

# 石油芳烃组分中未知化合物——三叔丁基苯基磷酸酯的高分辨质谱分析

张亚和<sup>1,2\*</sup>, 廖晶<sup>3</sup>, 卢鸿<sup>3</sup>, 任丽敏<sup>2</sup>, 郭绍辉<sup>1</sup>, 徐春明<sup>2</sup>, 史权<sup>2</sup>

(1. 中国石油大学(北京)理学院, 北京 102249; 2. 中国石油大学(北京)重质油国家重点实验室, 北京 102249; 3. 中国科学院广州地球化学研究所 有机地球化学国家重点实验室, 广东 广州 510640)

**摘要:** 将大气压光电离(APPI)、电喷雾(ESI)、实时直接分析(DART)多种电离源和傅立叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR MS)联用对石油芳烃样品中的未知化合物进行研究。通过高分辨质谱的精确质量, 结合碰撞诱导解离(CAD)技术, 经分析与文献标准物质谱图比对, 推断未知物为三(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯(TDTBPP), 并研究了其在不同大气压电离源中的电离特性。APPI谱图中主要为 $[M+H]^+$ 峰, 同时存在 $M^+$ 峰。ESI谱图中主要为 $[M+Na]^+$ (不加甲酸)或 $[M+NH_4]^+$ 峰(加甲酸)。DART谱图中主要为 $[M+NH_4]^+$ 峰, 而EI谱图中基峰为 $m/z$  57(叔丁基), 次强峰为 $[M-CH_3]^+$ 峰。

**关键词:** 三(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯; 大气压光电离(APPI); 电喷雾(ESI); 实时直接分析(DART); 傅立叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR MS); 芳烃

中图分类号: O657.63; TE622.12 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2016)08-1026-05

## Identification of Tris(2,4-di-tert-butylphenyl) Phosphate in Petroleum Aromatics by FT-ICR MS with Multiple Ionization Techniques

ZHANG Ya-he<sup>1,2\*</sup>, LIAO Jing<sup>3</sup>, LU Hong<sup>3</sup>, REN Li-min<sup>2</sup>, GUO Shao-hui<sup>1</sup>, XU Chun-ming<sup>2</sup>, SHI Quan<sup>2</sup>

(1. College of Science, China University of Petroleum, Beijing 102249, China; 2. State Key Laboratory of Heavy Oil Processing, China University of Petroleum, Beijing 102249, China; 3. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** An unknown compound in petroleum aromatics was analyzed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS) coupled with atmospheric pressure photoionization (APPI), electrospray ionization (ESI) and direct analysis in real time (DART) ionization. It was determined as tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphate (TDTBPP) by the accurate mass of FT-ICR MS and collision-activated dissociation (CAD). The characteristic spectra of TDTBPP in multiple ionization sources were demonstrated. The result indicated that the main mass peak in APPI was  $[M+H]^+$ , and  $M^+$  was also present. The main mass peak in ESI was  $[M+Na]^+$  (without formic acid) or  $[M+NH_4]^+$  (with formic acid), and the main mass peak in DART was  $[M+NH_4]^+$ . APPI FT-ICR MS could be used to determine the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with relatively higher molecular weight which could not be determined by gas chromatography-mass spectrometry.

**Key words:** tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphate; atmospheric pressure photoionization (APPI); electrospray ionization (ESI); direct analysis in real time (DART); Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS); aromatics

气相色谱-质谱技术(GC-MS)是有机地球化学生物标志化合物研究不可缺少的技术手段<sup>[1]</sup>, 然而, 该技术仅能对饱和烃和芳烃组分中的烃类化合物开展有效分析。非烃组分中化合物更多, 近年来石油中杂原子化合物已开始应用于油气勘探研究, 可为源岩与油气成因类型<sup>[2-7]</sup>、成熟度<sup>[7-8]</sup>、油气

收稿日期: 2016-01-08; 修回日期: 2016-02-28

基金项目: 中国博士后科学基金(2015M571226); 国家自然科学基金青年科学基金(41503032); 国家自然科学基金(21236009, 21376262)

\* 通讯作者: 张亚和, 博士, 研究方向: 石油化学、质谱分析, Tel: 010-89734478, E-mail: zhangyh@cup.edu.cn, zhangyahe2000@163.com

运移及硫酸盐热化学还原反应(TSR)<sup>[7,9]</sup>等方面提供重要的识别与评价信息。但非烃杂原子化合物极性大、沸点高,分离富集较困难<sup>[10]</sup>,传统色谱-质谱的分辨率低、电离选择性差,难以全面反映非烃化物的分布面貌<sup>[11-12]</sup>。

新近发展起来的傅立叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR MS)具有非常高的分辨率和质量准确度,可从分子层次研究石油的化学组成,在非烃分子组成研究方面取得了重大进展,推动石油化学进入“石油组学”(Petroleomics)<sup>[13-15]</sup>研究的新时代。在石油组分相对分子质量范围(200~1 000 Da)内 FT-ICR MS 的分辨率高达几十万甚至上百万,可精确地确定由 C, H, N, O, S 及其主要同位素所组成的各种元素组合,真正从分子层次上研究石油分子组成。结合新型软电离技术,可以直接、高选择性地电离石油中的非烃杂原子化合物<sup>[16-18]</sup>。同时,FT-ICR MS 可以直接提供分子组成信息,全程“监控”分离过程,监测目标化合物的走向与分布<sup>[12,19]</sup>;可快速建立分离富集方法,发现新型生物标志化合物<sup>[12,19-22]</sup>,在有机地球化学理论研究和油气勘探实践方面具有重大的应用价值。

此前在江汉原油和源岩常规 GC-MS 研究中,发现 1 个未知化合物峰稳定出现在芳烃组分中,依据质谱图难以判断其化合物类型和结构。本文采用 FT-ICR MS 结合大气压光电离(APPI)、电喷雾(ESI)、实时直接分析(DART)电离源,对该未知化合物峰进行分析,通过精确分子量得到谱峰的分子式,采用碰撞活化解离(CAD)技术,隔离出母离子,逐级碰撞解离得到碎裂离子,经综合分析并与文献标准物质谱图比对,最终鉴定该化合物为三(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯,并研究了其在不同电离源中的电离特性。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

ApexUltra 型傅立叶变换离子回旋共振质谱(美国 Bruker 公司),磁场强度为 9.4 T; 配备 ESI, DART, APPI 电离源。甲苯、甲醇、二氯甲烷均为分析纯(北京化工厂),重蒸后保存在磨砂广口瓶中备用。甲酸(纯度 99%, Fluka 公司)。

### 1.2 样品制备

分析所用样品为江汉盆地某油井样品经四组分分离<sup>[23]</sup>得到的芳烃组分。气相色谱-质谱:用二氯甲烷配成 10 mg/mL 溶液。ESI:用甲苯配成 10 mg/mL 溶液,取 20  $\mu$ L 溶于 1 mL 甲苯-甲醇(1:3)混合溶液,负离子模式加入 20  $\mu$ L 28% 氨水,正离子模式加入 20  $\mu$ L 甲酸,超声振荡混合均匀后,进行 ESI FT-ICR MS 分析。DART:用甲苯配成 10 mg/mL 溶液。APPI:用甲苯配成 10 mg/mL 溶液,取 20  $\mu$ L 溶于 1 mL 甲苯。

### 1.3 GC-MS 分析

采用 Bruker 公司 SCION TQ 三重四极杆 GC-MS 联用仪分析石油芳烃。电离源为 EI, 70 eV; 质量扫描范围为 35~1 000; 色谱柱为 HP-5MS(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m) 石英毛细柱; 升温程序为: 初始 50  $^{\circ}$ C 保持 1 min, 以 15  $^{\circ}$ C/min 升至 100  $^{\circ}$ C, 然后以 3  $^{\circ}$ C/min 升至 300  $^{\circ}$ C, 保持 15 min。进样口恒温 300  $^{\circ}$ C, 不分流进样。

### 1.4 FT-ICR MS 分析

ESI FT-ICR MS 主要仪器参数: 极化电压 3 500 V, 毛细管入口电压 4 000 V, 毛细管出口电压 320 V, 四极杆  $Q_1=250$  Da, 碰撞能量 1.5 V, 源累积时间 0.01 s, 碰撞池累积时间 0.02 s, 离子导入分析池飞行时间 1.2 ms; 采集质量范围 200~1 000 Da, 采样点数 4 M, 扫描次数 64 次, 偏转电压 -6 V, 偏转补偿电压 1.95 V, 激发衰减 12 dB, 前板电压 -1.10 V, 后板电压 -1.15 V。进样速度 180  $\mu$ L/h, 干燥气温度 200  $^{\circ}$ C。

DART 电离源: 正离子模式, 氮气作为载气, 流速为 2.5 L/min, 加热温度为 350  $^{\circ}$ C, 离子源出口与质谱进样接口的距离为 3.5 cm。APPI 电离源: 正离子模式, 雾化温度为 350  $^{\circ}$ C。

## 2 结果与讨论

### 2.1 石油芳烃中未知物的 GC-MS 谱图

石油芳烃的 GC-MS 总离子流图(TIC)及未知物质的谱图见图 1。该芳烃的主要化合物组成为无侧

链或短侧链的芳香母核化合物,包括菲类、芴类、氧芴、硫芴、苯并萘并噻吩、苯基萘、芘类、蒽类、苯并芘、苯并花、苯并萘并咪喃等。图 1 插图为在 TIC 谱图中丰度较高的未知化合物峰质谱图。其基峰为  $m/z$  57, 碎片离子  $m/z$  647 和  $m/z$  662 较高,其质量差 15 对应  $\text{CH}_3$ ; 由于采用 70 eV 的 EI 电离源,因此不能确定  $m/z$  662 是否为分子离子。另外,还存在 5 个与  $m/z$  647 依次相差 56 的碎片离子,推测相差基团碎片为  $\text{C}_4\text{H}_8$ 。经谱库(NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0 g, build May 19 2011)检索,未检索到匹配的化合物。综合而言,根据这些质谱信息很难推测该未知峰的具体结构。此外,未知物左侧小峰基峰为  $m/z$  57, 碎片离子  $m/z$  663 和  $m/z$  678 较高,同样难以确定其结构。

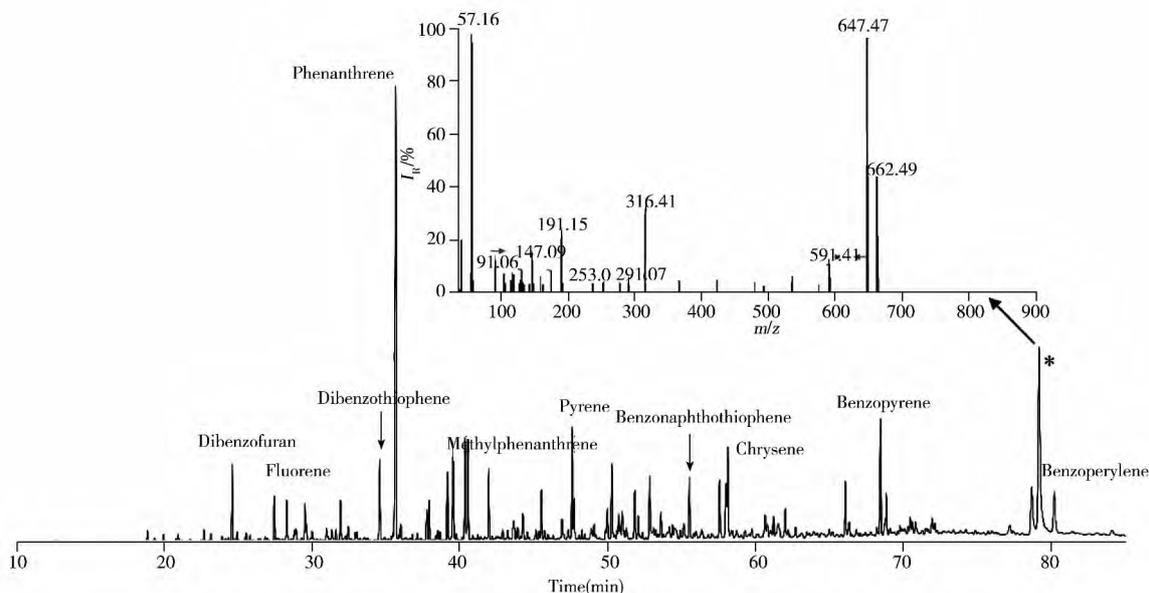


图 1 芳烃的 TIC 谱图及未知化合物峰(标记为\*号)的质谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the aromatics and the mass spectrum of unknown compound( noted\* )

## 2.2 正离子 APPI FT-ICR MS 谱图

对芳烃样品用正离子 APPI FT-ICR MS 进行分析,谱图如图 2 所示。由于 APPI 同时产生自由基离子和质子化离子,因此,可同时看到  $\text{M}^+$  和  $[\text{M} + \text{H}]^+$  质谱峰,两者的质量误差均小于 0.2 ppm,对应分子式分别为  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{O}_4\text{P}$  和  $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_4\text{P}$ ,推断其为磷酸酯,GC-MS 中  $m/z$  622 应为其分子离子。但与稠环芳烃不同的是,APPI 谱图中稠环芳烃一般主要为  $\text{M}^+$ ; 而该未知物主要为  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $\text{M}^+$  相对丰度较低。此外,正离子 APPI FT-ICR MS 可以检测到许多大分子( $300^+$ )稠环芳烃化合物,这是传统 GC-MS 无法气化检测的,揭示出芳烃的复杂程度远超传统 GC-MS 的结果<sup>[24]</sup>。该 FT-ICR MS 谱图中未检测到小于 200 的质量峰,这是由 FT-ICR MS 传输系统质量歧视作用造成的,通过调节离子传输参数,也可以分析小分子芳烃化合物。同时,还检测到  $m/z$  678 分子离子对应的  $\text{M}^+$  和  $[\text{M} + \text{H}]^+$  质谱峰  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{O}_5\text{P}$  和  $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_5\text{P}$ ,但其丰度较低。

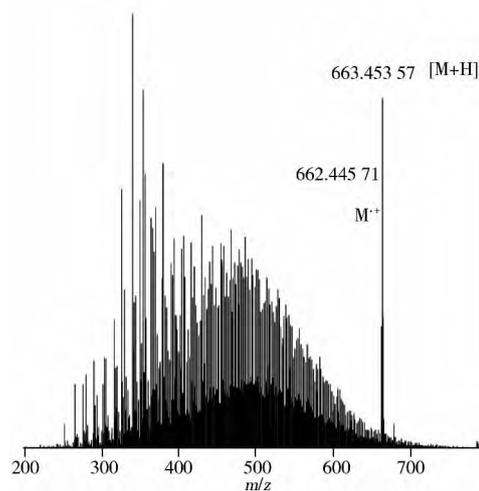


图 2 芳烃的正离子 APPI FT-ICR MS 谱图  
Fig. 2 Positive-ion APPI FT-ICR MS spectrum of aromatics

## 2.3 正离子 ESI FT-ICR MS 谱图

进一步用 ESI 电离源进行验证,以负离子 ESI FT-ICR MS 对该样品进行直接进样分析,未检测到目标峰。采用正离子 ESI FT-ICR MS 进行分析,结果显示,在不加甲酸的情况下,谱图中基峰为  $m/z$  685.434 48,由同位素峰可知其带 1 个电荷,经高分辨质谱精确质量分析确定其分子式为  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{O}_4\text{PNa}$ 。

在 1 mL 的  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  分析物中加入  $20 \mu\text{L}$  甲酸重新进行分析, 所得谱图中基峰变为  $m/z$  680.479 21, 同时发现存在  $m/z$  663.454 08 峰, 结合以上分析结果, 推测该化合物的分子离子峰为 662,  $m/z$  685.434 48, 680.479 21, 663.454 08 分别为  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ,  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  和  $[\text{M} + \text{H}]^+$  峰。不加甲酸时, 由于仪器经常做负离子样品添加氨水电离促进剂, 管路为碱性环境, 因此易产生  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ; 加甲酸后, 管路为中性环境, 铵离子的存在也会导致产生  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 。根据 ESI 电离机理, 这些峰的存在均合理, 其结果可以相互印证。还检测到  $m/z$  678 分子离子对应的  $[\text{M} + \text{H}]^+$  质谱峰  $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_5\text{P}$ , 但其丰度非常低。

为进一步确定该未知化合物的分子结构, 采用碰撞诱导解离 (CAD) 技术对加甲酸条件下产物的  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  在四极杆中进行母离子隔离, 随后在碰撞池中用氦气碰撞, 在不同碰撞电压 (CV) 下得到系列谱图。结果显示, 在  $\text{CV} = 6 \text{ V}$  时, 即可将  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  大部分打碎, 得到  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; 进而在  $\text{CV} = 12 \sim 40 \text{ V}$  条件下, 依次失去 6 个  $\text{C}_4\text{H}_8$  基团, 得到相当稳定的  $m/z$  327.1  $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{24}\text{H}_{48}]^+$  离子, 即  $[\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P} + \text{H}]^+$ , 由此推测其母核结构为三苯基磷酸酯, 推断未知化合物为三(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯, 结构式如图 3 所示。根据 EI

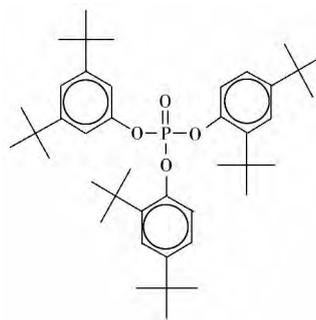


图 3 三(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯的结构式  
Fig. 3 Structural formula of tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphate

电离源谱图, 该化合物在 EI 电离源中的分子离子为  $m/z$  662, 脱去 15 (即  $\text{CH}_3$ ) 产生稳定的  $m/z$  647  $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$  离子, 依次失去 56 (即  $\text{C}_4\text{H}_8$ ) 得到相应碎片离子, 基峰  $m/z$  57 为叔丁基  $\text{C}_4\text{H}_9$ ,  $m/z$  91 为亚甲基苯,  $m/z$  147 为亚甲基-叔丁基苯,  $m/z$  191 为二叔丁基苯酚, 每个碎片均得到合理解释。而且该结果和文献标准品结果完全一致<sup>[25]</sup>, 因此, 可以确定该未知化合物分子结构为三(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯。有文献报道该化合物为抗氧化剂 Irgafos 168 的氧化产物<sup>[25-26]</sup>, 也有文献报道从黄荆 (*Vitex negundo* L.) 叶子中分离提取出该化合物<sup>[27-28]</sup>。如果该化合物来自石油而非污染物, 有可能提供相关的母源生物或成岩反应信息, 其具体来源有待进一步研究。

## 2.4 正离子 DART FT-ICR MS 谱图

DART 是近年快速发展起来的一种新型实时直接分析离子源, 是一种热解析和离子化技术, 尤其适合快速筛查。为考察三(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯在 DART 电离源中的电离特性, 并验证 ESI 的结果, 对此芳烃样品进行了 DART FT-ICR MS 分析 (图 4), 发现其主要为  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  质谱峰, 也存在  $[\text{M} + \text{H}]^+$  质谱峰, 但丰度较低。有文献报道<sup>[29]</sup>, 当铵离子存在时, DART 电离源会产生  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ , 尤其是含有羰基的化合物及过氧化物, 本研究发现磷酸酯类化合物也会产生  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 。邻苯二甲酸酯类和硅氧化合物的本底较高。在  $\text{CV} = 12 \text{ V}$  时,  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  质谱峰的 CAD 谱图结果与 ESI 相似, 主要为  $[\text{M} + \text{H}]^+$  质谱峰, 同时产生  $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_4\text{H}_8]^+$  碎片峰。

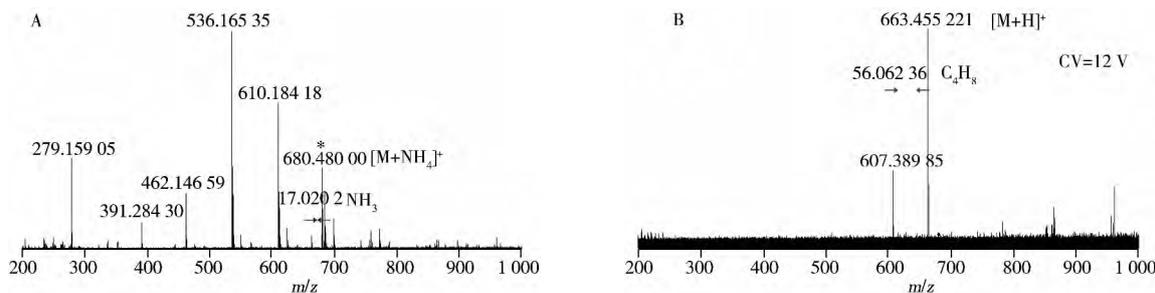


图 4 芳烃的正离子全谱 (A) 及其隔离碰撞 DART FT-ICR MS 谱图 (B)

Fig. 4 Positive-ion mass spectrum (A) and CAD DART FT-ICR MS spectrum (B) of aromatics

### 3 结 论

采用 APPI, ESI, DART 多种离子源和 FT-ICR MS 对石油芳烃组分 GC-MS 谱图中的未知化合物谱峰进行研究, 根据高分辨质谱的精确质量, 结合碰撞活化解离 (CAD) 技术, 推断未知物结构为三(2,4-二叔丁基苯基)磷酸酯, 分子式为  $C_{42}H_{63}O_4P$ , EI 谱图与文献标准品谱图完全吻合。此外, 还研究了其在不同大气压电离源中的电离特性, 各电离源各有特点, 结果相互支撑。APPI 可同时电离芳烃类化合物, 磷酸酯在谱图中主要为  $[M+H]^+$ , 同时存在  $M^+$ ; ESI 谱图中主要为  $[M+Na]^+$  (不加甲酸) 或  $[M+NH_4]^+$  (加甲酸); DART 谱图中主要为  $[M+NH_4]^+$ 。如果该化合物确实来自石油, 有望为其提供相关的母源生物或成岩反应信息。

#### 参考文献:

- [1] Song G X, Li Z G, Wang C, Xu C L. *J. Instrum. Anal.* (宋桂侠, 李振广, 王成, 徐春龙. 分析测试学报), **2005**, 24(6): 411-414.
- [2] Barrow M P, McDonnell L A, Feng X D, Walker J, Derrick P J. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(4): 860-866.
- [3] Teräväinen M J, Pakarinen J M H, Wickström K, Vainiotalo P. *Energy & Fuels*, **2007**, 21(1): 266-273.
- [4] Pakarinen J M H, Teräväinen M J, Pirskanen A, Wickström K, Vainiotalo P. *Energy & Fuels*, **2007**, 21(6): 3369-3374.
- [5] Bae E, Na J G, Chung S H, Kim H S, Kim S. *Energy & Fuels*, **2010**, 24(4): 2563-2569.
- [6] Hughey C A, Galasso S A, Zumbeke J E. *Fuel*, **2007**, 86(5/6): 758-768.
- [7] Li S M, Pang X Q, Shi Q, Zhang B S, Zhang H Z, Pan N, Zhao M. *Energy, Exploration & Exploitation*, **2011**, 29(6): 711-742.
- [8] Hughey C A, Rodgers R P, Marshall A G, Walters C C, Qian K N, Mankiewicz P. *Org. Geochem.*, **2004**, 35(7): 863-880.
- [9] Walters C C, Qian K N, Wu C P, Mennito A S, Wei Z B. *Org. Geochem.*, **2011**, 42(9): 999-1006.
- [10] Wang P R. *Non-hydrocarbon Geochemistry and Its Application*. Beijing: Petroleum Industry Press(王培荣. 非烃地球化学和应用. 北京: 石油工业出版社), **2001**.
- [11] Liu P, Li M W, Sun Y G, Jiang Q G, Tao G L, Cao T T. *J. Instrum. Anal.* (刘鹏, 黎茂稳, 孙永革, 蒋启贵, 陶国亮, 曹婷婷. 分析测试学报), **2014**, 33(1): 57-62.
- [12] Zhang Y H, Xu C M, Shi Q, Zhao S Q, Chung K H, Hou D J. *Energy & Fuels*, **2010**, 24(12): 6321-6326.
- [13] Marshall A G, Rodgers R P. *Acc. Chem. Res.*, **2004**, 37(1): 53-59.
- [14] Rodgers R P, Schaub T M, Marshall A G. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(1): 20A-27A.
- [15] Marshall A G, Rodgers R P. *PNAS*, **2008**, 105(47): 18090-18095.
- [16] Qian K N, Robbins W K, Hughey C A, Cooper H J, Rodgers R P, Marshall A G. *Energy & Fuels*, **2001**, 15(6): 1505-1511.
- [17] Hughey C A, Rodgers R P, Marshall A G, Qian K, Robbins W K. *Org. Geochem.*, **2002**, 33(7): 743-759.
- [18] Qian K N, Rodgers R P, Hendrickson C L, Emmett M R, Marshall A G. *Energy & Fuels*, **2001**, 15(2): 492-498.
- [19] Zhang Y H, Shi Q, Li A Q, Chung K H, Zhao S Q, Xu C M. *Energy & Fuels*, **2011**, 25(11): 5083-5089.
- [20] Zhang Y H, Zhao H, Shi Q, Chung K H, Zhao S Q, Xu C M. *Energy & Fuels*, **2011**, 25(7): 3116-3124.
- [21] Zhao X, Shi Q, Gray M R, Xu C M. *Sci. Rep.*, **2014**, 4: 1-6.
- [22] Zhao X, Liu Y, Xu C M, Yan Y Y, Zhang Y H, Zhang Q Y, Zhao S Q, Chung K, Gray M R, Shi Q. *Energy & Fuels*, **2013**, 27(6): 2874-2882.
- [23] Shi Q, Hou D J, Chung K H, Xu C M, Zhao S Q, Zhang Y H. *Energy & Fuels*, **2010**, 24(4): 2545-2553.
- [24] Jiang B, Liang Y M, Xu C M, Zhang J Y, Hu M, Shi Q. *Environ. Sci. Technol.*, **2014**, 48(9): 4716-4723.
- [25] Tanaka Y, Takahashi K, Sasao T, Kirigaya T, Hosoi S, Nagaoka N, Kawamura T, Nakazawa H. *Shokuhin Eiseigaku zasshi. J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **2003**, 44(4): 181-185.
- [26] Simoneit B R T, Medeiros P M, Didyk B M. *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39(18): 6961-6970.
- [27] Vinuchakkaravarthy T, Sangeetha C K, Velmurugan D. *Acta Crystallogr. Sect. E*, **2010**, 66(Pt 9): o2207-o2208.
- [28] Vinuchakkaravarthy T, Kumaravel K P, Ravichandran S, Velmurugan D. *Bioinformation*, **2011**, 7(4): 199-206.
- [29] Cody R B. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(3): 1101-1107.