



УДК 547.455.623'597 : 543.51

© 1990 г.

В. Л. Садовская, Л. Ю. Ракитин, И. И. Гришина,
Л. М. Краснопольская, Г. С. Муромцев, В. П. Шевченко*

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУЗИКОКЦИНОВЫХ ТЕРПЕНОИДОВ МЕТОДОМ ВТОРИЧНО-ИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
ВАСХНИЛ, Москва;

* Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Изучены возможности применения вторично-ионной масс-спектрометрии для количественной оценки содержания фузикокициновых терпеноидов в культуральной жидкости гриба-продуцента *Fusicoccum amygdali* Del. Индивидуальные фузикокицины А, С, J и H были использованы для построения стандартных калибровочных кривых. Показано, что зависимость отношения интенсивностей $I_{C, J, H}/I_A$ пиков ионов $[M + Na]^+$ от количества фузикокицинов С, J и H в диапазоне 1—5 нмоль имеет линейный характер, что позволяет определять количества этих метаболитов в присутствии известного количества фузикокицина А. Для количественного определения фузикокицина А предлагается использовать метод изотопного разбавления с применением в качестве внутреннего стандарта $[^2H_4]$ дигидрофузикокицина, полученного при гидрировании фузикокицина А газообразным дейтерием. Установлено, что величина ответного масс-спектрометрического сигнала в условиях вторично-ионной масс-спектрометрии с применением щелочных матриц возрастает с увеличением относительной полярности изученных соединений.

Метод масс-спектрометрии вторичных ионов (LSIMS) так же, как и масс-спектрометрии с бомбардировкой ускоренными атомами (FAB-MS), прочно завоевал репутацию чрезвычайно удобного, простого и информативного при анализе относительно полярных и высокомолекулярных веществ. Поскольку отличительная особенность масс-спектров LSIMS и FAB-MS — их малолинейчатость и учитывая тот факт, что максимальным по интенсивности в спектре, как правило, является пик молекулярного иона (протонированного или катионированного), оба метода с успехом применяются для анализа смесей.

Значительную роль методы LSIMS и FAB-MS играют в сиквенсном анализе белков при составлении пептидных карт ферментативных белковых гидролизатов (FAB mapping) [1—6]. Так как пептидные карты строят из суммы протонированных молекулярных ионов MH^+ , получаемых при анализе пептидных смесей, ясно, что безошибочная реконструкция исходной белковой молекулы возможна лишь в том случае, если в процессе масс-спектрометрирования обнаружены молекулярные ионы всех без исключения пептидов анализируемой смеси. Однако, как было предсказано Барбером [7] и в дальнейшем показано им и другими исследователями [8—11], существенную роль в процессах ионизации, протекающих в глицериновой матрице, играют поверхностно-активные свойства изучаемых молекул. Поскольку бомбардирующий поток ускоренных частиц (атомов He^0 или ионов He^+ соответственно для FAB-MS или LSIMS) способен проникать лишь на ~10 нм в глубь глицериновой матрицы, в процессе ионообразования участвуют молекулы вещества, расположенные только на ее поверхности. Различия поверхностно-активных свойств компонентов смесей приводят к так называемому эффекту подавления сигналов MH^+ ионов гидрофильных компонентов за счет более гидрофобных, наблюдаемому для пептидов [9] и гликопептидов [10] при использовании в качестве жид-

ких матриц глицерина, тиоглицерина или их смеси, что ведет в ряде случаев к потере информации.

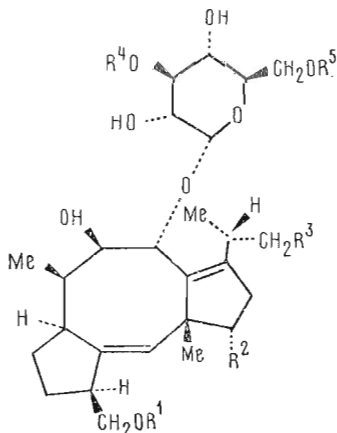
Очевидно, что «эффект подавления» и подобные явления нельзя не учитывать не только при составлении пептидных карт, но и при проведении работ по количественному определению веществ в смеси с помощью FAB-MS или LSIMS, имея в виду, что величина ответного масс-спектрометрического сигнала различных соединений будет сильно зависеть от полярности и других физических и химических свойств их молекул.

Ранее мы сообщали об использовании LSIMS для прямого анализа качественного состава фузикоциновых терпеноидов, содержащихся в культуральной жидкости гриба-продуцента *Fusicoccum amygdali* Del. [12]. Главный продукт ферментативного синтеза — фузикоцин А, широко известный регулятор роста растений [13], однако в культуре гриба накапливаются другие вещества фузикоциновой природы, отличающиеся от фузикоцина А степенью окисленности агликона и соотношением свободных и замещенных гидроксигрупп в агликоне и углеводном фрагменте молекулы.

Необходимым условием комплексного изучения микробного синтеза фузикоцинов, включающего в себя исследование различных регуляторных аспектов этого процесса, оптимизацию биотехнологии получения фузикоцина А, разработку условий направленного синтеза других фузикоцинов, обладающих рострегулирующей активностью, является не только знание качественного состава образующихся метаболитов, но и прежде всего количественная оценка компонентов [14].

Известно, что количественные измерения с помощью FAB-MS можно проводить с достаточной точностью, если вводить в пробу внутренний стандарт. При этом лучшие результаты достигаются при использовании в качестве внутреннего стандарта изотопномеченных аналогов [15, 16]. Представляло интерес изучить возможности использования LSIMS для проведения количественных определений фузикоциновых терпеноидов, образующихся в процессе ферментативного синтеза, используя в качестве внутреннего стандарта фузикоцин А, основной компонент реакционной смеси.

Для оценки характера зависимости между величиной ответного масс-спектрометрического сигнала и строением различных фузикоцинов, а также для построения стандартных калибровочных кривых были выбраны несколько индивидуальных фузикоцинов, выделенных из культуральной жидкости гриба-продуцента и очищенных с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).



Фузикоцин	M_r	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
А	680	Me	OH	OAc	Ac	$C(CH_3)_2CH=CH_2$
С	638	»	»	»	H	»
Г	580	»	»	H	»	»
Н	482	H	H	»	»	H

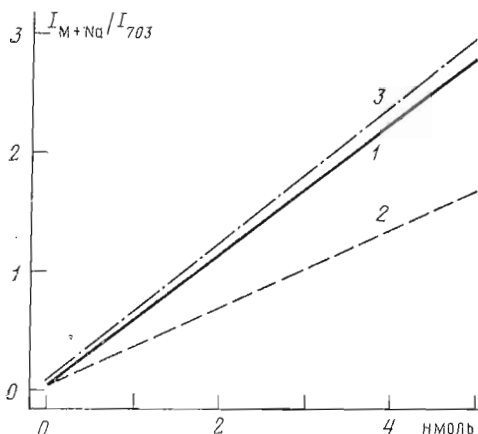


Рис. 1. Стандартные кривые зависимости отношения $I_{[M+Na]}/I_{703}$ для фузикоцинов С (1), J (2) и H (3) от их количества

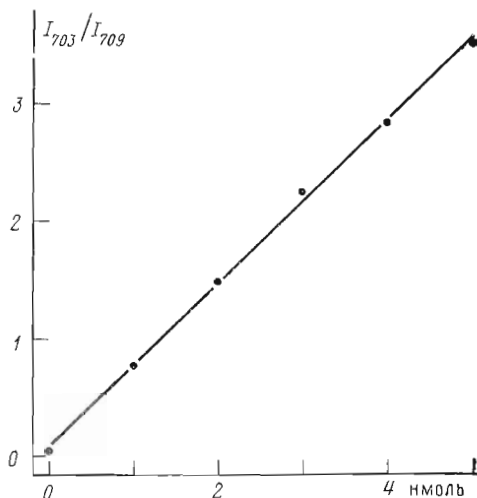


Рис. 2. Стандартная кривая зависимости отношения I_{703}/I_{709} от количества фузикоцина А

Построение стандартных кривых включало в себя приготовление пяти композиций, каждая из которых содержала 30 нмоль фузикоцина А, принятого в качестве внутреннего стандарта, и соответственно по 10, 20, 30, 40 или 50 нмоль фузикоцинов С, J и H.

Для получения воспроизводимых результатов из каждой пробы производили две последовательные съемки спектров по 8 сканирований в каждой, расходуя при этом на одну съемку $1/10$ общего количества вещества пробы, т. е. 1—5 нмоль каждого компонента.

В качестве жидкой матрицы применяли глицерин с добавкой следовых количеств водного раствора NaCl, при этом в спектре, снятом в диапазоне m/z 400—800, регистрировали пики катионированных молекулярных ионов $[M + Na]^+$ с m/z 703, 661, 603 и 505 соответственно для фузикоцинов А, С, J и H. На рис. 1 в виде линий регрессии приведены стандартные калибровочные кривые, представляющие собой зависимость отношения величин ионных токов $I_{[M+Na]}/I_{703}$ от количества анализируемого компонента смеси. По оси ординат, таким образом, для каждой кривой откладывали среднеарифметические значения из 16 измерений отношения интенсивностей пиков ионов $[M + Na]^+$: I_{661}/I_{703} , I_{603}/I_{703} и I_{505}/I_{703} соответственно для фузикоцинов С, J, H. Регрессивный анализ проводили по методу наименьших квадратов, доверительный интервал был принят равным 95%, параметры линий регрессии приведены в таблице.

Нетрудно видеть, что представленная функция имеет линейный характер в диапазоне анализируемых количеств каждого из компонентов смеси от 1 до 5 нмоль. Данные линейной регрессии позволяют с достаточной точностью определить относительный фактор отклика (F) для каждого из исследуемых веществ. Значения F , приведенные в таблице, представляют

Параметры линий регрессии, относительный фактор отклика (F) и время удерживания (R_t) при хроматографировании фузикоцинов А, С, J, H в условиях ВЭЖХ *

Фузикоцин	m/z иона $[M+Na]^+$	Коэффициент корреляции	Стандартная ошибка	F	R_t , мин
А	703	—	—	1,0	24,5
С	661	0,9928	0,14	1,7	16,2
J	603	0,9964	0,05	1,0	17,8
H	505	0,9986	0,05	1,8	12,3

* Условия см. в «Экспер. части».

собой величину отношения сигналов $I_{[M+Na]^+}/I_{703}$, полученных при измерении одинаковых количеств вещества и стандарта.

Фактор F можно использовать при расчете количеств фузикоцинов С, J, H в пробе в присутствии известного количества фузикоцина А по следующему уравнению:

$$c_x = \frac{I_{[M+Na]^+}/I_{703}}{F_x} c_A,$$

где c_x — количество измеряемого вещества; c_A — количество фузикоцина А; $I_{[M+Na]^+}/I_{703}$ — отношение интенсивностей пиков ионов $[M + Na]^+$ измеряемого вещества фузикоцина А; F_x — относительный фактор отклика.

Измерение содержания фузикоцина А в пробе может быть также выполнено с помощью LSIMS методом изотопного разбавления. В качестве внутреннего стандарта применяли дейтероаналог дигидрофузикоцина А (Ia), синтезированный нами гидрированием фузикоцина А газообразным дейтерием на 5% Vd/BaSO₄ [17].

В этих условиях гидрируется двойная связь изопентенильной группы с одновременным замещением в ней атомов водорода на дейтерий, что было подтверждено соответствующим сдвигом m/z пиков молекулярного и осколочных ионов, содержащих эту группу, в масс-спектре тетраэтилсилильного производного, снятого в условиях электронного удара.

Полученный таким образом дейтеро-Ia имел следующий изотопный состав, рассчитанный из интенсивностей пиков $[M + Na]^+$ с учетом отношения величин пиков $[M + Na]^+$, $[M + Na + 1]^+$ и $[M + Na + 2]^+$ в спектре фузикоцина А (указаны проценты от общего состава продуктов гидрирования, количество вошедших при гидрировании атомов водорода и дейтерия, m/z иона $[M + Na]^+$ в спектре дейтеро-Ia): 6, [¹H₃], 705; 8, [¹H][²H], 706; 21, [²H₂], 707; 22, [²H₃], 708; 34, [²H₄], 709; 6, [²H₅], 710; 1, [²H₆], 711.

Построение стандартной кривой осуществляли аналогично описанному выше, анализируемые пробы содержали 1, 2, 3, 4 и 5 нмоль фузикоцина А с добавлением к каждой пробе 3 нмоль дейтеро-Ia. Съемку спектров вели в узком диапазоне m/z 700—720, стандартную кривую строили как зависимость I_{703}/I_{709} от количества фузикоцина А. При этом отношение интенсивностей пиков рассчитывали как среднеарифметическое из 40 сканирований. Как видно из рис. 3, зависимость эта линейная (коэффициент корреляции равен 0,9993), что позволяет использовать этот метод для определения концентрации фузикоцина А в пробах культуральной жидкости и технического препарата.

Анализируя полученные данные, нетрудно заметить, что наблюдается определенная зависимость между строением изученных терпеноидов и величиной ответного масс-спектрометрического сигнала и, как следствие, большой интенсивностью пиков ионов $[M + Na]^+$ для более полярных и, следовательно, более гидрофильных компонентов смеси. В частности, величина относительного фактора F имеет ярко выраженную тенденцию к росту при переходе от фузикоцина А, наименее полярного из всех приведенных здесь терпеноидов, к фузикоцину H (см. таблицу). Последний имеет шесть свободных ОН-групп в молекуле и, по данным ТСХ и ВЭЖХ, является самым полярным из четырех исследованных фузикоцинов.

В то же время, сопоставляя данные ВЭЖХ (время R_t) и LSIMS (фактор F), приведенные в таблице, следует отметить, что не имеется четкой корреляции между этими величинами, так как в пределах точности измерений значения F для фузикоцинов С и H так же, как для А и J, можно считать одинаковыми, в то время как параметры R_t для этих пар фузикоцинов существенно различаются. По-видимому, не только количество свободных ОН-групп и полярность, но и другие детали структуры, такие, как степень окисленности атома С-20, наличие или отсутствие изопентенильного заместителя в гликозидной части, определяют химические и физико-химические свойства фузикоцинов и их способность к образованию ионов $[M + Na]^+$.

Сравнивая полученные нами результаты с данными о влиянии степени гидрофильности на величину ответного сигнала FAB-MS при анализе пептидов, о чем говорилось в начале статьи, следует заключить, что мы наблюдаем эффект противоположного знака. Причина таких различий, по нашему мнению, связана с различным характером применяемой жидкой матрицы. Для нейтральных и кислых матриц, какие применяют в случае пептидов и гликопептидов, главную роль в процессе образования MH^+ -ионов играют поверхностно-активные свойства молекул и, как следствие, их распределение на поверхности и внутри глицериновой капли. При использовании матриц, содержащих катионы щелочных металлов, существенную роль играет большая реакционная способность более полярных молекул в образовании катионированных ионов. Аналогичный эффект был отмечен ранее и при исследовании природных простагландинов [18]. Он заключался в том, что свободные кислоты проявляли себя значительно более реакционноспособными при образовании иона $[M + Na]^+$ и даже $[M + 2Na - H]^+$, чем соответствующие метилвые эфиры. Соображения такого рода в конечном счете определяют и выбор подходящей жидкой матрицы, и выбор степени дериватизации, необходимой для получения максимального ответного сигнала, что особенно важно при анализе малых количеств и при проведении количественных определений.

Экспериментальная часть

Масс-спектры LSIMS получали на масс-спектрометре M-80A (Hitachi, Япония) при энергии ионизирующего пучка He^+ 8 кэВ; в качестве жидкой матрицы использовали глицерин с добавкой следовых количеств водного раствора NaCl. Спектры регистрировали в виде осциллографической записи участка с m/z 400—800 или 700—720 в режиме последовательного сканирования. Приготовление модельных композиций с заданным содержанием фузикокицинов А, С, J, H проводили смешиванием адекватных объемов их метанольных растворов с известной концентрацией. Из полученных смесей растворитель отгоняли и высушенные пробы перерастворяли в 30 мкл метанола. 3 мкл полученного метанольного раствора прибавляли к 1 мкл матрицы на серебряной мишени, перемешивали до полного испарения растворителя и использовали для получения масс-спектра.

Фузикокин А (содержание 96—98% определяли аналитической ВЭЖХ) получали многократной перекристаллизацией из этилацетата главного продукта микробного синтеза.

Фузикокицины С, J и H выделяли из остаточного фильтрата колоночной хроматографией на силикагеле и очищали до индивидуального состояния препаративной ВЭЖХ на хроматографе DuPont серии 8800. В качестве детектора применяли УФ-спектрофотометр с длиной волны 235 нм. Разделение осуществляли на колонке (9,4 × 250 мм) Zorbax C_8 в режиме последовательного изократического элюирования в системах MeOH/ H_2O (60 : 40) и MeCN/ H_2O (35 : 65) при 40° С и скорости потока 3 мл/мин. Аналитическое хроматографирование проводили на колонке (4,6 × 250 мм) Zorbax ODS C_{18} при 40° С и скорости потока 1 мл/мин; времена удерживания R_t (мин) для фузикокицинов А, С, J и H приведены в таблице.

Дейтерированный дигидрофузикокин А (Ia) получали по методу [17], продукт выделяли на жидкостном хроматографе фирмы Gilson (Франция) 70% водным метанолом при скорости потока 1 мл/мин на колонке (4,6 × 250 мм) Partisil 5 ODS-3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morris H. R., Pinaco M., Taylor G. W. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 117. № 1. P. 299—305.
2. Wada Y., Hayashi A., Masanori F., Katakuse I., Ichihara T., Nakabushi H., Matsuo T., Sacurai T., Matsuda H. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 749. № 3. P. 244—248.
3. Gibson B. W., Biemann K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 7. P. 1956—1960.

4. Katakuse I., Ichihara T., Nakabushi H., Matsuo T., Matsuda H., Wada Y., Hayashi A. // Biomed. Mass Spectrom. 1984. V. 11. № 8. P. 386—391.
5. Wada Y., Hayashi A., Katakuse I., Matsuo T., Matsuda H. // Biomed. Mass Spectrom. 1985. V. 12. № 3. P. 122—126.
6. Biemann K. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1988. V. 16. № 1—12. P. 99—112.
7. Barber M., Bordoli R. S., Elliott G. J., Sedgwick R. D., Tyler A. N. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1. 1983. V. 79. № 5. P. 1249.
8. Glench M. R., Garner G. V., Gordon D. B., Barber M. // Biomed. Mass Spectrom. 1985. V. 12. № 7. P. 355—357.
9. Naylor S., Findeis A. F., Gibson B. W., Williams D. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 20. P. 6359—6363.
10. Naylor S., Skelton N. J., Williams D. H. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1986. № 21. P. 1619—1621.
11. Caprioli R. M., Moore W. T., Fan T. // Rapid communications in mass spectrometry. 1987. V. 1. № 1. P. 15—18.
12. Садовская В. Л., Катыхикова Т. И., Ракитин Л. Ю., Столпакова В. В., Муромцев Г. С. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 198—204.
13. Муромцев Г. С., Герасимова Н. М., Кобрин Н. С., Коренева В. М., Смоляков В. В. // Успехи микробиологии. 1984. Т. 19. С. 106—135.
14. Muromtsev G. S., Gorbatyuk M. S., Grishina I. I., Krasnopolskaya L. M., Priede M. A., Sadvovskaya V. L., Stolpakova V. V., Sultonov Yu. S. // Progr. Industr. Microbiol. 1989. V. 27. Bioactive metabolites from microorganisms. P. 193—203.
15. Clay K. L., Stene D. O., Murphy R. C. // Biomed. Mass Spectrom. 1984. V. 11. № 1. P. 47—49.
16. Price K. R., Mellon F. A., Self R., Fenwick G. R., Osman S. F. // Biomed. Mass Spectrom. 1985. V. 12. № 2. P. 79—85.
17. Шевченко В. П., Нагаев И. Ю., Мясоедов Н. Ф. // Радиохимия. 1989. Т. 31. № 3. С. 90—95.
18. Садовская В. Л., Ракитин Л. Ю., Голованова Н. К., Когтев Л. С., Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 956—960.

Поступила в редакцию
7.XII.1989

V. L. SADOVSKAYA, L. Yu. RAKITIN, I. I. GRISHINA, L. M. KRASNOPOLSKAYA,
G. S. MUROMTSEV, V. P. SHEVCHENKO*

**APPLICATION OF LIQUID SECONDARY ION MASS SPECTROMETRY
FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF FUSICOCCIN
TERPENOIDS PRODUCED BY *FUSICOCCUM AMUGDALY DEL.***

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

* *Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Application of the liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS) for quantitative evaluation of the fusicoccin terpenoids in the cultural liquid of *Fusicoccum amygdali Del.* has been studied. Function of the $[M + Na]^+$ ion intensity ratio $I_{C, J, H}/I_A$ versus the fusicoccin C, J or H amount being linear within 1—5 nmoles, fusicoccin C, J and H contents can be determined in mixtures containing known amount of fusicoccin A. For quantitative determination of fusicoccin A in the cultural liquids the isotopic dilution method is suggested with $[^2H_4]$ dihydrofusicoccin A as the internal standard.

It is shown that a rise in the relative polarity of compounds being analysed increases the LSIMS signal response.