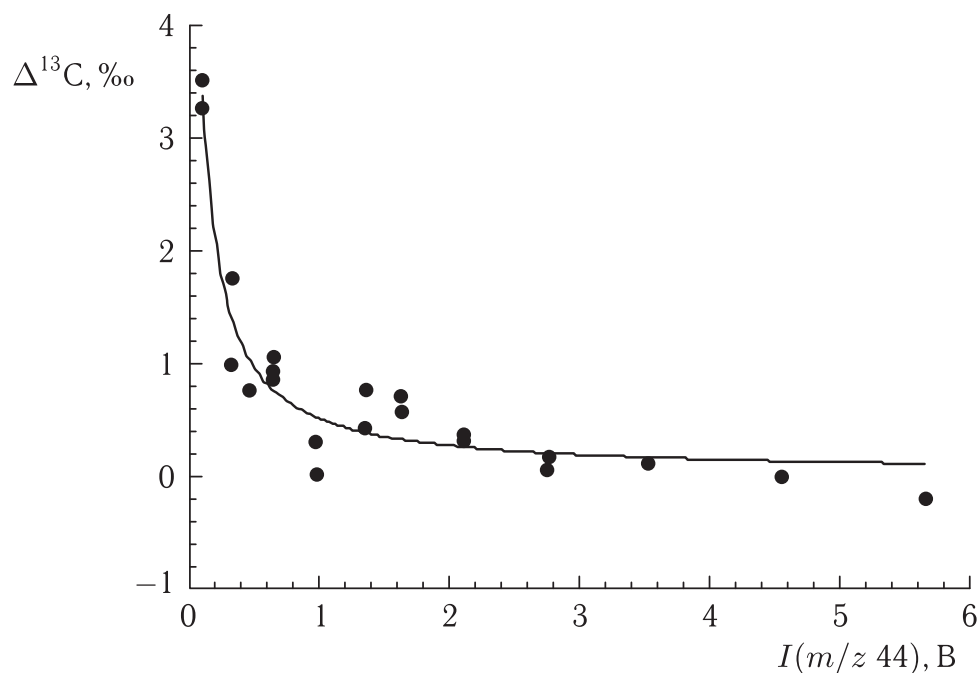
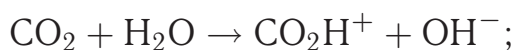


Рис. 1.31. Зависимость результатов измерений изотопного состава углерода стандартного газа CO_2 ($\delta^{13}C = -50,26 ‰$) от величины аналитического сигнала (газ CO_2 напускается в ионный источник масс-спектрометра через интерфейс ConFlo 2)

1. Изотопный масс-спектрометр DELTA Plus. Режим работы: GC-C-IRMS и EA-IRMS. На рисунках 1.30 и 1.31 показано изменение результатов измерений изотопного состава углерода стандартного газа CO_2 ($\delta^{13}C = -50,26 ‰$) в зависимости от величины аналитического сигнала.

В режиме GC-C-IRMS, когда стандартный газ CO_2 подается через интерфейс Combustion 3, изменение измеренного изотопного состава углерода, равное $\Delta^{13}\text{C} = 0,2\text{‰}$, достигается при сигнале $I(m/z\ 44) = 400\text{--}600$ мВ. В то же время при использовании режима EA-IRMS и подачи стандартного газа CO_2 через интерфейс ConFlo 2 величина $\Delta^{13}\text{C} = 0,2\text{‰}$ достигается при сигнале $I(m/z\ 44) = 1400\text{--}1800$ мВ. Столь существенные различия в величинах сигналов связаны с различной конструкцией интерфейсов (табл. 1.11) и, соответственно, с существенно различным фоном воды в ионном источнике масс-спектрометра при подключении этих интерфейсов и дополнительного оборудования для пробоподготовки.

2. Изотопный масс-спектрометр DELTA Plus XP. Режим работы: TC/EA-IRMS. На рисунках 1.32–1.35 показаны изменения результатов измерения изотопного отношения углерода, азота и кислорода стандартных газов в зависимости от величины сигнала аналитического пика $I(m/z\ 44)$, $I(m/z\ 28)$ соответственно. Из этих рисунков видно, что изменение результатов измерений изотопного отношения, равное $\Delta^{13}\text{C} = \Delta^{15}\text{N} = \Delta^{18}\text{O} = 0,2\text{‰}$, достигается при величине сигнала меньше, чем 1–1,2 В для углерода, 0,6 В для азота и 1,2 В для кислорода. Также видно, что при уменьшении величины сигнала происходит изменение результатов измерений, соответствующее возрастанию величины изотопного отношения углерода, кислорода и уменьшению этой величины для азота. Такое изменение сигналов можно объяснить наличием паров воды в ионном источнике масс-спектрометра, приводящих к протеканию ионно-молекулярных реакций на поверхности катода и вблизи него [23, 29, 30]:



Так как в чистом азоте следы паров воды практически отсутствуют, на поверхности катода возможны и другие ионно-молекулярные реакции, приводящие к изменению результатов измерений изотопных отношений.

На рисунках 1.36 и 1.37 показано, что изменение тока эмиссии электронов $I_{\text{эмиссии}}$ в ионном источнике приводит к расширению области, в которой результаты измерений изотопного состава углерода CO_2 начинают зависеть от величины аналитического сигнала $I(m/z\ 44)$. При токе эмиссии $I_{\text{эмиссии}} = 1,5$ мА $\Delta^{13}\text{C}$ превышает величину $0,1\text{‰}$ при значении $I(m/z\ 44) < 1$ В, а при токе эмиссии электронов $I_{\text{эмиссии}} = 1,0$ мА превышает эту величину $\Delta^{13}\text{C}$ уже при значении сигнала $I(m/z\ 44) < 2,4$ В. Аналогичные изменения результатов измерений изотопного состава углерода могут наблюдаться также при загрязнении элементов ионной оптики масс-спектрометра или при изменении их потенциалов.

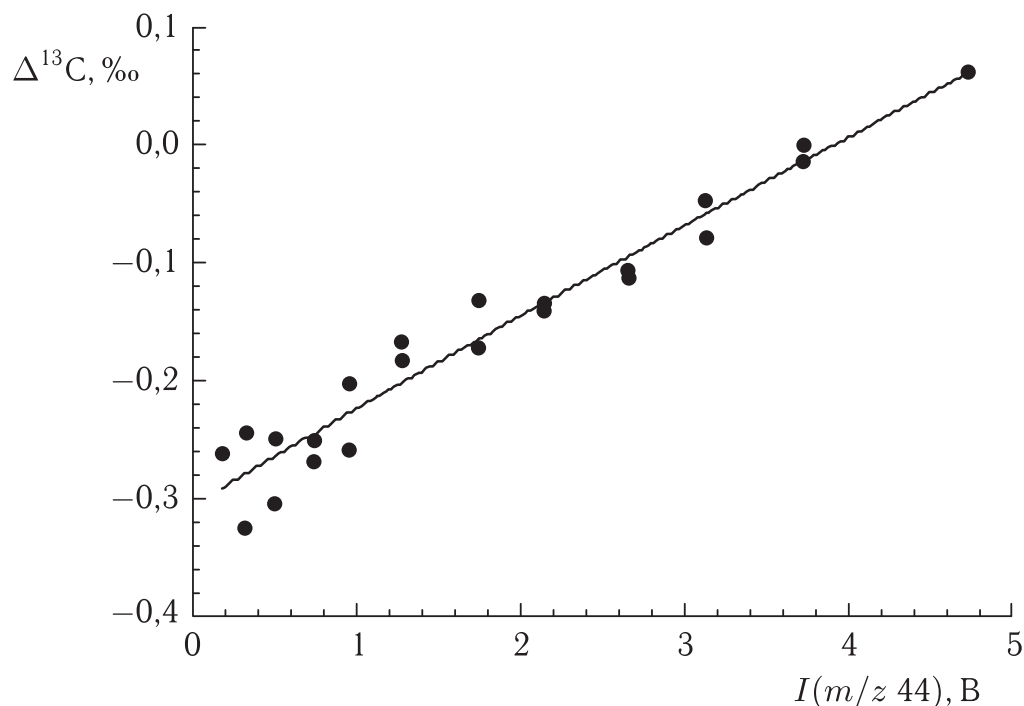


Рис. 1.32. Зависимость результатов измерений изотопного отношения углерода стандартного газа CO_2 от величины аналитического сигнала $I(m/z\ 44)$; интерфейс ConFlo 3, амплитуда сигналов переменна

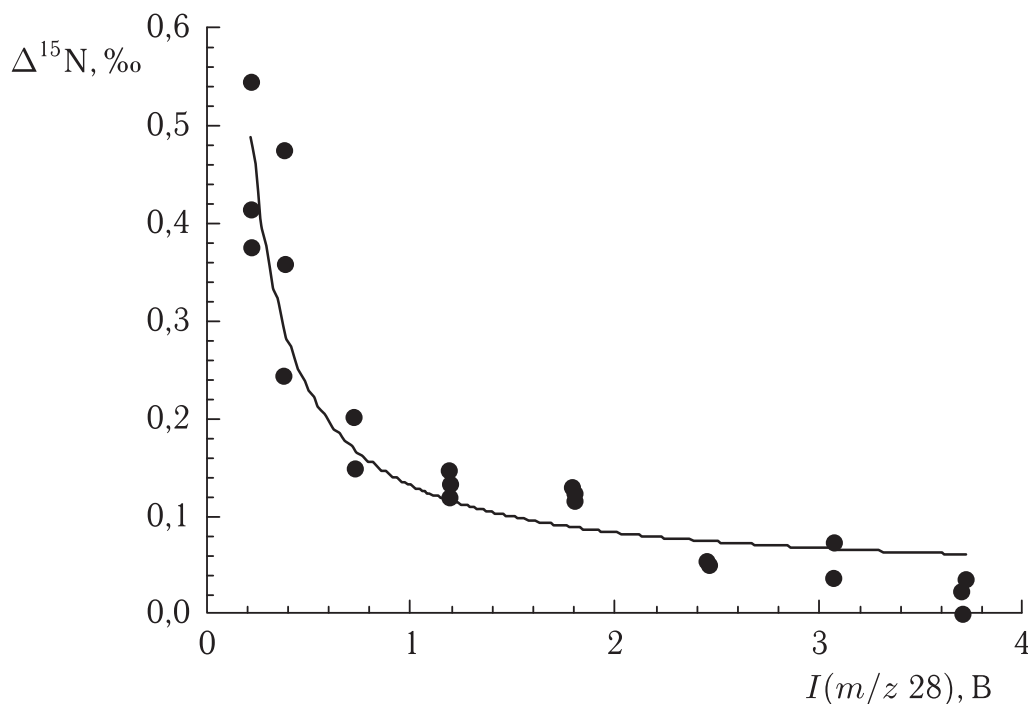


Рис. 1.33. Зависимость результатов измерений изотопного отношения азота стандартного газа N_2 от величины аналитического сигнала $I(m/z\ 28)$; интерфейс ConFlo 3, амплитуда сигналов переменна

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1.16. Из табл. 1.16 видно, что в режиме двойного напуска (прибор DELTA Plus) дополнительная подача гелия через интерфейс Combustion 3 приводит к расширению области сигналов $\Delta I = (0 - I_\Delta)$ В, соответствующую

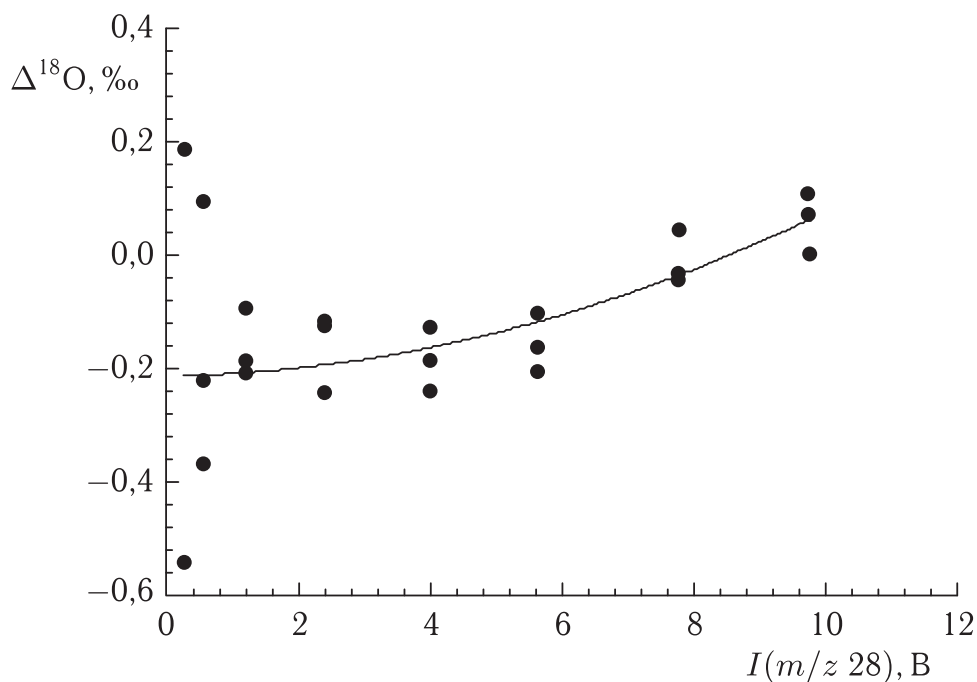


Рис. 1.34. Зависимость результатов измерений изотопного отношения кислорода стандартного газа CO от величины аналитического сигнала $I(m/z 44)$, интерфейс ConFlo 3, амплитуда сигналов переменна

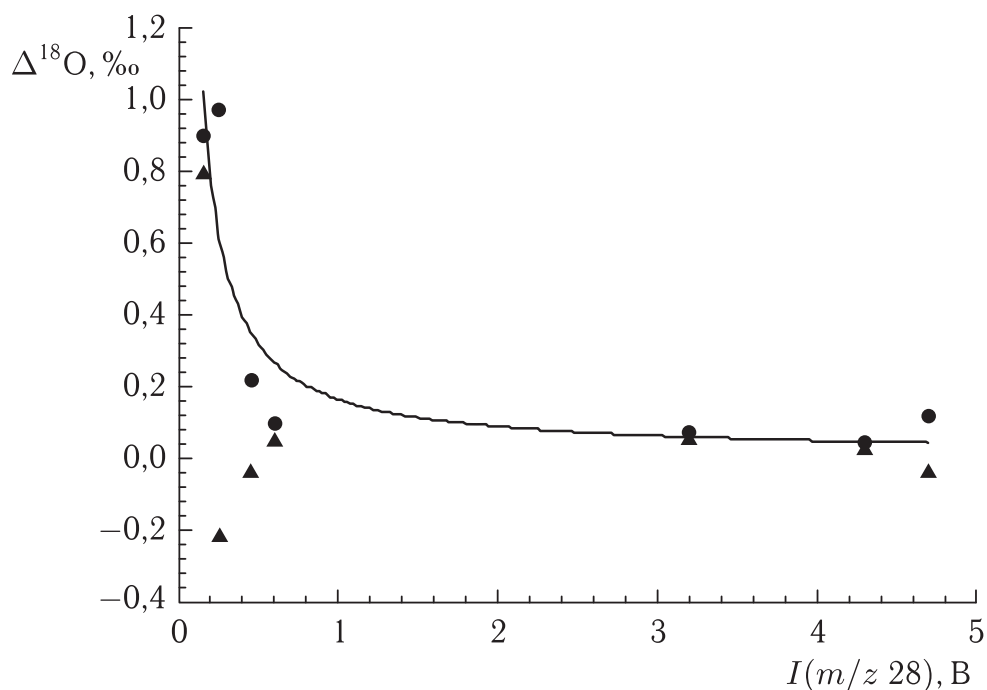


Рис. 1.35. Зависимость результатов измерений изотопного отношения кислорода стандартного газа CO от величины аналитического сигнала $I(m/z 44)$, интерфейс ConFlo 3, амплитуда сигналов постоянна: ● — результаты измерения изотопного состава кислорода, ▲ — стандартное отклонение

щему изменению изотопного состава стандартного газа на $0,2\text{‰}$ и более. При изотопном анализе в режиме EA-IRMS, при котором поток гелия через ЕА значительно больше, область ΔI становится еще шире 1400–1800 мВ. Аналогичная ситуация имеет место и для прибора

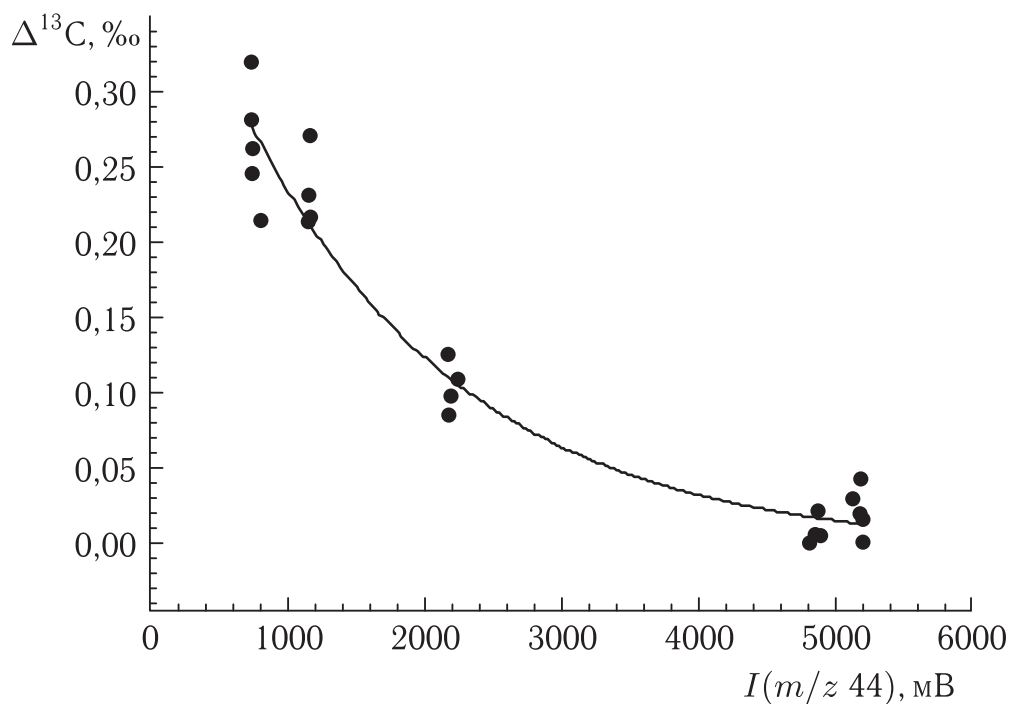


Рис. 1.36. Зависимость результатов измерений изотопного состава углерода CO_2 от величины аналитического сигнала $I(m/z\ 44)$ при токе эмиссии $I_{\text{эмиссии}} = 1,0\ \text{мА}$

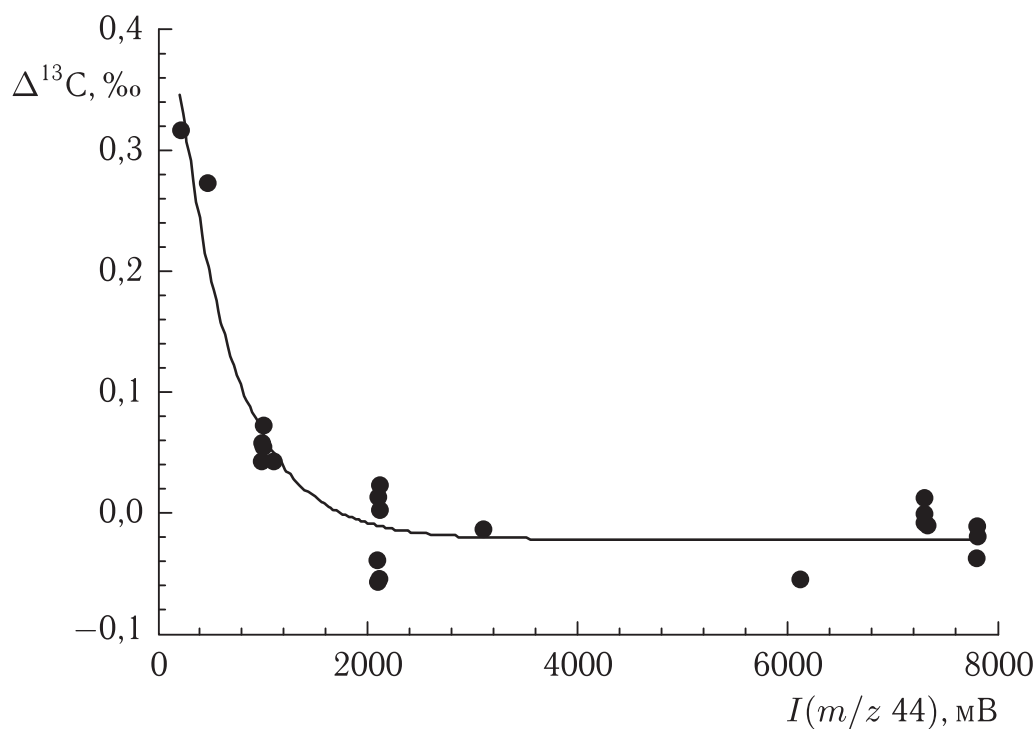


Рис. 1.37. Зависимость результатов измерения изотопного состава углерода CO_2 от величины аналитического сигнала $I(m/z\ 44)$ при токе эмиссии $I_{\text{эмиссии}} = 1,5\ \text{мА}$

DELTA Plus XR. Сравнение с результатами измерений при напуске стандартного газа N_2 , при котором область ΔI значительно уже, показывает величину 600 мВ. При этом в газе практически отсутствуют

Таблица 1.16

Влияние величины аналитического сигнала I на изменение результатов измерения изотопного состава газов Δ при различных режимах ввода газовой пробы в ионный источник масс-спектрометра и методах пробоподготовки

Масс-спектрометр	Конфигурация прибора, режим работы	Δ , ‰	I_{Δ} , мВ
DELTA Plus	Двойной напуск, $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} \neq \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}}$, $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$	^{13}C : 0,2	220
	Двойной напуск, $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}}$, $I_{\text{обр}} = I_{\text{станд}}$, напуск He	^{13}C : 0,2	270
	Двойной напуск, $\delta^{13}\text{C}_{\text{обр}} \neq \delta^{13}\text{C}_{\text{станд}}$, $I_{\text{обр}} \neq I_{\text{станд}}$, напуск He	^{13}C : 0,2	390–870
	EA-IRMS, масло	^{13}C : 0,2	1000–2000
	GC-C-IRMS, ON-OFF	^{13}C : 0,2	400–600
	EA-IRMS, ON-OFF	^{13}C : 0,3-0,5	1400–1800
DELTA Plus XP	EA-IRMS, байкальский ил БИЛ-1	^{13}C : 0,2	1000–1500
	TC/EA-IRMS, кодеин	^{18}O : 1,0	2000
	TC/EA, ON-OFF	^{13}C : 0,2	1000–1200
	TC/EA, ON-OFF	^{18}O : 0,2	1200
	TC/EA, ON-OFF	^{15}N : 0,2	600

пары воды. Это доказывает сильное влияние паров воды на ширину области ΔI .

Изучение полноты сгорания трудноокисляемых соединений

Процесс окисления различных органических соединений в элементном анализаторе осуществляется в атмосфере инертного газа и некоторого количества кислорода [32]. Ограниченное содержание кислорода в зоне сжигания образца компенсируют применением катализаторов, выделяющих кислород при нагревании. Однако при сжигании трудноокисляемых полициклических, ароматических и гетероциклических соединений могут возникнуть трудности, связанные с полнотой их окисления [33]. От полноты сжигания пробы зависит правильность определения изотопного состава легких элементов [31].

С целью выбора наилучших условий окисления этих соединений была испытана серия известных катализаторов, приведенных в табл. 1.17. В качестве образца сжигания была выбрана асфальтеновая фракция нефти, содержащая полиароматические соединения.

Принцип работы элементного анализатора EA 1110 (CE Instruments) показан на рис. 1.38. Пробу органического соединения, упакованную в оловянную капсулу, подвергают окислительному разложению в реакторе. Образовавшиеся газообразные продукты разложения оконча-

Таблица 1.17
Результаты определения изотопного состава углерода образцов асфальтенов с дополнительными окислителями

Образцы асфальтенов с дополнительной навеской окислителей		$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$	Стандартное отклонение, ‰	Число анализов
Без добавления окислителя; истощенный реактор		-29,03	0,35	3
Без добавления окислителя; новый реактор		-28,48	0,24	8
Истощенный реактор с добавленным окислителем	CeO ₂	-28,72	0,19	9
	Cr ₂ O ₃	-28,55	0,12	5
	Co ₃ O ₄	-28,39	0,26	3
	CuO	-28,31	0,26	3

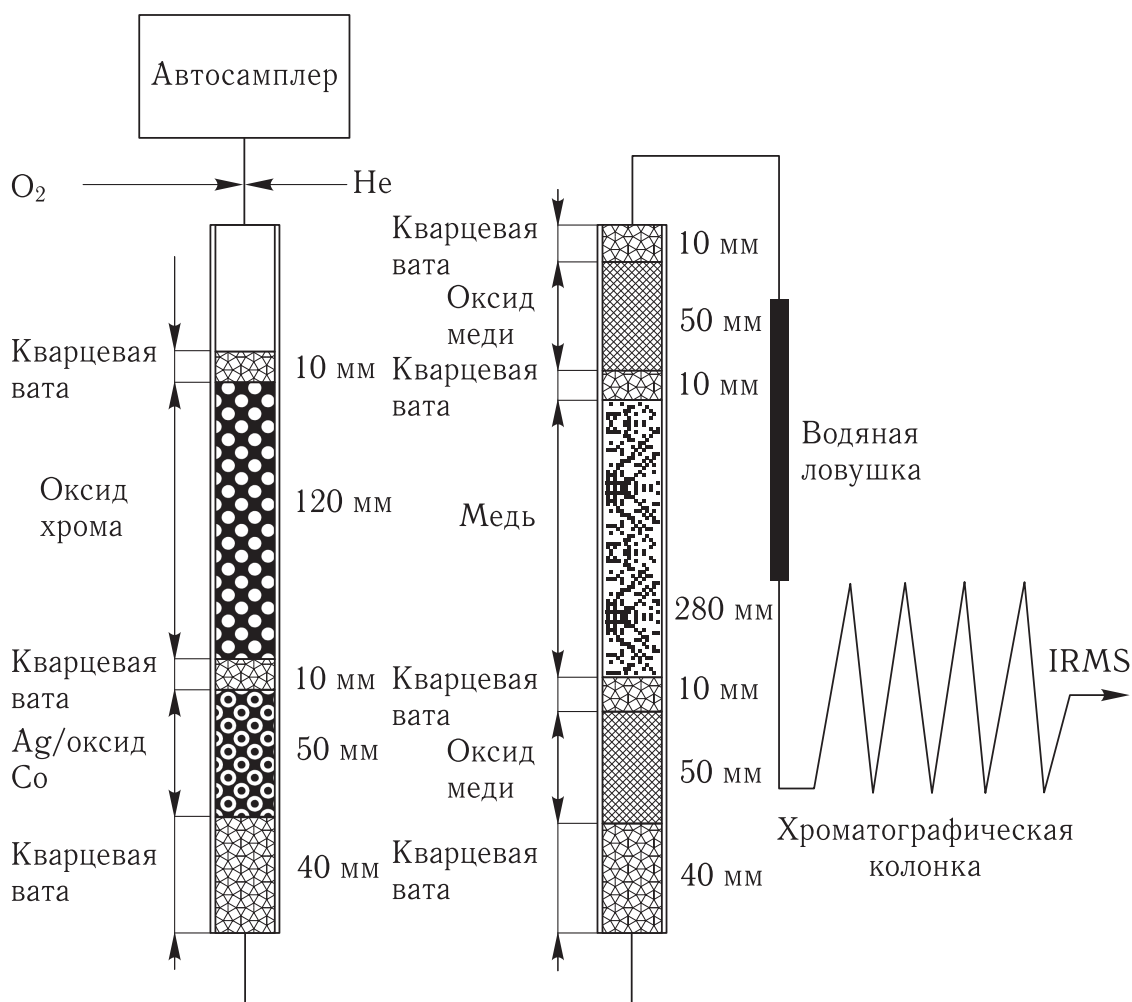


Рис. 1.38. Схема работы элементного анализатора и заполнение катализаторами окислительного и восстановительного реакторов

тельно окисляются в зоне доокисления, в которой находятся различные катализаторы: Cr₂O₃, посеребренный Co₃O₄, CuO. В случае неполного окислительного разложения сложных полициклических органических

веществ в оловянный контейнер добавляют энергичные окислители, легко отдающие кислород, и катализаторы. Затем газообразные продукты в потоке гелия (100 мл/мин) проходят через восстановительную зону, нагретую до температуры 650 °С. В этой зоне поглощается избыток кислорода, введенного в реактор, и происходит восстановление оксидов азота до молекулярного азота. Температура окислительной зоны составляет 1020 °С.

Навеска асфальтенов была достаточной для получения аналитического сигнала, большего 1 В, и составляла 0,2 мг. Оксидные катализаторы — чистые реактивы CeO_2 фирмы Aldrich, CuO , Cr_2O_3 , Co_3O_4 фирмы «Thermo Fisher Scientific» упаковывали вместе с образцом в оловянный контейнер и изучали их окислительные свойства.

Оказалось, что 1 мг окислителей было достаточно для полного сжигания асфальтенов при использовании истощенного окислительного реактора. Без дополнительных окислителей измеренная концентрация ^{13}C в образцах асфальтенов была меньше, чем в случае использования реакторов со свежими реактивами. Результаты определения изотопного состава углерода представлены в табл. 1.17. Видно, что использование дополнительных окислителей вместе с образцом позволяет получить правильную величину изотопного отношения углерода. Однако наилучшая правильность и воспроизводимость были получены при использовании в качестве дополнительных окислителей оксидов церия и хрома. Поэтому эти катализаторы были рекомендованы как наилучшие, обеспечивающие полное сжигание трудноокисляемых соединений.

Разработка нового способа пробоподготовки на основе твердых электролитов для изотопного масс-спектрометрического анализа

Окисление органических соединений с помощью твердого электролита на основе диоксида циркония. В настоящее время уделяется большое внимание исследованию высокотемпературных электрохимических превращений газов в системах с твердыми электролитами. Это связано с разработкой топливных элементов, электролизеров газов, электрохимических насосов и газовых датчиков [34–36]. Традиционно в электрохимии изучаются реакции анодного и катодного превращений кислорода, разложения воды, а также окисления водорода и оксида углерода [34]. В последние годы наблюдается повышенный интерес к исследованию возможности применения электрохимических устройств с кислородопроводящими твердыми электролитами в качестве каталитических реакторов [37]. Это позволяет, в отличие от случая применения электрохимических систем с растворами, осуществлять достаточно большой ряд химических реакций между газообразными реагентами. Твердоэлектролитная керамика обладает высокой механической прочностью и химической стойкостью, может работать в диапазоне температур 500–1000 °С. Амперометрические сенсоры на ее основе

обладают такими достоинствами, как долговечность, линейная зависимость сигнала от концентрации, высокая точность анализа [35, 38]. В качестве электродов для сенсорных устройств часто используют пористое платиновое покрытие, обладающее в области рабочих температур высокой каталитической активностью [39].

Точность полученных результатов изотопного анализа существенно зависит от свойств окислительного реактора, способного окислять разнообразные трудноокисляемые соединения. Неполное сгорание приводит к искажению изотопных данных. Это особенно важно для легких углеводородов, содержащих в своем составе не более четырех атомов углерода. Для их полного окисления необходимо обеспечить высокую температуру и достаточное количество кислорода. Поэтому нами была предпринята попытка создать простой и удобный окислительный реактор, позволяющий проводить полное окисление органических соединений.

Эксперименты проводились на установке, изображенной на рис. 1.5. Разработанный окислительный твердоэлектrolитный реактор имел двухэлектродную и трехэлектродную схему включения. Схема двухэлектродного высокотемпературного твердоэлектrolитного реактора показана на рис. 1.6, а трехэлектродного реактора — на рис. 1.39.

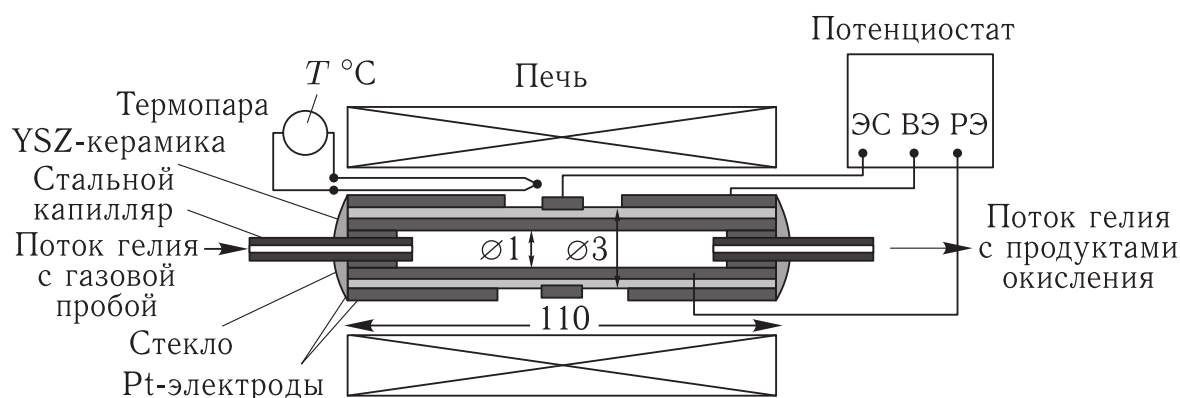


Рис. 1.39. Схема трехэлектродного твердоэлектrolитного реактора: РЭ — рабочий электрод, ЭС — электрод сравнения, ВЭ — вспомогательный электрод

Для исследований была приготовлена стандартная газовая смесь в аргоне, которая содержала компоненты со следующими концентрациями: азот — 14,8 об.%, CO_2 — 6,1 об.%, CH_4 — 9,5 об.%, C_2H_4 — 6,8 об.%, C_3H_8 — 5,6 об.%, $n\text{-C}_4\text{H}_{10}$ — 3,0 об.%, $\text{изо-C}_4\text{H}_{10}$ — 7,0 об.% и другие газы.

Условия для проведения хроматографического разделения газовой стандартной смеси были следующими:

колонка	PoraPlot Q (25 м × 0,32 мм);
газ-носитель	гелий 60;
поток гелия	2 мл/мин;
температура узла ввода проб	100 °С;
скорость нагрева	5 °С/мин;
конечная температура	200 °С.

Исследуемую газовую смесь вводили в хроматограф с помощью газового шприца (объем пробы 100 мкл, разбавление 20 : 1). В капиллярной колонке PoragPlot Q происходит разделение введенной газовой смеси на отдельные компоненты, которые последовательно проходят через стандартный окислительный реактор и твердоэлектролитный реактор. Образующиеся продукты окисления всех компонентов газообразные, поэтому они беспрепятственно покидают зону реактора и транспортируются в потоке гелия в восстановительный реактор, затем проходят ловушку для воды и поступают в ионный источник изотопного масс-спектрометра для измерения изотопного состава углерода в CO_2 .

Если в разделенных твердоэлектролитной трубкой объемах парциальные давления кислорода различны, то имеет место диффузия ионов кислорода через твердый электролит, причем соответствующий установившийся стационарный диффузионный поток j_d ($\text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$) в первом приближении можно описать уравнением

$$j_d = -D \text{grad } c_{\text{O}}, \quad (1.4)$$

где D — коэффициент диффузии, $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, c_{O} — концентрация кислорода, см^{-3} . Диффузия ионов кислорода приводит к накоплению положительного заряда на внешнем электроде и отрицательного заряда на внутреннем электроде, разность потенциалов которых (E) выражается уравнением Нернста:

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{p_{\text{O}_2}(\text{катод})}{p_{\text{O}_2}(\text{анод})}, \quad (1.5)$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура, n — электронный эквивалент кислорода, F — постоянная Фарадея, p_{O_2} — парциальное давление кислорода у катода или у анода. При соединении этих электродов в электрическую цепь по ней потечет постоянный ток. При изменении величины внешнего напряжения U , приложенного к электродам ТЭР с обратным знаком по отношению к E , можно дозировать ток ионов кислорода, поступающего в поток газа носителя. На поверхности внутреннего электрода происходит окисление органических соединений, поступающих в реактор в потоке газа-носителя.

Например, при окислении метана будет происходить следующая реакция:



Аналогичные уравнения можно написать и для других углеводородных газов.

Схема процессов, происходящих на трехфазной границе (твердый электролит — платиновый электрод — газовая среда) трехэлектродного ТЭР при окислении углеводородных газов, показана на рис. 1.40. Кислород, содержащийся в воздухе, адсорбируется, а затем диссоциирует на наружном платиновом электроде. На трехфазной границе, образованной газовой средой, электродом и твердым электролитом, происходит образование ионов кислорода O^{2-} , которые мигрируют через кри-

сталлическую решетку твердого электролита. На трехфазной границе с рабочим платиновым электродом ионы кислорода отдают свой заряд и превращаются в адсорбированные атомы, которые затем могут быть десорбированы в виде молекул. Кроме того, на трехфазной границе происходит окисление углеводородных газов.

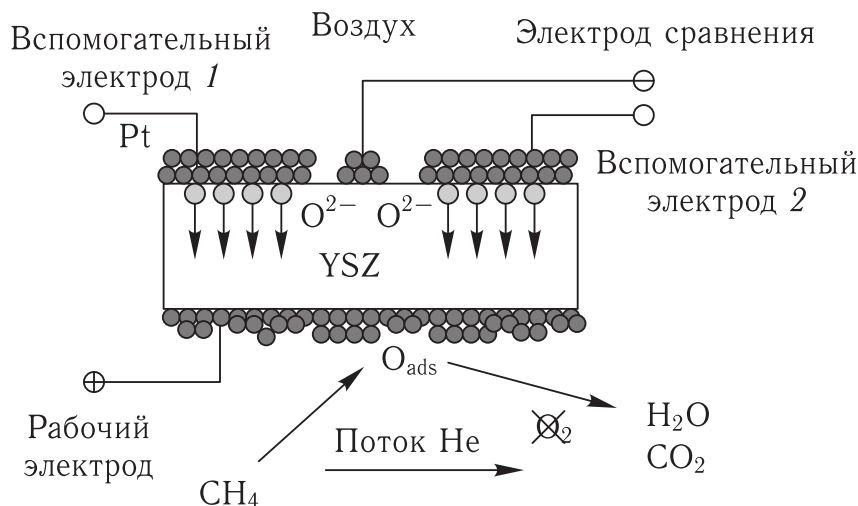


Рис. 1.40. Схема процессов, происходящих при окислении углеводородных газов на трехфазной границе трехэлектродного твердоэлектролитного реактора

На рис. 1.41 представлен график напуска кислорода в поток гелия в зависимости от напряжения, приложенного к электродам твердоэлектролитного реактора, при температуре 900°C . На участке кривой

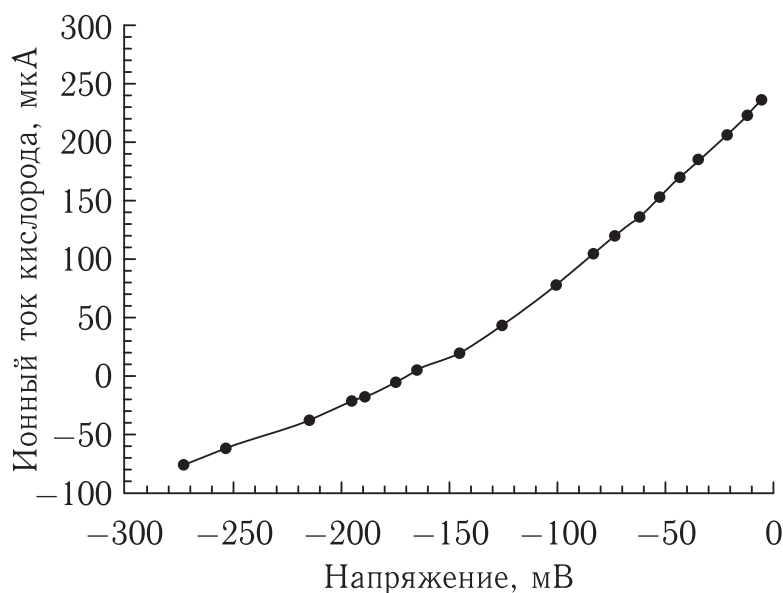


Рис. 1.41. Зависимость ионного тока кислорода, протекающего в двухэлектродном ТЭР, от напряжения, приложенного к электродам ТЭР

от -150 до 0 мВ электрический ток, протекающий через ТЭР, изменяется от 240 до 0 мкА. При этом характер кривой описывается в первом приближении линейной функцией. В качестве анода выступает внутренний электрод ТЭР, вдоль которого движется поток гелия, а катод

работает в среде воздуха (наружный электрод) с высоким содержанием кислорода.

При малых плотностях тока анодная и катодная поляризации электродов пренебрежимо малы, поэтому наклон кривой характеризует суммарное активное омическое сопротивление ТЭР (токоподводы, электроды и твердый электролит). При изменении направления электрического тока, протекающего через ТЭР, резко возрастает катодная поляризация, связанная с затруднениями при выведении остаточного кислорода из гелия (анодной поляризацией в этом случае можно пренебречь, так как выделение кислорода на наружном электроде в воздух происходит без затруднений). Это отражается изломом кривой при -150 мВ (фактически это электрохимический потенциал кислорода в гелии).

В области малых величин отрицательного тока кривая имеет характер, близкий к линейной зависимости, а наклон прямой характеризует сумму активного сопротивления ТЭР и катодной поляризации внутреннего электрода. Далее с увеличением плотности тока кривая должна принимать характер степенной зависимости, связанной с поляризационными процессами на электродах.

Таким образом, изменяя напряжение, приложенное к электродам ТЭР, можно изменять поток кислорода, поступающий в поток газа носителя. Аналогичным образом можно изменять поток кислорода, поступающий в поток газа-носителя гелия, при изменении потенциала рабочего электрода в трехэлектродном ТЭР. На рис. 1.42 показана эта зависимость, полученная при температуре 940°C . Эта зависимость представляет собой степенную функцию и может быть описана уравнением $y = y_0 + ax^b$.

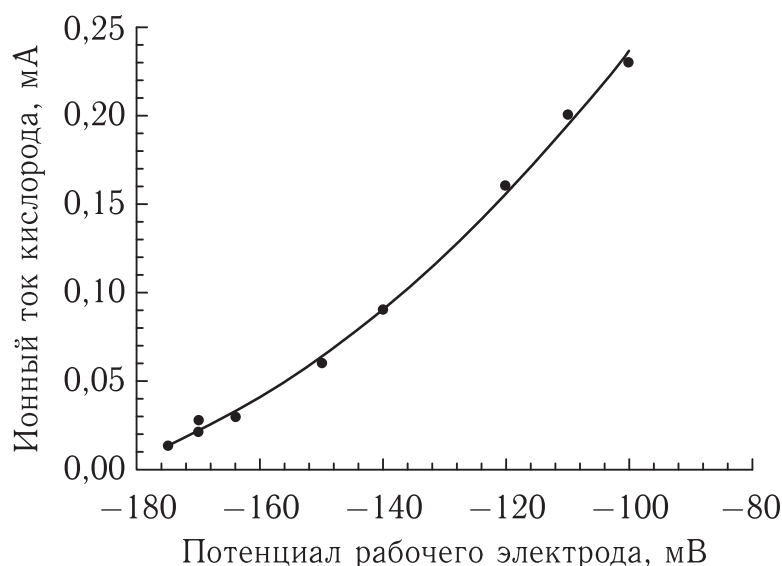


Рис. 1.42. Зависимость ионного тока кислорода, протекающего в трехэлектродном ТЭР, от потенциала рабочего электрода при температуре 940°C

Ионный ток кислорода для трехэлектродного ТЭР примерно 3–5 раз больше, чем ионный ток для двухэлектродного ТЭР при одном и том же потенциале рабочего электрода. Такое расхождение в величине ионного

тока кислорода можно объяснить поляризацией рабочего электрода, которая препятствует движению ионов кислорода. При использовании потенциостата PS 8 для трехэлектродного реактора поляризация рабочего электрода устраняется с помощью введения вспомогательного электрода.

На рис. 1.43 показана зависимость ионного тока кислорода (масса m/z 32), измеренного с помощью детектора изотопного масс-спектрометра и преобразованного в напряжение, от ионного тока кислорода, проходящего через ТЭР, величина которого регулируется напряжением, приложенным к электродам реактора. Этот график представляет собой прямую линию. На основании этого графика можно рассчитать количество кислорода, поступающего в ионный источник масс-спектрометра, при отсутствии органических газов в потоке газа-носителя.

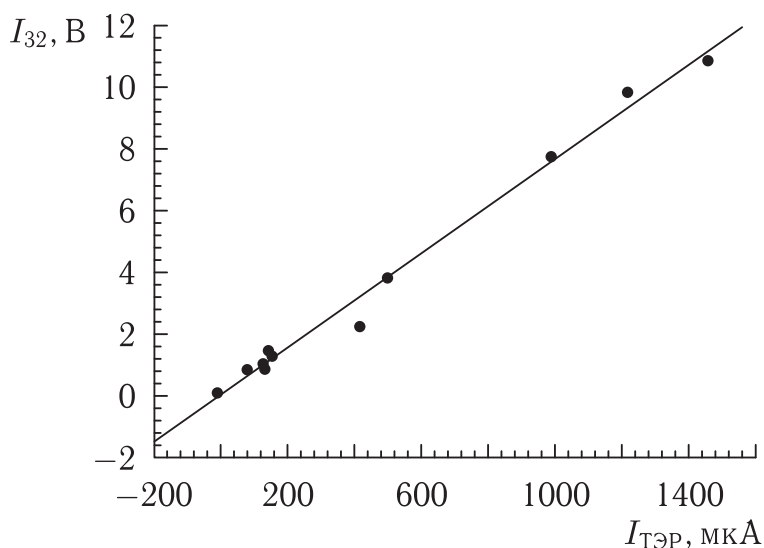


Рис. 1.43. Зависимость напряжения, создаваемого ионным током кислорода на выходе усилителя масс-спектрометра I_{32} с m/z 32, от ионного тока кислорода $I_{\text{ТЭР}}$, прошедшего через твердый электролит

При введении в систему пробы углеводородных газов на внутреннем пористом платиновом электроде ТЭР происходит каталитическая реакция глубокого окисления органических соединений с образованием углекислого газа. Измерение амплитуды сигнала ионного тока CO_2^+ с помощью детектора изотопного масс-спектрометра при температуре ТЭР 950°C показало, что для двухэлектродного ТЭР максимальная амплитуда сигналов достигается при ионном токе кислорода, проходящем через ТЭР, большем 80 мкА. Соответствующий сигнал, регистрируемый на цилиндре Фарадея, составляет $I_{32} = 850$ мВ. При изотопном анализе углеводородов величина I_{32} не должна быть существенно выше полученной величины, так как избыток кислорода в ионном источнике масс-спектрометра может привести к ухудшению аналитических характеристик метода и уменьшению срока службы катода.

При окислении углеводородных газов наблюдается линейная зависимость между ионным током кислорода, прошедшим через твердый

электролит, и величиной ионного тока CO_2^+ , зарегистрированного с помощью детектора изотопного масс-спектрометра. На рис. 1.44 показана такая линейная зависимость, полученная при окислении пропана (трех-электродный ТЭР). Аналогичные прямые можно построить для других углеводородных газов.

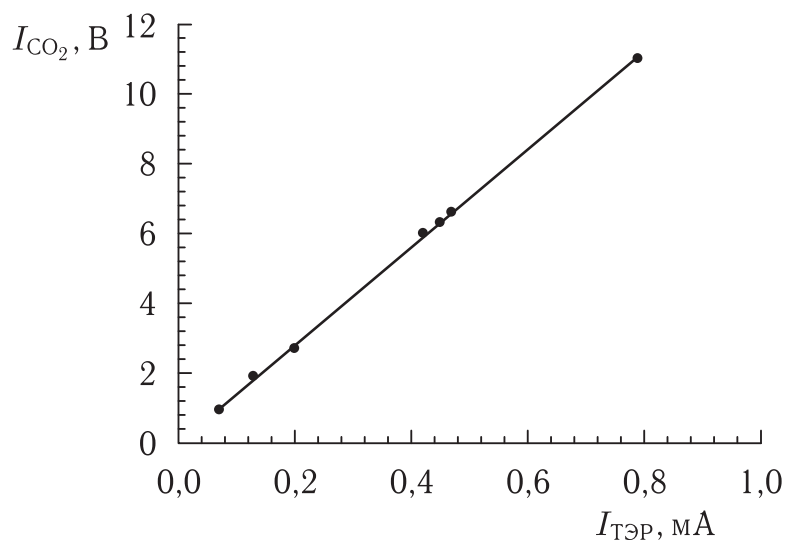


Рис. 1.44. Зависимость напряжения, создаваемого ионным током CO_2^+ на выходе усилителя изотопного масс-спектрометра, от ионного тока кислорода $I_{\text{ТЭР}}$, прошедшего через ТЭР при окислении пропана

Таким образом, количество кислорода, затраченное на окисление УВГ, пропорционально количеству образовавшегося газа CO_2 . Это означает, что ТЭР может быть использован для определения содержания соединений органических газов в смеси по следующей формуле [40]:

$$C = \frac{V_M}{4nFV_{\text{пр}}} \cdot Q \cdot 100\%, \quad (1.6)$$

где C — объемная концентрация соединения в газовой пробе, V_M — объем одного моля газа при нормальных условиях, n — количество молекул кислорода, необходимое для окисления одной молекулы определяемого восстановителя, F — постоянная Фарадея, $V_{\text{пр}}$ — объем пробы, Q — заряд, прошедший через твердый электролит.

На рис. 1.45 показано изменение напряжения на выходе усилителя детектора масс-спектрометра при регистрации ионов кислорода при окислении углеводородных газов в трехэлектродном твердоэлектролитном реакторе. Несмотря на различный уровень кислорода в потоке газа-носителя, величины сигналов твердоэлектролитного детектора, полученные при окислении углеводородных газов (УВГ), практически не изменяются. Это доказывает то, что полное окисление газов может происходить за счет кислорода, находящегося на трехфазной границе [41], а влияние газообразного кислорода или адсорбированного на поверхности платинового электрода незначительно. Хроматограмма смеси углеводородных газов, зарегистрированная по ионному току кислорода, прошедшего через твердый электролит, показана на рис. 1.45.

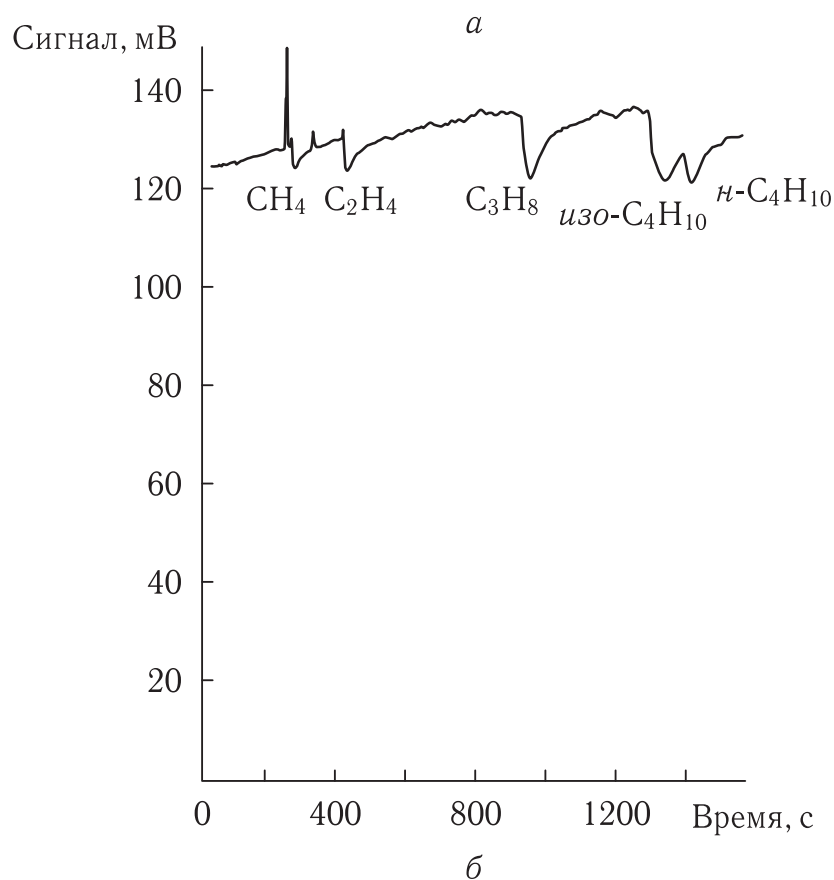
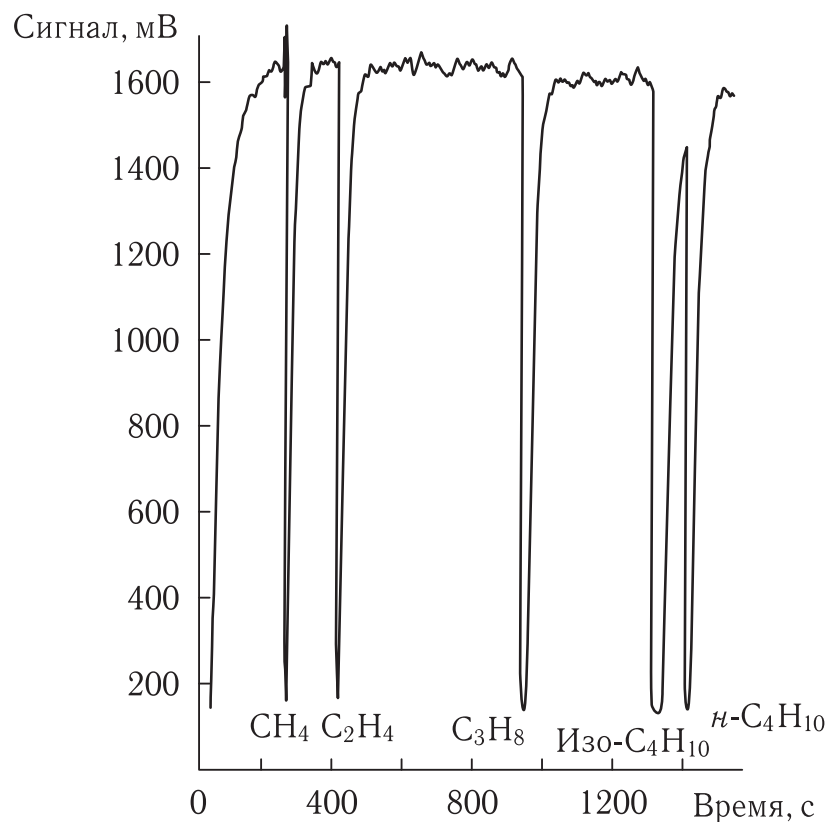


Рис. 1.45. Изменение напряжения, создаваемого ионным током кислорода на выходе усилителя детектора масс-спектрометра, при окислении углеводородных газов при различных значениях потенциала рабочего электрода:
а) -100 мВ, *б*) -175 мВ

Для правильного измерения изотопного состава углерода органических соединений необходимо, чтобы кислород не поступал в поток газа-носителя, так как в дальнейшем он может взаимодействовать с углеродом катода ионного источника и приводить к искажению величины $\delta^{13}\text{C}$. На основании экспериментальных данных было установлено, что концентрация кислорода в потоке газа-носителя гелия не должна превышать 60 ppm.

Оптимальным режимом работы твердоэлектролитного реактора является такой режим, который обеспечивает полное окисление органических соединений на трехфазной границе и в то же время практически не допускает поступления кислорода из внешней среды в поток газа-носителя (рис. 1.40). На основании этих критериев для проведения экспериментов был выбран потенциал рабочего электрода, равный $\varphi_p = -175$ мВ, и температура 940°C .

Полнота окисления органических соединений в реакторе подтверждается следующими аргументами:

1) величина аналитического сигнала ТЭР при окислении органических соединений не зависит от количества кислорода в потоке газа-носителя (рис. 1.45);

2) измеренный изотопный состав углерода органических соединений (в пределах погрешности), полученный при окислении с помощью ТЭР и стандартного окислительного реактора, одинаков.

На основании критерия 2 можно контролировать правильность работы стандартного окислительного реактора, который требует периодического восстановления окислительной способности путем восстановления оксида меди (табл. 1.18).

Таблица 1.18

Амплитуды аналитических сигналов компонентов газовой смеси для ТЭР (I_1 , мА), для «истощенного» (I_2 , В) и восстановленного стандартного окислительного реактора (I_3 , В), а также значения изотопных отношений углерода $\delta^{13}\text{C}$ при использовании соответствующих реакторов

Соединение	I_1 , мА	$\delta^{13}\text{C}_1$, ‰	I_2 , В	$\delta^{13}\text{C}_2$, ‰	I_3 , В	$\delta^{13}\text{C}_3$, ‰
CH_4	0,40	−39,33	4,7	−38,50	5,8	−38,99
C_2H_4	0,38	−32,97	0,9	−41,96	7,6	−33,21
C_3H_8	0,47	−32,62	4,1	−32,51	6,6	−32,66
изо- C_4H_{10}	0,57	−37,14	4,2	−38,36	6,5	−37,14
н- C_4H_{10}	0,48	−34,12	3,7	−34,97	6,4	−34,93

Из табл. 1.18 видно, что ослабление окислительной способности стандартного реактора привело к ошибке измерения изотопного отношения углерода $\delta^{13}\text{C}$ по сравнению с результатами, полученными при использовании ТЭР и восстановленного стандартного окислительного реактора. Воспроизводимость результатов измерения величины $\delta^{13}\text{C}$ со-

ставляет 0,3‰. Кроме того, неполное окисление углеводородных газов при неизменных условиях анализа привело к уменьшению амплитуды аналитических сигналов, особенно это сказалось на амплитуде сигнала этилена (C_2H_4).

Проведенные исследования показали, что площади сигналов, полученных при окислении углеводородных газов, кроме метана, слабо зависят от температуры твердоэлектролитного реактора в диапазоне температур от 820°C до 940°C. Для метана эта зависимость площади сигнала от температуры выражена сильнее (рис. 1.46).

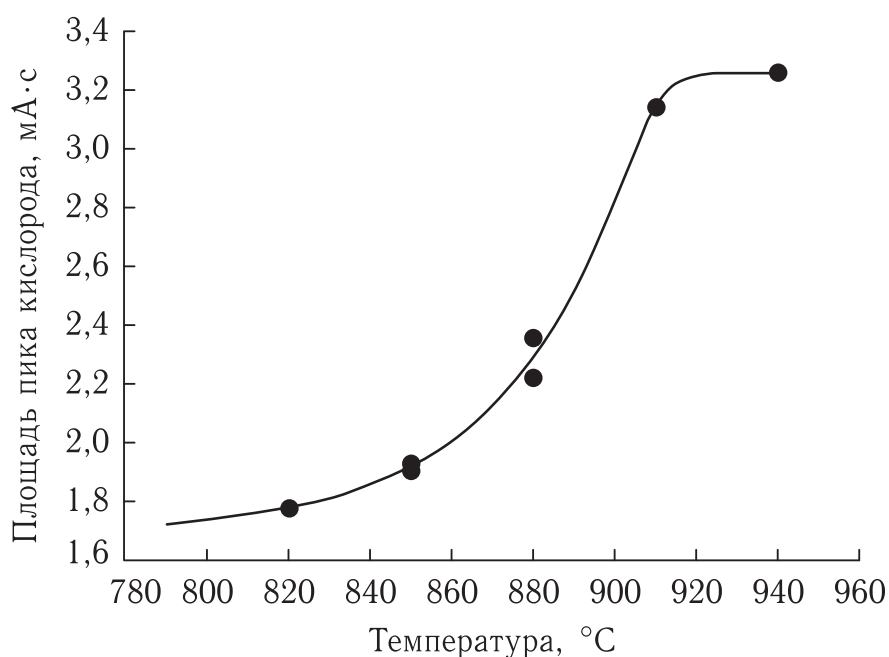


Рис. 1.46. Зависимость площади пиков кислорода, прошедшего через твердоэлектролитный реактор при окислении метана, от температуры реактора

При понижении температуры реактора ниже 900°C происходит неполное окисление метана. При этом измеренное изотопное отношение углерода метана меняется незначительно. Это означает, что неполное окисления метана в твердоэлектролитном реакторе не всегда приводит к значительному фракционированию изотопов углерода (табл. 1.19).

Таблица 1.19
Зависимость измеренного изотопного отношения углерода от температуры ТЭР

$T, ^\circ C$	$\delta^{13}C_{PDB}, \text{‰}$				
	Метан	Этилен	Пропан	изо-Бутан	н-Бутан
940	−39,81	−32,97	−32,70	−37,04	−34,92
910	−39,58	−32,99	−32,40	−37,19	−34,67
880	−39,54	−32,85	−32,12	−36,88	−34,71
850	−39,36	−32,95	−26,62	−37,00	−34,63
820	−39,30	−32,69	−21,56	−36,70	−34,17

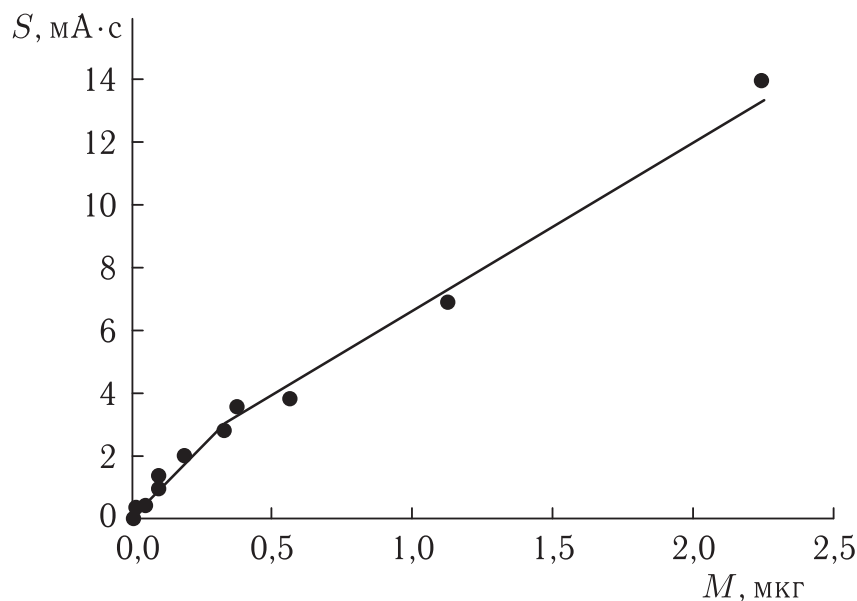


Рис. 1.47. Зависимость площади пиков кислорода, идущего на окисление углерода метана, от массы углерода, окисленного в ТЭР ($T = 940^\circ\text{C}$, $\varphi_p = -175 \text{ мВ}$)

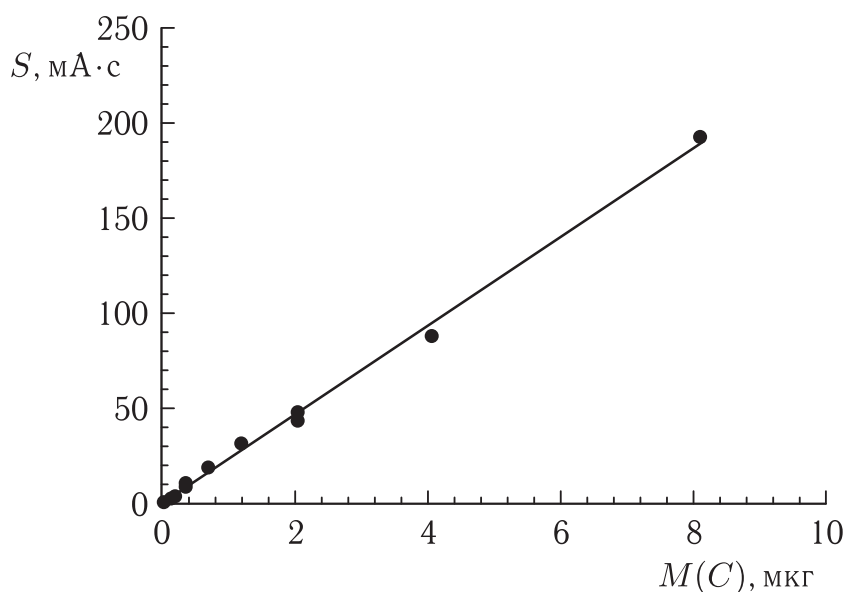


Рис. 1.48. Зависимость площади пиков кислорода, идущего на окисление углерода *изо*-бутана, от массы углерода, окисленного в ТЭР ($T = 940^\circ\text{C}$, $\varphi_p = -175 \text{ мВ}$)

Для пропана фракционирование изотопов углерода начинается при температуре ниже 850°C , для бутана при температуре ниже 820°C , а при окислении этилена фракционирование изотопов углерода не наблюдается во всей области температур от 820 до 940°C . Такой характер поведения изотопов углерода можно объяснить различным размером молекул газа и различной подвижностью этих молекул в пористом электроде. На основании проведенных экспериментов была выбрана достаточно высокая оптимальная температура работы ТЭР, равная 940°C , обеспечивающая полное окисление исследуемых органических соединений.

На рисунках 1.47 и 1.48 показаны градуировочные графики, представляющие собой зависимости площади пиков кислорода, идущего на

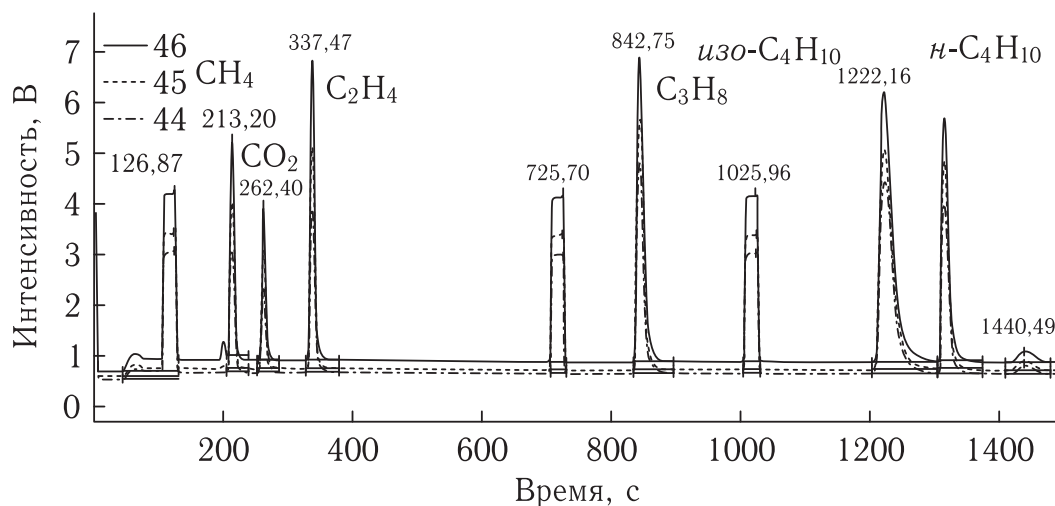


Рис. 1.49. Хроматограмма газов стандартной смеси, полученная по ионному току CO_2^+ с m/z 44, 45, 46

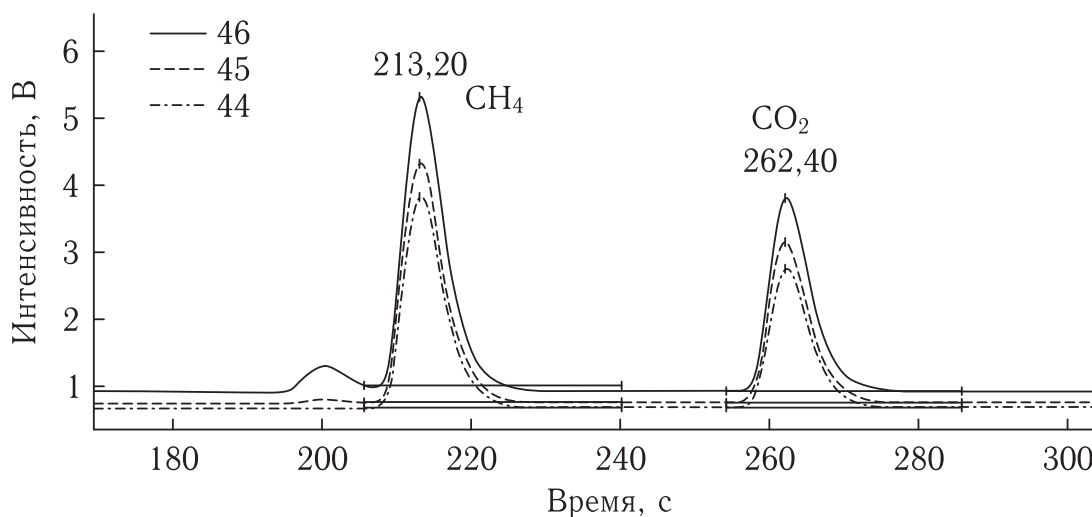


Рис. 1.50. Выделенный участок хроматограммы, показанный на рис. 1.49

окисление углерода метана и *изо*-бутана, от массы углерода в этих соединениях во введенной пробе.

Проведенные эксперименты показали, что площади пиков CO_2^+ , образованных при окислении УВГ с помощью стандартного окислительного реактора и ТЭР, оказались равными по величине. Кроме того, известно [20], что стандартный окислительный реактор изотопного масс-спектрометра позволяет проводить полное окисление углеводородных газов при температуре 950°C . Следовательно, в области линейности градуировочного графика для углеводородных газов (при небольшом количестве введенного вещества) происходит полное окисление соединений в пробе при использовании ТЭР.

На рисунках 1.49 и 1.50 показаны хроматограммы, полученные по току ионов CO_2^+ с массами m/e 44, 45, 46 при окислении газовых компонентов исследуемой смеси, и кулонометрические спектры, полученные с помощью двухэлектродного (рис. 1.51) и трехэлектродного (рис. 1.52) детекторов для одной и той же газовой пробы. Из сравнения

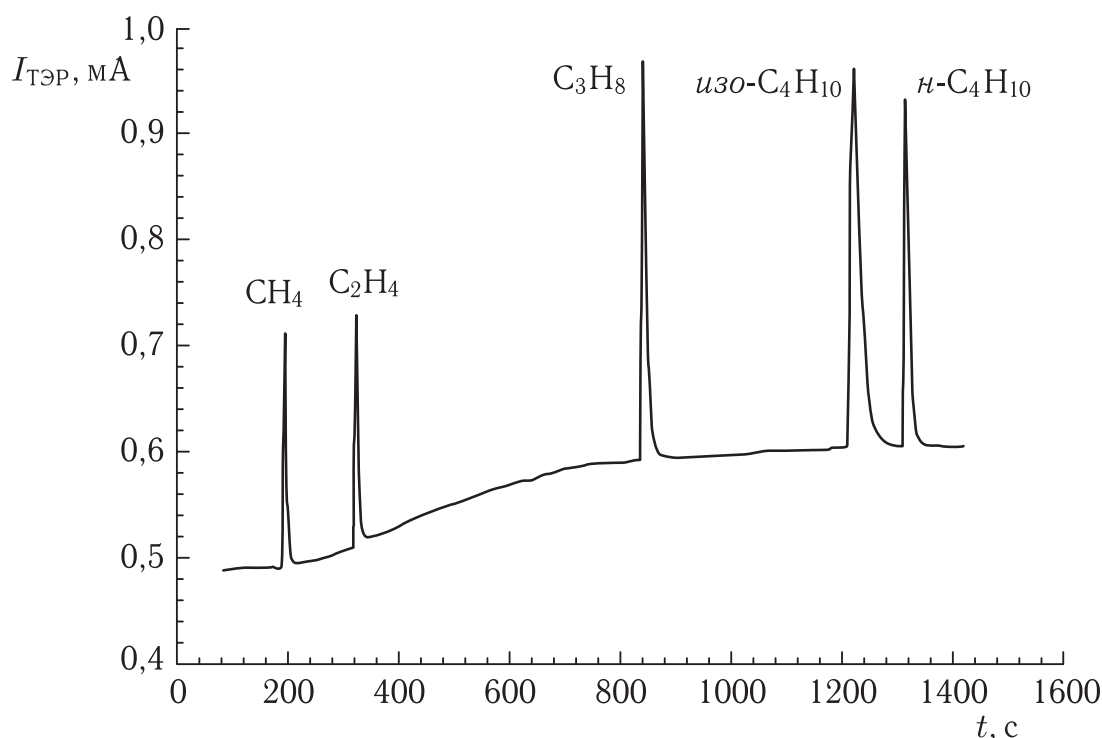


Рис. 1.51. Хроматограмма газовой смеси, полученная при использовании двухэлектродной схемы включения ТЭР ($T = 970^\circ\text{C}$, $V = 100$ мкл, разбавление 1:20)

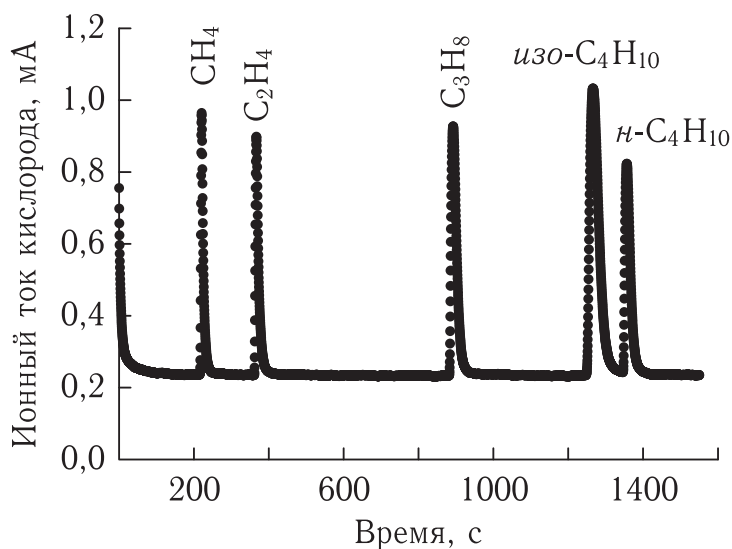


Рис. 1.52. Хроматограмма УВГ, зарегистрированная по ионному току кислорода, прошедшему через твердый электролит при использовании трехэлектродной схемы включения ТЭР ($T = 940^\circ\text{C}$, $V = 100$ мкл, разбавление 1:20, $\varphi = -175$ мВ)

этих спектров видно, что твердоэлектrolитный реактор, работающий в кулонометрическом режиме в качестве хроматографического детектора, позволяет с высокой чувствительностью определять содержание органических газов в пробе и может быть использован в качестве хроматографического детектора органических газов.

Из сравнения хроматограмм на рисунках 1.51 и 1.52 видно, что использование трехэлектродной схемы включения ТЭР приводит к повышению чувствительности метода при уменьшении уровня фона. Введение

дополнительного ТЭР в стандартную хромато-масс-спектрометрическую систему сильно не повлияло на форму и ширину хроматографических пиков, благодаря высокой температуре реактора и небольшому его объему, сравнимому с объемом стандартного реактора. Поэтому практически нет необходимости в уменьшении внутреннего диаметра ТЭР.

Результаты изотопного анализа, полученные в двух режимах окисления пробы (с помощью ТЭР и стандартного окислительного реактора), представлены в табл. 1.20. Из сравнения этих данных видно, что для всех газов, за исключение CO_2 , величина $\delta^{13}\text{C}$, полученная при использовании двухэлектродного ТЭР, оказалась в среднем на 0,4‰ более положительная, чем полученная при использовании стандартного реактора. При этом для ТЭР воспроизводимость результатов (стандартное отклонение) изотопного анализа была лучше и изменялась от 0,11 до 0,25‰.

Таблица 1.20

Результаты определения изотопного состава углерода углеводородных газов и CO_2

Реактор окисления		CH_4	CO_2	C_2H_4	C_3H_8	изо- C_4H_{10}	н- C_4H_{10}
Стандартный	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	−38,73	−20,27	−32,88	−32,45	−37,04	−34,84
	S , ‰	0,31	0,22	0,26	0,13	0,21	0,31
	n	8	7	8	9	7	8
Твердо-электролитный, 2-электродный	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	−38,29	−20,68	−32,47	−32,13	−36,71	−34,50
	S , ‰	0,15	0,22	0,29	0,25	0,15	0,11
	n	4	7	7	6	6	4
Твердо-электролитный, 3-электродный	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	−39,00	−20,76	−32,75	−32,53	−36,65	−34,31
	S , ‰	0,35	0,21	0,24	0,18	0,23	0,36
	n	12	10	9	8	10	10

Результаты изотопного анализа, полученные с помощью трехэлектродного ТЭР и стандартного окислительного реактора, оказались близкими по значению величины $\delta^{13}\text{C}_{\text{РДВ}}$ (табл. 1.20). Это подтверждает правильность вывода о полном окислении углеводородных газов с помощью ТЭР. Воспроизводимости результатов изотопного анализа для двух методов практически не различались и изменялись от 0,13 до 0,36‰.

Одновременно с проведением изотопного анализа можно с помощью ТЭР контролировать чистоту газа-носителя и определять концентрацию органических газов в пробе. Предел детектирования разработанного конверсионного твердоэлектролитного кислородпроводящего детектора (КТД) оценивали по следующей формуле [42]:

$$m_{\min} = \frac{2\Delta x}{A}, \quad (1.7)$$

где $m_{\min}$ — минимально определяемое количество вещества, Δx — уровень шумов, A — чувствительность детектора. Минимально определяемое количество углеводородов рассчитывали по полученным спектрам

(рисунки 1.51, 1.52). Сравнение с характеристиками пламенно-ионизационного детектора ПИД проводили при использовании того же хроматографа и при тех же условиях анализа. Полученные результаты показаны в табл. 1.21.

Таблица 1.21
Сравнительные характеристики твердоэлектrolитного и пламенно-ионизационного детекторов

Компонент	Минимально определяемое количество вещества, г		
	КТД (2-электродный)	КТД (3-электродный)	ПИД
CH ₄	$6,4 \cdot 10^{-10}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$7,0 \cdot 10^{-11}$
C ₂ H ₆	$8,2 \cdot 10^{-10}$	$1,4 \cdot 10^{-8}$	$4,8 \cdot 10^{-11}$
C ₃ H ₈	$8,0 \cdot 10^{-10}$	$1,9 \cdot 10^{-8}$	$1,4 \cdot 10^{-10}$
изо-C ₄ H ₁₀	$1,1 \cdot 10^{-9}$	$3,6 \cdot 10^{-8}$	$2,1 \cdot 10^{-10}$
н-C ₄ H ₁₀	$6,41 \cdot 10^{-10}$	$1,8 \cdot 10^{-8}$	$1,3 \cdot 10^{-10}$

Из табл. 1.21 видно, что пламенно-ионизационный детектор обладает лучшими аналитическими характеристиками, чем разработанные хроматографические детекторы на основе твердого электролита. Однако проведенные исследования показали, что эти характеристики могут быть значительно улучшены.

Таблица 1.22
Воспроизводимость результатов (S_r) хроматографического анализа углеводородных газов при использовании конверсионного твердоэлектrolитного детектора

Детектор		CH ₄	C ₂ H ₄	C ₃ H ₈	изо-C ₄ H ₁₀	н-C ₄ H ₁₀
Твердо-электrolитный, 2-электродный	S_r	0,10	0,32	0,32	0,25	0,30
	n	6	6	9	7	7
Твердо-электrolитный, 3-электродный	S_r	0,11	0,12	0,15	0,12	0,19
	n	10	13	9	8	9

На основании градуировочных графиков была вычислена чувствительность хроматографического метода с твердоэлектrolитным детектором. Оказалось, что чувствительность метода при использовании трехэлектродного твердоэлектrolитного детектора примерно в 3–5 раз выше, чем чувствительность метода с двухэлектродным твердоэлектrolитным детектором. Воспроизводимость результатов измерения площади пиков кислорода, потребляемого на окисление углеводородных газов, показана в табл. 1.22. Из этой таблицы видно, что воспроизводимость результатов хроматографического анализа углеводородных газов при использовании трехэлектродного твердоэлектrolитного детектора значительно лучше, чем при использовании двухэлектродного детектора.

**Электрохимическое разложение воды с помощью
твердого электролита на основе диоксида циркония
для определения изотопного состава водорода**

Результаты измерения изотопного состава водорода воды широко используются в геохимии, гидрологии, для идентификации подделок продуктов питания, в физиологии. Для проведения изотопного анализа водорода воды используются различные способы ее разложения: электролиз, пиролиз, химическое взаимодействие с цинком, ураном или хромом, изотопное уравнивание водорода с водой. Преимущества и недостатки этих методов представлены в табл. 1.23. Изотопные отношения водорода и кислорода воды измеряются в режиме двойного напуска газов или в режиме постоянного потока.

Таблица 1.23

Преимущества и недостатки различных способов разложения воды для определения изотопного состава водорода воды

№	Способ разложения	Преимущества	Недостатки	Литература
1	Электролиз	Погрешность 0,2‰	Необходимо полное разложение воды Время анализа 10 мин Объем пробы 15–20 мкл	[43]
2	Пиролиз	Объем пробы 0,5–1 мкл Время анализа несколько минут	Наличие эффекта памяти Высокая температура 1400 °С Погрешность 2–3‰	[44] [45]
3	Химическое разложение с использованием Сг	Погрешность 1‰	Токсичность реагентов Высокая стоимость реактора (100 анализов) Время анализа образца 7 мин Эффект памяти	[46]
4	Уравнивание	Погрешность 0,8‰ Нет химических реагентов Отсутствует эффект памяти	Необходим термостат Объем пробы 1–5 мл Время анализа 1 ч	[47] [48]

Несмотря на большое число методов определения изотопного состава водорода воды, в промышленном производстве выпускается в основном только один прибор HD device («Thermo Fisher Scientific»), принцип работы которого основан на разложении воды при ее взаимодействии с порошком хрома.

Нами был разработан новый простой аналитический прибор для пробоподготовки при масс-спектрометрическом изотопном определении водорода в режиме двойного напуска газов (см. рис. 1.8), основанный

на принципе электрохимического разложения воды на поверхности платинового электрода с последующим выведением кислорода из реакционной зоны в окружающую среду через стенку твердоэлектролитного реактора, обладающего кислород-ионной проводимостью при повышенных температурах [34].

Для определения изотопного состава водорода анализируемой воды был построен градуировочный график по международным стандартам воды с известным изотопным составом водорода. Были использованы образцы IAEA-ОН-4 с изотопным составом $\delta D = -109,4 \pm 1,4\text{‰}$, GISP с $\delta D = -189,5 \pm 1,2\text{‰}$, SLAP с $\delta D = -428,0\text{‰}$. Градуировочный график представляет собой прямую линию $y = 0,899x - 69,1$. Используя этот график, можно определить изотопный состав водорода воды с неизвестным изотопным составом. Длительность анализа составляет 10–15 мин. Для устранения эффекта памяти при переходе от анализа одного образца к анализу другого необходимо предварительно провести опыт с введением пробы воды без измерения изотопного состава водорода. Воспроизводимость результатов измерения изотопного состава водорода составляет $0,5\text{‰}$ ($n = 7$).

Вид кривой разложения воды с помощью высокотемпературного твердоэлектролитного реактора на основе диоксида циркония представлен на рис. 1.53. Так как ток ионов кислорода, прошедших через электролит, соответствует числу распавшихся молекул воды в единицу времени, то площадь под этой кривой пропорциональна общему числу распавшихся молекул. На основании полученных кривых можно рассчитать степень разложения воды за время анализа, которая оказалась равной 90%. Показано, что в процессе разложения воды не происходит изотопного фракционирования. Чтобы предотвратить попадание остатков водяного пара в масс-спектрометр, использовали ловушку с жидким азотом.

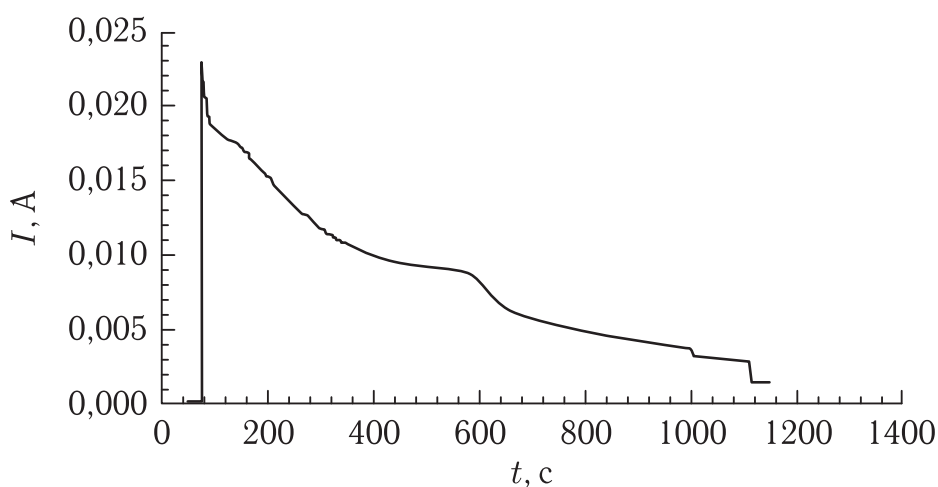


Рис. 1.53. Кривая разложения воды с помощью высокотемпературного твердоэлектролитного реактора

Получено авторское свидетельство (№2003137448) на разработанную конструкцию прибора. В настоящее время разработана и изготавливается

модернизированная коммерческая версия прибора, обладающая улучшенными аналитическими характеристиками и повышенной надежностью.

Таким образом, был создан простой в изготовлении прибор для разложения воды, позволяющий получить хорошую воспроизводимость результатов изотопного анализа, обладающий небольшим энергопотреблением, электробезопасный, не требующий для своей работы химических реагентов, позволяющий осуществлять непрерывный контроль количества разложившейся воды. Срок службы такого прибора по литературным данным составляет 2 года и более.

Кроме восстановительного реактора для разложения воды, используемого с изотопным масс-спектрометром, работающим в режиме двойного напуска газов, нами был разработан восстановительный трех-электродный твердоэлектролитный реактор (см. рис. 1.39), работающий в режиме постоянного потока газа-носителя гелия. Этот реактор применялся совместно со стандартным окислительным реактором в установке с изотопным масс-спектрометром (см. рис. 1.5). Между этими реакторами дополнительно была установлена капиллярная колонка PoragPlot Q (30 м × 0,32 мм), помещенная в термостат с разделительной колонкой при температуре 40 °С. Она была предназначена для разделения продуктов сжигания углеводородных газов в окислительном реакторе. Температура восстановительного твердоэлектролитного реактора составляла 940 °С, а потенциал рабочего электрода — $\varphi = -1,2$ В. Время прохождения пробы через реактор составляло несколько секунд.

Было обнаружено, что при выбранных восстановительных условиях молекулы CO_2 практически не восстанавливались, в то время как молекулы воды восстанавливались полностью. При окислении CH_4 образуются вода и CO_2 . При этом площадь пика кислорода, образовавшегося в результате разложения молекул воды, превышала площадь пика кислорода, образовавшегося в результате разложения с помощью твердоэлектролитного реактора молекул CO_2 , более, чем в 10 раз. Хроматограмма, полученная в результате разложения с помощью твердоэлектролитного реактора молекул воды, образованной при окислении смеси углеводородов в потоке газа носителя в стандартном окислительном реакторе, представлена на следующем рис. 1.54.

На основании расчетов, проведенных по следующим формулам, была оценено количество молекул кислорода, идущих на окисление углеводородных газов, и количество молекул кислорода, образовавшихся при восстановлении воды с помощью ТЭР:

$$n_{\text{теор}} = K \frac{CPVN_A}{S_p RT}; \quad (1.8)$$

$$n_{\text{эксп}} = \frac{Q}{4e}, \quad (1.9)$$

где $n_{\text{теор}}$, $n_{\text{эксп}}$ — число молекул кислорода, идущих на образование молекул воды при окислении углеводородных газов и образующихся при восстановлении молекул воды, соответственно, Q — интеграл ион-

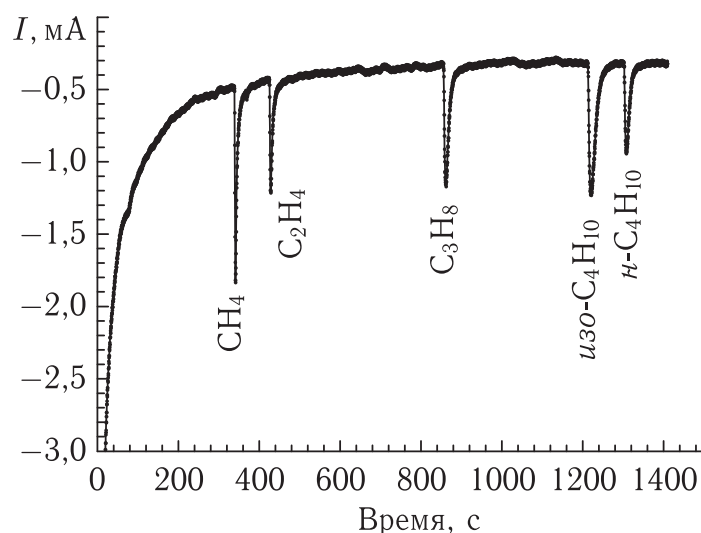


Рис. 1.54. Хроматограмма, полученная при прохождении ионов кислорода через твердый электролит, полученных в результате разложения молекул воды, которые образуются при окисления смеси углеводородных в стандартном окислительном реакторе в потоке газа-носителя

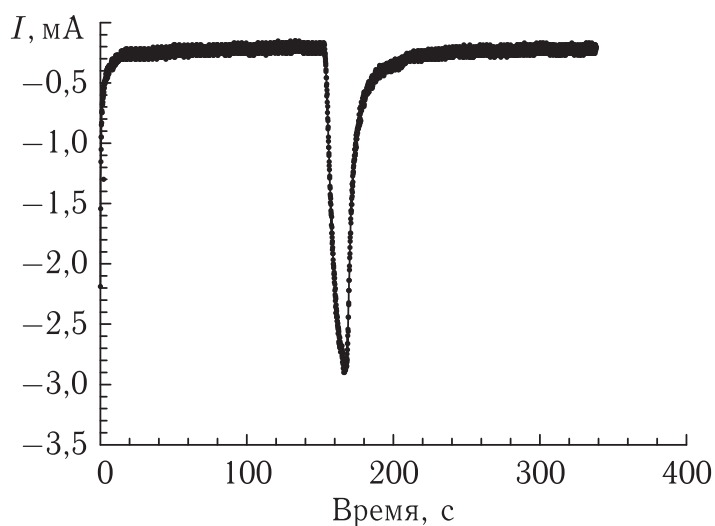


Рис. 1.55. Сигнал ионного тока, образованный при прохождении ионов кислорода через твердый электролит, при разложении молекул воды в твердоэлектродном реакторе в потоке газа носителя

ного тока кислорода O^{2-} , прошедшего через твердый электролит, e — заряд электрона, C — объемная концентрация соединения в газовой пробе, V — объем пробы при нормальных условиях, P — нормальное давление, N_A — число Авагадро, R — молярная газовая постоянная, S_p — коэффициент деления пробы, K — число молекул кислорода, необходимое для образования молекул воды при окислении одной молекулы углеводородного газа или другого горючего соединения.

Проведенные эксперименты с разложением введенной воды, с водой, образовавшейся при окислении углеводородных газов, а также спиртов показали, что в пределах точности эксперимента соблюдается равенство $n_{\text{теор}} \approx n_{\text{эксп}}$. Это доказывает то, что в восстановительном твердоэлектродном реакторе происходит полное разложение во-

ды в потоке газа-носителя за время примерно 3 с. Хроматографический пик восстановления молекул воды, введенной в капиллярную колонку, приведен на рис. 1.55. Полученные результаты для углеводородных газов приведены в табл. 1.24. Из таблицы видно, что расхождение между величинами $\Delta = n_{\text{теор}} - n_{\text{эксп}}$ небольшое, равное 10–20%. Число измерений для каждого газа равнялось трем.

Таблица 1.24

Результаты разложения воды, образовавшейся при окислении углеводородных газов (объем пробы 50 мкл, разбавление 1:20), метанола (0,1 мкл, 1:40) и воды (0,1 мкл, 1:20), с помощью твердоэлектролитного реактора

Соединение	$n_{\text{теор}},$ 10^{16} мол. O_2	$n_{\text{эксп}},$ 10^{16} мол. O_2	$\Delta,$ 10^{16} мол. O_2
CH_4	1,1	1,2	–0,1
C_2H_4	0,7	0,8	0,1
C_3H_8	1,3	1,4	–0,1
<i>изо</i> - C_4H_{10}	2,2	2,1	0,1
<i>н</i> - C_4H_{10}	1,1	0,9	0,2
H_2O	8,0	9,3	–1,3
CH_3OH	2,6	2,3	0,3

Таким образом, разработанный восстановительный твердоэлектролитный реактор позволяет проводить практически полное разложение воды, без изменения своих восстановительных характеристик в течение длительного времени. Эти качества реактора играют важную роль при проведении изотопного масс-спектрометрического анализа воды. Кроме того, восстановительная твердоэлектролитная ячейка, так же как и окислительная твердоэлектролитная ячейка, могут служить в качестве хроматографических детекторов, не требующих, в отличие от других детекторов, проведения калибровки.

Изучение распределения изотопов легких элементов в различных объектах

Нахождение источника происхождения наркотических и взрывчатых веществ

Проблема определения географического происхождения наркотических (НВ) и взрывчатых веществ (ВВ), в частности получаемых из природных источников, до сих пор остается актуальной во всем мире. Один из путей ее решения основан на измерении изотопных отношений углерода и азота исследуемых веществ.

Известно, что изотопный состав растений формируется в биохимических процессах, поэтому наблюдаемые изотопные вариации отражают не только видовые различия, но и различия в метаболизме растений, свя-

занные с условиями окружающей среды. Изотопный состав газов окружающей среды, а также такие параметры, как влажность, температура, длительность светового дня определяют изотопные отношения элементов в растениях. Растения, произрастающие при высокой влажности или на почве с большим содержанием воды, могут иметь значения изотопных отношений $\delta^{13}\text{C}$ на 4–5‰ более отрицательные, чем растения, растущие в сухом климате. Изотопный состав азота в растениях может изменяться в зависимости от состава почвы и микробной активности азотфиксаторов на 10‰ и более [46]. Процессы биологического фракционирования изотопов подробно рассмотрены в книге [50].

Наркотические вещества. Уже в течение многих лет сохраняется интерес к решению проблемы установления географического происхождения наркотических веществ, полученных из природных источников сырья [49, 51, 52]. В основном речь идет об изотопном анализе углерода и азота героина, морфина и кокаина. Героин является полусинтетическим продуктом, получаемым путем ацетилирования морфина. Так как изотопный состав углерода в уксусном ангидриде может изменяться в зависимости от условий его изготовления, обогащение героина углеродом ^{13}C может быть связано как с географическим происхождением образца, так и с источником уксусного ангидрида, используемого производителями наркотиков. Измерение изотопного состава углерода уксусного ангидрида имеет большое значение при определении принадлежности образцов к одной партии. А степень обогащения морфина углеродом ^{13}C может указывать на географическое происхождение образцов. Разность между изотопным составом углерода героина и соответствующего деацетилированного героина может составлять от –4,99‰ до 0,17‰ [53].

Кокаин является одним из наиболее распространенных наркотических веществ наряду с героином. Определение изотопного состава углерода и азота в образцах кокаина и листьев кустарника коки из Боливии, Перу и Колумбии было выполнено авторами статьи [54]. В листьях коки величины $\delta^{13}\text{C}$ изменялись в интервале от –32,4‰ до –25,3‰, а величины $\delta^{15}\text{N}$ изменялись в более широком интервале от 0,1 до 13‰. Следует также отметить, что для наркотических веществ величины $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ имели на 3–8‰ более отрицательные значения, чем для растений, из которых они были получены [49]. Наиболее полный и серьезный анализ изотопного состава углерода и азота героина и морфина из Южной Америки, Юго-восточной Азии, Юго-западной Азии и Мексики, а также кокаина из Южной Америки был выполнен в работе [49]. Оказалось, что героин из четырех регионов имел максимальную разницу в изотопном составе углерода 2,4‰ и азота 3,1‰, а морфин 1,4‰ и 3,5‰ соответственно. Для кокаина максимальная разница в изотопном составе углерода и азота составляла 0,6‰ и 7,1‰ соответственно.

Часто анализируемые наркотические вещества имеют недостоверный источник происхождения, так как образцы отбирают из конфиско-

ванных партий наркотиков. Очевидно, что создание и расширение соответствующего банка данных имеет ключевое значение для достоверной идентификации географического источника происхождения наркотических веществ.

Определение изотопных соотношений $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ и $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ твердых и жидких проб проводили на изотопном масс-спектрометре «Thermo Fisher Scientific» Delta Plus, соединенном с газовым хроматографом HP 6890 посредством интерфейсного блока Combustion 3 (конфигурация GC-C-IRMS) и с элементным анализатором EA 1110 (CE Instruments) посредством интерфейсного блока ConFlo 2 (конфигурация EA-IRMS).

В конфигурации GC-C-IRMS растворенные пробы наркотиков вводили в капиллярную колонку DB-5 (фирма «J&W Scientific», 30 м × 0,32 мм). Условия анализа были следующими: газ-носитель гелий, температура узла ввода проб 250 °С, начальная температура термостата 150 °С, конечная температура термостата 320 °С, скорость нагрева 10 °С/мин.

Анализировали листья конопли, героин, морфин, кокаин. Образцы героина и кокаина имели степень очистки 60–100%. Одну часть образцов в виде порошка анализировали с использованием элементного анализатора, а другую часть растворяли в метаноле (фирма «Merck») и анализировали с использованием капиллярного хроматографа.

Образцы листьев конопли были отобраны в различных регионах России (Брянская, Курская области, Мордовская, Татарская, Кабардино-Балкарская республики, Приморский край, Ставрополье) и Украины (Сумская область). Перед анализом листья конопли высушивали при температуре 50 °С и измельчали в агатовой ступке до получения однородной массы. Необходимые для анализа навески проб взвешивали на аналитических весах Mettler AT 261. Анализ изотопного состава таких образцов проводили с использованием метода EA-IRMS.

Во всех образцах концентрация углерода существенно превышала концентрацию азота. Например, на один атом азота в молекуле кокаина и морфина приходится 17 атомов углерода, а в героине 21 атом углерода. Поэтому при определении изотопного состава азота необходимая навеска для листьев конопли и порошков наркотических средств составляла 0,5–1,5 мг, а при определении изотопного состава углерода была достаточной навеска образца равная 0,5 мг. Концентрация наркотических веществ, растворенных в метаноле, была 2 мг/мл при определении изотопного состава углерода и 18–20 мг/мл при определении изотопного состава азота. Пробу объемом 1 мкл вводили в хроматограф с использованием устройства автоматического ввода проб A200S. Каждый образец анализировали не менее 3 раз. Идентификация пиков на хроматограммах, зарегистрированных на изотопном масс-спектрометре Delta Plus в конфигурации GC-C-IRMS (детектирование по ионам с массой 44 и 28), проводили с использованием времен удерживания, полученных с помощью газового хроматографа/масс-спектрометра HP 5973 в тех же условиях хроматографии.

Были проанализированы 15 образцов кокаина, 5 образцов героина и 1 образец морфина из Колумбии, три образца героина из Кореи, один образец героина из Афганистана и 8 образцов листьев конопли из России и Украины. Результаты определения изотопного состава углерода и азота листьев конопли представлены в табл. 1.25.

Таблица 1.25

Результаты определения изотопного состава азота и углерода образцов листьев конопли (S — стандартное отклонение, n — число измерений)

№	Регион	Сорт	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$	$S, \text{‰}$	n	$\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}, \text{‰}$	$S, \text{‰}$	n
1	Брянская область	Глуховский зеленец	−27,72	0,21	4	1,83	0,27	4
2	Мордовская республика	ЮСО-27 зеленец	−26,54	0,16	5	−3,17	1,60	5
3	Курская область	Кавказский зеленец	−27,19	0,25	4	1,93	0,30	5
4	Татарская республика	Кавказский зеленец	−26,50	0,21	5	2,04	0,23	5
5	Сумская область	ЮСО-19 зеленец	−27,65	0,23	5	5,70	0,14	5
6	Приморский край		−26,43	0,16	5	5,17	0,14	4
7	Ставрополье		−28,38	0,12	4	9,65	0,25	4
8	Кабардино-Балкария		−28,12	0,14	4	4,13	0,34	3

Как видно из таблицы, изотопные отношения углерода изменяются в узком интервале от $-28,38\text{‰}$ до $-26,43\text{‰}$, а изотопные отношения азота изменяются в более широком диапазоне значений от $-3,17\text{‰}$ до $9,65\text{‰}$. Стандартные отклонения результатов измерения составляют $0,12\text{--}0,25\text{‰}$ для углерода и $0,14\text{--}0,37\text{‰}$ для азота. Листья конопли из Мордовской республики оказались более неоднородными по структуре, чем другие образцы, что привело к большему разбросу результатов измерений. Данные по изотопному составу углерода и азота листьев конопли, выращенной в различных регионах России и на Украине, получены впервые. Изменения изотопного состава, вероятно, связаны с региональным изменением свойств почв и природно-климатических условий произрастания растений. Так, изотопное отношение азота листьев конопли из Ставрополья имеет наибольшее значение $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}} = 9,65\text{‰}$, а из Мордовской республики наименьшее $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}} = -3,17\text{‰}$, для изотопных отношений углерода зависимость противоположная: $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -28,38\text{‰}$ и $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -26,54\text{‰}$, соответственно.

В табл. 1.26 приведены изотопные отношения углерода и азота героина, морфина и соединений, присутствующих в этих образцах. С помощью газового хроматографа/масс-спектрометра HP 5973 в составе об-

разцов героина были обнаружены ацетилкодеин и моноацетилморфин, в кокаине — кодеин и лидокаин. Ряд примесей не удалось идентифицировать. Видно, что изотопные отношения углерода героина изменяются в интервале значений от $-38,25\text{‰}$ до $-32,74\text{‰}$, а изотопные отношения азота в более широком диапазоне от $-6,69\text{‰}$ до $7,15\text{‰}$. Как правило, изотопный состав углерода моноацетилморфина по сравнению с изотопным составом углерода героина обогащен тяжелым изотопом ^{13}C , а изотопный состав углерода ацетилкодеина — легким изотопом углерода. Абсолютное стандартное отклонение результатов определения изотопных отношений углерода составляло $0,09\text{--}0,25\text{‰}$, азота несколько больше — $0,17\text{--}0,21\text{‰}$, а при измерении микропримесей стандартное отклонение достигало $0,45\text{‰}$.

Таблица 1.26

Результаты определения изотопного состава азота и углерода героина, морфина и соединений, присутствующих в образцах

№	Название наркотического вещества	Метод анализа	Героин		Моноацетилморфин	Ацетилкодеин
			$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}, \text{‰}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}, \text{‰}$
1	Героин (Колумбия)	GC-C-IRMS	$-34,95$	$0,78$	$-32,73$	$-34,53$
2	Героин (Колумбия)	GC-C-IRMS	$-32,74$	$0,92$	$-32,96$	$-34,64$
3	Героин (Колумбия)	GC-C-IRMS	$-35,94$	$1,08$	$-34,17$	$-36,25$
4	Героин (Колумбия)	EA-IRMS	$-34,61$	$1,29$		
5	Героин (Колумбия)	EA-IRMS	$-33,26$	$-6,69$		
6	Морфин (Колумбия)	GC-C-IRMS	$-33,38$	$0,42$		
7	Героин (Корея)	GC-C-IRMS	$-35,74$	$-2,93$	$-33,99$	$-36,15$
8	Героин (Корея)	GC-C-IRMS	$-38,25$	$7,15$		
9	Героин (Корея)	EA-IRMS	$-35,11$	$-1,95$		
10	Героин (Афганистан)	GC-C-IRMS	$-35,35$		$-32,21$	$-34,33$

Как видно из табл. 1.27, героин из Кореи имеет значения $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ более отрицательные ($-38,25 \div -35,11\text{‰}$), чем героин из Колумбии ($-35,94 \div -32,74\text{‰}$), а значения $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$ более положительные ($-1,95 \div 7,15\text{‰}$) и ($-6,69 \div 1,29\text{‰}$), соответственно. При сравнении

Таблица 1.27

Результаты определения изотопных отношений углерода и азота образцов кокаина методами EA-IRMS и GC-C-IRMS (t_α — коэффициент Стьюдента при доверительной вероятности α , S — стандартное отклонение, n — общее число измерений)

№	Происхождение кокаина	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, ‰		$\Delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, ‰	$\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$, ‰		$\Delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$, ‰
		EA-IRMS	GC-C-IRMS		EA-IRMS	GC-C-IRMS	
1	Колумбия, округ Коара	−35,47	−35,76	0,29	−2,19	−1,73	−0,46
2	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	−36,14	−36,00	−0,14	−3,39	−2,62	−0,77
3	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	−34,81	−34,54	−0,27	−5,60	−5,32	−0,28
4	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	−35,82	−36,93	1,11	−6,10	−6,23	0,13
5	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	−36,04	−35,86	−0,18	−3,70	−3,22	−0,48
6	Колумбия, деп. Сев. Сантандер	−35,72			−3,70		
7*	Колумбия, деп. Какета	−30,85'	−37,31	6,46'	−9,93'	−5,90	−4,03'
8*	Колумбия, деп. Какета	−35,46'	−36,49	1,03'	−3,69'	−1,64	−2,05'
9	Колумбия, деп. Уила	−35,51	−36,31	0,80	−4,88	−4,33	−0,55
10	Колумбия, деп. Кундина-Марка	−34,96	−34,84	−0,12	−9,71	−10,50	0,79
11	Колумбия, деп. Валье	−36,05	−36,08	0,03	−5,15	−7,14	1,99
12*	Колумбия, деп. Бойаха	−34,47'	−36,30	1,83'	−10,36'	−8,93	−1,43'
13	Колумбия, деп. Гауйяр	−34,88			−4,53		
14*	Колумбия	−35,84	−36,38	0,54	−3,09'	−1,96	−1,03'
15*	Колумбия	−39,92'	−35,53	−4,39'	−5,24	−4,63	−0,61
Среднее $\pm t_\alpha S / \sqrt{n}$ ($\alpha = 0,95$)		−35,48 $\pm 0,32$	−36,03 $\pm 0,46$	0,55	−4,77 $\pm 1,2$	−4,93 $\pm 1,7$	0,16

' — величины не учитывались при расчете средних значений из-за присутствия посторонних примесей в пробе; * — образцы, в которых присутствовали примеси

$$\Delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}(\text{EA-IRMS}) - \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}(\text{GC-C-IRMS});$$

$$\Delta^{15}\text{N}_{\text{air}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{air}}(\text{EA-IRMS}) - \delta^{15}\text{N}_{\text{air}}(\text{GC-C-IRMS}).$$

полученных изотопных отношений углерода героина с литературными данными [51] можно сделать вывод, что по изотопным отношениям углерода героин из Колумбии, Кореи и Афганистана (табл. 1.26) отличается от героина, произведенного в Нигерии, Таиланде, Пакистане и Индии, но не различим с героином из Турции.

Наличие характерных примесей в наркотических веществах позволяет повысить достоверность идентификации и определения их происхождения. Например, для героина из Афганистана (номер 10) и из Колумбии (номер 3) разность значений $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ для соединения героин составляет 0,59‰ и увеличивается для моноацетилморфина до 1,96‰ и до 1,92‰ для ацетилкодеина. Для более серьезных выводов база данных по изотопному составу углерода и азота должна быть расширена. Кроме того, изотопный состав углерода героина зависит от изотопного состава углерода уксусного ангидрида, используемого при производстве героина. В дальнейшем нами планируется проводить деацетилирование героина, что позволит более точно определять географический регион происхождения героина и сравнивать результаты, полученные разными исследователями.

Так как при измерении изотопных отношений азота наркотических веществ методом GC-C-IRMS требуется большой объем пробы, то это приводит к перегрузке капиллярной колонки и искажению формы аналитического пика. Возможно также неполное сгорание разделенных компонентов в окислительном реакторе. Влияние этих факторов на правильность измерения изотопного состава в литературе не освещено. Поэтому были проведены параллельные измерения образцов кокаина методами EA-IRMS и GC-C-IRMS, так как известно, что элементный анализатор позволяет сжигать навески до 10 мг и более. Для проведения изотопного анализа азота методом EA-IRMS требуются пробы наркотических веществ массой 1 мг. Чистоту образцов проверяли на хроматомасс-спектрометре HP 5973. Результаты определения изотопных отношений углерода и азота кокаина методами EA-IRMS и GC-C-IRMS приведены в табл. 1.27.

Номера в табл. 1.27, помеченные звездочкой, соответствуют образцам кокаина, загрязненным посторонними примесями. Значения изотопных отношений, помеченные в табл. 23 знаком ', не учитывались при расчете средних величин. Как видно из табл. 23, для чистого кокаина из Колумбии средние значения $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, определенные разными методами, отличаются незначительно, в пределах 0,55‰. При этом изотопный состав углерода, определенный методом EA-IRMS, был сдвинут в сторону более положительных значений по сравнению с результатами, полученными методом GC-C-IRMS. Различие между средними величинами азота $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$, определенными двумя методами, было еще меньше — 0,16‰. Результаты, приведенные в статье [55] для диацетилморфина, были хуже: различие в значениях $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$ для двух методов составляло 0,49‰. Такое различие в результатах измерения

изотопного состава азота двумя методами в статье никак не объясняется. Кроме того, из табл. 1.27 видно, что при определении изотопных отношений азота применение больших концентраций наркотических веществ (20 мг/мл) приводит к перегрузке капиллярной колонки, но это не вызывает фракционирования изотопов азота и углерода. Количество углерода в пробе при этом составляет $3 \cdot 10^{-6}$ г.

Согласно табл. 1.27 при доверительной вероятности 0,95 образцы кокаина из различных регионов Колумбии имеют среднее значение изотопных отношений $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -35,48 \pm 0,32\text{‰}$ и $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}} = -4,77 \pm 1,2\text{‰}$. Сравнение полученных результатов с данными статьи [49] показало, что по изотопному составу углерода различие составляет примерно в 1‰, а по изотопному составу азота различия практически нет. Полученные расхождения в результатах измерения изотопных отношений углерода могут быть объяснены либо различной пробоподготовкой образцов, приводящей к фракционированию изотопов углерода, либо это связано с недостаточной чистотой анализируемых проб. В работе [49] также показано, что несмотря на близкие климатические условия произрастания коки в различных регионах Южной Америки по изотопному составу углерода и азота можно различить образцы кокаина из Колумбии, Боливии, Перу и Эквадора.

Изотопный состав углерода шести опийных алкалоидов в 6 образцах опия, полученных из различных провинций Афганистана, представлены в табл. 1.28.

Таблица 1.28

Изотопный состав углерода $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) отдельных компонентов опия из провинций Афганистана

Алкалоид	Провинции Афганистана					
	Нангархар	Фарах	Нимруз	Гильменд	Бадахшан	
					С поливом	Без полива
Меконин	−34,87	−29,89	−29,91	−35,01	−36,19	−36,53
Кодеин	−36,46	−33,77	−34,44	−33,82	−36,67	−36,41
Морфин	−31,05	−32,16	−31,89	−31,56	−32,20	−32,26
Тебаин	−31,99	−31,46	−31,59	−32,09	−32,53	−32,27
Папаверин	−38,28	−38,72	−38,68	−38,10	−39,60	−37,67
Носкапин	−34,97	−34,45	−33,39	−32,61	−34,99	−33,76

Изотопный состав углерода для разных алкалоидов изменяется в сравнительно большом интервале значений $\delta^{13}\text{C}$ от −39,6 до −29,91‰. Наименьшие вариации значений $\delta^{13}\text{C}$ отмечаются для морфина и тебаина, а наибольший диапазон вариаций $\delta^{13}\text{C}$ характерен для меконина из разных провинций Афганистана. Для провинции Бадахшан наличие или отсутствие полива сказывается только на изотопном составе угле-

рода папаверина и носкапина. Хотя, как известно [49], обильный полив приводит к уменьшению $\delta^{13}\text{C}$ растений.

Полученные результаты определения изотопных отношений углерода и азота листьев конопли, кокаина, героина, морфина позволяют считать, что при создании достаточного банка данных перспективна сопоставительная изотопия $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ для выявления географического источника наркотических веществ.

Для определения изотопных отношений углерода и азота чистых наркотических веществ можно применять любой из двух методов EA-IRMS и GC-C-IRMS, а при изотопном анализе загрязненных образцов необходимо использовать только метод GC-C-MS, позволяющий выделять и анализировать конкретные соединения.

Взрывчатые вещества. В современных условиях актуальной задачей является идентификация взрывчатых веществ в связи с проблемой их хищения с заводов и различных структур Минобороны, а также в связи с необходимостью проведения криминалистической экспертизы при расследовании преступлений с применением взрывчатых веществ.

Из многих способных к взрыву соединений в качестве взрывчатых веществ и компонентов взрывчатых смесей применяют лишь 2–3 десятка веществ. Основные из них — нитросоединения (тринитротолуол, тетрил, гексоген, октоген, нитроглицерин, тетранитропентаэритрит (ТЭН), нитроклетчатка, нитрометан и др.) и соли азотной кислоты, особенно нитрат аммония. Как правило, эти вещества применяют не в чистом виде, а в виде смесей, например смеси октогена, гексогена и тэна с тротилом, нитроглицерина с нитроглицеролом, диэтиленгликольдинитратом и нитроклетчаткой, тротила с нитратом аммония, смеси аммиачной селитры с жидкими (например, соляровым маслом) и порошкообразными (например, древесной мукой, порошкообразным алюминием) горючими веществами.

Во многих случаях только определение изотопного состава легких элементов (C, N, O) основных соединений, входящих в состав взрывчатых веществ, позволяет идентифицировать их место производства. На результаты изотопного анализа отдельных соединений не влияют загрязняющие примеси и добавки к взрывчатым веществам. При этом изотопный состав азота наиболее информативен для взрывчатых веществ, содержащих нитрогруппы.

Современные методы аналитической химии, используемые в криминалистических лабораториях (в основном, это хроматографические, хроматомасс-спектрометрические методы, спектрометрия подвижности ионов), позволяют идентифицировать присутствие широкого спектра взрывчатых веществ с достаточно высокой чувствительностью 10^{-8} – 10^{-6} г в пробе [56]. Однако эти методы обычно не дают информацию о возможных источниках взрывчатых веществ или не позволяют правильно идентифицировать образцы, принадлежащие к одной партии. Во многих лабораториях мира (Defence Science Technology Laboratory — DSTL, Англия) уже длительное время применяется

газовая изотопная масс-спектрометрия (IRMS) для изотопного анализа взрывчатых веществ. Доказано, что этот метод имеет большие потенциальные возможности для получения уникальной информации о происхождении, чистоте и условиях производства как взрывчатых веществ, так и их компонентов. В настоящее время проводятся исследования по изотопным вариациям легких элементов взрывчатых веществ, произведенных на промышленных и подпольных предприятиях, а также по фракционированию элементов в зависимости от условий производства. Все взрывчатые вещества по их взрывной способности можно разделить на несколько групп и в каждой группе необходимо определять изотопный состав легких элементов.

Исследование коммерческого гексогена (RDX) и подпольного нитроглицерина (NG) подтверждают, что по результатам изотопного анализа $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ можно идентифицировать взрывчатые вещества. Метод IRMS может быть успешно применен для взрывчатых веществ ТЭН (PETN) и пероксидов. Специалисты Университета Рединга (Англия) считают необходимым для обеспечения контроля за распространением наркотиков и взрывчатых веществ создание банка данных изотопного состава легких элементов наркотических и взрывчатых веществ из различных регионов мира.

Таким образом, в развитых странах проводятся широкомасштабные изотопные исследования легких элементов взрывчатых веществ. В России такие работы ранее не проводились. В Англии регулярно проводятся конференции «Forensic Science in Isotope Mass Spectrometry», на которых подробно обсуждаются результаты криминалистических экспертиз с использованием изотопных исследований. Организаторы этих конференций предлагают сотрудничество со всеми заинтересованными организациями.

Таблица 1.29

Изотопный состав углерода и азота ТНТ

№ образца	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, ‰	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$, ‰
1	–29,86	+4,54
2	–29,74	–2,48
3	–29,72	–8,41
4	–29,51	–5,65

На приборе DELTA Plus с элементным анализатором EA 1110 нами были проанализированы образцы тринитротолуола, изготовленные на 4 заводах России. Измеряли изотопный состав азота $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ и углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Было показано (табл. 1.29), что все образцы ТНТ имеют близкий изотопный состав углерода, а изотопный состав азота изменяется в широких пределах от –8,41 до +4,54‰. Поэтому изотопный состав азота образцов ТНТ является наиболее информативной величиной для

идентификации образцов, как принадлежащих одному из заводов-изготовителей. Хроматограммы проб воздуха с парами образцов ТНТ, представленных в табл. 1.29, показаны на рис. 1.56. Хроматограммы были получены на хроматографе ЭХО-М [57] с многоканальной колонкой. Как видно из рис. 1.56, хроматограммы четырех образцов ТНТ по виду очень похожи друг на друга и их нельзя раздельно идентифицировать. Однако по изотопному составу образцы хорошо различимы.

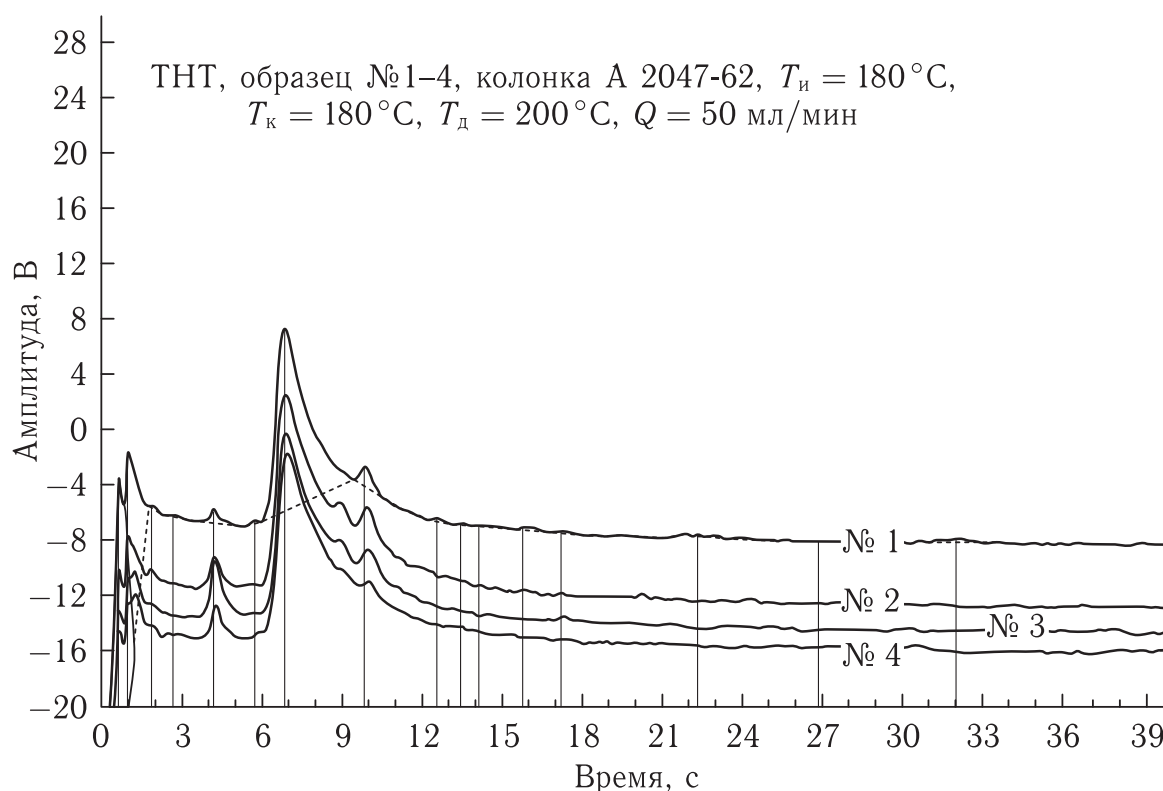


Рис. 1.56. Хроматограммы проб воздуха с парами образцов ТНТ, представленных в табл. 25. $T_{\text{и}}$, $T_{\text{к}}$, $T_{\text{д}}$ — температуры инжектора, колонки и детектора соответственно

Таким образом, имеющиеся экспериментальные данные и мировой опыт позволяют сделать вывод о перспективности разработки методик проведения изотопного анализа взрывчатых веществ и создания банка данных изотопных отношений легких элементов во взрывчатых веществах различных производителей.

Алкольные напитки. Актуальность идентификации этилового спирта, произведенного из пищевого сырья, связана с тем, что его часто подменяют синтетическим этиловым спиртом, запрещенным к употреблению согласно «Списку сильнодействующих и ядовитых веществ» Постоянного Комитета по контролю наркотиков (от 01.07.2002 г.). В настоящее время единственным стандартом для определения фальсификации водок и спиртов является ГОСТ Р 51786–2001 «Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности». Однако использование этого метода не позволяет сделать однозначного заключения о природе этиловых спиртов в тех

случаях, когда спирты хорошо очищены. Идентификация примесей еще более усложняется в случае смешивания спиртов различной природы (экономически выгодного из-за низкой себестоимости синтетического спирта). Одним из эффективных методов определения природы этилового спирта является сцинтилляционная жидкостная спектроскопия. Естественное содержание радиоуглерода, который образуется в верхних слоях атмосферы из атмосферного азота под действием нейтронной компоненты космических лучей, переменное. Участвуя в цикле обмена с биомассой Земли, ^{14}C усваивается живыми растениями. В этаноле, изготавливаемом из растительного сырья нового урожая, содержится строго определенное количество ^{14}C . Это эталонное значение, называемое ежегодным эталонным значением, определяется каждый год по результатам анализов, проводимых Бюро по эталонным данным ЕЭС совместно с научно-исследовательским центром в г. Испра. Очевидно, что в синтетических спиртах, полученных путем синтеза из нефти или из природного газа, вследствие полного радиоактивного распада концентрация ^{14}C равна нулю. Радиоактивность спиртов определяли на жидкостном сцинтилляционном ультра-низкофоновом спектрофотометре Quantilus 1220 (производитель Финляндия). Исследуемую пробу спирта с концентрацией не менее 85% смешивали с жидким сцинтиллятором Optifase Highsafe-3, в котором возникают световые вспышки при прохождении β -частиц в результате распада ^{14}C . Вспышки регистрируются фотоэлектронным усилителем ФЭУ. Для исследований были приготовлены образцы этилового спирта различной природы — синтетического марки «А», «О», технического, зернового ректифицированного различных производителей и различных марок — «Люкс», «Экстра». Образцы были приготовлены с различным соотношением частей синтетического и зернового спиртов. В табл. 1.30 приведены результаты

Таблица 1.30

Результаты анализов образцов спиртов, выполненные методами жидкостной сцинтилляционной спектрометрии и GC-C-IRMS

№ пробы	Наименование пробы	Радиоактивность, Бк/г (углерода)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, ‰
1	Спирт зерновой ректифицированный «Люкс»	6,3	–25,30
2	Спирт синтетический марки «А», ГОСТ Р 51999	0	–34,77
3	Смесь спиртов: зерновой ректифицированный «Люкс» и синтетический марки «А» в соотношении 1:1	2,9	–29,95
4	Смесь спиртов: зерновой ректифицированный «Люкс» и синтетический марки «А» в соотношении 3:1	4,4	–28,28

анализов образцов, выполненные методами жидкостной сцинтилляционной спектрометрии и GC-C-IRMS.

Результаты, полученные методами жидкостной сцинтилляционной спектрометрии и IRMS, хорошо согласуются между собой. Эти результаты подтвердили не только происхождение проанализированных образцов, но и соотношение в них доли синтетического и зернового спирта. Воспроизводимость результатов измерения радиоактивности углерода не превышала 0,03. Время анализа составило 3–4 ч.

Как видно на рис. 1.57, соотношение содержания стабильного изотопа ^{13}C и радиоизотопа ^{14}C для этиловых спиртов различной природы имеет вид линейной зависимости. Важным свойством метода IRMS является возможность установления не только происхождения этилового спирта, но и источника его получения (зерно, кукуруза, свекла, сахарный тростник и др.). В табл. 1.31 приведены результаты измерения ^{13}C в образцах этиловых спиртов различного происхождения, выполненные методом IRMS.

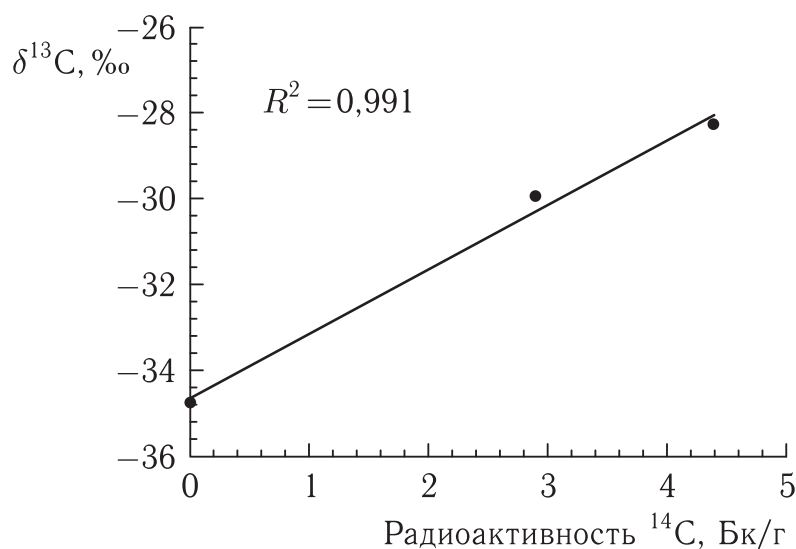


Рис. 1.57. Соотношение между изотопным составом углерода $\delta^{13}\text{C}$ и радиоактивностью спиртов

Так, например, результаты анализа проб №1 и 2 из табл. 1.31 свидетельствуют, что исходное сырье в этих пробах — зерно из различных климатических зон, так как содержание ^{13}C в них несколько различается по абсолютной величине. Содержание изотопа ^{13}C в образцах технического спирта (пробы №5 и 6) свидетельствует о том, что они не относятся к синтетическим спиртам. Использование метода изотопной масс-спектрометрии позволило по изотопному составу углерода этилового спирта различного сырьевого происхождения выявить тот факт, что синтетический этиловый спирт имеет наименьшую величину $\delta^{13}\text{C}$, а этиловый спирт из сахарного тростника — наибольшую.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными А. М. Зякуна [58], в работе которого установлены значения ^{13}C для зерновых спиртов на основе ржи, равные $-22,1 \pm -21,9\text{‰}$, на основе пшеницы — $-25,6 \pm -23,8\text{‰}$, кукурузы — $-15,6 \pm -15,1\text{‰}$.

Таблица 1.31

Результаты определения изотопного состава углерода и дейтерия этанола спиртов различного происхождения

№ пробы	Наименование пробы	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, ‰	(D/H) ₂ , ppm	(D/H) ₃ , ppm
1	Спирт этиловый зерновой ректификованный «Экстра»	–23,15	129,9	100,5
2	Спирт этиловый зерновой ректификованный «Люкс»	–23,88	126,2	96,5
3	Спирт-сырец синтетический марки «О»	–33,98	147,4	132,9
4	Спирт синтетический высшей очистки	–32,86	144,4	129,7
5	Спирт технический ГОСТ 17298	–24,33	135,0	108,0
6	Спирт технический ГОСТ 18200–87	–24,30	134,6	106,2
7	Спирт тростниковый	–12,67		

Для определения природы происхождения этилового спирта успешно применяется спектрометрия ядерного магнитного резонанса на ядрах дейтерия (^2H -ЯМР), позволяющая количественно определять общее и селективное содержание дейтерия в каждом из положений в молекуле, где он находится [58]. Результаты по количественному определению содержания дейтерия в CH_2D - и CHD -группах представлены в табл. 1.31. Из этой таблицы видно, что спирты различного происхождения хорошо различаются не только по изотопному составу углерода, но и по содержанию дейтерия в различных функциональных группах.

Таким образом, установление природы этилового спирта и определение относительного содержания каждого из спиртов (синтетического, зернового) в смесях возможно с достаточной надежностью и достоверностью с помощью методов жидкостной сцинтилляционной спектрометрии, масс-спектрометрии стабильных изотопов и спектрометрии ядерного магнитного резонанса на ядрах дейтерия. Однако наиболее чувствительным и экспрессным методом является масс-спектрометрия стабильных изотопов, позволяющая проводить анализ в течение 10 мин.

Эффекты фракционирования изотопов, сопровождающие органический синтез

Природные углеводороды в основном образуются при термическом разрушении органического вещества (термогенезис) или при микробных процессах (бактериогенезис). Абиогенные углеводороды образуются при восстановлении диоксида углерода. Полагают, что эти процессы могут иметь место при охлаждении магмы [59], в геотермальных системах при взаимодействии воды с горными породами и при серпентинизации ультраосновных пород [60, 61]. Основным критерием абиогенности углеводородов, синтезированных из водорода и оксидов углерода (по реакции Фишера–Тропша), считается, согласно работам [62–64], спе-

цифическое (реверсивное) распределение изотопного состава углерода в легких насыщенных углеводородах: $\delta^{13}\text{C}_{\text{C1}} > \delta^{13}\text{C}_{\text{C2}} > \delta^{13}\text{C}_{\text{C3}} > \delta^{13}\text{C}_{\text{C4}}$. Вторичные процессы, включая миграцию, смешивание и окисление биогенных газов, могут также приводить к реверсивному распределению изотопов углерода в углеводородных газах.

Оказалось, что углеводороды, извлеченные из щелочных пород Хибин, и углеводороды, синтезированные в электрическом разряде из метана (кинетически контролируемая реакция полимеризации), имеют тем более низкую величину изотопных отношений углерода, чем выше в них число атомов углерода [63], т. е. $\delta^{13}\text{C}_{\text{C1}} > \delta^{13}\text{C}_{\text{C2}} > \delta^{13}\text{C}_{\text{C3}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{C4}}$. Это обусловлено тем, что при полимеризации молекулы $^{12}\text{CH}_4$ легче вступают в реакцию с образованием углеводородных цепей, чем молекулы $^{13}\text{CH}_4$. Аналогичное распределение изотопов углерода было найдено в легких углеводородах, извлеченных из метеоритов [62]. Совсем недавно похожее распределение изотопов было найдено в газах из глубоких скважин, пробуренных в Канадском щите [62]. Углеводороды газонефтяных месторождений (C1–C4) всегда имеют противоположное распределение $\delta^{13}\text{C}$, т. е. имеет место увеличение изотопного отношения с ростом углеродного числа [62, 65]. Такое же изотопное распределение углерода имеют газы, полученные при низко- и средне-температурном пиролизе высокомолекулярной органики. Это происходит потому, что предпочтительно разрушаются более слабые связи $^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$, а не $^{12}\text{C}-^{13}\text{C}$.

Насколько нам известно, изотопные эффекты в реакции каталитического синтеза Фишера–Тропша до настоящего времени не исследованы сколько-нибудь детально [66]. Предполагается, что углеводороды (УВГ) по этой реакции образуются следующим образом:



Изучение изотопных эффектов реакции Фишера–Тропша важно не только для изотопной геохимии углерода, но может оказаться полезным при изучении механизмов катализа в нефтехимическом синтезе.

Экспериментальная часть. Катализаторы готовили путем сплавления в дуговом разряде магнетита и промотирующих добавок, в качестве которых использовали оксид алюминия, оксид калия и оксид кальция. Образцы катализаторов различались относительным содержанием этих компонентов. В некоторых случаях в состав катализатора дополнительно вводили оксид хрома или каолин. Перед использованием в синтезе катализаторы восстанавливали водородом при 5 МПа и 450 °С в течение 12 ч. Катализаторы после восстановления пирофорны, поэтому все последующие операции с ними проводили в защитной атмосфере CO_2 . Синтез проводили в проточных установках с реакторами объемом 100 мл, заполненными катализатором (гранулы железа размером 2–3 мм), при давлении 3 МПа, температуре 250–270 °С и скорости потока газовой смеси $\text{N}_2 + \text{H}_2 + \text{CO}$ (2.5 : 1.5 : 1) около 40 л/ч на входе в реактор. Этот состав моделировал газ, получаемый конверсией метана

Таблица 1.32

Химический состав (об.%) газообразных продуктов, синтезированных по реакции Фишера–Тропша с использованием модифицированных железных катализаторов: $T = 230^{\circ}\text{C}$, $P = 30$ атм

Соединение	Серия	
	1	2
N_2	65,1	63,3
CO	0,84	3,90
H_2		
CO_2	8,98	7,16
CH_4	1,64	2,62
C_2H_4	0,47	0,1
C_2H_6	0,20	0,54
C_3H_6	0,31	0,08
C_3H_8	0,11	0,26
$\sum\text{C}_4$	0,32	0,22
$\sum\text{C}_5$	0,32	0,21
$\sum\text{C}_6$	0,15	0,11
$\sum\text{C}_7$	0,10	0,08
$\sum\text{C}_8$	0,07	0,08

в воздухе. Реакция выходит на стационарный уровень примерно через 20 ч после начала эксперимента. В этих условиях конверсия исходного CO составляет 90–95%. Отбирали две пробы газообразных продуктов в нестационарном режиме и две–три пробы в стационарном режиме. В конце эксперимента отбирали также пробы образовавшейся в эксперименте воды и жидких углеводородных продуктов. Как правило, вода содержит до 5 масс.% растворимых органических соединений, в основном спиртов. Анализ состава легких углеводородов проводили на хроматографе CHROM-5 по стандартной методике с использованием пламенно-ионизационного детектора, азота в качестве газа-носителя и колонки с модифицированным Порапаком Q. Определение изотопного состава углерода исходного CO и продуктов реакции Фишера–Тропша CO_2 , CH_4 , C_2H_4 , C_2H_6 , C_3H_6 , C_3H_8 , C_4H_8 и C_4H_{10} осуществляли на изотопном масс-спектрометре DELTA-Plus, соединенном с капиллярным хроматографом HP 6890. Пробу объемом 100 мкл вводили в хроматограф с помощью газового шприца и разделяли с помощью капиллярной колонки PoraPlot Q (30 м × 0,32 мм). Условия анализа были следующими: газ-носитель гелий, температура узла ввода проб 100°C , начальная температура термостата 40°C , конечная температура термостата 180°C , скорость нагрева $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Пробы для анализа отбирались в герметичные пробирки вместимостью 10 мл с плотными резиновыми пробками. Воспроизводимость результатов определения изотопного со-

Таблица 1.33
Изотопный состав углерода CO₂ и углеводородов до C₄ (‰ PDB) в продуктах синтеза Фишера–Тропша на разных стадиях процесса синтеза

Соединения	Время отбора, ч					
	10	20	30	40	50	70
Серия 1						
CO ₂	–6,3	–11,7	–19,8	–11,1	–1,3	+1,1
CH ₄		–41,6	–39,4	–42,2	–43,3	–44,9
C ₂ H ₄		–43,2	–42,7	–38,5	–35,2	–40,1
C ₂ H ₆		–46,8	–44,7	–44,7	–42,6	–46,0
C ₃ H ₆		–46,2	–46,1	–44,5	–40,7	–41,7
C ₃ H ₈		–41,1	–41,3	–44,6	–44,4	–46,2
1-C ₄ H ₈		—	—	—	–46,3	–44,9
2-C ₄ H ₈		–44,5	–46,3	–44,5	–42,1	–44,9
<i>n</i> -C ₄ H ₁₀		–48,4	–48,7	–46,4	–44,7	–45,0
<i>изо</i> -C ₄ H ₁₀		–47,2	–47,0	–44,1	–50,9	–44,1
Серия 2						
CO ₂	–7,4	–13,3				–13,0
CH ₄		–43,6				–43,7
C ₂ H ₄		—				—
C ₂ H ₆		–43,8				–43,3
C ₃ H ₆		—				—
C ₃ H ₈		–44,7				–45,9
1-C ₄ H ₈		–45,5				–46,2
2-C ₄ H ₈		–42,6				–40,3
<i>n</i> -C ₄ H ₁₀		–44,7				–45,0
<i>изо</i> -C ₄ H ₁₀		—				—

става углерода составляла 0,3–0,5‰. Состав газовой фазы в стационарном режиме до C₈ представлен в табл. 1.32. Вообще говоря, при достаточно высокой конверсии CO химический состав газовой фазы практически не зависит от времени отбора. Однако в самом начале процесса, пока в системе еще не образовалось достаточного количества воды, первым в газе появляется CO₂ за счет рекомбинации CO на поверхности катализатора. Серия экспериментов 1 проведена с катализатором, при использовании которого в преобладающем количестве синтезируются олефины. Серия 2 проведена с катализатором, на котором в преобладающем количестве синтезируются парафины. В проведенных сериях опытов концентрация легких углеводородов монотонно уменьшается с ростом углеродного числа.

Как видно из табл. 1.33, в процессе реакции Фишера–Тропша образуются CO₂, предельные и непредельные углеводороды, изотопный состав

углерода которых зависит от времени протекания реакции в стационарном режиме для серии 1 и практически не зависит от времени для серии 2. Кроме того, как правило, для соединений серии 1 предельные углеводороды имеют более низкие величины изотопных отношений углерода, чем непредельные углеводороды с одинаковым числом атомов углерода.

Исходный изотопный состав углерода CO составляет $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -25\text{‰}$.

В табл. 1.33 приведен изотопный состав углерода CO_2 и углеводородов до C_4 в продуктах синтеза Фишера–Тропша на разных стадиях процесса синтеза, а в табл. 1.34 усредненный изотопный состав углерода для соединений с одинаковым числом атомов углерода. Практически наблюдается уменьшение величины $\delta^{13}\text{C}$ с увеличением числа атомов углерода. После 70 ч работы катализатора в серии 1, по-видимому, происходит его загрязнение, что приводит к уменьшению величины $\delta^{13}\text{C}$ для метана и ее увеличению для других соединений (рис. 1.58). Особенно сильно возрастает величина $\delta^{13}\text{C}$ для углерода в составе CO_2 , она изменяется на 10‰.

Таблица 1.34

Усредненный изотопный состав углерода CO_2 и углеводородов ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, ‰) в продуктах синтеза Фишера–Тропша на разных стадиях синтеза

Соединения	Время отбора, ч					
	10	20	30	40	50	70
Серия 1						
CO_2	−6,3	−11,7	−19,8	−11,1	−1,3	+1,1
C_1		−41,6	−39,4	−42,2	−43,3	−44,9
C_2		−44,3	−43,3	−41,0	−37,5	−42,6
C_3		−44,7	−44,8	−44,5	−41,7	−42,2
C_4		−47,2	−47,7	−45,2	−46,3	−44,7
Серия 2						
CO_2	−7,4	−13,3				−13,0
C_1		−43,6				−43,7
C_2		−43,8				−43,3
C_3		−44,7				−45,9
C_4		−44,6				−44,7

На рис. 1.59 показано изменение усредненного по времени изотопного состава углерода для соединений с одинаковым количеством атомов углерода в зависимости от этого количества. Для соединений, образованных в серии 1, наблюдается следующая закономерность:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{C}_1} \approx \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_2} > \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_3} > \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_4}.$$

Для соединений, образованных в серии 2, наблюдаются практически такие же закономерности, за исключением изотопного состава углерода соединений C_4 :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{C}_1} \approx \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_2} > \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_3} < \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_4}.$$

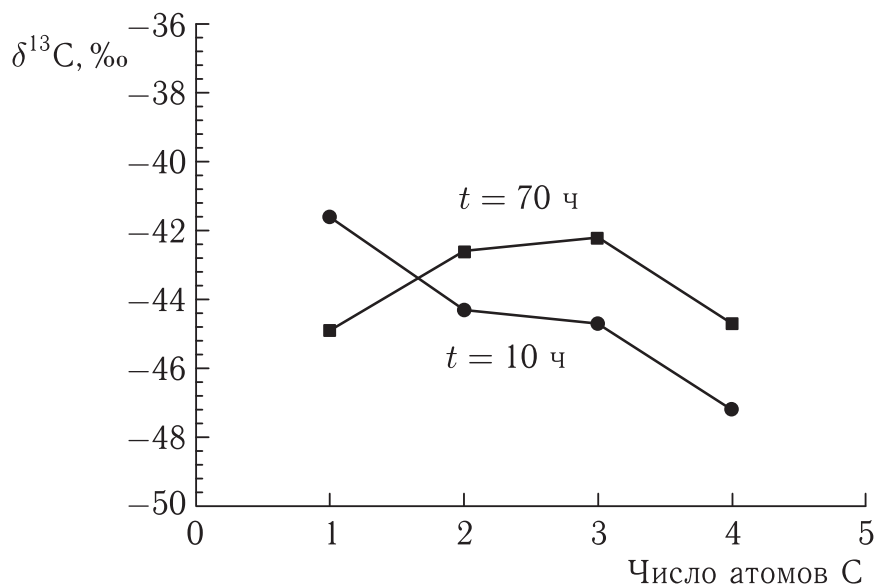


Рис. 1.58. Зависимость усредненного по времени изотопного состава углерода синтезированных соединений от числа атомов углерода для двух серий экспериментов с различными катализаторами

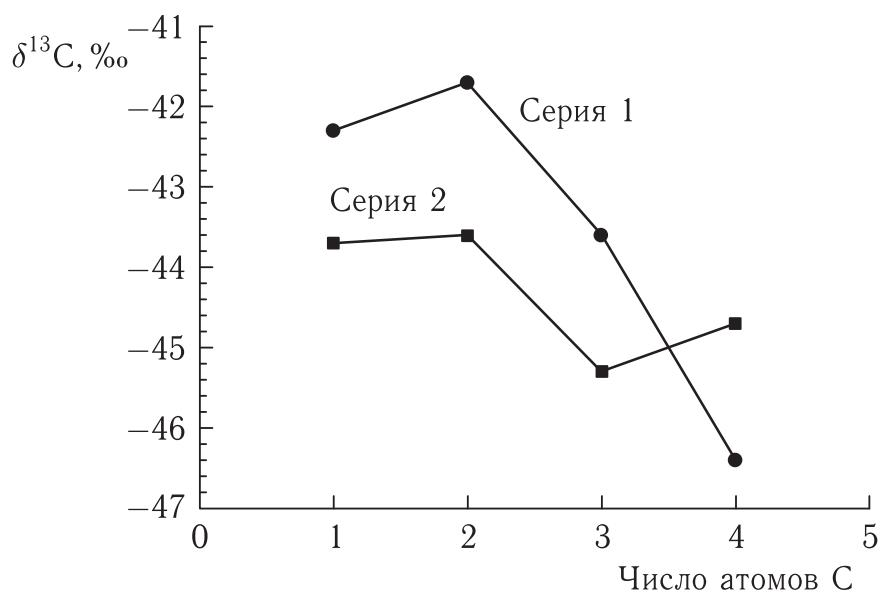


Рис. 1.59. Зависимость изотопного состава углерода синтезированных соединений от числа атомов углерода и времени проведения синтеза

Аналогичное изменение изотопного состава углерода наблюдается для глубинных газов [67]. Распределение изотопного состава углерода в глубинных углеводородных газах Ен-Яхинского месторождения (глубина скважины 7163 м) показано на рис. 1.60.

Концентрация углеводородных газов и изотопный состав углерода газов Ен-Яхинского месторождения приведены в табл. 1.35. Как видно из таблицы, углерод метана имеет очень большую величину $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -19,4\text{‰}$. Все остальные углеводородные газы имеют значительно меньшее значение $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$. Таким образом, было показано, что при abiогенном синтезе углеводородов по реакции Фишера–Тропша происходит возрастание величин изотопных отношений углеводородов

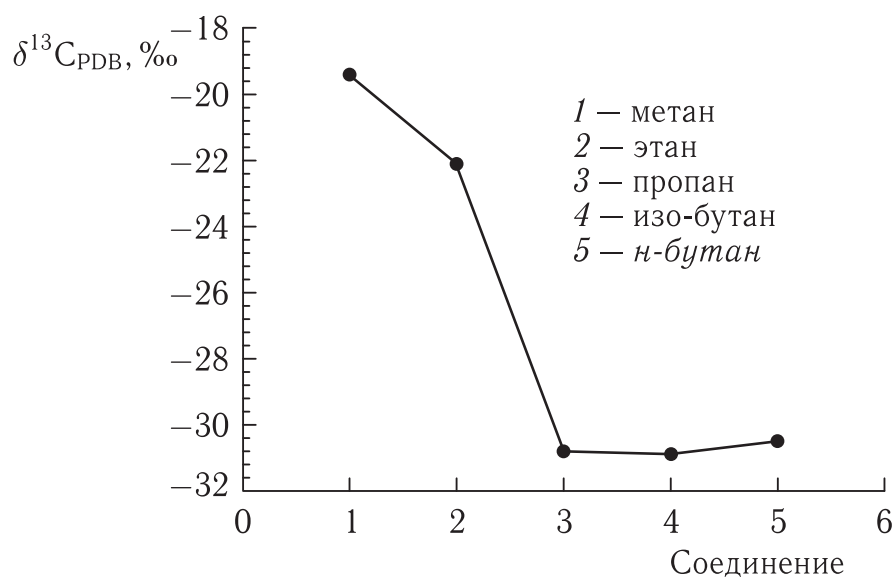


Рис. 1.60. Изменение изотопного состава углерода с увеличением числа атомов углерода в соединениях углеводородных газов Ен-Яхинского месторождения

Таблица 1.35
Концентрация углеводородных газов и изотопный состав углерода газов Ен-Яхинского месторождения

	Метан	Этан	Пропан	изо-Бутан	н-Бутан
Концентрация, об. %	92,93	0,67	0,20	0,03	0,17
$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, ‰	-19,4	-22,1	-30,8	-30,9	-30,5

с увеличением числа атомов углерода в соединениях. Кроме того, по изменению изотопного состава углерода синтезированных соединений можно судить о процессах, происходящих в реакторе во время синтеза.

Изотопные эффекты в углистых хондритах

Одним из направлений в решении проблемы распространенности химических форм абиогенного органического вещества в протопланетном облаке является исследование вариаций изотопного состава углерода в битумоидной и керогенной составляющих органического вещества метеоритов. При этих исследованиях важно знать первичный изотопный состав углерода в протопланетном облаке. В качестве объекта для его определения мы использовали наноалмаз метеоритов, представляющих собой наименее измененное вещество Солнечной системы, являющееся источником информации о ядерных и химических процессах в окрестностях звезд [68]. Средний размер алмазных зерен в метеоритах составляет 2,6 нм. Для проведения исследований выделяли наноалмазы из углистого метеорита Борискино CM2, который претерпел в минимальной степени термальный метаморфизм, и из термально метаморфизованного метеорита Ефремовка CV3. Метеорит Ефремовка относится к восстановительной группе метеоритов, содержание наноалмазов

в которых незначительно (0,004 масс.%) по сравнению с содержанием наноалмазов в неметаморфизированных метеоритах (0,14 масс.%).

Выделение наноалмазов из метеоритов включало следующие этапы: а) удаление силикатной и металлической фаз растворением в кислотах HCl и смеси HCl + HF; б) разрушение трудно растворимых фаз, содержащих углерод и серу, обработкой щелочами, бихроматом калия, перекисью водорода и хлорной кислотой; в) удаление растворимых в фосфорной кислоте минеральных фаз, таких как SiC и шпинели. Последней стадией было отделение зерен наноалмаза от сохранившихся других кислотостойких фаз. С этой целью была использована уникальная способность таких зерен алмаза находиться в щелочной среде в коллоидном состоянии. Эта способность обусловлена наличием на поверхности зерен наноалмаза карбоксильных групп. По этой причине полученный на конечном этапе химического травления осадок был суспендирован в аммиачном растворе при помощи ультразвуковой обработки. Полученную суспензию затем центрифугировали, в результате чего образовывался коллоидный раствор наноалмазов, обедненный другими кислотостойкими фазами. Коллоидный раствор алмаза был высушен, в результате чего был получен характерный для наноалмаза метеоритов светло-коричневый осадок.

Анализ изотопного состава углерода в аликвотах наноалмаза был проведен на элементном анализаторе EA 1110, соединенном с изотопным масс-спектрометром DELTA Plus. Для этого навески массой примерно 0,2 мг помещали в оловянные капсулы. Для гарантированного окисления пробы дополнительно в оловянные капсулы с образцом добавляли 1–3 мг окислителя CeO_2 . Методику изотопного анализа углерода наноалмазов разрабатывали при использовании стандартного образца графита USGS 24 с известным изотопным составом углерода $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -16,0\text{‰}$ и порошка ультрадисперсных детонационных алмазов УДА-6 с размером кристаллитов 4–10 нм. Так как эти образцы недостаточно быстро сгорают в элементном анализаторе, их сжигали с дополнительным окислителем. Экспериментально было доказано, что 1–2 мг CeO_2 было достаточно, чтобы обеспечить полное сгорание этих образцов. Определенный нами изотопный состав углерода графита USGS 24 совпал в пределах погрешности с заданной величиной $\delta^{13}\text{C}$. Воспроизводимость результатов изотопного анализа углерода была достаточно высокой и составляла величину 0,1‰. Результаты определения изотопного состава углерода приведены в табл. 1.36.

Как видно из таблицы, изотопный состав углерода для наноалмаза метеорита Борискино CM2 имеет значение $\delta^{13}\text{C} = (-33,67 \pm 0,1)\text{‰}$, а для наноалмаза метеорита Ефремовка CV3 — $\delta^{13}\text{C} = (-31,89 \pm 0,1)\text{‰}$. Из приведенных в таблице данных следует, что имеет место явное возрастание величин $\delta^{13}\text{C}$ наноалмаза при переходе от слабо термально метаморфизованного метеорита (Борискино) к сильно метаморфизованному метеориту (Ефремовка). Эта тенденция подтверждает вывод работ

Таблица 1.36

Изотопный состав углерода нанодиазмов метеоритов и международного стандарта графита при различной температуре окислительного реактора элементного анализатора

Образец	Температура сжигания, °C	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, ‰	S, ‰
Нанодиазм метеорита Борискино CM2	1020	–33,67	0,10
	900	–29,17	0,16
Нанодиазм метеорита Ефремовка CV3	1020	–31,89	0,10
	900	–27,69	0,39
Синтетический алмаз УДА-6	1020	–25,96	0,10
Графит USGS 24	1020	–15,90	0,13

[69, 70] об изменении изотопного состава углерода нанодиазма метеоритов в зависимости от степени их метаморфизма. Наиболее вероятно, что эти изменения обусловлены наличием в веществе родительских тел метеоритов нескольких популяций зерен нанодиазма, имеющих разный изотопный состав углерода и различающихся по термостабильности.

Измерение выхода углерода нанодиазма проводили на основании результатов сжигания атропина ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$). Выход углерода при окислении образцов нанодиазма составил не менее 80 масс.%. Отсутствие 100%-го выхода углерода при сжигании образцов нанодиазма скорее всего обусловлено такими факторами, как наличие существенного количества водорода в нанодиазме (до 5 масс.%), а также присутствие различных химических функциональных групп на поверхности зерен.

Понижение температуры окислительного реактора элементного анализатора до 900 °C приводит к частичному сгоранию зерен нанодиазма. При этом центральная часть зерен догорает позже. Из результатов изотопного анализа углерода нанодиазмов при пониженной температуре следует, что либо периферийная часть нанодиазмов, которая сгорает быстрее, имеет более тяжелый изотопный состав углерода, чем центральная их часть, либо пленки нанодиазмов неоднородны по своему составу и структуре, что сказывается на скорости их сгорания. Вывод о том, что нанодиазные пленки являются неоднородными по своим физико-химическим свойствам и по изотопному составу углерода, представляется более вероятным. Кроме того, нельзя исключить, что нанодиазм состоит из нескольких популяций зерен, одна из которых является досолнечной, а другие имеют солнечное происхождение.

Определение изотопного состава водорода и кислорода воды, изотопные эффекты при испарении

Изотопный состав кислорода и водорода воды может существенно изменяться в процессе фазового перехода воды [17, 71]. Физической

причиной этого явления служит различие в давлении пара изотопных составляющих воды, что приводит к фракционированию ^{18}O и ^2H при испарении, конденсации, таянии и замерзании воды. Такое разделение изотопов оказывается тем больше, чем ниже температура фазового перехода. Таким образом, пар, испаряющийся при более высоких температурах, будет иметь относительно более высокие значения изотопных отношений. При испарении вода обогащается тяжелыми изотопами в жидкой фазе, а при конденсации и замерзании происходит уменьшение изотопного состава водяного пара или воды. Изотопные зависимости, сопровождающие испарение и конденсацию водяного пара, определяются двумя факторами: изотопным равновесным разделением на границе фаз и изотопным распределением в результате диффузии и конвекции в граничном слое одной или обеих фаз [72].

Так как изотопный состав кислорода и водорода водяного пара зависит от условий испарения, мы изучали эффект фракционирования изотопов кислорода при наличии на поверхности воды пористой губки или многоканальной полимерной пленки. Такая система моделирует испарение жидкости из пористых горных пород.

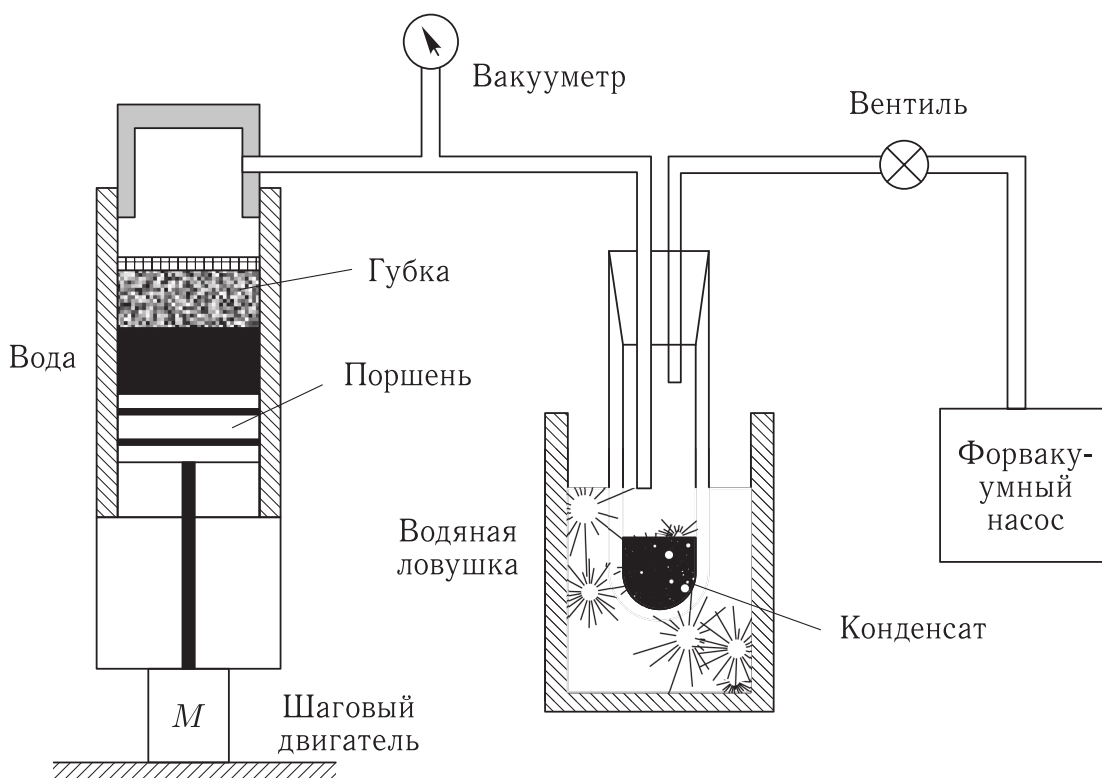


Рис. 1.61. Эскиз установки для испарения воды

Для моделирования испарения была создана экспериментальная установка, изображенная на рис. 1.61. Эта установка включала шаговый двигатель Mdrive 23, который перемещал поршень в цилиндре с внутренним диаметром 2 см. Под действием избыточного давления вода (объем воды 10–12 см³) насыщает неподвижную поролоновую губку толщиной 1–2 см, имеющую поры диаметром примерно 0,5 мм. При

увеличении давления вода поднимается по порам губки все выше, достигая ее поверхности. Благодаря непрерывному давлению поршня, вода будет оставаться на поверхности губки несмотря на ее испарение.

Поворот вала двигателя на 1 шаг приводит к перемещению поршня на 2,5 мкм. Перед проведением экспериментов воду и губку тщательно обезгаживали с помощью форвакуумного насоса с тем, чтобы пузырьки воздуха не могли блокировать движение жидкости по губке и не создавали неконтролируемое парциальное давление в газовой фазе. Предварительно губку пропитывали водой. При комнатной температуре давление над губкой было равно давлению насыщенных паров воды (около 20 мм. рт. ст). Пары воды конденсировались в водяной ловушке, охлаждаемой сухим льдом. За время 20 мин конденсировался объем воды, равный 0,25 мл. Эксперимент длился от 30 до 60 мин. Аналогичная система была создана для изучения испарения воды через многоканальную пленку толщиной 10 мкм с диаметром пор 0,25 мкм.

Таблица 1.37

Изотопный состав кислорода воды и конденсата при различных условиях ее испарения

№ опыта	Толщина губки, см	$\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$, ‰			$\Delta_1 = \delta_1 - \delta_2$, ‰	$\Delta_2 = \delta_1 - \delta_3$, ‰
		Исходная вода, δ_1	Вода из губки, δ_2	Конденсат, δ_3		
1	2, сжатие	-14,91	-14,47	-24,38	-0,44	9,47
2	1, сжатие	-14,91	-14,07	-24,76	-0,84	9,85
3	2, без сжатия	-11,39	-9,80	-21,77	-1,59	10,38
4	1, без сжатия	-11,39		-21,68		10,29
5	без губки	-15,23		-23,63		8,4

Измерения изотопного состава кислорода и водорода воды проводили на изотопном масс-спектрометре DELTA Plus XP, соединенном с пиролизатором ТС/ЕА при температуре 1450 °С. Воспроизводимость результатов измерения изотопного состава кислорода и водорода составляла 0,3–0,4 ‰ и 1 ‰ соответственно. Результаты по изучению фракционирования кислорода воды при испарении в различных условиях приведены в табл. 1.37. Из таблицы видно, что наличие губки на поверхности воды приводит к уменьшению величин изотопных отношений кислорода конденсата (Δ_2) по сравнению с испарением без губки. По-видимому, это связано с затрудненным испарением воды. Поджатие губки и выход воды на ее поверхность приводит к небольшому увеличению изотопных отношений кислорода конденсата по сравнению с результатами для несжатой губки, так как испарение из сжатой губки несколько облегчается. Результаты изотопного анализа кислорода практически не зависят от толщины губки, так как измерения статистически неразличимы. В процессе испарения изотопный состав кис-

лорода воды в губке также изменяется, увеличивается $\delta^{18}\text{O}$. Особенно сильно это заметно в случае свободной губки. Конденсат, образованный при испарении через свободную, несжатую губку, имеет наименьшую величину $\delta^{18}\text{O}$.

При наличии пористой многоканальной пленки на поверхности воды происходит ее испарение практически без фракционирования. Изотопный состав кислорода конденсата облегчается только на 1,3‰ (рис. 1.62). Это происходит вследствие того, что малые диаметры каналов и быстрое испарение воды обуславливают такую ситуацию, что диффузионные и конвективные процессы в приповерхностном слое воды не успевают выравнять изменение изотопного состава молекул воды, согласно критерию Стентона [73].

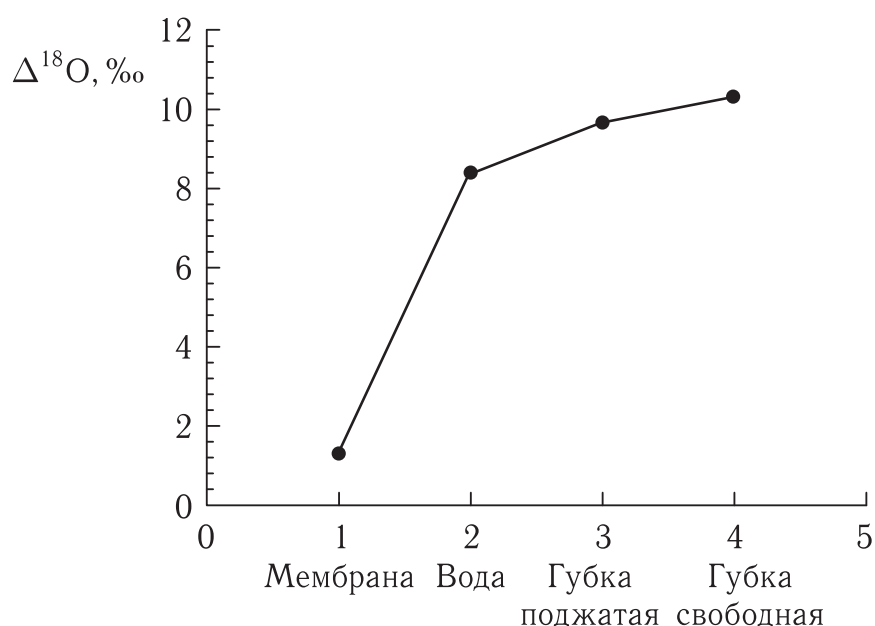


Рис. 1.62. Изменение изотопного состава кислорода конденсата воды при ее испарении через губку и многоканальную мембрану

Таким образом, установлено, что при испарении воды изменение изотопного состава конденсата сильно зависит от состояния ее поверхности.

Эффект уменьшения значений $\delta^{18}\text{O}$ и δD конденсата при испарении воды широко используется для получения воды с изотопным составом, аналогичным воде из горных источников [74]. Кроме того, имеются сведения о том, что облегченная вода обладает рядом полезных свойств: имеет высокую биологическую активность, что доказано экспериментами на растениях [75], обладает противоопухолевыми свойствами [76, 77]. Отмечено значительное увеличение продолжительности и качества жизни онкологических больных, улучшение работы важнейших систем организма. Питьевая вода с содержанием дейтерия 105 ppm продается в качестве профилактического противоопухолевого средства в США и некоторых странах Европы.

Для оценки изотопного состава кислорода и водорода столовой воды, производимой зарубежными фирмами, и воды из природных ис-

точников нами был измерен изотопный состав кислорода и водорода различных образцов воды. Полученные данные приведены в табл. 1.38.

Таблица 1.38

Результаты изотопного анализа кислорода и водорода отобранных проб воды

№	Образец воды	Изотопный состав воды	
		δD_{SMOW} , ‰	$\delta^{18}O_{SMOW}$, ‰
1	«Perrier», Франция	–41,96	–6,87
2	«Vittel», Франция	–51,96	–6,91
3	«Selters», Германия	–53,80	–6,57
4	«Премьер», Уфимский район	–102,18	–12,42
5	«Кургазак», Салаватский район	–100,73	–12,65
6	«Красный ключ», Нуримановский район	–96,52	–10,86

Изотопный состав проб столовой воды иностранного производства, представленный в табл. 1.38, соответствует данным работы [78]. Кроме того, полученные значения изотопного состава кислорода и водорода этих проб воды близки к изотопному составу водопроводной воды в этих странах [79]. Между тем, столовая вода из природных горных источников Башкирии имеет облегченный изотопный состав. Это означает, что полезные качества столовой воды могут определяться не только ее химическим составом и известностью фирмы производителя, но и изотопным составом, который часто не указывается в сертификате.

Распределение изотопов углерода в сложных органических соединениях биологического происхождения (нефть, углеводородные газы)

Проблемы идентификации источника нефти, определение генетических связей между залежами являются весьма актуальными в органической геохимии. Изотопные геохимические исследования в сочетании с физико-химическими методами анализа широко используются для выявления генезиса нефтяных залежей, направлений миграции и формирования залежей.

При изучении проблемы источников нефти многопластовых месторождений северо-востока Русской платформы (Шумавское Верхнекамской впадины, Батырбайское и Бардымское Башкирского свода) и Предуральского прогиба были осуществлены изотопно-геохимические исследования нефтей Прикамья. Для этого было проведено измерение изотопного состава углерода нефтей, выделенных фракций повышающейся полярности и концентратов нормальных алканов. Изотопный анализ углерода нефтей и их фракций проводили на изотопном масс-спектрометре DELTA Plus, соединенном с элементным анализатором EA 1110 (EA-IRMS), а изотопный анализ углерода нормальных алканов

выполняли при использовании масс-спектрометра DELTA Plus, соединенного с капиллярным хроматографом HP 6890 (GC-C-IRMS).

Условия хроматографического анализа были следующими: колонка HP-5 (30 м × 0,32 мм), температура испарителя 300 °С, начальная температура термостата 40 °С (выдержка 3 мин), конечная температура термостата 310 °С (выдержка 30 мин), программирование температуры 4 °С/мин, газ-носитель — гелий марки 60. Перед анализом пробы растворяли в гексане и нагревали до температуры 40 °С для полного растворения фракций. С помощью шприца пробы объемом 1 мкл вводили в хроматограф. Воспроизводимость результатов изотопного анализа углерода для метода EA-IRMS составляла 0,1–0,2‰, а для метода GC-C-IRMS — 0,2–0,3‰.

В результате проведенных исследований была установлена специфичность нефти пашийских терригенных отложений верхнего девона Бардымского месторождения, характеризующейся максимальным содержанием изотопа ^{13}C в гексан-бензольной фракции и несколько повышенным — в бензол-этанольной фракции (рис. 1.63). При этом видно подобие изотопно-фракционных кривых нефтей визейских отложений Шумовского и Батырбайского месторождений с нефтью среднекаменноугольных отложений Шумовского месторождения.

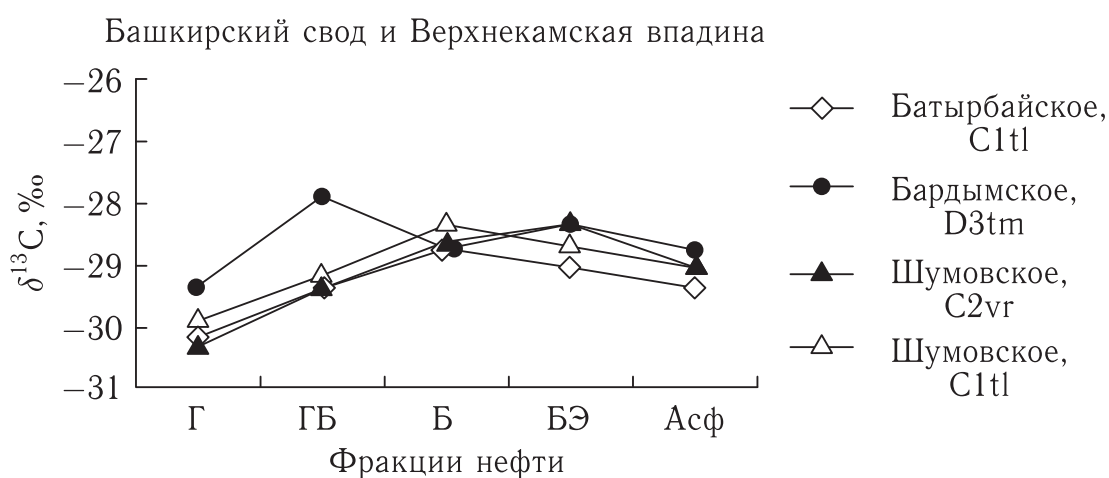


Рис. 1.63. Изотопный состав углерода нефтей и фракций повышенной полярности Башкирского свода и Верхнекамской впадины

Распределение стабильных изотопов углерода по фракциям повышенной полярности нефтей нижнекаменноугольных терригенных и девонских карбонатных отложений Белопашинской площади практически аналогичны, что соответствует сходству других геохимических параметров и их генетической однотипности (рис. 1.64).

На рис. 1.65 видно, что графики зависимости изотопного состава углерода нормальных алканов от числа атомов углерода для двух залежей карбона Шумовского месторождения практически одинаковы и отличаются от графиков для нефтей карбона Батырбайского и девона Бардымского месторождений. Подобны между собой и графики изотопного со-

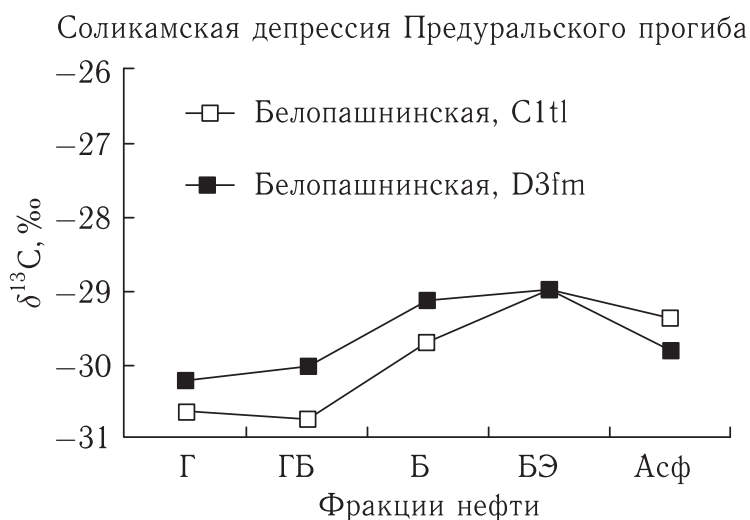


Рис. 1.64. Изотопный состав углерода нефтей и фракций повышенной полярности Соликамской депрессии Предуральяского прогиба. Фракции нефти: Г — гексановая, ГБ — гексан-бензольная, Б — бензольная, БЭ — бензол-этанольная, Асф — асфальтены

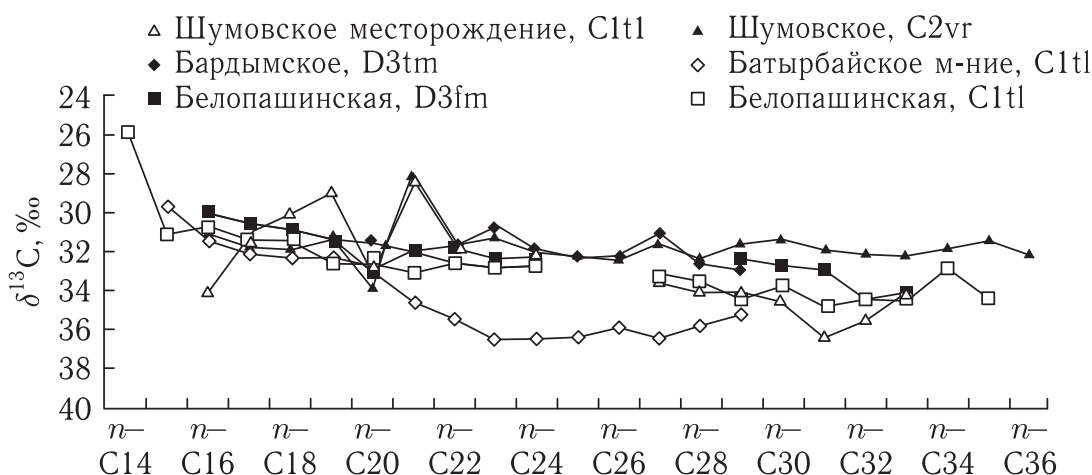


Рис. 1.65. Изотопный состав углерода *n*-алканов нефтей Прикамья

става углерода нормальных алканов для двух залежей Белопашинской площади.

Следовательно, сопоставление изотопного состава углерода нормальных алканов позволяет уточнить результаты корреляции по фракциям повышенной полярности.

В табл. 1.39 приведен состав углеводородных газов месторождений Восточной Сибири. Изотопный состав углерода этих соединений измеряли методом GC-C-IRMS. Условия хроматографического анализа были следующими: колонка Poraplot Q (30 м × 0,32 мм), температура испарителя 100 °С, начальная температура термостата 40 °С (выдержка 3 мин), конечная температура термостата 180 °С (выдержка 15 мин), программирование температуры 4 °С/мин, газ-носитель — гелий марки 60. Газовую пробу объемом 50–300 мкл вводили в хроматограф с помощью газоплотного шприца. Воспроизводимость результатов изотопного анализа углерода составляла 0,2–0,3 ‰.

Таблица 1.39

Компонентный состав проб нефтяного газа

№	Месторождение	Скважина	Пласт	Интервал перфор., м	Содержание, мол. %							
					CO ₂	CH ₄	C ₂ H ₆	C ₃ H ₈	И-C ₄ H ₁₀	Н-C ₄ H ₁₀	И-C ₅ H ₁₂	И-C ₅ H ₁₂
1	Болотное	1	Ю ₁ ¹	2444–2447	0,92	40,41	6,04	19,55	11,39	10,69	4,61	3,18
2	Вахское	646	Ю ₁ ^{2–3}	2434–2452	1,35	48,69	9,43	20,75	3,99	10,09	1,00	2,10
3	Герасимовское	УПН			1,00	82,16	5,04	5,61	1,18	1,88	0,35	0,33
4	Гуаринское	182		2130–2134	4,86	68,19	3,82	10,85	1,75	3,29	0,58	0,47
5	Западно-Ключевское	68	Ю ₁ ^{1–2} +Ю ₁ ³		1,36	63,72	6,79	12,02	4,20	6,00	2,05	1,58
6	Западно-Полуденное	УПН			0,58	88,30	2,10	1,57	1,12	1,61	0,80	0,92
7	Ломовое	356	Ю ₁	2667–2672	2,02	63,17	11,30	13,00	2,47	4,41	1,09	1,17
8	Приграничное	6	Б ₁	1918–1922	0,30	69,47	2,54	8,80	3,48	7,93	1,87	1,81
9	Северо-Васюганское	18	Ю ₁ ^{2–3}	2306–2316	0,73	86,48	5,27	2,51	0,41	0,32	0,03	0,01
10	Северное	305	Б ₃		0,08	96,25	0,80	0,36	0,22	0,19	0,07	0,05
11	Советское	УПСВ-9			0,26	84,95	2,67	5,23	1,35	2,39	0,44	0,45
12	Средне-Нюрольское	131	Ю ₁ ^{3–4}	2400–2419	2,22	65,42	6,75	11,18	3,17	5,21	1,46	1,13
13	Чкаловское	23	Pz		4,47	63,97	8,61	11,24	3,04	4,28	1,18	1,00
14	Чкаловское	91	Ю ₁	2748–2757	4,62	61,93	6,97	11,53	1,85	6,15	1,51	2,06
15	Южно-Мыльджинское	221	Б ₁₀	2128–2132	2,38	79,71	5,63	5,73	1,74	0,78	0,19	0,09
16	Южно-Черемшанское	На ФНД			0,65	61,76	4,35	13,16	3,31	8,78	1,98	2,31

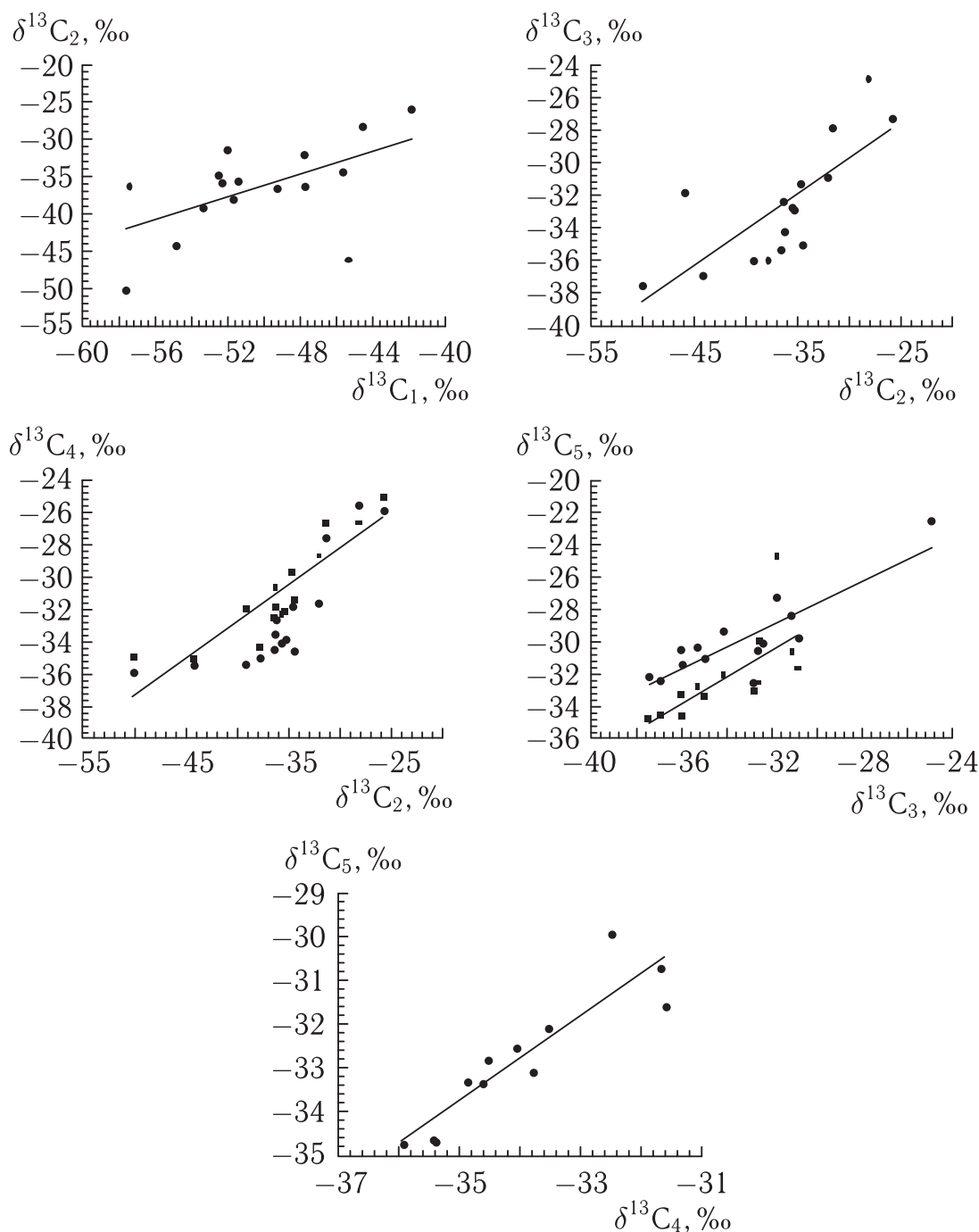


Рис. 1.66. Связь между величинами $\delta^{13}\text{C}$ индивидуальных углеводородов в составе попутных нефтяных газов

На рис. 1.66 показана корреляция изотопного состава углерода индивидуальных углеводородов. Для пары $\text{CH}_4\text{--C}_2\text{H}_6$ коэффициент корреляции составляет $R^2 = 0,32$, для $\text{C}_2\text{H}_6\text{--C}_3\text{H}_8$ $R^2 = 0,57$, для $\text{C}_2\text{H}_6\text{--C}_4\text{H}_{10}$ $R^2 = 0,78$ (● — *n*-бутан, ■ — *изо*-бутан), для $\text{C}_3\text{H}_8\text{--C}_5\text{H}_{12}$ $R^2 = 0,49$ (*n*-пентан) и $R^2 = 0,73$ (♦ — *изо*-пентан), для $n\text{-C}_4\text{H}_{10}\text{--}n\text{-C}_5\text{H}_{12}$ $R^2 = 0,83$. Между изотопным составом углерода метана и этана корреляция не очень высока, в то время как корреляционная связь между более тяжелыми углеводородами достаточно высокая (от 0,73 до 0,83). Однако, если исключить точки низким значением $\delta^{13}\text{C}$ для этана

($\delta^{13}\text{C} = -44 \div -50\text{‰}$), то имеет место увеличение корреляционного коэффициента. Аналогичные результаты получены и для углеводородных газов Пермского Приуралья в работе [62].

Таким образом, между изотопным составом углерода углеводородных газов существует корреляционная связь, которая может быть нарушена непредсказуемым значением изотопного состава углерода этана в некоторых месторождениях. Кроме того, было установлено, что монотонное утяжеление изотопного состава углерода с ростом числа атомов углерода в молекуле углеводородов нарушается для этана из некоторых месторождений.

Определение изотопного состава углерода в коллагене костей древних захоронений

Абсолютная хронология культур эпохи бронзы Евразийской степи строится на анализе радиоуглеродных данных. Отобранные из четких стратифицированных комплексов разнообразные углесодержащие материалы — кости животных и людей, древесина и уголь, растительные остатки (семена, фрагменты подстилок, текстиль) и органическое вещество почв датируются радиоуглеродным методом для получения исторических интервалов существования археологических культур. Однако есть много факторов, оказывающих влияние на радиоуглеродный возраст образцов разных углесодержащих материалов. Одним из них является влияние так называемого резервуарного эффекта [80, 81]. Часто образцы, взятые из одного археологического контекста, имеют разный радиоуглеродный возраст.

Резервуарный эффект относится к вариациям изотопного состава углерода внутри резервуара, из которого организм черпает свой углерод [80]. Эффект морского резервуара хорошо изучен [82–84]. Однако до сих пор влияние эффекта пресноводного водоема на радиоуглеродный возраст потребителей продуктов речного происхождения изучен недостаточно [80, 84, 85]. Исследования последних лет [80, 81, 86] показали, что потребление пищи водного происхождения — рыбы, моллюсков — приводит к тому, что коллаген костей человека и животных оказывается намного древнее в результате влияния резервуарного эффекта. Коррекция данных на влияние эффекта пресноводного водоема весьма затруднена из-за его большой региональной и временной изменчивости [80].

Задачами данного исследования является изучение влияния резервуарного эффекта на радиоуглеродный возраст коллагена костей человека раннекатакомбной, восточноманычской катакомбной и ямно-катакомбной культур.

Согласно существующим международным соглашениям, на которых базируется радиоуглеродное датирование [82], при расчете возраста образцов учитывается значение периода полураспада ^{14}C , вносится поправка на изотопное фракционирование, далее радиоуглеродный воз-

раст переводится в календарный путем калибровки ^{14}C -даты. Для ее проведения рекомендуется использовать программу INTCAL04 [87].

Изотопное фракционирование подразумевает, что радиоуглеродный возраст образцов с тем же календарным возрастом, но различными значениями $\delta^{13}\text{C}$ окажется тоже различным, с отклонением в 16 лет на каждый 1‰ $\delta^{13}\text{C}$. Содержание радиоуглерода $^{14}\text{C}_c$ рассчитывается из количества измеренного $^{14}\text{C}_m$ с учетом изотопного фракционирования по формуле:

$$^{14}\text{C}_c = ^{14}\text{C}_m \left[1 - \frac{2(\delta^{13}\text{C} + 25)}{1000} \right]. \quad (1.10)$$

Коэффициент 2 учитывает удвоение изотопного фракционирования для $\delta^{14}\text{C}$ по сравнению с $\delta^{13}\text{C}$ [82].

С разработкой в 1970–1980 гг. инструментальных методов анализа химического состава коллагена, выделенного из костей древнего человека [88], стало возможным определение основных компонентов диеты на основе изучения соотношения стабильных изотопов азота и углерода в коллагене. Изотопный состав коллагена костей мало изменяется со временем, так как полное его обновление происходит за время 10–30 лет [89]. Измерение значения $\delta^{13}\text{C}$ — обязательная процедура для всех радиоуглеродных лабораторий. Но лишь некоторые лаборатории сегодня измеряют $\delta^{15}\text{N}$. Так как значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ коллагена костей человека и животного определяются системой питания, то по их изотопному составу можно выявить группы людей, которые в значительной степени питались рыбой. Радиоуглеродный возраст в этом случае будет определен неверно из-за влияния резервуарного эффекта.

Как видно из табл. 1.40, значения $\delta^{15}\text{N}$ имеют более положительные значения для людей, питающихся рыбой, чем для людей, потребляющих продукты наземного происхождения. Разность между соотношением изотопов в коллагене костей человека и костей животных, составляющих источник его пищи, для углерода равна примерно 5‰

Таблица 1.40

Средние значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ и резервуарный эффект, ожидаемый в коллагене костей человека и животных, при теоретическом 100%-м пищевом рационе

Системы питания	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	Резервуарный эффект, лет
Растения группы С3	–21	+5	0
Мясо травоядных животных (растения группы С3)	–18	+8	0
Растения группы С4	–7	+5	0
Морепродукты	–13	+18	400
Речная рыба	–24	+16	1500–2500
Озерная рыба	–20	+16	500–1500

в сторону обогащения изотопом ^{13}C в костях человека [90]. Для азота эта разность составляет около 4‰ в сторону обогащения изотопом ^{15}N [89, 91].

Впервые резервуарный эффект в археологических образцах был изучен в работе [92]. Кости арктических животных и человека, время смерти которых было известно и в диете которых преобладали морские продукты (100%), были датированы радиоуглеродным методом. Все даты показали резервуарный эффект с поправкой $\Delta R = 400$ лет. В работе [86] провели параллельные датировки морских и наземных организмов, происходящих из культурных слоев древнеэскимосских селений Дежнево и Эквен на Чукотке. Они определили резервуарный эффект и разницу календарных дат морских и наземных организмов от 140 до 607 лет. Наиболее иллюстративный пример, связанный с изучением системы питания, резервуарного эффекта и его влияния на радиоуглеродный возраст, был проведен археологами, изучавшими мезолитический памятник на Балканах — в ущелье Железные ворота [84]. Они определили значения $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{14}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене костей людей, похороненных после битвы, которая состоялась в этом районе 7000 лет до н. э. В телах людей, павших в бою, застреляли наконечники стрел, сделанные из костей наземных копытных животных. Как кости человека, так и кости копытных были продатированы радиоуглеродным методом. Кости человека оказались древнее на 300–500 лет. Считается, что мнимый возраст образцов костей человека явился результатом воздействия резервуарного эффекта. В системе питания мезолитического населения, проживавшего в ущелье Железные ворота, значительное место занимала рыба из Дуная. Значения $\delta^{15}\text{N}$ для коллагена костей человека составляет +15‰, для костей наземных животных +5‰.

Коллаген из костей был химически выделен как нерастворимый в кислотах остаток по методике, описанной в работе [76]. Изотопный состав углерода и азота коллагена костей измеряли методом EA-IRMS

Таблица 1.41

Результаты масс-спектрометрических исследований коллагена костей индивидуумов ямно-катакомбной и полиритуальных групп Северо-Западного Прикаспия

Курган, погребение, пол, возраст	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	$\delta^{15}\text{N}$, ‰
Зунда-Толга-V: к. 1, п. 7, женщина 50–55 лет	–17,77	+14,93
Зунда-Толга-V: к. 1, п. 7, булавка из кости животного	–21,01	+5,36
Зунда-Толга-2: к. 2, п. 2, мужчина ≥ 50 лет	–17,24	+16,69
Му-Шарет-1: к. 8, п. 3, женщина 17–19 лет	–17,40	+15,54
Улан-Зуха: к. 3, п. 8, взрослый	–17,56	+14,45
Восточный Маныч, Левый берег, I, 1966, овца	–18,52	+9,02
Зунда-Толга-V: к. 1, п. 7, женщина 50–55 лет	–17,77	+14,93

Таблица 1.42

Результаты масс-спектрометрических исследований коллагена костей индивидов раннекатакомбной культуры Северо-Западного Прикаспия

Могильник, курган, погребение, пол, возраст	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	$\delta^{15}\text{N}$, ‰
Песчаный-V: к. 1, п. 1, женщина 25–35 лет	–18,25	+14,13
Песчаный-V: к. 2, п. 3, мужчина 40–45 лет	–18,15	+15,79
Песчаный-V: к. 3, п. 1, мужчина 45–50 лет	–17,02	+17,16
Песчаный-V: к. 3, п. 2, мужчина 40–45 лет	–21,54	+15,24
Песчаный-V: к. 1, жертвенное место 1, лошадь	–21,16	+4,66
Темрта-III: к. 1, п. 1 женщина 30–35 лет	–18,34	+14,95
Темрта-III: к. 1, п. 4, мужчина 40–45 лет	–18,15	+14,73
Темрта-III: к. 2, п. 1, мужчина (?) 45–50 лет	–17,85	+14,12
Темрта-III: к. 1, находка 7, овца	–19,47	+9,57
Бага-Бурул: к. 5, п. 6, мужчина 30–35 лет	–18,79	+12,64
Бага-Бурул: к. 5, п. 19, бык	–18,5	+9,92
Манджикины-2: к. 42, п. 1, женщина 40–45 лет	–17,16	+17,28
Манджикины-2: к. 42, п. 4, ребенок 3–4 лет	–15,29	+18,13
Манджикины-2: к. 45, п. 2, мужчина 17–20 лет	–17,10	+17,50
Манджикины-2: к. 54, п. 6, женщина 25–35 лет	–17,59	+15,04
Зунда-Толга-2: к. 1, п. 1, мужчина adultus	–17,46	+16,13
Зунда-Толга-2: к. 2, п. 3, мужчина около 35 лет	–18,62	+13,92
Зунда-Толга-5: к. 1, п. 5, мужчина senilis	–18,65	+14,03
Темрта-V: к. 1, п. 2, женщина 17–20 лет	–17,97	+12,49
Темрта-V: к. 1, п. 2, мужчина 20–25 лет	–20,60	—
Темрта-V: к. 1, п. 3, женщина 40–50 лет	–17,98	+10,73
Темрта-V: к. 1, п. 3, женщина 40–50 лет	–17,49	+15,40
Темрта-V: к. 1, п. 3, мужчина 40–50 лет	–17,74	+12,79
Темрта-V: к. 1, п. 3, мужчина 40–50 лет	–17,18	+15,61
Темрта-V: к. 1, п. 2, булавка из кости животного	–18,28	+8,75
Хар-Зуха-1: к. 5, п. 3Б, женщина senilis	–15,42	+18,10
Хар-Зуха-1 к. 7, п. 4, мужчина 30–35 лет	–18,10	+14,15
Хар-Зуха 1: к. 1, п. 5, мужчина 45–50 лет	–17,62	+15,66

Таблица 1.43

Результаты радиоуглеродного датирования образцов древесины и коллагена кости человека из раннекатакомбных погребений могильника Хар-Зуха

Курган/погребение	Материал	^{14}C -возраст, в годах от наших дней (BP)	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	$\delta^{15}\text{N}$, ‰
К. 1, п. 1	Дерево	3561 ± 308		
К. 5, п. 3А	Женщина пожилого возраста	3940 ± 70	–15,42	+18,1
К. 1, п. 5	Мужчина 45–50 лет	4059 ± 152	–17,62	+15,70

на изотопном масс-спектрометре DELTA Plus, соединенном с элементным анализатором EA 1110. Для этого отбирали пробы образцов массой 0,3–0,8 мг, которые упаковывали в оловянные капсулы и помещали в устройство ввода проб элементного анализатора. Каждый образец анализировали 3 раза и полученные результаты усредняли. Стандартное отклонение результатов измерения $\delta^{13}\text{C}$ составляло $\pm 0,2\text{‰}$, а при измерении $\delta^{15}\text{N} \pm 0,3\text{‰}$.

Результаты изотопного анализа коллагена костей человека и животных, найденных в курганах и погребениях, представлены в таблицах 1.41 и 1.42. Из таблиц видно, что в коллагене костей человека значения $\delta^{13}\text{C}$ варьируют от $-21,54$ до $-15,29\text{‰}$, а $\delta^{15}\text{N}$ — от $+10,73$ до $+18,13\text{‰}$. Соответственно, в костях травоядных животных значения $\delta^{13}\text{C}$ охватывают диапазон от $-21,16$ до $18,28\text{‰}$, а $\delta^{15}\text{N}$ — от $+4,66$ до $+9,92\text{‰}$. Масс-спектрометрические данные убедительно свидетельствуют о том, что в системе питания всех проанализированных индивидуумов большое место занимал рыбный компонент. Это и вызвало сдвиг в более древнюю область многих дат (ΔR), полученных по костям человека.

Подтверждением о постоянном рыбном компоненте в системе питания человека свидетельствуют найденные в погребениях микропластинки чешуи речной и озерной рыбы, раковины речных моллюсков.

Для ранней катакомбной культуры предположительное значение ΔR пока может быть определено по сопоставлению ^{14}C данных по коллагену кости человека и по древесине из могильника Хар-Зуха (табл. 1.43). Захоронения этого могильника очень близки по погребальному обряду и, скорее всего, были оставлены самостоятельной группой раннекатакомбного населения.

Данные табл. 1.43 свидетельствуют о резервуарном эффекте в костях погребенного человека, составляющем 400 ± 100 ^{14}C лет. Более точное определение невозможно из-за значительной ошибки в датировании древесины. Разница дат, полученная для костей человека и овцы из могильника Островной восточноманычанской катакомбной культуры составляла $\Delta R = 230 \pm 100$ ^{14}C лет. Дальнейшее проведение параллельного датирования разных углеродсодержащих образцов из погребений раннекатакомбной культуры должно уточнить поправку ΔR .

Таким образом, полученные данные позволяют ввести региональную и временную поправку ΔR на резервуарный эффект и скорректировать исторические интервалы существования культур эпохи бронзы Северо-Западного Прикаспия.

Выводы

Проведенные исследования показали пути улучшения аналитических характеристик изотопного масс-спектрометрического метода анализа стабильных изотопов. Перспективным направлением является ис-

пользование твердых электролитов в устройствах пробоподготовки для проведения изотопного анализа легких элементов. Это позволяет заменить громоздкие и не очень надежные стандартные окислительные и восстановительные реакторы на реакторы, использующие твердоэлектrolитную кислород- и водородпроводящую керамику. Тем самым появилась возможность не только проводить полное окисление сложных органических соединений, но и восстанавливать оксиды легких элементов. В дальнейшем можно будет отказаться от пиролитических приставок к IRMS, работающих при повышенных температурах (1500 °C), и от стандартных систем для разложения воды.

Таким образом, дальнейшее развитие изотопной масс-спектрометрии легких элементов связано с оптимизацией изотопного метода анализа, с новой более чувствительной электронной аппаратурой, с новыми устройствами для пробоподготовки.

Литература

1. *Eloy J. F.* Analyses chimiques semi-quantitative par spectrographie de mass a ionization par bombardement photonique // *Int. J. Mass Spectr. and Ion Phys.* 1971. — V. 16. ¹/₂. — P. 101–115.
2. *Ireland T. R.* SIMS measurement of stable isotopes // *Handbook of stable isotope analytical techniques*. — V. 1. Ed. by P. A. de Groot. Chapter 30. — P. 652–691.
3. *Сысоев А. А., Артаев В. Б., Кащеев В. В.* Изотопная масс-спектрометрия. — М.: Энергоатомиздат, 1993. — 288 с.
4. *Чунахин М. С.* Зондовые методы в искровой масс-спектрометрии. — М.: Энергоатомиздат, 1985. — 110 с.
5. *Pajo L., Tamborini G., Rasmussen G., Mayer K., Koch I.* A novel isotope analysis of oxygen in uranium oxides: comparison of secondary ion mass spectrometry, glow discharge mass spectrometry, and thermal ionization mass spectrometry // *Spectrochim. Acta*. — 2001. — V. B56. — P. 541–549.
6. *Wilson R. G.* SIMS quantification in Si, GaAs, and diamond — an update // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* — 1995. — V. 143. — P. 413–417.
7. *Williams P.* On mechanisms of sputtered ion emission // *Appl. Surface. Sci.* — 1982. — V. 13. — P. 241–259.
8. *Eiler J. M., Graham C. W., Valley J. M.* SIMS analysis of oxygen isotopes: matrix effects in complex minerals and glasses // *Chem. Geol.* — 1997. — V. 138. — P. 221–244.
9. *Riciputi L. R.* A comparison of extreme energy filtering and high mass resolution techniques for measurements of ³⁴S/³²S ratios by ion microprobe. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1996. — V. 10. — P. 282–286.
10. *Leshin L. A., Rubin A. E., McKeegan K. D.* The oxygen isotopic composition of olivin and pyroxene from CI chondrites // *Geochim. Cosmochim. Acta*. — 1997. — V. 61. — P. 835–845.
11. *Mojzsis S. J., Harrison T. M., McKeegan K. D.* Oxygen isotope evidence from ancient zircons for liquid water at the Earth's surface 4,300 Myr ago // *Nature*. — 2001. — V. 409. — P. 178–181.

12. *Larras-Regard E., Mony M. C.* Improvements in biomedical imaging by SIMS (IMS 3F, 4F, and nanoSIMS) // In: SIMS 11. G. Gillen, R., L. Lareau, J. Barnett, F. Stevie (eds.). — 1997. — P. 119–122.
13. *Fayek M., Harrison T.M., Glove M., McKeegan K.D., Coath C.D., Boles J.D.* In situ isotopic evidence for protracted and complex carbonate cementation in a petroleum reservoir, North Coles Leveem, San Joaquin Basin, California, USA // J. Sedim. Res. — 2001. — V. 71(3). — P. 454–478.
14. *Hauri E. H., Wang J., Pearson D. G., Bulanova G. P.* Microanalysis of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and N abundances in diamonds by secondary ion mass spectrometry // Chemical Geology. — 2002. — V. 185. — P. 149–163.
15. *Bulanova G. P., Pearson D. G., Hauri E. H., Griffin B. J.* Carbon and nitrogen isotope systematics within a sector-growth diamond from the Mir kimberlite, Yakutia // Chemical Geology. — 2002. — V. 188. — P. 105–123.
16. *Токарев М. И., Файнберг В. С., Ходеев Ю. С.* Современные возможности и перспективы масс-спектрометрии легких элементов // Масс-спектрометрия. — 2004. — Т. 1(3). — С. 179–190.
17. *Васильчук Ю. К., Котляков В. М.* Основы изотопной геокриологии и гляциологии. — М.: Издательство университета, 2000. — 616 с.
18. *Urey H. C.* The thermodynamic properties of isotopic substances // J. Chem. Soc. — 1947. — V. 47, No. 3. — P. 562–581.
19. *Fogel M. L., Cifuentes L. A.* Isotope fractionation during primary production. In Organic Geochemistry / Ed. by M. H. Engel, S. A. Macko. — New York and London: Plenum Press, 1993. — P. 73–220.
20. *Matthews D. E., Hayes J. M.* Isotope-ratio-monitoring gas chromatography-mass spectrometry // Analytical Chemistry. — 1978. — V. 50. — P. 1465–1473.
21. *Hayes J. M., Freeman K. H., Hoham C. H., Popp B. N.* Compound-specific isotopic analyses: a novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes // Organic Geochemistry. — 1989. — V. 16. — P. 1115–1128.
22. *Slater C., Preston T., Weaver T.* Stable isotopes and the international system of units // Rapid Communications in Mass Spectrometry. — 2001. — V. 15. — P. 1270–1273.
23. *Werner R. A., Brand W. A.* Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis // Rapid Communications in Mass Spectrometry. — 2001. — V. 15. — P. 501–519.
24. *Hachey D. L., Wong W. W., Boutton T. V., Klein P. D.* Isotope ratio measurements in nutrition and biomedical research // Mass Spectrom. Rev. — 1987. — V. 6, No. 2. — P. 289–328.
25. *Sharp Z. D., Atudorei V., Durakiewicz T.* A rapid method for determination of hydrogen and oxygen isotope ratios from water and hydrous minerals // Chemical geology. — 2001. — V. 178. — P. 197–210.
26. *Kornexl B., Gehre M., Hofling R., Werner R. A.* On-line $\delta^{18}\text{O}$ measurement of organic and inorganic substances // Rapid communications in mass spectrometry. — 1999. — V. 13. — P. 1685–1693.
27. *Merritt D. A., Freeman K. H., Ricci M. P., Studley S. A., Hayes J. M.* Performance and optimization of a combustion interface for isotope ratio monitoring gas chromatography / mass spectrometry // Analytical Chemistry. — 1995. — V. 67. — P. 2461–2473.

28. *Whiticar M. J., Eek M.* Challenges of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ measurements by CF-IRMS of biogeochemical samples at sub-nanomolar levels // New approaches for stable isotope ratio measurements: Proc. Advisory Group meeting held in Vienna, 1999, Sep. 20–23. — P. 75–95. International Atomic Energy Agency. IAEA-TECDOC-1247.
29. *Meier-Augenstein W., Hess A., Hoffman G. F., Rating D.* Evaluation of water removal and memory effect in $^{13}\text{CO}_2$ breath tests by isotope ratio mass spectrometry // *Environ. Health Stud.* — 1994. — V. 30. — P. 349–358.
30. *Ricci M. P., Merritt D. A., Freeman K. H., Hayes J. M.* Acquisition and processing of data for isotope-ratio-monitoring mass spectrometry // *Org. Geochem.* — 1994. — V. 21, No. 6/7. — P. 561–571.
31. *Merritt D. A., Hayes J. M.* Factors controlling precision and accuracy in isotope-ratio-monitoring mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 1994. — V. 66. — P. 2336–2347.
32. *Гельман Н. Э., Терентьева Е. А., Шанина Т. М., Кипаренко Л. М., Резл В.* Методы количественного элементного микроанализа. — М.: Химия, 1987. — 296 с.
33. *Мирошина В. П., Дубина В. М.* Катализатор для окислительного разложения полициклических органических соединений в условиях анализа на СНН-автомате Хьюлетт-Паккард // *Ж. аналит. химии.* — 1991. — Т. 46. Вып. 3. — С. 493–499.
34. *Перфильев М. В., Демин А. К., Кузин Б. Л., Липилин А. С.* Высокотемпературный электролиз газов. — М.: Наука, 1988. — 232 с.
35. *Таланчук П. М., Шматко Б. А., Заика Л. С., Цветкова О. Е.* Полупроводниковые и твердоэлектrolитные сенсоры. — Киев: Техника, 1992. — 222 с.
36. *Вечер А. А., Вечер Д. В.* Твердые электролиты. — Мн.: Университетское, 1998. — 109 с.
37. *Зуев Б. К., Оленин А. Ю.* Твердоэлектrolитный датчик как детектор для газохроматографического определения горючих примесей в воздухе // *Ж. аналит. химии.* — 2006. — Т. 61, №2. — С. 157–163.
38. *Somov S. I., Reinhardt G., Guth U., Gopel W.* Multi-electrode zirconia electrolyte amperometric sensors // *Solid State Ionics.* — 2000. — V. 136–137. — P. 543–547.
39. *Шкерин С. Н., Перфильев М. В.* Кинетика реакции на модельном электроде в системе Pt, O^2/O^{2-} . Зависимость электродного импеданса от температуры и состава электролита // *Электрoхимия.* — 1990. — С. 1461–1467.
40. *Кунин Л. Л., Федоров М. С.* Твердые электролиты на основе диоксида циркония в газовом анализе // *Ж. аналит. химии.* — 1990. — Т. 45, В. 3. — С. 421–433.
41. *Metcalfe I. S.* Electrochemical promotion of catalysis at metal surfaces // *Proceedings of the 26th Risø International Symposium on Materials Sciences: Solid State Electrochemistry.* — 2005. — P. 30–50.
42. *Бражников В. В.* Детекторы для хроматографии. — М.: Машиностроение. — 317 с.
43. *Iqbal M. S., Rashid F., Javed N. A.* An electrolytic device for preparation of hydrogen and oxygen from water for isotopic analysis // *Talanta.* — 1991. — V. 38. — P. 603–605.

44. Sharp Z. D., Atudorei V., Durakiewicz T. A rapid method for determination of hydrogen and oxygen isotope ratios from water and hydrous minerals // *Chemical geology*. — 2001. — V. 178. — P. 197–210.
45. Gehre M., Geilmann H., Richter J., Werner R. A., Brand W. A. Continuous flow $^2\text{H}/^1\text{H}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ analysis of water samples with dual inlet precision // *Rapid communications in mass spectrometry*. — 2004. — V. 18. — P. 2650–2660.
46. Gehre M., Hoeffling R., Kowski P., Strauch G. Sample preparation device for quantitative hydrogen isotope analysis using chromium metal // *Anal. Chem.* 1996. — V. 68. — P. 4414–4417.
47. Horita J., Ueda A., Mizukami K., Takatori I. Automatic δD and $\delta^{18}\text{O}$ analyses of multi-water samples using H_2 - and CO_2 -water equilibration methods with a common equilibration set-up. // *Appl. Radiat. Isot.* — 1989. — V. 40. — P. 801–805.
48. Brand W. A., Avak H., Seedorf R., Hofmann D., Conrad Th. New methods for fully automated isotope ratio determination from hydrogen at the natural abundance level // *Isotopes Environ. Health Stud.* — 1996. — V. 32. — P. 263–273.
49. Ehleringer J. R., Cooper D. A., Lott M. J., Cook C. S. Geo-Location of heroin and cocaine by stable isotope ratios // *Forensic Science International*. — 1999. — V. 106. — P. 27–35.
50. Галимов Э. М. Природа биологического фракционирования изотопов. — М.: Наука, 1981. — 247 с.
51. Desage M., Guilluy R., Brazier L. J. Gas chromatography with mass spectrometry or isotope-ratio mass spectrometry in studying the geographical origin of heroin // *Analytica Chimica Acta*. — 1991. — V. 247. — P. 249–254.
52. Hays P. A., Remaud G. S., Jamin E., Martin Y.-L. Geographic origin determination of heroin and cocaine using site-specific isotopic ratio deuterium NMR // *J. Forensic Sci.* — 2000. — V. 45. — P. 552–562.
53. Besacier F., Chaudron-Thozet H., Lascaux F., Rousseau-Tsangaris M. Application of gas chromatography-nitrogen isotopic mass-spectrometry to the analysis of drug samples // *Analusis*. — 1999. — V. 27. — P. 213–217.
54. Ehleringer J. R., Casale J. F., Lott M. J., Ford V. L. Tracing the geographical origin of cocaine // *Nature*. — 2000. — V. 408. — P. 311–312.
55. Besacier F., Guilluy R., Brazier J. L., Chaudron-Thozet H., Girard J., Lamotte A. Isotopic analysis of ^{13}C as a tool for comparison and origin assignment of seized heroin samples // *J. Forensic Sci.* — 1997. — V. 42. — P. 429–433.
56. Руденко Б. А. Хроматография против терроризма // *Партнеры и конкуренты*. — 2005. — № 9. — С. 30–34.
57. Грузнов В. М., Филоненко В. Г., Шишмарев А. Т., Балдин Н. М., Науменко И. И. Экспрессный анализ объектов окружающей среды с применением портативных газовых хроматографов и поликапиллярных колонок // *Ж. аналит. химии*. — 1999. — Т. 54, № 9. — С. 957–956.
58. Зякун А. М. Определение источников сырья этилового спирта в спиртоводочных продуктах // *Проблемы идентификации алкогольсодержащей продукции*. — М.: Госстандарт, 2001. — С. 110–114.
59. Kelley D. S. Methane-rich fluids in the oceanic crust // *J. Geophys. Res.* — 1996. — V. 101. — P. 2943–2962.

60. Berndt M.E., Allen D.E., Seyfried W.E.J. Reduction of CO₂ during serpentinization of olivine at 300°C and 500 bar // *Geology*. — 1996. — V. 24. — P. 351–354.
61. Horita J., Berndt M.E. Abiogenic methane formation and isotopic fractionation under hydrothermal conditions // *Science*. — 1999. — V. 285. — P. 1055–1057.
62. Галимов Э.М. Изотопы углерода в нефтегазовой геологии. — М.: Недра, 1973. 384 с.
63. DeMarais D.J., Donchin J.H., Nehring N.L., Truesdell A.H. Molecular carbon isotopic evidence for the origin of geothermal hydrocarbons // *Nature*. — 1981. — V. 292. — P. 826–828.
64. Schoell M. Multiple origins of methane in the earth // *Chemical Geology*. — 1988. — V. 71. — P. 1–10.
65. Sherwood Lollar B., Westgate T.D., Ward J.A., Slater G.F., Lacrampe-Coulume G. Abiogenic formation of alkanes in the Earth's crust as a minor source for global hydrocarbon reservoirs // *Nature*. — 2002. — V. 416. — P. 522–524.
66. Lancet H.S., Anders E. Carbon isotope fractionation in the Fischer-Tropsch synthesis of methane // *Science*. — 1970. — V. 170. — P. 980–982.
67. Prinzhofer A., Huc A.Y. Genetic and post-genetic molecular and isotopic fractionations in natural gases // *Chemical Geology*. — 1995. — V. 126. — P. 281–291.
68. Ott U. Interstellar grains in meteorites // *Nature*. — 1995. — V. 364. — P. 25–33.
69. Sephton M.A. Organic compounds in meteorites // *Nat. Prod. Rep.* — 2002. — V. 19. — P. 292–311.
70. Russell S.S., Arden J.W., Pillinger C.T. A carbon and nitrogen isotopic study of diamonds from primitive chondrites // *Nature*. — 1989. — V. 31. — P. 343–355.
71. Alley R.B., Cuffey K.M. Oxygen- and hydrogen-isotopic ratios of water in precipitation: beyond paleothermometry // Ed. by J.W. Valley, D.R. Cole. *Reviews in mineralogy and geochemistry. Stable isotope geochemistry*. — 2001. — V. 43. — P. 527–553.
72. Поляков В.Б. Изотопный эффект, лимитированный диффузией, при протекании гетерогенной реакции в кинетической области. Теория // *Физическая химия*. — 1989. — Т. 8. №11. — С. 1539–1541.
73. Поляков В.Б., Мальцев К.А. Изотопный эффект, лимитируемый диффузией, при протекании гетерогенной реакции в кинетической области. Эксперимент // *Физическая химия*. — 1989. — Т. 8, №12. — С. 1648–1652.
74. Ферронский В.И., Поляков В.А. Изотопия гидросферы. — М.: Наука, 1983. — 280 с.
75. Лобышев В.Н., Калиниченко Л.П. Изотопные эффекты D₂O в биологических системах. — М.: Наука, 1978.
76. Bild W. et al. Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water // *Rom. J. Physiol.* — 1999. — V. 36, No. 3–4. — P. 205–218.
77. Somlyai G. The biological effect of deuterium depletion. — Budapest: Academiai Klado, 2002. — 149 p.

78. *Bowen G. J., Winter D. A. et al.* Stable hydrogen and oxygen isotope ratios of bottled water of the world // *Rapid communications in mass spectrometry*. — 2005. — V. 19. — P. 3442–3450.
79. *Forstel H., Hoube J., Hutzen H.* Use of trap water samples for monitoring the geographical variation of stable isotopes used in authenticity studies // *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*. — 1997. — V. 204. — P. 103–108.
80. *Lanting J. N., van der Plicht J.* Wat hebben Floris 5, skelet Swifterband en visotters gemeen? // *Palaeohistoria*. — 1995/1996. — V. 37/38. — P. 491–519.
81. *Cook G. T., Bonsall C., Hedges R. E. M., McSweeney K., Oronean V. B., Pettitt P. B.* A freshwater diet-derived ^{14}C reservoir effect at the stone age sites in the Iron Gates gorge // *Radiocarbon*. — 2001. — V. 43. — P. 448–453.
82. *Арсланов Х. А.* Радиоуглерод: геохимия и геохронология. — Л.: Из-во Ленингр. ун-та, 1987. — 298 с.
83. *Хасанов Б. Ф., Савинецкий А. Б.* Параллельные датировки морских и наземных организмов из северной части Берингового моря // *OPUS: Междисциплин. исследования в археологии*. — 2002. — № 1–2. — С. 188–196.
84. *Cook G. T., Bonsall C., Hedges R. E. M., McSweeney K., Oronean V. B., Pettitt P. B.* A freshwater diet-derived ^{14}C reservoir effect at the stone age sites in the Iron Gates gorge // *Radiocarbon*. — 2001. — V. 43. — P. 448–453.
85. *Olsson I. U.* Dating of non terrestrial materials // *Proc. Groningen Symp. ^{14}C and Archaeology* / Ed. by W. G. Mook, H. T. Waterbolk. PACT Publications 8. — 1983. — P. 277–294.
86. *Olsson I. U.* The radiocarbon contents of various reservoirs / Ed. by R. Berger, H. E. Suess. *Radiocarbon dating*. — Los Angeles: University of California Press, 1979. — P. 613–618.
87. *Mook W. G., van der Plicht J.* Reporting ^{14}C activities and concentrations // *Radiocarbon*. — 1999. — V. 41. — P. 227–239.
88. *Pate F. D.* Bone chemistry and paleodiet // *Journal of Archaeological Method and Theory*. — 1994. — V. 1. — P. 161–209.
89. *Muldner G., Richards M. P.* Fast or feast: reconstructing diet in later medieval England by stable isotope analysis // *Journal of Archaeological Science*. — 2005. — V. 32. — P. 39–48.
90. *Chistolm B. S., Nelson D. E., Schwarcz H. P.* Stable-carbon isotope ratios as a measure of marine versus terrestrial protein in ancient diets // *Science*. 1982. — V. 216, No. 4550. — P. 1131–1132.
91. *Schwarcz H. P., Melbye J., Katzenberg M. A., Knuf M.* Stable isotopes in human skeletons of southern Ontario: Reconstructing palaeodiet // *Journal of Archaeological Science*. — 1985. — V. 12, No 2. — P. 187–206.
92. *Tauber H.* ^{14}C activity of arctic marine mammals / Ed. by R. Berger, H. E. Suess. *Radiocarbon dating*. — Los Angeles: University of California Press, 1979. — P. 447–452.

Глава 2

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕТОД ПОДГОТОВКИ ЖИДКИХ, ТВЕРДЫХ И ГАЗООБРАЗНЫХ ПРОБ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА УГЛЕРОДА

Т. А. Веливецкая¹, А. В. Игнатьев¹, С. И. Кияшко²

¹Дальневосточный геологический институт ДВО РАН, Владивосток

²Институт биологии моря ДВО РАН, ул. Пальчевского, Владивосток

Введение

Измерение изотопных отношений $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ углерода широко применяется для изучения различных природных процессов, включая вопросы глобального изменения климата, изучения экологических и геохимических изменений окружающей среды. Вариации изотопного состава углерода представляют ценную информацию для определения источника углеродных резервуаров, понимания физических и биохимических процессов, которые приводят к перемещению потоков углерода между резервуарами, что играет важную роль в изучении процессов в современной биосфере и атмосфере, а также для построения палеоэкологических и палеоклиматических реконструкций. С этой целью измеряют изотопные отношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ углерода различных природных материалов, представляющих собой разнообразные формы твердых, жидких и газообразных веществ. Для изотопного анализа углерода твердых, жидких и газообразных образцов используют соответствующие методы и специализированное оборудование. Количественное конвертирование углерода образцов в форму CO_2 для масс-спектрометрического анализа обычно проводят с применением твердого окислителя оксида меди.

Впервые этот метод и техника его реализации была описана в статьях [1, 2] и стала в настоящее время уже классикой. Согласно этому методу, миллиграммовое количество образца вместе с окислителем запаивают в откачанной кварцевой ампуле. Ампулы с образцами прокаливают при 850–900 °С длительное время (5–6 ч) и медленно охлаждают (~ 12 ч). Затем каждую ампулу индивидуально вскрывают в высоковакуумной линии при помощи специального устройства [3, 4] и проводят

криогенную очистку CO_2 от остальных продуктов сжигания. Sofer [5] модифицировал этот метод, предложив использовать вместо дорогостоящих кварцевых ампул более экономичные ампулы из боросиликатного стекла (Pyrex). В этом случае прокаливание образца проводят при более низкой температуре $550\text{--}590^\circ\text{C}$, что не всегда достаточно для полного окисления углерода [6]. В работе [7] описан метод низкотемпературной (500°C) конверсии с использованием окислителей: калия пероксодисульфата и серебра перманганата. Показано, что за 24 ч достигается полное окисление углерода органических веществ.

Метод сжигания в кварцевых ампулах после ряда усовершенствований [8, 9] нашел широкое применение для определения изотопного состава углерода различных твердых органических веществ, почв и рассеянных форм углерода в горных породах и осадках. Классический метод сжигания углерода в ампулах обеспечивает правильность и высокую воспроизводимость результатов измерения изотопного состава $\delta^{13}\text{C}$ твердых образцов. Однако применение этого метода для сжигания легколетучих жидких и газообразных образцов вызывает большие технические затруднения и ухудшает воспроизводимость результатов изотопного анализа. Вместе с тем, метод является трудоемким, дорогостоящим и малопродуктивным.

В начале 1980-х годов был предложен метод измерения $\delta^{13}\text{C}$ в потоке гелия, основанный на применении CN-элементного анализатора, соединенного с масс-спектрометром с помощью интерфейса ConFlo (метод EA-IRMS) [10–12]. Образцы органического вещества, упакованные в оловянные капсулы, сбрасывают в нагретый до $900\text{--}1050^\circ\text{C}$ реактор элементного анализатора, через который проходит непрерывный поток гелия. Сжигание образца происходит по методу «вспышки» при впрыске кислорода в поток гелия. Продукты сгорания последовательно проходят через серию колонок с окислительными и восстановительными реагентами. Для удаления воды используют ловушку с поглотителем (обычно перхлорат магния), CO_2 и N_2 разделяют на хроматографической колонке и подают с током гелия в масс-спектрометр через интерфейс ConFlo. В таких системах процессы конверсии, хроматографическое разделение продуктов реакции, поступление исследуемого газа в источник ионов масс-спектрометра и измерение $\delta^{13}\text{C}$ интегрированы в единый автоматизированный процесс, который занимает 8–10 мин для одного образца.

Благодаря этой технике, навески анализируемых образцов уменьшены в десятки раз, и значительно возросла производительность. Воспроизводимость результатов измерения $\delta^{13}\text{C}$ для рутинных анализов $0,1\text{--}0,5\text{‰}$. Следует заметить, что метод EA-IRMS обычно используют для органических образцов, которые имеют высокое содержание углерода (ткани растений и животных). Если образцы имеют низкое содержание углерода (рассеянный углерод в породах, осадочные породы, почвы) необходимо увеличивать навеску в несколько раз, для

того чтобы получить оптимальный сигнал для измерения. В этом случае, чрезмерное количество углеродсодержащей матрицы может стать причиной неполного сжигания углерода и снижения точности анализов [13]. Для решения этих проблем Liu с соавторами [14] предложили применить лазер Nd-YAG для изотопного анализа органического углерода в осадочных породах и получили воспроизводимость результатов измерения 0,1‰.

Изотопные исследования газообразных форм углерода, например CH_4 в вулканических газах и атмосфере, требуют особо высокой точности анализа. Техника количественной экстракции CH_4 и конвертирования в CO_2 не тривиальна. Системы пробоподготовки включают высоковакуумные линии очистки CH_4 и сжигания в присутствии платинового катализатора. Полученный CO_2 криогенно разделяют от остальных продуктов реакции и анализируют на масс-спектрометре в конфигурации двойной системы напуска [15]. Воспроизводимость результатов изотопного анализа составляла 0,05‰. Применение нового метода измерения $\delta^{13}\text{C}$ в потоке гелия позволило более быстро и эффективно определять изотопный состав углерода метана в образцах с экстремально низкой концентрацией [16].

Таким образом, для твердых, жидких и газообразных образцов применяют соответственные методы пробоподготовки и технику. В данной работе предложен универсальный метод пробоподготовки, который применим как для твердых, так и для жидких и газообразных образцов. Реализация метода проста и не требует дорогостоящей техники для выполнения изотопных анализов с высокой точностью для образцов твердых органических веществ, почв, рассеянных форм углерода в горных породах и осадках, масел, легколетучих жидких и газообразных веществ.

Экспериментальная часть

Аппаратура и материалы

Для подготовки к изотопному анализу твердых и жидких образцов органического углерода, а также газообразных форм углерода (CH_4 и CO_2 атмосферы и газогидратов) использована высоковакуумная установка (рис. 2.1). Установка состоит из линии откачки, включая форвакуумный насос и турбомолекулярный насос; 6 параллельных портов (входов) для одновременного подсоединения 6 линий для экстракции CO_2 ; пробоотборника для CO_2 . Вакуумные линии сделаны из молибденового стекла и соединены между собой металлическими соединениями с витоновым уплотнением. Линия экстракции включает кварцевый реактор для сжигания образцов и криогенную U-ловушку. Нагрев каждого реактора производится двумя раздельными нагревателями. На установке имеется дополнительная терморегулируемая криогенная ловушка для очистки газов.

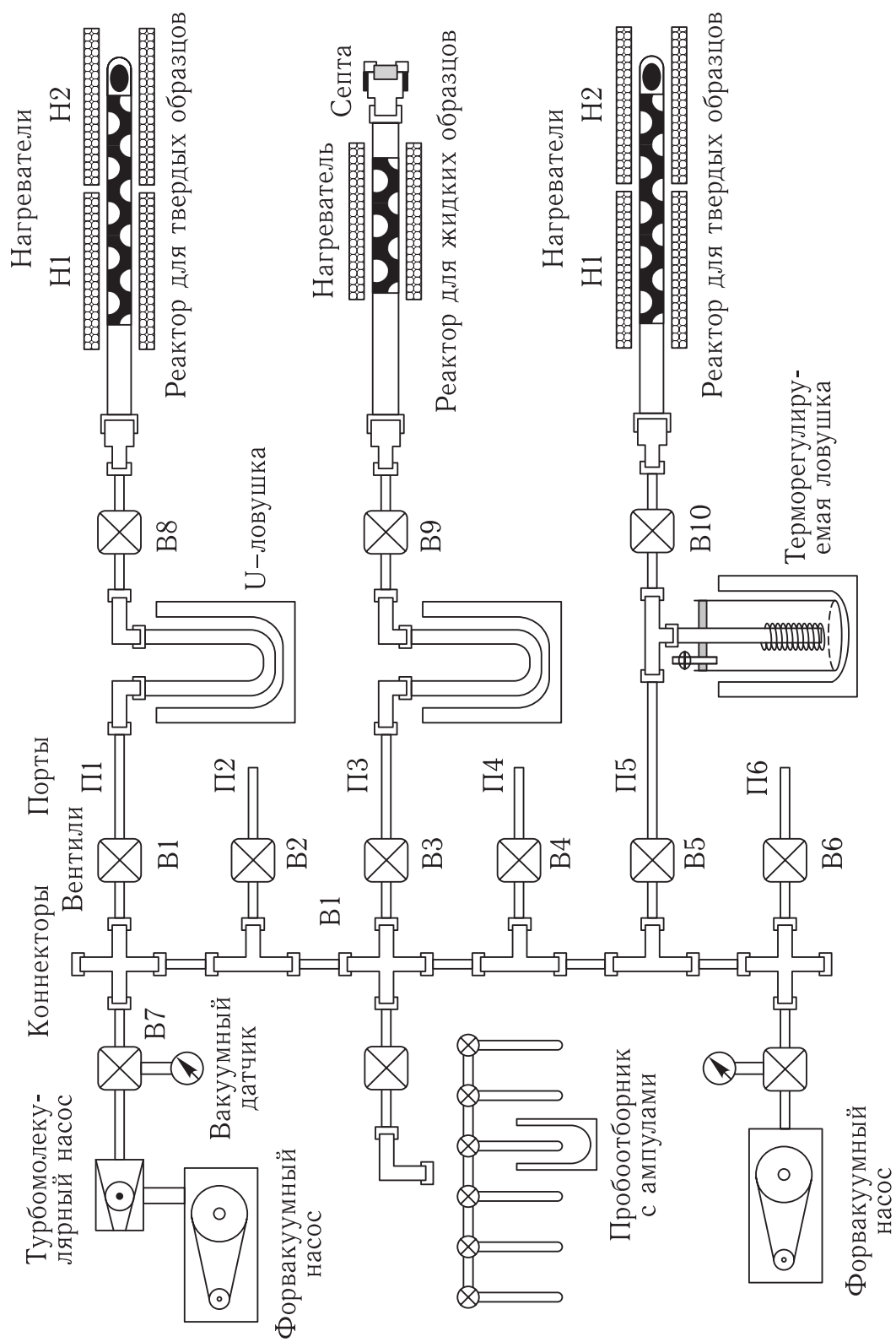


Рис. 2.1. Универсальный метод подготовки жидких, твердых и газообразных проб для определения изотопного состава углерода

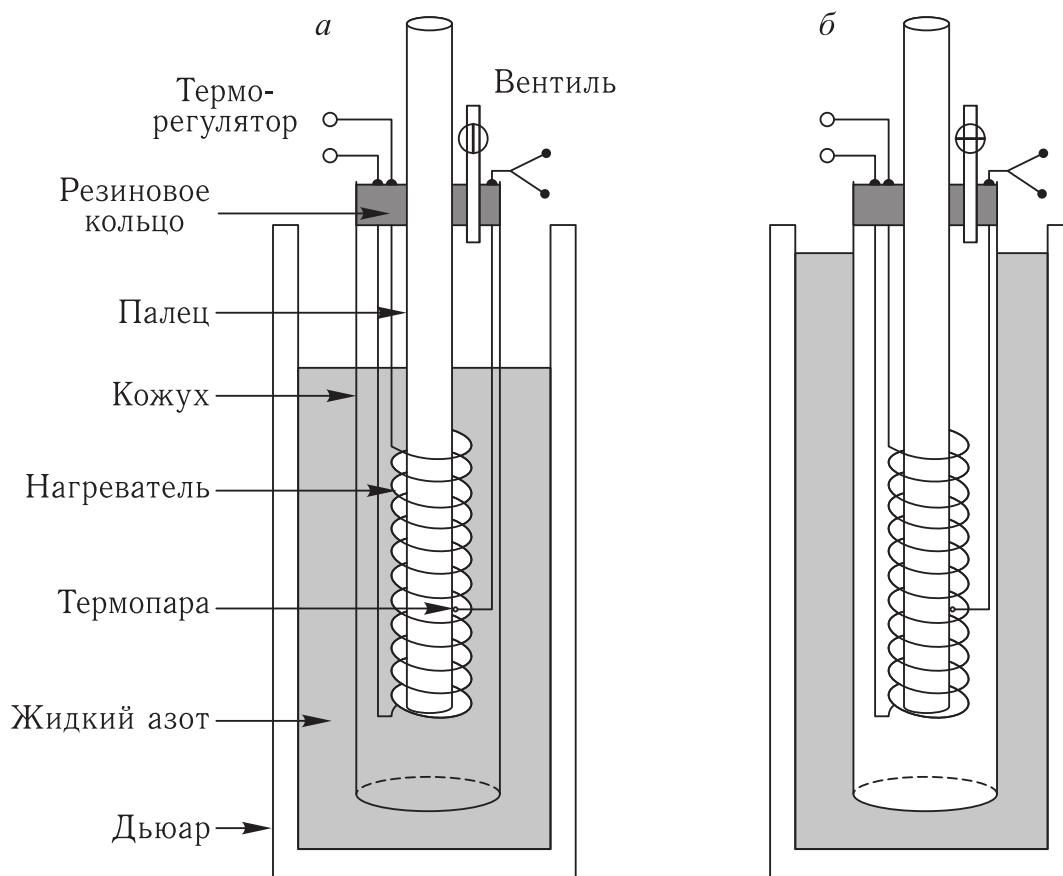


Рис. 2.2. Схема криогенной терморегулируемой ловушки: *а* — ловушка в режиме вымораживания образцов -196°C (нагреватель выключен, вентиль открыт); *б* — ловушка в режиме дистилляции образцов (нагреватель включен, вентиль закрыт)

Конструкция и изготовление этой ловушки просты (рис. 2.2). «Палец» из пирексового стекла обвит нихромовой спиралью и вместе с термопарой помещен внутри цилиндрического кожуха. Между пальцем и верхним краем кожуха проложено уплотнительное резиновое кольцо, снизу кожух открыт. В верхней части кожуха встроен вентиль. Ловушку охлаждают жидким азотом, температуру на «пальце» регулируют нагревом спирали до заданного значения.

Масс-спектрометр Finnigan MAT 252, работающий в конфигурации двойной системы напуска, использован для измерения изотопных отношений углерода в анализируемом газе.

Сжигание твердых и труднолетучих жидких образцов для определения изотопного состава углерода

Подготовка реактора и загрузка пробы. Реактор для сжигания твердых и вязких жидких образцов сделан из кварцевой трубки длиной 30 см и внутренним диаметром 0,6 см, один конец трубки запаян (рис. 2.3, *а*). Заполнение реактора производится в следующем порядке. На дно реактора помещают образец (1–2 мг), смешанный с порошком CuO в пропорции 1:10 по весу, затем помещают слой кварцевой ваты

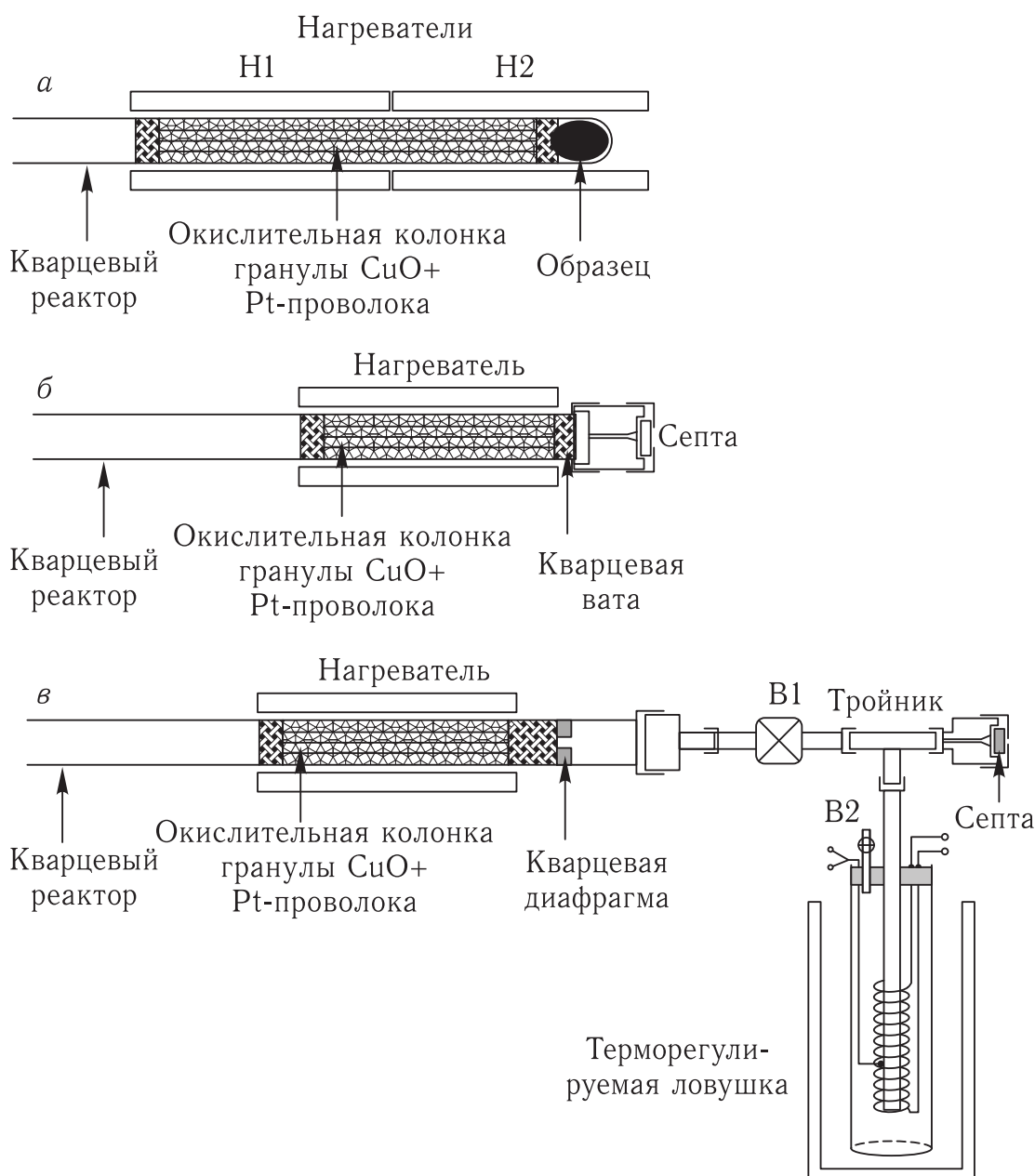


Рис. 2.3. Схема подготовки реакторов для окисления углерода органических образцов: а — реактор для твердых и труднолетучих жидких образцов; б — реактор для легколетучих жидких образцов; в — реактор для газообразных образцов в соединении с терморегулируемой ловушкой

(1–2 мм) и окислительную колонку, состоящую из гранул оксида меди с добавлением платиновой проволоки, высота окислительной колонки 15 см, гранулы — 1–2 мм. Оксид меди должен быть предварительно прокален при 900°C для удаления следовых количеств загрязнения органическим углеродом.

Заполненный реактор подсоединяют к U-ловушке одного из портов на вакуумной установке, например, порта П1 (рис. 2.1). На реактор надевают два нагревателя. Нагреватель Н1 расположен на реакторе так, что в зону нагрева входит только часть колонки (около $2/3$ ее длины). Оставшаяся часть колонки и проба входят в зону нагревателя 2.

Процедура сжигания и очистки. Реактор откачивают и устанавливают на Н1 температуру 850°C. Этот нагреватель обеспечивает предварительный нагрев окислительной колонки, при этом проба и часть CuO-колонки остаются при комнатной температуре. После того как температура на Н1 достигнет 850°C, U-ловушку охлаждают жидким азотом и перекрывают откачку вентилем В1. Включают Н2 и устанавливают температуру 850°C. Этот нагреватель обеспечивает разогрев пробы и оставшейся части CuO-колонки. Во время подъема температуры в зоне с образцом начинается возгонка легколетучих фракций (продукты неполного окисления органического вещества), которые полностью окисляются до CO₂ и H₂O на предварительно нагретой CuO-колонке и немедленно вымораживаются в U-ловушке. После того как температура на Н2 достигнет 850°C, достаточно 10 мин для полного сжигания образца и вымораживания всех продуктов реакции в U-ловушке. Затем закрывают вентиль В8 между U-ловушкой и реактором, открывают вентиль В1 для откачки из U-ловушки не сконденсированных газов. После этого перекрывают откачку вентилем В7 и производят очистку CO₂. На U-ловушке заменяют дьюар с жидким азотом на сухой лед и перемораживают чистый CO₂ в одну из ампул пробоотборника.

Такой способ очистки позволяет разделить только CO₂ и H₂O и эффективен при анализе органических соединений простого состава C_xH_yO_z, но не эффективен при анализе многокомпонентных органических веществ (например, органика почв и осадки), так как продукты окисления N_xO и SO₂ могут образовываться в достаточном количестве. В случае анализа сложнокомпонентных органических веществ мы предлагаем применять дифференциальную криогенную ловушку для очистки CO₂ (рис. 2.1, порт №5). Ловушку помещают в дьюар с жидким азотом, вентиль на верхней части ловушки должен быть открыт на атмосферу, чтобы азот заполнил внутренний объем кожуха и быстро охладил палец (рис. 2.2, а). Все продукты реакции перемораживают в палец. После этого вентиль на ловушке закрывают и включают нагреватель на палец. Давление паров азота возрастает, и жидкий азот выдавливается из внутреннего объема кожуха. Палец прогревается до заданной температуры (рис. 2.2, б). Ступенчатый нагрев пальца позволяет криогенно разделять различные виды газов. При температуре –120°C возрастает давление паров CO₂, его перемораживают в ампулу пробоотборника. При разогреве до –75°C возрастает давление паров SO₂, который скачивают из системы. Следует заметить, что криогенно разделить N₂O и CO₂ очень сложно, так как температуры кипения N₂O и CO₂ очень близки между собой. Однако количество N₂O очень незначительно, так как реакция окисления на платиновом катализаторе смещает процесс в сторону образования NO, который слабо вымораживается при температуре жидкого азота и его легко скачать.

Пробоотборник с чистым CO₂ подсоединяют к двойной системе напуска масс-спектрометра для анализа δ¹³C.

Реактор и окислительную колонку используют повторно для анализа новой пробы. Реактор отсоединяют от вакуумной линии, высыпают гранулированную CuO в чистую емкость и механически очищают реактор. В очищенный реактор загружают новую пробу, как описано выше. Такой тип реактора и процесс получения CO_2 применим как для твердых образцов органики, так и для вязких жидкостей (масла). Ресурс реактора и окислительной колонки достаточен для проведения более 100 анализов.

Сжигание легколетучих жидкостей для определения изотопного состава углерода

Подготовка реактора и ввод пробы. Реактор для сжигания легколетучих жидкостей сделан из кварцевой трубки длиной 20 см и внутренним диаметром 0,6 см (рис. 2.3, б). Трубка вакуумно уплотнена резиновой септой на одном конце. Часть реактора заполнена окислительной колонкой из гранулированной окиси меди с добавлением платиновой проволоки (длина окислительной колонки 8 см, гранулы — 1–2 мм). Колонка расположена на расстоянии 3 см от края реактора, заглушенного септой. На реактор надевают нагреватель и придвигают его близко к септе. Колонка находится в центральной части нагревателя. Реактор подсоединяют к U-ловушке одного из портов на вакуумной установке, например, ПЗ (см. рис. 2.1).

Процедура сжигания и очистки. Реактор откачивают, и устанавливают на нагревателе температуру 850°C . Нагреватель обеспечивает предварительный нагрев окислительной колонки и прогревает (до температуры 150°C) объем между септой и окислительной колонкой. Когда температура на нагревателе достигнет 850°C , ловушку охлаждают жидким азотом и перекрывают откачку вентилем В3. Образец легколетучей жидкости (1–1,5 мкл) вводят внутрь реактора через септу при помощи микрошприца. Пары образца сгорают на окислительной колонке, продукты реакции CO_2 и H_2O немедленно вымораживаются в U-ловушку. Время полного сжигания и сбора продуктов реакции составляет не более 3 мин. После этого вентиль В9 закрывают, вентиль В7 открывают для откачки несконденсированных газов. Процедура очистки CO_2 такая же, как описано для твердых образцов. Очищенный CO_2 собирают в пробоотборник для последующего масс-спектрометрического анализа. После этого система готова к проведению следующего анализа.

Вышеуказанные условия проведения реакций полного окисления углерода твердых и труднолетучих жидких образцов ($T = 850^\circ\text{C}$, $t = 10$ мин), а также легколетучих жидких образцов ($T = 850^\circ\text{C}$, $t = 3$ мин) являются оптимальными для данного метода и были определены экспериментально [17, 18].

Сжигание метана для определения изотопного состава углерода

Подготовка реактора. Реактор для сжигания метана сделан из кварцевой трубки длиной 20 см и внутренним диаметром 0,6 см (рис. 2.3, в).

В реактор впаяна кварцевая диафрагма (кварцевый диск толщиной 0,2 см и проходным отверстием 0,5 мм) на расстоянии 5 см от края трубки. Часть реактора заполнена окислительной колонкой из гранулированной окиси меди с добавлением платиновой проволоки (длина окислительной колонки 8 см, гранулы 1–2 мм). Между окислительной колонкой и кварцевой диафрагмой проложен слой кварцевой ваты (2–3 мм). На реактор надевают нагреватель и располагают так, чтобы колонка оказалась в центральной части нагревателя. К реактору (со стороны кварцевой диафрагмы) последовательно подсоединяют тройник и терморегулируемую криогенную ловушку (рис. 2.3, в). Один конец тройника заглушен септой. Реактор подсоединяют к U-ловушке одного из портов на вакуумной установке, например П6 (рис. 2.1).

Процедура сжигания и очистки. Реактор и терморегулируемую ловушку откачивают и устанавливают на нагревателе реактора температуру 850°C. Нагреватель обеспечивает предварительный нагрев окислительной колонки. Когда температура на нагревателе достигнет 850°C, терморегулируемую ловушку и U-ловушку охлаждают жидким азотом и перекрывают откачку. Закрывают вентиль В1 и вводят пробу (1–2 см³) через септу при помощи шприца для газов (рис. 2.3, в). СО₂ и Н₂О, содержащиеся в пробе, полностью вымораживаются в ловушку. Метан частично вымораживается при температуре жидкого азота. Включают нагреватель дифференциальной ловушки и устанавливают температуру –180°C. Давление паров метана возрастает, метан проходит через диафрагму на окислительную колонку. Продукты реакции немедленно вымораживаются в U-ловушку. Время полного сжигания и сбора продуктов реакции составляет не более 10 мин. После этого откачивают несконденсированные газы и проводят криогенную очистку СО₂, как описано выше. Чистый СО₂ собирают в пробоотборник.

Для дистилляции СО₂, замороженного в терморегулируемой ловушке, устанавливают температуру на нагревателе ловушки –80°C. Размороженный СО₂ проходит через окислительную колонку и вымораживается в ампулу пробоотборника.

Описанная процедура подготовки газообразных проб применима к пробам со средним и высоким содержанием СН₄.

Результаты и обсуждение

Оценка правильности и воспроизводимости результатов предлагаемого метода была проведена с использованием международных стандартов IAEA-CH-7 (polyethylene), IAEA-CH-6 (sucrose), NBS-22 (oil), IAEA-C-6 (sucrose), IAEA-C-3 (cellulose) (табл. 2.1). Воспроизводимость полученных результатов < ±0,1‰ для сертифицированных стандартов. Разница между измеренными значениями δ¹³С и соответствующими данными по каталогу International Atomic Energy Agency (IAEA) лежит в пределах от 0,01‰ до 0,20‰.

Таблица 2.1

Значения $\delta^{13}\text{C}$ международных стандартов IAEA, полученные методом сжигания на окислительной колонке

Образец	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (среднее $\pm \sigma$)		Δ^{B}
	Метод сжигания на окислительной колонке	Принятые значения	
Polyethylene IAEA-CH-7	$-32,12 \pm 0,02$ ($n = 7$)	$-32,15^{\text{a}}$	0,03
Sucrose IAEA-CH-6	$-10,50 \pm 0,03$ ($n = 5$)	$-10,45^{\text{a}}$	0,05
Oil NBS-22	$-30,04 \pm 0,03$ ($n = 6$)	$-30,03^{\text{a}}$	0,01
Sucrose IAEA-C-6	$-10,60 \pm 0,09$ ($n = 5$)	$-10,8^{\text{b}}$	0,20
Cellulose IAEA-C-3	$-24,63 \pm 0,03$ ($n = 5$)	$-24,72^{\text{b}}$	0,09

^a Опубликовано [19].

^b Данные IAEA: <http://www-naweb.iaea.org/nahu/nmrm/nmrm2003/browse.htm>.

^B Разница между измеренным и принятым значением.

Достоверность результатов $\delta^{13}\text{C}$ различных твердых органических соединений, полученных предлагаемым методом, оценена путем сравнения с соответствующими результатами по $\delta^{13}\text{C}$, полученными по классическому ампульному методу. С этой целью были проанализированы образцы органических веществ, органический углерод из почв, современные морские осадки и осадочные породы (табл. 2.2). Результаты анализов $\delta^{13}\text{C}$ органических веществ, таких как полиэтилен, целлюлоза, сахар, крахмал, полученные методом сжигания на колонке и методом сжигания в ампулах, характеризуются одинаково хорошей воспроизводимостью ($\leq 0,1\text{‰}$). Значения величин $\delta^{13}\text{C}$, полученные разными методами, совпадают в пределах ошибки и показывают расхождение между методами Δ в среднем меньше $0,1\text{‰}$. Хорошая согласованность данных, полученных методом сжигания на колонке с традиционным методом сжигания в ампулах, свидетельствует о высокой достоверности результатов предлагаемого метода.

Пример использования нашего метода для анализа различных природных образцов растительных тканей приведен в табл. 2.3. Воспроизводимость результатов измерения изотопного состава углерода в среднем $\pm 0,1\text{‰}$.

С целью апробации предложенного метода для анализа органического углерода почв были проанализированы образцы почв различного типа: подзолистая почва с содержанием органического углерода $0,58\%$ (вес образцов 120 мг), бурая лесная почва с содержанием органического углерода $3,53\%$ (вес образцов 20 мг) и чернозем с содержанием органического углерода $7,8\%$ (вес образцов 9 мг) (табл. 2.2). Эти образцы были также проанализированы методом сжигания в кварцевых ампулах. Сравнение результатов измерения $\delta^{13}\text{C}$ двумя методами, свидетельствует, что воспроизводимость результатов, полученных предложенным методом, не уступает классическому анализу.

Таблица 2.2

Сравнение анализов $\delta^{13}\text{C}$, полученных методом сжигания в окислительной колонке и методом сжигания в кварцевых ампулах

Образец	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (среднее $\pm\sigma$)		Δ^{B}
	Метод сжигания в окислительной колонке	Метод сжигания в кварцевых ампулах	
Zolyethylene IAEA-CH-7	$-32,12 \pm 0,02$ ($n = 7$)	$-31,95 \pm 0,08$ ($n = 5$)	0,17
Cellulose IAEA-C-3	$-24,63 \pm 0,03$ ($n = 5$)	$-24,47 \pm 0,03$ ($n = 3$)	0,16
Сахар свекловичный	$-23,90 \pm 0,10$ ($n = 5$)	$-23,93 \pm 0,12$ ($n = 3$)	0,03
Сахар тростниковый	$-11,88 \pm 0,08$ ($n = 11$)	$-11,79 \pm 0,05$ ($n = 3$)	0,09
Целлюлоза	$-24,48 \pm 0,05$ ($n = 20$)	$-24,47 \pm 0,02$ ($n = 4$)	0,01
Крахмал кукурузный	$-10,88 \pm 0,05$ ($n = 14$)	$-10,76 \pm 0,08$ ($n = 4$)	0,12
Подзолистая почва ^а	$-24,81 \pm 0,07$ ($n = 3$)	$-24,74 \pm 0,05$ ($n = 3$)	0,07
Бурая лесная почва ^а	$-25,91 \pm 0,08$ ($n = 4$)	$-25,70 \pm 0,03$ ($n = 4$)	0,21
Чернозем ^а	$-24,56 \pm 0,02$ ($n = 3$)	$-24,63 \pm 0,03$ ($n = 4$)	0,07
Морские отложения №4 ^б	$-22,67 \pm 0,11$ ($n = 3$)	$-22,43 \pm 0,09$ ($n = 3$)	0,24
Морские отложения №5 ^б	$-24,91 \pm 0,10$ ($n = 3$)	$-24,77 \pm 0,14$ ($n = 3$)	0,14
Аргиллит (докембрий) №1 ^г	$-22,26 \pm 0,11$ ($n = 6$)	$-22,14 \pm 0,07$ ($n = 2$)	0,12
Аргиллит (докембрий) №2 ^г	$-23,19 \pm 0,06$ ($n = 5$)	$-23,01 \pm 0,04$ ($n = 2$)	0,18

^а Образцы предоставлены Институтом биологии и почвоведения ДВО РАН.

^б Крупнозернистый песок-шельф Охотского моря, содержание органического углерода 0,02%.

^в Илистые осадки, Охотское море, содержание органического углерода 1,4%.

^г Осадочные породы, Русская платформа, верхний венд, образцы предоставлены М. В. Бурзиным (Институт палеонтологии РАН).

^д Разница между методами.

Таблица 2.3

Значения $\delta^{13}\text{C}$ растений С3 и С4 типов, полученные методом сжигания в окислительной колонке

Вид растения (проба)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (среднее $\pm\sigma$)
<i>Salsola</i> sp. (листья)	$-13,53 \pm 0,09$ ($n = 3$)
<i>Salsola</i> sp. (стебли)	$-22,35 \pm 0,07$ ($n = 3$)
<i>Leymuz mollis</i> (листья)	$-26,51 \pm 0,11$ ($n = 3$)
<i>Leymuz mollis</i> (стебли)	$-24,31 \pm 0,10$ ($n = 3$)
<i>Arundinella</i> sp.	$-11,10 \pm 0,12$ ($n = 3$)
<i>Pucrenr nilagiricus</i>	$-10,52 \pm 0,09$ ($n = 5$)
<i>Fimbristysis ochotensis</i>	$-6,20 \pm 0,04$ ($n = 6$)
<i>Panax ginseng</i> (корень)	$-32,14 \pm 0,08$ ($n = 9$)
<i>Zea mays</i> (зерно)	$-11,09 \pm 0,12$ ($n = 8$)
<i>Schisandra chinensis</i> (лиана)	$-28,26 \pm 0,05$ ($n = 12$)

Возможность высокоточного анализа образцов с низким содержанием углерода продемонстрирована на образцах морских донных отложений, состоящих в основном из минеральных частиц с содержанием органического углерода от 0,02 до 1,4% (табл. 2.2). Образцы проанализированы с применением двух методов. Вес анализируемых образцов был от 25 до 1000 мг в зависимости от содержания органического углерода и был идентичен для обоих методов. Результаты, полученные методом сжигания на окислительной колонке, согласуются с соответствующими данными ампульного метода. Воспроизводимость результатов для обоих методов в среднем $\pm 0,11\text{‰}$, расхождение величин $\delta^{13}\text{C}$ между методами меньше чем $0,25\text{‰}$. Данные представленные в табл. 2.2 позволяют заключить, что метод сжигания на колонке является хорошей альтернативой классическому методу сжигания в кварцевых ампулах.

Некоторые образцы морских донных отложений были также проанализированы методом EA-IRMS (элементный анализатор, соединенный с масс-спектрометром изотопных отношений) с применением CN-элементного анализатора Flash1112 Thermoquest (табл. 2.4). Вес анализируемых образцов составлял 50 мг для метода сжигания на колонке и от 1 до 4 мг для метода EA-IRMS. Сравнение анализов показало значительное расхождение величин $\delta^{13}\text{C}$ между методами. Результаты, полученные методом EA-IRMS, имеют низкую воспроизводимость, порядка 1‰ . Значения $\delta^{13}\text{C}$ в среднем на 3‰ легче по сравнению с соответствующими результатами метода сжигания на колонке (табл. 2.4).

Таблица 2.4

Сравнение значений $\delta^{13}\text{C}$, полученных методом сжигания в колонке и методом EA-IRMS с использованием элементного анализатора

Образец	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (среднее $\pm \sigma$)		Δ^a
	Метод сжигания в окислительной колонке	EA-IRMS метод	
Морские отложения №3	$-24,73 \pm 0,24$ ($n = 3$)	$-27,29 \pm 0,84$ ($n = 3$)	2,56
Морские отложения №4	$-26,26 \pm 0,19$ ($n = 3$)	$-29,51 \pm 1,22$ ($n = 3$)	3,25
Морские отложения №5	$-26,66 \pm 0,08$ ($n = 3$)	$-29,93 \pm 1,04$ ($n = 3$)	3,27

^a Разница между методами.

Возможно, метод EA-IRMS не обеспечивает полного окисления органического углерода в осадках и приводит к существенной разнице значений $\delta^{13}\text{C}$ в этих методах. Следует отметить, что в табл. 2.4 мы привели результаты, специально отобранные из большого числа наших рутинных анализов, для демонстрации наибольших отклонений результатов от истинных значений. В большинстве случаев воспроизводимость результатов метода EA-IRMS $0,2\text{--}0,5\text{‰}$, иногда $0,05\text{‰}$, отклонение результатов от метода сжигания на окислительной колонке обычно лежит в диапазоне $0,1\text{--}0,7\text{‰}$. Большие отклонения, приведенные в табл. 2.4,

могут быть объяснены спецификой самих проб (например, содержание трудногорючих составов органики или сильная неоднородность). Результаты табл. 2.4 являются примерами, которые обращаются к проблеме малого выхода реакции в методе EA-IRMS.

Для расширения возможностей предложенного метода мы анализировали труднолетучие жидкие вещества, такие как минеральные и растительные масла, используя реактор для сжигания твердых образцов (табл. 2.5). Получена высокая воспроизводимость результатов определения $\delta^{13}\text{C} \leq \pm 0,05\text{‰}$.

Таблица 2.5

Значения $\delta^{13}\text{C}$ для образцов различных масел; значения получены методом сжигания в окислительной колонке

Образец	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (среднее $\pm \sigma$)
NBS 22 (масло)	$-30,04 \pm 0,03$ ($n = 7$)
Минеральное форвакуумное масло	$-28,87 \pm 0,05$ ($n = 5$)
Оливковое масло	$-29,45 \pm 0,04$ ($n = 6$)
Кукурузное масло	$-16,54 \pm 0,05$ ($n = 6$)
Соевое масло	$-29,87 \pm 0,04$ ($n = 6$)

Метод сжигания на окислительной колонке был опробован для анализа органического углерода легколетучих жидких соединений и их водных растворов. Для этого анализировали 96%-е и 40%-е образцы этанола, некоторые образцы органических растворителей и алкогольных изделий промышленного производства (табл. 2.6). Объем анализируемых проб составлял 0,5–1,5 мкл. Этого объема достаточно для получения CO_2 в оптимальном количестве для измерения изотопного состава по стандартной методике на масс-спектрометре MAT-252 с двухка-

Таблица 2.6

$\delta^{13}\text{C}$ легколетучих жидких образцов, значения получены методом сжигания в окислительной колонке

Образец	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (среднее $\pm \sigma$)
Этанол, проба №1	$-23,89 \pm 0,02$ ($n = 19$)
Этанол, проба №1 (40% водный раствор)	$-23,90 \pm 0,04$ ($n = 4$)
Спирт «Люкс» (производство Россия)	$-24,15 \pm 0,03$ ($n = 3$)
Спирт (производство Китай)	$-12,45 \pm 0,03$ ($n = 6$)
Водка «Татарстан»	$-25,86 \pm 0,04$ ($n = 3$)
Бальзам «Уссурийский»	$-23,47 \pm 0,05$ ($n = 3$)
Виски (производство США)	$-13,47 \pm 0,04$ ($n = 3$)
Ацетон	$-26,97 \pm 0,04$ ($n = 5$)
Гексан	$-29,21 \pm 0,03$ ($n = 5$)

нальной системой напуска. Воспроизводимость результатов составила $\leq \pm 0,04\text{‰}$. Проведено тестирование метода на наличие «памяти». Для этого были поочередно проанализированы образцы этилового спирта, которые существенно различаются по изотопному составу углерода ($\delta^{13}\text{C} = -29,21\text{‰}$ и $-12,45\text{‰}$). Измеренные величины $\delta^{13}\text{C}$ показали отклонение от среднего значения в пределах погрешности метода, что указывает на отсутствие «памяти».

В табл. 2.7 продемонстрированы результаты анализа газообразных образцов на примере спонтанных газов из газодренажных скважин бурогоугольного месторождения Тавричанское, Дальний Восток, Россия. В состав образцов входят в основном CO_2 , CH_4 , N_2 , и O_2 . В зависимости от содержания CO_2 и CH_4 объем анализируемых проб варьировал от 1 до 100 см^3 . Воспроизводимость результатов в среднем $\pm 0,04\text{‰}$ и $\pm 0,06\text{‰}$ для метана и углекислоты соответственно.

Таблица 2.7

$\delta^{13}\text{C}$ метана и CO_2 в образцах природного газа. Значения получены методом сжигания в окислительной колонке

Образец	Концентрация, %						$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$, ‰	
	CO_2	O_2	N_2	CH_4	C_2H_6	C_3H_8	CO_2	CH_4
2	0,59	16,44	72,65	10,30	0,0048	—	$-50,6 \pm 0,08$	$-72,8 \pm 0,05$
3	16,53	3,47	21,91	57,99	0,0824	0,0027	$-32,9 \pm 0,03$	$-57,8 \pm 0,03$
7	16,63	3,39	28,45	51,50	0,0365	0,0011	$-34,3 \pm 0,06$	$-59,3 \pm 0,04$
9	14,23	1,51	15,54	68,66	0,0474	0,0015	$-33,6 \pm 0,05$	$-59,5 \pm 0,03$

Предложенный метод сжигания на окислительной колонке успешно работает в нашей лаборатории уже более 5 лет. Такие характеристики, как многофункциональность, простота и экономичность обуславливают предпочтение этого метода при выполнении высокоточных изотопных анализов органического углерода.

Выводы

Идея конвертирования органического углерода в диоксид углерода на предварительно нагретой окислительной колонке позволила нам предложить универсальный, экономичный, простой и экспрессный метод пробоподготовки органических веществ для измерения $\delta^{13}\text{C}$ с высокой воспроизводимостью. Метод может быть использован для изотопного анализа твердых, жидких, и газообразных образцов.

Благодаря высокой эффективности окисления органического углерода на CuO -колонке, время полной конверсии углерода занимает не более 10 мин. Многократное использование реакторов значительно сокращает расход дорогостоящего кварцевого материала. Правильность предложенного метода проверена на международных стандартах и под-

тверждена путем сравнения с результатами, полученными по методу сжигания образцов в кварцевых ампулах.

Метод окисления на колонке с CuO показывает достоверные результаты и высокую воспроизводимость значений $\delta^{13}\text{C}$ для образцов различных органических веществ, органического углерода почв, рассеянного углерода в осадочных породах, вязких и легколетучих жидкостей, образцов природного газа с высоким и средним содержанием метана. Предложенный метод является хорошей альтернативой классическому методу сжигания образцов в кварцевых ампулах.

Литература

1. *Buchanan D. L. and Corcoran B. J.* // *Anal. Chem.* — 1959. — V. 31. — P. 1635–1638.
2. *Frazer J. W.* // *Mikrochim. Acta.* — 1962. — P. 993–999.
3. *DesMarais D. J., Hayes J. M.* // *Anal. Chem.* — 1976. — V. 48. — P. 1651–1652.
4. *Coleman D. D.* // *Anal. Chem.* — 1981. — V. 53. — P. 1962–1963.
5. *Sofer Z.* // *Anal. Chem.* — 1980. — V. 52. — P. 1389–1391.
6. *Boutton T. W., Wong W. W., Hachey D. L., Lee L. S., Cabrera M. P., Klein P. D.* // *Anal. Chem.* — 1983. — V. 55. — P. 1832–1833.
7. *Ertl S., Spitzzy A.* // *Isotop. Environ. Health Stud.* — 2004. — V. 40. — P. 163–170.
8. *Le Feuvre R. P., Jones R. J.* // *Analyst.* — 1988. — V. 113. — P. 817–823.
9. *Macko S. A., Lee W. Y., Parker P. L.* // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* — 1982. — V. 63. — P. 145–149.
10. *Matthews D. E. and Hayes J. M.* // *Anal. Chem.* — 1978. — V. 50. — P. 1465–1473.
11. *Preston T. and Owens N. J. P.* // *Biomed. Mass Spectrum.* — 1985. — V. 12. — P. 510–513.
12. *Gehre M., Strauch G.* // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2003. — V. 17. — P. 1497.
13. *Fujimoto T., Nishimura C., Omori H. and Matsuda J.* // *J. Mass Spectrom. Society Japan.* — 2004. — V. 52. — P. 196–204.
14. *Liu Y., Naraoka H., Hayashi K. and Ohmoto H.* // *Geochem. J.* — 2000. — V. 34. — P. 195–205.
15. *Lowe D. C., Brenninkmeijer C. A. M., Tyler S. C. and Dlugokencky E. J.* // *J. Geophys. Res.* — 1991. — V. 96. — P. 15455–15467.
16. *Merritt D. A., Hayes J. M. and Des Marais D. J.* // *J. Geophys. Res.* — 1995. — V. 100. — P. 1317–1326.
17. *Velivetskaya T. A., Ignatyev A. V., Reize M. V. and Kiyashko S. I.* // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2007. — V. 21. — P. 2451–2455.
18. *Веливецкая Т. А., Игнатьев А. В., Рейзе М. В., Кияшко С. И.* // *Масс-спектрометрия.* — 2006. — Т. 3. — С. 169–174.
19. *Coplen T. B., Brand W. A., Gehre M., Groning M., Meijer H. A. J., Toman B. and Verkouteren R. M.* // *Anal. Chem.* — 2006. — V. 78. — P. 2439–2441.

Глава 3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗОТОПНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ

А. М. Зякун¹, О. Дилли²

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
Пущино, Московская область

²Кафедра охраны почв и рекультивации, Бранденбургский технический
университет, Котбус, Германия

Введение

В большинстве национальных программ, контролирующих экологическое состояние и качество почв, используют микробиологические показатели, отражающие их биологическую активность и микробное разнообразие. Почвенные микроорганизмы играют ключевые функции в биодеструкции природных и антропогенных органических веществ, участвуют в минеральных пищевых циклах, непосредственно отвечая на изменения в окружающей среде и отражая сумму всех факторов, регулирующих трофические циклы. В настоящее время Европейский союз (EU) и многие страны во всем мире работают над законопроектами по охране качества почв и их биоразнообразия, используя информацию о тенденциях в изменении окружающей среды и расширении масштабов землепользования в будущем.

Качество почвы — это «... способность в течение длительного времени функционировать как консервативный компонент наземной экосистемы, обеспечивая ее биопродуктивность и поддерживая качество воды и воздуха, а также здоровье растений, животных и человека» [1]. Фактическая биопродуктивность качественной почвы агроценозов, наряду с плодородием, определяется ее экологической устойчивостью. Последняя проявляется как самоподдерживающаяся, саморегулируемая и самоочищающая способность почвы в отношении вредных для биогеоценоза стресс-факторов — биотических и абиотических. Именно экологическая устойчивость почвы обеспечивает ее безвредность для человека, почвенной и наземной биоты, экологичность биопродукции, незагрязненность сопряженных с почвой водной и воздушной сред,

а также, что немаловажно, безопасность и качество урожая, сохранение его от инфицирования и расхищения вредными организмами.

Качественная почва обеспечивает потенциальную биопродуктивность наземных экосистем, их экологическую устойчивость и непрерывное функционирование как глобального источника биофильных элементов. Потенциальная биопродуктивность и экологическая устойчивость почв определяют не только оптимальные объемы и качество биопродукции сельскохозяйственных и лесных экосистем, но, в первую очередь, условия экологического благополучия самого человека.

В настоящее время потеря плодородия почв и их деградация — важнейшая социально-экономическая проблема, создающая угрозу экологической, экономической и национальной безопасности России [2]. Наибольший ущерб почвам наносят загрязнение канцерогенными нефтепродуктами, стойкими пестицидами, техногенными радионуклидами, тяжелыми металлами; дегумификация, заселение токсиногенными фитопатогенами и другими вредными организмами, отходами социумов и животноводства, а также эрозия почв, локальное их переувлажнение и засоление [3]. Деградированные почвы во многом утратили природную микрофлору, свойственные ей структуру и функции. Такие почвы не способны к самоочищению, азотфиксации, иммобилизации элементов питания. Следствием деградации почв является утрата земельными и лесными угодьями рекреационных функций, невозможность использования их для создания и обустройства селитебных территорий, значительный недобор с таких земель растениеводческой продукции, ухудшение ее качества, а также загрязнение сопряженных сред (атмосферы, поверхностных, грунтовых и артезианских вод).

Современные задачи научных исследований постоянно ориентируют научные сообщества на разработку действенных методов для получения представительных биологических данных, характеризующих качество почвы и роль микроорганизмов в поддержании и сохранении экологического состояния [4]. Это крайне сложная задача, поскольку почвенные микроорганизмы быстро реагируют и адаптируются к условиям окружающей среды. Кроме того, воздействия на окружающую среду, причиняемые деятельностью человека, могут быть отделены от природных изменений лишь в том случае, когда они определяются в сравнении с историческими данными или когда проводится адекватный постоянный контроль экологически важных процессов и мест в окружающей среде.

Следовательно, ближайшей задачей экологических исследований является выбор таких специфических показателей микробных процессов в почве, которые отражали бы как краткосрочные, так и длительные изменения состояния и качества почв. При этом основными критериями таких показателей должны быть: 1) полезность в характеристике процессов определенных экосистем; 2) возможность интегрирования физических, химических и биологических свойств; 3) чувствительность к землепользованию и климатическим изменениям [4].

Впоследствии были предложены показатели, позволяющие охарактеризовать метаболический потенциал почвенной микробиоты, которые могут быть разделены на четыре основные группы в зависимости от той информации, которую они могут обеспечить.

1. Микробная биомасса в почве и количество микробных клеток.
2. Активность почвенных микроорганизмов и субстрат-индуцируемое дыхание (СИД).
3. Разнообразие почвенной микробиоты и структура микробного сообщества.
4. Взаимодействие растения–микроорганизмы.

Как известно, микроорганизмы являются главными факторами, обеспечивающими растения необходимыми питательными компонентами благодаря их участию в процессах иммобилизации и минерализации лабильных минеральных и органических веществ в почве [5]. Микробная биомасса может служить показателем эффективности разных схем землепользования (например, выбора севооборота, использования минеральных удобрений, обработки почвы, использования гербицидов против сорняков и т. п.). Кроме того, количество и специфика микробной биомассы являются важными индикаторами, свидетельствующими о степени загрязнения почвы токсичными поллютантами [6–9].

В числе основных современных и перспективных методов, позволяющих получить достоверные значения этих показателей, является метод молекулярной и изотопной масс-спектрометрии. Молекулярная масс-спектрометрия позволяет выявить наличие разных микробных представителей в почве по отдельным специфическим клеточным компонентам и продуктам их жизнедеятельности, а изотопная масс-спектрометрия дает уникальную возможность оценить микробную метаболическую активность по скорости и масштабам потребляемых субстратов.

Применение методов изотопной масс-спектрометрии было продемонстрировано на примерах определения метаболического потенциала микробиоты в пахотной [10] и лесной [11] почвах. Для разделения источников продукции микробного катаболита — углекислоты — использовались тестовые органические субстраты, которые отличались соотношениями распространенностей стабильных изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ от нативного почвенного органического вещества (ПОВ).

Показателями активизации микробиоты, использующей ПОВ, служили эффект глюкозной затравки, или прайминг-эффект (ПЭ), и дыхательный коэффициент (RQ), который количественно равен отношению мольных концентраций образовавшейся CO_2 и потребленного при этом кислорода [12]. Результаты изучения микробной минерализации органических продуктов в почве показали, что внесение в почву легко метаболизируемого продукта (например, глюкозы) наряду с активацией почвенной микробиоты способствует разрушению почвенного органического вещества и увеличению потока CO_2 из почвы в атмосферу.

Целью настоящего сообщения является демонстрация аналитических возможностей изотопной масс-спектрометрии в определении метаболической активности почвенных микроорганизмов и степени воздействия экзогенных субстратов на экологическую устойчивость почвы и окружающую среду.

Методы анализа микробной активности в почвах

Микробиологический метод. Традиционные методы определения количества микроорганизмов, живущих в почве, основаны на суммарной оценке метаболической активности или прямого счета микробных клеток [13–16]. Процедура определения жизнеспособных клеток требует их культивирования и включает два подхода: а) методика счета на чашках, содержащих селективные питательные среды и б) методика счета наиболее вероятного числа живых клеток. Некоторые некультивируемые почвенные микроорганизмы могут быть потенциально культивируемыми, если будут обеспечены адекватные пищевые условия для их роста. Тем не менее, многие микроорганизмы остаются некультивируемыми, поскольку они находятся в состоянии покоя (дремлющие) и требуют специальной «реанимации» для начала их роста или, являясь нежизнеспособными, но еще неповрежденными, могут быть определены микроскопически [17].

Используя соответствующие культуральные среды, в ряде случаев удастся выявить и пересчитать специфические функциональные группы микроорганизмов. Тем не менее, даже с универсальными средами для обеспечения общего роста микроорганизмов определяемые их количества обычно на порядок ниже, чем количества, полученные непосредственно микроскопированием. Следует отметить, что при внесении соответствующих изотопно-меченных субстратов и использовании методов изотопной масс-спектрометрии имеется возможность выявить метаболическую активность почвенных микроорганизмов, не культивируемых в лабораторных условиях.

Особая значимость определения микробной биомассы при оценке качества почвы нашла отражение в продолжающихся в настоящее время усилиях, направленных на разработку и усовершенствование методологии по определению ее количественных показателей [18]. Известны три методики, используемые для количественной характеристики микробной биомассы: а) окуривание парами хлороформа, влияющее на рост микроорганизмов [19]; б) окуривание парами хлороформа — экстракция микробных продуктов и их масс-спектрометрические характеристики [20, 21]; в) субстрат-индуцируемое дыхание (СИД) почвенной микробиоты [22]. В случае применения метода СИД для определения метаболического потенциала микробиоты существует проблема определения субстрата, который используют микроорганизмы в продукции биоген-

ной углекислоты. Для решения этой проблемы успешно применяют методы изотопной масс-спектрометрии.

Изотопная масс-спектрометрия в изучении субстрат-индуцируемого дыхания (СИД). В настоящее время метод СИД является наиболее часто используемым физиологическим методом для измерения активности микробной биомассы в почве. Так, после внесения в почву легко метаболизируемого субстрата (например, глюкозы) наблюдается немедленное увеличение скорости образования метаболической углекислоты, которое, как предполагают, является пропорциональным количеству микробных клеток и их биомассе. Используя экзогенный субстрат, который отличается по изотопному составу углерода от нативного почвенного органического вещества, с использованием методов изотопной масс-спектрометрии количественно прослеживаются источники метаболической углекислоты и идентифицируются ее основные продуценты. Предполагается, что количество бактерий и грибов в почве может быть определено путем селективного ингибирования скорости СИД с помощью антибиотиков и фунгицидов [23–26].

Во всех этих оригинальных методах скорость продукции CO_2 регистрируют как в первые часы, так в течение определенного времени после внесения субстрата. Данные, получаемые таким образом, могут быть отнесены к разным фазам микробного метаболизма в почве: а) базальная продукция CO_2 до внесения субстрата, б) начальная стадия субстрат-индуцируемого дыхания (СИД) сразу после внесения субстрата, в) лаг-период и г) экспоненциальный рост удельной скорости дыхания, количественно измеряемой по наклону прямолинейной зависимости, которую получают в случае представления скорости дыхания в логарифмических масштабах относительно координаты времени.

Методы разделения на бактериальную и грибную биомассы с использованием антибиотиков и фунгицидов при количественной оценке субстрат-индуцируемого логарифмического роста могут быть применимыми при условии, что все микроорганизмы будут расти сразу после внесения субстрата или, по крайней мере, растущие микроорганизмы являются репрезентативными для микроорганизмов, которые до этого не демонстрировали рост [25].

Кинетика продукции CO_2 при субстрат-индуцированном дыхании. С использованием изотопной характеристики углерода метаболической углекислоты определяют минерализуемый субстрат в процессе роста микробиоты в тестируемых почвах. Исходя из того что скорость образования микробных продуктов dp/dt пропорциональна удельной активности (q) и концентрации жизнеспособных микроорганизмов (N) [27], можно записать дифференциальное уравнение

$$\frac{dp}{dt} = qN. \quad (3.1)$$

Экспоненциальный рост микроорганизмов (N_t) во времени может быть представлен уравнением

$$N_t = N_0 e^{\mu t}, \quad (3.2)$$

где N_0 является начальной концентрацией микроорганизмов, μ — удельная скорость их роста, t — время. Скорость образования продуктов при экспоненциальной скорости роста микроорганизмов получаем после совместного решения уравнений (3.1) и (3.2):

$$\frac{dp}{dt} = qN_0 e^{\mu t}. \quad (3.3)$$

Концентрацию продукта в определенный момент времени t находим путем интегрирования (3.3) при условии, что p_0 соответствует концентрации продукта при $t = 0$:

$$p = p_0 + q \frac{N_0(e^{\mu t} - 1)}{\mu}. \quad (3.4)$$

Очевидно, что уравнение (3.4) применимо в случае образования продукции индивидуальными культурами микроорганизмов. Однако его можно использовать также и при описании образования продуктов смешанным сообществом почвенной микробиоты при условии, что микроорганизмы проявляют экспоненциальный рост в результате внесения субстрата, как, например, это было продемонстрировано при оценке потенциальной скорости микробной денитрификации [28].

Ранее [29, 30] обсуждалось, что микробная минерализация в почве легко метаболизируемого субстрата, такого как глюкоза, осуществляется двумя группами микроорганизмов: микроорганизмами, которые осуществляют экспоненциальный рост после внесения этого субстрата в почву (г-стратегии), и микроорганизмами, которые увеличивают константу скорости продукции CO_2 без роста численности их клеток (К-стратегии или нерастающие микроорганизмы) [31]. Обозначив константу скорости образования CO_2 или CO_2 -дыхания, осуществляемого нерастающими микроорганизмами, величиной K и заменив начальную скорость дыхания растущих микроорганизмов qN_0 на r , суммарную скорость продукции углекислоты почвенной микробиоты после внесения субстрата можно представить уравнением

$$\frac{dp}{dt} = re^{\mu t} + K. \quad (3.5)$$

После интегрирования (3.5) получим выражение, отражающее образование микробной продукции указанного метаболита:

$$p = p_0 + \frac{(e^{\mu t} - 1)r}{\mu} + Kt. \quad (3.6)$$

Скорость субстрат-индуцируемого дыхания (СИД), определяемая как скорость продукции CO_2 , которая наблюдается в результате минерализации внесенного субстрата ($t \approx 0$), представляется выражением

$$\text{СИД} = r + K. \quad (3.7)$$

Если справедливо, что количество К-стратегов не увеличивается при внесении экзогенного субстрата, а лишь возрастает их минерализующая активность, то должно существовать такое оптимальное количество субстрата, выше которого продукция CO_2 не увеличивается. При этом предполагается, что в начальный момент после внесения субстрата в почву активность г-стратегов является минимальной, но со временем происходит их экспоненциальный рост и соответствующее увеличение продукции метаболической CO_2 .

Принципиально значимым показателем в этом случае является однозначно определенное количество использованного внесенного в почву субстрата как фактора, активирующего рост почвенной микробиоты и образования CO_2 . Сложность в количественной регистрации углекислоты в этих измерениях состоит в том, что источниками метаболической углекислоты могут быть как почвенное органическое вещество (ПОВ), так и внесенный в почву легко метаболизируемый субстрат (например, глюкоза). При использовании субстрата, отличающегося по содержанию ^{13}C -изотопа от ПОВ, имеется возможность на основе материально-изотопного баланса определить количество метаболической углекислоты, которая образовалась при минерализации субстрата и ПОВ, соответственно.

Характеристика изотопного состава углерода микробных продуктов. Природные распространенности стабильных изотопов углерода в углеродсодержащих продуктах составляют около 1,1% ^{13}C и 98,9% ^{12}C . Чтобы обеспечить необходимую точность измерения отношений распространенностей ^{12}C и ^{13}C , углеродсодержащие минеральные и органические продукты превращают в CO_2 , а затем определяют соотношение интенсивностей пиков ионизированных молекул, изотопно разных по углероду, в масс-спектре CO_2 .

Величины $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ для органических продуктов в почве, глюкозе как экзогенном субстрате и BaCO_3 , полученном в результате осаждения метаболической CO_2 , измеряют с помощью специализированного изотопного масс-спектрометра. Количественной характеристикой распространенности изотопа ^{13}C в анализируемых образцах является относительная величина $\delta^{13}\text{C}$, которую определяют согласно выражению

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{sa}}}{R_{\text{st}}} - 1 \right) \cdot 1000 \text{‰}, \quad (3.8)$$

где $R_{\text{sa}} = [^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$ и $R_{\text{st}} = [^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$ являются отношениями $[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$ для изотопно разных молекулярных ионов CO_2 , получаемых из образца и международного стандарта *PDB* (Pee Dee Belemnite) соответственно.

Материально-изотопный баланс для смеси ПОВ и глюкозы, внесенной в почву, проводят, используя выражение

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}} Q_{\text{ПОВ}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{Глю}} Q_{\text{Глю}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{Глю+ПОВ}} (Q_{\text{ПОВ}} + Q_{\text{Глю}}), \quad (3.9)$$

где величины $\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}}$ и $\delta^{13}\text{C}_{(\text{Глю}+\text{ПОВ})}$ отражают содержание изотопа ^{13}C в органическом веществе почвы до и после внесения глюкозы в почву; $\delta^{13}\text{C}_{\text{Глю}}$ — изотопный состав углерода глюкозы; $Q_{\text{ПОВ}}$ и $Q_{\text{Глю}}$ — количества ПОВ и глюкозы в почвенных образцах соответственно. Полагая, что изотопные характеристики метаболической углекислоты наследуют ПОВ и внесенную в почву глюкозу с точностью до изотопных эффектов при их микробном потреблении и, используя (3.9), можно вычислить с помощью (3.10) долю CO_2 (F), которая образовалась при минерализации ПОВ после внесения глюкозы в почву:

$$F = \frac{\delta^{13}\text{C}_{(\text{Глю}+\text{ПОВ})} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Глю}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Глю}}}, \quad (3.10)$$

где $\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}}$ и $\delta^{13}\text{C}_{(\text{Глю}+\text{ПОВ})}$ отражают количество изотопа ^{13}C в CO_2 продуцируемом в почве до и после внесения глюкозы в почву; $\delta^{13}\text{C}_{\text{Глю}}$ — изотопный состав углерода глюкозы.

Обычно по условиям экспериментов, связанных с определением субстрат-индуцируемого дыхания (СИД), используют глюкозу в качестве легко метаболизируемого субстрата, углерод которой отличается величиной $\delta^{13}\text{C}$ от почвенного органического вещества (ПОВ) [10]. Благодаря этому суммарное количество CO_2 , выделившееся из почвы при микробной минерализации глюкозы и ПОВ, с помощью выражений (3.9) и (3.10) можно разделить на CO_2 , которая образуются из глюкозы и из ПОВ соответственно. Таким образом, разницу между количествами углерода CO_2 , продуцируемыми при минерализации ПОВ в образцах почвы с глюкозой и в контроле (без внесения глюкозы), отнесенную к количеству CO_2 в контроле (в процентах), можно использовать для оценки степени дополнительной минерализации нативного ПОВ в результате микробного использования экзогенного субстрата — глюкозы. В специальной литературе этот феномен (т.е. активация микробной минерализации ПОВ экзогенной глюкозой) получил название прайминг-эффекта (ПЭ) глюкозы. [10, 11, 32, 33]. Было показано [10], что использование изотопно различающихся по углероду глюкозы и ПОВ позволяет оценить степень активации микробной минерализации ПОВ в присутствии глюкозы и вычислить величину ее ПЭ в почве, используя выражение

$$\text{ПЭ} = \left(\frac{FC_{(\text{Глю}+\text{ПОВ})} - C_{\text{ПОВ}}}{C_{\text{ПОВ}}} \right) \cdot 100\%, \quad (3.11)$$

где $C_{\text{Глю}+\text{ПОВ}}$ — суммарное количество углерода CO_2 , образующееся при минерализации глюкозы и ПОВ в почве, сдобренной глюкозой; $FC_{\text{Глю}+\text{ПОВ}}$ — количество углерода CO_2 , образующееся при минерализации ПОВ в почве, сдобренной добавкой глюкозы, и рассчитанное с учетом (3.10).

Количество метаболической углекислоты и характеристика ее происхождения в почвах

Использование отношений $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ для характеристики активности микробиоты в пахотных почвах. Как отмечалось выше, микроорганизмы в почве играют важную роль в превращении и круговороте почвенного органического вещества (ПОВ) [34, 35]. Активация микробной минерализации ПОВ в пахотных, степных и лесных почвах является предметом исследований для агрохимиков, заинтересованных в получении максимального урожая на сельскохозяйственных угодьях. Получаемая информация в таких исследованиях представляет интерес также и для экологов, занимающихся поиском источников, которые могут быть причиной непрерывно возрастающей концентрации углекислоты в атмосфере и потенциально способствующей глобальным изменениям температуры и климата Земли в целом [36].

Внесение в почву органических и минеральных веществ оказывает определенное воздействие на микробные процессы, связанные с использованием ПОВ [37–39]. Ускорение или торможение микробной деградации органических продуктов (гуматов) в пахотной почве по сравнению с процессами без добавки субстратов свидетельствуют о положительной или отрицательной активации (затравки) этих процессов внесенными продуктами и назывались, соответственно, положительным или отрицательным прайминг-эффектами (ПЭ) [32, 40–42]. Имеющиеся в настоящее время результаты по изучению роли органических добавок в почву с целью активации микробной минерализации ПОВ связаны с разноречивыми суждениями, как со скептическими [43–45], так и весьма оптимистическими [46]. Положительный ПЭ, составляющий 336% от исходной продукции CO_2 почвы, наблюдали после внесения в почву зеленой растительной массы. Этот пример показал, что микробная минерализация ПОВ может быть активирована поступлением органических продуктов в почву и может достигать существенных размеров [46].

Большинство экзогенных субстратов, попадающих в почву, стимулировали микробную деградацию веществ, содержащих ароматические структуры гуматов (положительный ПЭ). Однако в случае модельной системы по изучению микробной минерализации лигниноподобных веществ внесение глюкозы как дополнительного субстрата не сопровождалось ПЭ, а добавка в почву щавелевой кислоты и катехола сопровождалась отрицательным ПЭ, т. е. микроорганизмы переключались на потребление внесенных субстратов [38]. Возникает вопрос: возможна ли (и если да, то в какой степени) интенсификация микробных процессов, способствующих трансформации и минерализации ПОВ в почвах путем внесения легко утилизируемых субстратов?

Известно, что в результате потребления растительных продуктов микроорганизмами образуются микробная биомасса, углекислота и ор-

ганические метаболиты с изотопным составом углерода, наследующим с точностью до изотопного эффекта состав использованных продуктов. Величины $\delta^{13}\text{C}$ углекислоты, выделившейся из почвы в процессе разрушения растительного материала, могут быть использованы для того, чтобы проследить минерализацию растительных остатков и других веществ, попадающие в почву [47–50]. Глюкоза как растительный продукт часто применялась в качестве экзогенного субстрата в экспериментах по биodeградации органических продуктов [51–54]. Известно, что изотопный состав углерода ПОВ пахотных почв, на которых были выращены C_3 -растения, и продуцируемой CO_2 , образующейся при микробной минерализации ПОВ, характеризуются величинами $\delta^{13}\text{C}$ в диапазоне $-30 \div -25\text{‰}$ [55, 57]. В свою очередь, углекислота, образующаяся при минерализации глюкозы как продукта фотосинтеза C_4 -растений с изотопным составом углерода, имеющем $\delta^{13}\text{C}$ в диапазоне $-13 \div -11\text{‰}$, отличается от ПОВ в почвах после культивирования на них C_3 -растений. Следовательно, различие значений $\delta^{13}\text{C}$ экзогенной глюкозы и эндогенного ПОВ в таких случаях может быть использовано как изотопная метка для определения происхождения CO_2 , образующейся при микробной минерализации указанных органических продуктов в почве.

Показано [54], что микробная минерализация глюкозы, внесенной в почву в лабораторных экспериментах, сопровождалась выделением CO_2 , количество которой не было сбалансировано по отношению к потребленному при этом молекулярному кислороду, как это следовало из теоретических расчетов. Отношение молярных количеств, продуцируемой CO_2 и потребленного количества O_2 , которое носит название дыхательного коэффициента (RQ), было выше 1, т. е., $\text{RQ} > 1$, в то время как RQ при количественном окислении глюкозы до CO_2 должен быть равен 1. Наблюдаемый факт рассматривался как свидетельствовало о наличии, наряду с кислородом, дополнительных акцепторов электронов при микробной минерализации глюкозы в почве. Учитывая научную и практическую значимость возникших при этом вопросов, требовалось проведение специальных исследований для понимания обнаруженного явления.

В основу модельных экспериментов было положено использование количественных и изотопных характеристик углерода метаболической CO_2 , ПОВ и вносимого в почву субстрата (глюкозы), создающих возможность оценить влияние этого легко метаболизируемого субстрата на активацию микробной минерализации органических продуктов в пахотной почве, а также выяснить особенности использования молекулярного кислорода как акцептора электронов в процессах минерализации нативных органических продуктов (гуминовых веществ).

Анализируемые образцы почвы. Модельные опыты по изучению микробной минерализующей активности проводили, используя образцы почв, которые были отобраны на поле (пахотные земли) в районе озера

Борнхевед, Германия (54°06'N, 10°14'E), где среднегодовая температура и среднегодовые осадки составляли 8,1°C и 697 мм соответственно [39]. Каждый из образцов почвы (AB₁, AB₂ и AB₃), собранный в трех местах верхнего слоя от 0 до 20 см, составлен из 10 отдельных проб, отобранных на расстоянии около 20 м друг от друга. Остатки растений были удалены, а почвы просеяли через сито (2 мм) и хранили не более 4 недель при 4°C. Органическое вещество составляло около 15000 мкг С/г сухой почвы, а величина рН ~ 5,5 [39]. Образцы почвы предварительно выдерживали в течение 6 суток при 22°C, до начала измерения дыхания почвенной микробиоты, которое активировали путем внесения экзогенной глюкозы.

На первом этапе были проведены опыты, различающиеся количеством внесенной глюкозы (С-Глю) на 1 г сухой почвы (СП) (мкг С-Глю/г СП): 2000 (I), 500 (II), 50 (III) и 0 (IV, контроль). Каждый опыт проводили на трех образцах почвы, используя, соответственно, AB₁, AB₂ и AB₃. Соответствующие количества глюкозы перед внесением в почву смешивали с 0,5 г тальковой пудры. Образцы почвы (100 г СП) помещали в 250 мл колбы, внутри которых размещали 10 мл стеклянные стаканчики с 2–6 мл 1 М NaOH для улавливания выделяющейся CO₂. Образующуюся CO₂ определяли по объему 0,1 М HCl, расходуемому при титровании щелочного абсорбента до обесцвечивания в растворе индикатора рН — фенолфталеина. Углекислоту, зафиксированную в виде карбоната натрия, осаждали затем как BaCO₃ с использованием BaCl₂. Затем 3 мг сухого осадка, содержащего около 200 мкг С, использовали для измерения характеристики отношений ¹³C/¹²C с помощью изотопного масс-спектрометра Finnigan MAT Delta Plus (Германия).

Внесение в тестируемые образцы почвы разных количеств субстрата (глюкозы), очевидно, в разной степени могло адаптировать отдельные группы почвенных микроорганизмов к этому субстрату. Следовательно, для оценки адаптации микробиоты к внесенному субстрату было проведено повторное внесение глюкозы в почвы (второй этап экспериментов).

На втором этапе экспериментов с образцами пахотной почвы повторно вносили по 500 мкг С-Глю/г СП в варианты II, III, и IV после 8-суточной минерализации органических продуктов в почвах.

В обеих схемах экспериментов для оценки микробной активности в образцах почв использовали количественные показатели продукции CO₂ и потребленного микробиотой O₂ (величины RQ). Утилизацию кислорода контролировали с помощью респирометра (Sapromat, Германия). Дыхательный коэффициент (RQ), определяемый как отношение мольных концентраций выделившейся CO₂ и потребленного O₂, служил индикатором минерализующей активности микроорганизмов.

Минерализация ПОВ и экзогенной глюкозы. Если количество активных микробных клеток в тестируемых образцах почвы постоянно, увеличение и продолжительность минерализующей активности почвенной микробиоты зависит от количества внесенной глюкозы в почву

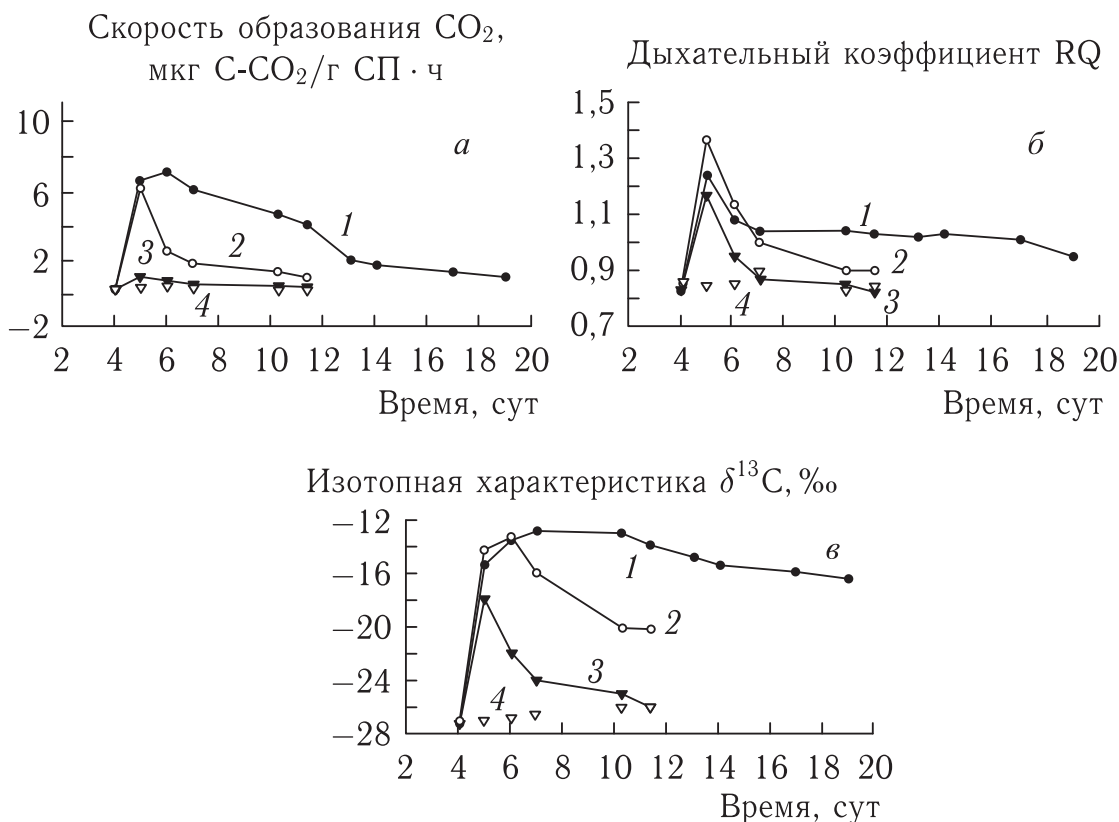


Рис. 3.1. Характеристики микробной минерализации органических продуктов в почве: *a* — скорость образования CO₂; *б* — дыхательный коэффициент (RQ); *в* — δ¹³C-CO₂ до (опыт IV) и после внесения в почву глюкозы (опыт I–III) в течение 8 суток инкубации

(рис. 3.1): максимальная микробная продукция CO₂ отмечена при добавке 2000 (опыт I) и минимальная — 50 мкг С-Глю/г СП (опыт III). На первом этапе экспериментов в течение 8 сут инкубации в опытах I и II общее количество выделившейся CO₂ превышало в 7 и 2,7 раза количество CO₂, соответственно обнаруженное в контроле (табл. 3.1). Согласно материальному балансу, около половины внесенной глюкозы оставалось в почвах опытов I и II в конце первого этапа. В опыте III продукция CO₂ за этот период была близка к контролю (опыт IV), что свидетельствовало об исчерпании внесенной глюкозы в почву. Максимальные различия в количествах CO₂, образовавшихся в опытах I–III, были зарегистрированы в начальный период инкубации. Как следует из рис. 3.1, после внесения глюкозы в почву максимальная скорость образования CO₂ наблюдалась через 24 ч в опытах II и III и через 48 ч в опыте I. В табл. 3.2 представлены скорости потребления O₂, образования CO₂ и соответствующие значения RQ в первые сутки после добавки глюкозы в почву. Во всех опытах величина RQ была максимальной по сравнению с контролем и значимо превышала 1,0. В опытах I и II максимальные скорости выделения CO₂ из почвы были сравнительно близкими и составляли, соответственно, 6,61 и 6,15 мкг С-CO₂ · г⁻¹ СП · ч⁻¹ (табл. 3.2), превосходя более чем в 20 раз скорости выделения CO₂ до внесения глюкозы в почву и контроле. В опыте III в первые 23 ч

Таблица 3.1

Скорость образования CO_2 и ее количество, выделившееся из почвы в течение интервала наблюдения после внесения (опыты I–III) и без внесения глюкозы (опыт IV)

Опыт	Интервал наблюдения, ч	Скорость выделения CO_2 , мкг С- CO_2 /(г СП · ч)	*Образование CO_2 , мкг С- CO_2 /г СП
I	0–23	6,61 (0,60)	152,0 (14)
	23–48	7,12 (0,59)	178,0 (15)
	48–73	6,08 (0,41)	154,0 (10)
	73–145	4,67 (0,03)	327,0 (2)
	145–177	4,08 (0,19)	131,0 (6)
	0–177	—	952,0 (47)
II	0–23	6,15 (0,42)	142,0 (10)
	23–48	2,47 (0,37)	62,0 (9)
	48–145	1,35 (0,05)	132,0 (4)
	145–177	0,98 (0,03)	31,0 (1)
	0–177	—	367,0 (24)
III	0–23	1,07 (0,29)	25,0 (7)
	23–145	0,79 (0,05)	97,0 (4)
	145–177	0,42 (0,02)	13,0 (1)
	0–177	—	135,0 (12)
IV	0–145	0,83 (0,07)	121,0 (10)
	145–177	0,41 (0,06)	13,0 (2)
	0–177	—	134,0 (12)

* Количество CO_2 , образовавшееся в течение интервала наблюдения в опыте. В скобках приведены стандартные отклонения измерений для трех параллельных повторов каждого опыта.

Таблица 3.2

Скорость потребления O_2 и образования CO_2 , величина дыхательного коэффициента (RQ) в процессе минерализации глюкозы почвенной микробиотой в течение 24 ч после внесения глюкозы в образцы пахотной почвы

Глюкоза, мкг С-глю/г СП	Потребление O_2 , мкг O_2 /г СП · ч	Выделение CO_2 , мкг С – CO_2 /г СП · ч	RQ
0,0 (контроль)	1,12 (0,09)	0,36 (0,06)	0,83 (0,01)
50,0 (опыт III)	2,02 (0,11)	1,07 (0,29)	1,17 (0,05)
500,0 (опыт II)	12,08 (0,32)	6,15 (0,42)	1,36 (0,07)
2000,0 (опыт I)	14,86 (1,37)	6,61 (0,60)	1,24 (0,01)

Примечание. В скобках даны стандартные отклонения трех параллельных измерений в каждом из опытов.

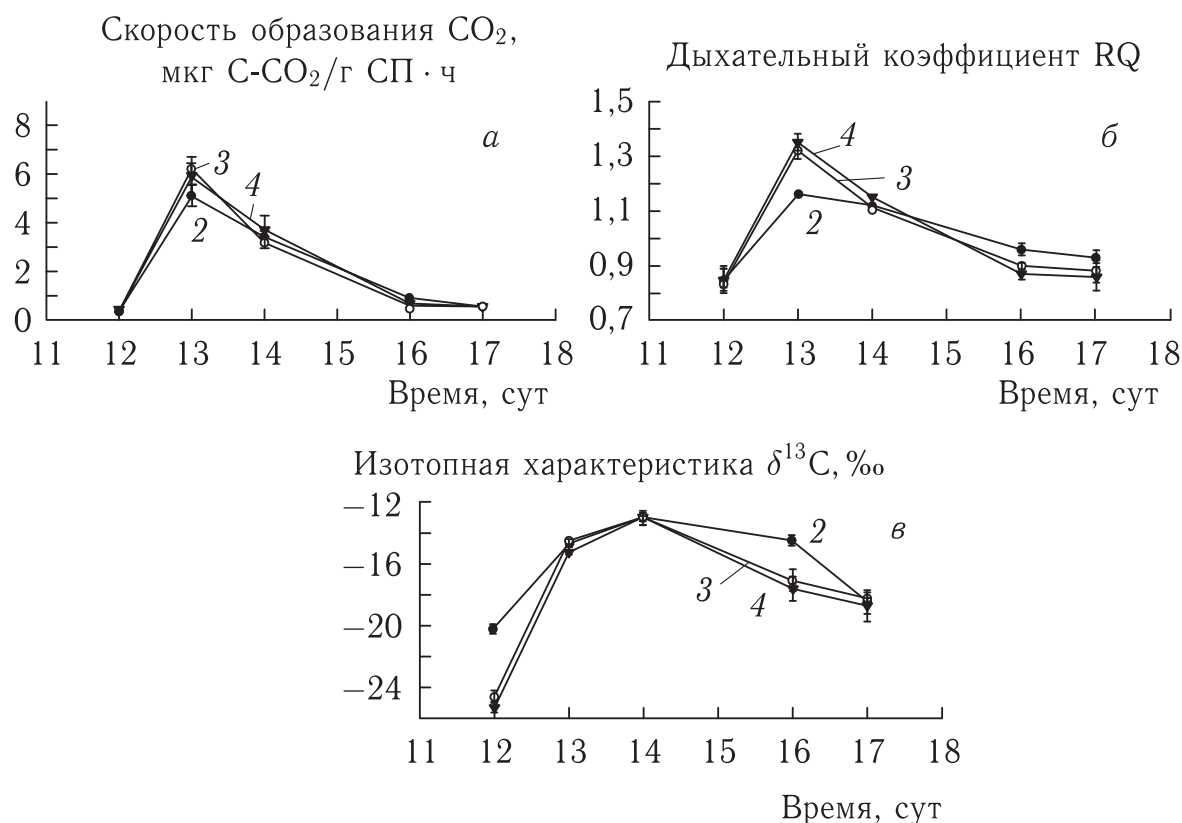


Рис. 3.2. Характеристики микробной минерализации органических продуктов в почве после внесения 500 мкг С-Глю/г СП в опытах II–IV по истечении 8 сут инкубации: а) — скорость образования CO_2 ; б) — дыхательный коэффициент (RQ); в) — $\delta^{13}\text{C-}\text{CO}_2$ выделившейся из почвы

после добавки глюкозы скорость образования CO_2 возросла в 3 раза по сравнению со скоростью минерализации ПОВ до внесения глюкозы (табл. 3.2). Скорость минерализации органических продуктов в последнем случае (опыт III) со временем постепенно снижалась, практически достигая скорости выделения CO_2 в контроле (табл. 3.1).

Как отмечалось выше, в первые сутки наблюдения после внесения глюкозы в почву скорости продукции CO_2 в опытах I (2000 мкг С-Глю/г СП) и II (500 мкг С-Глю/г СП) имели близкие значения, несмотря на существенно разные количества внесенной глюкозы в почву (рис. 3.1). Согласно кинетическим представлениям, подобная независимость скорости продукции CO_2 от количества внесенного субстрата свидетельствует о «насыщении» им активной части почвенной микробиоты, которая представляется как К-стратеги. Учитывая результаты приведенных выше наблюдений, метаболический потенциал К-стратегов в образцах пахотной почвы в районе озера Борнхевед (Германия) не превышал 500 мкг С-Глю/г СП . В случае превышения указанного количества внесенной глюкозы (опыт I) отмечен дальнейший рост скорости продукции за счет развития микроорганизмов, относящихся к г-стратегам. Следует отметить, что сравнительно быстрое исчерпание количества внесенной глюкозы К-стратегами в опытах II и III не позволило развиваться г-стратегам, что привело к резкому снижению скорости продукции CO_2 . Как

отмечалось выше, по схеме эксперимента для оценки степени адаптации почвенной микробиоты к экзогенному субстрату было проведено дополнительное внесение субстрата.

Согласно рис. 3.2 (второй этап экспериментов), повторное внесение по 500 мкг С-Глю/г СП в опытах II, III и IV также сопровождалось повышенной скоростью образования CO_2 в первые сутки после внесения глюкозы. Последующее существенное снижение продукции углекислоты демонстрирует метаболическое преимущество К-стратегов по отношению к г-стратегам в конкуренции за субстрат. В табл. 3.3 представлены скорости образования CO_2 , потребления O_2 , а также изменение RQ в течение 24 ч после внесения глюкозы в почву на втором этапе экспериментов. Особенностью опытов II, III и IV на этом этапе была разная степень адаптации почвенной микробиоты к экзогенной глюкозе. Так, указанная адаптация отсутствовала в опыте IV, была минимальной в опыте III (преинкубация с 50 мкг С-Глю/г СП) и максимальной в опыте II (преинкубация с 500 мкг С-Глю/г СП). Как следует из табл. 3.3, максимальная скорость образования CO_2 и значение RQ, значительно превышающее 1, были зарегистрированы в опытах с низкой адаптацией почвенной микробиоты к глюкозе (опыты III и IV). Это рассматривается как свидетельство доминирующей роли К-стратегов на начальных стадиях потребления легко метаболизируемого субстрата — глюкозы.

Таблица 3.3

Скорость потребления O_2 , образование CO_2 и величина RQ в процессе минерализации глюкозы почвенной микробиотой в течение 24 ч после внесения 500 мкг С-Глю/г СП и 8-суточной преинкубации с разными количествами глюкозы

Опыт	Глюкоза, мкг С/г СП	Потребление O_2 , мкг/г СП · ч	Выделение CO_2 , мкг С/г СП · ч	RQ
II	500,0	11,73 (0,93)	5,10 (0,43)	1,16 (0,01)
III	50,0	12,55 (0,68)	6,21 (0,22)	1,32 (0,03)
IV	0,0 (контроль)	11,58 (1,32)	5,90 (0,79)	1,35 (0,03)

Примечание. В скобках даны стандартные отклонения трех параллельных измерений в каждом из опытов.

$\delta^{13}\text{C}$ как специфический признак углерода субстратов. Изотопный состав углерода исходного ПОВ в АВ₁, АВ₂ и АВ₃ характеризовался величиной $\delta^{13}\text{C}$, равной $-27,01 \pm 0,32\text{‰}$ (табл. 3.4). Полученное значение $\delta^{13}\text{C}$ является типичным для органического вещества почв после выращивания на них С₃-растений в течение длительного времени [28]. Изотопный состав углерода глюкозы, используемой в опытах, характеризовался величиной $\delta^{13}\text{C} = -11,4\text{‰}$, присущей С₄-растениям. Таким образом, вносимые в почву дозы глюкозы отличались величинами $\delta^{13}\text{C}$ на 15,6‰ от изотопного состава углерода ПОВ и рассматривались как изотопно меченные субстраты.

Таблица 3.4

Изотопные характеристики углерода органического вещества в образцах пахотной почвы ($\delta^{13}\text{C}$, ‰) до (исходные) и после 19 сут инкубации с разными количествами глюкозы, внесенной в почву

Образец	$\delta^{13}\text{C}$, ‰				
	Исходные	2000*	500*	50*	0,0*
AB ₁	–27,60	–26,10	–26,83	–26,57	–26,82
AB ₂	–26,49	–26,10	–27,49	–26,42	–27,09
AB ₃	–26,94	–26,12	–26,53	–26,92	–26,68
	–27,0(0,6)**	–26,1(0,01)	–27,0(0,5)	–26,6(0,3)	–26,9(0,2)

* Количества глюкозы, внесенные в образцы почвы, (мкг С-Глю/г СП).

** Среднее значение величин $\delta^{13}\text{C}$ для образцов почвы, в скобках представлены стандартные отклонения трех параллельных измерений.

Согласно расчетам, проведенным с помощью выражения (3.9), следовало ожидать, что величина $\delta^{13}\text{C}$ суммарного органического вещества в почве после внесения глюкозы (первый и второй этапы эксперимента) должна быть равной –25,2‰ в опыте I (15000 мкг С-ПОВ/г СП + 2000 мкг С-Глю/г СП), около –26,03‰ в опыте II (15000 мкг С-ПОВ/г СП + 1000 мкг С-Глю/г СП), около –26,46‰ в опыте III (15000 мкг С-ПОВ/г СП + 550 мкг С-Глю/г СП) и около –26,5‰ в опыте IV (15000 мкг С-ПОВ/г СП + 500 мкг С-Глю/г СП). Как следует из табл. 3.4, добавки глюкозы в почву (первый и второй этапы экспериментов) в опытах II, III и IV по истечении 19 сут инкубации не изменили содержания ^{13}C в суммарном органическом веществе (в пределах ошибки измерения $\pm 0,2\%$). Это позволило полагать, что внесенное в почву количество глюкозы до 1000 мкг С-Глю/г СП было минерализовано почвенной микробиотой до CO_2 в течение 19 сут. Заметная разность около $0,9 \pm 0,2\%$ между значениями $\delta^{13}\text{C}$ для органического вещества в почве относительно исходного его значения была обнаружена после 19 сут инкубации в опыте I, где было внесено 2000 мкг С-Глю/г СП (табл. 3.4). Ожидаемая разность между $\delta^{13}\text{C}$ органического вещества в почве после внесения глюкозы и исходным содержанием ^{13}C в ПОВ составляла 1,8‰, а экспериментально обнаруженная разность в $0,9 \pm 0,2\%$ показала, что в опыте I было минерализовано до CO_2 не более 50% глюкозы или не более 1000 мкг С-Глю/г СП. Таким образом, анализ количественного и изотопного состава углерода органического вещества в опытах I, II, III и IV позволил определить общую метаболическую активность микробиоты в образцах почвы, которая характеризовалась средней скоростью минерализации экзогенной глюкозы около 50 мкг С-Глю/г СП в сутки. С этим согласуется степень потребления глюкозы в опыте III, где через сутки скорость продукции CO_2 была близкой к контролю.

Возможное фракционирование ^{12}C и ^{13}C при потреблении ПОВ микробиотой оценивали по разности между изотопным составом углерода ПОВ и CO_2 , образующейся при минерализации только ПОВ. Изотопный состав выделившейся CO_2 в опытах I, II, III и IV до внесения экзогенной глюкозы и рассчитанный как среднее значение данных в табл. 3.5 составлял около $-27,15 \pm 0,2\text{‰}$. В пределах ошибки измерения изотопный состав углерода CO_2 наследовал ПОВ, характеризующийся $\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}} = -27,01 \pm 0,32\text{‰}$ (табл. 3.4). Следовательно, можно полагать, что фракционирование изотопов углерода при микробной минерализации органического вещества в почве отсутствовало или имело незначительную величину. Этот вывод согласуется с литературными данными, в которых также показано незначительное фракционирование изотопов углерода субстратов, метаболизируемых микробиотой почв [10, 49, 58, 59]. Таким образом, величина $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$ в проводимых опытах наследует $\delta^{13}\text{C}$ органических продуктов, используемых микроорганизмами в качестве субстратов.

Таблица 3.5

Изотопный состав органического вещества в почвах и CO_2 , образующейся при его минерализации почвенной микробиотой в течение 3 сут (до внесения глюкозы в почву)

Образец	$\delta^{13}\text{C}, \text{‰}$				
	ПОВ(исх.)	$\text{CO}_2(\text{исх})\text{I}^*$	$\text{CO}_2(\text{исх})\text{II}^*$	$\text{CO}_2(\text{исх})\text{III}^*$	$\text{CO}_2(\text{исх})\text{IV}^*$
AB ₁	-27,60	-27,1	-27,3	-28,0	-27,0
AB ₂	-26,5	-27,4	-26,6	-26,7	-27,0
AB ₃	-27,0	-27,2	-27,1	-27,2	-27,3
	-27,0(0,6)**	-27,24(0,2)	-27,0(0,4)	-27,3(0,7)	-27,1(0,2)

*I, II, III, IV — опыты, в которых впоследствии была внесена глюкоза в количествах 2000, 500, 50 и 0 мкг С-Глю/г СП соответственно.

** Среднее значение величин $\delta^{13}\text{C}$ для образцов почвы, в скобках даны стандартные отклонения трех параллельных измерений.

В течение 7 сут после внесения глюкозы в почву (опыты I, II, III) величина $\delta^{13}\text{C}$ метаболической CO_2 существенно различались по сравнению с контролем (первый этап экспериментов) в результате минерализации глюкозы и ПОВ (табл. 3.6). Наибольшее обогащение ^{13}C образовавшейся CO_2 по сравнению с исходным ее значением было зарегистрировано в опыте I в течение первых 7 сут инкубации. В опыте III величина $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$ была близка к контролю уже через 6 сут после внесения глюкозы в почву. Изменения величин $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$ в первые 24 ч после внесения разных доз глюкозы в опытах I, II, III представлены на рис. 4.3. Эти данные и результаты предварительных измерений $\delta^{13}\text{C}$ глюкозы и ПОВ были использованы при оценке количества углерода глюкозы, включенного в общий пул CO_2 на основе материально-изотопного баланса (3.9). Анализ динамики изменения скорости минера-

Таблица 3.6
Изменение величины $\delta^{13}\text{C}$ для CO_2 выделившейся при инкубации образцов почвы в зависимости от количества внесенной в почву глюкозы

Время, сут	$\delta^{13}\text{C}$, ‰			
	2000*	500*	50*	0,0* (контроль)
0	−27,1 (0,5)	−27,0 (0,3)	−27,1 (0,5)	−27,1 (0,2)
1	−15,3 (0,3)	−14,3 (0,2)	−17,9 (0,2)	−26,8**
2	−13,5 (0,3)	−13,3 (0,4)	—	−26,4**
3	−12,8 (0,2)	—	—	−24,4**
6	−13,0 (0,6)	−20,1 (0,2)	−24,6 (0,6)	−25,3 (0,3)
7	−13,9 (0,8)	−20,1 (0,1)	−23,8 (0,3)	−24,2 (0,7)

* Количество глюкозы, внесенной в почву, (мкг С-Глю/г СП).

** Величины $\delta^{13}\text{C}$ (‰) были рассчитаны путем экстраполяции между исходными и через 7 сут инкубации значениями $\delta^{13}\text{C}$ в образцах почвы (без внесения глюкозы).

В скобках даны стандартные отклонения при трех параллельных измерениях в каждом из опытов.

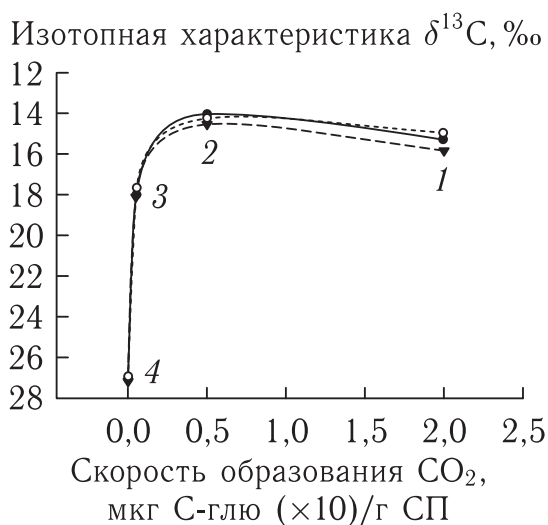


Рис. 3.3. Вариации изотопного состава углерода углекислоты ($\delta^{13}\text{C}$, ‰), образующейся при микробной минерализации органических продуктов через 1 сут после внесения глюкозы в почву, в зависимости от количества глюкозы (мкг С-Глю/г СП): 1 — 2000; 2 — 500; 3 — 50; 4 — 0

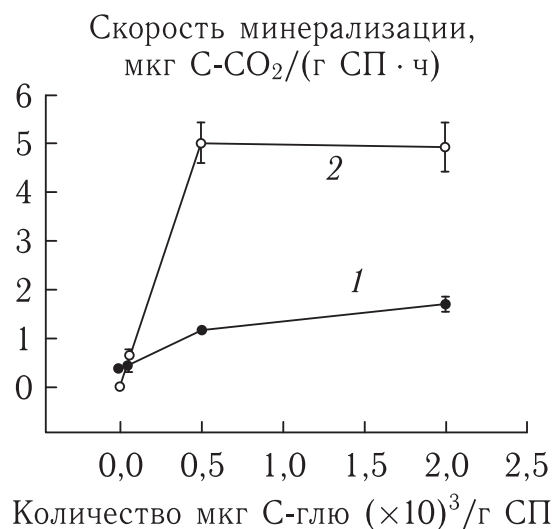


Рис. 3.4. Скорости минерализации органических продуктов в почве в течение 1 сут после внесения глюкозы, в зависимости от количества экзогенной глюкозы (мкг С-Глю/г СП): 1 — CO_2 из ПОВ; 2 — CO_2 из глюкозы

лизации глюкозы до CO_2 (рис. 3.4) показал, что метаболический потенциал микробного пула в почве на начальной стадии после внесения глюкозы (предположительно К-стратегии) имеет ограничение и достигает «насыщения» экзогенной глюкозой при внесении в почву свыше 500 мкг С-Глю/г СП.

Для понимания катаболических процессов крайне важным было определить вклад углерода глюкозы и ПОВ в продукцию CO_2 на стадии развития микроорганизмов в почве, относящихся к К-стратегам. Принимая во внимание то, что в опыте I в течение 24 ч образовалась CO_2 с $\delta^{13}\text{C}_{\text{Глю+ПОВ}} = -15,34\text{‰}$ (рис. 3.3) и с учетом характеристик изотопного состава углерода ПОВ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}} = -27,1\text{‰}$) и глюкозы ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Глю}} = -11,4\text{‰}$), с помощью (3.9) и (3.10) были вычислены количества углерода ПОВ и глюкозы, которые минерализовались микробиотой. Оказалось, что в общем пуле CO_2 доля углерода ПОВ составляет около 25%, а глюкозы 75%. Это свидетельствует о том, что на один атом С из ПОВ приходится три атома С из глюкозы или 1 моль глюкозы активирует использование одного моля двухуглеродной органической единицы из ПОВ. Такой единицей, вероятно, может быть ацетил-КоА, который образовался из ПОВ в результате активации этого процесса за счет микробного окисления глюкозы.

Прайминг-эффект (ПЭ) глюкозы. С учетом характеристик изотопного состава углерода ПОВ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{ПОВ}}$), глюкозы ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Глю}}$) и суммарной CO_2 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Глю+ПОВ}}$) были определены скорости образования углекислоты при минерализации ПОВ и экзогенной глюкозы, соответственно (рис. 3.5). Микробная минерализация ПОВ после добавки глюкозы в почву была значительно выше, чем в контроле в течение всего 19-суточного наблюдения. При этом максимальная минерализация ПОВ отмечена лишь в первые 48 ч после глюкозной добавки. Через 3 сут экспозиции скорость минерализации ПОВ заметно снизилась, несмотря на активность почвенной микробиоты, свидетельством чего была высокая скорость минерализации глюкозы.

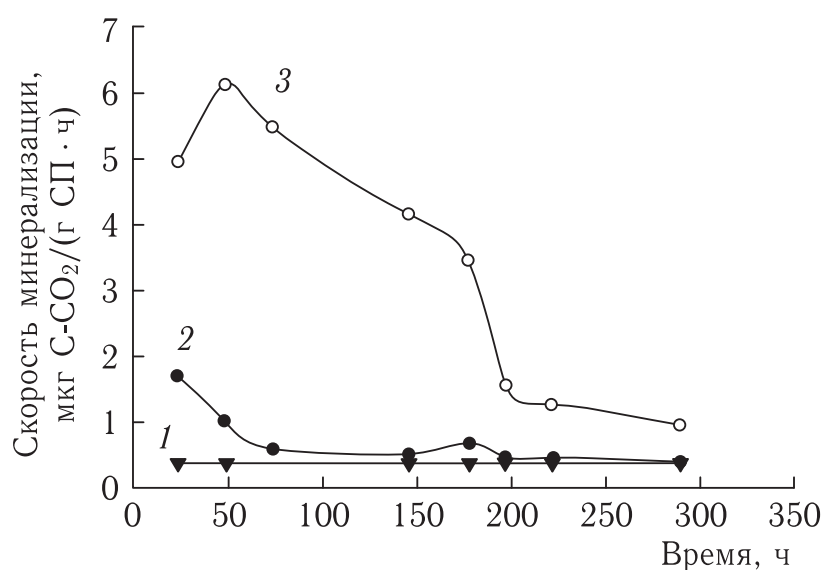


Рис. 3.5. Скорости микробной минерализации почвенного органического вещества (ПОВ) в зависимости от времени инкубации: 1 — контроль; 2 — активация минерализации ПОВ, внесенной глюкозой в почву (прайминг-эффект); 3 — минерализация глюкозы в почве

Как было отмечено выше, почвенная микробиота состоит из двух групп микроорганизмов: К- и г-стратегов [31, 60–62]. Микроорганизмы К-стратегии — это бодрствующая часть почвенной популяции, которая способна минерализовать ПОВ. Микроорганизмы г-стратегии — ее дремлющая часть, которая может быстро развиваться при попадании в почву легко метаболизируемого субстрата (например, глюкозы); г-стратегии не минерализуют ПОВ или минерализуют его в незначительном количестве [10, 62].

С учетом этого предполагалось, что в опыте I (рис. 3.5) в первый момент после внесения глюкозы в почву скорости минерализации глюкозы и ПОВ определяются активностью микроорганизмов, принадлежащих к К-стратегам [61]. В дальнейшем видно (рис. 3.5), что г-стратегии получили преимущество в конкуренции за глюкозу как субстрат на 3 сут, поскольку при высокой скорости минерализации глюкозы отмечена низкая минерализация ПОВ. Через 8 сут инкубации произошло истощение глюкозы и/или необходимых минеральных веществ, обеспечивающих высокую скорость метаболизма г-стратегов. В результате этого часть клеток отмерла и, соответственно, снизилась скорость продукции CO_2 [61]. Часть биомассы мертвых клеток послужила субстратом для К-стратегов, благодаря чему вновь возросла скорость минерализации ПОВ (рис. 3.5).

Максимальное значение ПЭ, составляющее 357%, отмечено в течение 1 сут после внесения глюкозы в почву в опыте I, и оно снижалось до 84% по истечении 8 сут инкубации (табл. 3.7). Величина ПЭ также уменьшалась по мере снижения дозы вносимой в почву глюкозы: в опыте II величина ПЭ в первые сутки составляла 213%, а в опыте III она снижалась до 22%.

На втором этапе экспериментов в образцы почв (опыты II, III и IV) после 8-суточной инкубации с разными количествами глюкозы повторно было внесено по 500 мкг С-Глю/г СП. Из результатов этих опытов прослеживается определенная корреляция между величинами ПЭ и RQ. Так, в течение 8 сут инкубации ПЭ изменялся от положительных величин, превышающих 100%, до отрицательных значений (табл. 3.8), а RQ — от величин больше единицы до исходных значений. Следовательно, увеличение микробной минерализации ПОВ, активируемого глюкозой, связано с оттоком части электронов, образующихся при окислении глюкозы, на акцепторы иные, чем O_2 .

Известно, что ПОВ представляет собой, в основном, трудно метаболизируемые продукты (гуминовые вещества), в которых содержатся ароматические структуры. Превращение ПОВ в доступные для микроорганизмов субстраты предусматривает трансформацию этих структур (например, гидроксилирование или оксигенирование) с расходом восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) или восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН) [63, 64]. Микробная минерализация органических продуктов связана с циклом

Таблица 3.7

Минерализация почвенного органического вещества (CO_2 из ПОВ), экзогенной глюкозы (CO_2 из глюкозы) и ПЭ после внесения глюкозы в образцы почв

Опыт	*Время инкубации, сут.	CO_2 из ПОВ, мкг С- CO_2 /г СП · ч	CO_2 из глюкозы, мкг С- CO_2 /г СП · ч	ПЭ, %
I	0	0,38 (0,07)	—	—
II	0	0,37 (0,06)	—	—
III	0	0,37 (0,06)	—	—
IV	0	0,36 (0,04)	—	—
I	1	1,69 (0,15)	4,92 (0,5)	357 ± 20
II	1	1,15 (0,03)	5,00 (0,41)	213 ± 4
III	1	0,45 (0,13)	0,62 (0,16)	22 ± 17
I	2	1,00 (0,04)	6,12 (0,62)	170 ± 6
II	2	0,30 (0,01)	2,16 (0,38)	-19 ± 6
I	3	0,59 (0,06)	5,48 (0,44)	60 ± 8
I	7	0,68 (0,21)	3,40 (0,10)	84 ± 28
II	7	0,55 (0,02)	0,43 (0,01)	49 ± 3
III	7	0,22 (0,16)	0,06 (0,04)	—
IV	7	0,33 (0,03)	0,08 (0,03)	—

* Временем инкубации является временной интервал, измеряемый с момента внесения глюкозы в почву.

В скобках приведены стандартные ошибки измерений трех параллельных опытов.

трикарбоновых кислот (ЦТК). Главными факторами, которые контролируют функционирование ЦТК, являются: 1) скорость поступления ацетильных групп; 2) наличие оксалоацетата; 3) скорость окисления НАДН в его окисленную форму (НАД^+) в цепи переноса электронов [65]. Очевидно, что потребление микроорганизмами такого субстрата, как глюкоза может обеспечить поступление энергии, необходимой для трансформации ПОВ в продукт, который затем будет использован в качестве субстрата. Кроме того, глюкоза является источником пирувата, превращающегося в ключевой метаболит ЦТК — оксалоацетат. По условиям экспериментов количество O_2 в опытах поддерживалось на уровне его атмосферной концентрации и возможность появления анаэробных или микроаэрофильных условий полностью исключалась. Поэтому причиной, определяющей увеличение RQ (табл. 3.8), могло быть появление дополнительно к O_2 других акцепторов электронов, например расходование энергии на трансформацию ароматических структур, содержащихся в ПОВ [37]. Следовательно, можно считать, что часть энергии, получаемой при метаболизме глюкозы, расходовалась микробными клетками на гидроксирование ПОВ. В качестве подтвер-

Таблица 3.8

Минерализация почвенного органического вещества (CO_2 из ПОВ), экзогенной глюкозы (CO_2 из глюкозы), RQ и ПЭ до ($t = 0$) и после внесения глюкозы в почву

Опыт	Время инкубации, сут.	CO_2 из ПОВ, мкг С- CO_2 /г СП · ч	CO_2 из глюкозы, мкг С- CO_2 /г СП · ч	RQ	ПЭ, %
I	0	0,38 (0,07)	—	0,83(0,02)	—
II	0	0,37 (0,06)	—	0,85(0,04)	—
III	0	0,37 (0,06)	—	0,83(0,05)	—
IV	0	0,36 (0,04)	—	0,85(0,01)	—
I	7	0,46 (0,12)	1,57 (0,13)	1,05 (0,04)	21 ± 16
*II	7	1,09 (0,07)	4,01 (0,36)	1,16 (0,01)	181 ± 9
*III	7	1,28 (0,06)	4,94 (0,20)	1,32 (0,03)	246 ± 8
*IV	7	1,47 (0,14)	4,43 (0,65)	1,35 (0,03)	287 ± 18
I	8	0,46 (0,09)	1,27 (0,02)	1,03 (0,05)	24 ± 12
*II	8	0,37 (0,04)	3,05 (0,19)	1,12 (0,02)	0 ± 5
*III	8	0,34 (0,02)	2,84 (0,29)	1,11 (0,01)	-8 ± 2
*IV	8	0,41 (0,15)	3,27 (0,46)	1,15 (0,01)	8 ± 20
I	11	0,39 (0,06)	0,94 (0,09)	1,01 (0,02)	$2,5 \pm 8$
*II	11	0,21 (0,04)	0,67 (0,16)	0,96 (0,02)	-43 ± 5
*III	11	0,21 (0,03)	0,37 (0,02)	0,90 (0,0)	-43 ± 4
*IV	11	0,27 (0,04)	0,40 (0,03)	0,87 (0,13)	-29 ± 5
I	14	0,33 (0,02)	0,70 (0,08)	0,93 (0,03)	-11 ± 2
*II	14	0,25 (0,01)	0,30 (0,08)	0,88 (0,04)	-32 ± 2
*III	14	0,22 (0,02)	0,28 (0,01)	0,88 (0,01)	-41 ± 2
*IV	14	0,25 (0,05)	0,28 (0,04)	0,85 (0,05)	-34 ± 6

* В образцы почвы была добавлена глюкоза 500 мкг С-Глю/г СП.

В скобках приведены стандартные ошибки измерений трех параллельных опытов.

ждения этого предположения следует рассматривать увеличение RQ от величины 0,83, регистрируемой при минерализации ПОВ, до 1,36, наблюдаемой после внесения глюкозы в почву (табл. 3.8). Из образовавшихся гидроксированных промежуточных продуктов ПОВ происходит отрыв двухуглеродной единицы, вероятно в виде ацетильной производной кофермента ацетилирования (ацетил КоА), которая окисляется до CO_2 в ЦТК. Таким образом, можно полагать, что дополнительное увеличение микробной минерализации ПОВ после внесения глюкозы в почву по сравнению с контролем (ПЭ), обусловлено соответствующей трансформацией ПОВ и образованием продуктов, которые впоследствии могут быть использованы почвенными микроорганизмами.

Оценка продолжительности воздействия экзогенного субстрата на микробиоту. В начале 80-х годов прошлого столетия был предложен критерий оценки степени влияния антропогенных поллютантов на микробиоту почвы [66]:

а) если изменения микробиологических показателей, обусловленных как природными факторами, так и поллютантами, возвращаются к нормальным значениям в пределах до 30 сут, то считают, что вещество, попавшее в почву, не оказывает никакого токсического действия и не нарушает естественные флюктуационные процессы;

б) если изменения показателей наблюдаются до 60 сут после попадания в почву поллютанта, то его влияние считают толерантным;

в) если изменения указанных показателей сохраняются свыше 90 сут после попадания поллютанта в почву, то наличие поллютанта в почве квалифицируют как фактор стрессового воздействия.

В нашем случае на примере разных количеств изотопно отличающейся от ПОВ глюкозы, внесенных в почву (опыты I, II, III), продемонстрирована разная степень активации минерализующей способности микроорганизмов, непосредственно использующих как указанный экзогенный субстрат, так и дополнительное окисление нативного почвенного вещества (прайминг-эффект). Скорость продукции CO_2 и потребление экзогенного субстрата, определяемое по изотопной характеристике углерода, рассматриваются как специфические показатели воздействия этого субстрата на почвенную микробиоту. Так, однократное внесение 2000, 500 и 50 мкг С-Глю/г СПВ в почву, что составляет 13,3%, 3,3% и 0,33% от количества ПОВ в исходной почве, сопровождалось разными скоростями продукции CO_2 и продолжительности превышения ее количеств в сравнении с существующими до этого естественными процессами. Как следует из табл. 3.9, скорости минерализации суммарного органического вещества в почве (глюкоза + ПОВ) в опы-

Таблица 3.9

Время возврата к исходному состоянию микробной активности в почве после внесения экзогенного субстрата (глюкоза), определенное по скорости продукции CO_2 и по характеристике изотопного состава углерода

Опыт	*Относительное количество субстрата, %	Период возврата микробной активности в почве к исходному значению, сут	
		По скорости продукции CO_2	*По величине $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$, ‰
I	13,3	18,4	103
II	3,3	5,4	20
III	0,33	0,74	14

* $(\text{Количество С-глюкозы} / \text{количество С-ПОВ}) \cdot 100\%$.

** В расчетах использовали данные из табл. 3.1.

*** В расчетах использовали данные из табл. 3.6.

тах I–III возвращаются к исходному значению (до внесения глюкозы) по истечении от 1 до 18 сут. Так как количество экзогенного субстрата (глюкозы) до 13,3% от количества ПОВ оказывает влияние на скорость продукции CO_2 по продолжительности меньше 30 сут, то согласно [66] можно полагать, что степень воздействия этого субстрата (глюкозы) на минерализующую активность почвенной микробиоты не нарушает естественные микробиологические процессы в почве.

Однако согласно балансовым расчетам (см. табл. 3.1), при существенном снижении скорости продукции CO_2 после 7 сут наблюдения (опыт I), в почве оставалось свыше 50% внесенной глюкозы. С этим показателем согласуются величины $\delta^{13}\text{C}$ (см. табл. 3.6), которые показывают, что внесенный в почву субстрат продолжает участвовать в процессах микробного метаболизма, несмотря на существенное снижение скорости продукции CO_2 . Как следует из табл. 3.9, по изотопным показателям метаболической CO_2 для возвращения микробного метаболизма к исходным показателям требуется свыше 100 сут при нагрузке глюкозы 13,3% и около 20 и 14 сут при значительно меньших нагрузках глюкозы (3,3 и 0,33%) от количества ПОВ. По этим показателям попадание глюкозы в почву в количестве свыше 13% от ПОВ характеризуется как стрессовое воздействие на микроорганизмы в почве. Таким образом, показатель изотопного состава углерода метаболической углекислоты, образующейся при минерализации суммарного органического вещества (глюкоза + ПОВ), является более чувствительным параметром, который отражает степень воздействия экзогенного субстрата на почвенную микробиоту.

Заключение

Изотопная масс-спектрометрия может служить высоко информативным методом при определении микробной минерализации почвенного органического вещества и органических продуктов, попадающих в почву. Использование легко метаболизируемого субстрата, отличающегося изотопным составом углерода от ПОВ (например, глюкозы), позволило оценить степень влияния экзогенного продукта, поступившего в почву, на минерализацию ПОВ по сравнению с нативными почвами (прайминг-эффект). Многократное увеличение метаболической активности в почве после внесения глюкозы свидетельствует о лимите роста почвенных микроорганизмов легко метаболизируемыми субстратами. Показано, что для минерализации ПОВ почвенной микробиотой необходим источник энергии, способствующий трансформации ПОВ в продукты, доступные в качестве субстратов для микроорганизмов. Внесение молекулы экзогенной глюкозы обеспечивает трансформацию ПОВ микроорганизмами, в результате чего происходит минерализация двухуглеродного продукта из ПОВ. Исходя из предположения, что первоначальная трансформация ПОВ осуществляется путем гидроксирования

или оксигенирования ароматических структур ПОВ, величина дыхательного показателя (RQ) отстает по времени от РЕ как показателя прайминг-продукции CO₂. Из полученных данных следует заключение, что превышение значений $RQ > 1$ обусловлено различием во времени регистрации потребления O₂ и последующего образования CO₂ за счет микробной минерализации продуктов трансформации ПОВ.

При оценке воздействия экзогенного субстрата на почвенную микробиоту оказалось, что изотопный состав углерода метаболической углекислоты, образующейся в результате микробной минерализации ПОВ и экзогенного субстрата, является наиболее чувствительным параметром, отражающим степень и продолжительность влияния субстрата на биогеохимические процессы в почве.

Литература

1. *Doran J. W., Sarrantonio M., Liebig M. A.* // *Advances in Agronomy.* — 1996. — V. 56. — P. 1–54.
2. *Добровольский Г. В., Никитин Е. Д.* Сохранение почв как незаменимого компонента биосферы. — М.: Наука, 2000. — 184 с.
3. *Domsch K. H.* Interpretation and evaluation data. Recommended Test for Assessing the Side-effects of Pesticides on the Soil Microflora // *Weed Research Organization Report No. 59.* — 1980. — P. 6–8.
4. *Doran J. W.* // *Appl. Soil Ecol.* — 2000. — V. 15. — P. 3–11.
5. *Smith J. L. and Paul E. A.* The significance of soil microbial biomass estimation // *Soil Biochemistry.* Ed. by J. M. Bollag and G. Stozky). — New York: Marcel Dekker, 1990. — P. 357–398.
6. *Brookes P. C., and McGrath S. P.* // *J. Soil Sci.* — 1984. — V. 35. — P. 341–346.
7. *Nordgren A., Baath E. and Soderstrom B.* // *Soil Biol. Biochem.* — 1988. — V. 20. — P. 949–954.
8. *Chander K., and Brookes P. C.* // *Soil Biol. Biochem.* — 1991. — V. 23. — P. 927–932.
9. *Fliessbach A., Martens R., and Reber H. H.* // *Soil Biol. Biochem.* — 1994. — V. 26. — P. 1201–1205.
10. *Зякун А. М., Дилли О.* // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2005. — Т. 41, № 5. — С. 582–591.
11. *Dilly O., Zyakun A.* // *Geomicrobiology J.* — 2008. — V. 25. — P. 425–431.
12. *Dilly O.* // *Soil Biol. Biochem.* — 2001. — V. 33. — P. 117–127.
13. *Zuberer D. A.* Recovery and enumeration of viable bacteria // *Methods of soil Analysis. Part 2: Microbial and Biochemical Properties* / Ed. by R. W. Weaver, S. Angle, and F. Bottomley. Soil Science Society of America Book Series. No. 5, Medison, Wisconsin, 1994. — P. 119–144.
14. *Alef K. and Nannipieri P.* *Methods in Applied Soil Microbiology.* — New York: Academic Press, 1995. — 370 p.
15. *Dobereiner J.* Isolation and identification of nitrogen fixing bacteria from soil and plants // *Methods in Applied Soil Microbiology* / Ed. by K. Alef and P. Nannipieri. — New York: Academic Press, 1995. — P. 134–135.

16. *Lorch H.J., Benkieser G., and Ottow J.C.G.* Basic methods for counting microorganisms in soil and water // *Methods in Applied Soil Microbiology* / Ed. by K. Alef and P. Nannipieri. — New York: Academic Press, 1995. — P. 136–161.
17. *Madsen E.L.* A critical analysis of methods for determining the composition and biogeochemical activities of soil microbial communities in situ // *Soil Biochemistry* / Ed. by G. Stotzky and J.M. Bollag. — New York: Marcel Dekker, 1996. — V. 9. — P. 287–370.
18. *Martens R.* // *Biol. Fertil. Soils*. — 1995. — V. 19. — P. 87–99.
19. *Jenkinson D.S., et. al.* // *Soil Biol. Biochem.* — 1976. — V. 8. — P. 209–213.
20. *Voroney R.P. and Paul E.A.* // *Soil Biol. Biochem.* — 1984. — V. 16. — P. 9–14.
21. *Vance E.D., Brooks P.C., Jenkinson D.S.* // *Soil Biol. Biochem.* — 1987. — V. 19. — P. 703–707.
22. *Anderson J.P.E., and Domasch K.H.* // *Soil Biol. Biochem.* — 1978. — V. 10. — P. 213–221.
23. *Anderson J.P.E., and Domasch K.H.* // *Arch. Microbiol.* — 1973. — V. 93. — P. 113–127.
24. *Anderson J.P.E., and Domasch K.H.* // *Ann. Microbiol. Enzimol.* — 1974. — V. 24. — P. 189–194.
25. *Anderson J.P.E., and Domasch K.H.* // *Can. J. Microbiol.* — 1975. — V. 21. — P. 314–322.
26. *Сусьян Е.А., Ананьева Н.Д., Благодатская Е.Б.* // *Микробиология*. — 2005. — Т. 74, №3. — С. 394–400.
27. *Stenstrom J., Hansen A. and Svensson B.* // *Swed. J. Agric. Res.* — 1991. — V. 2. — P. 55–62.
28. *Pell V., Stenberg R., Stenstrom J., and Forstenstrom I.* // *Soil Biol. Biochem.* — 1996. — V. 28. — P. 393–398.
29. *Drobnik K.* // *Plant Soil*. — 1960. — V. 12. — P. 199–211.
30. *Gerson U., and Chet I.* // *Rev. Ecol. Biol. Sci.* — 1981. — V. 18. — P. 285–289.
31. *Pianka E.R.* // *The American Naturalist*. — 1970. — V. 102. — P. 592–597.
32. *Kuzyakov Y., Friedel J.K., and Stahr K.* // *Soil Biol. Biochem.* — 2000. — V. 32. — P. 1485–1498.
33. *Fontaine S., Mariotta A., and Abbadie L.* // *Soil Biol. Biochem.* — 2003. — V. 35. — P. 837–843.
34. *Zvyagintsev D.G.* *Beyond the Biomass* / Ed. by K. Ritz, J. Dighton, K.E. Giller. — Chichester: Willey Press, 1994. — P. 29–37.
35. *Mamilov A.Sh., Bysov B.A., Zvyagintsev D.G., Dilly O.* // *Appl. Soil Ecology*. — 2001. — V. 16. — P. 131–139.
36. *IPCC 2001* / Report of Working Group I of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate change 2001 the scientific basis. — Cambridge: Univ. Press, 2001.
37. *Wu J., Brookers P.C., Jenkinson D.S.* // *Soil Biol. and Biochem.* — 1993. — V. 25. — P. 1435–1441.
38. *Hamer U., Marschner B.* // *Plant Nutr. Soil Sci.* — 2002. — V. 165. — P. 261–268.
39. *Dilly O.* // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* — 2004. — V. 167. — P. 261–266.
40. *Tuomela M., Hatakka A., Karjomaa S., Itovaara M.* // *Biodegradation*. — 2002. — V. 13. — P. 131–140.

41. *Fontaine S., Mariotti A., Abbadie L.* // Soil Biol. and Biochem. — 2003. — V. 35. — P. 837–843.
42. *Fontaine S., Bardoux G., Benest D., Verdier B., Mariotti A., Abbadie L.* // Soil Sci. Soc. Am. J. — 2004. — V. 68. — P. 125–131.
43. *Dalenberg J. W. and Jager G.* // Soil Biol. Biochem. — 1981. — V. 13. — P. 219–223.
44. *Dalenberg J. W., Jager G.* // Soil Biol. and Biochem. — 1989. — V. 21. — P. 443–448.
45. *Shen J. and Bartha R.* // Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — V. 62. — P. 1428–1430.
46. *Kuzyakov Y., Raehmann J., Geyer B.* // Gartenbauwissenschaft. — 1997. — V. 62. — P. 151–157.
47. *Mary B., Mariotty A., Morel J. L.* // Soil Biol. and Biochem. — 1992. — V. 24. — P. 1065–1072.
48. *Rochette P., Flanagan L. B., Gregorich E. G.* // Soil Sci. Soc. Am. J. — 1999. — V. 63. — P. 1207–1213.
49. *Ekblad A., and Hogberg P.* // Plant and Soil. — 2000. — V. 219. — P. 197–209.
50. *Kristiansen S. M., Brandt M., Hansen E. M., Magid J., Christensen, B. T.* // Soil Biol. and Biochem. — 2004. — V. 36. — P. 99–105.
51. *Vasconcellos C. A.* // Pesquisa Agropecaria Brasil. — 1994. — V. 29. — P. 1129–1136.
52. *Degens B., and Sparling G.* // Soil Biol. Biochem. — 1996. — V. 28. — P. 453–462.
53. *Aoyama M., Angers D. A., N'Dayegamiye A. N., and Bissonnette N.* // Soil Biol. Biochem. — 2000. — V. 32. — P. 295–300.
54. *Dilly O.* // FEMS microbial. Ecology. — 2003. — V. 43. — P. 375–381.
55. *Smith B. N., Epstein S.* // Plant Physiol. 1971. — V. 47. — P. 380–384.
56. *Teery J. A., Stowe L. G.* // Oecologia. — 1976. — V. 23. — P. 1–2.
57. *Cheng W.* // Plant and Soil. — 1996. — V. 183. — P. 263–268.
58. *Ekblad A., Nyberg G., Hogberg P.* // Oecologia. — 2002. — V. 131. — P. 245–249.
59. *Stenstrom J., Svensson K. and Johansson M.* // FEMS Microbiol. Ecol. — 2001. — V. 36. — P. 93–104.
60. *Tate R. L.* Soil Microbiology. — New York: Wiley Press, 1995. — 398 p.
61. *Paul E. A., Clark F. E.* Soil Microbiology and Biochemistry. — San Diego: Acad. Press, 1989. — 273 p.
62. *Fontaine S., Bardoux G., Abbadie L., and Mariotti A.* // Ecology Lett. — 2004. — V. 7. — P. 314–320.
63. *Мецлер Д. Е.* Биохимия / Химические реакции в живых клетках. — М.: Мир, 1980. — Т. 2. — С. 306–360.
64. *Newsholme E. A., Start C.* Regulation in metabolism. — New York: Willey Press, 1973. — P. 124–145.
65. *Lovley D. R., Coates J. D., Blunt-Harris E. L., Phillips E. J. P., Woodward J. C.* // Nature. — 1996. — V. 382. — P. 445–448.
66. *Domsch K. H., Jagnow G., and Anderson T. H.* // Residue Rev. — 1983. — V. 80. — P. 65–105.

Глава 4

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА НОРМАЛЬНЫХ АЛКАНОВ КОНТИНЕНТАЛЬНОЙ РАСТИТЕЛЬНОСТИ

Н. А. Педенчук

Факультет Изучения Окружающей Среды, Университет Восточной Англии,
Норвич, Великобритания

Введение

Изотопный состав разного рода биологических субстанций является одним из самых распространенных объектов исследования палеоклиматологов и экологов, изучающих сравнительно недавние климатические изменения в голоцене, а также в предшествующие геологические эпохи [1–5]. Широкая популярность такого рода исследований основана на прямой взаимосвязи между изотопным составом углерода, водорода и кислорода в окружающей среде (например, в океанических, морских, и озерных водах, в дождевых и снеговых осадках, углекислом газе в атмосфере) и изотопным составом этих элементов в органических и неорганических составляющих флоры и фауны (например, целюлозы и липидов растений, фосфатов костей животных, карбонатов раковин), обитающих в континентальных и морских условиях. Так как органически связанные водород, углерод и кислород являются участниками глобального гидрологического и углеродного циклов, климатические изменения, влияющие на эти циклы, оказывают существенное влияние на их изотопный состав. Таким образом, имея четкое представление о степени фракционирования изотопов конкретного элемента в процессах биосинтеза, а также об уровне диагенической истории образца, исследователь имеет возможность установить климатически вызванные изменения этих циклов в прошлом.

Методологически, изучение изотопного состава органических составляющих растительных и животных организмов может проводиться на двух уровнях. Образец органического материала может быть изучен или как единое целое, или после его разделения на отдельные органические фракции/соединения. Например, изотопный состав углерода, входящего в органические соединения листа дерева, может быть измерен на небольшом количестве измельченного листа без предваритель-

ного разделения лигнина, целлюлозы, липидов и других органических соединений, составляющих единое целое листа. С другой стороны, разделение образца на разные органические фракции позволяет измерить изотопный состав углерода каждой из этих фракций отдельно. Первый подход пользуется популярностью из-за относительной простоты подготовки образца для анализа и меньшей затраты времени для изотопного измерения на масс-спектрометре. Однако, несмотря на большие затраты времени и усилий, второй метод имеет несколько важных преимуществ.

Так как разные биохимические компоненты, даже в одном организме, имеют разный изотопный состав из-за разной степени фракционирования в ходе биосинтеза, изучение индивидуальных органических соединений позволяет установить наиболее прямую связь между изотопным составом органически связанного элемента (например, С, Н, или О) и изотопным составом этого элемента в окружающей среде. Другим важным фактором является разная степень диагенетической устойчивости разных органических компонентов. Поэтому изотопное изменение определенного элемента, исследуемого на уровне индивидуальных соединений, позволяет избежать потенциальной ошибки, когда изотопный состав элемента, измеренного на уровне целого образца, претерпевает серьезное изменение из-за потери какой-либо фракции во время диагенеза, а не по причине изменения палеоклиматических условий.

Нормальные алканы (*n*-алканы), состоящие из элементов С и Н и происходящие в основном из воскового покрытия листьев и иголок, наряду с лигнином, целлюлозой и жирными кислотами, являются одними из наиболее распространенных органических соединений, синтезируемых наземной растительностью. Однако большая мобильность (в сравнении с лигнином) после разрушения организма и большая стабильность во время диагенеза, а также более простая процедура пробоподготовки образцов (в сравнении с целлюлозой и жирными кислотами) делает *n*-алканы идеальными кандидатами для исследования изотопного состава.

Несколько недавно вышедших обзорных статей посвящены получению и применению данных изотопного анализа индивидуальных органических соединений в разных областях науки и прикладной деятельности [6–9].

В последнее время для изучения палеоклимата [10, 11] широко используются стабильные изотопы водорода. Шефус и др. [12] объяснили увеличение δD на 20‰ *n*-алкана C_{29} , экстрагированного из морских осадков, наличием засушливых условий в экваториальной Африке во время позднего дриаса, т.е. от 12800 до 11500 лет назад. Шуман и др. [13] интерпретировали два положительных изменения δD (до 40‰) нормальной жирной кислоты C_{28} из озерных осадков как индикатор увеличения количества осадков, выпадающих в летний период, в сравнении с другими временами года в северо-западной части

США приблизительно 8200 лет назад. Пагани и др. [14] объяснили увеличение величин δD *n*-алканов $C_{27/29}$ на 55‰ в результате сокращения выпадения осадков в тропиках, что привело к увеличению относительного количества влаги, достигающей Арктики, на начальной стадии Позднепалеоценового термального максимума. Более того, отрицательное изменение величин $\delta^{13}C$ (от –4,5 до –6‰) *n*-алканов $C_{27/29}$ в этот промежуток времени имеет существенное значение для подсчета потенциального количества метана, внезапно выброшенного из отложений гидратов метана под морским дном [15].

Изотопный состав цветковых и хвойных видов растений, основных составляющих континентальной растительной биомассы, зависит от регионального климата [16]. Этот состав может подвергаться значительным изменениям даже в относительно короткий период времени, меньше чем за 1000 лет [17, 18].

Таким образом, правильная интерпретация данных δD и $\delta^{13}C$ *n*-алканов из осадков и осадочных пород зависит в значительной степени от детальной информации о возможных изменениях состава и изотопных значений местной флоры. Важность этих факторов была подчеркнута Смит и др. [19]. Авторы этой работы утверждают, что переход от смешанной цветково-хвойной флоры к преобладающей цветковой флоре привел к более значительным изменениям величин $\delta^{13}C$ (от –4 до –5‰, *n*-алканы из почвы, штат Вайоминг, США) по сравнению с величинами $\delta^{13}C$, полученными при исследовании морских карбонатов во время Позднепалеоценового термального максимума. Роль этого фактора для подсчета количества метана была подчеркнута выше.

Наряду с палинологией, одновременное исследование данных по δD и $\delta^{13}C$ *n*-алканов из листьев растений может служить дополнительным контролем для изучения динамики хвойной и цветковой растительности. По сравнению с листопадными цветковыми, вечнозеленые цветковые и хвойные растения обычно имеют более массивный восковой налет на листьях/иголках, в результате чего устьица этих двух типов, как правило, меньше размером и окружены бóльшим слоем воска [20]. Такое строение устьиц приводит к более ограниченной проводимости устьиц по отношению к CO_2 и пару H_2O некоторых вечнозеленых и хвойных растений [21]. Более ограниченный доступ к газу CO_2 во время биосинтеза приводит к ^{13}C -обогащению органических соединений. В то же время, меньший размер устьиц ограничивает испарение молекул H_2O из полости листа/иголки, что оказывает влияние на степень D -обогащения воды листа, используемой во время биосинтеза.

Таким образом, весьма вероятно наличие связи между физиологией разных типов растений, выраженной в строении и биохимическом составе листьев/иголок, и изотопными параметрами этих растений.

Однако до настоящего времени эта связь остается практически не изученной. До 2008 г. только две группы авторов опубликовали результаты совместного исследования изотопного состава δD и $\delta^{13}C$

n-алканов, которые не выявили значимой разницы по этим двум типам растений. Исследование хвойных и цветковых видов из нескольких мест в Японии и Таиланде показало отсутствие корреляции между изотопными значениями $\delta D/\delta^{13}C$ [22]. С другой стороны, несмотря на то что растения с разной продуктивностью транспирации показали незначительную корреляцию между $\delta D/\delta^{13}C$, эта корреляция не выявила определенных отличий между хвойными и цветковыми видами [23].

Таким образом, основными целями работы являются:

- 1) обзор методик, необходимых для выделения, пробоподготовки и изотопного анализа *n*-алканов, биосинтезированных континентальной растительностью;
- 2) обсуждение полученных результатов изотопного анализа современных цветковых и хвойных растений и возможности применения разработанных методик для изучения палеоклимата.

Экспериментальная часть

Общие положения

Органические соединения, представляющие интерес для палеоклиматологов, могут быть экстрагированы из осадочных пород, нефти, угля, морских, озерных и речных осадков, а также из почв и различных органов низших и высших растений (в основном, листьев и иглолок). В нескольких недавних публикациях подробно обсуждаются традиционные методы экстракции, а также преимущества и недостатки этих методов по отношению к вышеупомянутым образцам разного рода [9, 24–27]. Базовый принцип заключается в наиболее эффективном отделении интересующего геохимика органического соединения от матрицы образца. Твердые и консолидированные образцы (песчанник, сланец, известняк, уголь) обычно требуют первоначального измельчения до порошка. В зависимости от типа образца и лабораторных ресурсов, доступных исследователю, общая органическая фракция может быть экстрагирована с использованием ультразвука на приборе Сокслет или на автоматическом экстракторе ASE 300. Последующие этапы разделения определенных органических фракций и дериватизация отдельных соединений зависят от конкретных целей научного исследования. Содержащая *n*-алканы неполярная углеводородная фракция отделяется от общей органической фракции с помощью жидкостной колоночной хроматографии. Колонка заполняется силикагелем (частицы диаметром 0,063–0,200 мм). В качестве элюента применяют легколетучие растворители (гексан, хлористый метилен, метанол); *n*-алканы содержатся в первоначальной неполярной фракции и выходят в процессе экстракции гексаном. Степень «загрязненности» *n*-алканов другими соединениями в неполярной фракции зависит от природы образца. Например, гексановая фракция, выделенная из суммарной органической фракции

после экстрагирования листьев современных растений, в большинстве случаев достаточно чиста для последующих изотопных анализов. Однако неполярная фракция выделяемая из осадочных пород и почв, обычно требует дополнительного разделения *n*-алканов от *изо*- и цикло-алканов с помощью мочевины или молекулярных сит [28].

Для выражения изотопного состава элементов водорода и углерода используется величина дельта (δ), которая определяется по следующей формуле:

$$\delta = \frac{R_x - R_{\text{std}}}{R_{\text{std}}} \cdot 1000,$$

где R — отношение тяжелого изотопа к легкому, индексы x и std относятся к образцу и к стандарту соответственно. В случае элементов водорода и углерода, R представляет собой отношение D/H и $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, соответственно.

Для определения изотопного состава углерода и водорода индивидуальных соединений, в данном случае — *n*-алканов, требуется система GC-IRMS (газовый хроматограф, соединенный с изотопным масс-спектрометром), оснащенная окислительным реактором и высокотемпературным конвертером. Окислительный реактор используется для перевода индивидуальных *n*-алканов в углекислый газ с последующим измерением изотопов углерода; высокотемпературный конвертер — для перевода индивидуальных *n*-алканов в газ водород с последующим измерением его изотопного состава. Современные масс-спектрометры, оснащенные газовым хроматографом, позволяют добиться следующей погрешности измерения изотопного состава углерода и водорода органических соединений: 0,1–0,3‰ для соединений, содержащих 0,1–5 нмоль C, 2–5‰ для соединений содержащих 10–50 нмоль H [8].

На рис. 4.1 показана упрощенная схема прибора для GC-IRMS, оснащенного окислительным реактором. Гексановая фракция, содержащая *n*-алканы, с помощью микрошприца впрыскивается в газовый хроматограф, в котором происходит разделение *n*-алканов на капиллярной колонке. Затем в реакторе окисления при наличии катализатора ($\text{CuO}/\text{NiO}/\text{Pt}$, 940 °C; [29]) они превращаются в H_2O и CO_2 . Попутно образующиеся оксиды азота восстанавливаются до N_2 в реакторе восстановления (Cu , 600 °C, [30]). H_2O удаляется из потока газа-носителя в ловушке для воды типа Nafion. «Очищенный» CO_2 подается в масс-спектрометр, оснащенный коллекторами Фарадея, на которых регистрируются ионы с массами 44, 45, и 46, относящиеся к ионам трех изотопомеров $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$, и $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ соответственно. Величина $\delta^{13}\text{C}$ для исследуемого образца рассчитывается по отношению к стандартному газу с известным изотопным составом либо по отношению к внутреннему стандарту. На рис. 4.2 показана типичная хроматограмма анализа методом GC-IRMS. На хроматограмме приведены 6 пиков стандартного газа и несколько пиков *n*-алканов с ярко выраженным

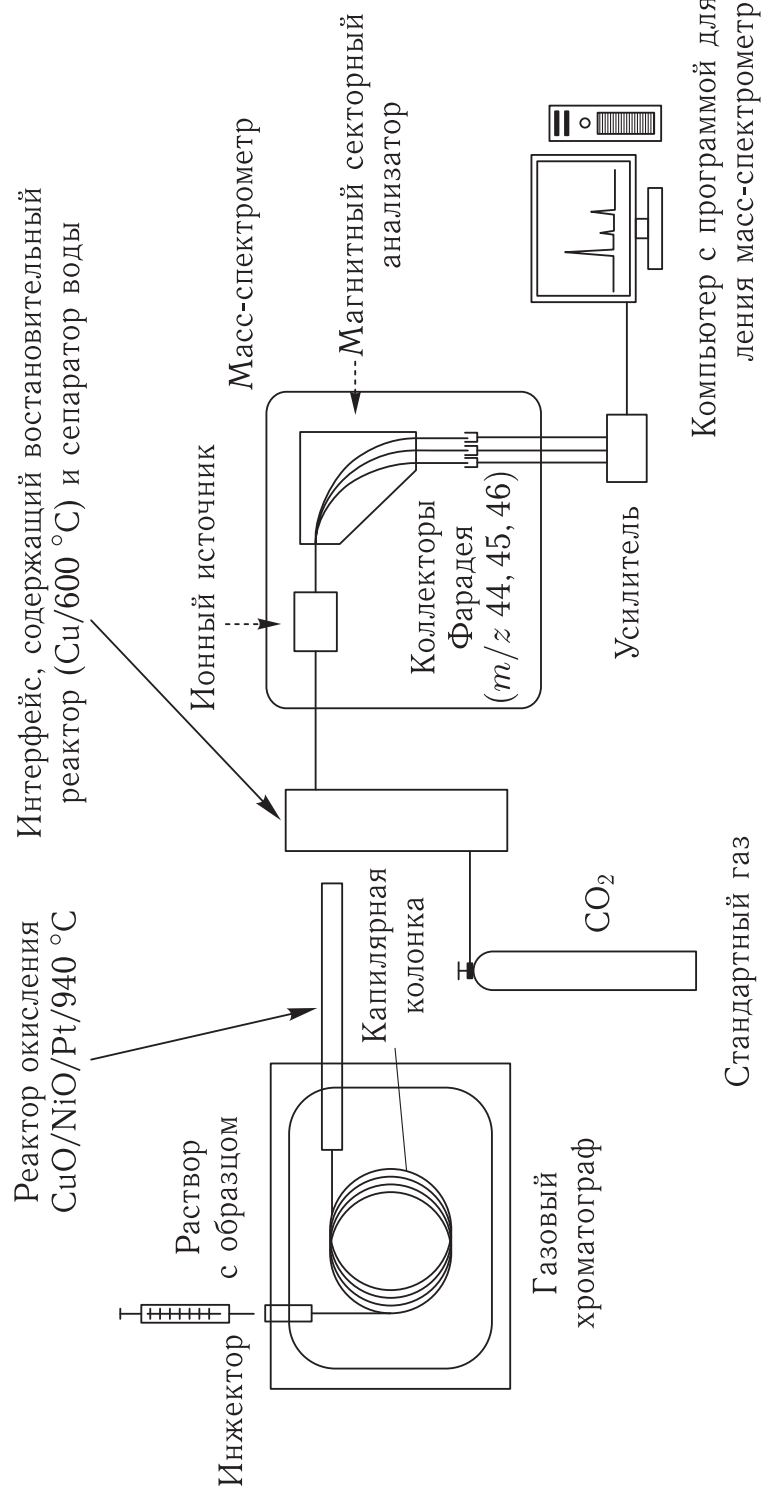


Рис. 4.1. Общая схема газового хроматографа масс-спектрометра для измерения изотопного состава углерода ($\delta^{13}\text{C}$)

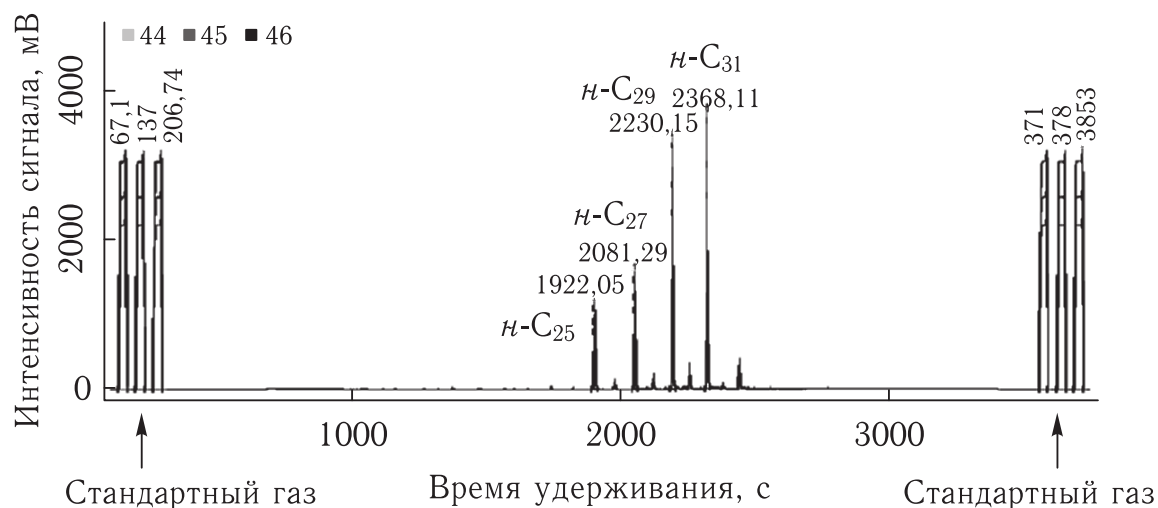


Рис. 4.2. Хроматограмма GC-IRMS *n*-алканов, выделенных из фракции неполярных углеводородов листа Дуба английского (*Quercus robur*), г. Ньюкасл, Великобритания; *n*-алканы малой концентрации с четным числом атомов углерода не обозначены

преобладанием соединений с нечетным числом атомов углерода — типичное распределение *n*-алканов из листьев высших растений. Хроматограмма также демонстрирует хорошее хроматографическое разделение индивидуальных соединений, что является одним из наиболее важных факторов для получения высококачественных данных по $\delta^{13}\text{C}$.

Основное отличие методики определения изотопных величин δD от $\delta^{13}\text{C}$ для индивидуальных органических соединений состоит в способе получения анализируемого газа. Вместо реактора окисления, для перевода органических соединений в газ H_2 , используется высокотемпературный конвертор, работающий при температуре 1450°C . При этой температуре органические соединения, выходящие из ГХ, переводятся в газы H_2 , CO и соответствующие изотопомеры [31]. При этом не происходит образования H_2O . Газ H_2 в потоке газа-носителя He подается в масс-спектрометр, оснащенный коллекторами Фарадея для регистрации ионов с массами 2 и 3, для определения H_2 и HD соответственно. Другой особенностью этой методики является необходимость учитывать влияние эффекта протонирования в ионном источнике на величину δD . Реакции протонирования приводят к образованию ионов H_3^+ . Так как количество H_3^+ пропорционально квадрату давления газа водорода, обычно используется поправка H_3 -фактор, который определяется на основании измерения различных по величине пиков стандартного газа [32, 33].

В настоящей статье приводятся последние результаты работы автора и его коллег в штате Вашингтон, США, и некоторых странах Западной Европы. Изучалось влияние климатических условий на величины $\delta^{13}\text{C}$ и δD органических соединений из листьев современных цветковых и хвойных растений и влияние физиологии этих растений на их изотопный состав.

Методические особенности анализа

Центральная часть штата Вашингтон, США. Климат в месте изучения сухой, с четырьмя ярко выраженными сезонами и с менее 10 см осадков с мая по октябрь [34]. Вода из скважины глубиной 95 м была основным источником влаги для исследуемых растений в период сбора образцов. Листья были собраны с трех цветочных (*Betula pendula* — береза повислая, *Populus tremuloides* — тополь осинообразный, и *Syringa vulgaris* — сирень обыкновенная) и двух хвойных (*Pinus sylvestris* — сосна обыкновенная и *Picea pungens* — ель голубая) растений. Все пять растений приблизительно одного возраста (7–8 лет в 2005 г.), растут в открытых условиях недалеко друг от друга (< 10 м) и получают одинаковое количество солнечного света. Растения поливались в одно и то же время (в течение 2–3 ч) один или два раза в неделю в зависимости от погоды. Каждое дерево получало около 70 л воды во время полива. Относительная влажность и температура измерялись каждые два часа, используя прибор VERITEQ SP-2000–20R, установленный в тени на высоте 2 м от поверхности земли. Четырнадцать образцов воды из скважины и от 7 до 10 листьев (или 3 ветки хвойных) каждого дерева были отобраны для изотопных анализов с мая по октябрь 2005 г.

Листья были экстрагированы гексаном с помощью ультразвука (30 мин, два раза). Фракции липидов были разделены на хроматографической колонке (размер зерен 70–230) в следующей последовательности: гексан, смесь гексана/хлористого метилена (9:1, по объему) и смесь хлористого метилена/метанола (2:1, по объему). Гексановая фракция была использована для получения данных по $\delta^{13}\text{C}$ и δD на изотопном масс-спектрометре MAT 253 («Thermo Finnigan», Бремен, Германия), соединенном с газовым хроматографом с микропечью сжигания Thermo Finnigan Trace GC/C III (для $\delta^{13}\text{C}$) и с высокотемпературным конвертором (для δD). Данные по δD образцов воды из скважины были определены на том же изотопном масс-спектрометре с помощью устройства H/Device («Thermo Finnigan»). Индивидуальные *n*-алканы были разделены на капиллярной колонке J&W Scientific DB-1 (60 м × 0,25 мм × 0,25 мкм). Температура колонки ГХ поднималась от 60 °C (1 мин) до 320 °C (25 мин) со скоростью 6 °C в минуту. Данные по $\delta^{13}\text{C}$ приведены по отношению к стандарту Vienna Pee Dee белемнит (VPDB). Воспроизводимость результатов измерений $\delta^{13}\text{C}$ была не ниже $\pm 0,6\text{‰}$. Высокотемпературный пиролиз органических соединений для образования водорода H_2 осуществлялся при температуре 1400 °C. Данные δD *n*-алканов указаны по отношению к Венскому среднему стандарту океанской воды (VSMOW). Воспроизводимость результатов измерений δD в основном была не ниже $\pm 5\text{‰}$, достигая $\pm 11\text{‰}$ только в нескольких случаях. Данные δD воды из скважины указаны по отношению к VSMOW и нормализованы по стандартам воды из гренландского льда (GISP) и антарктического льда (SLAP). Воспроизводимость результатов измерений δD воды из скважины не превышала $\pm 1\text{‰}$.

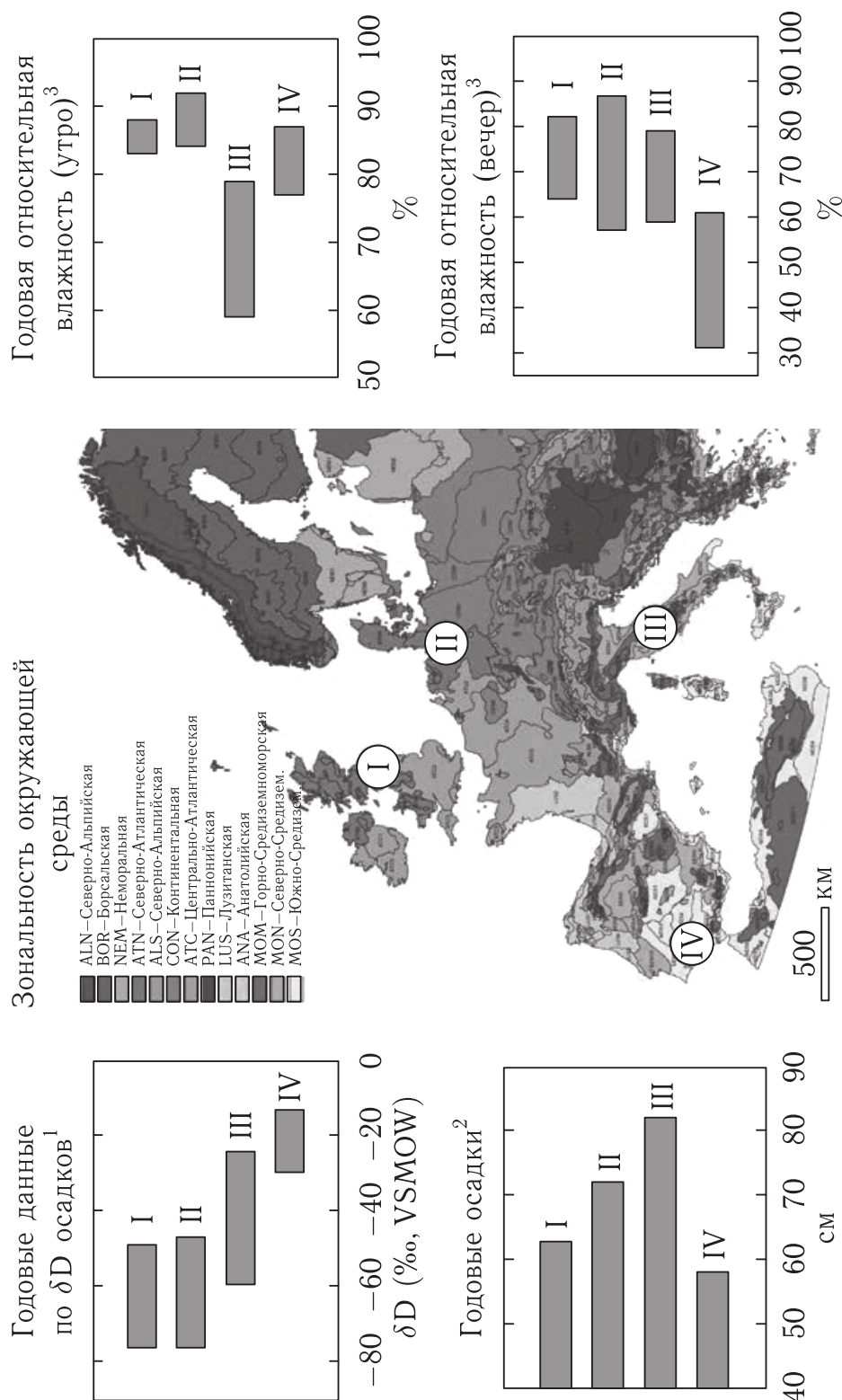


Рис. 4.3. Распределение растительности в Европе: I и II – Северо-Атлантическая Зона, III – Горно-Средиземноморская Зона, IV – Южно-Средиземноморская Зона. Источники климатических данных: 1) данные δD осадков были определены, используя онлайн-калькулятор www.waterisotopes.org, основываясь на данных по широте, долготе и высоте над уровнем моря; 2) данные с 1961 по 1990 гг. [40]; 3) данные взяты из www.weatherbase.com. Модифицированная карта зон окружающей среды взята из [41]

Западная Европа. В отличие от проекта, описанного выше, изучение изотопного состава С и Н *n*-алканов из цветковых и хвойных растений в Европе проводилось в нескольких климатически и экологически отличающихся зонах: Северо-Атлантической (Ньюкасл-апон-Тайн, Великобритания, и Бремен, Германия), Горно-Средиземноморской (Порано, Италия), и Южно-Средиземноморской (Национальный Парк Донатан, в районе Севильи, Испания) зонах. На рис. 4.3 показано количество и изотопный состав осадков (которые являлись единственным источником влаги для изучаемых растений), а также уровень относительной влажности, характерный для мест изучения. Наибольшее коли-

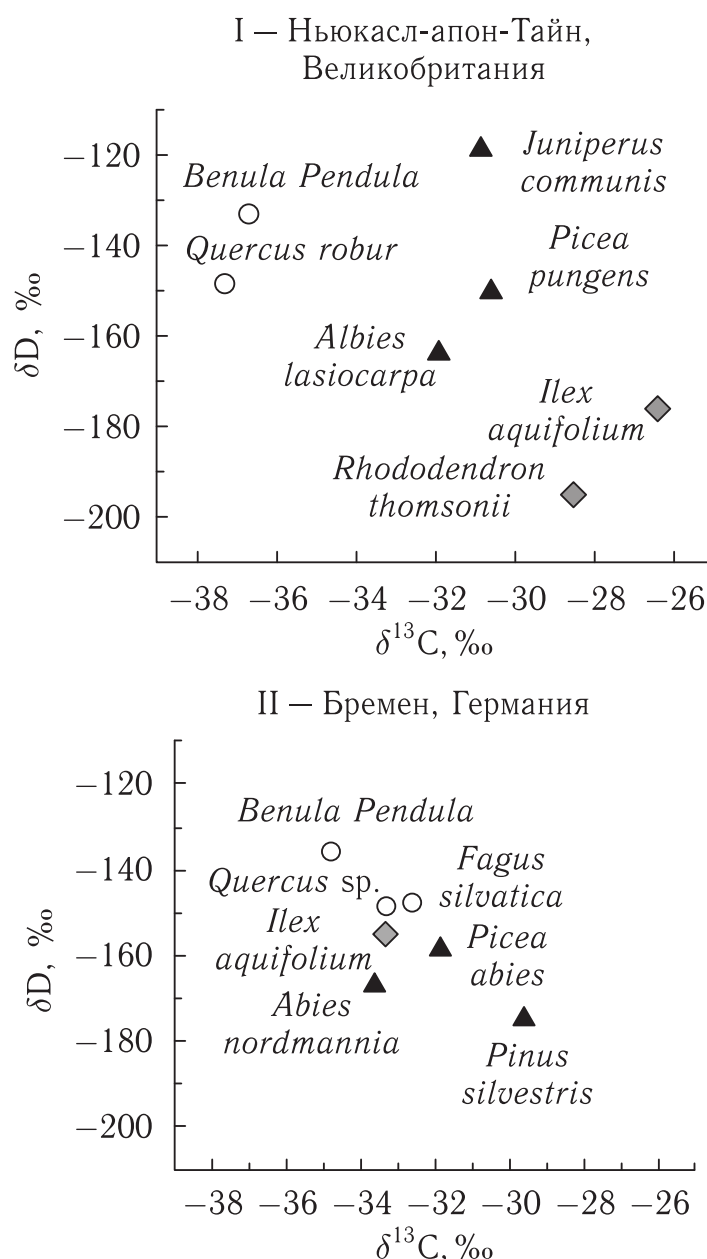


Рис. 4.4. Изотопный состав $\delta^{13}\text{C}$ и δD алкана $n\text{-C}_{29}$, выделенного из растений, собранных в Великобритании и Германии. Заштрихованные черным цветом знаки обозначают хвойные виды деревьев, серым — цветковые вечнозеленые; незаштрихованные знаки — цветковые листопадные

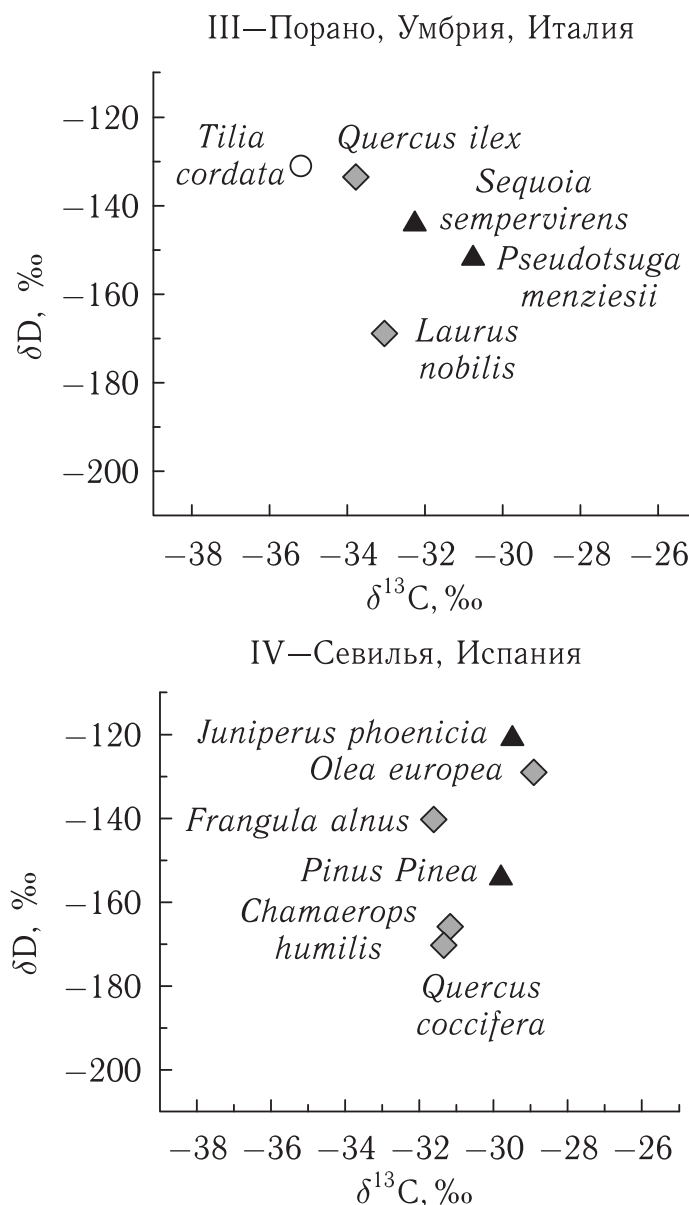


Рис. 4.4. (продолжение). Данные $\delta^{13}\text{C}$ и δD алкана $n\text{-C}_{29}$ из растений, собранных в Италии и Испании. Заштрихованные черным цветом знаки обозначают хвойные виды деревьев, серым — цветковые вечнозеленые; незаштрихованные знаки — цветковые листопадные

чество осадков выпадает в Бремене и Порано, в то время как Ньюкасл и Севилья по их числу сравнительно одинаковы. Севилья отличается наиболее высокими значениями δD , а Ньюкасл и Бремен — наиболее низкими. Разница в относительной влажности между четырьмя местами зависит от времени дня, однако наиболее сходными являются Ньюкасл и Бремен. В изучаемом аспекте Севилья более похожа на Ньюкасл и Бремен в утреннее время, Порано — в вечернее.

Образцы листьев были собраны с трех типов растений: цветковых листопадных, цветковых вечнозеленых и хвойных деревьев. Растения отличались по возрасту и высоте, однако сбор всех образцов проводился с теневой стороны деревьев. Распределение определенных видов растений в каждом месте показаны на рис. 4.4. Все три типа растений

присутствуют в Ньюкасле, Бремене и Порано. Однако, вследствие жаркого и сухого климата, цветковые листопадные растения отсутствуют в Севильи. Процедура экстракции *n*-алканов была идентична той, которая была использована при работе с листьями из штата Вашингтон. Изотопные данные $\delta^{13}\text{C}$ и δD *n*-алканов были получены на изотопном масс-спектрометре Delta V Plus (Thermo Finnigan, Бремен, Германия) с газовым хроматографом и с микропечью сжигания Thermo Finnigan Trace GC/C III и высокотемпературным конвертором. Воспроизводимость результатов измерений $\delta^{13}\text{C}$ была не ниже $\pm 0,5\text{‰}$, δD не ниже $\pm 6\text{‰}$. Алкан *n*-C₂₉ был выбран для сравнения между разными видами растений.

Особенностью данного проекта является тот факт, что наряду с изучением изотопного состава растений были также замерены максимальная проводимость устьиц по отношению к CO₂ и транспирации H₂O деревьев, исследуемых в Ньюкасле. Эти измерения были проведены на приборе CIRAS-1 Portable Photosynthesis System как минимум на двух листьях с теневой стороны дерева, только на цветковых листопадных и цветковых вечнозеленых деревьях, так как специальная насадка, необходимая для работы с хвойными деревьями, была недоступна в начале этого проекта.

Результаты и обсуждение

Центральная часть штата Вашингтон, США

Подробные результаты измерения изотопного состава углерода и водорода *n*-алканов из листьев, собранных в штате Вашингтон, показаны в работе [35]. Так как алкан *n*-C₂₇ был единственным соединением, находящимся в достаточном количестве для надежных измерений данных по $\delta^{13}\text{C}/\delta\text{D}$, дальнейшее обсуждение ограничится только этим соединением. Данные по алкану *n*-C₂₇ четко различаются между двумя хвойными и двумя цветковыми видами деревьев (рис. 4.5). С мая по октябрь величины $\delta^{13}\text{C}$ и δD *Syringa vulgaris* и *Populus tremuloides* были в пределах от $-31,9$ до $-32,7\text{‰}$ и от -168 до -186‰ соответственно, показывая небольшую тенденцию к уменьшению величин δD в конце сезона роста растений (рис. 4.6). Однако данные $\delta^{13}\text{C}$ и δD *Pinus sylvestris* и *Picea pungens* были в пределах от $-28,8$ до $-30,6\text{‰}$ и от -190 до -212‰ . Так же как и другие цветковые виды, *Betula pendula* имела более положительные значения δD (от -162 до -178‰) по отношению к хвойным видам. Данные $\delta^{13}\text{C}$ *Betula pendula* были сходны с данными *Pinus sylvestris* и *Picea pungens* в мае, и изменились на $+4\text{‰}$, становясь таким образом еще более ^{13}C -обогащенными по отношению к другим цветковым в конце сезона.

Так как все пять видов растений находились в одних и тех же климатических условиях и поливались водой с одним и тем же изотопным составом, наиболее вероятным объяснением полученных данных

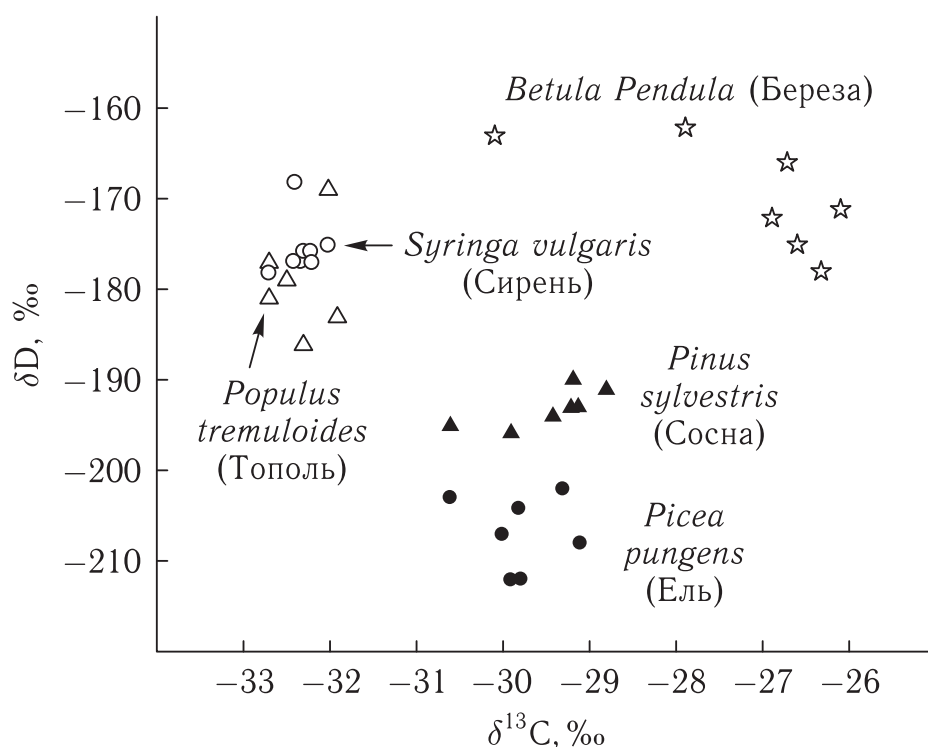


Рис. 4.5. Данные по изотопному составу $\delta^{13}\text{C}$ и δD алкана $n\text{-C}_{27}$ пяти видов растений, собранных в штате Вашингтон, США. Заштрихованные знаки обозначают хвойные виды деревьев, незаштрихованные — цветковые

являются отличия в физиологии и биохимии этих растений. Относительное ^{13}C -обогащение *Pinus sylvestris* и *Picea pungens* может быть объяснено пониженной проводимостью устьиц этих двух видов по отношению к *Syringa vulgaris* и *Populus tremuloides* и, как следствие, понижением концентрации CO_2 в межклеточном пространстве внутри листа и уменьшением дискриминации изотопа ^{13}C в процессе биосинтеза [36]. Данные по проводимости устьиц растительных видов, изучаемых в штате Вашингтон, в настоящий момент отсутствуют, однако ранее опубликованный материал — или для тех же самых видов (*Pinus sylvestris* и *Populus tremuloides*) или для растений, принадлежащих к тому же роду (*Picea sitchensis* и *Betula alleghaniensis*), — показывает, что хвойные деревья действительно обладают пониженной проводимостью устьиц [37] (рис. 4.7). Однако пониженная проводимостью устьиц хвойных не может объяснить более низкие данные δD алканов в этих растениях, так как более слабый поток молекул воды в процессе испарения привел бы к более положительным значениям δD воды внутри листа [38]. Разница данных δD алканов между хвойными и цветковыми видами деревьев, видимо, не может быть объяснена без дополнительной информации о внутреннем строении листьев этих видов и о процессах фракционирования атомов водорода во время биосинтеза.

Результаты по степени видимого фракционирования изотопов, полученные в процессе этого проекта от -120 до -65‰ (рис. 4.8), значительно отличаются от ранее опубликованных данных [39–41]. Предыдущие данные по степени видимого фракционирования изотопов водорода

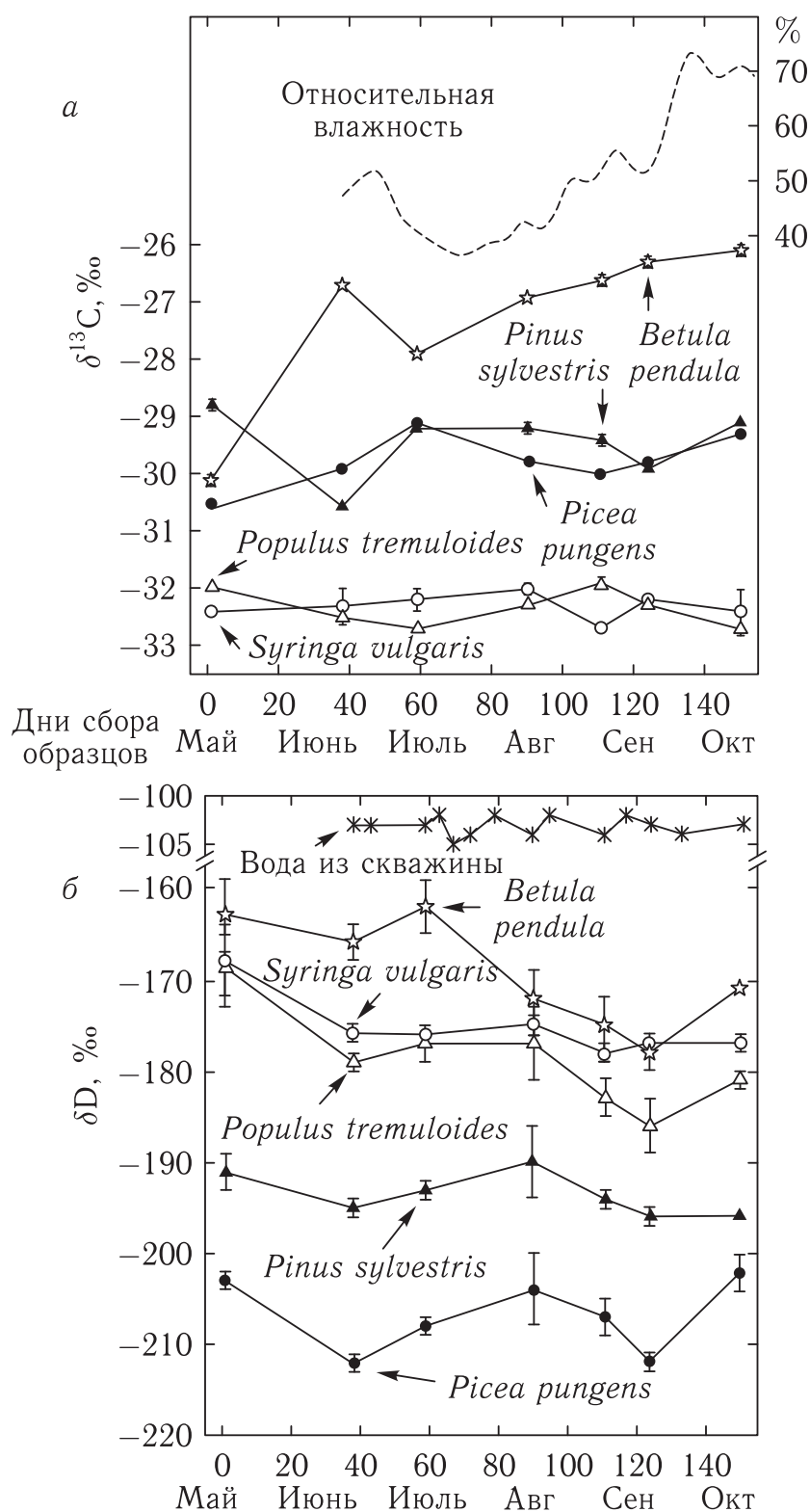


Рис. 4.6. Сезонные изменения изотопного состава $\delta^{13}\text{C}$ и δD алкана $n\text{-C}_{27}$ пяти видов растений и δD воды из скважины в течение лета и осени 2005, центральный штат Вашингтон, США

обычно относительно неизменны и более отрицательны ($\sim -120\text{‰}$) для хвойных и цветочных видов растений. Причиной такой сильной разницы может быть необычайно засушливый климат, в котором произрастали растения в центральной части штата Вашингтон. Поэтому

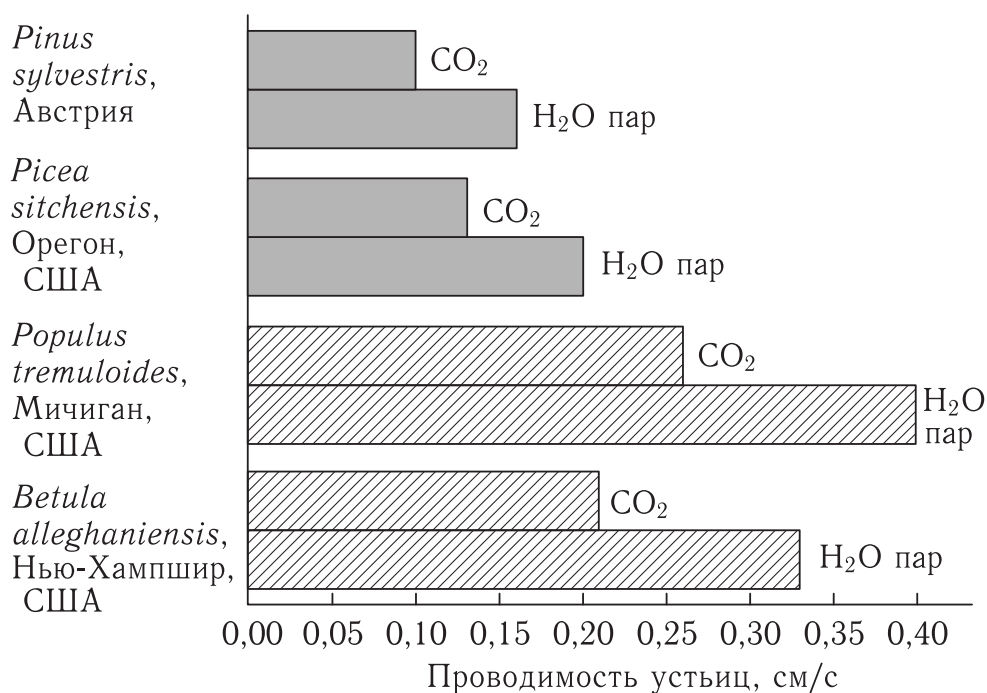


Рис. 4.7. Максимальная проводимость устьиц. Данные из [37]. Обозначенные серым цветом колонки — хвойные виды растительности; диагональными линиями — цветковые виды

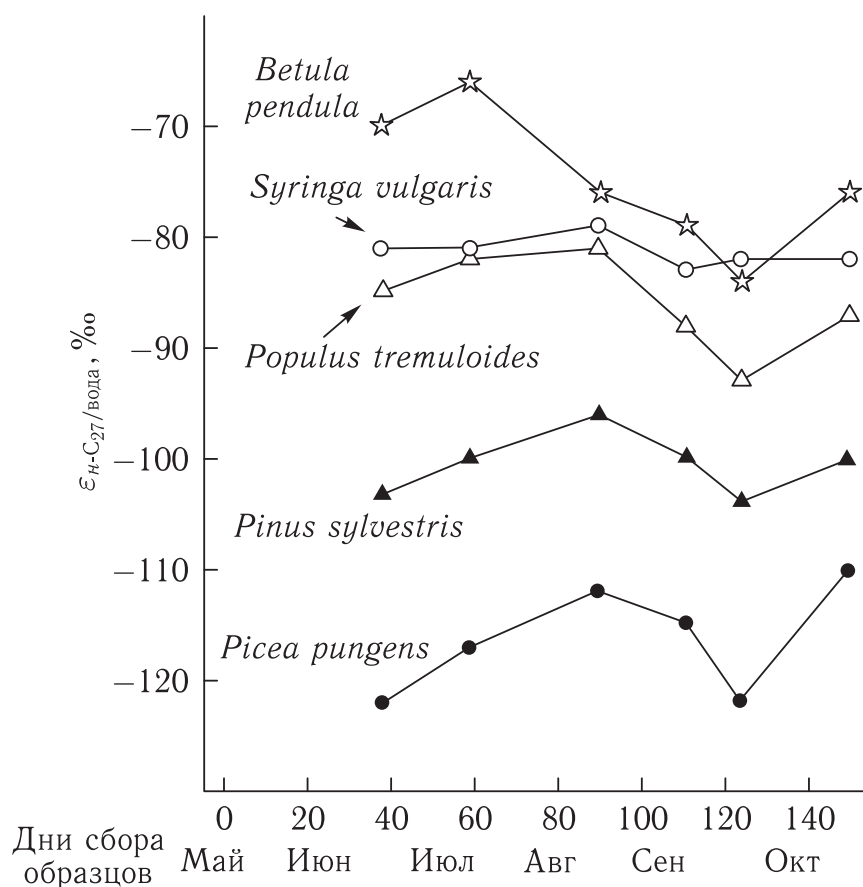


Рис. 4.8. Степень видимого фракционирования (ϵ) между данными δD алкана $n\text{-C}_{27}$ пяти видов растений и δD воды из скважины; $\epsilon_{n\text{-C}_{27}/\text{вода}} = (R_{n\text{-C}_{27}}/R_{\text{в}} - 1) \times 1000\text{‰}$, где $R = D/H$. В каждый определенный момент времени использовалось одно и тоже значение $\delta D_{\text{в}}$ для подсчета ϵ каждого из пяти видов растений

к обобщениям, основанным на результатах этого проекта, следует относиться с осторожностью.

Другим неожиданным результатом этого исследования является значительное отличие данных $\delta^{13}\text{C}$ для *Betula pendula* по отношению к другим цветковым видам. Возможным объяснением этого наблюдения является сильный климатический стресс (особенно в июле–августе при наиболее низкой относительной влажности), который испытывало это, обычно растущее в более влажных условиях, растение. Этот стресс, возможно, повлиял на изотопный состав углерода в *n*-алканах *Betula pendula*, сохранившийся в течение всего сезона. Косвенным подтверждением этого является тот факт, что *Betula pendula* — единственное растение, которое испытало значительное увеличение относительного количества алкана *n*-C₃₁ в сравнении с другими *n*-алканами, обладающими более короткой углеродной цепочкой. Относительное увеличение количества алканов с более длинной углеродной цепочкой и более высокой температурой плавления может являться защитной реакцией против засушливых климатических условий [42].

Западная Европа

Несмотря на значительные различия климатических условий, данные $\delta^{13}\text{C}/\delta\text{D}$ *n*-C₂₉ алкана разнообразных видов деревьев, растущих в Северо-Атлантической, Горно-Средиземноморской, и Южно-Средиземноморской зонах, относительно схожи (см. рис. 4.4). Однако если рассматривать каждое место в отдельности, то изотопные данные $\delta^{13}\text{C}/\delta\text{D}$ в Ньюкасле, Бремене, и Порано показывают отрицательную связь между $\delta^{13}\text{C}$ и δD . Более того, цветковые листопадные виды, в основном, более D-обогащены и ^{13}C -обеднены по сравнению с вечнозелеными цветковыми и хвойными видами. В районе Севильи, где изотопные данные по *n*-C₂₉ представлены только вечнозелеными и хвойными видами, никакой корреляции не наблюдается. Существенные различия данных δD осадков в Порано и Севильи, в сравнении с Ньюкаслем и Бременом, не привели к аналогичной разнице данных δD *n*-C₂₉ алкана. Диапазон изотопных данных δD этого соединения практически не отличается между всеми четырьмя местами.

Измерения максимальной проводимости устьиц требуют специальной аппаратуры, которая должна быть доступна во всех местах изучения растительности. Так как на начальном этапе проекта это было невозможно, измерения проводились только в Ньюкасле. Максимальная проводимость устьиц по отношению к CO₂ и пару H₂O показана на рис. 4.9. Максимальная проводимость устьиц по отношению к CO₂ показывает отрицательную корреляцию с данными $\delta^{13}\text{C}$ алкана *n*-C₂₉ двух листопадных цветковых и двух вечнозеленных цветковых видов. В свою очередь, максимальная транспирация устьиц по отношению к пару H₂O показывает положительную корреляцию с данными δD тех же четырех видов деревьев. Положительная корреляция между

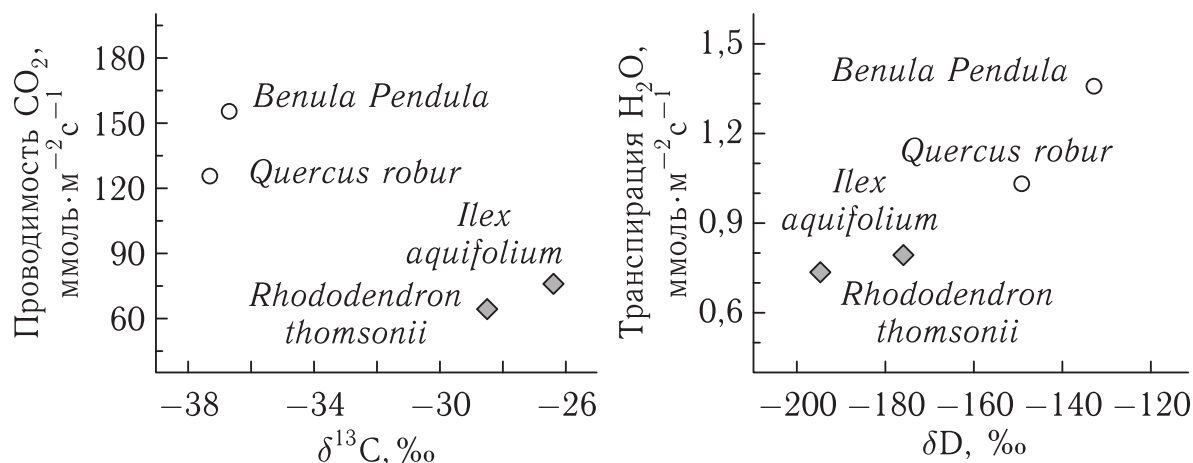


Рис. 4.9. Максимальная проводимость устьиц. Данные были получены в г. Ньюкасл между 12:00 и 13:00 8 июля 2008 г.; $\blacklozenge$ — цветковые вечнозеленые виды деревьев; $\circ$ — цветковые листопадные

транспирацией и данными δD алканов трудно объяснима, потому что, как было указано выше, уменьшение транспирации должно привести к более положительным значениям δD воды внутри листа [38]. Изотопный состав H молекул воды претерпевает значительные изменения в процессе биосинтеза и, по всей вероятности, разница во внутреннем строении листьев и/или особенности биосинтеза между цветковыми и хвойными видами оказывает более существенное влияние на δD алканов чем первоначальный D/H состав воды.

По аналогии с объяснением данных из штата Вашингтон, приведенные выше данные по изотопному составу C среди цветковых и хвойных деревьев в Ньюкасле, Бремене и Порано, могут быть объяснены с точки зрения физиологии изучаемых растений. Относительное ¹³C-обеднение *n*-алканов листопадных цветочных растений наиболее вероятно связано с повышенной максимальной проводимостью устьиц по отношению к CO₂. Объяснение разницы данных δD алканов между хвойными и цветковыми видами деревьев требует дополнительной информации об изотопном составе воды внутри листа, внутреннем строении листьев, а также о фракционировании H в процессе биосинтеза органических соединений, составляющих восковое покрытие листьев исследуемых растений.

Заключение

В данной главе был рассмотрен новый подход к использованию изотопного состава *n*-алканов из листьев континентальной растительности с целью изучения палеоклимата и физиологии растений. Подготовка образцов для изучения данных $\delta^{13}C$ и δD *n*-алканов требует определенных усилий и наличия высоко специализированной аппаратуры.

Однако данные, полученные на уровне индивидуальных органических соединений, потенциально могут предложить уникальную информацию, недоступную при использовании других методов.

Были рассмотрены самые последние результаты работы автора и его коллег в штате Вашингтон, США, и некоторых странах Западной Европы с целью определение влияния климатических условий и физиологии на значения $\delta^{13}\text{C}$ и δD органических соединений из листьев современных цветковых и хвойных растений. Предварительные результаты этих проектов имеют существенное значение для интерпретации изотопных данных *n*-алканов, используемых для изучения палеоклимата. Заметные изменения значений $\delta^{13}\text{C}$ и δD органических соединений, экстрагированных из осадков или осадочных пород, могут быть не только следствием изменения климатических факторов, но также могут быть обусловлены сменой типов растений. Более того, степень отличия изотопных значений между разными типами (и в каждом индивидуальном типе) растений может быть обусловлена различными климатическими условиями и физиологией этих растений.

Литература

1. *Parrish J. T.* Interpreting Pre-Quaternary Climate from the Geologic Record. — New York: Columbia University Press, 1998. — 338 p.
2. *Burroughs W. J.* Climate Change: A Multidisciplinary Approach. — Cambridge: Cambridge University Press, 2001. — 298 p.
3. *Mackay A., Battarbee R., Birks J., Oldfield F.* Global Change in the Holocene. — London: Arnold, 2003. — 528 p.
4. *Cowie J.* Climate Change: Biological and Human Aspects. — Cambridge: Cambridge University Press, 2007. — 504 p.
5. *Dawson T. E., Siegwolf R. T. W.* (Eds.) Stable Isotopes as Indicators of Ecological Change. — London: Academic Press, 2007. — 417 p.
6. *Meier-Augenstein W.* Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. — 1999. — V. 842. — P. 351–371.
7. *Glaser B.* Compound-specific stable-isotope ($\delta^{13}\text{C}$) analysis in soil science // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. — 2005. — V. 168. — P. 633–648.
8. *Sessions A. L.* Isotope-ratio detection for gas chromatography // *Journal of Separation Science*. — 2006. — V. 29. — P. 1946–1961.
9. *Evershed R. P., Bull I. D., Corr L. T., Crossman Z. M., Van Dongen B. E., Evans C. J., Jim S., Mottram H. R., Mukherjee A. J., Pancost R. D.* Compound-specific stable isotope analysis in ecology and paleoecology // In: *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science* / Ed. by R. Michener, K. Lajtha. — Blackwell Publishing Ltd, 2007. — P. 480–540.
10. *Pancost R. D., Boot C. S.* The palaeoclimatic utility of terrestrial biomarkers in marine sediments // *Marine Chemistry*. — 2004. — V. 92. — P. 239–261.
11. *Tiple B. J., Pagani M.* The early origin of terrestrial C_4 photosynthesis // *Annual Reviews of Earth and Planetary Sciences*. — 2007. — V. 35. — P. 435–461.
12. *Schefuß E., Schouten S., Schneider R. R.* Climatic controls on central African hydrology during the past 20,000 years // *Nature*. — 2005. — V. 437. — P. 1003–1006.

13. Schuman B., Huang Y., Newby P., Wang Y. Compound-specific isotopic analyses track changes in seasonal precipitation regimes in the Northeastern United States at ca 8200 cal yr BP // *Quaternary Science Reviews*. — 2006. — V. 25. — P. 2992–3002.
14. Pagani M., Pedentchouk N., Huber M., Sluijs A., Schouten S., Brinkhuis H., Sinninghe Damsté J.S., Dickens G.R. The IODP Expedition 302 Expedition Scientists (2006). Arctic hydrology during global warming at the Palaeocene/Eocene thermal maximum // *Nature*. — 2006. — V. 442. — P. 671–675.
15. Dickens G.R. Methane oxidation during the Late Palaeocene thermal maximum // *Bulletin De La Societe Geologique De France*. — 2000. — V. 171. — P. 37–49.
16. Woodward F.I. A review of the effects of climate on vegetation: Ranges, competition, and composition // In: *Global Warming and Biological Diversity* / Ed. by R.L. Peters, T.E. Lovejoy. — New Haven & London: Yale University Press, 1992. — P. 105–123.
17. Tinner W., Lotter A.F. Central European vegetation response to abrupt climate change at 8.2 ka. // *Geology*. — 2001. — V. 29. — P. 551–554.
18. Williams J.W., Shuman B.N., Webb T.III., Bartlein P.J., Leduc P.L. Late-quaternary vegetation dynamics in North America: Scaling from taxa to biomes // *Ecological Monographs*. — 2004. — V. 74. — P. 309–334.
19. Smith F.A., Wing S.L., Freeman K.H. Magnitude of the carbon isotope excursion at the Paleocene-Eocene thermal maximum: The role of plant community change // *Earth and Planetary Science Letters*. — 2007. — V. 262. — P. 50–65.
20. Esau K. *Anatomy of Seed Plants*. — 2nd ed. — John Wiley & Sons, Inc., 1977. — 576 p.
21. Körner C., Scheel J.A., Bauer H. Maximum leaf conductance in vascular plants // *Photosynthetica*. — 1979. — V. 13. — P. 45–82.
22. Chikaraishi Y., Naraoka H. $\delta^{13}\text{C}$ and δD relationship among three *n*-alkyl compound classes (*n*-alkanoic acid, *n*-alkane, and *n*-alkanol) of terrestrial higher plants // *Organic Geochemistry*. — 2007. — V. 38. — P. 198–215.
23. Hou J., D'Andrea W.J., MacDonald D., Huang Y. Evidence for water use efficiency as an important factor in determining the δD values of tree leaf waxes // *Organic Geochemistry*. — 2007. — V. 38. — P. 1251–1255.
24. Smith R.M. Before the injection — modern methods of sample preparation for separation techniques // *Journal of Chromatography A*. — 2003. — V. 1000. — P. 3–27.
25. Zygmunt B., Namiećnik J. Preparation of samples of plant material for chromatographic analysis // *Journal of Chromatographic Science*. — 2003. — V. 41. — P. 109–116.
26. Peters K.E., Walters C.C., Moldowan J.M. *The Biomarker Guide*. Second Edition. I. Biomarkers and Isotopes in the Environmental and Human History. — Cambridge: Cambridge University Press, 2005. — 471 p.
27. Péres V.F., Saffi J., Melecchi M.I.S., Abad F.C., de Assis Jacques R., Martinez M.M., Oliveira E.C., Caramão E.B. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth // *Journal of Chromatography A*. — 2006. — V. 1105. — P. 115–118.

28. Grice K., de Mesmay R., Glucina A., Wang S. An improved and rapid 5A molecular sieve method for gas chromatography isotope ratio mass spectrometry of *n*-alkanes (C8–C30+) // *Organic Geochemistry*. — 2008. — V. 39. — P. 284–288.
29. Merritt D. A., Freeman K. H., Ricci M. P., Studley S. A., Hayes J. M. Performance and optimization of a combustion interface for isotope ratio monitoring gas chromatography/mass spectrometry // *Analytical Chemistry*. — 1995. — V. 67. — P. 2461–2473.
30. Brand W. A., Tegtmeier A. R., Hilkert A. Compound-specific isotope analysis: extending towards $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ // *Organic Geochemistry*. — 1994. — V. 21. — P. 585–594.
31. Burgoyne T. W., Hayes J. M. Quantitative production of H_2 by pyrolysis of gas chromatographic effluents // *Analytic Chemistry*. — 1998. — V. 70. — P. 5136–5141.
32. Sessions A. L., Burgoyne W. W., Hayes J. M. Correction of H_3^+ contributions in hydrogen isotope ratio monitoring mass spectrometry // *Analytical Chemistry*. — 2001a. — V. 73. — P. 192–199.
33. Sessions A. L., Burgoyne W. W., Hayes J. M. Determination of the H_3 factor in hydrogen isotope ratio monitoring mass spectrometry // *Analytical Chemistry*. — 2001b. — V. 73. — P. 200–207.
34. Kittitas County, 2004. Kittitas County 2004 Road Atlas. Appendices. Accessible from: «http://www.co.kittitas.wa.us/publicworks/atlas/Atlas2004_Appendices.pdf».
35. Pedentchouk N., Sumner W., Tiple B., Pagani M. $\delta^{13}\text{C}$ and δD compositions of *n*-alkanes from modern angiosperms and conifers: An experimental set up in central Washington State, USA // *Organic Geochemistry*. — 2008. — V. 39. — P. 1066–1071.
36. Farquhar G. D., O'Leary M. H., Berry J. A. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves // *Australian Journal of Plant Physiology*. — 1982. — V. 9. — P. 121–137.
37. Körner C., Scheel J. A., Bauer H. Maximum leaf conductance in vascular plants // *Photosynthetica*. — 1979. — V. 13. — P. 45–82.
38. Farquhar G. D., Cernusak L. A., Barnes B. Heavy water fractionation during transpiration // *Plant Physiology*. — 2007. — V. 143. — P. 11–18.
39. Chikaraishi Y., Naraoka H. Compound-specific δD – $\delta^{13}\text{C}$ analyses of *n*-alkanes extracted from terrestrial and aquatic plants // *Phytochemistry*. — 2003. — V. 63. — P. 361–371.
40. Bi X., Sheng G., Liu X., Li C., Fu J. Molecular and carbon and hydrogen isotopic composition of *n*-alkanes in plant leaf waxes // *Organic Geochemistry*. — 2005. — V. 36. — P. 1405–1417.
41. Sachse D., Radke J., Gleixner G. δD values of individual *n*-alkanes from terrestrial plants along a climatic gradient — implications for the sedimentary biomarker record // *Organic Geochemistry*. — 2006. — V. 37. — P. 469–483.
42. Kozłowski T. T., Pallardy S. G. *Physiology of Woody Plants*. — 2nd ed. — Academic Press, 1997. — 411 p.
43. New M., Lister D., Hulme M., Makin I. A high-resolution data set of surface climate over global land areas // *Climate Research*. — 2002. — V. 21. — P. 1–15.
44. Metzger M. J., Bunce R. G. H., Jongman R. H. G., Mucher C. A., Watkins J. W. A climatic stratification of the environment of Europe // *Global Ecology and Biogeography*. — 2005. — V. 14. — P. 549–563.

Глава 5

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ИЗОТОПНЫХ ОТНОШЕНИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ТАБАКА

А. Б. Урюпин

Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН,
Москва

Современные методы масс-спектрометрических исследований получили широкое распространение при изучении органических веществ растительного происхождения, в частности табачного сырья и табачной продукции [1, 2]. Наибольшую популярность при рутинной идентификации компонентов смесей приобрели комбинированные (hyphenated) методы, основанные на сочетании масс-спектрометров с хроматографической аппаратурой [3]. Создание производителями аппаратуры банков данных — масс-спектров отдельных стандартных соединений — пробудило иллюзию, что с помощью хроматомасс-спектрометров можно «расшифровать» состав любой сложной смеси веществ табака с высоким уровнем вероятности. В реальной практике к результатам такого анализа следует подходить достаточно осторожно.

Другое направление масс-спектральных исследований — масс-спектрометрия изотопных отношений (IRMS) [4], развитие которой стало возможным в результате создания высокоточной аппаратуры нового поколения и разработки на ее основе оригинальных методов анализа, имеющих непосредственный практический интерес [5].

Абсолютная величина соотношения изотопов может меняться в очень узких пределах, что проявляется в случае «легких» химических элементов, из которых состоят вещества табака (водород, углерод, азот, кислород и сера). Эти элементы, в отличие от минорных, «тяжелых» элементов, обнаруживаемых в табаке (например, свинца, урана и т. д.), в целом обогащены в природе более легким изотопом. Следует подчеркнуть, что в силу специфики обсуждаемого метода необходимым этапом анализа любого вещества, в том числе компонентов табака, является его сжигание или превращение в простейшие газы. Существует и альтернативный метод, не требующий этапа сжигания или термического превращения образца — ЯМР-спектроскопия [6, 7], но и для его осуществления необходимо соблюдение целого ряда экспериментальных условий.

К настоящему моменту IRMS находит все более широкое признание в качестве метода, полезного для применения в пищевой промышленности для контроля аутентичности и подтверждения места производства пищевых продуктов и их ингредиентов. Существовавшие ранее методы идентификации поддельной продукции были основаны на выявлении в ней отдельных химических веществ, отсутствующих в натуральном продукте, или на определении несоответствия содержания компонентов сравниваемых продуктов. Метод IRMS позволяет на основе измерения величины δ дифференцировать химически идентичные вещества. Необходимым условием успешного практического применения IRMS для идентификации табачного сырья и табачной продукции является предварительный сбор массива данных по изотопным отношениям конкретных объектов идентификации и статистическая обработка собранных данных. Это позволяет учесть влияние на δ видовой специфики растения табака, его сорта, района произрастания, климатических и сезонных условий.

В настоящий момент отсутствуют стандартные международные методики определения изотопных отношений, предназначенные для решения табачных проблем. Большинство методик, используемых при исследовании других объектов пищевой продукции (к которой условно относится и табак) подразумевают измерение изотопных отношений для одного элемента, хотя достоверность выводов существенно повышается при использовании изотопных отношений двух элементов ($\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{18}\text{O}$ или $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$). Для специалистов, осуществляющих идентификацию табака и табачной продукции, несомненный интерес представляет изотопный анализ, направленный на выяснение происхождения растительной продукции, подобно тому как это осуществляется в случае вина [5] (например, путем корреляции величин $\delta^{13}\text{C}$ спирта и $\delta^{18}\text{O}$ воды в образцах).

Сложный химический состав табака ставит задачу выбора индивидуальных компонентов, для которых эффект биологического фракционирования изотопов был бы выражен в степени, соответствующей чувствительности существующих методов. Алкалоиды табака относятся к азотсодержащим метаболитам растений, для выяснения происхождения которых (например, кофеина) ранее также применялся мультиэлементный вариант метода IRMS (определение $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ и $\delta^{18}\text{O}$). Что касается никотина, главного алкалоида табака, то наиболее информативным с точки зрения определения его источника оказалось парное определение изотопных отношений азота и водорода [8].

Результаты GC-C-IRMS определения соотношения изотопов углерода, водорода и азота в образцах никотина, выделенного за 6 мин микроволновой экстракцией из табака, были использованы для оценки страны происхождения контрабандных сигар [9]. Аналогичным образом мультиэлементный изотопный анализ использовался для дифференциации канадских и контрабандных китайских сигарет. Метод из-

мерения отношений $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ и $^2\text{H}/^1\text{H}$ включал экстракцию никотина табака канадских (47 марок) и китайских сигарет (23 марки) метанолом с последующим прямым вводом пробы в хроматограф, соединенный с изотопным масс-спектрометром. Никотин из канадских сигарет имел более высокие значения изотопных отношений для водорода $\delta^2\text{H} = -232,7 \div -203,4\text{‰}$, чем значения для китайских сигарет $\delta^2\text{H} = -262,6 \div -219,9\text{‰}$ и более низкие значения изотопных отношений для азота $\delta^{15}\text{N} = -7,7 \div -6,3\text{‰}$ и $-7,6 \div -5,7\text{‰}$, для канадских и китайских сигарет соответственно [10].

Оценка вариаций природного содержания ^{15}N проводилась не только для никотина, но и для других алкалоидов — его аналогов, а также его метаболитов (например, N-метил-2-фенилпирролидина и продуктов деметилирования) [11]. Алкалоиды извлекали из биологической матрицы твердофазной экстракцией. Результаты измерений $\delta^{15}\text{N}$ для различных образцов отличались на 4‰, воспроизводимость результатов была не хуже 0,5‰. Кроме того, никотин, наряду с ацетанилидом и мочевиной, оказался удобным стандартным веществом (reference material) для метода IRMS при интервальных значениях изотопных отношений $\delta^{13}\text{C} = -30,05 \div +7,72\text{‰}$, $\delta^2\text{H} = -162 \div -45\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = -6,03 \div +35,62\text{‰}$ [12].

Заслуживают внимания также исследования изотопного состава не только никотина, но и соединений других классов, входящих в состав табачного листа (оксикислоты, сахара, целлюлоза); различия в величинах изотопных отношений δ авторы относят к отличающимся региональным условиям биосинтеза перечисленных компонентов [13].

Определенной «брутто-характеристикой» сигарет может служить суммарное содержание изотопа ^{13}C в газообразных продуктах горения и распада, содержащихся в сигаретном дыме (CO_2 и CO), анализируемых с помощью метода GC-C-IRMS [14].

В условиях ужесточения требований к составу ингредиентов, добавляемых в табачное сырье и табачные изделия (соусы, ароматизаторы) особую важность приобретает проблема подтверждения их натурального происхождения.

Многие из ингредиентов являются оптически активными веществами, в молекулах которых содержатся один или несколько центров асимметрии. Оптически активные вещества могут существовать в нескольких изомерных формах, отличающихся конфигурацией этих центров. Ингредиенты природного происхождения представляют собой, как правило, один из оптических изомеров, а произведенные в промышленности — смесь оптических изомеров. Обнаружено, что изотопные отношения оптических изомеров могут отличаться. Например, в случае природного ароматизатора линалоола изотопный состав водорода составляет $\delta^2\text{H}_{\text{smow}} = -265 \div -307\text{‰}$, а для синтетического линалоола, для которого соотношение оптических изомеров зависит от источника получения, $\delta^2\text{H}_{\text{smow}}$ лежит в пределах от -185 до -209‰ [15, 16]. Аналогич-

ные исследования проведены для ментола, одного из важнейших ароматизаторов табачных изделий [17], а также для (Е)-метилциннамата [18].

Синтетический имитатор аромата малины, используемый в производстве ряда табачных изделий, содержит в своей основе альфа-ионол, для которого определялись $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^2\text{H}$. Ароматизатор «малина» природного происхождения характеризовался $\delta^{13}\text{C} = -30,3 \div -35,1\text{‰}$ и $\delta^2\text{H} = -176 \div -221\text{‰}$, а синтетический $\delta^{13}\text{C} = -24,5\text{‰}$ и $\delta^2\text{H} = -184\text{‰}$ [19]. Поэтому с помощью IRMS можно обнаружить неприродные ингредиенты в составе табачных ароматизаторов и соусов.

Однако для решения целого комплекса «табачных проблем» необходимо создание базы данных по изотопным отношениям с использованием табачного сырья и вспомогательных материалов, предоставленных известными производителями, гарантирующими аутентичность образцов. Затем на основе международных стандартных методик анализа можно получить достоверные результаты.

Дополнительный интерес представляют химические изменения ингредиентов, нанесенных на табак в процессе прокуривания, в частности оценка возможного вклада образующихся продуктов в выход так называемых «аналитов Хоффманна» [20]. Нельзя считать надежным предсказание путей превращений ингредиентов на основании результатов их непосредственного пиролиза, так как он не может симулировать условия сгорания веществ, нанесенных на табак. Удачной альтернативой явился метод IRMS с применением соединений, меченных радиоактивным изотопом ^{14}C или изотопом ^{13}C , чтобы проследить судьбу летучих и нелетучих ингредиентов и продуктов сгорания в главной и побочной струе табачного дыма. Тестовые сигареты, с нанесенными на табак мечеными ^{13}C ванилином, бензальдегидом или D-глюкозой, прокуривали с использованием специальной насадки «рыбий хвост» для отбора побочной струи и дыма в различных ловушках. Соотношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ определяли в CO, CO₂ и летучих углеводородах дыма, также в окурках и золе, и оценивали вклад меченых соединений. Таким путем было показано, что заметные количества летучего ингредиента (бензальдегида) переходят в дым без разложения, а полуметучие и нелетучие ингредиенты (ванилин и глюкоза) вносят значительный вклад в концентрацию ^{13}C в CO и CO₂. К близким выводам привели результаты исследования с применением IRMS превращений стандартных увлажнителей табака (глицерина, пропиленгликоля), геранилацетата и тетраметилпиразина [21].

В целом же следует отметить пока недостаточное использование возможностей масс-спектрометрии изотопных отношений для анализа табака.

Литература

1. Tobacco Encyclopedia. — Mainz: Verlagsgruppe Rhein Mainz GmbH & Co. KG, 2000.

2. *Rodgman A.* // Beitrage zur Tabakforschung Int. — 2002. — V. 20. — P. 83–103, 277–297.
3. *Хмельницкий Р. А., Бродский Е. С.* Методы аналитической химии. Хромато-масс-спектрометрия. — М.: Химия, 1984.
4. Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques / Ed. by P. A. de Groot. — Elsevier B.A. 2004.
5. *Rossmann A.* // Food Reviews International. — 2001. — V. 17. — P. 347.
6. *Hays P. A., Remaud G. S., Jamin E., Martin Y. L.* // J. Forensic Sci. — 2000. — V. 45. — P. 552.
7. *Фримэн Р.* Магнитный резонанс в химии и медицине. — М.: URSS, 2009. — 331 с.
8. *Jamin E., Naulet N., Martin G. J.* // Plant. Cell. Environ. — 1997. — V. 20. — P. 589.
9. *Binnet M. -J., Hupe M., Lafontaine P.* // Pittcon 2005. Abstr.N 920-5. Open-Vessel Microwave Assisted Extraction of Nicotine from Tobacco for Stable Isotope Measurements.
10. *Binette M. J., Lafontaine P., Vanier M., Ng L. K.* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2009. — V. 57. — P. 1151.
11. *Molinie R., Ferchaud-Roucher V., Lebreton J., Robuns R. J.* // Rapid Commun. Mass Spectrometry. — 2005. — V. 19. — P. 2039.
12. *Schimmelmann A., Albertino A., Sauer P. E., Qi H., Molinie R., Mesnard F.* // Rapid Commun. Mass Spectrometry. — 2009. — V. 23. — P. 3513.
13. *Jamin E., Naulet N., Martin G. J.* // Phytochemical Analysis. — 1998. — V. 8. P.105.
14. *Russow R. W., Intorp M., Mueller C., Stangl C.* // Isotope Environ. Health Study. — 2007. — V. 43. — P. 257.
15. *Bentley R.* //Chemical Reviews. — 2006. — V. 106. — P. 4099.
16. *Горяев М., Плива И.* Методы исследования эфирных масел. — Алма-Ата: Изд. АН КазССР, 1962. — 751 с.
17. *Sybilska D., Asztemborska M. J.* // Biochem. Biophys. Methods. — 2002. — V. 54. — P. 187.
18. *Fink K., Richling E., Heckel F., Schreier P.* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2004. — V. 52. — P. 3065.
19. *Del Mar Caja M., Preston C., Kempf M., Schreier P.* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2007. — V. 55. — P. 6700.
20. *Mueller C., Intorp M., Russow R.* «Application of isotope mass-spectrometry to study fate and behaviour of ingredients applied on tobacco» // 2006. CORESTA Congress. Smoke science/Product Tecnology. Paris. Oral Presentation SS16.
21. *Mueller C., Intorp M.* «Fate of tobacco ingredients: application of isotope mass-spectrometry to study the behaviour of humectants, geranyl acetate and tetramethyl pyrazine during combustion» 2009. CORESTA Congress. Smoke science/Product Tecnology. Aix-en-Provence. Oral Presentation SSPT22.

Глава 6

ПРИМЕНЕНИЕ ИЗОТОПНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ УГЛЕРОДА В ДОПИНГОВОМ КОНТРОЛЕ

Т. Г. Соболевский, И. С. Прасолов, Г. М. Родченков

ФГУП «Антидопинговый центр» Министерства спорта, туризма
и молодежной политики Российской Федерации, Москва

Введение

В настоящее время в практике допинг-контроля существует необходимость выявления случаев употребления допинговых препаратов, являющихся близкими аналогами гормонов, вырабатываемых в организме человека, или их предшественниками (тестостерон, дегидроэпиандростерон, андростендион, андростендиолы и т. д.). По результатам классических методов — газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией — это сделать не удастся из-за отсутствия специфических метаболитов, и отмечаются лишь так называемые атипичические изменения гормонального профиля спортсмена (изменения концентраций либо соотношений определенных стероидов).

Применение синтетического тестостерона в спорте было запрещено более 25 лет назад. Ранее единственным способом установить факт его использования являлось определение отношения концентраций тестостерона (Т) и его неактивного изомера — эпитестостерона (Эпи) в моче. Однако данный подход имеет ряд существенных ограничений, поскольку отношение Т/Эпи в популяции варьирует в довольно широких пределах (от 0,1 до 4,0 и выше) [1], причем у некоторых людей в силу генетических особенностей отношение Т/Эпи даже после употребления тестостерона не достигает 4.

Поскольку подавляющее большинство синтетических стероидов получают из ситостерола и стигмастерола — соединений растительного происхождения с изотопным составом углерода около -30‰ и ниже (относительно международного стандарта белемнита), факт их применения может быть выявлен с использованием изотопной масс-спектрометрии. Метод основан на измерении отношения изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) эндогенных стероидов в организме человека, которое лежит в диапазоне от -17 до -26‰ и практически никогда не достигает

значений ниже -27‰ [2–4]. Исследования показали, что изотопный состав стероидных гормонов у людей, проживающих на разных континентах, заметно отличается: эндогенные стероиды у жителей Северной и Южной Америки обогащены изотопом ^{13}C в большей степени, чем у европейцев [5, 6]. Это обусловлено тем фактом, что в США многие сельскохозяйственные культуры, например, кукуруза и сахарный тростник, используют для фотосинтетического потребления CO_2 по так называемому механизму C4 (значения $\delta^{13}\text{C}$ изменяются от -6 до -19‰), в Европе же у растений преобладает механизм C3 ($\delta^{13}\text{C}$ изменяется от -24 до -34‰).

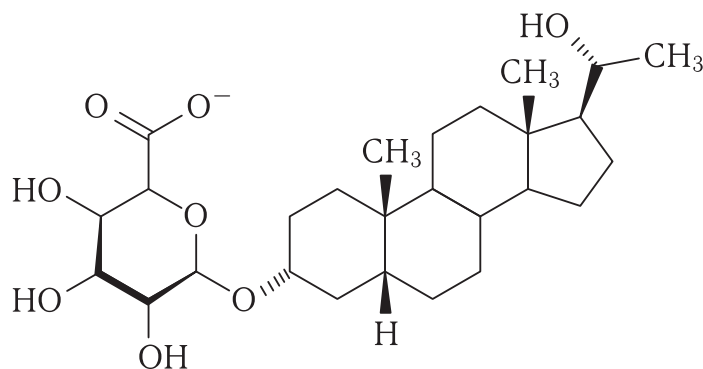
В 2004 г. Всемирное антидопинговое агентство (ВАДА) опубликовало технический документ [7], регламентирующий использование метода изотопной масс-спектрометрии, но даже сегодня у антидопинговых лабораторий отсутствует единый подход к методике анализа ввиду его сложности и трудоемкости. При этом из существующих в мире 35 аккредитованных лабораторий (количество по состоянию на январь 2010 г.) лишь 2/3 из них располагают технической возможностью проведения подобного анализа. Наиболее часто используют многостадийную твердофазную экстракцию (ТФЭ) [8–11] и ТФЭ в сочетании с полупрепаративной жидкостной хроматографией [12].

Цель данной работы — разработка методики определения отношения изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в стероидах, выделенных из мочи человека, методом газовой хроматографии в сочетании с изотопной масс-спектрометрией (ГХ-С-ИМС) и установление внутрилабораторных критериев оценки результатов анализа.

Метаболизм стероидных гормонов

Для более глубокого понимания принципа анализа необходимо рассмотреть схему биосинтеза стероидных гормонов в организме человека. Их общим предшественником считается холестерин, претерпевающий ряд превращений под воздействием высокоспецифичных ферментов, которые обеспечивают протекание реакций гидроксирования, гидрирования, дегидрирования, изомеризации, расщепления и ароматизации. На заключительном этапе происходит образование конъюгатов с глюкуроновой кислотой. По сравнению с исходными соединениями конъюгаты гораздо лучше растворимы в воде и легко выводятся из организма. На рис. 6.1 в качестве примера приведена структурная формула 3α -глюкуронида прегнандиола.

Тестостерон — наиболее важный представитель андрогенов, обладающий выраженным анаболическим эффектом. Он синтезируется клетками Лейдига и контролирует развитие и функцию половых желез, а также отвечает за формирование вторичных мужских половых признаков (развитие мускулатуры, волосяной покров и т. п.). Тестостерон активно метаболизирует с образованием 5α - и 5β -андростандиолов, которые в свою очередь превращаются в неактивные продукты анд-

Рис. 6.1. 3 α -глюкуронид прегнандиола

ростерон (А) и этиохоланолон (Э). Следует отметить, что концентрация тестостерона в моче составляет в среднем 20–40 нг/мл (у женщин редко превышает 10 нг/мл), андростандиолов — 20–100 нг/мл, тогда как концентрация терминальных метаболитов (А и Э) достигает 10 мкг/мл и более. Схема метаболизма стероидных гормонов приведена на рис. 6.2.

Отдельно стоит упомянуть стероиды, не участвующие в метаболизме андрогенов (в области допинг-контроля их называют эндогенными маркерами, ЭМ), такие как прегнандиол (ПД), прегнантриол, андростенон (16ен), а также продукты метаболизма кортикостероидов: 11 β -гидроксиандростерон, 11 β -гидроксиэтиохоланолон и 11-кетоэтиохоланолон (рис. 6.3). Эти соединения находятся в моче в концентрации 100–3000 нг/мл. Поскольку их изотопный состав определяется только регионом проживания и особенностями диеты человека, в допинговом контроле ЭМ используют для принятия решения о факте употребления спортсменом запрещенных препаратов. При интерпретации результатов анализа сравнивают значения $\delta^{13}\text{C}$ тестостерона или его метаболитов с аналогичными значениями ЭМ, и если различие по абсолютной величине не превышает 3‰, результат анализа признается отрицательным, т.е. считается, что андрогены в данном образце имеют *эндогенное* происхождение. Эту разницу принято обозначать как «дельта-дельта», $\Delta\delta$. Однако в последнее время антидопинговые лаборатории чаще используют внутрилабораторные критерии оценки результатов анализа, индивидуальные для каждой пары «стероид–ЭМ». Эти данные получают в процессе метрологической аттестации *конкретной* методики в отдельно взятой лаборатории, что позволяет учесть все потенциальные источники систематической погрешности и исключить возможность ложноположительного результата. Последний способ оценки результатов получил название метода референтных интервалов.

В качестве эндогенных маркеров антидопинговые лаборатории используют различные соединения, но чаще всего ПД [13]. Стоит отметить, что его использование иногда может оказаться бесполезным, так как некоторые пищевые добавки, продаваемые на рынке США, содержат прегненолон, который метаболизирует до ПД и существенно

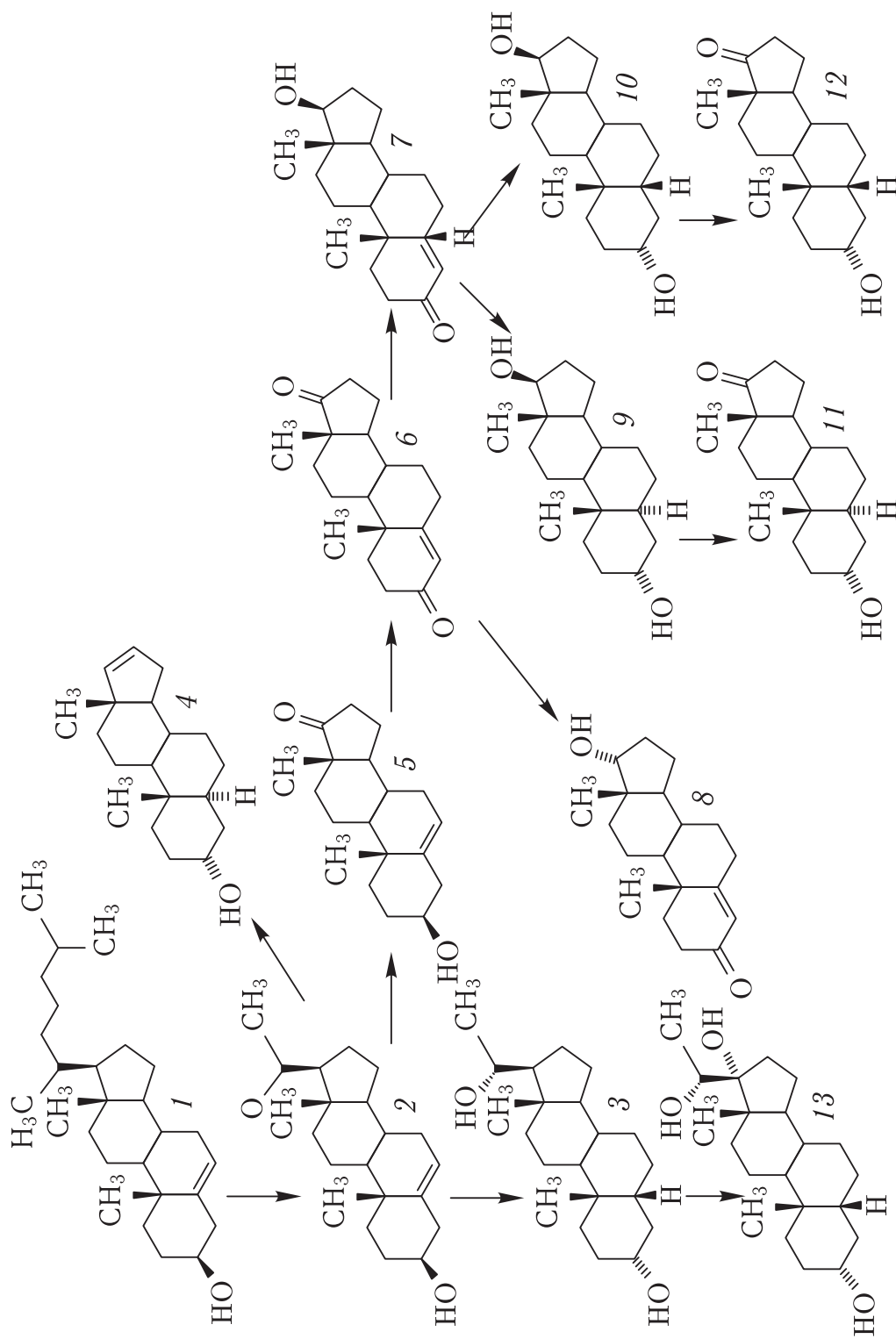


Рис. 6.2. Схема биосинтеза стероидных гормонов: 1 — холестерин; 2 — прегненолон; 3 — прегненолон; 4 — андростенон; 5 — дегидроэпиандростерон; 6 — андростенон; 7 — тестостерон; 8 — эпитестостерон; 9 — 5α-андростандиол; 10 — 5β-андростандиол; 11 — андростерон; 12 — этиохоланолон; 13 — прегнантриол

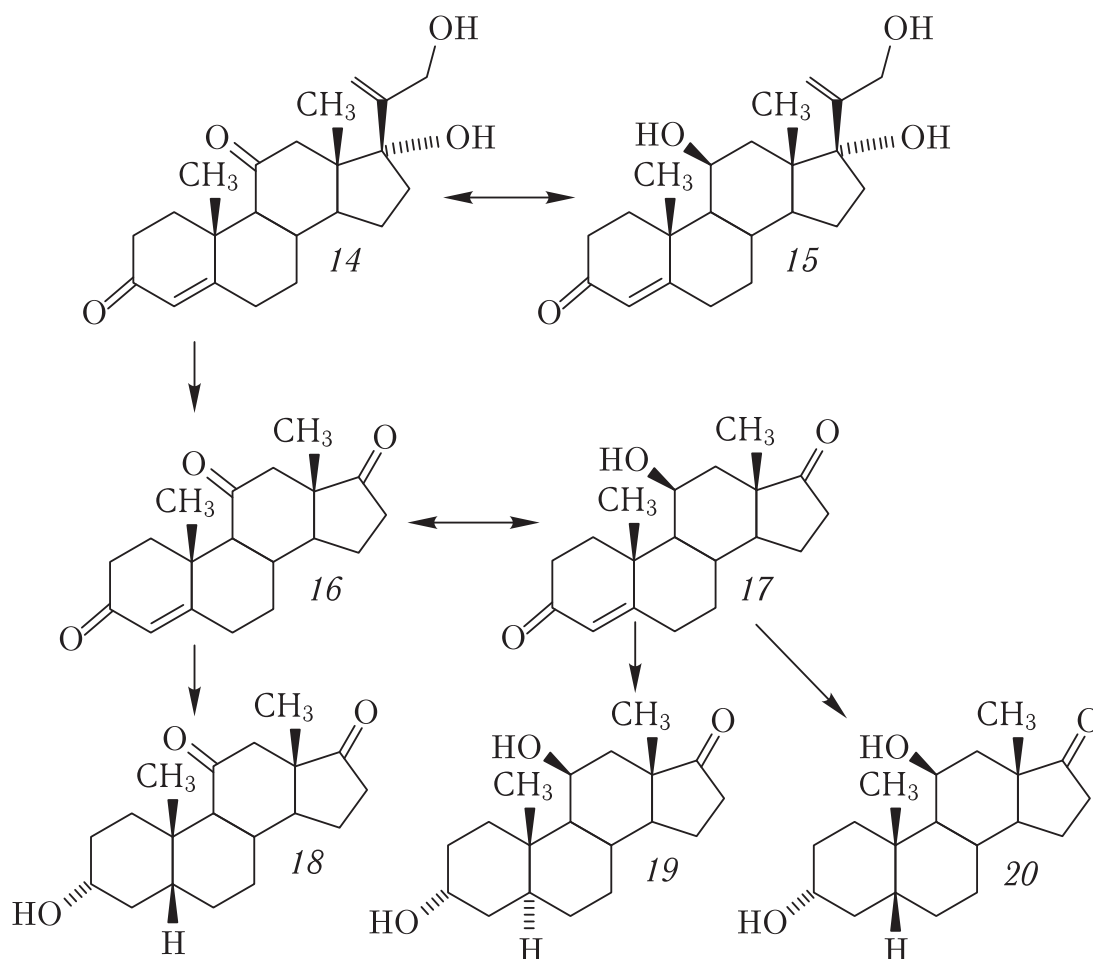


Рис. 6.3. Схема биосинтеза стероидных гормонов (продолжение): 14 — кортизон; 15 — кортизол; 16 — 11-кетоандростендион; 17 — 11β-гидроксиандростендион; 18 — 11-кетоэтиохоланолон; 19 — 11β-гидроксиандростерон; 20 — 11β-гидроксиэтиохоланолон

искажает его изотопный состав [14, 15]. Также довольно часто используют другие ЭМ: 11β-гидроксиандростерон, 11β-гидроксиэтиохоланолон и 11-кетоэтиохоланолон [16]. Однако и на их изотопный состав можно повлиять, принимая пищевую добавку, содержащую 11-кетоандростендион, также доступную на рынке спортивного питания. Кроме этого, данные соединения в силу низкой летучести обладают посредственными газохроматографическими свойствами даже в виде производных. В целом, наиболее подходящим ЭМ является андростенон, хотя в моче женщин его концентрация как правило не превышает 300 нг/мл.

Экспериментальная часть

Оборудование

Работу проводили на изотопном масс-спектрометре Delta V Advantage (Thermo, Бремен), подключенном с помощью интерфейса сжигания Combustion III к газовому хроматографу TRACE GC (Thermo, Италия). Для структурной идентификации определяемых соединений ис-

пользовали масс-спектрометр DSQ II (Thermo, США), соединенный со вторым газовым хроматографом. Для ввода жидких проб использовали автодозатор TriPlusAS (Thermo, Италия) в исполнении, позволяющем вводить пробу в инжекторы двух газовых хроматографов попеременно.

Целевые соединения (в виде ацетатов) разделяли на идентичных капиллярных колонках RTX-35MS с интегрированной предколонкой длиной 5 м (Restek, США) 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм в одинаковых условиях программирования температуры: 120 °С (2 мин), нагрев 30 °С/мин до 260 °С, нагрев со скоростью 1 °С/мин до 276 °С, нагрев со скоростью 30 °С/мин до 310 °С (2 мин). Пробу вводили в режиме без деления потока при температуре 250 °С. Скорость потока газа-носителя (гелий 99,9999%) составляла 1,7 мл/мин в случае ГХ-МС и 2 мл/мин в случае ГХ-С-ИМС. Газ-носитель для ГХ-С-ИМС дополнительно осушали с помощью термokatалитического дожигателя (Supelco, США). Для ГХ-С-ИМС также использовали СО₂ чистоты 99,995% (газ сравнения) и О₂ чистоты 99,999%. Температура окислительного реактора в интерфейсе сжигания составляла 940 °С, а восстановительного — 600 °С. Окислительный реактор регенерировали, насыщая кислородом в течение 15 мин при рабочей температуре за несколько часов до начала каждой серии анализов. В случае ГХ-МС данные регистрировали в режиме сканирования от 50 до 410 а.е.м. в условиях ионизации электронным ударом при 70 эВ. Объем вводимой пробы составлял 2 мкл для ГХ-С-ИМС и 0,5 мкл для ГХ-МС.

В процессе пробоподготовки использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent серии 1100 (Германия), оборудованный бинарным насосом, автодозатором, диодно-матричным детектором и препаративным коллектором фракций G1364В. Разделение проводили на колонке SunFire C18 (Waters, США) 250 мм × 4,6 мм с размером зерна сорбента 5 мкм. Для защиты аналитической колонки использовали предколонку 20 мм × 4,0 мм с аналогичным сорбентом. Условия градиентного элюирования были следующими: (1) «А» (вода) от 70 до 0% за 20 мин, 10 мин при 100% «В» (ацетонитрил), далее до 70% «А» в течение 5 мин и 5 мин при 70% «А» либо (2) от 30 до 0% «А» за 33 мин, 5 мин при 100% «В», далее до 30% «А» в течение 5 мин и 5 мин при 30% «А». Скорость потока элюента через колонку 1 мл/мин, колонку термостатировали при 35 °С. Детектировали при 197 нм и 240 нм.

Реактивы и материалы

Стандартные образцы тестостерона, 5 α - и 5 β -андростан-3 α ,17 β -диолы (5 α , 5 β) и прегнандиол (5 β -прегнан-3 α ,20S-диол) были получены от LGC Standards (Германия), андростерон, этиохоланолон, андростенон (5 α -андрост-16-ен-3 α -ол), андростанол (5 α -андростан-3 β -ол), ацетат дегидропрегненолона, ацетат тестостерона, а также пиридин, уксусный ангидрид, гептан, диэтиловый эфир и соли для приготовления буферных растворов получены от Sigma-Aldrich (США). Диацетат 5 α -андро-

стандиола получен от Research Plus Inc. (США). β -Глюкуронидаза из *E. Coli* K12 получена от Roche (Германия). Метанол для приготовления растворов исследуемых соединений получен от Merck (Германия). Особо чистые газы произведены компанией НИИ КМ (Россия).

В качестве элюента использовали деионизованную воду (18,2 МОм) (установка Milli-Q Synthesis, Millipore, Англия), и ацетонитрил качества «для дальнего УФ» (JT Baker, Голландия). Для ТФЭ использовали патроны Bond Elut LRC C18 (Varian, США) объемом 10 мл, содержащие 500 мг сорбента.

Пробоподготовка

Пробу мочи объемом 10 мл (в некоторых случаях 20 или 40 мл) пропускали через предварительно кондиционированный патрон для ТФЭ, затем промывали его водой и элюировали метанолом (4 раза по 1 мл). Элюат упаривали, растворяли остаток в 1 мл 0,8 М фосфатного буферного раствора ($\text{pH} = 6,3$) и экстрагировали 5 мл диэтилового эфира. Органический слой отбрасывали, после чего к водному слою добавляли 100 мкл β -глюкуронидазы и инкубировали 1 ч при 57°C . После охлаждения добавляли 3 М карбонатный буферный раствор ($\text{pH} = 10$), 5 мл диэтилового эфира и экстрагировали на автоматическом встряхивателе в течение 10 мин. После центрифугирования и вымораживания водного слоя при -30°C эфирный экстракт переносили в новую пробирку, упаривали при 60°C и растворяли сухой остаток в 60 мкл метанола, содержащего 50 нг/мкл ацетата дегидропрегненолона (внутренний стандарт для контроля времени удерживания), добавляли 40 мкл воды и переносили в сосуд (виалу) со вставкой уменьшенного объема.

Затем 90 мкл полученной пробы вводили в жидкостный хроматограф в условиях 1 (длина волны 197 нм). Собирали фракции, соответствующие по времени удерживания тестостерону (I), 5α - и 5β -андростандиолам (II), андростерону и этиохоланолону (III), прегнандиолу (IV) и андростенолу (V). К фракциям III–V добавляли раствор андростанола (300 нг/мкл) в количестве, равном 1/10 от конечного объема фракции (см. ниже), упаривали досуха и ацетилировали действием 100 мкл смеси (50:50) пиридина и уксусного ангидрида 2 ч при 80°C . Реакционные смеси упаривали, и фракции I и II снова растворяли в 60 мкл метанола, содержащего 50 нг/мкл ацетата дегидропрегненолона, добавляли 40 мкл воды, переносили в виалу и вводили 90 мкл в жидкостный хроматограф. Собирали фракцию, соответствующую ацетату тестостерона, в условиях 1 при длине волны 240 нм и фракцию, содержащую ацетаты 5α - и 5β -андростандиолов, в условиях 2 при длине волны 197 нм. Для контроля временных интервалов сбора фракций с каждой серией проб в жидкостный хроматограф вводили тестовые смеси, содержащие стероиды в нативном виде, либо в виде ацетатов.

Фракции I и II упаривали досуха, после чего к фракциям I–V добавляли раствор пентакозана в гептане (100 нг/мкл) в количестве,

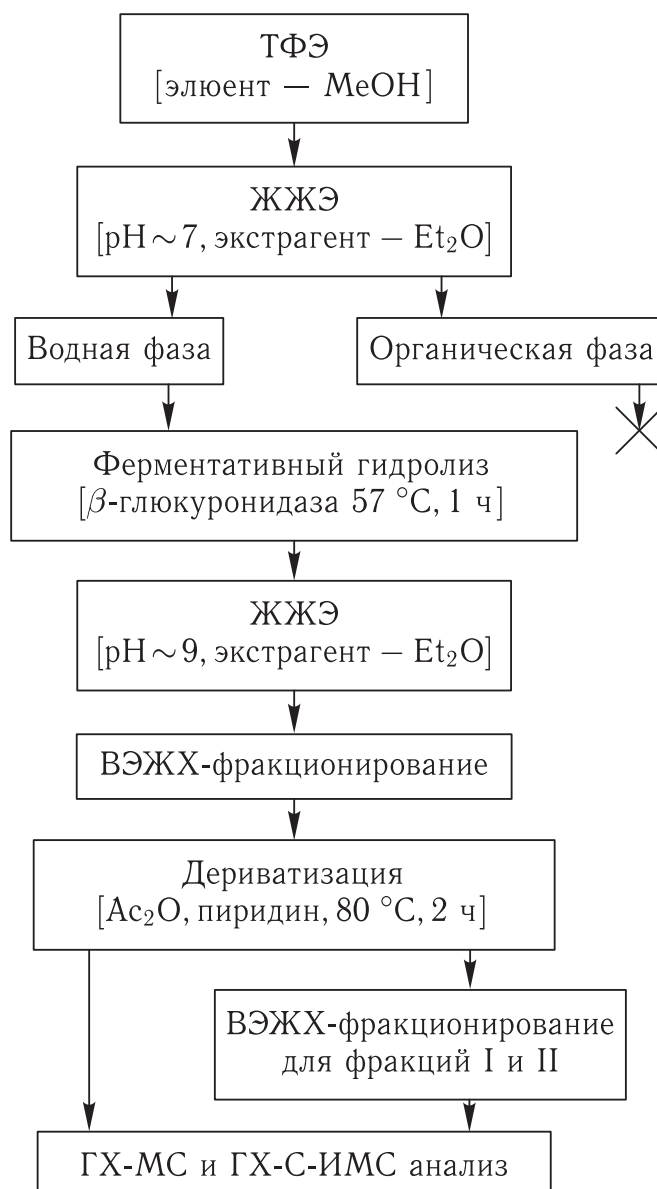


Рис. 6.4. Блок-схема пробоподготовки

равном 1/10 от конечного объема фракции, и 9/10 объема чистого гептана. Полученные образцы I–V анализировали методами ГХ-МС и ГХ-С-ИМС. На рис. 6.4 приведена блок-схема пробоподготовки.

Результаты и их обсуждение

Основной проблемой определения изотопного состава эндогенных стероидов в моче является сложность этой матрицы и существенная разница в концентрации целевых соединений — от десятков наногرامмов (тестостерон) до десяти и более микрограммов (андростерон, этиохоланолон). Более того, линейный диапазон изотопного масс-спектрометра в проточном режиме (continuous flow) ограничен, и для достижения правильных результатов необходимо, чтобы аналитический сигнал находился в довольно узких пределах, которые соответствуют

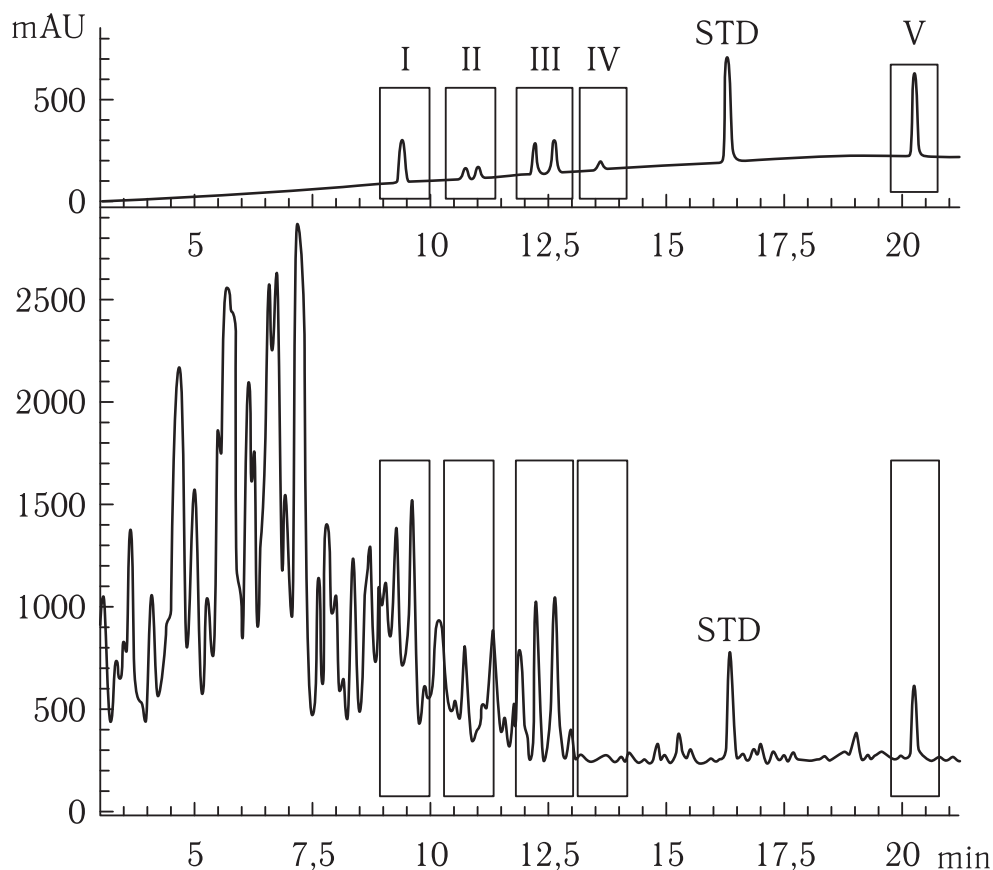


Рис. 6.5. Хроматограммы, соответствующие ВЭЖХ-разделению тестовой смеси стероидов (сверху) и реального объекта (снизу). Выделенные зоны отвечают временным интервалам сбора фракций: I — тестостерон, II — $5\alpha/5\beta$ -андростандиолы, III — А/Э, IV — ПД, V — 16ен, STD — маркер времени (ацетат дегидропрегненолона)

30–100 нг стероида, введенного в хроматографическую колонку. Все это приводит к необходимости фракционирования пробы, что удобнее всего делать в процессе пробоподготовки с помощью ВЭЖХ. На рис. 6.5 показаны хроматограммы тестовой смеси целевых соединений, используемой для контроля временных интервалов сбора фракций, и экстракта, полученного из мочи.

Для улучшения газохроматографических свойств стероидов необходимо получение более летучих производных. Силилирование, являясь одним из самых простых и распространенных способов дериватизации, не подходит для ГХ-С-ИМС, так как при окислении силильных производных образуется диоксид кремния, отложения которого со временем приводят к нарушению функциональности окислительного реактора. Использование фторсодержащих реагентов (трифторуксусный ангидрид) вызовет отравление окислительного реактора из-за образования устойчивых фторидов меди и никеля, что приведет к невозможности его регенерации. С другой стороны, использование уксусного ангидрида в качестве дериватирующего агента не наносит вреда системе, а продукты реакции обладают хорошими хроматографическими свойствами. Изменение изотопного состава стероидов при ацетилировании вычис-

ляют на основе экспериментальных данных [17], хотя в случае неколичественной конверсии или нестабильных условий проведения реакции возможно получение невоспроизводимых результатов из-за изотопного фракционирования.

Эффект изотопного фракционирования может быть обусловлен как кинетическими, так и термодинамическими факторами. Причина возникновения этого эффекта заключается в различии энергии колебательных уровней в связях, содержащих тяжелые изотопы, в сравнении со связями, содержащими легкие изотопы [18]. В случае кинетического изотопного эффекта эта энергетическая разность приводит к различию в скорости процессов, включающих соединения разного изотопного состава (реакции дериватизации). Влияние данного эффекта особенно велико в процессах, в которых разрыв или образование связи является лимитирующей стадией. Второй тип эффекта изотопного фракционирования (термодинамический) связан с различием в таких физико-химических свойствах, как поглощение теплового излучения, молярный объем, давление пара, температура плавления и кипения. Наиболее отчетливо этот эффект проявляет себя при фазовых переходах, и поэтому в ГХ-С-ИМС ввод пробы в испаритель (инжектор) газового хроматографа должен осуществляться в режиме без деления потока, что необходимо для исключения дискриминации изотопного состава [19]. Идеальным решением является использование инжектора с непосредственным вводом пробы в колонку минуя испарение (так называемый «on-column» инжектор), однако его применение сопряжено с некоторыми техническими сложностями [20]. В данном случае, для минимизации потерь целевых соединений в испарителе нами предложено вводить пробу, в 2,5 раза увеличивая давление в нем на 1 мин после инъекции. Для ацетатов стероидов при повышении давления в испарителе площади хроматографических пиков увеличивались примерно в 2 раза, тогда как для нативных стероидов, как показали наши предварительные исследования, — почти на порядок. Учитывая низкие концентрации некоторых целевых стероидов в моче, подобные потери были недопустимы. Кроме этого, неколичественный перенос вещества в колонку ГХ может приводить к регистрации искаженных значений $\delta^{13}\text{C}$ из-за изотопного фракционирования, что также неприемлемо в области допинг-контроля.

Другим ярким примером изотопного фракционирования является хроматографическое разделение: так, в жидкостной хроматографии изотопный состав углерода вещества в начале и в конце хроматографического пика может различаться на 10‰ [21], поэтому использование ВЭЖХ при пробоподготовке для изотопной масс-спектрометрии требует строгого контроля времен удерживания и количественного сбора фракций. Важно понимать, что изотопное фракционирование сопутствует практически каждой стадии анализа, и если нельзя его полностью исключить, то нужно сделать постоянным.

Хроматографический анализ в системе ГХ-С-ИМС также имеет несколько особенностей, связанных с конструкцией интерфейса между

ГХ и изотопным масс-спектрометром. Большое количество соединений и длинных капилляров различного диаметра приводит к уширению хроматографических зон, в том числе пика CO_2 , образовавшегося после сжигания компонентов пробы. Для минимизации этого размывания нами модифицирован интерфейс системы ГХ-С-ИМС заменой металлического тройника в термостате ГХ на стеклянный коннектор («прессфит») и продеванием кварцевого капилляра, через который проба поступает в окислительный реактор, непосредственно в реактор (в оригинальной конструкции соединение реализовано через металлический коннектор). Даже после этих изменений ширина пика в ГХ-С-ИМС в среднем составляла 25–40 с в зависимости от вещества и его количества, что накладывает дополнительные требования по эффективности разделения соседних пиков. Необходимо отметить, что для получения правильных результатов по определению изотопного состава окислительный реактор должен обеспечивать 100%-ю конверсию анализируемых веществ, так как в противном случае наряду с образованием CO_2 происходит неполное сгорание до CO . Этот процесс приводит к изотопному фракционированию продуктов конверсии анализируемых соединений, поскольку вследствие кинетических изотопных эффектов CO обогащается изотопом ^{13}C и регистрируемые значения $\delta^{13}\text{C}$ оказываются смещенными в отрицательную область [21]. Перегрузка реактора большим количеством органического вещества также может привести к неполному сгоранию и искажению результатов измерения. С другой стороны, остаточные количества паров воды в потоке газа-носителя могут протонировать $^{12}\text{CO}_2$ с образованием иона $\text{H}^{12}\text{CO}_2^+$, имеющего то же отношение массы к заряду, что и $^{13}\text{CO}_2$. Это приводит к измерению значений $\delta^{13}\text{C}$, смещенных в положительную область.

Соединение масс-спектрометра и интерфейса сжигания реализовано как открытый делитель потока, поэтому почти 80% пробы, введенной в хроматограф, теряется. Это приводит к необходимости вводить в ГХ-С-ИМС больший объем пробы по сравнению с ГХ-МС, что в ряде случаев вызывает перегрузку хроматографической колонки. Этого можно было бы избежать при использовании колонки с большим внутренним диаметром (0,32 мм), либо увеличив толщину пленки неподвижной фазы, однако в первом случае это может повлечь за собой снижение эффективности разделения близких по химической структуре исследуемых соединений (5 α - и 5 β -андростандиолы, андростерон и этиохоланолон), а во втором — привести к значительному увеличению продолжительности анализа. В связи с этим было решено, что использование капиллярной колонки 30 м $\times$ 0,25 мм $\times$ 0,25 мкм является разумным компромиссом для решения поставленной задачи.

Мы определили изотопный состав вышеуказанных стероидов методом ГХ-С-ИМС более чем в 100 пробах мочи спортсменов и добровольцев. Это было необходимо, чтобы сформулировать статистически обоснованные критерии оценки результатов анализа, т. е. определить референтные интервалы.

При разработке методики нам пришлось столкнуться с необходимостью получения значений $\delta^{13}\text{C}$ для стероидов, находящихся в моче как в незначительных, так и в очень больших количествах. Для получения корректных результатов необходимо заранее оценить концентрации целевых стероидов в исследуемом образце мочи, чтобы аналитический сигнал на изотопном масс-спектрометре находился в пределах его линейного диапазона. Концентрации стероидов мы определяли предварительным анализом пробы по существующей методике допинг-контроля [22], после чего рассчитывали, в каком объеме надо растворить ту или иную фракцию до содержания 20–50 нг/мкл стероида в конечном экстракте. Если рассчитанный объем фракции составлял менее 50 мкл, то сухой остаток перерастворяли в 50 мкл гептана, после чего упаривали в токе азота до заданного объема. Благодаря использованию узких стеклянных микровставок в вials минимальный объем фракции в нашей работе составлял всего 10 мкл.

В качестве внутреннего стандарта использовали два соединения: пентакозан и андростанол. Андростанол добавляли перед ацетилированием во фракции III, IV и V для контроля изотопного фракционирования при дериватизации. В случае фракций I и II, которые подвергали повторному разделению методом ВЭЖХ, андростанол не добавляли, так как это привело бы к необходимости собирать дополнительную фракцию.

Среднее значение $\delta^{13}\text{C}$ пентакозана ($-30,0 \pm 0,8\text{‰}$), определенное по более чем 300 анализам, служило показателем состояния окислительного реактора и системы в целом.

В табл. 6.1 приведены времена удерживания исследованных соединений в системе ГХ-С-ИМС. На рис. 6.6 в качестве примера показаны хроматограммы тестовой смеси стероидов и отдельных фракций мочи, из которых видно, что использование полупрепаративной ВЭЖХ обеспечивает селективное выделение исследуемых стероидов и сводит к минимуму влияние мешающих компонентов матрицы.

Таблица 6.1

Времена удерживания исследуемых соединений (стероиды в виде ацетатов, ВС — внутренний стандарт)

Соединение	$t_{\text{уд}}, \text{с}$	Соединение	$t_{\text{уд}}, \text{с}$
Пентакозан (ВС)	548,0	5 β -Андростандиол	970,8
Андростенол	606,1	5 α -Андростандиол	995,5
5 α -Андростан-3 β -ол (ВС)	657,7	Тестостерон	1127,1
Этиохоланолон	893,5	Прегнандиол	1223,9
Андростерон	910,4		

Поскольку данная методика подразумевает длительный и трудоемкий процесс пробоподготовки (подготовка серии из 6 проб занимает почти 3 дня), а также принимая во внимание сложность ГХ-С-ИМС

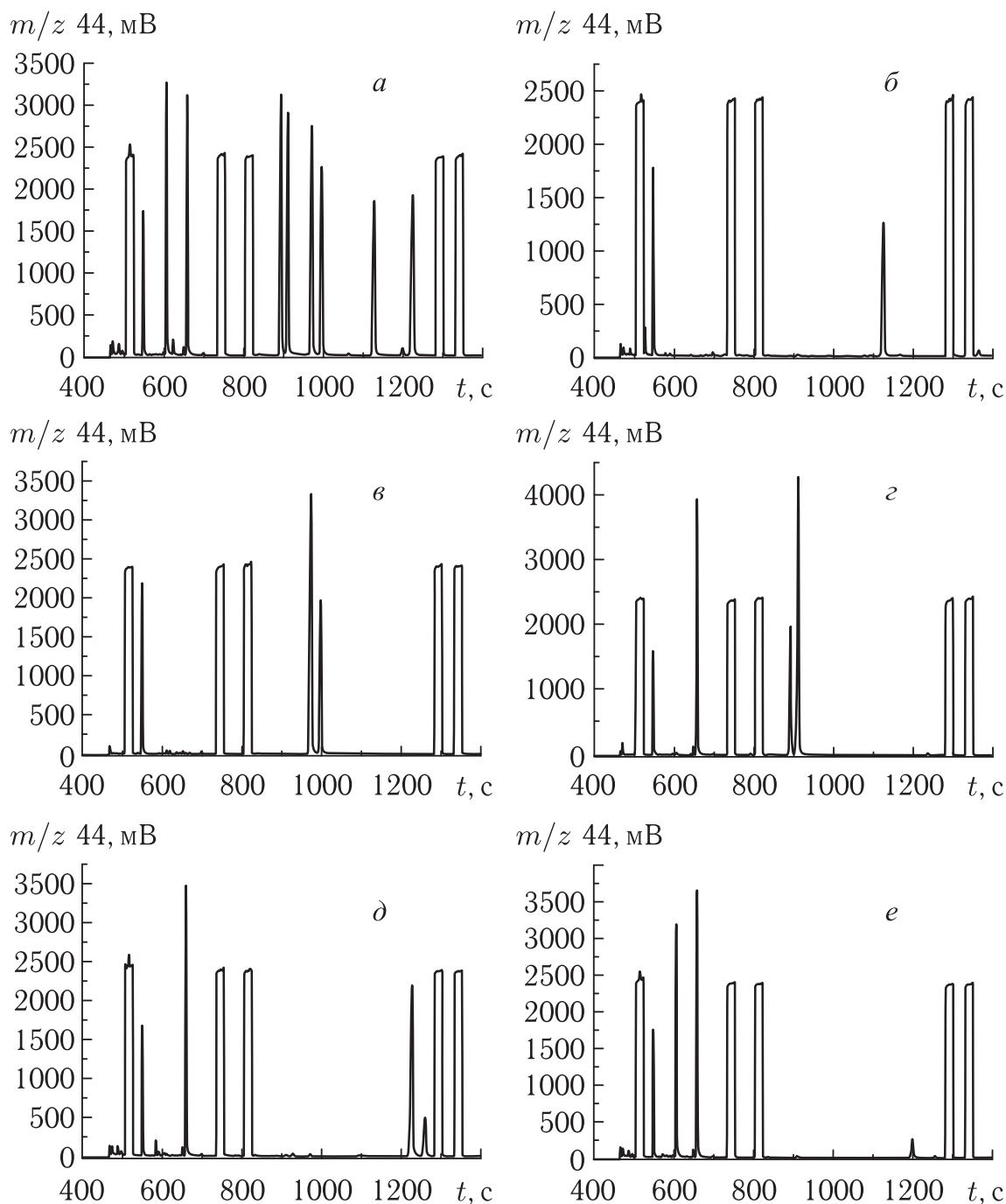


Рис. 6.6. Хроматограммы тестовой смеси стероидов и отдельных фракций образца мочи. Пики прямоугольной формы представляют собой импульсы CO_2 с известным изотопным составом: *a* — тестовая смесь стероидов, используемая для проверки состояния системы и идентификации компонентов (названия и времена удерживания в табл. 6.1), *б* — фракция I (тестостерон), *б* — фракция II (андростандиолы), *г* — фракция III (андростерон, этиохоланолон), *д* — фракция IV (прегнандиол), *е* — фракция V (андростенол)

системы, каждая анализируемая проба (серия проб) должна сопровождаться двумя пробами контроля качества: заведомо положительной и заведомо отрицательной. Заведомо положительная проба была получена от добровольца, принявшего 2 капсулы лекарственного препарата «Анриол» (80 мг ундеканата тестостерона), а заведомо

Таблица 6.2

Значения $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ целевых стероидов в заведомо положительной и заведомо отрицательной пробах мочи ($n = 20$)

Соединение	Положительная проба		Отрицательная проба	
	Среднее, ‰	СКО	Среднее, ‰	СКО
Тестостерон	–28,2	0,8	–22,6	0,8
5 α -Андростандиол	–29,4	0,7	–22,1	0,8
5 β -Андростандиол	–27,4	0,5	–21,9	0,4
Андростерон	–27,5	0,5	–22,8	0,5
Этиохоланолон	–27,3	0,4	–22,9	0,4
Прегнандиол	–22,2	0,5	–22,4	0,6
Андростенон	–22,5	0,4	–21,6	0,6

отрицательная — от добровольца, не принимавшего стероидных препаратов. Оба добровольца собирали мочу в течение 2 суток, после чего мочу стабилизировали азидом натрия (1 г/л), профильтровали, разлили по флаконам по 10 мл и заморозили, предварительно определив концентрации целевых стероидов. Затем каждую из этих проб несколько раз анализировали методом ГХ-С-ИМС для получения информации о значениях $\delta^{13}\text{C}$ целевых стероидов и промежуточной прецизионности метода и было установлено, что среднеквадратичное отклонение (СКО) в условиях воспроизводимости составляет 0,4–0,8 ‰ в зависимости от соединения. В табл. 6.2 приведены данные по изотопному составу заведомо положительной и заведомо отрицательной проб, полученные в ходе аттестации методики.

На основании статистической обработки данных были получены значения $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ стероидов (табл. 6.3). Выполнение нормального закона распределения проверяли визуально построением графиков «квантиль–квантиль» с использованием ПО для статистической обработки данных SPSS версии 17. На рис. 6.7 представлены гистограммы для

Таблица 6.3

Значения $\delta^{13}\text{C}$ целевых стероидов, установленные в работе

Соединение	Среднее, ‰	Интервал, ‰	СКО	Число измерений
Тестостерон	–23,4	–(21,2–25,5)	0,93	83
5 α -Андростандиол	–23,8	–(20,8–25,7)	0,91	105
5 β -Андростандиол	–22,0	–(19,5–25,2)	0,94	127
Андростерон	–22,9	–(20,7–24,9)	0,78	131
Этиохоланолон	–22,8	–(20,8–24,6)	0,71	128
Прегнандиол	–21,9	–(19,9–24,1)	0,73	131
Андростенон	–22,6	–(21,2–24,1)	0,65	130

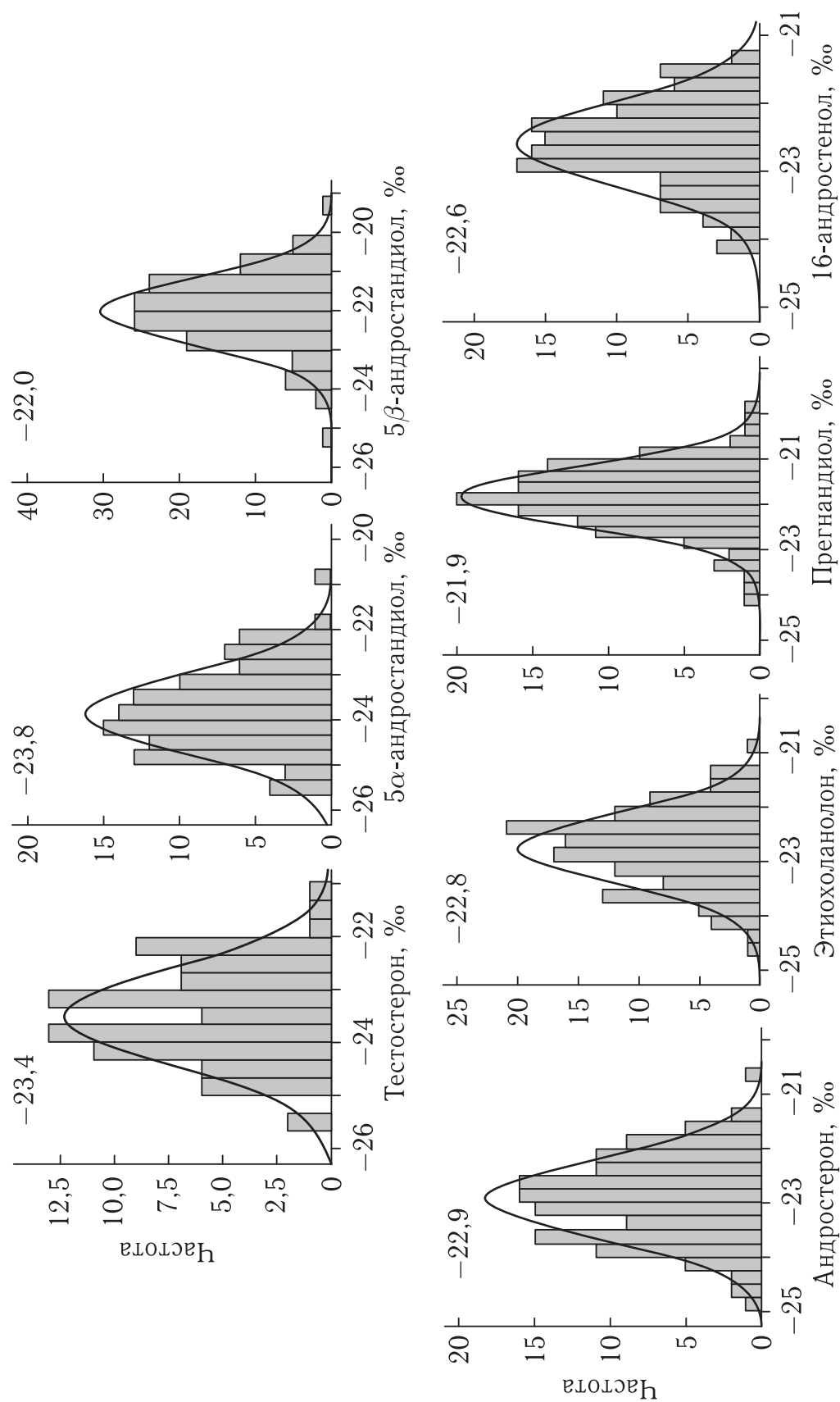


Рис. 6.7. Графики плотности распределения вероятности значений $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ целевых стероидов

каждого стероида, характеризующие плотность распределения вероятности соответствующих значений $\delta^{13}\text{C}$.

В табл. 6.4 приведены референтные интервалы, рассчитанные для двух эндогенных маркеров (прегнандиол, андростенон) и пяти целевых стероидов (тестостерон, 5α -андростандиол, 5β -андростандиол, андростерон, этиохоланолон). Референтные интервалы, как было сказано выше, представляют собой усредненную по всем проанализированным в лаборатории пробам разницу «стероид — эндогенный маркер». Путем прибавления утроенного стандартного отклонения к этому значению, что соответствует доверительной вероятности 99,7%, мы получили критическое значение для каждой пары стероидов (при расчете использовали две значащих цифры после запятой, округляя только результат). Аналогично построением графиков «квантиль–квантиль» нами показано, что значения $\Delta\delta$ распределены в соответствии с нормальным законом.

Таблица 6.4

Референтные интервалы для исследованных стероидов

Пара	Разность в паре $\Delta\delta$, среднее $\pm$ СКО, ‰	Критическое значение, ‰
ПД–Т	$1,5 \pm 1,1$	4,8
ПД– 5α	$1,9 \pm 1,1$	5,1
ПД– 5β	$0,1 \pm 0,6$	2,0
ПД–А	$1,1 \pm 0,8$	3,4
ПД–Э	$0,9 \pm 0,6$	2,5
16ен–Т	$0,9 \pm 0,8$	3,3
16ен– 5α	$1,2 \pm 0,8$	3,8
16ен– 5β	$-0,6 \pm 1,0$	2,3
16ен–А	$0,4 \pm 0,6$	2,0
16ен–Э	$0,2 \pm 0,7$	2,3

Таким образом, наши результаты подтверждают, что при интерпретации получаемых результатов целесообразно руководствоваться не единым порогом в 3‰, установленным ВАДА, а внутрилабораторными критериями, поскольку, например, для тестостерона и 5α -андростандиола это значение составляет 4,8 и 5,1‰ соответственно (относительно прегнандиола). Если же установленное в лаборатории значение оказывается менее 3‰, то следует использовать порог в 3‰, чтобы не входить в противоречие с техническим документом ВАДА.

Литература

1. *Sutras P., Saudan C., Schweizer C., Baume N., Mangin P., Saugy M.* // Forensic Sci. Int. — 2008. — V. 174, No. 2. — P. 166.

2. Meldensohn D., Immelman A.R., Vogel J.C., von la Chevallier G. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. — 1986. — V. 13, No. 1. — P. 21.
3. von Kuk C., Flenker U., Guntner U., Hulsemann F., Schanzer W. // Proceedings of Cologne Workshop on Dope Analysis. Cologne, 2005. — P. 219.
4. Flenker U., von Kuk C., Guntner U., Hulsemann F., Gougoulidis V., Schanzer W. // Proceedings of Cologne Workshop on Dope Analysis. Cologne, 2005. — P. 227.
5. von Kuk C., Flenker U., Guntner U., Hulsemann F., Schanzer W. // Recent advances in doping analysis. — 2005. — V. 13. — P. 219–225.
6. Flenker U., von Kuk C., Guntner U., Hulsemann F., Gougoulidis V., Schanzer W. // Recent advances in doping analysis. — 2005. — V. 13. — P. 227–233.
7. WADA Laboratory Committee. Montreal, 2004. WADA Document TD2004EAAS (http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/end_steroids_aug_04.pdf).
8. Aguilera R., Catlin D.H., Becchi M., Phillips A., Wang C., Swerdloff R.S., Pope H.G., Hatton C.K. // J. Chromatogr. B. — 1999. — V. 727, No. 1. — P. 95.
9. Aguilera R., Catlin D.H., Chapman T.H. // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 2000. — V. 14, No. 23. — P. 2294.
10. Aguilera R., Catlin D.H., Chapman T.H., Hatton C.K., Starcevic B. // Clin. Chem. — 2001. — V. 47, No. 2. — P. 292.
11. Saudan C., Emery C., Marclay F., Strahm E., Mangin P., Saugy M. // J. Chromatogr. B. — 2009. — V. 877, No. 23. — P. 2321.
12. Piper T., Mareck U., Geyer H., Flenker U., Thevis M., Platen P., Schanzer W. // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 2008. — V. 22, No. 14. — P. 2161.
13. Becchi M., Aguilera R., Farizon Y., Flament M., Casabianca H., James P. GC-C-IRMS analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 1994. — V. 8. — P. 304–308.
14. Ferry M., Mathurin J.-C., Becchi M., de Ceaurriz J. Influence of pregnenolone administration on IRMS analysis // Recent advances in doping analysis. — 2000. — V. 8. — P. 209–213.
15. Saudan C., Baume N., Mangin P. Urinary analysis of 16(5 α)-androst-3 α -ol by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: implications in anti-doping analysis // J. Chromatogr. B. — 2004. — V. 810. — P. 157–164.
16. Trout G.J., Rogerson J.H., Cawley A.T., Alma C.W. Developments in sports drug testing // Aust. J. Chem. — 2003. — V. 56. — P. 175–180.
17. de Groot P.A. Handbook of stable isotope analytical techniques. — Bristol: Elsevier, 2004. — P. 857.
18. Meier-Augenstein W. Applied GC-C-IRMS // J. Chromatogr. A. — 1999. — V. 842. — P. 351–371.
19. Thermo Finnigan. GC Combustion Interface Operating Manual. — 2002. — P. 71.
20. Высокоэффективная газовая хроматография / Под ред. К. Хайвера. — М.: Мир. — 1993. — 288 с.
21. Horning S., Nolteernsting E., Geyer H., Flenker U., Schanzer W. // Recent advances in doping analysis. — 1999. — V. 6. — P. 243–256.
22. Mareck U., Geyer H., Opfermann G., Thevis M., Schänzer W. // J. Mass Spectrom. — 2008. — V. 43, No. 7. — P. 877.

Глава 7

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ В ИЗОТОПНОЙ ГЕОХИМИИ БЛАГОРОДНЫХ ГАЗОВ

А. И. Буйкин

Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского РАН,
Москва

Введение

Изучение распространенности благородных газов и их изотопов в различных природных объектах имеет большое значение как инструмент для познания закономерностей эволюции вещества, начиная от самых ранних этапов формирования Солнечной системы и заканчивая современными процессами, происходящими в земных недрах, знание о которых иначе недоступно. Например, присутствие солнечных гелия и неона в мантии Земли показывает, что наша планета захватила солнечные газы в процессе аккреции либо прямо из солнечной небулы, либо в результате имплантации солнечного ветра. Избытки радиогенных нуклидов (^{40}Ar , образованный из ^{40}K , ^4He и ^{21}Ne из U и Th , ^{129}Xe из короткоживущего ^{129}I и ксенона спонтанного деления ^{238}U и короткоживущего ^{244}Pu) указывают на масштабную дегазацию мантии, имевшую место на ранних этапах развития Земли. Изотопы благородных газов несут важную информацию о ранней эволюции земной атмосферы. Наконец, различия в изотопном составе благородных газов мантии-источника MORB (базальты срединно-океанических хребтов) и источника мантийных плюмов тесно связаны со структурой и эволюцией мантии Земли. Это вносит свой вклад в обсуждение проблемы происхождения мантийных плюмов — связаны ли они с менее деплетированными и менее дегазированными (по сравнению с верхней мантией) глубинными резервуарами и требует ли их существование рассмотрения моделей послойной мантийной конвекции или же допускает полную конвекцию мантии. Ответ на эти важные вопросы во многом зависит от правильной оценки изотопного состава благородных газов мантии Земли: как состава первичных изотопов, так и величины избытка радиогенных нуклидов редких газов, образовавшихся из разных (по времени жизни) материнских ядер.

Радиогенные изотопы благородных газов — источник информации о разнообразных физико-химических, геохимических, геологических

явлениях, протекающих в литосфере, гидросфере и атмосфере Земли. Знание концентрации радиогенных благородных газов и их материнских элементов в соответствующих объектах позволяет определить возраст минералов и пород, природных вод и атмосферы, оценить время и температуру вторичных геологических явлений.

Широта спектра применения изотопов благородных газов определила интенсивное развитие экспериментальной техники для изучения элементных и изотопных соотношений благородных газов в породах и минералах. Чувствительность масс-спектрометрической методики анализа микроколичеств благородных газов увеличилась за последние 50 лет на несколько порядков. Соответственно, стало возможным проводить все более тонкие исследования с применением различных методик.

В настоящей работе мы предлагаем рассмотреть одну из важных составляющих экспериментального исследования, а именно методы выделения благородных газов из пород и минералов.

Ступенчатый отжиг

На протяжении нескольких десятилетий изучения изотопного состава благородных газов в различных объектах самым широко применяемым является метод ступенчатого отжига. Техника ступенчатого отжига заключается в том, что образец нагревают постепенно, выдерживая на каждой температурной ступени в течение определенного времени (обычно от 10 до 60 мин). Это позволяет частично или полностью разделить компоненты газов, характеризующиеся разными энергиями активации и/или находящиеся в разных минеральных фазах. Перед началом процедуры ступенчатого отжига взвешенные и запакованные в Al- или Ni-фольгу пробы помещают в стеклянную гребенку вместе с магнитными толкателями и вакуумируют. Для удаления адсорбированных атмосферных газов пробы прогревают и откачивают при температуре 150°C до достижения высокого вакуума (около $n \cdot 10^{-8}$ мбар); длительность прогрева определяется степенью выветривания образца и количеством вторичных минералов. Перед проведением анализа печь тренируют при максимальной температуре для уменьшения газовыделения тигля. Контроль проводится путем выполнения холостого опыта с навеской фольги (бланк). Обычно выполняется серия холостых опытов при разных температурах для построения кривой зависимости количества выделяемого газа от температуры и дальнейшего учета бланка при анализе.

Когда количество газа в бланке уменьшается до приемлемых значений, можно приступать к анализу образцов. Образец сбрасывают в холодный тигель для предотвращения «вскипания», затем закрывают откачку тигля и поднимают температуру. Газы, выделенные при нагреве пробы, попадают в систему очистки (рис. 7.1), которая состоит из двух расположенных последовательно ступеней. Каждая ступень содержит



Рис. 7.1. Система выделения и очистки благородных газов. На заднем плане видна индукционная печь (см. также рисунки 7.2 и 7.3)

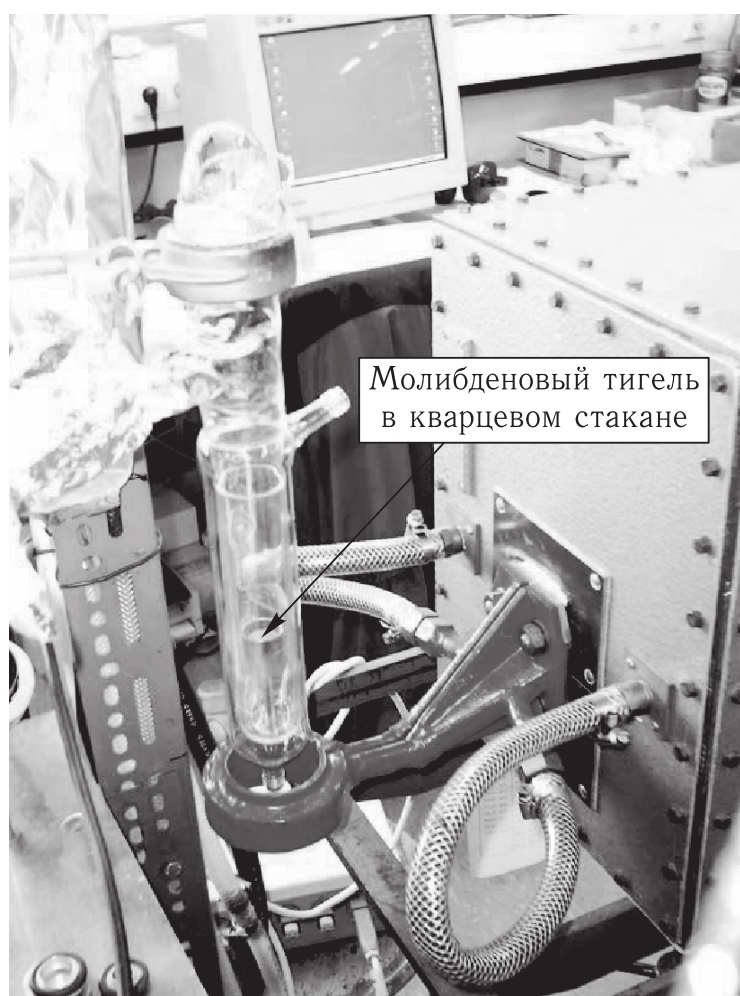


Рис. 7.2. Индукционная печь до нагрева. Молибденовый тигель вставлен в кварцевый стакан, который, в свою очередь, впаян в стеклянную колбу с контуром водяного охлаждения

«палец» с активированным углем для сбора сорбируемых газов и корпус с Ti- и Zr-Al-геттерами (рис. 7.1) для очистки газов от химически-активных примесей (CO_2 , H_2O , N_2 и др.). После очистки и разделения выделившиеся газы напускают в масс-спектрометр. Процедура очистки и разделения газов повторяется для следующей температурной ступени. Снижение температуры печи между ступенями обычно не производится, если используется печь сопротивления. При использовании печи индукции (рисунки 7.2 и 7.3), в которой фон холостого опыта при котором определяется количество накапливаемого в печи газа без нагрева образца, значительно выше, уменьшают время нахождения образца при заданной температуре (до 10–15 мин), а также отключают нагрев тигля между ступенями.

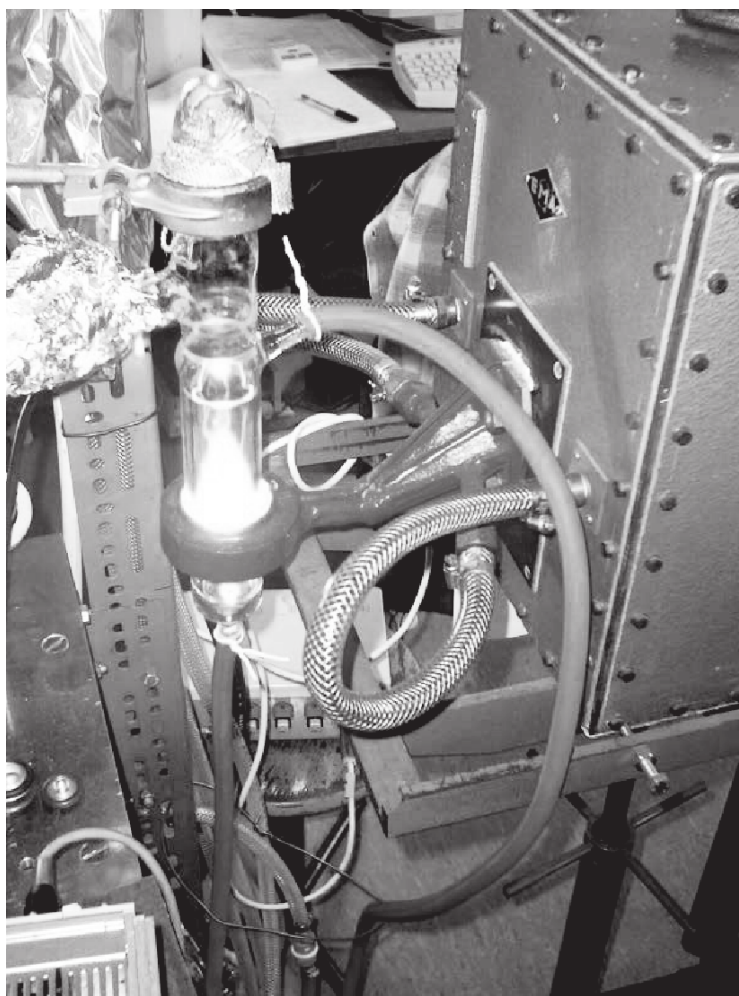


Рис. 7.3. Тренировка печи индукции при высокой температуре ($\sim 1700^\circ\text{C}$) после загрузки образцов в вакуумную линию, прогрева и откачки системы

Часто в земных образцах (и почти всегда в космических) общее содержание благородного газа представляет собой сумму компонентов различного происхождения, занимающих в веществе образца физически различные позиции. В общем случае эти компоненты характеризуются различными кривыми выделения газа, т.е. газы, собранные на различных температурных ступенях, будут иметь различные соотноше-

ния компонентов. Именно частичное разделение является большим преимуществом ступенчатого отжига: он позволяет оценить содержания и составы этих компонентов или, как минимум, продемонстрировать само их существование [1, 2].

Выделение газов с помощью нагрева лазерным пучком

Часто в минералах присутствуют минеральные и/или расплавные включения, которые могут (иногда существенно) искажать полученную изотопно-геохимическую или геохронологическую информацию по минералу-хозяину. Такие включения могут оказаться механически не отделимыми от минерала. В таких случаях может быть применена методика с использованием лазера. Впервые лазерный метод выделения газов из твердых тел был применен Мегрю (Megrue) [3] для изучения распространенности гелия, неона и аргона в лунных породах из Моря Спокойствия. С тех пор этот метод стал широко применяться для датирования лунных и метеоритных брекчий, содержащих ряд фрагментов различного возраста. Суть метода заключается в том, что плавление вещества происходит в очень маленьком объеме за счет воздействия на него лазерного луча (рис. 7.4). Последний фокусируется на поверхность

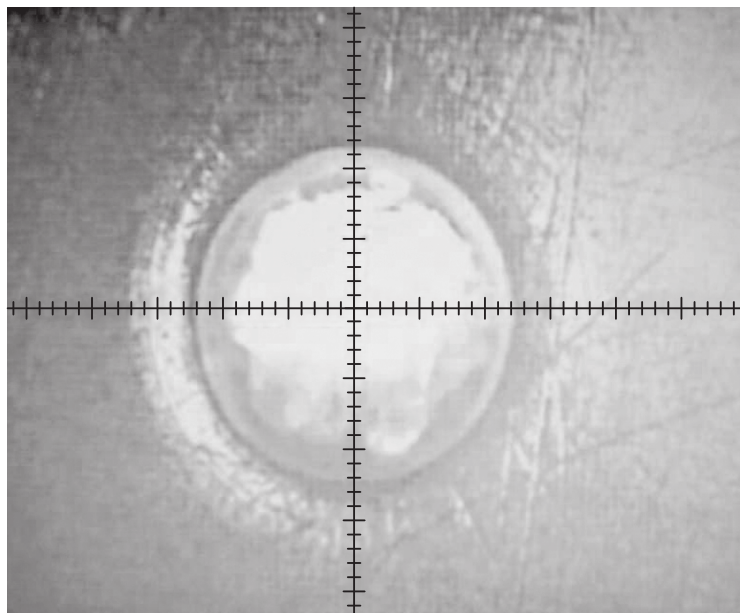


Рис. 7.4. Лунка в никелевом держателе с образцом, плавящимся под действием лазерного луча

образца, помещенного на предметный столик (если исследуется плоскополированный шлиф) или насыпанного в лунку в вакуумной камере. В зависимости от типа лазера можно сжигать сразу всю пробу (обычно весом от долей мг до нескольких мг), либо проводить анализ в точке, строя профили вдоль зерен и исследуя, таким образом, изменения изо-

топного состава или возраста от центра к краям минеральных зерен. Выделившийся газ, как и в случае ступенчатого отжига, очищают и напускают в камеру масс-спектрометра.

Выделение газов из небольших объемов твердых тел с помощью лазеров имеет ряд преимуществ по сравнению с обычными методиками: 1) уменьшается количество газа в холостом опыте (бланке), что позволяет существенно уменьшить навеску образца, что становится очень важным особенно при исследовании таких редких образцов, как метеориты, алмазы, цирконы; 2) можно эффективно исследовать породы, содержащие минералы разного возраста и/или генезиса, например полимиктные брекчии, без механического разделения минералов, которое иногда оказывается очень трудным или даже невозможным 3) можно также проводить изучение вариаций изотопного состава или возраста от краев к центру отдельных кристаллов и изучать таким образом термальную историю образца.

Основным фактором, ограничивающим использование лазера, является количество выделяемого газа. К ограничениям лазерного метода можно также отнести возможность того, что лазерный луч может вызвать выделение газов из других минералов, если пятно от луча захватывает их. Эксперименты, однако, показали, что лишь менее 1% газа выделяется из области, находящейся на расстоянии более 10 мкм от границы пятна [4]. Еще одним ограничением лазерного метода является то, что полученные с его помощью данные соответствуют данным метода «полного выделения», использование которых, например, в К–Аг-датировании приводит к занижению возраста образцов, терявших аргон после кристаллизации, или, наоборот, к завышению возраста, если образцом при образовании был захвачен избыточный аргон [5].

Метод послойного окисления

Этот метод может применяться для экстракции благородных газов из алмазов [6]. Суть его состоит в сжигании алмазов в среде кислорода. Система окисления состоит из реактора, в который через шлюзовое устройство сбрасываются исследуемые образцы; второго реактора — с окисью меди, и двух вакуумметров. Реакторы изготавливаются из сплава на основе никеля. В реакторе с образцом температура может подниматься до 1200 °С. Нагрев реактора с окисью меди до 870 °С обеспечивает давление кислорода в системе окисления на уровне 15 торр. Необходимый температурный режим в объеме SiO и в объеме окисления обеспечивается системой автоматического контроля и стабилизации температур. Контроль процесса окисления-восстановления меди и определение количества образованного при горении алмаза CO₂ осуществляется с помощью соединенных с объемом окисления вакуумметров.

Одним из преимуществ этого метода является возможность реализовать комбинированную схему выделения благородных газов из алмазов. Сначала можно нагреть образцы до 1200°C без кислорода и тем самым избавиться от атмосферных сорбированных газов и газов из примесных минеральных фаз. Затем провести окисление алмаза, при этом возможно послойное окисление алмазов, так как реакция окисления алмаза зависит от температуры и давления образующегося CO_2 . Использование метода послойного окисления алмазов перспективно для изучения зональной неоднородности изотопного состава благородных газов в радиальном направлении кристаллов алмаза.

Ступенчатое дробление

В последние годы все больший интерес представляет изучение флюидных включений, в частности в мантийных минералах. Для того чтобы отделить мантийный флюидный компонент благородных газов от радиогенного или возможного космогенного компонентов (например, ^3He , образующийся на ядрах лития под действием космических лучей),

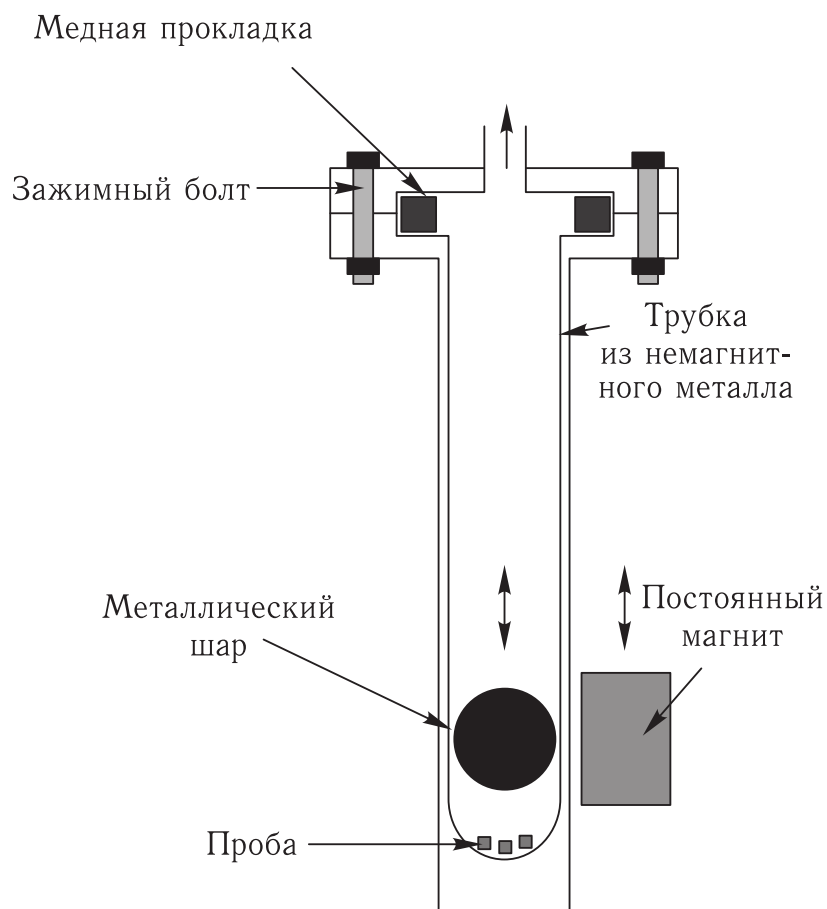


Рис. 7.5. Схематическое изображение вакуумируемой немагнитной трубки из нержавеющей стали и процесса дробления. Внутри насыпан образец (до 3 г в одну трубку), сверху которого положен металлический шарик, приводимый в действие с помощью постоянного магнита

расположенных в кристаллической решетке, газ выделяется методом ступенчатого дробления [7, 8]. Для этого подготовленные образцы помещают в металлические (немагнитные) цилиндры (рис. 7.5), которые затем подсоединяются к высоковакуумной системе выделения и очистки. Всю эту систему подвергают предварительному отжигу при 150°C и откачке до высокого вакуума ($n \cdot 10^{-8}$ мбар) в течение 48–72 ч для удаления поверхностно-адсорбированных атмосферных газов. Выделение газа проводится путем механического дробления образцов металлическими шарами, находящимися внутри цилиндров. Шары приводятся в движение вручную с помощью постоянного магнита (в некоторых лабораториях этот процесс автоматизирован с помощью электромагнитов). С каждой ступенью (фракцией) дробления количество ударов увеличивается; соответственно увеличивается и степень измельчения образца. Таким образом, по мере дробления газ извлекается из все более мелких пузырьков. Выделенный из образца газ, как и при ступенчатом отжиге, собирают, очищают от химически активных газов и анализируют.

Метод ступенчатого дробления как способ выделения благородных газов из газовой-жидких включений в минералах, на наш взгляд, более перспективен, чем существующие попытки вскрытия включений с помощью лазера. С одной стороны, последний имеет преимущество, так как позволяет вскрывать одиночные включения на выбор, с другой стороны, возникает проблема нехватки количества выделяемого газа и/или захвата материала матрицы.

Заключение

В настоящей статье кратко описаны методы выделения благородных газов из пород и минералов. В заключение следует отметить, что для каждого конкретного объекта и задачи исследования необходимо подбирать индивидуальную схему выделения благородных газов — как метод выделения, так и число и шаги температурных ступеней или ступеней дробления. В некоторых случаях разумно комбинировать разные методы выделения, например метод ступенчатого дробления и ступенчатого отжига, что позволит получать более полную картину эволюции объекта [9].

Литература

1. Шуколюков Ю. А., Левский Л. К. Геохимия и космохимия изотопов благородных газов. — М.: Атомиздат, 1972. — 336 с.
2. Озима М., Подосек Ф. Геохимия благородных газов. — Л.: Недра, 1987. — 343 с.
3. Megrue G. H. // J. Geophys. Res. — 1971. — V. 76. — P. 4956–4968.

4. *Schaeffer O. A.* // In: L. A. Currie, ed., Nuclear and chemical dating techniques, 139–148. Amer. Chem. Soc. 1982. Symp. Ser. 176. 516 p.
5. *Dalrymple G. B., Lanphere M. A.* // Earth Planet. Sci. Lett. — 1971. — V. 12, No. 3. — P. 300–308.
6. *Плешаков А. М.* Дис. ... канд. хим. наук. — М.: Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского, 1998. — 184 с.
7. *Hopp J., Trierloff M. and Altherr R.* // Earth Planet. Sci. Lett. — 2004. — V. 219. — P. 61–76.
8. *Buikin A. I., Trierloff M., Hopp J., Althaus T., Korochantseva E. V., Schwarz W. H. and Altherr R.* // Earth Planet. Sci. Lett. — 2005. — V. 230. — P. 143–162.
9. *Trierloff M., Weber H. W., Kurat G., Jessberger E. K., and Janicke J.* // Geochim. Cosmochim. Acta. — 1997. — V. 61. — P. 5065–5088.

Глава 8

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ОТНОШЕНИЙ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ

В. С. Севастьянов

Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского РАН,
Москва

Исследования, рассматривающие глобальное изменение климата, нуждаются в чрезвычайно точных измерениях содержания и изотопного состава парниковых газов (преимущественно CO_2 и CH_4), чтобы разработать улучшенные модели углеродного цикла. Известно, что использование ископаемого топлива приводит к увеличению концентрации углекислого газа в атмосфере на $3 \cdot 10^{-4}$ об. % в год, и это ведет к глобальному изменению климата Земли. Земные экосистемы действуют как естественные источники, так и стоки для атмосферного углерода, но механизмы этого процесса пока изучены недостаточно. Несмотря на то что масс-спектрометрия изотопных отношений (IRMS) является хорошо развитым изотопным методом, для определения изотопного состава парниковых газов в атмосфере более предпочтительным является применение абсорбционной инфракрасной спектроскопии, которая за последнее время достигла больших успехов.

В инфракрасных спектрах, связанных с колебательно-вращательным движением молекул, наблюдаются линии поглощения молекул с различным изотопным составом. По этим линиям можно определить концентрацию изотопологов, например $^{12}\text{CO}_2$ и $^{13}\text{CO}_2$, и рассчитать изотопные отношения легких элементов в соединении.

Для воды изотопные отношения можно рассчитать по следующим формулам:

$$R^{18\text{O}} = \frac{[\text{H}_2^{18}\text{O}]}{[\text{H}_2^{16}\text{O}]}, \quad RD = \frac{[\text{HD}^{16}\text{O}]}{[\text{H}_2^{16}\text{O}]},$$

где $[\text{H}_2^{18}\text{O}]$, $[\text{H}_2^{16}\text{O}]$, $[\text{HD}^{16}\text{O}]$, $[\text{H}_2^{16}\text{O}]$ — концентрации соответствующих изотопологов. Изотопный состав элемента в соединении выражается по формуле

$$\delta = \left(\frac{R}{R_{\text{станд}}} - 1 \right) \cdot 1000,$$

Таблица 8.1

Полупроводниковые диодные лазеры

Полупроводник	Химическое соединение	Длина волны, мкм
Лазеры с электронным возбуждением		
Сульфид цинка	ZnS	0,33
Селенид галлия	GaSe	0,6
Арсенид галлия	GaAs	0,85
Сульфид свинца	PbS	4,3
Антимонид индия	InSb	5,3
Селенид свинца	PbSe	8,5
Инжекционные лазеры		
Арсенид галлия	GaAs	0,85
Арсенид индия	InAs	3,2
Теллурид свинца	PbTe	6,5
Селенид свинца	PbSe	8,5
Лазеры с оптическим возбуждением		
Сульфид кадмия	CdS	0,5
Арсенид индия	InAs	3,2
Антимонид индия	InSb	5,3
Теллурид свинца	(Pb + Sn)Te	6,5–16,5

где δ приводится в тысячных долях (‰). Международным стандартом является вода Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) с изотопным составом $\delta^{18}\text{O} = \delta\text{D} = 0\text{‰}$.

Впервые инфракрасная спектроскопия была применена для измерения содержания дейтерия в воде в 1950 г. [1]. В 1951 г. был создан бездисперсионный инфракрасный спектрометр с фотоакустическим детектором для определения изотопного состава углерода в CO_2 [2]. До сих пор точность определения изотопного состава легких элементов уступала точности метода IRMS. Однако оптические изотопные анализаторы значительно компактней, дешевле и легче в управлении. Для инфракрасной спектроскопии изотопных отношений не столько важна чувствительность, сколько большой линейный диапазон и высокое соотношение сигнал–шум.

Таким образом, абсорбционная спектроскопия для определения изотопного состава легких газообразующих элементов является альтернативным методом по отношению к масс-спектрометрии изотопных отношений (IRMS).

В настоящее время большое развитие получила лазерная инфракрасная спектроскопия, так как лазеры могут работать при комнатной температуре, имеют узкую ширину линии излучения 1–10 МГц. Для лазеров,

излучающих в области длин волн вблизи $\lambda = 3$ мкм, это составляет приблизительно 10^{-3} – 10^{-2} Å. Широкое применение получили диодные лазеры, имеющие небольшой размер, легко управляемые и обладающие одномодовой структурой излучения в инфракрасной области (табл. 8.1) [3], и в то же время легко перестраиваемые по частоте в достаточно широком спектральном диапазоне. Диодные лазеры могут работать в непрерывном и импульсном режимах. Спектральная область генерации распространяется от ближнего УФ- до дальнего ИК-диапазона.

Большие перспективы имеют недавно созданные одномодовые квантово-каскадные лазеры (QCL) (Alpes Laser, Neuchatel, Switzerland), излучающие на длине волн от 5 до 12 мкм и обладающие узкой линией генерации с шириной 1–3 МГц. Они представляют собой многослойные гетероструктуры из полупроводниковых материалов типа InGaAs–InAlAs, в которых генерация происходит за счет каскада внутризонных переходов. Длина волны генерации определяется толщиной полупроводниковых слоев гетероструктуры и поэтому может задаваться при изготовлении лазера. Квантово-каскадные лазеры по своим характеристикам близки к перестраиваемым диодным лазерам. Они могут перестраиваться в широком спектральном диапазоне за счет изменения температуры и тока накачки, мощность их генерации может составлять десятки милливатт. При этом существенно, что разработчики надеются в скором будущем реализовать эти характеристики при комнатных температурах [4].

Абсорбционная спектроскопия

В абсорбционной спектроскопии коэффициент абсорбции, связанный с концентрацией образца в пробе, выражается формулой

$$\alpha(\nu) = S f(\nu - \nu_0) n l,$$

где S — силовой фактор, зависящий от свойств изотополога и температуры, $f(\nu - \nu_0)$ — нормализованная функция формы линии, ν — частота излучения источника света, ν_0 — частота в центре пика, n — плотность газа, l — эффективная длина оптического пути.

В работе [5] было показано, что при использовании диодного лазера с длиной волны 4,7 мкм для хорошо разрешаемых линий вращательного спектра $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ и $^{12}\text{C}^{18}\text{O}$ удалось получить воспроизводимость 3‰ при определении $\delta^{18}\text{O}$ для чистого СО при давлении 3 мбар. При этом использовался двухлучевой спектрометр с двумя неравноценными путями прохождения излучения для выравнивания пропускания двух кювет. Для определения изотопного состава водорода и кислорода воды использовался лазер на красителях с длиной волны 2,73 мкм [6]. Пробу воды объемом 5–10 мкл вводили в емкость объемом 1 л. Измерения δD проводились в области от -428 до $+15000$ ‰, $\delta^{18}\text{O}$ — в области от -55

до $+200\text{‰}$, $\delta^{17}\text{O}$ — в области от -100 до $+300\text{‰}$. Точность измерения δD составляла 1‰ , а $\delta^{18}\text{O}$ — $0,5\text{‰}$. Время измерения трех изотопных отношений составляло 20 мин.

Чувствительность абсорбционной спектроскопии может быть существенно улучшена при использовании частотной модуляции лазерного света с фазово-чувствительным детектированием. Были проанализированы образцы атмосферного метана. Полученная точность измерения $\delta^{13}\text{C}$ составляла $0,6\text{‰}$ (минимальная концентрация метана 2 мкМ) и 5‰ для δD (минимальная концентрация метана 80 мкМ). Время анализа 15 мин [7]. Использование двух диодных лазеров позволило провести изотопный анализ воды с воспроизводимостью $0,2\text{‰}$ для $\delta^{18}\text{O}$, $0,5\text{‰}$ для $\delta^{17}\text{O}$ и δD . При изотопном анализе метана воспроизводимость определения $\delta^{13}\text{C}$ составляла $0,3\text{‰}$ [8].

В работе [9] изучались перспективы применения перестраиваемого диодного лазера на солях свинца в абсорбционной спектроскопии для определения изотопного состава углерода CO_2 в воздухе с целью изучения природы углеродного обмена между почвой и атмосферой. Была создана установка на основе газового анализатора TGA 100 (Cambell Scientific Inc., Logan, UT, USA). Стандартное отклонение результатов определения $\delta^{13}\text{C}$ составляло $0,35\text{‰}$ ($n = 82$), а отклонение от результатов, полученных с помощью масс-спектрометра изотопных отношений Finnigan MAT 252 (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA), составляло $1,77\text{‰}$. Проведенные эксперименты показали, что значения $\delta^{13}\text{C}$ CO_2 на расстоянии 1 и 60 см от поверхности почвы изменяются в течение ночи от $-29,1 \pm 0,4$ до $-22,7 \pm 0,8\text{‰}$. Для анализа были выбраны абсорбционные линии с длиной волны $2308,225$ ($^{12}\text{CO}_2$) и $2308,171\text{ см}^{-1}$ ($^{13}\text{CO}_2$). Интенсивность линии $^{12}\text{CO}_2$ была в 2 раза слабее, чем интенсивность линии $^{13}\text{CO}_2$. Узкие молекулярные линии образуются при пониженном давлении в кювете ($2,1\text{ кПа}$), при повышении давления они расширяются.

Применение инфракрасной спектроскопии с криптоновым лазером (длина волны $0,647\text{ мкм}$) позволяет с большой точностью одновременно определять изотопные отношения $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ воды. Воспроизводимость результатов определения составляет $0,7\text{‰}$ для δD , $0,5\text{‰}$ для $\delta^{17}\text{O}$ и $\delta^{18}\text{O}$. Давление паров воды в кювете при вводе 10 мкл воды с помощью хроматографического шприца составляло 13 мбар [6].

Инфракрасная спектроскопия с фурье-преобразованием

Разрешение инфракрасного спектрометра с фурье-преобразованием может достигать $0,01\text{ см}^{-1}$. Это является достаточным для определения изотопного состава углерода с точностью $0,1\text{‰}$ в атмосферном CO_2 и в выдыхаемом человеком воздухе. Анализатор позволяет измерять $\delta^{17}\text{O}$ и $\delta^{18}\text{O}$ в CO_2 и CO , а также $\delta^{15}\text{N}$ в N_2O [10].

Бездисперсионная абсорбционная спектроскопия

Существующие недисперсионные инфракрасные (NDIR) анализаторы для мониторинга CO_2 атмосферы пока не полностью удовлетворяют требованиям для таких измерений по нескольким причинам: у них нелинейная градуировочная характеристика, имеется чувствительность к парам воды, наблюдается дрейф результатов измерения со временем и зависимость их от температуры. Для того чтобы получить правильные результаты, необходима частая (почасовая) градуировка прибора с использованием дорогого стандартного газа. NDIR-анализаторы имеют двухлучевую конфигурацию с двумя кюветами. В одной кювете находится образец, а в другой — стандартный или инертный газ. Анализатор обладает невысокой стоимостью и простой конструкцией. Анализатор с фотоакустическим детектором позволяет определять в выдыхаемом воздухе изотопный состав углерода $\delta^{13}\text{C}$ CO_2 (концентрация 3–5%) с точностью 0,3‰ [11]. Изотопный анализ образца CO_2 объемом 50 мл и с концентрацией 0,5–5% был проведен с помощью коммерческого прибора на основе NDIR IRIS 2TM (Wagner Analysen Technik Bremen, Germany). Удалось достигнуть воспроизводимости результатов определения $\delta^{13}\text{C}$, равной 0,3‰.

Лазерная спектроскопия по затуханию света с кольцевой многоходовой кюветой

В 1988 г. были разработаны базовые принципы новой технологии под названием Cavity Ring Down Spectroscopy (CRDS) — лазерная спектроскопия по затуханию света с кольцевой многоходовой кюветой [12]. CRDS основана на измерении времени затухания излучения в ячейке (кювете) с тремя высокоотражающими зеркалами при многократном прохождении света между ними. Ультравысокая точность измерения и низкий дрейф его характеристик делают ее идеально подходящей для атмосферных исследований. CRDS имеет три отличительных признака. Во-первых, CRDS обеспечивает очень большую длину пути луча лазера в оптической кювете. Это повышает его чувствительность по сравнению с обычными абсорбционными методами, такими как инфракрасная спектроскопия с фурье-преобразованием (FTIR), спектроскопия и недисперсионная инфракрасная спектроскопия (NDIR). В анализаторе на основе CRDS, имеющем кольцевую оптическую кювету с тремя зеркалами, луч лазера проходит путь ~ 12 км с временем затухания ~ 40 мкс. Вторым отличительным признаком анализатора является измерение времени затухания, а не ослабление интенсивности излучения, как это происходит в обычной оптической абсорбционной спектроскопии. Поэтому результаты измерения концентрации поглощающего газа не зависят от флуктуаций интенсивности источника света, что особенно важно при использовании импульсных лазеров. Третья

выгодная особенность анализатора на основе CRDS — это высокая разрешающая способность. Разрешение анализатора на основе CRDS составляет $0,0001 \text{ см}^{-1}$, в то время как анализаторы с FTIR имеют разрешение $\sim 0,5 \text{ см}^{-1}$ (разрешение повышено примерно в 5000 раз). Пониженное давление газа (50–150 торр) внутри аналитической кюветы приводит к сужению спектральных линий по сравнению с их шириной при атмосферном давлении. При этом уменьшается вероятность наложения от соседних линий и от спектральных линий интерферирующих соединений. Это приводит к увеличению чувствительности и точности спектрального анализа.

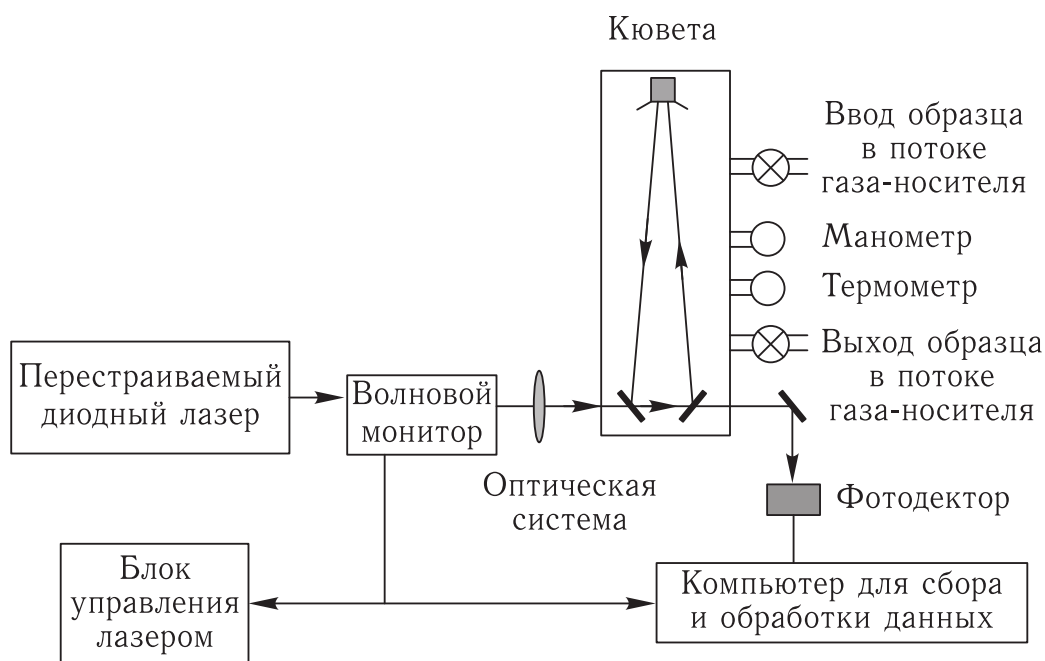


Рис. 8.1. Схема оптического анализатора на основе CRDS

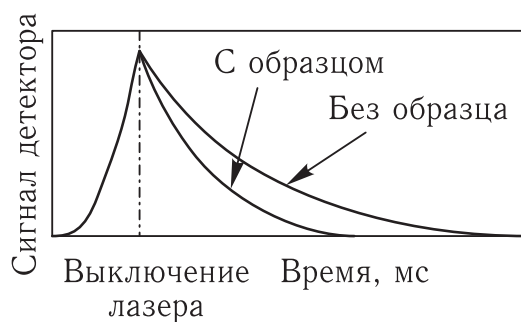


Рис. 8.2. Кривая изменения интенсивности света в оптической кювете анализатора на основе CRDS до и после выключения генерации лазера

Основой метода CRDS является определение времени затухания интенсивности излучения в проточной оптической кювете, заполненной анализируемым газом (рис. 8.1). На рис. 8.2 показана кривая изменения интенсивности света в кювете анализатора на основе CRDS как функция времени. Когда частота лазерного излучения совпадает с резонансной частотой анализируемого газа, в кювете происходит накопление

энергии. После выключения лазера интенсивность излучения (I), накопленная в кювете, падает экспоненциально в результате оптических потерь с временем затухания (τ)

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau},$$

где I_0 — интенсивность в момент выключения лазера. Предполагая, что абсорбция в ячейке подчиняется закону Бера, можно записать

$$\tau(\nu) = \frac{d}{c[1 - R + \alpha(\nu)]},$$

где ν — частота излучения, c — скорость света, d — длина пути излучения в кювете, R — коэффициент отражения зеркал, $\alpha(\nu) = \sigma(\nu)nd$ — коэффициент поглощения вещества в кювете, n — плотность газа

$$\sigma(\nu)n = \frac{1}{c} \left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \right),$$

τ_0 — время затухания в пустой кювете. Так как луч лазера не попадает в кювету во время затухания излучения τ в кювете с пробой, это приводит к уменьшению осцилляции базовой линии и улучшению правильности анализа на 4‰.

Если частота излучения не является резонансной для анализируемого газа, то время затухания определяется оптическими потерями при отражении от зеркал. При использовании резонансной частоты излучение поглощается пробой в кювете, приводя к уменьшению времени затухания в зависимости от концентрации образца. Особенностью анализатора на основе CRDS является то, что время затухания излучения может быть измерено с большей точностью, чем абсолютная или относительная интенсивность излучения света. В анализаторе используется высокоточный волновой монитор для измерения и контроля длин волн излучения. Разработанный волновой монитор обеспечивает детальное сканирование оптических спектров, которое нельзя сделать с помощью анализатора на основе NDIR. Это позволяет избежать интерференций от соединений газовой смеси и устранить одну из основных причин повторной градуировки анализатора, необходимой для большинства устройств подобного типа.

В анализаторе имеется цифровая система обработки сигналов для определения скорости затухания излучения (оптических потерь) в зависимости от длины волны. Измерения проводятся в течение ~ 6 мс, что позволяет получать типичный спектр, состоящий из 10–100 точек. Точный контроль температуры и давления является решающим фактором для получения точных и достоверных данных в автоматическом режиме. Температура в кювете поддерживается с точностью $3 \cdot 10^{-6}$, а давление с точностью $2 \cdot 10^{-3}$ [13].

В настоящее время разработаны анализаторы, способные непрерывно, в режиме реального времени измерять изотопные отношения в атмосферных газах, таких как CO_2 и водяной пар. Например, по изме-

нению изотопного состава углерода CO_2 можно изучить углеродный цикл экосистемы, так как все растения несколько менее эффективно поглощают CO_2 , содержащий тяжелый изотоп углерода (^{13}C). Точно так же измерение изменений изотопного состава кислорода и водорода воды позволяет изучать водный цикл. На рисунках 8.3 и 8.4 приведены примеры спектров, используемых при измерении изотопных отношений [14]. Чрезвычайно высокое спектральное разрешение анализатора позволяет измерять близко расположенные спектральные линии, соответствующие различным газовым изотопологам.

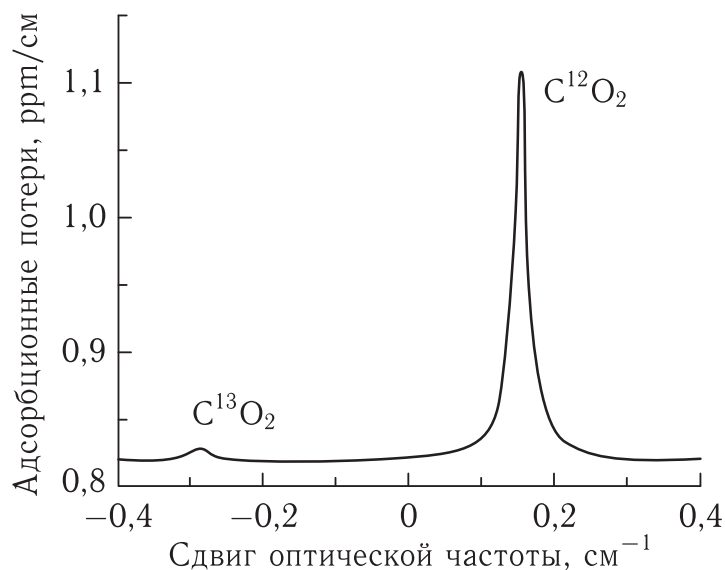


Рис. 8.3. Изотопный спектр CO_2 высокого разрешения, полученный с помощью оптического анализатора на основе CRDS

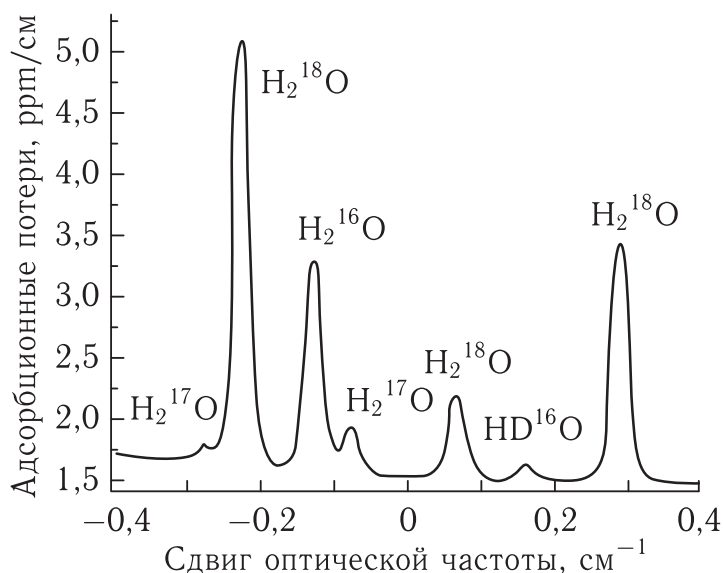


Рис. 8.4. Изотопный спектр воды высокого разрешения, полученный с помощью оптического анализатора на основе CRDS

Полевые испытания анализатора на основе CRDS показали, что он в течение многих месяцев способен работать в различных условиях окружающей среды, не требуя частой градуировки, обеспечивая необ-

ходимую линейность в широком диапазоне, точность и правильность результатов измерения. Анализируемые образцы практически не требуют пробоподготовки.

Для измерения $\delta^{13}\text{C}$ в CO_2 компанией Picarro был разработан анализатор на основе CRDS Picarro G1101-i. Благодаря небольшим размерам анализатор легко можно перемещать, и через несколько минут после включения анализатора можно проводить измерения. Образцы не требуют пробоподготовки и удаления влаги. Линейный диапазон измерения концентрации CO_2 составляет 0–2000 ppmv, воспроизводимость определения $\delta^{13}\text{C}$ (CO_2 в воздухе) равна 0,3‰ [14].

Тестовые испытания по определению содержания CO_2 в течение 45 дней с помощью анализаторов на основе CRDS и NDIR показали, что среднее различие между результатами составляло 180 ppbv. Для анализатора Picarro G 1101-i наблюдался дрейф 0,8 ppbv в день. Это означает, что ежедневный дрейф составляет 0,0002%, а за 45 дней — 0,045%. За время исследований проводилась только одна градуировка анализатора на основе CRDS по стандартам CO_2 и воды. Напротив, анализатор на основе NDIR градуировался по стандарту CO_2 каждые четыре часа, и необходимо было удалять водной пар из газового потока. Воспроизводимость результатов измерения концентрации для анализатора на основе CRDS составляла 50 ppbv для CO_2 и 100 ppmv для H_2O с полным временем измерения 3 с [14].

Таблица 8.2

Аналитические характеристики изотопного анализатора воды Picarro L1102-i

Проба	Изотопный состав	Воспроизводимость, ‰	Память, процент от предварительного образца, %	Дрейф (за 24 ч), ‰
Ввод воды с помощью автосемплера	$\delta^{18}\text{O}$	0,1	2	$\pm 0,3$
	δD	0,5	6,5	$\pm 0,9$
Ввод воды с помощью шприца	$\delta^{18}\text{O}$		2	$\pm 0,3$
	δD		6,5	$\pm 0,9$
Ввод водяного пара	$\delta^{18}\text{O}$			$\pm 0,3$
	δD			$\pm 0,9$

Для измерения δD и $\delta^{18}\text{O}$ в воде компанией Picarro был создан анализатор на основе CRDS Picarro L1102-i. В состав анализатора входит автоматический дозатор, с помощью которого в прибор можно многократно вводить жидкую пробу объемом от долей до нескольких микролитров. Обычно анализируется проба воды объемом 1 мкл. В табл. 8.2 приведены аналитические характеристики изотопного анализатора воды Picarro L1102-I [13].

Этот анализатор способен работать в полевых и лабораторных условиях. Эффект памяти от ввода предыдущего образца исчезает после

3 вводов анализируемой пробы. Объем оптической кюветы составляет 35 см^3 . Температура в кювете поддерживается с точностью $80 \pm 0,02^\circ\text{C}$, а давление с точностью $35 \pm 0,1$ Торр [15]. Длина волны перестраиваемого диодного лазера 1392 нм. Время единичного измерения составляет 30 с, полный анализа одного образца длится 9 мин. Определение изотопного состава кислорода и водорода проводится в диапазоне концентрации воды от 6000 до 26000 ppmv. Испытания прибора показали, что происходит сдвиг результатов измерений δD на 2‰ в течение 4-недельного эксперимента [14]. Вес прибора 26,3 кг, а размеры $43 \times 25 \times 59$ см (ширина $\times$ высота $\times$ глубина).

Для перевода воды в пар его гомогенизации и напуска в анализатор был изготовлен испаритель, показанный на рис. 8.5 [15]. Он состоит из цилиндра объемом 150 см^3 , вентиля для напуска газа-носителя, вентиля для форвакуумной откачки цилиндра, узла ввода пробы воды и трехходового вентиля для ввода пробы или сухого воздуха в анализатор. Газом-носителем является азот или сухой воздух. Узел ввода позволяет вводить пробу с помощью хроматографического шприца через резиновую прокладку. Температура испарителя 140°C . Испаритель может переключаться от измерения водяного пара в воздухе к измерению жидкой воды.

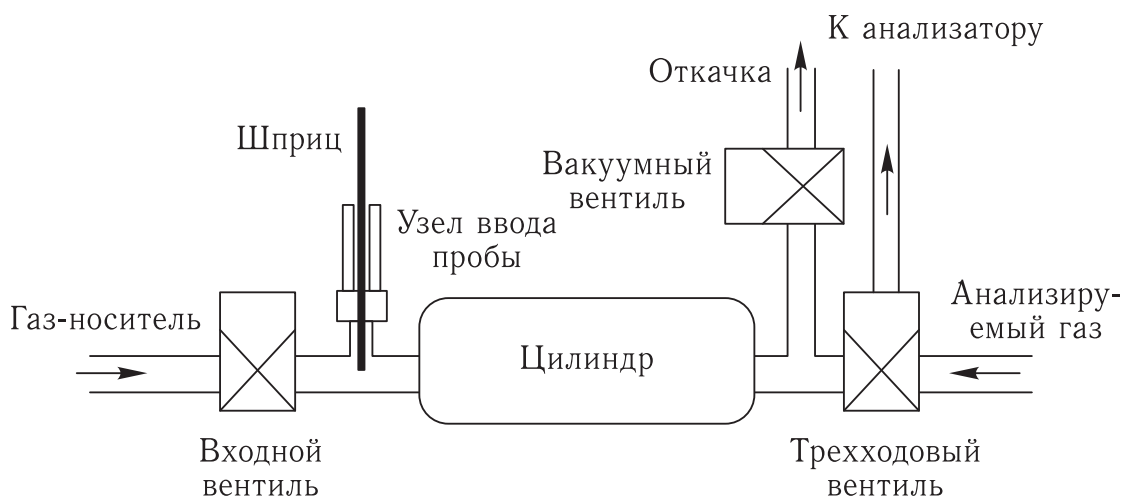


Рис. 8.5. Схема испарителя воды, соединенного с изотопным оптическим анализатором

В статье [16] было проведено сравнение результатов изотопного анализа воды с использованием оптического анализатора на основе CRDS Picarro L1102-i и масс-спектрометра изотопных отношений Delta Plus XP с пиролизатором TC/EA (Thermo Fisher, Bremen, Germany). Воспроизводимости измерения величин δD и $\delta^{18}\text{O}$ чистой воды для двух методов оказались близки и составляли $\pm 0,22$ и $\pm 0,5\text{‰}$ соответственно. Средний сдвиг результатов измерений между масс-спектрометрическими данными и спектроскопическими составлял $0,15\text{‰}$ для δD и $0,03\text{‰}$, для $\delta^{18}\text{O}$ (табл. 8.3). Была обнаружена линейная зависимость результатов определения δD и $\delta^{18}\text{O}$ при вводе пробы воды в области 0,5–1 мкл.

Таблица 8.3
Результаты изотопного анализа воды методом TC/EA-IRMS (Delta Plus XP с присоединенным TC/EA) и сравнение с результатами, полученными по методу CRDS

Образец	δD , ‰	Стандартное отклонение, ‰	Разность ΔD (TC/EA-IRMS-CRDS), ‰
R1	−101,19	0,15	−0,63
R3	−4,87	0,51	0,15
R5	114,77	0,11	0,60
R6	418,59	0,10	0,42
Образец	$\delta^{18}O$, ‰	Стандартное отклонение, ‰	Разность $\Delta^{18}O$ (TC/EA-IRMS-CRDS), ‰
R1	−12,56	0,00	0,00
R3	−3,10	0,01	0,11
R5	−3,27	0,10	−0,08
R6	−3,41	0,09	−0,15

В случае использования в качестве газа-носителя сухого воздуха сдвиг между результатами анализа по двум методам увеличивался до 1–2 ‰ для $\delta^{18}O$ и 5 ‰ для $\delta^{18}O$.

Лазерная спектроскопия по затуханию света с неаксиальной многоходовой кюветой

Компанией Los Gatos Research (LGR) [17] были созданы три изотопных оптических анализатора: для воды — Liquid Water Isotope Analyzer (LWIA-24d), для углекислого газа — CO₂ Isotope Analyzer и для метана — Methane Carbon Isotope Analyzer. Принцип их работы основан на измерении времени затухания излучения в ячейке (кювете) с двумя высокоотражающими зеркалами при многократном прохождении света между ними. Этот метод анализа получил название лазерная спектроскопия по затуханию света с неаксиальной многоходовой кюветой (on-axis integrated cavity output spectroscopy — OA-ICOS) [17–19]. Изотопные аналитические характеристики методов OA-ICOS и CRDS оказались близки (таблицы 8.2–8.4). Нет необходимости в проведении ежедневной градуировки анализаторов, одновременно измеряются изотопные отношения D/H, ¹⁸O/¹⁶O при единичном вводе пробы воды, устраняется погрешность, обусловленная конверсией молекул H₂O в H₂ и CO/CO₂, как это происходит в масс-спектрометре изотопных отношений. По своей конструкции анализаторы на основе OA-ICOS и CRDS очень похожи, в них используются подобные диодные лазеры с перестраиваемой длиной волны, оптические кюветы различаются только количеством отражающих зеркал. В состав анализатора на

Таблица 8.4

Усредненные результаты ($n = 3$) изотопного анализа воды методом OA-ICOS

Международная стандартная вода	δD , ‰		Разность ΔD , ‰
	стандартная величина	измеренная величина	
ОН 5	–2,1	–2,5	–0,4
ОН 6	–39,1	–38,3	0,8
ОН 7	–77,8	–77,7	–0,1
ОН 8	–122,0	–120,7	1,3
Международная стандартная вода	$\delta^{18}O$, ‰		Разность $\Delta^{18}O$, ‰
	стандартная величина	измеренная величина	
ОН 5	–0,26	–0,38	–0,12
ОН 6	–4,22	–4,19	0,03
ОН 7	–10,72	–10,87	–0,15
ОН 8	–16,27	–16,21	0,06

основе CRDS дополнительно входит волновой монитор (см. рис. 8.1). Длина пути излучения в оптической кювете анализатора на основе OA-ICOS составляет примерно 3 км. Анализаторы просты в управлении и имеют небольшие размеры, позволяющие их использовать в полевых условиях. Стоимость анализаторов невелика, но анализаторы на основе OA-ICOS несколько дешевле. Изотопные анализаторы LGR позволяют определять концентрацию CO_2 в диапазоне 0–20000 ppmv, концентрацию CH_4 в диапазоне 10–10000 ppmv.

Анализаторы на основе OA-ICOS для определения изотопного состава воды имеют автоматический дозатор на 200 жидких проб, позволяющий автоматически вводить с помощью шприца 0,2–1 мкл воды в узел ввода анализатора при температуре 70 °С. Проведенные эксперименты [19] показали, что воспроизводимость результатов изотопного анализа чистой воды в течение 11 ч работы (160 вводов пробы) составила $\pm 0,29\text{‰}$ для δD и $\pm 0,16\text{‰}$ для $\delta^{18}O$, а величина инструментального сдвига — 0,6 и 0,4 ‰ для δD и $\delta^{18}O$ соответственно. Эффект памяти от ввода предыдущего образца на результаты изотопного анализа воды с другим изотопным составом устраняется после 3 вводов пробы. Еще одной причиной погрешности изотопного анализа воды для анализаторов на основе OA-ICOS (тоже для анализаторов на основе CRDS) является линейная зависимость от объема введенной в анализатор пробы в диапазоне 0,2–1 мкл. С увеличением объема пробы величины δD становятся более положительными на 11 ‰, а величины $\delta^{18}O$ более отрицательными в диапазоне от –17,56 ‰ до –17,80 ‰.

В табл. 8.4 [19] показаны отклонения результатов измерения изотопного состава международных стандартов вод с помощью анализатора на

Таблица 8.5

Аналитические характеристики оптических методов измерения изотопных отношений

Метод	Лазер/длина волны	Газовая проба/ концентрация	Воспроизводимость, ‰	Литература
Абсорбционная спектроскопия	Лазер на солях Pb/3,3 мкм	Чистый CH ₄ /2 мкмоль	0,6($\delta^{13}\text{C}$)	[22]
	Диодный лазер/1,66 мкм	Чистый CH ₄ /100 мкм	0,3($\delta^{13}\text{C}$)	[23]
	Лазер на солях Pb/3,3 мкм	Чистый CH ₄ /80 мкмоль	5($\delta^{13}\text{C}$)	[22]
	Лазер на солях Pb/4,7 мкм	Чистый CO/50 мкм	2,5($\delta^{18}\text{O}$)	[5]
	Лазер на солях Pb/4,3 мкм	Чистый CO ₂ /10 мкм	4($\delta^{13}\text{C}$)	[24]
	Лазер на солях Pb/4,3 мкм	Воздух/350–700 ppmv CO ₂	0,25($\delta^{13}\text{C}$)	[9]
	Диодный лазер/1,66 мкм	Выдыхаемый воздух/5 % CO ₂	10($\delta^{13}\text{C}$)	[25]
	Лазер на солях Pb/4,3 мкм	Выдыхаемый воздух/380 ppmv CO ₂	0,2($\delta^{13}\text{C}$)	[26]
	Лазер на солях Pb/4,3 мкм	Чистый CO ₂ /2 мкмоль	2($\delta^{13}\text{C}$)	[27]
	Диодный лазер/1,39 мкм	Вода	0,2($\delta^{18}\text{O}$) 0,5($\delta^{17}\text{O}$)	[28]
	Лазер на солях Pb/8,2 мкм	N ₂ O	0,5(δD) 0,4($\delta^{18}\text{O}$)	[29]
Инфракрасная спектроскопия с фурье-преобразованием	Разрешение 1 см ⁻¹	Воздух/350 ppmv CO ₂	0,15($\delta^{13}\text{C}$)	[30]
	Разрешение 1 см ⁻¹	Выдыхаемый воздух/5 % CO ₂	0,1($\delta^{13}\text{C}$)	[30]
	Разрешение 8 см ⁻¹	Вода	3(δD)	[31]
	Разрешение 0,012 см ⁻¹	N ₂ O/6–9 мкмоль	2,5–4($\delta^{18}\text{O}$) 1–2($\delta^{15}\text{N}$)	[10]
Бездисперсионная инфракрасная спектроскопия	Фотоакустическая	Выдыхаемый воздух/3–5 % CO ₂	0,3($\delta^{13}\text{C}$)	[11]
Лазерная спектроскопия по затуханию света с кольцевой кюветой	Диодный лазер	Воздух/50 ppbv CO ₂	0,3($\delta^{13}\text{C}$)	[13]
		Вода	0,1($\delta^{18}\text{O}$) 0,5(δD)	
		Водяной пар в воздухе	0,2($\delta^{18}\text{O}$) 1(δD)	
Лазерная спектроскопия по затуханию света с кольцевой кюветой	Диодный лазер	CH ₄ CO ₂ Вода	1($\delta^{13}\text{C}$) 0,25($\delta^{13}\text{C}$) 0,3(δD) 0,1($\delta^{18}\text{O}$)	[19, 20]

основе OA-ICOS от заданных величин. Средние величины отклонения результатов измерения для δD изменялись от $-0,4$ до $1,1\text{‰}$ при значении стандартного отклонения $\pm 0,8\text{‰}$, а для $\delta^{18}O$ величины отклонения изменялись от $0,03$ до $-0,15\text{‰}$ при стандартном отклонении $\pm 0,11\text{‰}$.

Аналитические характеристики оптических методов измерения изотопных отношений приведены в табл. 8.5.

Новые методики и результаты

Для определения изотопного состава углерода в твердых образцах был разработан интерфейс LiaisonTM для присоединения систем пробоподготовки (реакторов для сжигания образцов) Picarro Combustion Module, Costec elemental analyzer, AutoMate FX DIC к изотопному анализатору. Воспроизводимость определения величин $\delta^{13}C$ составляет $0,4\text{‰}$, а минимальная определяемая концентрация CO_2 — 200 ppbv (для молекул с изотопом ^{12}C) и 10 ppbv (для молекул с изотопом ^{13}C).

Таблица 8.6

Сравнение результатов определения изотопного состава углерода оливкового масла различными методами

Страна	$\delta^{13}C$ (Picarro CDRS), ‰	Стандартное отклонение ($n = 3$), ‰	$\delta^{13}C$ (IRMS), ‰
Испания	-28,95	0,18	-28,94
Италия	-28,98	0,05	-29,27
Греция	-29,29	0,02	-29,21
Турция	-30,34	0,11	-30,32
Ливан	-29,11	0,23	-28,87
Австралия	-31,23	0,01	-31,19

Для демонстрации возможностей изотопного оптического анализатора i-TOC-CRDS (Picarro and IO Analytical) был определен изотопный состав углерода в оливковом масле из различных стран (табл. 8.6). Результаты изотопного анализа сравнивались с данными, полученными на масс-спектрометре изотопных отношений. Для этого 2 мкл масла с помощью хроматографического шприца вводили в кварцевый тигель, который затем перемещали в окислительный реактор. Образовавшийся CO_2 автоматически попадал в оптическую кювету анализатора i-TOC-CRDS. Время анализа составляло 5 мин . Из табл. 8.6 видно, что данные, полученные с помощью изотопного оптического анализатора i-TOC-CRDS, коррелируют с данными масс-спектрометра изотопных отношений. Таким образом, изотопный анализатор i-TOC-CRDS может быть использован для быстрого скрининга оливкового масла с целью нахождения подделок и выявления его разбавления дешевым кукурузным маслом [20].

Таблица 8.7

Сравнение величин $\delta^{13}\text{C}$ метана, этана и пропана, измеренные с помощью масс-спектрометра изотопных отношений, соединенного с хроматографом, (метод GC-C-IRMS, объем пробы 2,5 мкл, разбавление 1:30), и оптического анализатора, соединенного с хроматографом, (метод GC-C-CRDS, объем пробы 25 мкл, без разбавления), число измерений каждой величины 5

Соединение	GC-C-IRMS $\delta^{13}\text{C}$ (‰), отдельные соединения	GC-C-CRDS $\delta^{13}\text{C}$ (‰), отдельные соединения	GC-C-CRDS $\delta^{13}\text{C}$ (‰), в смеси
Метан	$-44,07 \pm 0,46$	$-47,16 \pm 0,68$	$-45,76 \pm 0,61$
Этан	$-37,68 \pm 0,41$	$-39,63 \pm 0,89$	$-36,15 \pm 0,86$
Пропан	$-39,57 \pm 0,20$	$-39,57 \pm 0,82$	$-38,75 \pm 1,04$

В работе [21] был описан прибор для определения изотопного состава углерода в смеси летучих органических веществ, созданный на основе анализатора Picarro, соединенного с газовым хроматографом HP 5890 Series 2 (Agilent) и реактором сожжения (1 Pt и 3 Ni проволоки, 1000–1150 °C). Аналитические характеристики прибора были исследованы при использовании CH_4 , C_2H_6 , C_3H_8 . Газовая проба смеси вводилась в хроматограф и разделялась в колонке (HP-PLOT Q, 30 м × 0,53 мм) на компоненты согласно времени удерживания. Разделенные компоненты окислялись в ректоре сожжения. Образованный CO_2 с другими продуктами окисления попадал в поток азота, который проходил через оптическую кювету изотопного анализатора. Температура в оптической кювете была 45 °C, давление — 140 Торр. Воспроизводимость результатов определения изотопного состава углерода этана и пропана составляла 0,95‰ и 0,67‰, соответственно. Правильность определения $\delta^{13}\text{C}$ была не хуже 3‰. В табл. 8.7 приведены результаты сравнительного определения изотопного состава углерода углеводородных газов при использовании оптического анализатора на основе CRDS и масс-спектрометра изотопных отношений. Несмотря на невысокую воспроизводимость и правильность определения изотопного состава углерода в углеводородных газах при использовании оптического анализатора, разработанный прибор имеет большие перспективы использования. Дальнейшая модификация прибора приведет к улучшению его аналитических характеристик.

Выводы

В настоящее время наиболее разработанными изотопными оптическими приборами являются лазерные изотопные анализаторы на основе CRDS и OA-ICOS. Они позволяют с большой точностью определять изотопный состав углерода CO_2 , водорода и кислорода в H_2O и водяном паре. По аналитическим характеристикам оптические анализаторы

сравнимы с характеристиками масс-спектрометров изотопных отношений (IRMS), но существенно проще в управлении и намного дешевле. Для определения изотопного состава легких элементов в масс-спектрометрии изотопных отношений необходимо провести химическую конверсии соединений или изотопное уравнивание воды с H_2 или CO_2 . Благодаря высокоточному контролю температуры и давления в оптической кювете, а также строгому контролю длины волны перестраиваемого лазера удалось значительно уменьшить дрейф системы. Это позволяет проводить градуировку оптического анализатора один раз в течение нескольких дней. Изотопные оптические анализаторы имеют небольшую стоимость, портативны и могут быть применены в полевых условиях для мониторинга окружающей среды.

Литература

1. *Thornton V., Condon F. E.* Infrared spectrometric determination of deuterium oxide in water // *Anal. Chem.* — 1950. — V. 22. — P. 680–681.
2. *Milatz J. M., Kluyver J. C., Hardebol J.* Determination of isotope ratios, e.g. in tracer work, by infrared absorption method // *J. Chem. Phys.* — 1950. — V. 19. — P. 887–888.
3. *Федоров Б. Ф.* Лазеры. Основы устройства и применение. — М.: ДОСААФ, 1988. — 190 с.
4. *Степанов Е. В.* Методы высокочувствительного газового анализа молекул-биомаркеров в исследованиях выдыхаемого воздуха // *Труды Института общей физики им. А. М. Прохорова РАН.* — 2005. — Т. 61. — С. 5–47.
5. *Lee P. S., Majkowski R. F.* High resolution infrared diode laser spectroscopy for isotope analysis — measurement of isotopic carbon monoxide. // *Appl. Phys. Lett.* — 1986. — V. 48. — P. 619–621.
6. *Kerstel E. R. T., van Trigt R., Dam N., Reuss J., Meijer H. A. J.* Simultaneous determination of the $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope abundance ratios in water by means of laser spectrometry // *Anal. Chem.* — 1999. — V. 71. — P. 5297–5303.
7. *White J. U.* Very long optical paths in air // *J. Opt. Soc. Am.* 1976. — V. 66. — P. 411–416.
8. *Gianfrani L., Gagliardi G., van Burgel M., Kerstel E.* Isotope analysis of water by means of near-infrared dual-wavelength diode laser spectroscopy // *Opt. Express.* — V. 11. — P. 1566–1576.
9. *Bowling D. R., Sargent S. D., Tanner B. D., Ehleringer J. R.* Tunable diode laser absorption spectroscopy for stable isotope studies of ecosystem-atmosphere CO_2 exchange // *Agricultural and Forest Meteorology.* — 2003. — V. 118. — P. 1–19.
10. *Turatti F., Griffith D. W. T., Wilson S. R., Esler M. B.* Positionally dependent ^{15}N fractionation factors in the UV photolysis of N_2O determined by high resolution FTIR spectroscopy // *Geophys. Res. Lett.* — 2000. — V. 27. — P. 2489–2492.

11. *Haisch M., Hering P., Fabinski W., Zochbauer M.* Isotopenselective konzentrationmessungen an atemgasen mit einem NDIR-spectrometer // *Technisches Messen.* — 1996. — V. 63. — P. 322–328.
12. *O'Keefe A., Deacon D.A.G.* Cavity ring-down optical spectrometer for absorption measurements using pulsed laser sources // *Rev. Sci. Instr.* — 1988. — V. 59. — P. 2544–2554.
13. <http://www.picarro.com>.
14. *Van Pelt A.* Real-time atmospheric monitoring of stable isotopes and trace greenhouse gases // <http://www.picarro.com>.
15. *Gupta P., Noone D., Galewsky J., Sweeney C., Vaughn B.H.* Demonstration of high-precision continuous measurements of water vapor isotopologues in laboratory and remote field deployments using wavelength-scanned cavity ring-down spectroscopy (WS-CRDS) technology // *Rapid Communications in mass spectrometry.* — 2009. — V. 23. — P. 2534–2542.
16. *Brand W.A., Geilmann H., Crosson R., Rella C.W.* Cavity ring-down spectroscopy versus high-temperature conversion isotope ratio mass spectrometry; a case study on $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of pure water samples and alcohol/water mixture // *Rapid Communications in mass spectrometry.* — 2009. — V. 23. — P. 1879–1884.
17. <http://www.lgrinc.com>.
18. *Николаев И.В., Очкин В.Н., Спиридонов М.В., Цхай С.Н., Ломоносов В.Г.* Абсорбционная спектроскопия по затуханию света с неаксиальными многоходовыми кюветами // Препринт 4. Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН (ФИАН). — М., 2005. — С. 1–12.
19. *Lis G., Wassenaar L.I., Hendry M.J.* High-precision laser spectroscopy D/H and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ measurements of microliter natural water samples // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80. — P. 287–293.
20. Automated measurement of $\delta^{13}\text{C}$ for identifying and classifying edible oils // <http://www.picarro.com>.
21. *Zare R.N., Kuramoto D.S., Haase C., Tan S.M., Crosson E.R., Saad N.M.* High-precision optical measurements of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios in organic compounds at natural abundance // *PNAS.* — 2009. — V. 106. — P. 10928–10932.
22. *Bergamaschi P., Schupp M., Harris G.W.* High-precision direct measurements of $^{13}\text{CH}_4/^{12}\text{CH}_4$ and $^{12}\text{CH}_3\text{D}/^{12}\text{CH}_4$ ratios in atmospheric methane sources by means of a long-path tunable diode laser absorption spectrometer // *Applied Optics.* — 1994. — V. 33. — P. 7704–7716.
23. *Uehara K., Yamamoto K., Kikugawa T., Yoshida N.* Isotope analysis of environmental substances by a new laser-spectroscopic method utilizing different pathlengths // *Sensors and Actuators.* — 2001. — V. B74. — P. 173–178.
24. *Becker J.F., Sauke T.B., Loewenstein M.* Stable isotope analysis using diodes laser spectroscopy // *Appl. Opt.* — 1992. — V. 31. — P. 1921–1927.
25. *Cooper D.E., Martinelli U., Carlisle C.B.* Measurement of $^{12}\text{CO}_2:^{13}\text{CO}_2$ ratios for medical diagnostics with 1.6- μm distributed-feedback semiconductor diode lasers // *Appl. Opt.* — 1993. — V. 32. — P. 6727–6731.
26. *McManus J.B., Zahniser M.S., Nelson D.D., Williams L.R., Kolb C.E.* Infrared laser spectrometer with balanced absorption for measurement of isotopic ratios of carbon gases // *Spectrochim. Acta.* — 2002. — V. A58. — P. 2465–2480.

27. Sauke T.B., Becker J.F. Stable isotope laser spectrometer for exploration of Mars // Planet. Space Sci. — 1998. — V. 46. — P. 805–812.
28. Kerstel E.R.T., Gagliardi G., Gianfrani L., Meijer H.A.J., van Trigt R., Ramaker R. Determination of the $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope ratios in water by means of tunable diode laser spectroscopy at $1,39\ \mu\text{m}$ // Spectrochim. Acta. — 2002. — V. A58. — P. 2389–2396.
29. Wahlen M., Yoshinari T. Oxygen isotope ratios in N_2O from different environments // Nature. — 1985. — V. 313. — P. 780–782.
30. Esler M.B., Griffith D.W.T., Wilson S.R., Steele L.P. Precision trace gas analysis by FT-IR spectroscopy. 2. The $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio of CO_2 // Anal. Chem. — 2000. — V. 72. — P. 216–221.
31. Fusch C., Spririg N., Moeller H. Fourier transform infrared spectroscopy measures $1\text{H}/2\text{H}$ ratios of native water with a precision comparable to that of isotope ratio mass spectrometry // Eur. J. Clin Chem. Clin. Biochem. — 1993. — V. 31. — P. 639–644.

Научное издание

Проблемы аналитической химии

Том 15

Изотопная масс-спектрометрия легких газообразующих элементов

Утверждено к печати

Научным советом РАН по аналитической химии

Отделения химии и наук о материалах

Российской академии наук

Редактор *Е.Б. Гугля*

Оригинал-макет: *А.А. Пярнпуу*

Оформление переплета: *В.Ф. Киселев*

Подписано в печать 25.07.11

Формат 60×90/16

Печать офсетная

Усл. печ. л. 15 Уч.-изд. л. 16,2

Тираж 300 экз. Заказ №

Издательская фирма «Физико-математическая литература»

МАИК «Наука/Интерпериодика»

117997, Москва, ул. Профсоюзная, 90

E-mail: fizmat@maik.ru, fmlsale@maik.ru;

<http://www.fml.ru>

E-mail: secret@naukaran.ru

www.naukaran.ru

Отпечатано с электронных носителей издательства

в ППП «Типография «Наука»

121099, г. Москва, Шубинский пер., 6