

На правах рукописи



ЭСПАРСА САНДОВАЛЬ СЕСАР АУГУСТО

**Комбинация планарной хроматографии и масс-спектрометрии МАЛДИ для
исследования смесей органических соединений**

(02.00.03-органическая химия)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2019

Работа выполнена на кафедре органической химии факультета физико-математических и естественных наук Российского университета дружбы народов.

Научный руководитель:

Варламов Алексей Васильевич

доктор химических наук, профессор кафедры органической химии химического факультета ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов».

Официальные оппоненты:

Буряк Алексей Константинович

доктор химических наук, профессор РАН.

ФГБУ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук.

Лебедев Альберт Тарасович

доктор химических наук, профессор кафедры органической химии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова.

Защита диссертации состоится «21» мая 2019 г. в 18 час. 00 мин. на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.203.11 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117923, Москва, ул. Орджоникидзе, д. 3, зал №2.

С диссертацией можно ознакомиться в Учебно-научном информационном библиографическом центре Российского университета дружбы народов по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан « » 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



В. В. Курликин

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Среди различных новейших высокочувствительных и прецизионных методов анализа тонкослойная хроматография (ТСХ) до сих пор занимает одно из важных мест в качественном и полуколичественном анализе синтетических и природных смесей. В практике ТСХ идентификация разделенных компонентов обычно проводится с использованием различных оптических, химических методов и величин R_f , не отличающихся высокой селективностью, чувствительностью и информативностью. Гораздо более эффективным подходом для идентификации компонентов разделенных с использованием ТСХ является применение масс-спектрометрии с десорбционными методами ионизации, в частности, с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ).

Однако такой подход также не лишен недостатков, которые характерны для обоих этих методов. Если для молекул анализов процессы протонирования или депротонирования в условиях МАЛДИ затруднены, эффективность ионизации значительно снижается. Сюда относятся неполярные и слабополярные соединения как природного происхождения (например, спирты и амины), так и синтетические (например, биологически активные гетероциклические соединения) и многие другие.

Еще одной проблемой является то, что разделение соединений с использованием ТСХ приводит к значительному снижению концентрации аналита на поверхности адсорбента. Достаточно эффективным решением всех указанных проблем может быть применение дериватизации. При этом реакция должна проводиться непосредственно на пластине для ТСХ после хроматографического разделения компонентов. Наиболее оптимальным подходом в таком случае является химическая модификация, направленная на введение в молекулу детектируемого и идентифицируемого соединения остатка с фиксированным зарядом, который будет обеспечивать легкую десорбцию деривата в условиях МАЛДИ.

Следует подчеркнуть, что известно крайне мало публикаций, посвященных дериватизации для нужд комбинированного метода ТСХ/МАЛДИ. Необходимо отметить, что разработка методов постхроматографической дериватизации, основанных на введении фиксированного заряда в молекулу аналита имеет перспективы применения не только в tandemе ТСХ/ МАЛДИ, но и в сочетании ТСХ с другими “мягкими” десорбционными масс-спектрометрическими методами такими, например, как DART («прямой анализ в режиме реального времени»).

Цели и задачи работы - разработка эффективных методик детектирования и идентификации синтетических и природных органических соединений в смесях с использованием сочетания ТСХ и масс-спектрометрии МАЛДИ; разработка нового подхода для анализа этим методом (в он-лайновом режиме) плохо ионизирующихся веществ.

Научная новизна работы. Полученные результаты в рамках данной работы являются новыми. Разработаны и оптимизированы подходы для регистрации масс-спектров МАЛДИ непосредственно с пластин ТСХ в онлайновом режиме для широкого круга соединений. Впервые предложена композитная матрица, обеспечивающая десорбцию и ионизацию анализов из сорбента ТСХ при их анализе методом МАЛДИ. Она позволяет увеличить концентрацию аналита на поверхности адсорбента и тем самым повысить чувствительность анализа. Впервые предложен общий подход и разработаны методики для химической модификации (дериватизации) слабо и неполярных анализов непосредственно на пластинах для ТСХ. Показано, что особенно эффективным является использование реагентов, позволяющих вводить в анализ остаток с фиксированным зарядом.

Практическая значимость работы. Проведенные исследования расширяют границы применения комбинированного метода ТСХ/МАЛДИ при анализе органических соединений, сокращают ограничения этих двух методов, что мотивирует внедрение разработанной методологии в химические и аналитические лаборатории.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на: VI международной конференции по использованию физико-химических методов при открытии и разработке лекарственных средств (Загреб, Хорватия, 2017), VII Всероссийской конференции с международным участием "Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы" (Москва, Россия, 2017), Международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, Россия, 2016) и др.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в реферируемых журналах, которые входят в перечень ВАК, и 7 тезисов докладов на конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа объемом 120 страниц машинописного текста состоит из введения, обзора литературных данных, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы, который включает 114 источника. Содержит 7 схем, 10 таблиц, 31 рисунок.

Основное содержание диссертационной работы

Во введении обоснована актуальность темы работы, сформулированы ее цели и задачи, показана научная новизна и практическая значимость.

В обзоре литературы описаны имеющиеся сведения о подходах, применяемых при комбинировании ТСХ с масс-спектрометрией МАЛДИ, и возникающих при этом проблемах, а также о дополнительных приемах химической модификации анализаторов, используемых в каждом из этих двух методах.

В экспериментальной части перечислены все исследованные органические соединения, реагенты и материалы, приведены экспериментальные устройства и способы получения спектральной информации, а также описаны методики обработки хроматограмм и пост-хроматографической дериватизации анализаторов.

Обсуждение результатов

1. Разработка комбинированных матриц для анализа органических соединений методом ТСХ-МАЛДИ.

В этой части работы при разработке общих принципов сочетания ТСХ и масс-спектрометрии МАЛДИ в качестве модельных соединений были выбраны N-гетероциклические соединения, синтезированные на кафедре органической химии РУДН (Схема 1).

Предварительными экспериментами было установлено, что из двух типов адсорбентов (силикагель и оксид алюминия) для пластин ТСХ лишь первый обеспечивал надежную десорбцию/ионизацию исследованных веществ в присутствии органических матриц (НАВА, DHB, IAA и АТ). При этом в масс-спектрах наблюдали пики катионированных и протонированных молекул анализаторов. Пластины же с сорбционным слоем оксида алюминия оказались не пригодны для получения спектров МАЛДИ, поскольку никаких сигналов со значимым соотношением сигнал/шум (S/N) обнаружено не было. Поэтому в последующих исследованиях использовались лишь пластины ТСХ на основе силикагеля.

Было обнаружено, что при нанесении растворов органических матриц непосредственно на зоны (пятна) элюирования анализаторов с помощью шприца или специального распылителя, происходит повторное «хроматографированию» анализатора (в качестве подвижной фазы выступал растворитель, в котором наносилась матрица), что сопровождается размыванием его пятна и неравномерной сокристаллизацией с матрицей. Эти проблемы могут быть

устраниены при использовании берастворного способа нанесения матрицы. Особый интерес здесь представляет использование грифеля карандаша, которым, как следует из нескольких литературных источников, можно легко и просто обрабатывать элюированное пятно. В наших экспериментах элюированные пятна на ТСХ, содержащие адсорбированный аналит, визуализировались в УФ-свете и обводились мягким графитовым карандашом. Дополнительно на пятно наносилась графитовая сетка.

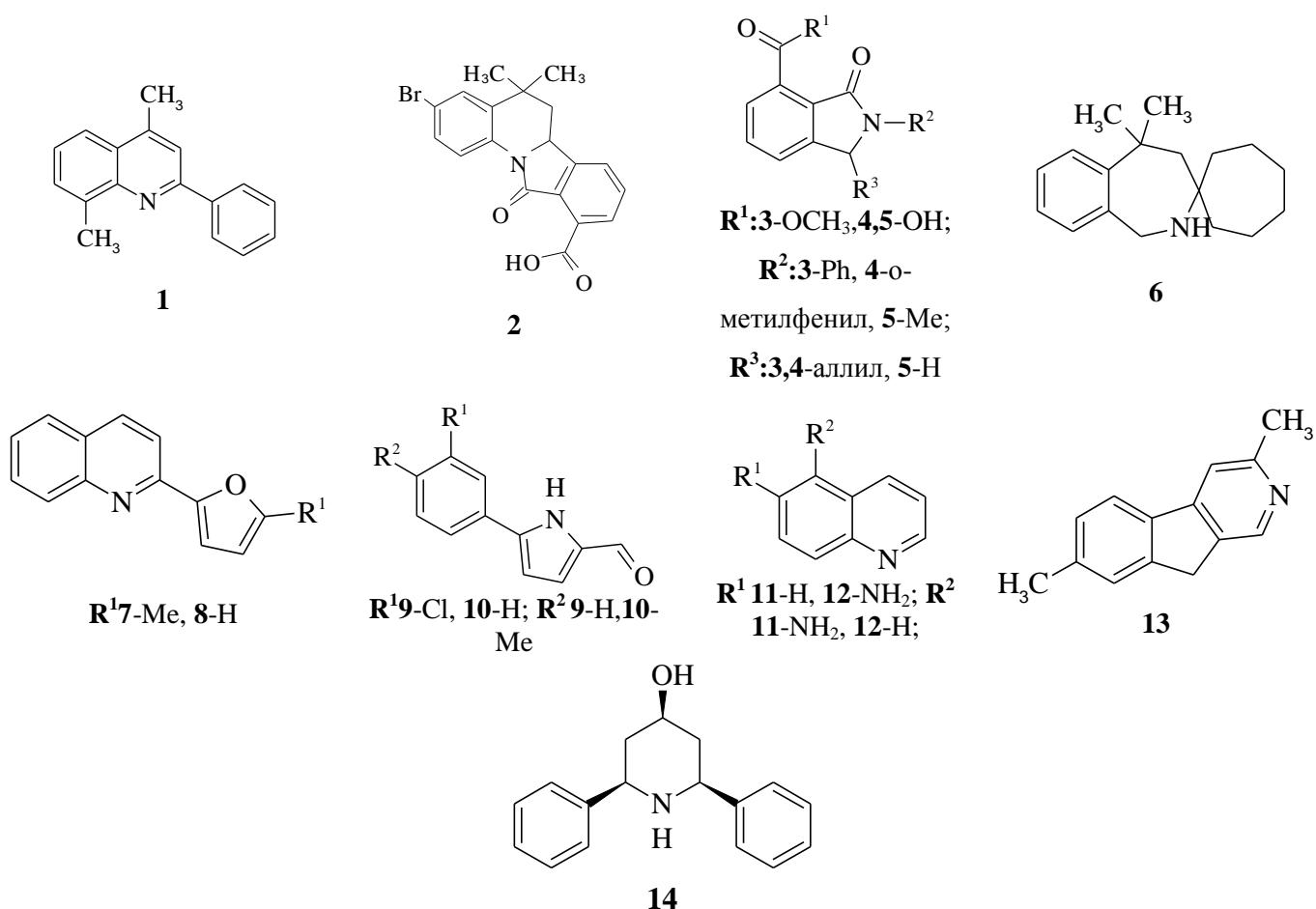


Схема 1. Структуры соединений, исследованных методом ТСХ/МАЛДИ.

При использовании графита для поверхностно-активированной лазерной десорбции/ионизации (ПАЛДИ) можно было ожидать образования только аддуктов с катионами натрия $[\text{M}+\text{Na}]^+$ и калия $[\text{M}+\text{K}]^+$, которые могут быть следствием присутствия в растворителях незначительных количеств этих катионов, но не ионов $[\text{M}+\text{H}]^+$, поскольку в системе нет источника протонов. Во многих случаях это действительно так, и по наличию дублетов таких катионизированных ионов можно уверенно определяются молекулярные массы. Но иногда в спектрах регистрируются пики не только катионизированных, но и протонированных молекул $[\text{M}+\text{H}]^+$. Возможно они являются результатом присутствия неорганической кислоты в анализе или силанольных групп на поверхности сорбента.

При переходе к регистрации масс-спектров МАЛДИ смесей гетероциклических соединений разделенных на пластинах ТСХ (этилацетат–гексан 3:2) было обнаружено, что соотношения S/N значительно ухудшилось. Вероятной причиной этого факта является то, что ионизация в МАЛДИ происходит на поверхности ТСХ, в то время как аналит распределяется в толщине слоя сорбента, и его концентрация на поверхности сорбента снижается. Для решения этой проблемы было решено наносить графит на пластину ТСХ в виде его дисперсии в глицерине. Высокая полярность глицерина практически не позволяет ему «двигаться» по пластине ТСХ, однако его присутствие позволяет экстрагировать анализ из слоя сорбента, увеличивая его концентрацию на поверхности. Использование этого подхода позволило существенно улучшить регистрируемые масс-спектры. Как и при использовании чистого графита, в масс-спектрах в основном наблюдались пики ионов-аддуктов с катионами натрия и калия $[M+Na]^+$ и $[M+K]^+$ (Рис. 1).

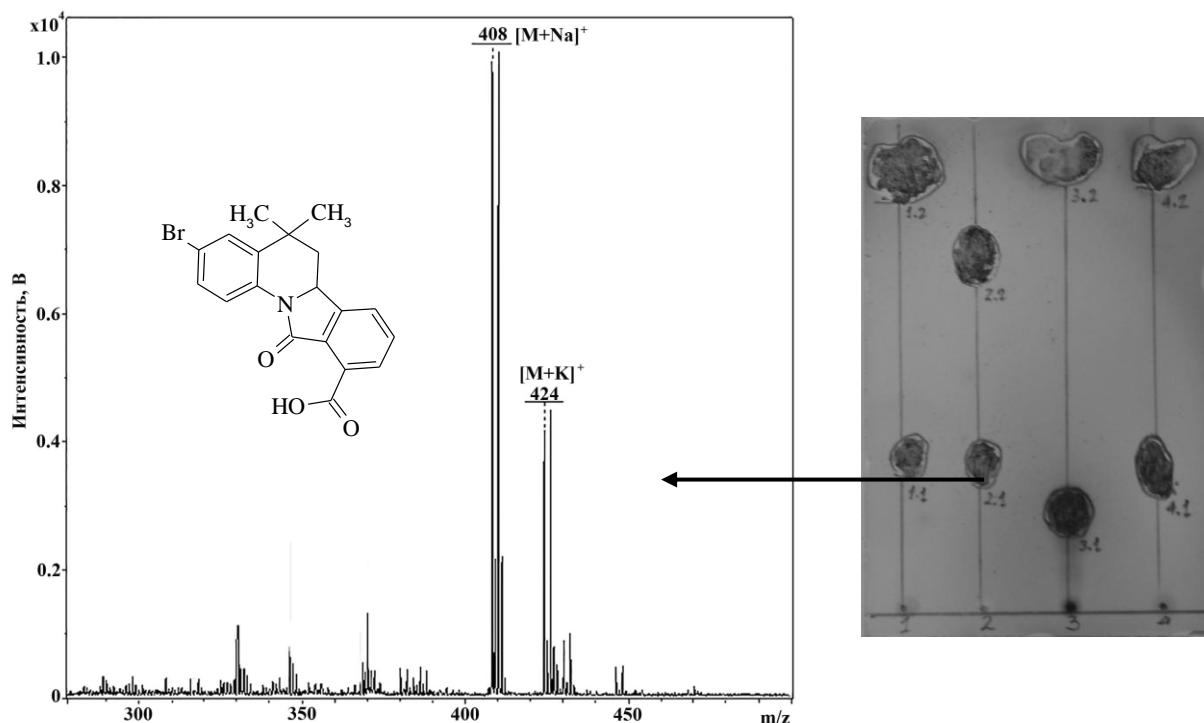


Рис. 1. Масс-спектр МАЛДИ бромсодержащего соединения (2); получен с пластин ТСХ после разделения и с использованием в качестве матрицы раствора графит-глицерин.

2. Ионные жидкости как матрицы для МАЛДИ.

Другой опробованный нами подход, позволяющий увеличить концентрацию аналита в приповерхностном слое, состоял в использовании в качестве матриц ионных жидкостей (ИЖ), которые, как и в случае глицерина, не перемещаются по пластине ТСХ и не размывают пятно аналита. Анализ полученных данных показал, что в масс-спектрах МАЛДИ зарегистрированных с использованием в качестве матрицы ИЖ, наблюдались

пики протонированных молекул и ионов-аддуктов с катионами натрия и калия $[M+Na]^+$ и $[M+K]^+$ (рис. 2).

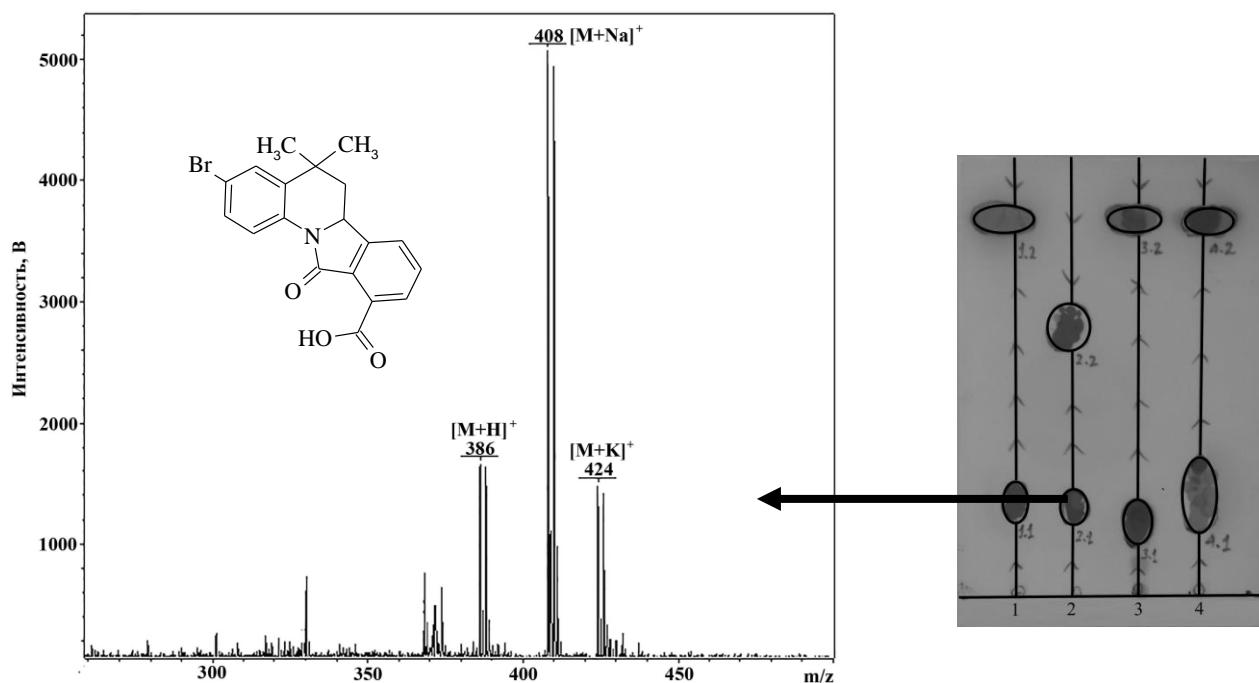


Рис. 2. Масс-спектр МАЛДИ соединения (2) получен с пластин ТСХ после разделения и использованием жидкокристаллической матрицы DHB-бутиламин.

Следующий этап нашего исследования состоял в дальнейшем улучшении методики анализа смесей органических соединений методом ТСХ/МАЛДИ. Для этого нами было подобрано несколько модельных смесей синтетических гетероциклических соединений из вышеприведенной серии. Все они были разделены с помощью ТСХ. Во всех случаях нам удалось зарегистрировать масс-спектры МАЛДИ соединений, входящих в состав смесей. Однако при масс-спектрометрическом мониторинге пластин ТСХ мы обнаружили отсутствие какой-либо зависимости интенсивности масс-спектра от места облучения пятна. Действительно, изначально мы предполагали, что суммарный ионный ток и выход характеристических ионов будут зависеть от концентрации соединения на пластине: т.е. при приближении к центру пятна увеличиваться, а на его краях уменьшаться, и, в целом, иметь вид классического гауссового распределения (может быть с некоторыми искажениями). Наблюдаемая же картина существенно отличалась от ожидаемой: интенсивность пиков ионов мало зависела от предполагаемого распределения концентрации анализаторов на пластине ТСХ и изменялась хаотически. Это связано, видимо, с неоднородностью формируемого слоя графита (в случае дисперсии графита в глицерине) или псевдожидкого слоя (в случае ионных жидкостей).

Для устранения такой фиксируемой неоднородности мы впервые предложили использовать композитную матрицу, составленную из традиционной органической матрицы для МАЛДИ и частиц графита, диспергированных в глицерине. С целью более наглядной визуализации мы реконструировали хроматограммы путем сканирования ионов, характеристических для конкретных соединений, вдоль всей области элюирования соединений. Как правило, практически для всех веществ характеристичными и наиболее интенсивными были пики, соответствующие протонированной молекуле $[M+H]^+$, но в некоторых случаях самым интенсивным мог быть пик содиированного аддукта, как, например, в случае соединения 3 (ионы m/z 330 и m/z 346, рис. 3). Полученные таким образом хроматограммы оказались существенно ближе к ожидаемому гауссовому распределению (Рис. 4).

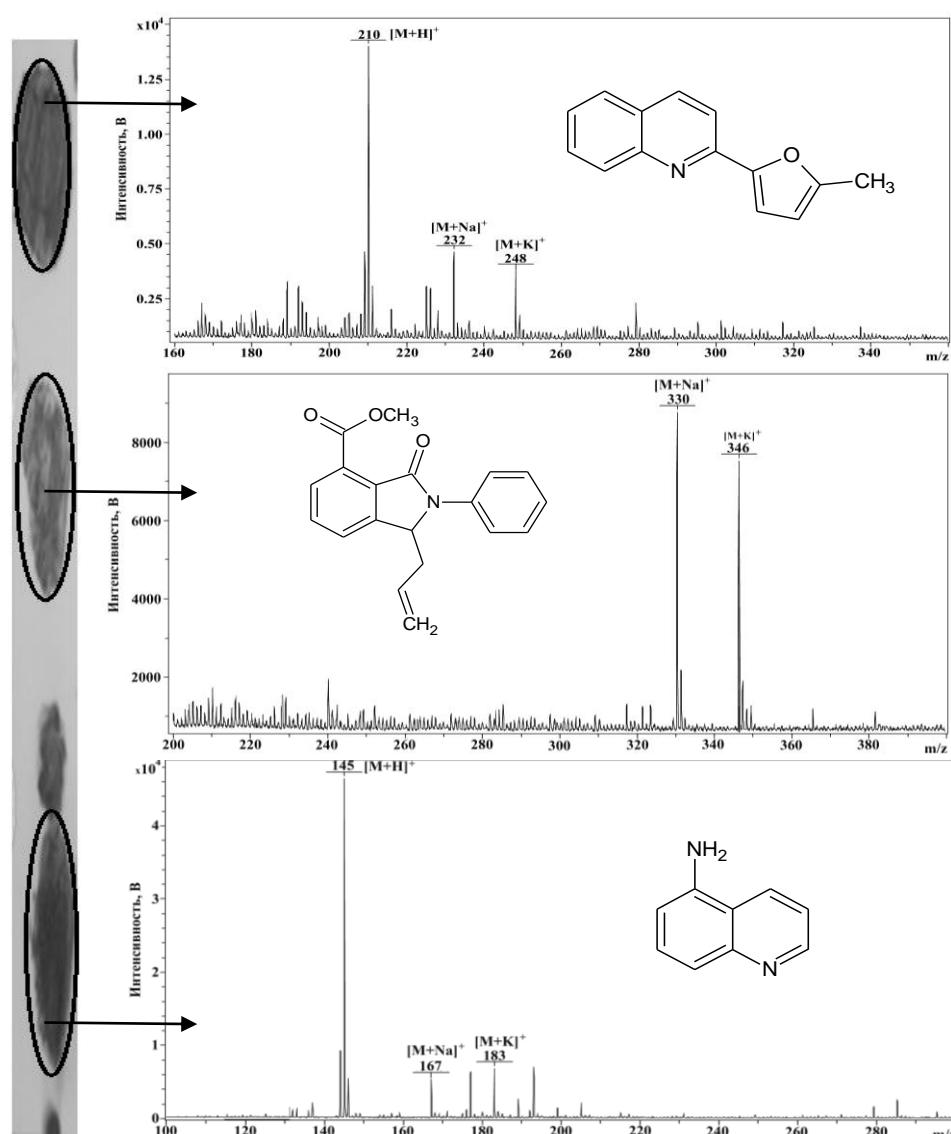


Рис. 3. Масс-спектры МАЛДИ соединений (2), (3) и (4), зарегистрированные с пластиной ТСХ после их разделения и использования матрицы DHB-графит-глицерин.

В целом, масс-спектры МАЛДИ и хроматограммы (рис. 3,4) удалось получить почти для всех изученных смесей, однако регистрация таких масс-спектров требовала большой энергии лазера. Лишь при использовании в качестве матрицы смеси DHB-графит-глицерин и IAA-графит-глицерин удалось зарегистрировать спектры с хорошим соотношением S/N.

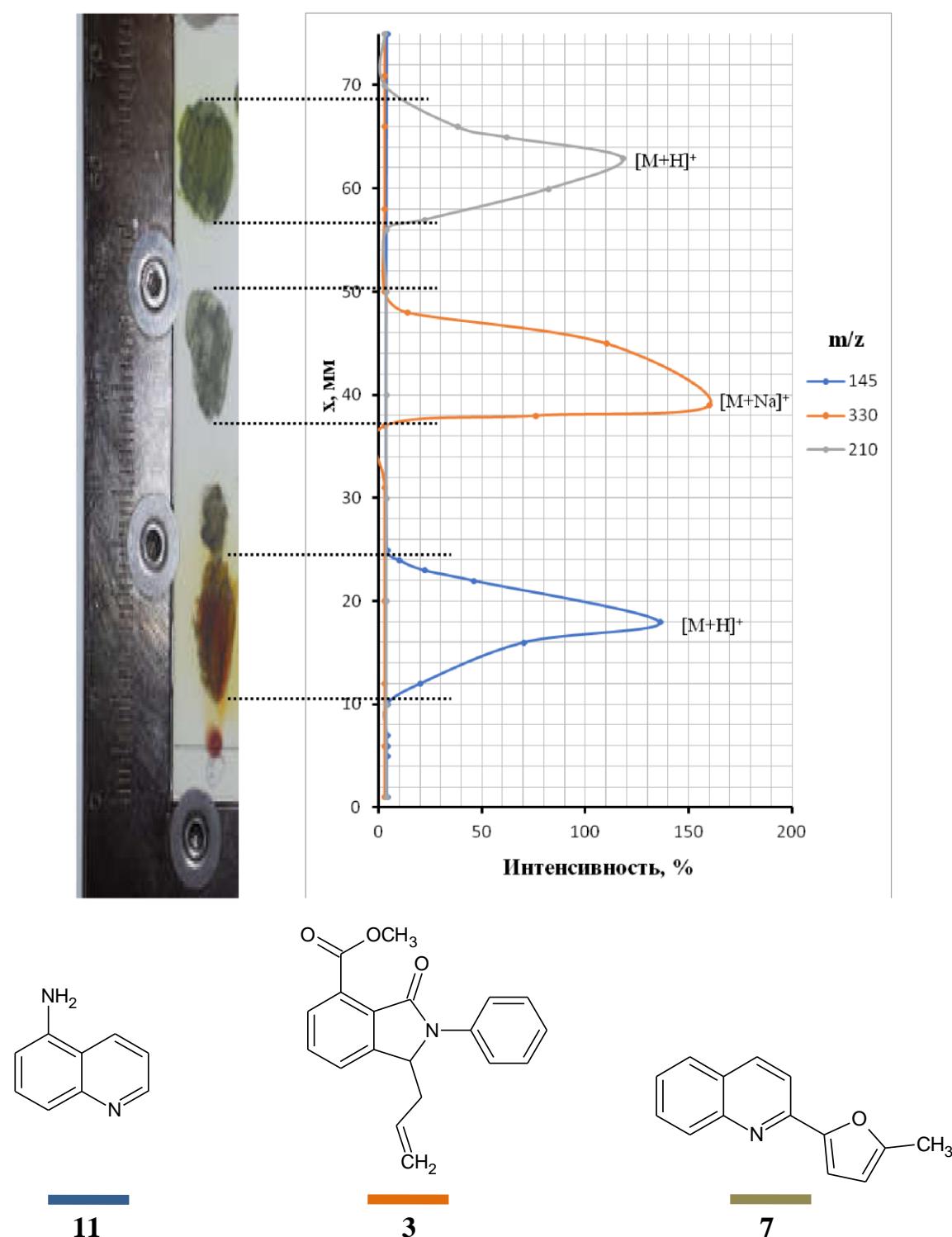


Рис. 4. Реконструированная хроматограмма, зарегистрированная с пластин ТСХ после разделения трехкомпонентной смеси и использования комбинированной матрицы DHB-графит-глицерин.

3. Пост-хроматографическая дериватизация при анализе ТСХ-МАЛДИ гидроксилсодержащих соединений.

В продолжение работы мы впервые исследовали возможность применения целевой дериватизации непосредственно на пластинке ТСХ после элюирования смеси (пост-хроматографическая дериватизация) для последующей онлайновой регистрации масс-спектров МАЛДИ модифицированных разделенных компонентов. Целью этих исследований являлось не получение производных для визуализации пятен на пластинке, а увеличение эффективности ионизации производного, получения структурной информации об аналитах и в перспективе для количественного их определения. До наших исследований работы такого характера никем не проводились.

Наибольший интерес представляло введение в молекулу аналита группы с коваленто-связанным зарядом. Как известно, при такой дериватизации неполярные и слабополярные соединения, неподдающиеся прямому анализу методом МАЛДИ, превращаются в солеобразные производные, обеспечивающие значительную эффективность ионизации под действием МАЛДИ или даже ее безматричного варианта, поскольку они содержат уже готовый катион, легко десорбирующийся в этих масс-спектрометрических условиях. Хотя регистрируемые при этом масс-спектры МАЛДИ содержат только катионные части производных, их массовые числа (с учетом инкремента вводимой массы реагента для дериватизации) позволяют получить важнейшую информацию о веществе – молекулярную массу. Целевая дериватизация может подтвердить наличие в молекуле конкретных функциональных групп и в общем случае добить важную информацию о структуре исследуемого соединения, в частности, при дополнительном использовании тандемной масс-спектрометрии.

Первыми объектами нашего исследования были различные спирты и фенолы (Схема 2). Поскольку это неполярные или слабополярные соединения, то, как и ожидалось, их масс-спектры МАЛДИ, зарегистрированные с пластин ТСХ с использованием всех опробованных матричных соединений и композитных матриц на их основе, не содержали сколько-либо значимых пиков ионов, соответствующих анализам.

Для дериватизации соединений, содержащих гидроксильную группу, нами было предложено использовать их ацилирование 3-бромпропионилхлоридом в присутствии пиридина до образования четвертичной аммониевой соли. Этот тип дериватизации гидроксил-содержащих соединений был разработан ранее в ИНХС РАН для анализов методом масс-спектрометрии МАЛДИ [Borisov R.S., Zhilyaev D.I., Polovkov N.Yu., Zaikin V.G. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2014. 28. P2231–2236].

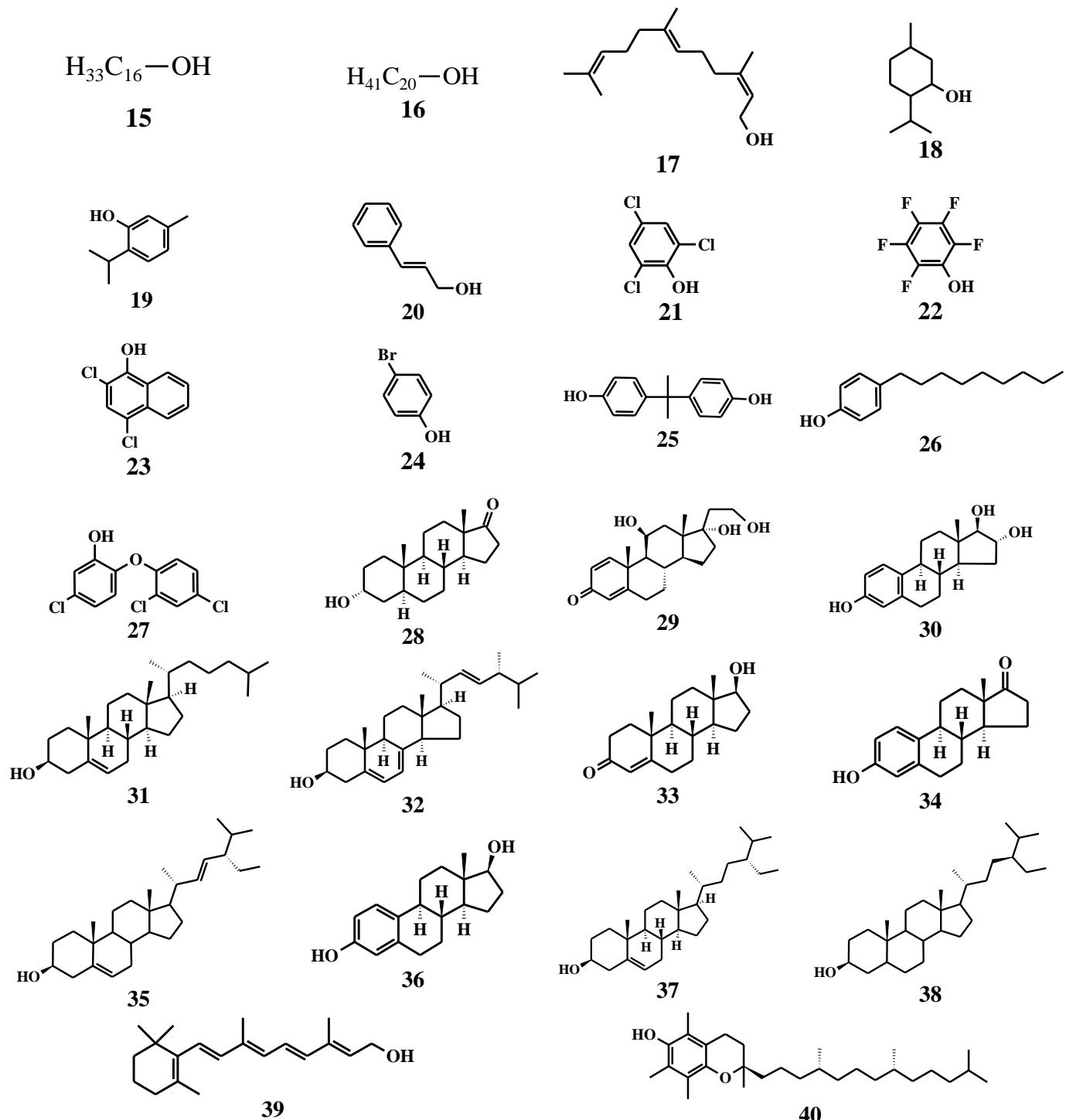


Схема 2. Структуры спиртов и фенолов, использованных для пост-хроматографической дериватизации в ТСХ/МАЛДИ.

Пиридин в данной реакции является катализатором ацилирования, но дополнительно способен претерпевать кватернизацию за счет концевой бромацильной группы. Формально эта реакция является двухстадийной, однако, как было показано, этот процесс может быть представлен как одностадийный (Схема 3).

Такой процесс отвечает почти всем критериям, предъявляемым нами к реакции дериватизации, проводимой в сорбенте для ТСХ *in situ* в сочетании с МАЛДИ. Реакция

протекает быстро и количественно при комнатной температуре, а предел обнаружения соединений, модифицированных таким образом, достигает нанограммовых уровней.

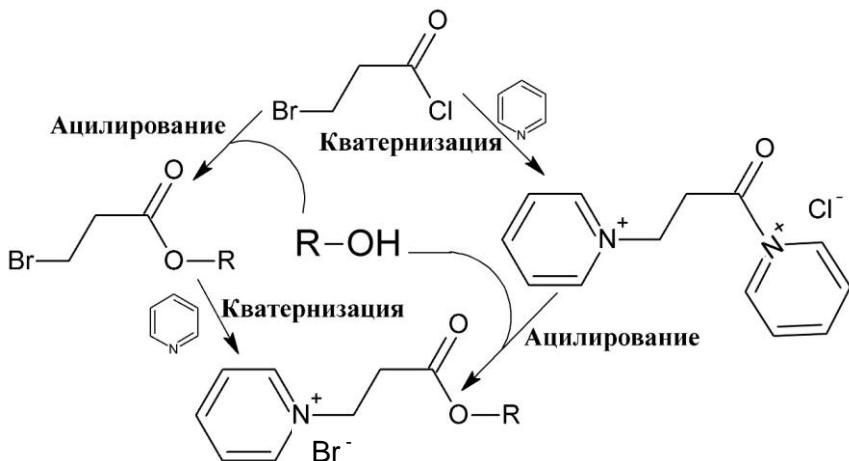


Схема 3. Вероятные пути реакции дериватизации спиртов смесью 3-бромпропионилхлорида и пиридином.

Для определения положения пятен компонентов на пластине ТСХ параллельно использовали контрольную пластину, визуализацию пятен на которой проводили стандартными методами.

Первоначально предложенный подход был опробован на примере индивидуальных линейных спиртов - гексадеканола (**15**) и эйкозанола (**16**). Их растворы были нанесены на пластину ТСХ без последующего хроматографирования. После высушивания растворителя полученные пятна спиртов были обработаны последовательно 3-бромпропионилхлоридом и пиридином. Затем пластиинки помещались в масс-спектрометр, где регистрировались масс-спектры МАЛДИ производных с использованием графитовой «матрицы». Полученные масс-спектры содержали пики катионных частей солей, образовавшихся в результате проведения дериватизации.

Параллельно реакции дериватизации в различных условиях проводили “off-line” в виалах для микросинтеза, а продукты наносились на стандартные стальные мишени для МАЛДИ для регистрации их масс-спектров. Последние оказались полностью идентичными спектрам, зарегистрированным с пластин ТСХ. В то же время интенсивность спектров, полученных с пластин ТСХ, была ниже, чем при использовании стандартной мишени. Этого и следовало ожидать, так как вещество при нанесении на пластину ТСХ распределяется не только по поверхности, но и по толщине слоя силикагеля, тем самым резко уменьшая концентрацию аналита на поверхности адсорбента. Чувствительность метода ТСХ/МАЛДИ еще больше падает после элюирования анализов в результате снижении их концентрации в приповерхностном слое. Далее предложенный

дериватизационный подход был опробован на соединениях, нанесенных на пластины для ТСХ и подвергшихся хроматографированию.

На следующем этапе работы к взятым выше модельным аналитам были добавлены природные терпенолы (фарнезол (**17**) и ментол (**18**)). Вещества наносили на пластины для ТСХ в индивидуальном виде, после чего хроматографировали с использованием ряда наиболее распространенных растворителей: этилацетат, гексан, хлороформ, метанол. Локализацию гидроксилсодержащих анализаторов после хроматографирования здесь и далее осуществляли с использованием контрольной пластины ТСХ, которую обрабатывали раствором анилового альдегида в метаноле с добавлением уксусной и серной кислот с последующим нагреванием пластины. После определения положения анализаторов на контрольной проэлюированной пластине в соответствующие места основной аналитической хроматограммы наносились реагенты, необходимые для проведения дериватизации с введением фиксированного заряда и графитовая матрица. Во всех случаях были зарегистрированы масс-спектры МАЛДИ соответствующих производных, качество (соотношение S/N) которых, к сожалению, оказалось не вполне удовлетворительным. Для улучшения качества спектров было решено применить разработанные нами композитные матрицы на основе глицерина, графита и традиционного для МАЛДИ матричного соединения, такой подход позволил значительно улучшить качество получаемых масс-спектров. Отметим, что наиболее подходящим органическим компонентом в таких матрицах оказался антрацентриол (АТ).

На следующем этапе были подобраны условия для хроматографического разделения смесей ряда гидроксилсодержащих соединений. В частности при ТСХ были разделена модельная смесь, состоящая из эйказанола (**16**), фарнезола (**17**) и ментола (**18**). Каждый разделенный компонент был продериватизирован, и для синтезированных производных были успешно зарегистрированы спектры МАЛДИ.

Предложенный подход оказался применимым и при анализе смесей фенолов. В частности, для смеси галоген-замещенных фенолов были подобраны условия их хроматографического разделения, проведена дериватизация *in-situ* и зарегистрированы высококачественные масс-спектры МАЛДИ производных с пластин для ТСХ (рис. 5). Вполне удовлетворительной выглядела также графическая хроматограмма этой смеси, построенная по характеристическим ионам разделенных компонентов (рис. 6).

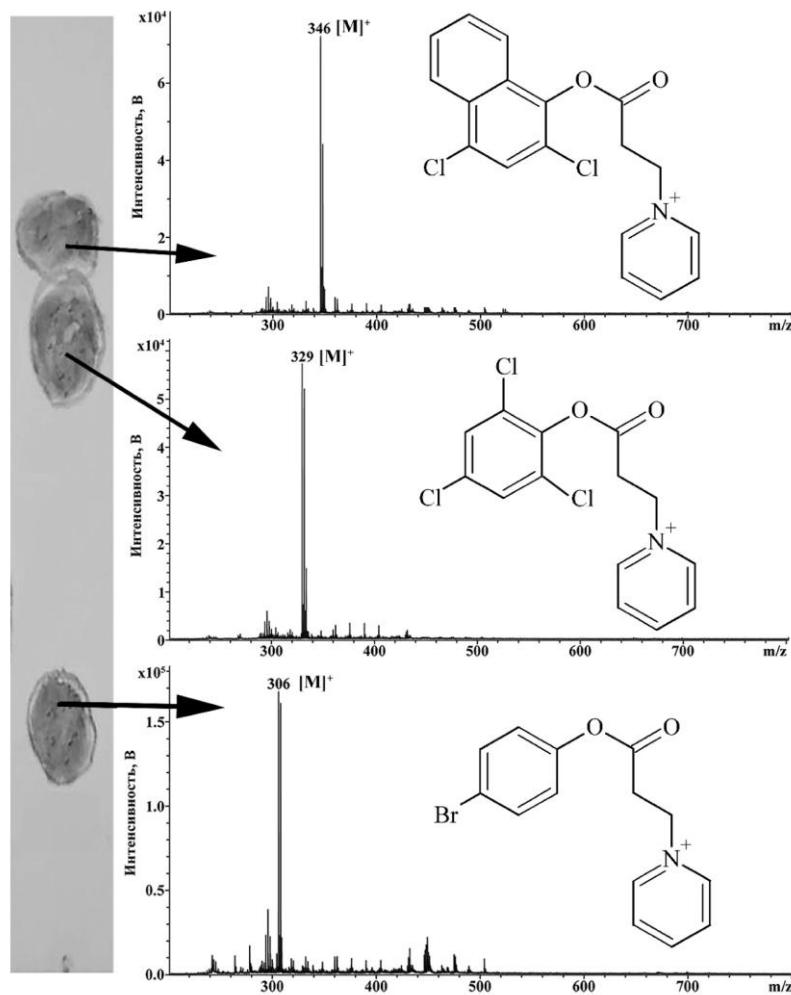


Рис. 5. Тонкослойная хроматограмма смеси и масс-спектры МАЛДИ продуктов дериватизации (**23, 21, 24**) (дериватизация проведена после разделения на пластине ТСХ). Масс-спектры зарегистрированы с использованием комбинированной матрицы состава: АТ-графит-глицерин.

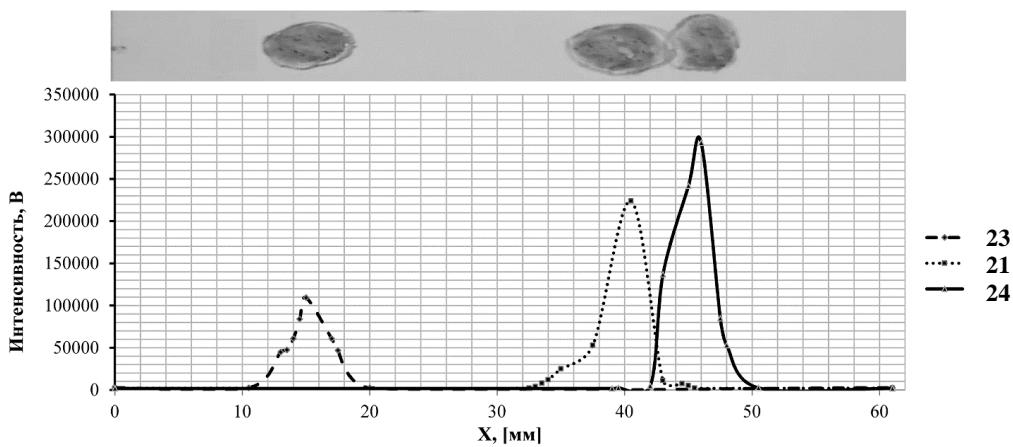


Рис. 6. Хроматограмма, построенная по характеристическим ионам (m/z 346, 329 и 306) с пластин ТСХ после разделения трехкомпонентной смеси соединений (**23, 21, 24**) с последующей дериватизацией 3-бромпропионилхлоридом и пиридином (матрицы АТ-графит-глицерин).

Поскольку разнообразные соединения фенольного типа являются постоянными объектами анализа из-за их потенциальной опасности для здоровья человека, были

исследованы возможности описываемого подхода к анализу и других фенолов (например ретинол (**39**) и токоферол (**40**)). Мы показали, что комбинация ТСХ/масс-спектрометрия МАЛДИ в сочетании с предлагаемым дериватизационным принципом подходит для разделения, детектирования и идентификации в смеси, например, таких фенолов как бисфенол (**25**) (используется в производстве пластмасс), триклозан (**27**) (широко применяется как антибактериальное и противогрибковое средство), а также промышленно значимый нонилфенол (**26**) – (рис.7).

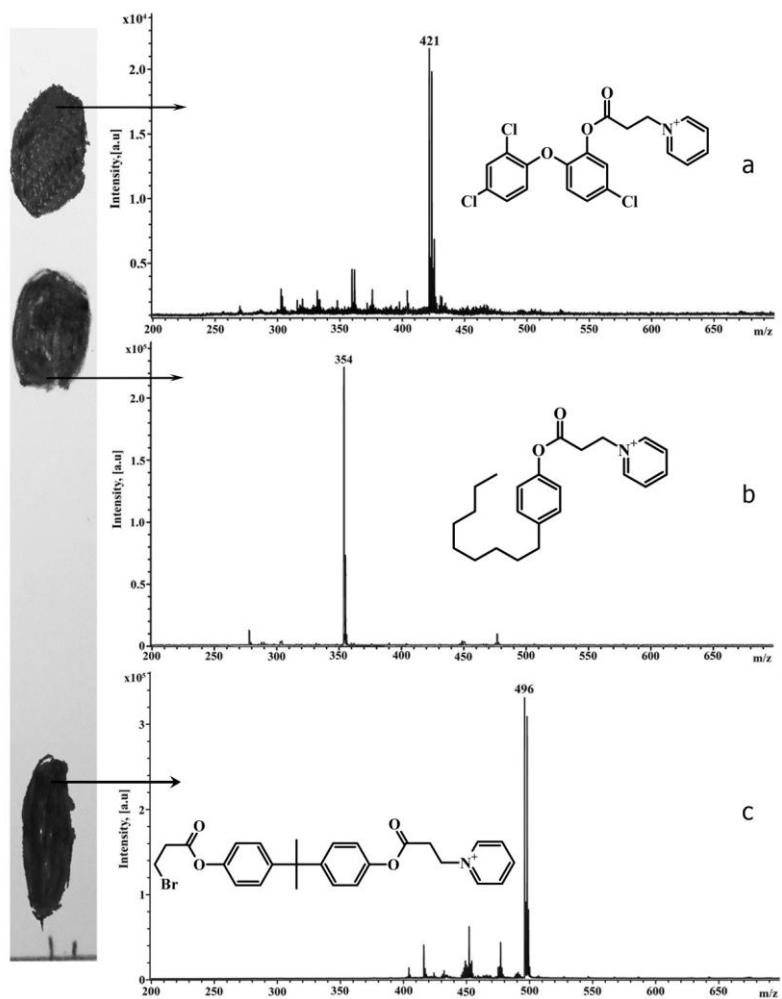


Рис. 7. Тонкослойная хроматограмма смеси и масс-спектры МАЛДИ продуктов дериватизации соединений **27** - а; **26** – б; **25** - с (дериватизация проведена после разделения на пластинке ТСХ). Масс-спектры зарегистрированы с использованием комбинированной матрицы состава: АТ-графит-глицерин.

Обратим внимание на продукт дериватизации бисфенола (**25**), содержащего две ОН-группы. Наиболее вероятно, что в данном случае модификации с введением фиксированного заряда подвергаются обе гидроксильные группы, а продукт является двойной солью. К сожалению, поскольку метод масс-спектрометрии МАЛДИ обычно не позволяет детектировать двухзарядные ионы, в зарегистрированном спектре мы естественно его не наблюдали. Однако получен высококачественный спектр

однозарядного иона, в котором вторая OH-группа оказалась просто ацилированной без сопутствующей кватернизации пиридина.

Важными природными соединениями, содержащими одну OH-группу, являются растительные и животные стерины, а также некоторые стероиды, например, тестостерон. Известно, что одним из распространенных методов их определения все еще остается ТСХ. Применение химической модификации стеринов в жирах без их предварительного разделения каким-либо методом и последующий анализ методом МАЛДИ затруднен, так как содержащиеся в образцах свободные жирные кислоты проявляют значительный «матричный» эффект, что снижают эффективность ионизации синтезируемых дериватов или вообще ее ингибирует. Однако, использование комбинированного метода ТСХ/МАЛДИ в комплексе с рассматриваемым дериватизационным принципом позволяет обойти это ограничение, так как в условиях ТСХ жирные кислоты отделяются от стеринов. Нами были подобраны хроматографические условия разделения модельных смесей наиболее распространенных стероидных спиртов и проведена дериватизация компонентов описанным выше способом. Все зарегистрированные масс-спектры МАЛДИ отличались высокой характеристичностью и хорошим соотношением S/N. Показано, что описанным методом можно детектировать и анализировать даже минорные OH-содержащие компоненты смесей.

Следует также заметить, что в случае стероидных диолов, как и для рассмотренного выше бисфенола, удается зарегистрировать только однозарядные катионы. Вторая OH-группа в них просто подвергнута ацилированию 3-бромпропионилхлоридом без параллельной кватернизацией пиридина. В случае стероидных триолов регистрируемые масс-спектры МАЛДИ производных также соответствуют моносолям с примесью продуктов дополнительного ацилирования одной или двух OH-групп.

4. Дериватизация и анализ методом ТСХ/МАЛДИ первичных аминов и α-аминокислот.

Еще один прием, впервые предложенный нами для пост-хроматографической дериватизации на пластине для ТСХ, был разработан нами для случая соединений, содержащих первичную амино-группу (первичные амины, α-аминокислоты и пептиды). При выборе соответствующей реакции учитывались следующие требования: реакция должна протекать быстро и количественно, желательно при комнатной температуре, а синтезируемые производные должны обладать максимально высокой эффективностью ионизации в условиях МАЛДИ. Исходя из особенностей метода тонкослойной хроматографии, желательно было также, чтобы образующиеся производные были

окрашенными. Это условие необходимо, для того чтобы иметь возможность наносить матрицу, необходимую для регистрации масс-спектров, непосредственно на пластину и локализовать пятно для регистрации масс-спектра без использования дополнительной контрольной пластины.

Следует отметить, что используемые в стандартной практике ТСХ химические приемы для визуализации пятен аминов невозможno применять в случае сочетания ТСХ/МАЛДИ, так как используемые при этом реагенты, как правило, значительно видоизменяют структуру определяемых соединений, что непредсказуемым образом сказывается на эффективности ионизации и характере масс-спектра. Так, например, производные аминокислот, разделенных на пластинке и для визуализации пятен модифицированных стандартном способом с использованием нингидрина, не способны ионизироваться при МАЛДИ. Кроме того, такие реакции могут блокировать или модифицировать функциональные группы, подходящие для химической модификации, что сделает проведение последующей целевой дериватизации бессмысленным.

Эта часть работы проведена с использованием первичных аминов и аминокислот, приведенных на схеме 4. Среди них находятся первичные амины, некоторые из которых обладают биологической активностью, а также практически все основные аминокислоты.

Качественный и количественный анализ выбранных нами аминокислот является актуальным еще и потому, что они зачастую являются основными компонентами многих лекарств или биологически-активных добавок (БАД).

Для дериватизации первичных аминов и аминокислот с введением ковалентно-связанного заряда в наших экспериментах с ТСХ/МАЛДИ был выбран гексафторfosфат три(2,6-диметоксифенил)метилия (**1**), оказавшийся весьма эффективным реагентом для анализа методом МАЛДИ [Топольян А.П., Стрижевская Д.А., Слюндина М.С., Беляева М.А., Иванова О.М., Коршун В.А., Устинов А.В., Михура И.В., Формановский А.А., Борисов Р.С // Масс-спектрометрия. 2015. 12. С253–258]. Эта реакция протекает за счет того, что соответствующий катион реагирует с первичными аминами путем нуклеофильного замещения двух метокси-групп в орто-положении бензольных колец (Схема 5).

Данный дериватационный подход соответствует всем требованиям, предъявляемым нами к реакциям, используемым при анализе методом ТСХ/МАЛДИ: высокая скорость реакции, отсутствие необходимости термического воздействия, высокая эффективность ионизации производных в условиях МАЛДИ.

В данном случае очень важным является то, что получаемые производные окрашены, а это не требует использования контрольной пластиинки для дополнительной визуализации положения разделенных на ТСХ компонентов. Еще одним положительным моментом является целевого выведение сигнала из области матричных шумов, так как вводимый фрагмент имеет большой инкремент массы (359 Да).

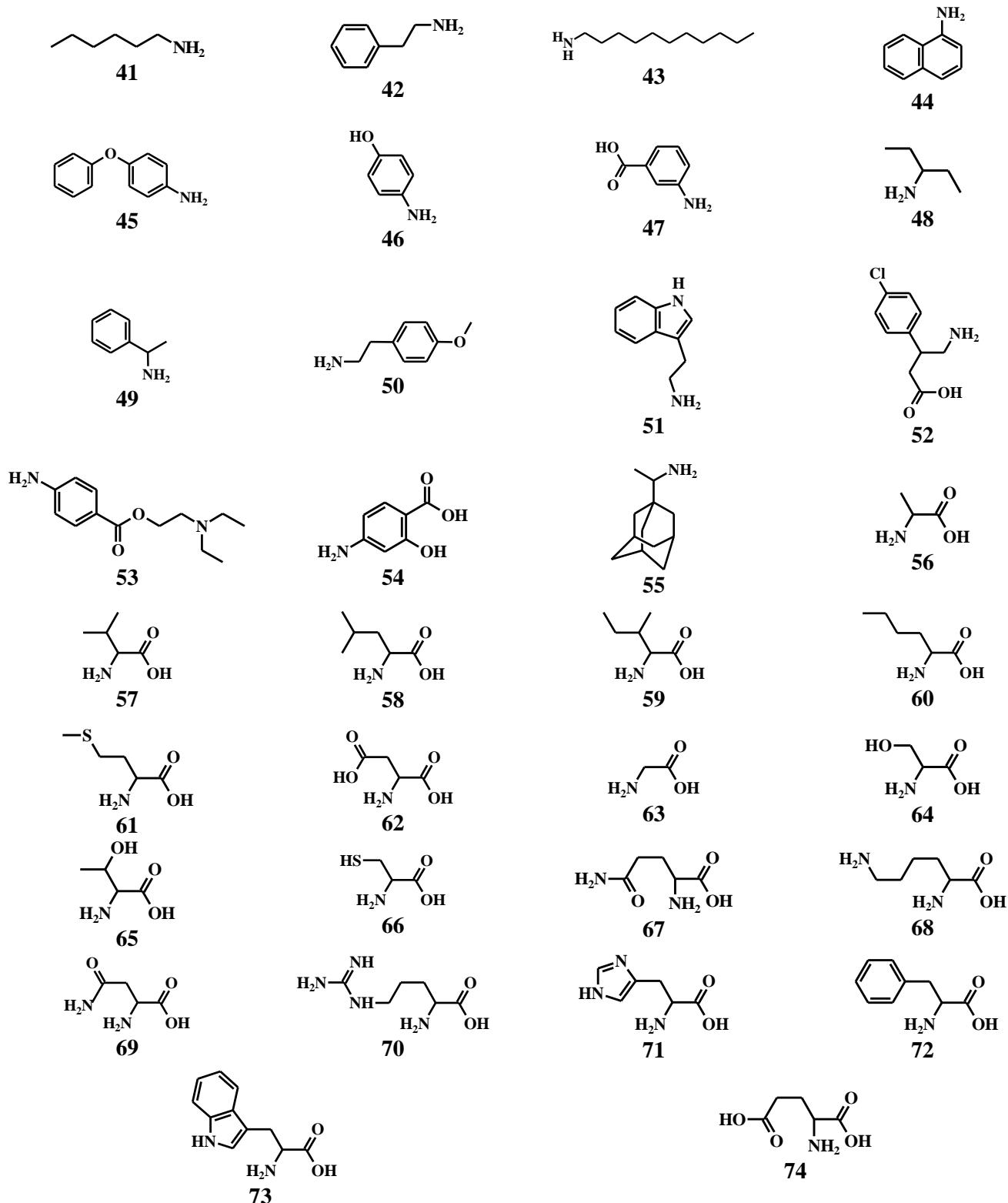


Схема 4. Первичные амины и аминокислоты, исследованные методом ТСХ/МАЛДИ с пост-хроматографической дериватизацией.

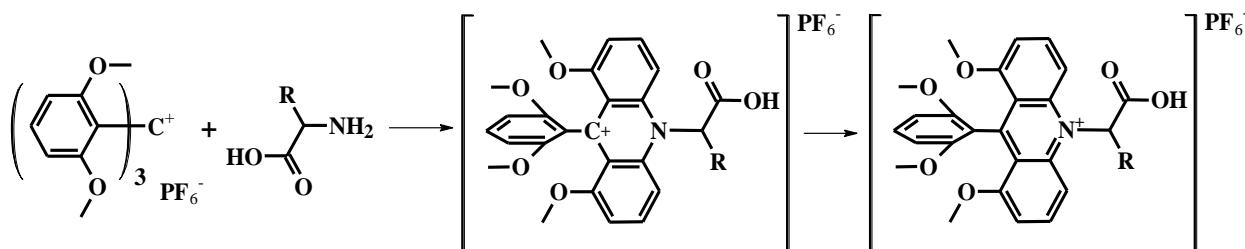


Схема 5. Принципиальная схема модификации амино-групп (на примере α-аминокислот).

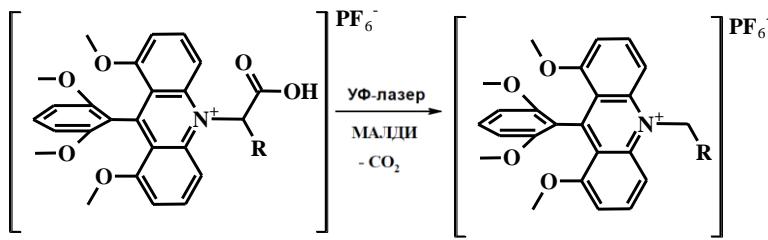
Как и в предыдущих экспериментах, растворы первичных аминов или аминокислот были нанесены на хроматографические пластиинки сначала без последующего хроматографирования. После высушивания растворителя они были дериватизированы последовательной обработкой растворами реагента **1** и триэтиламина в ацетонитриле, причем пятна дериватизированных анализаторов были цветными и хорошо поглощали УФ-излучение.

Таким образом, не было необходимости в использовании дополнительной контрольной пластиинки ТСХ для локализации анализируемых веществ на основной аналитической пластиинке. Пластиинки ТСХ помещались в масс-спектрометр МАЛДИ, где регистрировались спектры (в качестве матрицы использовались уже приготовленными нами комбинированные матрицы). Полученные масс-спектры содержали пики, соответствующие катионам синтезированных производных с введенным заряженным остатком (инкремент увеличения массы 359 Да).

Затем из набора вышеприведенных соединений были собраны модельные смеси (как для первичных аминов так и для аминокислот) и подобраны условия их хроматографического разделения. Затем после высушивания элюента была проведена дериватизация по приведенной схеме и зарегистрированы масс-спектры МАЛДИ (в качестве матрицы использовались комбинированные матрицы). В результате были зарегистрированы масс спектры производных всех аминов и аминокислот.

Важно отметить, что особенностью масс-спектров производных аминокислот является то, что наряду с незначительными пиками целевых катионов наблюдаются также более интенсивные пики, имеющие на 44 Да меньшую массу. Совершенно очевидно, что они возникают при декарбоксилировании производных возможно под воздействием лазерного излучения источника ионов МАЛДИ (схема 6).

Действительно, на процесс декарбоксилирования явно не влияет присутствие сорбента и матрицы, поскольку при регистрации спектра производного без матрицы с металлической мишени также фиксируется преимущественно пик декарбоксилированного катиона.



Кроме того, в спектре, зарегистрированном с использованием ионизации электрораспыления, наоборот доминирует пик ожидаемого катиона и слабый пик продукта его декарбоксилирования. Характер регистрируемых масс-спектров МАЛДИ для производных аминокислот можно видеть на рис. 7,8.

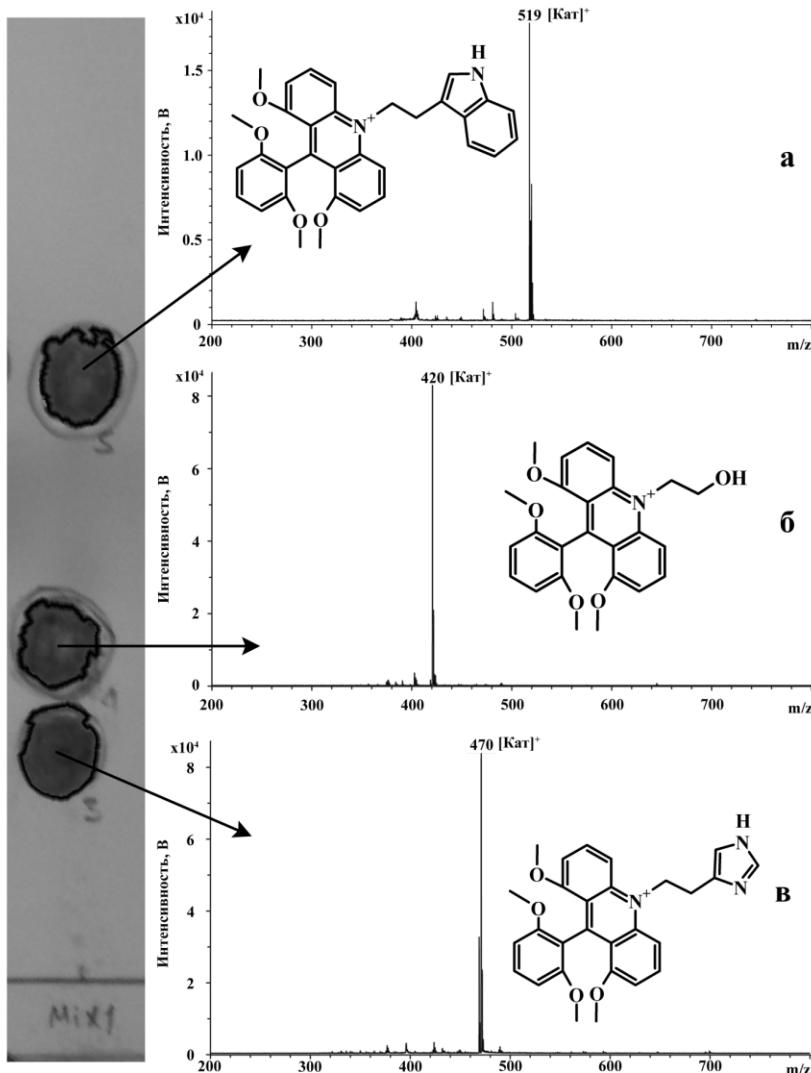


Рис. 8. Тонкослойная хроматограмма смеси и масс-спектры МАЛДИ продуктов дериватизации 73 – а; 64 – в и 71 - б (дериватизация проведена регентом 1 и триэтиламином после разделения на пластинке ТСХ). Масс-спектры зарегистрированы с использованием комбинированной матрицы состава: АТ-графит-глицерин.

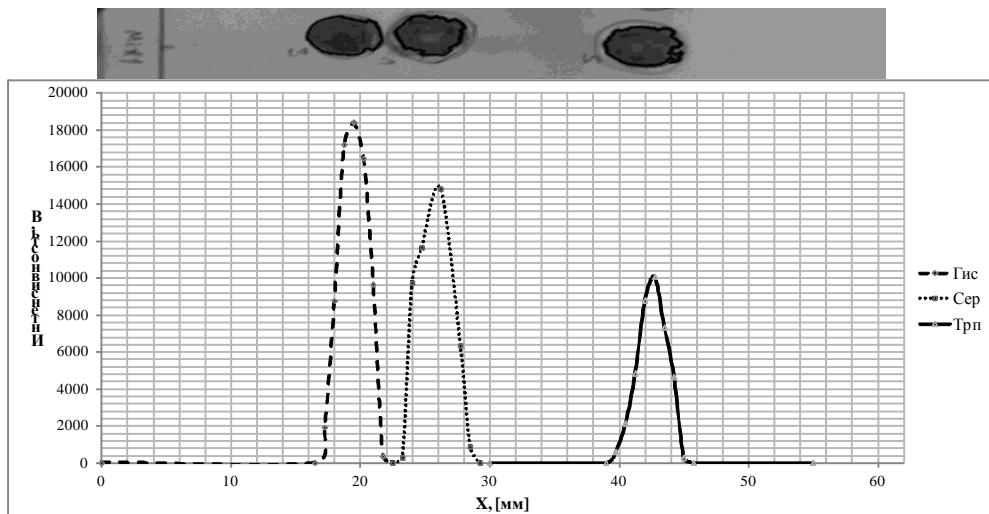


Рис. 8. Хроматограмма, построенная по характеристическим ионам (m/z 519, 420 и 470) с пластин ТСХ после разделения трехкомпонентной смеси **73**, **64** и **71** с последующей дериватизацией реагентом **1** и триэтиламином (матрица АТ-графит-глицерин).

Все производные характеризуются высокой эффективностью ионизации (большие величины отношений S/N), что свидетельствует о высокой чувствительности разработанного нами метода при анализе соединений, содержащих первичную амино-группу. На наш взгляд, данный метод представляется перспективным при исследовании не только аминов и аминокислот, но и олигопептидов, содержащих амино-группу на конце цепи или на конце боковой цепи как, например, в случае остатка лизина. К сожалению, метод в варианте масс-спектрометрии МАЛДИ не удастся использовать в случае полиаминов, рассматриваемые производные которых являются многозарядными солевыми соединениями, поскольку этот масс-спектрометрический метод обычно ограничивается регистрацией только монокатионов. Однако, можно надеяться, что описанный принцип дериватизации можно будет использовать, например, в оффлайновом режиме при анализе изолированных и модифицированных на пластинке ТСХ анализов методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

Выходы

1. Впервые разработан инновационный подход к исследованию смесей органических соединений комбинированным методом ТСХ и масс-спектрометрии МАЛДИ с использованием целенаправленной пост-хроматографической дериватизации разделенных компонентов. Метод дает возможность определять молекулярные массы последних, устанавливать наличие конкретных функциональных групп, получать информацию о структуре.

2. С использованием синтетических азотсодержащих гетероциклических соединений детально изучены принципы применения графита и ионных жидкостей в качестве "матрицы" при регистрации масс-спектров МАЛДИ веществ, разделенных с помощью ТСХ.

3. Впервые разработана композиционная матрица на основе суспензии графита в глицерине и традиционной матрицы (НАВА, DHB, АТ и IAA), благодаря которой удается устранить размывание пятна на ТСХ, обеспечить более равномерное распределение аналита по пятну, экстрагировать анализ из толщи адсорбента на его поверхность, тем самым увеличивая чувствительность при исследованиях методом ТСХ/масс-спектрометрии МАЛДИ.

4. Впервые продемонстрирована возможность и высокая эффективность использования пост-хроматографической дериватизации на пластинке ТСХ с образованием солеобразных производных, пригодных для сочетания масс-спектрометрии МАЛДИ и ТСХ. Особенno это подход перспективен при анализе слабоионизирующих соединений, таких как спирты. На примере спиртов и фенолов различного строения показано, что модификация OH-группы ацилированием 3-бромопропионилхлоридом с параллельной кватернизацией пиридина повышает эффективность ионизации определяемых компонентов в условиях МАЛДИ и пригоден для качественного и полуколичественного анализа сложных смесей как синтетического, так и природного происхождения.

5. Впервые для исследования аминов и аминокислот (пептидов) методом ТСХ/МАЛДИ, совмещенном с пост-хроматографической дериватизацией, предложено использовать гексафторфосфат три(2,6-диметоксифенил)метиля. В случае соединений с первичной амино-группой образуются производные, обеспечивающие крайне высокую эффективность ионизации при МАЛДИ.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Esparza C.A., Polovkov N. Yu, Borisov R.S., Zaikin V.G. Post-chromatographic fixed-charge derivatization for the analysis of hydroxyl-containing compounds by a combination of thin-layer chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // J Chromatogr A. (2018), P.97-103.

2. С.А. Эспарса, Р.С. Борисов, Н.Ю. Половков, А.В. Варламов, В.Г. Заикин. Пост-хроматографическая дериватизация спиртов и фенолов для их идентификации в смесях с

использованием сочетания планарной хроматографии и масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией // Масс-спектрометрия (2017), 14, С.203-207. [англ. Перевод J. Anal. Chem. (2018), Vol. 73, P.1242 –1247].

3. Esparza C, Borisov RS, Varlamov AV, Zaikin VG. Composite glycerol/graphite/aromatic acid matrices for thin-layer chromatography/matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of heterocyclic compounds // J Chromatogr A. (2016), P.118-122.

4. Р.С. Борисов, Д.И. Жиляев, С.А.Эспарса, Н.Ю. Половков, В.Г.Заикин Масс-спектрометрия с активируемой графитом лазерной десорбцией/ионизацией (ГАЛДИ) в комбинации с тонкослойной хроматографией. // Масс-спектрометрия (2014), 11, С.107-111. [англ. Перевод J. Anal. Chem. (2014), Vol. 69, P.1351 –1355].

5. Р.С. Борисов, Д.И. Жиляев, С.А.Эспарса Сандоваль, Н.Ю. Половков, В.Г.Заикин. Сочетание планарной хроматографии и масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для анализа биологически активных соединений // Масс-спектрометрия (2014), 11, С.220-225. [англ. Перевод J. Anal. Chem. (2015), Vol. 70, P.1635 – 1646].

6. С.А. Эспарса, Н.Ю.Половков, Р.С.Борисов, В.Г.Заикин. Пост-хроматографическая дериватизации в ТСХ/МАЛДИ: первые шаги. // VII всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы», Тез. докл. – г. Москва – 2017.

7. C.A. Esparza, D. I. Zhilyaev, R. S. Borisov. New derivatization approach for TLC/MALDI-TOF mass spectrometry analysis of mixtures of sterols and steroids // 6th World conference on physic chemical methods in drug discovery and development. Тез. докл. – г. Загреб – 2017.

8. С.А. Эспарса, Р.С.Борисов, В.Г.Заикин. ТСХ/МАЛДИ: применение комбинированных матриц // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Тез. докл. – г. Москва – 2016.