

## УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ НЕИЗВЕСТНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОСТИЖЕНИЙ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Н.А.Клюев

Институт проблем экологии и эволюции им.А.Н.Северцова РАН  
117071, Москва, Ленинский пр-т, 33

Рассмотрены вопросы установления структуры неизвестного соединения с использованием данных, полученных в результате масс-спектрометрического эксперимента.

Главной темой настоящего обзора является критическое осмысление методических приемов, применяемых при расшифровке структуры\*<sup>1</sup> выделенных из матрицы (биологическая и природная среда, смесь химических компонентов и др.) индивидуальных соединений. В основу методологии по структурной интерпретации неизвестных соединений (НС) легли традиционные положения, взятые из ряда монографий [1-4]. Согласно этим положениям, схема I идентификации органического соединения (Рис. 1) включает следующие обязательные стадии: проверка индивидуальности анализируемого вещества (I); исследование физических свойств (II) и получение физических констант (III); качественный (сплавление с натрием) и количественный элементный анализ (IV); определение молекулярной массы соединения (V); оценка его растворимости (VI); качественные реакции на функциональные группы (VII); спектральные исследования (VIII); предварительное структурное отнесение исследуемого вещества - библиотечный поиск (IX); уточнение идентификации с помощью

**Клюев Николай Алексеевич - заведующий лабораторией аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова Российской академии наук, кандидат химических наук.**

**Область научных интересов: теоретическая органическая химия, молекулярная масс-спектрометрия, хромато-масс-спектрометрия, аналитические измерения в экологических исследованиях и фармакологии.**

**Автор более 450 публикаций в отечественных и международных изданиях и около 30 изобретений.**

специальных реакций и приготовление производных (X). Последующая стадия не является оптимальной и надежной операцией по многим причинам, поэтому однозначность структурного отнесения контролируется идентичностью физических и спектральных данных НС и синтезированной модели, полученной встречным синтезом (XI). Основным недостатком схемы (рис. 1) является то, что она предназначена для идентификации вещества, находящегося в достаточном количестве у исследователя (>0.5-1 г) и обладающего небольшой молекулярной массой (>300-400 а.е.м.). Не умаляя достоинств существующих химических методов микроанализа и отмечая селективность проводимых реакций на функциональные группы, следует признать, что арсенал физических методов, оставляющих исследуемое вещество, как правило, без изменений в процессе эксперимента (методы УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии (VIII) по схеме (Рис. 1), используется не в полной мере. Это касается, прежде всего, высокочувствительного масс-спектрометрического метода (V), роль которого в схеме (Рис. 1) сужается до

\*<sup>1</sup> Понятие идентификации структуры неизвестного органического вещества подразумевает изображение его химической структурной формулы, термин "строение" означает определение геометрии исследуемой молекулы с указанием длин связей, валентных (плоских) и двугранных углов в трехмерном пространстве.

определения молекулярной массы и брутто-состава НС. Установление элементного состава изучаемой молекулы требует применения масс-спектрометра с разрешением ( $M/\Delta M$ ) выше 10000, что не является тривиальной аналитической задачей для исполнителя. Кроме того, понятие НС в рамках схемы (Рис. 1) предполагает соединение, описанное в литературе. К настоящему времени известно более 10 млн. индивидуальных органических соединений природного и синтетического происхождения (сейчас получают примерно 200 тысяч соединений в год и это не предел), для

которых опубликовано большинство физико-химических констант. Существующие системы автоматического поиска структуры НС, основанные на идентичности констант НС с константами вещества-свидетеля, находящимися в памяти ЭВМ, ограничены количеством соединений, не превышающих 100-150 тысяч. Естественно, что при таком подходе можно решать только узкие задачи идентификации НС, ограниченные рамками определения принадлежности соединения к конкретному классу - спирты, кислоты и т.д.

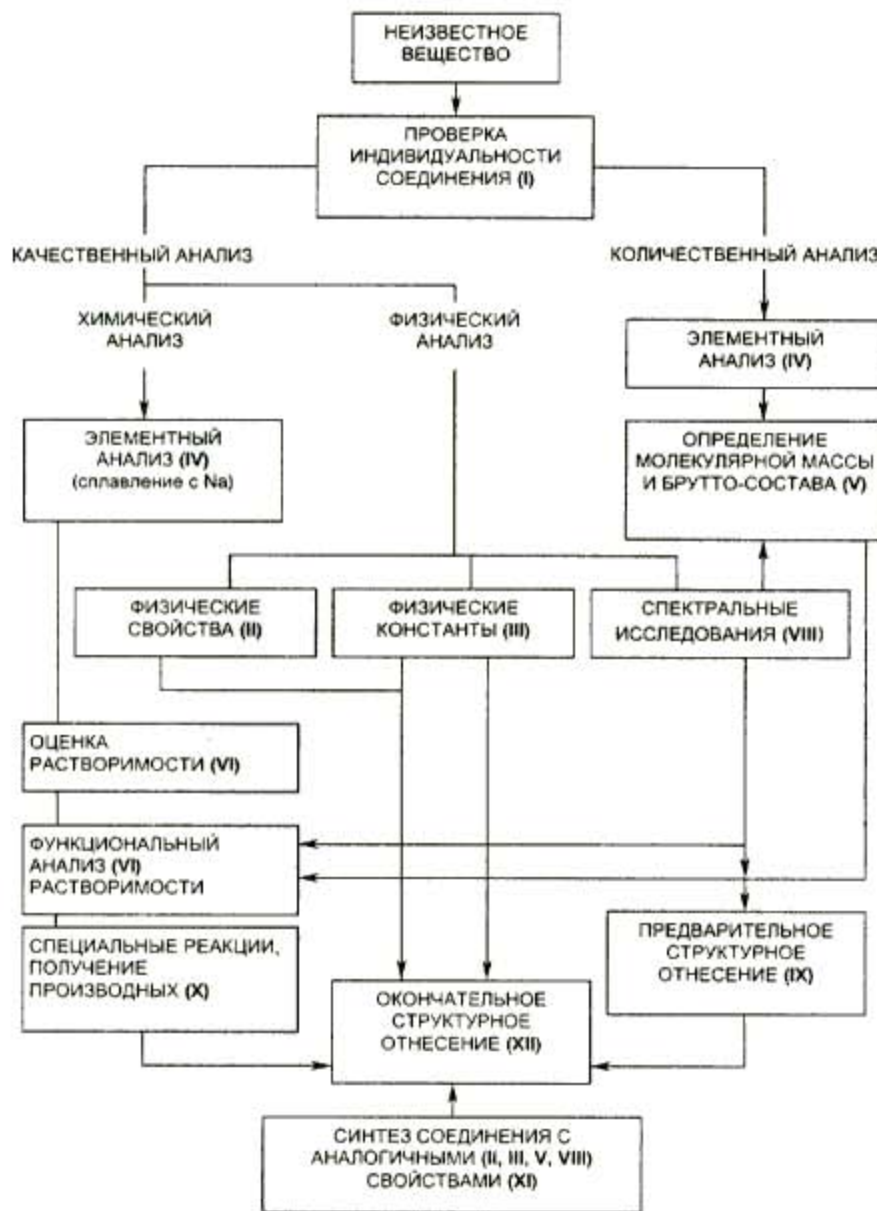


Рис. 1. Схема I идентификации органического соединения

Другим недостатком схемы (Рис. 1) является привлечение большого числа узких специалистов для работы по расшифровке структуры НС.

Глобальные проблемы органического анали-

за (охрана окружающей среды, токсикология, метаболизм лекарственных препаратов, получение высокочистых веществ и др.) требуют развития нового направления в следовом анализе, по-

звляющем производить идентификацию и структурные исследования НС в пределах обнаружения  $10^{-4}$ - $10^{-13}\%$  [5]. В условиях следового анализа предложенная схема (Рис. 1) не работает. Именно методическим вопросам структурной идентификации, проводимой на следовом уровне для НС, посвящен настоящий обзор.

**Понятие "неизвестное соединение".** В термин НС можно вкладывать различную по степени сложности выполняемого вида анализа нагрузку. В экологической (экотоксикологической), медицинской (судебно-медицинской), фармакологической, ветеринарной и других видах практики фиксируется определенный биологический эффект, причиной которого является НС. В этом случае можно выделить три вида аналитических задач: 1) по картине биологического эффекта можно предполагать химическую структуру (класс) НС. К такому виду следового анализа можно отнести идентификацию изомерных тетрахлордибензодиоксинов (или дибензофуранов, дифенилов и т.д.) в различных матрицах (воде, биоте и др.) [6]. В этом случае корректность в определении изомера определяет точное знание его токсичного действия [7] (например, фосфорорганические вещества ингибируют ацетилхолинэстеразу); 2) структура определяемого вещества неизвестна, но выявлен биологический эффект, по которому детектируется вещество в течение его выделения из матрицы и в период проведения анализа. К этой категории НС можно отнести биологические активные вещества, выделяемые из культуральных жидкостей и объектов растительного и животного происхождения; 3) неизвестные вещества, выделенные из объектов зарубежного производства или возникающие в результате различных видов физического и другого воздействия (термолиз, пиролиз, фотолиз, биологическая трансформация и др.) на реакционную массу.

Предпосылкой для указанных выше аналитических задач явились достижения в фундаментальных областях спектроскопии (ИК-Фурье, ГЖХ-ИК, ГЖХ-МС низкого и высокого разрешения, ВЭЖХ-МС, различные виды ионизации [8], новые технические приемы в масс-спектрометрии: МС-МС, техника активации соударениями в различных беспольных областях [9] и др.) и успехи в компьютерной обработке результатов эксперимента [10].

**Сущность нового подхода к расшифровке структуры неизвестного соединения.** Не отвергая комплексного подхода в распознавании структуры НС, предполагается первоначальный

этап изучения НС проводить с установления молекулярной массы вещества и его брутто-состава. Эти манипуляции требуют использования масс-спектрометра (обычно двухфокусного) с  $M/\Delta M$  выше 100000, снабженного источниками с различными видами ионизации. Квадрупольные масс-спектрометры и масс-спектрометры типа "ионная ловушка" мало пригодны для этой цели, т.к. ограничены в разрешении и дают частично искаженные масс-спектры (МС), что не позволяет в полной мере использовать атласы и библиотеку в памяти ЭВМ.

На последующих этапах исследования структуры НС, если позволяет количество пробы, происходит уточнение структуры с применением методов УФ-, ИК-спектроскопии,  $^1H$  и  $^{13}C$ -ЯМР-спектроскопии и др. [12]. Не исключается использование методов химической модификации [13] для уточнения определенных функциональных группировок в структуре НС и их количества.

Критерием выбора метода масс-спектрометрии как основного для цели определения структуры НС служит:

- универсальность метода (возможность применения для структурного анализа значительного круга объектов, независимо от их агрегатного состояния и степени растворимости);
- его высокие метрологические параметры (предел обнаружения - средний р.р.б. =  $1 \cdot 10^{-9}$  г/г, воспроизводимость - средняя 10-15 % относительных);
- оперативность (короткое время анализа и производительность метода).

**Требования к анализируемому образцу неизвестного соединения.** Главным условием успешного анализа образца НС является его индивидуальность. С точки зрения химика индивидуальным можно считать вещество, дающее одно пятно на хроматограмме в разных системах растворителей (вариации по полярности системы) с величиной смещения зоны  $R_f$  в интервале 0,2-0,8 (метод ТСХ). Исследование лучше проводить на пластинках силуфол УФ-254 или Силперл УФ-254, наблюдая люминесценцию пятен при освещении УФ-светом в темноте. Индивидуальным считается твердое вещество, имеющее четкую  $T_{пл}$  в пределах  $1-2^\circ C$ . При перекристаллизации вещества  $T_{пл}$  не должна меняться. Для микроколичеств вещества при определении  $T_{пл}$  используют столик Кофлера. Жидкость считается индивидуальной, если вещество кипит в пределах  $1-2^\circ C$  и не меняет показатель преломления ( $n_d^{20}$ ) в четвертом знаке и плотность ( $d_4^{20}$ ) при повторных перегонках.

Однако в следовом анализе эти условия не выполнимы из-за большого расхода анализируемой пробы. Для этой цели используется масс-спектрометрия низкого разрешения с различными источниками ионизации - электронный удар (ЭУ), химическая ионизация положительных и отрицательных ионов (ХИ-ПИ и ХИ-ОИ соответственно), бомбардировка "быстрыми" атомами (ББА) и другие виды ионизации [8, 16, 17].

Совпадение результатов по определению массового числа ( $m/z$ ) молекулярного иона ( $[M]^+$ ) дает первую аналитическую характеристику НС - его молекулярную массу. Широкий набор методов ионизации необходим для установления конкретного значения массы  $[M]^+$ , что особенно важно при отсутствии элементного анализа. Например, если в масс-спектре ЭУ видна масса меньшая, чем истинная у соединения (проверка с использованием "мягких" методов ионизации - ХИ, ББА, полевая десорбция (ПД)), то априорно можно предполагать, что НС содержит термолабильные связи - амидные, гликозидные и другие и НС относится к классу пептидов, олигосахаров, органических солей и т.д.

При получении масс-спектра НС определяется температурный интервал (запись полного ионного тока ( $\Sigma J$ )), при котором происходит съемка, что дает исследователю приблизительную оценку  $T_{\text{пл}}$  исследуемого вещества. При вакууме  $10^{-7}$  торр температура испарения пробы приблизительно на  $100^\circ\text{C}$  ниже  $T_{\text{пл}}$ . Таким образом, если по масс-спектрометрической оценке  $T_{\text{пл}}$  исследуемого неизвестного вещества лежит ниже  $200-250^\circ\text{C}$ , то для осуществления контроля за чистотой пробы и получения качественного масс-спектра НС можно использовать хромато-масс-спектрометрию. Количество пробы составляет один мкл. Анализ пробы следует проводить на нескольких колонках с фазами с различной полярностью - карбовакс 20М, SE-30, OV-101, DB-5 и др. Кроме того, масс-спектрометрия позволяет использовать еще несколько методических приемов. Первая манипуляция связана со снижением энергии ионизирующих электронов до величины энергии ионизации (примерно 15 эВ). В этом случае в масс-спектре ЭУ проявляются лишь пики  $[M]^+$  или низкоэнергетические перегруппировочные ионы. Другой прием связан с изучением масс-спектров метастабильных ионов, полученных техникой DADI (или MIKES) - для масс-спектров с "обратной" геометрией. Метастабильные спектры получают последовательно от  $[M]^+$  и затем от осколочных ионов. Этот прием является необходимым и в дальнейшем, т.к. достоверно определяет после-

довательность фрагментации  $[M]^+$  и осколочных ионов.

Определить ионы, возникновение которых обусловлено примесью, можно, используя запись ионных токов осколочных ионов в режиме масс-фрагментографии, ведя непрерывное сканирование масс-спектров в условиях линейно-программированного подъема температуры испарения пробы [18, 19].

Еще более желательным (в случае имеющегося тандемного масс-спектрометра - система МС-МС) является использование камеры соударений во втором бесполовом пространстве для выбранных ионов НС [9]. Поступающие в камеру ионы с определенным значением  $m/z$  при столкновении с молекулами применяемого газа распадаются, давая собственный масс-спектр. Этот прием позволяет проследить логическую связь между всеми ионами неизвестного вещества и отбросить (отсортировать) ионы, появление которых обусловлено примесью. Система МС-МС универсальна в отличие от хроматографии, где ограничивающим фактором является летучесть образца, правильность выбора фазы или система элюантов при комбинации ВЭЖХ с масс-спектрометром, где интерфейс - термоспрей (термоструйная распылительная ионизация) или плазмоспрей.

Таким образом, использование масс-спектрометрии на начальных стадиях эксперимента по расшифровке структуры НС позволяет обходиться без привлечения хроматографических методов в оценке индивидуальности анализируемого образца и проводить работу на следовом уровне.

#### Структурная информация, поступающая из первичных масс-спектрометрических данных.

Результаты, полученные из масс-спектрометрического эксперимента, позволяют сделать следующие предварительные выводы о структуре НС:

1. Установить истинную мол. массу неизвестного вещества, фиксируя одно и то же значение  $m/z$  для пика  $[M]^+$  в различных условиях ионизации.
2. Четная масса  $[M]^+$  свидетельствует о четном числе атомов азота в изучаемой молекуле - атомов  $N=0, 2, 4, 6$  и т.д. ("азотное" правило).
3. "Мультиплетность"  $[M]^+$  определяет возможное число атомов Cl, Br, S, Si в брутто-составе молекулы.
4. Найденная изотопная поправка для  $[M]^+$  соответствует приблизительному числу атомов C в брутто-составе молекулы (природный изотоп  $^{13}\text{C}$  равен 1, 107). Ошибка в определении числа C составляет  $\pm 2$  атома [20].

На основании полученных данных по указанным выше четырем пунктам дается предварительная оценка примерного качественного и количественного брутто-состава исследуемой молекулы. Например, НС согласно данным масс-спектрометрии дает пик  $[M]^+$  с  $m/z$  295 (95)\*, его изотопные пики - с  $m/z$  296 и 297 имеют соответственно интенсивность 18 и 1 %. Отсюда следует вывод, что число атомов азота в молекуле нечетное, в ее составе отсутствуют элементы S и Si, а число атомов С примерно равно 17. Тогда брутто-состав неизвестного вещества можно описать следующей формулой (1):  $(12_C \times 17) = 204$ ,  $14_N \cdot 3 = 42$ ,  $16_O \cdot 2 = 32$ , и  $1_H \cdot 17 = 17$ . Исходя из предельного количества атомов водорода для 17 атомов С и с учетом возможных гетероатомов, можно выбрать пределы каждого элемента, ввести их в ЭВМ для последующей съемки масс-спектров высокого разрешения (МСВР):



Второй этап рассмотрения масс-спектров неизвестного вещества включает оценку интенсивности  $[M]^+$ , величины стабильности  $[M]^+$  к ЭУ ( $W_M$ ) и значения селективности ( $S_{1/2}$ ) масс-спектра [20]. Обычно 100 %-ная интенсивность  $[M]^+$  и значение  $W_M$ , лежащее в пределах 10-30% от  $\Sigma J$ , а также высокая селективность спектра  $S_{1/2}$  (в пределах 3-6) свидетельствуют о том, что вещество обладает ароматическим характером. Наличие в масс-спектре интенсивного пика двузарядного  $[M]^{2+}$  позволяет отнести структуру к л-донорным (азолям) или к л-акцепторным ароматическим системам (азинам) [22]. Высокая интенсивность иона  $[M-H]^+$  в масс-спектре ХИ-ОИ и средняя интенсивность того же иона  $[M+H]^+$  в масс-спектре ХИ-ПИ свидетельствуют о высоком сродстве молекулы (атомов в молекуле) к электрону [23]. Можно полагать, что исследуемая молекула будет содержать много электроотрицательных атомов: Cl, O,  $NO_2$  и др. Знание путей фрагментации  $[M]^+$  и осколочных ионов (по спектрам DADI или с помощью техники МС-МС) позволяет сделать заключение о характере заместителей или целых группировок в структуре неизвестного вещества. Например, элиминирование частицы в 19 а.е.м. дает однозначный ответ в пользу присутствия атома фтора в составе молекулы. Отрыв частицы в 16 а.е.м., как правило, характеризует N-окиси. Фиксирование в масс-спектре электронного удара ионов  $[M-30]^+$  и  $[M-46]^+$  специфично для нитросоединений.

Таким образом, применение масс-спектрометрии на первом этапе позволяет получать струк-

турную информацию для НС на следовом уровне, которую не дает ни один из методов.

Использование данных масс-спектров высокого разрешения. МСВР позволяют измерять массу иона с точностью до  $\pm 0,005-0,00005$  а.е.м. в зависимости от возможностей прибора. МСВР могут быть получены для веществ в условиях ионизации ЭУ, ХИ-ПИ, ХИ-ОИ и ББА и даже в режиме ХМС эксперимента. Таким образом, приобретение количественной информации о брутто-составе  $[M]^+$  и осколочных ионов возможно как для термоллабильных, так и полярных соединений. Ранее такой эксперимент не был доступен. МСВР могут быть измерены фактически для всех ионов, имеющих в масс-спектре НС.

Продолжая интерпретацию структуры НС с  $m/z$  295, провели измерения точных масс для  $[M]^+$  и ряда осколочных ионов. Для  $[M]^+$  точная масса равна 295, 1348 ( $M/M = 10000$ ). Вкладывая в компьютер параметры формулы (1), найденные ранее из масс-спектра низкого разрешения, получаем следующие варианты брутто-молекул неизвестного соединения (Табл. 1).

Таблица 1

Формула (2)

Измерено:	Ошибка	Элементы и их число			
	$\Delta$	С	Н	N	O
295,1348	2,7	17	17	3	2
	3,5	19	19	0	3

Из двух возможных вариантов последний вариант формулы (2) не корректен, т.к. НС имеет нечетную мол. массу. Отсюда следует единственный вывод - брутто-состав НС описывается формулой -  $C_{17}H_{17}N_3O_2$

Далее рассматриваем первичные осколочные ионы. Масс-спектр метастабильных ионов (DADI) указывает на прямой отрыв частицы в 73 а.е.м. от  $[M]^+$ . МСВР, измеренный для осколочного иона с  $m/z$  222, показывает точную массу, равную 222, 1014. ЭВМ дает следующий вариант возможных структурных формул для этого осколочного иона (Табл. 2):

Таблица 2

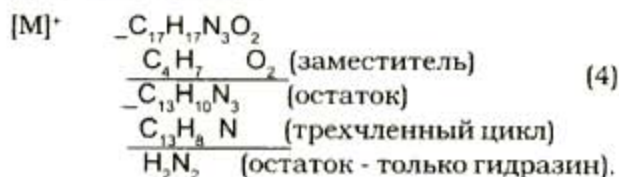
Формула (3)

Измерено:	$\Delta$	С	Н	N	O	Элиминируемые осколки
222,1014	-1,7	14	12	3	0	$C_3H_5O_2$
	-3,0	16	14	0	1	$CH_3N_3O$
	1,0	11	14	2	3	вариант не корректен

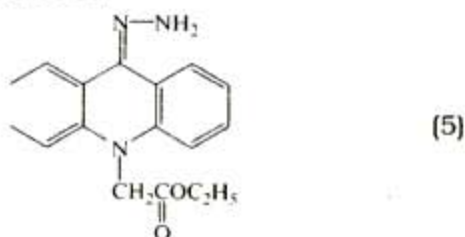
\* В скобках указана относительная интенсивность ( $\kappa J_{max}$  в масс-спектре) пика иона

В этом случае последний вариант не корректен, т.к. изначальная брутто-формула данного соединения не содержит трех атомов кислорода. Трудно представить структуру остатка при прямом элиминировании частицы  $\text{CH}_3\text{N}_3\text{O}$  из  $[\text{M}]^+$ . Поэтому можно предположить, что первый вариант наиболее реален и элиминируемый фрагмент будет иметь следующие структурные формулы:  $\text{C}_2\text{H}_5\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$  или  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(=\text{O})^-$  или  $\text{CH}_3\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2^-$  или  $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2^-$ . Известно, что кетоны и сложные эфиры имеют тенденцию к разрыву  $\alpha$ -связи относительно карбонильной группы, поэтому две последние структуры не реальны (нет в масс-спектре ионов  $[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$  или  $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CO}]^+$ ). В дальнейшем, используя метастабильные спектры и данные МСВР, можно сделать следующие выводы:  $[\text{M}]^+$ ,  $m/z 295 \rightarrow m/z 280$   $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ ,  $295 \rightarrow m/z 267$   $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$  (перегруппировка Мак-Лафферти),  $295 \rightarrow m/z 251$   $[\text{M}-\text{OC}_2\text{H}_4]^+$ ,  $m/z 295 \rightarrow 222$   $[\text{M}-\text{COOC}_2\text{H}_5]^+$  и  $m/z 295 \rightarrow m/z 208$   $[\text{M}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5]^+$ . В итоге заместитель имеет структуру:  $-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ . Дополнительно из спектра низкого разрешения следует:  $m/z 77$   $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ ,  $m/z 152$   $[\text{бифенилен}]^+$ , видны групповые характеристики ароматических соединений:  $m/z 77$  и  $152$ , трицикла -  $m/z 165$  и известен заместитель.

В итоге проведенного анализа с НС имеем следующую картину:



С учетом данных УФ-спектроскопии, как вспомогательного метода для НС получены следующие характеристики ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lambda_{\text{g}}\Sigma$ )): 232(4.74), 292(3.90), 373(3.94). Анализ полос поглощения показывает, что УФ-спектр не отвечает трехчленной структуре типа бензохинолина (акридина), а похож на трехчленную структуру хинойного типа. Совокупность приведенных и проанализированных данных предполагает возможность существования лишь одной структуры для НС: 9-гидразиноминно-10-карбэтоксиметилакридана (только акридановая структура может обеспечить появление ионов с  $m/z 152$  и  $165$ ).



**Использование дополнительных методов.** Из приведенного примера видно, какими структурными возможностями обладает только один метод масс-спектрометрии, оснащенный современной техникой. Однако следует признать, что в этом случае нам необходим дополнительный независимый контроль, позволяющий корректировать интерпретацию. При анализе НС необходимо учитывать визуальные характеристики: фазовое состояние вещества, его цвет и запах. Сопоставляя внешние признаки со знанием брутто-состава НС, можно мысленно отвергнуть целый ряд структурных вариантов. Например, в отсутствие цвета для соединений с большой молекулярной массой можно с достаточной степенью вероятности предполагать наличие многокольчатых циклоалкановых структур - типа стероидных. Наоборот, глубокое окрашивание НС при фиксировании в масс-спектре ЭУ незначительных по массе ( $<200$  а.е.м.) ионов свидетельствует в пользу комплекса органического лиганда с металлом. Визуальные характеристики не требуют расхода пробы. В случае, когда количество НС достигает 0,1 г, возможно применение большинства спектральных методов (возможно избирательное применение). Методы УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии дают проверяющую и уточняющую информацию и характеристики, что заметно повышает достоверность получаемой структурной информации.

С учетом высказанных выше пожеланий схема II идентификации НС должна выглядеть следующим образом (Рис.2).

**Расшифровка структуры с привлечением ЭВМ.** В рамках автоматизации научных исследований ставится задача ускорения и облегчения интерпретации спектроскопических данных, в частности результатов масс-спектрометрического эксперимента.

В настоящий момент для автоматизированной расшифровки масс-спектров применяются три подхода:

1) использование аддитивных свойств при интерпретации молекулярной массы с применением четырнадцатиричной системы счисления массовых чисел и выявление гомологической серии;

2) использование библиотеки данных полных масс-спектров (поиск с помощью ЭВМ);

3) использование системы искусственного интеллекта, в котором данные масс-спектрометрии служат органичным дополнением к результатам, получаемым из других видов спектроскопии.

Критически рассмотрим возможности каждо-

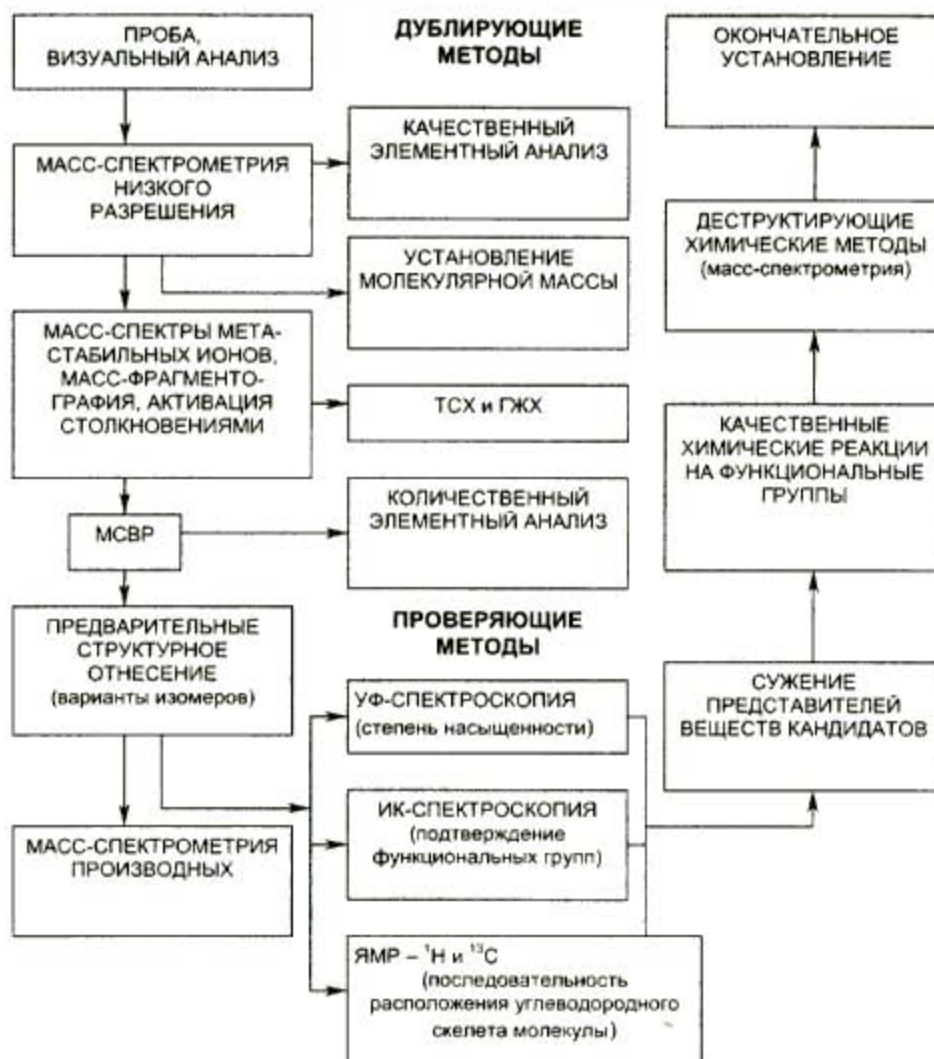


Рис. 2. Схема II идентификации неизвестного соединения

го подхода в решении задачи по установлению строения НС.

Первый подход развивался в нашей стране усилиями Зинкевича И.Г. и Иоффе Б.В. [24,25]. Прототипом этого метода служит классификация органических соединений по масс-спектрам ионных серий. Этот прием ранее широко использовался в структурно-групповом анализе [21]. Пользуясь различными видами гомологии в органической химии, любое массовое число, в том числе и  $[M]^+$ , можно записать в виде функции  $M=f(X,Y)$ , где  $X$  и  $Y$  - целые числа, в свою очередь полученные через функцию  $X=E(M/14)$  и  $Y=M-14E(M/14)$ , где  $E$  - функция, означающая часть числа. Все многообразие химических соединений в этом случае подразделено на 14 крупных таксономических категорий ( $0 \leq Y \leq 13$ ). Ясно, что заключить все многообразие органических веществ в 14 групп невозможно (напр., в гомологическую группу 1 входят алканы, нафталины, кетоны и т.д.). Подобный подход имеет успех лишь

при интерпретации простых соединений, но не полифункциональных веществ.

Наличие системы библиотечного поиска у исследователя полностью заменяет разработанный подход. Предложенная система интерпретации не делает выбора между изомерами [18,19], она не учитывает возможностей специфических перегруппировочных процессов (напр., "явление орто-эффекта" в масс-спектрометрии), протекающих в условиях ионизации ЭУ. Эта система не использует всей информации, поставляемой масс-спектрометрическим экспериментом - исключает другие виды ионизации, спектры метастабильных ионов, двузарядные ионы и др. В ее основе заложено лишь значение массового числа и его интенсивность ( $J \geq 10\%$  от  $J_{\text{макс}}$ ). Негативной стороной "библиотечного поиска" является то, что в масс-спектр НС попадают пики ионов от фазы хроматографической колонки, которые учитываются при сравнении полученного спектра с масс-спектром из библиотеки.

Учитывая факт невозможности прогнозирования масс-спектра (решение обратной спектральной задачи из-за отсутствия строгой теории в описании масс-спектра), многие исследователи идут по пути создания банков масс-спектров. Такие базы данных имеются в нашей стране и за рубежом (например, в Англии - центр масс-спектрометрических данных находится под руководством Министерства обороны Aldermaston, Reading, Berks). К 1985г. банк содержал 1,2 млн. структур и около 5 млн. сведений об их свойствах, реакциях и области применения (пакетный режим и телеступ [26,27]). Годовой объем базы - 300 тыс. сведений о структуре в год.

В научно - информационном центре по молекулярной спектроскопии НИОХа (Новосибирск) создана система "Компас-МС", базирующаяся на машинной библиотеке полных масс-спектров и структуры органических соединений (~25000 масс-спектров). Система оперирует с несколькими файлами и построена по модульному принципу, что позволяет легко расширять ее путем добавления новых программ и файлов. Эта система может давать информацию по массовым числам и их интенсивности, вести статический анализ масс-спектров, обладающих заданными структурными особенностями, с целью выявления общих спектральных признаков. База данных занимает 17 Мбайт внешней памяти [28, 29, 30]. Возможности таких программ также ограничены, прежде всего незначительностью информации в самом банке (10 млн. органических соединений - см. выше). Следует также отметить, что искажение МС-ЭУ, полученное в режиме хромато-масс-спектрометрии (ХМС), по сравнению с МС-ЭУ, зарегистрированного при прямом вводе пробы в ионный источник масс-спектрометра, также понижает результативность интерпретации по библиотечному поиску [31].

Наиболее перспективным направлением поиска структуры неизвестного соединения является построение интерпретирующей системы искусственного интеллекта. Ее реализуют на базе данных молекулярной спектроскопии (комплекса данных - программы РАСТР, МАИСС) [31]. Для реализации такой системы необходимо решить четыре типа задач: 1) выявление структуры молекулы; 2) интерпретация молекулярного спектра; 3) прогнозирование спектра и 4) поиск спектро-структурной информации. Выше мы уже обсуждали вопрос о том, что прогнозирование масс-спектра в отсутствие теории его образования не корректно. Интерпретация масс-спектра без данных масс-спектрометрии высокого разрешения

и метастабильных спектров также невозможна. Роль масс-спектрометрии в системе искусственного интеллекта в настоящий момент ограничена и сведена к роли естественного фильтра, ограничивающего число рассматриваемых вариантов структурных формул. За рубежом, однако, существуют системы искусственного интеллекта для распознавания структуры на основе масс-спектрометрической информации. Наибольшую известность получили системы "DENDRAL", "STIRS" и "CHEMIC" [31]. Программы рассчитаны на расшифровку структур у НС с мол. массой не более 300 а.е.м.

Слабость автоматизации процессов структурной идентификации НС на сегодняшний день не должна вселять пессимизм у исследователя, т.к. за этим направлением - будущее.

#### Примеры использования предложенной методики установления структуры.

Представлены результаты по интерпретации данных, полученных при установлении строения НС (**XIII**), которая установлена при расщеплении молекулы неизвестного состава при обработке  $N(Bu)_4^+OH^-$  в ДМСО. Эта часть молекулы получила название батуминовой кислоты [32].

Из масс-спектров полевой десорбции (МСПД) и МСВР была определена молекулярная масса (М.м.) и брутто-состав (**XIII**). МСПД показал, что максимальная М.м. (**XIII**) не выше 347 а.е.м. - проявляется пик протонированного молекулярного иона  $[M+1]^+$  с  $m/z$  347. МСВР определил брутто-состав (**XIII**) -  $C_{22}H_{34}O_3$  (найдено 346, 2519, рассчитано 346, 2508).

Прежде всего необходимо было выявить функциональные свойства трех атомов кислорода в структуре молекулы (**XIII**) (рис.3).

Батуминовая кислота обрабатывалась эфирным раствором диазометана с образованием продукта (**XIV**), а также смесью анилина, дициклогексилкарбодимида и 4-диметиламинопиридина в среде ацетона с выделением продукта (**XV**). В полученных соединениях (**XIV**) и (**XV**) были зафиксированы пики  $[M]^+$  с  $m/z$  360 и 421 соответственно. Их брутто-состав, согласно данным МСВР, соответствовал  $C_{23}H_{36}O_3$  (найдено 360, 2647, рассчитано 360, 2664) для соединения (**XIV**) и  $C_{28}H_{39}NO_2$  (найдено 421, 2974, рассчитано 421, 2981) для соединения (**XV**).

Получение метилового эфира (**XIII**) (соединение **XIV**) и анилида (**XIII**) (соединение **XV**) свидетельствовало о наличии карбоксильной группировки в структуре молекулы (**XIII**). Это подтверждает и характер фрагментации  $[M]^+$  соединения (**XIV**). В масс-спектре (**XIV**) фиксируются ионы с



$m/z$  329 -  $(M-OCH_3)^+$ , 301 -  $(M-COOCH_3)^+$  и 300 -  $(M-HCOOCH_3)^+$  - типичные для диссоциативной ионизации жирных кислот.

Таким образом, два атома кислорода из состава (**XIII**) входят в функциональную карбоксильную группировку. Относительно третьего атома кислорода можно предположить, что он входит в

состав концевой метилкетонной группировки, учитывая путь выделения (**XIII**) путем реакции ретроальдольного расщепления антибиотика неизвестного состава.

Для подтверждения этого предположения провели восстановление (**XIII**) в этаноле боргидридом натрия (рис.3).

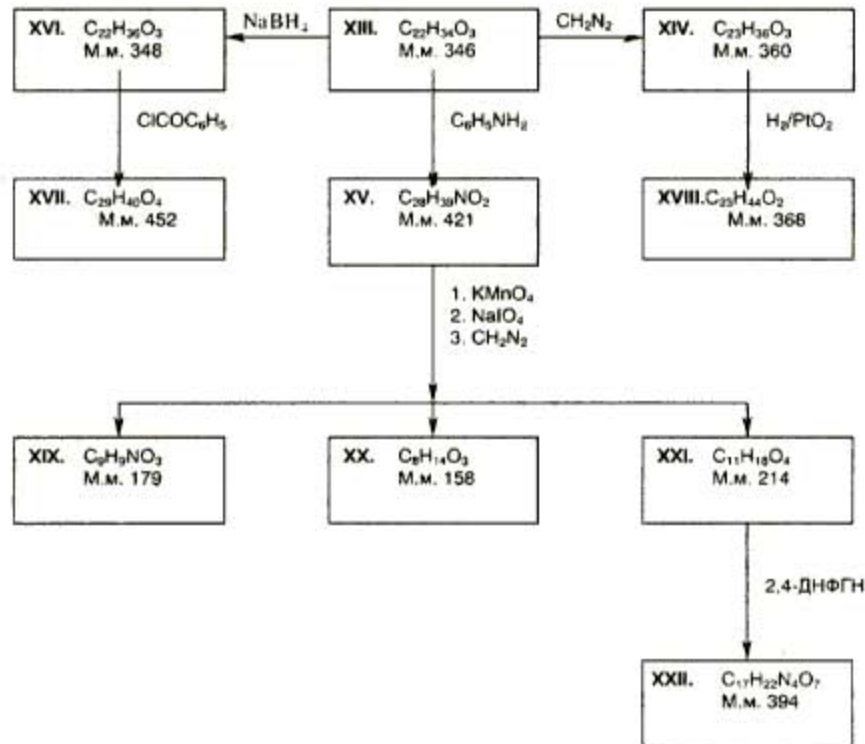
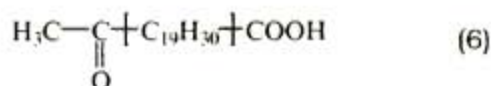


Рис. 3. Схема выявления функциональных свойств

В масс-спектре соединения (**XVI**) зарегистрировали пик  $[M]^+$  с  $m/z$  348. Последовательное отщепление двух молекул  $H_2O$  из  $[M]^+$  соединения (**XVI**) - пики ионов с  $m/z$  330 и 312 - подтверждало наше предположение о том, что концевым фрагментом молекулы (**XIII**) является метилкетонная группировка (элиминирование одной молекулы воды связано с карбоксильной группой в соединении (**XIII**)). Действительно, в масс-спектре продукта (**XIII**) были видны ионы с  $m/z$  43 -  $(COOH_3)^+$  и  $m/z$  303 -  $(M-COCH_3)^+$ . Дополнительно продукт (**XVI**) был бензоилирован (соединение **XVII**) хлористым бензоилом в среде пиридина и ацетона. Измеренное точное значение массы для  $[M]^+$  соединения (**XVII**) показало брутто-состав  $C_{29}H_{40}O_4$  (найдено 452, 2907, рассчитано 452, 2916). Исходя из этих данных строение батуминовой кислоты можно представить структурой:

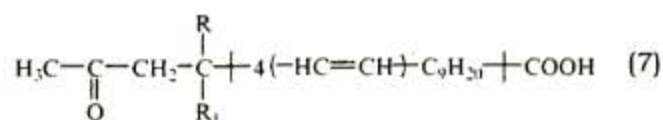


Найденная на основании МСВР эмпирическая формула соединения (**XIII**)  $C_{22}H_{34}O_3$  указывает на наличие 6 инкрементов ненасыщенности в исследуемой молекуле, два из которых приходилось на карбонильную и карбоксильные функции. Чтобы решить вопрос о количестве  $\pi$ -связей в соединении (**XIII**), этанольный раствор (**XIV**) гидрировали водородом в присутствии  $PtO_2$ . Зарегистрированный пик  $[M]^+$  соединения (**XVIII**) (схема 3) имеет  $m/z$  368 (октагидропроизводное XIV), что автоматически доказывает содержание четырех гидрируемых  $-C=C-$  связей в продукте (**XIII**).

Обнаруженное прямое элиминирование молекулы ацетона из  $[M]^+$  соединения (**XIII**) (доказано техникой DAD), происходящее с миграцией атома водорода по механизму перегруппировки Мак-Лафферти, с большой очевидностью свидетельствует о месте разветвления углеводородной цепи в молекуле (**XIII**), т.к. в процессе отщепления ацетона из  $[M]^+$  - процесс более интенсивный (найденно 288, 2047, рассчитано для формулы  $C_{19}H_{28}O_2$

- 288, 2089), чем элиминирование ацетильного остатка ( $m/z$  303).

Совокупность этих данных дает основание предположить, что структура соединения (**XIII**) описывается формулой:



где R, R<sub>1</sub> - H или CH<sub>3</sub>.

Дальнейшее рассмотрение масс-спектра продукта (**XIII**) показывает (техника DADI), что вторичные процессы фрагментации иона  $[\text{M}-\text{CH}_2\text{COCH}_3]^+$  связаны с элиминированием частиц CH<sub>3</sub> и C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>. Поэтому можно утверждать, что один из заместителей R или R<sub>1</sub> (формула (7)) представляет собой H, другой является CH<sub>3</sub> группой.

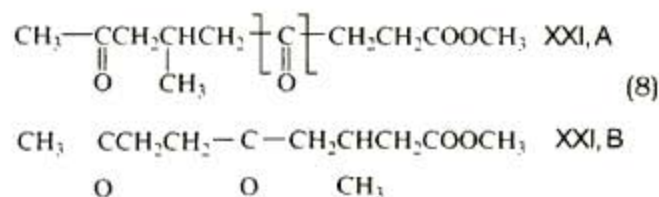
Таким образом, остается нерешенным вопрос о расположении л-связей в углеводородной центральной части молекулы (**XIII**). Поэтому нами было проведено окислительное расщепление двойных связей в соединении (**XV**) по методу Лемье-Рудольфа. Удалось выделить три кислоты, которые были переведены в соответствующие метиленовые эфиры для получения высокоинтенсивных пиков  $[\text{M}]^+$  в условиях электронного удара (рис. 3).

Первая из них (соединение (**XIX**)) дает в масс-спектре пик  $[\text{M}]^+$  с  $m/z$  179 и имеет брутто-состав C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub> (найдено 179, 0573, рассчитано 179,0580). Фиксация в масс-спектре осколочных ионов (брутто-состав которых подтвержден данными МСВР) с  $m/z$  120- $[\text{M}-\text{COOCH}_3]^+$ , 92- $[\text{NHC}_6\text{H}_5]^+$ , 59- $[\text{H}_3\text{COCO}]^+$  однозначно указывает структуру соединения (**XIX**), представленную как метиловый эфир моноанилида щевелевой кислоты.

Метиловый эфир второй кислоты (**XX**) дает в масс-спектре пик  $[\text{M}]^+$  с  $m/z$  158. Его брутто-состав по данным МСВР - C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> (найдено 158, 0926, рассчитано 158, 0943). Характер его фрагментации, рассмотренный с помощью МСВР и спектров метастабильных ионов, доказывает строение продукта (**XX**) - метиловый эфир 3-метил-5-кетогексановой кислоты. В масс-спектре (**XX**) фиксируются осколочные ионы с  $m/z$  127- $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ , 101- $[\text{M}-\text{CH}_2\text{COCH}_3]^+$ , 100- $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COCH}_3]^+$ , 99- $[\text{M}-\text{COOCH}_3]^+$ , 85- $[\text{M}-\text{CH}_2\text{COOCH}_3]^+$ , 74- $[\text{CH}_3\text{COOCH}_3]^+$ , 58- $[\text{CH}_3\text{COCH}_3]^+$ . Для ионов с  $m/z$  100, 74 и 58 миграция водорода осуществлялась в соответствии с перегруппировкой Мак-Лафферти.

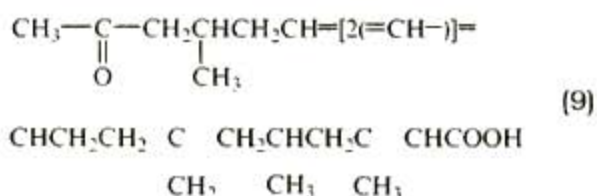
Третий метиловый эфир кислоты (**XXI**) имел  $[\text{M}]^+$  с  $m/z$  214. Его брутто-состав C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> (найдено 214, 1217, рассчитано 214, 1205). Из четырех

атомов кислорода, входящих в состав молекулы (**XXI**), два атома принадлежат карбоксильной группе, а два - кетонной. Этот вывод следует из общих положений фрагментации ациклических кетонов (α-разрыв относительно карбонильных групп). В масс-спектре (**XXI**) фиксируются осколочные ионы с  $m/z$  71, 87, 99, 115, 127, 143, образование которых может быть обусловлено двумя альтернативными структурами А и Б (нами принималась во внимание способность алифатических осколочных ионов дегидрировать в условиях ионизации):



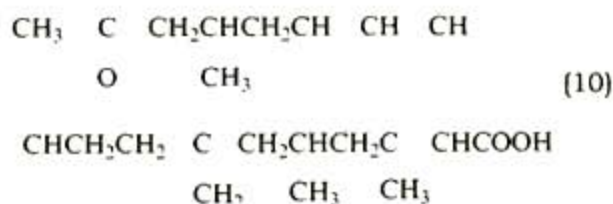
Чтобы решить, какая из двух предложенных структур является верной, мы получили основание Шиффа, проведя реакцию соединения (**XXI**) с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГН) - (см. рис.3). Было выделено вещество (**XXII**) с М.м. 394 (МСВР: найдено 394, 1496, рассчитано для C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> - 394, 1489). Из полученных данных следовало, что реакция осуществляется лишь по одной кето-группе. Первичным актом элиминирования из  $[\text{M}]^+$  является отщепление частицы в 87 а.е.м. состава C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub> (найдено 307, 1021, рассчитано для C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> - 307, 1043). Фиксация осколочных ионов с  $m/z$  279 состава C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (МСВР) и  $m/z$  115 состава C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub> (МСВР) строго доказывает положение карбонильной группировки, не вступившей в реакцию с 2,4-ДНФГН. Отсюда следует вывод, что метиловый эфир последней из трех кислот имеет строение (**XXI, A**) - метилового эфира 6-метил-4,8-дикетононановой кислоты.

Проделанный путь дериватизации и деструкции соединения (**XIII**) позволил установить строение структурных фрагментов этого продукта и описать его следующей формулой:



Два оставшихся метиленовых атома углерода, исходя из структурной формулы соединения (**XIII**), можно расположить, лишь образуя сопряженную диеновую группировку. Отсюда следует,

что батуминовая кислота имеет строение 3.5.15-триметил-7-метилен-17-кето-2,10,12-триеноктановой кислоты:



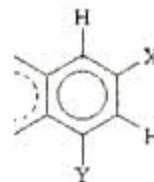
Проведенное масс-спектрометрическое исследование гарантирует структуру батуминовой кислоты (формула (10)) без учета ее пространственного строения.

Второй пример связан с расшифровкой формулы НС (количество 0.5 г) неизвестного происхождения. НС представляет собой желтовато-оранжевый кристаллический порошок без запаха. Индивидуальность рассматриваемого соединения проверялась с помощью метода ТСХ (в бензоле - Rf=0.2; в  $\text{CHCl}_3$  Rf=0.24; на пластинках Silufol UV -254 ЧССР, обнаружено в УФ-свете). Видимых примесей не обнаружено.

По данным элементного анализа, НС имеет: С-66.10, Н-4.36, N-11.44 и О-18.10 (при n=4 брутто-состав  $\text{C}_{34}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7$ ). Как видно, данные элементного анализа неоднозначны. В УФ-спектре проявляются следующие полосы поглощения (раствор в MeOH): нейтральная среда -  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lambda_{\text{g}}\Sigma$ ) -219 нм (4,19), 278-286 нм (4,15), 370-380 нм (4,11). Аналогичный УФ-спектр получен при подкислении раствора. При подщелачивании раствора возникла дополнительная широкая полоса поглощения с  $\lambda_{\text{max}}$  около 450 нм (3,91). В ИК-спектре наблюдались следующие полосы поглощения ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3450 (широкая), 3320 (широкая), 3220 (широкая) - все  $\lambda_{\text{втр.амин}}$  или  $\lambda_{\text{CONHR}}$ ; не исключено присутствие ОН-группы фенольного типа; 3060 -  $\lambda_{\text{СНаром}}$ ; 2920 и 2840 - (слабые) -  $\lambda_{\text{N-CH}_3}$ ; 1650 -  $\lambda_{\text{амид}}$  или  $\lambda_{\text{CO}}$  (хиноидный); 1600, 1490, 1430 (сильные) - колебания ароматического ядра, не исключается наличие связи  $\lambda_{\text{C=N}}$  в ароматическом цикле; 1543 и 1333 (сильные) -  $\lambda_{\text{NO}_2}$ ; 1395, 1170, 1145, 1089, 1010, 790, 765, 730, 700 (деформационные полосы при 765 и 730  $\text{cm}^{-1}$  указывают на 1,3-замещение бензольного ядра).

В спектре ПМР (растворитель ДМСО- $d_6$ , стандарт ТМС,  $\delta$ -шкала) регистрируются сигналы ароматических протонов: сложные мультиплеты в области 7.0-8.2 м.д. и два дублета с химическими сдвигами 8.98 и 8.92 м.д. и мета-константой спин-спинового взаимодействия  $J=2.9$  Пц. В слабом поле спектра наблюдаются уширенные сиг-

налы двух протонов NH-групп с химическими сдвигами 10.92 и 10.87 м.д. При повышении температуры образца до 80°C происходит смещение этих сигналов в сильное поле, сдвиги соответственно уменьшаются до 10.67 и 10.73 м.д. Значения хим. сдвигов и константы спин-спинового взаимодействия дублетов АВ-системы свидетельствуют о наличии в молекуле анализируемого соединения структурного фрагмента, в котором Х и У - электронно-отрицательные заместители.



Интегральная интенсивность сигналов в спектре ПМР соответствует наличию в молекуле  $21 \pm 2$  атомов водорода.

Совокупность спектроскопических данных не позволяет сделать даже приблизительный вывод о структуре НС. Вместе с тем вносятся противоречивые показания: по спектрам  $^1\text{H}$ -ЯМР мы имеем  $21 \pm 2$  атомов Н, а по  $^{13}\text{C}$ -ЯМР видны 34 сигнала (сравните с данными анализа); по УФ-спектру батохромное смещение при подщелачивании указывает на ОН-группу, а ИК-спектр - реальное существование амидных связей.

В масс-спектре ЭУ регистрируется пик  $[\text{M}]^+$  с  $m/z$  478 (рис.5). Найденная экспериментальная изотопная поправка 31,84% и 30,89% (из двух измерений) соответствует 28 или 29 атомам С. Четное массовое число  $[\text{M}]^+$  указывает на четное число атомов азота в составе исследуемой молекулы ("азотное правило"). Таким образом, брутто-состав  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_5$ , равный 481 а.е.м., ближе всего соответствует масс-спектрометрическим данным. В масс-спектрах ХИ-ОИ и ХИ-ПИ регистрируется соответственно ион  $[\text{M}-\text{H}]^+$  с  $m/z$  477 и  $[\text{M}+\text{H}]^+$  с  $m/z$  479. Эти данные позволяют утверждать, что молекула НС имеет молекулярную массу 478 а.е.м.

Общая картина фрагментации НС выглядит достаточно селективной (Рис.5), что предполагает возможность строения исследуемого соединения в виде отдельных арильных или гетерильных блоков (фрагментов), соединенных между собой или непосредственно через С-С межъядерную связь или через гетероатом, не содержащий алкильных заместителей согласно данным ЯМР.

Для пика  $[\text{M}]^+$  было измерено точное массовое число - 478,1300, что с учетом ошибки ( $\Delta=2.3$ ) соответствовало брутто-составу  $\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$  (табл.3).

Таблица 3

Масс-спектр высокого разрешения неизвестного соединения

Ион	Измеренное точное значение массы	Ошибка $\Delta$	Брутто-состав иона	Вывод
$[M]^+$	478,1300	2,3	$C_{27}H_{18}N_4O_5$	
$[M-33]^+$	445,1161	-2,7	$C_{29}H_{17}N_2O_4$	Примесь
		3,8	$C_{27}H_{17}N_4O_1S_1$	Примесь
$[M-34]^+$	444,1141	3,1	$C_{29}H_{16}N_2O_4$	Примесь
		-2,9	$C_{29}H_{18}N_3O_1S_1$	Примесь
$[M-107]^+$	371,0346	3,2	$C_{22}H_{11}O_4$	Примесь
$[(M-34)-73]^+$		3,3	$C_{22}H_{13}N_1O_1S_2$	Примесь
$[M-142]^+$	336,0660	3,9	$C_{17}H_{10}N_3O_5$	
$[M-176]^+$	302,0544	3,0	$C_{18}H_{10}N_2O_1S_1$	Примесь
		-3,5	$C_{19}H_{10}O_4$	Примесь
		-2,1	$C_{17}H_8N_3O_3$	Примесь
$\Phi, [(M-142)-NO_2]^+$	290,0663	-2,8	$C_{17}H_{10}N_2O_3$	
$[\Phi-NO_2]^+$	244,0731	-3,1	$C_{17}H_{10}NO$	
$[(\Phi-NO_2)-COH]^+$	215,0738	0,3	$C_{16}H_9N_1$	
	143,0718	-1,7	$C_{10}H_9N_1$	
	115,0554	0,6	$C_9H_7$	

Как следует из данных МСВР, пики осколочных ионов с  $m/z$  445, 444, 371 и 302 принадлежат другому веществу (примеси). Действительно, отрыв частиц в 33 и 34 а.е.м. из  $[M]^+$  может быть связан лишь с отщеплением частиц SH или SH<sub>2</sub>, но элементный анализ не обнаружил следов серы.

Для уточнения факта присутствия примеси в образце и выяснения механизма фрагментации использовались спектры метастабильных ионов. Нами была применена техника DADI. Дополнительно проведено исследование с помощью ВЭЖХ. Детектирование осуществлялось при трех длинах волн: 280 нм, 370 нм и 411 нм (по данным УФ-спектроскопии) для НС. Было обнаружено две примеси с временем выхода ( $t_{\text{вых}}$ ) с колонки - 2,18 и 4,18. Основное вещество имеет  $t_{\text{вых}}$ , равное 4,90.

Было показано с помощью метастабильных спектров, что направления распада  $[M]^+ \rightarrow m/z$  444 и  $[M]^+ \rightarrow m/z$  371 не существует. Картина фрагментации НС описывается следующей схемой (рис. 4).

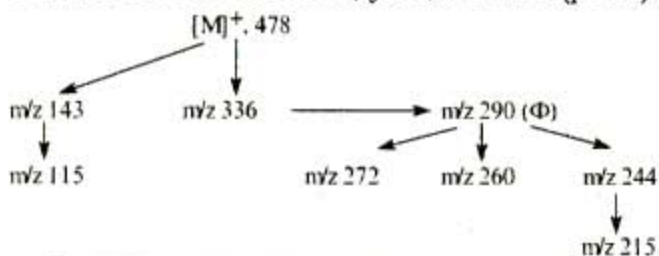
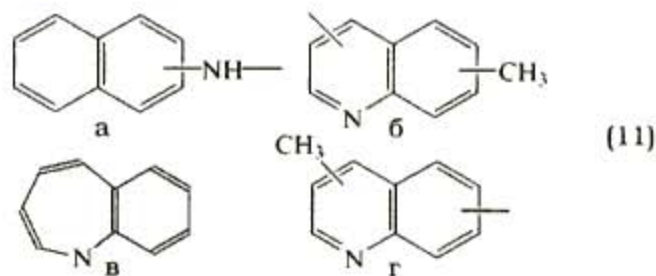


Рис.4. Схема фрагментации неизвестного соединения

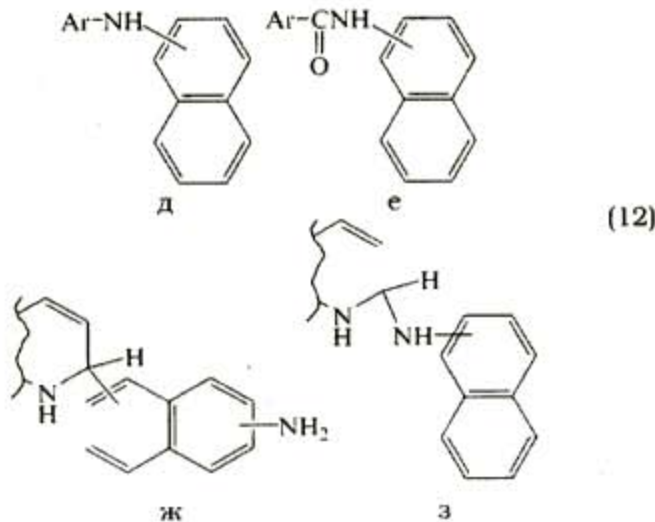
Таким образом, ионы с  $m/z$  445, 444, 371 и 302 принадлежат не НС, а его примеси (присутствие примеси подтвердилось спектрами <sup>13</sup>C-ЯМС и ВЭЖХ, но не было обнаружено ТСХ).

Как следует из масс-спектров метастабильных ионов, на первом этапе фрагментации  $[M]^+$  происходит отщепление частицы в 142 а.е.м. Ее брутто-состав (табл.3) соответствует  $C_{10}H_9N_1$ . Этот фрагмент, судя по формуле, является арильным или гетарильным. Регистрация осколочного иона с  $m/z$  143 состава  $[C_{10}H_9N_1]^+$  (табл.3) предполагает миграцию атома водорода при элиминировании частицы в 142 а.е.м. из  $[M]^+$ . Совокупность этих данных позволяет считать, что строение данного фрагмента может быть описано следующими арильными и гетарильными структурами (а-г):

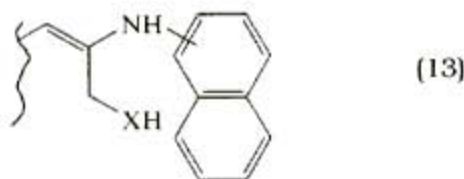


Возможность существования структурного фрагмента хинолинового (или изохинолинового)

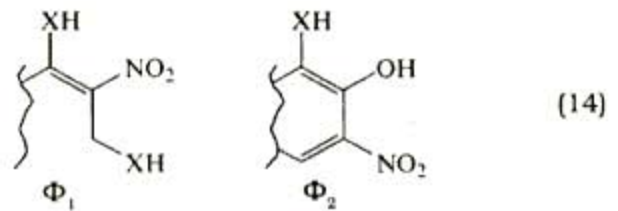
типа (форма-б,в) исключается (данные спектроскопии ЯМР). Вряд ли возможно ожидать и существование азепиновой структуры (г) - (данные ЯМР). Остается лишь один возможный вариант - это  $\alpha$ - или  $\beta$ -аминонафталин. Выяснить характер замещения у вторичного иона в условиях миграции атома водорода вряд ли возможно, но сам вопрос возможной миграции водорода вызывает интерес. Можно предположить следующие системы, с учетом имеющихся данных литературы (д-з):



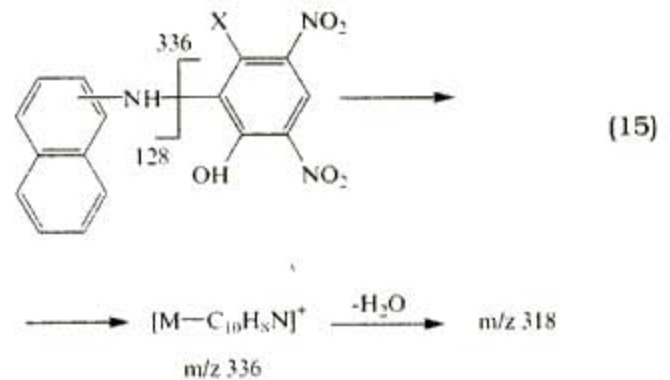
Анализ данных литературы показывает, что миграция атома водорода нереальна в системах дифениламина (структура д). Для структур типа (ж) и (з) такой процесс возможен [34], но атом водорода при кватернизованном углероде не виден в спектрах ЯМР. Миграция водорода через карбонильную группу никогда не происходит в масс-спектрометрии. Это означает, что структуры (д-з) не соответствуют реальному строению НС. Мы попытались провести химическую идентификацию и сделать отнесение к одному из данных типов соединений, а именно: мы провели пробу на присутствие системы дифениламина (НС+ капля конц.  $H_2SO_4 \rightarrow$ раствор+ $HNO_3$ ) и наблюдали голубое окрашивание. Этот факт свидетельствовал в пользу структур (д) и (е). В таком случае миграция атома водорода может происходить лишь при "орто" расположении группы, содержащей подвижный водород (явление "ортоэффекта" [35]):



Затем, после образования иона  $[M-C_{10}H_8N]^+$  с  $m/z$  336, происходит последовательное элиминирование двух нитрогрупп -  $m/z$  290 и 244 (Рис.4). Все характерные признаки, указывающие на присутствие двух нитрогрупп, есть (процессы элиминирования  $NO$ ,  $NO_2$ ). Удивителен процесс фрагментации, обусловленный потерей  $H_2O$ . Известны случаи отрыва частицы  $OH$  при орто-расположении нитрогруппы с какой-либо группировкой, содержащей атом водорода ( $OH$ ,  $SH$ ,  $NH_2$ ,  $COOH$  и т.д.). Он может быть вызван двойной миграцией атомов водорода при возможной структуре  $\Phi_1$  или при наличии  $OH$ -группы, стоящей рядом с донором водорода ( $\Phi_2$ ):

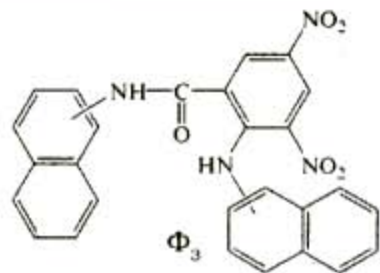


Таким образом, анализ масс-спектра (Рис.5) показывает, что оставшаяся часть молекулы структурно выглядит примерно следующим образом (X-ароматическая частица состава  $C_{11}H_8N$ ):

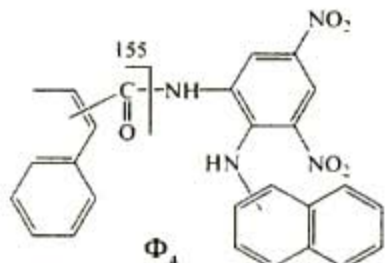


Частица "X" обладает высокой степенью ненасыщенности. Ароматической системы, включающей 11 атомов С, не существует. Атом азота не может находиться в цикле, т.к. в ПМР-спектре видны две  $NH$ -группы. Остается предполагать, что группа X представляет собой также  $\alpha$ - или  $\beta$ -аминонафталин ( $C_{10}H_8N$ ).

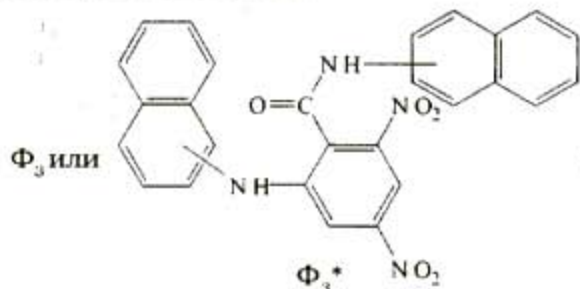
Недоказанной является функция одного атома С и атома О при дефиците атомов водорода (всего один). Тогда строение НС может иметь вид  $\Phi_3$  или  $\Phi_4$ :



(16)



Как известно[32], амидная связь легко рвется под действием электронного удара. Поэтому при реализации структуры  $\Phi_4$  должен в масс-спектре регистрироваться ион с  $m/z$  155, но его нет в масс-спектре (рис.5). Остается реальной структура  $\Phi_3$ . Сделать различия между двумя возможными изомерами по данным масс-спектрометрии невозможно:

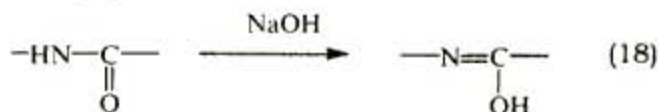


(17)

При интерпретации масс-спектра НС сомне-

ния вызывает отщепление молекул  $H_2O$  от ионов с  $m/z$  336 и от иона  $[Ф-NO_2]^+$  (табл.3), что косвенно предполагает наличие  $OH$  группы (смещение полосы поглощения в УФ-спектре при подщелачивании). Чтобы решить этот вопрос, мы провели реакцию ацелирования по гидроксильной группе ( $HC + (Ac)_2O + \text{пиридин}$ ). Однако в масс-спектре ацелированного НС не наблюдалось увеличения мол. массы на 42 а.е.м., что исключало возможность ее существования.

Поэтому можно утверждать, что при подщелачивании раствора НС происходит таутомерный сдвиг в енольную форму (вероятно, при электронном ударе происходит аналогичное явление, т.к. только этим можно объяснить отрыв  $H_2O$  в масс-спектре):



Таким образом, анализ масс-спектрометрических данных с учетом результатов спектроскопических исследований показывает, что структура НС описывается формулой  $\Phi_3$  или  $\Phi_3^*$  (характер замещения в ядре не установлен). Доказанное присутствие примесей существенно усложняет интерпретацию полученных данных.

#### Заключение

Предложенная методика подхода к установлению структуры НС, на наш взгляд, является оптимальной. Это положение вытекает из-за отсутствия ограничений по количеству анализируемой пробы (до уровня ррв.) и ее универсальности.

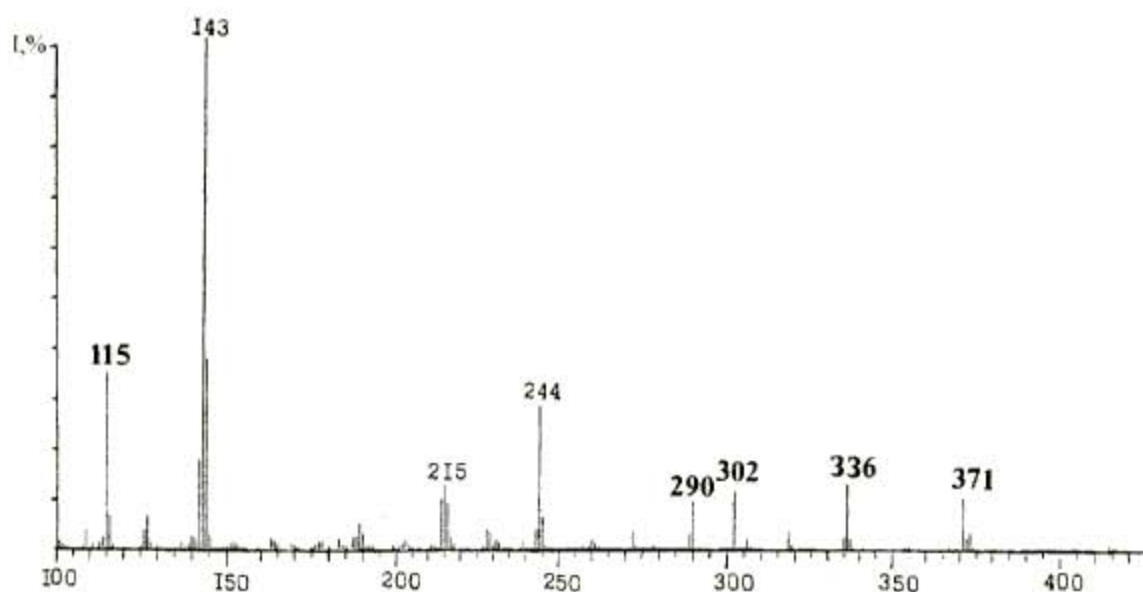


Рис.5. Масс-спектр неизвестного соединения

## ЛИТЕРАТУРА

1. Идентификация органических соединений / Р. Шрайнер, Р. Фьюзон, Д. Кертин, Т. Моррил. М.: Мир, 1983. 704 с.
2. Мазор Л. Методы органического анализа. М.: Мир, 1986. 584 с.
3. Файгль Ф. Капельный анализ органических веществ. М. Л.: Госхимиздат, 1962. 537 с.
4. Kotianho T. // J. Mass Spectrometry. 1996. V.31. P. 1-15.
5. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. М.: Мир, 1987. 429 с.
6. Korrick S.A., Altshul L. // Environment Health - perspectives. 1998. V.106, №.8. P.513-518.
7. Karasek F.W., Onuska P.I. // Anal. Chem. 1982. V.54, №.2. P.309A-324A.
8. Галль Л.Н., Туркина М.Я. // Успехи химии. 1985. Т.54, № 5. С.741-764.
9. Рафальсон А.Э., Смирнова Н.И. Современное состояние и тенденции развития масс-спектрометрии. Приборы, средства автоматизации и системы управления. М.: Информприбор, 1988. 45 с.
10. Баркер Ф. Компьютеры в аналитической химии. М.: Мир, 1987. 519 с.
11. Stenhaben E., Abrahamson S., McLafferty F.W. Atlas of mass spectral data. N-Y.: Interscience Publ., 1969. V.1-3. 1863 p.
12. Новые физические и химические методы исследования органических соединений / Б.В. Иоффе, И.Г. Зенкевич, М.А. Кузнецов, Н.Я. Бернштейн. Л.: ЛГУ, 1984. 240 с.
13. Заикин В.Г., Микая А.И. Химические методы в масс-спектрометрии органических соединений. М.: Наука, 1987. 197 с.
14. Лабораторное руководство по хроматографии и смежным методам / Под ред. О.Микеш. М.: Мир, 1982. Т.1. 400 с.
15. Хроматография. Практическое приложение метода / Под ред. Э.Хефтман. М.: Мир, 1986. Т.1. 336 с. Т.2. 422 с.
16. Levsen K., Schwarz H. // Mass Spectrom. Rev. 1983. V.2. P.77-148.
17. Архипов Д.Б., Галль Л.Н. / ЖАХ, 1999. Т. 54, № 6. С.585-512.
18. Клюев Н.А., Истратов Э.И., Хмельницкий Р.А., Сучбач В.П., Русинов В.Л., Зырянов В.А. // ЖОрХ. 1977. Т.13, № 7. С.1501-1507.
19. Клюев Н.А. // Аналитика и контроль. 1998. № 2(4). С.4-14.
20. Сильверстейн Р., Басслер Г., Меррил Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений. // М.: Мир, 1977. 422 с.
21. Полякова А.А., Хмельницкий Р.А. Масс-спектрометрия в органической химии // Л.: Химия, 1972. 367 с.
22. Клюев Н.А., Абраменко П.И., Шпилева И.С., Пинкин Л.Д. // ХГС. 1982. № 6. С.758-761.
23. Соловьев А.А., Каденцев В.И., Чижов О.С. Масс-спектрометрия... // Успехи химии, 1979. Т.48. С.1130-1231.
24. Иоффе Б.В., Зенкевич И.Г. Интерпретация масс-спектров органических соединений. Л.: Химия, 1986. 176 с.
25. Зенкевич И.Г. // ЖАХ, 1998. Т.53, № 1. С.43-49.
26. Математические методы в химии / 5-я Всесоюзная конференция: Тез. докл. Грозный, 1985. 312 с.
27. VII Всесоюзная конференция по использованию вычислительных машин в химических исследованиях и спектроскопии молекул: Тез. докл. Рига, 1986. 296 с.
28. Джурс И., Айзенауэр Т. Распознавание образов в химии. М.: Мир, 1977. 230 с.
29. Дерендяев Б.Г., Нехорошев С.А., Лебедев К.С., Киржанский С.Н. // ЖАХ, 1994. Т.46. С.1870-1878.
30. Дерендяев Б.Г., Лебедев К.С. Новое поколение ИПС по масс-спектрометрии: Тез. докл. Сумы: Электрон, 1986. Секция 3. С.52-53.
31. Эляшберг М.Е., Грибов Л.А., Серов В.В. Молекулярный спектральный анализ и ЭВМ. М.: Наука, 1980. 308 с.
32. Хмельницкий Р.А., Бродский Е.С. Хромато-масс-спектрометрия. М.: Химия, 1984. 211 с.
33. Есипов С.Е., Клюев Н.А., Мир-Кадырова Е.Я. // Успехи в области изучения и производства антибиотиков. 1985. №14. С. 316-322.
34. Клюев Н.А., Мальцева Г.А., Хмельницкий Р.А., Шейнкман А.К., Дейкало А.А., Ступникова Т.В. Известия ТСХА 1974. №3. С.200-208.
35. Schwarz H. // Top. Curr. Chem. 1975. V.73. P.231-268.

\* \* \* \* \*