



## РАЗРАБОТКА СПОСОБА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОСКОПИИ С ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИЕЙ/ИОНИЗАЦИЕЙ НА ПРИМЕРЕ АНАЛИЗА РЕЗВЕРАТРОЛА

**Д.И. ПИСАРЕВ  
О.О. НОВИКОВ  
Г.В. ВАСИЛЬЕВ  
М.Ю. НОВИКОВА  
Е.Т. ЖИЛЯКОВА**

*Белгородский  
государственный  
национальный  
исследовательский  
университет*

*e-mail: pisarev@bsu.edu.ru*

В статье приводятся результаты разработки методики количественного определения органических соединений методом масс-спектрометрии в варианте матрично-активированной лазерной десорбционной ионизации (MALDI) на примере *транс*-резвератрола. Для количественного определения использован принцип внутренней стандартизации. Возможность использования метода MALDI для количественного определения продемонстрирована при оценке прямолинейной зависимости между концентрацией и интенсивностью исследуемого пика компонента, которая оказалась таковой. В результате проведенных исследований доказана перспективность указанного метода для целей количественного определения органических соединений.

Ключевые слова: *транс*-резвератрол, матрично-активированная лазерная десорбционная ионизация, количественное определение, внутренняя стандартизация

В настоящее время для анализа биологически активных соединений используются физико-химические методы анализа, наиболее перспективными из которых считаются так называемые гибридные – ВЭЖХ, ГЖХ в сочетании с электроспрейной масс-спектрометрией и ионизацией электронным ударом. Основное достоинство данных методов – возможность определять индивидуальные компоненты в составе сложной смеси. Это особенно важно при анализе биологически активных веществ природного происхождения в растительных объектах в составе сложных комплексов, включающих десятки и сотни соединений. Основной проблемой при анализе таких многокомпонентных составов является необходимость не только обеспечить идентификацию и дать их количественную оценку, но и провести анализ экспрессно с высокой чувствительностью. Несмотря на эффективность существующей инструментальной базы, дефицит экспрессных и высокочувствительных методов анализа биологически активных соединений остается актуальной проблемой, поскольку данные методы в недостаточной степени оправдывают перечисленные критерии. Это создаёт необходимость привлечения новых адаптированных к современным требованиям науки методов анализа. В этом отношении масс-спектрометрия матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI/MS) является весьма перспективным инструментальным подходом, способным в сжатые сроки без использования стандартных образцов предоставить необходимую информацию. А в сочетании с времяпролётным анализатором масс (TOF/MS) отпадает необходимость в предварительном разделении многокомпонентных составов. К тому же высокая чувствительность MALDI/MS, недостижимая никакими другими методами, простота анализа, универсальность, объем получаемой информации способны сделать его одним из самых эффективных и востребованных среди аналитических методов.

Хотя метод MALDI/TOF/MS разрабатывался для анализа высокомолекулярных соединений, его с успехом используют и для низкомолекулярных структур, в том числе природного происхождения. Основным недостатком метода MALDI/TOF/MS при анализе низкомолекулярных соединений является неспособность определять изомеры, что делает его пригодным в основном для групповой характеристики анализируемой смеси. Поэтому в литературе часто метод MALDI/TOF/MS рассматривается с позиции дополняющего ВЭЖХ.

Масс-спектрометрия это физический метод измерения отношения массы заряженных частиц (ионов) к их заряду ( $m/z$ ), установлению атомов, составляющих молекулу, их молекулярной массы, а также структуры их расположения. На сегодняшний момент масс-спектрометрия является самым высокочувствительным физико-химическим методом анализа



широчайшего спектра соединений. Интерпретация масс-спектрометрических данных не требует глубоких знаний в данной области. Однако данный метод используется исключительно в целях идентификации определяемых соединений.

Вероятность использования MALDI/TOF/MS для целей количественного определения потенциально возможна.

Опубликованное к настоящему времени значительное число работ, посвященных данной теме, не адаптировано для фармацевтических объектов, кроме того, требует методологического обеспечения и подтверждения.

Использование метода внутреннего стандарта, на наш взгляд, позволит существенно расширить возможности масс-спектрологии с лазерной десорбцией/ионизацией.

Метод внутреннего стандарта очень широко применяется в практике количественного анализа смеси с помощью газо-жидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии, особенно в тех случаях, когда колебания приборных факторов регулируются недостаточно тщательно. В масс-спектрометрии этот метод применяется ограниченно – в варианте масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Метод внутреннего стандарта основан на введении в анализируемую смесь определенного количества стандартного вещества. Калибровочный график представляет собой зависимость между весовым количеством или процентным содержанием компонента и отношением высот (интенсивностей или площадей) пиков этого компонента и стандартного вещества. Калибровка производится путем добавления постоянного количества стандартного вещества к определенному объему различных смесей, содержащих переменные, но известные количества анализируемых компонентов. Составленные таким образом смеси анализируются.

Преимущества метода внутреннего стандарта:

1) При использовании метода внутреннего стандарта объем вводимой пробы и точность ее дозирования не влияют на точность количественного анализа. Отношение площадей пиков аналита и внутреннего стандарта остается постоянным.

2) Метод внутреннего стандарта очень удобен при проведении групповых определений.

3) Возможность в каждом проводимом определении контролировать потери аналитов в процессе подготовки пробы, причем на любой ее стадии. Для каждой такой стадии нужен еще один внутренний стандарт.

4) В методе внутреннего стандарта погрешность прибора оказывает наименьшее влияние на погрешность результата.

Таким образом, целью данного исследования явилась разработка способа количественного определения органических соединений с помощью метода масс-спектрологии с лазерной десорбцией/ионизацией.

Предлагаемый способ отработан на методике количественное определение резвератрола методом MALDI.

#### **Материалы и методы.**

В работе использован метод MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) – лазерная десорбция и ионизация в присутствии вспомогательного вещества – матрицы. Данный метод используется для исследований как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных веществ. В этом методе ионизации подвергается непосредственно твердая или жидкая проба без её предварительного испарения. Масс-спектры крайне просты и в предельном случае состоят только из молекулярного пика. Для ионизации используют УФ-лазер с длиной волны 337 нм. При анализе используют матрицу, играющую роль переносчика энергии.

Для количественного определения методом масс-спектрометрии необходимо выбрать некоторый пик, принадлежащий определенному компоненту, и измерить его интенсивность. Для исключения влияния условий эксперимента нужно использовать внутренний стандарт.

Для количественного определения методом масс-спектрометрии в качестве аналита использована субстанция природного биологически активного вещества стильбеновой структуры – резвератрола (производство “DSM Nutritional Products Europe Ltd” (Швейцария), зарегистрирована в РФ как сырье для БАД (свидетельство № 77.99.26.9.4.4087.4.09 от 30.04.2009 г.). В качестве внутреннего стандарта применено вещество, производное бензо-γ-пирона – кверцетин. Данные вещества друг с другом не взаимодействуют, имеют четко различающиеся молекулярные массы. Пик резвератрола ( $m/z = 228$ ) не накладывается на пик кверцетина ( $m/z = 303$ ), что видно на приведенном рис. 1.

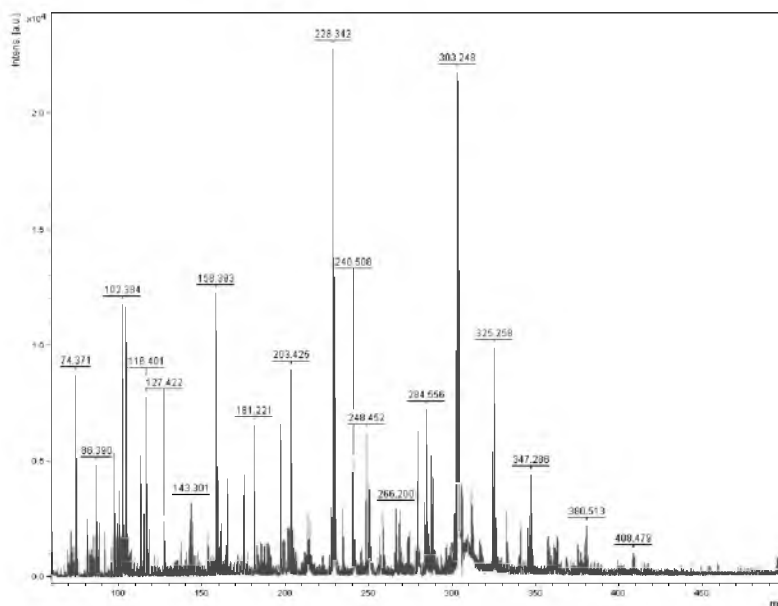


Рис. 1. Масс-спектр резвератрола и кверцетина при совместном присутствии

**Методика определения:** 0,1 г (аналитическая навеска) субстанции резвератрола помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 10 мл спирта этилового 96%-ного, тщательно взбалтывали до полного растворения и доводили до метки этим же растворителем (раствор А). Параллельно в аналогичных условиях готовили раствор внутреннего стандарта, в качестве которого был выбран стандартный образец кверцетина.

Из полученного раствора А далее готовили серию разведений, состоящую из 6 растворов. Для этого 6 мерных колб вместимостью по 25 мл помещали по 3 мл аликвоты раствора А аналита и раствора внутреннего стандарта кверцетина в объемах: 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 и 6,0 мл, содержимое колб тщательно перемешивали и доводили спиртом этиловым 96%-ным до метки (растворы Б).

Из каждого раствора Б микропипеткой отбирали по 0,05 мл аликвоты, помещали в пробирки градуированные емкостью 1,5 мл и разводили в два раза ацетонитрилом для удобства нанесения на мишень (растворы В).

Таким образом, пробы растворов В №1-6 в количестве по 0,5  $\mu$ л с помощью дозатора наносили на мишень «МТР 384 targen plate matt steel TF» в шесть лунок, высушивали и сверху наносили каплю матрицы.

Полученные концентрации внутреннего стандарта приведены в таблице 1. Регистрацию масс-спектров проб №1-6 проводили на приборе масс – спектрометр «Autoflex II» «MALDI TOF/TOF» фирмы Bruker Daltonics. В качестве матрицы использовали  $\alpha$ -цианокоричную кислоту, регистрацию спектров вели с помощью программы «Flex Control», обработку данных осуществляли в программе «Flex Analis» в режиме Reflex Positive.

#### Результаты исследования.

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

Из данных табл. 1 и на приведенном рис. 2 видно, что интенсивность пика иона аналита резвератрола плавно уменьшается, а внутреннего стандарта кверцетина увеличивается по мере нарастания его концентрации.

Каждую пробу регистрировали 3-хкратно и вычисляли среднее значение их интенсивности (I).

Интенсивности (I) пиков ионов аналита ( $I_{an}$ ) и внутреннего стандарта ( $I_{st}$ ), а также их отношения приведены в табл. 1.

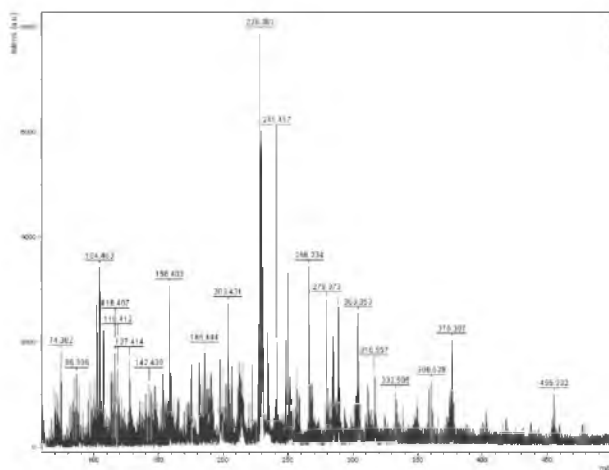
Для оценки прямолинейности зависимости концентрации внутреннего стандарта от отношения интенсивностей внутреннего стандарта и аналита построен калибровочный график в координатах  $C_{стандарта}$ , мкг/мл –  $I_{st}/I_{an}$ . (рис. 3).



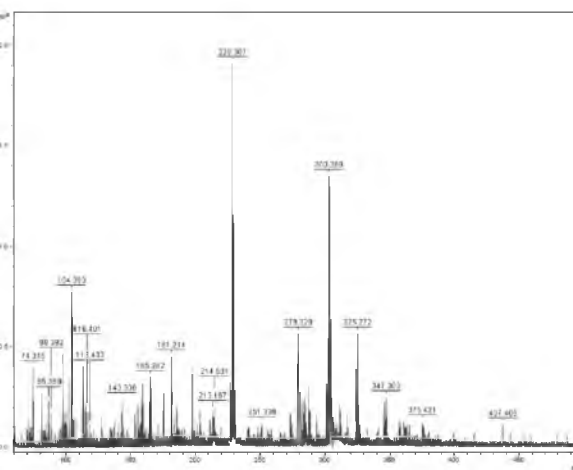
Таблица 1

**Интенсивности пиков ионов аналита и внутреннего стандарта и их отношения**

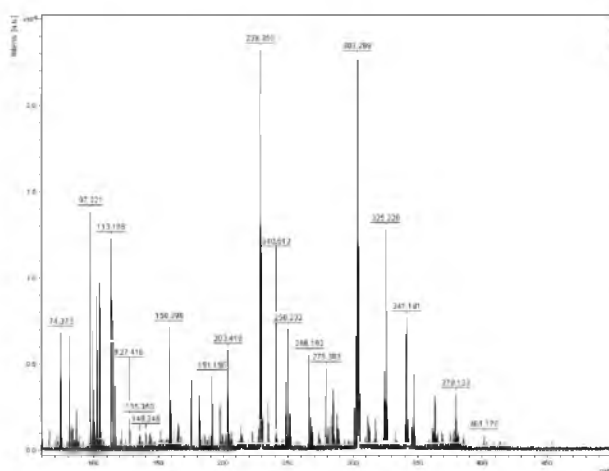
Сстандарта, мкг/мл	№ пробы					
	1	2	3	4	5	6
	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24
$I_{st}$ , Интенсивность пика стандарта кверцети- на, m/z 303,2	478,8 1670,02 538,3 $\bar{X} = 896$	20380,98 10408,1 12969,04 $\bar{X} = 14586$	22633,89 22338,93 23483,18 $\bar{X} = 22819$	26680,09 22343,26 23465,31 $\bar{X} = 24163$	9381,65 2440,07 8722,74 $\bar{X} = 6848$	6681,26 9548,16 8912,63 $\bar{X} = 8381$
$I_{an}$ , Интенсивность пика аналита резвератро- ла, m/z 228,3	244,85 2027,0 7056,21 $\bar{X} = 3109$	22067,7 19635,47 20491,97 $\bar{X} = 20732$	23090,95 23051,73 23934,41 $\bar{X} = 23359$	24557,09 21599,47 19170,81 $\bar{X} = 21776$	4698,78 4278,99 4183,3 $\bar{X} = 4387$	2768,39 5337,0 5608,64 $\bar{X} = 4571$
$I_{st}/I_{an}$	0,288	0,7035	0,977	1,2	1,56	1,833



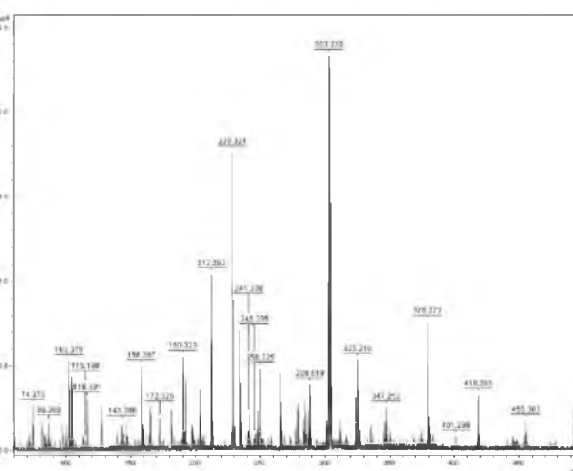
Проба №1



Проба №2



Проба №3



Проба № 4

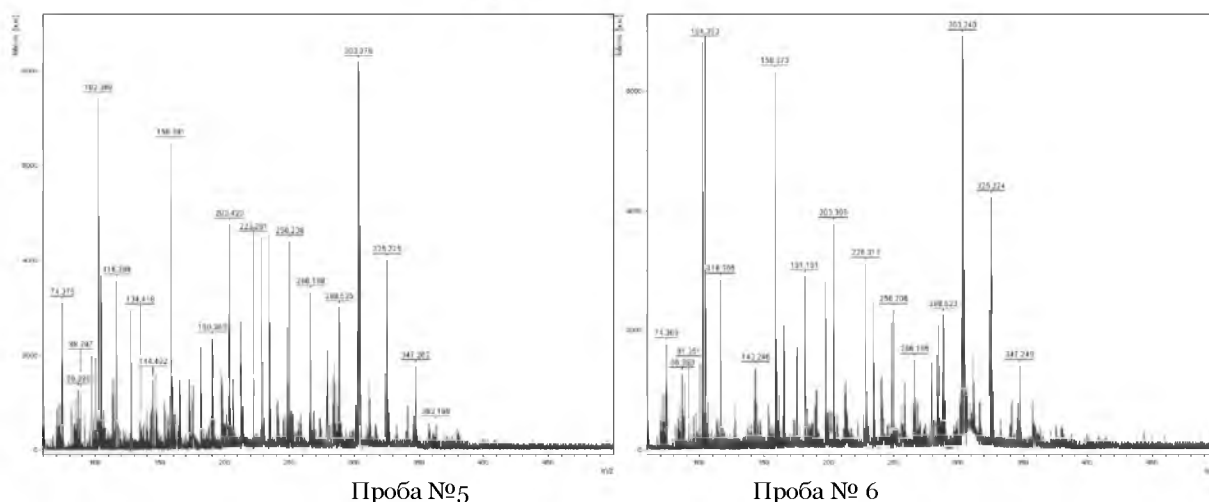


Рис. 2 – Масс-спектры анализируемой смеси

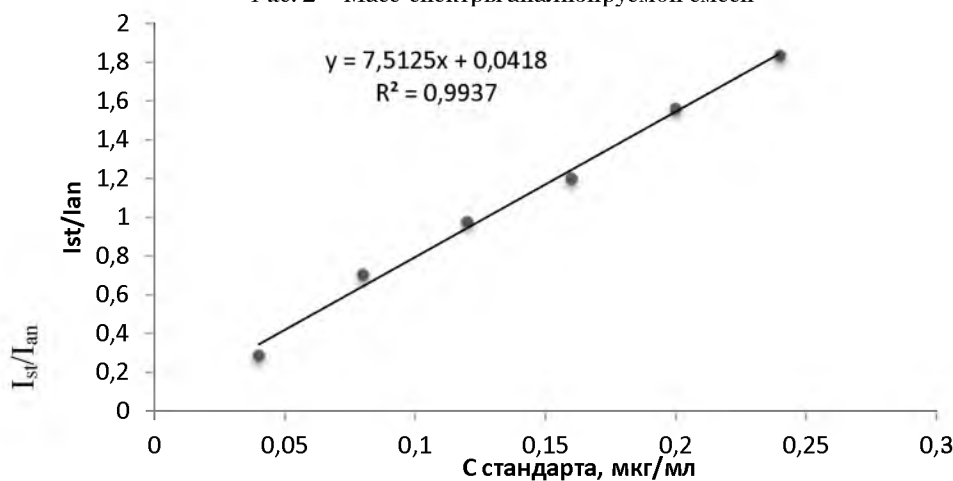


Рис. 3. Калибровочный график зависимости концентрации внутреннего стандарта от отношения интенсивностей внутреннего стандарта и аналита

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 приведенному калибровочному графику или вычислить по формуле:

$$C_x = C_{st} \frac{I_{an}}{I_{st}} \quad (1)$$

Из рассчитанных данных следует, что содержание аналита в пробе составило 0,1228 мкг/мл.

Относительную ошибку определяли в ходе 7 параллельных измерений разных образцов анализируемой смеси. Полученные данные обрабатывали статистически. Результаты статистической обработки определения содержания резвератрола методом масс-спектрометрии представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, относительная ошибка единичного определения методики количественного определения резвератрола методом масс-спектрометрии с вероятностью 95% составляет  $\pm 3,65\%$  и концентрацией определяемого вещества –  $10^{-7}$  г.

Для соотнесения полученных результатов использован метод количественного определения резвератрола методом УФ-спектрофотометрии в сравнении со стандартным образцом.



Таблица 2

**Результаты количественного определения резвератрола методом масс-спектрометрии**

X (мкг/мл)	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
0,1228	0,0005	0,00000025	$\bar{X} = 0,1233$ $\sum (\bar{X} - X)^2 = 0,00014$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,0018$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,0045$ $\varepsilon = 3,65 \%$
0,1303	-0,007	0,000049	
0,1301	0,0068	0,0000462	
0,1219	0,0014	0,00000196	
0,1194	0,0039	0,0000152	
0,1189	0,0044	0,000019	
0,1199	0,0034	0,000011	
$\bar{X} = 0,1233$		$\sum (\bar{X} - X)^2 = 0,00014$	

Для этого около 0,1 г (точная навеска) субстанции резвератрола, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл спирта этилового 96%-ного, перемешивали, доводили объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивали. 0,1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора спиртом этиловым 96%-ным до метки и перемешивали. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на УФ-спектрофотометре СФ-56, при длине волны 306 нм, относительно спирта этилового. Параллельно в аналогичных условиях готовили раствор стандартного образца резвератрола.

Было проведено 7 параллельных измерений. Результаты статистической обработки определения содержания резвератрола в субстанции представлены в табл. 3.

Таблица 3

**Результаты количественного определения резвератрола в субстанции**

X (мкг/мл)	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
4,1	-0,18	0,0324	$\bar{X} = 3,92$ $\sum (\bar{X} - X)^2 = 0,1789$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,065$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,163$ $\varepsilon = 4,16\%$
3,72	0,2	0,04	
3,85	0,07	0,0049	
3,94	-0,02	0,0004	
3,78	0,14	0,0196	
3,86	0,06	0,0036	
4,2	-0,28	0,078	
$\bar{X} = 3,92$		$\sum (\bar{X} - X)^2 = 0,1789$	

Как видно из данных табл. 3, относительная ошибка единичного определения методики количественного определения резвератрола в субстанции с применением метода УФ-спектрофотометрии с 95% вероятностью составляет  $\pm 4,16\%$  и концентрацией определяемого вещества –  $10^{-6}$  г.

Если соотнести результаты количественного определения резвератрола методом масс-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии приведённые в таблицах 2 и 3, то можно утверждать, что масс-спектрометрическое определение имеет более высокую чувствительность – более чем 30 раз, с меньшей погрешностью.

**Выводы.**

Таким образом, доказана в эксперименте возможность количественного определения биологически активных соединений различной природы методом MALDI/TOF/MS с использованием принципа внутренней стандартизации.

Разработан высокочувствительный способ количественного определения методом



MALDI/TOF/MS, пригодный для целей анализа органических соединений в объектах различного происхождения, что наглядно проиллюстрировано примером исследования субстанции *транс*-резвератрола.

#### Литература

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: В 2 т: пер. с англ. / Под ред. Р. Кельнера, Ж.-М. Мериме, М. Отто, М. Видмера. – М.: «Мир»: ООО «Издательство АСТ», 2004. – Т. 2. – 728 с.; Отто М. Современные методы аналитической химии. – 2-е испр. изд. – М.: Техносфера, 2006. – 416 с.
2. Сакодынский К.И. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский, В.В. Бражников, В.Ю. Зельвенский, Э.С. Ганкина, В.Д. Шац. М.: Химия, 1993. – 464 с.;
3. Сакодынский К.И. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский, В.В. Бражников, В.Ю. Зельвенский, Э.С. Ганкина, В.Д. Шац. М.: Химия, 1993. – 464 с.;
4. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / В.Д. Шатц, О.В. Сахартова. – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
5. Отто М. Современные методы аналитической химии. – 2-е испр. изд. – М.: Техносфера, 2006. – 416 с.

### **A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ORGANIC COMPOUNDS BY MASS SPECTROSCOPY, LASER DESORPTION / IONIZATION ON THE EXAMPLE OF THE ANALYSIS OF RESVERATROL**

**D.I. PISAREV  
O.O. NOVIKOV  
G.V. VASILIEV  
M.U. NOVIKOV  
E.T. ZHILYAKOVA**

*Belgorod National  
Research University*

*e-mail: pisarev@bsu.edu.ru*

The article presents the results of development of methods of quantitative determination of organic compounds by mass spectrometry in the form of matrix- assisted laser desorption ionization (MALDI) on an example of *trans*- resveratrol . Used for the quantitative determination principle of internal standardization. The possibility of using the method for quantifying MALDI demonstrated by assessing the linear relationship between concentration and intensity of the test component peak , which was itself. The studies proved this method promising for the quantitative determination of organic compounds.

Key words: *trans*-rezveratrrol, matrix-assisted laser desorption ionization, quantification, internal standardization.