

На правах рукописи



Краснова Татьяна Александровна

**Масс-спектрометрия с матрично(поверхностью)-
активированной лазерной десорбцией/ионизацией при
идентификации и определении олигомеров полисульфоновых,
поликарбонновых кислот и антибиотиков**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Саратов – 2013

Работа выполнена на кафедре химии
Владимирского государственного университета
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Амелин Василий Григорьевич

Официальные оппоненты:

Штыков Сергей Николаевич

доктор химических наук, профессор
Саратовского государственного университета
им. Н.Г. Чернышевского, профессор кафедры
аналитической химии и химической экологии

Гречников Александр Анатольевич

кандидат химических наук, зав. лабораторией
инструментальных методов анализа и
органических реагентов Института геохимии и
аналитической химии имени В.И. Вернадского
Российской академии наук (ГЕОХИ РАН)

Ведущая организация:

Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова

Защита диссертации состоится 19 декабря 2013 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.07 на базе Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, СГУ, Институт химии, I корпус.

С диссертацией можно ознакомиться в ЗНБ имени В. А. Артисевич Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского.

Автореферат разослан 19 ноября 2013 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук



Русанова Т. Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Исследование сложных органических соединений различной молекулярной массы всегда является важной задачей аналитической химии. Установление и подтверждение структуры веществ, идентификация и количественный анализ особенно актуальны для биологически активных веществ (антибиотики, лекарственные препараты, витамины), полимеров природного происхождения (пептиды, олигосахариды, белки), а также синтетических полимеров. Уникальным инструментом в таких исследованиях является масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ ионизацией (МС МАЛДИ). В настоящее время метод МС МАЛДИ используют в основном для исследования различных высокомолекулярных соединений с целью установления их структуры. Использование МС МАЛДИ для исследования органических соединений с относительной молекулярной массой менее 2000 Да затруднено наличием в масс-спектрах в данной области пиков ионов матрицы, перекрывающих пики ионов аналитов. Данная проблема в некоторой степени решена использованием неорганических матриц, наносимых на подложки (пористый кремний, углеродные подложки, металлические покрытия и наноструктуры, углеродные наноструктурные покрытия) – метод масс-спектрометрии с поверхностью активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МС ПАЛДИ).

Количественный анализ органических веществ затруднен некоторыми особенностями МС МАЛДИ/ПАЛДИ, такими как низкая воспроизводимость сигнала в рамках одной пробы и от пробы к пробе, снижение интенсивности сигнала из-за неравномерного распределения аналита в сокристаллизованной пробе. Чаще всего для количественного анализа методом МС МАЛДИ/ПАЛДИ применяют целый комплекс мероприятий, связанных с введением сложных многокомпонентных матриц, раздельным нанесением на подложку аналита и матрицы, введением внутренних стандартов и пр. Также возможно совмещение МС МАЛДИ и тонкослойной хроматографии (ТСХ) для проведения количественного анализа соединений с низкой относительной молекулярной массой. Совмещение нескольких методов приводит к усложнению пробоподготовки, большому расходу дорогостоящих реагентов, а также увеличению продолжительности анализа. Недостаточно изучено также влияние природы анализируемого образца (неорганическая, органическая) на определение в них органических веществ методом МС МАЛДИ.

В связи с этим, поиск приемов нанесения на подложку аналитов, подбор условий, вспомогательных компонентов, выбор матриц, изучение влияния основы анализируемых объектов на сигнал МС МАЛДИ/ПАЛДИ при исследовании органических веществ с относительной молекулярной массой до 2000 Да являются актуальными.

Цель работы состояла в разработке подходов к идентификации и определению олигомеров полисульфоновых, поликарбоновых кислот в строительных материалах и антибиотиков в различных объектах методом масс-спектрометрии с матрично(поверхностью)-активированной лазерной десорбцией/ ионизацией.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- Установление оптимальных условий пробоподготовки, включая выбор матриц, источника катионов, системы растворителей, внутреннего стандарта, соотношения компонентов при определении полиметиленафталинсульфо кислот (ПМНСК), производных поликарбоновых кислот – поликарбоксилатных эфиров (ПКЭ) и антибиотиков различных классов.

- Получение и интерпретация масс-спектров ПМНСК, установление параметров молекулярно-массового распределения (ММР).

- Получение и интерпретация масс-спектров антибиотиков различных классов – макролидов, тетрациклинов, полипептидов, цефалоспоринов и аминогликозидов.

- Разработка методик определения параметров ММР ПМНСК, идентификация различных модификаторов строительных материалов, определение ПМНСК в строительных материалах, идентификация и определение антибиотиков в кормах, пищевых продуктах, воде и почвах.

Научная новизна. Методом МС МАЛДИ с времяпролетным масс-анализатором получены и интерпретированы масс-спектры смеси олигомеров полиметиленафталинсульфо кислот, рассчитаны основные параметры молекулярно-массового распределения.

Получены и интерпретированы масс-спектры органических модификаторов на основе ПМНСК и производных поликарбоновых кислот – поликарбоксилатных эфиров для строительных материалов на основе портландцемента. Предложена методика идентификации модификаторов портландцемента в готовом строительном материале, а также методика определения модификатора на основе полиметиленафталинсульфонатов натрия в готовых строительных материалах.

Предложены способы скрининга проб с упрощенной пробоподготовкой методами МС МАЛДИ/ПАЛДИ для идентификации антибиотиков в пищевых продуктах и почве: макролидов, аминогликозидов, полипептидов, тетрациклинов и цефалоспоринов.

Предложен способ идентификации и определения антибиотиков-макролидов (наразина, монензина, тилмикозина и авиламицина) в кормах, продуктах питания и воде методом МС МАЛДИ/ПАЛДИ.

Практическая значимость работы. Разработана методика идентификации и определения полиметиленафталинсульфонатов натрия в готовых строительных материалах и изделиях. Показана прямая зависимость основных потребительских свойств модификатора от молекулярно-массового распределения олигомерной смеси ПМНСК, определены оптимальные показатели содержания различных фракций в смеси для контроля производственного процесса.

Предложена методика идентификации органических модификаторов на основе ПМНС и ПКЭ в готовых строительных материалах.

Предложены методики идентификации и определения антибиотиков в пищевых продуктах, кормах, воде и почве с использованием двух вариантов метода масс-спектрометрии – МАЛДИ и ПАЛДИ.

На защиту выносятся:

- Интерпретация масс-спектров ПМНСК и предполагаемых ионов, полученных в режиме регистрации отрицательных и положительных ионов. Интерпретация масс-

спектров водно-ацетонитрильных вытяжек из строительных материалов и результаты идентификации различных модификаторов.

- Методика определения основных параметров молекулярно-массового распределения смеси полиметиленафталинсульфоновых кислот. Методика идентификации и определения модификатора в готовом строительном материале на основе портландцемента.

- Интерпретация масс-спектров МАЛДИ/ПАЛДИ антибиотиков различных классов: макролидов, аминогликозидов, полипептидов, тетрациклинов и цефалоспоринов. Интерпретация масс-спектров ацетонитрильных вытяжек кормов и продуктов питания и результаты идентификации антибиотиков. Методики идентификации и определения антибиотиков в различных объектах.

Личный вклад автора заключался в проведении экспериментальных исследований по получению и интерпретации масс-спектров различных веществ методами МС МАЛДИ/ПАЛДИ; разработке методик идентификации и определения модификатора строительных материалов на основе портландцемента; разработке методик идентификации и определения антибиотиков в различных объектах; математической обработке данных; интерпретации результатов эксперимента, формулировании научных положений и выводов.

Апробация работы. Основные результаты доложены на Международных конференциях студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов – 2012», «Ломоносов – 2013» (Москва, МГУ), «VI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев – 2012» (Санкт-Петербург, 2012), «Всероссийской конференции "Современные проблемы химической науки и образования" (Чебоксары, 2012), «Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты химической науки, товарной экспертизы и образования» (Чебоксары, 2013), Второй Всероссийской молодежной научной интернет-конференции «Грани науки» (Казань, 2013), «2-ой Всероссийской научной конференции «Методы исследования состава и структуры функциональных материалов» (Новосибирск, 2013), международном аспирантском форуме «Современная наука: тенденции развития, проблемы и перспективы» (Ереван, 2013), 6 – ом международном симпозиуме «Recent Advances in Food Analysis», RAFA 2013» (Прага, 2013), «Втором съезде аналитиков России» (Москва, 2013), 14-ой международной конференции «Физико-химические и петрофизические исследования в науках о Земле» (Москва, 2013).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей в центральной печати (из рекомендуемого списка ВАК) и 11 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 147 страницах, включая введение, 5 глав, выводы, список литературы (140 источников), приложение. Работа содержит 45 рисунков и 27 таблиц.

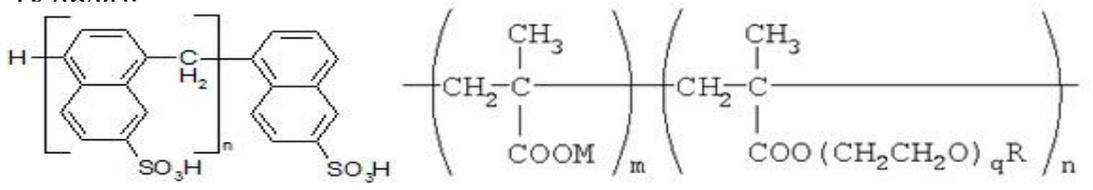
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены новизна и практическая значимость результатов исследований, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы (глава 1) кратко рассмотрена суть метода МС МАЛДИ/ПАЛДИ. Рассмотрены особенности пробоподготовки, включая выбор матрицы, растворителя для системы аналит – матрица, введение допанта и техники нанесения пробы на подложку. Систематизированы работы по качественному и количественному анализу различных веществ методами МС МАЛДИ/ПАЛДИ в различных объектах и модельных растворах. Обсуждены достоинства и недостатки масс-спектрометрии МАЛДИ/ПАЛДИ в количественном анализе.

Глава 2. Экспериментальная часть. Метод исследования: масс-спектрометрия МАЛДИ/ПАЛДИ. В работе использовали масс-спектрометр МАЛДИ с времяпролетным масс-анализатором Autoflex III smartbeam (Bruker Daltonic, Германия). Использовали режим работы с рефлектроном для положительных и отрицательных ионов в диапазоне масс 200 – 7000 Да (стандартный режим PerMix), основные параметры анализа: ультрафиолетовый азотный лазер с длиной волны 337 нм, длина импульса 3 нс, плотность мощности лазерного излучения $10^6 - 10^7$ Вт/см². Применяли автоматическое подавление сигналов массой до 400 Да – при исследовании модификаторов строительных материалов, до 600 Да – при исследовании антибиотиков-макролидов, до 200 Да – при исследовании других антибиотиков. Масс-спектры регистрировали с использованием программы FlexControl ver. 3.3. Анализ спектров проводили с использованием программы FlexAnalysis ver. 3.3 (Bruker Daltonic, Германия). При работе с масс-спектрометром использовали стандартные пластины для образцов двух видов: стальная подложка «МТР 384 ground steel TF», подложка для ПАЛДИ – «Nanosys MSP 96».

Объекты исследования: пробы промышленных образцов ПМНСК (пластификатор С-3) производства ООО «КОМПОНЕНТ» (г. Владимир, Россия), товарные формы модификаторов на основе эфиров поликарбонновых кислот производства «Sika» (Германия), «Макромер» (Россия), «НордЧем» (Россия), «РЕМА» (Россия).



антибиотики (макролиды, аминогликозиды, полипептиды, тетрациклины и цефалоспорины).

В качестве матриц использовали 4-гидрокси-3,5-диметоксикоричную (синапиновую) кислоту, α-циано-4-гидроксикоричную кислоту, 2,5-дигидроксибензойную кислоту (Bruker Daltonic), допанта – соли цезия, лития и рубидия (Panreac Química Sau, Испания).

Использовали стандартные образцы антибиотиков: наразина, монензина, эритромицина, тилозина, тилмикозина, джозамицина, ивермектина, рифампицина, спирамицина, рифабутина, авиламицина, семдурамицина, мадурамицина, салиномицина, ласалоцида, лаидломицина, хлортетрациклина, окситетрациклина, доксициклина, тетрациклина, метациклина, демеклоциклина, валиномицина, полимиксина, бацитрацина, цефтиофура, амикацина, стрептомицина, канамицина, неомицина, дигидрострептомицина, спектиномицина, абамектина, ивермектина (CRSO «Eli Lilly and Company»; «Sigma-Aldrich»; «Dr. Ehrenstorfer»). Растворы антибиотиков 1 мг/мл готовили растворением соответствующих навесок в

ацетонитриле. Рабочие растворы готовили в день использования разбавлением исходных ацетонитрилом.

Глава 3. МС МАЛДИ в исследовании полиметиленафталинсульфокислот: определение параметров ММР и влияние их на потребительские свойства строительных материалов. В данной главе показан выбор оптимальных условий определения параметров молекулярно-массового распределения ПМНСК, а также влияние соотношения олигомеров в смеси на основные технические и технологические свойства модификаторов на основе ПМНСК.

ПМНСК – полярные соединения, способные как отдавать, так и присоединять протон или ион металла. Именно поэтому масс-спектры получали как в режиме регистрации положительных (RP), так и отрицательных (RN) ионов. Определены оптимальные параметры масс-спектрометрического исследования: режим работы RP и RN PerMix при мощности лазера 55% от максимальной и напряжении рефлектрона 1569 В с подавлением масс до 400 Да, получение спектра суммированием 2000 единичных масс-спектров.

Выбраны условия пробоподготовки: использование в качестве растворителя смеси воды и ацетонитрила при объемном соотношении компонентов 1:1, применение α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в качестве матрицы и нитрата цезия в качестве допанта при соотношении компонентов 2:2:1 по объему при концентрации матрицы 20 мг/мл, аналита 0,1 мг/мл и нитрата цезия 5 мг/мл (рис. 1).

При введении в пробу нитрата цезия в спектрах регистрируются пики, соответствующие олигомерам с $n \geq 17$. В спектрах обнаружили пики ионов, соответствующих по значению m/z ионам с зарядом более 1. Для таких ионов наблюдали последовательность с изменением количества звеньев в цепи (для ионов с $n = 19 - 21$ с одним атомом цезия в составе), или встречали ионы одного олигомера во всех вариантах: с протоном, одним, двумя, тремя и более ионами цезия в составе. Вклад ионов с зарядом более +1 при расчете молекулярных масс составил не более 9%. Разница для m/z соседних пиков основных ионов олигомеров при регистрации как положительных, так и отрицательных ионов составляет 220 Да, что соответствует мономерному звену – β -сульфонафталинкислоте.

Определение параметров ММР. Для изучения молекулярно-массового распределения ПМНСК использовали среднечисловую (M_n), среднемассовую (M_w) молекулярные массы и показатель полидисперсности (ПД), который характеризует ширину ММР. Эти величины рассчитывали из масс-спектров, используя значения масс M_i и интенсивностей пиков N_i i -х олигомеров (где $i = n = 2 - 23$ – число звеньев):

$$M_n = \sum(N_i M_i) / \sum N_i, \quad M_w = \sum(N_i M_i^2) / \sum(N_i M_i), \quad \text{ПД} = M_w / M_n.$$

При интерпретации масс-спектров промышленных образцов ПМНСК установлено, что количество того или иного олигомера характеризуется присутствием нескольких видов ионов. Так один и тот же олигомер может присутствовать в форме $[M_n + H]^+$, $[M_n + Cs]^+$, $[M_n + 2Cs - H]^+$, $[M_n + 3Cs - 2H]^+$, $[M_n + 4Cs - 3H]^+$, а также в форме каких-либо многозарядных ионов. Полученный масс-спектр можно разложить на спектры последовательностей отдельных групп ионов, присоединивших протон и разное количество ионов цезия соответственно. При расчете параметров ММР в качестве интенсивности, характеризующей количество конкретного олигомера, брали сумму интенсивностей пиков всех ионов, относящихся к данному олигомеру. В таблице 1 представлены результаты определения ММР.

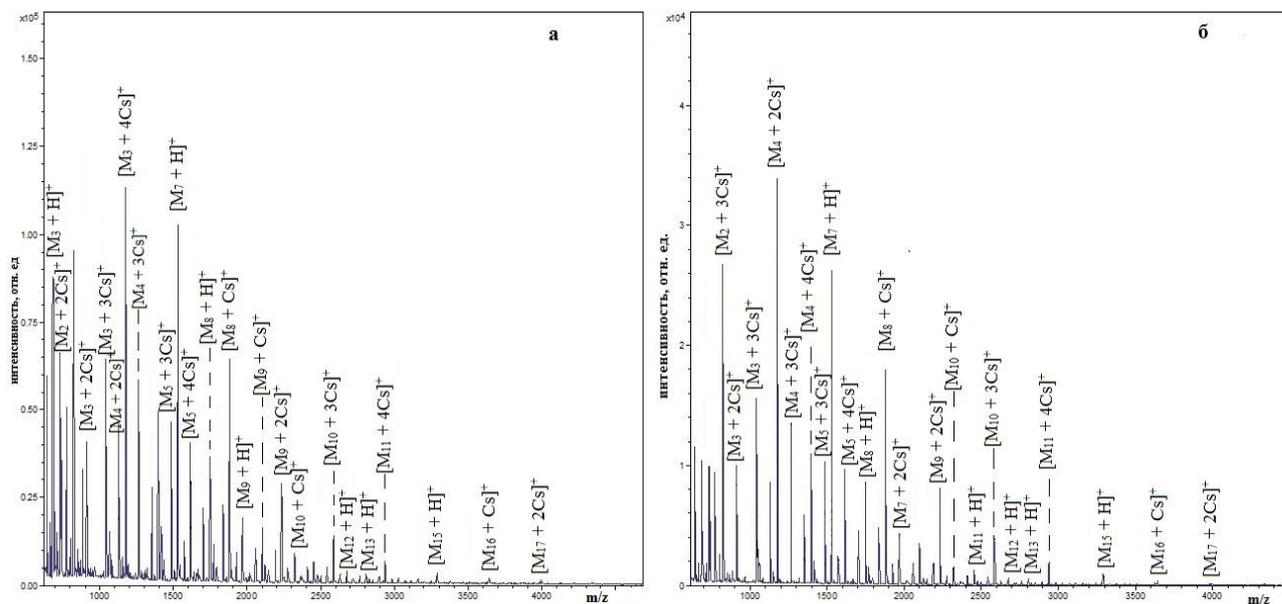


Рис. 1. Масс-спектры промышленных образцов 46 (а) и 51 (б) ПМНСК при использовании α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в качестве матрицы и соли цезия в качестве источника катионов.

Таблица 1. Значения среднечисловой и средневесовой молекулярных масс, полидисперсности, соотношение фракций, установленные по масс-спектрам промышленных образцов ПМНСК ($n = 3$, $P = 0.95$).

Шифр образца	M_n	s_r	M_w	s_r	ПД	Содержание фракций, % (МАЛДИ)		Содержание фракций, %(ТСХ)	
						$n < 5$	$n \geq 5$	$n < 5$	$n \geq 5$
33	1484.8	0.011	1721.6	0.008	1.16	18.2	81.8	20	80
46	1407.3	0.021	1787.1	0.015	1.27	26.7	73.3	---	---
51	1379.8	0.014	1868.8	0.012	1.35	34.4	65.6	35	65
59	1429.2	0.025	1798.3	0.011	1.26	28.1	71.9	25	75
60	1356.7	0.023	1782.4	0.012	1.31	31.8	68.2	---	---
62	1376.6	0.016	1802.4	0.009	1.31	32.7	67.3	---	---
63	1386.4	0.027	1813.8	0.013	1.31	32.9	67.1	30	70
64	1370.2	0.013	1783.9	0.006	1.30	36.4	63.6	---	---
65	1466.0	0.014	1891.1	0.017	1.29	28.9	71.1	30	70
66	1436.2	0.023	1847.7	0.016	1.29	32.3	67.7	---	---
68	1431.6	0.009	1801.9	0.012	1.26	31.1	68.9	---	---
85	1363.0	0.020	1699.6	0.014	1.25	34.9	66.0	---	---
87	1349.8	0.016	1708.7	0.010	1.27	38.1	61.9	---	---
89	1335.2	0.005	1687.7	0.009	1.26	36.7	63.3	---	---
91	1372.0	0.011	1729.1	0.007	1.26	35.0	65.0	---	---
94	1338.0	0.016	1680.4	0.019	1.26	37.0	63.0	---	---
96	1474.3	0.002	1787.3	0.007	1.21	23.7	76.3	---	---
98	1483.0	0.010	1960.8	0.022	1.32	24.7	75.3	---	---
2	1320.5	0.080	1612.2	0.030	1.22	33.2	66.8	---	---
3	1337.2	0.030	1659.1	0.040	1.24	35.8	64.2	---	---
4	1322.9	0.030	1644.1	0.040	1.24	36.7	63.3	---	---
5	1302.0	0.020	1611.3	0.010	1.24	34.7	65.3	---	---
6	1314.9	0.010	1635.7	0.010	1.24	36.6	63.4	---	---
7	1372.1	0.030	1689.1	0.010	1.23	33.2	66.8	35	65

Все исследованные образцы обладают достаточно широким ММР, что обуславливает наличие нескольких эффектов от применения ПМНС в качестве модификатора строительных материалов на основе портландцемента. Для образцов 51, 64, 85, 87, 89, 91, 94, 3, 4 и 6 наблюдали высокое содержание олигомеров с $n = 2 - 4$, что может привести к снижению их пластифицирующей и повышению воздухоовлекающей способности.

При оценке основных технологических свойств образцов установлено, что большая часть выпущенных партий ПМНС соответствуют нормативным документам, в частности ТУ. Образцы 87, 89, 94 и 6 не соответствуют требованиям нормативной документации, так как снижают прочность бетона в возрасте 28 суток более чем на 5%, указанные партии были утилизированы как брак. Для образцов 51, 64, 85, 91, 3 и 4, соответствующих ТУ, но обладающих более высоким содержанием легких фракций ПМНС ($n = 2 - 4$), необходимо повышение оптимальной дозировки добавки для обеспечения необходимой подвижности бетонной смеси. Кроме того, повышение воздухоовлекающей способности добавок при увеличении доли легких фракций ПМНС приводит к снижению прочности бетона. Таким образом, определяя параметры ММР можно предполагать – будет ли соответствовать выпущенная партия продукции требованиям нормативной документации, без оценки технологических свойств в бетоне.

Глава 4. МС МАЛДИ в анализе объектов неорганической природы. Идентификация и определение модификаторов в бетоне методом МС МАЛДИ. В данной главе рассмотрена возможность обнаружения и определения различных модификаторов строительных материалов в бетоне. Обнаружение и определение модификаторов в готовом строительном материале – одна из насущных проблем при установлении причин брака строительных материалов. На данный момент не существует методик идентификации органических модификаторов в строительных материалах на основе портландцемента.

Идентификация ПМНСК. Для извлечения модификаторов из готовых строительных материалов (бетон, строительный раствор) использовали водный ацетонитрил (1:1). На 20 г измельченного материала использовали 40 мл растворителя и для лучшего извлечения применяли ультразвуковую обработку в течение 30 минут. При выборе соотношения компонентов смеси матрицы и вытяжки установлено, что для системы матрица/аналит кристаллизация образца на стальной подложке идет с образованием неоднородной структуры. Поэтому к смеси добавляли растворитель при объемном соотношении компонентов матрица - анализируемый раствор - растворитель 1:1:2.

Идентификацию модификатора на основе ПМНСК проводили по наличию в спектрах пиков ионов олигомеров вида $[M_n-H]^-$. Об использовании именно пластификатора С-3 можно судить по наличию в масс-спектрах ионов нескольких олигомеров с $n = 2 - 6$. Также одним из факторов присутствия именно этого модификатора является распределение пиков ионов олигомеров, соответствующее основным параметрам ММР. В масс-спектрах вытяжек из бетонов наблюдали максимальную интенсивность для пика иона тримера $[M_3 - H]^-$, что согласуется с картиной по ММР для всех исследованных образцов ПМНСК.

На рисунке 2 представлены масс-спектры вытяжек из тяжелого бетона БСГ В25

П4F150, изготовленного с пластификатором С-3 в дозировке 0.5 и 0.6 % по сухому веществу от массы цемента. В спектрах отчетливо видно наличие пиков ионов олигомеров с числом звеньев от 2 до 5 (б), причем интенсивность пиков свидетельствует о различном количестве олигомеров в теле строительного материала.

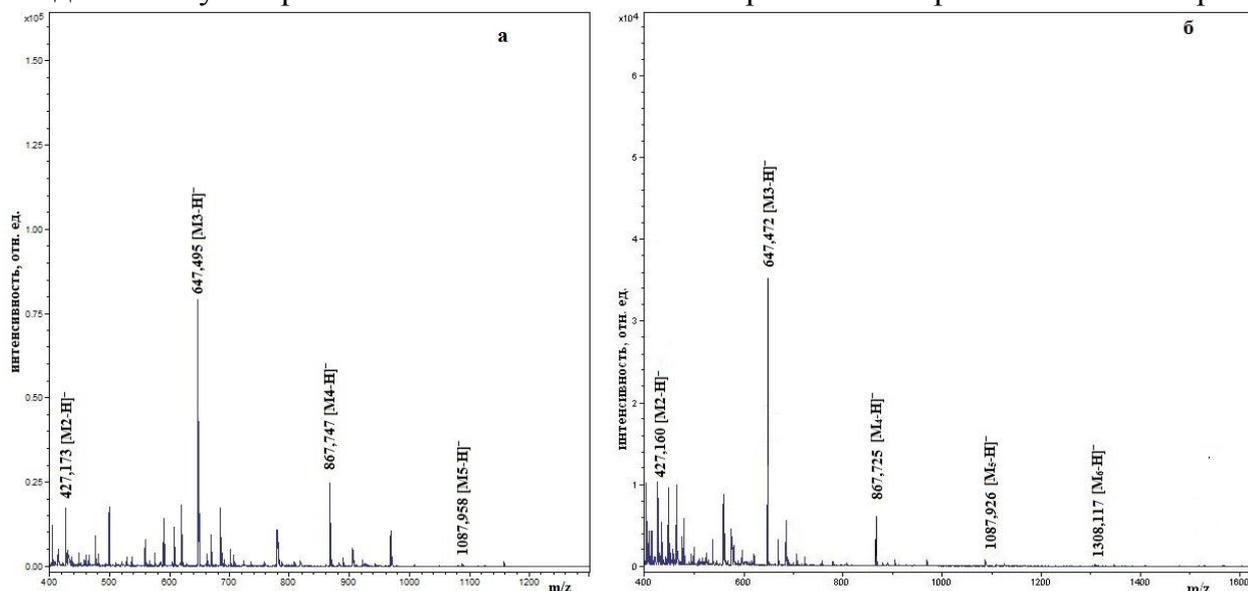


Рис. 2. Масс-спектры вытяжек из бетона БСГ В25 П4 F150 при использовании α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, начальном содержании пластификатора С-3 в бетоне 0.5 % (а) и 0.6 % (б).

Определение ПМНСК. Оценивали возможность определения ПМНСК в строительных материалах. Для этого изучили масс-спектры ПМНСК при использовании растворов с концентрациями 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 и 1 мг/мл. Установлено, что пики ионов олигомеров проявляются только при концентрации ПМНСК 0.005 мг/мл (соотношение сигнал/шум = 4) и более. Получен линейный градуировочный график в диапазоне 0.005 – 0.5 мг/мл при коэффициенте корреляции 0.933 ($y = 32241x + 7408$) и относительном стандартном отклонении не более 0.1. Но, в разные дни градуировочный график не повторялся. В связи с этим, для повышения сходимости результатов анализа использовали внутренний стандарт. В качестве внутреннего стандарта подбирали вещество с близкой молекулярной массой и структурой к аналиту для предотвращения конкурентной десорбции и ионизации. При выборе внутреннего стандарта исследовали несколько пептидов, олигосахаридов и антибиотиков с молекулярной массой в диапазоне 1300 – 2500 Да. Установлено, что оптимальным внутренним стандартом для ПМНСК является авиламицин с молекулярной массой 1404 Да.

Характеристическими массами для авиламицина при регистрации отрицательных ионов являются массы 1420, 1421 Да. Авиламицин находится в форме $[ABM + H_2O - 2H]^-$ $m/z = 1420$ и $[ABM + H_2O - H]^-$ $m/z = 1421$ Да. При построении градуировочного графика по оси ординат откладывали отношение суммы площадей пиков ионов олигомеров ($n = 2 - 7$) с массами 427, 647, 867, 1088, 1308 и 1528 Да, обнаруженных в масс-спектре, к сумме площадей пиков ионов авиламицина с массами 1420 и 1421 Да. Получена линейная зависимость для ПМНСК в диапазоне 0.01 – 1 мг/мл ($y = 14896x + 1824$) при коэффициенте корреляции 0.994 и

относительном стандартном отклонении 0.1.

Определяли модификатор на основе ПМНС в тяжелых бетонах БСГ В25 П5 W4, произведенных с применением цемента ЦЕМ I 42.5 Б производства ОАО «Мордовцемент». Результаты определения модификатора приведены в таблице 2.

Таблица 2. Определение пластификатора С-3 в тяжелом бетоне БСГ В25 П5 W4 ($n = 3, P = 0.95$).

Дата изготовления	Возраст бетона, сутки	Введено ПМНС, % (кг/м ³)	Найдено ПМНС, % (кг/м ³)	s _r
25.05.13	30	0.50 (1.75)	0.47 ± 0.07 (1.7 ± 0.3)	0.06
04.06.13	7	0.60 (2.10)	0.60 ± 0.10 (2.1 ± 0.4)	0.08
05.06.13	7	0.60 (2.10)	0.60 ± 0.10 (2.0 ± 0.4)	0.10
07.06.13	7	0.60 (2.10)	0.55 ± 0.06 (1.9 ± 0.2)	0.06
10.06.13	28	0.50 (1.75)	0.52 ± 0.08 (1.8 ± 0.3)	0.07
12.06.13	28	0.50 (1.75)	0.50 ± 0.09 (1.8 ± 0.3)	0.08

Идентификация поликарбоксилатных эфиров. Масс-спектры различных модификаторов на основе ПКЭ удалось получить при использовании α-циано-4-гидроксикоричной кислоты. Использовали растворы матрицы концентрации 20 мг/мл и ПКЭ концентрации 0.5 мг/мл. Масс-спектры получены только в режиме регистрации положительных ионов.

Масс-спектры модификаторов на основе ПКЭ отличаются набором хорошо разрешенных пиков ионов различных олигомеров в достаточно узком диапазоне масс (рис. 3). Помимо основных пиков ионов вида $[M_n + H]^+$ в масс-спектрах наблюдаются также ионы вида $[M_n + H_2O - 2H]^+$. Макромолекулы ПКЭ могут присоединять молекулы воды при образовании глобул, но такое поведение для ПКЭ наблюдается, обычно, при высоких значениях pH. Необходимо отметить, что при сравнении интенсивностей и площадей пиков основных ионов и ионов с присоединенной водой, последние составляют не более 7% от общего количества ионов.

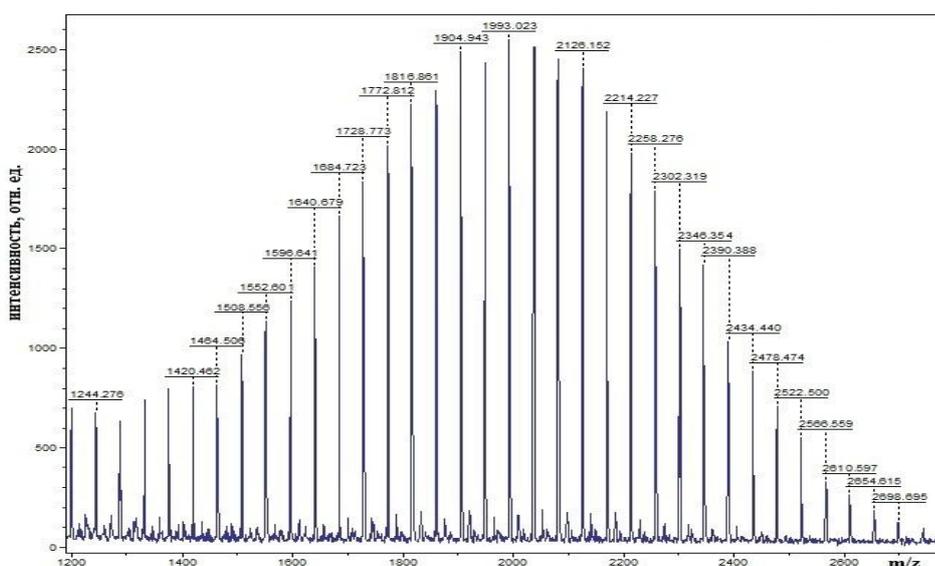


Рис. 3. Масс-спектр модификатора SD 512 (0.5 мг/мл) при использовании α-циано-4-гидроксикоричной кислоты (20 мг/мл) в качестве матрицы.

Масс-спектры различных модификаторов отличаются по массам ионов. Общим для всех соединений является то, что разница между двумя соседними пиками в спектре составляет 44 Да. Такая масса может соответствовать элементарному звену (–CH₂–

соединений является то, что разница между двумя соседними пиками в спектре составляет 44 Да. Такая масса может соответствовать элементарному звену (–CH₂–

СН₂ – О –), что характерно для полиэфиров, к классу которых относятся указанные модификаторы. Полученные масс-спектры растворов различных модификаторов на основе ПКЭ и вытяжек из бетонов, содержащих их в оптимальных дозировках, использовали для идентификации модификаторов в строительных материалах.

Идентификация модификаторов в бетоне. В вытяжках из бетона массы ионов, характеризующих присутствие олигомеров ПКЭ, превышают массы соответствующих ионов, присутствующих в масс-спектрах модельных растворов ПКЭ, на 16 Да. Это связано, вероятно, с тем, что в вытяжках ионы олигомеров ПКЭ присутствуют в форме $[M_n + H_2O - 2H]^+$.

Для проведения идентификации три образца бетона, содержащие пластификатор С-3, Карбоксинор и SD 512, зашифровали, измельчили и получили водно-ацетонитрильные вытяжки. После получения масс-спектров проводили идентификацию модификаторов бетона (рис. 4).

Установлено, что образец бетона № 1 содержит пластификатор С-3. В масс-спектрах наблюдали пики ионов олигомеров с числом звеньев от 2 до 5. Образец бетона № 2 содержит модификатор на основе ПКЭ – SD 512, а № 3 – Карбоксинор.

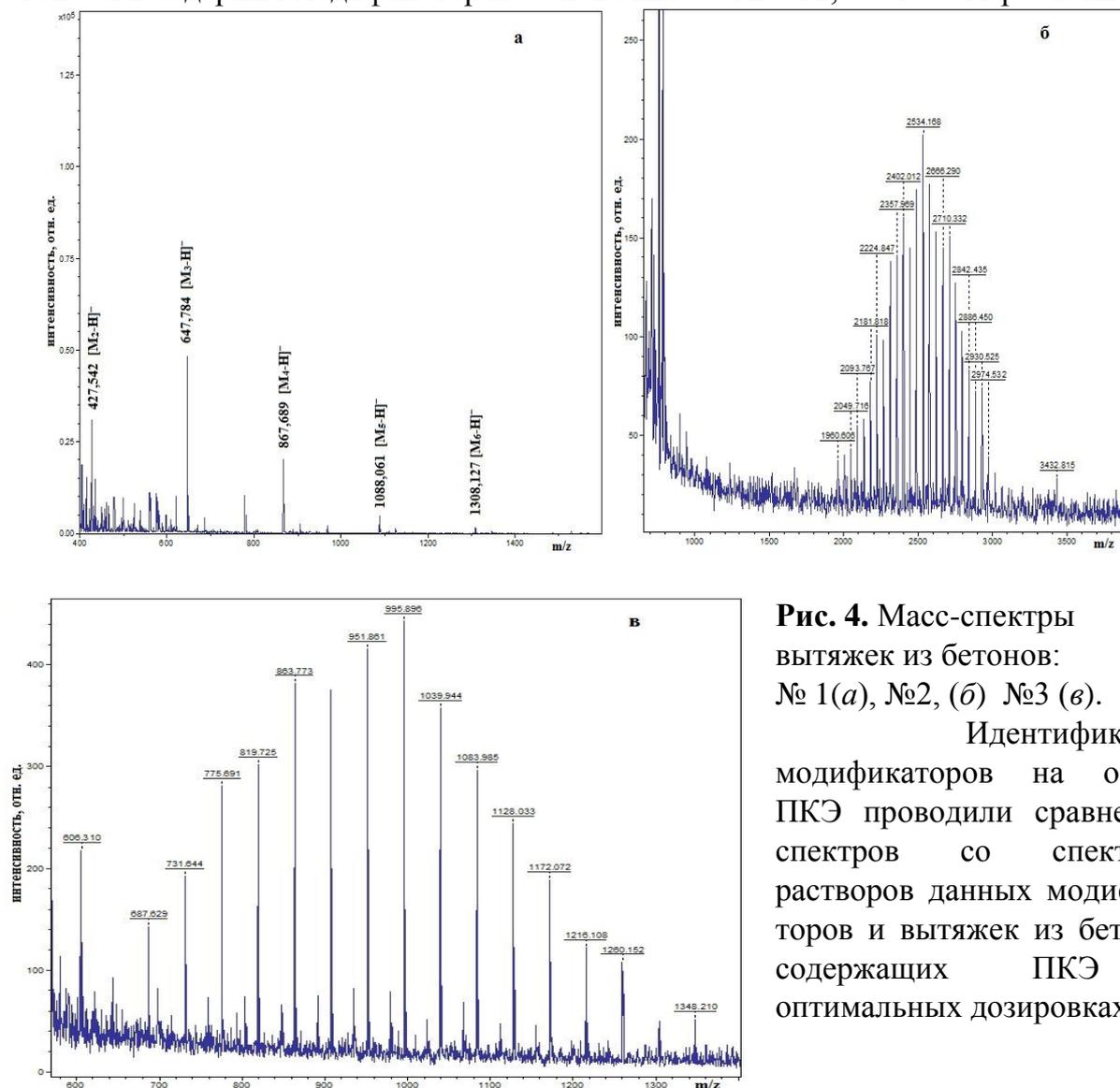


Рис. 4. Масс-спектры вытяжек из бетонов: № 1(а), №2, (б) №3 (в).

Идентификацию модификаторов на основе ПКЭ проводили сравнением спектров со спектрами растворов данных модификаторов и вытяжек из бетонов, содержащих ПКЭ в оптимальных дозировках.

Глава 5. МС МАЛДИ/ПАЛДИ в анализе объектов органической и неорганической природы. Идентификация и определение антибиотиков различных классов в пищевых продуктах и кормах, воде и почве. В данной главе показан выбор оптимальных условий при исследовании антибиотиков различных классов, а также возможность идентификации и определения антибиотиков в различных объектах методами МАЛДИ/ПАЛДИ. Исследование проводили для нескольких классов антибиотиков, широко применяемых в медицине и ветеринарии – макролидов, тетрациклинов, полипептидов, цефалоспоринов и аминогликозидов.

Установлено, что оптимальным режимом работы является стандартный с рефлектроном при регистрации положительных ионов – RP PerMix в диапазоне масс 200 – 3000 Да. При использовании режима работы с отрицательными ионами (RN PerMix) пики ионов антибиотиков в масс-спектрах не обнаруживались: это свидетельствует о том, что рассматриваемые антибиотики легче присоединяют протон(ион металла), чем отдают его в процессе ионизации. Оптимальным при исследовании антибиотиков различных классов является режим работы RP PerMix при мощности лазера 55% от максимальной и напряжении рефлектрона 1569 В с подавлением масс в диапазоне 200 – 600 Да в зависимости от класса исследуемых антибиотиков.

При исследовании антибиотиков установлено, что оптимальной органической матрицей является α -циано-4-гидроксикоричная кислота при соотношении по объему компонентов в системе матрица – аналит 1:1 и концентрации матрицы 20 мг/мл. В качестве неорганической матрицы использовали подложки с нанонитями «Nanosys MSP 96» (табл. 3).

Таблица 3. Характеристические массы ионов для аминогликозидов, макролидов, полипептидов, тетрациклинов и цефалоспоринов, полученные МС МАЛДИ/ ПАЛДИ при регистрации положительных ионов.

№	Антибиотик (мол. масса) (класс)	МАЛДИ	m/z, Да	ПАЛДИ	m/z, Да
1	Спектиномицин (332) (аминогликозид)	[СПМ + H] ⁺ [СПМ + Na] ⁺	333.254 356.254	[СПМ + H] ⁺ [СПМ + Na] ⁺	333.499 356.392
2	Тетрациклин (444)	Не определяется (наложение масс на массы матрицы)		[ТТЦ + H-H ₂ O] ⁺ [ТТЦ+H-NH ₃ -H ₂ O] ⁺	427.331 410.388
3	Метациклин (442) (тетрациклин)	Не определяется (наложение масс на массы матрицы)		[МТЦ -NH ₃] ⁺	426.425
4	Доксициклин (444) (тетрациклин)	[ДКЦ + H - NH ₃] ⁺	428.257	[ДКЦ + H - NH ₃] ⁺	428.257
5	Окситетрациклин (460) (тетрациклин)	[ОКЦ + H] ⁺ [ОКЦ+Na-NH ₃ -H ₂ O] ⁺	461.263 447.581	[ОКЦ + Na- 2H] ⁺ [ОКЦ+H-NH ₃ - H ₂ O] ⁺ [ОКЦ + H] ⁺	481.303 426.291 461.263
6	Демеклоциклин (464) (тетрациклин)	[ДМЦ + H] ⁺	465.344	[ДМЦ + H] ⁺	465.445

Таблица 3. Продолжение.

№	Антибиотик (мол. масса) (класс)	МАЛДИ	m/z, Да	ПАЛДИ	m/z, Да
7	Хлортетрациклин (478) (тетрациклин)	[ХТЦ + Н] ⁺ [ХТЦ - NH ₃] ⁺ [ХТЦ + Н - NH ₃] ⁺	479.300 461.279 462.279	[ХТЦ + Н - NH ₃]	462.279
8	Канамицин (484) (аминогликозид)	[КНМ + Н] ⁺	485.420	[КНМ + Н] ⁺	485.478
9	Цефтиофур (523) (цефалоспорин)	[ЦФТ + Н] ⁺ [ЦФТ + Na] ⁺ [ЦФТ + К] ⁺	524.198 546.200 562.181	[ЦФТ] ⁺ [ЦФТ + Н] ⁺ [ЦФТ + 2Н] ⁺	523.010 524.198 525.198
10	Стрептомицин (581) (аминогликозид)	[СТМ + Н] ⁺	582.764	[СТМ + Н] ⁺	582.751
11	Дигидрострептомицин (584) (аминогликозид)	[ДГС] ⁺	584.721	[ДГС] ⁺	584.635
12	Амикацин (585) (аминогликозид)	[АМК + Н] ⁺ [АМК + Na] ⁺ [АМК + К + 2Н] ⁺	586.484 608.487 626.547	[АМК + Н] ⁺	586.483
13	Ласалоцид (588)	[ЛСЦ + Н] ⁺ [ЛСЦ + Na] ⁺	589.756 611.770	[ЛСЦ + Н] ⁺ [ЛСЦ + Na] ⁺	589.643 611.634
14	Неомицин (614) (аминогликозид)	[НМЦ + Н] ⁺	615,523	[НМЦ + Н] ⁺	615,465
15	Монензин (670) (макролид)	[МНЗ + Na] ⁺ [МНЗ + К] ⁺ [МНЗ + Na-H ₂ O] ⁺	693.636 709.611 675.616	[МНЗ + Na] ⁺ [МНЗ + 2Na] ⁺ [МНЗ + Na-H ₂ O] ⁺	693.636 715.640 675.510
16	Лаидломицин (698) (макролид)	[ЛДМ + Na] ⁺ [ЛДМ + К] ⁺	720.458 736.354	[ЛДМ + Na] ⁺ [ЛДМ + К] ⁺	720.678 736.657
17	Эритромицин (733) (макролид)	[ЭРМ + Na] ⁺ [ЭРМ + К] ⁺ [ЭРМ + Н] ⁺	756.689 772.669 734.684	[ЭРМ + Н] ⁺ [ЭРМ + Na] ⁺ [ЭРМ + К] ⁺	734.786 756.853 771.900
18	Салиномицин (751) (макролид)	[СЛМ + Н] ⁺ [СЛМ + Na] ⁺ [СЛМ + К] ⁺	752.453 774.245 790.383	[СЛМ + Н] ⁺ [СЛМ + Na] ⁺ [СЛМ + К] ⁺	752.235 774.458 790.355
19	Наразин (764) (макролид)	[НРЗ + Na] ⁺ [НРЗ + К] ⁺	787.721 803.705	[НРЗ + Na] ⁺ [НРЗ + К] ⁺	787.775 803.760
20	Рифампицин (823) (макролид)	[РФП + Н] ⁺ [РФП + Na] ⁺ [РФП + К] ⁺	824.323 846.315 862.400	[РФП + Н] ⁺ [РФП + Na] ⁺ [РФП + К] ⁺	824.345 846.675 862.445
21	Джозамицин (828) (макролид)	[ДЖМ + Н] ⁺ [ДЖМ + Na] ⁺ [ДЖМ + К] ⁺	828.630 850.644 866.620	[ДЖМ + Н] ⁺ [ДЖМ + К] ⁺ [ДЖМ + Na] ⁺	828.767 866.620 850.644
22	Спирамицин (843) (макролид)	[СПМ + Н] ⁺ [СПМ + Na] ⁺ [СПМ + К] ⁺	843.683 865.695 881.673	[СПМ + Н] ⁺	843.862

Таблица 3. Окончание.

№	Антибиотик (мол. масса) (класс)	МАЛДИ	m/z, Да	ПАЛДИ	m/z, Да
23	Рифабутин (846) (макролид)	[РФБ + H] ⁺ [РФБ + Na] ⁺ [РФБ + K] ⁺	847.435 870.478 885.639	[РФБ + H] ⁺ [РФБ + Na] ⁺ [РФБ + K] ⁺	847.560 870.564 885.625
24	Тилмикозин (868) (макролид)	[ТМК+ H] ⁺ [ТМК+ Na] ⁺	869.835 891.816	[ТМК+ H] ⁺	869.794
25	Абамектин (873) (макролид)	[АМТ + Na + H] ⁺ [АМТ + K] ⁺	897.222 912.229	[АМТ + Na + H] ⁺ [АМТ + K] ⁺	897.230 912.301
26	Семдурамицин (873) (макролид)	[СДМ + H] ⁺ [СДМ + Na] ⁺ [СДМ + K] ⁺	874.383 896.195 912.373	[СДМ + H] ⁺ [СДМ + Na] ⁺ [СДМ + K] ⁺	874.437 896.789 912.569
27	Ивермектин (875) (макролид)	[ИМТ + Na – H] ⁺ [ИМТ + K] ⁺	897.227 914.230	[ИМТ + Na – H] ⁺ [ИМТ + K] ⁺	897.254 913.347
28	Тилозин (915) (макролид)	[ТЛЗ + H] ⁺ [ТЛЗ + Na] ⁺	916.702 938.713	[ТЛЗ + H] ⁺ [ТЛЗ + Na] ⁺	916.829 938.864
29	Мадурамицин (917) (макролид)	[МДМ + H] ⁺ [МДМ + Na] ⁺ [МДМ + K] ⁺	918.234 940.476 956.532	[МДМ + H] ⁺ [МДМ + Na] ⁺ [МДМ + K] ⁺	918.349 940.568 956.543
30	Валиномицин (1111) (полипептид)	[ВЛМ + H] ⁺ [ВЛМ + K] ⁺	1112.092 1150.078	[ВЛМ + H] ⁺ [ВЛМ + K] ⁺	1112.125 1150.085
31	Полимиксин сульфат (1203) (полипептид)	[ПЛМ+H] ⁺ [ПЛМ+K-3NH ₃] ⁺	1204.097 1190.071	[ПЛМ+H] ⁺ [ПЛМ+K-3NH ₃] ⁺	1204.085 1190.063
32	Авиламицин (1404) (макролид)	[АВМ + K] ⁺ [АВМ + K+2H] ⁺ [АВМ + 2K-H ₂ O-3H] ⁺	1443.137 1445.735 1461.715	[АВМ + K] ⁺ [АВМ + K+2H] ⁺	1444.022 1446.022
33	Бацитрацин (1422) (полипептид)	[БЦЦ+H] ⁺ [БЦЦ+K-3NH ₃] ⁺	1423.183 1409.129	[БЦЦ+H] ⁺ [БЦЦ+K-3NH ₃] ⁺	1423.167 1409.115

Масс-спектры антибиотиков при регистрации положительных ионов отличаются небольшим количеством хорошо разрешенных пиков ионов, характерных для конкретного соединения ионов – в основном это протонированные ионы $[M + H]^+$ и аддукты с натрием или калием ($[M + Na]^+$, $[M + K]^+$) (рис. 5). При исследовании макролидов, тетрациклинов и некоторых полипептидов в масс-спектрах наблюдаются пики ионов, связанные с дефрагментацией молекул, особенно это характерно для полипептидов и тетрациклинов – отщепление молекул воды и аммиака – $[M + Na - H_2O]^+$, $[M + K - H_2O]^+$, $[M + K - 3 NH_3]^+$, $[M + H - NH_3 - H_2O]^+$, $[M - NH_3]^+$. Указанные ионы наблюдаются как в спектрах, полученных методом МС МАЛДИ, так и в спектрах, полученных методом МС ПАЛДИ (рис. 6).

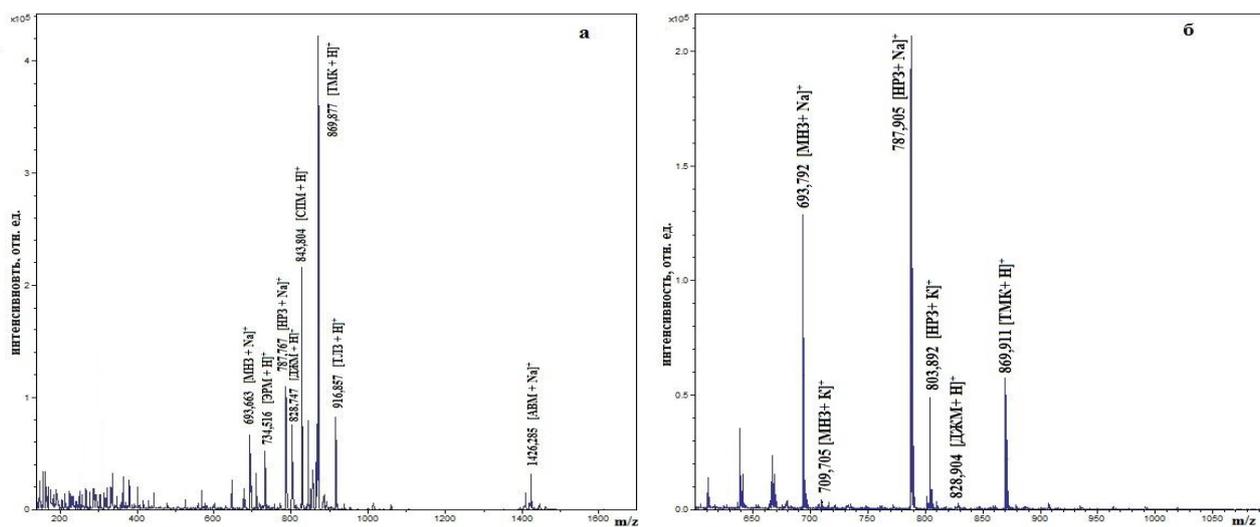


Рис. 5. Масс-спектры смеси антибиотиков-макролидов (МНЗ – монензин, НРЗ – наразин, ЭРМ – эритромицин, ДЖМ – джозамицин, ТМК – тилмикозин, ТЛЗ – тилозин, АВМ – авиламицин, СПМ – спектиномицин): при использовании в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты и концентрации антибиотиков 50 мкг/мл (а); при использовании подложки ПАЛДИ в качестве матрицы и концентрации антибиотиков 50 нг/мл (б).

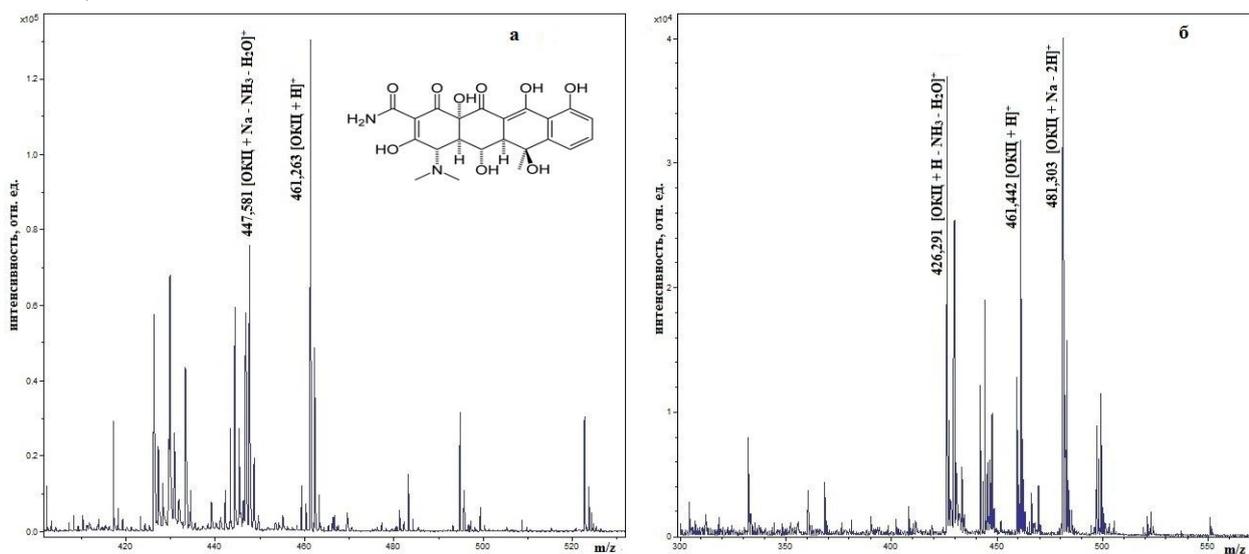


Рис. 6. Масс-спектры МАЛДИ (а) и ПАЛДИ (б) окситетрациклина (ОКЦ) при использовании α -циано-4-гидроксикоричной кислоты и подложки «Nanosys MSP 96» в качестве матриц.

Идентификация и определение антибиотиков в кормах и премиксах. Для установления возможности обнаружения антибиотиков в смеси исследовали смесь макролидов, наиболее часто применяемых в ветеринарии: монензин, эритромицин, наразин, джозамицин, спирамицин, тилмикозин, тилозин, авиламицин. При использовании в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в масс-спектрах обнаруживали пики основных ионов всех антибиотиков в смеси. Идентификацию антибиотиков проводили путем сравнения масс-спектров экстрактов и спектров стандартных растворов антибиотиков. Помимо соответствия значений m/z для пиков использовали также соответствие изотопного распределения, как одного из параметров для идентификации. Любое вещество представлено группой ионов,

отличающихся по массе на 1 Да. Эта группа представляет собой ниспадающий каскад пиков (рис. 7).

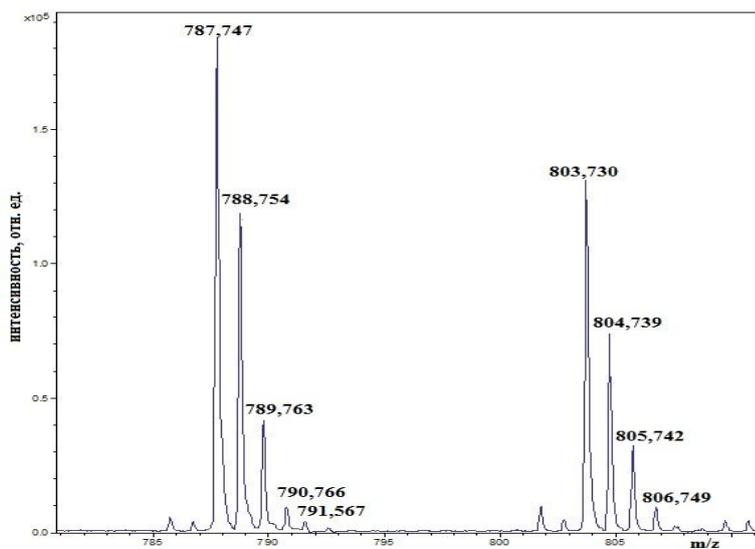


Рис. 7. Масс-спектр стандартного раствора наразина с концентрацией 50 мкг/мл с указанием изотопного распределения.

Присутствие такого каскада обусловлено тем, что в природе все органические вещества содержат изотопы углерода, водорода, кислорода, серы и азота, если таковые присутствуют в составе. Чем

выше масса соединения, тем более вероятно появление варианта данного вещества с различным содержанием указанных изотопов.

Пределы обнаружения (соотношение сигнал/шум = 4) указанных макролидов в смеси находились в диапазоне 0.003 – 1 мкг/мл. При использовании подложки «Nanosys MSP 96» в качестве матрицы получили масс-спектры с хорошо разрешенными пиками ионов. При исследовании смеси макролидов наблюдали конкуренцию в десорбции и ионизации различных антибиотиков, причем наиболее ярко этот процесс был выражен для авиламицина: пиков ионов авиламицина в масс-спектрах не наблюдали. Из восьми антибиотиков в масс-спектрах присутствовали пики ионов только наразина, монензина, тилмикозина и джозамицина. При этом пределы обнаружения (соотношение сигнал/шум = 4) для наразина, монензина и тилмикозина находились в диапазоне 0.001 – 0.03 нг/мл. Необходимо отметить, что чувствительность метода МС ПАЛДИ при исследовании антибиотиков значительно выше метода МС МАЛДИ: разница в чувствительности превысила 10000 раз. Таким образом, метод МС ПАЛДИ более чувствителен, чем МС МАЛДИ, но для него более выражена конкурентная десорбция и ионизация для антибиотиков с большой молекулярной массой, что затрудняет исследование антибиотиков при их совместном присутствии в смеси. Возможность количественного анализа антибиотиков в экстрактах из кормов и премиксов изучали на примере смеси антибиотиков монензина, наразина, тилмикозина и авиламицина. Для количественного анализа использовали метод внутреннего стандарта. Установлено, что оптимальным внутренним стандартом для данной смеси антибиотиков является джозамицин. Оптимальным соотношением экстракта и внутреннего стандарта по объему является 1:1 при концентрации джозамицина 10 мкг/мл. При построении градуировочного графика на оси ординат откладывали отношение суммы площадей пиков в масс-спектрах для наразина $[\text{НРЗ} + \text{Na}]^+ m/z = 787$ и $[\text{НРЗ} + \text{K}]^+ m/z = 803$; монензина – $[\text{МНЗ} + \text{Na}]^+ m/z = 693$, $[\text{МНЗ} + \text{K}]^+ m/z = 709$ и $[\text{МНЗ} + \text{Na} - \text{H}_2\text{O}]^+ m/z = 675$; тилмикозина – $[\text{ТМК} + \text{Na}]^+ m/z = 891$ и $[\text{ТМК} + \text{H}]^+ m/z = 869$; авиламицина – $[\text{АВМ} + \text{K}]^+ m/z = 1443$, $[\text{АВМ} + \text{K} + 2\text{H}]^+ m/z = 1445$ и $[\text{АВМ} + 2\text{K} - \text{H}_2\text{O} - 3\text{H}]^+ m/z = 1461$ к сумме площадей пиков ионов джозамицина – $[\text{ДЖМ} + \text{H}]^+ m/z = 828$, $[\text{ДЖМ} + \text{K}]^+ m/z$

= 866 и $[\text{ДЖМ} + \text{Na}]^+ m/z = 850$. Градуировочные графики линейны в диапазоне 1 – 20 мкг/мл для монензина и наразина, 0.01 – 10 мкг/мл – для тилмикозина и 1 – 50 мкг/мл – для авиламицина при относительном стандартном отклонении не более 0.09 (табл.4).

Правильность анализа проверяли методом «введено – найдено» на примере корма, не содержащего антибиотиков. Установлено, что степень извлечения антибиотиков из комбикорма экстракцией ацетонитрилом составляет 80 – 100 %.

В таблице 5 представлены результаты определения антибиотиков-макролидов в кормах и премиксах, на рисунке 8 приведен масс-спектр экстракта из премикса. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0.1.

Таблица 4. Пределы обнаружения (ПО) и диапазоны линейности (ДЛ) градуировочных графиков при определении антибиотиков–макролидов методом МС МАЛДИ.

Антибиотик	МС МАЛДИ			
	ПО, мкг/мл	ДЛ, мкг/мл	Уравнение градуировочного графика	R ²
Монензин	0.3	1 – 20	$y = 4.858 x$	0.991
Наразин	0.3	1 – 20	$y = 13.04 x$	0.999
Джозамицин	0.05	0.1 – 50	Внутренний стандарт	-
Тилмикозин	0.003	0.01 – 10	$y = 136.4 x$	0.992
Авиламицин	0.3	1 – 50	$y = 0.7350 x$	0.995

Таблица 5. Определение наразина и авиламицина в премиксах для комбикорма методом МС МАЛДИ ($n = 3, P = 0.95$).

Антибиотик	Проба	Найдено, мг/кг	s_r
Наразин	Корм №1	23.4 ± 0.5	0.01
	Корм №2	35 ± 2	0.02
	Корм №3	31 ± 6	0.08
	Премикс №1	3400 ± 400	0.05
	Премикс №2	4500 ± 620	0.06
	Премикс №3	230 ± 21	0.04
Авиламицин	Премикс №1	46 ± 8	0.07
	Премикс №2	150 ± 32	0.08
	Премикс №3	214 ± 55	0.10

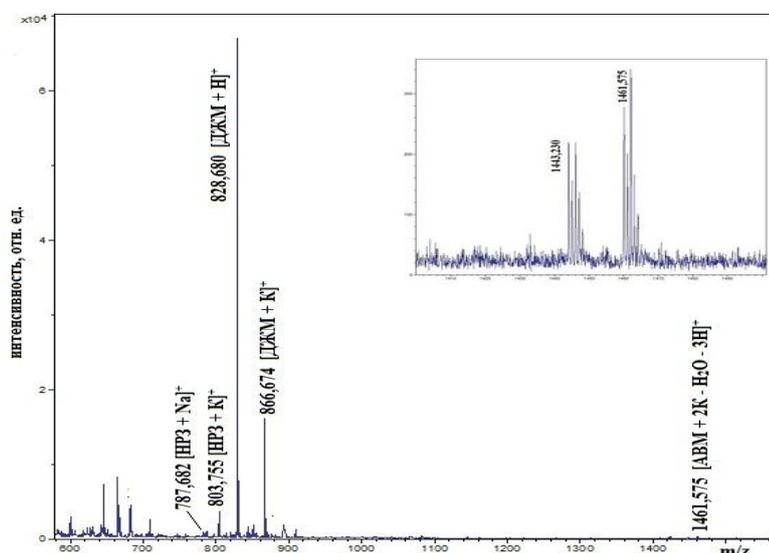


Рис. 8. Масс-спектр экстракта из премикса с введением внутреннего стандарта – джозамицина.

Идентификация антибиотиков в продуктах животного происхождения.

Возможность идентификации остаточных количеств антибиотиков определяли при исследовании масс-спектров экстрактов ацетонитрилом из различных продуктов. В масс-спектрах ацетонитрильных экстрактов продуктов животного происхождения (свинина, говядина, печень свиная, сало, курица и яйца) установлено наличие пиков некоторых антибиотиков (табл. 6).

Таблица 6. Идентификация остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах животного происхождения методом МАЛДИ.

Проба	Характеристические массы (m/z), Да	Отношение сигнал / шум (S/N)	Высота пика в спектре, отн. ед.	Площадь пика в спектре, отн. ед.	Идентифицированный антибиотик
Яйцо	869.743	4.50	51	7	Тилмикозин
Свинина	586.461	5.40	455	56	Амикацин
	584.437	5.10	428	59	Дигидрострептомицин
	709.567	8.20	465	61	Монензин
	756.733	4.40	232	22	Эритромицин
Сало	615.390	9.00	1364	180	Неомицин
	333.254	54.0	13635	1056	Спектиномицин
	356.254	4.70	1295	120	
	787.808	41.4	3471	651	Наразин
	803.503	10.6	938	144	
428.515	46.6	10256	1050	Доксициклин	
Говядина	586.430	6.30	255	27	Амикацин
	615.332	9.30	350	35	Неомицин
	333.230	21.6	550	36	Спектиномицин
	584.420	4.10	170	24	Дигидрострептомицин
	803.383	4.00	102	14	Наразин
	479.320	4.90	242	19	Хлортетрациклин
	428.502	250.2	12918	1149	Доксициклин
Свиная печень	608.464	9.50	410	51	Амикацин
	615.348	10.6	453	59	Неомицин
	333.231	13.1	715	47	Спектиномицин
	356.293	4.70	277	23	
	584.440	18.7	824	98	Дигидрострептомицин
Мясо курицы	333.230	13.4	1100	78	Спектиномицин
	461.139	4.30	337	27	Хлортетрациклин

Идентификация и определение антибиотиков в воде. Широкое использование антибиотиков в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности приводит к появлению и накоплению их в объектах окружающей среды.

В масс-спектрах, полученных методами МС МАЛДИ и ПАЛДИ, ацетонитрильных экстрактов питьевой воды (бутилированной, водопроводной, колодезной) установлено наличие пиков некоторых антибиотиков (табл. 7). Необходимо отметить, что концентрация антибиотиков в воде очень мала, поэтому применение метода МС МАЛДИ менее эффективно, по сравнению с методом МС ПАЛДИ из-за существенной разницы в чувствительности.

Возможность количественного анализа изучали на примере наразина. Для количественного анализа использовали джозамицин в качестве внутреннего

стандарта. Градуировочный график линеен в диапазоне 0.5 – 20 нг/мл ($y = 266.6x$) при коэффициенте корреляции 0.976 и относительном стандартном отклонении не более 0.09. В таблице 8 представлены результаты определения наразина в питьевой воде. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0.09.

Таблица 7. Идентификация остаточных количеств антибиотиков в питьевой воде методом МС ПАЛДИ.

Проба	Характеристические массы (m/z), Да	Отношение сигнал /шум (S/N)	Высота пика в спектре, отн. ед.	Площадь пика в спектре, отн. ед.	Идентифицированный антибиотик
Вода «Нарзан» (пластиковая тара)	584.742	6.70	2204	209	Дигидрострептомицин
	787.730	84.4	12802	3211	Наразин
	803.681	9.40	1436	184	
	462.579	7.40	3359	349	Хлортетрациклин
Вода «Нарзан» (стеклянная тара)	410.341	39.7	17729	2035	Тетрациклин
	462.465	13.8	5818	499	Хлортетрациклин
Вода «Нарзан» (стеклянная тара)	584.798	11.6	3203	362	Дигидрострептомицин
	333.523	114.2	95087	9289	Спектиномицин
Вода «Я» (пластиковая тара)	356.526	6.50	5964	477	
	584.726	5.30	1434	136	Дигидрострептомицин
	462.449	4.90	1931	142	Хлортетрациклин
	787.749	52.3	5987	705	Наразин
Вода «Липецкий бювет» (пластиковая тара)	584.708	14.4	2401	204	Дигидрострептомицин
	787.672	10.2	892	88	Наразин
Вода «Perrier» (стеклянная тара)	584.573	10.4	3095	280	Дигидрострептомицин
	462.579	4.20	2205	133	Хлортетрациклин
	787.498	10.9	1480	132	Наразин
Водопроводная вода г. Владимир	787.718	4.50	2096	292	Наразин

Таблица 8. Определение наразина в питьевой воде МС ПАЛДИ ($n = 3, P = 0.95$).

Проба воды	Найдено, мкг/л	s_r
«Нарзан» (пластиковая тара)	0.69 ± 0.07	0.04
«Я» (пластиковая тара)	0.29 ± 0.06	0.09
«Новлянская» (пластиковая тара)	0.11 ± 0.01	0.06

Идентификация антибиотиков в почве. В масс-спектрах, полученных методом МС ПАЛДИ, ацетонитрильных экстрактов из нескольких проб почв, отобранных вблизи животноводческих комплексов, установлено наличие пиков некоторых антибиотиков. В экстрактах обнаружено присутствие метациклина, хлортетрациклина, доксициклина, дигидрострептомицина и ласалоцида. С учетом интенсивности и площадей пиков найденных тетрациклинов, можно предположить, что их концентрация находится в диапазоне 0.02 – 0.20 мкг/кг.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны подходы к идентификации и определению олигомеров органических поликислот (модификаторов строительных материалов) и антибиотиков в продуктах питания методом МС МАЛДИ/ПАЛДИ.

2. Подобраны условия пробоподготовки при исследовании олигомерной смеси ПМНСК, ПМНС, поликарбоксилатных эфиров и антибиотиков различных классов: макролидов, тетрациклинов, полипептидов, цефалоспоринов и аминогликозидов, методом масс-спектрометрии МАЛДИ / ПАЛДИ. Установлены оптимальные способы экстракции данных соединений из объектов неорганической и органической природы. Показано, что использование α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в качестве органической матрицы и подложки «Nanosys MSP 96» в качестве неорганической матрицы обеспечивает высокую эффективность методов при исследовании, идентификации и определении модификаторов строительных материалов и антибиотиков различных классов.

3. Подобраны оптимальные условия определения параметров молекулярно-массового распределения ПМНСК: регистрация масс-спектра положительных ионов в режиме работы с рефлектором, использование допанта – источника ионов металла, органической матрицы – α -циано-4-гидроксикоричной кислоты и введения растворителя при пробоподготовке.

4. Установлены условия извлечения ацетонитрилом ПМНС и ПКЭ из бетонов на основе портландцемента. Показана возможность идентификации указанных модификаторов и их определения в строительных материалах.

5. Определены условия масс-спектрометрического исследования антибиотиков различных классов: выбор режима регистрации ионов, плотность мощности лазера, напряжение рефлектрона. Выбраны условия экстрагирования антибиотиков из различных объектов: использование экстракции ацетонитрилом с применением хлорида натрия. Разработаны методики идентификации антибиотиков различных классов и определения наразина, монензина, авиламицина и тилмикозина в кормах и премиксах. Пределы определения варьируются от 0.1 до 10 мг/кг.

6. Предложена методика идентификации антибиотиков различных классов: макролидов, тетрациклинов, полипептидов, цефалоспоринов и аминогликозидов в продуктах животного происхождения методом МС МАЛДИ/ПАЛДИ при извлечении их ацетонитрилом в присутствии хлорида натрия.

7. Предложена методика идентификации и определения антибиотиков в объектах неорганической природы – вода и почва. Показана высокая эффективность метода МС ПАЛДИ при идентификации и определении антибиотиков в воде. Разработана методика определения наразина в воде с пределами определения 0.1 мкг/л. Разработана методика идентификации антибиотиков в почве методом МС ПАЛДИ.

Основное содержание диссертации отражено в следующих публикациях:

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Краснова Т. А., Амелин В. Г. Изучение молекулярно-массового распределения олигомерных полиметиленафталинсульфоновых кислот методом масс-спектрометрии МАЛДИ // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2013. Т. 79. № 8. С. 7 – 11.
2. Краснова Т. А., Амелин В. Г. Идентификация и определение антибиотиков в питьевой воде методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией // Вода: химия и экология. 2013. № 11. С. 81 – 87.
3. Краснова Т. А., Амелин В. Г. Экспресс-способ идентификации остаточных количеств

антибиотика в молоке. Метод масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией // Молочная промышленность. 2013. № 11. С. 34 – 36.

4. Краснова Т. А., Амелин В. Г. Исследование молекулярно-массового распределения полиметиленафталинсульфокислот методом матрично-активированной лазерной десорбции / ионизации // Известия Саратовского университета. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13. № 3. С. 16 – 25.
5. Краснова Т. А., Амелин В. Г., Тимофеев А. А., Волкова Н. М. Идентификация и определение антибиотиков никарбазина и макролидов в кормах и продуктах питания // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2013. № 4. С. 26 – 28.
6. Краснова Т. А., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Определение антибиотиков – макролидов в кормах и премиксах методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией // Кормопроизводство. 2013. № 10. С. 41 – 43.

Тезисы докладов

7. Краснова Т. А. Определение молекулярно-массового распределения олигомеров полиметиленафталинсульфоната методом MALDI-TOF // Менделеев-2012. Аналитическая химия. Шестая Всероссийская конференция молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием. Тезисы докладов. СПб.: Издательство Соло, 2012. С. 206 – 208.
8. Краснова Т. А. Анализ полиметиленафталинсульфоната методом MALDI-TOF // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2012». М.: МАКС Пресс, 2012. (http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2012/structure_31_1932.htm).
9. Краснова Т. А. Анализ олигомеров полиметиленафталинсульфокислоты методом MALDI-TOF // Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы химической науки и образования». Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2012. С. 47 – 48.
10. Краснова Т. А. Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией при определении пластификатора на основе полиметиленафталинсульфонатов в строительных материалах // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2013». М.: МАКС Пресс, 2013. (http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2013/structure_31_2341.htm).
11. Краснова Т. А. Определение модификатора на основе олигомеров полиметиленафталинсульфокислоты в бетоне методом MALDI-TOF-MS // Теоретические и прикладные аспекты химической науки, товарной экспертизы и образования: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию со дня рождения В.Н. Николаева. Чебоксары: ООО Издательский дом «ПЕГАС», 2013. С. 102 – 104.
12. Краснова Т. А. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация при определении пластификатора на основе полиметиленафталинсульфонатов в строительных материалах // Сборник тезисов 2-й Всероссийской Интернет-конференции «Грани науки 2013». Казань.: СМУиС, 2013. С. 419 – 420. (http://grani2.kznscience.ru/data/documents/Tezisy_GraniNauki-2013.pdf)
13. Краснова Т. А. MALDI-TOF Масс-спектрометрия при определении пластификатора на основе полиметиленафталинсульфонатов в строительных материалах // 2-ая

Всероссийская научная конференция «Методы исследования состава и структуры функциональных материалов». Новосибирск, 2013. С. 341 – 342. (http://catalysis.ru/resources/institute/Publishing/Report/2013/Abstracts_MISSFM-2013.pdf).

14. Краснова Т. А. Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией при идентификации остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах // Международный аспирантский форум «Современная наука: тенденции развития, проблемы и перспективы». Ереван, 2013. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
15. Краснова Т. А. Матрично-активированная лазерная десорбция/ ионизация при идентификации остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах // Второй съезд аналитиков России. Москва, 2013. С. 68. (<http://www.wssanalytchem.org/car2013/doc/Abstracts-CRusAn2013.pdf>).
16. Krasnova T., Amelin V. Mass spectrometry with the matrix-assisted laser desorption / ionization in identification of residual quantities of antibiotics in foodstuff // «6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis RAFA 2013». Book of abstracts. Prague, 2013. P. 470.
17. Краснова Т. А., Ахметьева Н. П., Михайлова А. В. Исследование экологического состояния низинного торфяного болота методами масс-спектрометрии // Материалы конференции «14 международная конференция «Физико-химические и петрофизические исследования в науках о земле». Москва: ИИЦ института физики Земли им. О. Ю. Шмидта, 2013. С. 27 – 30.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю доктору химических наук, профессору Амелину Василию Григорьевичу за всестороннюю поддержку, ценные советы и консультации.

Автор также выражает благодарность заведующему лабораторией химического анализа Федерального центра охраны здоровья животных, кандидату химических наук Третьякову Алексею Викторовичу, за предоставленную возможность использования аналитического оборудования и помощь в обсуждении результатов работы, а также всем сотрудникам лаборатории за предоставленные антибиотики и объекты анализа.