



Б. О. Варинський

## Розвиток ВЕРХ-МС як методу оцінювання чистоти і підтвердження молекулярної маси нових біоактивних речовин

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** рідинна хромато-мас-спектрометрія, одноквадрупольний мас-аналізатор, чистота нових біоактивних речовин.

Для відтворення та розробки умов визначення чистоти та молекулярної маси нових біологічно активних сполук необхідно узагальнити інформацію щодо цього питання. Мета роботи – підсумувати відомості про розвиток рідинно-мас-спектрометричних методів з одноквадрупольними мас-аналізаторами при дослідженні чистоти та визначенні молекулярної маси сполук, що є потенційними лікарськими речовинами, для подальшого використання цих даних під час оптимізації методик в лабораторії рідинної хроматографії та мас-спектрометрії. Здійснили аналіз джерел фахової літератури, котрі присвячені оцінюванню чистоти і структури нових біоактивних речовин за допомогою ВЕРХ-МС з одноквадрупольними аналізаторами. У результаті описали основні етапи розвитку рідинної хромато-мас-спектрометрії відкритого доступу для дослідження чистоти й визначення молекулярної маси нових речовин, потенційних лікарських засобів.

### Развитие ВЭЖХ-МС как метода оценки чистоты и подтверждения молекулярной массы новых биоактивных веществ

Б. А. Варинский

Для воспроизведения и разработки условий определения чистоты и молекулярной массы новых биологически активных соединений необходимо обобщить информацию относительно данного вопроса. Цель работы – подытожить сведения о развитии жидкостно-масс-спектрометрических методов с одноквадрупольными масс-анализаторами при исследовании чистоты и определении молекулярной массы соединений, потенциальных лекарственных средств, для дальнейшего использования этих данных при оптимизации методик в лаборатории жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Проанализировали источники специализированной литературы, посвященной оценке чистоты и структуры новых биоактивных веществ с помощью ВЭЖХ-МС с одноквадрупольными анализаторами. В результате описали основные этапы развития жидкостной хромато-масс-спектрометрии открытого доступа для исследования чистоты и определения молекулярной массы новых веществ, потенциальных лекарственных средств.

**Ключевые слова:** жидкостная хромато-масс-спектрометрия, одноквадрупольный масс-анализатор, чистота новых биоактивных веществ.

*Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2014. – № 2 (15). – С. 85–88*

### The development of HPLC-MS as a method of purity assessment and confirmation the molecular mass of new bioactive compounds

B. A. Varynskyi

Aim. The analysis of the literature addressing the assessment of the purity and confirmation of the structure of new bioactive compounds by HPLC-MS with single quadrupole has been done.

Conclusion. The main stages in the development of open access liquid chromatography-mass spectrometry to purity research and determination of molecular weight of new substances that are potential drugshavebeen described.

**Key words:** Liquid Chromatography, Mass Spectrometry, Single Quadrupole Mass Analyzer, Bioactive Substances.

*Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2014; № 2 (15): 85–88*

На початку 1990-х років ВЕРХ-МС системи були автоматизовані і поліпшені для характеристики структури синтезованих лікарських речовин. Мас-спектрометри ставали стабільнішими і зручнішими в експлуатації. Цей період характеризується створенням мікропроцесорного контролю, робасної іонної оптики, детекторів, надійних автосамплерів, а також ВЕРХ-МС інтерфейсу, що зробило можливим автоматичний запис спектрів довгих послідовностей серій зразків. Схема одноквадрупольного мас-спектрометричного детектора наведена на рис.1.

Зважаючи, що за результатами ВЕРХ-МС можна визначати не тільки чистоту, але й молекулярні маси всіх компонентів, цей метод широко застосовують при підтвердженні структури синтезованих продуктів, він відповідає вимогам і потребам хіміків-синтетиків, які



Рис. 1. Схема мас-спектрометричного детектора.

працюють у галузі створення нових лікарських засобів. Це зумовило широке розповсюдження і збільшення доступності мас-спектрометрії на початку 1990-х рр. [1]. У 1995 р. у лабораторіях фармацевтичної компанії Пфайзер мас-спектрометри сканували більше ніж 100000 зразків на рік.

Одним із важливих нововведень було використання автосамплерів, які вперше з'явилися у газовій хромато-мас-спектрометрії, даючи змогу аналізувати багато серій зразків за стандартних умов [3].

Нині в рутинному аналізі субстанцій синтезованих біологічно активних речовин під час рідинної хромато-мас-спектрометрії використовують автосамплери та пристрої доставки розчинника для перенесення розчинних зразків у камеру іонізації як під час прямого введення зразка в потік (проточно-інжекційний аналіз (ПІА)), так і після хроматографічного розділення. Ці технологічні нововведення привернули увагу фармацевтичної промисловості, що виробляє величезну кількість нових хімічних сполук. Вимірювання молекулярних мас є найпростішою технікою для підтвердження структури. Єдине число (молекулярна маса) дозволяє прийняти або відкинути передбачувану структуру. Хімік здатний спостерігати, що передбачена зміна маси має місце від вихідної сировини до кінцевих продуктів. Це надає достатній аргумент на користь успішного синтезу для проведення наступного синтетичного кроку [1]. Вивчення фрагментації, що викликана зіткненнями, дає змогу також отримати додаткову інформацію про структуру синтезованих сполук.

Для швидкого визначення молекулярної маси першими пошорились системи проточно-інжекційного аналізу з мас-спектрометричною детекцією (ПІА-МС) (рис.2), а потім набули популярності системи відкритого доступу, котрі засновані на високоефективній рідинній хроматографії з мас-спектрометричною детекцією (ВЕРХ-МС) (рис.3).

У Запорізькому державному медичному університеті (ЗДМУ) здійснюють цілеспрямований синтез і систематичний пошук сполук, що мають різноманітну біологічну активність. Відстеження чистоти та структури цих речовин є дуже важливим завданням. Для відтворення та розробки умов визначення чистоти та молекулярної маси нових біологічно активних сполук необхідно було узагальнити інформацію, що стосується вказаної тематики.

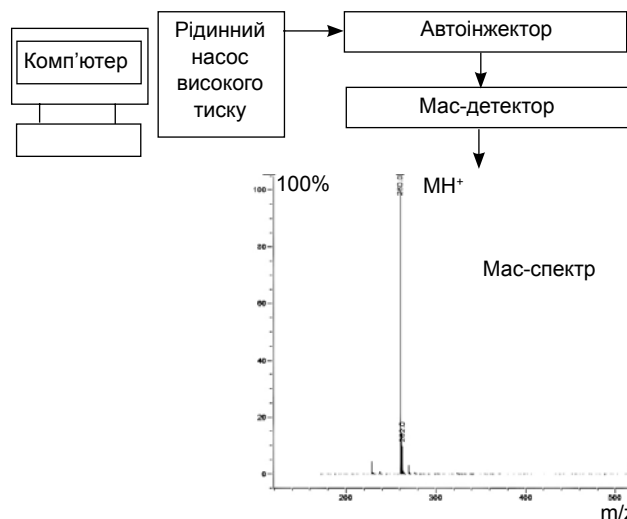


Рис. 2. Схема МСВД на основі проточно-інжекційного аналізу та мас-спектрометричного детектора.

**Мета роботи**

Узагальнити дані про розвиток рідинно-мас-спектрометричних методів з одноквадропольними мас-аналізаторами під час дослідження чистоти та визначення молекулярної маси сполук, що є потенційними лікарськими речовинами, для використання цих даних надалі при оптимізації методик у лабораторії рідинної хроматографії та мас-спектрометрії ЗДМУ.

*ПІА-МС системи.* У роботах Pulleni співавт., а також Taylor і співавт. на початку 1990-х рр. запропоновано концепцію мас-спектрометрії відкритого доступу (МСВД), тобто простої у використанні, уніфікованої мас-спектрометрії [1,2]. Спочатку розроблена як метод, що дає змогу розробникам нових лікарських засобів отримати безпосередній доступ до аналітичних технологій контролю якості, нині використовується в рутинних дослідженнях передусім у комбінаторній хімії. Вона суттєво знизила час, що необхідний для розробки схем

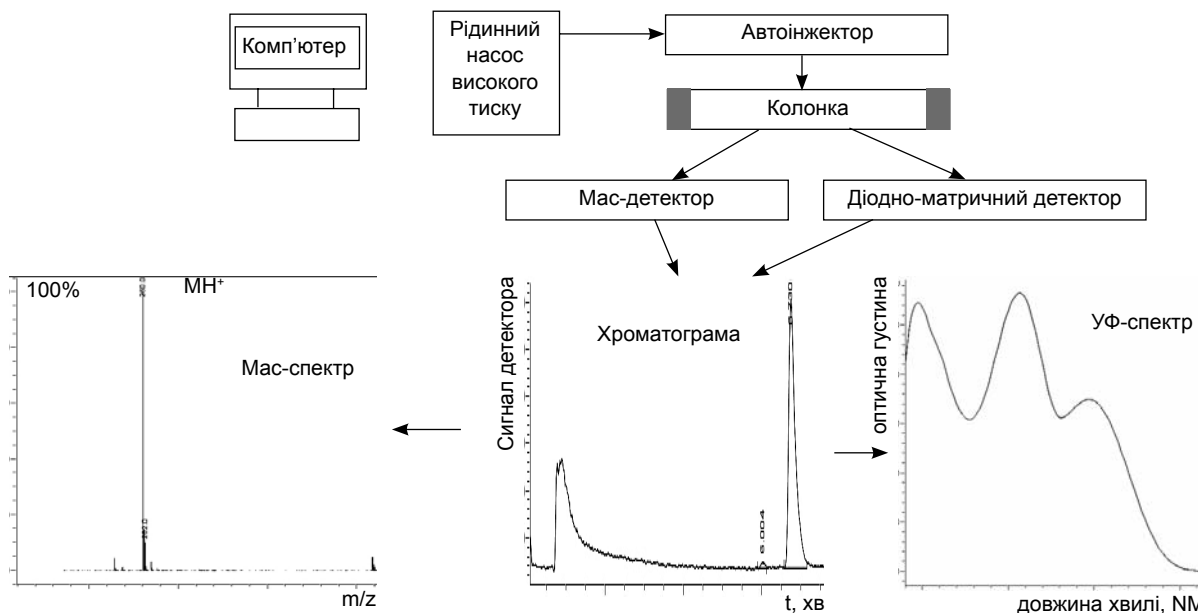


Рис.3. Схема МСВД на основі високоефективної рідинної хроматографії – діодно-матричного детектора та мас-спектрометричного детектора.

синтезу. МСВД надає хімікам можливість негайного коригування умов синтезу.

Новий підхід повністю витісняє тонкошарову хроматографію, яку використовували для підтвердження повноти перетворення вихідних сполук на кінцевий продукт [1].

Pullen і співавт. [1] описали систему МСВД (ПІА-МС) – без хроматографічної колонки, котра заснована на іонізації в термоспреї (ТС) (Trio-1000 спектрометр (ТС/МС), Fisons), у тому числі на основі хімічної іонізації пучком молекул (ХІПМ) аміаку при атмосферному тиску в двохваріантах: Trio-1000 спектрометр (ХІПМ/МС), Fisonsi HP-5989 (ХІПМ/МС), Hewlett-Packard.

Taylor і співавт. [2] запропонували альтернативну систему МСВД (ПІА-МС) без хроматографічної колонки, в якій використаний насос для високоефективної рідинної хроматографії, автосамплер із зовнішньою каруселлю (HP1050, Hewlett-Packard, DE), одноквадрупольний мас-спектрометр із ХІАТ під управлінням програмного забезпечення VG OpenLynx (Fisons Instruments, UK). Температура випарника ХІАТ дорівнює 420°C, тиск газу на небулайзері –  $4.13 \times 10^5$  Па. Маса зразка становила від 1 до 100 мкг. Його поміщали у 2 мл віалу і додавали 1 мл розчинника. Зазвичай використовували такі розчинники, як метанол, вода, ацетонітрил, хоча, якщо необхідно, може бути використаний метилен хлорид, диметилсульфоксид, хлороформ. Рухома фаза – метанол при швидкості потоку 0,5 мл/хв. Обсяг введеної проби – 5 мкл. Загальний цикл аналізу – близько 4 хвилин. Запропонована система дала можливість протягом 8 годин аналізувати 112 зразків.

У процесі удосконалення умов іонізації у відзначеній роботі дослідили майже 60 зразків за допомогою термоспрею, електроспрею (ЕСІ) і хімічної іонізації при атмосферному тиску (ХІАТ). Показано, що ХІАТ генерує молекулярний іон із більшою інтенсивністю, меншою фрагментацією, більшим відношенням сигнал-шум, ніж при використанні ТС. Більше того, ХІАТ утворив молекулярні іони для всіх зразків, що проаналізували, за винятком трьох пептидів. На противагу цьому майже 30% найбільш термолабільних зразків не утворювали молекулярних іонів у режимі терморозпилювальної іонізації. ЕСІ передбачає більш м'яку іонізацію, ніж ХІАТ і дає інформацію про молекулярну масу пептидів. Однак спектри ЕСІ характеризуються утворенням багатозарядних іонів і більшим хімічним фоном, ніж ХІАТ спектри. Оскільки більшість сполук, які автори роботи отримали в лабораторії, утворювали інтенсивні молекулярні іони з допомогою ХІАТ, дослідники обрали цей вид іонізації як основний.

*ВЕРХ-ДМД-МС системи.* Наступний крок – використання ВЕРХ-МС як МСВД. Діодно-матричний детектор (ДМД), запропонували як додатковий.

Такий підхід детально описали й обґрунтували Mallis і співавт. (2002) [4]. Цей метод включав ПІА-МС (1 хв), швидкий градієнт ВЕРХ-МС (3,5 хв), повільний градієнт (14 хв) і метод фрагментації (дисоціації, що викликана зіткненнями – ДВС). Система дає можливість аналізувати до 200 зразків щодня. Усі мас-спектри отримали з використанням одноквадрупольного спектрометра ЕСІ-МС (Micromass, Waters). Напруга на фрагментаторі – 25 вольт. При використанні ДВС – 60 вольт. Інтервал

сканованих  $m/z$  є 140–1000, із перемиканням полярностей. Програмне забезпечення було Masslynx version 3.5 у поєднанні з OpenLynx. ВЕРХ інструмент – WatersAlliance з автосамплером, діодно-матричний детектор Model 996 (ДМД). Сканування здійснювали від 210 до 400 нм. Використали дільник потоку між ДМД і МСД – 1:1. Колонка – WatersXTerra MS C18,  $50 \times 2.1$ ; розмір частинок сорбента – 5 мкм. Температура колонки становила 45°C. Рухому фазу отримали змішуванням 0,1% мурашиної кислоти у воді (А) і 0,1% мурашиної кислоти в ацетонітрилі (В). Обсяг введеної в автосамплер проби – 5 мкл. Для повільного градієнта використовували 10 мкл. Здійснювали автоматичне перемикання між ПІА і ВЕРХ. Зразок масою 0,1 мг розчиняли в суміші ДМСО, метанол, ацетонітрил 1:4:5 в 1 мл. Отриманий розчин в концентрації 0,1 мг/мл переносили у віалу об'ємом 2 мл.

Необхідність використання діодно-матричного детектора пояснюється тим, що деякі неполярні сполуки важко іонізуються в ЕСІ.

Автори показали, що з 1998 до 2001 р. використання ПІА-МС значно зменшилось, а кількість аналізів із використанням ВЕРХ-МС збільшилась у 25 разів. Незважаючи на те, що ПІА-МС є найшвидшим методом, він має важливий недолік: спостерігають ефект іонного пригнічення. При використанні ВЕРХ-МС при градієнтному елююванні іонні сполуки елюються в мертвому об'ємі і не заважають подальшому аналізу речовин.

*ВЕРХ-ДМД-ХАД-ДСР-МС системи.* Molina-Martin [5] і співавт. у 2005 р. описали систему, що поєднує ВЕРХ-ДМД-ХАД (хемілюмінесцентний азотний детектор)-ДСР (детектор по світлорозсіюванню)-МС для автоматизованого ортогонального поділу домішок лікарських речовин та основних компонентів. Ця система запропонована для оцінювання чистоти і визначення молекулярної маси сполук. У лабораторії авторів аналізують тисячі хімічно різних речовин. Традиційно ці дослідження здійснюються в кислому середовищі із трифтороцтовою або мурашиною кислотою, аби запобігти взаємодії аналіту з силанольними групами стаціонарної фази й іонізувати його для отримання позитивно заряджених іонів для мас-спектрометричної детекції. Однак низькі значення рН мобільних фаз забезпечують не кращі хроматографічні характеристики (передусім через малий час утримування) для основних сполук, які є найбільш численними лікарськими речовинами. Високі значення рН прийнятні для колонок, які отримують за новими технологіями. Автори виявили, що комбінування низьких і високих рН рухомої фази зменшує ризик неправильного оцінювання чистоти синтезованих сполук. У роботі обговорена можливість використання сигналу хемілюмінесцентного азотного детектора для об'єктивного кількісного оцінювання чистоти (абсолютне оцінювання чистоти), а також використання капілярного електрофорезу як додаткової можливості для оцінювання чистоти синтезованих сполук [5].

Хроматографічне розділення виконано на хроматографі Agilent HP1100, що оснащений бінарним насосом, термостатом колонок, ДМД. УФ-детекцію здійснювали при 214 нм. Після ДМД виробляли розподіл потоку між ХАД-ДСР-МС-детекторами. Використовували Agilent 1100 автосамплер, що розрахований на 100 віал або на

96-лунковий планшет. Також використаний Gilson 215 автосамплер високої ємності. Мас-спектри реєстрували на одноквадрупольному мас-детекторі з іонізацією в електроспрєї. Вимірювання проводили одночасно в позитивному і негативному режимі іонізації. Управління системою та аналіз здійснювали з використанням HP Chemstation (Agilent technologies). Детектор зі світлорозсіювання – PL-EMD (PolymerLaboratories, UK). Хемілюмінесцентний азотний детектор – CLND 8060 (AntekInstruments, USA). Аналітичні колонки – Kromasil C18 (Hi-Chrom), Discovery C18 (Supelco) – для використання в кислих середовищах, XTerra MS C18 (Waters) із розміром частинок сорбенту 5 мкм. Рухомі фази з кислим середовищем утворювались змішуванням води (розчинник А) та ацетонітрилу і метанол (розчинник В), обидва містять 0,1% мурашиної кислоти і 0,05% трифтороцтової кислоти. Для лужної рухомої фази використали 10 мМ гідрокарбонат амонію (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, розчинник А), котрий доведений до рН=9 за допомогою гідроксиду амонію та ацетонітрилу (розчинник В). Детектор зі світлорозсіювання необхідний для сполук, які давали слабкі сигнали або сигнали, що відсутні на ДМД і МСД.

Нещодавно була опублікована робота [6] з описом надвисокоєфективної рідинної хроматографічної системи з ДМД, ДСР, МС для оцінювання чистоти і підтвердження молекулярної маси синтезованих сполук, потенційних лікарських засобів. Статтю запропонували фахівці компанії Agilent Technologies як методичні рекомендації для використання обладнання компанії. Описаний одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 6130, ДМД Agilent 1260 Infinity, ДСР Agilent 1260 Infinity. Градієнтне елюювання здійснювали протягом 7 хвилин на 1,8 мкм колонках Agilent Zorbax EclipsPlus C18, 4.6×100 мм. Термостатували колонку при 40°C. Елюенти готували змішуванням води та ацетонітрилу з 0,1% мурашиної кислоти. Швидкість потоку – 1 мл/хв. ДМД використовували при 210, 254 і 280 нм для виявлення домішок. Зразок розчиняли в 100% метанолі. Обсяг введеної в інжектор проби – 10 мкл. Проводили розподіл потоку між ДСР і МСД. Напруга на фрагментові – 90 В. Тиск на небулайзері – 15 psig. Сканували m/z від 50 до

950. Для опрацювання даних запропонована програма Analytical Studio Reviewer B.02.01.

Цей метод дає змогу, по-перше, підтвердити наявність передбачуваної структури, по-друге, оцінити чистоту синтезованих сполук.

#### Висновки

Проаналізували розвиток чинних рідинних мас-спектрометричних систем відкритого доступу, які використовують для перевірки чистоти та встановлення молекулярної маси речовин, що мають біологічну активність і можуть бути перспективними лікарськими речовинами.

Наведені параметри конфігурації цих систем. Показана еволюція від МС систем проточно-інжекційного аналізу до МС систем на основі високоєфективної рідинної хроматографії з додатковими детекторами (рис. 4, табл. 1).

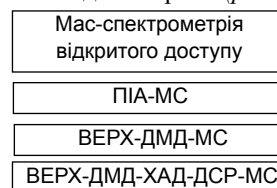


Рис. 4. Розвиток мас-спектрометрії відкритого доступу (МСВД).

Таблиця 1

Конфігурація систем МСВД			
Сорбент колонки, розмір частинок	Іонне джерело	Додаткові детектори	Посилання
-	ТС, ХІПМ	-	[1]
-	ХІАТ	-	[2]
C18; 5 мкм	ЕСІ	ДМД	[5]
C18; 5 мкм	ЕСІ	ДМД, ХАД, ДСР	[6]
C18; 1,8 мкм	ЕСІ	ДМД, ДСР	[7]

Наведені переваги та недоліки цих систем. Обґрунтували переваги ВЕРХ-МС систем перед ПІА-МС. Показана мета використання додаткових детекторів.

**Перспективи подальших досліджень.** Про дані, що наведені, використовуємо для створення підходів до оптимізації ВЕРХ-МС методик, які застосовуються в ВЕРХ-МС лабораторії ЗДМУ для дослідження речовин, потенційних лікарських засобів, а також для визначення складу сировини та напівпродуктів синтезу.

#### Список літератури

1. Pullen, F. S., Kerkins, G. L., Burton, K. I., Ware, R. S., Teague, M. S., & Kiplinger, J. P. (1995) Putting Mass Spectrometry in the Hands of the End User. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, – 1995. – Vol. 6. – № 5. – P. 394–399.
2. Taylor L.C.E. Open Access Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry for Routine Sample Analysis / L.C.E. Taylor, R.L. Johnson, R. Raso // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 1995. – Vol. 6. – № 5. – P. 387–393.
3. Brune C. New instrumentation in mass spectrometry / C. Brune // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* – 1982. – Vol. 45. – P. 51.
4. Open-access liquid chromatography/mass spectrometry in a drug discovery environment / [L.M. Mallis, A.B. Sarkahian, J.M. Kulishoff, et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2002. – Vol. 37. – P. 889–896.
5. Liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques for purity assessment in early drug discovery / [M. Molina-Martin, A. Marin, A. Rivera-Sagredo, A. Espada] // *J. Sep. Sci.* – 2005. – Vol. 28. – P. 1742–1750.
6. Rao N.S. K. Purity Assessment of Drug Discovery Compound Libraries Using an Agilent Single Quadrupole LC/MS System Coupled to Diode Array and Evaporative Light Scattering Detectors / N.S.K. Rao, S. Sen // *Application Note. Drug Discovery. Agilent Technologies, Inc.* – 2013. – 5991–2089EN.

#### References

1. Pullen, F. S., Kerkins, G. L., Burton, K. I., Ware, R. S., Teague, M. S., & Kiplinger, J. P. (1995) Putting Mass Spectrometry in the Hands of the End User. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 6, 394–399.
2. Taylor, L. C. E., Johnson, R. L., Raso, R. (1995). Open Access Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry for Routine Sample Analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 6, 387–393.
3. Brune, C. (1982) New instrumentation in mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, 45, 51.
4. Mallis, L. M., Sarkahian, A. B., Kulishoff, J. M., Watts, W. L., Watts, Jr. L. (2002) Open-access liquid chromatography/mass spectrometry in a drug discovery environment. *J. Mass Spectrom.*, 37, 889–896.
5. Molina-Martin, M., Marin, A., Rivera-Sagredo, A., & Espada, A. (2005) Liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques for purity assessment in early drug discovery. *J. Sep. Sci.*, 28, 1742–1750.
6. Rao, N. S. K., Sen, S. (2013) Purity Assessment of Drug Discovery Compound Libraries Using an Agilent Single Quadrupole LC/MS System Coupled to Diode Array and Evaporative Light Scattering Detectors. *Application Note. Drug Discovery. Agilent Technologies, Inc.*, 5991–2089EN.

#### Відомості про автора:

Варинський Б.О., к. фарм. н., ст. викладач каф. фізичної та колоїдної хімії, Запорізький державний медичний університет, E-mail: varinsky@zsmu.zp.ua.

Надійшла в редакцію 06.03.2014 р.