



УДК 577.175.19.088.5:543.51

ПРИМЕНЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВТОРИЧНЫХ ИОНОВ  
ДЛЯ ПРЯМОГО АНАЛИЗА СМЕСЕЙ МЕТАБОЛИТОВ  
*FUSICOCCUM AMYGDALI D.*

*Садовская В. Л., Камышкова Т. И., Ракитин Л. Ю.,  
Стопанкова В. В., Муромцев Г. С.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
биотехнологии, ВАСХНИЛ, Москва*

Изучены возможности применения метода масс-спектрометрии вторичных ионов с использованием жидких матриц для анализа химически немодифицированных фузикоцинов и их смесей, продуцируемых *Fusicoccum amygdali D.* Показано, что решающую роль при получении масс-спектров играет выбор жидкой матрицы: использование глицерина с добавкой NaCl делает возможным однозначное определение молекулярной массы метаболита, а спектры, полученные с применением чистого глицерина, содержат информацию о размере агликоновой части и характере заместителей гликозидной части молекулы. Последовательное применение масс-спектрометрии вторичных ионов, высокоэффективной жидкостной хроматографии и комбинированного метода газовой хроматографии — масс-спектрометрии в режиме электронного удара позволяет проводить идентификацию известных метаболитов и предоставляет значительную информацию о структуре неизвестных ранее соединений.

Исследование следовых количеств физиологически активных веществ, выделяемых из биологического материала, требует высокочувствительных аналитических методов, среди которых ведущую роль завоевала масс-спектрометрия с ионизацией электронным ударом, как наиболее чувствительный и селективный метод анализа летучих соединений. Трудности, связанные с анализом нелетучих и труднолетучих веществ, преодолены в настоящее время благодаря разработке и введению в аналитическую практику методов «мягкой» ионизации, которые значительно расширяют возможности масс-спектрометрии и позволяют использовать ее в тех случаях, когда применение масс-спектрометрии электронного удара практически невозможно без предварительных химических превращений исследуемого материала.

Среди методов анализа с использованием «мягкой» ионизации в последнее время получили широкое распространение масс-спектрометрия с бомбардировкой ускоренными атомами (Fast atom bombardment mass spectrometry — FAB-MS) и масс-спектрометрия вторичных ионов с применением жидких матриц (Liquid secondary ion mass spectrometry — LSIMS), которые используются в химии и биологии для определения молекулярных масс и установления отдельных элементов структуры полярных, термически нестойких органических соединений в нативном состоянии [1, 2], главным образом белков и пептидов [3, 4], нуклеозидов и нуклеотидов [5], глицо- и фосфолипидов [6–8], ганглиозидов [9] и других биологически важных веществ [1].

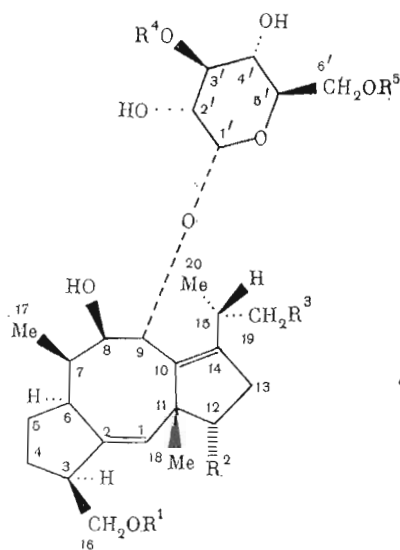
Высокая чувствительность и хорошая воспроизводимость в сочетании с легкостью и быстротой проведения анализа и возможностью выбора подходящих жидких матриц [10] для целенаправленного получения масс-спектральной информации — все это обеспечивало успех в применении методов FAB-MS и LSIMS даже в тех случаях, когда традиционный метод масс-спектрометрии электронного удара прочно завоевал свои позиции: так, ранее была показана перспектива применения LSIMS для анализа природных простагландинов [11].

В настоящем сообщении приведены результаты работы, в которой метод LSIMS использован для анализа фузикоцина А (I), широко извест-

ного биосинтетического регулятора роста растений [12]. Кроме основного соединения (фузикокина А) в фильтрате культуральной жидкости гриба-продуцента *Fusicoccum amygdali* D. накапливаются другие вещества фузикокиновой природы, отличающиеся от фузикокина А степенью окисленности агликона, ацилирования агликоновой и сахарных частей или взаимным расположением ацетильных групп в молекуле [13]. Разработанный нами ранее [14] метод анализа фузикокиновых метаболитов, основанный на применении масс-спектрометрии электронного удара в режиме газовой хроматография — масс-спектрометрия, позволяет проводить идентификацию индивидуальных соединений этого класса в смеси, а также, используя метод селективного детектирования, обнаруживать малые количества этих веществ в растительном материале. Однако для проведения такого анализа фузикокин А превращают в пер-триметилсилильное (TMS) производное, обладающее достаточной хроматографической подвижностью.

Представляло интерес изучить возможности метода LSIMS для осуществления прямого масс-спектрометрического анализа фузикокина А и смеси его метаболитов, содержащихся в культуральной жидкости гриба. Для проведения этой работы из хлороформного экстракта культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были выделены в индивидуальном состоянии и использованы в дальнейшем в качестве модельных соединений четыре известных фузикокина (I) — (IV), формулы которых приведены в таблице. Следует отметить, что соединения (II) — (IV) были идентифицированы лишь на основании данных масс-спектров их TMS-производных без учета стереохи-

Метаболиты фузикокиновой природы, обнаруженные в культуральной жидкости гриба-продуцента *F. amygdali* D.



- (I) Фузикокин А,  $M_r$  680
- (II) 3',19-Дидезацетилфузикокин (фузикокин D),  $M_r$  596
- (III) 16-О-Деметил-19-дезоксидезацетил-3'-дезацетил-3-эпифузикокин,  $M_r$  566
- (IV) Фузикокин Н,  $M_r$  482
- (V) 3',19-Дидезацетил-де-трет-пентенилфузикокин (фузикокин F),  $M_r$  528
- (VI) Фузикокин J,  $M_r$  580
- (VII) Де-трет-пентенилфузикокин,  $M_r$  612
- (VIII) 3'-Дезацетилфузикокин (фузикокин С),  $M_r$  638

Метаболит	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
I *	Me	OH	OAc	Ac	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>
II	Me	OH	OH	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>
III *	H	OH	H	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>
IV	H	H	H	H	H
V	Me	OH	OH	H	H
VI	Me	OH	H	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>
VII *	Me	OH	OAc	Ac	H
VIII *	Me	OH	OAc	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>

\* Известны или могут существовать соединения с иным расположением заместителей или стереоизомеры.

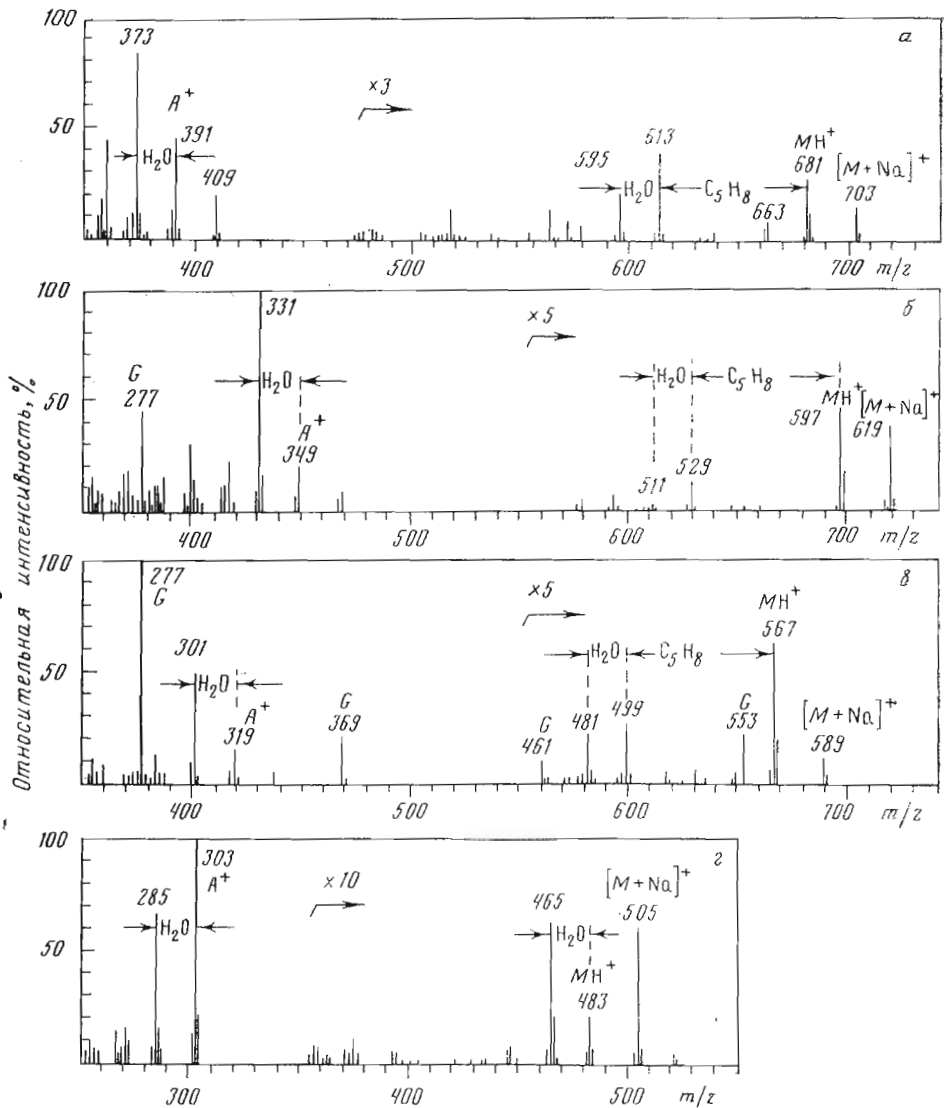


Рис. 4. Масс-спектры LSIMS фузикококцинов (I) — а, (II) — б, (III) — в, (IV) — г; жидкая матрица — глицерин. G — пики спектра глицериновой матрицы

мических аспектов и сравнения с аутентичными веществами; например, соединению (III) приписано строение 3-эпифузикококцина по аналогии с известным выделенным ранее метаболитом [15].

Масс-спектры LSIMS метаболитов (I)–(IV), полученные с использованием глицерина в качестве жидкой матрицы (рис. 1а–г), содержат пики ионов  $MH^+$  и  $[M+Na]^+$ , а также пики ряда осколочных ионов, образующихся в результате отрыва от ионов  $MH^+$  молекул  $H_2O$ ,  $C_5H_8$  (для соединений (I)–(III), содержащих *трет*-пентенильный заместитель в сахарной части молекулы) и углеводного остатка с образованием агликоновых ионов  $A^+$  и  $[A-H_2O]^+$ , не содержащих атома кислорода гликозидной связи. Интенсивность пиков ионов  $MH^+$  в спектрах относительно невелика по сравнению с интенсивностью пиков ионов  $A^+$  и  $[A-H_2O]^+$ , хотя существенно превышает интенсивность молекулярного иона в спектре фузикококцина А, полученном в условиях электронного удара [16]. Возникновение ионов  $[M+Na]^+$ , по-видимому, связано с присутствием следовых количеств солей Na в анализируемых образцах и растворителях.

Добавление солей щелочных металлов к глицериновой матрице приводит к резкому возрастанию интенсивностей пиков молекулярных катионированных ионов и исчезновению пиков осколочных ионов, что связано

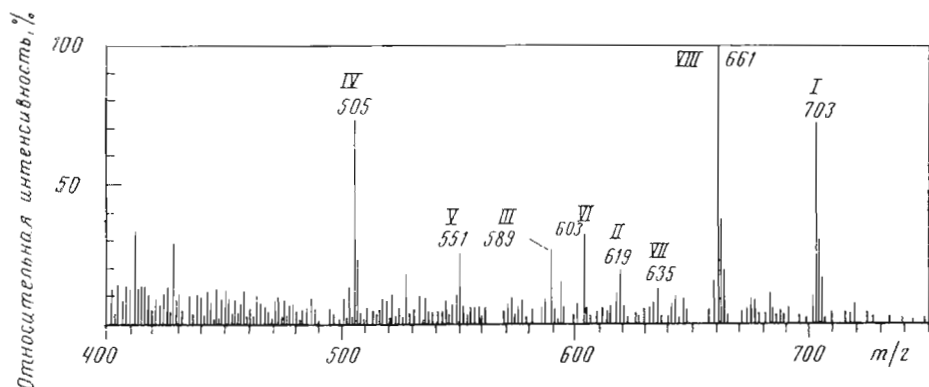


Рис. 2. Масс-спектр хлороформного экстракта культуральной жидкости *F. amygdali* D.; жидкая матрица — глицерин+NaCl

с образованием в присутствии катионов щелочных металлов в жидкой фазе стабильных заряженных молекулярных частиц типа  $[M+Met]^+$  ( $Met$  — катион щелочного металла) [2]. Эффект добавления  $NaHCO_3$  к глицериновой матрице, в результате чего в спектрах появляются интенсивные ионы  $[M+Na]^+$  и  $[M+2Na-H]^+$ , отмечен нами ранее для природных простагландинов [11].

Аналогичную картину мы наблюдали при добавлении водного раствора NaCl к глицерину, содержащему метаболиты фузикоцина: максимальные по интенсивности пики в спектрах отвечают ионам  $[M+Na]^+$ ; отсутствуют осколочные ионы в диапазоне 400–800 а.е.м., перекрывающем диапазон молекулярных масс известных в настоящее время метаболитов фузикоцина; при высоких концентрациях катионов  $Na^+$  в глицериновой матрице наблюдают появление ионов  $[M+2Na-H]^+$  (10–20% от интенсивности ионов  $[M+Na]^+$ ); нижний порог чувствительности снижается от 4–5 мкг до 50 нг. Практически спектр LSIMS, полученный в глицерине в присутствии NaCl, для каждого из соединений (I)–(IV) содержит лишь пик иона  $[M+Na]^+$  с  $m/z$  703, 619, 589 или 505 соответственно. Это обстоятельство, а также высокая чувствительность позволяют использовать метод LSIMS для прямого анализа смесей метаболитов фузикоцина. На рис. 2 представлен спектр хлороформного экстракта культуральной жидкости гриба, не подвергавшегося какой-либо предварительной очистке. Присутствующие в спектре пики с  $m/z$  505, 551, 589, 603, 619, 635, 661 и 703 отвечают ионам  $[M+Na]^+$  для известных метаболитов фузикоцина, представленных в таблице.

Следует иметь в виду, однако, что существуют метаболиты (помечены в таблице звездочкой), для которых известны изомеры с иным расположением заместителей и стереохимией при атоме C3. Поэтому на основании информации о величине молекулярной массы, вытекающей из спектров LSIMS, можно лишь высказать предположение об одной из вероятных структур, подтверждение которой в ряде случаев следует из данных газовой хроматографии (ГХ) и масс-спектрометрии электронного удара TMS-производных, а в отдельных случаях, например для соединения (III), из сравнения с аутентичным образцом.

Прямой анализ компонентов смесей метаболитов с помощью LSIMS позволяет осуществлять быстрый контроль за ходом ферментации, проводить определение состава фузикоциновых метаболитов, образующихся при использовании различных культуральных сред, а также обнаруживать неизвестные ранее метаболиты.

Иллюстрацией возможности обнаружения новых соединений данного класса методом LSIMS может служить анализ метаболитов (IX) и (X) (рис. 3 и 4), полученных в результате препаративного разделения с помощью ВЭЖХ этилацетатного экстракта культуральной жидкости, предварительно экстрагируемой хлороформом. Две минорные фракции, элюируемые с колонки ВЭЖХ, содержали вещества с молекулярными масса-

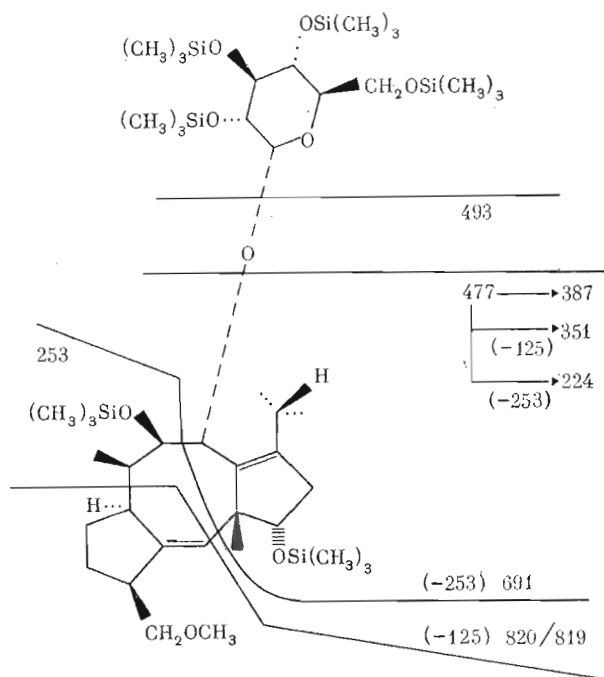


Рис. 3. Основные направления распада TMS-производного *deacet-19-дезоксидеацетилфузикокцина* (IX) ( $M_r$  944) в условиях масс-спектрометрии электронного удара

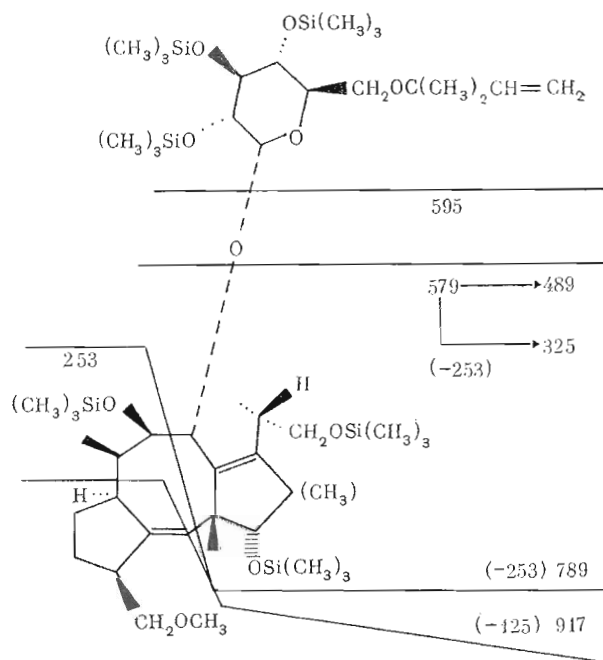


Рис. 4. Основные направления распада TMS-производного *Me-аналога* (X) ( $M_r$  1042) *фузикокцина D* в условиях масс-спектрометрии электронного удара

ми 512 и 610, в LSIMS-спектрах которых наблюдали пики ионов  $[M+Na]^+$  с  $m/z$  535 и 633 соответственно. Дальнейший анализ структуры этих соединений проводили методом ГХ-МС в режиме электронного удара. В спектрах TMS-производных были обнаружены пики молекулярных ионов с  $m/z$  944 и 1042 соответственно для *фузикокцинов* (IX) и (X), что свидетельствует о присутствии шести свободных OH-групп в молеку-

лах обоих веществ. Кроме того, максимальный по интенсивности пик с  $m/z$  364 в спектре TMS-(IX) характеризует фузикокин, содержащий незамещенный остаток гексозы (по аналогии с фузикокином H (IV) [14]); в то же время в спектре TMS-(X) наблюдается серия углеводных ионов с  $m/z$  379→289→217, характерная для 3'-дезацетилфузикокинов, содержащих *трет*-пентильный заместитель в положении C6' (по аналогии с метаболитами D (II) или C (VIII)). Совокупность остальных характеристических ионов в масс-спектрах TMS-производных соединений (IX) и (X), предполагаемые формулы которых представлены на рис. 3 и 4, позволяет предложить для метаболита (IX) строение аналога 19-дезоксидеацетилфузикокина (J), не содержащего *трет*-пентильного заместителя, а для (X) — строение аналога 3',19-дидеацетилфузикокина (D), имеющего дополнительную метильную группу в правом пятичленном кольце агликона.

Таким образом, полученные результаты показывают целесообразность использования метода масс-спектрометрии вторичных ионов для быстрого прямого анализа химически немодифицированных фузикокинов как в индивидуальном состоянии, так и в смесях, образующихся при культивировании *F. amygdali*. Минимальное количество вещества (0,1 нмоль) требуется для получения информации о молекулярной массе и значительно большее (1—5 нмоль) — для выяснения отдельных деталей структуры, например размера агликона или характера заместителя при C6' углеводного остатка. Решающую роль для получения информативного масс-спектра LSIMS играет выбор жидкой матрицы. Последовательное использование методов LSIMS и ГХ-МС при анализе фракций, полученных при разделении грубого экстракта методом ВЭЖХ, позволяет идентифицировать известные компоненты смеси и дает значительную информацию о структуре неизвестных ранее метаболитов.

Авторы выражают благодарность Л. М. Краснопольской за любезно предоставленные образцы индивидуального фузикокина А и экстрактов культуральной жидкости.

### Экспериментальная часть

Масс-спектры LSIMS и в режиме ГХ-МС при ионизации электронным ударом были получены на двухфокусном масс-спектрометре M-80A (Hitachi, Япония) при разрешающей способности прибора 1000, ускоряющем напряжении 3 кВ в диапазоне массовых чисел 0—1500 а. е. м. Сбор данных и их обработка проводились с помощью компьютерной системы M-003.

Ионизацию электронным ударом осуществляли при энергии электронов 70 эВ и температуре ионизационной камеры 200°С. Хроматографическое разделение проводили в насыпной колонке (3×1000 мм) со стационарной фазой OV-1 (на Gas Chrom Q, 100—120 меш) при температуре колонки 280°С с предварительным нагревом от 240 до 280°С со скоростью 10°/мин, температуре инжектора 250°С и скорости потока He 25 мл/мин. Образцы для анализа силилировали описанным ранее способом [14].

Масс-спектры LSIMS получали, используя в качестве жидкой матрицы глицерин или глицерин с добавкой следовых количеств водного раствора NaCl. Образец для анализа растворяли в метаноле. 1 мкл метанольного раствора, содержащего 1—10 мкг анализируемого вещества, прибавляли к 1 мкл жидкой матрицы, помещенной на серебряный держатель-мишень. Мишень бомбардировали пучком ионов He<sup>+</sup> с энергией 8 кэВ.

ВЭЖХ использовали для препаративного разделения экстрактов культуральной жидкости, которое проводили на хроматографе Dupont серии 8800. В качестве детектора использовали УФ-спектрофотометр с длиной волны 230 нм. Разделение осуществляли последовательным хроматографированием на колонках Zorbax Sil и Zorbax C8 (4,6×250 мм).

Первое разделение экстракта проводили на колонке Zorbax Sil в следующем режиме: 20 мин изократического элюирования в системе гексан — изопропанол (85 : 15); 40 мин в режиме градиентного элюирования при изменении соотношения растворителей до 60 : 40; 10 мин изократического элюирования в системе гексан — изопропанол (60 : 40) при скорости потока 1 мл/мин. После масс-спектрометрического контроля элюатов методом LSIMS фракции, содержащие метаболиты с молекулярными массами, лежащими в диапазоне 400—800 а. е. м., подвергали повторному разделению на колонке Zorbax C8 в системе ацетонитрил — вода (35 : 65) при 35°С и скорости потока 0,75 мл/мин.

1. *Burlingame A. L., Whitney J. O., Russell D. H.* // *Anal. Chem.* 1984. V. 56. P. 417R – 467R.
2. *Kambara H.* *Mass Spectrometry in the Health and Life Sciences, Proc. Int. Symp., San Francisco, California, Sept. 9–13, 1984* / Eds Burlingame A. L., Casiagnoli N., Jr. Netherlands, Elsevier Sci. Publ. Co., 1985. P. 65–82.
3. *Biemann K., Gibson B. W., Mathews W. R., Pang H.* *Mass Spectrometry in the Health and Life Sciences, Proc. Int. Symp., San Francisco, California, Sept. 9–13, 1984* / Eds Burlingame A. L., Casiagnoli N., Jr. Netherlands, Elsevier Sci. Publ. Co., 1985. P. 239–263.
4. *Katakuse J., Ichihara T., Nakabushi H., Matsuo T., Matsuda H., Wada Y., Hayashi A.* // *Biomed. Mass Spectrom.* 1984. V. 11. № 8. P. 386–394.
5. *Slowikowski D. L., Schram K. H.* // *Nucleosides and Nucleotides.* 1985. V. 4. № 3. P. 309–345.
6. *Hemling M. E., Yu R. K., Sedgewick R. D., Rinehart K.* // *Biochemistry.* 1984. V. 23. № 24. P. 5706–5713.
7. *Ohashi Y.* // *Biomed. Mass Spectrom.* 1984. V. 11. № 8. P. 383–385.
8. *Chilton III F. H., Murphy R. C.* // *Biomed. Environmental Mass Spectrom.* 1986. V. 13. № 2. P. 71–76.
9. *Egge H., Peter-Katalinic J., Reuter G., Schauer R., Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G.* // *Chem. and Phys. Lipids.* 1985. V. 37. № 2. P. 127–141.
10. *Gower J. L.* // *Biomed. Mass Spectrom.* 1985. V. 12. № 5. P. 191–196.
11. *Садовская В. Л., Ракитин Л. Ю., Голованова Н. К., Козтеев Л. С., Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д.* // *Биоорг. химия.* 1986. Т. 12. № 7. С. 956–960.
12. *Муромцев Г. С., Герасимова Н. М., Кобринна Н. С., Коренцева В. М., Смоляков В. С.* // *Успехи микробиологии.* 1984. Т. 49. С. 106–135.
13. *Ballio A.* // *Ann. Phytopathol.* 1978. V. 10. № 2. P. 145–156.
14. *Садовская В. Л., Казаков В. С., Ракитин Л. Ю., Муромцев Г. С.* // *Биоорг. химия.* 1986. Т. 12. № 6. С. 828–835.
15. *Ballio A., Casinovi C. G., Grandolini G., Pomponi M., Randozzo G., Rossi C.* // *Gazz. chim. ital.* 1975. V. 105. № 5–6. P. 647–650.
16. *Кобринна Н. С., Вобликова В. Д.* // *Химия природ. соединений.* 1980. № 6. С. 792–796.

Поступила в редакцию  
5.III.1987

**APPLICATION OF LIQUID SECONDARY ION MASS SPECTROMETRY  
FOR A DIRECT ANALYSIS OF METABOLITES PRODUCED  
BY *FUSICOCUM AMYGDALI* D.**

SADOVSKAYA V. L., KATYSHKOVA T. I., RAKITIN L. Yu.,  
STOLPAKOVA V. V., MUROMTSEV G. S.

*All-Union Research Institute of Agricultural Biotechnology, Academy  
of Agricultural Sciences of the USSR, Moscow*

Liquid secondary ion mass spectrometry has been applied to the direct analysis of underivatized fusicoccins and their mixtures produced by *Fusicoccum amygdali* D. It has been shown that type of liquid matrix determines specific features of mass spectra: thus, a combination of glycerol and sodium chloride allows estimating the metabolite's molecular weight whereas spectra obtained with glycerol only bear information on the size of the aglycon moiety and substituents of the glycoside moiety. A successive combination of secondary ion mass spectrometry, high performance liquid chromatography and gas chromatography-electron impact mass spectrometry makes it possible to identify known metabolites and gives the information on the structure of yet unknown compounds.