

Редакция журнала «Масс-спектрометрия»:

119234 Москва, а/я 51, журнал «Масс-спектрометрия». Тел.: +7 (495) 939-14-07. E-mail: mail@vmso.ru

Редакторы

Главный редактор

Заикин Владимир Георгиевич, д.х.н., профессор

Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, 119991 Москва, Ленинский пр., д. 29

Тел./факс: +7 (495) 954-22-69. E-mail: zaikin@ips.ac.ru

Приборостроение

Галль Лидия Николаевна, д.ф.-м.н., профессор

Институт аналитического приборостроения РАН, 190103 Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26

Тел.: +7 (812) 251-81-59. E-mail: gall@ianin.spb.ru

Новые масс-спектрометрические методы

Горшков Михаил Владимирович, к.ф.-м.н.

Институт энергетических проблем химической физики РАН, 119334 Москва, Ленинский пр., д. 38 корп. 2

Тел.: +7 (495) 137-10-07 (доб. 138), факс: +7 (495) 137-82-58. E-mail: gorshkov@chph.ras.ru

<http://www.proteomics.narod.ru>

Изотопная и неорганическая масс-спектрометрия

Чернышев Игорь Владимирович, д.г.-м.н., член-корреспондент РАН

Институт геологии рудных месторождений, петрографии, минералогии и геохимии РАН,

119017 Москва, Старомонетный пер., д. 35

Тел.: +7 (495) 951-36-43, 230-82-25. E-mail: cher@igem.ru

Органическая масс-спектрометрия

Некрасов Юрий Степанович, д.х.н., профессор

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991 Москва, ул. Вавилова, д. 28

Тел.: +7 (495) 135-93-93. E-mail: yusnekr@ineos.ac.ru

Биомедицинская масс-спектрометрия

Шевченко Валерий Евгеньевич, д.б.н.

Институт ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,

115478 Москва, Каширское ш., д. 24

Тел.: +7 (495) 323-56-11. E-mail: vshev@nm.ru

Проблемы охраны окружающей среды, аналитическая масс-спектрометрия

Лебедев Альберт Тарасович, д.х.н., профессор

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Воробьевы горы, д. 1 стр. 3

Тел./факс: +7 (495) 939-14-07. E-mail: lebedev@org.chem.msu.ru

Статьи на английском языке по всем вопросам масс-спектрометрии

Микая Анзор Иванович, д.х.н. (Dr. Anzor Mikaia)

National Institute of Standards & Technology,

100 Bureau Drive, 221/A111, Stop 8380, Gaithersburg, MD 20899-8380, USA

Phone: +1 301 975 2521; Fax: +1 301 975 3670. E-mail: anzor.mikaia@nist.gov

Секретарь редакции

Хрущева Мария Леонидовна, к.х.н.

119234 Москва, а/я 51, Хрущевой М.Л.

Тел.: +7 (495) 939-14-07. E-mail: mail@vmso.ru

Редакционная коллегия

Борщевский А.Я., д.х.н. (Москва)

Бродский Е.С., д.х.н. (Москва)

Ефремов Ю.Я., к.х.н. (Казань)

Зенкевич И.Г., д.х.н., профессор (Санкт-Петербург)

Зякун А.М., д.б.н. (Пушино)

Кудин Л.С., д.х.н., профессор (Иваново)

Кутин А.А. (Москва)

Мазунов В.А., д.ф.-м.н., профессор (Уфа)

Мнджоян К.К., к.филол.н. (Москва)

Самгина Т.Ю., к.х.н. (Москва)

Самсонов Д.П., к.х.н. (Обнинск)

Сысоев А.А., д.ф.-м.н., профессор (Москва)

Цыбин О.Ю., д.ф.-м.н., профессор (Санкт-Петербург)

Шморгунов В.А. (Москва)

Журнал включен в «Реферативный журнал» и Базы данных ВИНТИ.
Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной справочной системе
по периодическим и продолжающимся изданиям Ulrich's Periodical Directory.

СОДЕРЖАНИЕ

Третий съезд ВМСО. II Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», 3–8 сентября 2007 г. (первый циркуляр)	222
Масс-спектрометрическое <i>de novo</i> секвенирование пептидов (Обзор) К.А. Артеменко, Т.Ю. Самгина, А.Т. Лебедев	225
Исследование эффективности существующих алгоритмов идентификации пептидов С.Е. Певцов	255
Определение нуклеозидов в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией В.А. Логинов, А.И. Ревельский, И.А. Ревельский	265
Современная масс-спектрометрия: пропорции развития Б.Л. Мильман, Л.А. Конопелько	271
Масс-спектрометрическая идентификация высокотоксичных алкилфторфосфонатов А.Т. Лебедев, К.С. Лебедев, Б.Ф. Мясоедов, И.В. Рыбальченко, Г.И. Сигейкин, В.Н. Суворкин	277
Школа-семинар «Газовая хроматография/масс-спектрометрия: практические аспекты», 5–6 апреля 2007 г.	284
Информация. 5-й Европейский семинар по масс-спектрометрии вторичных ионов	286
Защищенные диссертации по масс-спектрометрии	287
Конференции, симпозиумы, семинары	288

CONTENTS

Third Congress of RSMS. II All-Russian Conference «Mass Spectrometry and Its Applied Problems», 3–8 September 2007 г. (first announcement)	222
Peptide <i>de novo</i> sequencing by mass spectrometry	
K.A. Artemenko, T.Yu. Samgina, A.T. Lebedev	225
<i>Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Lenin Hills 1/3, 119992 Moscow, Russia.</i>	
<i>E-mail: lebedev@org.chem.msu.ru</i>	
Performance evaluation of existing <i>de novo</i> sequencing algorithms	
S.E. Pevtsov	255
<i>Department of Computational Mathematics and Cybernetics, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia. E-mail: pevtsov@gmail.com</i>	
Determination of nucleosides in water solutions by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry	
V.A. Loginov, A.I. Revelsky, I.A. Revelsky	265
<i>Department of Chemistry, Analytical Chemistry Division, M.V. Lomonosov Moscow State University, Lenin Hills 1/3, 119992 Moscow, Russia. E-mail: vya-l@yandex.ru</i>	
Modern mass spectrometry: proportions of developments	
B.L. Milman, L.A. Konopel'ko	271
<i>D.I. Mendeleev Institute of Metrology, 19 Moskovskij pr., 198005 Saint-Petersburg, Russia.</i>	
<i>E-mail: bmilman@mail.rcom.ru</i>	
Identification of highly toxic alkyl fluorophosphonates by mass spectrometry	
A.T. Lebedev, K.S. Lebedev, B.F. Myasoedov, I.V. Rybalchenko, G.I. Cygeykin, V.N. Suvorkin	277
<i>Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia.</i>	
<i>E-mail: lebedev@org.chem.msu.ru</i>	
<i>D.I. Mendeleev Russian Chemistry and Technology University, Novomoskovsk Institute, ul. Druzhbi. 301665 Novomoskovsk, Russia. E-mail: KLebedev.AnChem@nirhtu.ru</i>	
<i>Interdisciplinary Center of Analytical Studies, Presidium of the RAS, 117333 Moscow, Russia.</i>	
<i>E-mail: mzairan@ipiran.ru; riv@lumex.ru</i>	
<i>«Interlab, Ltd», Tikhvinskii per. 11, build. 2, 127055 Moscow, Russia. E-mail: suvorkin@interlab.ru</i>	
Workshop «Gas chromatography/mass spectrometry: practical aspects», 5–6 April 2007	284
Information. 5th European Seminar on Secondary Ion Mass Spectrometry	286
Defended thesis in mass spectrometry	287
Conferences, Symposia, Seminars.	288

ВСЕРОССИЙСКОЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ РАН
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ им. М.В. ЛОМОНОСОВА
ИНСТИТУТ НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА им. А.В. ТОПЧИЕВА РАН
при участии ЗАО «МС-Аналитика»,
московского представительства компании LECO, ООО «Брукер»

ТРЕТИЙ СЪЕЗД ВМСО

II ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ И ЕЕ ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ»

3–8 сентября 2007 года
г. Москва

Первый циркуляр

Оргкомитет

председатель — д.х.н. Лебедев А.Т. (г. Москва)
ученый секретарь — к.х.н. Хрущева М.Л. (г. Москва)
к.ф.-м.н., к.т.н. Горшков М.В. (г. Москва)
д.х.н. Заикин В.Г. (г. Москва)
д.б.н. Зякун А.М. (Московская область, г. Пушкино)
д.т.н. Кириянов Г.И. (г. Москва)
д.х.н. Ковалев И.Д. (г. Нижний Новгород)
д.ф.-м.н. Косевич М.В. (г. Харьков)
д.ф.-м.н. Мазунов В.А. (г. Уфа)
д.х.н. Некрасов Ю.С. (г. Москва)
д.ф.-м.н. Покровский В.А. (г. Киев)
к.б.н. Полякова О.В. (г. Москва)
к.х.н. Самгина Т.Ю. (г. Москва)
к.х.н. Ходеев Ю.С. (г. Москва)
д.ф.-м.н. Цыбин О.Ю. (г. Санкт-Петербург)
д.б.н. Шевченко В.Е. (г. Москва)

Научные секции

1. Приборостроение
2. Изотопная масс-спектрометрия
3. Органическая масс-спектрометрия
4. Применение масс-спектрометрии для аналитических целей (экология, допинг-контроль, контроль продукции и процессов и т.д.)
5. Неорганическая и элементная масс-спектрометрия
6. Масс-спектрометрия в медицине и биологии

Программа конференции включает пленарные доклады приглашенных лекторов, устные доклады и стендовые сообщения участников.

Оргкомитет оставляет за собой право комплектовать программу устных сессий конференции на основе тезисов, зарегистрированных как тезисы устных докладов.

Среди приглашенных лекторов: проф. Г. Глиш (США), проф. Ф. МакЛафферти (США), проф. Г. Шварц (Германия), проф. М. Эбераин (Бразилия), проф. Р. Зубарев (Швеция).

Место проведения

Съезд и конференция будут проводиться на базе Научно-методического центра профсоюзов работников АПК, расположенного недалеко от Москвы (20 минут от м. Юго-Западная) в пос. Московский, там же расположена гостиница, предназначенная для проживания участников.

Регистрационный взнос

Полный регистрационный взнос обеспечивает бронирование гостиницы (в случае регистрации до 01.05.07) участие во всех заседаниях конференции, получение всех материалов (в том числе почтовые расходы), кофе-брейки, обеды в течение 4-х суток, другие орграсходы и составляет:

- для членов ВМСО — 3000 руб*.
- для иных лиц, участвующих в конференции — 4500 руб.
- для студентов и аспирантов — 1500 руб.

* Членам ВМСО могут предоставляться дополнительные льготы, с которыми можно ознакомиться в оргкомитете конференции по тел. (495) 939-14-07, e-mail: mail@vmso.ru, сайте www.vmso.ru

Язык конференции

Русский (для русскоязычных участников обязательно), английский (для иноязычных участников).

Ключевые даты

Прием регистрационных карт участников с проживанием в гостинице (место в гостинице гарантируется) — до **01.05.07**.

Прием регистрационных карт без проживания (место в гостинице не гарантируется) — до **20.08.07**.

Прием тезисов — до **01.07.07**.

Оплата оргвзноса — до **20.07.07** (после 20.07.07 оргкомитет съезда оставляет за собой право повысить размер оргвзноса).

Составление научной программы — **01.08.07**.

Заезд участников, регистрация — **03.09.07**.

Прочая информация

Приглашаются к сотрудничеству приборостроительные компании, а также фирмы, представляющие на рынке России лабораторное оборудование, химическую продукцию.

Регистрационную форму для участия в конференции можно заполнить на сайте www.vmsso.ru, прислать по факсу (495) 939-14-07, по почте 119234, г.Москва, а/я 51.

Подробную информацию о деятельности Всероссийского масс-спектрометрического общества можно получить на сайте www.vmsso.ru

Оформление тезисов

Тезисы докладов будут изданы отдельным сборником.

Тезисы представляются в редакторе Microsoft Word (версии от 6.0). Общий объем тезисов не должен превышать 1 печатную страницу А4 (поля: левое — 3 см, правое — 2 см, верхнее и нижнее — 2 см).

Структура тезисов

1. Полное название. Times New Roman 14, жирный.
2. Авторы (инициалы, фамилия полностью). Если авторы представляют разные организации, после фамилии надстрочным индексом устанавливается номер, который далее используется при обозначении организации. Автор, представляющий доклад на конференции, подчеркивается сплошной чертой, звездочкой (*) обозначается автор с которым будет вестись переписка в процессе подготовки тезисов к печати. Times New Roman 14.

3. Полное название института или организации, почтовый адрес (улица и номер дома, почтовый индекс, город, страна). Если статья представлена от не-

скольких организаций, название и адрес каждой начинается с новой строки, причем в начале надстрочным индексом обозначается номер, установленный для соответствующих авторов. После адреса организации пишется адрес электронной почты автора, с которым будет осуществляться связь. Times New Roman 12.

4. Текст тезисов. Шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — 1.

5. Рисунки, схемы, таблицы должны быть включены в текст.

6. Ссылки на цитируемую литературу нумеруются в тексте арабскими цифрами в виде надстрочного индекса в порядке упоминания. Ссылки в списке литературы обязательно должны содержать инициалы и фамилии всех авторов, сокращенные названия журналов (в соответствии с системой, используемой в Chemical Abstract) и быть оформлены аналогично оформлению ссылок при подготовке статей к публикации в журнале «Масс-спектрометрия».

Тезисы докладов принимаются в электронном виде по электронной почте mail@vmsso.ru до **01.07.2007**. Тезисы докладов, оформленные с существенным нарушением требований, изложенных выше, к опубликованию не принимаются.

Конкурс среди работ молодых ученых, доложенных на конференции

Победители конкурса (3 человека) получают премию в виде гранта на поездку на научную конференцию (семинар) по выбору лауреата. Условием получения гранта помимо победы в конкурсе на конференции является предоставление печатной статьи (краткого сообщения), подготовленного по материалам тезисов, для последующей публикации в журнале «Масс-спектрометрия». Замена оплаты поездки на конференцию денежной компенсацией не предусматривается.

Требования к конкурсантам

1. Конкурсант должен являться членом ВМСО.
2. Год рождения конкурсанта — не ранее 1973 г.
3. Количество авторов доклада — не более 3 человек (включая конкурсанта).
4. Конкурсант должен являться докладчиком (допускается представление как стендовых, так и устных докладов).
5. Обязательно присутствие конкурсанта на конференции и личное представление доклада.

Заявки на участие в конкурсе присылайте по e-mail: mail@vmsso.ru. В заявке в свободной форме должны быть указаны ФИО конкурсанта, авторы и название доклада.

Регистрационная форма участника конференции
«МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ И ЕЕ ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ»

Ф.И.О. (полностью) _____

Член ВМСО Не член ВМСО

Студент Аспирант

Ученая степень, звание, должность _____

Организация _____

Оплата физическое лицо юридическое лицо

Почтовый адрес _____

ИНН/КПП, юридический адрес, банковские реквизиты (в случае плательщика-юридического лица)

Телефон/факс _____

E-mail _____

Секция (укажите номер из списка научных секций на стр. 222 или «Иное» (укажите, что именно))

Название доклада _____

Авторы _____

Участие с устным докладом в качестве слушателя
со стендовым сообщением участник выставки оборудования

Нуждаетесь ли в гостинице*

- проживание «люкс»** (от 1600 руб./сутки, 1-, 2- или 3-комнатный номер, проживание 1 человек в номере)
 проживание «стандарт» (от 1200 руб./сутки, 2–3-комнатный номер, проживание по 1 человеку в комнате)
 проживание «эконом»*** (от 600 руб./сутки в 2–3-комнатном номере, по 2 человека в комнате)
 без проживания

* Стоимость питания не включена.

** Кол-во мест «люкс» ограничено.

*** Кол-во мест ограничено, предоставляются только при условии полного заполнения комнаты. В случае отсутствия возможности подселения в комнату предоставляются места «стандарт».

Обзор

Масс-спектрометрическое *de novo* секвенирование пептидов

К.А. Артеменко, Т.Ю. Самгина, А.Т. Лебедев

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Ленинские горы 1, строение 3, 119992 Москва, Россия
E-mail: lebedev@org.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 16.09.2006 г.

Установление аминокислотной последовательности белков является одной из наиболее актуальных задач современной химии, биологии, медицины. Масс-спектрометрия зарекомендовала себя превосходным методом для решения этой задачи и стала важнейшим инструментом недавно сформировавшегося научного направления — протеомики. Благодаря экспрессности, информативности и надежности метода он успешно конкурирует с классическими биохимическими вариантами секвенирования пептидов. Еще одним достоинством масс-спектрометрии является возможность не только быстро детектировать присутствие в образце десятков и сотен уже известных пептидов и белков, но и устанавливать структуру ранее не исследованных полипептидов. Такой вариант анализа получил название «*de novo* секвенирование». Именно ему и посвящен настоящий обзор.

Ключевые слова: *тандемная масс-спектрометрия, de novo секвенирование, пептиды, белки, аминокислотная последовательность.*

Sequencing of proteins is one of the most relevant tasks of modern chemistry, biology, and medicine. Mass spectrometry has proved itself to be an excellent method for resolving this task becoming the most important technique of the newly formed scientific direction — proteomics. Due to its speed, informational capacity and reliability mass spectrometry successfully competes with the classic biochemical methods of protein sequencing. An important advantage of mass spectrometry is due to its ability not only to detect efficiently the presence of hundreds of known peptides and proteins in a sample but also to determine the structure of previously unknown compounds of this class. The last approach, being the matter of the present review, is called «*de novo* sequencing».

Keywords: *tandem mass spectrometry, de novo sequencing, peptides, proteins, amino acid sequence.*

Содержание

Введение

1. Методы определения первичной структуры пептидов

- 1.1. Методы классической биохимии
- 1.2. Методы масс-спектрометрии
- 1.3. Комбинированный метод — леддерное секвенирование

2. *De novo* секвенирование пептидов методами тандемной масс-спектрометрии положительных ионов

- 2.1. Диссоциация, активированная соударением (ДАС)
- 2.2. Диссоциация при электронном захвате (ДЭЗ)
- 2.3. Использование МАЛДИ для секвенирования пептидов
- 2.4. Фотоактивация диссоциации

3. Основные ограничения масс-спектрометрии положительных ионов при секвенировании пептидов и пути их устранения

- 3.1. Изобарные аминокислоты
- 3.2. Изомерные аминокислоты: лейцин и изолейцин
- 3.3. Пептиды, содержащие дисульфидную связь

4. Использование масс-спектрометрии отрицательных ионов для секвенирования пептидов

Выводы

Список литературы

Введение

Наряду с классическими биохимическими методами, масс-спектрометрия за последние 10–15 лет стала наиболее широко используемой техникой идентификации белков и пептидов [1, 2]. Метод позволяет быстро, эффективно и весьма надежно устанавливать первичную структуру этих биополимеров, включая их посттрансляционные модификации. Именно благодаря проникновению масс-спектрометрии в область исследования этих важнейших природных соединений в середине 90-х годов прошлого века возникло новое научное направление, названное протеомикой. Предметом протеомики является не только установление всех белков, которые может экспрессировать конкретный организм, но также идентификация и количественное определение реально синтезируемых белков в разных условиях жиз-

недеятельности этого организма, выявление возможных посттрансляционных модификаций, установление всех уровней структуры белков и их назначения.

Наиболее широко распространенным вариантом анализа белков стал подход «bottom-up». Он представляет собой предварительное биохимическое расщепление белка (или крупного полипептида) на более мелкие пептиды, очистку полученного образца от низкомолекулярных примесей и масс-спектрометрический анализ смеси, как правило, методом, сочетающим высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и тандемную масс-спектрометрию (МС/МС). Структурную информацию получают из тандемного масс-спектра пептидов в газовой фазе [3, 4]. Далее производится обработка данных с помощью программного обеспечения. При этом автоматически генерируются варианты аминокислотной последовательности (сиквенса) всех пептидов, молекулярные ионы которых детектируются в процессе эксперимента. Введение анализируемого массива данных в компьютерную библиотеку белкового поиска (например, Mascot) позволяет получить структурную информацию об исходном белке и оценить долю полной последовательности белка, охарактеризованную идентифицированными пептидными фрагментами (score).

Очевидно, что описанный выше метод успешно функционирует только при анализе белков и пептидов известной структуры. Если геном организма не расшифрован полностью, то применение этого подхода невозможно. Однако масс-спектрометрия позволяет устанавливать последовательности аминокислот и для не описанных ранее полипептидов (белков). Такой вариант анализа получил название «*de novo* секвенирование».

В настоящем обзоре рассматриваются основные варианты именно масс-спектрометрического *de novo* секвенирования пептидов, а также проводится сравнение их результатов с достижениями классических биохимических методов. Отдельный раздел посвящен ограничениям масс-спектрометрического метода секвенирования и путям их преодоления.

Возможности всех описываемых методов секвенирования представлены в основном на примерах реальных природных соединений.

1. Методы определения первичной структуры пептидов

1.1. Методы классической биохимии

Первым методом определения последовательности аминокислот стало секвенирование пептидов по Сэнгеру [5]. Суть его заключалась в последовательном отщеплении N-концевых аминокислот в результате реакции пептида с 2,4-динитрофторбензолом. Их дальнейшая хроматографическая идентификация осуществлялась путем сравнения со стандартными образцами. В настоящее время более удобным и потому часто используемым методом определения первичной структуры является деградация пептидов по Эдману [6, 7].

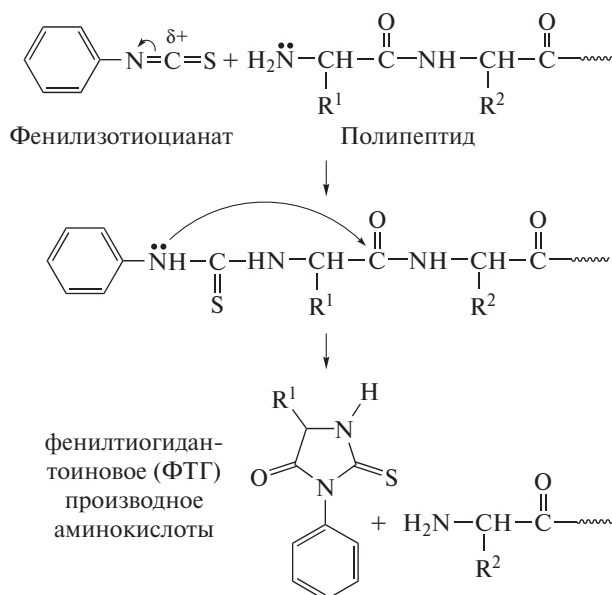


Схема 1. Деградация по Эдману.

Деградация по Эдману. При взаимодействии N-концевой аминокислоты пептида с реагентом Эдмана — фенилизотиоцианатом — образуется фенилтиогидантоиновое (ФТГ) производное этой аминокислоты [8] (схема 1). Последовательно отщепляемые ФТГ-производные аминокислот идентифицируют по их временам удерживания путем сравнения с набором стандартов (ФТГ-производных всех аминокислот) с помощью ВЭЖХ или тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Появление автоматических секвенаторов [9] превратило метод деградации по Эдману в рутинный способ установления последовательности аминокислотных звеньев в пептидах. К несомненным достоинствам метода следует отнести высокую надежность идентификации ФТГ-производных всех аминокислот и практически полную автоматизацию самого процесса их определения. Эти преимущества позволяют говорить о нем, как о наиболее надежном методе секвенирования пептидов на сегодняшний день.

Тем не менее метод деградации пептидов по Эдману обладает значительными недостатками. Прежде всего, это требование высокой степени чистоты анализируемого вещества (отсутствие примесных пептидов), сравнительно большие количества образца (~10–100 пмоль) и высокая стоимость анализа. При работе с природными материалами зачастую возникают непреодолимые препятствия, связанные с необходимостью выделения индивидуальных пептидов заданной степени чистоты и в нужных для анализа количествах.

Еще одним ограничением определения последовательности аминокислот по Эдману является длина анализируемого пептида. Поскольку, как и любая другая химическая реакция, взаимодействие с фенилизотиоцианатом не протекает количественно, и с каждым новым шагом появляется все больше аминокислот, не отщепившихся на более ранних стадиях. В результате получаемые хроматограммы осложняются пиками ФТГ-производных аминокислот, отщепившихся на предыдущих шагах, что сильно затрудняет интерпретацию получаемых данных. Надежно

идентифицировать можно лишь пептиды с максимальной длиной в 30–35 аминокислотных звеньев.

Помимо этого, химическая суть метода — взаимодействие фенилизотиоцианата с концевой аминокислотной группой — также накладывает ряд ограничений на его применение. Пептиды, имеющие посттрансляционно модифицированную концевую аминокислотную группу, фосфорилированные пептиды и гликопротеины не могут быть секвенированы по Эдману. В некоторых случаях не проходит сама реакция, и, кроме того, отсутствуют ФТГ-стандарты, необходимые для идентификации всех возможных посттрансляционно модифицированных аминокислот.

Методы геномной инженерии. Для определения первичной структуры белков все чаще используют анализ нуклеотидной последовательности комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) с применением соответствующих методов геномной инженерии [10]. Такой анализ занимает значительно меньше времени и ниже по стоимости, чем деградация по Эдману. Из нуклеотидной последовательности кДНК или соответствующей последовательности матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), которые содержатся в тех же тканях, что и анализируемые пептиды и белки, можно, учитывая особенности генетического кода, определить последовательность аминокислот кодируемого ими белка (не имея препарата белка!). Еще одним очевидным преимуществом метода является отсутствие ограничений по длине определяемого пептида или белка.

Однако этот подход, во-первых, не позволяет выявить посттрансляционные модификации белка, а, во-вторых, дает информацию обо всех возможных аминокислотных последовательностях, которые могли бы экспрессироваться с данных мРНК. Реальное же количество экспрессируемых белков и пептидов, как правило, значительно меньше. Таким образом, анализ кДНК не дает картины истинного состава протеома, а лишь предоставляет информацию о том, каким он мог бы быть [11]. Кроме того, последовательность праймеров для синтеза кДНК интересующего полипептида не всегда ясна.

Несмотря на указанные недостатки, метод исключительно полезен, особенно при сопоставлении его результатов с данными масс-спектрометрического анализа пептидных смесей [12]. При наличии информации об аминокислотной последовательности пептида, установленной масс-спектрометрически, анализ кДНК позволяет устранить «белые пятна» в полученном сиквенсе: идентифицировать изобарные и изомерные аминокислоты (лейцин (**Leu**)/изолейцин (**Ile**), лизин (**Lys**)/глутамин (**Gln**), фенилаланин (**Phe**)/окисленный метионин (**Met_{ox}**)), а также установить последовательность пептидов в исходном белке (полипептиде) после его энзиматического расщепления.

1.2. Методы масс-спектрометрии

Бомбардировка быстрыми атомами (ББА) исторически была первым эффективным масс-спектрометрическим методом для установления последователь-

ности аминокислот в недериватизованных пептидах [13, 14]. Однако узкий диапазон регистрируемых масс (обычно до 2000 Д) и сравнительно большие количества анализируемого вещества (не менее 100 пмоль чистого образца) делают его пригодным лишь для анализа олигопептидов [15]. ББА не является мягким способом ионизации: спектр характеризуется значимой фрагментацией молекулярного иона [16]. В некоторых случаях спектры ББА оказываются весьма полезными для интерпретации пептидного сиквенса, хотя тандемная масс-спектрометрия, безусловно, предоставляет более исчерпывающую и надежную структурную информацию (см. гл. 2).

Настоящий прорыв в использовании масс-спектрометрического секвенирования полипептидов связан с внедрением мягких методов ионизации: электрораспыления [17, 18] и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) [19]. Они позволяют переводить в газовую фазу и ионизировать большие, термолабильные, полярные молекулы. Оба метода ионизации позволяют определять молекулярные массы полипептидов, что является отправной точкой для установления их первичной структуры леддерным секвенированием (см. раздел 1.3).

Масс-спектрометрическое секвенирование пептидов обладает множеством достоинств. В первую очередь, это непревзойденная чувствительность — возможно проведение анализа вплоть до атто- и зептомольных (10^{-18} – 10^{-21} молей) концентраций анализируемого вещества (микроэлектрораспыление [20] и наноэлектрораспыление [21]). Даже используемые в рутинных масс-спектрометрических экспериментах фемтомольные количества пептидов на порядки меньше требуемого для проведения секвенирования по Эдману (раздел 1.1). Во-вторых, применимость этого метода для изучения посттрансляционных модификаций также является неоспоримым преимуществом перед классическими биохимическими методами. Помимо этого, объединение масс-спектрометра с жидкостным хроматографом [22] позволяет избежать многоступенчатой очистки пептидов: даже при неполном ВЭЖХ разделении анализируемой смеси можно выделять ионы, характеризующие молекулярную массу интересующих компонентов, и получать информацию об их структуре, используя тандемную масс-спектрометрию.

Как и любой другой, этот метод имеет ряд недостатков, которые, тем не менее, в большинстве случаев могут быть успешно преодолены. Возникающие сложности интерпретации масс-спектров *de novo* секвенированных пептидов рассмотрены в гл. 4 данного обзора.

1.3. Комбинированный метод — леддерное секвенирование

Метод леддерного (от англ. *ladder* — лестница) секвенирования представляет собой энзиматический гидролиз амидных связей исходного пептида с масс-спектрометрическим определением всей совокупности продуктов реакции. Детектируются леддеры пептида, содержащие на одну, две, три и т.д. концевых

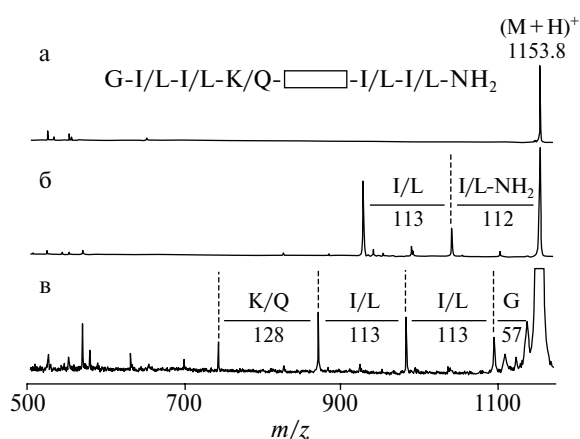


Рис. 1. Пример масс-спектра МАЛДИ при леддерном секвенировании: МАЛДИ-спектр исходного пептида (а), результаты леддерного секвенирования при использовании СРР/СРУ (б), леддеры при реакции с АРМ (в). Воспроизведено из работы [26] с разрешения издательства Wiley. (Обозначения на рисунке см. в Приложении 2).

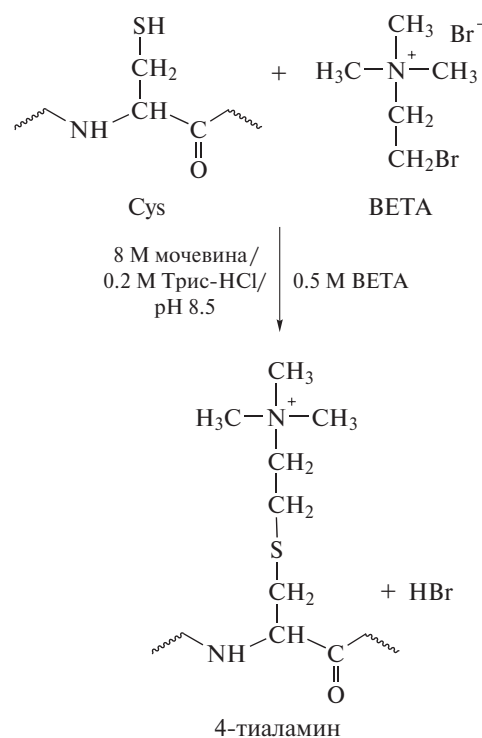
аминокислот меньше, чем исходный пептид. Таким образом, по разнице в массах леддеров устанавливается последовательность звеньев в пептиде (рис. 1). Отщепление аминокислоты происходит за счет ферментативного гидролиза. Поэтому разница в массах леддеров всегда соответствует массе аминокислотного остатка. В случае амидированного по С-концу пептида, разница в массах двух наиболее тяжелых ионов на единицу меньше массы первого аминокислотного остатка (см. рис. 1б).

В качестве ферментов для отщепления аминокислот используют карбоксипептидазу Y (СРУ) [23], карбоксипептидазу Р (СРР) или смесь этих неспецифических энзимов СРУ/СРР, дающих разрывы с С-конца пептида [24, 25]. Для отщепления N-концевых аминокислот применяется аминопептидаза М (АРМ) [26]. Средой для взаимодействия ферментов и субстрата служит цитратный буфер (30 мМ, рН 6.0) в случае СРУ/СРР (0.05 мкг мкл⁻¹) и 10 мМ буфер Трис-НСl (рН 7.5, 2.5 мкг мкл⁻¹) для АРМ.

Для леддерного секвенирования обычно используют МАЛДИ, поскольку при такой ионизации образца образуются однозарядные ионы [27]. Кроме того, толерантность МАЛДИ к примесям хорошо соотносится с условиями проведения леддерного секвенирования. Так, например, авторы работы [26] наносили каплю раствора фермента прямо на образец пептида на мишени. Полученные в этом случае результаты леддерного секвенирования представлены на рис. 1.

Несмотря на свою высокую чувствительность, метод имеет ряд недостатков. Во-первых, это сложность дифференциации изомерных Leu/Ile (113 Д) и изобарных Lys/Gln (128 Д) аминокислот (см. гл. 3). Во-вторых, невозможность прямого расщепления пептидазами амидных связей, следующих за цистеином [28]. Вторая проблема была решена авторами работы [28] путем дериватизации остатков цистеина. Присутствующие в пептиде дисульфидные связи предварительно восстанавливают дитиотриэтолом (ДТТ) (см. раздел 3.3), а затем алкилируют. Поскольку при

использовании более распространенного иодацетамида карбоксипептидазы остаются неактивными, в качестве алкилирующего тиольную группу реагента был применен (2-бромэтил) триметиламмонийбромид (ВЕТА), впервые предложенный авторами работы [29]:



2. De novo секвенирование пептидов методами тандемной масс-спектрометрии положительных ионов

Масс-спектрометрическое *de novo* секвенирование проводят на основе тандемного масс-спектра (МС/МС) интересующего пептида. Обычно такой спектр получают при фрагментации протонированных молекул пептидов. Существует большое количество методов стимулирования разрывов пептидной цепи [30]. На схеме 2 представлены типы ионов, образующихся в результате фрагментации протонированных молекул пептидов при различных способах активации.

При разрывах различных химических связей пептидной цепи образуются серии ионов, которые клас-

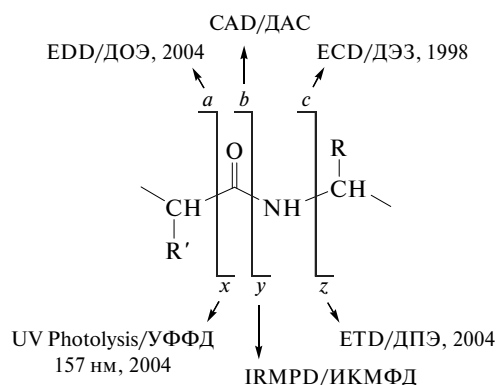
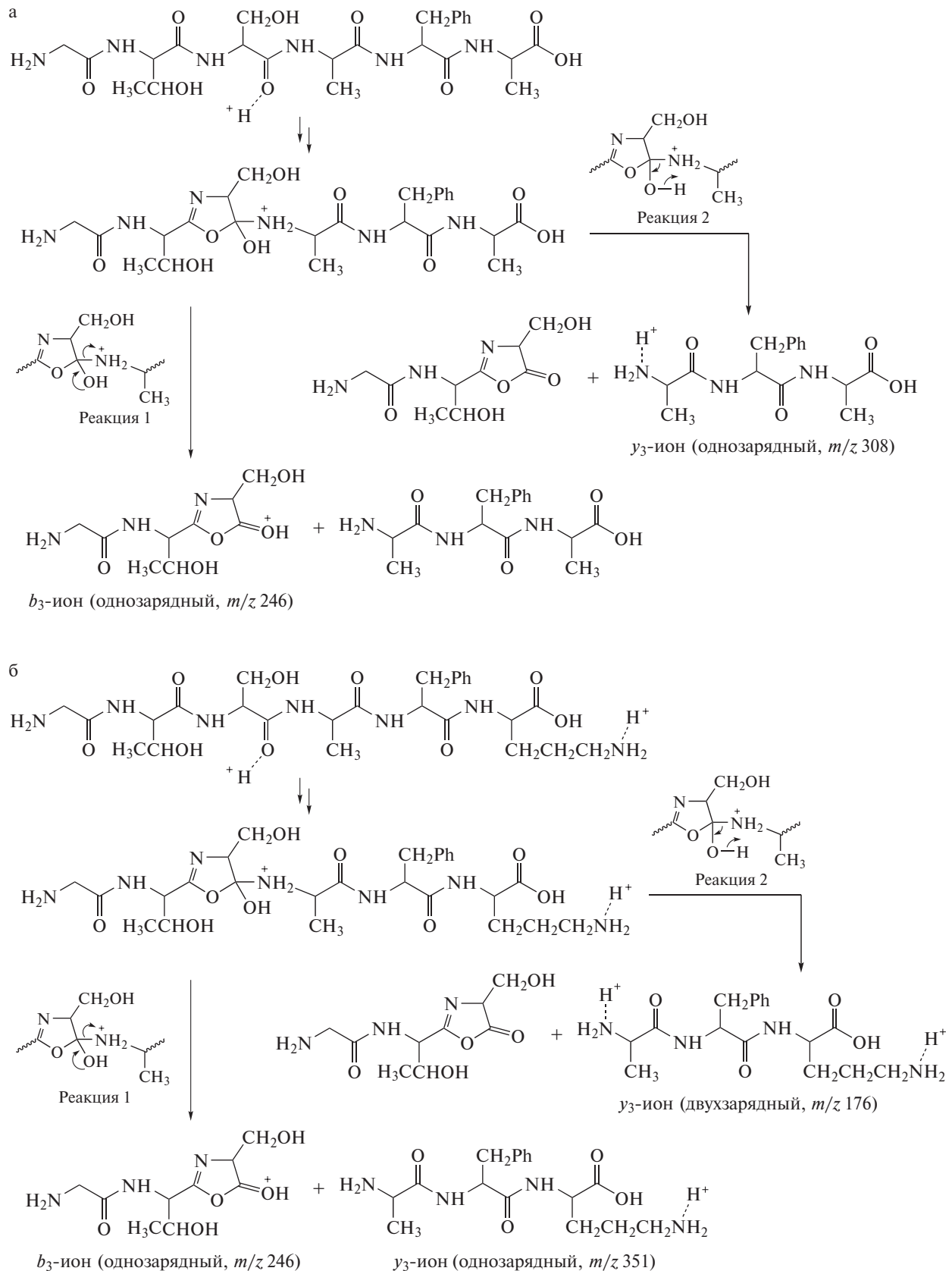


Схема 2. Методы активации фрагментации полипептидной цепи.



сифицируются в зависимости от того, на каком конце пептида остается положительный заряд. В ионах *a*, *b*, *c* заряд сохраняется на фрагментах, содержащих N-конец исходного пептида, тогда как в *x*-, *y*- и *z*-ионах — на фрагментах, включающих C-конец.

Стрелками на рисунке изображены методы активации разрывов различных связей в полипептидной цепи. Чаще других используется диссоциация, активированная соударениями (ДАС): с ее помощью получена львиная доля MS/MS спектров *de novo*

секвенированных пептидов. В последнее время резко возросло число публикаций по использованию для получения МС/МС спектров диссоциации при электронном захвате (ДЭЗ) [31, 32]. Остальные способы активации разрывов в цепи молекулярных ионов пептидов применяются реже, хотя в ряде случаев их использование весьма эффективно (см. раздел 2.3).

2.1. Диссоциация, активированная соударением (ДАС)

В случае активации соударением (как и для других методов активации распада) серии фрагментных ионов образуются при разрывах различных связей в протонированных молекулах исходных пептидов, образовавшихся в ионном источнике. Механизм образования фрагментных ионов из моно- и дипротонированного пептида в случае ДАС изображен на схеме 3.

Как следует из схемы 3б, дипротонированная молекула пептида MH_2^+ в результате активации соударением способна образовать одновременно и *b*-, и

y-ионы (реакция 1). Монопротонированная молекула пептида (схема 3а) приводит либо к *b*-, либо к *y*-ионам (реакции 1 или 2). В результате спектры ДАС полипротонированных пептидов оказываются более информативными. Этим, в частности, объясняется лучшее качество спектров ДАС пептидов, полученных с использованием ионизации электрораспылением, поскольку, этот способ ионизации способствует образованию многозарядных полипротонированных молекул.

Разрыв полипептидной цепи в условиях ДАС инициируется катионным центром протонированного аминокислотного остатка (на схеме 3 — карбонильная группа серина). Возникновение серий *b*- и *y*-ионов возможно только в случае разрывов разных пептидных связей, т.е. при статистическом распределении мест протонирования аминокислот в пептиде. Для объяснения экспериментальных результатов была выдвинута концепция мобильного протона, иллюстрируемая схемой 4 (пептид GTSAFK—OH).

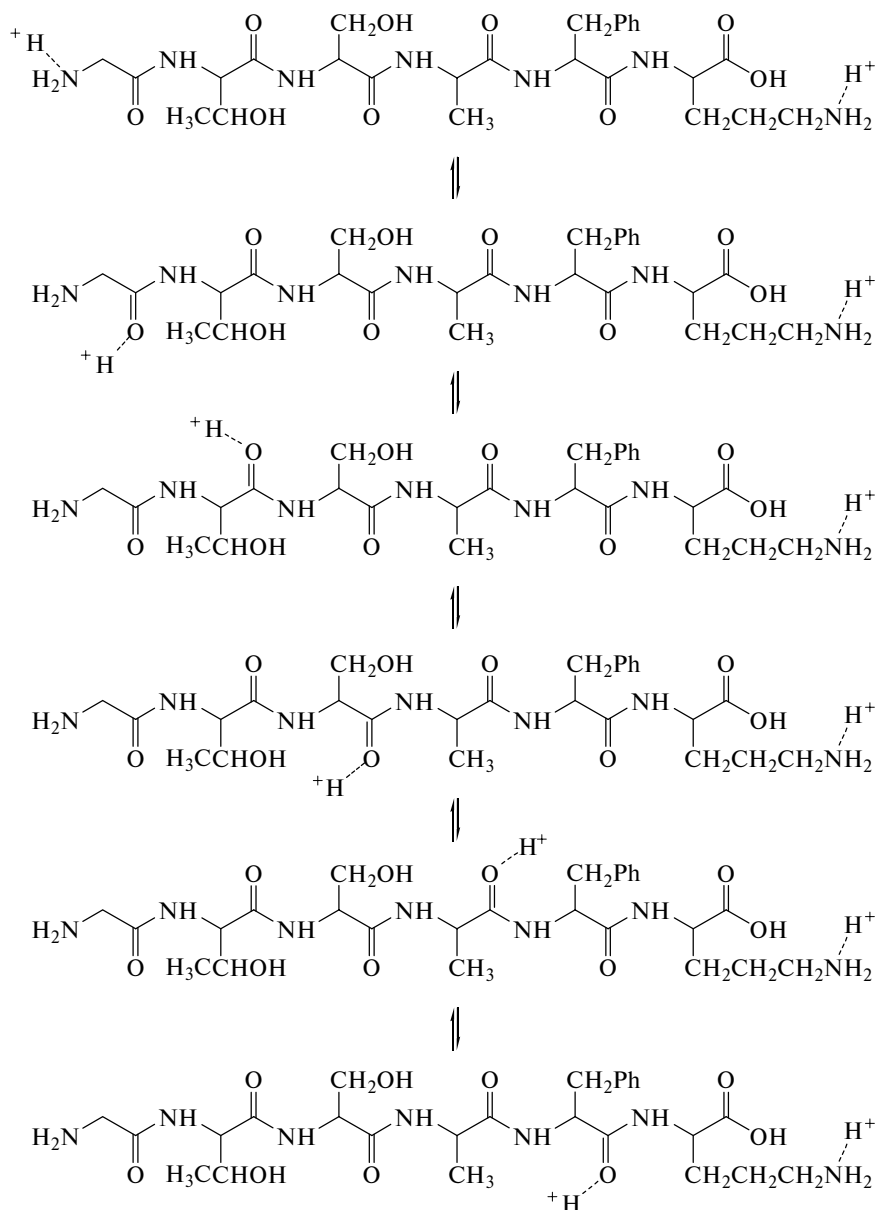


Схема 4. Иллюстрация концепции мобильного протона.

Эффективность протонирования различных аминокислотных остатков зависит от величины их сродства к протону. Преимущественными местами локализации протона являются основные аминокислоты (аргинин ($1052 \text{ кДж моль}^{-1}$) > лизин ($997 \text{ кДж моль}^{-1}$) \approx гистидин ($989 \text{ кДж моль}^{-1}$)), а также атом азота концевой аминогруппы пептида. Таким образом, при наличии основных аминокислот на С-конце пептида в его спектре ДАС будет более выражена у-серия. Если же основные аминокислоты находятся на N-конце, более интенсивными будут пики b-серии.

Наличие пролина в пептидах ведет к преимущественному разрыву у его N-конца. В то же время в ДАС-спектрах таких пептидов практически отсутствуют ионы, образовавшиеся при разрыве цепи на С-конце пролина. Причиной этому является циклическая структура данной аминокислоты (2-пирролинкарбоновая кислота). Согласно механизму образования b-ионов (схема 3), при разрыве амидной связи на С-конце пролина интермедиат должен иметь структуру **1** (схема 5). Данная структура является напряженной, а ее образование представляется маловероятным. Интермедиат, образующийся при разрыве пептидной связи с N-конца пролина, имеет структуру **2** (схема 5). Возникновение такого интермедиата ничем не затруднено, при этом отщепляющийся пролинсодержащий фрагмент является хорошей уходящей группой. При наличии пролина в молекуле полипептида, пики у- и b-ионов, соответствующие разрыву амидной связи с N-конца пролина, зачастую оказываются самыми интенсивными в ДАС-спектре. Напротив, разрыв пептидной связи в интермедиате **1** вообще невозможен.

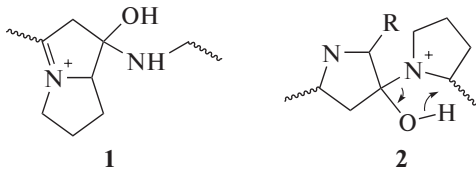


Схема 5. Интермедиаты, возникающие при разрыве полипептидной цепи на С-конце пролина (**1**) и N-конце пролина (**2**).

Поскольку пик иона, соответствующего такому разрыву, все же наблюдается (с крайне малой интенсивностью), предполагается реализация альтернативного механизма образования b- и у-ионов с участием ациклического интермедиата (схема 6) [4].

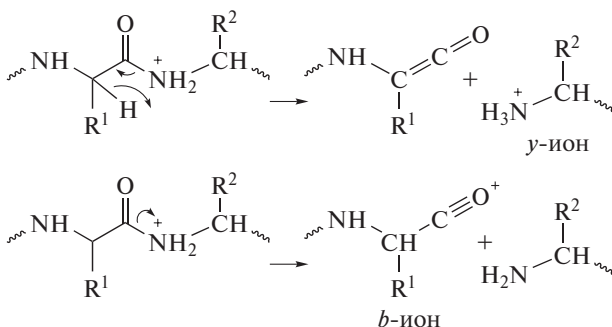


Схема 6. Механизм разрыва полипептидной цепи с участием ациклического интермедиата.

Таблица 1. Основные пики МС/МС спектров неописанных нейропептидов с массами 1049.31 Д и 1022.5 Д [34]. Установленная последовательность*.

МС/МС иона с m/z 1049.31			МС/МС иона с m/z 1022.5		
у-ион	b-ион \rightarrow	Остаток	у-ион	b-ион \rightarrow	Остаток
1048.6	157.1	Arg ₁	1021.5	100.1	Val ₁
892.4	254.2	Pro ₂	922.5	197.1	Pro ₂
795.4	325.2	Ala ₃	825.4	298.2	Thr ₃
724.4	382.2	Gly ₄	724.4	355.2	Gly ₄
667.3	529.3	Phe ₅	667.3	502.3	Phe ₅
520.3	630.3	Thr ₆	520.3	603.3	Thr ₆
419.2	727.4	Pro ₇	419.2	700.4	Pro ₇
322.2	874.4	Phe ₈	322.2	847.4	Phe ₈
175.1	1030.6	Arg ₉	175.1	1003.5	Arg ₉

Установленная последовательность: RPAGTFPFR

Установленная последовательность: VPTGTFPFR

* Жирным шрифтом выделены наблюдаемые ионы, обычным — вычисленные. (Обозначения в таблицах см. в Приложении 2).

Существование как циклического, так и ациклического b-ионов убедительно доказано. В действительности оба механизма реализуются, однако механизм, представленный на схеме 3, является преобладающим [4].

Спектры ДАС, содержащие в основном пики ионов серий b и у, могут эффективно применяться для *de novo* секвенирования. Метод расшифровки масс-спектров основан на дедуктивном подходе, восстанавливающем последовательность аминокислот в пептиде по различиям в массах фрагментных ионов. Метод детально описан, например, в [33]. Примеров установления однозначного пептидного сиквенса при использовании исключительно этого подхода, не так много. В частности, Ченом с соавторами были установлены первичные структуры ранее неизвестных нейропептидов, содержащихся в каждом секрете жерлянки *Bombina maxima* [34]. Полученные масс-спектры позволяют легко идентифицировать b- и у-серии и установить последовательности пептидов (см. табл. 1).

Эти данные были получены с помощью ВЭЖХ-МС/МС при использовании ионизации электрораспылением, ДАС и ионной ловушки как тандемного анализатора. При всех достоинствах ионная ловушка является далеко не лучшим анализатором для *de novo* секвенирования в режиме ДАС. Дело в том, что из теории работы ионной ловушки в условиях ДАС вытекает неизбежная потеря данных о фрагментных ионах в области низких масс. Диапазон этой области составляет от 0 до $\sim 0.2 \text{ М}$, где М — масса иона-предшественника. При анализе достаточно длинных пептидов это приводит к ощутимой потере важной структурной информации, например, не позволяет идентифицировать b₂-ион, ключевой для установления b-серии пептида [33].

Наиболее эффективным для *de novo* секвенирования является использование приборов гибридной геометрии (например, QTOF), получивших широкое распространение. Приборы такого типа позволяют регистрировать фрагментные ионы по всей

Таблица 2. Примеры установленных аминокислотных последовательностей пептидов методом ДЭЗ.

Название	Сиквенс*	Масса вычисленная	Масса определенная
Ликоцитин1	GKLQAF LAKMKEIAAQTL-NH ₂	1959.12	1959.13
Ликоцитин2	GRLQAF LAKMKEIAAQTL-NH ₂	1987.15	1987.14
Ликоцитин3	KIKWFKTMKSLAKFLAKEQMCKKHLGE-OH	3147.63	3147.82
	AGIGKIGDFIKKAIKYKN-OH	2034.21	2034.20
	M _{ox} IASHLAF EKLSKLGSKHTM _{ox} L-NH ₂	2372.28	2340.28

*Отнесение I/L сделано на основе данных деградации по Эдману (обозначение сиквенсов см. в Приложении 2).

шкале масс, выигрывают в чувствительности и разрешении [15].

Следует подчеркнуть, что фрагментация как в случае ионных ловушек, так и приборов QTOF, инициируется при взаимодействии иона-предшественника с молекулами инертного газа. Энергия соударений составляет 1–100 эВ (низкоэнергетические соударения) [35]. Высокоэнергетические столкновения (> 5 кэВ) также находят применение в секвенировании пептидов, о чем будет сказано ниже (гл. 3).

2.2. Диссоциация при электронном захвате (ДЭЗ)

В 1998 г. МакЛафферти и сотр. [36] предложили принципиально новый метод диссоциации полипептидных молекул, основанный на электронном захвате (ДЭЗ, ECD). Метод представляет собой захват низкоэнергетических (0–1 эВ) электронов полипротонированными молекулами пептидов в ячейке Пеннинга масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса (ИЦР) [37]. Диссоциация протекает согласно схеме 7.

Для разделения и детектирования фрагментов распада хотя бы один из радикалов R и/или R¹ (схема 7) должен нести положительный заряд. По этой причине спектр двухзарядного пептида, полученный в ДЭЗ, будет менее богатым и информативным, чем спектр трехзарядного, когда детектируются оба иона — c и z. Схема 8 демонстрирует фрагментацию трехзарядного пептида с локализацией зарядов на основных аминокислотах (лизин) и N-концевой аминогруппе. Таким образом, данный метод инициирования фрагментации совместим *только* с методом ионизации электрораспылением, способным генерировать полипротонированные молекулы пептидов.

Кроме того, электронный захват может быть осуществлен исключительно при использовании ИЦР в

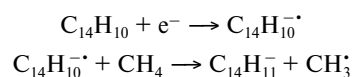
качестве анализатора ионов и несовместим с другими масс-спектрометрами [38] (ионные ловушки, квадрупольные, время-пролетные). Как следствие, широкое применение ДЭЗ ограничивается высокой стоимостью приборов ИЦР.

Примеров использования ДЭЗ в *de novo* секвенировании существует не так много. В частности, авторами работы [39] были определены первичные структуры пяти новых пептидов, выделенных из ядовитых желез тарантула *Lycosa singoriensis*. Сиквенсы были установлены исходя из ДЭЗ-спектров, полученных на масс-спектрометре ИЦР Ultima (4.7 Тл). ДЭЗ-спектр одного из охарактеризованных пептидов представлен на рис. 2, где хорошо прослеживается z- и, особенно, c-серия фрагментных ионов.

Последовательности еще четырех пептидов были определены аналогичным образом. Во всех случаях ДЭЗ-спектры характеризуются наличием всех ионов комплементарных серий c и z, необходимых для полной идентификации (присутствуют разрывы всех пептидных связей). Полученные сиквенсы представлены в табл. 2.

Поскольку ДЭЗ совместима лишь с приборами ИЦР, были предприняты попытки использовать химическую ионизацию отрицательных ионов как метод генерации анион-радикалов, служащих переносчиками электронов к ионам пептидов, удерживаемых в ионной ловушке. Этот метод, названный диссоциацией при переносе электрона (ДПЭ, electron transfer dissociation, ETD) [38], позволяет получать спектры, аналогичные ДЭЗ, при использовании обычных ионных ловушек в качестве масс-анализаторов.

В работе [38] применен метан в качестве газа-реагента и антрацен как ловушка электронов. Протекающие в источнике химической ионизации при бомбардировке электронами с энергией 70 эВ основные процессы могут быть описаны следующими уравнениями:



При взаимодействии ди- и трипротонированных пептидов с ионами антрацена образуются частицы (M + 2H)²⁺, (M + H)⁺, (M + 3H)²⁺ и (M + 3H)³⁺, которые могут быть изолированы в первом квадрупольном приборе QLT, и подвергнуты фрагментации в ионной ловушке по механизму ДАС. При этом образуются преимущественно ионы серий c и z, как при использовании ДЭЗ. Ионы серий b и y также образуются, но их количество незначительно (рис. 3).

Метод ДПЭ представляется весьма перспективным для протеомных исследований. Он был впервые

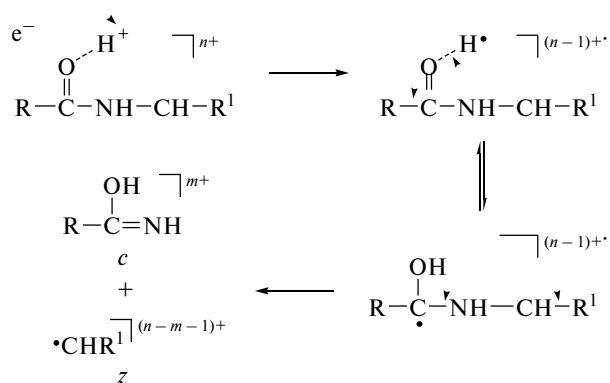


Схема 7. Механизм фрагментации полипептидной цепи при ДЭЗ.

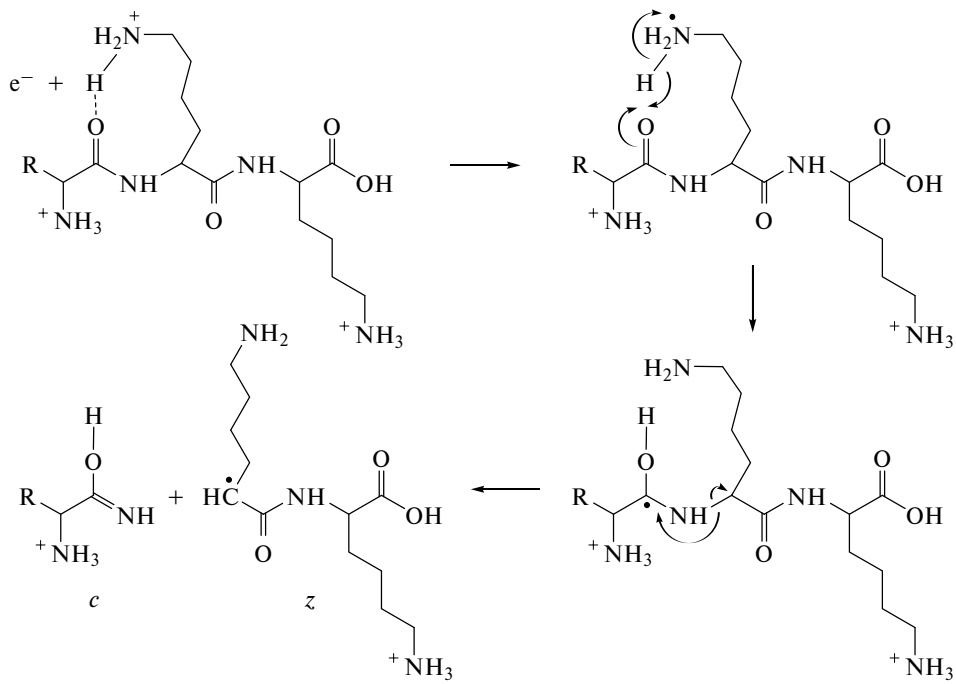


Схема 8. Фрагментация трехзарядного иона полипептида MH_3^{3+} при ДЭЗ.

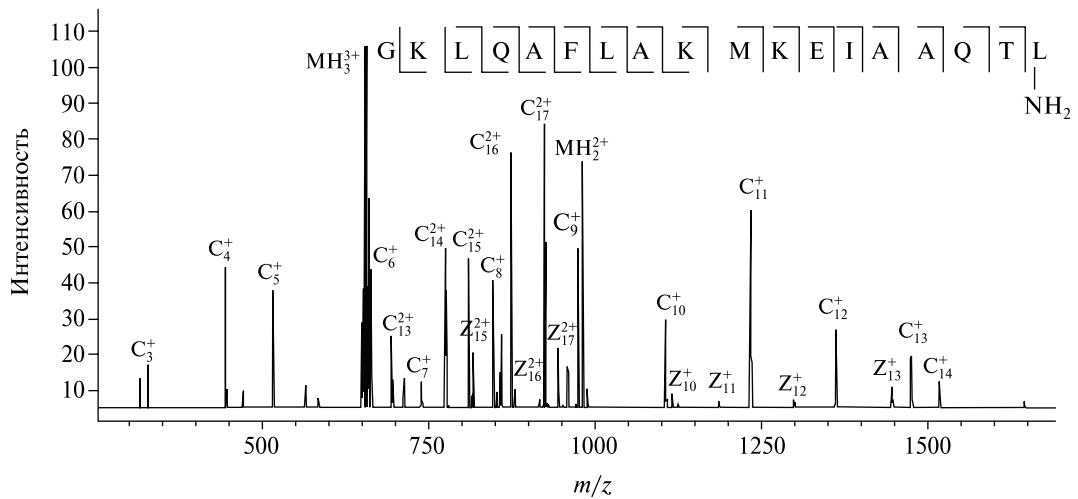


Рис. 2. ДЭЗ-спектр трехзарядного пептида $GKLQAF LAKMKEIAAQTL-NH_2$. Воспроизведено из работы [39] с разрешения издательства Wiley.

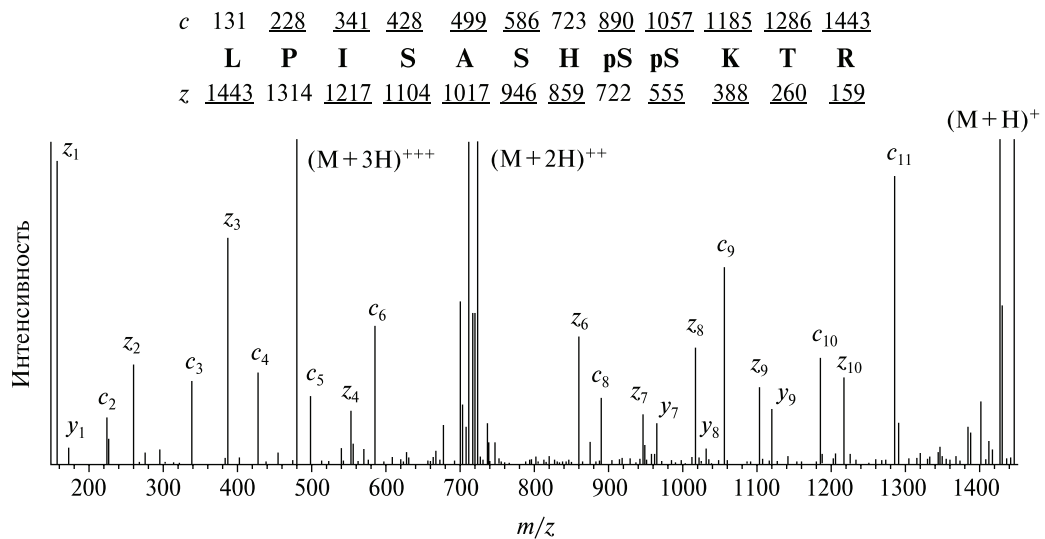


Рис. 3. ДПЭ MS/MS синтетического пептида $LPISASHpSpSKTR-OH$. Воспроизведено из работы [38].

предложен в 2004 г. [38], а в 2005 г. фирмой Bruker был анонсирован первый коммерческий прибор, позволяющий функционировать с использованием техники ДПЭ. На сегодняшний день коммерческие приборы с опцией ДПЭ выпускаются не только компанией Bruker (HCTultra PTM Discovery System), но также Thermo (LTQ XL).

2.3. Использование МАЛДИ для секвенирования пептидов

Как уже отмечалось выше, важнейшие используемые методы иницирования фрагментации — ДАС и ДЭЗ — наиболее эффективны при работе с многозарядными ионами. Характерной особенностью МАЛДИ является образование практически исключительно однозарядных ионов. Однако МАЛДИ является очень привлекательным инструментом для протеомных исследований, поскольку характеризуется исключительной экспрессностью, простотой и толерантностью к примесям (в отличие от ионизации электрораспылением) [40]. Показательным примером толерантности МАЛДИ к примесям и пробоподготовке являются результаты работы [41], в которой авторы определили последовательности нескольких нейропептидов из лягушки *Xenopus laevis*, просто смешав рассеянные клетки мозга амфибий с матрицей, нанесенной на мишень МАЛДИ.

Использование МАЛДИ (в подавляющем большинстве случаев с время-пролетным анализатором) базируется на специфических методах активации фрагментации молекулярных ионов. Наибольшее распространение получил метод распада после источника, (РПИ, post source decay, PSD). Шпенглер и соот. установили [42, 43], что молекулярные ионы интенсивно распадаются в начальной бесполовой части время-пролетного анализатора. Поскольку в бесполовом пространстве скорости как предшественника, так и продуктов одинаковы, невозможен их анализ в линейном время-пролетном анализаторе — ионы достигнут детектора одновременно. В то же время кинетические энергии этих ионов различны, поскольку различаются их массы ($E_k = mv^2/2$). Рефлек-

трон, благодаря наличию внутреннего потенциала, задерживает высокоэнергетические частицы дольше, чем низкоэнергетические, тем самым изменяя время достижения ионами детектора. Таким образом, рефлектрон в данном случае — анализатор ионов [44]. К сожалению, конструкция рефлектрона дает возможность оперировать только в ограниченном диапазоне потенциальных полей, что позволяет регистрировать с приемлемым разрешением только ионы с диапазоном масс от m_{\max} до $0.7 m_{\max}$ (где m_{\max} — максимальная масса иона, анализируемая при конкретных установленных параметрах рефлектрона). Для записи полного МС/МС спектра используют пошаговую регистрацию диапазонов масс: от m_{\max} до $0.7 m_{\max}$, затем от $0.7 m_{\max}$ до $(0.7)^2 m_{\max}$ и т.д. Понятно, что для регистрации спектра, например, в диапазоне от m/z 50 до m/z 2000, требуется $n = \lg(50/2000)/\lg 0.7 = 11$ шагов, что существенно замедляет анализ. Тем не менее, реализация режима МС/МС с помощью обычного время-пролетного масс-спектрометра с источником МАЛДИ привела к широкому распространению метода, в том числе и для *de novo* секвенирования пептидов. Например, авторы работы [45] выявили таким образом аминокислотную последовательность нового пептида из нейроэндокринной системы улитки *Lymnaea stagnalis*. Полученный ими масс-спектр содержит множество пиков и весьма сложен для «ручной» расшифровки. В основном пики обусловлены ионами *a*-, *b*-, *x*-, *y*-серий, хотя часто наблюдаются также серии *d* и *w* (см. гл. 3). Как правило, расшифровке помогает автоматическое нахождение комплементарных пар ионов, например, *b* и *y*, с использованием программного обеспечения [41, 45], поставляемого с масс-спектрометром. Используя такой поиск, авторы [45] установили последовательность изучаемого ими пептида как (FH)FYGPYDVFQ(RDV)—NH₂.

Также эффективно применение комбинации РПИ с другими методами, например, ледерным секвенированием [26], а также поиск в базах данных сиквенсов пептидов, родственных изучаемым [45].

Недостатки РПИ удалось преодолеть с помощью метода МАЛДИ на приборе с тандемным время-про-

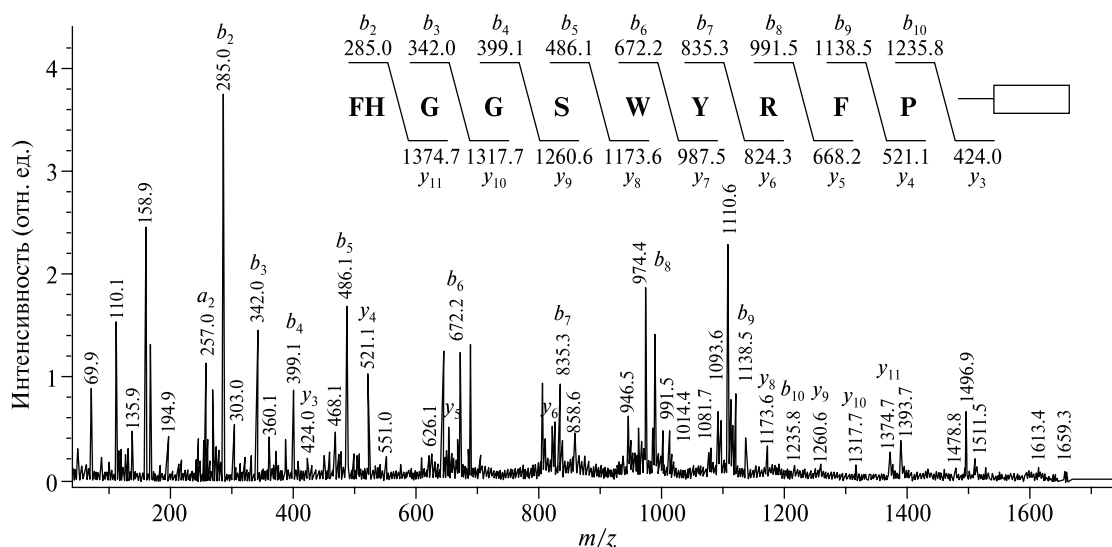


Рис. 4. Пример использования метода МАЛДИ-ВП-ВП для пептидного секвенирования. Воспроизведено из работы [46] с разрешения издательства Elsevier.

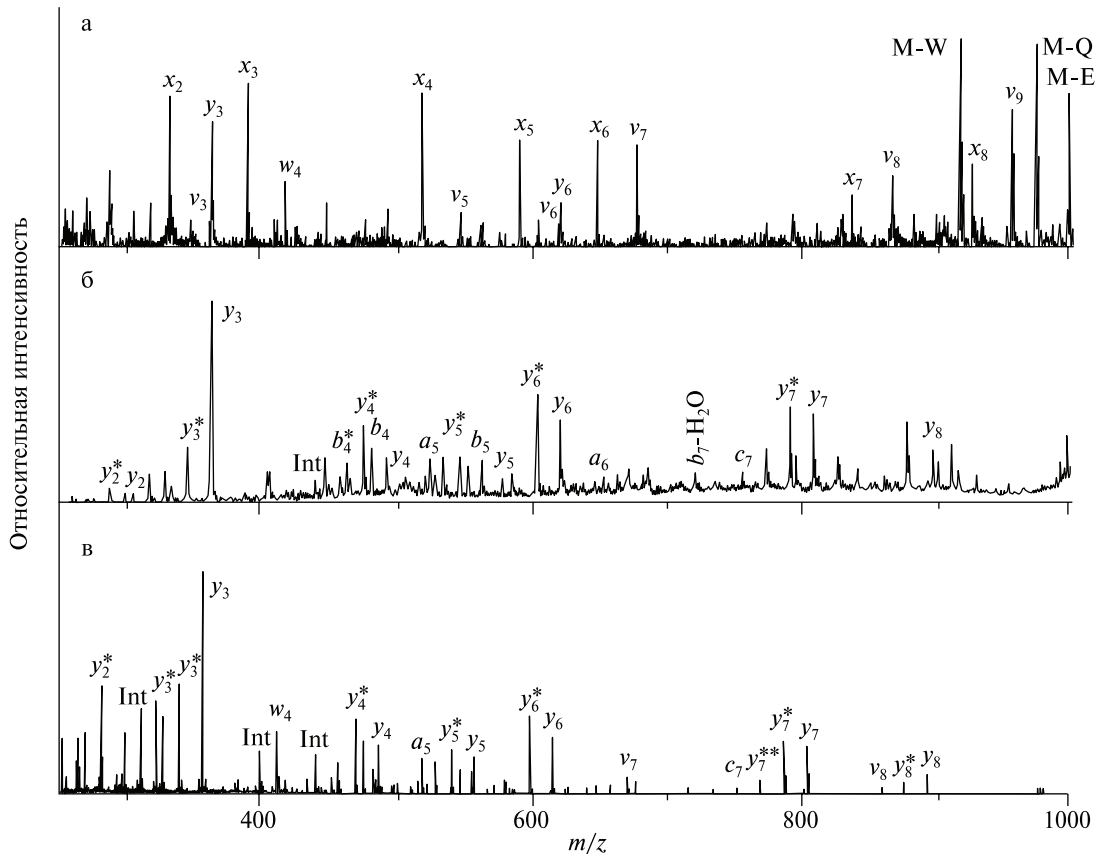


Рис. 5. Спектры пептида FSWGAEGR–OH, полученные с помощью МАЛДИ при УФФД (157 нм) (а), РПИ (б) и ДАС МАЛДИ-ВП-ВП (в). Воспроизведено из работы [48] с разрешения издательства Wiley.

летным анализатором, МАЛДИ-ВП-ВП (MALDI-TOF/TOF). Суть подхода заключается в сужении разброса кинетических энергий иона-предшественника и ионов-продуктов так, чтобы весь спектр записывался сразу, в одном диапазоне эквипотенциальных поверхностей, создаваемых в рефлектроне. По сути, приборы данного типа отличаются от обычного РПИ наличием ячейки, разделяющей трубу время-пролетного анализатора на две части. Этот дополнительный узел, например, запатентованный компанией Bruker «LIFT», позволяет скомпенсировать энергии ионов и тем самым записать масс-спектр по всему диапазону значений m/z сразу, а не за несколько шагов, как в классическом РПИ. При этом происходит не только выигрыш в скорости, но и увеличение разрешения.

Техника МАЛДИ-ВП-ВП позволяет добиться внушительных успехов в *de novo* секвенировании пептидов. Например, в работе [46] установлена частичная последовательность ранее не известного 13-членного пептида (FHGGSWYRFPWGY–NH₂) из яда улитки *Conus monile* (рис. 4). Структуру С-конца установили после трипсинолиза исходного пептида и регистрации масс-спектра С-концевого фрагмента при ионизации электрораспылением.

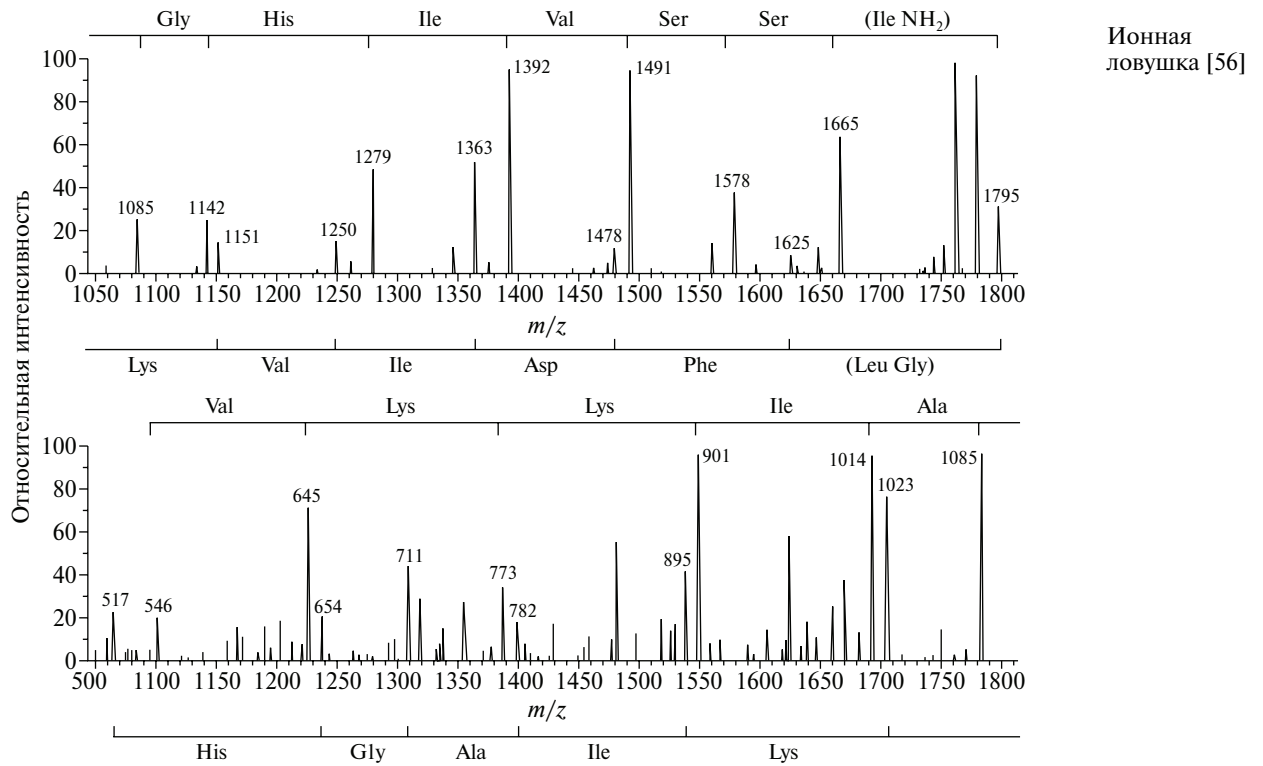
Как уже отмечалось, ДАС позволяет получить структурную информацию при иницировании фрагментации даже однозарядного иона. Коммерческие приборы систем МАЛДИ-РПИ и МАЛДИ-ВП-ВП,

как правило, снабжены камерой соударений. Стандартная кинетическая энергия ионов, покидающих ионный источник МАЛДИ, достаточно велика — порядка нескольких кэВ, поэтому соударения в этом случае высокоэнергетические. Значительного влияния на фрагментацию и вид спектра использование камеры соударений не оказывает, однако в ряде случаев обеспечивает больше структурной информации в области низких масс [47]. Кроме того, высокоэнергетические столкновения приводят к образованию большего числа ионов d и w , что находит применение в *de novo* секвенировании (подробнее — в гл. 3).

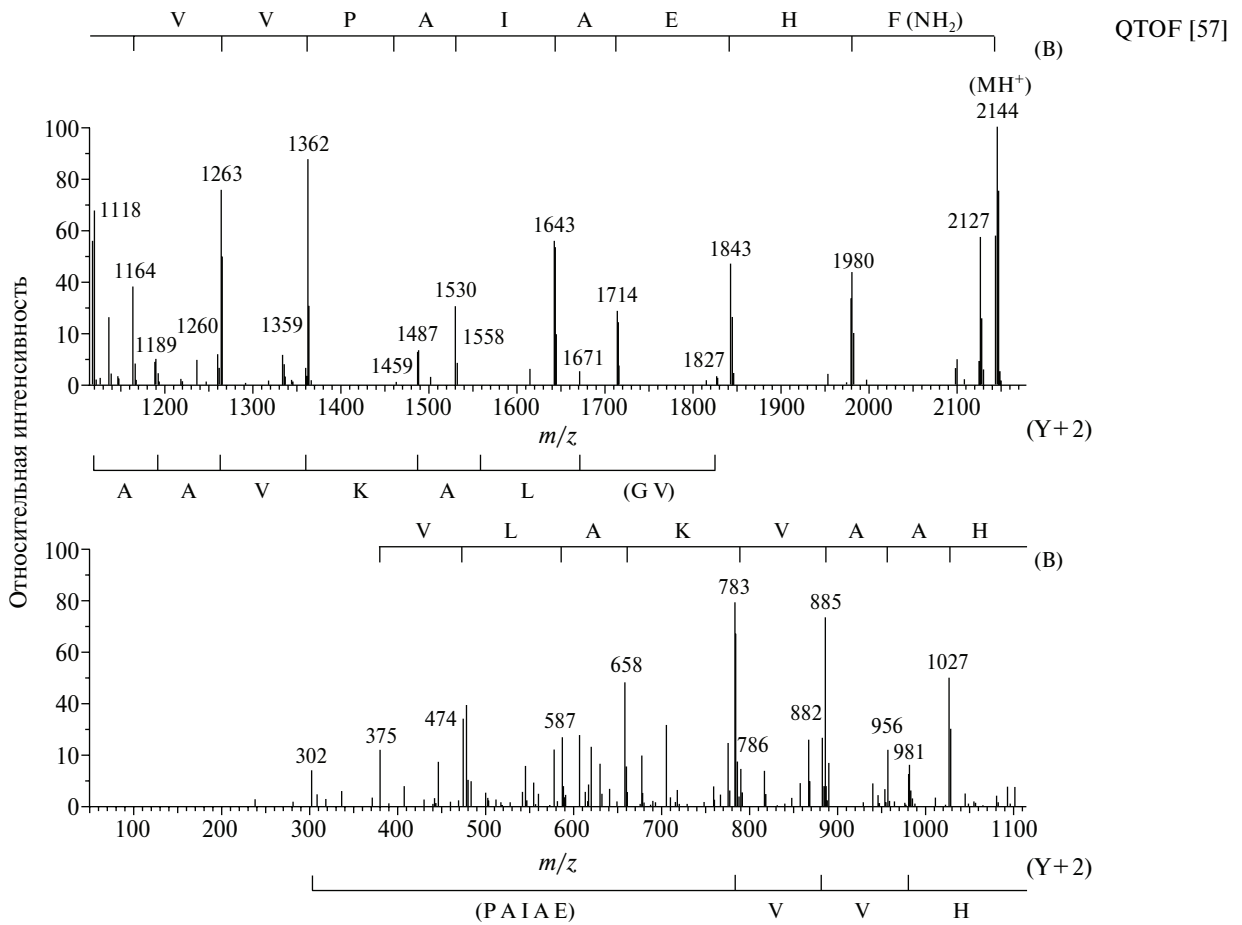
2.4. Фотоактивация диссоциации

Существует еще несколько методов активации фрагментации, находящих применение при секвенировании пептидов. Эти методы используются реже, но иногда оказываются весьма полезными.

В 2004 г. был предложен новый метод фотоактивации диссоциации полипептидной цепи [48]. Метод был назван ультрафиолетовой фотодиссоциацией (УФФД) при 157 нм (UV photodissociation, UVPD at $\lambda = 157$ нм), поскольку был первоначально применен с использованием излучения ультрафиолетового фторного лазера с рабочей длиной волны 157 нм вместо газа-реагента в ячейке столкновений. Наблюдаемые спектры кардинально отличались по набору ионов от образующихся при любом другом иницировании фрагментации (см. рис. 5).



Аурин-3.3 GLFDIVKKIAGHIVSSI-NH₂ MW1794 Д



Макулатин-1,1 GLFGVLAKVAANHVPVPAIAEHF-NH₂ MW 2144 Д

Рис. 6. Примеры секвенирования пептидов при ионизации электрораспылением, с использованием ДАС в tandemном масс-спектрометре конфигурации QTOF и ионной ловушке. Спектры воспроизведены из работ [56] и [57] с разрешения издательства Wiley.

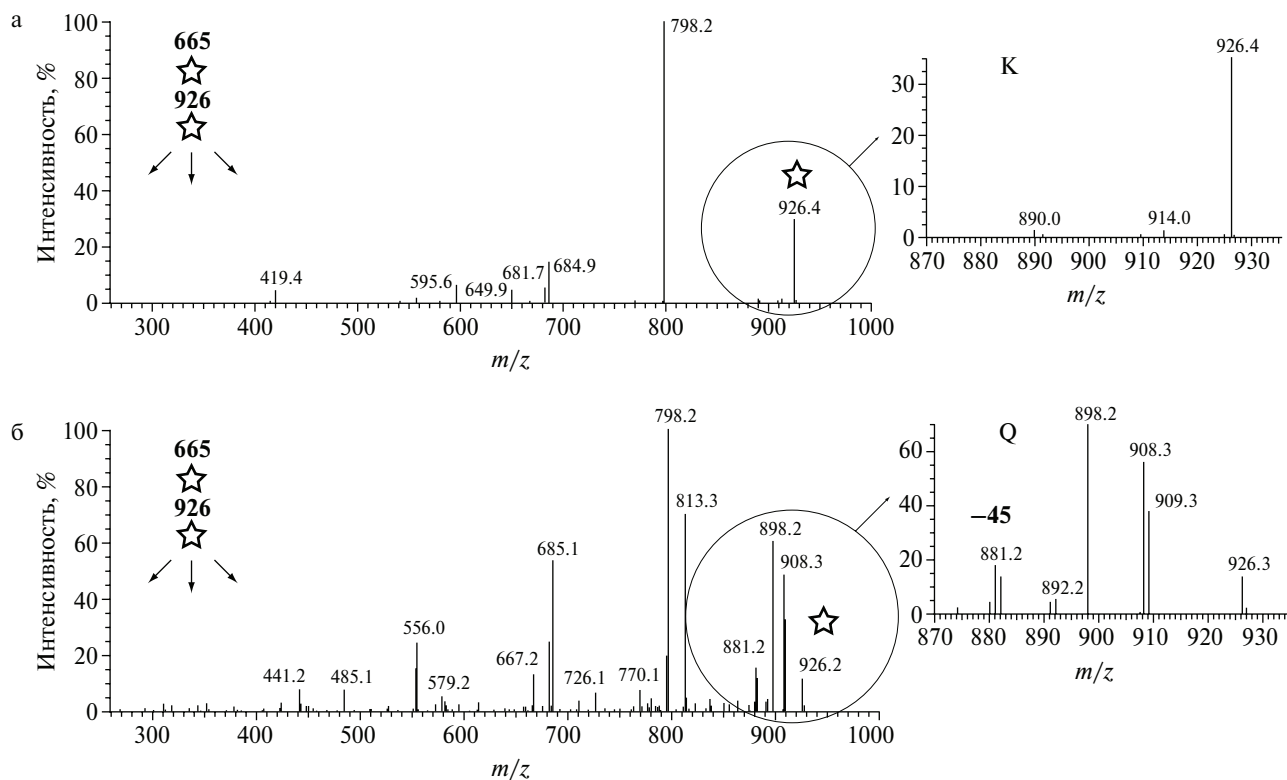


Рис. 7. MS³-спектр иона b_8 пептидов MICHAELKARAS MICHAELQARAS: фрагменты MICHAELK (а) и MICHAELQ (б). Воспроизведено из работы [60] с разрешения издательства Wiley.

Использование обычных методов активации фрагментации для масс-спектрометрического секвенирования дисульфидсодержащих пептидов приводит к тому, что разрывы полипептидной цепи между связанными остатками цистеина либо отсутствуют, либо очень слабо выражены. Причина этого — конкуренция в разрывах амидной и дисульфидной связей [54].

Для обеспечения разрывов пептидных связей между дисульфидсвязанными остатками цистеина применяют различные методы, включающие как химическую модификацию дисульфидной связи, так и ее разрыв при использовании ДЭЗ, УФФД, высокоэнергетической ДАС и фрагментации в МАЛДИ.

3.1. Изобарные аминокислоты

Лизин и глутамин. Наиболее очевидным методом различения лизина и глутамина является использование масс-спектрометрии высокого разрешения. Например, приборы ИЦР с разрешением более 100 000 позволяют однозначно проводить отнесение Lys/Gln измерением точных масс соответствующих фрагментных ионов. Разность масс соседних ионов любых серий равна 128.0949 для лизина и 128.0586 для глутамина. Примером использования данного подхода является работа [39].

К сожалению, масс-спектрометры ИЦР исключительно дороги и поэтому не являются широко распространенными. Рутинные приборы более низкого разрешения (ионная ловушка, квадрупольный или время-пролетный анализаторы) регистрируют раз-

ницу в массах с меньшей точностью и не позволяют надежно различать эти изобарные аминокислоты. Поэтому приходится применять другие подходы.

Так, например, Дж. Бови и сотр. [55, 56] была установлена первичная структура десятков новых пептидов, выделенных из кожи различных видов земноводных. Авторы использовали тандемную масс-спектрометрию в условиях ионизации электрораспылением, ДАС, с анализаторами ионов QTOF и ионной ловушкой. Характерные масс-спектры представлены на рис. 6.

Лизин и глутамин различали путем ферментативного расщепления исходного пептида пептидазой Lys-C. Данный фермент гидролизует пептидную связь лизина с С-конца. Таким образом, если обработка ферментом приводит к образованию фрагмента, соответствующего разрыву после сомнительного остатка Lys/Gln, — это лизин, в противном случае — глутамин. Образование фрагмента легко детектировать масс-спектрометрически по вычисленной массе, если последовательность установлена из спектров, подобных представленным на рис. 6. Различить аминокислотные остатки лейцина и изолейцина авторам удалось только при использовании деградации по Эдману. Установленные таким образом аминокислотные последовательности приведены в обзоре [55].

Другим распространенным способом дифференциации лизина и глутамина является дериватизация исходного пептида. Модифицируют всегда лизин. Образующиеся производные отличаются по массе от

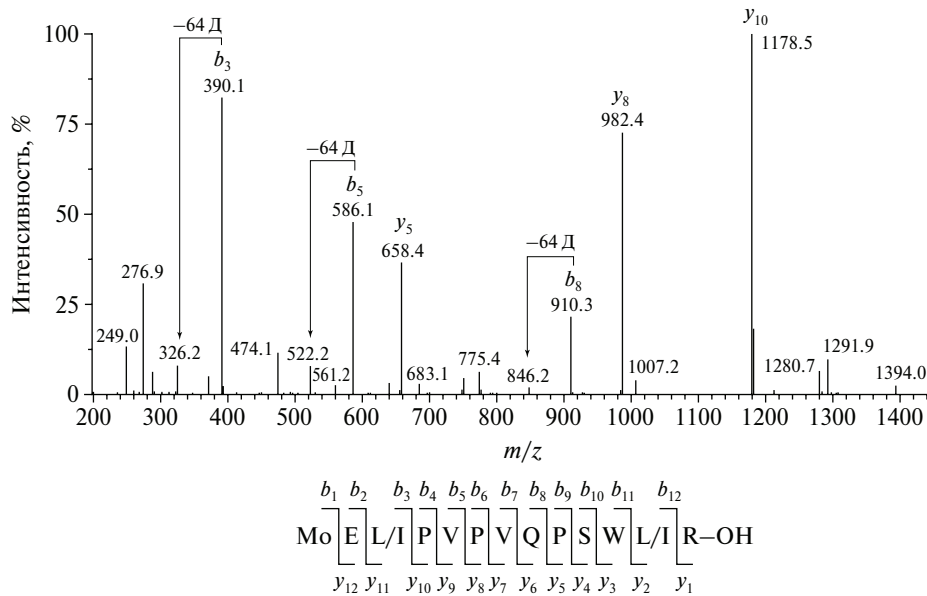
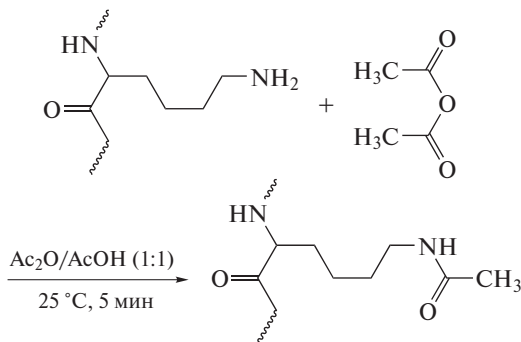


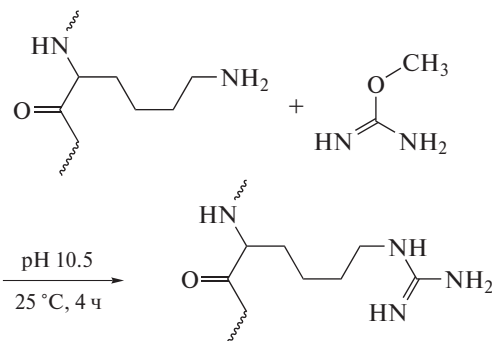
Рис. 8. Масс-спектрометрическое детектирование окисленного метионина. Воспроизведено из работы [33] с разрешения издательства Wiley.

глутамин и легко детектируются в повторном масс-спектрометрическом эксперименте. Например, авторы работы [46] ацилировали лизин согласно схеме:



После такой обработки лизин регистрируется как ацетиллизин с массой 170 Д. В ряде случаев ацилирование требует более жестких условий. Например, авторы работы [58] проводили ацилирование при 37 °C в течение 45 мин при активном перемешивании.

Другим распространенным методом дериватизации является гуанидирование лизина [28, 59]:



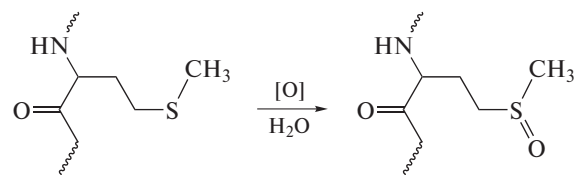
В этом случае лизин также регистрируется с массой 170 Д.

Оригинальный метод для различения лизина и глутамин масс-спектрометрическим путем был предложен авторами работы [60] с использованием техники

МС³. Его суть заключается в регистрации масс-спектра фрагментных ионов третьего поколения исходного пептида для иона *b*- или *y*-серий, содержащего Lys/Gln на C- или N-конце соответственно. При этом в спектре МС³ пептида с концевым остатком глутамин наблюдается потеря 45 Д из родительского иона, тогда как для пептида с концевым остатком лизина такой потери нет (рис. 7). К сожалению, данный метод был применен только для синтетических пептидов, хотя потенциально он может быть использован и для природного материала [60].

Еще один масс-спектрометрический метод идентификации лизина и глутамин состоит в регистрации тандемного масс-спектра отрицательных ионов. Глутамин, в отличие от лизина, всегда образует характеристический ион типа γ (иногда δ). Более подробно об этих разрывах будет сказано в гл. 4, посвященной возможностям масс-спектрометрии отрицательных ионов для секвенирования пептидов.

Фенилаланин и окисленный метионин. Окисление метионина — типичное явление для метионинсодержащих пептидов, происходящее под воздействием атмосферного кислорода как при работе с растворами пептидов, так и при их хранении [61, 62]:



В отличие от «обычного» метионина с массой аминокислотного остатка 131 Д окисленный имеет массу остатка 147 Д, изобарную широко распространенному в белках фенилаланину. Точные значения масс составляют 147.0354 Д для окисленного метионина и 147.0684 Д для фенилаланина.

Как и в случае Lys/Gln, пара Phe/Met_{ox} легко может быть различена при помощи приборов высокого разрешения. Типичный пример — работа [39], где отнесение Phe/Met_{ox} для пептида с установленным масс-спектрометрически сиквенсом M_{ox}IASHLA-FEKLKLGSKHTM_{ox}L-NH₂ было сделано на приборе ИЦР без каких бы то ни было дополнительных ухищрений (см. табл. 2).

При отсутствии прибора высокого разрешения отнесение Phe/Met_{ox} может быть сделано на основании более детального анализа пиков в масс-спектре. Окисленный метионин, в отличие от фенилаланина, склонен к выбросу молекулы HSOCH₃ (64 Д) из фрагментных ионов. Если такие сателлитные пики наблюдаются для фрагментных ионов, содержащих аминокислотный остаток с массой 147 Д, это означает наличие окисленного метионина, в противном случае — это фенилаланин [33] (рис. 8).

На рис. 8 все ионы *b*-серии содержат окисленный метионин, соответственно, для всех *b*-ионов потеря 64 Д будет характерной (на рис. 8 обозначены три из них).

3.2. Изомерные аминокислоты: лейцин и изолейцин

В отличие от проблемы дифференциации Lys/Gln, которую всегда можно решить (например, дериватизацией), распознавание лейцина и изолейцина масс-спектрометрически провести значительно труднее и не всегда удается.

Одним из первых методов дифференциации Leu/Ile стал подход, основанный на анализе интенсивностей пиков в MS³-эксперименте с фрагментным ионом с *m/z* 86, который является иммониевым ионом как лейцина, так и изолейцина [63, 64]. Используя ББА, было установлено, что если пептид содержит *один* остаток лейцина, то интенсивность пиков с *m/z* 43 и 44 в MS³-спектре велика, тогда как пики более тяжелых продуктов фрагментации имеют низкую интенсивность. Напротив, если пептид содержит *один* остаток изолейцина, более интенсивными оказываются пики более тяжелых ионов (*m/z* 56 и 69), а интенсивность пиков ионов с *m/z* 43 и 44 ниже. Изменяя относительную интенсивность пиков в спектре фрагментации иммониевого иона с *m/z* 86, можно с большой достоверностью идентифицировать Leu/Ile. Аналогичные спектры характерны и для MS³-процесса в случае электрораспыления [65].

Однако, если пептид содержит и лейцин, и изолейцин, данная техника не может быть использована: в таких пептидах пик с *m/z* 86 представляет собой сумму изомерных иммониевых ионов обеих аминокислот. В этом случае MS³-спектр представляет собой суперпозицию спектров индивидуальных аминокислот, и анализ относительных интенсивностей пиков не имеет смысла.

Во избежание этого было предложено использовать предварительную обработку анализируемого пептида термолизом, ферментом, который избирательно гидролизует пептидные связи, предшествующие Leu/Ile [64]. Но, как и любой другой энзим, термолизин не обеспечивает количественный и из-

бирательный гидролиз, что приводит к образованию пептидов, содержащих два и более «сомнительных» остатка Leu/Ile.

На сегодняшний день наиболее рациональный подход базируется на возможности регистрации *d*- и *w*-ионов в спектрах полипептидов. Эти два типа ионов возникают при разрывах в боковых цепях аминокислот. Для лейцина и изолейцина отрываются изопропильный и этильный радикалы соответственно, что и обуславливает различие в массах *d*- и *w*-ионов.

Механизмы образования *d*- и *w*-ионов можно продемонстрировать схемой 9:

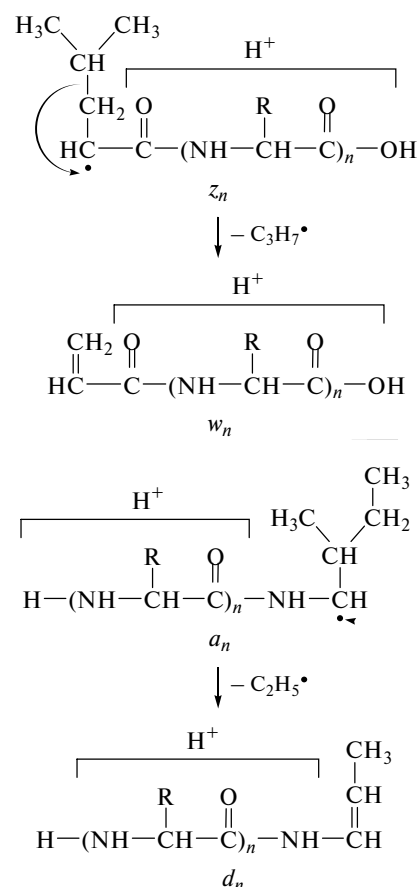


Схема 9. Образование *d*- и *w*-ионов.

Из схемы 9 видно, что массы *d*- и *w*-ионов ионов для лейцина (потеря 43 Д) и изолейцина (потеря 29 Д) будут различны. Ионы *d* и *w* образуются из *a*- и *z*-ионов соответственно. Хотя ионы *a*- и *z*-серий не характерны для ДАС, они могут возникать в процессе активации соударением за счет статистической возможности произвольного разрыва полипептидной цепи. Образование ионов *d* и *w* именно из катион-радикалов, а не из четноэлектронных катионов, убедительно подтверждено в работе [66].

Образованию *d*- и *w*-ионов способствует повышенная энергия столкновений, однако данные ионы часто регистрируются как минорные пики и при низкоэнергетических соударениях. Иногда с целью повысить выход *d*- и *w*-ионов при ионизации электрораспылением используют повышение напряжения на капилляре [67].

Авторами работы [58] данный подход был успешно применен для идентификации Leu/Ile (L/I) в двух

Таблица 3. Установление последовательностей пептидов с идентификацией Ile/Leu методом МАЛДИ-РПИ [26].

Вид осы	Сиквенс выделенного нового пептида*
<i>Anoplius samariensis</i>	GLLKRIKTLL-NH ₂
<i>Anterhynchium flavomarginatum micado</i>	INLLKIAKGI/LI/LKSI/L-NH ₂
<i>Eumenes rubronatatus</i>	I/LNLKGIFKKVASI/LI/LT-OH

*K/Q идентифицированы при ацилировании.

пептидах яда осы *Agelaia pallipes pallipes*: I/LLGTIL-GLLKGI/L-NH₂, MW 1207.8 Д и I/LNWLKLGK-AIPDAI/L-NH₂, MW 1565.0 Д. В полученном ДАС-спектре пептида с молекулярной массой 1207.8 Д наблюдались *w*-ионы, соответствующие разрывам лейцина в позициях 2, 6, 8, 9 и изолейцина в позиции 5. Аналогично были проведены соотнесения Leu/Ile для второго пептида. Концевые Leu/Ile определить не удалось.

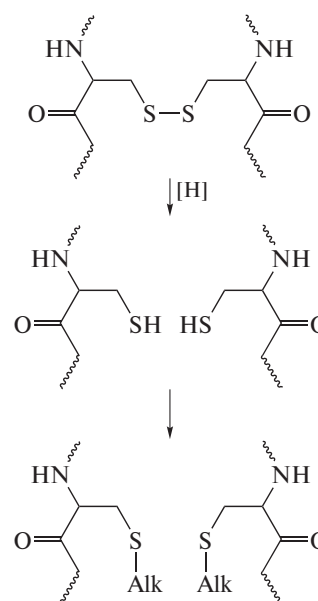
Похожим образом авторы [64] установили сиквенсы двух пептидов яда осы *Polybia paulista*. Структура первого — I/LNWI/LK/QI/LGK/QMVI/LDAI/L-NH₂, 1612 Д — была установлена с помощью QTOF. Ацилирование пептида позволило различить Lys и Gln, а регистрация пиков ионов *d*₄, *d*₆ и *d*₁₁ — соотнести Ile/Leu как Leu₄, Leu₆ и Ile₁₁, получив сиквенс I/LNWLKLGK MVIDAI/L-NH₂. Аналогично, первоначально определенный с помощью QTOF сиквенс второго пептида I/LDWI/LK/QI/LGK/QMVM DVI/L-NH₂, 1658 Д после ацилирования и регистрации ионов *d*₄ и *d*₆ был уточнен до I/LDW-LKLGK MVM DVI/L-NH₂.

Проблема дифференциации Leu/Ile в сиквенсах пептидов из яда еще трех видов ос была частично решена методом МАЛДИ-РПИ [26]. В спектрах присутствовали как *d*-, так и *w*-ионы (табл. 3).

Значительных успехов удалось добиться в различении Leu/Ile методом ДЭЗ при использовании высокоэнергетических электронов (hot ECD, HECD). Эта технология основана на захвате молекулами полипептида высокоэнергетического (~11 эВ) электрона, тогда как в обычном ДЭЗ эта величина не превышает 1 эВ. Идентификация проводится при детектировании *w*-ионов, которые образуются из *z*-ионов, являющихся наиболее значимыми фрагментами в условиях ДЭЗ (см. схему 2). Детектирование *w*-ионов при HECD позволяет в ~80 % случаев проводить успешное соотнесение I/L [68].

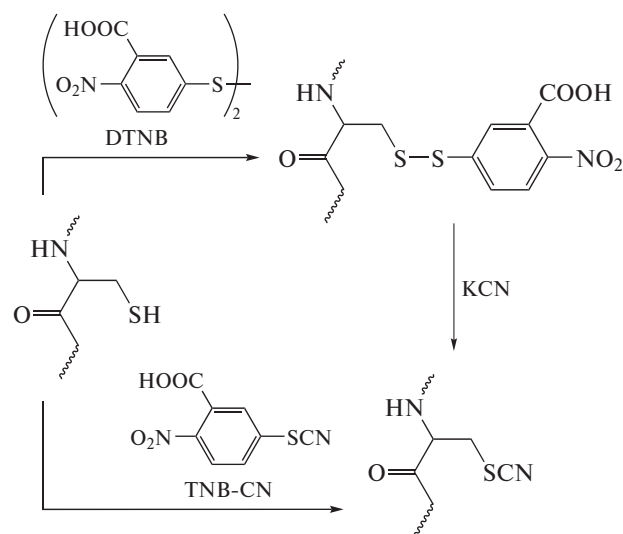
3.3. Пептиды, содержащие дисульфидную связь

Химические методы. Наиболее распространенным методом химического разрушения дисульфидной связи является ее восстановление с образованием свободных тиольных групп цистеинов. Для того, чтобы предотвратить возможное окисление с повторным образованием дисульфидной связи, обычно используют алкилирование цистеина по тиольной группе:

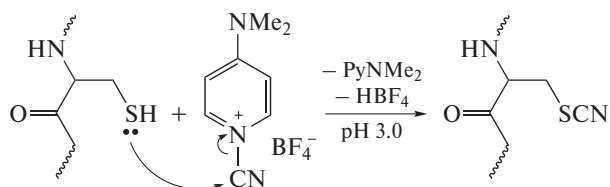


Существуют самые разнообразные методы как восстановления, так и алкилирования. Выбор конкретной методики может быть обусловлен, например, буфером, в котором у исследователя находится исследуемый образец, или набором доступных реагентов и оборудования. Многие из восстанавливающих реагентов используются в связке с конкретными алкилирующими реагентами (например, оба процесса протекают при одинаковом pH, что не требует смены буферов или доведения pH до требуемого значения). Основные методы восстановления дисульфидных связей и алкилирования цистеина приведены в табл. 4 и 5 соответственно.

Еще одним изящным методом предотвращения повторного образования дисульфидной связи после предварительного восстановления является предложенное авторами работы [90] превращение тиольной группы в тиоцианатную с использованием 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (DTNB) или 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислоты (TNB-CN):



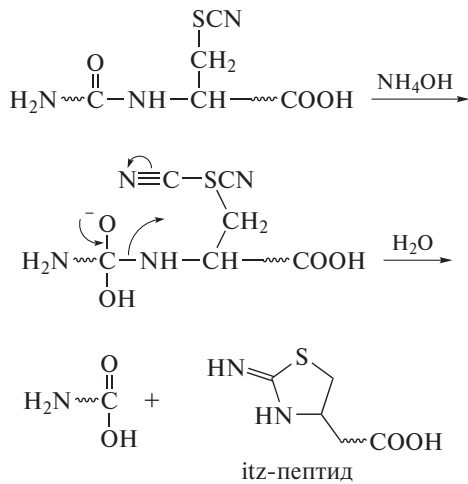
Данные методики оказались не очень удобными в препаративном отношении, поэтому авторами работы [91] было предложено использовать тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP):



Если затем обработать тиоцианатное производное раствором аммиака, происходит расщепление пептидной связи с N-конца модифицированного цистеина. При этом образуется пептид с терминальной аминогруппой исходного соединения и пептид, модифицированный по N-концу (2-иминотиазолидин-4-карбоксы — (itz-пептид)):

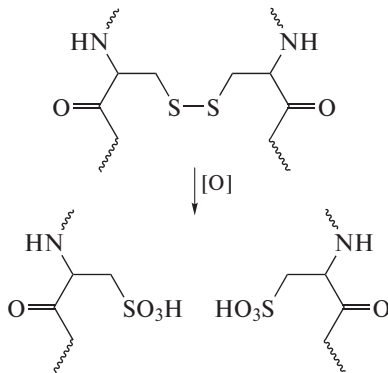
Таблица 4. Методики восстановления дисульфидной связи в полипептидах.

Реагент/реакция	Условия	Примечания	Лит.
<i>Тиолы. Общая схема реакции:</i>			
Дитиотриitol (DTT) 	0.25 М Трис-НСl, 1.25 мМ ЭДТА, рН 8.5, 37 °С, 2 ч, 10-кратный избыток DTT, N ₂	Описано в применении к пептидам	[69]
	Трис-НСl 100 мМ; 2 мМ ЭДТА; гуанидин гидрохлорид 6 М; рН 8.0, 10-кратный избыток DTT, N ₂	Используется для восстановления в белках	[70, 71]
	0.4 М водный раствор DTT добавляют в соотношении 1:20 к анализируемому раствору в 0.2 М водном растворе 4-метилморфолина (рН 8.9), N ₂	Описано в применении к пептидам	[72]
	30 мин при 56 °С в водном растворе 50–100 мМ NH ₄ HCO ₃ (рН ~8). Конечная концентрация DTT — 10 мМ	Универсальная процедура для пептидов и белков	[73–75]
Образец с рН 7.5 смешивается с 50 мМ водным раствором DTT на мишени МАЛДИ, через 2 мин добавляется раствор матрицы	Вариация метода для быстрого МАЛДИ-анализа	[76]	
Дитиозитритол (DTE), смесь с DTT 	рН 8.4 (NH ₄ HCO ₃ + NH ₃ ·H ₂ O), 40 °С, 1 ч, 5-кратный молярный избыток смеси DTT/DTE (3:1, масс.)	Описано для белка	[77]
2-Меркаптоэтанол (2-МЕ) 	Конечная концентрация 2-МЕ 0.3%. Восстановление в фосфатном буфере (рН 7.4) при 21 °С, 30 мин	В основном используется для белков	[78]
	20 мМ L-гистидиновый буфер (рН 6.0)/ 10 мМ 2-МЕ, 37 °С, 15–45 мин	То же	[79, 80]
<i>Фосфины. Общая схема реакции:</i>			
$R_3P + R'-S-S-R'' + H_2O \rightarrow R_2P=O + R'-SH + R''-SH$			
Трибутилфосфин (Bu ₃ P)	1%-ный раствор трибутилфосфина в изопропанол добавляют в соотношении 1:7 (по объему) к образцу в 0.2 М NH ₄ HCO ₃		[81]
Трис(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР) 	30 мМ ТСЕР в 25 мМ водном NH ₄ OAc, рН 4.5, добавляют в соотношении 1:30 к анализируемому раствору в 100 мМ NH ₄ OAc при 60 °С (1–2 мин)	Частичное восстановление дисульфидных связей пептида	[82]
	25 мМ водный раствор ТСЕР добавляют в соотношении 1:1 к анализируемому раствору в 3 М NaOAc/8 М гуанидин гидрохлорид (рН 4.6) при 37 °С (10 мин)	Частичное восстановление дисульфидных связей белков	[83]
	Восстановление 30 минут при 45 °С в растворе 1%-ной уксусной кислоты, конечная концентрация ТСЕР — 6 мМ	То же	[84]



Такая модификация дисульфидной связи позволяет неэнзиматически расщеплять пептиды строго по цистеину. Это полезно как для секвенирования пептидов, так и для установления локализации дисульфида в молекуле [92].

Дисульфидную связь также можно разрушить надмуравьиной кислотой [93]:

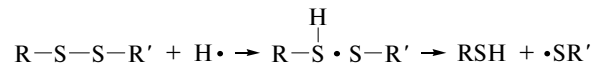


Однако окисление надмуравьиной кислотой одновременно приводит также к частичному окисле-

нию ряда других аминокислот (Трп, Тир, Мет), а также формилированию лизина [93]. Достоинством окисления надмуравьиной кислотой является улучшение фрагментации окисленных по цистеинам пептидов в условиях РПИ и ДАС. В результате в спектре наблюдается очень интенсивная у-серия [94].

Методы масс-спектрометрии. Для разрушения дисульфидной связи в пептидах могут применяться высокоэнергетические разрывы при ДАС [95], РПИ [96] и ДЭЗ [97]. Например, использование МАЛДИ-РПИ позволило авторам [96] получить одновременно разрывы пептидных и дисульфидной связей трехцепочечного пептида (рис. 9).

Аналогично, при использовании ДЭЗ [97] происходит разрыв дисульфидной связи:



К сожалению, этими методами можно получить информацию о структуре полипептидной цепи только в случае соединения дисульфидной связью отдельных цепей. Если же дисульфидная связь замыкает цикл в полипептидной цепи, разрывы внутри этого цикла крайне невразумительны [41, 97].

Значимых результатов удалось добиться при использовании следующего подхода к активации фрагментации дисульфидсодержащих пептидов. Было установлено [98], что при использовании лазерного излучения (фторный ультрафиолетовый лазер с рабочей длиной волны $\lambda = 157$ нм) для стимулирования фрагментации происходит преимущественный разрыв S-S-связи. Если пептид представляет собой две и более полипептидных цепи, результирующий спектр содержит практически только ионы отдельных цепей исходного полипептида. Детальный анализ мультиплетов ионов-продуктов позволил авторам работы [98] предположить следующий механизм разрыва:

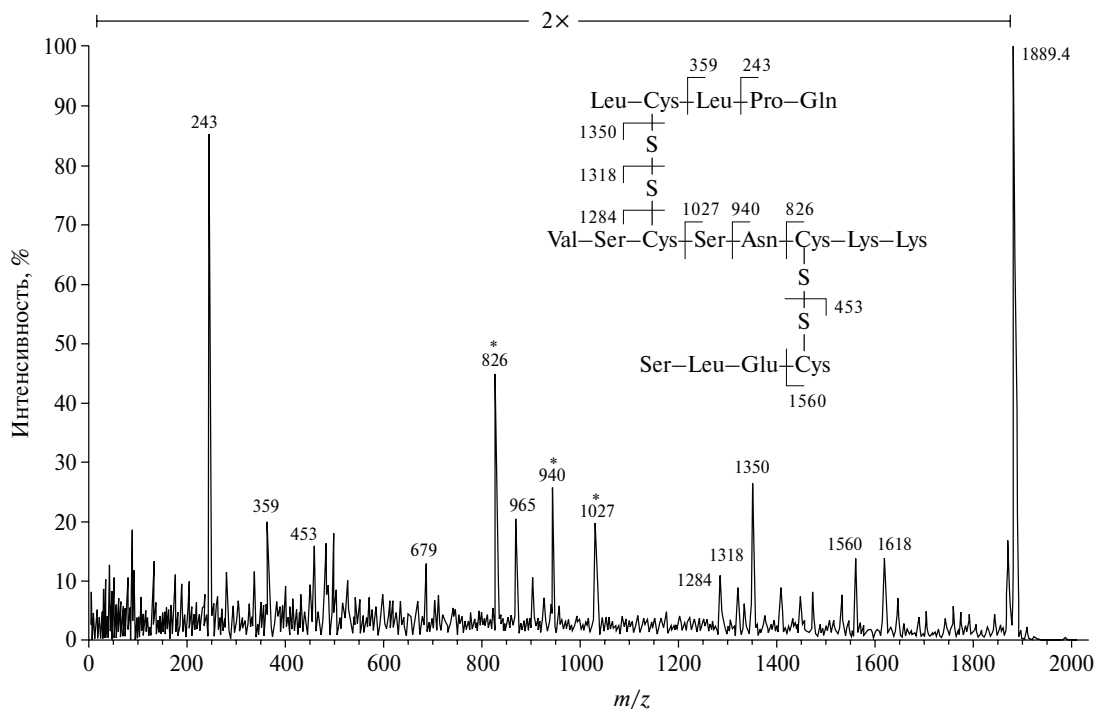
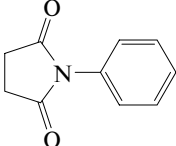
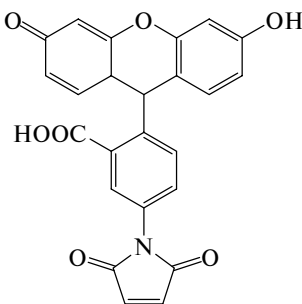
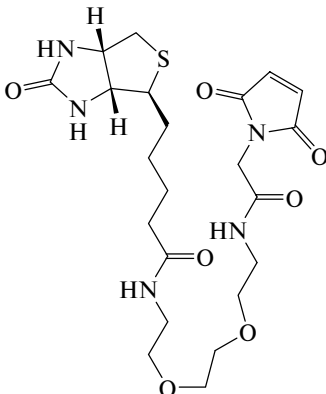
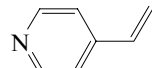
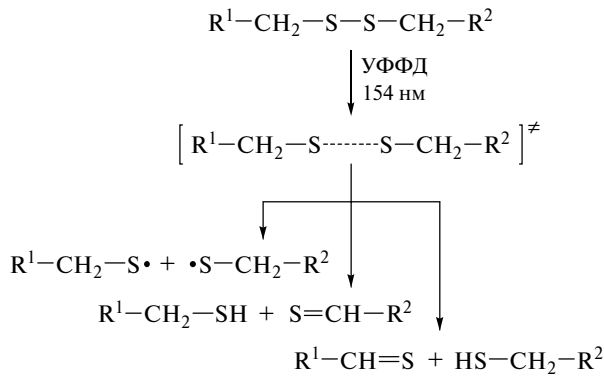


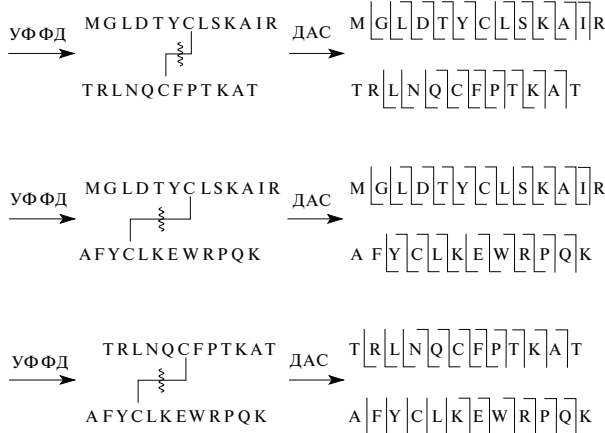
Рис. 9. Разрывы дисульфидной связи при РПИ. Воспроизведено из работы [96] с разрешения Американского химического общества (ACS).

Таблица 5. Методики алкилирования тиольной группы цистеина в восстановленных полипептидах.

Реагент/реакция	Условия	Примечания	Лит.
Замещение в производных иодуксусной кислоты. Общая схема реакции:			
$\text{R-SH} + \text{I-CH}_2\text{-C(=O)-X} \xrightarrow[\text{S}_{\text{N}}2]{-\text{HI}} \text{R-S-CH}_2\text{-C(=O)-X}$			
Иодацетамид (IAM) (X = NH ₂)	1 ч при 25 °С, pH 8, в темноте, N ₂ , 10-кратный избыток IAM	Для любых полипептидов	[69, 70]
	1 ч при 56 °С, в темноте, раствор 100 мМ NH ₄ HCO ₃ (pH ~8). Конечная концентрация IAM — 10мМ	То же	[74]
	30 мин при 20 °С, темнота, раствор 50 мМ NH ₄ HCO ₃ (pH 8). Конечная концентрация IAM — 10 мМ	Описано для белков	[73, 75]
Иодуксусная кислота (X = OH)	То же	Для любых полипептидов	[85]
Присоединение по кратным связям. Общая схема реакции:			
$\text{R'-SH} + \text{C=C} \longrightarrow \text{R-S-C-C}$			
N-Фенилмалеинимид (NPM) 	pH 4.5 (100 мМ NH ₄ OAc) + 5–50-кратный избыток NPM в виде 100 мМ раствора в изопропанол	Для любых полипептидов	[72]
N-Этилмалеинимид (NEM)	То же, буфер pH 4.6	То же	[71, 73]
N-Флуоресцеинилмалеинимид (FM) 	20 мМ FM (раствор в ДМСО) в 20-кратном избытке добавляется при pH 6.0. Реакция протекает при 25 °С за 1 ч	Реагент может применяться для УФ-детектирования Cys-содержащего пептида в ВЭЖХ	[73]
N-Биотинилмалеинимид (М-биотин) 	Буфер pH 4.6. 2–5-кратный избыток реагента в виде спиртового раствора	Для любых полипептидов	[71]
Акриламид H ₂ C=CH-CO-NH ₂	Буфер 40 мМ Трис-НСl /200 мМ акриламид (избыток 10:1 (Cys)) или <i>in situ</i> при геле-электрофорезе	Описано для белков	[86, 87]
4-Винилпиридин (4-VP) 	Буфер pH 7.5, обработка равным объемом свеже- перегнанного 4-VP в течение 1.5–2 ч при 25 °С	Для любых полипептидов	[88]
	Буфер pH 7.5, обработка 0.1-кратным объемом све- жеперегнанного 4-VP в течение 20 мин при 40–45 °С	Описано для пептидов	[89]



Предположительно, параллельно протекают все три процесса, включающие как гомолитический разрыв дисульфидной связи, так и диспропорционирование.



Данные распады авторы наблюдали при использовании ионной ловушки в качестве анализатора. Удерживая образующиеся при фрагментации в условиях УФФД ионы-продукты, можно инициировать их дальнейшую фрагментацию методом ДАС, в результате чего появляются стандартные серии *b*- и *y*-ионов для каждой из полипептидных цепей исходного дисульфида. Покрытие сиквенса в этом случае близко к 100 %.

Таким образом, комбинируя УФФД и ДАС, можно определять последовательности в *недериватизованных* дисульфидсодержащих пептидах.

Более того, метод УФФД дает прекрасные результаты и при работе с пептидами, в которых дисульфидная связь замыкает цикл в одной и той же полипептидной цепи. В этом случае стандартный эксперимент УФФД в режиме МС/МС приводит как к разрыву S-S-связи, так и к диссоциации внутри полипептидной цепи. Как уже отмечалось в гл. 2, для УФФД характеристическими являются разрывы с образованием серий *a*- и *x*-ионов. Пример такого спектра циклического дисульфида приведен на рис. 10.

Как следует из рис. 10, при использовании ДАС спектр весьма малоинформативен, тогда как УФФД-спектр легко интерпретируем и дает стопроцентное покрытие сиквенса пептида.

Авторы работы [99] предложили оригинальный метод для осуществления разрывов C-S- и S-S-связей дисульфидсодержащих пептидов. Перед съемкой масс-спектра пептида анализируемый раствор смешивается с солью или комплексом переходного металла. Образующиеся между катионом металла и ди-

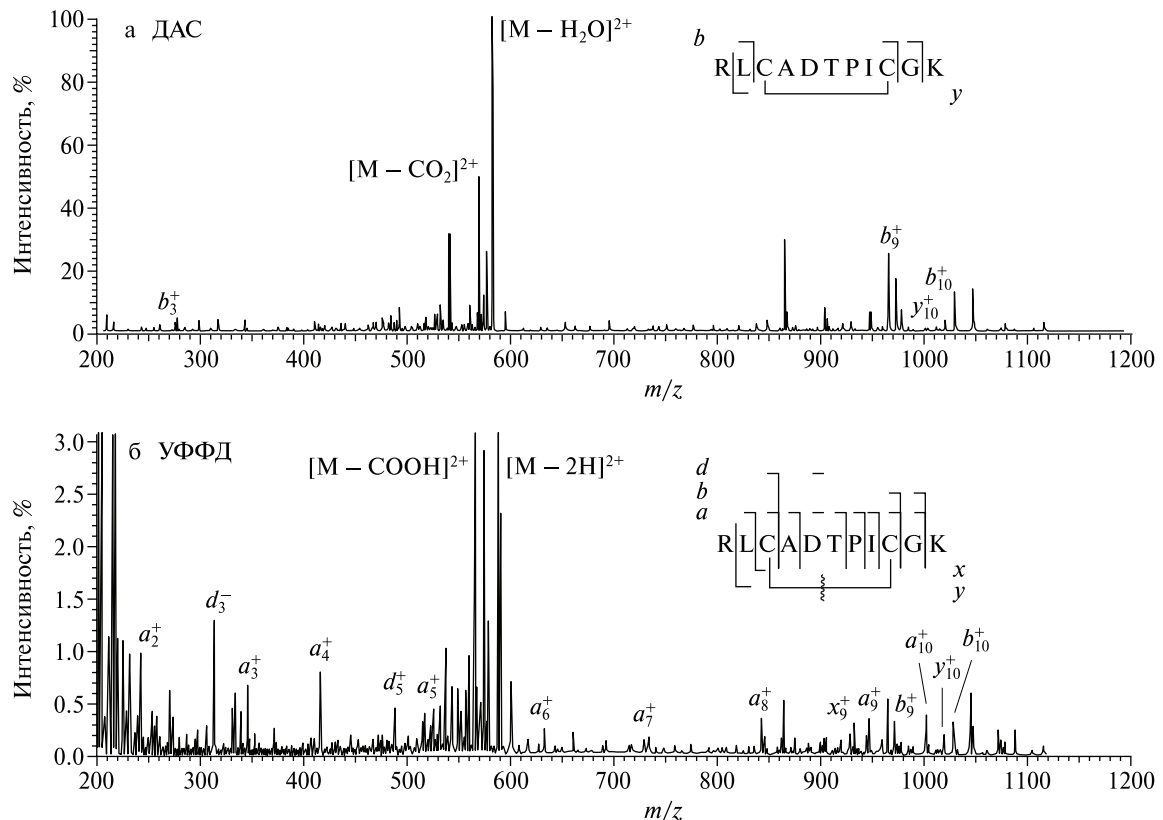


Рис. 10. МС/МС дисульфидсодержащего пептида RLCADTPICGK в режимах ДАС (а) и УФФД (б). Воспроизведено из работы [98] с разрешения издательства Wiley.

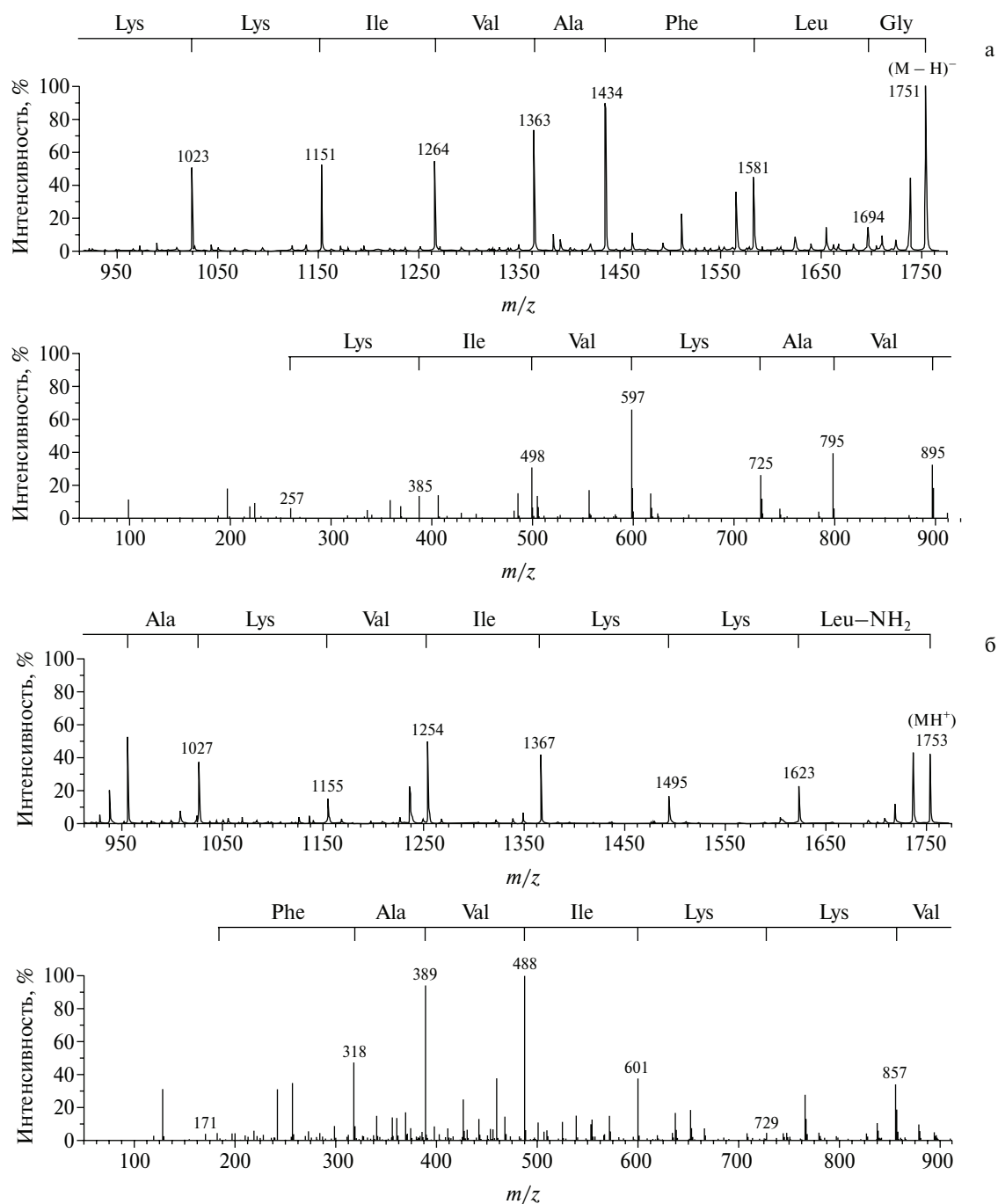


Рис. 11. ДАС спектр депротонированного (а) и протонированного (б) пептида GLFAVIKKVAKVIKKL-NH₂. Воспроизведено из работы [101] с разрешения издательства Wiley.

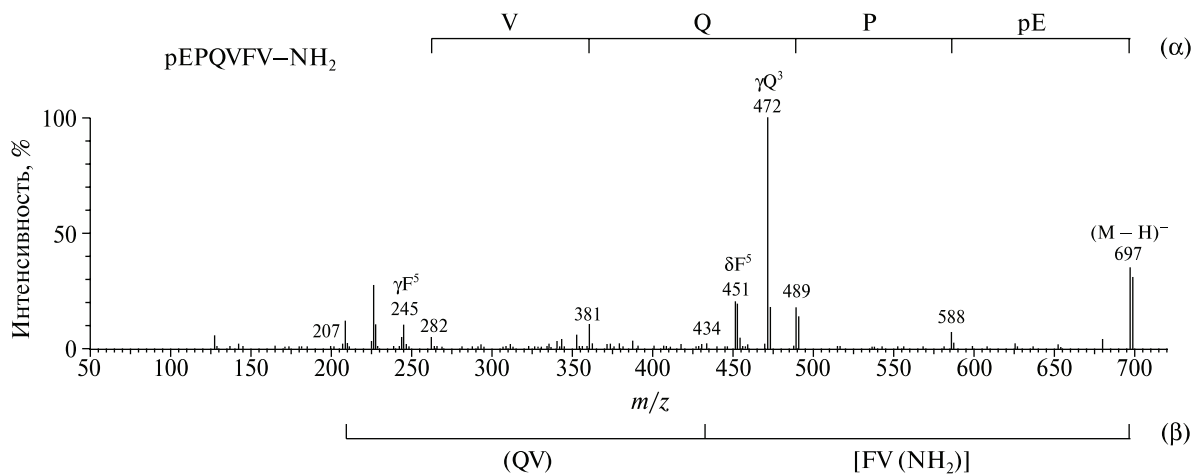


Рис. 12. Дифференциация Lys/Gln при использовании отрицательных ионов.

сульфидной связью пептида аддукты обладают специфической фрагментацией, зависящей от катиона металла. Наиболее впечатляющие результаты получены с комплексом одновалентного золота $\text{AuP}(\text{Me})_3^+$, инициировавшим селективный разрыв S–S-связи.

Значимых результатов удалось добиться в секвенировании пептидов, содержащих дисульфидные связи, при использовании масс-спектрометрии отрицательных ионов. Описанию этого метода посвящена гл. 4.

4. Использование масс-спектрометрии отрицательных ионов для секвенирования пептидов

Данный метод основан на регистрации тандемных масс-спектров депротонированных молекул пептидов $[\text{M} - \text{H}]^-$ чаще всего в режиме ДАС. Самым главным отличием масс-спектров отрицательных ионов от спектров положительных является наличие характерных разрывов в боковых цепях некоторых аминокислот. Полный список этих разрывов приведен в работе [100]: важными из них являются отщепления CH_2O (серин), MeCHO (треонин), H_2S (цистеин), H_2O (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) и NH_3 (аспарагин и глутамин) из ионов $[\text{M} - \text{H}]^-$.

Разрывы полипептидной цепи депротонированных молекул происходят по механизму, включающему образование енолят-ионов (схема 10). Последние образуются непосредственно при депротонировании пептида или в результате переноса протона к концевой COO^- (CONH^-)-группе [100].

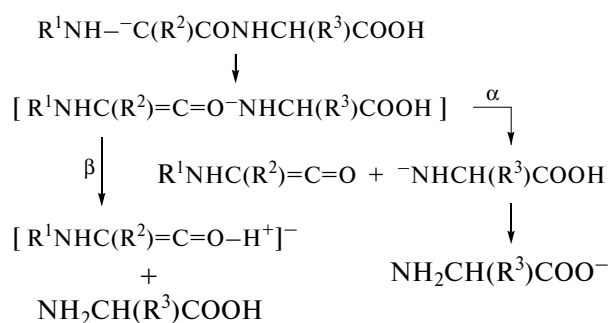


Схема 10. Основные разрывы депротонированных полипептидов.

Разрыв C–N-связи в образующемся анионе с зарядом, локализованным на атоме углерода, ведет к ион-нейтральному комплексу. При его дальнейшей фрагментации возникают ионы α - и β -типов, с сохранением отрицательного заряда на C- и N-конце пептида соответственно. Поскольку разрывается пептидная связь, ионы α - и β -типов аналогичны наблюдаемым при разрыве протонированных пептидов ионам y и b соответственно.

В большинстве случаев по спектрам отрицательных ионов установить сиквенс пептида очень сложно. Спектры положительных ионов, зарегистрированные для тех же пептидов, оказываются значительно более информативными, хотя иногда масс-спектры депротонированных пептидов оказываются не менее богатыми (рис. 11, [101]).

Еще один тип фрагментации, характерный для спектров отрицательных ионов, — разрывы с участи-

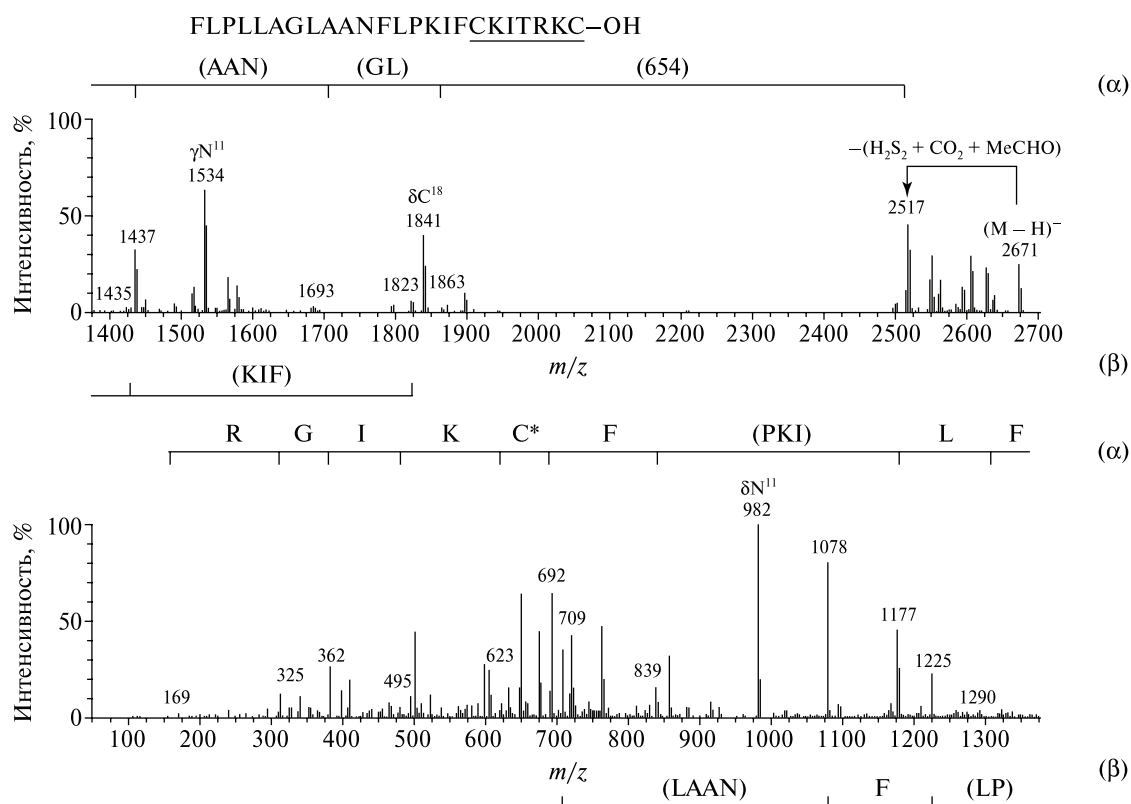


Рис. 13. Установление сиквенса внутри дисульфидного цикла пептида $\text{FLPLLAGLAANFLPKIFCKITRKC-OH}$ в режиме отрицательных ионов. MS/MS спектр воспроизведен из работы [102] с разрешения издательства Wiley.

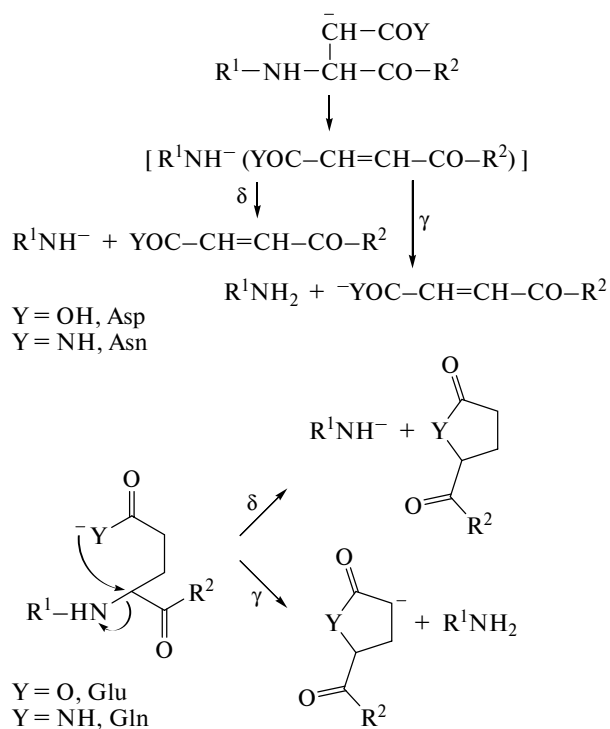


Схема 11. Механизм γ - и δ -разрывов депротонированных пептидов, содержащих Asp/Asn/Glu/Gln.

ем боковых цепей некоторых аминокислот, как правило, стабилизирующих отрицательный заряд. Это прежде всего аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu), аспарагин (Asn) и глутамин (Gln). Для этих аминокислот разрыв боковой цепи наблюдается всегда. Механизм разрыва [57] представлен на схеме 11.

При разрывах такого типа образуются ионы γ и δ , аналогичные z - и c -ионам, характерным для фрагментации протонированного полипептида. Присутствие γQ -иона в спектре депротонированного пептида позволяет очень легко различать изобарные Lys/Gln, поскольку лизин не образует γ -иона, а глутамин — образует его всегда [100]. Эти ионы, как правило, одни из самых интенсивных в спектре. Например, в спектре на рис. 12 наблюдается интенсивный пик γQ^3 -иона, что исключает наличие лизина в позиции 3.

Аналогично треонин (Thr), серин (Ser) и цистеин (Cys) всегда дают γ -разрыв, но по иному механизму [100, 102] (схема 12).

При наличии в пептидах фенилаланина и тирозина в их спектрах отрицательных ионов также образуются характеристические γ - и δ -ионы (рис. 12 — δF^5) по механизму, аналогичному для Asp/Asn.

Еще одной особенностью фрагментации отрицательных ионов пептидов, содержащих терминальный дисульфидный цикл, является процесс, представленный на схеме 13.

Образовавшийся отрицательный ион далее может распадаться обычным путем с образованием серий α - и β -ионов, позволяя установить сиквенс внутри дисульфидного цикла (рис. 13, [102]).

Рис. 13 наглядно демонстрирует сложность интерпретации масс-спектров депротонированных пеп-

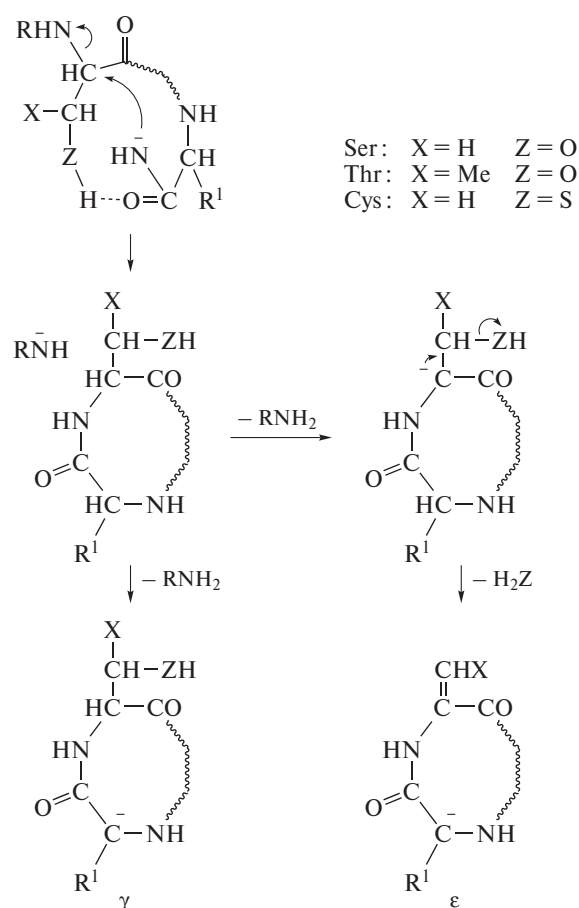


Схема 12. Механизм γ - и ϵ -разрывов депротонированных пептидов, содержащих Ser/Thr/Cys.

тидов, в том числе и для получения сиквенса внутри дисульфидного цикла.

Недавно был предложен еще один способ активации разрывов полипептидной цепи депротонированных пептидов [103]. В отличие от ДАС данный метод является аналогом ДЭЗ в режиме отрицательных ионов и называется диссоциацией при отрыве электрона — ДОЭ (EDD — electron detachment dissociation, см. схему 2).

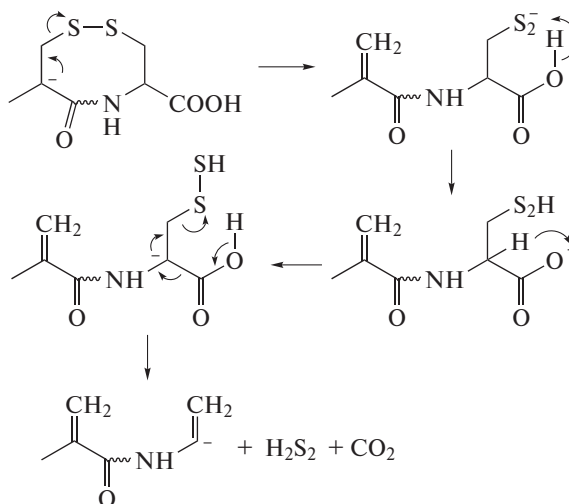


Схема 13. Элиминирование дисульфидной связи в циклических пептидах в режиме отрицательных ионов.

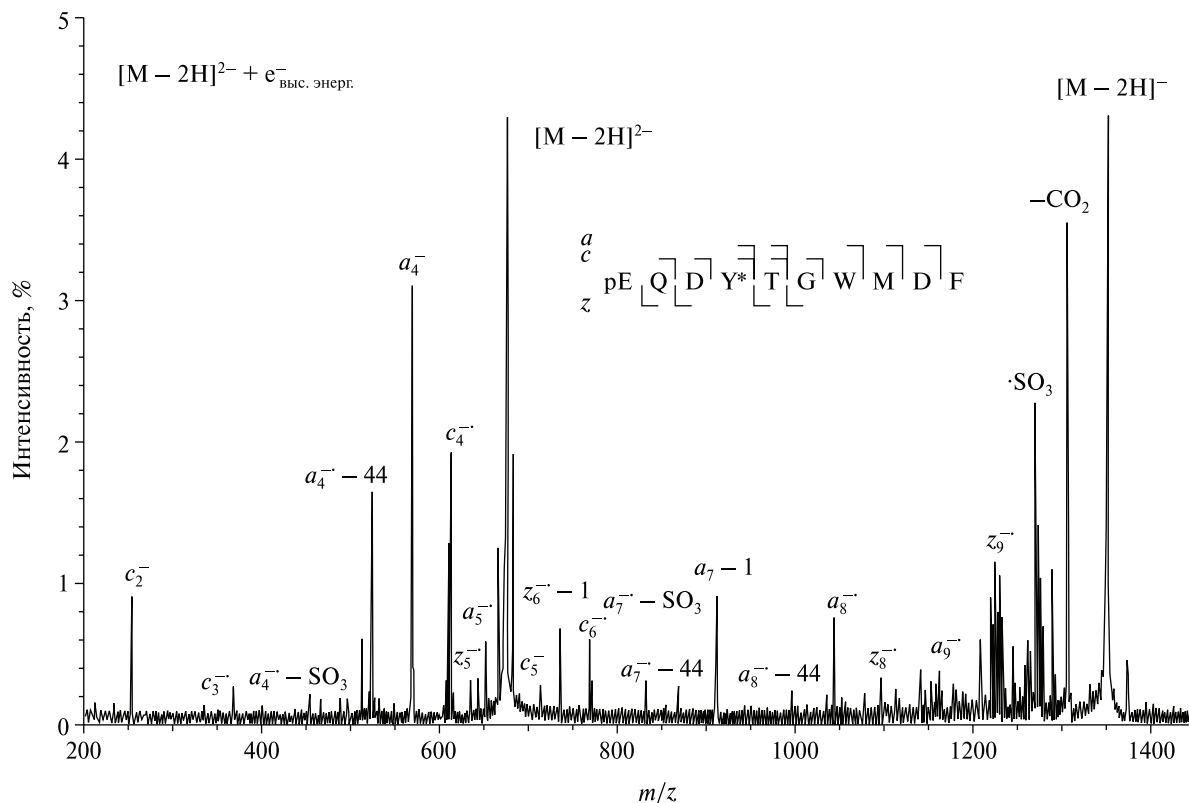
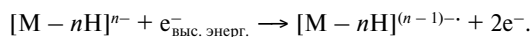


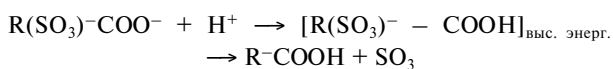
Рис. 14. ДОЭ (EDD)-спектр дианиона пептида pEQDY(SO₃)TGWMDF-NH₂. Воспроизведено из работы [103] с разрешения издательства Wiley.

Механизм активации фрагментации аналогичен классической электронной ионизации:

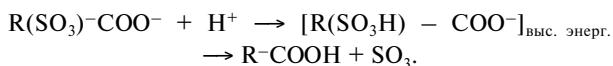


Метод может быть применен для многозарядных ионов, что требует наличия как минимум одного аминокислотного остатка кислотной природы (D, E, Y(SO₃)). Возможности ДОЭ были протестированы авторами [103] только на синтетических пептидах. В частности, был получен спектр МС/МС двухзарядного иона пептида pEQDY(SO₃)TGWMDF-NH₂ в режиме отрицательных ионов (рис. 14).

Основными направлениями фрагментации являются разрывы полипептидной цепи, соответствующие образованию ионов *a*- и *c*-серии (см. схему 3). Кроме того, молекулярный ион склонен к потерям простых нейтральных молекул, в первую очередь CO₂ и SO₃. Механизмы элиминирования этих нейтральных частиц приведены ниже:



или



На данный момент спектры ДОЭ получены только для нескольких синтетических пептидов. Однако хорошее качество получаемых спектров и высокий

потенциал метода при работе с пептидами, обладающими кислотными свойствами, делают этот метод весьма перспективным для дальнейшего использования [37].

Выводы

Самые разнообразные методы масс-спектрометрии активно используются в протеомных исследованиях. Современная масс-спектрометрия способна быстро, надежно и эффективно устанавливать последовательность аминокислотных звеньев в цепи полипептидов. На сегодняшний день она по многим параметрам предпочтительна по сравнению с классическими биохимическими методами секвенирования. Тем не менее во многих случаях химическая дериватизация или энзиматическое расщепление могут принести значимую пользу при установлении первичной аминокислотной последовательности масс-спектрометрическими методами.

Приложение 1

Список используемых сокращений

- БА — бомбардировка быстрыми атомами
- ВП (TOF) — время-пролетный анализатор (time-of-flight)
- ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ДАС (CAD) — диссоциация, активированная соударением (collisionally activated dissociation)

- кДНК — комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДОЭ (EDD) — диссоциация при отрыве электрона (electron detachment dissociation)
- ДПЭ (ETD) — диссоциация при переносе электрона (electron transfer dissociation)
- ДЭЗ (ECD) — диссоциация при электронном захвате (electron capture dissociation)
- ИКМФД (IRMPD) — инфракрасная мультифотонная диссоциация (infrared multiphoton dissociation)
- ИЦР — ионный циклотронный резонанс
- МАЛДИ (MALDI) — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (matrix-assisted laser desorption/ionisation)
- МС — масс-спектрометрия
- МС/МС — tandemный масс-спектр
- мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота
- РПИ (PSD) — распад после источника (post-source decay)
- ТСХ — тонкослойная хроматография
- УФФД (UVPD) — ультрафиолетовая фотодиссоциация (ultraviolet photodissociation)
- ФТГ — фенилтиогидантоиновый
- АРМ — аминопептидаза М
- ВЕТА — (2-бромэтил)триметиламмоний бромид
- BIRD — blackbody radiative infrared dissociation (диссоциация, активированная ИК-излучением абсолютно черного тела)
- СДАР — тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния
- СРР — карбоксипептидаза Р
- СРУ — карбоксипептидаза У
- ДТЕ — дитиоэритритол
- DTNB — 5,5'- дитиобис(2-нитробензойная кислота)
- ДТТ — дитиотритол
- FM — N-флуоресцеинилмалеинимид
- HECD — hot electron capture dissociation (диссоциация при захвате высокоэнергетического электрона)
- IAM — иодацетамид
- 2-ME — 2-меркаптоэтанол
- NEM — N-этилмалеинимид
- NPM — N-фенилмалеинимид
- QLT — quadrupole-linear trap (квадрупольная линейная ловушка)
- QTOF — quadrupole – time-of-flight (квадрупольный–время-пролетный tandemный масс-спектрометр)
- ТСЕР — трис(2-карбоксиэтил)фосфин
- TNB-CN — 2-нитро-5-тиоцианобензойная кислота
- 4-VP — 4-винилпиридин
- itz — иминотиазолидин

Приложение 2

Обозначения аминокислот

Название	Символ	Название	Символ
Аланин	Ala (A)	Лизин	Lys (K)
Аргинин	Arg (R)	Метионин	Met (M)
Аспарагин	Asn (N)	Пироглутаминовая к-та	(pE)
Аспарагиновая к-та	Asp (D)	Пролин	Pro (P)
Валин	Val (V)	Серин	Ser (S)
Гистидин	His (H)	Серин фосфат	(pS)
Глицин	Gly (G)	Тирозин	Tyr (Y)
Глутамин	Gln (Q)	Треонин	Thr (T)
Глутаминовая к-та	Glu (E)	Триптофан	Trp (W)
Изолейцин	Ile (I)	Фенилаланин	Phe (F)
Лейцин	Leu (L)	Цистеин	Cys (C)

Список литературы

1. J.R. Yates, «Mass spectrometry and the age of the proteome», *J. Mass Spectrom.* **33**, 1–19 (1998).
2. J. Peng, S.P. Gygi, «Proteomics: the move to mixtures», *J. Mass Spectrom.* **36**, 1083–1091 (2001).
3. M.J. Polce, D. Ren, C. Wesdemiotis, «Dissociation of the peptide bond in protonated peptides», *J. Mass Spectrom.* **35**, 1391–1398 (2000).
4. V.H. Wysocki, G. Tsaprailis, L.L. Smith, L.S. Breci, «Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation», *J. Mass Spectrom.* **35**, 1399–1406 (2000).
5. F. Sanger, «The free amino acid groups of insulin», *Biochem. J.* **39**, 507–515 (1945).
6. P. Edman, «A method for the determination of the amino acid sequence in peptides», *Arch. Biochem.* **22**, 475–476 (1949).
7. P. Edman, «Method for determination of the amino acid sequence in peptides», *Acta Chem. Scand.* **4**, 283–293 (1950).
8. В.П. Комов, В.Н. Шведова, *Биохимия*, Дрофа, Москва, 2004.
9. P. Edman, G. Begg, «A protein sequenator», *Eur. J. Biochem.* **1**, 80–91 (1967).
10. А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова, *Молекулярная биология*, Академия, Москва, 2003.
11. D. Vanhoye, F. Bruston, P. Nicolas, M. Amiche, «Antimicrobial peptides from hyliid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain», *Eur. J. Biochem.* **270**, 2068–2081 (2003).
12. T. Chen, C. Scott, L. Tang, M. Zhou, C. Shawa, «The structural organization of aurein precursor cDNAs from the skin secretion of the Australian green and golden bell frog, *Litoria aurea*», *Regulatory Peptides* **128**, 75–83 (2005).
13. C.V. Bradley, D.H. Williams, M.R. Hanley, «Peptide sequencing using the combination of Edman degradation, carboxypeptidase digestion and fast atom bombardment mass spectrometry», *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 1223 (1982).
14. D.F. Hunt, A.M. Buko, J.M. Ballard, J. Shabanowitz, A.B. Giordani, «Sequence analysis of polypeptides by collision

- activated dissociation on a triple quadrupole mass spectrometer», *Biomed. Mass Spectrom.* **8**, 397 (1981).
15. А.Т. Лебедев, *Масс-спектрометрия в органической химии*, БИНОМ, Москва, 2003.
 16. M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A.N. Tyler, «Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): A new ion source for mass spectrometry», *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 325–327 (1981).
 17. M. Yamashita, J.B. Fenn, «Electrospray ion source: another variation on the free-jet theme», *J. Phys. Chem.* **88**, 4451–4459 (1984).
 18. M. Yamashita, J.B. Fenn, «Negative ion production with the electrospray ion source», *J. Phys. Chem.* **88**, 4671–4675 (1984).
 19. M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, «Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds», *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **78**, 53–68 (1987).
 20. P.E. Andren, M.R. Emmett, R.M. Caprioli, «Microelectrospray: zeptomole/attomole per microliter sensitivity for peptides», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 867–869 (1994).
 21. M. Wilm, M. Mann, «Analytical properties of the nano-electrospray ion source», *Anal. Chem.* **68**, 1–8 (1996).
 22. М.Л. Александров, Л.Н. Галль, Н.В. Краснов, В.И. Николаев, В.А. Павленко, В.А. Шкуров, Г.И. Барам, М.А. Грачев, В.Д. Кнорре, Ю.С. Куснер, «Прямая стыковка микроколонного жидкостного хроматографа с масс-спектрометром», *Биоорганическая химия* **10**, 710–712 (1984).
 23. D.N. Nguyen, G.W. Becker, R.M. Riggan, «Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology», *J. Chromatogr. A* **705**, 21–45 (1995).
 24. B. Thiede, B. Wittmann-Liebold, M. Bienert, E. Krause, «MALDI-MS for C-terminal sequence determination of peptides and proteins degraded by carboxypeptidase Y and P», *FEBS Lett.* **357**, 65–69 (1995).
 25. A.S. Woods, A.Y. Huang, R.J. Cotter, G.R. Pasternack, D.M. Pardoll, E.M. Jaffee, «Simplified high-sensitivity sequencing of a major histocompatibility complex class I-associated immunoreactive peptide using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry», *Anal. Biochem.* **226**, 15–25 (1995).
 26. M. Hisada, K. Konno, Y. Itagaki, H. Naoki, T. Nakajima, «Advantages of using nested collision induced dissociation/post-source decay with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: sequencing of novel peptides from wasp venom», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1828–1834 (2000).
 27. P. Roepstorff, «MALDI-TOF mass spectrometry in protein chemistry. Proteomics in Functional Genomics: Protein Structure Analysis (Eds. P. Jollès, H. Jörnvall), Birkhäuser, Basel 81–97 (2000).
 28. V. Bonetto, A.C. Bergman, H. Jörnvall, R. Sillard, «C-Terminal Sequence Analysis of Peptides and Proteins Using Carboxypeptidases and Mass Spectrometry after Derivatization of Lys and Cys Residues», *Anal. Chem.* **69**, 1315–1319 (1997).
 29. H.A. Itano, E.A. Robinson, «4-Thialaminine, a strongly basic chemical modification of cysteine», *J. Biol. Chem.* **247**, 4819–4824 (1972).
 30. A.P. Jonsson, «Mass spectrometry for protein and peptide characterisation», *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 868–884 (2001).
 31. F.W. McLafferty, D.M. Horn, K. Breuker, Y. Ge, M.A. Lewis, B. Cerda, R.A. Zubarev, B.K. Carpenter, «Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by FTICR», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 245–249 (2001).
 32. R.A. Zubarev, «Electron capture dissociation of peptides», in *Mass spectrometry and hyphenated techniques in neuro-peptide research* (Eds. J. Silberring, R. Ekman), John Wiley & Sons, New York, 2002.
 33. M. Kinter, E. Sherman, *Protein Sequencing and identification using tandem mass spectrometry*, John Wiley & Sons, New York, 2000.
 34. T. Chen, F. David, D.F. Orr, A.J. Bjourson, S. McClean, M. O'Rourke, D.G. Hirst, P. Rao, C. Shaw, «Novel bradykinins and their precursor cDNAs from European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*) skin», *Eur. J. Biochem.* **269**, 4693–4700 (2002).
 35. L. Sleno, D.A. Volmer, «Ion activation methods for tandem mass spectrometry», *J. Mass Spectrom.* **39**, 1091–1112 (2004).
 36. R.A. Zubarev, N.L. Kelleher, F.W. McLafferty, «Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A non-ergodic process», *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3265–3266 (1998).
 37. R.A. Zubarev, «Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase», *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 57–77 (2003).
 38. J.E.P. Syka, J.J. Coon, M.J. Schroeder, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, «Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry», *PNAS (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)* **101**, 9528–9533 (2004).
 39. B.A. Budnik, J.V. Olsen, T.A. Egorov, V.E. Anisimova, T.G. Galkina, A.K. Musolyamov, E.V. Grishin, R.A. Zubarev, «De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*», *J. Mass Spectrom.* **39**, 193–201 (2004).
 40. S.A. Trauger, W. Webb, G. Siuzdak, «Peptide and protein analysis with mass spectrometry», *Spectroscopy* **16**, 15–28 (2002).
 41. S. Jespersen, P. Chaurand, F.J.C. van Strien, B. Spengler, J. van der Greef, «Direct Sequencing of Neuropeptides in Biological Tissue by MALDI-PSD Mass Spectrometry», *Anal. Chem.* **71**, 660–666 (1999).
 42. B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, «Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**, 198–202 (1991).
 43. B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, E. Jaeger, «Peptide sequencing by matrix assisted laser desorption mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6**, 105–108 (1992).
 44. B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, «Fundamental aspects of postsource decay in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. I. Residual gas effect», *J. Phys. Chem.* **96**, 9678–9684 (1992).
 45. C.R. Jimenez, A. ter Maat, A. Pieneman, A.L. Burlingame, A.B. Smit, K.W. Li, «Spatio-temporal dynamics of the egg-laying-inducing peptides during an egg-laying cycle: a semiquantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry approach», *J. Neurochem.* **89**, 865–875 (2004).
 46. S. Sudaralal, G. Singaravavelan, P. Ramasamy, K. Ananda, S.P. Sarma, S.K. Sikdar, K.S. Krishnan, P. Balaram, «A novel

- 13 residue acyclic peptide from the marine snail, *Conus monile*, targets potassium channels», *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 682–688 (2004).
47. <http://www.bdal.com/modux3/modux3.php?pid=125,001,000,01,01,023,001,0&rid=120,001,000,01,01,023,001,0&extend=37&extend2=&type=&application=&technology=&year=&search=mt-70#37>
48. M.S. Thompson, W. Cui, J.P. Reilly, «Fragmentation of singly charged peptide ions by photodissociation at $\lambda = 157$ nm», *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **43**, 4791–4794 (2004).
49. S.A. Raspopov, A. El-Faramawy, B.A. Thomson, K.W.M. Siu, «Infrared Multiphoton Dissociation in Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: Top-Down Characterization of Proteins», *Anal. Chem.* **78**, 4572–4577 (2006).
50. W. Li, C.L. Hendrickson, M.R. Emmett, A.G. Marshall, «Identification of intact proteins in mixtures by alternated capillary liquid chromatography electrospray ionization and LC ESI infrared multiphoton dissociation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry», *Anal. Chem.* **71**, 4397–4402 (1999).
51. K. Håkansson, M.J. Chalmers, J.P. Quinn, M.A. McFarland, C.L. Hendrickson, A.G. Marshall, «Combined electron capture and infrared multiphoton dissociation for multistage MS/MS in an FT-ICR mass spectrometer», *Anal. Chem.* **75**, 3256–3262 (2003).
52. W.D. Price, P.D. Schnier, E.R. Williams, «Tandem mass spectrometry of large biomolecule ions by blackbody infrared radiative dissociation», *Anal. Chem.* **68**, 859–866 (1996).
53. J.S. Klassen, P.D. Schnier, E.R. Williams, «Blackbody infrared radiative dissociation of oligonucleotide anions», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 1117–1124 (1998).
54. P.A. Chrisman, S.J. Pitteri, J.M. Hogan, S.A. McLuckey, « SO_2^- electron transfer ion/ion reactions with disulfide linked polypeptide ions», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1020–1030 (2005).
55. M.A. Apponyi, T.L. Pukala, C.S. Brinkworth, V.M. Maselli, J.H. Bowie, M.J. Tyler, G.W. Booker, J.C. Wallace, J.A. Carver, F. Separovic, J. Doyle, L.E. Llewellyn, «Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance», *Peptides* **25**, 1035–1054 (2004).
56. T. Rozek, J.H. Bowie, J.C. Wallace, M.J. Tyler, «The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. Part 2. Sequence determination using electrospray mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 2002–2011 (2000).
57. C.S. Brinkworth, J.H. Bowie, «Negative ion electrospray mass spectra of the maculatin peptides from the tree frogs *Litoria genimaculata* and *Litoria eucnemis*», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2215–2225 (2003).
58. M.A. Mendes, B.M. de Souza, L.D. dos Santos, M.S. Palma, «Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 636–642 (2004).
59. F.L. Brancia, S.G. Oliver, S.J. Gaskell, «Improved matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of proteins following guanidination of lysine-containing peptides», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 2070–2073 (2000).
60. U. Bahr, M. Karas, R. Kellner, «Differentiation of Lysine/Glutamine in Peptide Sequence Analysis by Electrospray Ionization Sequential Mass Spectrometry Coupled with a Quadrupole Ion Trap», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 1382–1388 (1998).
61. W. Mo, Y. Ma, T. Takao, T.A. Neubert, «Sequencing of oxidized methionine-containing peptides for protein identification», *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 2080–2081 (2000).
62. F.M. Lagerwerf, M. van de Weert, W. Heerma, J. Haverkamp, «Identification of oxidized methionine in peptides», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1905–1910 (1996).
63. I.L. Aubagnac, B. El Amrani, F.M. Devienne, R. Conbarieu, «Characterization of leucine and isoleucine by use of the FAB ionization method in tandem mass spectrometry», *Org. Mass Spectrom.* **20**, 428–429 (1985).
64. T. Nakamura, H. Nagaki, Y. Ohki, T. Kinoshita, «Differentiation of leucine and isoleucine residues in peptides by consecutive reaction mass spectrometry», *Anal. Chem.* **62**, 311–313 (1990).
65. B.L. Milman, «Towards a full reference library of MS^n spectra. Testing of the library containing 3126 MS^2 spectra of 1743 compounds», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 2833–2839 (2005).
66. R.S. Johnson, S.A. Martin, K. Biemann, J.T. Stults, J.T. Watson, «Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine», *Anal. Chem.* **59**, 2621–2625 (1987).
67. B.M. de Souza, M.R. Marques, D.M. Tomazela, M.N. Eberlin, M.A. Mendes, M.S. Palma, «Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 1095–1102 (2004).
68. F. Kjeldsen, K.F. Haselmann, E.S. Sørensen, R.A. Zubarev, «Distinguishing of Ile/Leu Amino Acid Residues in the PP3 Protein by (Hot) Electron Capture Dissociation in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry», *Anal. Chem.* **75**, 1267–1274 (2003).
69. C.V.F. Batista, A. Scaloni, D.J. Rigden, L.R. Silva, A.R. Romero, R. Dukor, A. Sebben, F. Talamo, C. Bloch, «A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*», *FEBS Lett.* **494**, 85–89 (2001).
70. A. Beck, M.-C. Bussat, N. Zorn, V. Robillard, C. Klinguer-Hamour, S. Chenu, L. Goetsch, N. Corva, A. Van Dorsselaer, J.-F. Haeuw, «Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NS0 cells», *J. Chromatogr. B* **819**, 203–218 (2005).
71. T.-Y. Yen, H. Yan, B.A. Macher, «Characterizing closely spaced, complex disulfide bond patterns in peptides and proteins by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry», *J. Mass Spectrom.* **37**, 15–30 (2002).
72. H. John, W.-G., «Forssmann Determination of the disulfide bond pattern of the endogenous and recombinant angiogenesis inhibitor endostatin by mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 1222–1228 (2001).

73. O.V. Krokhin, K. Cheng, S.L. Sousa, W. Ens, K.G. Standing, J.A. Wilkins, «Mass spectrometric based mapping of the disulfide bonding patterns of integrin α -chains», *Biochemistry* **42**, 12950–12959 (2003).
74. H. Matsunaga, Y. Sadakane, J. Haginaka, «Identification of disulfide bonds and site-specific glycosylation in chicken α 1-acid glycoprotein by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry», *Anal. Biochem.* **331**, 358–363 (2004).
75. W.W.H. Wu, J.P. Wong, J. Kast, R.S. Molday, «RS1, a discoidin domain-containing retinal cell adhesion protein associated with x-linked retinoschisis, exists as a novel disulfide-linked octamer», *J. Biol. Chem.* **280**, 10721–10730 (2005).
76. R. Mhatre, J. Woodard, C. Zeng, «Strategies for locating disulfide bonds in a monoclonal antibody *via* mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 2503–2510 (1999).
77. A. Tsarbopoulos, J. Varnerin, S. Cannon-Carlson, D. Wylie, B. Pramanik, J. Tang, T.L. Nagabhushan, «Mass spectrometric mapping of disulfide bonds in recombinant human interleukin-13», *J. Mass Spectrom.* **35**, 446–453 (2000).
78. D.A. Lappi, W. Kapmeyer, J.M. Beglau, N.O. Kaplan, «The disulfide bond connecting the chains of ricin», *PNAS (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)* **75**, 1096–1100 (1978).
79. J. Rho, D.P. Wright, D.L. Christie, K. Clinch, R.H. Furneaux, A.M. Robertson, «A novel mechanism for desulfation of mucin: identification and cloning of a mucin-desulfating glycosidase (sulfoglycosidase) from prevotella strain rs2», *J. Bacteriol.* 1543–1551 (Mar. 2005).
80. J. Messens, G. Hayburn, A. Desmyter, G. Laus, L. Wyns, «The essential catalytic redox couple in arsenate reductase from staphylococcus aureus», *Biochemistry* **38**, 16857–16865 (1999).
81. J.J. Pitt, E. Da Silva, J.J. Gorman, «Determination of the disulfide bond arrangement of newcastle disease virus hemagglutinin neuraminidase», *J. Biol. Chem.* **275**, 6469–6478 (2000).
82. J.-P. Bingham, N.M. Broxton, B.G. Livett, J.G. Down, A. Jone, E.G. Moczydlowski, «Optimizing the connectivity in disulfide-rich peptides: α -conotoxin SII as a case study», *Anal. Biochem.* **338**, 48–61 (2005).
83. E.J. Bures, J.O. Hui, Y. Young, D.T. Chow, V. Katta, M.F. Rohde, L. Zeni, R.D. Rosenfeld, K.L. Stark, M. Haniu, «Determination of disulfide structure in agouti-related protein (agrp) by stepwise reduction and alkylation», *Biochemistry* **37**, 12172–12177 (1998).
84. J.M. Hogan, S.A. McLuckey, «Charge state dependent collision-induced dissociation of native and reduced porcine elastase», *J. Mass Spectrom.* **38**, 245–256 (2003).
85. S. Odani, K. Baba, Y. Tsuchida, Y. Aoyagi, S. Wakui, Y. Takahashi, «Hepatic fatty acid-binding proteins of a teleost, *Lateolabrax japonicus*. The primary structures and location of a disulfide bond», *J. Biochem.* **129**, 69–76 (2001).
86. R. Mineki, H. Taka, T. Fujimura, M. Kikkawa, N. Shindo, K. Murayama, «*In situ* alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis», *Proteomics* **2**, 1672–1681 (2002).
87. D.C. Brune, «Alkylation of cysteine with acrylamide for protein sequence analysis», *Anal. Biochem.* **207**, 285–290 (1992).
88. M. Friedman, L.H. Krull, J.F. Cavins, «The chromatographic determination of cystine and cysteine residues in proteins as s- β -(4-pyridylethyl)cysteine», *J. Biol. Chem.* **245**, 3868–3871 (1970).
89. J.A. Jakubowski, J.V. Sweedler, «Sequencing and Mass Profiling Highly Modified Conotoxins Using Global Reduction/Alkylation Followed by Mass Spectrometry», *Anal. Chem.* **76**, 6541–6547 (2004).
90. G.R. Jacobson, M.H. Schaffer, G.R. Stark, T.C. Vanaman, «Specific chemical cleavage in high yield at the amino peptide bonds of cysteine and cystine residues», *J. Biol. Chem.* **248**, 6583–6591 (1973).
91. J. Wu, J.T. Watson, «A novel methodology for assignment of disulfide bond pairings in proteins», *Prot. Sci.* **6**, 391–398 (1997).
92. Y. Yang, J. Wu, J.T. Watson, «Disulfide mass mapping in proteins containing adjacent cysteines is possible with cyanation/cleavage methodology», *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5834–5835 (1998).
93. J. Dai, Y. Zhang, J. Wang, X. Li, Z. Lu, Y. Cai, X. Qian, «Identification of degradation products formed during performic oxidation of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization and tandem mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 1130–1138 (2005).
94. O. Bulet, C.Y. Yang, S.J. Gaskell, «Influence of cysteine to cysteic acid oxidation on the collision-activated decomposition of protonated peptides — evidence for intraionic interactions», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 337–344 (1992).
95. M.F. Bean, S.A. Carr, «Characterization of disulfide bond position in proteins and sequence analysis of cystine-bridged peptides by tandem mass spectrometry», *Anal. Biochem.* **201**, 216–226 (1992).
96. M.D. Jones, S.D. Patterson, H.S. Lu, «Determination of disulfide bonds in highly bridged disulfide-linked peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with postsource decay», *Anal. Chem.* **70**, 136–143 (1998).
97. R.A. Zubarev, N.A. Kruger, E.K. Fridriksson, M.A. Lewis, D.M. Horn, B.K. Carpenter, F.W. McLafferty, «Electron capture dissociation of gaseous multiply-charged proteins is favored at disulfide bonds and other sites of high hydrogen atom affinity», *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2857–2862 (1999).
98. Y.M.E. Fung, F. Kjeldsen, O.A. Silivra, T.W.D. Chan, R.A. Zubarev, «Facile disulfide bond cleavage in gaseous peptide and protein cations by ultraviolet photodissociation at 157 nm», *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **44**, 6399–6403 (2005).
99. H. Lioe, M. Duan, R.A.J. O'Hair, «Can metal ions be used as gas phase disulfide bond cleavage reagents?», *Proceedings of the 54th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics*, Seattle (USA), 2006, A060790.
100. J.H. Bowie, C.S. Brinkworth, S. Dua, «Collision-induced fragmentations of the (M-H)⁻ parent anions of underivatized peptides: and aid to structure determination and some unusual negative ion cleavages», *Mass Spectrom. Rev.* **21**, 87–107 (2002).

101. C.S. Brinkworth, S. Dua, A.M. McAnoy, J.H. Bowie, «Negative ion fragmentations of deprotonated peptides: backbone cleavages directed through both Asp and Glu», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 1965–1973 (2001).
102. D. Bilusich, V.M. Maselli, C.S. Brinkworth, T. Samguina, A.T. Lebedev, J.H. Bowie, «Direct identification of intramolecular disulfide links in peptides using negative ion electrospray mass spectra of underivatised peptides. A joint experimental and theoretical study», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 3063–3074 (2005).
103. B.A. Budnik, K.F. Haselmann, R.A. Zubarev, «Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon», *Chem. Phys. Lett.* **342**, 299–302 (2001).

Исследование эффективности существующих алгоритмов идентификации пептидов

С.Е. Певцов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет вычислительной математики и кибернетики, Ленинские горы,
119899 Москва, Россия. E-mail: pevtsov@gmail.com

Поступила в редакцию 04.09.2006 г.; после переработки — 21.09.2006 г.

Для идентификации белков по масс-спектрам используются два метода: поиск по базам данных и *de novo* секвенирование. Второй метод позволяет идентифицировать пептиды непосредственно по масс-спектрам. В данной работе исследуется производительность пяти алгоритмов *de novo* секвенирования: AUDENS, Lutefisk, NovoHMM, PepNovo и PEAKS. Предложенный способ оценки производительности алгоритмов основывается на вычислении относительного пептидного расстояния (relative sequence distance, RSD), чувствительности алгоритмов и качества спектров. Показано, что исследуемые алгоритмы более эффективны при идентификации пептидов по спектрам, полученным на QSTAR масс-спектрометре, по сравнению с LCQ. Для QSTAR данных рассмотренные пять алгоритмов можно расположить в порядке убывания эффективности таким образом: PEAKS > Lutefisk, PepNovo > AUDENS, NovoHMM. Эффективность PEAKS, Lutefisk и PepNovo прямо пропорциональна качеству экспериментальных спектров. Однако качество спектров практически не влияет на качество идентификации AUDENS и NovoHMM. По сравнению с остальными четырьмя алгоритмами PEAKS обладает наивысшей чувствительностью и эффективностью. Для LCQ данных алгоритмы расположились по убыванию эффективности в следующем порядке: NovoHMM > PEAKS, PepNovo > Lutefisk > AUDENS. NovoHMM обладает самой высокой чувствительностью и эффективностью, но в целом не намного опережает PEAKS и PepNovo. Качество идентификации пептидов при помощи программы AUDENS неудовлетворительно как при анализе QSTAR данных, так и для LCQ данных.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, идентификация пептидов, качество спектров, *de novo* секвенирование.

Two tandem mass spectrometry methods based on database searching and *de novo* sequencing have been developed for protein identification. The latter method identifies a peptide directly from tandem mass spectra. Among many proposed algorithms, there have been evaluated the performance of five *de novo* sequencing algorithms, AUDENS, Lutefisk, NovoHMM, PepNovo, and PEAKS. The evaluation methods were based on calculation of relative sequence distance (RSD), algorithm sensitivity, and spectrum quality. It was found that *de novo* sequencing algorithms had different performance in analyzing QSTAR data and LCQ mass spectrometer data, but in general performed better in analyzing QSTAR data than the LCQ data. To the QSTAR data, the performance order of the five algorithms was: PEAKS > Lutefisk, PepNovo > AUDENS, NovoHMM. The performance of PEAKS, Lutefisk and PepNovo strongly depended on the spectrum quality and increased with the increase of spectrum quality. However, AUDENS and NovoHMM were not sensitive to the spectrum quality. Compared to other four algorithms, PEAKS had the best sensitivity and the best performance in the entire range of spectrum quality. To the LCQ data, the performance order was: NovoHMM > PepNovo, PEAKS > Lutefisk > AUDENS. NovoHMM had the best sensitivity and its performance was the best in the entire range of spectrum quality. However the overall performance of NovoHMM was not significantly different from the performance of PEAKS and PepNovo. AUDENS did not give a good performance in analyzing QSTAR or LCQ data.

Keywords: mass spectrometry, peptide identification, spectra quality, *de novo* sequencing.

Введение

Идентификация белков является ключевым этапом на пути познания биологических процессов и систем [1]. Существует два подхода к анализу и интерпретации спектров — поиск по базам данных (database searching) и *de novo* секвенирование (*de novo* sequencing). Поиск по базам данных протеинов распространен более широко, чем *de novo* секвенирование. Данный подход заключается в том, что ищется пептид, теоре-

тически рассчитанный спектр которого сравнивается с экспериментальным спектром на предмет их наилучшего совпадения. Для определения степени сходства теоретического и экспериментального спектров используются различные системы оценки результатов (схемы оценивания) [2–10].

Определение аминокислотной последовательности пептида без использования баз данных протеинов называется *de novo* секвенированием. Такой подход необходим при идентификации новых белков,

идентификации белков, подверженных мутациям, белков, содержащих неописанные ранее пост-трансляционные модификации и т.п. Было создано множество алгоритмов *de novo* секвенирования, основанных на различных математических методах. Самым простым с точки зрения реализации алгоритмом является полный перебор всевозможных комбинаций аминокислот, составляющих заданную массу родительского иона [11,12]. Все полученные последовательности-кандидаты затем сравниваются с экспериментальным спектром для обнаружения лучшего совпадения. Однако, благодаря погрешностям измерения родительской массы, основным недостатком данного подхода является экспоненциальный рост числа возможных комбинаций при возрастании массы пептида. Тем не менее, с развитием масс-спектрометрии точность измерения масс увеличилась, и комбинаторное секвенирование на настоящий момент является многообещающим. Например, для массы пептида 1347 Д и для точности измерения массы лучше ± 1 ppm существует только около 100 последовательностей-кандидатов [13].

Другой подход основан на первоначальном рассмотрении только небольших частей последовательности (тэгов) с последующим добавлением аминокислот с обеих сторон тэга до тех пор, пока не наберется полная масса пептида [14–17]. Недостатком такого способа является возможная потеря хороших последовательностей-кандидатов по причине неполной фрагментации пептида, когда некоторые пики в спектре пропущены.

Основной идеей теоретико-графового подхода является представление спектра в виде «спектрального графа» [18]. Каждому пику спектра ставится в соответствие вершина графа, и между двумя вершинами проводится ребро, если разность масс между соответствующими пиками равна массе одной или нескольких аминокислот. Кроме того, в граф добавляются вершины, соответствующие N- и C-концам. Последовательности-кандидаты образуются при поиске пути от N-конца к C-концу, после чего рассчитываются соответствующие теоретические спектры, и производится сравнение с экспериментальным спектром [8, 19–24]. Таким образом, задача *de novo* секвенирования сводится к задаче нахождения самого длинного пути в направленном ациклическом графе [8, 25, 26].

В работе [27] предложено использовать динамическое программирование для поиска самого длинного асимметричного пути. Динамическое программирование позволяет найти оптимальное решение, которое, однако, в силу нетривиального характера фрагментации пептидов, может не быть правильной последовательностью аминокислот. Тем не менее, в работе [28] предложен алгоритм поиска субоптимальных решений, которые с большой вероятностью содержат последовательность, породившую экспериментальный спектр. Детали предложенного алгоритма можно найти в [29]. Другие алгоритмы, использующие динамическое программирование, с некоторыми изменениями описаны в работах [5, 21, 30].

Скрытые Марковские модели (СММ) также используются для решения задачи идентификации пептидов [31]. Натренированная СММ определяет модель воспроизведения спектров, которая используется для оценки степени схожести теоретического спектра полученной последовательности-кандидата и экспериментального спектра. Более того, помимо предсказания хороших последовательностей СММ позволяет определить достоверность таких предсказаний. Данный алгоритм был реализован в программе *de novo* секвенирования NovoHMM. Кроме того, байесовский подход используется в программном обеспечении MassSeq компании Micromass, в котором последовательности-кандидаты генерируются случайным образом [32].

Линейный алгоритм секвенирования, сочетающий в себе высокую эффективность и скорость работы, предложен в работе [33]. Этот алгоритм не основан на теоретико-графовом подходе, но идеологически близок к алгоритму, предложенному в [34]. В дополнение к описанным здесь алгоритмам следует заметить, что несколько работ по идентификации пептидов по масс-спектру используют также генетические алгоритмы [35, 36] и искусственные нейронные сети [37]. Кроме того, для повышения качества идентификации используются изотопные метки [38], техника MS/MS/MS [39, 40] и предсказание фрагментации пептидов [41].

Несмотря на то, что было осуществлено множество попыток решения задачи *de novo* секвенирования [5, 18–22, 27, 30, 31, 42–45], адекватных способов оценки качества подобных алгоритмов на настоящее время предложено не было [46]. Хотя сравнение алгоритмов присутствует практически во всех статьях, посвященных разработке программ идентификации пептидов, независимого исследования эффективности алгоритмов проведено не было. В данной работе представлен анализ производительности пяти существующих наиболее распространенных и доступных алгоритмов *de novo* секвенирования: Lutefisk [19, 20], NovoHMM [31], PEAKS [21], PepNovo [42] и AUDENS [30].

Экспериментальная часть

Материалы. Для работы были использованы: сывороточный альбумин (человеческий), лизоцим (куриный), цитохром с (бычий), апотрансферрин (человеческий), рибонуклеаза А (бычья), дитиотреитол (DTT), сыворотка (человеческая), HEPES-буфер, трипсин и N- α -тозил-L-лизин-хлорометилкетон (TLCK), приобретенные в «Sigma Chemical Co.» (St. Louis, MO, USA). Использовалась колонка «Agilent Zorbax SB-C18» (5 мкм 150×0.5 мм) обращенно-фазовой хроматографии. LC/MS анализ был проведен на капиллярной ВЭЖХ системе «Agilent 1100 series» и гибридном «PE Sciex QSTAR™» LC/MS/MS квадрупольном время-пролетном масс-спектрометре.

Протеолиз. К растворам белков в 50 мМ HEPES-буфере (pH 8.0) добавляли мочевины и дитиотреитол до концентрации 6 М и 10 мМ соответственно. Ко-

нечная концентрация белков была 1 мг моль⁻¹. После инкубации в течение 1 ч при температуре 65 °С белковые образцы разводили в 6 раз 50 мМ HEPES-буфера (рН 8.0) с добавлением 10 мМ CaCl₂ и инкубировали в присутствии высокоочищенного трипсина (2%) в течение не менее 8 ч при температуре 37 °С. Протеолитическую реакцию останавливали добавлением ингибитора TLCK в отношении трипсин:TLCK — 1:1.

LC/MS анализ. Пептиды разделяли на колонке «Agilent Zorbax SB-C18» (5 мкм 150×0.5 мм) обращенно-фазовой хроматографии с использованием капиллярной ВЭЖХ системы «Agilent 1100 series» при 4 мл мин⁻¹. Колонка была уравновешена 0.01 % TFA в деионизированной воде (dI H₂O) с помощью линейного градиента концентрации 95 % CH₃CN в 0.01 % TFA с 0 % до 60 % в течение часа. Разделенные на колонке пептиды подавали на установку QSTAR (Applied Biosystems, Framingham, MA), оборудованную ESI. Масс-спектры получали в режиме регистрации положительно заряженных ионов при скорости сканирования 1 спектр в минуту. Перевар каждого белка анализировали дважды с использованием метода IDA (Information Dependent Acquisition), причем для фрагмента выбирали три иона, представленные в наибольших количествах. В одном IDA эксперименте фрагментацию иона исключали, если он в течение последних 2 мин был фрагментирован. В другом IDA эксперименте фрагментацию не исключали ни для одного иона, независимо от того, был ли он фрагментирован ранее.

Идентификация белков. Каждый спектр был обработан программой SEQUEST для того, чтобы получить аминокислотные последовательности пептидов. Результаты идентификации программой SEQUEST были проанализированы на предмет достоверности, после чего была произведена проверка достоверности на уровне протеинов, что стало возможно благодаря тому, что реальные идентифицируемые протеины были известны. Таким образом, для каждого экспериментального спектра была получена правильная аминокислотная последовательность.

Набор данных Келлера. Помимо набора данных, полученных описанным выше методом, мы использовали данные, созданные Келлером и др. [47]. Для получения этих данных группой Келлера вначале было смешано 18 белков. Полученная смесь затем была разделена на две: А и В. Каждая смесь в концентрации приблизительно 1 мг/мл была обработана трипсином. Затем смеси были подвергнуты анализу mLC-MS на ESI-ITMS (Thermo Finnigan, San Jose, CA) с использованием стандартного информационно-зависимого метода выбора ионов. В итоге 14 раз проводился LC/MS/MS эксперимент со смесью А и 8 раз со смесью В. Далее пептиды были идентифицированы при помощи программы SEQUEST. Описанный набор данных может быть загружен с сайта http://www.systemsbiology.org/extra/protein_mixture.html с разрешения авторов.

Вычисление относительного пептидного расстояния. Сравнение *de novo* последовательности с истинной аминокислотной последовательностью пептида может быть рассмотрено как задача нечеткого поиска строк, когда обе последовательности представляют собой строки, где каждой аминокислоте соответствует буква из 20-буквенного взвешенного алфавита. Таким образом, для измерения степени схожести двух последовательностей аминокислот необходимо определить функцию расстояния между строками.

Одной из наиболее частых ошибок, возникающих в процессе *de novo* секвенирования, является перестановка двух соседних аминокислот. Такая ошибка может возникнуть из-за того, что в спектре отсутствуют пики, свидетельствующие в пользу того или иного порядка следования этих двух аминокислот, что может быть обусловлено неполной фрагментацией или же тем, что масс-спектрометр не детектировал соответствующие ионы. Другая типичная ошибка, возникающая в *de novo* последовательностях, это замена фрагментов эквивалентных масс. Массы могут совпадать точно (например, лейцин L и изолейцин I) или же совпадать в пределах точности измерения масс-спектрометра (например, аргинин K и глютамин Q при точности измерения 0.1 Д). Для того, чтобы правильно учитывать типичные для *de novo* секвенирования замены эквивалентных масс, необходимо расширить понятие расстояния редактирования и определить модифицированное пептидное расстояние. Расширение расстояния редактирования должно учитывать перестановки соседних букв, при этом вклад перестановки в расстояние должен быть нулевым. Более того, такое модифицированное расстояние должно учитывать, что одна или несколько аминокислот могут быть заменены одной или несколькими аминокислотами, если только выполнено условие эквивалентности масс. Более подробное описание относительного пептидного расстояния может быть найдено в [48].

Краткое описание анализируемых программ

PEAKS. Подход, используемый в алгоритме PEAKS [21], отличается от теоретико-графового подхода, в котором делаются попытки найти путь в спектральном графе от N-конца к С-концу, так что отсутствие некоторых пиков затрудняет получение правильной последовательности. В PEAKS для каждого возможного значения массы, независимо от того, есть ли пик в окрестности этой массы, вычисляется величина поощрения или штрафа. Таким образом, последовательность может быть идентифицирована даже при отсутствии некоторых пиков. Кроме того, множество других факторов, таких как интенсивность пиков, ранг пиков, ошибки совпадения масс, существование других типов ионов и т.д., влияет на оценку правильности полученной последовательности и повышает качество идентификации. PEAKS использует модифицированную версию алгоритма *de novo* секвенирования, основанного на динамичес-

ком программировании [49], для получения 10000 последовательностей-кандидатов с лучшим рангом. Помимо всего прочего, в PEAKS реализован алгоритм предварительной обработки спектров. На выходе из этой программы пользователь получает не только полную последовательность с оценкой достоверности, но и оценки достоверности для частичных последовательностей, полученные при помощи новой схемы позиционной оценки. В данной работе использовалась программа PEAKS Online версии 1.1 (доступно по адресу <http://www.bioinformaticssolutions.com/peaksonline>). Были заданы следующие параметры: «Enzyme»: *Trypsin*, «Variable Modifications»: *Carbamidomethylation, Oxidization of Methionine*, «M/Z error tolerance»: *Ion Trap — 0.4(parent) & 0.4(fragment), Q-TOF — 0.1(parent) & 0.1(fragment)*, «Spectrum Merge»: *no*.

Lutefisk. Эта программа основана на использовании теоретико-графового подхода для определения аминокислотной последовательности пептидов по спектрам, полученным столкновительной диссоциацией с низкой энергией, триптических пептидов [19, 20]. Вначале в программе все пики рассматриваются как пики, соответствующие *b*-ионам. Далее ищутся сопутствующие им пики: потери воды, аммиака и т.д. Таким образом, находятся признаки того, что рассматриваемый пик действительно соответствует *b*-иону. Аналогичная процедура проводится для *y*-ионов. После этого программа осуществляет проход по спектру от N-конца, пытаясь составить последовательности аминокислот. Этот процесс начинается с того, что разыскивается *b*-ион, отличающийся от N-конца на массу, равную массе какой-либо аминокислоты. Полные последовательности-кандидаты оцениваются в зависимости от длины цепочек пиков одного типа, по которым происходило восстановление последовательности. Так, последовательности, построенной по непрерывной цепочке пиков одного типа (например, по цепочке N-концевых пиков), в таком случае будет отдано предпочтение. При оценке последовательностей в зависимости от того, как часто меняются типы пиков в цепочках, в большей или меньшей степени учитываются интенсивности этих пиков. Затем лучшие последовательности подвергаются кросс-корреляционному анализу [2, 50, 51]. В итоге две полученные оценки объединяются и нормализуются для получения окончательной оценки и ранжирования последовательностей-кандидатов. В наших исследованиях были использованы параметры по умолчанию LutefiskXP v.1.0.5 (см. <http://sourceforge.net/projects/lutefiskxp>), которые заданы в файлах *Lutefisk.lcq_params* и *Lutefisk.qtof_params*, поставляемых с программой.

PepNovo. Алгоритм PepNovo также основан на представлении спектра в виде спектрального графа со специальным способом определения вершин. Далее при помощи методов динамического программирования в графе ищется наилучший асимметричный путь [42]. Основная часть функции качества в PepNovo заключается в проверке двух гипотез, касающихся

спектра S и массы фрагмента m . Первая гипотеза состоит в том, что m действительно была образована при фрагментации пептида, который породил спектр S . В соответствии с этой гипотезой могут быть описаны правила, по которым происходит фрагментация пептида. В частности, могут быть описаны некоторые комбинации пиков и интенсивностей, появление которых наиболее вероятно. Для определения вероятностей обнаружения набора пиков с определенными интенсивностями при условии, что m действительно получена при фрагментации пептида, породившего спектр S , используется вероятностная сеть, моделирующая правила фрагментации. Для вычисления вероятностей используется тестовый набор данных. Вторая гипотеза состоит в том, что все пики в спектре были получены в результате случайного процесса. Каждой массе m ставится в соответствие величина, равная логарифму отношения правдоподобия этих двух гипотез. Для каждой вершины вычисляются несколько значений, соответствующих различным комбинациям соседних аминокислот. На конечном этапе при оценке полученного пути учитываются значения, рассчитанные для каждой вершины, через которую этот путь проходит. Была использована программа PepNovo версии 1.01 (см. <http://www-cse.ucsd.edu/groups/bioinformatics/software.html#pep novo>). Спектры были обработаны при параметрах, установленных по умолчанию; были учтены возможные модификации аминокислот: «Carbamidomethylation» и «Oxidization of Methionine».

AUDENS. Это новая платформонезависимая программа с открытым кодом, предназначенная для автоматизированного *de novo* секвенирования пептидов по масс-спектрам [30]. В программе используются методы динамического программирования. На начальном этапе спектры обрабатываются при помощи гибкой системы предварительной обработки, состоящей из нескольких фильтров, позволяющих отделить значимые пики от шума. Каждому пику в спектре ставится в соответствие «фактор значимости». Система фильтров использует информацию о правилах фрагментации пептидов при столкновительной диссоциации. При оценке последовательностей-кандидатов, полученных при анализе спектра, складываются все «факторы значимости» пиков, по которым была построена последовательность. В наших исследованиях была использована программа AUDENS v.1. (<http://www.ti.inf.ethz.ch/pw/software/audens>). Параметры, при которых обрабатывались спектры описаны в работах [52, 30].

NovoHMM. Это новая эффективная программа, основанная на статистическом моделировании масс-спектров пептидов [31]. Алгоритм основан на использовании скрытой Марковской модели, позволяющей генерировать масс-спектры при помощи конечного автомата, в котором состояния соответствуют массам. Предложенная скрытая Марковская модель вероятностным способом эмулирует процесс образования

масс в масс-спектре, что позволяет отделять сигнал от шума в сложных спектрах. Модель состоит из двух основных частей. В первой части вычисляются вероятности перехода из одних состояний в другие. Во второй части определяются вероятности, согласно которым образуются пики определенной интенсивности в каждом состоянии. В итоге алгоритм объединяет эти два набора вероятностей. Мы использовали стандартные параметры программы, которую можно скачать по адресу <http://people.inf.ethz.ch/befische/proteomics>. LCQ данные были обработаны с группировкой, QSTAR — без группировки.

Обсуждение результатов

Было получено 10858 спектров на масс-спектрометре QSTAR, только для 1405 из них удалось идентифицировать истинную последовательность. Набор данных Келлера включает в себя 37044 спектров, для 1788 из которых известна правильная последовательность [47]. Все эти масс-спектры, для которых была произведена удачная идентификация пептидов при помощи программы SEQUEST, были обработаны исследуемыми пятью программами *de novo* секвенирования. Затем для каждого спектра из результатов каждой программы была выбрана последовательность с наивысшим рангом, которая в дальнейшем и сравнивалась с заранее известными правильными последовательностями.

Относительное пептидное расстояние как мера эффективности алгоритмов идентификации пептидов. Относительное пептидное расстояние (RSD) между полученной *de novo* последовательностью и последовательностью из базы данных протеинов вычислялось согласно алгоритму, описанному в [48]. При *de novo* секвенировании чаще всего возникают ошибки двух типов: перестановки соседних аминокислот и замена фрагментов последовательности эквивалентных масс. Перестановки соседних аминокислот вносят нулевой вклад при расчете относительного пептидного расстояния по предложенному алгоритму. Что касается ошибок второго типа, т.е. замен фрагментов эквивалентных масс, то мы рассматриваем различные варианты замен с различными максимальными значениями длин заменяемых фрагментов (h) и точностью совпадения масс (θ). Мы рассматриваем три значения h : $h = 0$, $h = 2$ и $h = 4$ при $\theta = 0.3$ Д. Если масса аминокислоты или комбинации аминокислот длины не более h в *de novo* последовательности совпадает в пределах указанной точности с массой аминокислоты или комбинации аминокислот в последовательности из базы данных, то считается, что алгоритм *de novo* секвенирования правильно определил последовательность — при вычислении RSD такая замена дает нулевой вклад в расстояние.

На рис. 1 изображены результаты идентификации пептидов для различных длин допускаемых эквивалентных замен. Все анализируемые алгоритмы показали производительность примерно в два раза лучше на QSTAR данных, чем на LCQ данных. Относитель-

ное расстояние, равное нулю, означает точную идентификацию, когда *de novo* последовательность, полученная алгоритмом, полностью совпадает с последовательностью из базы данных. На рис. 1А видно, что лучше всех с задачей идентификации для QSTAR данных справился PEAKS (49.7%), а для LCQ данных — NovoHMM (18.3%). PEAKS лидировал с большим отрывом на QSTAR данных, показывая большой процент точной идентификации, в то время как для LCQ данных NovoHMM лишь ненамного опередила PEAKS и PepNovo.

Для изучения характерных ошибок алгоритмов идентификации пептидов при подсчете RSD изменялась максимальная длина эквивалентных замен. Увеличение длины допустимых эквивалентных замен приводит к увеличению числа точно идентифицированных последовательностей. На рис. 1б—г изображены результаты идентификации при длине допустимых эквивалентных замен 2, 3 и 4. Интересно, что большинство последовательностей, которые близки к правильным последовательностям из базы данных, отличаются от правильных последовательностей одним или двумя сегментами, которые могут быть заменены комбинациями аминокислот той же массы с точностью θ . Для таких последовательностей значение RSD не превышает 0.3. Увеличение длины допустимых эквивалентных замен привело к увеличению числа идентификаций с RSD = 0, кроме того, результаты Lutefisk и PepNovo стали сравнимы с результатами PEAKS для QSTAR данных. Для LCQ данных NovoHMM имеет большое преимущество перед PEAKS и PepNovo, которые, в свою очередь, показали значительно лучшие результаты, чем AUDENS и Lutefisk.

Общий уровень качества идентификации всех анализируемых программ оказалось не столь высоким, как ожидалось. Для максимальной длины эквивалентных замен для QSTAR $h = 4$ алгоритм PEAKS показал лучший процент точной идентификации 80%, для LCQ лучшим результатом оказался результат NovoHMM — 58%. Остальные идентифицированные последовательности отличаются от правильных слишком сильно. Это указывает на то, что современные программы для идентификации пептидов по масс-спектрам ограничены в своих возможностях, так что для улучшения качества идентификации должен быть произведен поиск последовательности, полученной на выходе их программы, в базе данных протеинов, если это возможно.

Чувствительность и положительная предсказательная ценность как меры оценки эффективности алгоритмов идентификации пептидов. На настоящий момент способности адекватной оценки производительности алгоритмов идентификации пептидов не были предложены [46]. В данной работе предложены две меры оценки производительности алгоритмов — чувствительность S_n и положительная предсказательная ценность PPV [53, 54], которые вычисляются следующим образом:

$$S_n = \frac{TP}{TP + FN}, \quad (1)$$

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP}, \quad (2)$$

где S_n — чувствительность, TP — число истинно положительных identifications, FN — число ложно отрицательных identifications, FP — число ложно положительных identifications, а PPV — положительная предсказательная ценность. Значения TP , FN и FP вычисляются следующим образом:

1) Выбрать экспериментальный спектр, для которого известна правильная последовательность из базы данных, найденная SEQUEST.

2) Построить теоретический спектр, содержащий ионы a , b , c , x , y , и b/y -H₂O/NH₃ в соответствии с правилами фрагментации пептидов.

3) Для каждого пика теоретического спектра найти соответствующий пик в экспериментальном спектре. Если такового пика нет в экспериментальном спектре, удалить этот пик из теоретического спектра. Такая процедура позволит получить список пиков, которые одновременно были предсказаны в теоретическом спектре и присутствовали в экспериментальном. Обозначим этот список пиков как «СПИСОК А».

4) Выбрать последовательность, полученную на выходе из программы идентификации, для этого же экспериментального спектра (эта последовательность совпадает с последовательностью, выбранной в п. 1 только в случае точной идентификации).

5) Построить теоретический спектр для выбранной последовательности (аналогично п. 2). Обозначим этот список пиков как «СПИСОК Б».

6) Если пик присутствует и в СПИСКЕ А, и в СПИСКЕ Б, то

$$TP = TP + 1;$$

если пик присутствует в СПИСКЕ А, но НЕ присутствует в СПИСКЕ Б, то

$$FN = FN + 1;$$

если пик присутствует в СПИСКЕ Б, но НЕ присутствует в СПИСКЕ А, то

$$FP = FP + 1;$$

Значения TP , FN и FP складываются для всех пиков в СПИСКЕ А и СПИСКЕ Б.

7) Повторить данную процедуру для всех экспериментальных спектров.

В соответствии с определением S_n стремится к своему максимальному значению (единице), когда FN стремится к нулю. В этом случае все пики, которые могли бы быть использованы для идентификации пептидов, были использованы программой идентификации. Чем больше полезной информации в виде пиков в спектре было использовано, тем больше значение чувствительности S_n для рассматриваемого алгоритма. Таким образом, чувствительность является адекватной оценкой качества алгоритма идентификации пептидов. Однако, положительная пред-

Таблица 1. Чувствительность и положительная предсказательная ценность для анализируемых алгоритмов; набор данных, полученных на QSTAR масс-спектрометре.

	NovoHMM	AUDENS	PEAKS	Lutefisk	PepNovo
S_n	0.316	0.373	0.8	0.679	0.677
PPV	0.218	0.22	0.575	0.563	0.522

Таблица 2. Чувствительность и положительная предсказательная ценность для анализируемых алгоритмов; набор данных, полученных на LCQ масс-спектрометре.

	NovoHMM	AUDENS	PEAKS	Lutefisk	PepNovo
S_n	0.664	0.312	0.542	0.417	0.523
PPV	0.386	0.193	0.312	0.269	0.356

сказательная ценность PPV зависит от ряда других факторов. Например, FP возрастает, когда пик присутствует в СПИСКЕ Б и отсутствует в СПИСКЕ А, но пик может отсутствовать в СПИСКЕ А из-за плохого качества спектра. В такой ситуации FP возрастает из-за плохого качества спектра, а не из-за плохого качества алгоритма идентификации. Следовательно, чувствительность может быть использована как адекватная мера оценки алгоритмов идентификации пептидов, в то время как положительная предсказательная ценность может быть рассмотрена лишь как дополнительная мера оценки.

Все алгоритмы идентификации используют различные функции качества, но все они основаны на

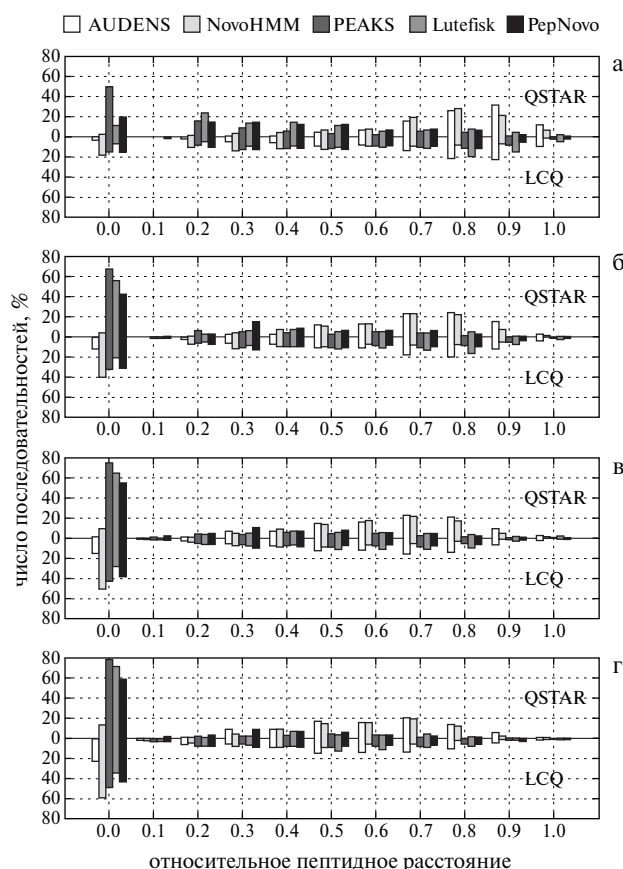


Рис. 1. Процент идентифицированных пептидов для различных длин разрешенных эквивалентных замен для QSTAR данных (вверху) и для LCQ данных (внизу). $h = 0$ (а), точная идентификация $h = 2$ (б), $h = 3$ (в), $h = 4$ (г). Перестановки аминокислот разрешены при $h > 1$.

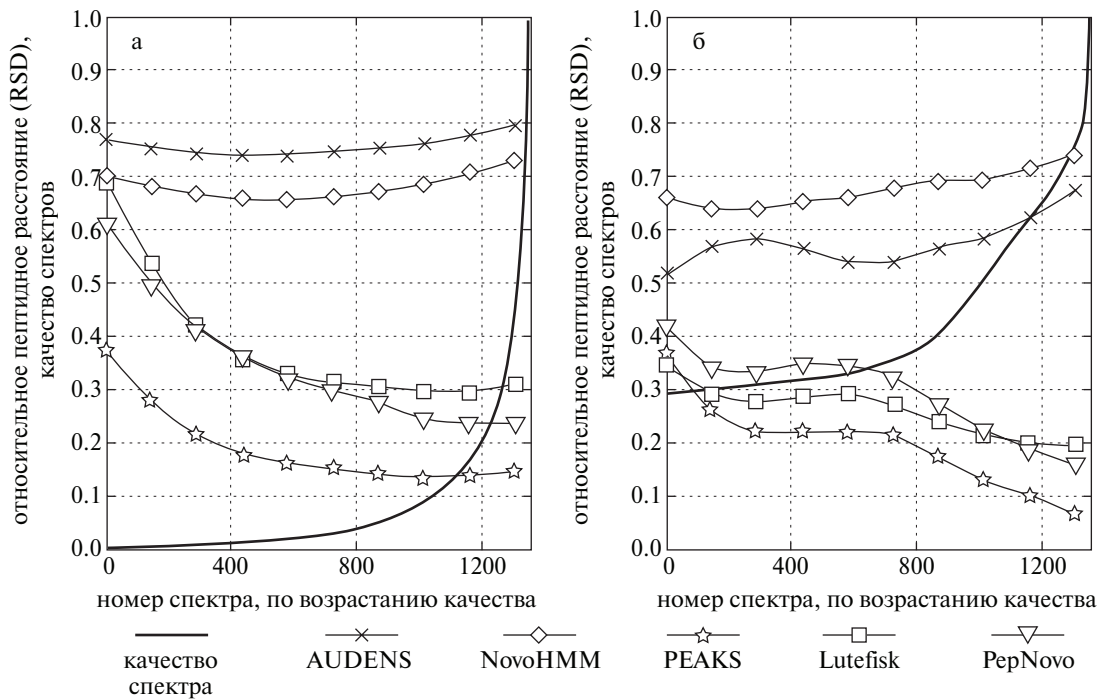


Рис. 2. Зависимость относительного расстояния от спектрального качества для QSTAR данных для рассматриваемых алгоритмов и для различных схем подсчета качества: (а) схема А, (б) схема Б. Для QSTAR данных качество идентификации растет с ростом качества спектров для PEAKS, PepNovo и Lutefisk; относительное расстояние для NovoHMM и AUDENS не зависит от качества спектров.

присутствии или отсутствии пиков в экспериментальном спектре. Различные программы рассматривают различные типы ионов, но при проведении данного исследования были использованы такие типы ионов, вероятность появления которых в спектре очень велика, а именно: a , b , c , x , y , $b/y-H_2O/NH_3$ ионы. Значения S_n и PPV были вычислены для QSTAR и LCQ данных и представлены в табл. 1 и 2.

В табл. 1 видно, что PEAKS превосходит по качеству все остальные программы при анализе QSTAR данных. По качеству идентификации рассматриваемые алгоритмы можно расположить в следующем порядке (по убыванию): PEAKS > Lutefisk, PepNovo > AUDENS, NovoHMM. Следует заметить, что на LCQ данных программы показали другое качество идентификации. Так, NovoHMM показала лучшие результаты: NovoHMM > PEAKS, PepNovo > Lutefisk > AUDENS. Следует отметить, что результаты анализа чувствительности алгоритмов полностью соответствуют результатам вычисления относительного пептидного расстояния RSD (см. рис. 1).

Исследование зависимости качества идентификации пептидов от качества спектров. Качество спектров является одним из многочисленных факторов, влияющих на производительность и эффективность алгоритмов идентификации пептидов. В данной работе рассматриваются две схемы оценки качества экспериментальных спектров. Схема А описана в [21], схема Б описана в [55]. Значения качества спектров были нормализованы, так что все они лежат в отрезке [0, 1]. Качество спектра Y в схеме А определяется как средняя интенсивность сигнала $Y = s/m$, где s — сумма интенсивностей пиков, превышающих заданный порог, а m — полная масса пептида. Пептиды

большой массы, как правило, состоят из большего числа аминокислот, так что обычно образуют в спектре большее число пиков. Считается, что чем больше число фрагментов в спектре, тем больше суммарная интенсивность сигнала. Таким образом, средняя интенсивность сигнала на единицу массы характеризует фрагментацию пептида. Ожидается, что спектры с большим значением средней интенсивности сигнала содержат большее количество необходимой для идентификации информации.

Схема Б использует характеристики пространственного распределения пиков в спектре. Спектральное качество Y вычисляется согласно (3) и (4):

$$Y = \log \left\{ -k_0 + \sum_{i=1}^4 k_i X_i + \sum_{i=1}^4 k'_i X_i^2 \right\}, \quad (3)$$

$$X_1 = \frac{C_2}{C_1}, \quad X_2 = \frac{C_3}{C_1}, \quad X_3 = C_4, \quad X_4 = C_5, \quad (4)$$

где C_1 — число пиков с интенсивностью большей, чем установленный порог; C_2 и C_3 — число пиков с интенсивностями большими 3% ТИС (total ion current) и 2% ТИС соответственно; C_4 и C_5 — среднее расстояние между пиками вдоль оси m/z для пиков, больших 2% ТИС и 1.0–1.5% ТИС, соответственно. Значения k_i и k'_i , $i = 1 \dots 4$ — калибровочные коэффициенты [55].

Для каждого экспериментального спектра вычислялось качество, после чего спектры сортировались в порядке его возрастания. Для изучения общих тенденций зависимости пептидного расстояния от качества спектров, использовался сглаживающий сплайн. Спектры располагались в порядке возрастания качества, а значения пептидных расстояний усреднялись.

На рис. 2 показана зависимость качества идентификации (относительное пептидное расстояние RSD)

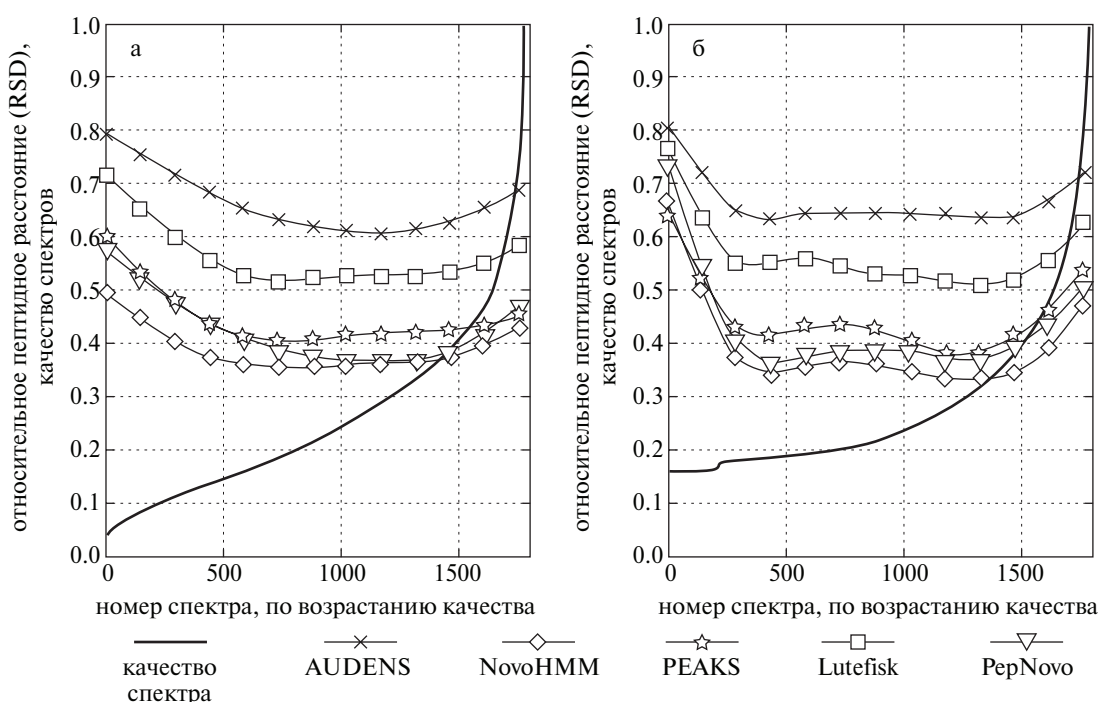


Рис. 3. Зависимость относительного расстояния от спектрального качества для LCQ данных для рассматриваемых алгоритмов и для различных схем подсчета качества: (а) схема А, (б) схема Б. Относительное расстояние уменьшается с ростом качества спектров. Характерные особенности последних 350–400 спектров приводят к небольшому росту относительного расстояния, что показано на правых частях графиков.

от качества спектров для QSTAR данных. Обе схемы расчета качества спектров дали одинаковый результат. Для программ PEAKS, PepNovo и Lutefisk RSD уменьшается с ростом качества спектров, в то время как качество идентификации для NovoHMM и AUDENS не чувствительно к качеству спектров. PEAKS, PepNovo и Lutefisk показывают гораздо лучшие результаты для спектров с высоким качеством.

На рис. 3 показана зависимость качества идентификации (относительное пептидное расстояние RSD) от качества спектров для LCQ данных. Как и для QSTAR данных алгоритмы лучше справляются с задачей идентификации для спектров высокого качества. Однако, все алгоритмы нечувствительны к качеству спектров, когда соответствующее значение лежит в пределах 0.15–0.4. Для LCQ данных NovoHMM является лидером, но результаты PEAKS и PepNovo не многим хуже.

Необходимо заметить, что производительность *de novo* алгоритмов падает, когда качество спектров превышает 0.35. Число спектров с таким качеством составляет 350–400. Ручной анализ этих спектров показал, что в них присутствуют кластеры пиков с аномальными интенсивностями 600–700, в то время как для обычных спектров интенсивности пиков не превышают 200. С другой стороны, общее число пиков в этих спектрах велико, хотя интенсивность основной части пиков не превышает 10. Полученные результаты, представленные на рисунках, зависят от способов оценки качества спектров, особенно для LCQ данных. В обеих схемах А и Б был использован простой порог интенсивности для отбрасывания пиков, считающихся шумом. В таком случае возможны ситуации, когда довольно интенсивные посторонние пики принимаются за пики, соответствующие

каким-то фрагментам пептида. Наличие таких пиков увеличивает качество спектров, однако не способно внести какой-либо положительный вклад в качество идентификации пептида. Наличие таких пиков приводит к тому, что *de novo* алгоритмы выдают неверные последовательности в качестве ответа.

Несколько протеинов было использовано для изучения производительности *de novo* алгоритмов. Несмотря на то, что в базу экспериментальных QSTAR данных была включена сыворотка, были идентифицированы только самые интенсивные протеины. Во всех рассмотренных протеинах практически не было химических модификаций. Ключевым моментом в протеомике является то, что множество белков содержат пост-трансляционные модификации (ПТМ).

Несмотря на то, что все алгоритмы *de novo* секвенирования, рассмотренные в данной работе, показали свою несовершенство при анализе модельных белков, *de novo* секвенирование будет продолжать играть важную роль в анализе спектров новых пептидов, пептидов с различными ПТМ или пептидов, содержащих мутации, поскольку включение в рассмотрение всех ПТМ при поиске в базах данных протеинов приведет к слишком большим вычислительным затратам. Даже если это возможно с точки зрения вычислительных ресурсов, включение в поиск по базам данных всех химических модификаций может привести к слишком высокому уровню ложноположительной идентификации.

Заключение

За последние несколько десятилетий было разработано более 15 алгоритмов идентификации пептидов, но они не были исследованы с позиций оценки ка-

чества идентификации. Была исследована производительность пяти наиболее популярных доступных алгоритмов: AUDENS, Lutefisk, NovoHMM, PEAKS и PepNovo. Для каждого алгоритма вычислялось относительное пептидное расстояние RSD, по которому производились оценки качества идентификации. RSD представляет собой меру схожести между полученной *de novo* последовательностью и правильной последовательностью. Все алгоритмы лучше идентифицируют пептиды по спектрам, полученным на QSTAR, чем на LCQ. PEAKS показал лучшие результаты точной идентификации для QSTAR: 49.7%; в то время как для LCQ лучшим алгоритмом был NovoHMM с 18.3% точной идентификации.

Была предложена универсальная адекватная мера оценки качества *de novo* алгоритмов — чувствительность, — которая не зависит от качества спектров. Алгоритмы PEAKS и NovoHMM обладают наивысшей чувствительностью для QSTAR и LCQ данных соответственно. Положительная предсказательная ценность зависит от качества спектров, так что может быть использована как дополнительная мера оценки производительности подобных алгоритмов. Вообще, качество масс-спектров сильно влияет на результат *de novo* секвенирования, и чем выше качество спектров, тем точнее идентификация.

Рассматривая три показателя: относительное пептидное расстояние (RSD), чувствительность алгоритмов и качество спектров, мы получили полностью согласующиеся друг с другом результаты. Полученные результаты подтверждают, что задача *de novo* секвенирования в общем случае еще не решена. Все рассмотренные алгоритмы не превысили 50%-ный порог правильной идентификации как на QSTAR данных, так и на LCQ. Расширение стандартизированных наборов спектральных данных позволит разработать более устойчивые алгоритмы сравнения и оценки эффективности программ *de novo* секвенирования и создать стандарт для оценки вновь разрабатываемых алгоритмов.

Благодарности

Проект был поддержан грантом РФФИ 05-07-90238. Авторы выражают глубокую признательность за тесное сотрудничество и чрезвычайно полезные комментарии: Xiang Zhang (Bindley Bioscience Center, Discovery Park, Purdue University), Richard Johnson (компания Amgen), Jonas Grossmann (проект AUDENS) и John Morey (проект PEAKS).

Список литературы

1. А.И. Арчаков, В.М. Говорун, «Методы и подходы в протеомике», *Биохимия* **67**, 1341–1359 (2002).
2. J.K. Eng, A.L. McCormack, J.R. Yates, «An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 976–989 (1994).
3. D.N. Perkins, D.J. Pappin, D.M. Creasy, J.S. Cottrell, «Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data», *Electrophoresis* **20**, 3551–3567 (1999).
4. J. Colinge, A. Masselot, M. Giron, T. Dessingy, J. Magnin, «OLAV: Towards high-throughput mass spectrometry data identification», *Proteomics* **3**, 1454–1463 (2003).
5. V. Bafna, N. Edwards, «SCOPE: a probabilistic model for scoring tandem mass spectra against a peptide database», *Bioinformatics* **17**, 13–21 (2001).
6. H.I. Field, D. Fenyo, R.C. Beavis, «RADARS, a bioinformatics solution that automates proteome mass spectral analysis, optimizes protein identification, and archives data in a relational database», *Proteomics* **2**, 36–47 (2002).
7. H. Havilio, Y. Haddad, Z. Smilansky, «Intensity-based statistical scorer for tandem mass spectrometry», *Anal. Chem.* **75**, 435–444 (2003).
8. V. Dancik, T.A. Addona, K.R. Clauser, J.E. Vath, P. Pevzner, «De Novo Peptide Sequencing via Tandem Mass Spectrometry», *J. Comput. Biol.* **6**, 327–342 (1999).
9. J.E. Elias, F.D. Gibbons, O.D. King, F.P. Roth, S. Gygi, «Intensity-based protein identification by machine learning from a library of tandem mass spectra», *Nat. Biotechnol.* **22**, 214–219 (2004).
10. K.R. Clauser, P. Baker, A.L. Burlingame, «Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching», *Anal. Chem.* **71**, 2871–2882 (1999).
11. T. Sakurai, T. Matsuo, H. Matsuda, I. Katakuse, «A Computer Program to Determine Probable Sequence of Peptides from Mass Spectrometric Data», *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 396–399 (1984).
12. C.W. Hamm, W.E. Wilson, D.J. Harvan, «Peptide sequencing program», *Comput. Appl. Biosci.* **2**, 115–118 (1986).
13. B. Spengler, «De novo sequencing, peptide composition analysis, and composition-based sequencing: a new strategy employing accurate mass determination by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 703–714 (2004).
14. K. Biemann, «Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure», *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **16**, 99–111 (1988).
15. R.S. Johnson, S.A. Martin, K. Biemann, J.T. Stults, J.T. Watson, «Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine», *Anal. Chem.* **59**, 2621–2625 (1987).
16. K. Ishikawa, Y. Niva, «Computer-aided peptide sequencing by fast atom bombardment mass spectrometry», *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **13**, 373–380 (1986).
17. M.M. Siegel, N. Bauman, «An efficient algorithm for sequencing peptides using fast atom bombardment mass spectral data», *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **15**, 333–343 (1988).
18. C. Bartels, «Fast algorithm for peptide sequencing by mass spectroscopy», *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **19**, 363–368 (1990).
19. A. Taylor, R. Johnson, «Sequence database searches via *de novo* peptide sequencing by tandem mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1067–1075 (1997).
20. A. Taylor, R. Johnson, «Implementation and uses of automated *de novo* peptide sequencing by tandem mass spectrometry», *Anal. Chem.* **73**, 2594–2604 (2001).
21. B. Ma, K. Zhang, C. Hendrie, C. Liang, M. Li, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, «PEAKS: Powerful Software for Peptide De Novo Sequencing by Tandem Mass Spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2337–2342 (2003).

22. J.F. Cossio, J. Gonzalez, L. Betancourt, V. Besada, G. Padron, Y. Shimonishi, T. Takao, «Automated interpretation of high-energy collision-induced dissociation spectra of singly protonated peptides by 'SeqMS', a software aid for *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 1867–1878 (1998).
23. M. Scigelova, F. Maroto, C. Dufresne, J. Vazquez, «High-Throughput De Novo Sequencing», *Proc. 50th ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Topics*, 2002.
24. H. Zhong, L. Li, «An algorithm for interpretation of low-energy collision-induced dissociation product ion spectra for *de novo* sequencing of peptides», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 1084–1096 (2005).
25. T.H. Cormen, C.E. Leiserson, R.L. Rivest, C. Stein, *Introduction to Algorithms*, The MIT Press, 2nd edition, 2001.
26. M.R. Garey, D.S. Johnson, *Computers and Intractability*, Freeman, New York, 1979.
27. T. Chen, M.Y. Kao, M. Tepel, J. Rush, G.M. Churc, «A Dynamic Programming Approach to De Novo Peptide Sequencing via Tandem Mass Spectrometry», *J. Comput. Biol.* **8**, 325–337 (2001).
28. B. Lu, T. Chen, «A Suboptimal Algorithm for De Novo Peptide Sequencing via Tandem Mass Spectrometry», *J. Comput. Biol.* **10**, 1–12 (2003).
29. <http://msms.usc.edu/sub>
30. J. Grossmann, F. Roos, M. Cieliebak, Z. Lipta, L.K. Mathis, M. Muller, W. Gruissem, S.J. Baginsky, «AUDENS: a tool for automated peptide *de novo* sequencing», *J. Proteome Res.* **4**, 1768–1774 (2005).
31. B. Fischer, V. Roth, F. Roos, J. Grossmann, S. Baginsky, P. Widmayer, W. Grulsem, J.M. Buhmann, «NovoHMM: A Hidden Markov Model for *de Novo* Peptide Sequencing», *Anal. Chem.* **77**, 7265–7273 (2005).
32. J. Skilling, J. Cottrell, B. Green, J. Hoves, E. Kapp, J. Landgridge, B. Bordoli, «Automated *de novo* peptide sequencing using Q-ToF ESI-MS/MS and software interpretation of the data», *Proc. 47th ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Topics*, 1999.
33. M.M. Savitski, M.L. Nielsen, F. Kjeldsen, R.A. Zubarev, «Proteomics-grade *de novo* sequencing approach», *J. Proteome Res.* **4**, 2348–2354 (2005).
34. D.M. Horn, R.A. Zubarev, F.W. McLafferty, «Automated *de novo* sequencing of proteins by tandem high-resolution mass spectrometry», *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **97**, 10313–10317 (2000).
35. J.M. Malard, A. Heredia-Langner, D.J. Baxter, K.H. Jarman, W.R. Cannon, «Constrained De-Novo Peptide Identification via Multi-Objective Optimization», *HiCOMB* (2004).
36. D.D. Stranz, L.B. Martin, «Derivation of Peptide Sequence from Mass Spectral Data using the Genetic Algorithm», *On-Line J. Biomol. Techniques Rapid Communications Articles* (1998).
37. R.E. Scarberry, Z. Zhang, D.R. Knapp, «Peptide sequence determination from high-energy CID spectra using artificial neural networks», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6**, 947–961 (1995).
38. J. Qin, C.J. Herring, X. Zhang, «De novo peptide sequencing in an ion trap mass spectrometer with ¹⁸O labeling», *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **12**, 209–216 (1998).
39. Z. Zhang, J.S. McElvain, «De novo peptide sequencing by two-dimensional fragment correlation mass spectrometry», *Anal. Chem.* **72**, 2337–2350 (2000).
40. J.V. Olsen, M. Mann, «Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation», *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **101**, 13417–13422 (2004).
41. Z. Zhang, «Prediction of Low-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides», *Anal. Chem.* **76**, 3908–3922 (2004).
42. A. Frank, P. Pevzner, «PepNovo: De Novo Peptide Sequencing via Probabilistic Network Modeling», *Anal. Chem.* **77**, 964–973 (2005).
43. O. Lubeck, C. Sewell, S. Gu, X. Chen, D.M. Cai, «New computational approaches for *de novo* peptide sequencing from MS/MS experiments», *Proc. IEEE* **90**, 1868–1874 (2002).
44. D. Fenyo, J. Qin, B.T. Chait, «Protein identification using mass spectrometric information», *Electrophoresis* **19**, 998–1005 (1998).
45. I. Fedulova, S. Pevtsov, M. Zhang, Z. Ouyang, S. Prabhakar, X. Zhang, «InProID: an Integrated Protein Identification System», *Proc. 53rd ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Topics*, 2005.
46. I. Shadforth, D. Crowther, C. Bessant, «Protein and peptide identification algorithms using MS for use in high-throughput, automated pipelines», *Proteomics* **5**, 4082–4095 (2005).
47. A. Keller, S. Purvine, A.I. Nesvizhskii, S. Stolyar, D.R. Goodlett, E. Kolker, «Experimental protein mixture for validating tandem mass spectrometry analysis», *OMICS* **6**, 207–212 (2002).
48. I.A. Fedulova, H. Mirzaei, S.E. Pevtsov, Z. Ouyang, X. Zhang, «PepTiger: Search Engine for Error-Tolerant Protein Identification from *de Novo* Sequences», *Proc. 54th ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Topics*, 2006.
49. B. Ma, K. Zhang, C. Liang, «An Effective Algorithm for the Peptide De Novo Sequencing from MS/MS Spectrum», *J. Comput. Sys. Sci.* **70**, 418–430 (2005).
50. D. West, *Introduction to Graph Theory*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1996.
51. K. Owens, «Application of Correlation Analysis Techniques to Mass Spectral Data», *Appl. Spectrosc. Rev.* **27**, 1–49 (1992).
52. S. Baginsky, M. Cieliebak, W. Gruissem, T. Kleffmann, Z. Liptak, M. Muller, P. Penna, «AuDeNS: A Tool for Automatic De Novo Peptide Sequencing», TECHNICAL REPORT #383, ETH Zurich, Dept. of Computer Science.
53. S. Gay, P.A. Binz, D.F. Hochstrasser, R.D. Appel, «Modeling peptide mass fingerprinting data using the atomic composition of peptides», *Proteomics* **2**, 1374–1391 (2002).
54. N. Blom, T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft, S. Brunak, «Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence», *Proteomics* **4**, 1633–1649 (2004).
55. M. Xu, L.Y. Geer, S.H. Bryant, J.S. Roth, K.A. Kowalak, D.M. Maynard, S.P. Markey, «Assessing data quality of peptide mass spectra obtained by quadrupole ion trap mass spectrometry», *J. Proteome Res.* **4**, 300–305 (2005).

Определение нуклеозидов в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией

В.А. Логинов*, А.И. Ревельский, И.А. Ревельский

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии, Ленинские горы 1, строение 3, 119992 Москва, Россия. E-mail: vya-l@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.10.2006 г.; после переработки — 28.10.2006 г.

Разработан способ определения нуклеозидов в смеси без разделения и с разделением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией (МС) и тандемной масс-спектрометрией (МС²). Изучены условия разделения нуклеозидов (уридин, цитидин, ксантозин, инозин, аденозин) на обращенно-фазовой колонке (силикагель, модифицированный октадецильными группами C18, зернение 5 мкм, 150×2.0 мм), Phenomenex, с использованием градиентного и изократического элюирования. Оптимизированы условия работы источника ионизации пробы электрораспылением. Изучено определение нуклеозидов в смеси без хроматографического разделения. Пределы детектирования уридина, цитидина, ксантозина, инозина и аденозина, определяли в 4 различных режимах: МС и МС² для прямого ввода модельного раствора через петлю дозатора и МС и МС² после разделения модельной смеси на обращенно-фазовой колонке (силикагель, модифицированный октадецильными группами C18, зернение 3 мкм, 150×0.5 мм), Phenomenex. Они составили 3×10^{-10} – 1×10^{-8} г, в зависимости от соединения и режима детектирования.

Ключевые слова: нуклеозиды, электрораспыление, тандемная масс-спектрометрия, пределы детектирования.

A technique for the determination of nucleosides in mixtures by mass spectrometry and tandem mass spectrometry with and without HPLC separation was developed. Separation conditions for a number of nucleosides (uridine, cytidine, xanthosine, inosine, adenosine) using Luna C18(2) (5 μm, 150×2.0 mm), Phenomenex, column in gradient and isocratic mode were considered. Electrospray conditions were optimized. Determination of solutions of nucleosides in mixtures without chromatographic separation was described. Detection limits of nucleosides were found in 4 different modes: MS and MS² for a direct injection of a model solution, and MS and MS² after the HPLC separation using Luna C18(2) (3 μm, 150×0.5 mm), Phenomenex. The limits were in the range 3×10^{-10} – 1×10^{-8} g depending on a nucleoside and a detection mode.

Keywords: nucleosides, electrospray, tandem mass spectrometry, detection limits.

Введение

Рибонуклеиновые кислоты (РНК), в частности транспортная РНК, являются основным источником модифицированных нуклеозидов, обнаруженных в моче [1]. РНК содержат модифицированные нуклеозиды, которые синтезируются после транскрипции модифицирующими ферментами [2]. В настоящее время известно более 90 модифицированных рибонуклеозидов из всех форм РНК. Наиболее распространенной модификацией структуры четырех основных рибонуклеозидов (аденозина, уридина, гуанозина и цитидина) является метилирование либо основания, либо сахарных гидроксигрупп, либо, в некоторых случаях, обеих частей нуклеозида. Нуклеозиды, продукты метаболизма РНК, возникают не только в клетках человека, но и в других формах жизни, включая бактерии, грибы и вирусы. Некото-

рые известные модифицированные нуклеозиды специфичны для определенных типов РНК.

Первое упоминание о количественном различии в уровне продуктов метаболизма нуклеиновых кислот в моче здоровых и больных раком людей датируется 1960 г., когда было отмечено различие в уровнях пуринов и пиримидинов в моче больных лейкемией и нормальных образцах мочи [1]. Тогда же было отмечено, что уровень псевдоуридина значительно повышен в моче больных лейкемией. Поэтому было высказано предположение, что уровень этого, а также других нуклеозидов, может служить индикатором, биомаркером рака. Два открытия в 1970-х годах пролили свет на феномен повышения уровня нуклеозидов в моче больных раком людей. Во-первых, было показано, что опухолевые клетки содержат гиперактивные метилирующие ферменты и, таким образом, производят большее количество модифицированных

нуклеозидов. Во-вторых, было отмечено, что круговорот (цикл синтеза-распада) РНК в раковых тканях происходит намного быстрее, чем в нормальных. С тех пор началось развитие способов определения модифицированных нуклеозидов в качестве биомаркеров рака и других болезней.

Наиболее широко используемый способ пробоподготовки рибонуклеозидов основан на высокоселективной аффинной экстракции этих соединений из биоматриц. Такой способ пробоподготовки был специально разработан Герке в конце 70-х годов XX века [3, 4] для определения рибонуклеозидов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), но впоследствии он был адаптирован для анализа и других биожидкостей. Способ позволяет извлекать только 2',3'-*цис*-диол-нуклеозиды. Компоненты ДНК и нуклеозиды с модифицированными 2',3'-гидроксидными группами, например, 3'-О-метилрибозиды не извлекаются.

Для селективного извлечения рибонуклеозидов из биоматриц используют аффинную хроматографию на геле, иммобилизованном фенолборной кислотой. Фенолборная кислота селективно связывает *цис*-диольные гидроксигруппы, которые находятся в рибозной части нуклеозидов. Этот процесс обратим в простых и мягких условиях. Для таких же целей подходит и силикагель, иммобилизованный борной кислотой [5]. Элюируют нуклеозиды 0.1 М водным раствором муравьиной кислоты.

По литературным данным, ВЭЖХ в сочетании с аффинной экстракцией является основным методом разделения и определения рибонуклеозидов в биожидкостях. При этом методом ВЭЖХ в биожидкостях определяют, как правило, не больше 14–18 нуклеозидов одновременно [6]. К современным методам определения нуклеозидов и других метаболитов нуклеиновых кислот относят масс-спектрометрические методы в сочетании с ВЭЖХ, газовой хроматографией (ГХ) и капиллярным электрофорезом, а также метод обнаружения специфических антигенов с помощью иммобилизованного на антителе фермента (ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay). С помощью метода ELISA выделяют и определяют 8-окси-2'-дезоксигуанозин в ДНК на уровне 1–5 пг поврежденного нуклеозида в 1 мкг ДНК. Этот предел обнаружения соответствует соотношению содержания модифицированных нуклеозидов к содержанию нормальных 2'-дезоксигуанозинон, равному 1.8×10^{-5} [7]. Однако методом ELISA групповое определение нуклеозидов не проводят, вследствие отсутствия селективного группового иммуносорбента для этих соединений. Пределы детектирования нуклеозидов методом ВЭЖХ составляют 3 нг и выше, методом ВЭЖХ/МС — от 30 пг до 3 нг [8, 9], методом газохроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС) — от 1–5 пг. Хотя метод ГХ/МС и позволяет достигать пределов обнаружения более низких, чем ВЭЖХ/МС, но он усложняется необходимостью проводить стадию дериватизации из-за недостаточной летучести нуклеозидов. Необходимо отметить, что литературные данные по пределам детектирования методом ВЭЖХ/МС очень сильно отличаются друг от друга.

Существуют несколько способов ионизации в ВЭЖХ/МС, наиболее часто используемые из которых электрораспыление (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Ионизация электрораспылением оптимальна для определения полярных соединений, к которым относятся и нуклеозиды. Преимущество масс-спектрометрических методов анализа состоит в том, что они позволяют одновременно определять гораздо большее количество соединений за счет своей селективности и имеют высокую чувствительность. Для анализа биосред неизвестного состава, когда невозможно разделить и распознать все компоненты, ВЭЖХ разделение становится неактуальным. Поэтому иногда не имеет смысла увеличивать время анализа введением ВЭЖХ стадии. В таком случае прямой масс-спектрометрический анализ становится актуальным.

Целью данной работы было определение пределов определения нуклеозидов методом ВЭЖХ/МС (МС²) в водных растворах, а также изучение определения смеси нуклеозидов в водных растворах при прямом вводе их в масс-спектрометр без ВЭЖХ разделения.

Экспериментальная часть

Эксперименты проводили на масс-спектрометре LCQ Advantage (Thermo Finnigan, США) с источником ионизации электрораспылением и анализатором ионная ловушка. Для подачи элюента использовали жидкостной насос Rheos 4000 Flux Instruments. Для разделения нуклеозидов использовали обращенно-фазовые колонки Luna C18(2) (зернение 5 мкм, 150×2.0 мм) и Luna C18(2) (зернение 3 мкм, 150×0.5 мм), Phenomenex. Сбор и обработка масс-спектрометрических данных проводили с помощью программного обеспечения Xcalibur (Thermo Finnigan, США).

В качестве модельных соединений использовали нуклеозиды аденозин, инозин, ксантозин, уридин и цитидин (Sigma-Aldrich, Германия). В работе также использовали метанол марки ОСЧ (Merck, Германия) и ацетат аммония марки ХЧ (Химмед, Россия).

Модельный раствор нуклеозидов готовили путем растворения 2 мг каждого нуклеозида в колбе в 200 мл дистиллированной воды и добавлением к раствору 32 мг ацетата аммония. Концентрация нуклеозидов в модельном растворе составляла 10^{-8} г мкл⁻¹. Также был приготовлен раствор ксантозина с концентрацией 10^{-9} г мкл⁻¹.

Изучение условий разделения проводили с использованием градиентного и изократического элюирования. В работе использовали три различных элюента: 2 мМ водный раствор ацетата аммония (элюент А); 2 мМ ацетат аммония в водном 10 %-ном метаноле (элюент Б); 2 мМ ацетат аммония в водном 20 %-ном метаноле (элюент В). Элюенты готовили путем растворения 0.077 г ацетата аммония в 500 мл воды, 10 и 20 %-ных водных растворах метанола соответственно.

Пределы детектирования модельных соединений определяли в 4 различных режимах: МС и МС² для прямого ввода модельного раствора и МС и МС²

после разделения модельной смеси на колонке Luna C18(2) (зернение 3 мкм, 150×0.5 мм), Phenomenex. Условия работы источника ионов были следующие: температура капилляра 200–285 °С, напряжение на электрораспылителе — 2.5–4.0 кВ, скорость высушивающего газа — 10–50 мл мин⁻¹, скорость вспомогательного газа — 0–20 мл мин⁻¹. Диапазон регистрируемых масс 100–2000 Д. Регистрировали положительные ионы. МС² детектирование проводили, используя в качестве ионов-предшественников протонированные молекулы [М + Н]⁺.

Нуклеозиды разделяли на колонке Luna C18(2) (зернение 5 мкм, 150×2.0 мм). Модельный раствор нуклеозидов с концентрациями 10⁻⁸ г мкл⁻¹ вводили в петлю, объемом 20 мкл. Скорость потока элюента составляла 150 мкл мин⁻¹. Начальные условия хроматографирования были следующими [10]: в течение первых 5 мин проводилось изократическое элюирование элюентом А, следующие 10 мин происходило градиентное добавление элюента Б до его 10%-ного содержания, следующие 12 мин повышение содержания элюента Б до 20 %, в течение последующих 26 мин содержание элюента Б было доведено до 100 % и затем проводили изократическое элюирование 100 %-ным элюентом Б в течение 4 мин. В статье [10] использовалась хроматографическая колонка Atlantis C18 (5 мкм, 150×2.1 мм) (Waters Corp., США), аналогичная нашей колонке.

Обсуждение результатов

Разделение нуклеозидов. Хроматограмма, полученная в начальных условиях, представлена на рис. 1. Времена удерживания нуклеозидов увеличивались в ряду цитидин, уридин, ксантозин, инозин, аденозин.

На хроматограмме видно, что пики уридина и ксантозина не разделились. Кроме того, время анализа является слишком долгим для разделения 5 компонентов. Поэтому мы изменяли условия элюирования для того, чтобы полностью разделить модельные нуклеозиды и уменьшить время анализа. Результаты представлены в табл. 1.

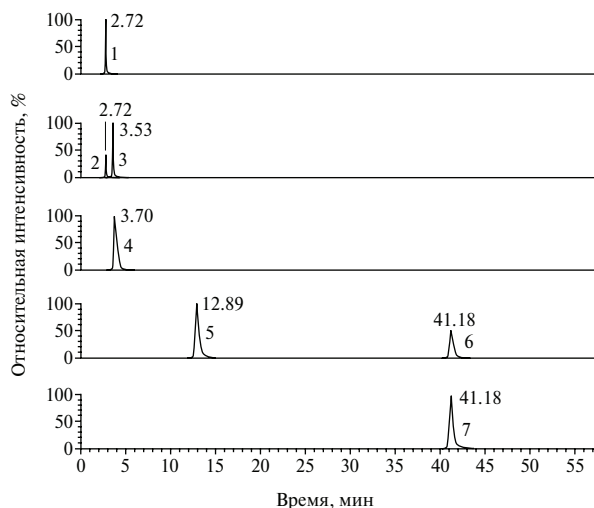


Рис. 1. Масс-хроматограммы, полученные в начальных условиях элюирования. Пики: 1 — цитидин, 2 — изотопный цитидин, 3 — уридин, 4 — инозин, 5 — ксантозин, 6 — изотопный аденозин, 7 — аденозин.

Таблица 1. Сравнение времен удерживания модельных нуклеозидов в зависимости от условий их элюирования методом ВЭЖХ на колонке Luna C18(2) (зернение 5 мкм, 150×2.0 мм), Phenomenex.

Условия элюирования	Времена удерживания нуклеозидов, мин	Примечания
5 мин 100 % А 10 мин 100 % → 90 % А 12 мин 90 % → 80 % А 26 мин 80 % → 0 % А 4 мин 100 % Б	Цитидин 2.7 Уридин 3.5 Ксантозин 3.7 Инозин 12.9 Аденозин 41.2	Пики уридина и ксантозина не разделены. Время анализа большое (57 мин)
5 мин 100 % → 95 % А 25 мин 95 % → 0 % А 5 мин 100 % Б	Цитидин 2.6 Уридин 3.1 Ксантозин 3.3 Инозин 11.2 Аденозин 27.8	Пики уридина и ксантозина разделяются на 10 % высоты (35 мин)
5 мин 100 % → 95 % А 15 мин 95 % → 0 % А 5 мин 100 % Б	Цитидин 2.6 Уридин 3.2 Ксантозин 3.6 Инозин 11.8 Аденозин 24.1	Все пики полностью разделились, но время пропускания элюента Б надо увеличивать еще на 5 мин для полного вымывания аденозина из колонки (25 мин)
5 мин 100 % → 95 % А 12 мин 95 % → 0 % А 5 мин 100 % Б	Цитидин 2.6 Уридин 3.3 Ксантозин 3.1 Инозин 12.7 Аденозин 21.1	Время выхода пика уридина стало больше, чем время выхода пика ксантозина (22 мин)
5 мин 100 % → 95 % А 1 мин 95 % → 0 % А 24 мин 100 % Б	Цитидин 3.4 Уридин 4.3 Ксантозин 4.4 Инозин 11.2 Аденозин 20.6	Пики уридина и ксантозина не разделились, и у пика аденозина появилась пологий «хвост» (30 мин)
50 % А + 50 % Б	Цитидин 3.8 Уридин 5.3 Ксантозин 4.7 Инозин 12.4 Аденозин 45.4	Слишком большое время выхода аденозина
100 % А	Цитидин 3.6 Уридин 5.6 Ксантозин 5.0 Инозин 12.1 Аденозин 23.8	Ширина пиков больше, чем при градиентном элюировании. Пики уридина и ксантозина хроматографически не разделяются, но при масс-спектрометрическом детектировании это не является недостатком (30 мин)
100 % Б	Цитидин 3.7 Уридин 4.6 Ксантозин 4.3 Инозин 9.4 Аденозин 35.8	Также слишком большое время выхода аденозина (55 мин)

Для упрощения элюирования решили изучить разделение нуклеозидов в изократическом режиме. В качестве элюентов использовали 5 %-, 10 %- и 20 %-ные растворы метанола в воде, содержащий 2 мМ ацетат аммония. В случае элюирования 5 %- и 20 %-ными растворами метанола время удерживания аденозина составляло более 35 и 45 мин соответственно.

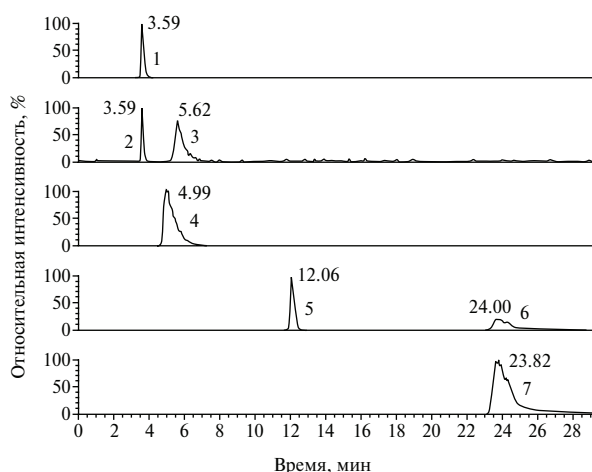


Рис. 2. Изократическое разделение нуклеозидов 2 мМ раствором ацетата аммония в 10%-ном водном растворе метанола. Пики: 1 — цитидин, 2 — изотопный цитидин, 3 — уридин, 4 — инозин, 5 — ксантозин, 6 — изотопный аденозин, 7 — аденозин.

В изократическом режиме разделяли смесь нуклеозидов элюентом Б. Пики уридина и ксантозина не разделяются полностью, но это не мешает определению в случае масс-спектрометрического детектирования. Недостатком изократического способа элюирования также является размывание пиков, что приводит к увеличению пределов детектирования данных соединений (рис. 2).

Проведенное исследование показало, что наилучшее разделение 5 модельных нуклеозидов достигается при использовании градиентного элюирования (5 мин 100% → 95% А; 15 мин 95% → 0% А; 5 мин 100% Б). При этом время анализа также оказывается достаточно небольшим по сравнению с другими системами. Также следует отметить, что ширина пиков в случае градиентного элюирования меньше, что является еще одним немаловажным достоинством такого способа. В то же время изократическое элюирование обладает простотой и также высокой скоростью анализа, хотя и не позволяет полностью хроматографически разделять все модельные соединения, но в случае использования в качестве детектора масс-спектрометра это не является большим недостатком.

Оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования нуклеозидов. В экспериментах по оптимизации работы источника ионизации пробы электрораспылением была использована колонка Luna C18(2) (зернение 3 мкм, 150×0.5 мм) с петлей дозатора объемом 2 мкл. Раствор ксантозина вводили в

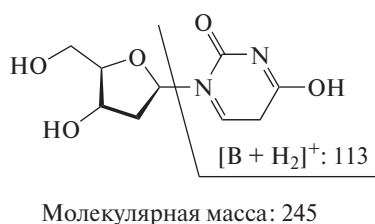


Рис. 3. Схема образования иона $[B + H_2]^+$ (на примере цитидина).

Таблица 2. Значения площадей и отношения сигнал/шум пиков ксантозина при различных значениях скорости высушивающего газа.

Высушивающий газ, мл мин ⁻¹	Среднее значение отношения сигнал/шум	Среднее значение площадей пиков
10	64	70 000
20	131	350 000
30	148	430 000
40	98	240 000
50	116	250 000

петлю микрошприцом на 10 мкл. Элюирование проводили в изократическом режиме элюентом Б. Скорость элюента составляла 20 мкл мин⁻¹. Хроматограммы по полному ионному току получали в режиме MS² при диапазоне детектируемых масс от 100 до 300 Д. Площади пиков определяли по масс-хроматограммам для ионов $[B + H_2]^+$ (рис. 3). Давление в анализаторе составляло $(2-3) \times 10^{-5}$ мм рт. ст.

Проводили серию опытов, варьируя различные условия работы источника ионов, такие как скорость высушивающего газа, скорость вспомогательного газа, температура капилляра, напряжение на электрораспылителе.

Начальными условиями работы источника ионов были температура капилляра 285 °С, напряжение на электрораспылителе — 3.5 кВ, скорость высушивающего газа — 30 мл мин⁻¹, скорость вспомогательного газа — 0.

Сначала варьировали значения скорости высушивающего газа от 10 до 50 мл мин⁻¹. При каждом значении скорости высушивающего газа проводили минимум по 3 опыта и определяли площади и отношение сигнал/шум пиков ксантозина (табл. 2.).

Из табл. 2 следует, что для проведения дальнейших опытов оптимальное значение скорости высушивающего газа составляет 30 мл мин⁻¹. Далее варьировали значения вспомогательного газа. Однако увеличение потока всего до 10 мл мин⁻¹ при постоянном значении высушивающего газа 30 мл мин⁻¹ приводило к двукратному уменьшению площади пиков нуклеозидов. Поэтому далее работали без вспомогательного газа.

Определяли оптимальные значения напряжения на электрораспылителе. Варьировали значения от 2.5 до 4.0 кВ. С ростом напряжения сигнал ксантозина увеличивается (рис. 3). При значениях выше 3.5 кВ происходил пробой искры между концом капилляра

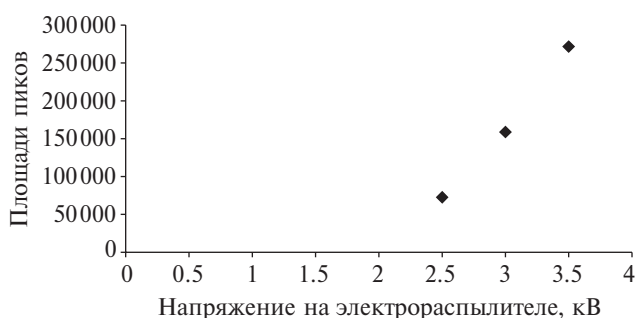


Рис. 4. Зависимость площадей пиков от напряжения на распылителе.

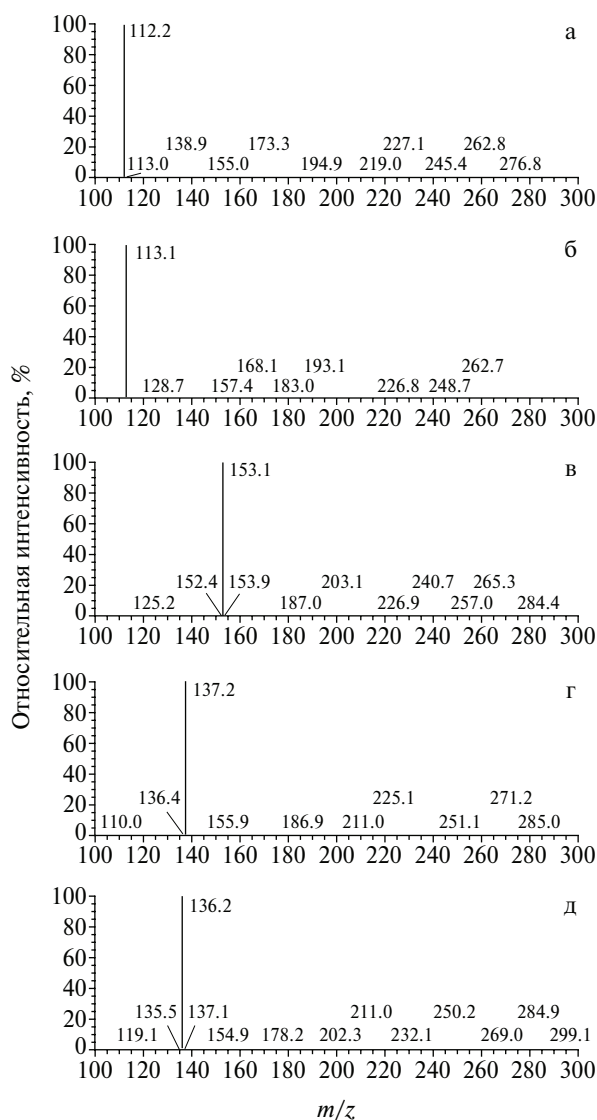
Таблица 3. Значение площадей пиков при изменении температуры.

Температура, °С	Среднее значение площадей пиков
250	500 000
285	431 000
200	409 000

и металлическим капилляром, по которому образовались ионы движутся к масс-анализатору. Оптимальное значение напряжения на электрораспылителе составило 3.5 кВ.

Определяли зависимость площади пика ксантозина в зависимости от температуры на электрораспылителе. Значения температуры варьировали от 200 до 285 °С (табл. 3). Наибольшие площади пиков ксантозина наблюдались при 250 °С на электрораспылителе.

В режиме МС варьировали те же параметры, что и в МС² режиме. Измеряли площади пиков аденозина по масс-хроматограммам, построенным по иону с массой 268 Д (протонированная молекула аденозина). Диапазон детектируемых масс установили от 100 до 500 Д. В петлю дозатора вводили раствор смеси нуклеозидов. Установили, что оптимальные условия

**Рис. 5.** МС² спектры нуклеозидов, полученные для протонированных молекул: а — цитидин, б — уридин, в — ксантозин, г — инозин, д — аденозин.**Таблица 4.** Пределы детектирования нуклеозидов в различных режимах (г).

Нуклеозид	МС без разделения	МС ² без разделения	МС с разделением	МС ² с разделением
Цитидин	4×10^{-9}	1×10^{-9}	1×10^{-9}	5×10^{-10}
Уридин	1×10^{-8}	1×10^{-9}	3×10^{-9}	1×10^{-9}
Ксантозин	2×10^{-8}	2×10^{-9}	3×10^{-9}	1×10^{-9}
Инозин	1×10^{-8}	2×10^{-9}	4×10^{-8}	4×10^{-9}
Аденозин	4×10^{-9}	2×10^{-9}	1×10^{-9}	3×10^{-10}

работы электрораспылителя в МС² оказались также оптимальными для МС режима, за исключением того, что для МС режима более низкие температуры на электрораспылителе приводят к повышению чувствительности по сравнению с МС² на 10–20 %.

Исходя из полученных данных, для определения пределов детектирования нуклеозидов было выбрано изократическое элюирование нуклеозидов 2 мМ ацетатом аммония в 10 %-ном водном растворе метанола. Условия работы источника ионизации: температура капилляра 250 °С, напряжение на электрораспылителе — 3.5 кВ, скорость высушивающего газа — 30 мл мин⁻¹, скорость вспомогательного газа — 0. В случае определения пределов детектирования нуклеозидов с их разделением на колонке Luna C18(2) (зернение 3 мкм, 150×0.5 мм) скорость потока элюента была равна 15 мкл мин⁻¹, а при определении пределов детектирования без разделения на колонке скорость потока равнялась 150 мкл мин⁻¹. Пределы детектирования определяли в режимах МС и МС² с разделением нуклеозидов на хроматографической колонке и без него. В режиме МС нуклеозиды определяли по масс-хроматограммам, построенным по протонированным молекулам $[M + H]^+$. В режиме МС² нуклеозиды определяли по масс-хроматограммам, построенным по ионам BH_2^+ , полученным из протонированных молекул. МС² спектры нуклеозидов представлены на рис. 5.

Пределы детектирования представлены в табл. 4. Относительное стандартное отклонение определения не превышало 30 %. Пределы определения некоторых нуклеозидов можно снизить еще в 1.5–3 раза, если использовать в качестве ионов-предшественников ионы $[M + Na]^+$ и $[2M + Na]^+$, сигнал по которым имеет большую интенсивность, чем в случае ионов $[M + H]^+$. Также было отмечено, что в режиме МС без разделения повышение скорости высушивающего газа приводит к небольшому, 20–30 %, повышению чувствительности, чего, однако, не происходит в случае МС² без разделения.

Сравнивая полученные результаты с результатами по пределам детектирования, описанными в статье [10], можно отметить, что, даже используя изократическое элюирование, пределы детектирования удалось снизить в 2–50 раз в зависимости от вещества. Кроме того, такие же пределы детектирования были получены при прямом вводе раствора нуклеозидов масс-спектрометр. Такой способ заметно упрощает определение и требует гораздо меньше времени на анализ. Однако прямой ввод имеет свои недостатки. Например, многие нуклеозиды (цитидин и ури-

дин, инозин и аденозин) имеют молекулярную массу, различающуюся на 1 Д, что приводит к повышению сигнала по более тяжелому веществу в паре за счет вклада изотопного иона более легкого вещества. Такой вклад может быть очень существенным, что хорошо видно на рис. 1 и 2. Как следствие, количественный анализ можно проводить только с учетом вклада изотопного иона.

Используя МС² детектирование, можно снижать пределы детектирования еще в 3–10 раз. Но в режиме МС² нельзя одновременно определять более одного компонента.

Список литературы

1. K.H. Schram, «Urinary nucleosides», *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 131–251 (1998).
2. G. Xu, C. Di Stefano, H.M. Liebich, Y. Zhang, P. Lu, «Reversed-phase high-performance liquid chromatographic investigation of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients», *J. Chromatogr. B.* **732**, 307–313 (1999).
3. C.W. Gehrke, K.C. Kuo, G.E. Davis, R.D. Suits, T.P. Waalkes, E. Borek, «Quantitative high-performance liquid chromatography of nucleosides in biological materials», *J. Chromatogr.* **150**, 455–476 (1978).
4. C.W. Gehrke, K.C. Kuo, R.W. Zumwalt, «Chromatography of nucleosides», *J. Chromatogr.* **188**, 129–147 (1980).
5. E. Schlimme, K.-S. Boos, E. Hagemeyer, K. Kemper, U. Meyer, H. Hobler, T. Schnelle, M. Weise, «Direct clean-up and analysis of ribonucleosides in physiological fluids», *J. Chromatogr.* **378**, 349–360 (1986).
6. G. Xu, H. Liebich, «Normal and modified nucleosides in urine as potential tumor markers determined by MECK and HPLC», *An. Clin. Lab. Mar* 22–32 (2001).
7. B. Yin, R.M. Whyatt, F.P. Perera, M.C. Randall, T.B. Cooper, R.M. Santella, «Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA», *Free Rad. Biol. Med.* **18**, 1023–1032 (1995).
8. H.M. Liebich, S. Muller-Hagendorn, F. Klaus, K. Meziane, K.-R. Kim, A. Frickenschmidt, B. Kammerer, «Chromatographic, capillary electrophoretic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of urinary modified nucleosides as tumor markers», *J. Chromatogr. A* **1071**, 271–275 (2005).
9. A. Weimann, D. Belling, H.E. Poulsen, «Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry», *Nucl. Acids Res.* **30**, e7 (2002).
10. S.H. Lee, B.H. Jung, S.Y. Kim, B.C. Chung, «A rapid and sensitive method for quantitation of nucleosides in human urine using liquid chromatography/mass spectrometry with direct urine injection», *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 973–977 (2004).

Современная масс-спектрометрия: пропорции развития

Б.Л. Мильман, Л.А. Конопелько

ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии
им. Д.И. Менделеева», Московский пр. 19, 198005 Санкт-Петербург, Россия.
E-mail: bmilman@mail.rcom.ru

Поступила в редакцию 17.09.2006 г.

Статья отражает новейшие тенденции развития масс-спектрометрии. Современное состояние метода прослежено по представительным выборкам научных статей в рассматриваемой области и с использованием экономических данных. Охарактеризованы области применения масс-спектрометрии, основные типы приборов и глобальный рынок масс-спектрометров.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, тенденции развития, биомедицинская масс-спектрометрия, протеомика, рынок масс-спектрометров.

Modern trends in mass spectrometry are explored. In the research, representative publication samples and economical data are used. Application fields of mass spectrometry, main types of instruments, and the mass spectrometer market are reviewed.

Keywords: mass spectrometry, research trends, biomedical mass spectrometry, proteomics, mass spectrometer market.

Введение

Масс-спектрометрия представляет собой основной или один из основных (в зависимости от области применения) инструментальных методов химического и биохимического анализа. На масс-спектрометрию приходится 42 % рынка приборов для молекулярного анализа [1]. В 1999 г. в мире насчитывали более 34 тыс. масс-спектрометров [2]. В 2005 г., по другим данным [3], работало уже более 200 тыс. масс-спектрометрических приборов. Значимость применения масс-спектрометрии в настоящее время предполагает важность освещения различных сторон развития этого метода, представляющих интерес для исследователей, специалистов в области практического химического и биохимического анализа, руководителей лабораторий и научных организаций и маркетологов (рынки аналитических приборов, стандартных образцов, реактивов и др.).

В настоящей статье освещаются основные тенденции развития современной масс-спектрометрии, касающиеся областей ее применения и типа применяемых приборов. Пропорции развития определены по научным (наукометрическим) индикаторам (число публикаций и ссылок на них) и экономическим показателям (объемы рынка различных масс-спектрометров), относящимся к 2005 г., а также к предыдущим годам. Эти данные в своем большинстве относятся к зарубежным публикациям и рынкам; российская доля всех суммарных показателей невелика.

Принятые сокращения: **ББА** — бомбардировка быстрыми атомами, **ГХ/МС** — газовая хроматография/масс-спектрометрия, **ЖХ/МС** — жидкостная хроматография/масс-спектрометрия, **ЭР** — электро-распыление (электроспрей), **MALDI** — matrix-assisted

laser desorption/ionization (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация).

Информационные методы, использованная информация

Научные статьи по масс-спектрометрии выявлены по базе данных «Указатель научного цитирования» («Science Citation Index Expanded», компания «Thomson ISI», США); найдена 5031 публикация за 2005 г. При этом использованы поисковые термины «mass spectrometry», «mass spectrometer», «mass spectrometric», некоторые родственные термины и их аббревиатуры (в заголовках статей). Пропорции развития масс-спектрометрии, характерные для 2005 г., определены по выборкам, насчитывающим 2000 статей (первые 2000 статей в их перечне по дате публикации; выборка, включающая последние 2000 публикаций, приводит к сходным результатам) или 150 статей (отобраны методом случайных чисел). В первом случае определяли общее распределение публикаций по различным научным областям, во втором — по рефератам статей выявляли объекты анализа (исследования) и основные типы приборов.

По указанной базе данных также определены ссылки на отмеченные масс-спектрометрические публикации 2005 г. (в т.ч. ссылки, выходящие за пределы масс-спектрометрии) и установлены наиболее цитируемые работы этого года. Кроме того, с использованием аналогичного информационного поиска выявлены высокоцитируемые статьи по масс-спектрометрии предшествующих лет.

Рынок масс-спектрометрических приборов освещен по публикациям [1–9] в Интернете.

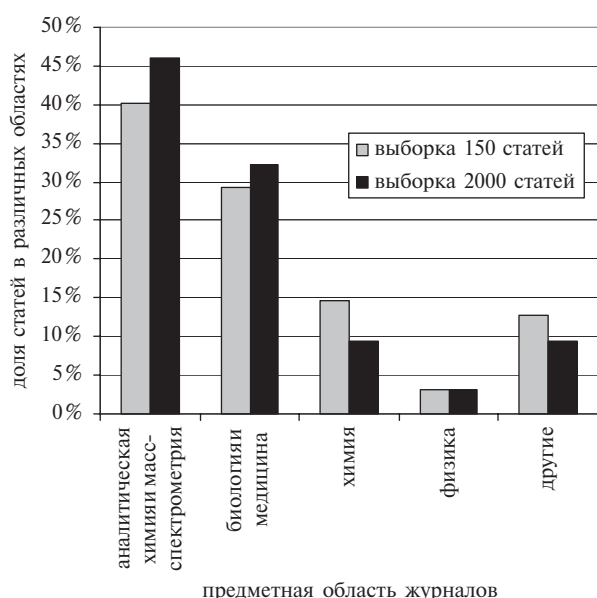


Рис. 1. Распределение масс-спектрометрических публикаций 2005 г. по различным областям. Последние установлены по тематике журналов, в которых опубликованы соответствующие статьи.

Области применения масс-спектрометрии

Различные научные (предметные) области, к которым относятся статьи по масс-спектрометрии, показаны на рис. 1. Почти половина публикаций относится к общим журналам в области масс-спектрометрии и аналитической химии. Эти статьи также носят общий характер или, чаще, связаны с определенными объектами химического и биохимического анализа (исследования) в различных научных и практических областях. Доля соответствующих статей в периодических изданиях «конкретной» направленности (т.е. без учета общих журналов по масс-спектрометрии и аналитической химии) ясно указывает на «биологизацию» и «медиализацию» современной масс-спектрометрии. Действительно, рассматриваемый показатель резко уменьшается в ряду: биология и медицина (науки о жизни) > химия > физика (рис. 1).

Более подробная информация о применении масс-спектрометрии в различных областях представлена на рис. 2 и 3, которые показывают наиболее распространенные объекты анализа (исследования) и сами определяемые (изучаемые) вещества. Наибольшая доля анализов (точнее, соответствующих статей) приходится на биологические образцы (кровь, плазма, моча, клетки, ткани, бактерии и др.). В них определяют эндогенные (прежде всего белки и пептиды) и экзогенные (лекарства, вредные вещества, их метаболиты, др.) вещества. Соответствующие аналитические и исследовательские работы проводятся в рамках новых широких научных направлений. К ним относятся «протеомика» (исследование протеома — совокупности белков, присутствующих в клетках, тканях, живых организмах в целом) [10–11], «метаболомика» (исследование совокупности метаболитов, присутствующих в живых организмах, в т.ч. метаболитов лекарственных и вредных веществ) [12–14] и др. Работы в традиционных для масс-спектрометрии областях — изотопном и элементном анализе,

определении/исследовании летучих органических соединений — продолжают в заметных пропорциях (в совокупности не менее ~ 20 %, см. рис. 3), но многие из этих направлений, если исходить из относительных темпов их развития и научной значимости соответствующих проблем, сейчас нельзя назвать лидирующими.

Фронт исследований

Исследования в новых быстроразвивающихся областях называют исследованиями переднего края или «фронтом исследований» («research front», см. [15–17]). Соответствующие текущие публикации включают ссылки на высокоцитируемые научные статьи, которые в свою очередь позволяют выявить тематическую структуру фронта исследований. В информационном смысле фронт исследований представляет собой группу статей, на которые часто ссылаются, и соответствующие цитирующие статьи, которые содержат эти ссылки (наибольшее значение в таком наукометрическом анализе приобретают группы высокоцитируемых статей) [15–17]. Соответственно, исследование переднего края можно характеризовать по обеим группам публикаций.

В табл. 1 приведены статьи по масс-спектрометрии, опубликованные и наиболее цитируемые в разное время: в 1975–2005 гг., 2001–2005 гг. и 2005 г. В эти современные периоды времени интенсивно развивалась и продолжает развиваться масс-спектрометрия нелетучих биоорганических соединений. Данному обстоятельству соответствует большое число ссылок на некоторые из основных начальных публикаций по новым методам ионизации: ЭР (I.1 и

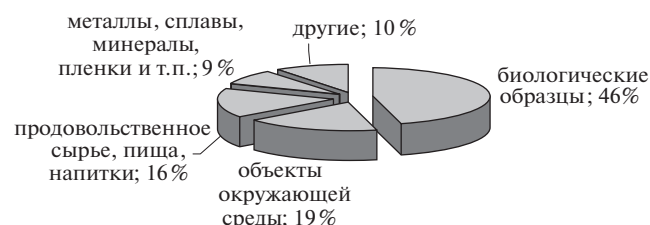


Рис. 2. Распределение масс-спектрометрических публикаций 2005 г. по видам анализируемых (изучаемых) образцов (матриц).

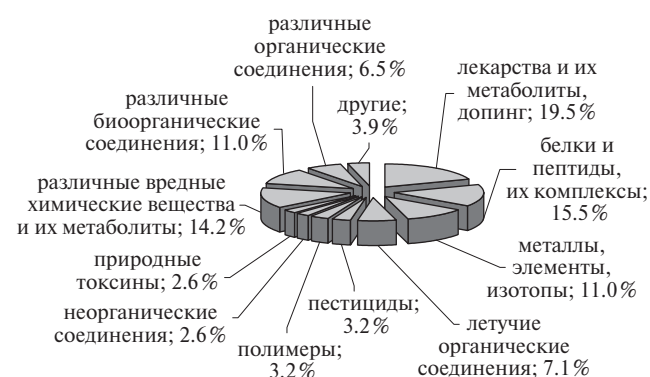


Рис. 3. Распределение масс-спектрометрических публикаций 2005 г. по группам определяемых (исследуемых) соединений. Их классификация условна. Вещества с небольшой долей статей (как правило, доли процента) объединены в три группы «различных» соединений.

Таблица 1. Наиболее цитируемые публикации по масс-спектрометрии^{а,б}.

Статьи	Число ссылок
I. Публикации и цитирование в 1975–2005 гг.	
I.1. J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, <i>et al.</i> , «Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules», <i>Science</i> 246 (4926), 64–71 (1989).	2358
I.2. A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, <i>et al.</i> , «Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels», <i>Anal. Chem.</i> 68 , 850–858 (1996).	2006
I.3. F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, <i>et al.</i> , «Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of biopolymers», <i>Anal. Chem.</i> 63 , A1193–A1202 (1991).	1208
I.4. M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, <i>et al.</i> , «Fast atom bombardment of solids (FAB) — A new ion-source for mass-spectrometry», <i>J. Chem. Soc. Chem. Commun.</i> 325–327 (1981).	1069
I.5. Y. Ho, A. Gruhler, A. Heilbut, <i>et al.</i> , «Systematic identification of protein complexes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by mass spectrometry», <i>Nature</i> 415 (6868), 180–183 (2002).	951
I.6. R.D. Smith, J.A. Loo, C.G. Edmonds, <i>et al.</i> , «New developments in biochemical mass-spectrometry — Electrospray ionization», <i>Anal. Chem.</i> 62 , 882–899 (1990).	927
I.7. D.N. Perkins, D.J.C. Pappin, D.M. Creasy, <i>et al.</i> , «Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data», <i>Electrophoresis</i> 20 , 3551–3567 (1999).	869
I.8. M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaeve, <i>et al.</i> , «Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry», <i>Nature</i> 379 , 466–469 (1996).	798
I.9. D.F. Hunt, R.A. Henderson, J. Shabanowitz, <i>et al.</i> , «Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass-spectrometry», <i>Science</i> 255 , 1261–1263 (1992).	787
I.10. E. Bard, B. Hamelin, R.G. Fairbanks, <i>et al.</i> , «Calibration of the C-14 timescale over the past 30 000 years using mass-spectrometric U-Th ages from Barbados corals», <i>Nature</i> 345 , 405–410 (1990).	759
II. Публикации и цитирование в 2001–2005 гг.	
II.1. Y. Ho, A. Gruhler, A. Heilbut, <i>et al.</i> , «Systematic identification of protein complexes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by mass spectrometry», <i>Nature</i> 415 , 180–183 (2002).	951
II.2. R. Aebersold, M. Mann, «Mass spectrometry-based proteomics», <i>Nature</i> 422 , 198–207 (2003).	544
II.3. S.B. Ficarro, M.L. McClelland, P.T. Stukenberg, <i>et al.</i> , «Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> », <i>Nature Biotechnol.</i> 20 , 301–305 (2002).	358
II.4. M. Mann, R.C. Hendrickson, A. Pandey, «Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry», <i>Ann. Rev. Biochem.</i> 70 , 437–473 (2001).	322
II.5. R. Aebersold, D.R. Goodlett, «Mass spectrometry in proteomics», <i>Chem. Rev.</i> 101 , 269–295 (2001).	309
II.6. D.K. Han, J. Eng, H.L. Zhou, <i>et al.</i> , «Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry», <i>Nature Biotechnol.</i> 19 , 946–951 (2001).	299
II.7. J.M. Peng, J.E. Elias, C.C. Thoreen, <i>et al.</i> , «Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: The yeast proteome», <i>J. Proteome Res.</i> 2 , 43–50 (2003).	185
II.8. A. Keller, A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, <i>et al.</i> , «Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search», <i>Anal. Chem.</i> 74 , 5383–5392 (2002).	173
II.9. J.N. Adkins, S.M. Varnum, K.J. Auberry, <i>et al.</i> , «Toward a human blood serum proteome — Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry», <i>Mol. Cell. Proteomics</i> 1 , 947–955 (2002).	153
II.10. K.H. Buetow, M. Edmonson, R. MacDonald, <i>et al.</i> , «High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry» <i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i> 98 , 581–584 (2001).	152
III. Публикации и цитирование в 2005 г.	
III.1. O.J. Semmes, Z. Feng, B.L. Adam, <i>et al.</i> , «Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of prostate cancer: I. Assessment of platform reproducibility», <i>Clin. Chem.</i> 51 , 102–112 (2005).	30
III.2. W.J. Qian, T. Liu, M.E. Monroe, <i>et al.</i> , «Probability-based evaluation of peptide and protein identifications from tandem mass spectrometry and SEQUEST analysis: The human proteome», <i>J. Proteome Res.</i> 4 , 53–62 (2005).	19
III.3. J. Reinders, U. Lewandrowski, J. Moebius, <i>et al.</i> , «Challenges in mass spectrometry-based proteomics», <i>Proteomics</i> 4 , 3686–3703 (2004).	15
III.4. H. Liao, J. Wu, E. Kuhn, <i>et al.</i> , «Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis», <i>Arthritis and Rheumatism</i> 50 , 3792–3803 (2004).	14
III.5. X.L. Han, R.W. Gross, «Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples», <i>Mass Spectrom. Rev.</i> 24 , 367–412 (2005).	13
III.6. B. Bogdanov, R.D. Smith, «Proteomics by FTICR mass spectrometry: Top down and bottom up», <i>Mass Spectrom. Rev.</i> 24 , 168–200 (2005).	11
III.7. L. Johnson, S. Mollah, B.A. Garcia, <i>et al.</i> , «Mass spectrometry analysis of <i>Arabidopsis</i> histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications», <i>Nucleic Acids Res.</i> 32 , 6511–6518 (2004).	11
III.8. K.M. Loyet, J.T. Stults, D. Arnott, «Mass spectrometric contributions to the practice of phosphorylation site mapping through 2003 — A literature review», <i>Mol. Cell. Proteomics</i> 4 , 235–245 (2005).	10
III.9. J. Castro-Perez, R. Plumb, J.H. Granger, <i>et al.</i> , «Increasing throughput and information content for in vitro drug metabolism experiments using ultra-performance liquid chromatography coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer», <i>Rapid Commun. Mass Spectrom.</i> 19 , 843–848 (2005).	10
III.10. G.J. Van Berkel, M.J. Ford, M.A. Deibel, «Thin-layer chromatography and mass spectrometry coupled using desorption electrospray ionization», <i>Anal. Chem.</i> 77 , 1207–1215 (2005).	10

^а Библиографические описания — по указанной базе данных. ^б Статьи, не содержащие в заголовках словосочетание «mass spectrometry» и родственные термины, очевидно, не попадают в эти списки.

Таблица 2. Распределение статей по 10 основным областям.

Ранг	Наука, научная область	Публикации 2005 г., %	
		Фронт исследований, связанный с масс-спектрометрией ^a	Все масс-спектрометрические публикации (ранг)
1	Методы биохимических исследований	21.3	14.1 (2)
2	Биохимия и молекулярная биология	15.4	6.0 (4)
3	Аналитическая химия	15.4	32.9 (1)
4	Медицинская лабораторная техника	5.9	2.9 (6)
5	Спектроскопия	5.3	12.8 (3)
6	Клеточная биология	3.7	0.4 (21)
7	Биофизика	3.2	2.2 (10)
8	Биотехнология и прикладная микробиология	3.2	0 (> 40)
9	Науки о растениях	3.2	0 (> 40)
10	Онкология	2.7	0 (> 40)

^a 145 публикаций, содержащих ссылки на высокоцитируемые публикации 2005 г., табл. 1.

I.6, табл. 1), MALDI (I.3) и ББА (I.4, к настоящему времени применение этого метода сократилось). Составная часть этой широкой исследовательской и аналитико-практической области — масс-спектрометрия пептидов и белков (половина высокоцитируемых публикаций 1975–2005 гг. — I.2, I.5, I.7–I.9).

Фронт исследований, связанный с белками, становится доминирующим в период 2001–2005 гг., на что указывают девять из десяти высокоцитируемых статей этих лет (табл. 1). Соответствующие термины «протеом» и «протеомика» попадают в назва-

ния шести публикаций. Статьи в этой области преобладают и в списке тех публикаций 2005 г., которые быстро «набрали» ссылок в этом же году: III.1–III.4, III.6–III.8 (табл. 1).

Статьи, содержащие ссылки на высокоцитируемые публикации, можно рассматривать как развитие и применение методов и подходов, изложенных в этих публикациях. Поэтому неудивительно, что исследовательский фронт 2005 г., описываемый по цитирующим статьям, также в основном относится к биологии и медицине (табл. 2). Доля медико-биологических публикаций от общего числа статей в 2005 г. выше в случае «фронтальных» цитирующих работ (73 %, см. табл. 2) по сравнению с общим массивом масс-спектрометрических публикаций (32 %). При этом многие цитирующие публикации выходят за пределы «чистой» масс-спектрометрии: акцент в них сделан, например, на получаемых биохимических данных, а не на особенностях применяемых аналитических методов

Рынок масс-спектрометров

Различные комбинации масс-анализаторов, источников ионов и систем разделения/вывода пробы в масс-спектрометр приводят к многочисленным типам приборов. В табл. 3 перечислены основные типы выпускаемых масс-спектрометров. Наиболее популярными в настоящее время являются:

- в молекулярном анализе — газовые (преимущественно ионизация электронами) и жидкостные (преимущественно образование ионов при ЭР) хроматомасс-спектрометры, масс-спектрометры с MALDI;
- в элементном анализе — приборы с ионизацией в индуктивно-связанной плазме.

Таблица 3. Основные типы масс-спектрометров.

№	Тип масс-спектрометра	Комментарии
1	Газовые хроматографы/масс-спектрометры	Сравнительно простые, компактные и недорогие приборы, до последнего времени — наиболее распространенные в молекулярном анализе
2	Жидкостные хроматографы/масс-спектрометры общего назначения	Значимость этих приборов (обычное разрешение) в молекулярном анализе нелетучих биологических соединений резко возросла. Спрос ^a на различные приборы в 2002 г. уменьшался в следующей последовательности: тройные квадрупольные масс-анализаторы (33 %) > ионные ловушки (17 %) > простые квадрупольные масс-анализаторы (15 %)
3	Жидкостные хроматографы/масс-спектрометры высокого разрешения	Значимость этих приборов в молекулярном анализе нелетучих биологических соединений также резко возросла. Спрос ^a на различные приборы в 2002 г. уменьшался в следующей последовательности: комбинация квадрупольного и время-пролетного масс-анализатора (19 %) > другие время-пролетные приборы (9 %) > масс-спектрометры с преобразованием Фурье (5 %)
4	Тандемный масс-спектрометр: комбинация квадрупольного и время-пролетного масс-анализатора	В сочетании с жидкостными хроматографами — наиболее популярные (хотя и дорогие) тандемные масс-спектрометры высокого разрешения (см. выше)
5	Матричная лазерная десорбция (MALDI), время-пролетный масс-анализатор	Распространенные приборы для молекулярного анализа нелетучих биологических соединений; высокое разрешение
6	Масс-спектрометры с преобразованием Фурье (ионно-циклотронный резонанс)	Наиболее дорогие приборы; высокоточные измерения массы (очень высокое разрешение); приборы сочетаются с хроматографами, используются различные методы ионизации
7	Масс-спектрометры с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС)	Наиболее распространенные современные масс-спектрометры для элементного анализа
8	Приборы с магнитным сектором	Во многом приборы исторического значения
	Другие	Анализаторы поверхности, производственные масс-спектрометры, портативные масс-спектрометры, анализаторы остаточного газа, детекторы течи

^a Указана доля рынка всех приборов для ЖХ/МС [4].

Кратко рассмотрим различные типы приборов для молекулярного анализа.

Газовые и жидкостные хроматографы/масс-спектрометры. Реальные пробы, содержащие органические соединения, в значительном большинстве случаев представляют собой сложные смеси. Поэтому масс-спектрометрическое определение отдельных веществ требует их предварительного разделения в хроматографической колонке, т.е. необходимо сочетание масс-спектрометров с газовыми (летучие и полунлетучие соединения) или жидкостными (нелетучие вещества, к которым относятся большинство биоорганических веществ) хроматографами.

Еще в 2000 г. суммы продаж приборов для ГХ/МС были на 40 % выше, чем продажи их жидкостных аналогов (ЖХ/МС) [5]. Начиная с 2004 г., по-видимому, доля продаж жидкостных хроматографов/масс-спектрометров становится выше доли указанных газовых комбинированных приборов (оценка по данным [3–5]). Рынок ЖХ/МС растет быстрее рынка масс-спектрометров в целом (12–15 % в год против 11 % к 2001 г. [5]). В настоящее время, по приблизительным оценкам, на ЖХ/МС приходится не менее трети рынка масс-спектрометров (рис. 4). В случайной выборке публикаций 2005 г. доля статей, в которых применяли метод ЖХ/МС, превышает соответствующий показатель для ГХ/МС, но неясно, насколько это соотношение справедливо для полного массива

Таблица 4. Распределение публикаций 2005 г. по типу масс-спектрометров.

Характеристика приборов	Публикации, % ^a
Типы приборов:	
газовые хроматографы/масс-спектрометры	22
жидкостные тандемные хроматографы/масс-спектрометры	20
тандемные хроматографы/масс-спектрометры	10
жидкостные хроматографы/масс-спектрометры	9
другие	6
не указаны	34
Масс-анализаторы:	
время-пролетные	12
ионные ловушки	4
масс-спектрометры с преобразованием Фурье	3
тандемные: квадрупольный – время-пролетный	2
простые квадрупольные	2
другие	5
не указаны	73
Методы ионизации:	
электрораспыление	26
лазерная десорбция и ионизация (MALDI и другие методы)	9
ионизация электронами	7
индуктивно-связанная плазма	5
химическая ионизация	3
химическая ионизация при атмосферном давлении	3
фотоионизация при атмосферном давлении	2
другие	3
не указаны	42

^a Случайная выборка, 150 статей (рефератов).

публикаций (в 1/3 анализируемых источников информации не указан тип прибора, см. табл. 4; это может быть источником неопределенности при оценках).

Тандемные масс-спектрометры. Во многих случаях комбинация масс-спектрометров в пространстве (сочетание квадрупольных масс-анализаторов между собой и с другими анализаторами, например, время-пролетными) и во времени (ионные ловушки, масс-спектрометры с преобразованием Фурье) обеспечивает (по сравнению с «одиночными» приборами) [18]:

- увеличение отношения сигнал:шум,
- разделение сигналов различных веществ,
- лучшую воспроизводимость масс-спектров,
- большой объем структурной информации.

Поэтому такие приборы широко применяют в настоящее время. Жидкостные хроматографы/масс-спектрометры в наибольшей степени комплектуются именно тандемными масс-спектрометрами (см. табл. 3). На тандемные масс-спектрометры и хроматомасс-спектрометры приходится не менее 30 % публикаций 2005 г. (табл. 4).

Масс-спектрометры высокого разрешения. Их применение позволяет разделить пики многих изобарных (при низком разрешении) ионов, точно измерить молекулярную массу и тем самым резко сократить число гипотез в отношении природы определяемых веществ, увеличить точность и правильность количественного определения многих аналитов. Современные приборы этого типа включают чаще всего время-пролетные масс-анализаторы (см. табл. 3). В публикациях 2005 г. на этот тип приборов приходится наивысший процент тех статей, в которых конкретно указан тип масс-анализатора; затруднительно, однако, экстраполировать эту долю на полную выборку статей, так как в большинстве рефератов

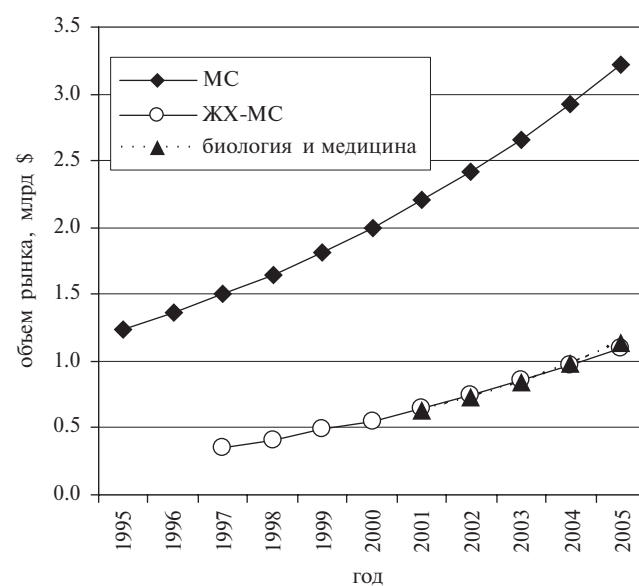


Рис. 4. Оценка тенденции рынка масс-спектрометров по данным [3–7]. Отдельно показана динамика продаж жидкостных хроматографов/масс-спектрометров и масс-спектрометров для биологии и медицины (совпадение двух кривых – случайное). Данные последних лет основаны на более ранних прогнозах.

статей не указан тип прибора (табл. 4). Рынок время-пролетных масс-спектрометров для анализа белков растет на 10–15 % в год [5], что, по-видимому, немного превышает темп роста продаж масс-спектрометров в целом (см. выше). Некоторые типы приборов имеют еще более высокое разрешение (табл. 3).

Масс-спектрометры в биологии и медицине. Протеомика [10, 11], фармацевтика [19–21] и метаболомика [12–14] — новые или сравнительно новые области применения масс-спектрометрии, которые во многом определяют ее развитие в целом. На медицину и биологию приходится приблизительно треть продаж масс-спектрометров (рис. 4). Рост продаж приборов рассматриваемого применения оказывается, по-видимому, наиболее высоким для масс-спектрометрии (15–16 % в год [6]).

На четыре типа приборов приходится 80 % рынка биомедицинских масс-спектрометров [8]. Это тандемные приборы обычного разрешения:

— тройные квадрупольные приборы,

— ионные ловушки

и приборы высокого разрешения:

— масс-спектрометры с MALDI и время-пролетным масс-анализатором,

— комбинация квадрупольного и время-пролетного масс-анализаторов.

В трех из четырех случаев основным методом ионизации является электрораспыление. Последние два типа масс-спектрометров — наиболее распространенные в биотехнологии; на первый из них (лазерная десорбция) приходится 30 % спроса [9].

Заключение

Для современной масс-спектрометрии характерны:

1. широкое применение в области биологии и медицины (науки о жизни, биотехнология, фармацевтика), прежде всего — в протеомике;

2. рост продаж и применения жидкостных хроматографов/масс-спектрометров (ионизация электрораспылением) и масс-спектрометров с лазерной десорбцией (MALDI) — в соответствии с первой из указанных тенденций;

3. существенный сектор рынка аппаратуры, приходящийся на тандемные масс-спектрометры и приборы высокого разрешения.

Благодарности

Авторы выражают благодарность коллегам из Центра масс-спектрометрических данных (Национальный институт стандартов и технологии, США) за предоставленную возможность доступа к базе данных «Science Citation Index Expanded».

Список литературы

1. T.V.N. Kumar, What is happening with world laboratory analytical instrumentation market. 03.06.2005; <http://www.frost.com/prod/servlet/market-insight-top.pag?docid=39513049>
2. G. Wells, Market segment focus — OEM/end-user in the analytical instrument industry. Extended Abstract of Presentation at the 1999 AVEM Fall Seminar; <http://www.avem.org/InformationExchangeF/00spectrumF/00spec2.html>
3. Strategic Directions International, Inc. Mass Spectrometry: Ultra High Performance and Innovation Reshape the Market. Los Angeles, 2005; <http://www.strategic-directions.com/apps/reports/index.cfm?action=detail&sdi=-1388986197>
4. Strategic Directions International, Inc. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS): A Plethora of Hyphenated Techniques Addressing a Challenging Market Environment. Los Angeles, 2003; <http://www.strategic-directions.com/pdf/LCMS03%20Promo.pdf>
5. D. Filmore. *Mass (spec) growth. Today's Chemist at Work.* **10**, 45 (2001); <http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/10/i10/html/10indu.html>
6. A. Wellstein. Everybody's darling — mass spectrometry. Inside-Lifescience 11.11. 2002; <http://www.bionews.net/B/5/141CD705-001.htm!ArcEntryInfo=0004.67.I41CD705>
7. Mass Spectrometry Market Expansion Forecast. Photonics Spectra. 13.04.2004; <http://www.photonics.com/content/news/2004/April/13/62104.aspx>
8. Proteomics Mass Spectrometry Market Survey. Laboratory-talk 04.06.2003; <http://www.laboratorytalk.com/news/fro/fro159.html>
9. HighBeam Research, Inc. Market profile: mass spectrometry in biotechnology. 01.06.2004; <http://www.highbeam.com/doc/1G1:118445983/Market+profile%7eC%7e+mass+spectrometry+in+biotechnology.html>
10. R. Aebersold, D.R. Goodlett, «Mass spectrometry in proteomics», *Chem. Rev.* **101**, 269–295 (2001).
11. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, Eds. M. Kinter, N.E. Sherman, Wiley, New York, 2000.
12. V.V. Tolstikov, O. Fiehn, «Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry», *Anal. Biochem.* **301**, 298–307 (2002).
13. P. Jonsson, J. Gullberg, A. Nordstrom, M. Kusano, M. Kowalczyk, M. Sjostrom, T. Moritz, «A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS», *Anal. Chem.* **76**, 1738–1745 (2004).
14. J.E. Katz, D.S. Dumlaio, S. Clarke, J. Hau, «A new technique (COMSPARI) to facilitate the identification of minor compounds in complex mixtures by GC/MS and LC/MS: Tools for the visualization of matched datasets», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 580–584 (2004).
15. H. Small, E. Sweeney, «Clustering the science citation index using co-citation I. A Comparison of methods», *Scientometrics* **7**, 391–409 (1985).
16. H. Small, E. Sweeney, E. Greenlee, «Clustering the science citation index using co-citation II. Mapping science», *Scientometrics* **8**, 311–340 (1985).
17. H. Small, E. Garfield, «The geography of science: Disciplinary and national mappings», *J. Inform. Sci.* **11**, 147–159 (1985).
18. K.L. Bush, G.L. Glish, S.A. McLuckey, *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications in Tandem Mass Spectrometry*, New York, VCH Publishers, 1988.
19. J. Ermer, M. Vogel, «Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis», *Biomed. Chromatogr.* **14**, 373–383 (2000).
20. Y.H. Wu, «The use of liquid chromatography-mass spectrometry for the identification of drug degradation products in pharmaceutical formulations», *Biomed. Chromatogr.* **14**, 384–396 (2000).
21. S. Gorog, «Chemical and analytical characterization of related organic impurities in drugs», *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 852–862 (2003).

Масс-спектрометрическая идентификация высокотоксичных алкилфторфосфонатов

А.Т. Лебедев^{*а}, К.С. Лебедев^б, Б.Ф. Мясоедов^в, И.В. Рыбальченко^в,
Г.И. Сигейкин^в, В.Н. Суворкин^г

^а Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Ленинские горы 1, строение 3, 119992 Москва, Россия.
E-mail: Lebedev@org.chem.msu.ru

^б Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Новомосковский институт, ул. Дружбы 8, 301665 Новомосковск, Тульской обл., Россия. E-mail: KLebedev.AnChem@nirhtu.ru

^в Межведомственный центр аналитических исследований в области физики, химии и биологии при Президиуме РАН, ул. Вавилова 44, 117333 Москва, Россия.
E-mail: mzairan@ipiran.ru; riv@lumex.ru

^г ООО «ИНТЕРЛАБ», Тухвинский пер. 11, строение 2, 127055 Москва, Россия.
E-mail: suvorkin@interlab.ru

Поступила в редакцию 15.09.2006 г.

Основной задачей химико-аналитического контроля при уничтожении химического оружия является необходимость идентификации близких по строению высокотоксичных соединений в составе обширных гомологических рядов. Сложность идентификации обусловлена большим количеством возможных структур таких соединений с близкими спектральными признаками, что требует разработки специальных подходов к интерпретации аналитических данных. Анализ масс-спектров, полученных с использованием ионизации электронами, более 150 О-алкил-алкилфторфосфонатов позволил установить особенности их масс-спектрометрического поведения и разработать подход к детектированию и групповой идентификации этих соединений. Предложенный алгоритм идентификации позволяет не только установить принадлежность образца к О-алкил-алкилфторфосфонатам, но и отнести его к конкретной подгруппе этих опасных токсикантов.

Ключевые слова: алкилфторфосфонаты, ионизация электронами, масс-спектр, идентификация

The main analytical task referred to the control of chemical warfare destruction deals with the identification of highly toxic isomeric compounds belonging to wide homologous rows. The complexity of the task involves a notable array of possible structures with similar spectral characteristics. The latter requires development of special approaches to interpret analytical data. Electron ionization mass spectra of 150 O-alkyl alkylfluorophosphonates were analyzed to clarify peculiarities of their fragmentation and to create a methodology of reliable detection of these compounds, as well as group identification. The proposed algorithm allows referring of the sample to a certain group inside the class of these hazardous toxicants.

Keywords: alkylfluorophosphonates, electron ionization, mass spectrum, identification

Введение

Мероприятия химико-аналитического контроля в рамках многосторонней Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении (далее Конвенция), принятая в Париже в 1993 г. [1], представляют собой сложный комплекс задач, связанных с идентификацией и количественным определением отравляющих веществ в чрезвычайно загрязненных и сложных по составу пробах. Вещества, подлежащие контролю, включены в Списки Конвенции, причем основная часть высокотоксичных веществ представляет собой производные алкилфосфоновых кислот. Для точного расчета количества неизоморфных структур гомологических рядов алкилфторфосфонатов,

подлежащих идентификации, был модифицирован программный продукт [2], позволяющий по заданной брутто-формуле рассчитывать число различных изомеров фосфорорганических соединений этой группы. После расчета общего количества структуры были сгенерированы в виде молекулярных графов, записаны в общепринятом формате в виде файла и переведены в химическую базу данных структур. Например, пункт А.1. Списка 1 Конвенции [О-алкил-(\leq C10, включая циклоалкил)-алкил (Me, Et, *n*-Pr или *изо*-Pr)фторфосфонаты] содержит 24596 соединений. Столь значительная цифра обусловлена большим количеством теоретически возможных углеводородных радикалов, соединенных с атомом кислорода — 6149, умноженным на количество углеводородных ради-

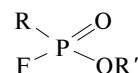
калов, соединенных с атомом фосфора — 4. Общее теоретически возможное число фосфорорганических соединений, исходя из Списков Конвенции, может насчитывать миллионы [3, 4]. Для решения задачи такой сложности и объема в лабораториях различных стран мира используются современные физико-химические методы анализа, среди которых наиболее эффективным по специфичности и чувствительности признана масс-спектрометрия.

Современная масс-спектрометрия представляет собой эффективный метод исследования состава, строения, термодинамических и кинетических свойств веществ, находящихся в любом агрегатном состоянии. Высокая чувствительность, большой объем получаемой информации, почти универсальная применимость обусловили чрезвычайно бурный рост широты и разнообразия приложений масс-спектрометрических методов. Этому в немалой степени способствовало развивавшееся в течение последних 20–25 лет все более активное применение вычислительной техники для целей регистрации и обработки масс-спектрометрических данных. Благодаря универсальности и воспроизводимости именно спектры, полученные при использовании ионизации электронами, стали основой компьютерных библиотек масс-спектров. Наиболее эффективной в настоящее время является масс-спектральная библиотека NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, очередная версия которой NIST05 выпущена в 2005 г. В нее включено 190 825 спектров для 163 198 соединений. Кроме того, она содержит 120 786 литературных и оценочных величин газохроматографических индексов удерживания для 25 728 соединений, а также 5 191 спектр МС/МС для 1920 исходных ионов. Тем не менее, лишь несколько сотен спектров ионизации электронами фосфорорганических соединений содержится в современных компьютерных библиотеках, в частности, в Центральной аналитической базе данных Организации по запрещению химического оружия [5, 6]. В силу рассмотренных выше обстоятельств актуальным является решение задачи создания библиотек масс-спектральных данных, полученных путем расчета с точностью, необходимой для достоверной идентификации любого из соединений этого ряда.

Результаты и их обсуждение

Установление структуры соединения обычно является конечной целью качественного анализа. Однако, как показывает практика, при идентификации соединений с неизвестной структурой достижение этой цели не всегда оказывается возможным. В этом случае качественный анализ обычно сводится к определению принадлежности соединения к известной таксономической единице — классу или гомологическому ряду. При идентификации соединений по масс-спектрам ионизации электронами для этих целей используется подход, базирующийся на установлении механизмов фрагментации и набора масс осколочных ионов, характерных для определенной таксономической единицы, которые в дальнейшем используются для интерпретации спектра неизвестного соединения.

Таблица 1. Варианты исследованных структур О-алкил-алкилфторфосфонатов



Структура углеводородного радикала R'	Структура углеводородного радикала R			
	метил	этил	пропил	изопропил
Метил (CH ₃)	+	+	+	+
Этил (C ₂ H ₅)	+	+	–	+
Пропил (C ₃ H ₇)	+	+	+	+
Изопропил (C ₃ H ₇)	+	+	+	+
Бутил (C ₄ H ₉)	+	+	+	+
1-Метилпропил (C ₄ H ₉)	+	+	+	+
2-Метилпропил (C ₄ H ₉)	+	+	+	+
Пентил (C ₅ H ₁₁)	+	+	–	–
2-Метилбутил (C ₅ H ₁₁)	+	+	+	–
3-Метилбутил (C ₅ H ₁₁)	+	+	+	–
Циклопентил (C ₅ H ₉)	+	+	+	+
Гексил (C ₆ H ₁₃)	+	+	+	+
2-Метилпентил (C ₆ H ₁₃)	+	+	+	–
1,2,2-Триметилпропил (C ₆ H ₁₃)	+	–	–	–
Циклогексил (C ₆ H ₁₁)	+	+	+	+
Гептил (C ₇ H ₁₅)	+	+	+	+
3-Метилциклогексил (C ₇ H ₁₃)	+	+	+	+
4-Метилциклогексил (C ₇ H ₁₃)	+	+	+	+
Октил (C ₈ H ₁₇)	+	+	+	+
2-Этилгексил (C ₈ H ₁₇)	+	+	+	+
1-Метилгептил (C ₈ H ₁₇)	+	+	+	+
Нонил (C ₉ H ₁₉)	+	+	+	–
Децил (C ₁₀ H ₂₁)	+	+	+	+
2-Метоксиэтил (C ₃ H ₇ O)	+	+	–	–
2-Этоксиэтил (C ₄ H ₉ O)	+	+	–	–

В качестве таксономических единиц для О-алкил-алкилфторфосфонатов были выбраны четыре гомологических ряда: О-алкил-метилфторфосфонаты, О-алкил-этилфторфосфонаты, О-алкил-пропилфторфосфонаты и О-алкил-изопропилфторфосфонаты (табл. 1). С целью выявления закономерностей механизмов фрагментации в ходе работы были экспериментально получены и проанализированы масс-спектры ионизации электронами 94 соединений этих четырех гомологических рядов (рис. 1–4).

Молекулярные ионы алкилфторфосфонатов нестабильны и в спектрах не регистрируются. Максимальное значение m/z имеют ионы $[M - H]^+$, характеризующиеся малоинтенсивными пиками. Позитивным с точки зрения анализа является факт, что фторфосфонатам каждого гомологического ряда характерен определенный набор пиков. В частности, область высоких величин m/z представлена исключительно выбросами алкильных радикалов. Наиболее интенсивные пики в спектрах метилфторфосфонатов обусловлены ионами с m/z 81 и 99; этилфторфосфонатов — m/z 84, 95 и 113; пропилфторфос-

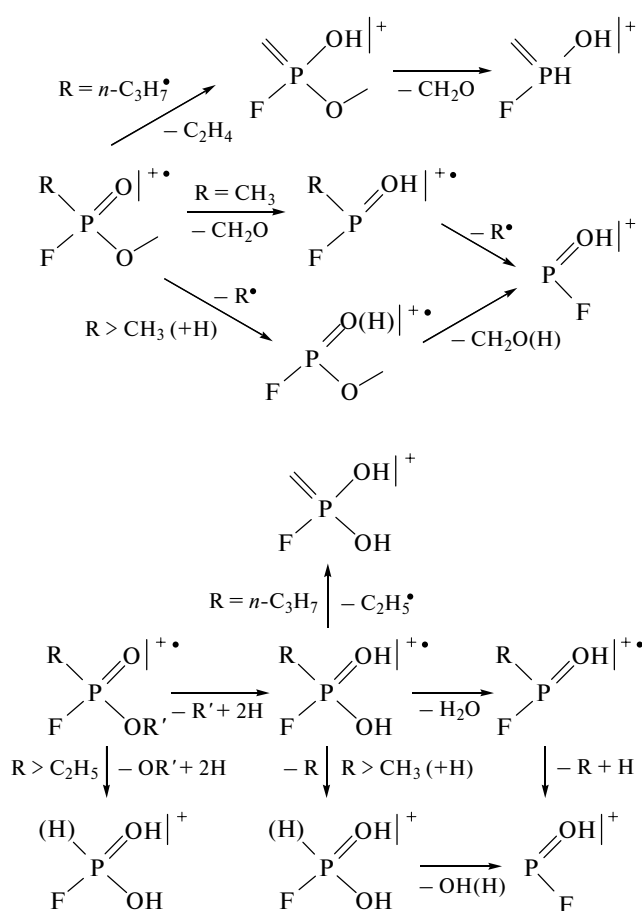


Рис. 1. Основные направления фрагментации О-алкилфторфосфонатов при ионизации электронами.

фонатов — m/z 85, 98, 111 и 127; изопропилфторфосфонатов — m/z 85, 111 и 127. Максимальную интенсивность во всех случаях имеет пик иона А (схема 1, ион m/z 99), образующегося из M^{+} по механизму перегруппировки МакЛафферти +1 с миграцией двух атомов водорода от алкоксигруппы [7]. Для протекания этого процесса необходима длина алкильной цепи не менее этильной, что делает его невозможным только в случае самой фторфосфоновой кислоты или ее О-метильного производного. Интенсивность пика альтернативного иона, обусловленного классической перегруппировкой МакЛафферти (схема 1, ион m/z 98), напротив, незначительна, что отличает исследуемые соединения, например, от алкиловых эфиров карбоновых кислот [7].

Заметную интенсивность имеют пики перегруппировочных ионов с m/z 83, 97, 111 в спектрах производных с метильной, этильной и пропильной группами у атома фосфора соответственно. Механизм образования этих ионов можно представить как двойную перегруппировку атомов водорода в молекулярном ионе. Первая миграция идет по механизму классической перегруппировки МакЛафферти с переносом атома водорода от β -углеродного атома О-алкильного фрагмента на второй атом кислорода. Последующий перенос протона в образовавшемся интермедиате к атому кислорода приводит к основному иону, продукту перегруппировки МакЛафферти +1. Альтернативный процесс связан с миграцией водорода к атому фосфора с разрывом связи Р–О (схема 1, ион m/z 83).

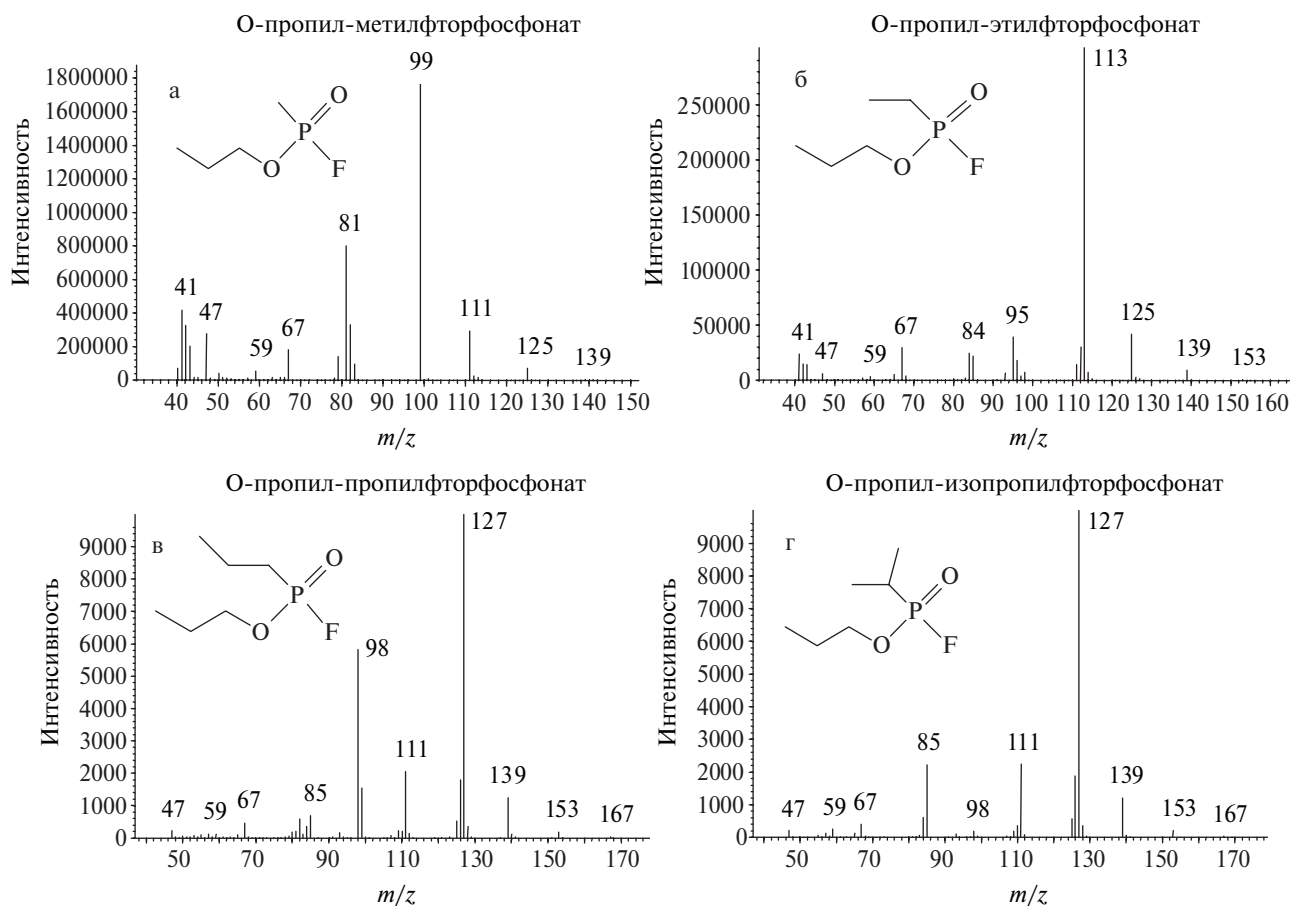
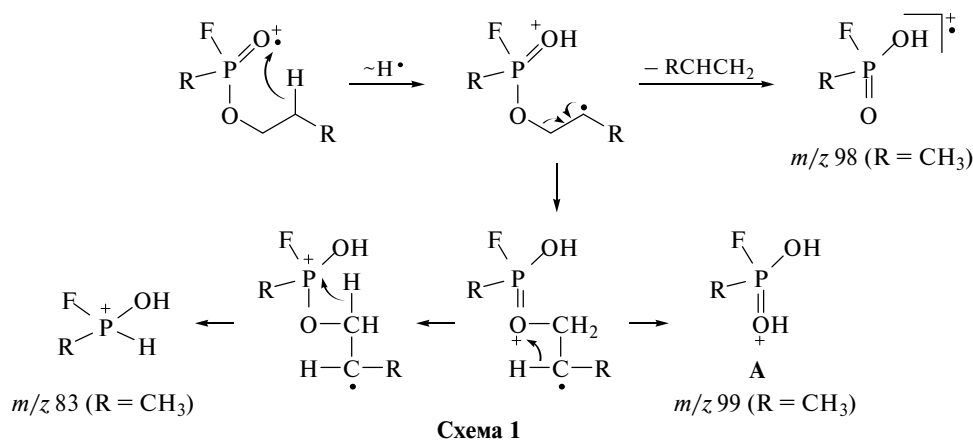


Рис. 2. Примеры масс-спектров О-пропил-алкилфторфосфонатов.



Следует также подчеркнуть, что доля пиков четно-электронных ионов очень низка. Ионы с m/z 84, пики которых присутствуют в спектрах всех изученных фосфонатов за исключением Р-Ме-производных, обусловлены вторичным процессом элиминирования углеводородного радикала от атома фосфора в ионе А. Другим процессом, связанным с ионом А, является выброс гидроксидной группы с образованием ионов с массой 82, 96 и 110 для метильных, этильных и пропильных производных соответственно. В случае О-бутильных производных, повышенную интенсивность имеет пик иона с m/z 56, образующийся в результате перегруппировки МакЛафферти из молекулярного иона с сохранением заряда на бутиленовом фрагменте, энергия ионизации которого сравнима с таковой для альтернативной гетероатомной части исходной молекулы.

Действительно высокую интенсивность имеет только пик четноэлектронных ионов в спектрах О-пропильных производных (m/z 98 на рис. 2в и 4в). Можно предположить два пути его образования: выброс алкильного радикала ионом А, или последовательная, двукратная перегруппировка МакЛафферти по двум алкильным цепям. Поскольку в случае этильной и изопропильной групп у атома фосфора пик соответствующего иона не наблюдается, можно

сделать вывод о реализации двух последовательных перегруппировочных процессов (схема 2). Для этильного и изопропильного производных такой процесс невозможен в связи с недостаточной длиной углеводородной цепи.

Величины m/z фрагментных ионов, более тяжелых по отношению к указанному выше ключевому перегруппировочному иону А, также зависят от вида центрального фрагмента. Их набор и соотношение интенсивностей обусловлено, в основном, структурой фрагмента OR'. На примере спектров, приведенных на рис. 2, видно, что для линейного пропильного радикала характерно отщепление как метильного, так и этильного фрагмента, о чем свидетельствует наличие пиков ионов с m/z 111 и 125 (рис. 2а), m/z 125 и 139 (рис. 2б), 139 и 153 (рис. 2в, 2г). Похожая картина наблюдается и в случае линейного бутильного радикала при отщеплении этильного и пропильного фрагментов, о чем свидетельствуют пики ионов с m/z 111 и 125 (рис. 3а). Отщепление этильного и пропильного радикалов для О-пропил- и О-бутил-фосфонатов достаточно логично, представляя собой типичный процесс α -разрыва связи с сохранением заряда на гетероатоме [7]. Отщепление меньшего по размеру фрагмента в этом случае должно сопровождаться α -разрывом с образованием циклической

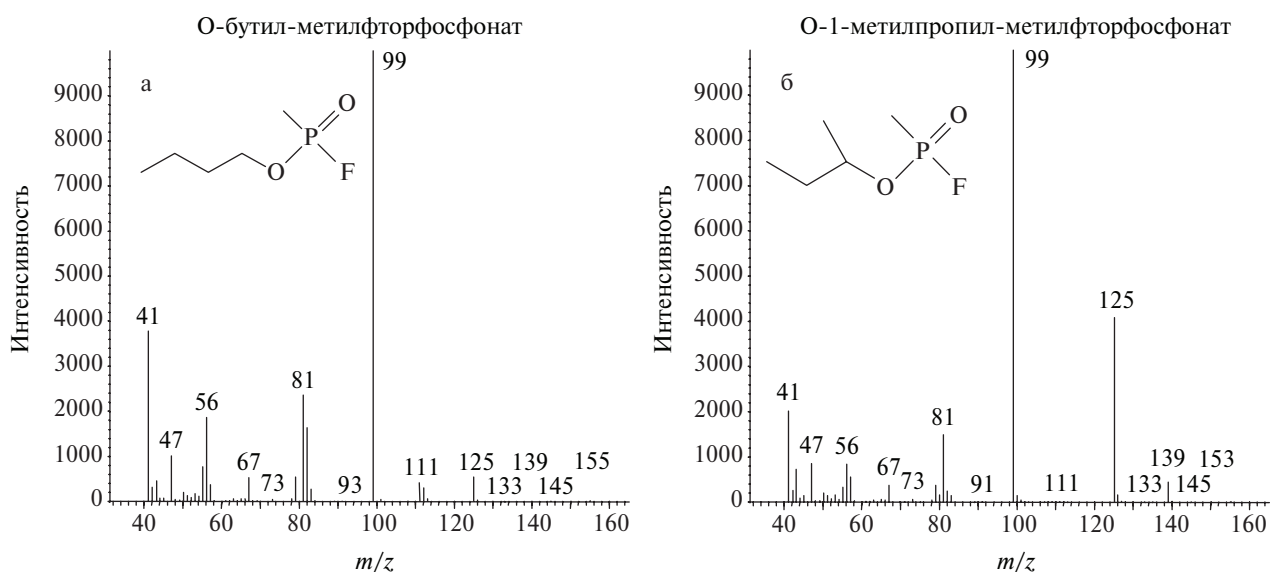


Рис. 3. Примеры масс-спектров метилфторфосфонатов: а — с О-бутильным и б — с О-1-метилпропильным структурным фрагментом.

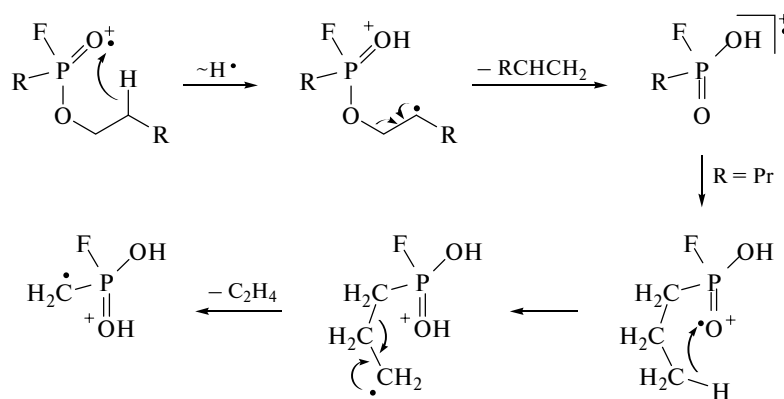


Схема 2

структуры с участием атома фтора или одного из атомов кислорода. Поскольку процессы распада, сопровождающиеся циклизацией очень чувствительны к стерическим факторам, разветвление углеродного скелета O-алкильного фрагмента приводит к подавлению β-разрыва. Доминирующую роль играет α-разрыв.

Интенсивности пиков альтернативных фрагментных ионов подчиняются правилу выброса максимального алкила [7]. Для изопропильных производных выброс метильного радикала полностью доминирует по сравнению с выбросом атома водорода (рис. 4), а для 1-метил-пропильного производного элиминирование этильного радикала значительно выгоднее, чем метильного (рис. 3б).

Общие правила фрагментации молекул с различным строением O-алкильного углеводородного фраг-

мента для рассматриваемых нами производных алкилфосфоновых кислот можно сформулировать следующим образом:

- пики ионов с величинами m/z , близкими к молекулярной массе фосфоната, обусловлены фрагментацией O-алкильных радикалов;
- основной пик во всех спектрах принадлежит иону, образуемому в результате перегруппировки МакЛафферти +1, протекающей с участием O-алкильных радикалов;
- процессы простого разрыва связей в O-алкильных радикалах идут с учетом правила выброса максимального алкила.

Таким образом, общий вид масс-спектра, включая все ионы, характеризующиеся значимыми пиками, определяется, в основном, присутствием в данных со-

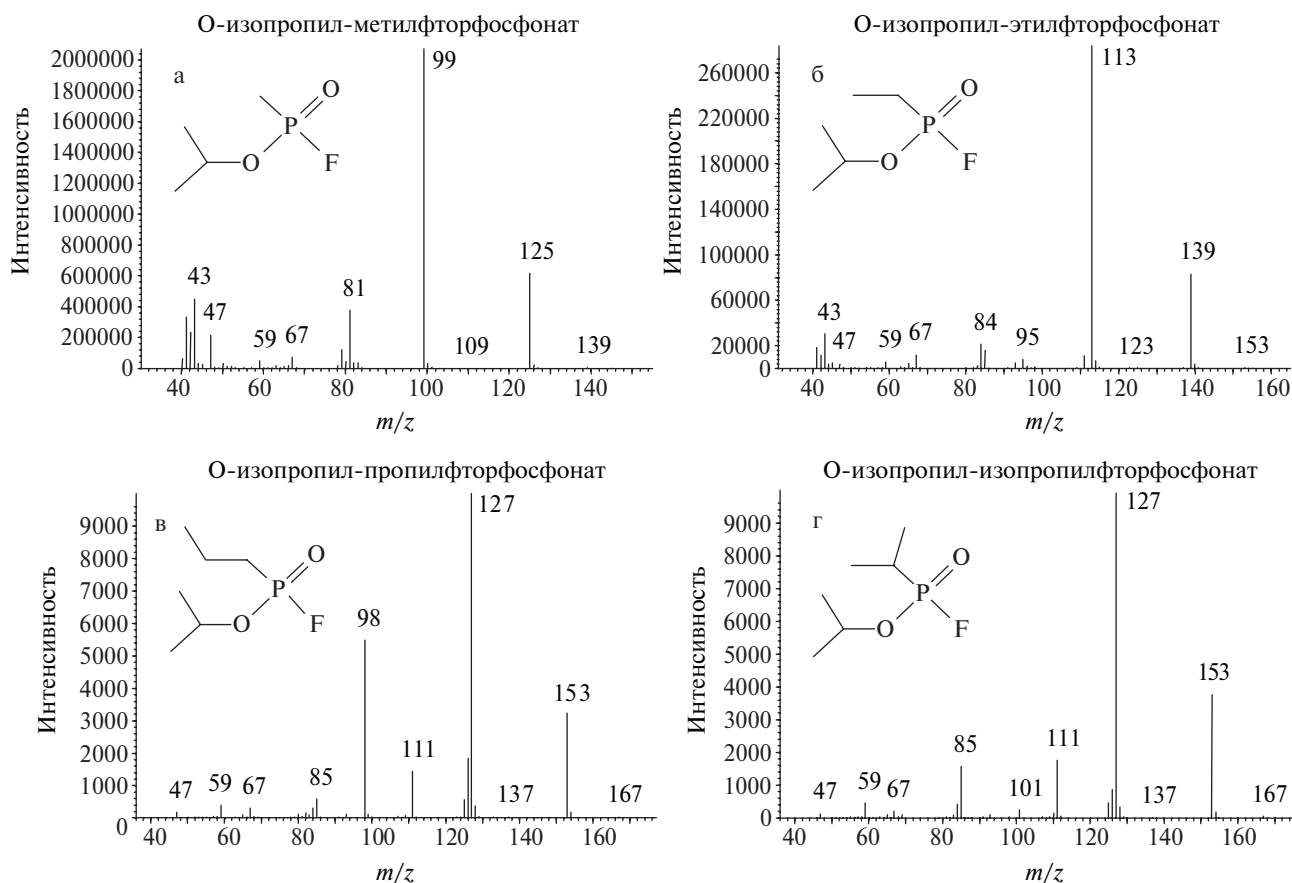
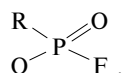


Рис. 4. Примеры масс-спектров O-изопропил-алкилфторфосфонатов.

единениях фрагмента молекулы, который можно описать следующей обобщенной структурной формулой



С учетом описанных выше закономерностей, исследованные соединения были классифицированы и сгруппированы в виде табл. 2. Так как фрагментация первого члена каждого гомологического ряда принципиально отличается от общих закономерностей, то соответствующие соединения выделены в отдельные подгруппы (табл. 2).

Установленные характерные направления распада позволили определить набор специфичных ионов для производных каждого из классов алкилфосфоновых кислот с соответствующими значениями m/z , что необходимо для создания системы детектирования и групповой идентификации исследуемых со-

единений. Известно, что базы знаний и библиотеки подобных систем обычно задаются в виде таблиц соответствий с различной степенью полноты описания или генерируются в виде «решающих правил» программными средствами на обучающих спектроструктурных выборках (с использованием ЭВМ) [8]. Основой разработанного нами подхода к детектированию и групповой идентификации О-алкил-алкилфторфосфонатов является алгоритм классификации, блок-схема которого изображена на рис. 5. Для корректной работы алгоритма каждому массовому числу поставлено в соответствие пороговое значение интенсивности пика. Если интенсивность пика в анализируемом спектре больше соответствующего порогового значения, алгоритм работает по ветви «Да», в противном случае — по ветви «Нет». Величину порогового значения по каждому используемому массовому числу оценивали статистически на выборке

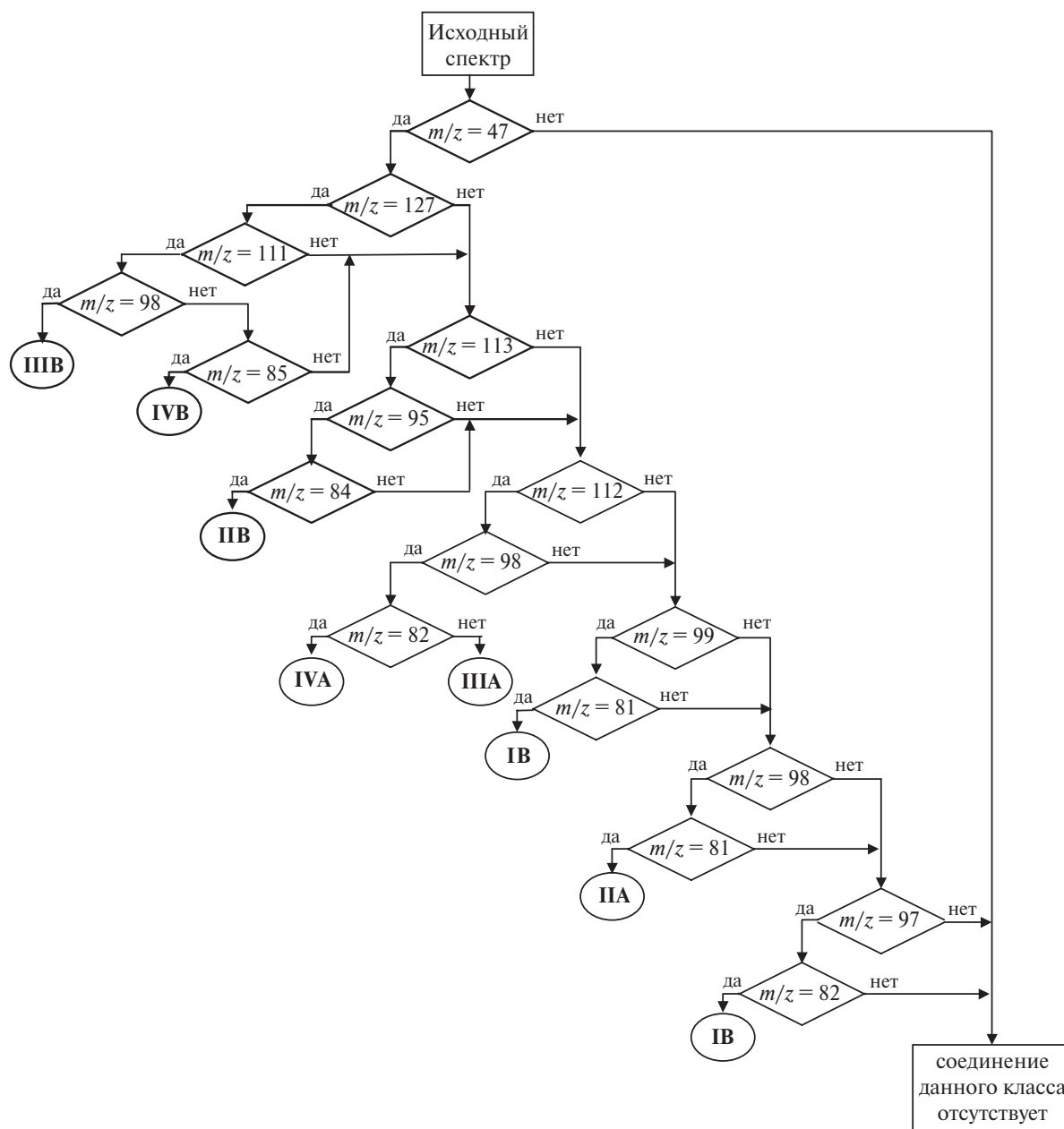


Рис. 5. Блок-схема алгоритма классификации О-алкил-алкилфторфосфонатов по масс-спектрам электронной ионизации.

Таблица 2. Классификация производных алкилфосфоновых кислот с учетом строения углеводородных радикалов по РО–С-связи.

Группа	Подгруппа	
(R = CH ₃)	I A	I B
(R = C ₂ H ₅)	II A	II B
(R = <i>n</i> -C ₃ H ₇)	III A	III B
(R = <i>изо</i> -C ₃ H ₇)	IV A	IV B

из 10–20 спектров по каждой из подгрупп. Данные алгоритмы были реализованы в программной оболочке (для обработки масс-спектров) HP G1034C MSChemStation в виде соответствующих макросов. Достоверность идентификации группы и/или подгруппы соединения(й) (см. табл. 2) с помощью разработанного алгоритма оценивалась по контрольной выборке из 15 соединений по (следующей) формуле [9]:

$$D = 100 RC / (RC + FP) \%,$$

где: *RC* — «recall»; *FP* — «false positive», определяемые выражениями $RC = Ic/Pc$; $FP = If/Pf$; *Ic*, *If* — числа корректных и некорректных предсказаний; *Pc*, *Pf* — общие возможные числа корректных и некорректных предсказаний соответственно, и составила 100%. При этом необходимо отметить, что определяющим фактором в высокой достоверности предсказания предложенным способом является высокая характеристичность масс-спектра(ов) изучаемого класса соединений.

Выводы

Анализ основных направлений фрагментации О-алкил-алкилфторфосфонатов в условиях ионизации электронами позволил разделить их на восемь самостоятельных подгрупп, установить основные пути распада молекулярных ионов этих соединений и создать алгоритм для установления принадлежности

образца к классу О-алкил-алкилфторфосфонатов и отнесения его к соответствующей подгруппе. На базе полученных результатов в перспективе представляется возможной реализация программного продукта для предсказания масс-спектров ионизации электронами для соединений исследуемого ряда.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-03-08163офи.

Список литературы

1. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении, *Собрание законодательства Российской Федерации от 9 декабря 1998 г.*, N 6, статья 682.
2. S.G. Molodtsov, «Computer-aided generation of molecular graphs», *Commun. Math. Chem. (MATCH)* **30**, 213–219 (1994).
3. A.F. Kireev, V.I. Kholstov, E.B. Rodyushkina, I.V. Rybalchenko, V.N. Suvorkin, «Structural identification of alkylphosphonic acids by GC/MS and GC/FTIR», *Proceedings of the 1st Singapore International Symposium on Protection Against Toxic Chemicals (1st SISPAT)*. December, 1998, p. 34.
4. И.В. Рыбальченко, В.И. Цехмистер, А.Ф. Киреев, «Химико-аналитический контроль в рамках Конвенции о запрещении химического оружия», *Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)* **38**, 13–18 (1994).
5. OPCW Central Analytical Database, PDF-OCAD v. 8, e-OCAD v. 6, Technical Secretariat of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, December 2004.
6. *Recommended operating procedures for sampling and analysis in the verification of chemical disarmament*, 1994 Edition, Ed. Marjatta Rautio. ISBN 951-724-008-2 Helsinki, 1994.
7. А.Т. Лебедев, *Масс-спектрометрия в органической химии*, Бином, Москва, 2003.
8. П. Джурс, Т. Айзенауэр, *Распознавание образов в химии*, Мир, Москва, 1977.
9. В.И. Вершинин, Б.Г. Дерендяев, К.С. Лебедев, *Компьютерная идентификация органических соединений*, ИКЦ «Академкнига», Москва, 2002.

ВСЕРОССИЙСКОЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО

**Школа-семинар «Газовая хроматография/
масс-спектрометрия: практические аспекты»**

5–6 апреля 2007 года
г. Москва (пос. Московский)

Первый циркуляр**Оргкомитет**

Председатель — к.б.н. Полякова О.В.
Ученый секретарь — к.х.н. Хрущева М.Л.
д.х.н. Лебедев А.Т.
к.х.н. Вирюс Э.Д.
д.х.н. Бродский Е.С.

Тематика школы

1. Метод ГХ-МС, его возможности и инструментальное оформление на современном этапе.
2. Качественный и количественный анализ. Преимущества ГХ-МС перед другими методами анализа. Проблемы пробоподготовки. Калибровка и подготовка оборудования к конкретным экспериментам. Интерпретация и расшифровка спектров.
3. Особенности применения ГХ-МС для конкретных исследований.
4. Новейшие разработки приборостроительных компаний, представленных на российском рынке, в области ГХ-МС.

Подробная программа будет предоставлена каждому участнику не позднее 25.03.2007.

Место проведения семинара

Семинар будет проводиться на базе Научно-методического центра профсоюзов работников АПК, расположенного недалеко от Москвы (20 минут от м. Юго-Западная) в пос. Московский, там же расположена гостиница, предназначенная для проживания участников.

Регистрация

Регистрация открыта с 10.12.2006 (см. ключевые даты). Регистрационные карты можно отправлять

любым удобным способом (почта, факс, e-mail).

В программе работы школы-семинара также примут участие представители приборостроительных компаний с лекциями-семинарами о применении приборов, выпускаемых или поставляемых этими компаниями на российский рынок, в ГХ-масс-спектрометрии.

Ключевые даты

Прием регистрационных карт участников с проживанием в гостинице (место в гостинице гарантируется) — до **01.02.07**.

Прием регистрационных карт без проживания (место в гостинице не гарантируется) — до **20.03.07**.

Оплата оргвзноса. Льготный период — до **10.02.07**.

Оплата без льгот — с **11.02.07** (при оплате после семинара необходимо гарантийное письмо от организации).

Заезд участников, регистрация — **05.04.07**.

Регистрационный взнос

Полный регистрационный взнос обеспечивает бронирование гостиницы (в случае регистрации до 01.02.07), участие в занятиях, получение всех материалов (в том числе почтовые расходы), кофе-брейки, обеды в течение 2 суток, другие орграсходы и составляет:

— при оплате до 10.02.07 (включительно)

для членов ВМСО* — 5900 руб.

для иных лиц — 10 030 руб.

— при оплате после 10.02.07

для членов ВМСО* — 8260 руб.

для иных лиц — 12508 руб.

* Членам ВМСО по решению Президиума Совета ВМСО могут быть предоставлены дополнительные льготы.

**Регистрационная форма участника семинара
«Газовая хроматография/масс-спектрометрия:
практические аспекты»**

Ф.И.О. (полностью) _____

Член ВМСО Не член ВМСО

Организация _____

Почтовый адрес _____

Телефон/факс _____

E-mail _____

Интересующая проблематика в рамках школы: _____

Дополнительные пожелания к тематике школы: _____

Нуждаетесь ли в гостинице*

- проживание «люкс»** (от 1600 руб./сутки, 1-, 2- или 3-комнатный номер, проживание 1 человек в номере)
 проживание «стандарт» (от 1200 руб./сутки, 2–3-комнатный номер, проживание по 1 человеку в комнате)
 проживание «эконом»*** (от 600 руб./сутки в 2–3-комнатном номере, по 2 человека в комнате)
 без проживания

* Стоимость питания не включена.

** Кол-во мест «люкс» ограничено.

*** Кол-во мест ограничено, предоставляются только при условии полного заполнения комнаты. В случае отсутствия возможности подселения в комнату предоставляются места «стандарт».

даты пребывания _____

Информация

5-й Европейский семинар по масс-спектрометрии вторичных ионов

С 24 по 26 сентября 2006 г. в г. Мюнстер, Германия прошел 5-й Европейский семинар по масс-спектрометрии вторичных ионов (МСВИ) (5th European Workshop on Secondary Ion Mass Spectrometry SIMS, Europe2006, <http://www.sims-europe.uni-muenster.de/index.php>). Семинары данной серии проводятся раз в два года, начиная с 1998 г. и чередуясь с международными конференциями по МСВИ, имеющими также двухгодичную периодичность. В семинаре приняло участие более 200 ученых.

Инициатором проведения и бессменным председателем оргкомитета семинара является один из основоположников метода МСВИ [1], профессор Университета Мюнстера Альфред Беннигховен. Чести быть членами оргкомитета удостоились двое ученых из Украины — чл.-корр. НАН Украины В.Т. Черепин [2-4] и д-р М.В. Косевич. Организаторы семинара из Университета Мюнстера активно развивают международное сотрудничество и поддерживают контакты с учеными СНГ; благодаря щедрой поддержке Немецкого Научно-исследовательского общества (Deutsche Forschungsgemeinschaft) в работе семинара смогли принять участие около 20 ученых из России, Украины, Узбекистана.

Программа семинара была весьма насыщенной и напряженной: на устные сообщения выделялось по 15 минут, что позволило за два рабочих дня заслушать более 40 докладов, включая 4 обзорных. Также было представлено около 100 стендовых сообщений. Стало традицией предварять конференцию своего рода «воскресной школой» — однодневным обзорным курсом основ МСВИ и последних достижений в данной области, который могли прослушать все желающие студенты и сотрудники Университета Мюнстера. Также традиционно в рамках конференции организуется круглый стол для обсуждения наиболее «горячих» вопросов. На встрече в 2004 г. обсуждались перспективы применения МСВИ в медицине. В этом году ключевой темой стала бомбардировка кластерными ионами. Распылению кластерными ионами был посвящен приглашенный доклад профессора Х.М. Урбассека и ряд устных сообщений. Отмечено, что кластерные ионные пучки (Au_n , Bi_n , C_{60}) сейчас используются во многих исследовательских лабораториях и внедрены на коммерческих приборах. Бомбардировка кластерами позволила значительно повысить эффективность распыления, в особенности, органических материалов. Последнее вызвало значительный прогресс МСВИ в анализе биологических объектов — клеток и тканей. Впечатляющими являются успехи МСВИ в визуализации и картировании биоматериала. Если ранее картирование было возможно, в основном, для отдельных эле-

ментов, а определение наличия тех или иных биомолекул велось по их низкомолекулярным фрагментам или изотопным меткам, то, благодаря появлению более эффективных первичных источников ионов, становится возможным детектирование ряда биомолекул с массой до 1000 Д. Использование время-пролетных масс-анализаторов сделало доступным диапазон масс до 10000 Д для органических полимеров (например, фторированных полиэфиров). Для сохранения клеток и тканей в гидратированном состоянии в условиях вакуума до коммерческого уровня доведены криотехнологии приготовления образцов.

Из обзорных докладов большой интерес вызвал рассказ «МСВИ звездной пыли» профессора Института палеонтологии Университета Мюнстера Е. Стефана, участника соответствующей программы NASA. Для сравнения возможностей МСВИ и МАЛДИ — второго мощного метода, разработанного в стенах Университета Мюнстера — с обзорным докладом «Образование ионов в УФ и ИК МАЛДИ» был приглашен д-р Клаус Драйсеверд, сотрудник лаборатории профессора Франца Хилленкампа.

Прогресс компьютерной техники и усовершенствование методов расчетов расширили возможности моделирования и визуализации процессов распыления и вторичной эмиссии ионов, которым был посвящен ряд красочных презентаций.

МСВИ методы послойного анализа (depth profiling) и получения трехмерной картины распределения различных веществ в образце (3D анализ) стали уже практически рутинными инструментами контроля неорганических материалов в тонких нано-технологических процессах и незаменимыми в полупроводниковой и электронной промышленности.

По оценкам организаторов, распределение тезисов по темам, в целом отражающее структуру европейских исследований в области МСВИ, выглядит следующим образом: микроэлектроника — 25%, механизмы образования ионов и бомбардировка кластерными ионами — 30%, молекулярные поверхности, биологические и биомедицинские исследования — 40%; остальное приходится на приложения в геологии, палеонтологии, атмосферных и космических исследованиях.

На выставке, проводимой в рамках конференции, были представлены фирмы, производящие масс-спектрометры МСВИ, приборы для анализа поверхности, вакуумное оборудование: ION-TOF, Munster, Germany; CAMECA, Gennevilliers, France; Physical Electronics, Ismaning, Germany; Hiden Analytical, Kochel, Germany; IONOPTIKA Ltd, Eagle Close, Chandler's Ford, Hants., England; Atomic Force, Mannheim, Germany; Leica Mikrosysteme, Bensheim

Germany; SurfaceSpectra Ltd., Manchester, United Kingdom; TASCION, Munster, Germany. Значительный интерес вызвало оборудование, производимое фирмой ION-TOF (<http://www.iontof.com>). Данная фирма, основанная в Мюнстере в 1989 г. при непосредственном участии профессора А. Беннингховена, успешно реализует изначально поставленную задачу внедрения и коммерциализации оригинальных разработок и результатов научных исследований, проводимых в Университете Мюнстера. Приборы последнего поколения представляют собой фактически целую лабораторию, обеспечивающую комплексный анализ поверхности любых типов образцов.

Проведение шестого Европейского семинара SIMS Europe планируется в 2008 г. в Мюнстере. Предыдущая 15-я международная конференция по МСВИ (SIMS XV) прошла в Манчестере (Великобритания), в 2005 г. (<http://www.meeting.co.uk/simsxv/info.htm>),

очередная 16-я состоится в 2007 г. в Японии (<http://beams.cc.kogakuin.ac.jp/sims>).

Информацию о ежегодных семинарах по МСВИ, проводимых в США, можно найти на сайте <http://www.simsworkshop.org/meetings.htm>; последний из этой серии 19th Annual Workshop on SIMS прошел в мае 2006 г. (<http://www.simsworkshop.org/annualworkshops/workshop06/index.htm>).

1. A. Benninghoven, F.G. Rudenauer, H.W. Werner, *Secondary ion mass spectrometry: basic concepts, instrumental aspects, applications and trends*, Wiley, New York, 1987. 1226 p.
2. В.Т. Черепин, *Ионный зонд*, Наукова думка, Киев, 1981, 328 с.
3. V. Cherepin, *Secondary ion mass spectroscopy of solid surfaces*, Science Press, Utrecht, 1987. 138 p.
4. В.Т. Черепин, *Ионный микроразнозондовый анализ*, Наукова Думка, Киев, 1992. 344 с.

Защищенные диссертации по масс-спектрометрии

Мильман Борис Львович

«РАЗВИТИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ К МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ И ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ»

*Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук*

Специальность 02.00.02 — Аналитическая химия

Официальные оппоненты:

Доктор химических наук, профессор *В.Г. Заикин*
Доктор химических наук, профессор *И.Г. Зенкевич*
Доктор химических наук, профессор *Д.А. Пономарев*

Ведущая организация:

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, химический факультет
Защита состоялась 23 ноября 2006 г. в Санкт-Петербургском государственном университете

Развиты новые подходы к масс-спектрометрической и хроматомасс-спектрометрической идентификации органических веществ, основанные на использовании априорной информации, статистических тестах при сравнении экспериментальных и справочных данных, применении библиотек тандемных масс-спектров и усовершенствовании способов интерпретации масс-спектров. Предложена концепция химической идентификации как совокупности процедур генерации и испытания гипотез; к существенным элементам концепции относятся поиск и обработка априорной информации и статистическая проверка идентификационных гипотез. С целью отбора идентификационных гипотез для неизвестных компо-

нентов проб предложено использовать априорную информацию о встречаемости и совместной встречаемости химических соединений в научной литературе и соответствующих базах данных. Установлены относительно высокие значения этих показателей у идентифицированных компонентов разнообразных смесей органических веществ, что позволяет предсказывать состав различных проб. Проведена хроматомасс-спектрометрическая идентификация летучих углеводородов и их производных по справочным данным с использованием традиционных (интервальных) и новых (статистических) идентификационных критериев. Разработана, сформирована и подвергнута тестированию электронная библиотека, содержащая более 3100 тандемных масс-спектров аналитически важных нелетучих органических веществ. Показано, что сравнение экспериментальных и справочных тандемных масс-спектров, зарегистрированных на одном и том же приборе, обеспечивает идентификацию всех изомерных трипептидов, содержащих остатки аминокислот аргинина, лизина и лейцина или изолейцина. Установлено влияние явлений и процессов, типичных для химии (физической химии) растворов (кислотность, редокс-процессы, поверхностная активность), на образование ионов при электрораспылении растворов органических солей. Обнаружено, что кластеры двухзарядных катионов пестицидов диквата и параквата превращаются в однозарядные катионы солей и соответствующие депротонированные ионы в результате процессов восстановления и кислотной диссоциации. Показано, что относительная чувствительность метода масс-спектрометрии с электрораспылением при обнаружении однозарядных катионов и анионов ионных жидкостей определяется поверхностной активностью (гидрофобностью) катионов и анионов.

Конференции, симпозиумы, семинары

- 25 февраля—1 марта 2007 г.
Дортмунд, Германия
**6th International Colloquium on Process Related Analytical Chemistry
PREACH 2007**
<http://www.iaea.ch>
- Март—апрель 2007 г.
Екатеринбург, Россия
**Всероссийская конференция молодых ученых
«Проблемы глобальной и региональной экологии»**
тел. (343) 260-82-55
- 10—13 апреля 2007 г.
Москва, Россия
АналитикаЭкспо 2007
- Май—июнь 2007 г.
Нижний Новгород, Россия
**XII Всероссийская конференция «Высокочистые вещества и материалы.
Получение, анализ, применение»**
тел. (8312) 12-77-50
- 3—7 июня 2007 г.
Индианаполис, США
55th ASMS Conference on Mass Spectrometry
<http://www.asms.org>
- 26—30 июня 2007 г.
Стирия, Австрия
Trends in Sample Preparation'2007
<http://www.trisp07.at>
- 22—27 июля 2007 г.
Левистоун, США
**Biological Molecules in Gas Phase: Mass Spectrometry,
High-resolution Spectroscopy and Theory**
<http://www.grs.org/programs/2007/gasphase.htm>
- 3—8 сентября 2007 г.
Москва, Россия
**III съезд ВМСО и Всероссийская конференция с международным
участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы»**
<http://www.vmsso.ru>
- Сентябрь 2007 г.
Азов, Россия
**Школа молодых ученых в рамках IV Международной конференции по
новым технологиям и приложениям современных физико-химических
методов (ядерный магнитный резонанс, хроматография/масс-спектро-
метрия, ИК-Фурье спектроскопия и их комбинации) для изучения
окружающей среды**
тел./факс: (863) 266-56-77, тел. (863) 243-47-00
- Сентябрь 2007 г.
Туапсе, Россия
IXX Симпозиум «Современная химическая физика»
тел./факс: (495) 137-82-73
- Сентябрь 2007 г.
Уфа, Россия
VI Семинар «Химия и медицина» со школой для молодых ученых
тел. (3472) 35-55-60
- 9—12 сентября 2007 г.
Торун, Польша
**11th International Conference on Chemistry and the Environment
«Chemistry, Environment and Human Activity in Civilization Development»**
www.chem.uni.torun.pl/en
- 9—12 сентября 2007 г.
Антверп, Бельгия
Euroanalysis 14
<http://www.euroanalysisXIV.ua.ac.be>
- 7—12 октября 2007 г.
Краснодар, Россия
Всероссийская конференция «Аналитика России»
e-mail: analyt@chem.kubsu.ru
- 14—18 октября 2007 г.
Мемфис, США
34-d FACSS-34-d National Meeting for the Society for Applied Spectroscopy
<http://facss.org/facss>
- 14—15 ноября 2007 г.
Кейптаун, ЮАР
Solid-Liquid Separation 07
<http://www.min-eng.com/sls07/index.html>

Подписка на 2007 год

ВНИМАНИЕ! Журнал «Масс-спектрометрия» включен в каталог агентства «Роспечать» «Газеты. Журналы» на 1 полугодие 2007 года. Индекс издания – 20000.
Вы также можете оформить редакционную подписку.

Редакционная подписка на 2007 год Для юридических лиц

Вы можете подписаться сразу на весь год (4 номера),
выписать отдельные номера журналов.

Поставщик: **Всероссийское масс-спектрометрическое общество**
Адрес: **117628, г. Москва, ул. Знаменские Садки**
Адрес для корреспонденции: **119234, г. Москва, а/я 51.**

Образец заполнения платежного поручения

ИНН 7727268148	КПП 772701001		
Получатель: Всероссийское масс-спектрометрическое общество		Сч. №	40703810700750021532
Банк получателя: ЗАО «ГЛОБЭКСБАНК», г. Москва		БИК	044525243
		Сч.№	30101810000000000243

Счет № _____
от _____

Заказчик: _____
Плательщик: _____

№	Наименование	Кол-во экз.	Цена 1 номера, руб.	Сумма, руб.
1	Подписка на журнал «Масс-спектрометрия» на 2007 год (4 номера) с учетом почтовых расходов на доставку по России	1	236=00	944=00
			Итого:	944=00
			Итого НДС 10%:	94=40
			Всего к оплате:	1038=40

Всего к оплате: одна тысяча тридцать восемь рублей 40 копеек,
в том числе НДС 10% девяносто четыре рубля 40 копеек.

Президент



Главный бухгалтер



Внимание!

Указанные цены действуют с 01.01.2007 г. В стоимость подписки входит доставка журнала заказными бандеролями по России. К каждому журналу прилагается счет-фактура и товарная накладная.

Вы можете подписаться на любое количество номеров.

Стоимость одного номера в этом случае 300 руб. 00 коп., плюс НДС 10% 30 рублей 00 коп.

После оплаты отправьте копию платежного поручения с указанием вашего почтового адреса по факсу (495) 939-14-07 или заполните и вышлите нам Бланк-заказ с указанием номеров, за которые производилась оплата.

Редакционная подписка для физических лиц

Уважаемые коллеги, специалисты в области масс-спектрометрии и все, кто интересуется данным методом!

Подписаться на наш журнал очень легко! Все, что от Вас требуется – заполнить бланк в Сбербанке. При заполнении Бланка укажите требуемую сумму.

После оплаты обязательно сообщите нам свой адрес, номера, которые вы хотите получить, заполнив Бланк-заказ, и перешлите Бланк-заказ на оформление подписки в редакцию (письмом, факсом или электронной почтой). Сохраняйте квитанцию об оплате до получения подтверждения об оплате – на платежных поручениях, оплачиваемых через Сбербанк, часто отсутствует наименование плательщика.

Стоимость подписки на 2007 год (с учетом пересылки по России и всех налогов)*:

	для физических лиц – членов ВМСО	для прочих физических лиц
1 номер	77 руб. 00 коп.	187 руб. 00 коп.
Подписка на 4 номера	250 руб. 80 коп.	660 руб. 00 коп.

* Указанные цены действуют с 1 января 2007 г.

Вы также можете оплатить и получить номера журнала, вышедшие до 2007 года. Со стоимостью и порядком приобретения номеров журнала можно ознакомиться в редакции журнала.

Тел. для справок по приобретению журнала: (495) 939-14-07.

Контактное лицо – секретарь редакции Хрущева Мария Леонидовна.

БЛАНК-ЗАКАЗ

Куда: 119234, г.Москва, а/я 51

Кому: Общероссийская общественная организация «Всероссийское масс-спектрометрическое общество»

Или по e-mail: mail@vmso.ru; или по факсу: (495) 939-14-07.

(название организации или ФИО)

заказываю журнал «Масс-спектрометрия»: Т.1 № 1, 2, 3 Т.2 № 1, 2, 3, 4 Т.3 № 1, 2, 3, 4 Т.4 № 1, 2, 3, 4
(вычеркнуть лишнее)

в кол-ве _____ экз.

адрес: _____

Тел.: _____

e-mail: _____ Факс: _____

Для оплаты редакционной подписки можно использовать квитанции и формы платежного поручения со стр. 289 и 291.

Внимание! Стоимость подписки, указанная в квитанции, действительна только при оформлении подписки членами ВМСО в количестве 1 экземпляра. Для оформления подписки лицами, не являющимися членами ВМСО, либо членами ВМСО в количестве более 1 экземпляра обращайтесь в редакцию журнала.

Проверяйте правильность указанного в документах периода и стоимости подписки!

Настоящая квитанция действительна для оплаты только с 1 января 2007 г.

ИЗВЕЩЕНИЕ	Форма № ПД-4	
	<p align="center">Общероссийская общественная организация «Всероссийское масс-спектрометрическое общество» ИНН 7727268148, КПП 772701001 Р/с 40703810700750021532 в ЗАО «ГЛОБЭКСБАНК» г.Москва, корр. счет № 30101810000000000243 БИК 044525243, ИНН 7744001433, код ОКПО 09317031 Ф.И.О. плательщика:</p>	
	Адрес: _____	

КАССИР	Назначение платежа	Сумма всего (в том числе НДС 10%)
	Подписка на журнал «Масс-спектрометрия» на 2007 год для члена ВМСО	250 рублей 80 копеек
	Кол-во номеров	
	4	
Подпись _____ " ____ " _____ 2007 г.		
КВИТАНЦИЯ	Форма № ПД-4	
	<p align="center">Общероссийская общественная организация «Всероссийское масс-спектрометрическое общество» ИНН 7727268148, КПП 772701001 Р/с 40703810700750021532 в ЗАО «ГЛОБЭКСБАНК» г.Москва, корр. счет № 30101810000000000243 БИК 044525243, ИНН 7744001433, код ОКПО 09317031 Ф.И.О. плательщика:</p>	
	Адрес: _____	

КАССИР	Назначение платежа	Сумма всего (в том числе НДС 10%)
	Подписка на журнал «Масс-спектрометрия» на 2007 год для члена ВМСО	250 рублей 80 копеек
	Кол-во номеров	
	4	
Подпись _____ " ____ " _____ 2007 г.		

Учредитель и издатель: «Всероссийское масс-спектрометрическое общество» ©
Свидетельство о регистрации СМИ: ПИ № ФС77-19426 от 28.01.2005

Выпускающий редактор: *В.Г. Заикин*
Редактор: *Е.И. Хрущева*
Верстка: *С.И. Ососков*
Дизайн обложки: *А.Н. Соловьева*
Менеджер по реализации рекламной площади: *М.Л. Хрущева*

Издание отпечатано в типографии ООО «Издательско-полиграфический центр «Информкнига»
Заказ № Тираж 500 экз.

**Перепечатка материалов или их фрагментов допускается
только по согласованию с редакцией в письменной форме.
Редакция не несет ответственности за содержание рекламы.**