



УДК 543.51

## Анализ пентоксифиллина методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

Чамян К.Р., Парамонов С.А., Ревельский И.А., Буряк А.К.

*Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва*

Поступила в редакцию 1.04.2011 г.

### Аннотация

Изучена возможность анализа фармацевтической субстанции – пентоксифиллина методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ). Исследовано влияние природы используемой матрицы, способа нанесения образца, мощности ионизирующего лазерного излучения на состав масс-спектра. Показано, что метод масс-спектрометрии МАЛДИ позволяет идентифицировать пентоксифиллин на уровне  $8 \cdot 10^{-15}$  моль. Изучены процессы фрагментации протонированных молекулярных ионов пентоксифиллина. Проведено сопоставление масс-спектров МС/МС, полученных с ионизацией МАЛДИ и литературных данных, полученных с ионизацией электрораспылением.

**Ключевые слова:** матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, масс-спектрометрия, пентоксифиллин, анализ лекарств.

The possibility of pentoxifylline analysis using matrix-assisted laser/desorption/ionisation mass spectrometry (MALDI MS) was investigated. Influence of matrix nature, sample preparation method and laser settings on mass spectrocoric characteristics were studied. It was shown that MALDI MS allows to analyze pentoxifylline at  $8 \cdot 10^{-15}$  level. Fragmentation pathways of protonated molecular ions were studied using MALDI mass-spectrometry. The results were compared with respective literature data received with electrospray ionisation

**Keywords:** matrix-assisted laser/desorption/ionisation, mass spectrometry, pentoxifylline, analysis of pharmaceuticals

### Введение

Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) широко применяют для анализа высокомолекулярных веществ, таких как пептиды, протеины, синтетические полимеры, полисахариды, олигосахариды, олигонуклеатиды [1,2]. Преимуществом метода является образование высокоинтенсивного пика квазимолекулярного иона для лабильных соединений разных классов в отличие от других методов ионизации [3].

Метод МАЛДИ длительное время не получал широкого применения для анализа низкомолекулярных веществ из-за мешающего влияния ионов матрицы в низкомолекулярной области. Однако в настоящее время растет интерес к

применению метода МАЛДИ для анализа низкомолекулярных соединений [4]. Известны работы по применению этого метода для определения аминокислот [5], жирных кислот [6], фармацевтических средств [7-10]. Для анализа лекарственных средств применение метода МАЛДИ является актуальным из-за возможности их определения непосредственно в лекарственной форме (таблетке) [11,12].

Выбор матрицы для МАЛДИ в таких исследованиях часто определяет успех анализа. Большинство соединений, применяемых в качестве МАЛДИ матриц, являются низкомолекулярными органическими соединениями. Самыми распространенными матрицами являются  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота и 2,5-дигидроксибензойная кислота [4, 5, 9]. Однако существует ряд работ по определению низкомолекулярных соединений, в которых в качестве матриц используются порфирины, относительно высокомолекулярные соединения [6, 7, 13].

Для анализа низкомолекулярных соединений применяют также метод поверхностно-активированной лазерной десорбции/ионизации (ПАЛДИ), в котором в процессе ионизации вместо матрицы используется поверхность. В качестве поверхностей, участвующих в ионизации, используют углеродные материалы, порошки металлов и их оксидов, дисперсный кремний и др. [3] Например, раствор образца смешивают с суспензией порошка углерода в метаноле или глицерине. Также добавляют сахарозу для уменьшения фоновых сигналов, отвечающих углероду [14].

Целью настоящего исследования являлось изучение возможности применения масс-спектрометрии МАЛДИ к анализу фармацевтической субстанции – пентоксифиллина и влияния параметров эксперимента на состав масс-спектра этого важного соединения. Пентоксифиллин является действующим веществом различных фармацевтических препаратов улучшающих реологические свойства крови и применяющиеся в лечении нарушений периферического и цереброваскулярного кровообращения. В данной работе исследованы различные варианты нанесения матрицы и аналита на мишень, исследован состав ионов в масс-спектре МАЛДИ в зависимости от матрицы и соотношения матрица/аналит для данной фармацевтической субстанции.

## Эксперимент

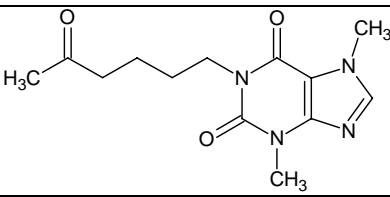
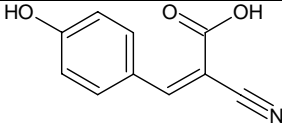
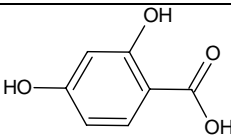
Работу проводили на масс-спектрометре фирмы Bruker модели «Ultraflex II MALDI TOF» (Германия). Ионизацию проводили азотным лазером с рабочей длиной волны  $\lambda=337$  нм, максимальной энергией 100 мкДж/импульс непосредственно на мишени с регистрацией положительных ионов. Частота выстрелов – 20 Гц, количество импульсов – 50, время между импульсами, дающими суммарный спектр – 1 мкс. Регистрацию масс-спектров проводили в диапазоне 50 - 500 Д. МС-МС спектры фрагментации протонированных молекул пентоксифиллина  $[M+H]^+$  регистрировали с помощью метода FAST.

В МАЛДИ-МС экспериментах использовали мишень из нержавеющей стали на 384 образца («Bruker», Германия). Растворы образцов наносили микрошприцем на 1 мкл («Hamilton», США). Объем вводимой пробы составлял 1 мкл.

В качестве объекта исследования была выбрана фармацевтическая субстанция - пентоксифиллин (3,7-дигидро-3,7-диметил-1-(5-оксогексил)-1Н-пурин-2,6-дион), степень чистоты которой по данным ВЭЖХ и элементного анализа составляла свыше 99%. В качестве матрицы использовали  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричную кислоту ( $\alpha$ -CHCA) и 2,5-дигидроксибензойную кислоту (DHB)

(Табл 1). В качестве растворителя для приготовления растворов исследуемых соединений и матриц использовалась смесь ацетонитрила и дистиллированной воды в соотношении 1:1.

Таблица 1. Анализируемые вещества и матрицы, использованные в исследовании.

Название	М	Структурная формула	Исходная концентрация
Пентоксифиллин (3,7-дигидро-3,7-диметил-1-(5-оксогексил)-1Н-пурин-2,6-дион)	278,1		1 мкг/мл
$\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота	189,7		$2.13 \cdot 10^3$ мкг/мл
2,5-дигидроксibenзойная кислота	154,1		$1.17 \cdot 10^3$ мкг/мл

Исходные растворы пентоксифиллина,  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты и 2,5-дигидроксibenзойной кислоты были приготовлены растворением сухого вещества в смеси ацетонитрил : вода. Остальные растворы получали последовательным разбавлением первоначального раствора. Исходные концентрации растворов приведены в табл 1.

Образцы наносились на мишень следующими способами:

- наносили последовательно раствор матрицы, затем раствор аналита;
- наносили раствор, полученный предварительным смешением равных объемов растворов матрицы и аналита.

Нанесённые образцы высушивались досуха, затем мишень помещали в прибор и регистрировали масс-спектры.

## Обсуждение результатов

Одной из задач данной работы являлось исследование влияния параметров пробоподготовки и условий эксперимента на состав масс-спектра пентоксифиллина. Нами исследовалось два варианта нанесения образца и матрицы на мишень, описанные выше. Обнаружено, что при различных способах нанесения образцов кристаллизация протекает по-разному. На Рисунке 1 представлены фотографии участков мишени с нанесенными на поверхность образцами.

В случае последовательного нанесения с матрицей СНСА (а) наблюдается крупные практически равномерно распределенные кристаллы, тогда как в случае предварительного смешения (б) - мелкие кристаллы. При использовании матрицы – ДНВ в обоих случаях кристаллизация приводит к образованию кристаллов едва заметных или незаметных на поверхности мишени (в, г) при данном увеличении камеры.

При этом в случае ДНВ для обоих способов нанесения пробы пики протонированных молекулярных ионов имеют крайне низкую интенсивность, или

едва регистрируемые в масс-спектрах (Рис. 2). При этом регистрируются пики ионов  $[M+Na]^+$ , имеющие более высокую интенсивность. Изменение соотношения матрица – аналит, мощность лазерного импульса не привело к увеличению интенсивности искомых пиков ионов. В связи с этим дальнейшее изучение возможности применения ДНВ для данной фармацевтической субстанции не проводили.

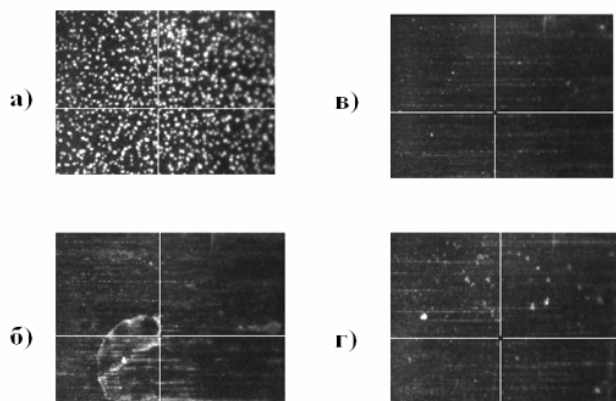


Рис. 1. Изображения поверхности мишени с нанесенными образцами пентоксифиллина (1 мкг/мл) с матрицами: а)  $\alpha$ -СНСА, последовательное нанесение; б)  $\alpha$ -СНСА, предварительное смешение; в) ДНВ, последовательное нанесение; г) ДНВ, предварительное смешение

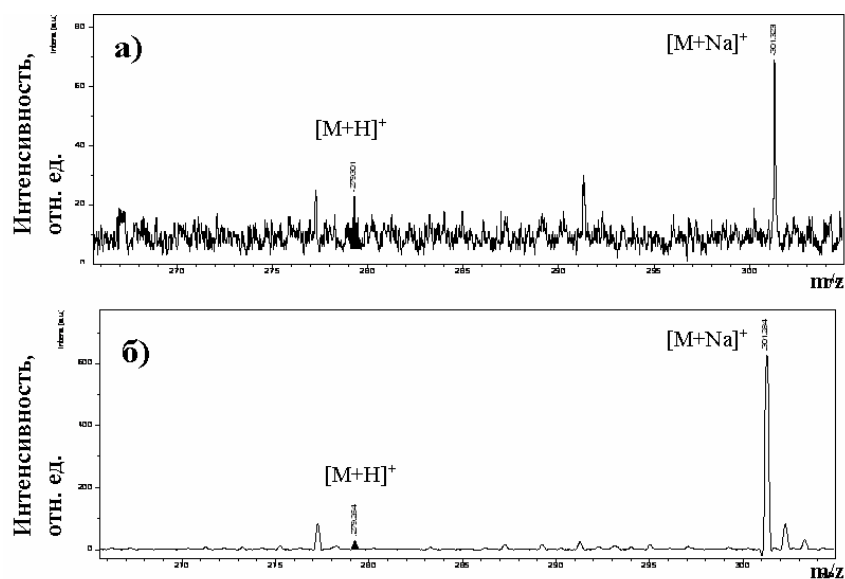


Рис. 2. Масс-спектры МАЛДИ пентоксифиллина в присутствии матрицы ДНВ: а) предварительное смешение, б) последовательное нанесение

Нанесение предварительно приготовленной смеси аналит – матрица для  $\alpha$ -СНСА также приводит к появлению в масс-спектрах МАЛДИ низкоинтенсивных пиков протонированных молекулярных ионов  $[M+H]^+$  (Рис. 3 а). При последовательном нанесение матрицы и аналита наблюдается значительное увеличение интенсивности пиков протонированных ионов пентоксифиллина (Рис. 3 б).

Таким образом, способ нанесения образца имеет критическое значение в анализе пентоксифиллина методом масс-спектрометрии МАЛДИ.

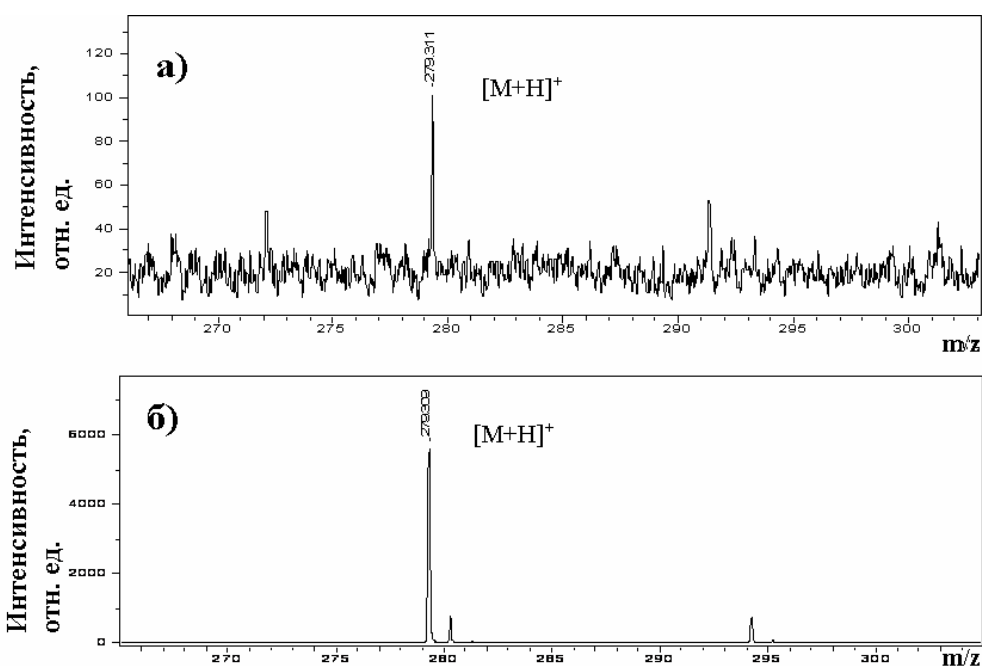


Рис. 3. Масс-спектры МАЛДИ пентоксибиллина в присутствии матрицы  $\alpha$ -СНСА: а) предварительное смешение б) последовательное нанесение

Известно, что величина рабочей энергии лазерного излучения существенным образом влияет на интенсивность пиков ионов, так и на уровень шума. При увеличении мощности лазерного излучения с 15 мкДж до 30 мкДж приводит к двукратному увеличению интенсивности сигнала иона  $[M+H]^+$  аналита (Рис. 3б и Рис. 4а). Дальнейшее увеличение мощности лазера приводит к увеличению уровня фона, при этом интенсивность сигнала аналита увеличивается в незначительной степени (Рис. 4б). Следует отметить, что при энергии импульса 60 мкДж нарушается изотопное распределение, и пик протонированного молекулярного иона имеет тупую вершину, что указывает на насыщение детектора. Таким образом, оптимальной энергией лазерного излучения будет 28-44 мкДж/импульс.

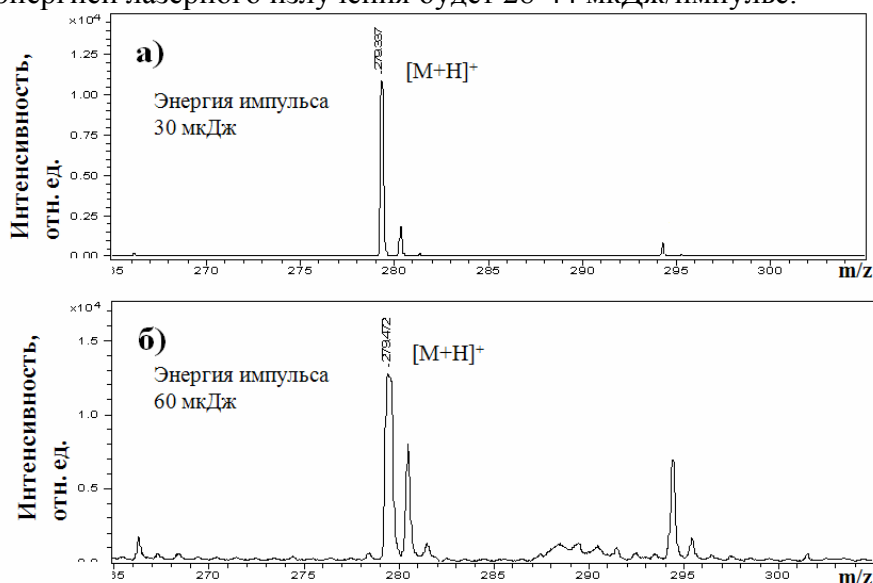


Рис. 4. Влияние мощности лазерного излучения на интенсивность ионов  $[M+H]^+$  пентоксибиллина (матрица  $\alpha$ -СНСА)

Исследовался состав масс-спектров при соотношении матрица:аналит 1:1, 10:1 и 100:1 и более. Показано что при соотношениях 100:1 и более регистрируются высокоинтенсивные пики иона  $[M+H]^+$  при высоком соотношении сигнал/шум.

В выбранных условиях определили предел обнаружения пентоксибиллина методом МАЛДИ. Показано, что этим методом можно определять присутствие пентоксибиллина в растворах с использованием СНСА в качестве матрицы на уровне  $8 \times 10^{-15}$  моль, Рис. 5.

Предел обнаружения пентоксибиллина методом МАЛДИ, в выбранных условиях в 5-10 раз ниже, по сравнению с методами, использующими ионизацию электрораспылением [15,16].

Известно, что наличие пиков характеристических ионов в масс-спектрах ионизации электрораспылением или электронной ионизацией позволяет надежно идентифицировать определяемые соединения, что является важным для изучения фармакокинетики пентоксибиллина [15,16]. В связи с этим нами исследованы процессы фрагментации метастабильных протонированных молекулярных ионов пентоксибиллина протекающие после ионного источника в условиях МАЛДИ-МС. Так в масс-спектрах фрагментации родительских ионов пентоксибиллина  $[M+H]^+$  с  $m/z = 279$  присутствуют пики характеристических ионов с  $m/z = 43, 99, 138, 181$ , (табл. 2).

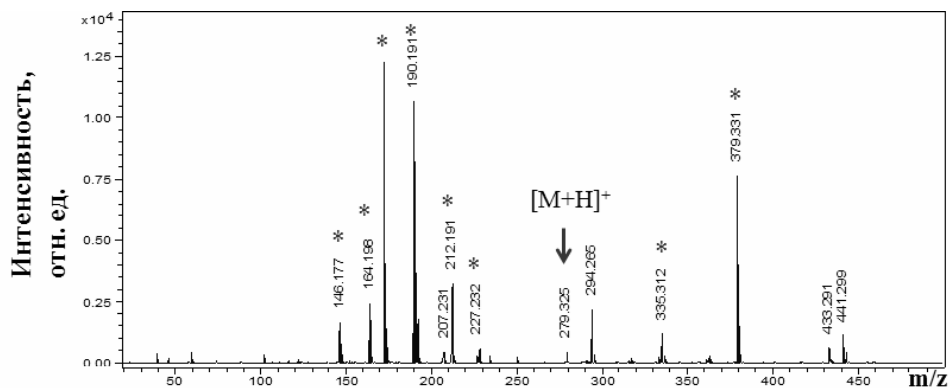


Рис. 5. Масс-спектр МАЛДИ пентоксибиллина в присутствии СНСА, количество вещества на мишени  $2 \times 10^{-12}$  г или  $8 \times 10^{-15}$  моль, \* - пики ионов матрицы

Таблица 2. Состав ионов вторичных масс-спектров, полученных при диссоциации иона  $[M+H]^+$  пентоксибиллина в условиях ионизации МАЛДИ и электрораспыления.

Метод ионизации	Состав вторичного масс-спектра
МАЛДИ	43, 99, 138, 181, 279
Электрораспыление	99, 138, 181, 221, 279 [15]
	99, 138, 149, 181 [16]

Как видно из табл. 2, пути фрагментации оказываются схожими при этом в случае использования ионизации МАЛДИ наблюдается более глубокий распад до образования фрагментного иона с  $m/z = 43$  обусловленного, по-видимому, отщеплением ацетильной группы, рис.6.

Следует отметить, что в процессе фрагментации родительских ионов пентоксибиллина  $[M+H]^+$  с  $m/z = 279$  в условиях ионизации МАЛДИ не происходит образование фрагментного иона с  $m/z = 221$ , обусловленного элиминированием нейтральной молекулы ацетона, тогда как в работе [15] данный ион присутствует и имеет крайне низкую интенсивность. Видно, что в ряде случаев при ионизации

электрораспылением во вторичном масс-спектре отсутствует пик иона  $[M+H]^+$  пентоксифиллина [16].

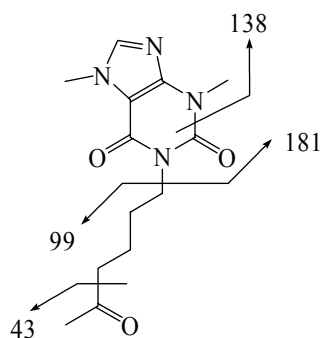


Рис. 6. Схема фрагментации родительских ионов пентоксифиллина  $[M+H]^+$  с  $m/z = 279$ . Ионизация методом МАЛДИ

Таким образом, применение масс-спектрометрии с ионизацией МАЛДИ расширяет возможности анализа важной фармакологической субстанции – пентоксифиллина.

### Заключение

Исследованы различные варианты нанесения матрицы и вещества на мишень. Исследован состав ионов в масс-спектре МАЛДИ в зависимости от матрицы и соотношения матрица/аналит для данной фармацевтической субстанции. Показано, что матрица  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота является более подходящей для определения пентоксифиллина, подобрано соотношение матрица/аналит, при котором достигается наилучшее соотношение сигнал/шум. Установлено что данным методом можно определять пентоксифиллин с матрицей СНСА до уровня  $8 \cdot 10^{-15}$  моль. Изучен состав ионов вторичного масс-спектра пентоксифиллина, полученного в результате фрагментации иона с  $m/z=279$ , образованного при ионизации методом МАЛДИ. Проведено сопоставление этого масс-спектра и вторичных масс-спектров, полученных в результате ионизации электрораспылением.

### Список литературы

- 1.Chan T-W.D, Colburn A.W, Derrick P. Matrix-assisted laser desorption/ionization using a liquid matrix: Formation of high-mass cluster ions from protein // J. Org. Mass Spectrom. 1992. V. 27. P. 53.
- 2.Danis P.O., Karr D.E., Mayer F., Holle A., Watson C.H. The analysis of water-soluble polymers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry // J. Org. Mass Spectrom. 1992. V. 27. P. 843.
- 3.Hillenkamp F., Peter-Catalinit J. MALDI MS. WILEY-VCH. 2007. с. 363.
- 4.Cohen L. H., Gusev A. I. Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry // Anal Bioanal Chem. 2002. V. 373. P.571–586.
5. Zabet-Moghaddam M., Heinzle E., Tholey A. Qualitative and quantitative analysis of low molecular weight compounds by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrices // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004. V. 18. P. 141.

6. Ayorinde F. O., Garvin K., Saeed K. Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000. V. 14. P. 608.

7. Ling Y-C., Lin L., Chen Y-T. Quantitative Analysis of Antibiotics by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998. V. 12. 317.

8. LeRiche T., Osterodt J., Volmer D. A. An experimental comparison of electrospray ion-trap and matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectra for the characterization of small drug molecules // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001. V. 15. P. 608.

9. Sleno L., Volmer D. A. Some fundamental and technical aspects of the quantitative analysis of pharmaceutical drugs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. V. 19. P. 1928.

10. Crecelius A., Clench M. R., Richards D. S., Parr V. Quantitative determination of Piroxicam by TLC-MALDI TOF MS // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004. V. 35. P. 31.

11. Earnshaw C.J., Carolan V.A., Richards D.S., Clench M.R. Direct analysis of pharmaceutical tablet formulations using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010. V. 24. P. 1665.

12. Su A.K., Liu J.T., Lin C.H. Rapid drug-screening of clandestine tablets by MALDI-TOF mass spectrometry // *Talanta.* 2005. V. 67. P. 718.

13. Morrow A. P., Kassim Folahan O. O., Ayorinde O. Detection of cationic surfactants in oral rinses and a disinfectant formulation using by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001. V.15. P. 767.

14. Chen Y-C., Shiea J., Sunner J. Rapid determination of trace nitrophenolic organics in water by combining solid-phase extraction with surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000. V. 14. P. 86.

15. Ramakrishna N.V.S., Vishwottan K.N., Manoj S., Santosh M., Anjaneyulu Y. Rapid liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantification of pentoxifylline in human plasma // *Chromatographia.* 2006. V. 63. P. 135.

---

**Чамян Карине Робертовна** - аспирант, Учреждение РАН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

**Парамонов Сергей Александрович** - к.х.н., м. н. с., Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

**Ревельский Игорь Александрович** - д.х.н., профессор, химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

**Буряк Алексей Константинович** - зав. лаб., д. х. н., Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

**Chamyán Karine R.** - post-graduate student, Institution of Russian Academy of Science A.N. Frumkin Institute Of Physical Chemistry And Electrochemistry of RAS, Moscow, e-mail: [kchamyán@gmail.com](mailto:kchamyán@gmail.com)

**Paramonov Sergei A.** - Dr. Sc. Chem., Institution of Russian Academy of Science A.N. Frumkin Institute Of Physical Chemistry And Electrochemistry of RAS, Moscow

**Revelsky Igor A.** - Dr. Sc. Chem, Prof, Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow

**Buryak Aleksey K.** - Chief of laboratory, Dr. Sc. Chem., Institution of Russian Academy of Science A.N. Frumkin Institute Of Physical Chemistry And Electrochemistry of RAS, Moscow