ДӘРІС 12

ДӘРІС ТАҚЫРЫБЫ

Қосарланған әдістер (hyphenated techniques).



Фармацевтикалық талдау және күрделі қоспаларды зерттеу

Дәріскер: PhD, Қауымдастырылған профессор
Кудайбергенова Батес Маликовна

Дәрістің мақсаты мен күтілетін нәтижесі

Қосарланған әдістердің мәні – бір өлшеуде қоспаны алдымен бөлу, содан кейін әр компонент туралы қосымша ақпарат алу. Әдісті дұрыс таңдау үшін екі кезеңнің де міндетін түсіну қажет.

Оқу міндеті	Дәріс соңында студент орындай алады
Ұғымды түсіндіру	Қосарланған әдістің анықтамасын айтып, хроматографиялық бөлу мен детекцияның айырмасын түсіндіреді.
Жүйені сипаттау	Үлгі, бөлгіш жүйе, интерфейс, детектор және деректер арасындағы байланысты ажыратады.
Әдістерді салыстыру	GC–MS, LC–MS, LC–DAD, LC–NMR және CE–MS әдістерінің қай кезде қолданылатынын атайды.
Нәтижені бағалау	Хроматограмма мен спектрдегі негізгі белгілерді оқып, идентификацияны стандартпен растаудың неге маңызды екенін айтады.

Негізгі сұрақ: бөлу әдісі қандай ақпарат береді, ал детектор сол ақпаратты қалай толықтырады?

Дәріскер: PhD, Қауымдастырылған профессор Кудайбергенова Батес Маликовна

Қосарланған әдіс дегеніміз не?

Қосарланған (hyphenated) әдіс – бөлуге арналған аналитикалық тәсілді онлайн спектроскопиялық немесе спектрометриялық детектормен тікелей байланыстыру. Ең танымал мысалдарда хроматография компоненттерді ажыратады, ал масс-спектрометрия олардың масс-заряд қатынасы мен фрагменттері туралы мәлімет береді.

Бөлік	Негізгі қызметі	Нәтижеге қосатын ақпараты
Бөлу жүйесі	Қоспа компоненттерін ұсталу уақыты немесе миграциясы бойынша бөледі.	Қай компоненттің қашан шыққанын көрсетеді.
Интерфейс	Элюат ағынын детекторға жеткізіп, қысым, ағын және еріткіш жағдайын сәйкестендіреді.	Тұрақты сигнал алуға мүмкіндік береді.
Детектор	Әр компонентті спектрлік немесе масс-спектрометриялық белгісі бойынша тіркейді.	Идентификацияны, құрылымды түсіндіруді немесе сандық анықтауды күшейтеді.

Сызықша әдістердің тек қатар қолданылуын емес, аспаптардың бір жүйе ретінде байланысын білдіреді.

Өлшеу нәтижесіне дейінгі негізгі кезеңдер

Жүйені бір ғана детектор емес, үлгіні дайындаудан бастап деректерді түсіндіруге дейінгі тізбек ретінде қарастырған дұрыс.

Кезең	Не орындалады?	Қандай нәтиже шығады?
1. Үлгіні дайындау	Еріту, сүзу, сұйылту немесе қажет болса экстракциялау.	Аспапқа енгізуге дайын ерітінді.
2. Бөлу	LC, GC немесе CE қоспа компоненттерін әр түрлі уақытта бөледі.	Уақыт бойынша ажыратылған компоненттер ағыны.
3. Интерфейс	Ағынды детекторға сай жеткізеді; еріткіш пен иондану жағдайын үйлестіреді.	Тұрақты және өлшенетін сигнал.
4. Детекция	MS, DAD, NMR немесе IR компоненттің жеке белгісін тіркейді.	Масс-спектр, УФ-спектр, ЯМР немесе ИҚ спектрі.
5. Түсіндіру	Хроматограмма, спектр және стандарт/дерекқор нәтижесі біріктіріледі.	Компонент туралы тексерілетін аналитикалық қорытынды.

Интерфейс үйлеспесе, жақсы бөліну де сапалы масс-спектрге айналмайды.

Интерфейстің үйлесімділігі нәтижеге әсер етеді

Әр бөлу әдісі детекторға өзіне тән ағын мен еріткішті береді. Әдісті құрастырғанда осы жағдайларды алдын ала салыстырады.

Сәйкестік факторы	LC–MS	GC–MS	CE–MS
Үлгінің сипаты	Ерігіш, көбіне ұшпайтын немесе қызуға сезімтал молекулалар.	Ұшқыш, қызуға төзімді заттар; қажет болса дериваттау.	Иондық, полярлы молекулалар және биомолекулалар.
Қозғалмалы орта	Иондануға кедергі келтірмейтін ұшқыш еріткіш/тұздар таңдалады.	Тасымалдаушы газ және температуралық бағдарлама қажет.	MS-пен үйлесетін электролит және төмен ағын керек.
Түйісетін бөлік	ESI немесе APCI көзіне элюат беріледі.	Колонкадан шыққан газ MS ион көзіне өтеді.	Капилляр ағыны ESI интерфейсіне жалғанады.
Жиі кездесетін кедергі	Тұздар, матрица және буфер иондануды төмендетуі мүмкін.	Қайнау/ыдырау қасиеті жарамсыз болса шың жоғалады.	Электролит ESI сигналын басуы немесе тұрақсыздандыруы мүмкін.
Әдісті оңтайландыру	Еріткіш құрамы, ағын және иондану полярлығы тексеріледі.	Инжектор, колонка температурасы және газ ағыны реттеледі.	Кернеу, ағын, электролит және капилляр жағдайы тексеріледі.

Кең таралған қосарланған әдістер

Әдіс атауында алдымен бөлгіш тәсіл, одан кейін детекция немесе екінші аналитикалық әдіс көрсетіледі.

Жұп әдіс	Бөлу тәсілі	Қосылатын өлшеу	Қолайлы міндет
GC–MS	Газ хроматографиясы	Масса және фрагменттер	Ұшқыш компоненттер, еріткіш қалдықтары, эфир майы.
LC–MS	Сұйық хроматография	Масса-заряд қатынасы	Полярлы, ұшпайтын, термолабильді молекулалар.
LC–MS/MS	Сұйық хроматография	Іріктелген иондардың фрагментациясы	Қоспадағы нысаналы заттарды сезімтал сандық анықтау.
LC–DAD/PDA	Сұйық хроматография	УФ-көрінетін аймақтағы спектр	Хромофоры бар заттар, шың тазалығын бағалау.
LC–NMR	Сұйық хроматография	Ядролық магниттік резонанс	Құрылымды терең түсіндіру, изомерлерді ажырату.
CE–MS / GC–IR	Капиллярлық электрофорез / газ хроматографиясы	MS / инфрақызыл спектр	Иондық заттар / ұшқыш қосылыстардың функционалдық тобы.

GC–MS: ұшқыш заттарды бөлу және тану

Газ хроматографиясы заттарды колонкада ұшқыштығы мен стационарлық фазамен әрекеттесуіне қарай бөледі. Колонкадан шыққан қосылыс MS ион көзіне өтеді. Электрондық иондану кезінде пайда болған фрагменттердің үлгісі сапалық сәйкестендіруге көмектеседі.

Көбіне қолданылатын нысандар

- Қалдық еріткіштер мен ұшқыш қоспалар
- Эфир майлары және хош иісті компоненттер
- Қажет болғанда туындыға айналдырылған полярлы заттар

Шектеуі: зат үлгіні енгізгенде буланып, колонка температурасында бұзылмай сақталуы керек. Осы талап орындалмаса, LC–MS жиі қолайлырақ болады.



Иллюстрациялық көрініс. Нақты құрал моделін көрсетпейді.

LC–MS: сұйық қоспаларға арналған жұп әдіс

LC–MS әсіресе ұшпайтын, полярлы немесе қызуға сезімтал заттарды талдауға ыңғайлы. Хроматограммадағы әр ұсталу уақытында масса-спектр алынып, қосымша идентификациялық белгі беріледі.

Құрамдас бөлік	Қызметі және таңдау себебі
LC бөлігі	Колонка мен элюент қоспаны ұсталу уақыты бойынша бөледі. Градиентті элюция құрамдары кең ауқымды үлгілерге бейімделуі мүмкін.
Иондану көзі	ESI ерітіндідегі ион түзетін және полярлы қосылыстарға жиі қолданылады. APCI салыстырмалы түрде аз полярлы қосылыстар үшін қарастырылады.
Масс-анализатор	Иондарды m/z бойынша тіркейді. Жоғары ажыратымдылық дәл массаны өлшейді; үш квадруполь нысаналы сандық талдауға ыңғайлы.
Практикалық талап	Қозғалмалы фазада MS-сигналды басатын ұшпайтын буфер/тұз қолданбау және үлгінің матрицалық әсерін бағалау керек.

LC–MS нәтижесі тек массамен шектелмейді: ұсталу уақыты, иондану түрі, изотоптық үлгі және фрагментация бірге бағаланады.

LC–MS/MS: нысаналы ионды бөлек бақылау

Тандем масс-спектрометрияда бірінші масс-анализатор таңдалған прекурсор-ионды өткізеді. Соқтығысу камерасында ол фрагменттерге бөлінеді, ал екінші анализатор таңдалған өнім-иондарды тіркейді.

Қадам	Аспапта не болады?	Аналитикалық мағынасы
1. Прекурсорды таңдау	Белгілі m/z аймағындағы бастапқы ион іріктеледі.	Матрицадағы өзге сигналдардың ықпалын азайтады.
2. Фрагментация	Ион соқтығысу энергиясымен фрагменттерге ыдырайды.	Молекуланың құрылымына тән өнім иондарын алуға көмектеседі.
3. Өнім ионын бақылау	Прекурсор → өнім-ион ауысуы жазылады.	Нысаналы заттың таңдаулылығын арттырады.
4. Сандық анықтау	Сигналды калибрлеу ерітіндісі мен ішкі стандартпен салыстырады.	Концентрацияны матрицада бағалауға мүмкіндік береді.

MRM/SRM режиміндегі сезімталдық әдіс таңдауға көмектеседі, бірақ матрицалық әсер мен тасымалдануды (carryover) бәрібір тексеру керек.

LC–DAD/PDA: бір шыңнан толық УФ-профиль алу

Диодты массив немесе фотодиодты матрица детекторы (DAD/PDA) бөліну барысында бірнеше толқын ұзындығындағы сигналды тіркейді. Әр хроматографиялық шың үшін спектрлік профиль алуға болады; бұл хромофоры бар заттарды салыстыруға және шыңның спектрлік тазалығын бағалауға көмектеседі.

Қандай ақпарат береді?	Қай кезде пайдалы?	Шектеуі
Ұсталу уақыты және бірнеше толқын ұзындығындағы хроматограмма.	Белсенді зат немесе қоспа УФ-сәулені жұтқанда, толқын ұзындығын оңтайландырғанда.	УФ-хромофоры жоқ қосылыстар әлсіз көрінеді немесе мүлде анықталмайды.
Шыңның спектрлік профилі.	Белгілі стандартпен спектрді салыстыруға немесе бірге элюцияланатын қоспаны байқауға.	Ұқсас спектр беретін қосылыстарды әрдайым сенімді ажыратпайды.
Шың тазалығының спектрлік индикаторы.	Әдісті дамыту және қосымша тазалық бағасы үшін.	Жеке қоспаларды түгел жоққа шығармайды; қажет кезде MS немесе басқа селективті әдіс қажет.

DAD/PDA мен MS бір-бірін толықтырады: спектрдің УФ-профилі массалық ақпаратқа балама емес, бөлек сипаттама береді.

LC–NMR: молекулалық құрылымды тереңірек түсіндіру

LC–NMR хроматографиялық бөлуді ЯМР спектроскопиясымен жалғайды. Хроматография жеке шыңды бөліп береді, ал ЯМР сигналдары молекулада сутек пен көміртек атомдарының ортасы және өзара байланысы туралы құрылымдық мәлімет береді.

Артық беретін ақпарат	Тәжірибеде ескерілетін жағы
Құрылым изомерлерін және байланыс орындарын түсіндіру; массасы бірдей заттардың құрылымын ажыратуды толықтыру.	MS-пен салыстырғанда сезімталдығы төмен болуы мүмкін, сондықтан шыңда жеткілікті мөлшердегі зат керек.
Күрделі өсімдік экстрактындағы белгісіз шыңның құрылымын тікелей зерттеуге жағдай жасау.	Қозғалмалы фазаның еріткіш сигналдары спектрді жабуы мүмкін; еріткішті басу тәсілі мен ЯМР ұяшығын ескеру қажет.
LC–SPE–NMR сияқты схемаларда шыңды жинап, еріткішті ауыстыру арқылы қосымша спектрлік эксперимент жасау.	Құралдың құны мен тәжірибе уақыты жоғары; сондықтан оны барлық рутиндік талдауға емес, құрылымды растауға таңдайды.

Қолданылатын жағдай: MS молекулалық масса мен фрагменттерді ұсынғанымен, құрылымды толық растай алмайтын кезде.

CE–MS және GC–IR: басқа бөлу жолдары

Қосарланған әдіс міндетті түрде тек LC немесе GC-мен шектелмейді. Капиллярлық электрофорез және инфрақызыл спектрометрия да басқа молекулалық белгіні аша алады.

Әдіс	Бөлу механизмі	Қосылатын белгі	Қолданылуы және ескерту
CE–MS	Капиллярдағы электр өрісінде заттар заряды мен өлшеміне байланысты әр түрлі жылдамдықпен қозғалады.	MS молекулалық m/z және фрагмент ақпаратын береді.	Иондық, полярлы молекулалар, метаболиттер, пептидтер мен биофармацевтикалық заттар. Электролит интерфейске сай болуы керек.
GC–IR	Газ хроматографиясы ұшқыш компоненттерді ұсталу уақыты бойынша бөледі.	IR молекуладағы байланыс тербелістерінің жұтылу аймақтарын көрсетеді.	Функционалдық топтарды сипаттауға көмектеседі. Үлгінің ұшқыш және қызуға төзімді болуын тексеру қажет.

Бөлу өлшемі де өзгереді: CE заряд/өлшемге сүйенеді, ал LC және GC стационарлық фаза мен қозғалмалы фазаның өзара әсеріне сүйенеді.

Фармацевтикалық талдаудағы қолданылуы

Құрал жұбы аналитикалық сұраққа қарай таңдалады: затты тану керек пе, қоспаны іздеу керек пе, әлде төмен деңгейдегі мөлшерді есептеу керек пе?

Талдау міндеті	Мысал жұп әдіс	Неге қолайлы?
Белсенді заттың белгісіз қоспасын зерттеу	LC–HRMS немесе LC–MS/MS	Дәл масса/фрагмент пен ұсталу уақытын бірге бағалап, ықтимал құрылымды табады.
Қалдық еріткіштерді бақылау	Headspace GC–MS	Ұшқыш заттарды дәрілік матрицадан бөліп, спектрлік белгісімен ажыратады.
Деградация өнімдерін зерттеу	LC–DAD–MS немесе LC–MS/MS	Хроматографиялық шың, УФ-профиль және молекулалық ион ақпаратын біріктіреді.
Плазмадағы дәрілік затты сандық анықтау	LC–MS/MS	Нысаналы ион ауысуын бақылап, матрицадағы төмен концентрацияны бағалауға мүмкіндік береді.
Өсімдік текті шикізатты профильдеу	LC–DAD–MS; қажет болса LC–NMR	Бірнеше компонентті салыстыруға және таңдалған шыңдардың құрылымын терең тексеруге көмектеседі.

Өсімдік экстрактын талдаудағы жұмыс реті

Өсімдік экстрактында компонент саны көп болғандықтан, аспаптық талдау көбіне скринингтен басталып, қызықты шыңдарды жеке зерттеуге жалғасады.

Қадам	Аналитикалық жұмыс	Нәтиже
Экстракт дайындау	Еріткішпен алу, сүзу және концентрацияны тіркеу.	Талдауға жарамды бастапқы ерітінді.
Хроматографиялық профиль	LC–DAD немесе LC–MS арқылы шыңдардың ұсталу уақытын жазады.	Қоспаның қайталанатын химиялық профилі.
Кандидатты бағалау	УФ спектрі, дәл масса, изотоп үлгісі және MS/MS фрагменттері салыстырылады.	Құрылымға ықтимал кандидаттар тізімі.
Белгілі затты қайта бөлмеу	Кандидаттар сенімді кітапханамен/әдебиетпен салыстырылып, стандартпен тексеріледі.	Dereplication: белгілі қосылыстарды қайта оқшаулауды азайту.
Құрылымды нақтылау	Маңызды немесе белгісіз шыңға LC–NMR, жинау немесе қосымша спектрлік әдіс қолданылады.	Құрылымдық қорытындының дәлелі күшейеді.

Хроматограмма мен масс-спектрді бірге оқу

Хроматограмма компоненттердің шығу уақытын көрсетеді. Таңдалған ұсталу уақытындағы масс-спектр сол шыңға сәйкес иондардың m/z үлгісін көрсетеді.





Ұсталу уақыты бөлу нәтижесін көрсетеді; m/z иондық құрамды береді. Шартты графиктегі мәндер нақты затқа жатқызылмайды.

Әдісті талданатын затқа қарап таңдау

Алдымен үлгінің қасиеті мен сұрақты анықтаңыз. Содан кейін ғана бөлу механизмі мен детекторды таңдаңыз.

Үлгінің/міндеттің сипаты	Әдісті қарастыру	Негізгі артықшылығы	Нені тексеру керек?
Ұшқыш және қызуға төзімді компонент	GC–MS	Ұсталу уақыты мен спектрлік фрагментация.	Булану, термиялық тұрақтылық және кітапхана сәйкестігі.
Ұшпайтын немесе термолабильді қосылыс	LC–MS	Ерітіндідегі компоненттерге сай бөлу және молекулалық ион.	Еріткіш/тұздың ESI/APCI-ға ықпалы, матрицалық әсер.
УФ-сіңіретін, белгілі зат немесе тазалық профилі	LC–DAD/PDA	Бірнеше толқын ұзындығындағы сигнал мен спектрлік профиль.	Хромофор болуы және бірге элюцияланатын қоспалар.
Құрылымды растау немесе изомерді талдау	LC–NMR; кейде LC –MS–NMR	Құрылымдық байланысты ЯМР сигналдарымен түсіндіру.	Зат мөлшері, еріткіш сигналдары, уақыт және құрал қолжетімділігі.
Полярлы/иондық қосылыс	CE–MS	Заряд пен өлшемге байланысты ажырату.	Электролит құрамы және интерфейс тұрақтылығы.

Артықшылық пен шектеуді бірге бағалау

Екі өлшеудің бірігуі ақпаратты көбейтеді, бірақ жаңа интерфейс пен деректерді түсіндіру міндетін де қосады.

Нені жақсартады?	Жұмыс барысында нені бақылау керек?
Қоспадағы ұқсас компоненттерді тек бір сигналға сүйенбей бағалайды.	Бөлу толық болмаса, бірге элюцияланған сигналдарды дұрыс түсіндіру керек.
Массалық немесе спектрлік белгі затты тануға қосымша дәлел береді.	Спектр ұқсас болуы мүмкін; reference standard немесе ортогонал әдіс қажет болуы ықтимал.
Нысаналы анализде сезімталдық пен таңдаулылық өседі.	Матрицалық әсер, иондану бәсеңдеуі және carryover нәтижені бұрмалайды.
Деректерді жинау бір инжекцияда бірнеше ақпарат береді.	Құрал күрделі: интерфейс баптау, техникалық қызмет және маман біліктілігі қажет.
Дамыту мен белгісіз қоспаны зерттеуді жылдамдатады.	Әдіс күрделілігі оның дәлдігін өздігінен дәлелдемейді; жарамдылық валидациямен көрсетіледі.

Артықшылық талдау мақсатына сай болғанда ғана пайдалы: әр қосылған детектор нақты сұраққа жауап беруі керек.

Қосарланған әдісті валидациялау

ICH Q2(R2) бойынша валидация әдістің мақсатына және өлшеу түріне тәуелді. Қосарланған жүйеде аналитикалық сипаттамалармен бірге интерфейс пен аспап сигналдарының тұрақтылығы да бағаланады.

Сипаттама	Нені дәлелдейді?	Қосарланған әдістегі тексеріс
Ерекшелік/селективтілік	Нысаналы затты матрица және қоспалар аясында ажырату.	Бірге элюция, спектрлік қабаттасу, изобарлық/матрицалық иондар.
Дәлдік	Нақты мәнге жақын нәтиже.	Қалпына келу, сертификатталған немесе сипатталған үлгі, стандарт қосу.
Прецизия	Қайталанған өлшемдердің жақындығы.	Инжекция, күн, аналитик және қажет болғанда аспапаралық өзгеріс.
Сызықтылық және диапазон	Жұмыс аралығындағы жауап пен концентрация байланысы.	Калибрлеу модельдері, төменгі/жоғарғы шектер және қалдықтар.
DL/QL	Анықтау және сандық бағалау шегін негіздеу.	Нақты үлгі матрицасында сигнал/шу және төменгі деңгейдегі дәлдік.
Робастылық және жүйе жарамдылығы	Ұсақ өзгерістерге төзімділік және өлшеу сериясының жарамдылығы.	Ағын/температура/элюент, ион көзі тазалығы, retention time, сигнал және carryover.

Дәрістің негізгі қорытындысы

Қосарланған әдісті түсіндіру үшін үш сұрақты есте сақтаңыз: қалай бөлді, қандай белгі өлшеді және осы белгіні қалай растады?

01	**Бөлу бөлігі**	Қоспа компоненттерін уақыт, ұсталу немесе миграция бойынша ажыратады.
02	**Интерфейс**	Бөлгіш жүйе мен детектордың ағынын, еріткішін және жұмыс жағдайын сәйкестендіреді.
03	**Детектор**	MS, DAD, NMR немесе IR компонент туралы қосымша спектрлік белгі береді.
04	**Әдіс таңдау**	Үлгінің ұшқыштығы, полярлығы, тұрақтылығы және аналитикалық сұрақ ескеріледі.
05	**Қорытынды**	Бір спектрлік сәйкестік – бастапқы дәлел; сенімді нәтиже стандарт, бақылау және валидацияны қажет етеді.

Пайдаланылған дереккөздер

1. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology (Gold Book). “Hyphenated mass spectrometry technique” (12429); “LC–MS” (12466); “GC–MS” (12421). DOIs: 10.1351/goldbook.12429; 10.1351/goldbook.12466; 10.1351/goldbook.12421. goldbook.iupac.org

2. Sarker SD, Nahar L. Hyphenated techniques and their applications in natural products analysis. Methods Mol Biol. 2012;864:301–340. doi:10.1007/978-1-61779-624-1_12

3. Agilent. Basics of LC/MS – a primer. LC, ESI, MS and common LC/MS instrument components. agilent.com/en/product/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lcms-fundamentals

4. NIST. Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS). ASM Handbook, Vol. 10: Materials Characterization, 2019. nist.gov/publications/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms

5. ICH. Q2(R2) Validation of Analytical Procedures. Step 5, Revision 2; effective 14 June 2024. EMA: ema.europa.eu/en/scientific-guidelines/ich-q2r2-validation-analytical-procedures

6. Menard NRC, Schug KA. A Review of LC–NMR Methods and Applications for Pharmaceutical and Natural Product Analysis. J Sep Sci. 2025;48(11):e70304. doi:10.1002/jssc.70304

7. Seyfinejad B, Jouyban A. Capillary electrophoresis-mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analyses. J Pharm Biomed Anal. 2022;221:115059. doi:10.1016/j.jpba.2022.115059

8. Vouros P, et al. The integration of LC–MS and NMR for analysis of low molecular weight trace analytes in complex matrices. Mass Spectrom Rev. 2020;39(1–2):35–54. doi:10.1002/mas.21575