

В. Г. МАНУСАДЖЯН

## ПРИМЕНЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В БИОЛОГИИ И БИОХИМИИ

В настоящем обзоре будут рассмотрены те работы в области прикладной масс-спектрометрии, которые имеют непосредственное отношение к общебиологическим и биохимическим исследованиям. Мы кратко остановимся на физическом принципе масс-спектрометрии, укажем наиболее важные конструктивные узлы прибора, отметим некоторые трудности, возникающие при проведении исследований, после чего остановимся на изотопном и молекулярном анализе, выполняемых с помощью масс-спектрометра. Список литературы по масс-спектрометрическому анализу аминокислот и пептидов охватывает все первоисточники в этой области, опубликованные вплоть до мая 1964 г.

### Методическая часть

Масс-спектрометрия предназначена для измерения масс изотопов различных химических элементов, а также для проведения анализа неорганических и органических соединений.

Масс-спектрометр представляет собой прибор, в котором исследуемое вещество, находящееся в газовой фазе, ионизируется и образующийся ионный пучок делится на компоненты с определенным отношением массы ионов к их заряду. Относительные количества ионов каждого типа регистрируются. Большинство масс-спектрометров измеряет только положительные ионы, образующиеся в ионизационной камере масс-спектрометра при столкновении молекулярного пучка анализируемого вещества с электронным пучком. Полученные ионы ускоряются в электрическом поле, равном нескольким киловольтам. После ускорения ионный пучок проходит через секторное магнитное поле, которое отклоняет заряженные частицы тем больше, чем меньше их масса. Регистрирующий коллектор масс-спектрометра жестко зафиксирован. Попадание каждой из компонентов ионного пучка с определенной массой на коллектор обеспечивается изменением напряженности магнитного поля, которое развертывает масс-спектр в пространстве. При этом отношение массы иона к его заряду пропорционально квадрату напряженности магнитного поля.

В соответствии со сказанным, основными узлами масс-спектрометра являются: 1) система напуска, в которую вводится исследуемое вещество, 2) ионный источник, в котором осуществляется столкновение молекул с электронами, 3) магнитный анализатор, 4) система регистрации

ионного пучка, 5) система получения высокого вакуума (до  $10^{-7}$  мм рт. ст.) в камере анализатора и 6) управляющие и контролирующие электронные схемы [1—3]. На рис. 1 приведена блок-схема масс-спектрометра.

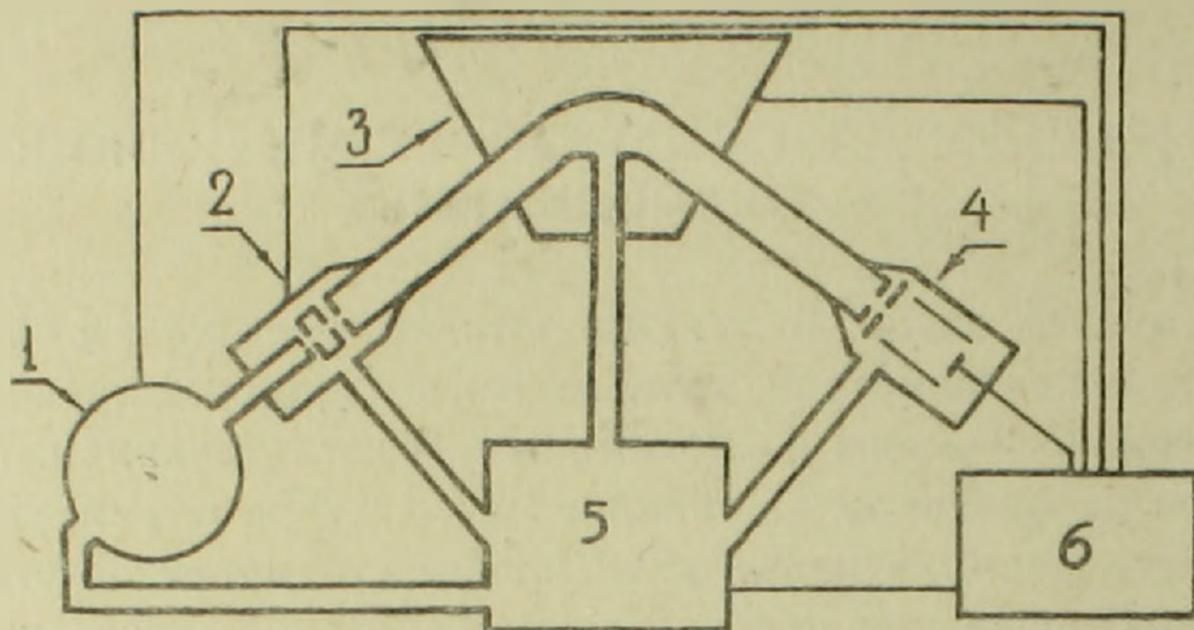


Рис. 1. Блок-схема масс-спектрометра: 1) система напуска, 2) ионный источник, 3) магнитный анализатор, 4) система регистрации, 5) вакуумная линия и 6) управляющие и контролирующие электронные схемы.

В зависимости от микроструктуры изучаемого вещества различают изотопный и молекулярный анализы. Первый из них используется при применении метода меченых атомов в проводимых исследованиях. Молекулярный анализ отличается значительной сложностью получаемого масс-спектра. Для облегчения интерпретации полученных спектров многокомпонентной смеси обычно производят предварительное разделение смеси на отдельные, составляющие с помощью газовой хроматографии.

При проведении масс-спектрометрического анализа часто возникают трудности в приготовлении годного для анализа образца. Во время опыта исходный продукт не должен претерпевать термического разложения в системе напуска масс-спектрометра, температура которой лежит в пределах от 100 до 300°C. В противном случае мы будем иметь дело с двух или более компонентной смесью исходного вещества с продуктами его разложения. Подобного явления можно избежать, если для анализа использовать термоустойчивые производные изучаемого вещества. Следует указать также на часто возникающую трудность ввода исследуемого образца в систему напуска, без нарушения предварительного вакуума [2]. Важное значение имеет подбор подходящих натекателей, которые обеспечивают получение устойчивого молекулярного потока в ионизационной камере.

В масс-спектрометрических лабораториях наиболее общеупотребительны масс-спектрометры для изотопного и молекулярного (химического) анализов типа МИ 1305 и МХ 1303 с разрешающей способностью 300 и 400, диапазоном измерения по массам (а. е. м.) 1—400 и 2—600 соответственно.

### Изотопный анализ

Использование масс-спектрометра для изотопного анализа в биохимических исследованиях основано на применении метода меченых атомов. Поэтому мы остановимся лишь на тех экспериментах, в которых для изотопного анализа был применен масс-спектрометрический метод. Масс-спектрометр является уникальным прибором, позволяющим определять разницу в изотопном составе исследуемых соединений.

Основными элементами, представляющими интерес для выяснения судьбы органических соединений в биохимических реакциях, являются стабильные изотопы D, N<sup>15</sup>, C<sup>13</sup> и O<sup>18</sup>. Эти изотопы используются для метки молекул, которые могут быть применены непосредственно или усвоены организмом при опытах *in vitro* или *in vivo* соответственно. Получаемая при этом информация относится к вопросам переноса вещества, кинетики реакции и механизму ее протекания.

Первые исследования подобного рода были проведены Хевешем, Гофером и Крогом в 1934 г. [4, 5]. Они применили D<sub>2</sub>O для изучения водного обмена в организме. Шоенхемер и Риттенберг исследовали промежуточный обмен веществ с помощью дейтерия, подтвердив и расширив основные выводы по протеиновому обмену, применив N<sup>15</sup> [6]. Риттенберг и Блох [7] использовали меченный дейтерием холестерол для изучения его переноса к центральной нервной системе. Хевешом [5], Шоенхемером и Риттенбергом [6] была определена скорость переноса меченой воды D<sub>2</sub>O через кожу лягушки.

Масс-спектрометрия позволила начать широкий фронт исследований по промежуточному обмену аминокислот и протеинов, используя их аналоги, меченные по азоту [8, 9]. Вуд и Веркман [10, 11], используя изотоп углерода C<sup>13</sup> в соединении NaHC<sup>13</sup>O<sub>3</sub>, впервые открыли процесс фиксации двуокиси углерода. Риттенберг и Блох [12] применили двойко меченную уксусную кислоту CD<sub>3</sub>C<sup>13</sup>OOH для исследования ее усвоения крысами и мышами. Тяжелый изотоп кислорода O<sup>18</sup> был применен Долом [13, 14], Рубеном и др. [15] при изучении фотосинтеза. Бентли [16] применил тяжелую воду, меченную по кислороду H<sub>2</sub>O<sup>18</sup>, при изучении механизма реакции гидролиза ацетилфосфата. Изотоп O<sup>18</sup> применялся также при изучении дыхания [17] в некоторых ферментативных реакциях [18, 19].

В качестве примера приведем исследование гидролизатов белка, содержащих 24 α-аминокислоты [20]. Необходимо было определить количественное содержание каждой аминокислоты для установления структуры белка. Используя метод изотопного разбавления [2, 3], удалось провести полный количественный анализ аминокислот. Для этого синтезированную α-аминокислоту, например, глицин добавляли к изучаемому гидролизату и получали неразделимую смесь с небогащенным исходным глицином. Затем выделяли небольшое количество чистого глицина и измеряли на масс-спектрометре отношение N<sup>14</sup>/N<sup>15</sup>. Это позволило точно оценить содержание этой аминокислоты в смеси. Аналогич-

но было выяснено содержание других аминокислот. Этот метод особенно полезен при определении количеств различных веществ, остающихся в остатке после процесса экстракции, когда остаток содержит большое число различных примесей.

При масс-спектрометрическом анализе требуется всего лишь около 1 мг исходного органического вещества, что чрезвычайно важно при биохимических исследованиях.

Методы приготовления образцов D,  $C^{13}$ ,  $N^{15}$  и  $O^{18}$  были разработаны в основном Риттбергом и его сотрудниками [21]. Содержание изотопов водорода определяется обычно после получения из меченого органического соединения газообразного водорода, который подвергается масс-спектрометрическому анализу. По отношению интенсивностей пиков 3 и 2 в масс-спектре, соответствующих ионам  $(HD/HH)^+$ , после пересчета устанавливается количество дейтерия в исходном продукте.

Отношение  $C^{13}/C^{12}$  определяется после получения из исходного продукта простого газообразного соединения, например, двуокиси углерода.

Содержание тяжелого изотопа углерода можно определить или по пикам 12 и 13 или же по пикам с массовыми числами 44 и 45, которые соответствуют ионам  $(C^{12}O_2)^+$  и  $(C^{13}O_2)^+$  [2, 3]. Анализ образцов на  $N^{15}$  производится на элементарном азоте. Азот из органического соединения получается путем превращения органического азота в аммиак с последующим окислением его до элементарного азота. Изотопное отношение  $N^{15}/N^{14}$  определяется по пикам 28, 29 и 30 после соответствующего пересчета результатов [2, 3]. Тяжелый изотоп кислорода  $O^{18}$  в органических соединениях определяется посредством его превращения в свободный кислород или же газ  $CO_2$ . Содержание изотопа  $O^{18}$  может быть определено по пикам 32/34 или 44/46 также после соответствующего пересчета [2, 3].

### Молекулярный анализ

а) Газовый анализ. Использование масс-спектрометра для анализа газообразных продуктов, например, выдыхаемых человеком при различных физических условиях или изучение газообмена на клеточном уровне, основано на общих положениях газового анализа с помощью масс-спектрометра. Для этого предварительно необходимо экспериментально установить схему диссоциации молекулярных ионов каждого вида и добиться того, чтобы относительные интенсивности пиков осколочных ионов представляли собой характерные для данной молекулы постоянные величины. Для сравнения, в качестве стандарта, используется пик, соответствующий осколочному иону, который образуется с наибольшим выходом. Характерное распределение интенсивностей между пиками в масс-спектре молекулы позволяет идентифицировать молекулы разных веществ, имеющих одинаковые массовые числа.

Успешное приложение масс-спектрометрии к количественному анализу зависит от воспроизводимости масс-спектров в течение опыта, линей-

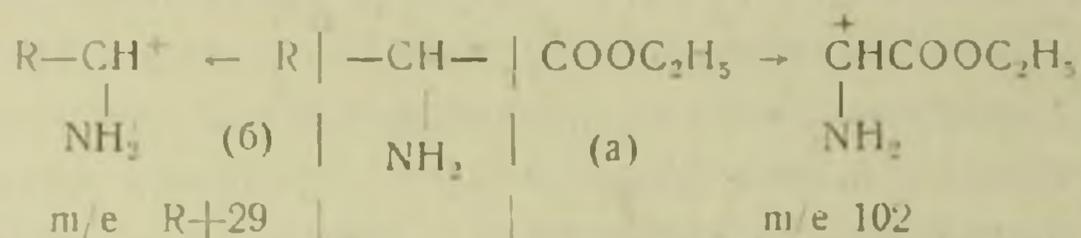
ности наложения масс-спектров различных компонент смеси и пропорциональности ионного тока парциальным давлениям компонент различных газов в смеси. С учетом этих требований Миллер и др. [22] путем анализа выдыхаемых газов при помощи портативного масс-спектрометра изучили накопление двуокиси углерода у пациентов, подвергшихся анестезии. Пратт с сотрудниками опубликовал работу по изучению дыхательного обмена [23]. Браун и др. [24] при помощи масс-спектрометра с быстродействующей системой регистрации произвели непрерывную регистрацию газового обмена клеток, тканей и целых организмов. Бартелс и др. [25] измерили объем остаточного воздуха при процессе дыхания. Описан метод анализа очень малых количеств диэтилового эфира в крови при исследовании анестезирующих веществ [26]. Сравнительно недавно масс-спектрометр был применен при диагностике работы легких [27], а также в измерениях давления газа в крови [28].

**б) Масс-спектры аминокислот и пептидов.** Возможность применения масс-спектрометра к изучению сложных органических соединений подробно рассмотрена в ряде обзоров и монографий [1, 2, 29—34]. При столкновении молекулярного пучка с электронами в ионизирующей камере масс-спектрометра образуются возбужденные молекулярные ионы, которые некоторое время существуют как целое, причем энергия их возбуждения статистически распределяется внутри молекулы. Затем эти ионы распадаются с перегруппировкой атомов внутри молекулы или без перегруппировки, образуя различные первичные осколочные ионы, которые в свою очередь могут претерпевать дальнейший распад по закону мономолекулярных реакций. В тех случаях, когда между структурой молекул исследуемого соединения и образующимися из нее ионами имеется связь, удается определить структуру исходной молекулы по ее масс-спектру.

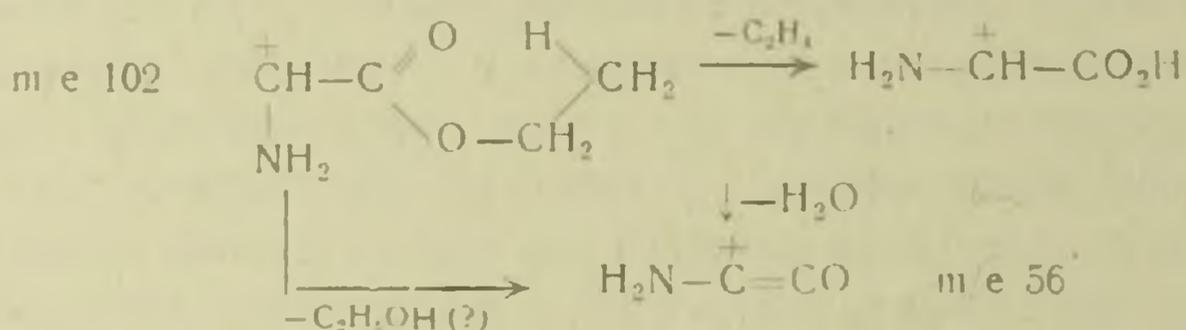
Масс-спектрометрическое изучение аминокислот началось около десяти лет назад. Низкая упругость пара аминокислот, обусловленная наличием полярных  $\text{NH}_2$  и  $\text{COOH}$ -групп, затрудняет непосредственную идентификацию и изучение этих соединений при помощи масс-спектрометра. В первых опубликованных работах по масс-спектрометрическому анализу аминокислот изучались масс-спектры их летучих производных метиловых и этиловых эфиров [35—39]. Лишь недавно были предприняты попытки получения масс-спектров свободных аминокислот и их хлористоводородных солей [29, 40]. При этом образцы непосредственно испарялись в ионном источнике при температуре  $100\text{—}250^\circ\text{C}$ . Этот способ ввода вещества позволил свести вес анализируемых образцов до  $0,25\text{—}10\text{ мкг}$ . Полученные масс-спектры свидетельствуют о том, что свободные аминокислоты при переходе из твердой фазы в газообразную заметно не разлагаются. Общая картина их масс-спектров сходна с масс-спектрами производных аминокислот. В масс-спектрах свободных аминокислот присутствуют два интенсивных пика. Первый пик с массовым числом 45, которому соответствует ион  $(\text{O}=\text{C}=\text{O}-\text{H})^+$ , со стабилиза-

цией положительного заряда на кислороде, и второй пик с массовым числом 75, соответствующий иону  $(\text{H}_2\text{N}-\text{CH}=\text{C}(\text{OH})_2)^+$ .

Аналогично были получены масс-спектры моногидрохлоридов аминокислот, которые давали дополнительные пики в диапазоне 35—39, соответствующие ионам, возникающим благодаря наличию молекулы  $\text{HCl}$ . Из-за присутствия атома азота в молекуле аминокислоты легко расщепляются  $\text{C}-\text{C}$  связи в местах (а) и (б):



В результате образуются два осколка ( $\text{R}+29$ ) и 102. Первый осколок легко дает резонансно-стабилизированный ион  $(\text{R}-\text{CH}=\text{NH}_2)^+$ . Из этого иона в результате перегруппировки может образовываться ион с  $m/e 30 (\text{NH}_2\text{CH}_2)^+$ , а от аминного осколка может отщепляться аммиак. Возможны и другие перегруппировки в аминном фрагменте, зависящие от конкретного вида боковой группы. Эти реакции подробно рассмотрены в работе Бимана [38]. Эфирный осколок 102 может распадаться на более низкомолекулярные фрагменты следующим путем:



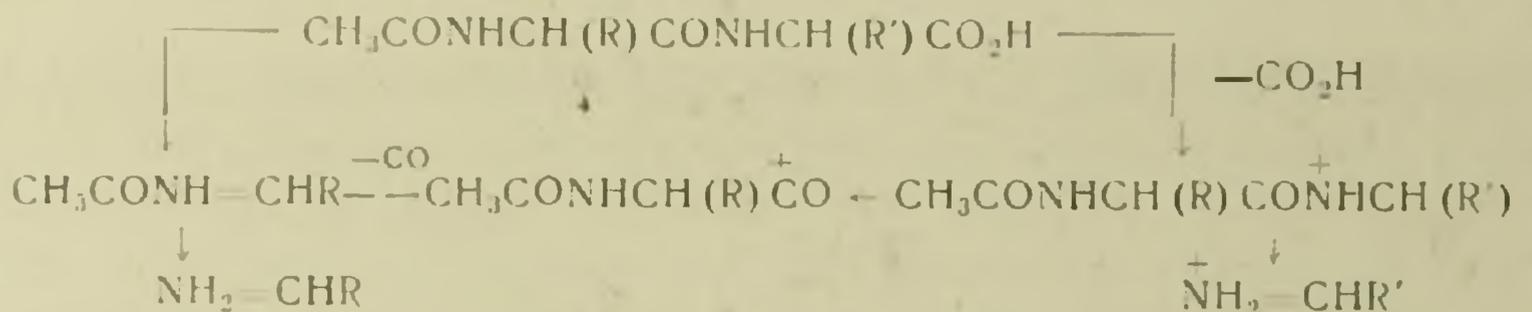
В результате образуется хорошо стабилизированный ион с массовым числом 56. Образование ионов при расщеплении связей в боковой  $\text{R}$ -группе для эфиров аминокислот рассмотрено в работах Бимана [37, 38].

В масс-спектрах эфиров  $\text{N}$ -ацетилированных аминокислот присутствует интенсивный пик 43, который образуется, по-видимому, главным образом за счет ацетильного иона [41, 42, 43]. Молекулярный ион наблюдается в большинстве масс-спектров этих производных аминокислот. Однако довольно часто пик с массовым числом  $\text{M}+1$  оказывается более интенсивным, чем молекулярный пик. Механизм образования иона  $(\text{M}+1)^+$  обсуждался Бейноном [2]. Обычно этот ион образуется вследствие столкновения молекулярного иона с нейтральной молекулой, приводящего к присоединению водорода. Ион с  $m/e 88$ , который присутствует в масс-спектрах свободных эфиров аминокислот [39], наблюдается также и в масс-спектрах ацетилированных эфиров аминокислот. Этот ион может образовываться в результате перегруппировки молекулярного иона и отщепления кетена и боковой группы. От молекулярного иона могут отщепляться также и другие молекулы, например, метанола в случае метиловых эфиров, воды и др. Доказательством этого служат соответ-



Попытку масс-спектрометрического изучения свободных пептидов сделал Биман [29]. Однако молекулярные ионы в этом случае подвергаются перегруппировкам значительно легче, чем их летучие производные, что усложняет масс-спектр.

Недавно были изучены масс-спектры N-ацетилпептидов и циклопептидов [56] и этиловых эфиров N-ацетилпептидов [57]. Например, основная схема распада ацетилированного дипептида имеет вид:



Другим возможным путем стабилизации первичного иона является его циклизация с отщеплением кетена или ацетильной группы.

Приведенные выше данные свидетельствуют о принципиальной возможности масс-спектрометрического анализа аминокислот и коротких пептидов, что чрезвычайно важно для решения проблем молекулярной биологии. Следует отметить полученные недавно масс-спектры нуклеотидов [29] и липидов [58]. Это делает возможным применение масс-спектрометрии в химии нуклеиновых кислот и липидов.

Высокая чувствительность масс-спектрометрического метода в сочетании со скоростью и точностью анализа делает его крайне полезным инструментом для решения разнообразных проблем биологии и биохимии.

Сектор радиобиологии  
АМН СССР

Поступило 26.IX 1964 г.

## Վ. Հ. ՄԱՆՍԱԶՅԱՆ

ՄԱՍՍ-ՍՊԵԿՏՐՈՄԵՏՐԻԱՅԻ ԿԻՐԱՌՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ  
ԵՎ ԲԻՈՔԻՄԻԱՅԻ ՄԵՋ

Ա մ փ ո փ ու լ մ

Հոդվածում վերլուծված են այն աշխատանքները կիրառական մասս-սպեկտրոմետրիայի բնագավառում, որոնք անմիջական կապ ունեն կենսաբանության հետ: Համառոտակի նկարագրված են մասս-սպեկտրոմետրիայի սկզբունքները և արդյունաբերական սարքերի հիմնական հանդույցները: Բերված են ջրածնի, ածխածնի, ազոտի և թթվածնի իզոտոպային անալիզից աշխատանքներ, որոնք կիրառվել են կենսաբանական ուսումնասիրությունների մեջ՝ նշած ատոմների մեթոդի ժամանակ, ինչպես նաև աշխատանքներ դադային անալիզից: Մանրամասն վերլուծված են աշխատանքներ, որոնց մեջ բերված են ամինոթթուների և սպեկտրոնների մասս-սպեկտրոնները, հրատարակ-

իլած ընդհուպ մինչև 1964 թ. մայիս ամիսը: Բերված ավյալները ցույց են տալիս, որ մասս-սպեկտրոմետրիան կարող է ունիկալ կիրառություն ունենալ ամինոթթուների քիմիայի և այլ բիոքիմիական ուսումնասիրությունների մեջ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Успехи масс-спектрометрии, п. р. Эллиота Р. М. (пер. с англ.), М., ИЛ, 1963.
2. Бейнон Д. Масс-спектрометрия и ее применение в органической химии, М., Мир, 1964.
3. Барнард Д. Современная масс-спектрометрия, М., ИЛ., 1957.
4. Hevesy G., Hofer E., Krogh A. Skand Arch. Physiol., 72, 199, 1935.
5. Hevesy G. Gold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 13, 129, 1948 (цит. по [3]).
6. Schoenheimer R., Rittenberg D., Journ. Biol. Chem., 127, 285, 1939.
7. Rittenberg D. Rapports et discussions sur les isotops, Institute International de Chimie Solvay, Symposium, Brussels, 1948 (цит. по [3]).
8. Shemin D., Rittenberg D., Journ. Biol. Chem., 153, 401, 1944; 167, 875, 1947.
9. Shemin D. Journ. Biol. Chem., 162, 297, 1946.
10. Wood H. G., Werkman C. H. Biochem. Journ., 34, 129, 1940.
11. Wood H. G., Werkman C. H., Hemingway A., Nier A. O. Journ. Biol. Chem., 135, 789, 1940.
12. Rittenberg D. Bloch K., Jour. Biol. Chem., 160, 417, 1945.
13. Dole M. Jour. Amer. Chem. Soc., 57, 2731, 1935.
14. Dole M. Science, 109, 77, 96, 1949.
15. Ruben S., Randall M., Kamen M. D., Hyde J. L., Jour. Amer. Chem. Soc., 63, 877, 1941.
16. Bentley R. Journ. Amer. Chem. Soc., 70, 2183, 1948.
17. Lifson N., Gordon G. B., Visscher M. B., Nier A. O., Journ. Biol. Chem., 180, 803, 1949.
18. Cohn M., Journ. Biol. Chem., 180, 771, 1949.
19. Bentley R., Neuberger A. Biochem. Sourn., 45, 584, 1949.
20. Rittenberg D., Journ. Appl. Phys., 13, 561, 1942.
21. Получение и определение меченных атомов, сб. ст., ИЛ, 1948.
22. Miller F. A., Hemingway A., Brown E. B., Nier A. O. C., Knight R., Varco R. L. Surg. Forum., Proc. 36th Congr., Amer. Coll. Surgeons, 1950, p. 602 [цит. по V. Dibelar, Mass Spectrometry, 26, 58, 1954.
23. Pratt A. W., Burr B. E., Eden M., Lorenz E., Rev. Sci. Instr., 22, 694, 1951.
24. Brown A. H., Nier A. O. C., Van Norman R. W. Plant. Phystol., 27, 320, 1952.
25. Bartels J., Severinghaus J. W., Forster R. E., Briscoe W. A., Bates D. V. Jour. Chin. Invest., 33, 41, 1954.
26. Jones C. S., Saari J. M., Devloo R. A., Falconer A., Baldes F. J. Anesthesiology, 14, 490, 1953.
27. Muysers K., Stelhoff F., Worth G. Klin. Wochschr, 38, 490, 1960.
28. Strang L. B. J. Appl. Physiol., 16, 562, 1961.
29. Biemann K. Mass Spectrometry. New York, McGraw-Hill, 1962.
30. McLafferty F. W. Mass Spectral Correlations. Washington, Amer. Chem. Soc., 1963.
31. Bently K. W. Elucidation of Structures by Physical and Chemical Methods. N. Y. and London, 1963, p. 261.
32. Budzikiwicz H. Djerassi C., Williams D. H. Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds. San Francisco, Holden-Day, Inc., 1964.
33. McDowell C. A. Mass Spectrometry, N. Y., McGraw-Hill, 1963.
34. McLafferty F. W. Mass Spectrometry of Organic Ions. N. Y., Acad. Press, 1963.

35. Andersson G. O., *Acta Chem. Scand.*, 12, 1353, 1958.
36. Stenhagen E. *Z. anal. Chem.*, 181, 462, 1958.
37. Biemann K., J. Seibl a. F. Gapp, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1, 307, 1957.
38. Biemann K. J. Seibl a. F. Gapp, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 3795, 1961.
39. Andersson G. O., Ryhage R. S. Stallberg-Stenhagen a. E. Stenhagen, *Arkiv for Kemi*, 12, 405, 1962.
40. Biemann K. a Mc Gloskey S. A. *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 2005, 1962.
41. Heyns K., Grutzmacher H. F. *Naturforsch Z.*, 16 293, 1963.
42. Andersson G. O., Ryhage R., Stenhagen E. *Arkiv for Kemi*, 19, 417, 1962.
43. Манусаджян В. Г., Баршавский Я. М. *Изв. АН Арм.ССР, ХН*, 17, 2, (1964).
44. Вульфсон Н. С., Степанов В. М., Пучков В. А., Зякун А. М. *Изв. АН СССР*, 8, 1524, (1963).
45. Biemann K. a Vetter W. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2, 93, 1960.
46. Spackmann D. H., Stein W. H. a Moore S. *Anal. Chem.*, 29, 1190, 1958.
47. Biemann K. a Daffner G. G. S. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 4, 283, 161.
48. Sallach H. J. a Kornguth M. L. *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 582, 1959.
49. Biemann K., Daffner G. G. S. a Steward F. C. *Nature*, 191, 380, 1961.
50. Biemann K., Lioret C., Asselineau J., Lederer E. a Polonsky J. *Biochim. Biophys. Acta*, 40, 369, 1960.
51. Biemann K., Lioret C., Asselineau, J., Lederer E. a Polonsky J. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42, 979, 1960.
52. Biemann K., Gapp F. a Seibl J., *Amer. Chem. Soc.*, 81, 2274, 1959.
53. Biemann K. a Vetter W. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 3, 578, 1960.
54. Манусаджян В. Г., Варшавский Я. М. *Изв. АН Арм.ССР, ХН*, 17, 2, (1964).
55. Stenhagen E. *Z. Anal. Chem.*, 181, 468, 1961.
56. Heyns u. Grutzmacher H. F. *Annalen der Chemie*, 669, 189, 1963.
57. Манусаджян В. Г., Зякун А. М., Чувилин А. В., Варшавский Я. М. *Изв. АН Арм.ССР, ХН*, 17, 2, 1964.
58. Ryhage R., Stenhagen E., *J. Lipid Res.*, 1, 369, 1960.