

ЛЕКЦИЯ № 5

*«Методы анализа, основанные на
использовании магнитного поля»*

Общая характеристика методов

Методы ЯМР-, ПМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии отличаются высокой специфичностью, чувствительностью и используются для анализа многокомпонентных смесей, в том числе лекарственных форм без предварительного их разделения.

Метод спектроскопии ЯМР используют для испытания подлинности лекарственных веществ, которая может быть подтверждена либо по полному набору спектральных параметров, характеризующих структуру данного соединения, либо по наиболее характерным сигналам спектра. Подлинность можно также установить с помощью стандартного образца, добавляя определенное его количество к анализируемому раствору. Полное совпадение спектров анализируемого вещества и его смеси со стандартным образцом указывает на их идентичность.

Регистрацию ЯМР-спектров выполняют на спектрометрах с рабочими частотами 60 мГц и более, используя такие основные характеристики спектров, как химический сдвиг, мультиплетность сигнала резонанса, константу спин-спинового взаимодействия, площадь сигнала резонанса. Наиболее обширную информацию о молекулярной структуре анализируемого вещества дают спектры ЯМР ^{13}C и ^1H .

Надежная идентификация препаратов гестагенных и эстрогенных гормонов, а также их синтетических аналогов: прогестерона, прегнина, этинилэстрадиола, метилэстрадиола, эстрадиола дипропионата и др. — может быть осуществлена методом спектроскопии ЯМР ^1H в дейтерированном хлороформе на спектрометре УН-90 с рабочей частотой 90 мГц (внутренний стандарт — тетраметилсилан).

Систематические исследования позволили установить возможность применения спектроскопии ЯМР ^{13}C для идентификации лекарственных веществ 10-ацилпроизводных фенотиазина (хлорацизина, фторацизина, этмозина, этацизина), 1,4-бензодиазепина (хлор-, бром- и нитропроизводные) и др. Методом спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C осуществлены идентификация, количественная оценка основных компонентов и примесей в препаратах и стандартных образцах природных и полусинтетических антибиотиков аминогликозидов, пенициллинов, цефалоспоринов, макролидов и др. Указанный метод использован для идентификации в унифицированных условиях ряда витаминов: липоевой и аскорбиновой кислот, липамида, холина и метилметионинсульфония хлоридов, ретинола пальмитата, кальция пантотената, эргокальциферола. Метод спектроскопии ЯМР ^1H позволил осуществлять надежную идентификацию таких сложных по химической структуре природных соединений, как сердечные гликозиды (дигоксин, дигитоксин, целанид, дезланозид, нериолин, цимарин и др.). Для ускорения обработки спектральной информации использована ЭВМ. Ряд методик идентификации включен в ФС и ВФС.

Количественное определение лекарственного вещества может быть также выполнено с использованием спектров ЯМР. Относительная погрешность количественных определений методом ЯМР зависит от точности измерений площадей резонансных сигналов и составляет $\pm 2\text{—}5\%$. При определении относительного содержания вещества или его примеси измеряют площади сигналов резонанса испытуемого вещества и стандартного образца. Затем вычисляют количество испытуемого вещества. Для определения абсолютного содержания лекарственного вещества или примеси анализируемые образцы готовят количественно и добавляют к навеске точно отвешенную массу внутреннего стандарта. После этого выполняют регистрацию спектра, измеряют площади сигналов анализируемого вещества (примеси) и внутреннего стандарта, затем вычисляют абсолютное содержание.

Развитие импульсной техники Фурье-спектроскопии, применение ЭВМ позволили резко повысить чувствительность метода ЯМР ^{13}C и распространить его на количественный анализ многокомпонентных смесей биоорганических соединений, в том числе лекарственных веществ без их предварительного разделения.

Спектроскопические параметры ПМР-спектров дают целый комплекс разнообразной и весьма селективной информации, который может быть использован в фармацевтическом анализе. Следует строго соблюдать условия регистрации спектров, так как на значения химических сдвигов и другие параметры оказывают влияние тип растворителя, температура, рН раствора, концентрация вещества.

Если полная интерпретация ПМР-спектров затруднена, то выделяют только характерные сигналы, по которым идентифицируют испытуемое вещество. ПМР-спектроскопия применена для испытания подлинности многих лекарственных веществ, в том числе барбитуратов, гормональных средств, антибиотиков и др.

Поскольку метод дает информацию о наличии или отсутствии примесей к основному веществу, важное практическое значение имеет ПМР-спектроскопия для испытания лекарственных веществ на чистоту. Различия в значениях величин тех или иных констант позволяют сделать заключение о присутствии примесей продуктов разложения лекарственного вещества. Чувствительность метода к примесям колеблется в широких пределах и зависит от спектра основного вещества, наличия в молекулах тех или иных групп, содержащих протоны, растворимости в соответствующих растворителях. Минимальное содержание примеси, которое можно установить, составляет обычно 1—2%. Особенно ценной является возможность обнаружения примесей изомеров, присутствие которых невозможно подтвердить другими методами. Так, например, обнаружена примесь кислоты салициловой в кислоте ацетилсалициловой, морфина в кодеине и т.д.

Количественный анализ на основе использования ПМР-спектроскопии имеет преимущества перед другими методами, заключающиеся в том, что при анализе многокомпонентных смесей нет необходимости выделять индивидуальные компоненты для калибровки прибора. Поэтому метод широко применим для количественного анализа как индивидуальных лекарственных веществ, так и растворов, таблеток, капсул, суспензий и других лекарственных форм, содержащих один или несколько ингредиентов. Стандартное отклонение не превышает $\pm 2,76\%$. Описаны способы анализа таблеток фуросемида, мепробамата, хинидина, преднизолона и др.

Расширяется диапазон применения масс-спектрометрии в анализе лекарственных веществ для идентификации и количественного анализа. Метод основан на ионизации молекул органических соединений. Он отличается большой информативностью и исключительно высокой чувствительностью. Масс-спектрометрию применяют для определения антибиотиков, витаминов, пуриновых оснований, стероидов, аминокислот и других лекарственных веществ, а также продуктов их метаболизма.

Использование лазеров в аналитических приборах значительно расширяет практическое применение УФ- и ИК-спектрофотометрии, а также флуоресцентной и масс-спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, нефелометрии и других методов. Лазерные источники возбуждения позволяют повысить чувствительность многих методов анализа, сократить продолжительность их выполнения. Лазеры используют в дистанционном анализе в качестве детекторов в хроматографии, в биоаналитической химии и т.д.

Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия — это физический метод, основанный на измерении массы заряженных частиц материи.

Существенное отличие масс-спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что оптические, рентгеновские и некоторые другие методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, а масс-спектрометрия непосредственно детектирует сами частицы вещества. Масс-спектрометрия измеряет их массы, вернее отношение массы к заряду. Для этого используются законы движения заряженных частиц материи в магнитном или электрическом поле. Масс-спектр — это просто рассортировка заряженных частиц по отношениям массы к заряду. Так как большинство небольших органических молекул при ионизации приобретает только один заряд, то для упрощения говорят о разделении веществ по массе. Важным исключением из этого правила являются белки, нуклеиновые кислоты и другие полимеры, которые способны приобретать множественные заряды.

Атомы химических элементов имеют специфическую массу. Таким образом, точное определение массы анализируемой молекулы, позволяет определить её элементный состав. Масс-спектрометрия также позволяет получить важную информацию об изотопном составе анализируемых молекул.

В органических веществах молекулы представляют собой определенные структуры, образованные атомами. Современные масс-спектрометры способны фрагментировать детектируемые ионы и определять массу полученных фрагментов. Таким образом, можно получать данные о структуре вещества.

Принцип работы и устройство масс-спектрометра

Источники ионов

Первое, что надо сделать для того, чтобы получить масс-спектр, превратить нейтральные молекулы и атомы, составляющие любое органическое или неорганическое вещество, в заряженные частицы — ионы. Этот процесс называется **ионизацией** и по-разному осуществляется для органических и неорганических веществ. Вторым необходимым условием является перевод ионов в газовую фазу в вакуумной части масс-спектрометра. Глубокий вакуум обеспечивает беспрепятственное движение ионов внутри масс-спектрометра, а при его отсутствии ионы рассеются и рекомбинируют (превратятся обратно в незаряженные частицы).

Условно способы ионизации органических веществ можно классифицировать по фазам, в которых находятся вещества перед ионизацией.

1. Газовая фаза:

- электронная ионизация
- химическая ионизация

2. Жидкая фаза:

- термоспрей
- ионизация при атмосферном давлении
- электроспрей (ESI)
- химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
- 1. фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)

• Твердая фаза:

- ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы (MALDI)
- 2. бомбардировка быстрыми атомами (FAB)

В неорганической химии для анализа элементного состава применяются жесткие методы ионизации, так как энергии связи атомов в твердом теле гораздо больше и значительно более жесткие методы необходимо использовать для того, чтобы разорвать эти связи и получить ионы.

- ионизация в индуктивно-связанной плазме
- термоионизация или поверхностная ионизация
- ионизация в тлеющем разряде и искровая ионизация
- 1. ионизация в процессе лазерной абляции

Первые методы ионизации были разработаны для газовой фазы. Однако, очень многие органические вещества невозможно испарить, то есть перевести в газовую фазу, без разложения. А это значит, что их нельзя ионизовать электронным ударом. Среди таких веществ почти все, что составляет живую ткань (белки, ДНК и т. д.), физиологически активные вещества, полимеры, то есть все то, что сегодня представляет особый интерес. Масс-спектрометрия не стояла на месте, и последние годы были разработаны специальные методы ионизации таких органических соединений. Сегодня используются, в основном, два из них — ионизация при атмосферном давлении и её подвиды — электроспрей (ESI), химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI) и фотоионизация при атмосферном давлении (APPI), а также ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы (MALDI).

Масс-анализаторы

Полученные при ионизации ионы с помощью электрического поля переносятся в масс-анализатор. Там начинается второй этап масс-спектрометрического анализа — сортировка ионов по массам (точнее по отношению массы к заряду, или m/z). Существуют следующие типы масс-

1. Непрерывные масс-анализаторы:
анализаторов:

- Магнитный масс-анализатор
- Масс-анализатор со скрещенными магнитным и электростатическим полями
- Квадрупольный масс-анализатор

2. Импульсные масс-анализаторы:

- Времяпролетный масс-анализатор
- Ионная ловушка
- Масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием

Разница между непрерывными и пульсовыми масс-анализаторами заключается в том, что в первые ионы поступают непрерывным потоком, а во вторые — порциями, через определенные интервалы времени.

Масс-спектрометр может иметь два масс-анализатора. Такой масс-спектрометр называют **тандемным**. Тандемные масс спектрометры применяются, как правило, вместе с «мягкими» методами ионизации, при которых не происходит фрагментации ионов анализируемых молекул (молекулярных ионов). Таким образом, первый масс-анализатор анализирует молекулярные ионы. Покидая первый масс-анализатор, молекулярные ионы фрагментируются под действием соударений с молекулами инертного газа или излучения лазера, после чего их фрагменты анализируются во втором масс-анализаторе. Наиболее распространенными конфигурациями тандемных масс-спектрометров являются квадруполь-квадрупольная и квадруполь-времяпролетная.

Детекторы

Последним элементом описываемого упрощенного масс-спектрометра, является детектор заряженных частиц. Первые масс-спектрометры использовали в качестве детектора фотопластинку. Сейчас используются диодные вторично-электронные умножители, в которых ион, попадая на первый динод (*электрод в фотоэлектронном умножителе и некоторых других электровакуумных приборах, служащий для усиления электронного потока за счёт вторичной эмиссии электронов*), выбивает из него пучок электронов, которые в свою очередь, попадая на следующий динод, выбивают из него ещё большее количество электронов и т.д. Другой вариант — фотоумножители, регистрирующие свечение, возникающее при бомбардировке ионами люминофора. Кроме того, используются микроканальные умножители, системы типа диодных матриц и коллекторы, собирающие все ионы, попавшие в данную точку пространства (коллекторы Фарадея).

Хромато-масс-спектрометрия

Масс-спектрометры используются для анализа органических и неорганических соединений.

Органические вещества в большинстве случаев представляют собой многокомпонентные смеси индивидуальных компонентов. Например, доказано, что запах жареной курицы составляют 400 компонентов (т.е. 400 индивидуальных органических соединений). Задача аналитики состоит в том, чтобы определить, сколько компонентов составляют органическое вещество, узнать какие это компоненты (идентифицировать их) и узнать, сколько каждого соединения содержится в смеси. Для этого идеальным является сочетание хроматографии с масс-спектрометрией. Газовая хроматография как нельзя лучше подходит для сочетания с ионным источником масс-спектрометра с ионизацией электронным ударом или химической ионизацией, поскольку в колонке хроматографа соединения уже находятся в газовой фазе. Приборы, в которых масс-спектрометрический детектор скомбинирован с газовым хроматографом, называются хромато-масс-спектрометрами ("Хромасс").

Многие органические соединения невозможно разделить на компоненты с помощью газовой хроматографии, но можно с помощью жидкостной хроматографии. Для сочетания жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией сегодня используют источники ионизации в электроспрее (ESI) и химической ионизации при атмосферном давлении (APCI), а комбинацию жидкостных хроматографов с масс-спектрометрами называют ЖХ/МС или LC/MS по-английски. Самые мощные системы для органического анализа, востребованные современной протеомикой, строятся на основе сверхпроводящего магнита и работают по принципу ионно-циклотронного резонанса. Они также носят название FT/MS, поскольку в них используется Фурье преобразование сигнала.

Характеристики масс-спектрометров и масс-спектрометрических детекторов

Важнейшими техническими характеристиками масс-спектрометров являются *чувствительность, динамический диапазон, разрешение, скорость сканирования.*

Важнейшая характеристика при анализе органических соединений — это чувствительность. Для того чтобы достигнуть как можно большей чувствительности при улучшении отношения сигнала к шуму прибегают к детектированию по отдельным выбранным ионам. Выигрыш в чувствительности и селективности при этом колоссальный, но при использовании приборов низкого разрешения приходится приносить в жертву другой важный параметр — достоверность. Ведь если Вы записывали только один пик из всего характеристического масс-спектра, Вам понадобится ещё много поработать, чтобы доказать, что этот пик соответствует именно тому компоненту, который Вас интересует. Как же разрешить эту проблему?

Использовать высокое разрешение на приборах с двойной фокусировкой, где можно добиться высокого уровня достоверности не жертвуя чувствительностью. Или использовать тандемную масс-спектрометрию, когда каждый пик, соответствующий одиночному иону можно подтвердить масс-спектром дочерних ионов. Итак, абсолютным рекордсменом по чувствительности является органический хромато-масс-спектрометр высокого разрешения с двойной фокусировкой.

По характеристике сочетания чувствительности с достоверностью определения компонентов следом за приборами высокого разрешения идут ионные ловушки. Классические квадрупольные приборы нового поколения имеют улучшенные характеристики благодаря ряду инноваций, примененных в них, например, использованию искривленного квадрупольного префильтра, предотвращающего попадание нейтральных частиц на детектор и, следовательно, снижению шума.

Применения масс-спектрометрии

Разработка новых лекарственных средств для спасения человека от ранее неизлечимых болезней и контроль производства лекарств, геновая инженерия и биохимия, протеомика. Без масс-спектрометрии немислим контроль над незаконным распространением наркотических и психотропных средств, криминалистический и клинический анализ токсичных препаратов, анализ взрывчатых веществ.

Конечно и медицина не обходится без масс-спектрометрии. Изотопная масс-спектрометрия углеродных атомов применяется для прямой медицинской диагностики инфицированности человека *Helicobacter pylori* и является самым надежным из всех методов диагностики. Также, масс-спектрометрия применяется для определения наличия допинга в крови спортсменов.

Трудно представить область человеческой деятельности, где не нашлось бы места масс-спектрометрии. Ограничимся просто перечислением:

- аналитическая химия, биохимия, клиническая химия, общая химия и органическая химия,
- фармация,
- медицина и токсикология,
- криминалистика,
- допинговый контроль,
- контроль наркотических средств, контроль алкогольных напитков,
- косметика,
- парфюмерия,
- пищевая промышленность,
- химический синтез,
- нефтехимия и нефтепереработка,
- контроль окружающей среды,
- производство полимеров и пластиков,
- геохимия, геология, гидрология, петрография, минералогия, геохронология,
- археология,
- ядерная промышленность и энергетика,
- полупроводниковая промышленность,
- металлургия.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Метод основан на наблюдении индуцированных радиочастотным полем переходов между ядерными магнитными энергетическими уровнями молекул в постоянном магнитном поле.

Такие переходы возможны для ядер, имеющих спиновое квантовое число I , не равное нулю (ядра ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , у которых $I = S$ и др.).

Спектр ЯМР состоит из совокупности сигналов указанных переходов. Отдельный спектр ЯМР характерен для одного типа ядер, специфичен для каждого вещества. В практике исследований органических лекарственных веществ используется спектроскопия протонного магнитного резонанса ^{13}C .

Основными направлениями использования спектроскопии ЯМР в фармацевтическом анализе являются: идентификация лекарственных средств и их комплексов с другими соединениями; исследование стабильности и метаболизма; определение примесей и оптической чистоты лекарственных средств; количественное определение компонентного состава различных лекарственных форм.

Подлинность может быть подтверждена:

- ✓ по полному набору спектральных параметров, характеризующих структуру данного соединения,
- ✓ по наиболее характерным сигналам спектра.
- ✓ с помощью стандартного образца, добавляя определенное его количество к анализируемому раствору. Полное совпадение спектров анализируемого вещества и его смеси со стандартным образцом указывает на их идентичность.

Количественное определение проводят измерением площади сигналов резонанса испытуемого вещества и стандартного образца. Относительная погрешность $\pm 2-5 \%$.