

*На правах рукописи*

**Соболевский Тимофей Геннадьевич**

**Определение следовых концентраций аминокислот, различных органических кислот и Сахаров при их совместном присутствии методом реакционной хромато-масс-спектрометрии в водных и органических растворах**

02.00.02 - Аналитическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук



Москва - 2004

ОБЯЗАТЕЛЬНЫЙ  
БЕЗВУЗВУШНЫЙ  
ЭКЗЕМПЛЯР

Издательство ООО "МАКС Пресс".  
Лицензия ИД № 00510 от 01.12.99 г.  
Подписано к печати 15.03.2004 г.  
Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 280.  
Тел. 939-3890,939-3891,928-1042. Тел./факс 939-3891.  
119992, ГСП-2, Москва,  
Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова.

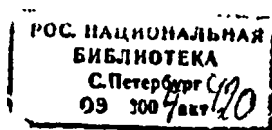
## Общая характеристика работы

Актуальность темы. В настоящее время все чаще возникает необходимость высокоселективного и высокочувствительного определения состава таких биологически важных соединений, как аминокислоты, органические кислоты и сахара, в различных объектах. Подобные исследования проводятся при диагностике различных заболеваний, в том числе врожденных. Состав органических кислот и Сахаров — один из показателей качества пищевой продукции и различных напитков. Микробиологические исследования также требуют определения этих классов соединений на ультранизком уровне.

При определении таких соединений в ряде случаев используется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и капиллярный электрофорез (КЭ), поскольку эти методы позволяют проводить определение указанных соединений напрямую (после предварительной очистки пробы). Однако пределы обнаружения (за исключением ВЭЖХ с амперометрическим детектированием), достигаемые в этом случае, сравнительно высоки, а в качестве элюента необходимо использование органических растворителей высокой степени чистоты. Кроме этого, ВЭЖХ и КЭ не позволяют проводить определение соединений различных классов при их совместном присутствии в смеси.

Газовая хроматография (ГХ) находит более широкое применение в анализе указанных соединений, и, как правило, определение проводят с использованием пламенно-ионизационного детектора. Поскольку рассматриваемые соединения чаще всего не подлежат прямому газохроматографическому анализу, необходимо проведение предколоночной дериватизации для перевода таких соединений в соответствующие летучие производные. В существующих публикациях уровень рабочих концентраций составляет обычно  $10^{-4} - 10^{-1}\%$ , и в подавляющем большинстве случаев не проводится определение всех рассматриваемых соединений при их совместном присутствии в смеси (или же определяют лишь несколько представителей каждого из классов).

В литературе наблюдается значительная противоречивость данных по условиям получения различных производных рассматриваемых классов соединений. Применимость некоторых описанных в литературе методов получения летучих производных для ГХ показана только на модельных смесях соединений, а не на реальных объектах, хотя матрица может оказывать настолько сильное мешающее влияние, что ни о каком не только количественном, но и качественном установлении состава не может быть и речи. Также в литературе редко приводятся данные по пределам детектирования для соответствующих летучих производных, и совершенно не рассматривается приме-



ние концентрирования для снижения предела обнаружения. Как правило, только малая часть реакционной смеси, полученной после дериватизации, подвергается анализу (1-2 мкл из 0.5-1 мл конечного экстракта), что приводит к значительному повышению пределов обнаружения.

Необходимо отметить немногочисленность работ по использованию реакционной хромато-масс-спектрометрии для анализа отдельных групп соединений, относящихся к рассматриваемым классам, хотя она является более высокочувствительным и, в большинстве случаев, - более высокоселективным методом. Кроме того, масс-спектры летучих производных регистрируют для относительно больших количеств веществ, хотя известно, что общий вид масс-спектра зависит от концентрации, и чем ниже концентрация, тем больше масс-спектр может отличаться от библиотечного.

Таким образом, актуальной является разработка общей методологии получения и последующего анализа летучих производных жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, а также Сахаров, спиртов и стеролов на уровне следов при их совместном присутствии в водном либо органическом растворе.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлась разработка способа определения жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, а также Сахаров, спиртов и стеролов в водных и органических растворах (экстрактах) при их совместном присутствии в смеси на уровне следовых концентраций методом реакционной хромато-масс-спектрометрии и снижения пределов обнаружения за счет использования сорбционного концентрирования из органического раствора (экстракта) с последующим анализом всего концентрата.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить закономерности силилирования различных жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, Сахаров, спиртов и стеролов в органических растворах с использованием гексамтилдисилазана (ГМДС), *N,O*-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА), *N*-метил-*N'*-третбутилдиметилсилилтрифторацетамида (МТБСТФА) и различных растворителей, и выбрать условия ГХ-МС определения соответствующих триметилсилильных (ТМС) и третбутилдиметилсилильных (ТБДМС) производных;
- изучить масс-спектры электронной (ЭИ) и химической (ХИ) ионизации для различных количеств этих производных и провести оценку пределов детектирования в режиме регистрации полного ионного тока и селективного ионного детектирования;

- разработать методологию определения жирных, дикарбоновых, гидроксид-, оксо- и аминокислот, Сахаров, спиртов и стеролов при их одновременном присутствии в смеси на уровне следов методом реакционной ГХ-МС;
- изучить условия дериватизации в водно-органическом растворе для аминокислот, жирных, дикарбоновых и других органических кислот с помощью реакции этерификации — ацилирования (реагент — изобутилхлорформат, **ИБХФ**) и разработать условия ГХ-МС определения получающихся производных;
- изучить масс-спектры ЭИ и ХИ для различных количеств соответствующих изобутоксикарбонильных производных и алкиловых эфиров и оценить пределы детектирования;
- изучить состав жирных, дикарбоновых, гидроксид-, оксо- и аминокислот, а также Сахаров, выделенных экстракцией из лиофилизированной культуры *E. Coli* (после дериватизации);
- изучить состав жирных, дикарбоновых и аминокислот, выделенных из клеточных культур аденокарциномы прямой кишки человека и фибробластов (после дериватизации), и возможность дифференциации этих типов клеток;
- разработать способ определения следовых количеств аминокислот в водном растворе, основанный на получении N-изобутоксикарбонил-О-гептафторбутиловых (**ИБОК-ГФБ**) производных, их экстракции хлороформом, сорбционном концентрировании этих производных из органического раствора (экстракта) и ГХ-МС анализе всего концентрата.

**Научная новизна.** В работе изучены условия дериватизации широкого круга веществ (всего 60 соединений), принадлежащим к классам аминокислот, жирных, дикарбоновых, гидроксид- и оксокислот, а также Сахаров и стеролов с использованием следующих реагентов: ГМДС, БСТФА, МТБСТФА, ИБХФ. Показаны преимущества и недостатки каждого способа получения летучих производных и установлены оптимальные условия дериватизации и определения изученных веществ при их совместном присутствии.

Для всех производных изучены масс-спектры для различных количеств веществ. Получены масс-спектры ЭИ ТМС производных ряда органических кислот, Сахаров и стеролов, отсутствующие в библиотеке масс-спектральных данных NIST 98. Впервые представлены масс-спектры ЭИ N-изобутоксикарбонил-0-изобутиловых и N-изобутоксикарбонил-0-гептафторбутиловых эфиров аминокислот, а также гептафторбутиловых эфиров жирных и дикарбоновых кислот. Установлены пределы детектирования всех соответствующих производных в режиме регистрации полного ионного тока (по масс-хроматограмме) и селективного ионного детектирования, которые составили

$2.5 \times 10^{-9} - 2.0 \times 10^{-12}$  з и  $1.4 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-12}$  з в пробе (в зависимости от соединения и типа производных).

В режиме ХИ положительных ионов изучены масс-спектры ТМС производных гидрокси- и оксокислот, стеролов и Сахаров, N-юобутоксшсарбонил-0-изобутиловых и N-изобутоксикарбонил-О-гептафторбутиловых эфиров аминокислот, а также изобутиловых и гептафторбутиловых эфиров жирных и дикарбоновых кислот. Показано, что пределы детектирования всех изученных производных составляли  $3.4 \times 10^{-9} - 5.0 \times 10^{-12}$  з в режиме регистрации полного ионного тока (по масс-хроматограмме) и  $1.0 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-12}$  з в случае селективного ионного детектирования (в зависимости от соединения и типа производных).

Предложена методология определения жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, а также спиртов, Сахаров и стеролов при их одновременном присутствии в смеси на уровне следов, основанная на обработке одной части образца смесью БСТФА с пиридином (после высушивания), а другой - смесью ИБХФ с гептафторбутанолом в водно-органическом растворе. При этом в первом случае в виде ТМС производных определяются все классы соединений, кроме аминокислот, а во втором - аминокислоты, жирные, дикарбоновые и короткоцепные гидрокси- и оксокислоты.

На основании проведенных исследований установлен состав свободных аминокислот, а также других органических кислот и Сахаров в лиофилизированной культуре клеток *E. Coli* (штамм *K-12 HfrH thi*).

Проведено исследование состава жирных, дикарбоновых и аминокислот в суспензии клеток аденокарциномы прямой кишки человека и фибробластов и показана возможность дифференциации этих типов клеток на основании различия в составе аминокислот.

Предложен способ определения аминокислот в водных растворах, основанный на получении ИБОК-ГФБ производных, их экстракции хлороформом, сорбционном концентрировании этих производных из органического раствора (экстракта) и ГХ-МС анализе всего концентрата, позволяющий снизить пределы обнаружения по крайней мере на 2 порядка.

Практическая значимость. Предложенная методология позволяет решать задачи определения следовых концентраций широкого круга веществ в водных и органических растворах при их совместном присутствии. Изученные закономерности дериватизации соединений различных классов позволяют выбрать наиболее подходящий реагент и условия проведения реакции в зависимости от цели и задач исследования, а также предполагаемого состава смеси.

Масс-спектры ЭИ и ХИ, полученные для различных производных всех изученных соединений, позволяют увеличить селективность определения и дополнительно снизить пределы детектирования при использовании селективного ионного детектирования.

Масс-спектры ЭИ соединений, отсутствующих в библиотеке масс-спектральных данных NIST 98, позволяют увеличить достоверность идентификации, что особенно важно в анализе аминокислот в виде изобутоксикарбонильных производных.

Разработанная методология анализа микробиологических образцов позволяет проводить высокочувствительное и селективное определение широкого круга соединений в указанных объектах на следовом уровне.

Предложенный способ определения аминокислот в раковых клетках и фибробластах позволяет увеличить достоверность дифференциации раковых и здоровых клеток.

Разработанный способ сорбционного концентрирования из органических растворов обеспечивает возможность снижения пределов обнаружения по крайней мере на 2 порядка благодаря ГХ-МС анализу всего концентрата.

#### На защиту выносятся:

- оптимизированные условия дериватизации соединений, принадлежащих к классам жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, спиртов, Сахаров и стеролов с использованием таких реагентов, как ГМДС, БСТФА, МТБСТФА, ИБХФ;
- масс-спектры ЭИ ТМС производных различных органических кислот, Сахаров и стеролов, а также Л-изобутоксикарбонил-О-изобутиловых, N-изобутоксикарбонил-О-гептафторбутиловых эфиров аминокислот, изобутиловых и гептафторбутиловых эфиров жирных и дикарбоновых кислот, и соответствующие пределы детектирования;
- масс-спектры ХИ положительных ионов ТМС производных гидрокси- и оксокислот, спиртов, Сахаров и стеролов, N-изобутоксикарбонил-О-изобутиловых и N-изобутоксикарбонил-О-гептафторбутиловых эфиров аминокислот, изобутиловых и гептафторбутиловых эфиров жирных и дикарбоновых кислот, и соответствующие пределы детектирования;
- методология определения жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, а также спиртов, Сахаров и стеролов при их одновременном присутствии в смеси на уровне следов, основанная на обработке одной части образца смесью БСТФА с пиридином (после высушивания), а другой - смесью ИБХФ с гептафторбутанолом в водно-органическом растворе;

- результаты определения состава соединений изученных классов, выделенных экстракцией из лиофилизированной клеточной культуры *E. Coli*;
- способ дифференциации клеток аденокарциномы и фибробластов, основанный на определении различия в составе аминокислот методом реакционной ГХ-МС;
- способ определения аминокислот в водном растворе, основанный на получении ИБОК-ГФБ производных, их экстракции хлороформом, сорбционном концентрировании производных и ГХ-МС анализе всего концентрата, позволяющий снизить пределы обнаружения по крайней мере на 2 порядка.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на Питтсбургской конференции по аналитической химии и прикладной спектроскопии (12-17 марта.2000 г., Новый Орлеан, Луизиана, США), 24-м Международном симпозиуме по хроматографии (15-20 сентября 2002 г., Лейпциг, Германия) и 8-м Международном симпозиуме по гибридным методам в хроматографии (4-6 февраля 2004 г., Брюгге, Бельгия).

Публикации. По материалам работы опубликовано 8 работ в виде статей и тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка использованных литературных источников.

Материал диссертации изложен на 178 страницах, содержит 28 таблиц и 83 рисунка. Список литературных источников состоит из 96 наименований.



## Основное содержание работы

### Исходные вещества, аппаратура, техника эксперимента

Работу проводили на хромато-масс-спектрометре спектрометре "Automass Mult?" (ThermoQuest, Франция) в сочетании с газовым хроматографом "Trace GC" (ThermoQuest, CE Instruments, Италия), оборудованном инжектором для ввода проб с делением/без деления потока. Для разделения силильных производных использовали капиллярную кварцевую колонку RTX-5K1S (Restek, США) 30 м x 0.32 мм x 0.25 мкм с привитой неподвижной фазой SE-54 (5% фенил 95% диметилполисилоксан), а в случае изобутоксикарбонильных производных и алкиловых эфиров - колонку CP Sil 24CB (Varian, США) 30 м x 0.32 мм x 0.5 мкм с неподвижной фазой средней полярности (50% фенил 50% диметилполисилоксан). Объем пробы - 1 мкл.

В качестве модельных соединений использовали 17 аминокислот, 17 жирных кислот, 6 дикарбоновых кислот, 7 гидроксикислот, 2 оксокислоты, 5 Сахаров, 4 стерола, 2 спирта.

Разделение проводили в режиме программирования температуры, варьируя начальную температуру термостата, скорость нагрева и температуру конечной изотермы. В качестве газа-носителя использовали гелий марки «А» (99.99%).

Масс-спектрометрическую регистрацию соответствующих производных осуществляли в режиме полного ионного тока (ПИТ) и селективного ионного детектирования (СИД). Масс-спектры получали в условиях электронной и химической ионизации, используя в последнем случае изобутан (99.5%) в качестве газа-реагента.

Температура ионного источника составляла 100-250°C в зависимости от способа ионизации. Регистрацию спектров ЭИ проводили в диапазоне масс 90-750 D для силильных производных, и 80-400 D- для изобутоксикарбонильных производных и изобутиловых / гептафторбутиловых эфиров. Энергия электронов - 70 эВ. Идентификацию продуктов дериватизации проводили путем библиотечного поиска в базе масс-спектральных данных NIST 98, а также вручную. В случае ХИ масс-спектры регистрировали в диапазоне 200-800 D для силильных производных и 150-815 D в случае изобутоксикарбонильных производных и изобутиловых / гептафторбутиловых эфиров. Энергия электронов в ХИ - 160 эВ.

В качестве объекта исследования использовали лиофилизированную культуру *Escherichia Coli* (штамм K-12 HfrH thi, выращенный сотрудниками кафедры микробиологии биологического факультета МГУ В.В. Куц, И.Б. Котовой, Н.В. Угольковой и А.Д. Исмаиловым), а также суспензии физиологически активных и физиологически неактивных клеток аденокарциномы человека и фибробластов в изотоническом растворе, приготовленных сотрудниками Онкологического центра Н.Ю. Анисимовой и М.В. Киселевским.

## Дериватизация и хромато-масс-спектрометрическая идентификация летучих производных жирных, дикарбоновых, гидроксид-, оксо- и аминокислот, Сахаров, спиртов и стеролов

При проведении настоящего исследования нами были выбраны следующие реагенты: для получения силильных производных - гексаметилдисилазан, *N, O*-бис(триметилсилил)трифторацетамид, и *N*-метил-*N*-третбутилдиметилсилилтрифторацетамид, а для получения изобутоксикарбонильных производных и алкиловых эфиров - изобутилхлорформиат. Следует заметить, что любые силильные эфиры (а также сами реагенты) подвержены гидролизу, поэтому дериватизацию необходимо проводить в среде, не содержащей даже следов воды. Особенно это важно для ТМС производных, тогда как, по имеющимся данным, стабильность ТБДМС эфиров по отношению к гидролизу в  $10^4$  выше. Реакция же с ИБХФ протекает в водно-органической среде.

*Дериватизация гексаметилдисилазаном.* ГМДС - один из наиболее доступных реагентов для получения ТМС производных, широко используемый в настоящее время в практике реакционной газовой хроматографии. Дериватизация этим реагентом требует присутствия в качестве катализатора трифторуксусной кислоты (ТФУК).

Из литературы известно, что наиболее сложную задачу представляет собой получение ТМС производных аминокислот, поэтому нами прежде всего была изучена возможность дериватизации этого класса соединений. Поскольку аминокислоты очень плохо растворимы в органических растворителях, для дериватизации необходимо использовать упаренные досуха водные растворы. Аминокислоты в водном растворе при *pH* существуют в виде внутренних солей, и для разрушения этой структуры их стандартные растворы обычно готовят в *0.1M HCl*.

Проведение дериватизации модельного раствора 17 аминокислот в оптимальных условиях, выбранных в результате эксперимента ( $100^\circ\text{C}$  в течение 1 ч.), показало, что были получены производные только для аланина, глицина, валина, лейцина, изолейцина, пролина, серина, треонина, метионина, тирозина и триптофана, т.е. 11 из 17 соединений. Более того, масс-спектрометрическое исследование показало, что в ряде случаев происходило образование не *N(O)*-ТМС ТМС эфиров аминокислот, а *N(O)*-трифторацетил ТМС эфиров. Это означает, что ТФУК сама взаимодействовала с аминокислотами, ацилируя их по аминогруппе, а реакционной способности ГМДС не хватало для замещения трифторацетильной группы на ТМС группу. К недостаткам этой реакции следует отнести необходимость работы с агрессивной ТФУК, выделение аммиака (а значит, опасность проведения реакции в замкнутом объеме) и образование осадка  $\text{NH}_4\text{CF}_3\text{COO}$ , на котором может происходить адсорбция образующихся производных. По этой причине в дальнейших исследованиях мы отказали-

лись от использования ГМДС в качестве дериватирующего реагента и не использовали его для получения летучих производных остальных соединений.

*Дериватизация N,0-бис(триметилсил)трифторацетамидом.* БСТФА был применен для дериватизации всех изучаемых соединений. Обычно при проведении этой реакции требуется присутствие полярного растворителя - имеющиеся в литературе данные указывают на то, что выход ТМС производных в этом случае выше. Нами было установлено, что пиридин является лучшим растворителем для всех изучаемых соединений (кроме аминокислот), тогда как при использовании ацетонитрила или тетрагидрофурана полного растворения Сахаров и некоторых других веществ добиться не удавалось. Модельные соединения были разбиты на несколько групп, так как в противном случае наблюдали частичное либо полное перекрытие хроматографических пиков, отвечающих соответствующим производным. Поскольку было необходимо изучить масс-спектры всех производных, и в точности установить, какие ионы являются характеристичными для каждого соединения, перекрытие хроматографических пиков на данном этапе исследования было недопустимо.

Нами было установлено, что максимальный выход ТМС производных жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксокислот, Сахаров, спиртов и стеролов наблюдался при соотношении объемов пиридина (содержащего дериватируемые соединения) и БСТФА 1:2, температуре 100°C и времени проведения реакции 1 ч. Также было показано, что в этих условиях не происходило количественного образования ТМС производных аминокислот.

Имеющиеся в литературе данные по условиям получения ТМС производных аминокислот с этим реагентом крайне противоречивы. Можно только сказать, что дериватизация аминокислот БСТФА происходит в гораздо более жестких условиях.

Нам удалось получить летучие производные только 14 из 17 модельных аминокислот (что находится в противоречии с литературными данными). Варьирование температурно-временного режима в сочетании с высушиванием, а также использование ацетонитрила вместо пиридина так и не позволило нам получить ТМС эфиры аспарагина, аргинина и гистидина. Возможно это было связано с присутствием следовых количеств воды в используемых растворителях.

Для производных всех исследуемых соединений, полученных в выбранных нами оптимальных условиях, были изучены масс-спектры ЭИ и ХИ. В первом случае большинство соединений претерпевало значительную фрагментацию, интенсивность пика молекулярного иона  $[M]^+$  была незначительной, либо ион  $[M]^+$  отсутствовал в масс-спектрах. У всех ТМС производных в масс-спектре присутствовал малоинтенсивный пик иона  $[M-CH_3]^+$ . Показано, что в случае жирных кислот соотношение интенсивностей пиков ионов с  $m/z = 129$  и  $132$  может служить показателем

насыщенности / ненасыщенности: так, для насыщенных жирных кислот  $I(m/z\ 129) \leq I(m/z\ 132)$ , а при наличии двойных связей —  $I(m/z\ 129) \gg I(m/z\ 132)$ .

В масс-спектрах ТМС производных изомерных Сахаров, фруктозы и галактозы, присутствовали одинаковые ионы, однако их интенсивности заметно отличались.

Использованная нами версия библиотеки масс-спектральных данных NIST 98 содержала сведения не для всех производных изученных соединений: в ней отсутствовали масс-спектры ТМС эфиров ундекановой кислоты, всех ненасыщенных жирных кислот (за исключением линоленовой), /5-гидроксипентадекановой, 22-гидроксидокозановой, хинной, шикимовой (приведена неверная структура), хлорогеновой кислот, ***n*-октил- $\beta$ -D-глокопиранозид**, сахарозы, трегалозы, линалоола и всех стеролов (за исключением катехола). Масс-спектр ТМС эфира  $\alpha$ -кетопропионовой кислоты, полученный нами, не соответствует масс-спектру, приведенному в NIST 98, при этом есть все основания полагать (исходя из возможных направлений фрагментации), что в библиотеке представлены ошибочные данные.

Оценку пределов детектирования (ПД) для ТМС производных всех изученных соединений, полученных в выбранных нами условиях, проводили в режимах ПИТ (по масс-хроматограмме) и СИД. В случае ЭИ ПД составили  $1.2 \times 10^{-11} - 2.5 \times 10^{-9}$  г, а при использовании СИД- от  $5.0 \times 10^{-12}$  до  $1.4 \times 10^{-9}$  г в пробе в зависимости от соединения.

В режиме ХИ в выбранных нами оптимальных условиях были получены масс-спектры ТМС эфиров гидрокси-, оксокислот, а также Сахаров, спиртов и стеролов. Масс-спектры многих соединений содержали пик протонированного молекулярного иона  $[MH]^+$ , относительная интенсивность которого была максимальной. В ряде случаев в масс-спектрах присутствовал пик иона  $[M-89]^+$ , отвечающего элиминированию группы  $(CH_3)_3SiO$ . ТМС производные Сахаров, особенно дисахаридов, претерпевали выражающую фрагментацию, и пик  $[MH]^+$  присутствовал только у производного галактозы.

При использовании ХИ ПД составили  $2.0 \times 10^{-11} - 1.5 \times 10^{-9}$  г и  $7.0 \times 10^{-12} - 1.0 \times 10^{-9}$  г в режимах ПИТ (по масс-хроматограмме) и СИД, соответственно.

Таким образом, нами были разработаны условия, позволяющие проводить определение жирных, дихарбоновых, гидрокси-, оксокислот, спиртов, Сахаров и стеролов при их совместном присутствии в органическом растворе на уровне следов в виде ТМС производных методом реакционной ГХ-МС (ЭИ/ХИ), когда определение аминокислот не требуется.

***Дериватизация N-метил-*M*-третбутилдиметилсилилтрифторацетамидом.*** МТБСТФА был применен только для исследования дериватизации аминокислот как наиболее трудно дериватируемых соединений. Были изучены условия получения ТБДМС эфиров аминокислот в различных температурно-временных режимах с использованием в качестве растворителя пиридина и ацетонитрила. Для разрушения

структуры внутренней соли аминокислоты предварительно растворяли в 0.1 М и 0.01 МНС1. Установлено, что при температуре 70°C и времени дериватизации 30 мин (растворитель — ацетонитрил) происходит образование соответствующих производных 17 модельных аминокислот независимо от того, какой концентрации НС1 использовали для приготовления исходного раствора.

Нами была изучена стабильность ТБДМС эфиров аминокислот во времени и при разбавлении. Реакционные смеси при хранении в холодильнике при 4°C были стабильны в течение как минимум одной недели. Для изучения стабильности производных при разбавлении, реакционные смеси разбавляли в 10 и в 500 раз ацетонитрилом и МТБСТФА. Оказалось, что уже при 10-кратном разбавлении ацетонитрилом на соответствующих хроматограммах отсутствовали пики ТБДМС производных лизина, аргинина и гистидина. Этот факт можно объяснить их нестабильностью в отсутствие избытка реагента. Разбавление же реакционных смесей самим МТБСТФА приводило к пропорциональному уменьшению площадей пиков ТБДМС эфиров в соответствии с фактором разбавления.

Масс-спектры ТБДМС производных аминокислот изучали в условиях ЭИ. Было показано, что для ТБДМС эфиров аминокислот типичным являлся отрыв третбутильной группы, что приводило к появлению интенсивных пиков  $[M-C_3H_7]^+$ . ПД этих производных в режимах ПИТ (по масс-хроматограмме) и СИД составили  $3.0 \times 10^{-12}$  —  $3.5 \times 10^{-10}$  з и  $1.0 \times 10^{-12}$  —  $1.2 \times 10^{-10}$  з, соответственно (в зависимости от соединения).

Таким образом, в результате проведенных нами исследований были разработаны условия определения аминокислот на уровне следов, основанные на получении ТБДМС производных и последующем ГХ-МС анализе. Поскольку целью работы являлось изучение возможности определения всех классов соединений при их одновременном присутствии в смеси, представлялось логичным использовать для их дериватизации МТБСТФА. Однако предварительное исследование состава лиофилизированной культуры *E.Coli* показало, что в присутствии значительного количества сахаров в образце одновременная регистрация всех классов соединений в виде ТБДМС производных невозможна.

*Дериватизация изобутилхлорформиатам.* По вышеуказанной причине нами была изучена дериватизация аминокислот, жирных, дикарбоновых и других органических кислот ИБХФ в сочетании с изобутанолом (ИБ) и гептафторбутанолом (ГФБ) и возможность их ГХ-МС определения на уровне следов. Оказалось, что среди изученных нами соединений летучие производные образовывали только жирные, дикарбоновые и аминокислоты (а также а-кетоглутаровая, а-кетопропионовая и яблочная кислоты). Вместе с тем, подобная селективность алкилхлорформиатов исключительно полезна при анализе реальных проб, содержащих значительные количества Сахаров. При использовании ИБХФ с ИБ для дериватизации смеси

жирных, дикарбоновых и аминокислот в выбранном нами соотношении реагентов  $\text{H}_2\text{O}$  - ИБ - пиридин - ИБХФ 10:2:1:2 были получены N-изобутоксикарбонил-0-изобутиловые эфиры (ИБОК-ИБ) 15 из 17 аминокислот, а также изобутиловые и диизобутиловые эфиры всех жирных и дикарбоновых кислот.

В случае гидроксиаминокислот серина и треонина, площади соответствующих пиков на хроматограмме были существенно ниже остальных производных. Варьирование соотношений реагентов и длительное воздействие ультразвукового поля не привело к значимому увеличению выхода этих производных. Кроме этого, не были получены производные гистидина и аргинина.

Площади пиков производных аминокислот на соответствующих хроматограммах, полученных в случае использования для дериватизации раствора этих соединений в 0.1 M HCl и дистиллированной воде, значимо не отличались. Это является существенным преимуществом данного способа получения летучих производных аминокислот.

При дериватизации трех указанных классов соединений смесью ИБХФ и гептафторбутанола при экспериментально выбранном соотношении реагентов  $\text{H}_2\text{O}$  - ГФБ - пиридин - ИБХФ 10:2:1:1, были получены N-изобутоксикарбонил-О гептафторбутиловые (ИБОК-ГФБ) эфиры всех аминокислот, кроме аргинина, и гептафторбутиловые и дигептафторбутиловые эфиры всех жирных и дикарбоновых кислот. Несмотря на существенно большую молекулярную массу, фторсодержащие производные элюировались при меньших температурах, что позволило сократить время анализа и получить более узкие пики.

Экспериментально было показано, что температура не оказывала заметного влияния на эффективность дериватизации ИБХФ, поэтому реакцию проводили при комнатной температуре. Вместе с тем, время реакции должно быть минимизировано, поскольку при продолжительном контакте с водной фазой наблюдали падение сигнала для некоторых производных.

Масс-спектры ИБОК-ИБ / ИБОК-ГФБ производных аминокислот, а также ИБ / ГФБ эфиров жирных и дикарбоновых кислот были изучены в режимах ЭИ и ХИ. В случае ЭИ, ион  $[M-101]^+$ , отвечающий отщеплению групп  $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}$ , присутствовал в масс-спектрах производных всех аминокислот, за исключением лизина, триптофана и цистина, причем его интенсивность во многих случаях была максимальной. Ион с  $m/z$  91  $[\text{C}_6\text{H}_7\text{CH}_2]^+$  характерен для производных ароматических аминокислот, фенилаланина и тирозина, причем в последнем случае интенсивность этого иона очень низка из-за присутствия гидроксигруппы в кольце. Рассмотрение масс-спектра производного аспарагина позволило предположить, что его амидогруппа не только не дериватизировалась, но и элиминировала воду с образованием нитрила. По всей видимости, это происходило в инжекторе, поскольку пик производного аспарагина был

несимметричным. Кроме этого, было обнаружено, что в случае алифатических гидроксиаминокислот (серии, треонин) происходило образование *N,O*-диизобутоксикарбонил-0-изобутиловых эфиров, хотя считается, что алкилхлорформиаты взаимодействуют только с Oil-группами, расположенными в а-положении к карбоксилу.

Масс-спектры ЭИ ИБОК-ИБ производных аминокислот в нашей работе были получены впервые. В табл. 1 приведены характеристичные ионы и их относительные интенсивности для этих производных.

Таблица 1. Характеристичные ионы и их относительные интенсивности для ИБОК-ИБ производных аминокислот в масс-спектрах электронной ионизации (жирным шрифтом выделены наиболее интенсивные ионы)

Соединение	ММ	m/z характеристичных ионов (I, %)
Аланин ИБОК-ИБ	245	116 (20), <b>144</b> (100)
Глицин ИБОК-ИБ	231	102 (35), 120 (25), <b>130</b> (100), 176 (35)
Валин ИБОК-ИБ	273	116 (40), <b>172</b> (100)
Лейцин ИБОК-ИБ	287	130 (25), <b>186</b> (100)
Изолейцин ИБОК-ИБ	287	130 (55), <b>186</b> (100)
Пролин ИБОК-ИБ	271	114 (20), <b>170</b> (100)
Аспарагин ИБОК-ИБ	270	113 (10), 141 (15), 143 (10), <b>169</b> (100)
Метионин ИБОК-ИБ	305	101 (35), 119 (80), 156 (20), <b>175</b> (100), 188 (20), 204 (45), 231 (70), 244 (20), 305 (30)
Треонин ИБОК-ИБ	375	<b>100</b> (100), 119 (53), 156 (45), 162 (17), 175 (33), 202 (19), 218 (14), 231 (33), 257 (4), 274 (7)
Серин ИБОК-ИБ	361	<b>104</b> (100), 142 (59), 176 (13), 187 (28), 204 (87), 243 (5), 260 (19)
Фенилаланин ИБОК-ИБ	321	91 (30), 120 (40), 130 (30), <b>148</b> (100), 164 (35), 204 (30), 220 (30)
Лизин ИБОК-ИБ	402	128 (40), <b>184</b> (100), 198 (15), 272 (10), 328 (10)
Тирозин ИБОК-ИБ	437	107 (45), <b>164</b> (100), 180 (10), 220 (55), 320 (25), 336 (10)
Триптофан ИБОК-ИБ	360	<b>130</b> (100), 360 (15)
Цистин ИБОК-ИБ	552	176 (30), <b>188</b> (100), 276 (20)

ПД ИБОК-ИБ производных аминокислот и ИБ эфиров жирных и дикарбоновых кислот в режимах ПИТ (по масс-хроматограмме) и СИД составили  $3.0 \times 10^{-12}$  -  $2.0 \times 10^{-10}$  з и  $1.0 \times 10^{-12}$  -  $7.0 \times 10^{-11}$  з, соответственно (в зависимости от соединения).

Масс-спектры ЭИ ИБОК-ГФБ производных аминокислот, ГФБ эфиров жирных и дикарбоновых кислот также были получены впервые. В табл. 2 приведены характеристичные ионы и их относительные интенсивности для ИБОК-ГФБ производных аминокислот.

Таблица 2. Характеристичные ионы и их относительные интенсивности для ИБОК-ГФБ производных аминокислот в масс-спектрах электронной ионизации

Соединение	ММ	$m/z$ характеристичных ионов (I, %)†
Аланин ИБОК-ГФБ	371	<b>144</b> (100), 270 (31)
Глицин ИБОК-ГФБ	357	102 (26), 113 (21), <b>130</b> (100), 183 (10), 256 (69), 258 (34), 302 (10)
Валин ИБОК-ГФБ	399	98 (26), 101 (35), 116 (58), <b>172</b> (100), 256 (12), 283 (13), 298 (14), 301 (6)
Лейцин ИБОК-ГФБ	413	101 (9), 112 (2), 130 (29), <b>186</b> (100), 256 (9), 301 (4), 312 (8)
Изолейцин ИБОК-ГФБ	413	101 (76), 130 (74), <b>186</b> (100), 256 (17), 283 (12), 301 (23), 312 (12), 357(2)
Пролин ИБОК-ГФБ	397	114 (38), <b>170</b> (100), 296 (23)
Аспарагин ИБОК-ГФБ	396	95 (84), 113 (34), 119 (9), 141 (10), 154 (6), <b>169</b> (100), 183 (5), 223 (8), 256 (20), 295 (36)
Метионин ИБОК-ГФБ	431	<b>101</b> (100), 114 (22), 116 (20), 119 (7), 127 (41), 156 (9), 175 (15), 204 (15), 256 (6), 270 (12), 284 (11), 301 (54), 311 (13), 327 (5), 357 (27), 431 (9)
Треонин ИБОК-ГФБ	501	<b>101</b> (100), 156 (12), 162 (5), 254 (6), 284 (13), 301 (47), 328 (18), 357 (13)
Серин ИБОК-ГФБ	487	101 (52), <b>104</b> (100), 113 (55), 142 (49), 148 (56), 176 (11), 204 (71), 224 (10), 270 (28), 301 (16), 314 (99)
Фенилаланин ИБОК-ГФБ	447	<b>91</b> (100), 120 (17), 131 (19), 146 (13), 164 (6), 220 (7), 256 (17), 330 (64)
Лизин ИБОК-ГФБ	528	100 (19), 110 (14), 116 (21), 128 (93), 143 (18), 153 (21), 172 (36), <b>184</b> (100), 198 (38), 256 (6), 272 (13), 310 (31), 355 (27), 454 (10)
Тирозин ИБОК-ГФБ	563	<b>107</b> (100), 163 (4), 346 (8)
Триптофан ИБОК-ГФБ	486	<b>130</b> (100), 486 (1)
Цистин ИБОК-ГФБ	804	96 (24), 102 (51), 113 (44), 118 (32), 144 (16), 146 (21), 223 (6), 256 (15), 269 (15), 295 (6), 301 (19), <b>314</b> (100), 346 (39), 370 (5), 402 (10)
Гистидин ИБОК-ГФБ	537	110 (31), 121 (23), 136 (50), 154 (11), <b>181</b> (100), 210 (24), 236 (22), 254 (9), 310 (35), 320 (74), 364 (23), 420 (45), 464 (8), 481 (5), 537 (31)

Как видно из данных табл. 2, ИБОК-ГФБ производные аминокислот претерпевали глубокую фрагментацию в условиях ЭИ, что, вообще говоря, типично для фторсодержащих соединений. В масс-спектрах ИБОК-ГФБ производных многих аминокислот также присутствовали ионы  $[M-101]^+$ , отвечающие отщеплению  $C_4H_9OSO$ . Кроме этого, например, ион с  $m/z = 144$  характерен как для ИБОК-ИБ, так и для ИБОК-ГФБ эфира аланина, ион с  $m/z = 130$  - для обоих производных глицина,  $m/z = 172$  - для обоих производных валина и т.д. Несмотря на существенную фрагментацию, в масс-спектрах производных метионина, гистидина и триптофана присутствовали пики молекулярных ионов, причем интенсивность пика  $[M]^+$  у производного гистидина достигала 30%.

Было установлено, что характер фрагментации ГФБ эфиров насыщенных жирных кислот уникален: независимо от длины углеродного скелета, в масс-спектрах всех гомологов присутствовали два наиболее интенсивных пика с  $m/z = 242$  и 255.

ПД ИБОК-ГФБ производных аминокислот и ГФБ эфиров жирных и дикарбоновых кислот в режимах ПИТ (по масс-хроматограмме) и СИД составили  $2.0 \times 10^{-12}$  -  $8.0 \times 10^{-10}$  з и  $1.0 \times 10^{-12}$  -  $1.0 \times 10^{-10}$  з, соответственно (в зависимости от соединения).

В выбранных нами оптимальных условиях были изучены масс-спектры ХИ ИБОК-ИБ / ИБОК-ГФБ производных аминокислот, а также ИБ / ГФБ эфиров жирных и ди-



карбоновых кислот. В масс-спектрах производных всех соединений присутствовал интенсивный пик  $[MH]^+$ . Значение  $m/z$  для  $[MH]^+$  изобутоксикарбонильного производного аспарагина подтверждает ранее сделанное предположение о том, что в действительности его амидогруппа превращается в нитрил до попадания в ионный источник масс-спектрометра. В случае же алифатических гидроксиминокислот, серина и треонина, величины  $m/z$  наиболее интенсивных пиков указывают на образование смешанных *N,O*-диизобутоксикарбонильных производных. В масс-спектрах производных лейцина, изолейцина, пролина, метионина и фенилаланина присутствовали малоинтенсивные пики ионов  $[M-101]^+$ , отвечающих элиминированию изобутоксикарбонильной группы. В масс-спектрах производных серина, треонина и тирозина также присутствовали пики ионов  $[M-117]^+$ , отвечающие отрыву  $C_4H_9OC(O)O$ .

Масс-спектры ХИ ИБ эфиров жирных и дикарбоновых кислот, помимо интенсивных пиков  $[MH]^+$ , содержали фрагменты  $[M-55]^+$  и  $[M-73]^+$ , образованные вследствие отщепления  $C_4H_7$  и  $C_4H_9O$ , причем среди эфиров дикарбоновых кислот ион  $[M-55]^+$  присутствовал только у малоновой кислоты. В масс-спектрах ИБ эфиров жирных кислот с длиной углеродного скелета до  $C_{16}$  включительно присутствовал только ион  $[M-55]^+$ , а для старших гомологов - оба этих иона.

В случае ГФБ эфиров дикарбоновых кислот происходило отщепление группы  $CF_3CF_2CF_2CH_2O$ , что приводило к появлению пиков ионов  $[M-199]^+$ , причем их интенсивность увеличивалась по мере роста длины углеродного скелета, и у последних трех гомологов она превышала относительную интенсивность протонированных молекулярных ионов.

В условиях ХИ ПД для ИБОК-ИБ производных аминокислот и ИБ эфиров жирных и дикарбоновых кислот в режимах ПИТ (по масс-хроматограмме) и СИД составляли  $5.0 \times 10^{-12} - 2.0 \times 10^{-9}$  з и  $1.0 \times 10^{-12} - 2.0 \times 10^{-10}$  з, а для ИБОК-ГФБ / ГФБ производных -  $1.8 \times 10^{-11} - 3.4 \times 10^{-9}$  з и  $6.0 \times 10^{-12} - 5.7 \times 10^{-10}$  з, соответственно (в зависимости от соединения).

Таким образом, на основании проведенных исследований по дериватизации и ГХ-МС определению различных классов соединений, нами предложена методология анализа жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, спиртов, Сахаров и стеролов при их одновременном присутствии в смеси на уровне следов. Она подразумевает обработку одной части образца смесью пиридина и БСТФА (после высушивания), а другой - смесью ИБХФ с гептафторбутанолом в водно-органическом растворе (для определения аминокислот, жирных и дикарбоновых кислот) с последующим ГХ-МС анализом соответствующих продуктов дериватизации.

Изучение состава соединений, выделенных из клеточных культур

**Определение состава соединений, выделенных из лиофилированной культуры *Escherichia Coll*** В качестве объекта исследования нами был выбран лиофилизированный штамм кишечной палочки *K-12 HfrH thi*, выращенный на среде Гловера, которая содержала значительное количество глюкозы. Клеточные оболочки были предварительно разрушены замораживанием в жидком азоте. Для определения гидрофобных соединений проводили экстракцию пиридином (с последующей конверсией в ТМС производные), а для определения аминокислот - водную экстракцию и дериватизацию ИБХФ.

В выбранных оптимальных условиях в соответствии с предложенной методологией нами были приготовлены и протериватизированы образцы лиофилизатов. Исследование показало, что полученные экстракты представляли собой очень сложные смеси, в которых концентрации компонентов отличались на порядки. Основную массу выделенных соединений, как было установлено масс-спектрометрически, представляли собой производные различных Сахаров, причем из-за большого их количества занимаемый ими интервал времен удерживания был очень широк, что не позволяло провести достоверное качественное определение совместно элюирующихся микрокомпонентов. В табл. 3 приведен список веществ, идентифицированных в образце лиофилизата, и оценка их содержания (% в пробе).

**Таблица 3.** Соединения, идентифицированные в образце лиофилизата *E. Coli* после экстракции пиридином и дериватизации БСТФА, и оценка их содержания ( $s_r \leq 0.20$ )

Соединение	Оценка содержания, %	Соединение	Оценка содержания, %
$\alpha$ -Кетопропионовая кислота, ЗТМС	$6.7 \times 10^{-3}$	D-Маннит, 6ТМС	$1.0 \times 10^{-4}$
Аланин, N-ТМС O-ТМС	$2.0 \times 10^{-3}$	D-Фруктоза, 5ТМС	$2.4 \times 10^{-3}$
Янтарная кислота, 2ТМС	$2.0 \times 10^{-3}$	Сорбираноза, 5ТМС	$1.2 \times 10^{-3}$
Яблочная кислота, 3ТМС	$2.7 \times 10^{-3}$	D-Мальтоза, 8ТМС	$2.0 \times 10^{-4}$
$\alpha$ -Кетоглутаровая кислота, 3ТМС	$1.3 \times 10^{-2}$	D-Тураноза, 7ТМС	$6.0 \times 10^{-4}$
Гексадекановая кислота, ТМС	$6.7 \times 10^{-4}$	Лактоза, 8ТМС	$1.0 \times 10^{-2}$
Октадекановая кислота, ТМС	$6.7 \times 10^{-4}$	Мелибиоза, 8ТМС	$5.0 \times 10^{-4}$
D-Галактоза, 5ТМС	$1.3 \times 10^{-2}$	Норвалин, N-ТМС O-ТМС	$2.7 \times 10^{-4}$
Трегалоза, 8ТМС	$4.4 \times 10^{-4}$	Фумаровая кислота, 2ТМС	$2.7 \times 10^{-4}$
Ксилуза, 4ТМС	$1.0 \times 10^{-4}$	3-Кетоглутаровая кислота, 3ТМС	$6.0 \times 10^{-4}$
Ксилит, 5ТМС	$1.0 \times 10^{-4}$	3-Гидроксиглутаровая кислота, 3ТМС	$3.3 \times 10^{-4}$
Талоза, 5ТМС	$4.0 \times 10^{-4}$	2-Гидроксиглутаровая кислота, 3ТМС	$4.7 \times 10^{-4}$
L-Альтоза, 3ТМС	$1.1 \times 10^{-2}$	D-Глюкоза, 5ТМС	$1.3 \times 10^{-1}$

Для оценки содержания использовали метод внешнего стандарта, анализируя смесь производных модельных соединений и сравнивая площади соответствующих пиков. В случае перегруженных пиков проводили дополнительное разбавление реакционной смеси. Идентификацию неизвестных проводили с использованием библиотеки масс-спектральных данных NIST 98. Из табл. 3 видно, что оценка содержания идентифицированных в образце лиофилизата *E.Coli* соединений составляла  $1.0 \times 10^{-4} - 1.3 \times 10^{-1} \%$ .

Для определения состава жирных, дикарбоновых и аминокислот в образце лиофилизата навеску обрабатывали дистиллированной водой, при этом происходило практически полное его растворение. Для того, чтобы достичь максимальной степени извлечения соединений, образец помещали в ультразвуковое поле на 15 мин.

Соединения, идентифицированные в образце после водной экстракции и дериватизации смесью ИБХФ-ИБ, а также оценка их содержания приведены в табл. 4. Соответствующая хроматограмма представлена рис. 1.

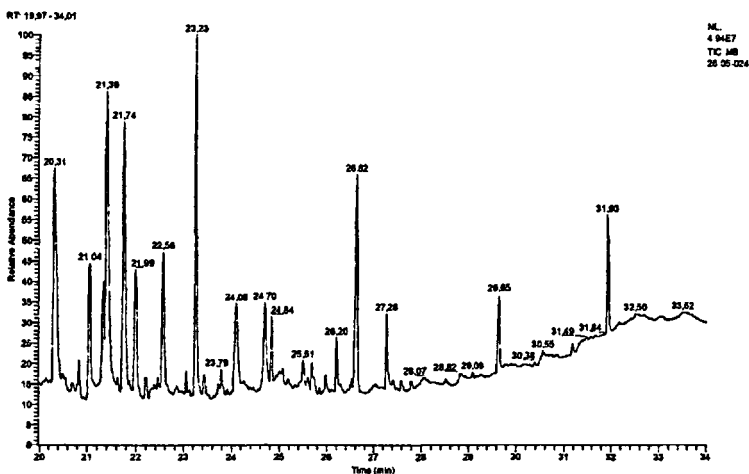


Рис. 1. Хроматограмма, полученная после дериватизации водного экстракта образца лиофилизата *E.Coli* смесью ИБХФ-ИБ

**Таблица 4. Соединения, идентифицированные в образце лиофилизата *E. Coli* после экстракции водой и дериватизации ИБХФ-ИБ, и оценка их содержания ( $s, \leq 0.20$ )**

Соединение	Оценка содержания, %	Соединение	Оценка содержания, %
Аланин, ИБОК-ИБ	$3.0 \times 10^{-2}$	Лизин, 2ИБОК-ИБ	$2.2 \times 10^{-1}$
Глицин, ИБОК-ИБ	$9.1 \times 10^{-5}$	Триптофан, ИБОК-ИБ	$2.3 \times 10^{-5}$
Валин, ИБОК-ИБ	$5.0 \times 10^{-3}$	Тирозин, 2ИБОК-ИБ	$5.0 \times 10^{-4}$
Лейцин, ИБОК-ИБ	$4.7 \times 10^{-4}$	$\beta$ -Аминоизомасляная кислота, ИБОК-ИБ	$4.4 \times 10^{-4}$
Изолейцин, ИБОК-ИБ	$1.0 \times 10^{-4}$	Норвалин, ИБОК-ИБ	$7.0 \times 10^{-5}$
Пролин, ИБОК-ИБ	$1.0 \times 10^{-4}$	Норлейцин, ИБОК-ИБ	$3.1 \times 10^{-4}$
Аспарагин, ИБОК-ИБ	$9.0 \times 10^{-5}$	Тетрадекановая кислота, ИБ	$1.0 \times 10^{-4}$
Метионин, ИБОК-ИБ	$5.0 \times 10^{-5}$	Гексадекановая кислота, ИБ	$5.2 \times 10^{-4}$
Треонин, 2ИБОК-ИБ	$2.1 \times 10^{-4}$	Октадекановая кислота, ИБ	$4.9 \times 10^{-4}$
Серин, 2ИБОК-ИБ	$2.3 \times 10^{-4}$	<i>cis/trans</i> -9-Октадеценная кислота, ИБ	$4.0 \times 10^{-5}$
Фенилаланин, ИБОК-ИБ	$5.2 \times 10^{-4}$		

Как видно из табл. 4, оценка содержания идентифицированных в образце соединений (преимущественно аминокислот) составляла  $2.3 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-3}\%$ . Следовательно, можно сделать однозначный вывод о целесообразности проведения экстракции водой с последующей дериватизацией экстракта при определении жирных и аминокислот.

**Определение состава аминокислот в клетках аденокарциномы и фибробластов человека.** В настоящее время наиболее общепринятым способом диагностики опухолевых тканей является гистологический метод, базирующийся на морфологических различиях нормальных и раковых клеток. Метод является весьма субъективным и имеются литературные данные о невысокой его достоверности. В связи с этим, актуальным является поиск новых подходов к увеличению достоверности диагностики рака на основании изучения особенностей нормальных и раковых клеток. В литературе имеются отрывочные данные, указывающие на пониженное содержание аминокислот в раковых клетках по сравнению с нормальными.

Нами было решено изучить состав аминокислот (а также жирных и дикарбоновых кислот) в клетках аденокарциномы и фибробластах (нормальных клетках соединительной ткани) в соответствии с предложенной методологией. Образцы клеточных культур представляли собой взвеси клеток (вскрытых замораживанием в жидком азоте) в изотоническом растворе.

Аминокислоты, идентифицированные в виде N-изобутоксикарбонил-O-гептафторбутиловых эфиров в исследованных образцах физиологически активных клеток аденокарциномы (*ac +*) и фибробластов (*fb +*), а также данные по оценке их содержания

представлены в табл. 5. Кроме этого, в этой таблице приведены расчетные коэффициенты ( $K$ ), численно равные отношению абсолютных концентраций аминокислот, обнаруженных в образцах фибробластов и аденокарциномы, соответственно.

Как видно из данных табл. 5, в образцах физиологически активных клеток аденокарциномы и фибробластов было обнаружено 16 аминокислот, однако раковые клетки оказались существенно обеднены аминокислотами по сравнению с фибробластами, на что указывают высокие значения коэффициента  $K$ . Особенно значимое отличие ( $K > 10$ ) наблюдалось для таких аминокислот, как валин, лейцин, изолейцин, аспарагин, метионин, треонин, фенилаланин, лизин, гистидин, триптофан, тирозин и цистин. Дикарбоновые кислоты обнаружены не были, а количества жирных кислот в обоих пробах существенно не отличались.

Таблица 5. Результаты анализа физиологически активных клеток аденокарциномы и фибробластов ( $s_r \leq 0.20$ ) на содержание аминокислот

Аминокислота	Оценка содержания, %		K
	ас.	фб.	
Аланин, ИБОК-ГФБ	$3.2 \times 10^3$	$1.6 \times 10^2$	5.0
Глицин, ИБОК-ГФБ	$7.6 \times 10^3$	$4.8 \times 10^3$	0.7
Валин, ИБОК-ГФБ	$7.2 \times 10^4$	$1.2 \times 10^2$	16.9
Лейцин, ИБОК-ГФБ	$1.2 \times 10^3$	$2.7 \times 10^2$	23.2
Изолейцин, ИБОК-ГФБ	$4.6 \times 10^4$	$1.5 \times 10^2$	31.9
Пролин, ИБОК-ГФБ	$5.2 \times 10^3$	$1.7 \times 10^2$	3.3
Аспарагин, ИБОК-ГФБ	$3.2 \times 10^4$	$4.0 \times 10^3$	12.7
Метионин, ИБОК-ГФБ	$3.4 \times 10^4$	$1.1 \times 10^2$	31.8
Треонин, ИБОК-ГФБ	$1.3 \times 10^3$	$1.3 \times 10^2$	10.3
Фенилаланин, ИБОК-ГФБ	$7.5 \times 10^4$	$2.1 \times 10^2$	27.9
Серин, ИБОК-ГФБ	$1.8 \times 10^3$	$1.3 \times 10^2$	7.5
Лизин, ИБОК-ГФБ	$1.3 \times 10^3$	$1.5 \times 10^2$	11.8
Гистидин, ИБОК-ГФБ	$1.6 \times 10^4$	$4.2 \times 10^3$	25.4
Триптофан, ИБОК-ГФБ	$1.7 \times 10^4$	$6.5 \times 10^3$	38.1
Тирозин, ИБОК-ГФБ	$8.2 \times 10^4$	$2.1 \times 10^2$	25.7
Цистин, ИБОК-ГФБ	$9.7 \times 10^5$	$1.2 \times 10^3$	12.8

На рис.2 представлены две хроматограммы, зарегистрированные для образца физиологически активных фибробластов (вверху) и физиологически активных клеток аденокарциномы (внизу) в режиме СИД после соответствующей пробоподготовки.

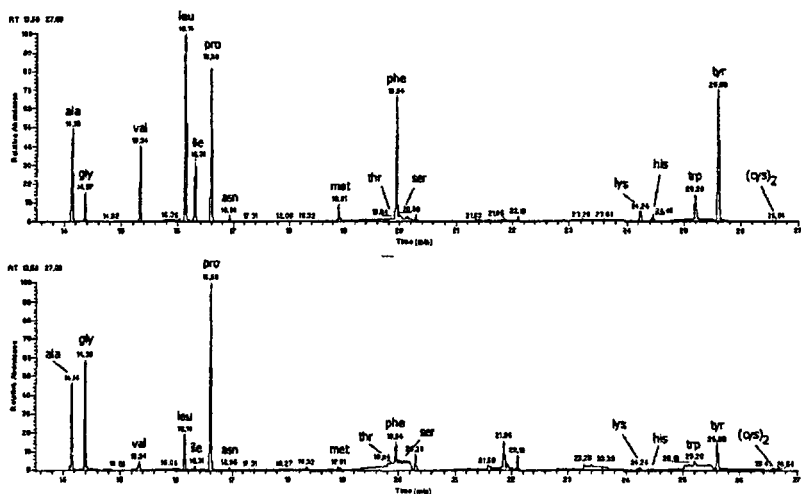


Рис 2. Хроматограммы, полученные для образца физиологически активных фибробластов (вверху) и клеток аденокарциномы (внизу) в режиме селективного ионного детектирования

Таким образом, полученные данные (см. табл. 5 и рис. 2) позволяют сделать вывод о значимом различии в составе аминокислот как внутри пробы, так и между пробами, что указывает на принципиальную возможность дифференцирования раковых и здоровых клеток. Эти результаты являются предварительными, и в настоящее время продолжают работы по накоплению экспериментальных данных.

### Определение следовых содержаний аминокислот в водных растворах с использованием сорбционного концентрирования

Снижение предела обнаружения аминокислот имеет важное значение, поскольку это может уменьшить как число клеток, поступающих на анализ, так и уровень определяемых в них концентраций. В связи с этим, нами была изучена возможность снижения пределов обнаружения аминокислот в водных растворах.

В качестве модельных соединений были выбраны ИБОК-ГФБ эфиры аминокислот, выделение которых включает стадию экстракции из воды летучим органическим растворителем - хлороформом. Существенное отличие температур кипения хлороформа ( $t_{кип} = 61.7^{\circ}\text{C}$ ) и ИБОК-ГФБ производных аминокислот, которые являются среднелетучими соединениями ( $t_{кип} \approx 260 + 390^{\circ}\text{C}$ ), позволило предположить, что возможно селективное сорбционное концентрирование из экстракта с последующим переносом всего концентрата производных в ГХ-МС путем термодесорбции.

Основным требованием при выборе сорбента было условие минимальной остаточной сорбции определяемых соединений, что необходимо для обеспечения переноса ультрамалых количеств изучаемых веществ, и химической инертности по отношению к компонентам реакционной смеси. Этим требованиям, как показали наши исследования, в наилучшей степени удовлетворяло сверхтонкое кварцевое волокно (СКВ), обладающее развитой поверхностью, обеспечивающей селективную сорбцию, и исключительной термостабильностью.

Для отработки условий термодесорбции ультрамалых количеств ИБОК-ГФБ производных аминокислот  $1 \text{ мкл}$  раствора с минимальной концентрацией по веществу  $n \times 10^{-10} \text{ г}$  наносили (при комнатной температуре) на слой СКВ, помещенного во вкладыш инжектора хроматографа, после чего растворитель удаляли в потоке гелия (вне хроматографа). После этого вкладыш помещали в инжектор хроматографа, находящийся при  $50^\circ\text{C}$ , и нагревали его. Варьируя условия термодесорбции (конечную температуру инжектора, скорость потока газа-носителя при термодесорбции и время термодесорбции), экспериментально были выбраны следующие условия, обеспечивающие количественный перенос следовых количеств ИБОК-ГФБ производных аминокислот с сорбента в колонку: температура инжектора -  $300^\circ\text{C}$  (время термодесорбции - 10 мин); скорость потока газа-носителя через колонку во время термодесорбции -  $3 \text{ мл/мин}$ . Для обеспечения фокусировки производных аминокислот на начальном участке колонки ее температуру при термодесорбции поддерживали равной  $40^\circ\text{C}$ . Для оценки степени переноса изучаемых соединений с сорбента площади пиков на хроматограмме сравнивали с соответствующими площадями, полученными при обычном вводе  $1 \text{ мкл}$  того же раствора в ГХ-МС.

С целью изучения возможности сорбционного концентрирования ИБОК-ГФБ-производных аминокислот на СКВ из больших по объему проб экстрактов исходный раствор соответствующих производных был разбавлен в 10 и 100 раз хлороформом. Далее, 10 либо  $100 \text{ мкл}$  раствора, разбавленного 1:10 (1:100), наносили на СКВ и затем удаляли растворитель в потоке гелия ( $50 \text{ мл/мин}$ ) в течение 5-10 мин (в зависимости от объема пробы) вне хроматографической системы. После этого проводили термодесорбцию, как описано выше. Для оценки степени переноса в этом случае площади пиков на хроматограмме сравнивали с соответствующими площадями, полученными при обычном вводе  $1 \text{ мкл}$  исходного (неразбавленного) раствора в ГХ-МС.

В табл. 6 представлены сводные данные по степеням переноса ИБОК-ГФБ производных аминокислот, полученные при нанесении на сорбент 1, 10 и  $100 \text{ мкл}$  соответствующих растворов, содержащих одни и те же количества определяемых веществ ( $n \times 10^{-10} \text{ г}$ ), удалении растворителя и последующей термодесорбции в ГХ-МС.

Таблица 6. Степени переноса\* следовых количеств ИБОК-ГФБ производных аминокислот с сорбента в капиллярную колонку ( $s_r \leq 0.15$ ,  $n = 5$ )

Аминокислота	Степень переноса, %		
	1 мкл	10 мкл	100 мкл
Аланин, ИБОК-ГФБ	102	105	100
Глицин, ИБОК-ГФБ	95	96	94
Валин, ИБОК-ГФБ	97	99	95
Лейцин, ИБОК-ГФБ	99	97	96
Изолейцин, ИБОК-ГФБ	98	94	96
Пролин, ИБОК-ГФБ	100	97	99
Аспарагин, ИБОК-ГФБ	103	100	98
Метионин, ИБОК-ГФБ	93	95	92
Треонин, ИБОК-ГФБ	89	90	85
Фенилаланин, ИБОК-ГФБ	97	99	95
Серин, ИБОК-ГФБ	85	83	81
Лизин, ИБОК-ГФБ	82	81	80
Гистидин, ИБОК-ГФБ	80	82	80
Триптофан, ИБОК-ГФБ	95	97	94
Тирозин, ИБОК-ГФБ	98	95	96
Цистин, ИБОК-ГФБ	90	87	91

*степень переноса учитывает и степень извлечения из раствора*

Как видно из табл. 6, степени переноса являлись количественными и независимо от объема раствора составляли 80-105%. Меньшие значения наблюдали для производных алифатических гидроксиаминокислот, а также труднодериватируемых лизина, гистидина и цистина.

Таким образом, предложен способ определения аминокислот в водных растворах, основанный на получении ИБОК-ГФБ производных, их экстракции хлороформом, сорбционном концентрировании этих производных из органического раствора (экстракта) и ГХ-МС анализе всего концентрата. По сравнению с общепринятым подходом, этот способ позволяет снизить пределы обнаружения по меньшей мере на 2 порядка.



## Выводы

1. Изучены условия силилирования следовых количеств 60 различных жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, спиртов, Сахаров и стеролов в органических растворах с использованием гексаметилдисулфана, N,0-бис-(триметилсилил)трифторацетамида и N-метил-N-третбутидиметилсилилтрифторацетамида и различных растворителей; показаны преимущества и ограничения каждого из способов дериватизации, установлены оптимальные условия дериватизации и определения изученных соединений при их совместном присутствии в смеси.
2. Изучены условия этерификации / ацилирования аминокислот, жирных, дикарбоновых и ряда других органических кислот в водно-органических растворах с использованием изобутилхлорформата в сочетании с изобутанолом и гептафторбутанолом, и выбраны оптимальные условия этерификации и ацилирования.
3. Изучены масс-спектры электронной и химической ионизации ТМС, ТБДМС, ИБОК-ИБ, ИБОК-ГФБ, ИБ и ГФБ производных, и оценены пределы детектирования в режиме регистрации полного ионного тока (по масс-хроматограмме) и селективного ионного детектирования, которые составили  $2.0 \times 10^{-12}$  –  $3.4 \times 10^{-9}$  з и  $1.0 \times 10^{-12}$  –  $1.4 \times 10^{-9}$  з в пробе, соответственно (в зависимости от соединения и способа ионизации); впервые представлены масс-спектры электронной ионизации ИБОК-ИБ и ИБОК-ГФБ производных аминокислот, а также ГФБ эфиров жирных и дикарбоновых кислот.
4. Предложена методология определения следовых содержаний жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, а также спиртов, Сахаров и стеролов при их одновременном присутствии в смеси, основанная на обработке одной части образца смесью БСТФА с пиридином (после высушивания), а другой - смесью ИБХФ с гептафторбутанолом в водно-органическом растворе с последующим ГХ-МС анализом соответствующих производных.
5. При использовании разработанной методологии определен состав жирных, дикарбоновых, гидрокси-, оксо- и аминокислот, а также Сахаров, выделенных экстракцией пиридином и водой из лиофилизированной культуры *E. Coli*, и проведена оценка их содержания.
6. В экспериментально выбранных условиях определен состав жирных, дикарбоновых и аминокислот в культурах клеток аденокарциномы прямой кишки человека и фибробластов, и показана возможность увеличения достоверности дифференциации этих клеток, основанной на установленном различии в составе аминокислот.
7. Предложен способ определения аминокислот в водных растворах, основанный на получении ИБОК-ГФБ производных, их экстракции хлороформом, сорбционном концентрировании этих производных из органического раствора (экстракта) и ГХ-МС анализе всего концентрата, позволяющий снизить пределы обнаружения по меньшей мере на 2 порядка.

## Список публикаций по теме диссертации

1. T.G. Sobolevsky, A.I. Revelsky, LA. Revelsky, B. Miller, V. Oriedo. Electron ionization mass spectra of *N* (0, 5-isobutoxycarbonyl isobutyl esters of amino acids // Eur. J. Mass Spectrom. 2002.8. P. 447-449.
2. T.G. Sobolevsky, E.S. Chernetsova, A.I. Revelsky, IA. Revelsky, A.B. Starostin, B. Miller, V. Oriedo. Electron ionization mass spectra and their reproducibility for trialkylsilylated derivatives of organic acids, sugars and alcohols // Eur. J. Mass Spectrom. 2003.9. P. 487- 495.
3. IA. Revelsky, Yu.S. Yashin, T.G. Sobolevsky, A.I. Revelsky, B. Miller, V. Oriedo. Electron ionization and atmospheric pressure photochemical ionization in gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acids // Eur. J. Mass Spectrom. 2003. 9. P. 497- 507.
4. T.G. Sobolevsky, A.I. Revelsky, B. Miller, V. Oriedo, E.S. Chernetsova, IA. Revelsky. Comparison of silylation and esterification / acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids // J. Sep. Sci. 2003.26. No. 17. P. 1474-1478.
5. T.G. Sobolevsky, A.I. Revelsky, IA. Revelsky, B. Miller, V. Oriedo. Simultaneous determination of fatty, dicarboxylic and amino acids based on derivatization with isobutyl chloroformate followed by gas chromatography - positive ion chemical ionization mass spectrometry // J. Chromatogr. B. 2004.800. No. 1-2. P. 101-107.
6. A.I. Revelsky, T.G. Sobolevsky, LA. Revelsky, I.N. Glazkov, MA. Gruzdeva. Off-line large sample injection and its perspectives in GC and GC-MS analysis. // Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Новый Орлеан, Луизиана, США, март 2000.1826P.
7. T.G. Sobolevsky, A.Yu. Gurianov, A.I. Revelsky. Sorption concentrating of impurities traces from organic solutions and their solventless analysis using GC and GC-MS // 24<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography, Лейпциг, Германия, сентябрь 2002. SAMP-022.
8. T.G. Sobolevsky, A.I. Revelsky, N.Yu. Anisimova, T.S. Odaryuk, M.V. Kiselevsky, IA. Revelsky, B. Miller. Cancer vs. healthy human cells: the profiling of amino acids as isobutoxycarbonyl heptafluorobutyl esters by GC-MS EI // 8<sup>th</sup> International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography, Брюгге, Бельгия, февраль 2004. P108.

Работа выполнена на кафедре аналитической химии  
Химического факультета Московского государственного  
университета им. М.В. Ломоносова

*Научный руководитель:*

доктор химических наук, профессор Ревельский Игорь Александрович

*Официальные оппоненты:*

доктор химических наук, профессор

Заикин Владимир Георгиевич

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник

Бродский Ефим Соломонович

*Ведущая организация:*

Институт физической химии РАН, г. Москва

Защита состоится 21 апреля 2004 года в 16 ч. 10 мин. в ауд. 344 на заседании диссертационного совета Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу:  
119992, Москва, Ленинские горы д. 1 стр. 3, МГУ, Химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан                      марта 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук



Торочешникова И.И

№ 10479