



УДК 615.07

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА MALDI/TOF/MS В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

**Д.И. ПИСАРЕВ¹, О.О. НОВИКОВ¹
Г.В. ВАСИЛЬЕВ¹, О.А. СЕЛЮТИН²**

¹ *Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

² *Центр контроля качества
и сертификации лекарственных
средств, г. Воронеж*

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

В статье представлены результаты исследований, посвящённых разработке методологии анализа некоторых тест-препаратов, относящихся к различным химическим группам, с помощью метода MALDI/TOF/MS.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, карнозин, резвератрол, флавоноиды.

Введение. В данной статье представлены результаты собственных исследований, посвящённых разработке методологии анализа некоторых тест-препаратов, относящихся к различным химическим группам, с помощью метода MALDI/TOF/MS. Выбор объектов исследования является практически случайным, так как именно такой подход, на наш взгляд, в полной мере позволил наглядно показать возможности метода масс-спектрометрии, широту его аналитических возможностей.

Кроме того, предлагаемые наборы разработанных методик имеют реальную практическую значимость, так как решают в достаточной степени весь спектр аналитических задач, связанных с конкретными объектами исследования.

Для решения задач, стоящих перед современной химией и фармацией, требуется использование методов быстрого и надежного анализа на молекулярном уровне как индивидуальных веществ, так и сложных смесей. Использование классических методов разделения (колоночная, тонкослойная, бумажная хроматография) и анализа (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопия) до сих пор широко распространено, поскольку предоставляет большой объём важной информации о строении соединения. Так, УФ-спектр указывает на тип ароматической системы или сопряжённого хромофора, ИК-спектр позволяет обнаружить наличие функциональных групп, спектр ЯМР позволяет определить атомы, входящие в молекулу, и то, как они между собой соединены химическими связями, т. е. определить или подтвердить структуру вещества (основная задача метода). Эти методы не требуют дорогостоящего аппаратного оснащения (исключение ЯМР). Однако их использование в большинстве случаев оправдано только тогда, когда устанавливается структура нового соединения, поскольку они имеют ряд существенных недостатков. В частности, требуют наличия большого количества образца в очень чистом состоянии, сопровождаются длительной пробоподготовкой, имеют недостаточную чувствительность, экспрессность и селективность, характеризуют какой-либо один структурный элемент молекулы, что обуславливает их совокупное использование для характеристики вещества, часто сопряжены с использованием базы данных.

Поэтому для анализа биологически активных веществ в настоящее время наибольшее распространение приобрели хроматографические методы, а именно высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и газожидкостная хроматография (ГЖХ). Настоящие хроматографические методы являются многоканальными источниками информации, то есть с их помощью одновременно реализуется большое число параметров, характеризующих разделение, идентификацию, количественную оценку компонентов. Метод ВЭЖХ является более гибким, чем ГЖХ, что определяется его возможностью определения термолabileльных и малолетучих веществ. Поэтому ВЭЖХ

идеально отвечает всем требованиям, предъявляемым к аналитическим методам по селективности и чувствительности. Метод ВЭЖХ, однако, не всегда удобен из-за его низкой пропускной способности и большой продолжительности исследований.

Несмотря на практически полное отсутствие слабых сторон ВЭЖХ, конкуренцию ему может составить масс-спектрометрический метод (МС).

Установлено, что с помощью МС решается большое количество аналитических задач. Качественные исследования используются для установления структуры неизвестных органических соединений различного происхождения, в том числе природных, синтетических, метаболитов лекарственных веществ. МС даёт важную информацию для определения молекулярной массы, структуры молекул. Среди масс-спектрометрических методов метод *MALDI/TOF/MS* стал мощным аналитическим инструментом в химических и биологических исследованиях за счет высокой производительности и чувствительности, мягкой и эффективной ионизации нелетучих веществ, толерантности к присутствию примесей, скорости определения молекулярных масс, а также относительной простоте получаемых масс-спектров [1, 2].

Несмотря на это, МС до сих пор считается методом, дополняющим информацию, получаемую с помощью других физических методов. К тому же зачастую МС – это весьма удобный метод детекции результатов хроматографического разделения [3-5].

Существующий подчинённый характер данного метода ограничивает его применение в индивидуальном приложении для анализа таких весьма сложных объектов, как природные соединения. Имеющиеся в литературе данные [4-7] по изучению с помощью масс-спектрометрии природных соединений не имеют системного характера, поэтому требуют обобщения.

Нами выбран метод *MALDI* для разработки количественного определения, поскольку он имеет значительные преимущества перед другими методами масс-спектрометрии, основные из которых перечислены в таблице.

Как видно из данных таблицы, конкурентные *MALDI/TOF/MS* методы электро-спрейной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении имеют исключительно вторичный характер в качестве детекторов в методе ВЭЖХ и самостоятельного применения не имеют. К тому же метод *ESI/MS* требует нахождения вещества в растворённом виде в полярном растворителе, что подходит для анализа только полярных соединений. Хотя этого недостатка лишён метод *APCI/MS*, однако при его использовании возможно термическое разложение образца.

Чтобы полностью и реалистично оценить возможности *MALDI/TOF/MS*, необходимо установить его сильные и слабые стороны.

Основные достоинства метода:

1. *Универсальность*. Метод *MALDI/TOF/MS* подходит для анализа соединений любой степени сложности, полярности и термочувствительности.

2. *Высокая чувствительность*. Замечательной особенностью МС является сверхвысокая чувствительность, недостижимая никакими другими методами. Следствием этого является возможность обойтись незначительным количеством образца для анализа.

3. *Широкий диапазон измерений масс*. Метод *MALDI/TOF/MS* позволяет определять молекулярную массу соединений от 0 до 300000 дальтон.

4. *Использование для неочищенных образцов*. Вследствие дифференцирующей возможности времяпролётного анализатора масс (*TOF/MS*), на одном спектре можно наблюдать наличие всех компонентов сложной смеси без предварительного сложного и длительного по времени её разделения и очистки на индивидуальные компоненты. Следовательно, для анализа не требуется сложной пробоподготовки.

5. *Возможность идентификации*. Поскольку *MALDI/TOF/MS* относится к методам мягкой ионизации, то в спектре можно наблюдать пик молекулярного иона, что может служить в качестве способа идентификации. Точное измерение массы с высоким разрешением является важным инструментом, наряду с другими спектральными методами для подтверждения структуры природных соединений. Он также использу-



ется в качестве структурного доказательства, когда элементный анализ не представляется возможным, например, при изучении второстепенных компонентов.

Таблица

Сравнение основных способов ионизации в масс-спектрометрии

Способ ионизации	Диапазон масс (Da)	Влияние матрицы	Разложение	Сложные смеси	Совместимость с ЖХ	Чувствительность
Ионизация электроспрея (ESI)	70000	Нет	Нет	Ограничено	Превосходно	От фемтомоля до пикомоля
Комментарии	Подходит для совмещения жидкостной хроматографии (ЖХ) и МС; устойчивость к небольшим концентрациям солей (до нескольких мМ); многократная зарядка полезна, но значительно подавлена в случае смесей; низкая устойчивость к смесям; мягкая ионизация (наблюдается мало фрагментов)					
NanoESI	70000	Нет	Нет	Несколько ограничено, но лучше, чем ESI	Возможно	От зептомоля до фемтомоля
Комментарии	Очень чувствителен и очень малые скорости потока; применим для ЖХ/МС, но малые скорости потока требуют специальных систем; умеренная устойчивость к солям (до нескольких мМ); многократная зарядка полезна, но может быть подавлена в случае смесей; умеренно применим для смесей; мягкая ионизация (наблюдается мало фрагментов)					
APCI	1200	Нет	Термическое разложение	Ограничено	Превосходно	Фемтомоли
Комментарии	Превосходно для совмещения ЖХ и МС; малая устойчивость к солям (до нескольких мМ); применимо к гидрофобным образцам					
MALDI	300000	Есть	Фоторазложение и реакции с матрицей	Хорошо для сложных смесей	Возможно	Фемтомоли
Комментарии	Несколько устойчиво к солям; высокая чувствительность; фон матрицы может быть проблемой для ионов с малой массой; мягкая ионизация (наблюдается мало фрагментов); возможно фоторазложение; применимо к сложным смесям. Многократная зарядка весьма ограничена, так что данные не соотносятся с некоторыми другими способами.					
Комментарии	Относительно слабочувствителен; малая фрагментация; мягкая ионизация; высокая устойчивость к солям – до 0,01М; необходима растворимость в матрице					
Электронная ионизация (EI)	500	Нет	Термическое разложение	Ограничено, если не используется ГЖХ/МС	Очень ограничено	Пикомоли
Комментарии	Хорошая чувствительность; уникальные данные по фрагментации с возможностью просмотра по базам данных; термическое разложение – основная проблема для биомолекул и других высокомолекулярных соединений					

6. *Возможность количественного определения.* МС является мощным методом количественного анализа, основанием к этому является факт, что масс-спектрометрический сигнал пропорционален потоку частиц.

7. *Надёжность и точность.* При использовании МС возможно получение очень точного значения молекулярной массы. Значение прямого определения молекулярной массы с точностью до 0,1 единицы трудно переоценить.

8. *Структурная информация.* По данным масс-спектра можно сделать вывод относительно размера и структуры углеродных заместителей, структурной информации, характера агликона и заместителей (сахара, ацильные группы и т. д.); межгликозидных связей и позиции замещения агликона, а также углеводной последовательности. К тому же в масс-спектрах можно наблюдать структурные изменения в молекуле (гидролиз, окисление).

9. *Экспрессность.* *MALDI/TOF/MS* позволяет быстро получать и обрабатывать результаты, часто требуя меньше минуты для фактического анализа после элементарной пробоподготовки. Это позволяет осуществлять быстрый скрининг веществ.

10. *Простота.* Предоставляемая *MALDI/TOF/MS* информация понятна даже непрофессионалам, поскольку интерпретация масс-спектрометрических данных не требует глубоких знаний в данной области. Также прибор не требует особого обслуживания, расходных материалов.

Недостатки метода:

1. *Высокая стоимость оборудования.* Стоимость оборудования некоторых приборов может достигать десятков тысяч евро, хотя имеющиеся настольные приборы позволяют компенсировать этот недостаток.

2. *Влияние пиков матрицы.* Наблюдению молекулярного пика иона могут мешать пики матрицы. Поскольку для регистрации спектров веществ используется матрица, она может накладываться на пики основных веществ с молекулярной массой ниже 500 Da. Но в общем случае матрица пригодна к использованию для анализа малых молекул, если она обеспечивает эффективную ионизацию, минимальную фрагментацию и не вызывает наложений сигналов в масс-спектре.

3. *Невозможность определить изомеры.* Поскольку изомеры имеют одинаковую молекулярную массу, следовательно, с помощью масс-спектрометрии их различить нельзя. К тому же масс-спектрометрия даёт мало информации о конфигурации гликозидной связи.

Таким образом, представленные результаты сравнительного анализа *MALDI/TOF/MS* позволяют сделать вывод о существенном преобладании достоинств настоящего метода. Большинство перечисленных недостатков может быть легко компенсировано.

Ниже в качестве примеров представлены результаты анализа ряда соединений различного происхождения методами *MALDI/TOF/MS*.

Экспериментальная часть

Использование *MALDI/TOF/MS* для идентификации резвератрола

Для идентификации субстанции резвератрола методом *MALDI/TOF/MS* использовали $2,5 \times 10^{-5}$ г/мл раствор в смеси спирта этилового 96% и ацетонитрила, который в количестве 0,5 μ л с помощью дозатора наносили на мишень, высушивали и сверху наносили каплю матрицы, и после высушивания регистрировали масс-спектр, который приведён на рис. 1.

В масс-спектре резвератрола наблюдаются интенсивные пики молекулярных ионов с зарядом $m/z = 228,347$ и $229,231$. Это свидетельствует о том, что резвератрол ионизируется частично (пик иона с зарядом $m/z = 229,321$), а часть молекулы не претерпевает ионизации и показывает пик незаряженной молекулы (пик иона с зарядом $m/z = 229,321$). Данное поведение резвератрола при ионизации в методе *MALDI/TOF/MS* может являться его специфической особенностью и однозначно характеризовать его подлинность. Отсутствие других интенсивных пиков молекулярных ионов в масс-спектре даёт дополнительную информацию о чистоте субстанции. Чувствительность метода составляет $<1,2 \times 10^{-8}$ г/мл.

Представленный метод позволяет однозначно подтвердить подлинность и чистоту резвератрола, характеризуется минимальной пробоподготовкой, исключительно высокой чувствительностью, не достижимой другими методами, легко реализуется за весьма короткий промежуток времени (общее время анализа, включая пробоподготовку, составляет несколько минут).

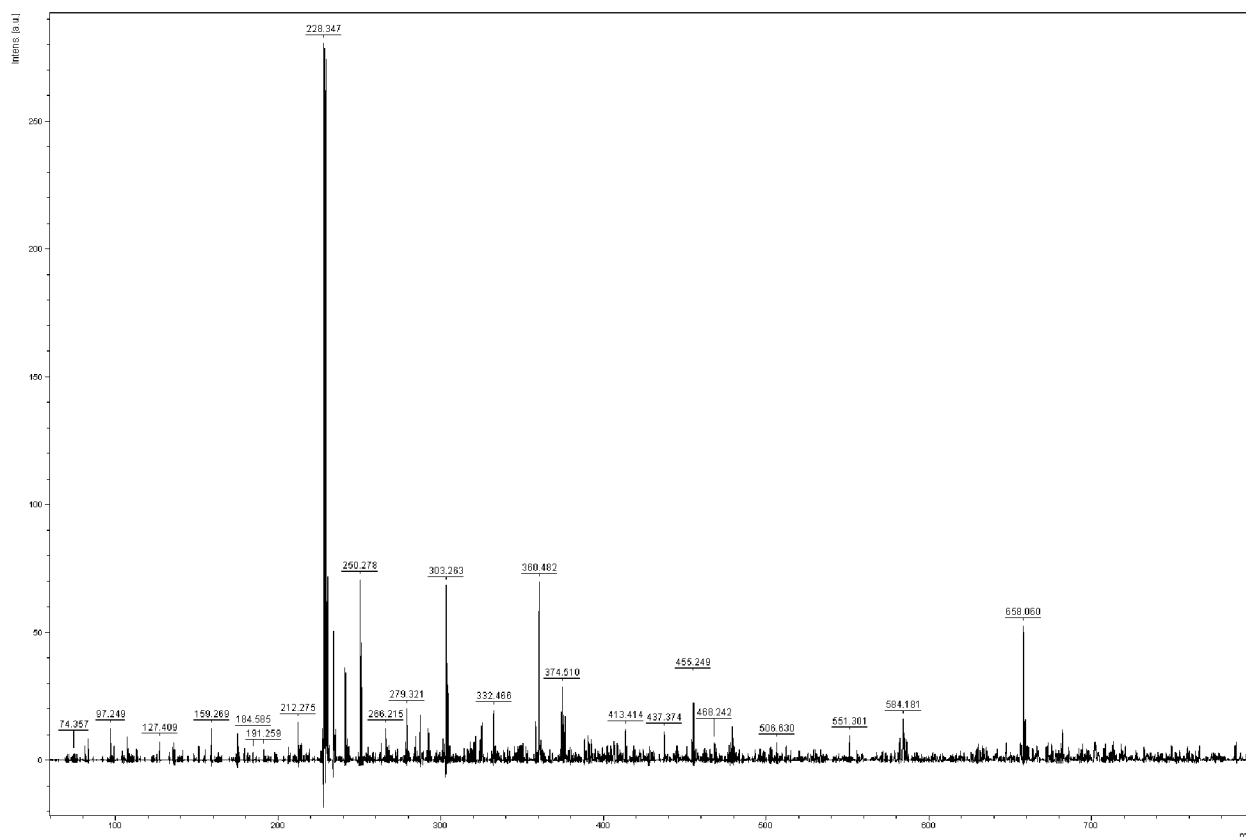


Рис. 1. Масс-спектр резвератрола, полученный *MALDI/TOF/MS*

Определение резвератрола в продуктах растительного происхождения

Для разработки идентификации резвератрола в объектах растительного происхождения использована экспресс-методика *MALDI/TOF/MS*, подтверждение правильности получаемых результатов осуществляли с помощью ВЭЖХ на обращенных фазах в градиентном режиме элюирования.

В качестве объектов исследования задействованы плоды винограда (чёрный сорт кишмиш), биологически активная добавка – пищевой концентрат полифенолов винограда «Эноант» (Украина).

Полученные результаты масс-спектрометрического определения представлены на рис. 2.

На представленном рис. 2 видно, что компонент, имеющий пик молекулярного иона $m/z = 228,218$, соответствует молекулярной массе резвератрола.

Таким образом, использованная методика позволяет экспрессно, достоверно подтвердить присутствие резвератрола в анализируемых образцах без предварительного хроматографического разделения. Результаты масс-спектрометрического определения подтверждали с помощью обращённофазной ВЭЖХ.

Для определения резвератрола в плодах винограда 10,0 г свежих плодов измельчали в ступке, помещали в плоскодонную колбу ёмкостью 100 мл, добавляли 25 мл спирта этилового и экстрагировали на ультразвуковой водяной бане при температуре 80°C в течении 2 часов. Полученное извлечение фильтровали и в количестве 5 µl вводили в хроматограф. Детектировали при длине волны $\lambda = 306$ нм, результаты представлены на рис. 3.

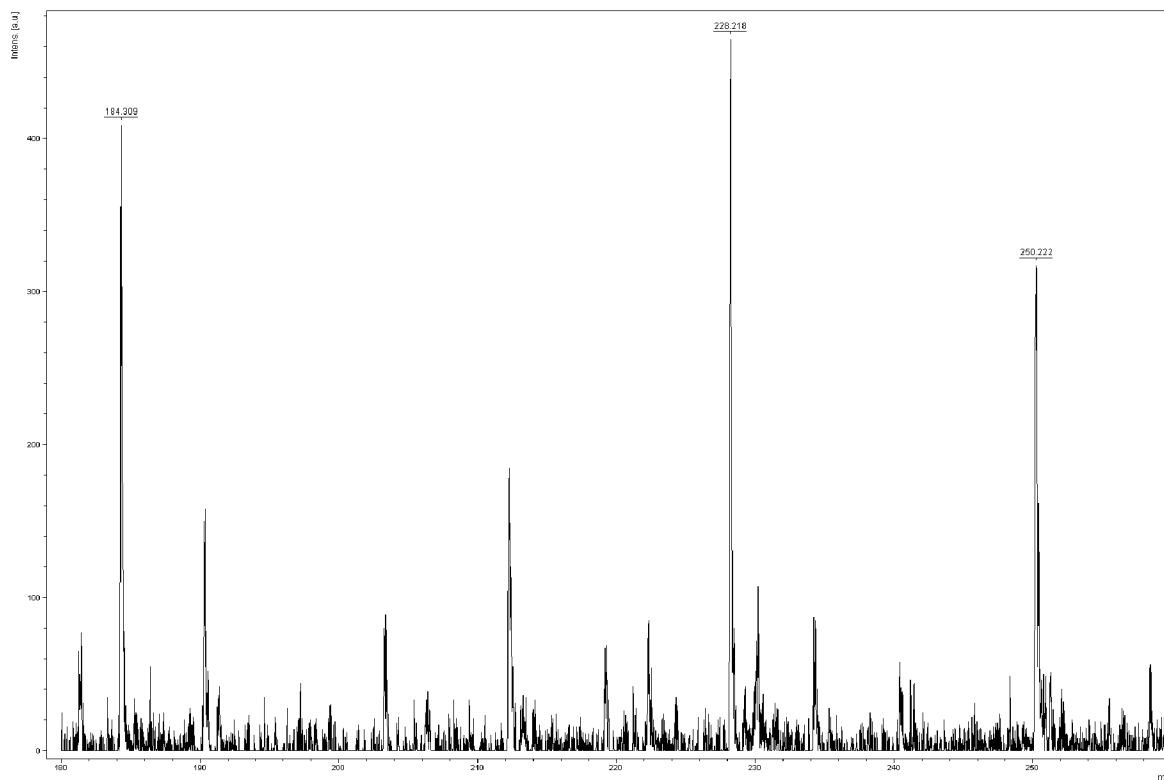


Рис. 2. Масс-спектр спиртового извлечения из плодов винограда

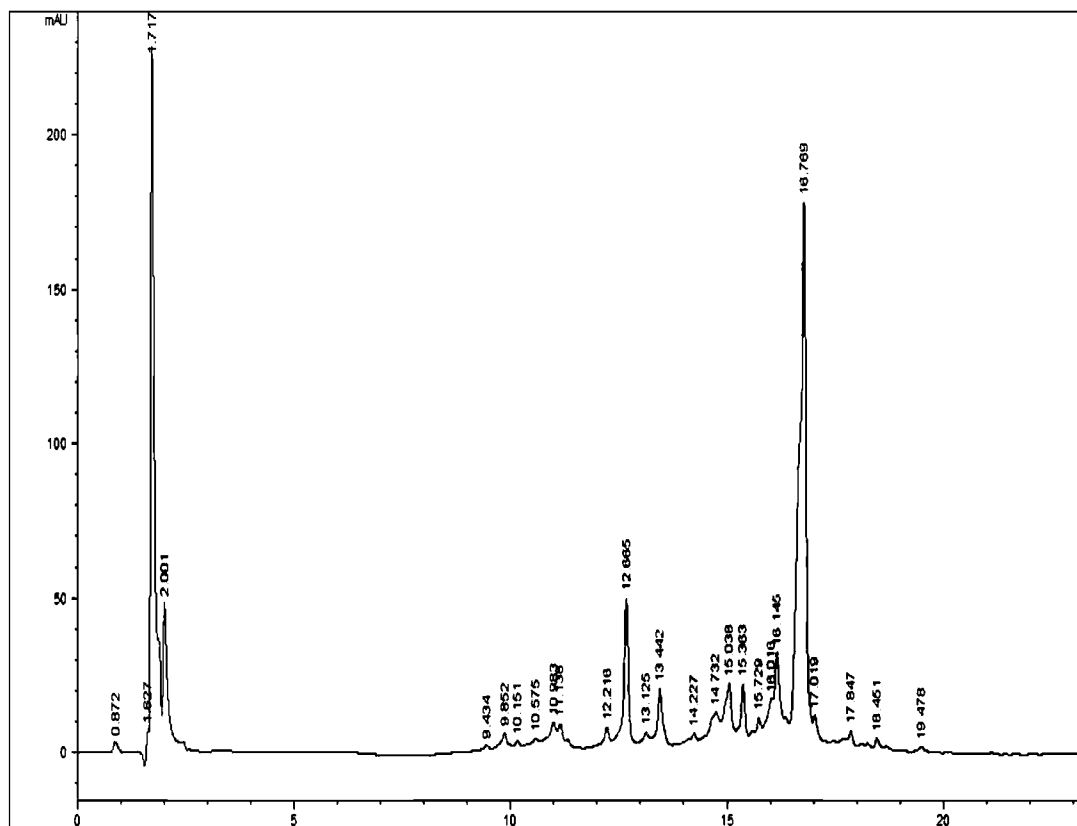


Рис. 3. Хроматограмма спиртового извлечения из плодов винограда

В образце ягод винограда, взятых на анализ, удалось обнаружить резвератрол. На представленной хроматограмме время его удерживания составило 17,847 мин.

В пищевом концентрате полифенолов винограда «Эноант» также удалось обнаружить резвератрол. Для этого вышеобозначенный объект в количестве 5 μl вводили в хроматограф. Результаты представлены на рис. 4. На хроматограмме резвератрол имел время удерживания 13,481 мин по характерному электронному спектру.

Таким образом, из вышеизложенного следует, что присутствие резвератрола можно обнаружить методом *MALDI/TOF/MS* с большей экспрессностью, чем методом ВЭЖХ.

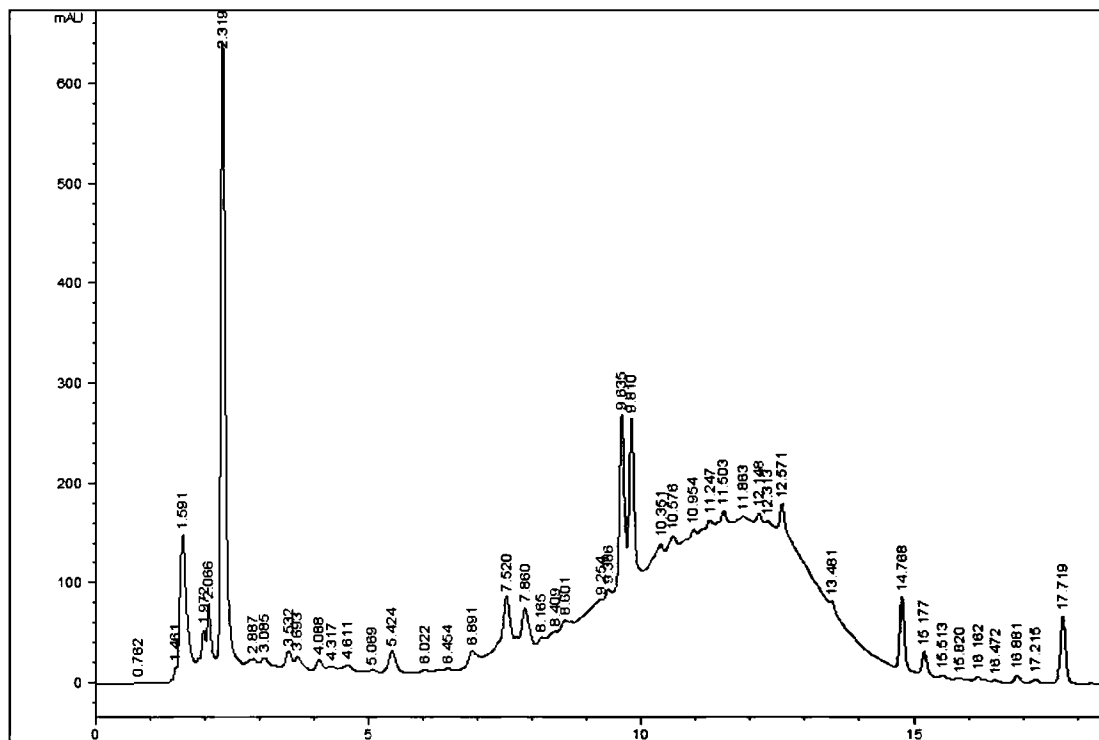


Рис. 4. Хроматограмма пищевого концентрата полифенолов винограда «Эноант»

Использование масс-спектрометрии *MALDI/TOF/MS* для идентификации карнозина

Идентификация карнозина с помощью МС разработана очень мало. В доступной нам литературе найдены ссылки на использование тандемной масс-спектрометрии и электроспрейной ионизации для характеристики карнозина в биохимических исследованиях [8-10]. Для целей фармацевтического анализа они малопригодны, поэтому нами предложена методика идентификации карнозина с помощью *MALDI/TOF/MS*.

Для масс-спектрометрического исследования получали водный раствор карнозина, который в количестве 0,5 μl наносили на мишень и после высыхания сверху капали каплю матрицы – α -цианокоричной кислоты. При регистрации масс-спектра наблюдается наиболее интенсивный пик молекулярного иона с зарядом $m/z = 227,489$, что соответствует протонированной форме карнозина. Кроме того, встречаются пики молекулярных ионов меньшей интенсивности с зарядами $m/z = 249,485$ и $265,440$, свидетельствующие о нахождении карнозина в виде аддуктов с ионами натрия и калия. Весьма полезную информацию для идентификации может предоставить частичная фрагментация молекулы карнозина. Поскольку карнозин является дипептидом, построенным из остатков β -аланина и гистидина, то на спектре можно увидеть фрагментацию молекулы с образованием гистидина – пик иона с $m/z = 156,492$, что несомненно можно охарактеризовать как специфический признак карнозина (рис. 5).

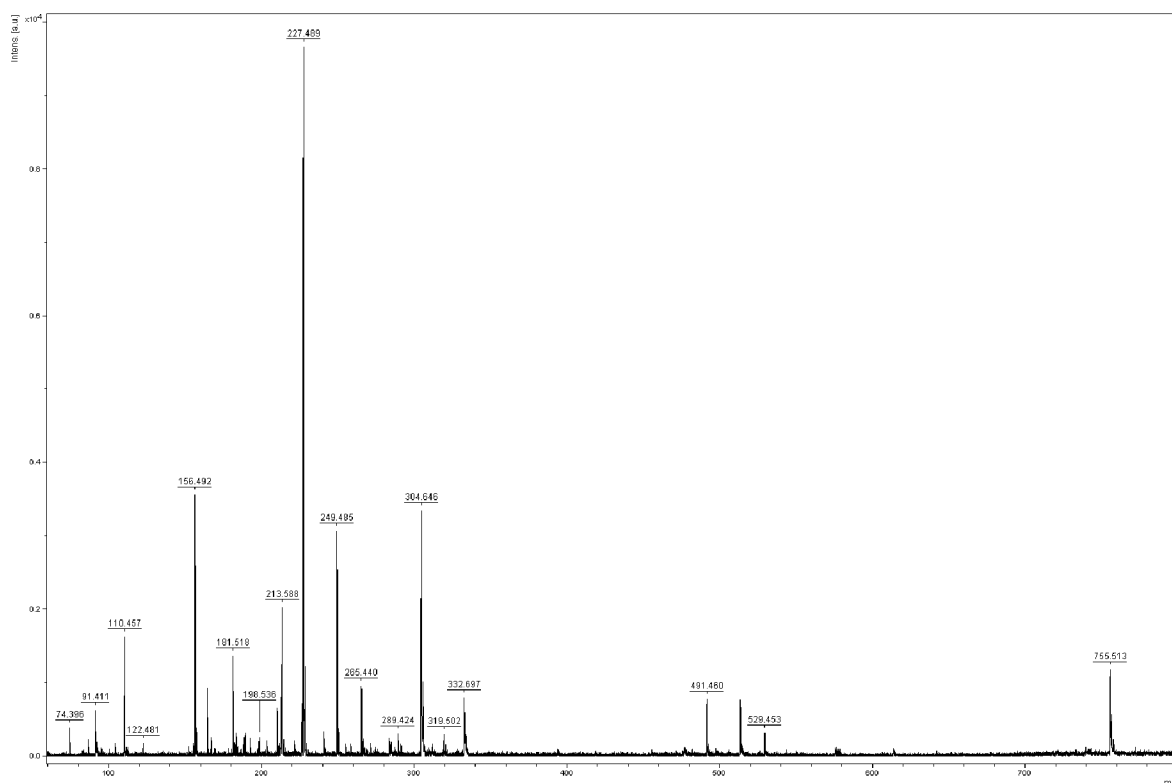


Рис. 5. Масс-спектр карнозина

Чувствительность методики составила $< 0,221$ пикомоль ($2,21 \times 10^{-12}$ моль), что гораздо превышает чувствительность известных способов идентификации.

Определение флавоноидов будры плющевидной

Для анализа использовали экстракт густой травы будры плющевидной, который в количестве около 0,1 г помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 10 мл спирта этилового 70%, взбалтывали до его полного растворения и доводили тем же растворителем до метки. Полученный раствор в количестве 0,5 μ л наносили на мишень и после высыхания сверху капали каплю матрицы – α -цианокоричной кислоты. Результаты представлены на рис. 6.

Полученный масс-спектр позволил без предварительного фракционирования обнаружить молекулярные массы флавоноидов будры плющевидной. В частности, пики молекулярных ионов с зарядами $m/z = 272,408$; $m/z = 287,364$; и $m/z = 303$ принадлежат молекулярным массам агликонов флавоноидов, а именно апигенину, лютеолину/кемпферолу и кверцетину соответственно. Пик молекулярного иона с зарядом $m/z = 433,221$ соответствует гликозидной форме апигенина, пик иона с $m/z = 449$ указывает на гликозидирование агликона лютеолина/кемпферола, а пик иона с $m/z = 487,266$ и $633,249$ соответствует моно- и дигликозидной формам кверцетина.

Таким образом, можно утверждать, что метод *MALDI/TOF/MS* применим для идентификации флавоноидов будры плющевидной.

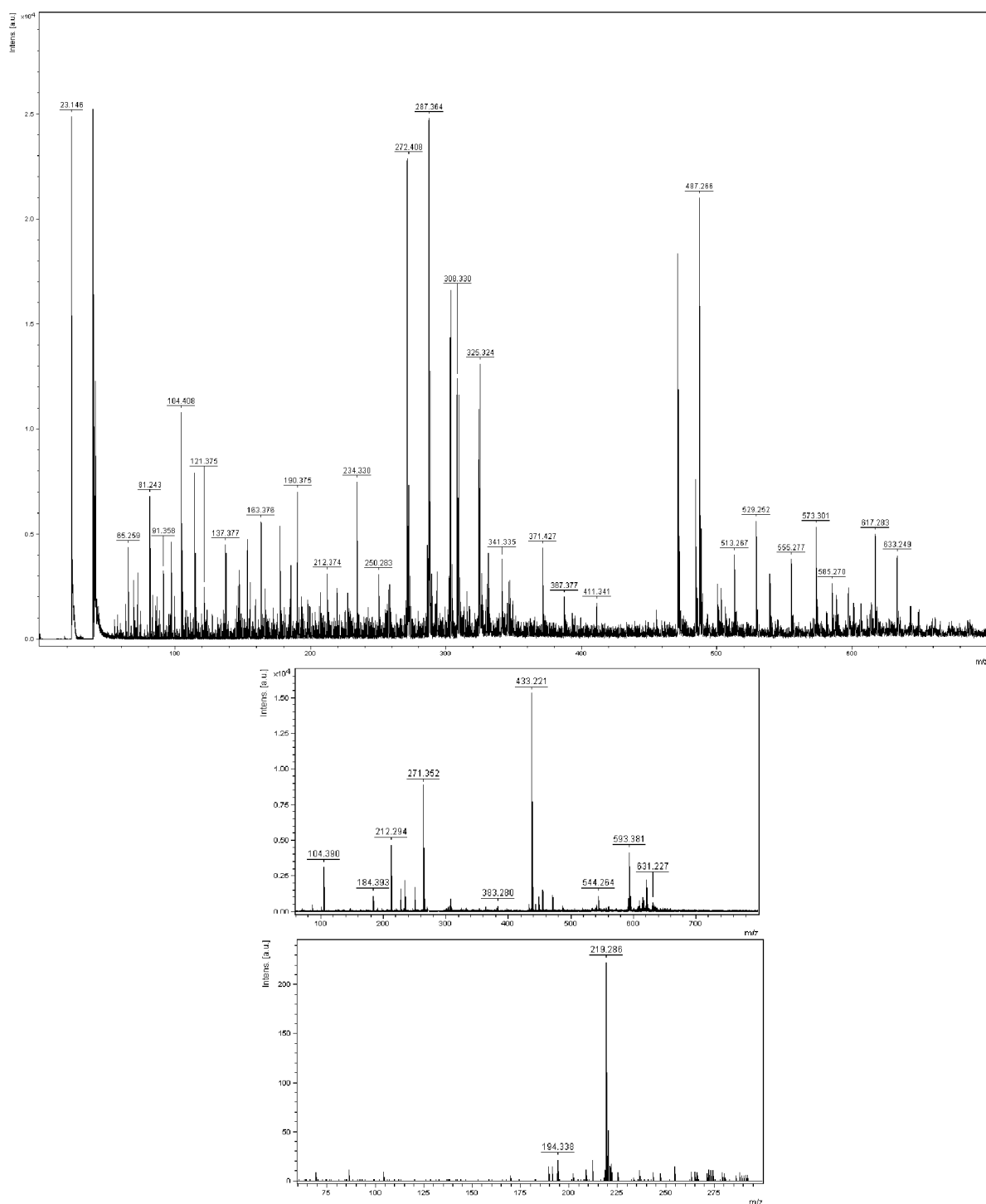


Рис. 6. Масс-спектры экстракта будры плющевидной

Резюме

В результате проведенных исследований наглядно продемонстрированы возможности метода *MALDI/TOF/MS* применительно к исследуемым объектам.

Предложенная *MALDI/TOF/MS*-методика позволила достоверно подтвердить присутствие резвератрола в нативном виде и анализируемых образцах пищевой добавки «Эноант» без ее предварительного хроматографического разделения и с большей экспрессностью, чем методом ВЭЖХ.

Чувствительность *MALDI/TOF/MS*-методики обнаружения карнозина составила < 0,221 пикомоль ($2,21 \times 10^{-12}$ моль), что значительно превышает чувствительность известных способов идентификации.



Также без предварительного фракционирования с помощью *MALDI/TOF/MS* удалось обнаружить молекулярные массы флавоноидов будры плющевидной.

Работа выполнена в рамках задания Министерства образования и науки РФ НИУ «БелГУ» № 4.959.2011 по теме «Разработка оригинальной малостадийной технологии получения субстанций биологически активных соединений класса антоцианов в виде стабильных металлорганических комплексов».

Литература

1. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М. : Бинوم. Лаборатория знаний, 2003. – 494 с.
2. Клюев, Н.А. Современные методы масс-спектрометрического анализа органических соединений / Н.А. Клюев, Е.С. Бродский // Рос. хим. ж-л. – 2002. – Т. XLVI, № 4. – С. 57-63.
3. Dass, C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry / C. Dass // New Jersey: John Wiley & Sons. – 2007. – 585 p.
4. Tanaka, K. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry / K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1988. – Т. 2. – С. 151.
5. Karas, M. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules / M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp // Anal. Chem. – 1985. – № 57. – С. 2935.
6. Knochenmuss, R. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization / R. Knochenmuss // J. Mass Spectrom. – 2002. – № 37. – P. 867.
7. Chaurand, P. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry / P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, B. Spengler // J Am Soc. Mass Spectrom. – 1999. – № 10(2). – P. 91-103.
8. Aldini, G. Detoxification of cytotoxic α,β -unsaturated aldehydes by carnosine: characterization of conjugated adducts by electrospray ionization tandem mass spectrometry and detection by liquid chromatography/mass spectrometry in rat skeletal muscle / G. Aldini, P. Granata, M. Carini // J. Mass Spectrom. – 2002. – № 37. – P. 1219-1228.
9. Aldini, G. Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: through what mechanism of reaction? / G. Aldini, M. Carini, G. Beretta et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2002. – Vol. 298. – P. 699-706.
10. Yi-Hong Chen. Mass spectrometric determination of dabsyl-chloride derivatised anserine, carnosine and taurine in commercial chicken essences / Chen Yi-Hong, Lin Ya-Ping, Liou Su-Er et al. / International Journal of Food Science and Technology. – 2007. – Vol. 42. – P. 593-600.

EXPERIENCES OF MALDI / TOF / MS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS

D.I. PISAREV¹
O.O. NOVIKOV¹
G.V. VASILIEV¹
O.A. SELJUTIN²

¹ *Belgorod National Research University*

² *Center for quality control and certification of medical products, Voronezh*

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

The paper presents results of studies on the development of methodology for analysis of some of the test drugs belonging to different chemical groups, using the MALDI / TOF / MS.

Key words: mass spectrometry, carnosine, resveratrol, flavonoids