

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
ПОВЕРХНОСТНЫХ ЯВЛЕНИЙ

УДК 544.7;544.08

ИНТЕГРИРОВАНИЕ СИГНАЛА ПО ПОВЕРХНОСТИ КАК СПОСОБ
НИВЕЛИРОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПРИ АНАЛИЗЕ
НЕРЖАВЕЮЩЕЙ СТАЛИ НА СОДЕРЖАНИЕ ХЛОРА

© 2021 г. И. С. Пыцкий^{a,*}, Е. С. Кузнецова^a, А. К. Буряк^a

^a Российская академия наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, Москва, Россия

*e-mail:ivanpic4586@gmail.com

Поступила в редакцию 28.04.2021 г.

После доработки 28.04.2021 г.

Принята к публикации 11.05.2021 г.

Исследована возможность анализа количества хлора на поверхности нержавеющей стали и описан способ получения воспроизводимых результатов нивелированием или устранением физико-химических особенностей поверхностной ионизации закристаллизованного из раствора калибранта. Показано, что основным фактором влияющим на качество калибровки и анализа является форма получаемой капли и ее размер. Также обнаружено, что интегрирование аналитического сигнала по всей капле является наиболее приемлемым методом калибровки и получения наиболее воспроизводимых результатов. Приведены основные факторы, влияющие на физико-химические особенности ионизации и как следствие на воспроизводимость калибровочных данных. Установлено, что метод калибровки с интегрированием сигнала по капле может эффективно применяться при анализе сверхмалых количеств хлора на поверхности нержавеющей стали в диапазоне от 0.12 до 120 пкмоль/мм². При этом предложенный подход нивелирует физико-химические факторы, влияющие на эффективность ионизации, которые ограничивают применение поверхностной лазерной десорбции/ионизации для количественного анализа.

Ключевые слова: интегрирование сигнала, поверхностно-активированная лазерная десорбция/ионизация, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0044453721110170

Масс-спектрометрические методы анализа являются передовой группой методов в современном мире и используются в различных областях науки, промышленности и техники. Их применение охватывает практически всю жизнь человека и необходимо в медицине, инженерии, допинг-контроле, пищевой промышленности, океанографии, палеонтологии и многих других областях вплоть до астрономических исследований. Как современный метод исследования масс-спектрометрия используется для количественного анализа в широком диапазоне концентраций от следовых и до г/кг образца. Масс-спектрометрия с лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) является одним из востребованных методов исследования благодаря возможности поверхностной ионизации твердых закристаллизованных образцов. С появлением MALDI в качестве инструмента для микробной характеристики, значительно улучшилось оснащение лабораторий для меры борьбы с биотерроризмом, предотвращения заражения пищевых продуктов, и мониторинга распространения устойчивых к антибиоти-

кам бактерий [1]. Кроме того MALDI как инструмент, позволяющий детектировать соединения с большими массами, широко применяется в клинической вирусологии [2], так как позволяет не только обнаруживать, но и определять структуру вирусов. Также, благодаря точечной ионизации MALDI используется в режиме имиджинга, который дает возможность построения диаграмм распределения любых соединений на различных поверхностях [3]. Имиджинг позволяет изучать распределение примесей в полимерах [4–6], проникновение и распространение лекарственных средств в ткани и органы [7–9], строить трехмерные диаграммы распределения соединений при исследовании последовательных срезов образцов [10, 11]. Основным ограничением метода является толщина исследуемого образца, так как при ионизации необходимо инициирование поверхности. Следует отметить что для металлических поверхностей таких работ не обнаружено и имиджинг возможен только для тонких пленок. Масс-спектрометрия в данном случае объединяет лучшие черты этих методов. Она является высо-

кочувствительным методом с возможностью идентификации большинства поверхностных соединений и при этом современное оборудование позволяет модифицирование под анализ практически любого типа образцов.

Авторами показана возможность использования метода имиджинга MALDI не только на подготовленных поверхностях, но и на любых конструкционных материалах [12]. Показано, что при использовании в качестве иницилирующей поверхности сам образец, возможно исследование однородности поверхности и распределение примесей по ней [13, 14]. Также показано, что имиджинг такой поверхности позволяет охарактеризовать не только примеси, но и морфологию. Следующим шагом в исследовании является количественный анализ. Существуют работы по имиджингу с количественным анализом методом MALDI. Так в работе [15] предлагается использование МАЛДИ имиджинга для исследования раковых опухолей у лабораторных мышей. Результаты позволяют сделать выводы о кинетике развития заболевания и производить соотношение результатов с человеческим организмом. Имиджинг также применяется для исследования соединений биологического происхождения [16–18]. Из данного выше обзора видно, что имиджинг применяется в основном для исследования образцов живых тканей и других поверхностей с микронной толщиной. Такие образцы накладывают определенные ограничения на проведение эксперимента и значительно усложняют пробоподготовку. В случае использования металлической поверхности в качестве образца и одновременно для иницирования ионизации можно избежать значительных трудностей в пробоподготовке, так как поверхность исследуют напрямую. Следует отметить, что при таком анализе в режиме имиджинга возможен как целевой поиск, так и идентификация неизвестных примесей. Важной частью работы является количественное определение целевых соединений на поверхности. Цель данной работы разработке метода количественного анализа и установлении аналитических характеристик метода при анализе поверхности металлических материалов на содержание адсорбированного хлора. Из различных исследований известно, что на поверхности различных сталей и алюминиевых сплавов адсорбируется хлор из атмосферы. Несмотря на небольшое количество ($\sim 10^{-15}$ – 10^{-10} моль/мм²), хлор может крайне негативно влиять на состояние поверхностных слоев, вызывая как язвенную, так и гораздо более опасную для конструкционных материалов, питтинговую коррозию. Для контроля состояния поверхности крайне необходим количественный или полуколичественный метод анализа количества хлора. В то же время даже полуколичественный анализ в поверхностных масс-спектрометри-

ческих методах крайне затруднен из-за неравномерной кристаллизации соединений по поверхности и особенностей физико-химии ионизации. В настоящей работе предложен метод калибровки по хлору с интегрированием и усреднением общего сигнала по закристаллизованному веществу, а также способ устранения ошибок вызванных процессами ионизации из закристаллизованного на поверхности калибранта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперимент проводился на масс-спектрометре с лазерной десорбцией/ионизацией Bruker Daltonic Ultraflex, оснащенный азотным лазером с рабочей длиной волны 337 нм и энергией 110 мкДж/импульс. Частота варьировалась от 20 до 150 Гц. Для построения двумерных диаграмм распределения использовалась программа, разработанная в лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Построение диаграмм проводили последовательной ионизацией набором лазерных импульсов точек на поверхности с шагом от 50 до 200 мкм.

Для калибровки использовали растворы хлорида калия, полученные последовательным разбавлением в деионизированной воде из сухой соли (калия хлорид, “о.с.ч.”, Реахим, Россия). Полученные концентрации составляли 10^{-6} – 10^{-1} М с шагом в один порядок. Нанесение на поверхность проводили с использованием дозатора. Объем наносимой капли – 5 мкл. При нанесении добивались, чтобы размер капли составлял не менее 3.4 мм. Размер капли контролировали микроскопом. Сушку и кристаллизацию проводили на воздухе в течение 20 мин.

Эксперимент проводили путем последовательной ионизации поверхности с закристаллизованным хлоридом калия и получением масс-спектра. Для калибровки по содержанию хлора на поверхности использовали величину сигнала по изотопу Cl^{35} . Ионизацию проводили по центральному фрагменту капли размером 3.2×3.2 мм. Шаг между точками по вертикали и горизонтали составлял 100 мкм. Таким образом для каждого центрального фрагмента капли получали 1024 точки со значением сигнала по хлору. Полученные значения усредняли и определяли доверительный интервал и дисперсию значений. Определяли среднее значение сигнала по Cl^{35} в каплях с различными концентрациями и определяли зависимость сигнала от концентрации.

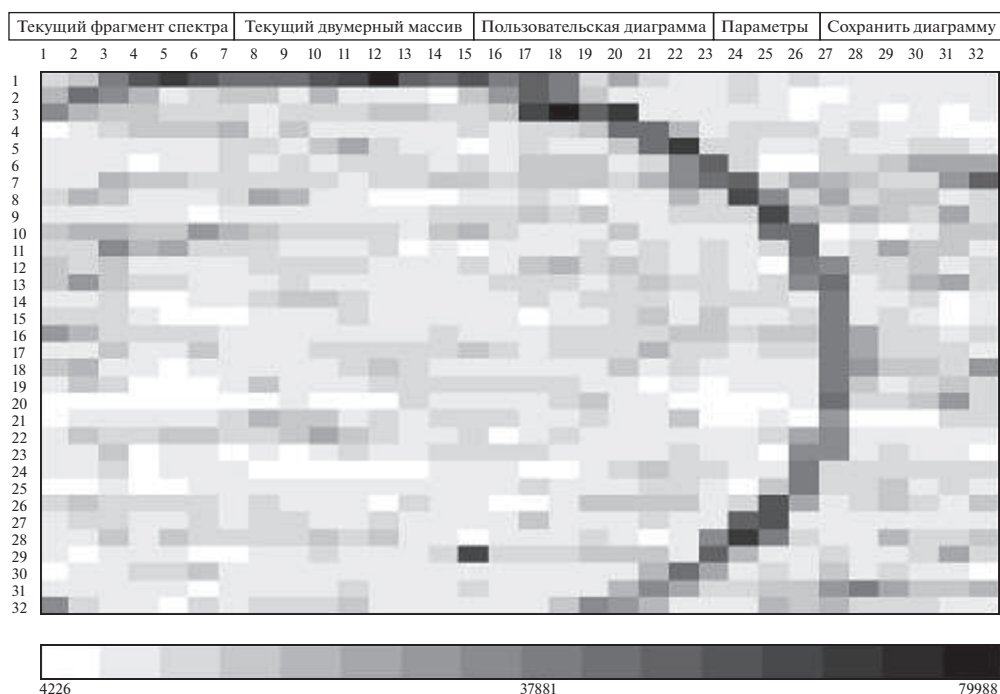


Рис. 1. Распределение аниона хлора Cl^{35} по поверхности нержавеющей стали, закристаллизованного из раствора хлорида калия с концентрацией 10^{-6} М. Разрешение 32×32 точки с шагом 100 мкм (62500 dpi).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение диаграмм распределения хлора из закристаллизованной капли

В мировой научной литературе крайне малый процент работ с использованием масс-спектрометрии поверхности использует количественные методы анализа. Это связано прежде всего с трудностями равномерного нанесения калибровочных растворов на поверхность. Также было показано, что кристаллизация калибратора из раствора происходит также неравномерно из-за перераспределения сил поверхностного натяжения в высыхающей капле. Отсюда следует что масс-спектры в одной точке поверхности капли не несут полезной информации о количестве калибровочного вещества на поверхности в целом и не могут быть аналитическим сигналом при построении калибровочной кривой. В данной работе предложен вариант проведения калибровки интегрированием по поверхности капли сигнала анализируемого соединения методом построения двумерных диаграмм распределения. Было получено распределение иона Cl^{35} по поверхности нержавеющей стали с использованием масс-спектров. Наименьшая концентрация раствора хлорида калия составляла 10^{-6} М, что в пересчете на количество хлора на поверхности закристаллизованной капли составляло 0.125 пмоль/мм². Полученные результаты приведены на рис 1.

Размер исследуемой области составлял 3.2 мм по вертикали и по горизонтали. На диаграмме четко видно трехфазную границу капля—сталь—воздух благодаря повышенному сигналу в области края капли в форме эллипса. Видно, что даже не учитывая область края капли кристаллизация идет крайне неравномерно и вероятно всего для получения адекватной характеристики аналитического сигнала нужно проводить интегрирование по большому числу точек.

Влияние формы капли на качество калибровочной зависимости

Важнейшим вопросом данного исследования является возможность воспроизводимого интегрирования сигнала калибруемого соединения вне зависимости от внешних факторов, таких как используемый для кристаллизации растворитель, сотрудник производящий нанесение, размер получаемой капли и т.д. Для проведения калибровки по хлориду калия вода является наиболее подходящим растворителем, поэтому в настоящей работе подбор растворителя не рассматривается. Наиболее важным фактором, влияющим на воспроизводимость калибровочных данных, является форма и способ нанесения капли. Для проверки гипотезы проводили нанесение капель раствора хлорида калия с различными концентрациями разными способами. Важным фактором является правильность формы капли, которая зависит от

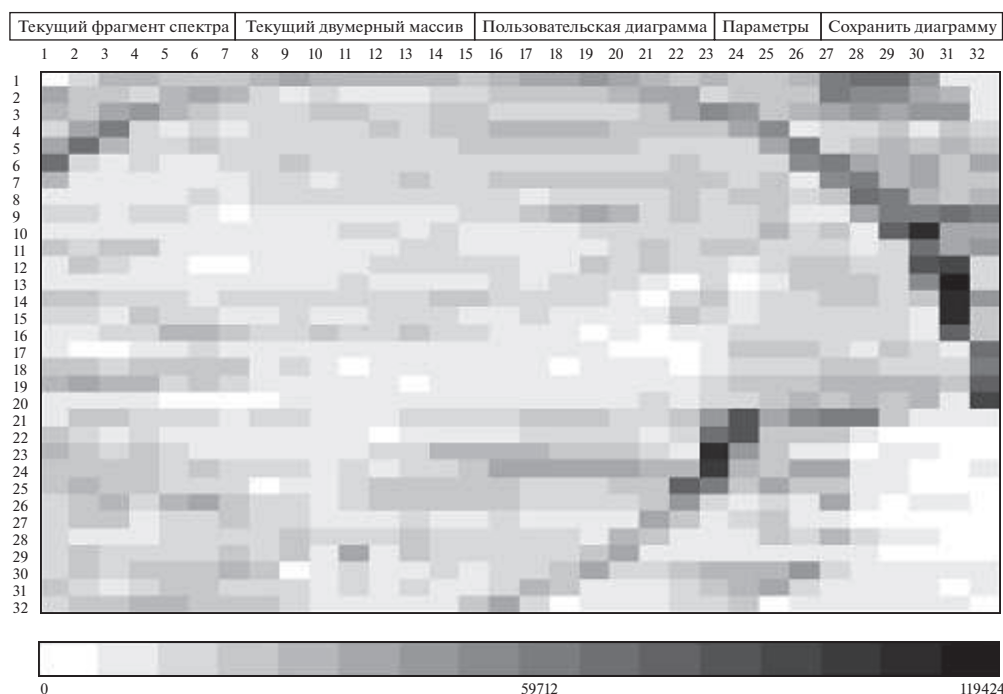


Рис. 2. Распределение аниона хлора по поверхности нержавеющей стали с нанесенной на поверхность частицей из инертного материала размером около 200 мкм, закристаллизованного из раствора хлорида калия с концентрацией 10^{-5} М. Разрешение 32×32 точки с шагом 100 мкм (62500 dpi).

многих факторов, например, от поверхности на которую капля нанесена. Известно, что любая неровность или случайно занесенная частица могут негативно сказаться на форме капли. Для оценки этого фактора при нанесении раствора на поверхность вносили частицу размером 50–200 мкм из инертного материала, на которую наносили каплю. При построении диаграмм было обнаружено, что наибольшее влияние на форму капли оказывают частицы, попадающие на границу капли. Одна из таких диаграмм изображена на рис. 2.

Из рисунка видно, что граница капли с высоким содержанием хлора имеет искаженную форму и разрыв в области попадания инородной частицы. Очевидно, что такое искажение приводит к еще большей неоднородности капли и может влиять на качество интегрирования по поверхности.

Еще одним фактором, влияющим на качество калибровочной кривой является способ нанесения и размер получающейся капли. Во многом это зависит от лаборанта, производящего нанесение. На рис. 3 приведена диаграмма распределения атомов хлора при кристаллизации из капли небольшого размера.

Из рисунка видно, что размер пятна, содержащего атомов значительно меньше, чем на приведенных выше диаграммах. При этом шкала интенсивности сигналов значительно смещается в сторону увеличения в основном за счет крайних

правых точек на границе капли, а в центре интенсивности в целом соответствуют средней по данной концентрации.

Наиболее правильная и равномерная кристаллизация достигается при средних величинах концентраций порядка 10–100 пмоль/мм². Пример такой кристаллизации приведен на рис. 4.

При переходе к более высоким концентрациям равномерность кристаллизации также часто нарушается из-за концентрирования зародышей кристаллов около одной стороны границы капли и смещения к ней основной части растворенного хлорида калия. Типичный пример приведен на рис. 5.

На рисунке видно концентрирование ионов хлора вокруг верхней границы, и значительно нарушает равномерность распределения вещества, достигнутую по центру капли.

Подбор оптимальных условий калибровки для определения хлора на поверхности нержавеющей стали

Из всего выше сказанного следует, что достижение успеха в количественном анализе методом поверхностной ионизации зависит от многих факторов. Оценить вклад каждого фактора в точное определение аналитического сигнала от количества закристаллизованного вещества — наиболее важный шаг при таком исследовании.

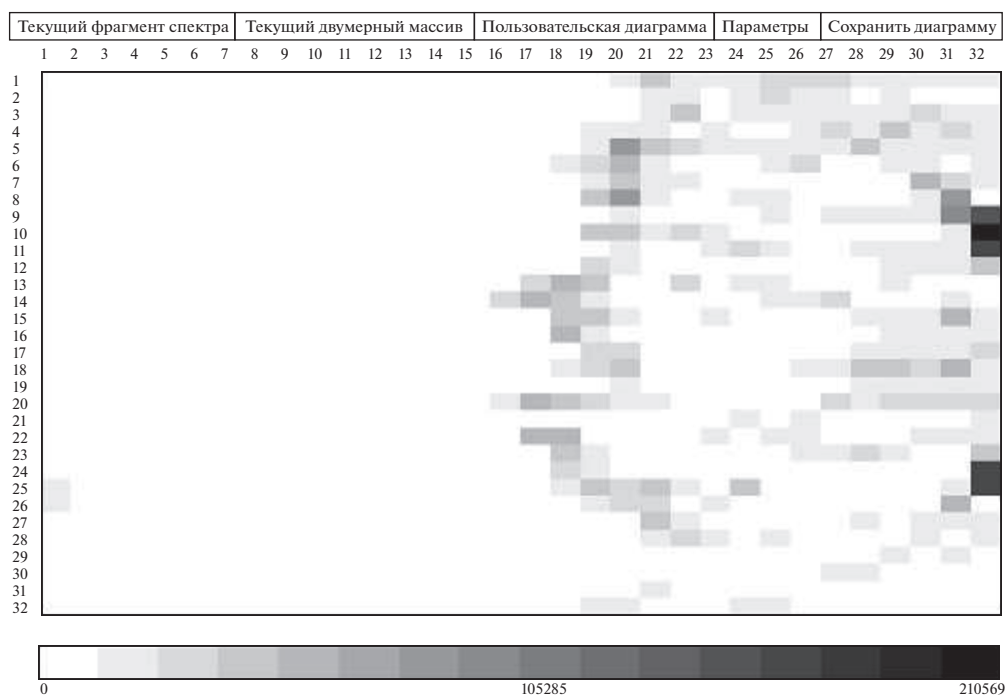


Рис. 3. Распределение аниона хлора по поверхности нержавеющей стали, закристаллизованного из раствора хлорида калия с концентрацией 10^{-4} М и с размером капли не более 500 мкм. Разрешение 32×32 точки с шагом 100 мкм (62500 dpi).

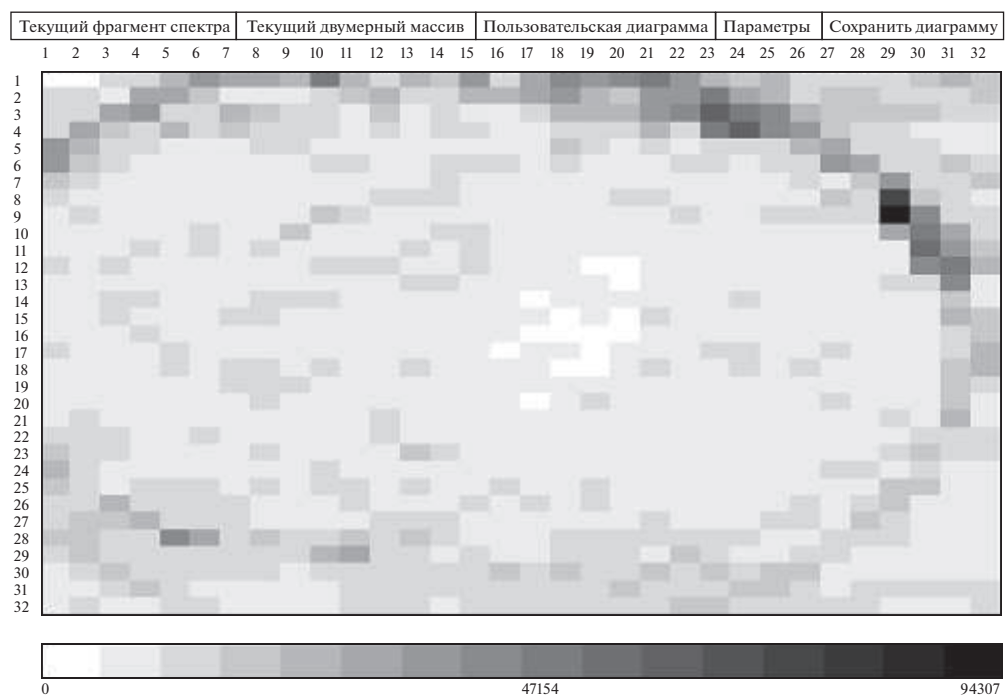


Рис. 4. Распределение аниона хлора по поверхности нержавеющей стали, закристаллизованного из раствора хлорида калия с концентрацией 10^{-3} М при “правильной”. Разрешение 32×32 точки с шагом 100 мкм (62500 dpi).

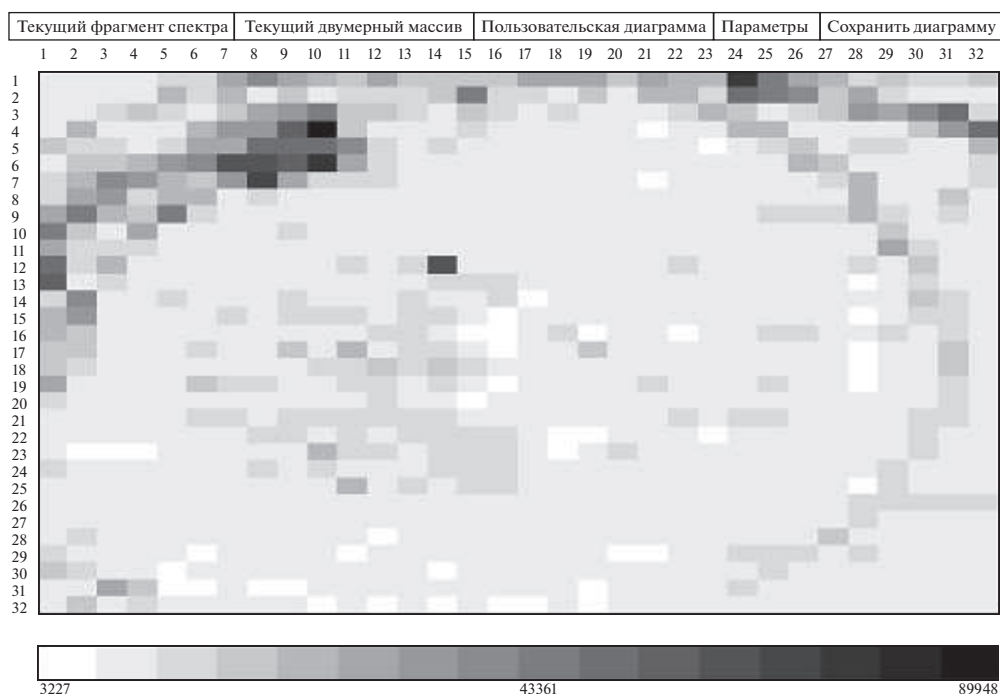


Рис. 5. Распределение аниона хлора по поверхности нержавеющей стали, закристаллизованного из раствора хлорида калия с концентрацией 10^{-1} М. Разрешение 32×32 точки с шагом 100 мкм (62500 dpi).

В таблице 1 приведены результаты исследования воспроизводимости аналитического сигнала при различных концентрациях хлорида калия. Видно, что “правильное” нанесение капли значительно влияет на ошибку измерения и качество калибровки, однако, даже при таком нанесении средняя ошибка измерения может достигать 20 процентов.

Помимо формы капли, значительно влияет фактор инородных частиц на исследуемой поверхности. Поэтому важна тщательная очистка поверхности перед исследованием с использованием высокочистых растворителей и нетканых материалов.

Таблица 1. Оценка погрешности измерения среднего аналитического сигнала по иону Cl^{35} в зависимости от различных факторов

Фактор	Полученная погрешность измерения аналитического сигнала, %
“Идеальная” капля	10–20 (максимальна в высоких концентрациях)
Капля с инородной частицей	15–50 (зависит от размера частицы)
Капля с высокой концентрацией вещества	15–20
Капля малого размера	>20

Отдельно следует отметить значительное влияние концентрации калибратора на относительную ошибку измерения. Данное явление характерно для большинства методов анализа и его влияние зависит от фазовой однородности аналита. Как следствие, этот фактор очень критичен для аналитов в твердом состоянии и закристаллизованных из раствора.

После поиска основных факторов искажения был проведен ряд экспериментов по калибровке с возможным нивелированием или исключением всех влияющих факторов. По результатам исследования было показано, что калибровка дает логарифмическую зависимость в диапазоне пяти порядков концентрации. Пример полученной калибровочной кривой приведен на рис. 6.

В оптимальных условиях наилучший доверительный интервал составлял 5–7%. При этом необходимо соблюдать все перечисленные выше условия. Также следует отметить, что разброс абсолютных значений логарифмически растет в области загиба калибровочной кривой выше концентрации 120 пкмоль/мм^2 . Загиб калибровочной кривой в области “высоких” концентраций объясняется нарастанием толщины закристаллизованного вещества, затрудняющего прожигание поверхности при ионизации до стали, что значительно снижает эффективность ионизации. При этом калибровка в диапазоне ниже 120 пкмоль/мм^2 аппроксимируется с большой точно-

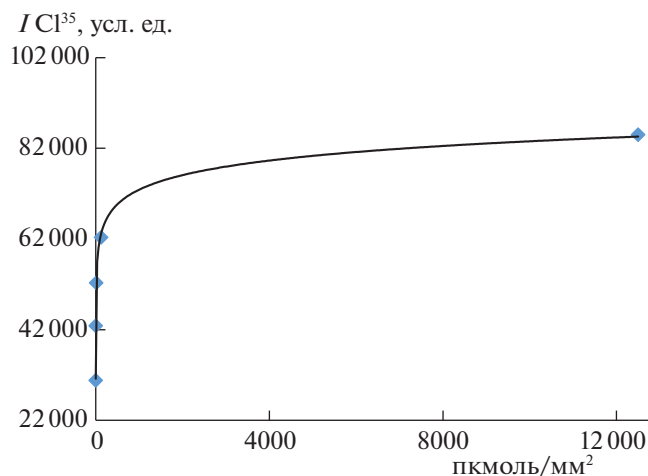


Рис. 6. Калибровочная кривая по хлору на поверхности нержавеющей стали, полученная при нивелировании или исключении всех мешающих факторов.

стью линейной зависимостью, как и в классических аналитических методах. В то же время было показано, что при атмосферной коррозии нержавеющей стали максимальные поверхностные концентрации хлора составляли не более 70–100 пкмоль/мм². Следовательно, метод поверхностной масс-спектрометрической ионизации с интегрированием сигнала по поверхности может быть эффективен для полуколичественного анализа содержания хлора на поверхности нержавеющей стали в диапазоне 0.12–120 пкмоль/мм².

Таким образом, авторами предложен комплекс мер по проведению калибровки и выполнению полуколичественного анализа хлора на поверхности нержавеющей стали методом поверхностной лазерной десорбции/ионизации. Несмотря на сложности с равномерностью распределения при кристаллизации калибранта из капли показано, что при использовании интегрального сигнала по всей капле возможно проведение полуколичественного анализа с доверительным интервалом сигнала 7–10%, что достаточно в анализе в области 0.12–120 пкмоль/мм². При этом необходимо строгое соблюдение следующих условий (помимо стандартных требований к любому анализу):

- капли калибровочного раствора наносимые на поверхность должны быть одинакового размера для всех концентраций калибранта;

- размер интегрируемой области при калибровке должен совпадать с размером исследуемой области образца;

- поверхность для нанесения калибровочных растворов должна быть очищена от мелких инородных частиц;

- капля калибранта должна занимать не менее 80% интегрируемой области.

При соблюдении этих условий даже учитывая физико-химические особенности масс-спектрометрии поверхности возможен полуколичественный анализ хлора в диапазоне четырех порядков и в оценочном режиме при более высоких концентрациях.

Благодаря высокой экспрессности и простоте пробоподготовки метод может быть использован для быстрого количественного мониторинга поверхности по хлору, что необходимо для оценки коррозионной опасности для исследуемого материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sandrin T.R., Goldstein J.E., & Schumaker S. // *Mass spectrum. Rev.* 2013. V. 32. № 3. P. 188.
2. Cobo F. // *Virologia J.* 2013. V. 7. P. 84.
3. Schwamborn K., Kriegsmann M., Weichert W. // *BBA – Proteins and Proteomics.* 2017. V. 1865. № 7. P. 776.
4. Scotcher K., Bradshaw R. // *Sci. rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 1.
5. Rivas D., Ginebreda A., Pérez S. et al. // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 566. P. 27.
6. Drzeżdżon J., Jacewicz D., Sielicka A., Chmurzyński L. // *TrAC Trends in Analyt. Chem.* 2019. V. 115. P. 121.
7. Schulz S., Becker M., Groseclose M.R. et al. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 55. P. 51.
8. Lukowski J.K., Weaver E.M., Hummon A.B. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 16. P. 8453.
9. LaBonia G.J., Lockwood S.Y., Heller A.A. et al. // *Proteom.* 2016. V. 16. № 11–12. P. 1814.
10. Kompauer M., Heiles S., Spengler B. // *Nat. methods.* 2017. V. 14. № 12. P. 1156.
11. Tucker L.H., Conde-González A., Cobice D. et al. // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 15. P. 8742.
12. Iartsev S.D., Matyushin D.D., Pytskii I.S. et al. // *Surf. Innov.* 2018. V. 6. № 4–5. P. 244.
13. Pytskii I.S., Minenkova I.V., Kuznetsova E.S. et al. // *Pure Appl. Chem.* 2020. V. 92. № 8. P. 1227.
14. Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Iartsev S.D., Buryak A.K. // *Colloid J+.* 2017. V. 79. № 4. P. 526.
15. Swales J.G., Dexter A., Hamm G. et al. // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 10. P. 6051.
16. Touve M.A., Carlini A.S., Gianneschi N.C. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1.
17. Angel P.M., Mehta A., Norris-Caneda K., Drake R.R. *Maldi Imaging Mass Spectrometry of n-Glycans and Tryptic Peptides from the Same Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Section.* In *Tissue Proteomics.* New York: Humana Press, 2017. P. 225.
18. Longuespée R., Ly A., Casadonte R. et al. // *Proteomics Clin. Appl.* 2019. V. 13. № 1. P. 180.