

На правах рукописи



Жиляев Дмитрий Игоревич

**Производные с фиксированным зарядом в масс-спектрометрии МАЛДИ  
соединений с низкой эффективностью ионизации**  
(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 Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

**Научный руководитель:**

**Воскресенский Леонид Геннадьевич**

доктор химических наук, профессор. Заведующий кафедрой органической химии факультета Физико-математических и естественных наук «Российского университета дружбы народов»

**Официальные оппоненты:**

**Зенкевич Игорь Георгиевич**

доктор химических наук, профессор. Заведующий лабораторией газовой хроматографии НИИ химии «Санкт-Петербургского государственного университета»

**Родин Игорь Александрович**

доктор химических наук. Старший научный сотрудник кафедры аналитической химии Химического факультета «Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова»

**Ведущая организация:** Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

Защита диссертации состоится «28» 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  
кандидат химических наук, доцент

В. В. Курилкин

## Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** Масс-спектрометрия (МС) с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС) является одним из наиболее популярных «мягких» масс-спектрометрических методов. Первоначально нацеленный на изучение высокомолекулярных соединений, этот способ ионизации все активнее применяется и для детектирования низкомолекулярных аналитов, что связано с бурным развитием масс-спектрометрической визуализации поверхностей и применения сочетания МАЛДИ-МС и планарной хроматографии. При этом метод применим, как правило, только к соединениям, которые способны в условиях МАЛДИ присоединять протон или другой катион либо депротонироваться. Однако многие неполярные соединения не способны претерпевать эти процессы и часто остаются вне поля зрения исследования с помощью МАЛДИ-МС и многих других «мягких» ионизационных методов. Одним из способов решения этой проблемы являются подходы, основанные на химическом превращении аналитов в производные, легко ионизирующиеся в условиях таких методов. При этом удастся не только зарегистрировать масс-спектры с высоким отношением сигнал/шум, но и получить важную информацию о структуре аналитов (природа и количество функциональных групп, их расположение в молекуле, дифференциация линейных и циклических структур и др.).

К таким неполярным соединениям, которые практически не поддаются прямому анализу методами МАЛДИ-МС, относятся спирты и кетоны, разнообразие которых наблюдается в живых объектах, синтетических и промышленных продуктах. Для их исследования «мягкими» масс-спектрометрическими методами разработан ряд дериватизационных подходов с использованием химических реакций, осуществляемых на стадии пробоподготовки. При этом большинство из них касаются масс-спектрометрии с ИЭР, используют двухстадийные синтетические процедуры и не позволяют синтезировать изотопологи производных без использования изотопно-меченных аналогов аналитов, что необходимо для их количественного определения методом изотопного разбавления. Поэтому особую актуальность приобретает разработка методов химической модификации таких соединений, которые позволяли бы без выделения промежуточных продуктов синтеза получать производные, обладающие высокой эффективностью десорбции/ионизации в условиях МАЛДИ-

МС, а также могли бы быть использованы для получения изотопологов продуктов дериватизации.

Другим классом промышленно важных соединений, чей прямой анализ методом масс-спектрометрии МАЛДИ не возможен, являются галогензамещенные полиэтилены. Свойства этих соединений предопределяются молекулярно-массовым распределением получаемых олигомеров. Таким образом, использование химической модификации для синтеза производных полиэтилендиодов, способных к ионизации в условиях МАЛДИ, позволило бы решить задачу быстрого и достоверного определения их характеристик.

**Цели и задачи работы.** Исследование, проведенное в рамках настоящей диссертационной работы, преследовало цель разработать метод количественного и быстрого превращения спиртов и карбонильных соединений различного типа, а также иод-замещенных полиэтиленов в производные, которые бы эффективно ионизировались в условиях масс-спектрометрии МАДЛИ и ее безматричном варианте - поверхностно-активированной лазерной десорбции/ионизации (ПАЛДИ). В качестве основы таких подходов выбрано введение или генерация в молекулах аналитов групп, включающих фиксированный положительный заряд. Его присутствие в молекуле производного обеспечивает десорбцию соответствующего катиона, проявляющегося в масс-спектре интенсивным характеристическим пиком. Для достижения этих целей необходимо было решить следующие задачи:

- разработать методики микросинтеза производных спиртов, фенолов, альдегидов, кетонов и полиэтилендиодов с использованием простейших дериватирующих агентов, которые бы позволяли получать солеподобные производные, катионные части которых обладают высокой эффективностью десорбции/ионизации в условиях МА(ПА)ЛДИ-МС;
- определить экспериментальные условия для регистрации масс-спектров МА(ПА)ЛДИ получаемых производных;
- изучить возможность получения изотопологов производных спиртов, фенолов, альдегидов, кетонов и оценить возможность их использования для количественного анализа методом изотопного разбавления;
- определить параметры ММР иод-замещенных полиэтиленов.

**Научная новизна работы.** Разработаны новые методы химической модификации гидроксил-содержащих соединений с помощью их ацилирования

галоидацилгалогенидами и силилирования бромметилхлордиметилсиланом с последующим образованием солей в результате взаимодействия с основными азотистыми соединениями. Установлено, что полученные производные обладают высокой эффективностью десорбции/ионизации в условиях масс-спектрометрии МАЛДИ и ПАЛДИ, а предложенные дериватизационные подходы позволяют получать изотопологи модифицированных аналитов. Показана возможность применения метода для определения спиртов и фенолов в реальных объектах.

Предложен новый способ дериватизации карбонильных соединений для анализа методом МА(ПА)ЛДИ-МС  $\omega$ -диметиламиноалкиламинами, первичная аминогруппа которых обеспечивает образование оснований Шиффа, а третичная амино-группа подвергается кватернизации галоидалкилом. Показано, что катионы образующихся в результате этого солей легко десорбируются в условиях масс-спектрометрии МА(ПА)ЛДИ, а использование в качестве кватернизирующих агентов изотопномеченных соединений позволяет получать стандарты для количественного анализа методом изотопного разбавления.

Установлено, что взаимодействие иод-замещенных полиэтиленов с основными азот- и фосфор-содержащими соединениями приводит к образованию производных, позволяющих регистрировать масс-спектры МАЛДИ и определять молекулярно-массовые характеристики исходных соединений.

**Практическая значимость работы.** Разработанные дериватизационные методы существенно расширяют границы применения масс-спектрометрии МАЛДИ в области детектирования и изучения гидроксил- и карбонил-содержащих соединений, а так же функционализированных полиэтиленов. Предложенные подходы к получению изотопологов производных аналитов с использованием доступных и дешевых агентов упрощают проведение их количественного определения, а химическая модификация полиэтиленйодидов позволяет определять их молекулярно-массовые характеристики.

**На защиту выносятся следующие положения:**

- методы химической модификации гидроксил-содержащих соединений путем их обработки галоидацилгалогенидами и бромметилхлордиметилсиланом в присутствии азотистых оснований с образованием производных, обладающих высокой эффективностью десорбции/ионизации в условиях МА(ПА)ЛДИ-МС;

- способы дериватизации карбонильных соединений с помощью их взаимодействия с  $\alpha,\omega$ -диметиламиноалкиламинами и алкилгалогенидами, приводящие к образованию четвертичных аммонийных солей, чьи катионы легко десорбируются в условиях масс-спектрометрии МА(ПА)ЛДИ;

- подходы к химической модификации полиэтилендиодов в результате их реакции с основными азот- и фосфор-содержащими соединениями с образованием ионизирующихся в условиях МАЛДИ производных, масс-спектры которых позволяют определять молекулярно-массовые характеристики исходных соединений.

**Апробация работы.** Результаты работы были доложены на: XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014» (7-11 апреля 2014, Москва), III Всероссийской научной конференции с международным участием «Успехи синтеза и комплексообразования» (21-25 апреля 2014, Москва), VI Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (12-17 октября 2015, Москва), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (11-15 апреля 2016, Москва), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (26-30 сентября 2016, Екатеринбург), Марковниковских чтениях "Органическая химия: от Марковникова до наших дней" «WSOC» (13-18 января 2017, Красновидово), Всероссийской конференции «Байкальская школа-конференция по химии-2017» (15-20 мая 2017, Иркутск), 6-ой Всемирной конференции по физико-химическим методам обнаружения и разработке лекарств (3-7 сентября 2017, Загреб), VII Всероссийской конференции с международным участием "Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы" (9-13 октября 2017, Москва), II Всероссийской конференции "Байкальская школа-конференция по химии" (24-28 сентября 2018, Иркутск).

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 6 статей (все в журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации) и 10 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация объемом 130 страниц, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, трех глав обсуждения результатов работы и выводов. Содержит 13 таблиц и 46 рисунков. Библиография включает 103 названий.

## Основное содержание работы

Во **Введении** дано обоснование актуальности работы, новизны, научной и практической значимости выбранной темы.

В литературном обзоре, представленном **первой главой**, в соответствующих разделах приведено описание методов химической модификации соединений для последующего анализа методом масс-спектрометрии МАЛДИ.

Во **второй главе** перечислены реагенты, материалы и аналитические приборы, использованные в работе, а также описана техника проведения эксперимента. Масс-спектры ионизации электронами получены на газовом хроматографе/масс-спектрометре Finnigan MAT 95 XL, а масс-спектры МАЛДИ на масс-спектрометре Bruker Autoflex Speed, оснащенном твердотельным лазером и рефлектроном.

В **третьей, четвертой и пятой главах** обсуждаются собственные результаты, полученные в данной работе:

### **3. Дериватизация аналитов со свободной гидроксильной группой**

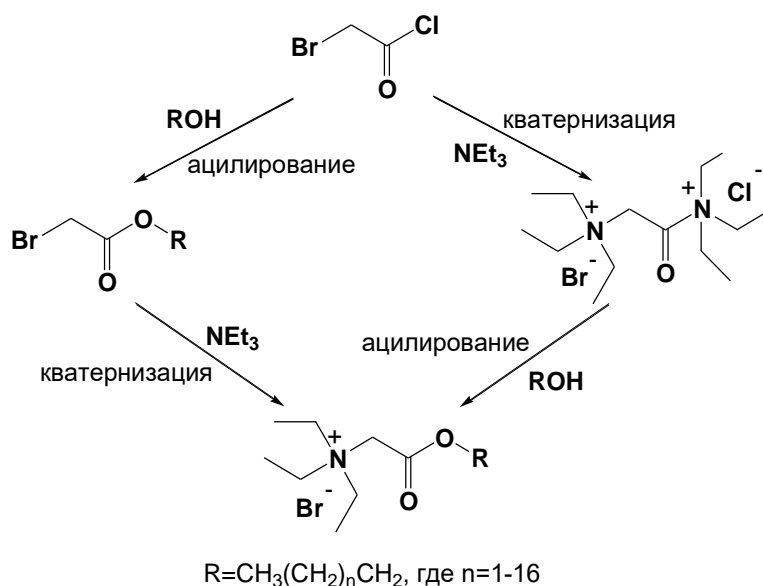
Алифатические и ароматические спирты различного строения широко распространены в природе и часто используются в промышленности. Однако их анализ низкоэнергетическими («мягкими») методами масс-спектрометрии затруднен, так как при отсутствии в их составе других функциональных групп эффективность (десорбции/ионизации) спиртов и фенолов не велика. При этом даже в тех случаях, когда ионизация протекает, из образующего иона происходит элиминирование молекулы воды. Результатом этого процесса становится низкая интенсивность (а во многих случаях и отсутствие) пиков протонированных или катионизированных молекул в сочетании с появлением ионов -продуктов дегидратации.

Одним из способов увеличения эффективности (десорбции/ионизации) молекул аналитов является их химическая модификация. Дериватизация гидроксильной группы обычно подразумевает количественное и легко протекающее замещение активного атома водорода в них на остаток дериватирующего агента. Поэтому наиболее подходящими методами для получения производных по гидроксильной группе являются ацилирование и силилирование. В нашей работе мы оценили возможность применения этих способов для разработки процедур дериватизации с введением фиксированного заряда для анализа спиртов и фенолов одним из наиболее популярных из «мягких» масс-спектрометрических методов - МА(ПА)ЛДИ.

### 3.1 Ацилирование с введением фиксированного заряда

Для проведения химической модификации аналитов со свободной гидроксильной группой с помощью ацилирования были выбраны галогенангидриды галогензамещенных жирных кислот. Такие реагенты легко доступны и обладают высокой реакционной способностью при проведении реакций ацилирования. В то же время концевые галоидоалкильные группы могут вступать в реакции с основными соединениями с образованием солей. В качестве таких соединений удобно использовать азотистые основания: с одной стороны, они обеспечивают более глубокое и быстрое протекание реакции ацилирования за счет связывания выделяющихся кислот, а с другой - могут участвовать в реакциях кватернизации под действием алкилгалогенидов с образованием четвертичных солей. Причем, вероятно, в такой трехкомпонентной реакционной смеси реакции ацилирования спиртов и кватернизации амина протекают параллельно, а спирты могут подвергаться ацилированию не только галоидацилгалогенидом, но и возникающим из него бромидом триэтиламмонийацил галогенида. В конечном счете реакцию можно рассматривать как просто «одностадийную» (схема 1 дана для случая дериватизации алифатических спиртов бромоацетилхлоридом и триэтиламином).

Схема 1



Возможность использования такого подхода была изучена на серии спиртов различного строения.

#### 3.1.1 Алифатические спирты

На начальном этапе работы следовало выяснить, насколько эта методика применима к соединениям, содержащим гидроксильную группу. Для этого в качестве



модельного соединения нами был выбран *n*-нонанол. Необходимо отметить, что в масс-спектрах МАЛДИ, зарегистрированных с помощью всех опробованных в ходе работы матриц, и при ионизации в безматричном варианте на наноструктурированных поверхностях (ПАЛДИ) исходного спирта не было обнаружено сколь-либо значимых пиков, соответствующих аналиту.

Напротив, масс-спектры МАЛДИ продуктов дериватизации содержали пики ионов катионных частей получаемых производных. Сравнение абсолютных интенсивностей пиков ионов полученных катионов и соответствующих соотношений сигнал/шум показали, что наименьшие значения наблюдаются в масс-спектрах продуктов дериватизации с использованием хлорацетилхлорида и 4-хлорбутирилхлорида. Сопоставление результатов анализа продуктов дериватизации (при добавлении меньших количеств азотистых оснований для предотвращения солеобразования) методом ГХ/МС показали, что ацилирование во всех случаях протекает полностью. Поэтому причиной этого явления, видимо, является меньшая глубина прохождения реакции кватернизации в случае хлоралкильных групп. Зависимости между регистрируемыми масс-спектрами и используемыми кватернизирующими агентами выявлено не было.

Чтобы продемонстрировать потенциал применения разработанного метода для анализа объектов сложного состава он был опробован на смеси гомологичных *n*-алканолов с числом атомов углерода от 2 до 18. Во всех случаях полученные масс-спектры МАЛДИ содержали интенсивные пики ионов катионных частей молекул продуктов дериватизации.

Как и при отработке методики дериватизации с использованием *n*-нонанола, заметной разницы между масс-спектрами продуктов дериватизации, полученных с использованием различных кватернизирующих агентов, не наблюдается: все масс-спектры содержат только пики соответствующих катионов, которые можно уверенно использовать для определения молекулярной массы исходных спиртов.

### **3.1.2 Ненасыщенные спирты**

На следующем этапе разработки метода мы исследовали его возможности при анализе непредельных алифатических спиртов, которые являются важными природными объектами. Кроме того, они имеют в своем составе двойную связь, которая может вступать в химические взаимодействия с генерируемыми в результате дериватизации промежуточными и побочными продуктами. Поэтому необходимо

было проверить, происходят ли реакции присоединения по двойной связи. Для этого нами была приготовлена смесь из нескольких ненасыщенных соединений ряда терпенолов: изопренола, нерола, фарнезола и циклического терпенового спирта – ментола. Для дериватизации использовались те же реагенты, что и в случае алканолов.

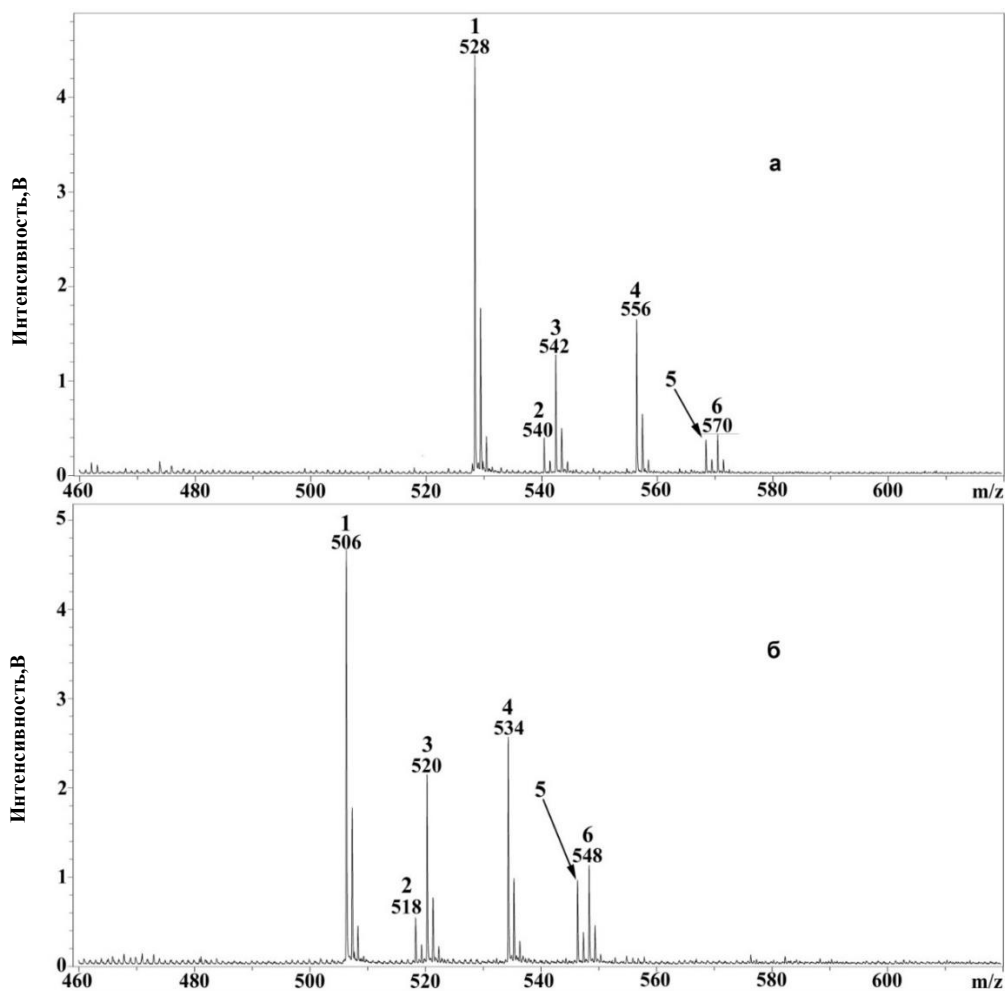
Зарегистрированные масс-спектры МАЛДИ производных, полученных как для индивидуальных терпенолов, так и их смесей содержали только пики катионных частей этих молекул. Никакого присоединения элементов вводимых дериватирующих реагентов или побочных продуктов реакции по двойным связям обнаружено не было. Сравнение масс-спектров производных, полученных с использованием разных ацилирующих агентов вновь продемонстрировало преимущество соединений с атомом брома в алкильной цепи. Поэтому в дальнейшей работе от ацилирующих агентов с атомом хлора в алкильной цепи мы отказались. Было также обнаружено, что для дериватизации непредельных соединений в качестве основания лучше всего подходит пиридин, поскольку эффективность десорбции/ионизации соответствующих солей выше, чем для солей на основе хинолина или триэтиламина.

Важным преимуществом предлагаемого метода является возможность его использования при количественном анализе с применением метода изотопного разбавления: необходимые для этого изотопномеченные стандарты легко синтезируются с использованием дешевых дейтерированных третичных аминов или N-гетероароматических оснований, например, пердейтеропиридина.

Для демонстрации возможности использования такого подхода в количественном анализе мы провели химическую модификацию смеси терпенолов бромацетилхлоридом в присутствии смеси пиридина и D5-пиридина (в объемном соотношении 1:1). Масс-спектр МАЛДИ продуктов модификации данной смеси содержат дублеты пиков, по массовому числу отличающиеся на 5 Дальтон и соответствующие катионным частям продуктов дериватизации. Соотношение интенсивностей пиков во всех четырех дублетах близко взятому объемному соотношению немеченого и меченого пиридина. Это позволяет утверждать, что метод изотопного разбавления можно с успехом использовать для количественного определения подобных соединений в различных смесях.

### 3.1.3 Алициклические спирты (стерины)

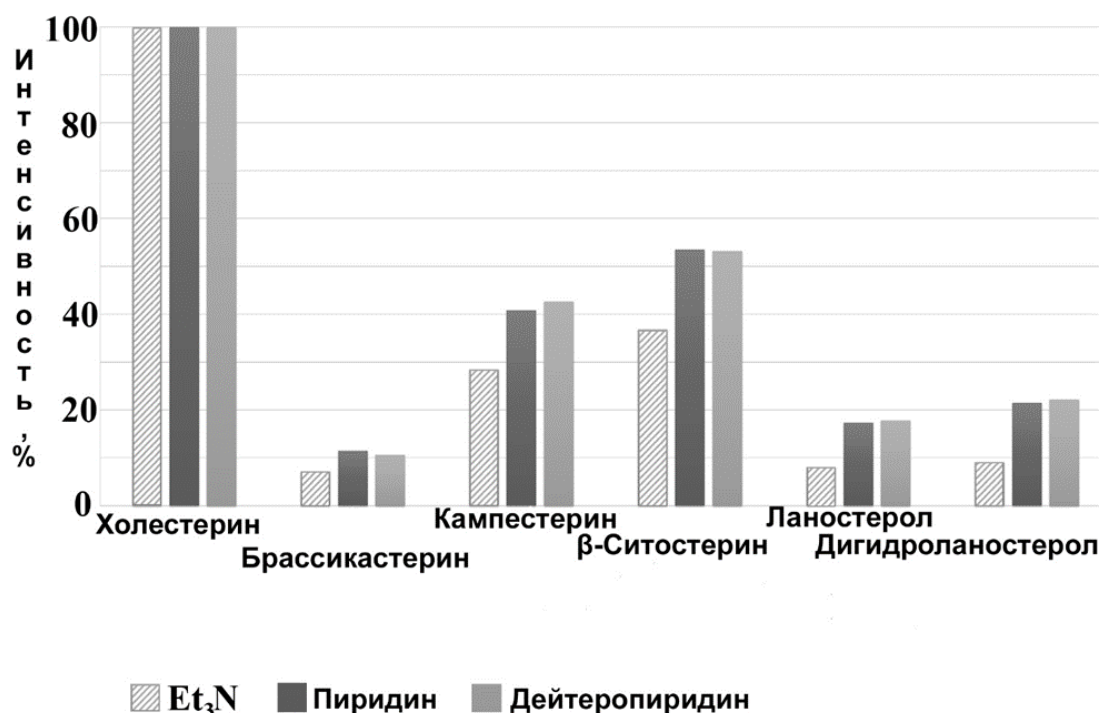
Крайне важным объектом исследований являются алициклические спирты, в частности зоо- и фитостерины, являющиеся ключевыми компонентами многих пищевых и косметических продуктов, биотоплив первого и третьего поколения. В литературе показано, что масс-спектры соединений такого типа могут содержать малоинтенсивные пики протонированных продуктов дегидратации исходных аналитов. Но зарегистрированные нами с использованием всех опробованных в ходе работы матриц и в безматричном поверхностно-активированном варианте масс-спектры таких пиков ионов не содержали. Напротив, в масс-спектрах МАЛДИ продуктов дериватизации стеринов и их смесей наблюдались интенсивные пики катионных частей получаемых производных (рис. 1).



**Рис. 1.** Масс-спектры МАЛДИ (матрица ДНА) смеси стеринов, дериватизированной бромацетилхлоридом и **(а)** триэтиламино, **(б)** пиридином. 1 – холестерин, 2 – брассикастерин, 3 – кампестерин, 4 –  $\beta$ -ситостерин, 5 – ланостерин, 6 – дигидроксиланостерин.

Отметим, что для регистрации масс-спектров ПАЛДИ (наноструктурированная мишень) потребовалось использовать более высокую энергию лазера, а спектры отличались существенно худшим соотношением сигнал/шум.

Предложенный подход к количественному определению спиртов методом изотопного разбавления был опробован и для алициклических спиртов. В данном случае сравнивались интенсивности пиков ионов в масс-спектрах МАЛДИ смеси шести стероидов, предварительно модифицированных с помощью бромацетилхлорида в присутствии триэтиламина и пиридина, а также пиридина-D5. Интенсивности пиков в зарегистрированных масс-спектрах нормировались относительно пика производного холестерина (рис. 2). Анализ полученных данных показывает, что эффективность десорбции/ионизации соответствующих производных при кватернизации пиридином и пиридином-D5 практически идентична. В то же время эффективность десорбции/ионизации производных с использованием триэтиламина отличается от таковой для пиридиновых производных. Поэтому для проведения количественных измерений необходимо использовать производные одного типа.



**Рис. 2.** Гистограмма интенсивности пиков (нормализованных к интенсивности пика производного холестерина) производных различных стероидов.

Поскольку содержание стероидных соединений в смесях обычно исключительно мало, для них был путем установлен предел обнаружения с помощью предложенного подхода. Последний определялся как минимальная концентрация, необходимая для

достижения соотношения сигнал/шум не менее 3:1. Полученные величины варьировались в пределах от  $5 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-6}$  мг/мл.

Предложенный подход был опробован для анализа реального объекта, пищевой добавки Vegarure (Swiss Natural, Швейцария, предоставлена ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), содержащей фитостерина. Масс-спектр МАЛДИ полученный после обработки образца бромацетилхлоридом в присутствии пиридина содержали пики ионов, чье массовое число соответствовало кампестирину и ситостерину. Полученные результаты совпали с данными ГХ/МС для этого образца, но на съемку последним методом было затрачено существенно больше времени по сравнению с методом МАЛДИ, что подтверждает преимущество в экспрессности метода МАЛДИ над ГХ/МС.

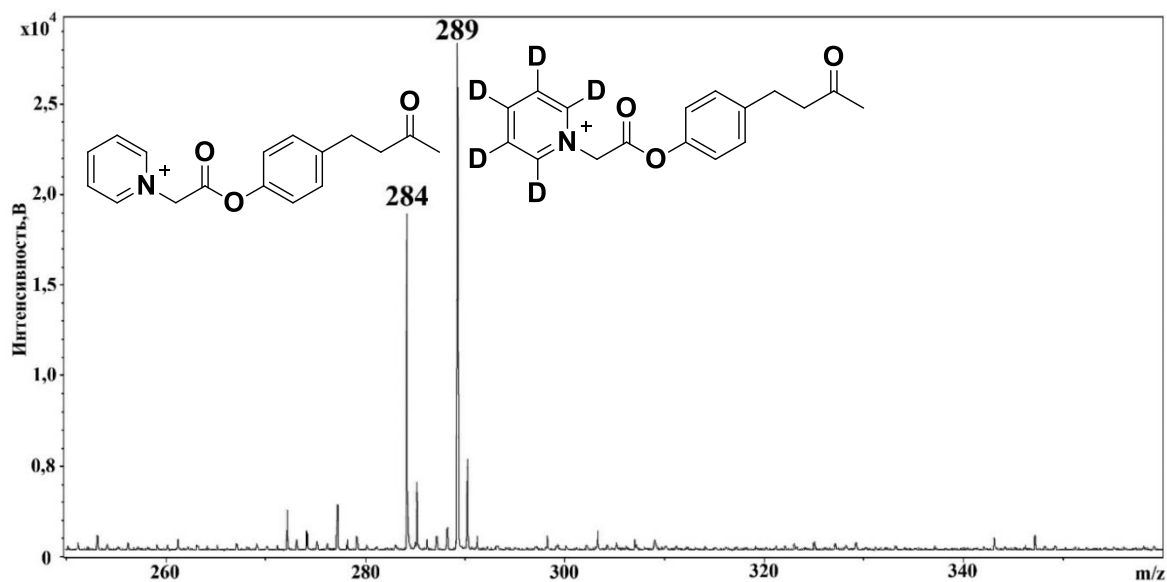
### **3.1.4 Хлор-замещенные фенолы**

Описанный способ дериватизации был так же опробован для детектирования серии фенолов, отличающихся числом и положением атомов хлора в бензольном кольце (2-хлорфенол, 2,4-дихлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, 2,3,4,6-тетрахлорфенолы) и относящихся к списку приоритетных экотоксикантов. Масс-спектры МАЛДИ и ПАЛДИ исходных соединений не содержали соответствующих им пиков ионов. В это же время, масс-спектры продуктов дериватизации содержат интенсивные пики ионов катионных частей полученных солей с высоким соотношением сигнал/шум. Как и ожидалось, соотношение интенсивностей изотопных пиков позволило однозначно определить количество атомов хлора в каждом случае. Вместе с тем определить относительное положение атомов в ароматическом кольце не удается.

Как в случае стеринов, хлорзамещенные фенолы обычно присутствуют в изучаемых объектах в крайне низких количествах, поэтому нами были определены их предел обнаружения с помощью описанного способа последовательного разбавления. Полученные величины ( $1 \times 10^{-3}$  -  $5 \times 10^{-4}$  мг/мл) оказались существенно выше, чем для стеринов. Поскольку данные ГХ/МС для реакций с небольшим присутствием (для предотвращения образования солей) азотистых оснований говорят о полном прохождении ацилирования, причиной этого явления является, видимо, худшая сокристаллизация таких производных с матрицей.

Предложенный подход был опробован для количественного определения 4-(4-гидроксифенил)-бутан-2-она (т.н. «кетон малины») в биологически-активной добавке

Raspberry Ketone (Yusbio, Китай), предоставленной ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Для этого была проведена предварительная экстракция, после чего раствор исследуемого соединения ацилировали бромацетилхлоридом в присутствии пиридина, добавляли раствор стандарта и регистрировали масс-спектр МАЛДИ (матрица АТ). Расчет количества вещества в образце проводился путем сравнения интенсивностей пика катиона производного ( $m/z$  284) и его дейтероаналога ( $m/z$  289) с заранее известной концентрацией (Рис. 3). Сравнение полученных результатов с данными анализа ГХ/МС (получены по валидированной методике в ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии») показало их практическое совпадение:  $102 \pm 5$  мг/г и  $107 \pm 3$  мг/г, соответственно. При этом необходимое время на проведение анализа методом МАЛДИ было в несколько раз меньше, чем в случае ГХ/МС.



**Рис. 3.** Масс-спектры МАЛДИ (матрица АТ) продуктов дериватизации 4-(4-гидроксифенил)-бутан-2-она бромацетилхлоридом в присутствии пиридина и дейтеропиридина.

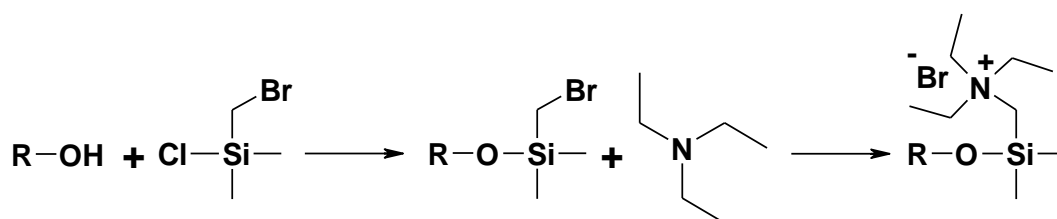
### 3.2 Силилирование с генерацией фиксированного заряда для анализа спиртов методом масс-спектрометрии МАЛДИ и ПАЛДИ

Как уже отмечалось, наряду с ацилированием еще одним подходящим методом для дериватизации гидроксильной группы является силилирование. Силилирование – более универсальный дериватизационный подход, чем ацилирование, поэтому мы изучили возможность его применения для увеличения эффективности десорбции/ионизации спиртов.

Для дериватизации гидроксильной группы спиртов мы предлагаем использовать их силилирование бромметилхлордиметилсиланом. Такой подход с одной стороны

требует тщательности пробоподготовки в виду сравнительно большей способности силилхлоридов к гидролизу, а с другой - обеспечивает высокую скорость реакции и степень превращения за счет повышенной реакционной способности этих соединений. Как и в случае ацилирования, для достижения максимальной степени превращения в реакционную смесь можно добавлять основание, улавливающее выделяющуюся соляную кислоту. При использовании в качестве таких соединений азотистых оснований с третичным атомом азота, например, триэтиламина и пиридина, могут быть получены соответствующие соли (Схема 2, на примере триэтиламина).

Схема 2



Поскольку при изучении возможности применения ацилирования было обнаружена зависимость ионообразования от используемого кватернизирующего агента, при разработке методов на основе силилирования были рассмотрены все ранее использованные кватернизирующие агенты.

### 3.2.1 Алифатические спирты

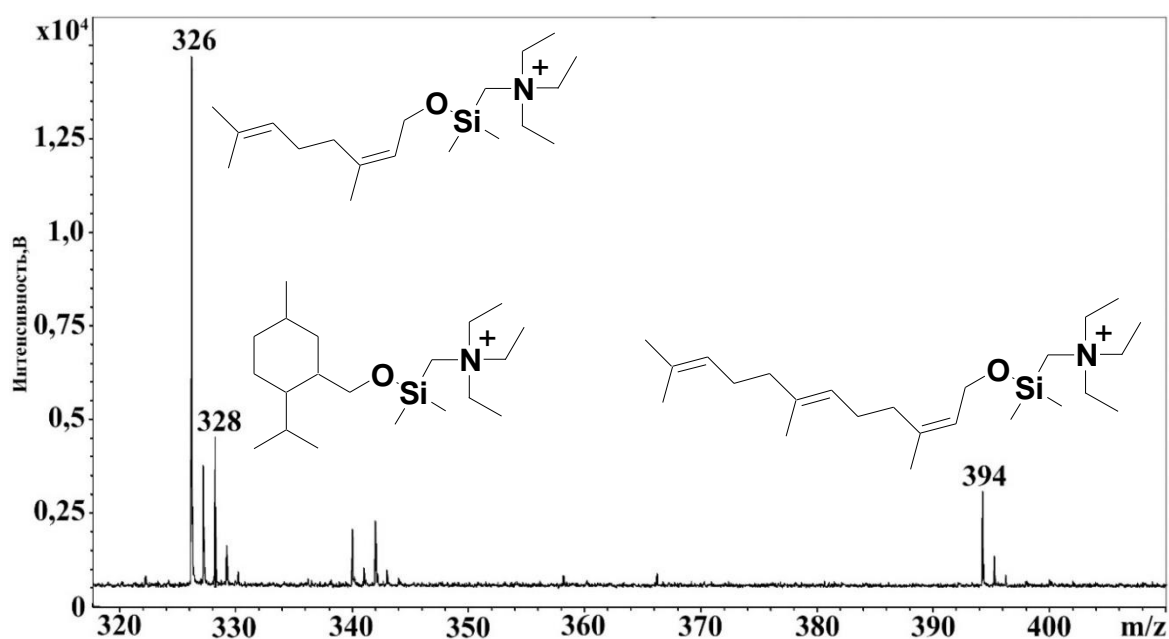
В качестве модельных соединений для проверки работоспособности предлагаемой методики были использованы n-алканолаы - n-гептанол, n-нонанол и n-ундеканол. Полноту протекания силилирования оценивали с помощью изучения состава реакционных смесей, полученных с добавкой небольшого (для предотвращения кватернизации) количества азотистого основания, методом ГХ/МС. Анализ результатов показал, что превращения проходят не количественно: целевые соединения в большинстве случаев являлись не основным компонентом, а в смесях в значительных количествах присутствовали исходные спирты и продукты гидролиза дериватирующего агента – тетраметилди(бромметил) - и тетраметил(бромметил) (хлорметил)дисилоксаны. Возможным объяснением этого факта являлся гидролиз компонентов реакционной смеси в результате их взаимодействия с влагой воздуха. Для проверки этого предположения реакция была проведена в токе аргона. Результаты изучения состава смеси методом ГХ/МС подтвердил, что выход продукта

дериватизации существенно вырос, а исходные спирты практически не детектируются. Вместе с тем продукты гидролиза дериватирующего агента по-прежнему присутствовали. Для регистрации масс-спектров МАЛДИ реакция была проведена с бóльшим количеством азотистого основания.

Масс-спектры МАЛДИ продуктов дериватизации, зарегистрированные с использованием органических кислот (IAA, DHB, НАВА) не содержали пиков продуктов дериватизации. Причиной этого может быть ранее обнаруженный нами матричный эффект, заключающийся в миграции силильных групп с полученных производных на молекулы матричных соединений. В случае же АТ зарегистрированные масс-спектры МАЛДИ содержали интенсивные пики ионов, соответствующие катионным частям полученных солей.

### 3.2.2 Ненасыщенные спирты

Для проверки возможности использования предлагаемого метода для детектирования циклических и непредельных спиртов, а также изучения возможности присоединения побочных продуктов дериватизации по двойным связям, он был опробован на смеси терпенолов: нерола (цис-гераниол), фарнезола и ментола. Как и в случае алифатических спиртов, полученные с использованием АТ масс-спектры МАЛДИ производных, содержали интенсивные пики катионных частей этих молекул (Рис. 4), продуктов присоединения по двойной связи не отмечено.



**Рис. 4.** Масс-спектр МАЛДИ (матрица АТ) четвертичных солей на основе триэтиламина, синтезированных из смеси терпенолов.



### 3.2.3 Алициклические спирты (стерины)

Дальнейшее изучение потенциала применения описываемого подхода проводили на примере стероидных спиртов различного строения (холестерин, ланостерин, дигидроланостерин, стигмастерин, эргостерин, андростерон, бетулин). В масс-спектрах МАЛДИ продуктов дериватизации этих соединений также присутствовали пики ионов, соответствующие положительно заряженным фрагментам полученных производных. Аналогичные результаты достигаются и при регистрации масс-спектров с использованием наноструктурированных мишеней, хотя в этом случае для регистрации масс-спектра требуется большая по сравнению с МАЛДИ энергия лазера.

Как и в случае ацилирования, преимуществом предлагаемого подхода является возможность самостоятельного получения изотопномеченных стандартов для проведения количественного анализа с помощью метода изотопного разбавления. Такой синтез может быть проведен заменой кватернизирующегося агента на его изотополог, например, дейтероаналог. Полученные таким образом производные также обладают высокой эффективностью десорбции/ионизации и отличаются по массовому числу иона на 5 Да.

Для сравнения обеспечиваемой предлагаемым способом дериватизации чувствительности, для набора исследуемых стероидных спиртов были определены пределы обнаружения с использованием способа, описанного в разделе 3.1.3. Полученные величины были близки к величинам, полученным для продуктов ацилирования/кватернизации.

Попытки применить дериватизационный подход на основе силилирования для анализа фенолов оказались безрезультатными, что, предположительно, объясняется менее эффективной сокристаллизацией получаемых производных с матрицей.

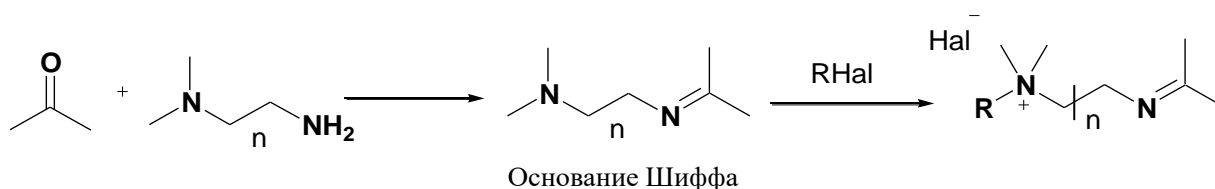
### 4. Дериватизация соединений с карбонильной группой.

Карбонильные соединения-один из основных классов органических веществ, присутствующих в окружающей среде. В отличие от спиртов, такие соединения с большей вероятностью участвуют в процессах ионообразования в условиях «мягких» масс-спектрометрических методов, а образующиеся при этом ионы обычно не подвергаются фрагментации. Тем не менее, пределы обнаружения карбонильных соединений с использованием этих методов масс-спектрометрии достаточно велики, поэтому и в этом случае широко применяются дериватизационные подходы. Мы

рассмотрели возможность разработки нового способа дериватизации карбонильных соединений, который позволял бы проводить модификацию соединений без выделения промежуточных продуктов и осуществлять синтез изотопологов производных.

Для этого нами были выбраны несимметричные  $\alpha,\omega$ -N,N-диметиламиноалкиламины: 2-диметиламиноэтиламин (DMAEA), 3-диметиламинопропиламин (DMAPA) и 4-диметиламинобутиламин (DMABA). Предлагаемые реагенты содержат два реакционноспособных центра - первичные и третичные аминогруппы. Первый обеспечивает конденсацию с карбонильной группой с образованием основания Шиффа, а второй способен подвергаться кватернизации в присутствии алкилгалогенидов (метилюдид, этилиодид) с образованием солеподобных соединений (Схема 3).

Схема 3



#### 4.1 Алифатические карбонильные соединения

Первичные эксперименты по изучению возможности применения предлагаемой методики были проведены с использованием алифатических альдегидов (алидегиды нормального строения с числом атомов углерода от 5 до 10, изогексаналь, 2-этилгексаналь) и кетона (4-гептанон). Зарегистрированные с использованием всех опробованных в работе матричных соединений масс-спектры МАЛДИ и ПАЛДИ исходных соединений не содержали пиков ионов аналитов.

Для контроля полноты превращений альдегидов мы опирались на данные ГХ/МС, которые показали, что использование традиционных для дериватизационных методов 2-3 кратных избытков дериватизирующих агентов не позволяет добиться полного превращения карбонильных соединений в имины. Причиной этого, очевидно, является обратимость реакции образования оснований Шиффа в случае алифатических и алицилических кетонов. Простейшим путем сдвига равновесия этого процесса в сторону образования производных является выведение из реакционной среды воды, образующейся при конденсации. Однако внесение в реакционную среду водоотнимающих средств (например, молекулярных сит и

сульфата магния) или использование кипячения в несмешивающихся с водой растворителях противоречило предполагаемой концепции дериватизации, так как затрудняло дальнейшее использование реакционной смеси без дополнительных процедур пробоподготовки. Поэтому мы приняли решения увеличить избыток реагента до 8 кратного.

Масс-спектры МАЛДИ и НАЛДИ полученных таким образом производных содержали интенсивные пики целевых производных. При этом в случае альдегидов нормального строения в них так же присутствовали пики ионов, которые, видимо, относились к продуктам дериватизации соединений, образующихся в результате альдольно-кетоновой конденсации. Известно, что альдегиды могут даже в мягких условиях участвовать в этом процессе с образованием димеров, поэтому их появление вполне объяснимо. Образование продукта конденсации возможно только в присутствии  $\text{CH}_2$ -группы в  $\alpha$ -положении относительно карбонильной группы. В случае 2-этилгексаналя образование побочного продукта обнаружено не было. Интересно, однако, что продукт конденсации не наблюдался и в случае изогексаналя, который содержит  $\text{CH}_3$ -группу в четвертом положении. Кроме того, димерные побочные продукты не были обнаружены в масс-спектрах МАЛДИ 4-гептанона, что, видимо, является следствием большей затрудненности протекания этих процессов в случае кетонов.

Сравнение абсолютных интенсивностей и соотношения сигнал/шум пиков ионов производных с различной длиной алкильной цепи в дериватирующем агенте показало, что наилучшие результаты достигаются при использовании DMAEA. При этом зависимости выхода ионов от кватернизирующего агента выявлено не было.

## **4.2 Алициклические кетоны**

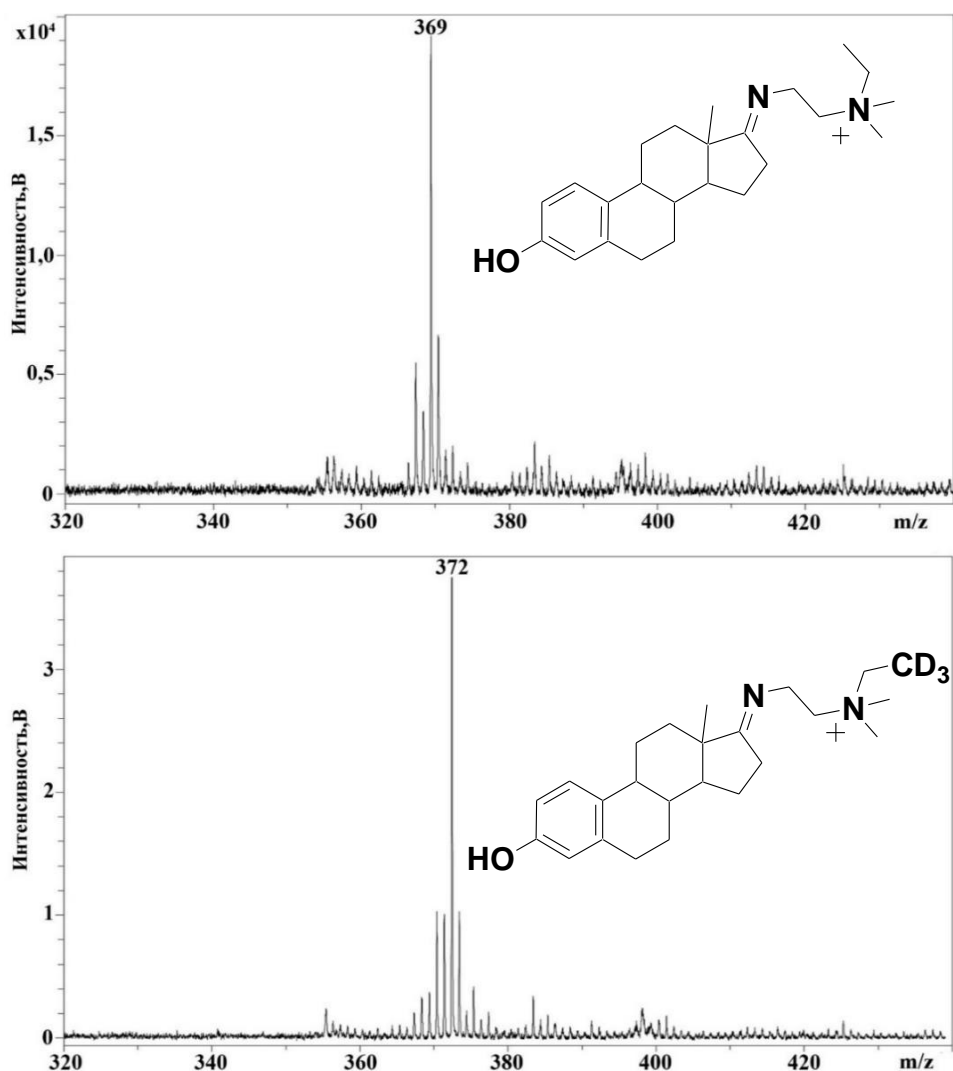
Возможность использования предлагаемого способа дериватизации для анализа алициклических кетонов была изучена на примере широко применяемых в органическом синтезе циклогексанона и адамантанона, а также распространенной в природе камфоре.

Обнаружено, что все агенты (DMAEA, DMAPA и DMAVA) легко реагируют с алициклическими кетонами. Дальнейшее взаимодействие полученных иминов с алкилгалогенидами приводит к образованию четвертичных аммониевых солей, в масс-спектрах МАЛДИ и ПАЛДИ которых имеются пики, соответствующие катионным частям молекул аналита. Использование дейтеромеченного иодистого

метила позволило получить изотопномеченные производные, пригодные для использования в количественном анализе методом изотопного разбавления.

Объектами наших дальнейших исследований были стероидные кетоны, которые обладают высокой биологической активностью, широко используются в фармацевтике, участвуют в регуляции обмена веществ и определенных физиологических функций организма: тестостерон, эстрон, бетаметазон, кортикостерон, прогестерон, андростерон, норэтистерон,  $5\alpha$ -андростен- $17\beta$ -ол-3-он.

Как и в предыдущем случае, полученные в результате кватернизации иминов аммонийные соли обеспечивали эффективную десорбцию/ионизацию соответствующих катионов в условиях МАЛДИ и ПАЛДИ. В результате использования дейтериодистого метила были так же получены изотопологи производных (Рис. 5).



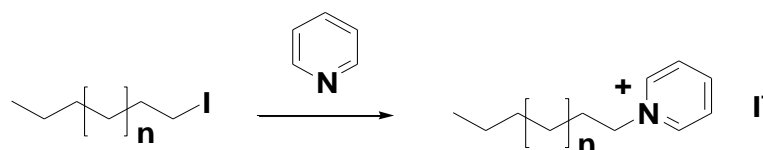
**Рис. 5.** Масс-спектры МАЛДИ эстрона, дериватизированные 2-диметиламиноэтиламином + C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>I (**а**) и + CD<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>I (**б**) (матрица IAA).

Незначительность концентраций кетостероидов в природных матрицах предопределила необходимость установления пределов их обнаружения с использованием предлагаемого метода. Полученные величины варьировались в пределах от  $1 \times 10^{-4}$  до  $5 \times 10^{-5}$  мг/мл.

### 5. Дериватизация полиэтилендиодидов

Олигомеры полиэтилена с терминальным атомом иода широко используются для получения различных блок- и графт-сополимеров, включая компатибилизаторы, обеспечивающие совместимость индивидуального полиэтилена и различных типов полярных полимеров в процессе получения композиционных материалов. Молекулярно-массовое распределение (ММР) таких соединений предопределяет их свойства, что приводит к необходимости создания экспрессных методов его определения. Наиболее подходящий для этого метод масс-спектрометрии МАЛДИ не позволяет ионизировать такие соединения, поскольку в них отсутствуют центры присоединения протона или катиона. Поэтому мы изучили возможность использования методов химической модификации таких соединений для получения производных, обеспечивающих регистрацию масс-спектров МАЛДИ. Поскольку алкильная цепь этих соединений мало реакционноспособна, мы опирались на взаимодействие концевых иод-алкенильных групп с основными соединениями (опробованы трифенилфосфин, пиридин, хинолин, триэтиламин и N,N-диметилдодецилаламин) с образованием соответствующих солей (Схема 4, на примере пиридина).

Схема 4



Масс-спектры МАЛДИ исходных полиэтилендиодидов зарегистрированные с использованием всех примененных в работе матричных соединений не содержали пиков ионов ионизированных олигомеров. Однако проведение дериватизации, путем смешивания растворов дериватирующих реагентов и полиэтилендиодидов изменило ситуацию. Независимо от используемой матрицы полученные соли обеспечивали эффективную десорбцию соответствующих катионов при лазерном облучении. Их масс-спектры МАЛДИ имели хорошо разрешенные пики ионов с разностью масс 28

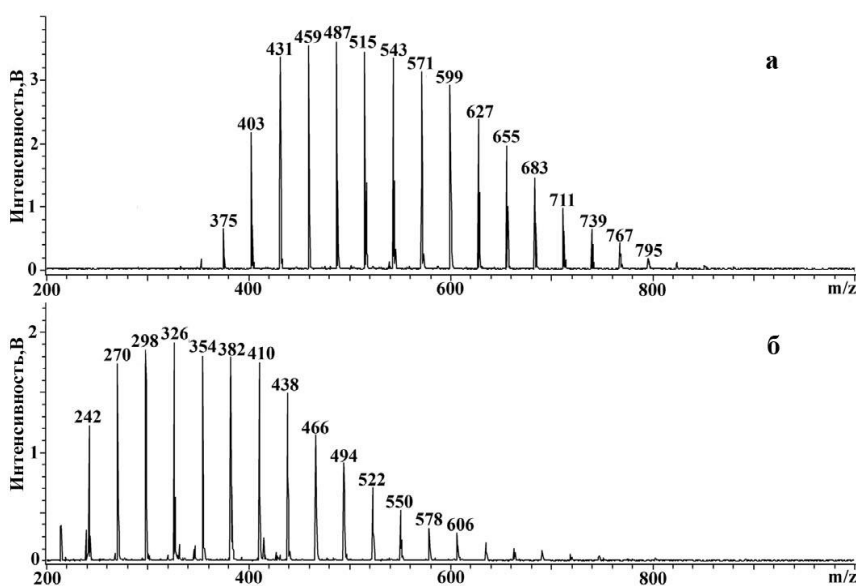
(молекулярная масса мономера этилена), соответствующие катионным частям олигомерных солей (Рис 6).

Предполагая, что эффективность десорбции/ионизации таких родственных катионов в относительно узком диапазоне масс практически одинакова мы рассчитали их ММР с помощью следующих выражений:

$$M_N = \sum M_i N_i / \sum N_i \quad [1]$$

$$M_w = \sum (M_i)^2 N_i / \sum M_i N_i \quad [2]$$

$$\text{ПД} = M_w / M_N \quad [3]$$



**Рис. 6.** Масс-спектры МАЛДИ (матрица ДНВ) полиэтиленйодидов, модифицированных: **(а)** трифенилфосфином, **(б)** триэтиламиноном.

В этом случае интенсивность соответствующего пика олигомера была принята за значение  $N_i$  и его массового числа  $M_i$  (с корректировкой на замену атома иода дериватирующим агентом).

При переходе к анализу более высокомолекулярных аналитов было обнаружено, что использование примененных на первом этапе дериватирующих агентов позволяет детектировать только сравнительно низкомолекулярные (до 1.5 кДа) олигомеры. Причиной этого стала необходимость большего нагрева реакционной смеси для растворения высокомолекулярных компонентов: гетерофазно реакция практически не идет. Использование сравнительно высоких температур приводило к процессам термического разрушения получаемых производных. Для решения этой проблемы был задействован более основный дериватирующий агент - 4-(N,N-

диметиламино)пиридин. Его применение позволило зарегистрировать масс-спектры МАЛДИ более высокомолекулярных олигомеров. Вместе с тем, эффективность десорбции/ионизации получаемых высокомолекулярных производных (2-5 кДа) оказалась ниже таковой их низкомолекулярных аналогов (до 1.5 кДа), поэтому для достижения приемлемых соотношений сигнал/шум масс-спектр регистрировался в линейном режиме. Этот факт, впрочем, не повлиял на возможность расчета молекулярно-массовых характеристик олигомеров, которые были определены для широкого набора исследуемых полиэтилендиодов.

### Выводы

1. Разработаны новые способы дериватизации гидроксил- и карбонил-содержащих соединений, а так же иод-замещенных полиэтиленов для их анализа методом масс-спектрометрии МАЛДИ и ПАЛДИ. Предложенные методы основаны на введении или генерации в молекуле фиксированного заряда и позволяют получать солеподобные производные, обладающие высокой эффективностью десорбции/ионизации в условиях масс-спектрометрии МА(ПА)ЛДИ. Регистрируемые при этом пики катионных частей продуктов дериватизации дают возможность однозначно определять молекулярную массу аналитов.
2. Методики опробованы на широком круге модельных соединений и реальных объектах, включая алифатические, непредельные и алициклических спирты, фенолы, алифатические и алициклические кетоны, полиэтилендиоды. В результате определены оптимальные дериватирующие агенты, условия проведения реакций дериватизации и способы пробоподготовки.
3. Установлено, что использование легко доступных дейтероаналогов кватернизирующих агентов позволяет получать изотопологи производных аналитов, которые необходимы для проведения количественного анализа методом изотопного разбавления.
4. Показано, что масс-спектры МАЛДИ продуктов дериватизации полиэтилендиодов позволяют определять их молекулярно-массовые характеристики.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

1. R. S. Borisov, N. Y. Polovkov, D. I. Zhilyaev et al. Determination of the molecular mass characteristics of polyethylene oligomers with terminal iodine atoms by MALDI mass spectrometry after derivatization // *Journal of Analytical Chemistry*, 2013, Vol. 68, P. 1227-1228.
2. V. G. Zakin, R. S. Borisov, N. Y. Polovkov et al. Characterization of low-molecular weight iodine-terminated polyethylenes by gas chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with the use of derivatization // *European Journal of Mass Spectrometry*, 2013, Vol. 19, P. 163-173.
3. R. S. Borisov, D. I. Zhilyaev, N. Y. Polovkov, V. G. Zaikin. Simple approach to derivatization of alcohols and phenols for the analysis by matrix(surface)-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2014, Vol. 28, no. 21, P. 2231-2236.
4. Д. И. Жилияев, Н. Ю. Половков. Дериватизация хлорфенолов для последующего анализа методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Тезисы докладов XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», Москва, Россия, 7-11 апреля 2014.
5. Д.И. Жилияев, А.А. Виноградов, Н.Ю. Половков, Р.С. Борисов. Химическая модификация олигомерных полиэтиленов с концевым атомом йода для анализа с помощью масс-спектрометрии МАЛДИ // Тезисы докладов III Всероссийской научной конференции с международным участием «Успехи синтеза и комплексообразования», посвященной 55-летию РУДН, Москва, Россия, 21-25 апреля 2014.
6. R. S. Borisov, N. Y. Polovkov, D. I. Zhilyaev, V. G. Zaikin. A simple and easy approach to the derivatization of alcohols for study by soft ionization mass spectrometry methods // *Journal of Analytical Chemistry*, 2015, Vol. 70, P. 1542–1545.
7. Д.И. Жилияев, Н.Ю. Половков, Р.С. Борисов, В.Г. Заикин. Количественный анализ смесей стеринов методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», Москва, Россия, 12-17 октября 2015.
8. D.I. Zhilyaev, R.S. Borisov, N.Y. Polovkov, V.G. Zaikin. N,N-dimethylaminoalkylamines as possible derivatization agents for the analysis of small carbonyl compounds by low energy mass spectrometry // *European Journal of Mass Spectrometry*, 2016, Vol. 22, no. 3, P. 151-158.



9. Д.И. Жилиев. Дериватизация спиртов растительного происхождения для последующего анализа методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Тезисы докладов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», Москва, Россия, 11-15 апреля 2016.
10. Н.Ю. Половков, Д.И. Жилиев, В.В. Ильюшенкова, Р.С. Борисов, В.Г. Заикин. Производные с фиксированным зарядом в масс-спектрометрии МАЛДИ; анализ спиртов и фенолов // Тезисы докладов XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии, Екатеринбург, Россия, 26-30 сентября 2016.
11. В.В. Ильюшенкова, В.Г. Заикин, Н.Ю. Половков, Д.И. Жилиев. Дериватизация спиртов и фенолов с введением фиксированного заряда для масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением // Тезисы докладов WSOC. Марковниковских чтениях. Органическая химия: от Марковникова до наших дней, Красновидово, Россия, 13-18 января 2017.
12. Д.И. Жилиев, Р.С. Борисов. Дериватизация карбонильных соединений с введением фиксированного заряда для последующего анализа методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Тезисы докладов Всероссийской школы-конференции с международным участием БШКХ-2017, Иркутск, Россия, 15-20 мая 2017.
13. D. I. Zhilyaev, R. S. Borisov. Fixed-charge derivatization of carbonyl compounds for their analysis by MALDI mass spectrometry // Тезисы докладов 6-ой Всемирной конференции по физико-химическим методам обнаружения и разработке лекарств, Загреб, Хорватия, 3-7 сентября 2017.
14. Д.И. Жилиев, Н.Ю. Половков, Р.С. Борисов. Дериватизация карбонильных соединений с введением фиксированного заряда для последующего анализа методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Тезисы докладов VIII съезде ВМСО "Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы", Москва, Россия, 9-13 октября 2017.
15. Д.И. Жилиев, В.В. Ильюшенкова, М.Д. Матвнеева, С.В. Горяинов. Дериватизация кетостероидов с введением фиксированного заряда для последующего анализа методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Тезисы докладов II Всероссийской конференции "Байкальская школа-конференция по химии", Иркутск, Россия, 24-28 сентября 2018.
16. Д.И. Жилиев, Л.Г. Воскресенский, Н.Ю. Половков, Р.С. Борисов. Силилирование с генерацией фиксированного заряда для анализа спиртов методом масс-спектрометрии МАЛДИ и ПАЛДИ // Масс-спектрометрия, 2018, Т. 15, № 1, С. 22-25.

Жиляев Дмитрий Игоревич (Россия)

**Производные с фиксированным зарядом в масс-спектрометрии МАЛДИ соединений с низкой эффективностью ионизации**

Разработаны новые способы дериватизации гидроксил- и карбонил-содержащих соединений, а так же иод-замещенных полиэтиленов для их анализа методом масс-спектрометрии МАЛДИ и ПАЛДИ. Предложенные методы основаны на введении в молекулу фиксированного заряда и приводя к получению солеподобных производных, обладающих высокой эффективностью десорбции/ионизации в условиях масс-спектрометрии МА(ПА)ЛДИ. Регистрируемые при этом пики катионных частей продуктов дериватизации дают возможность однозначно определять молекулярную массу аналитов. Показано, что использование легко доступных дейтероаналогов кватернизирующих агентов позволяет получать изотопологи производных аналитов, которые необходимы для проведения количественного анализа методом изотопного разбавления.

Zhilyaev Dmitry Igorevich (Russia)

**Fixed charge derivatization of compounds with low ionization efficiency by MALDI mass spectrometry**

New fixed-charge derivatization approaches for analysis of hydroxyl- and carbonyl-containing compounds, as well as iodine-terminated polyethylenes by MALDI and SALDI mass spectrometry have been developed. The proposed methods produce salts, which cationic part readily desorbs under MA(SA)LDI mass spectrometry conditions. Mass numbers of detected ions can be used for determination of analytes' molecular weight. Substitution of quaternization agents by their readily available deuterioanalogs allows preparation of isotopically labeled derivatives of analytes, which are necessary for isotopic dilution quantitative analysis.