



РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАРИАНТА ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА MALDI/TOF/MS С ДРУГИМИ МЕТОДАМИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА РЕЗВЕРАТРОЛА

**Д.И. ПИСАРЕВ
О.О. НОВИКОВ
Г.В. ВАСИЛЬЕВ**

*Белгородский государственный
национальный
исследовательский университет*

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

Рассмотрен вариант внутреннего стандарта MALDI/TOF/MS в сравнении с другими методами количественного анализа на примере субстанции резвератрола. Установлены очевидные методические и аналитические преимущества масс-спектрометрии при ее реализации предложенным способом.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия, титриметрия, ВЭЖХ, резвератрол.

Преимущество масс-спектрометрии перед другими методами анализа заключается, в первую очередь, в том, что данный метод на сегодняшний день является наиболее чувствительным из спектроскопических методов молекулярного анализа по сравнению с другими ныне существующими, такими как ЯМР-, ИК-, УФ-спектроскопия. Кроме того, масс-спектрометрия дает возможность проведения анализа за минимальное время с простой пробоподготовкой [1, 2].

Для количественного анализа данным методом можно использовать масс-спектр как таковой. Для этого следует выбрать некоторый пик, принадлежащий определяемому веществу, и измерить его интенсивность.

Однако для того чтобы нивелировать погрешности стадии пробоподготовки и погрешности выхода ионизации, по нашему мнению, необходимо использовать внутренний стандарт.

Для сравнения предлагаемого варианта масс-спектрометрии использованы методики количественного определения резвератрола методами УФ-спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и метод ацетилирования с алкалиметрическим завершением.

Экспериментальная часть

Определение резвератрола с помощью спектрофотометрии в ультрафиолетовой области

Для анализа резвератрола методом УФ-спектрофотометрии использовали 0,0004% раствор субстанции резвератрола в спирте этиловом 96%. Для этого около 0,01 г (точная навеска) субстанции резвератрола, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл спирта этилового 96%, перемешивали, доводили объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивали.

1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объём раствора спиртом этиловым 96% до метки и перемешивали.

Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 306 нм, относительно спирта этилового. Параллельно в аналогичных условиях измеряли 0,0004% раствор стандартного образца (СО) резвератрола в спирте этиловом 96%. Количественное содержание резвератрола определяли по формуле 1:

$$X = \frac{D_x \times C_{cm} \times W_1 \times W_2}{D_{cm} \times m \times V_a}, \quad (1)$$

где:

D_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_{cm} – оптическая плотность раствора СО резвератрола;

m_0 – масса навески стандартного образца резвератрола, г.

Приготовление раствора СО резвератрола

0,01 г (точная навеска) СО резвератрола помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли небольшое количество спирта этилового 96%, перемешивали до полного растворения, объём раствора доводили до метки тем же растворителем (исходный раствор).

1 мл исходного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объём раствора спиртом этиловым 96% до метки и перемешивали.

Полученные спектры представлены на рис. 1.

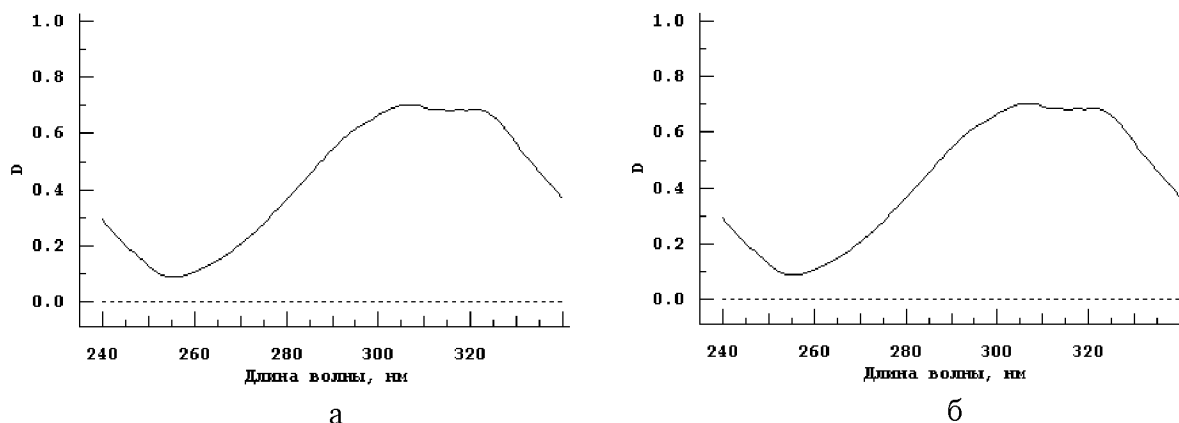


Рис. 1. Спектр поглощения резвератрола:
а – раствор СО резвератрола, б – раствор субстанции резвератрола

Было проведено 7 параллельных измерений. Результаты статистической обработки определения содержания резвератрола в субстанции представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты количественного определения резвератрола в субстанции методом УФ-спектрофотометрии

№ п/п	Масса навески, г	Содержание резвератрола (X), %	S	$\Delta\bar{X}$	$\varepsilon, \%$
1.	0,01	102,5	1,24	3,05	3,08
2.	0,0093	97,0			
3.	0,0096	96,9			
4.	0,0098	98,5			
5.	0,0094	97,5			
6.	0,0096	96,5			
7.	0,0105	105,0			
		$\bar{X} = 99,1\%$			

Как видно из данных табл. 1, содержание резвератрола в субстанции составило $99,1 \pm 3,05\%$, относительная ошибка единичного определения с 95% вероятностью находилась в пределах $\pm 3,08\%$, что укладывается в критерий погрешности, регламентируемый ГФ.

Определение субстанции резвератрола методом ВЭЖХ

Хроматографические исследования проводили на хроматографическом приборе фирмы «Agilent Technologies 1200 Infinity» с автоматическим пробоотборником Agilent 1200, вакуумным микродегазатором, градиентным насосом и термостатом той же серии. Регистрацию полученных данных осуществляли с помощью двух систем детекторов: спектрофотометрического и масс-спектрометрического. Электронные спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей серии Agilent 1200 (диапазон длин волн от 190 до 950 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм; объемом 13 мкл), шаг сканирования – 2 нм.



Для регистрации и обработки спектральных данных и хроматограмм использовали программное обеспечение «*Agilent ChemStation*».

Испытания проводили с использованием стальных хроматографических колонок, наиболее подходящей из которых оказалась: *Reprosil-Pur C18-AQ 150 мм×2 мм*, с размером частиц 3 мкм.

Для приготовления подвижных фаз использовали растворители: воду сверхчистую (*HPLC*), спирт этиловый (ч.д.а.), ацетонитрил (*HPLC*), уксусную кислоту (х.ч.), ортофосфорную кислоту (х.ч.).

Количественное определение субстанции резвератрола осуществляли в градиентном режиме элюирования. В качестве подвижной фазы (А) – 4% водный раствор кислоты фосфорной, (Б) – ацетонитрил. Элюирование проводили в следующих условиях:

Скорость потока: 0,25 мл/мин.

Температура колонки: 35°C.

Давление: 168 bar.

Детекция: 306 нм.

Объем вводимой пробы: 5 мкл.

Состав подвижной фазы программировали (табл. 2).

Таблица 2

Условия градиентного элюирования резвератрола

Время, мин	А,%	В,%
0	90	10
2	50	50
7	30	70

Продолжительность анализа составила 15 минут.

Расчет количественного содержания резвератрола проводили по площади полученного пика, которая должна соответствовать площади пика его стандарта по формуле 2:

$$X = \frac{S_x \times C_{cm} \times W_1 \times W_2 \times 100}{S_{cm} \times m \times V_a}, \quad (2)$$

где S_x – площадь пика исследуемого вещества;

S_{cm} – площадь пика стандарта;

W_1, W_2 – разведения, мл;

m – масса навески, г;

V_a – объем аликвоты, мл.

Приготовление раствора испытуемого и СО резвератрола

Около 0,03 г (точная навеска) СО резвератрола помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, прибавляли 80,0 мл спирта этилового 96%, перемешивали, довели объем раствора этим же растворителем до метки и снова перемешивали.

5,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, довели объем раствора спиртом этиловым 96% до метки и перемешивали.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы

2,0 мл раствора СО резвератрола выдерживали в течение 5,0 мин на расстоянии 10 см от УФ-ртутной лампы мощностью 250 Вт.

Проверка пригодности хроматографической системы

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

– эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пикам резвератрола на хроматограммах раствора СО резвератрола, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок;

– относительное стандартное отклонение площадей пиков резвератрола на хроматограммах испытуемого раствора и раствора СО резвератрола должно быть:



для двух параллельных хроматограмм – 0,51%;
 для трех – не более 1,34%;
 для четырех – не более 1,92%;
 для пяти – 2,37%;

– коэффициент разделения пиков *цис*- и *транс*-резвератрола на хроматограммах раствора для проверки пригодности хроматографической системы должен быть не менее 1,8.

Хроматограммы субстанции и СО резвератрола представлены на рис. 2.

Было проведено 7 параллельных измерений. Параллельно в аналогичных условиях измеряли 0,0004% раствор СО резвератрола в спирте этиловом 96%. Полученные данные обрабатывали статистически. Результаты исследования количественного определения резвератрола в субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты количественного определения резвератрола в субстанции методом ВЭЖХ

№ п/п	Масса навески, г	Содержание резвератрола (X), %	S	$\overline{\Delta X}$	$\varepsilon, \%$
1.	0,030	101,0	1,29	3,18	3,17
2.	0,033	98,6			
3.	0,036	103,3			
4.	0,038	106,4			
5.	0,034	97,3			
6.	0,036	98,7			
7.	0,035	97,2			
		$\overline{X} = 100,35\%$			

Как видно из данных табл. 3, содержание резвератрола в субстанции составило 100,35±3,18%, ошибка единичного определения ВЭЖХ – методики определения субстанции резвератрола с 95% вероятностью находилась в пределах 3,17%, что не превышает установленного в ГФ X издания критерия погрешности.

Определение резвератрола методом ацетилирования

Для ацетилирования различных фенолов применяют ангидриды уксусной, пропионовой, стеариновой кислот, 3,5-динитробензольной и некоторые другие. Из этих ацетилирующих реагентов наибольшее распространение получил уксусный ангидрид.

Химическая структура резвератрола близка структуре диэтилстильбестрола, для которого в ГФ X издания предложена методика ацетилирования уксусным ангидридом. Взяв ее за основу и модифицировав, мы разработали и апробировали методику для количественного анализа резвератрола.

Около 0,4 г препарата (точная навеска) помещали в колбу для ацетилирования емкостью 250 мл, прибавляли пипеткой 5 мл раствора уксусного ангидрида в пиридине (3 части безводного пиридина: 1 часть уксусного ангидрида), соединяли колбу с обратным холодильником и нагревали на водяной бане при температуре 70°C в течение 45 минут. Раствор охлаждали, прибавляли через холодильник 25 мл воды очищенной и через 15 минут титровали 0,5Н раствором NaOH, точку эквивалентности фиксировали по изменению окраски индикатора фенолфталеина. Параллельно проводили контрольный опыт. Разность между количеством миллилитров 0,5Н раствора натра едкого, израсходованного на титрование контрольного опыта, и исследуемого раствора пересчитывали на резвератрол. 1 мл 0,5Н раствора NaOH соответствовал 0,038 г резвератрола.

Титр 3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбена в анализируемом растворе составил:

$$T = \frac{C_n \times M}{1000} = \frac{0,5 \times 228,25 \times 1}{1000 \times 3} = 0,038 \text{ г/мл} \quad (3)$$



Количество 3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбена в анализируемом растворе рассчитывали согласно формуле 4:

$$\frac{(V_1 - V_2) \times T}{a} \times 100\% \quad (4)$$

где V_1 – объем титранта, пошедшего на титрование контрольного опыта, мл;
 V_2 – объем титранта, пошедшего на титрование анализируемого раствора, мл;
 T – титр вещества в анализируемом растворе, г/мл;
 a – масса навески, взятой на титрование, г.

Результаты количественного определения резвератрола в субстанции методом ацетилирования с последующим алкалиметрическим завершением представлены в табл. 4.

Таблица 4

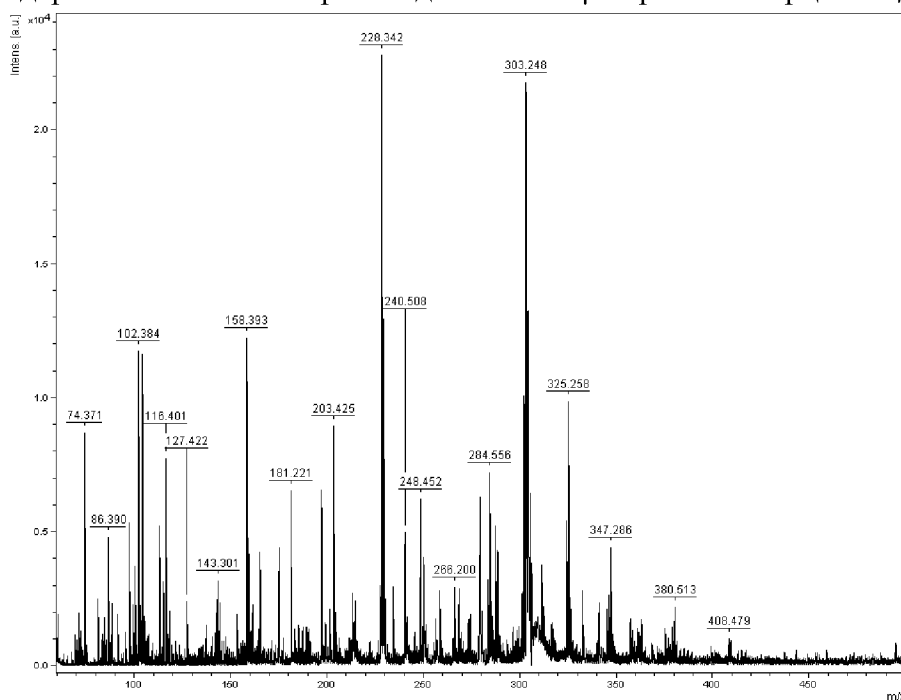
**Результаты количественного определения
резвератрола методом ацетилирования**

№ п/п	Масса навески, г	Содержание резвератрола (X), %	S	$\overline{\Delta X}$	ε , %
1.	0,4013	96,26	0,81	2,0	2,04
2.	0,4057	98,84			
3.	0,3944	95,68			
4.	0,4025	99,11			
5.	0,4007	98,39			
6.	0,4017	97,04			
7.	0,4007	102,12			
		$\overline{X} = 98,2\%$			

Как видно из данных табл. 4, содержание резвератрола в субстанции, с использованием метода ацетилирования с алкалиметрическим завершением, составило $98,2 \pm 2\%$, ошибка единичного определения при вероятности 95% – 2,04%, что не превышает предела погрешности, регламентируемого ГФ X издания.

Определение резвератрола методом масс-спектрометрии

В качестве аналита использована субстанция природного биологически активного вещества стильбеновой структуры – резвератрола. В качестве внутреннего стандарта использовано производное бензо- γ -пирона – кверцетин. Данные вещества друг с



другом не взаимодействуют, имеют чётко различающиеся молекулярные массы. Пик резвератрола ($m/z = 228,342$) не накладывается на пик кверцетина ($m/z = 303,248$), что видно на рис. 2, пики матрицы не мешают определению.

Рис. 2. Масс-спектр резвератрола и кверцетина при совместном присутствии

В результате количественного определения получены объединенные спектры, на которых наблюдаются интенсивные пики ионов анализата – резвератрола с зарядом иона $m/z = 228,3$ и пики внутреннего стандарта – кверцетина с зарядом иона $m/z = 303,2$ (рис. 3).

На приведенном рис. 3 видно, что интенсивность пика иона анализата резвератрола плавно уменьшается, а внутреннего стандарта кверцетина увеличивается по мере нарастания его концентрации.

Каждую пробу регистрировали 3-кратно и вычисляли среднее значение их интенсивности (I), а также отношения интенсивностей внутреннего стандарта и анализата.

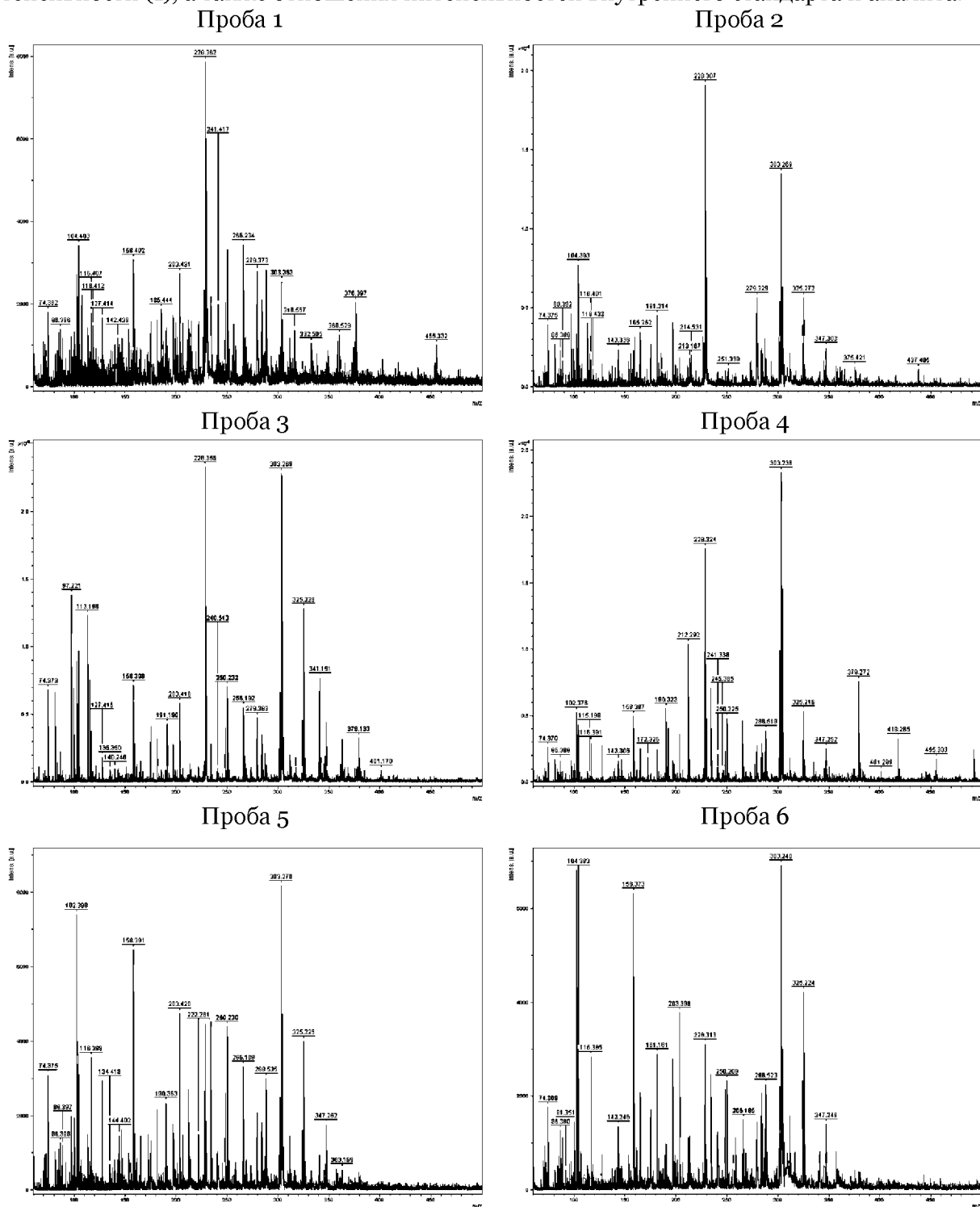


Рис. 3. Масс-спектры анализируемой смеси



При проведении калибровки также проводили вычисление фактора отклика K_x по формуле 5:

$$K_x = \left(\frac{I_{st}}{I_{an}} \right) \times \left(\frac{C_x}{C_{st}} \right), \quad (5)$$

где I_{st} – интенсивность пика иона стандарта кверцетина;

I_{an} – интенсивность пика иона аналита резвератрола;

C_{st} – количество внутреннего стандарта, нанесённого на мишень;

C_{an} – количество аналита, нанесенного на мишень.

Интенсивности (I) пиков ионов аналита (I_{an}) и внутреннего стандарта (I_{st}), а также их отношения приведены в табл. 4.

Таблица 4

Интенсивности пиков ионов аналита и внутреннего стандарта и их отношения в субстанции

$C_{\text{стандарта, мкг/мл}}$	N° пробы					
	1	2	3	4	5	6
	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24
I_{st} , интенсивность пика стандарта кверцетина, m/z 303,2	896	14586	22819	24163	6848	8381
I_{an} , интенсивность пика аналита резвератрола, m/z 228,3	3109	20732	23359	21776	4387	4571
I_{st}/I_{an}	0,288	0,7035	0,977	1,2	1,56	1,833
K_x , фактор отклика	0,864	1,055	0,976	0,832	0,936	0,916

Для оценки прямолинейности зависимости концентрации внутреннего стандарта от аналитического сигнала (отношение интенсивностей внутреннего стандарта и аналита) построен калибровочный график в координатах $C_{\text{стандарта, мкг/мл}}$ – I_{st}/I_{an} . (рис. 4).

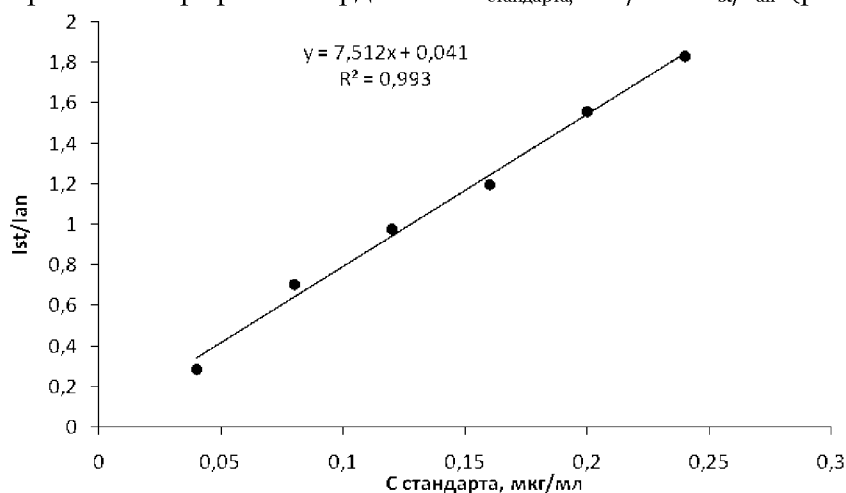


Рис. 4. Калибровочный график зависимости концентрации внутреннего стандарта кверцетина от отношения интенсивностей внутреннего стандарта и аналита (резвератрола)

Из приведенного графика следует, что отношение I_{st}/I_{an} к концентрации стандартного раствора имеет прямолинейную зависимость. Это указывает на то, что отношение площадей пиков ионов аналита и внутреннего стандарта остается постоянным.

Когда отношение I_{st}/I_{an} приближается к единице, это является свидетельством совпадения концентраций внутреннего стандарта и исследуемого вещества. Тогда содержание исследуемого вещества можно найти по приведённому калибровочному графику.



Конечная формула расчёта для аналита выглядит следующим образом:

$$C_x = K_x \times \left(\frac{I_{st}}{I_{an}} \right) \times I_{an}, \quad (6)$$

где K_x – фактор отклика;

C_{st} – количество внутреннего стандарта, нанесенного на мишень;

I_{st} – интенсивность пика иона стандарта кверцетина;

I_{an} – интенсивность пика иона аналита резвератрола.

Относительную ошибку определяли в ходе 7 параллельных измерений разных образцов анализируемой смеси. Полученные данные обрабатывали статистически. Результаты статистической обработки определения содержания резвератрола в субстанции методом масс-спектрометрии представлены в табл. 5.

Таблица 5

Результаты количественного определения резвератрола в субстанции методом масс-спектрометрии

№ п/п	Масса навески, г	Содержание резвератрола (X),%	S	$\overline{\Delta X}$	$\varepsilon, \%$
1.	0,102	99,6	1,49	3,6	3,66
2.	0,103	105,6			
3.	0,103	105,5			
4.	0,102	98,86			
5.	0,101	96,8			
6.	0,101	96,43			
7.	0,102	97,2			
		$\overline{X} = 100,0\%$			

Как следует из данных табл. 5, относительная ошибка единичного определения методом масс-спектрометрии с вероятностью 95% не превышает 5%, что укладывается в пределы, регламентируемые государственной фармакопеей, и для резвератрола составила $\pm 3,65\%$ (найденно $1,2 \times 10^{-4} \pm 0,0045$ мг/мл), что более чем в 30 раз превышает чувствительность методики УФ-спектрофотометрического определения.

Резюме

Таким образом, рассмотрен вариант внутреннего стандарта MALDI/TOF/MS в сравнении с другими методами количественного анализа на примере субстанции резвератрола. Установлены очевидные методические и аналитические преимущества масс-спектрометрии при ее реализации предложенным способом.

Литература

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы : в 2 т : пер. с англ. / под ред. Р. Кёльнера, Ж.-М. Мериме, М. Отто, М. Видмера. – М. : Мир ; Издательство АСТ, 2004. –Т. 2. – 728 с.
2. Отто, М. Современные методы аналитической химии. 2-е изд., испр. / М. Отто. – М. : Техносфера, 2006. – 416 с.

RESULTS OF COMPARATIVE STUDIES OF MALDI / TOF / MS USING INTERNAL STANDARD WITH OTHER TECHNIQUES OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF RESVERATROL

**D.I. PISAREV
O.O. NOVIKOV
G.V. VASILIEV**

Belgorod National Research University
e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

A variant of the internal standard MALDI / TOF / MS in comparison with other methods of quantitative analysis on the example of the substance resveratrol is viewed. Obvious methodological and analytical advantages of mass spectrometry in its implementation by the proposed method are identified.

Key words: mass spectrometry, UV spectrophotometry, titrimetry, HPLC, resveratrol.