



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011119370/28, 13.05.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.05.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.05.2011

(45) Опубликовано: 10.12.2012 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2008109632 A1, 12.09.2008. SU 1649426 A1, 15.05.1991. Persike M., Karas M. Rapid simultaneous quantitative determination of different small pharmaceutical drugs using a conventional matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system // Rapid Commun. Mass Spectrom, Vol.23, стр.3555-3562, 2009. RU 2165618 C1, 20.04.2001. RU 2278384 C1, 20.06.2006.

Адрес для переписки:

308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, БелГУ,
отдел интеллектуальной собственности, Н.Д.
Цуриковой

(72) Автор(ы):

Новиков Олег Олегович (RU),
Писарев Дмитрий Иванович (RU),
Жилякова Елена Теодоровна (RU),
Новикова Марина Юрьевна (RU),
Васильев Георгий Владимирович (RU),
Фадеева Дарья Александровна (RU),
Казакова Валентина Сергеевна (RU),
Халикова Мария Альбертовна (RU),
Воронкова Ольга Сергеевна (RU),
Безменова Марина Дмитриевна (RU),
Сабельникова Наталья Николаевна (RU),
Нетребенко Наталья Николаевна (RU),
Коваленко Борис Степанович (RU),
Голивец Татьяна Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (RU)

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

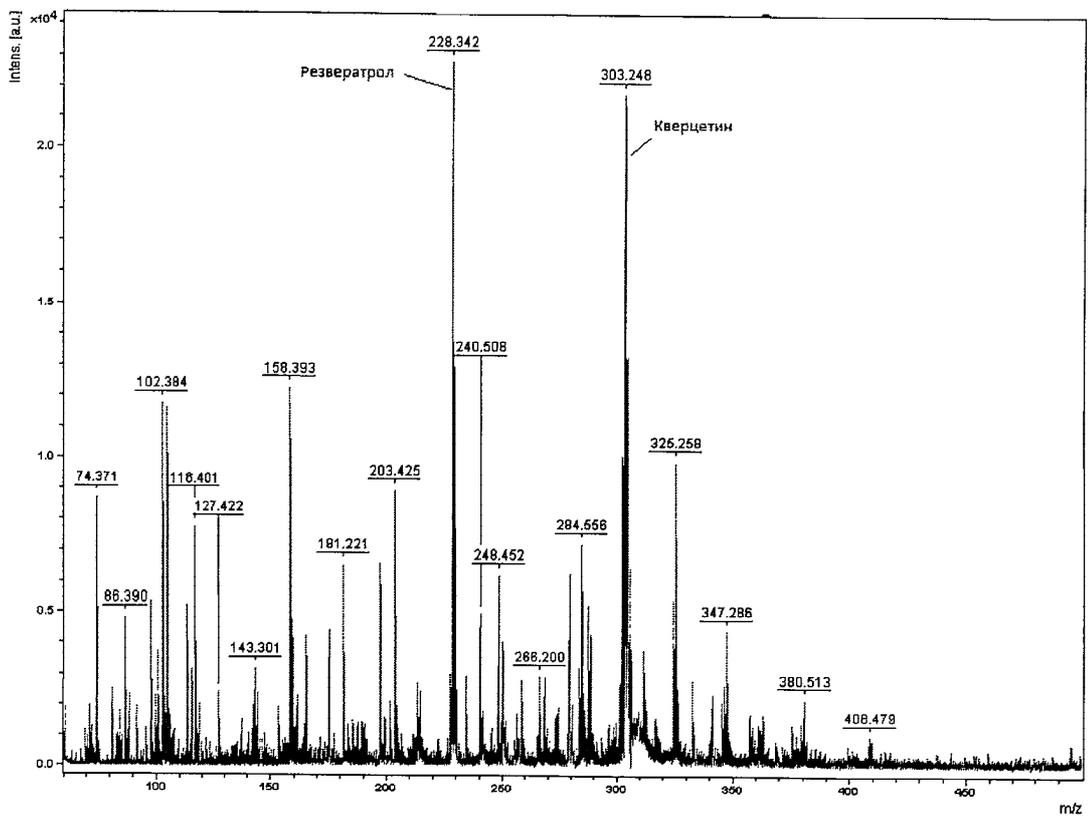
(57) Реферат:

Способ относится к области аналитической химии, а именно к инструментальным оптическим методам анализа. Способ включает проведение анализа вещества методом масс-спектропии с лазерной десорбцией/ионизацией с использованием в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты и внутреннего стандарта, не содержащего изотопов. В качестве внутреннего стандарта используют

вещество, наиболее близкое по строению молекулы к определяемому органическому соединению. Оценку количества органического соединения проводят с помощью калибровочного графика. Техническим результатом изобретения являются простота в исполнении и интерпретации данных и пригодность для целей анализа органических соединений в объектах различного происхождения. 8 ил.

RU 2 469 315 C1

RU 2 469 315 C1



Фиг. 1

RU 2469315 C1

RU 2469315 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011119370/28, 13.05.2011

(24) Effective date for property rights:
13.05.2011

Priority:

(22) Date of filing: 13.05.2011

(45) Date of publication: 10.12.2012 Bull. 34

Mail address:

308015, g.Belgorod, ul. Pobedy, 85, BelGU, otdel
intellektual'noj sobstvennosti, N.D. Tsurikovoj

(72) Inventor(s):

Novikov Oleg Olegovich (RU),
Pisarev Dmitrij Ivanovich (RU),
Zhiljakova Elena Teodorovna (RU),
Novikova Marina Jur'evna (RU),
Vasil'ev Georgij Vladimirovich (RU),
Fadeeva Dar'ja Aleksandrovna (RU),
Kazakova Valentina Sergeevna (RU),
Khalikova Marija Al'bertovna (RU),
Voronkova Ol'ga Sergeevna (RU),
Bezmenova Marina Dmitrievna (RU),
Sabel'nikova Natal'ja Nikolaevna (RU),
Netrebenko Natal'ja Nikolaevna (RU),
Kovalenko Boris Stepanovich (RU),
Golivets Tat'jana Pavlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovaniya "Belgorodskij
gosudarstvennyj natsional'nyj issledovatel'skij
universitet" (RU)

(54) **METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ORGANIC COMPOUNDS**

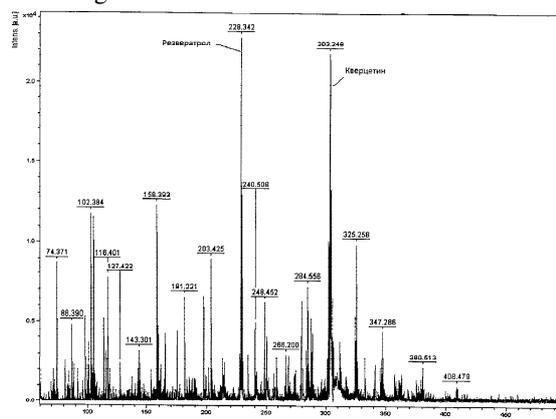
(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method involves analysis of a substance via mass spectrometry with laser desorption/ionisation using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix and an internal standard which does not contain isotopes. The internal standard used is a substance which is closest on molecular structure to the determined organic compound. The amount of the organic compound is estimated using a calibration curve.

EFFECT: easy implementation and interpretation of data and suitability for analysis of organic compounds in various objects.

8 dwg



Фиг. 1

Изобретение относится к области аналитической химии, а именно к инструментальным оптическим методам анализа.

Одним из инструментальных методов анализа является масс-спектрометрия - 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. Одной из разновидностей масс-спектрометрии является метод MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) - лазерная десорбция и ионизация в присутствии вспомогательного вещества - матрицы, играющей роль переносчика энергии (Аналитическая химия: проблемы и подходы. Т.2 / Под ред. Р.Келнера. - М: «Мир» «act». - 2004. - С.271).

Особенно перспективен метод MALDI в анализе лекарственных веществ и органических соединений благодаря высокой чувствительности и специфичности.

Известен способ определения кокаина методом MALDI в мозговой ткани умерших больных кокаинистов с использованием внутреннего стандарта (Reich R.F., Cudzilo K., Levisky J.A., Yost R.A. Quantitative MALDI-MS(n) analysis of cocaine in the autopsied brain of a human cocaine user employing a wide isolation window and internal standards // J Am Soc Mass Spectrom. - 2010. - Apr; 21 (4). - P.564-71).

Существует способ определения препарата "Саквинавира" в плазме человека с использованием MALDI, заключающийся в использовании в качестве внутреннего стандарта дейтерийсодержащего саквинавира или резерпина. В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту. Количественное содержание саквинавира определяли по среднему отношению площадей пиков аналита и внутреннего стандарта (Wagner M., Hopfgartner G. Ultra-fast quantitation of saquinavir in human plasma by matrix-assisted laser desorption/ionization and selected reaction monitoring mode detection // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. - 2008. - Sep 1; 872(1-2). - P.68-76).

Недостатком известных способов является использование внутренних стандартов с мечеными атомами (изотопами), являющимися редкими и дорогостоящими реактивами.

Наиболее близким к предлагаемому техническому решению является способ определения различных лекарственных веществ с помощью MALDI без использования меченых атомов во внутреннем стандарте. В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту (Persike M., Karas M. Rapid simultaneous quantitative determination of different small pharmaceutical drugs using a conventional matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system // Rapid Commun. Mass Spectrom. - 2009. - Vol.23. - P.3555-3562). Недостатком данного способа является необходимость предварительного выбора вещества, используемого в качестве внутреннего стандарта, и сложная система расчетов количественного содержания вещества с использованием логарифмических исчислений.

Задачей настоящего изобретения является разработка высокочувствительного способа количественного определения органических веществ, простого в исполнении, не требующего трудоемких расчетов и использования математических операций для интерпретации полученных данных.

Поставленная задача решается с помощью предлагаемого способа количественного определения органических соединений, включающего проведение анализа вещества методом масс-спектрологии с лазерной десорбцией/ионизацией с

использованием в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты и внутреннего стандарта, не содержащего изотопов, причем в качестве внутреннего стандарта используют вещество, наиболее близкое по строению молекулы к определяемому органическому соединению, кроме того, оценку количества органического соединения проводят с помощью калибровочного графика.

Отличительными признаками заявляемого изобретения являются:

- в качестве внутреннего стандарта используют вещество, наиболее близкое по строению молекулы к определяемому органическому соединению, что позволяет оптимизировать процесс анализа;

- оценку количества органического соединения проводят с помощью калибровочного графика, что позволяет избежать трудоемких расчетов и использования математических операций для интерпретации полученных данных.

Способ иллюстрируется следующим примером.

Количественное определение резвератрола методом MALDI.

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. В качестве внутреннего стандарта применено вещество сходной флавоноидной структуры, 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 ($m/z=303$) (фиг.1).

Для количественного определения резвератрола 0,1 г его субстанции 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 в 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% 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 мкл с помощью дозатора наносили на мишень «MTP 384 target plate matt steel TF» в шесть лунок, высушивали и сверху наносили каплю матрицы - раствор кислоты α -циано-4-гидроксикоричной. Регистрацию масс-спектров проб №1-6 проводили на приборе масс-спектрометр «Autoflex II» «MALDI TOF/TOF» фирмы Bruker Daltonics. Обработку данных осуществляли в программе «Flex Analis» в режиме Reflex Positive. В результате 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 $m/z=303,2$ (фиг.2-7).

Как видно из фиг.2-7, интенсивность пика иона аналита резвератрола плавно уменьшается, а внутреннего стандарта кверцетина увеличивается по мере нарастания его концентрации.

Каждую пробу регистрировали трехкратно и вычисляли среднее значение их интенсивности (I).

Для оценки прямолинейности зависимости концентрации внутреннего стандарта от отношения интенсивностей внутреннего стандарта и аналита построен калибровочный график в координатах $C_{\text{стандарта}}$, мкг/мл - $I_{\text{st}}/I_{\text{ан}}$ (фиг.8).

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

Когда отношение $I_{\text{st}}/I_{\text{ан}}$ приближается к единице, это является свидетельством совпадения концентраций внутреннего стандарта и исследуемого вещества. Тогда количественное содержание исследуемого вещества можно найти по приведенному калибровочному графику или вычислить по формуле:

$$C_x = C_{\text{st}} \frac{I_{\text{ан}}}{I_{\text{st}}}$$

Из рассчитанных данных следует, что содержание аналита (резвератрола) 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 количественного определения содержания резвератрола методом масс-спектрометрии представлены в таблице.

X (мкг/мл)	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
0,1228	0,0005	0,00000025	$\bar{X} = 0,1233$ $\sum (\bar{X} - X)^2 = 0,00014$ $S_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} = 0,0018$ $\Delta X = S_x \cdot t_x = 0,0045$ $\epsilon = 3,65\%$
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	
$\bar{X} = 0,1233$		$\sum (\bar{X} - X)^2 = 0,00014$	

Как видно из данных таблицы, относительная ошибка единичного определения способа количественного определения резвератрола методом масс-спектрометрии с вероятностью 95% составляет $\pm 3,65\%$. Нижний предел обнаружения составил 10^{-7} г/мл.

Таким образом, разработан высокочувствительный способ количественного определения органических соединений методом масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией простой в исполнении и интерпретации данных и пригодный для целей анализа органических соединений в объектах различного происхождения.

Формула изобретения

Способ количественного определения органических соединений, включающий

проведение анализа вещества методом масс-спектропии с лазерной десорбцией/ионизацией с использованием в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты и внутреннего стандарта, не содержащего изотопов, отличающийся тем, что в качестве внутреннего стандарта используют вещество, наиболее близкое по строению молекулы к определяемому органическому соединению, кроме того, оценку количества органического соединения проводят с помощью калибровочного графика.

10

15

20

25

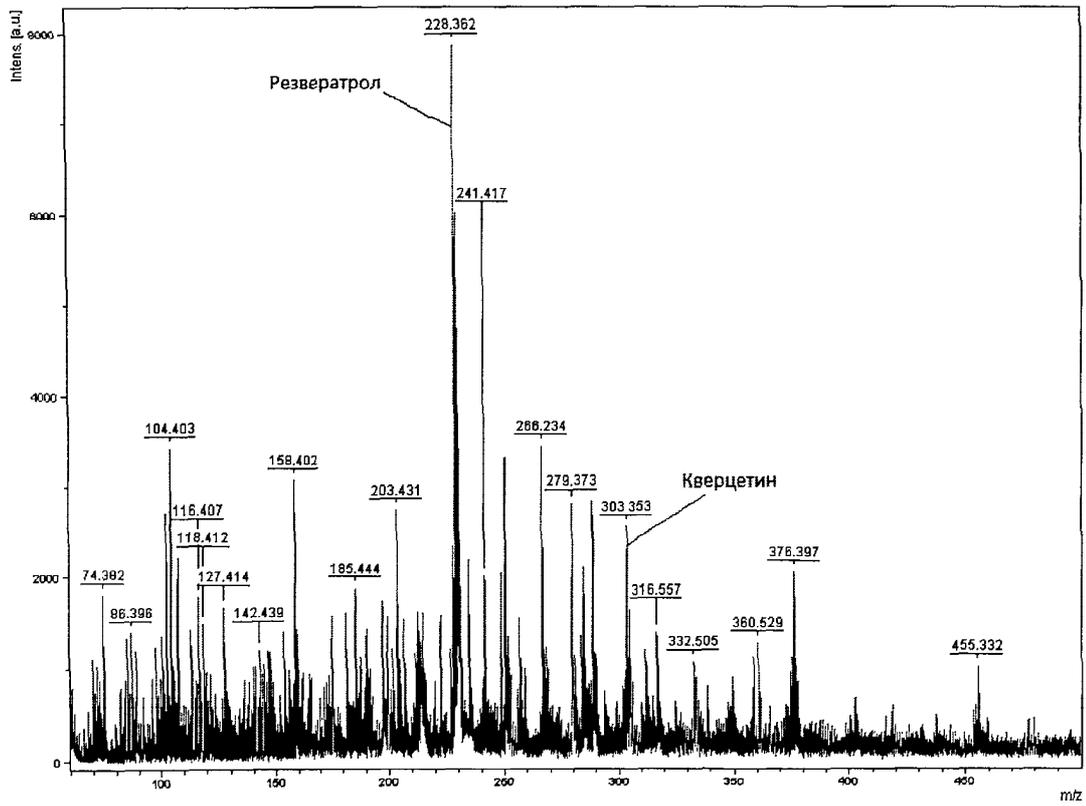
30

35

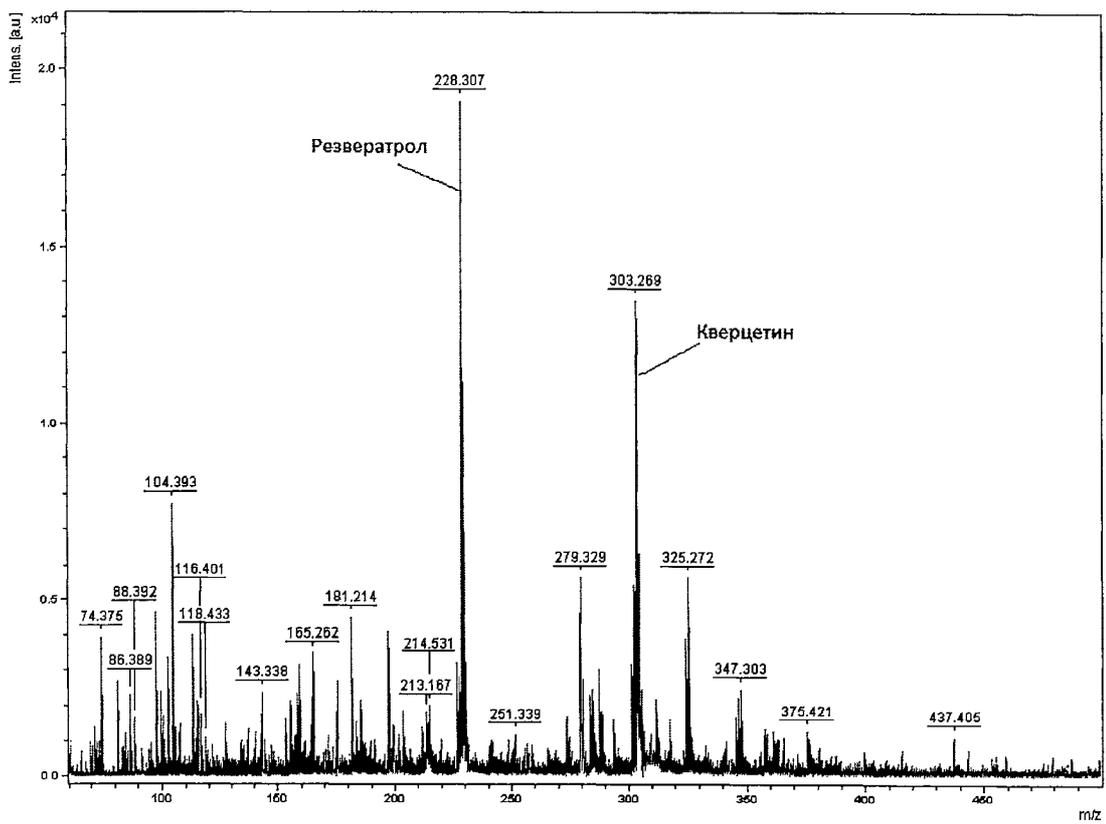
40

45

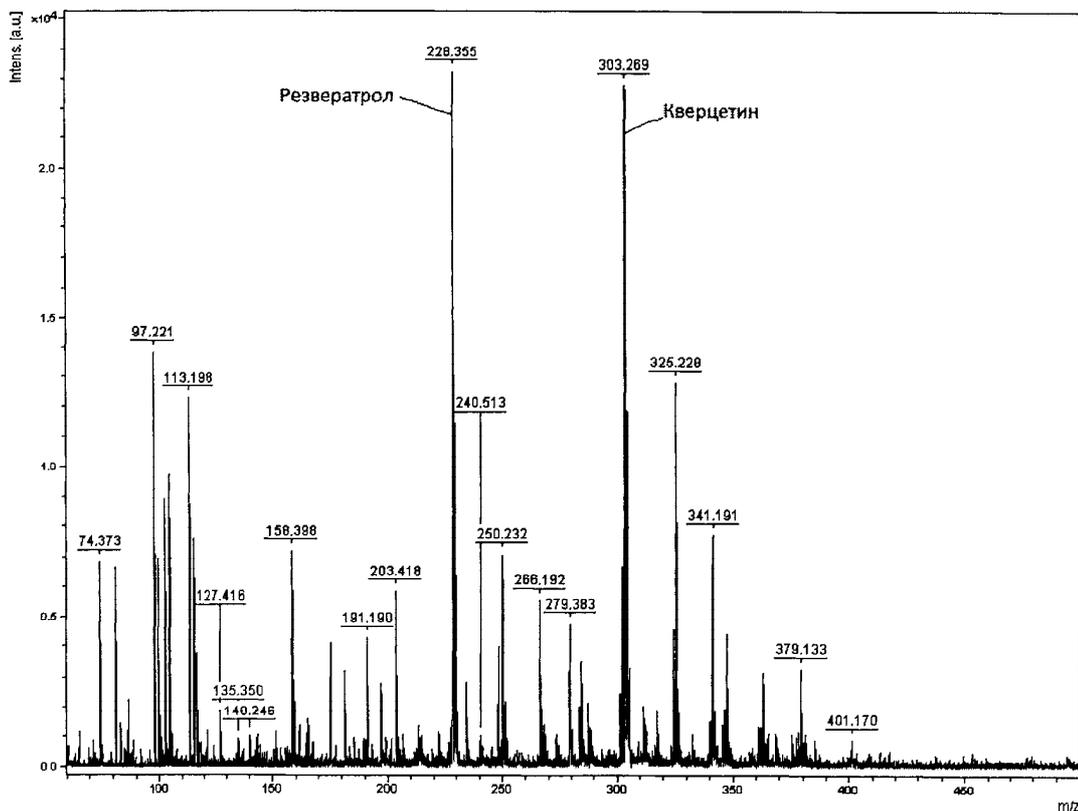
50



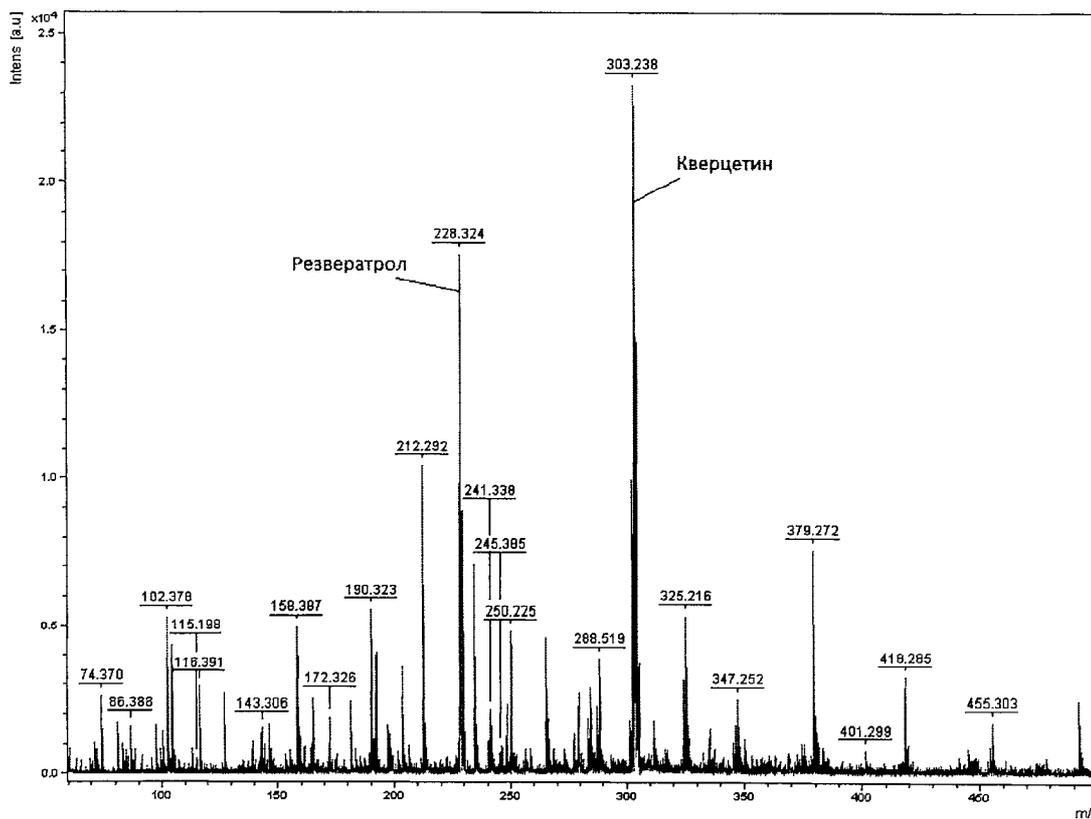
Фиг. 2



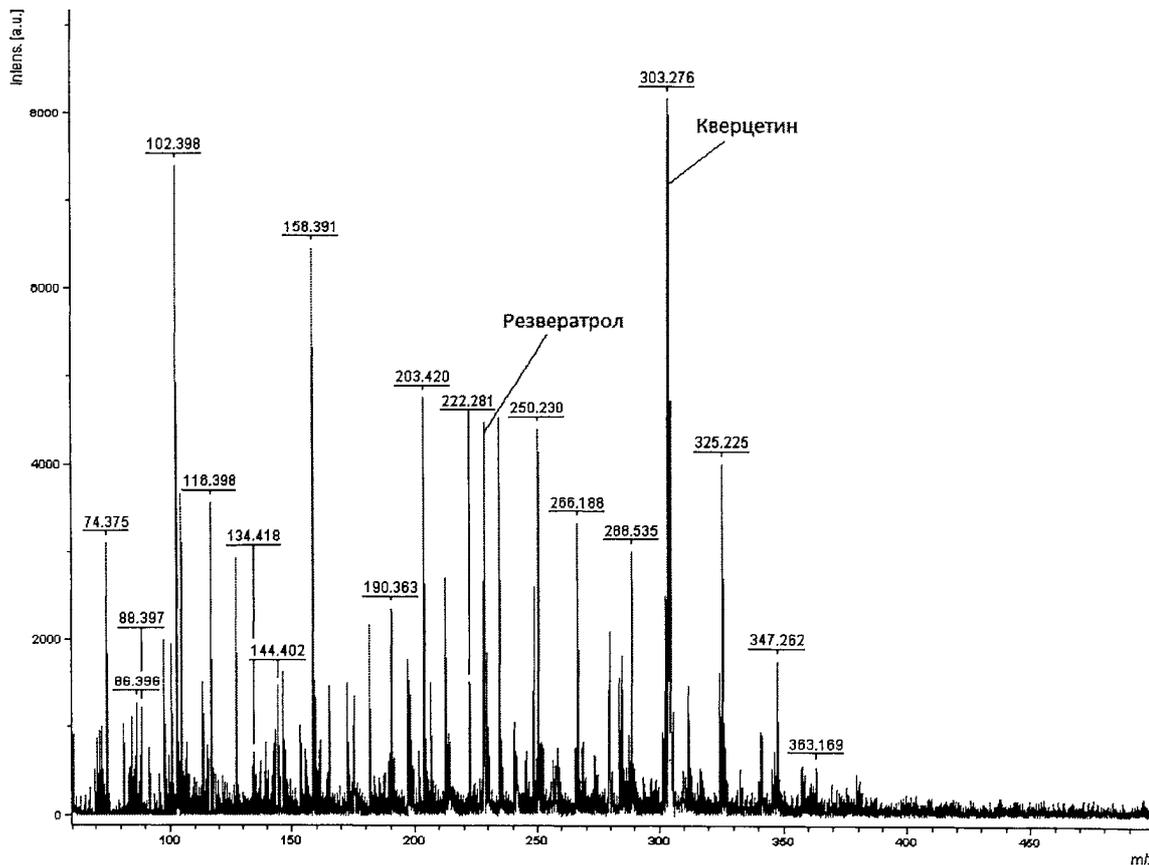
Фиг. 3



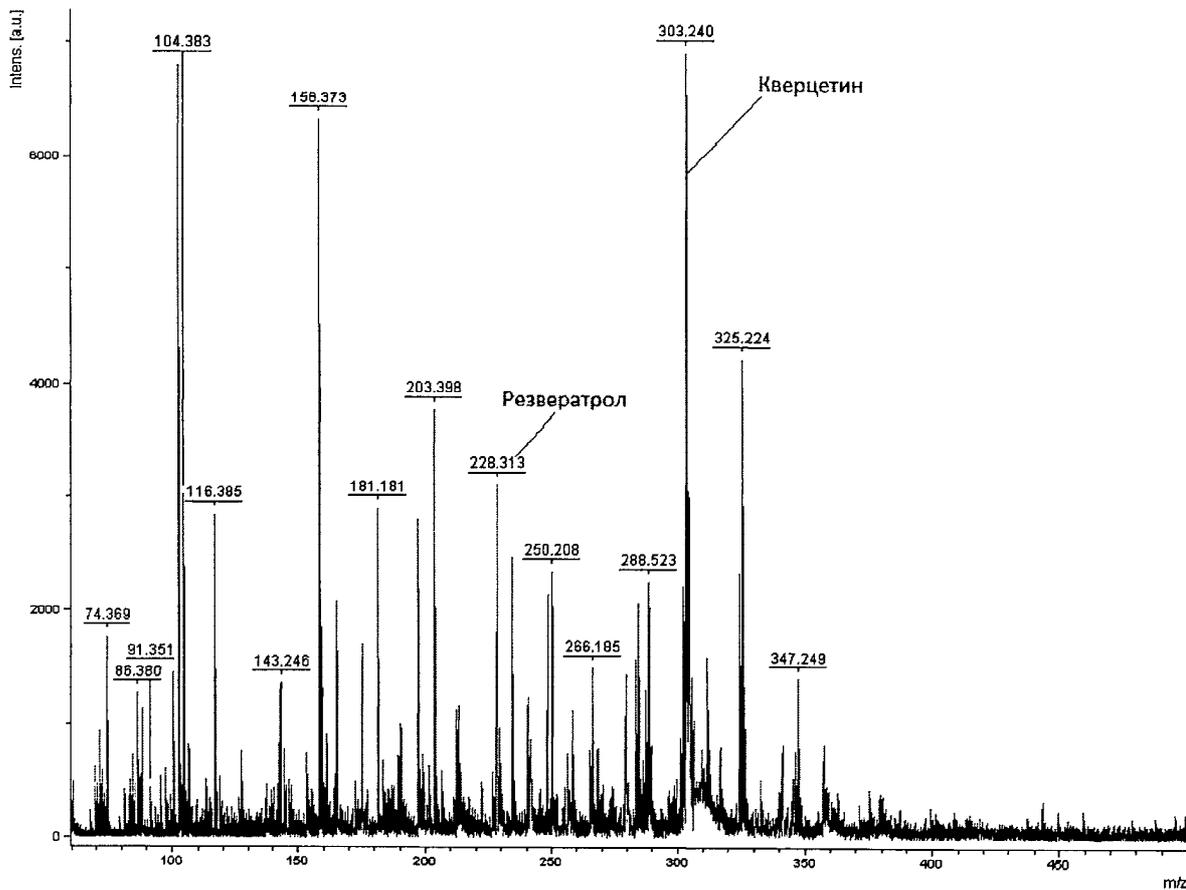
Фиг. 4



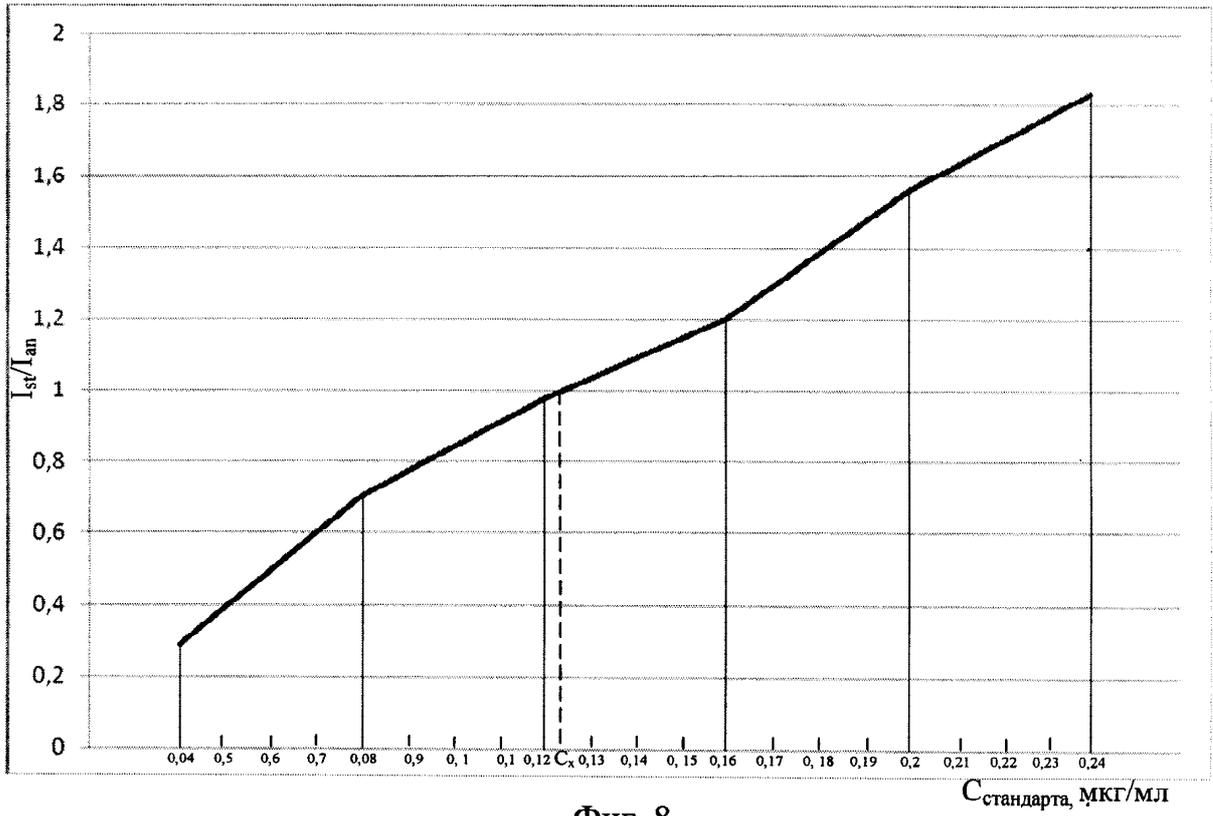
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

$C_{\text{стандарта}}$, $\mu\text{г/мл}$