

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

УТВЕРЖДАЮ

**Председатель СПбНЦ РАН
академик**



Ж. И. Алфёров

О Т Ч Е Т

**ПО ТЕМЕ «РАЗРАБОТКА НОВОГО МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ
МЕТАБОЛИЗМА ЭКОЛОГИЧЕСКИХ И ЖИВЫХ СИСТЕМ ПО
ОСНОВНЫМ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ РЕАКЦИЯМ С ПОМОЩЬЮ
ИОНИЗАЦИИ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЕМ И ЕГО РЕАЛИЗАЦИЯ В
ВИДЕ АППАРАТНО-МЕТОДИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА»
по Государственному заданию СПбНЦ РАН в 2014–2016 гг.**

Этап 2015 года




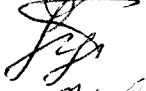


**Научный руководитель,
д.ф.м.н. Л.Н.Галль**

A handwritten signature in black ink, written over a solid horizontal line. The signature appears to be 'Л.Н. Галль'.

Санкт-Петербург

2015

Список исполнителей.

1. Галль Л.Н., в.н.с., д.ф.м.н. 
2. Масюкевич С.В., вед. специалист 
3. Кулешов Д.О., м.н.с., без степени 
4. Русских Я.В., с.н.с., к х.н. 
5. Чернова Е.Н., инж. с высш. обр. 
6. Березкина Т.Э., инж. с высш. обр. 

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ЭМП	– Электромагнитное поле
ЭРИАД	– Экстракция растворенных ионов при атмосферном давлении
ВЭХЖ	– Высокоэффективная жидкостная хроматография
ТДО	– Тиолдисульфидное отношение
ВПОУ	– Время полуокисления
АФК	– Активные формы кислорода
GSH	– Глутатион в восстановленной форме
GSSG	- Глутатион в окисленной форме
МС-МС	– Масс-спектрометрический тандем для определения дочерних продуктов реакций
SH-	– Сульфгидрильная (тиоловая) группа молекулы
ESI	– Электроспрей – метод анализа веществ в растворах при распылении в электрическом поле

РЕФЕРАТ

Отчет 45 с, 43 рис., 6 табл., 14 источников.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, хроматография, электрораспыление, электроспрей, глутатион, спектрофотометрия, импульсное магнитное поле.

На втором этапе работы на основе аналитического обзора биохимии глутатиона показана его определяющая роль в системе антиоксидантной защиты живого организма, что определило выбор глутатиона в качестве модельного вещества в изучении реакции живого организма на внешние физические воздействия. Была изучена возможность масс-спектрометрического анализа глутатиона методом электрораспыления («электроспрей»), и показано, что глутатион в масс-спектре представлен стабильным молекулярным ионом с массой 308 а.е.м., а также продуктами его окисления. Оттестирована методика измерения скорости окисления тиоловых соединений с помощью ВЭЖХ-МС-МС, показано, что для изучения реакции окисления достаточно ВЭЖХ-МС анализа и не требуется использования систем МС-МС.

Были подобраны условия «мягкого» окисления глутатиона перекисью водорода и получены кинетические кривые, количественно представляющие динамику окисления по падению интенсивности молекулярного иона во времени одновременно с нарастанием во времени продуктов его окисления. Масс-спектрометрические результаты были продублированы известным ранее спектрофотометрическим методом и получено хорошее совпадение динамики окисления.

Для изучения влияния на живой организм внешних физических факторов был рассчитан, сконструирован и изготовлен соленоидальный источник магнитного поля, позволяющий создавать в области погруженного в него реактора однородное магнитное поле в широком диапазоне напряженностей и формы импульса. Были проведены измерения влияния магнитного поля в области напряженности $5 \cdot 10^{-6}$ Тл и показано, что под действием импульсного магнитного поля скорость реакции окисления глутатиона существенно изменяется. Поведение кинетических кривых для этого случая также было подтверждено спектрофотометрически. Установленная зависимость скорости окисления глутатиона от магнитного поля позволяет на третьем этапе работы приступить к систематическому определению условий управляемого воздействия магнитного поля на эту тестовую реакцию.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МОДЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ: УНИТИОЛ И ГЛУТАТИОН.	6
2. МАТЕРИАЛЫ И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИБОРЫ	12
2.1. МАСС-СПЕКТРОМЕТР ESI LCMS-IT-TOF	13
2.2. МАСС-СПЕКТРОМЕТР LTQ ORBITRAP СОВМЕСТНО С ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМОЙ ACCELA	14
2.3. СПЕКТРОФОТОМЕТР СФ-26	16
3. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ	17
3.1 ПОДБОР УСЛОВИЙ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	17
3.2. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ, ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОК	18
3.3. ВЫБОР РЕАГЕНТОВ И УСЛОВИЙ ДЛЯ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ГЛУТАТИОНА	19
4. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	19
5. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ТИОЛОВ В УСЛОВИЯХ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВНЕШНЕГО ФИЗИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ	21
5.1. РАЗРАБОТКА ТЕРМОСТАТИРОВАННОГО РЕАКТОРА	21
5.2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ТИОЛОВ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ	22
6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	23
6.1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	23
6.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
7. ДЕСТВИЕ ВНЕШНИХ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СКОРОСТЬ ОКИСЛЕНИЯ ТИОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ	35
7.1. УСТРОЙСТВО ДЛЯ СОЗДАНИЯ УПРАВЛЯЕМОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ	35
7.2. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОКИСЛЕНИЯ ГЛУТАТИОНА В МАГНИТНОМ ПОЛЕ	37
8. КРАТКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	42
ПРИЛОЖЕНИЕ	43

Введение

Работа, проводимая в рамках темы «Разработка нового масс-спектрометрического метода для моделирования метаболизма экологических и живых систем по основным метаболическим реакциям с помощью ионизации электрораспылением и его реализация в виде аппаратно-методического комплекса», посвящена разработке физического метода, позволяющего в прямом эксперименте наблюдать действие внешних слабых физических факторов ход метаболических химических реакций, характерных для живой системы, и моделировать тем самым реакцию живого организма на аналогичные факторы окружающей среды. Результаты таких экспериментов совместно с основными теоретическими представлениями о физических процессах, протекающих на межмолекулярном уровне в живых системах, позволят в дальнейшем построить модели межмолекулярных управляющих процессов в живых системах для их использования в медицинской физиологии.

На первом этапе работы (2014 г), посвященном обоснованию применения масс-спектрометрии с электрораспылением при изучении реакции живого организма на внешние физические и химические факторы были найдены условия, позволяющие получать информативные спектры реагентов унитиолового теста в режиме масс-спектрометрии с электрораспылением. Были также проведены теоретические и экспериментальные исследования режимов электрораспыления, позволившие значительно увеличить стабильность ионного тока в этом режиме, т.е. повысить точность регистрации ионного тока, необходимую для изучения метаболизма живого организма.

На втором этапе (2015 г), в соответствии с предварительным планом работ по теме, основное внимание было посвящено приспособлению метода к тиолсодержащим веществам живого организма, в качестве главного из которых рассматривается трипептид глутатион, играющий основную роль в адаптационном механизме организменной антиоксидантной защиты [1]. Кроме того, были проведены работы по разработке и изготовлению термостабиризованного микроустройства для ввода пробы, размещенного в соленоидальном источнике электромагнитного поля, и проведены предварительные опыты по влиянию ЭМП на скорость окисления глутатиона.

1. Сравнительные свойства модельных веществ: унитиол и глутатион.

1.1. Унитиол (2,3-димеркаптопропан-1-сульфонат натрия, структурная формула – рис.1.1.) является дезинтоксикационным лекарственным средством. Особенностью унитиола является наличие двух сульфгидрильных SH-групп, расположенных в

максимальной близости друг от друга. Это облегчает образование внутримолекулярной дисульфидной связи при окислении соединения в мягких условиях.

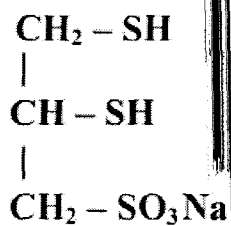


Рисунок 1.1. – Структурная формула молекулы унитиола.

Унитиол хорошо растворяется в воде и является удобным веществом, позволяющим достаточно просто моделировать как непосредственно кинетику его окисления, так и действие на этот процесс внешних физических факторов. Методика такого эксперимента была подробно описана в работах В.В.Соколовского [2,3], использовавшего кинетику окисления унитиола нитритным ионом как модельную реакцию, позволяющую отделить влияние внешних факторов на организм от действия факторов физиологических. Она уже была описана в отчете по теме за 2014г. Там же было показано, что при использовании масс-спектрометрии ЭРИАД и других разновидностей электрспрея можно не только получать масс-спектры унитиола и продуктов его окисления, но и с достаточной точностью наблюдать кинетику его окисления как нитритным ионом, так и при использовании в качестве окислителя перекиси водорода.

Однако, поскольку метод ориентирован на изучение влияния физических факторов на живой организм, более перспективным представляется использование в качестве модельного вещества трипептида глутатиона, являющегося самым распространенным неспецифичным низкомолекулярным тиолсодержащим веществом всех живых организмов на Земле.

Глутатион – низкомолекулярный тиол, важнейший компонент физиологической антиоксидантной системы организма, со следующей химической формулой – $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ и молярной массой равной 307,3235 г/моль. Глутатион – L-гамма-глутамил-L-цистеинилглицин – является трипептидом (рис.1.2).

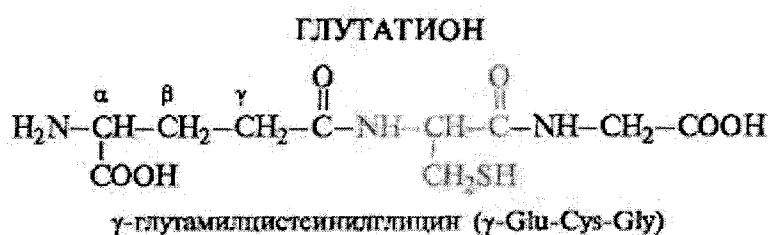


Рисунок 1.2. – Структурная формула молекулы глутатиона.

Глутатион присутствует во всех эукариотических клетках. У прокариотов он встречается почти у всех грамотрицательных и у некоторых видов грамположительных бактерий [4]. Основным резервуаром этого трипептида служит цитозоль, в котором сосредоточено почти 90 % глутатиона, 10 % приходится на митохондрии, и остаток содержится в эндоплазматическом ретикулуме. Обмен глутатиона протекает очень быстро, например, в печени крыс период его полужизни составляет всего 2–3 часа [5].

Основные функции [5,7] включают защиту от АФК, функционирование GSH как восстановительного переносчика; образование, восстановление и изомеризацию дисульфидных связей, присоединение глутатиона к SH-группам цистеиновых остатков (глутатионирование белков) как механизм регуляции функций белков и участие системы глутатиона в контроле тиол-дисульфидного обмена; влияние на активность ферментов и других белков; поддержание функций мембран; коферментные функции; участие системы глутатиона в обмене липидных гормонов и взаимодействие системы глутатиона с гормонами и сигнал-трансдукторными системами; восстановленный глутатион является резервом цистеина в организме; влияние на синтез нуклеиновых кислот и белка; метаболизм ксенобиотиков; повышение устойчивости клеток к вредным воздействиям; значение для пролиферации.

В организме глутатион присутствует в восстановленной и окисленной формах. Восстановленный глутатион (GSH) преобладает во многих растительных, микробных и во всех животных клетках, в которых его молярная концентрация выше, чем концентрация большинства органических веществ и составляет 90–95 % [8]. Окисленный глутатион (GSSG) найден во всех типах клеток и внеклеточном пространстве. Содержание GSSG в клетках и вне их невелико и жестко регулируется относительно сопряженного с ним GSH, составляя 10^{-4} – 10^{-5} М против 10^{-2} – 10^{-1} М GSH [9]. Отношение GSH/GSSG является важной характеристикой, по величине которой можно судить о наличии или отсутствии окислительного стресса в живой системе, вызываемого активными формами кислорода (АФК).

Активные формы кислорода постоянно образуются в живой клетке в качестве продуктов нормального метаболизма кислорода и имеют многочисленные полезные функции в организме. Но повышенной продукции АФК приводят к окислительному стрессу, являющемуся причиной и основным источником повреждений ДНК, белков, липидов и других внутриклеточных молекул. Молекулярный кислород имеет низкую реакционную способность, но в организме он может восстанавливаться с образованием супероксида ($O_2^{\cdot-}$) и гидроперекисного радикала (HO_2^{\cdot}), которые токсичны и оказывают

мутагенное действие на все виды клеток. Супероксид является источником и других форм АФК, таких как: перекись водорода (H_2O_2) – наибольшая концентрация в клетках, гидроксильный радикал ($HO\cdot$) – действует непосредственно в месте образования, гипохлорит ($HOCl$), озон (O_3), синглетный кислород (1O_2) – образуется при поглощении кванта энергии (УФ или видимого света). Эти радикалы обладают слабой реакционной способностью, т.е. окислительно-восстановительным потенциалом [5]. Оксиданты образуются в митохондриях ($O_2\cdot^-$ и H_2O_2), в пероксисомах (H_2O_2), в микросомах ($O_2\cdot^-$), в фагоцитах ($NO\cdot$). Супероксид $O_2\cdot^-$ генерируется митохондриями в результате утечки электронов из электронтранспортной цепи [10].

Схема работы антиоксидантной системы живого организма представлена на рис.1.3. и включает в себя низкомолекулярные соединения, которые связывают железо, являются «ловушками» электронов или обрывают цепную реакцию образования липоперекисей, также могут использоваться ферментативные реакции.

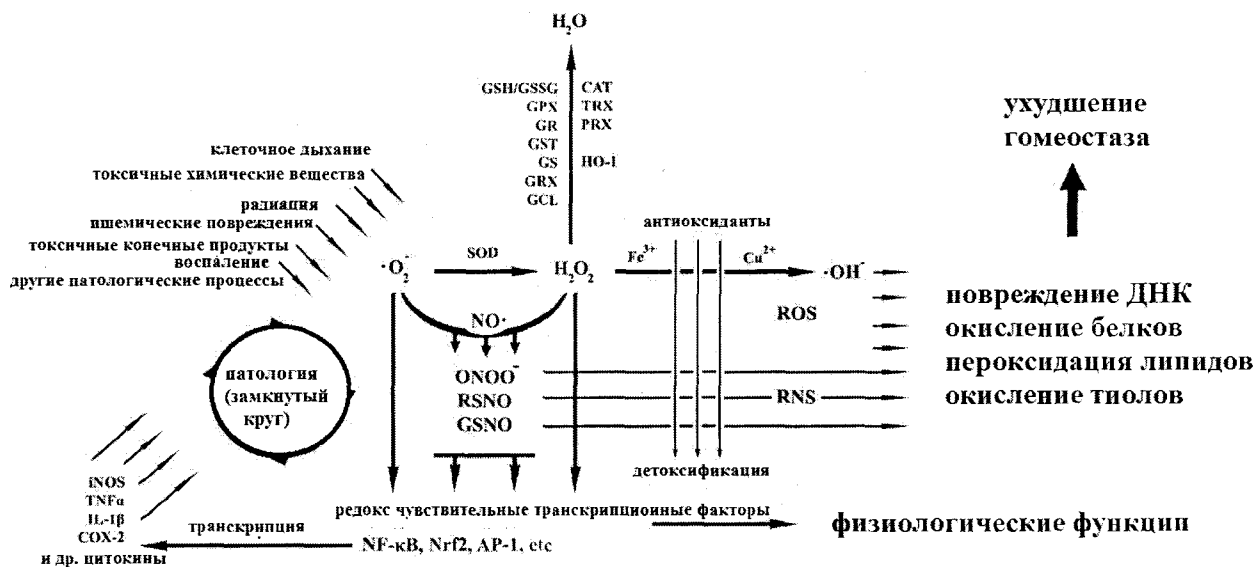


Рисунок 1.3. – Основные известные антиоксидантные пути в живых организмах.

Механизм действия низкомолекулярных антиоксидантов состоит в том, что они окисляясь, прерывают цепь реакций с участием реактивных производных кислорода. К ним относятся – глутатион, аскорбат, токоферолы, полиамины, каротиноиды, некоторые аминокислоты и др.

Прямой функцией восстановленного глутатиона является разрушение свободных радикалов. Глутатион в восстановленной форме может функционировать как антиоксидант разными способами. Он может взаимодействовать с синглетным кислородом, супероксидом и радикалами гидроксила или на прямую разрушать свободные радикалы. GSH является коферментом для ферментов, активность которых

основана на изменении редокс-потенциала глутатиона. Роль окисленного глутатиона в физиологических процессах рассматривается преимущественно в аспекте клеточных реакций глутатиона [11]. Поддержание высокого уровня GSH и низкого GSSG осуществляется с помощью фермента – глутатионредуктазы. Так как глутатион в основном почти все свои функции выполняет в восстановленной форме, глутатионредуктаза является необходимой составляющей антиоксидантной системы. Она позволяет значительно уменьшить потребность в синтезе GSH. Функционирование глутатионредуктазы сопряжено с ферментами, окисляющими GSH в GSSG в результате восстановления перекисей (глутатионпероксидаза и глутатионтрансфераза), дисульфидов (глутатионредуктаза, протеиндисульфидизомераза) или рибонуклеотидов (рибонуклеотидредуктаза) (рис. 1.4) [8].

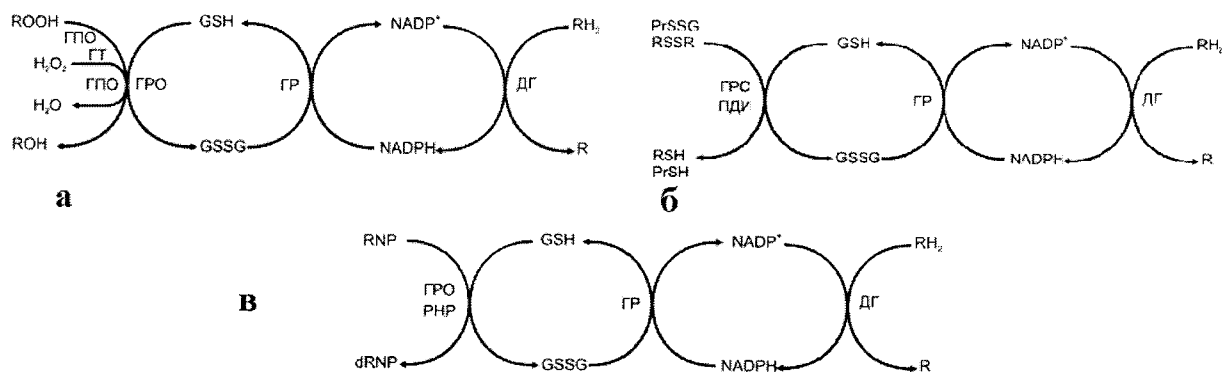


Рисунок 1.4. – Сопряженные восстановительные глутатионовые системы. а - антиоксидативные реакции, б - деглутатионирование белков или дисульфидредуктазные реакции, в - рибонуклеотид-редуктазные реакции.

В клетках постоянно идут глутатион-зависимые тиол-дисульфидные реакции. Они могут приводить к глутатионированию и деглутатионированию белков. Эти процессы катализируются и направляются различными ферментами. Самый распространенный вид образования смешанного дисульфида (S-тиолирования) – S-глутатионирование белков. Процесс заключается в присоединении глутатиона к SH-группам цистеиновых остатков.

Общепринятыми методами анализа низкомолекулярных тиолов являются высокоэффективная жидкостная, газовая хроматография и капиллярный электрофорез.

Для количественного измерения основных низкомолекулярных тиолов (цистеина, гомоцистеина, глутатиона и т.д.) в основном используется жидкостная хроматография (ЖХ) со спектрофлуориметрической детекцией. Сведения о тиоловых производных могут быть получены также с помощью масс-спектрометрии с электрораспылением.

Широко используемым методом для определения глутатиона является детектирование соединения связанного с реактивом Элмана (5,5'-дитио-бис-2-

нитробензойной кислотой) по интенсивности цветной реакции. Он позволяет определить содержание малых концентраций (нанограммы) окисленного глутатиона и общей фракции [12]. Определение редокс состояния глутатиона проводится путем измерения концентрации окисленного и восстановленного глутатиона. Так как реакция окисления-восстановления является обратимой, то равновесие, определяющее редокс-статус клетки, пропорционально логарифму $[GSH]^2 / [GSSG]$

Все перечисленные инструментальные методы, используемые для изучения глутатиона и его роли в живом организме, однако, не позволяют отслеживать кинетические характеристики реакций для взаимодействующих систем в автоматизированном режиме, без непосредственного участия оператора. Основное препятствие – это участники реакций, как правило, нелетучие термонеустойчивые соединения, участвующие в реакции. Они являются при этом основным препятствием, так как для их регистрации пока не существует надежных физических методов.

В связи с этим особо актуальным является разработка физического метода, позволяющего в прямом эксперименте наблюдать действие внешних слабых физических факторов на ход метаболических химических реакций, характерных для живой системы и моделировать тем самым реакцию живого организма на аналогичные факторы окружающей среды. Результаты таких экспериментов совместно с основными теоретическими представлениями о физических процессах, протекающих на межмолекулярном уровне в живых системах, позволят построить модели межмолекулярных управляющих процессов в живых системах для их последующего использования в медицинской физиологии.

2. МАТЕРИАЛЫ И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИБОРЫ

Основным инструментом для проведения исследований является масс-спектрометр с электрораспылением в качестве способа ионизации. Метод позволяет вводить в высоковакуумную область масс-спектрометра ионы нелетучих веществ без их разрушения в результате электрораспыления растворов этих веществ в области перед газодинамическим интерфейсом прибора. По сумме положительных качеств – удобство реализации, возможность управления процессом распыления, получение и последующий ввод ионов нелетучих веществ для масс-анализа, достаточная чувствительность - электрораспыление является наиболее удобным методом для проведения экспериментов с тиоловым тестом [13].

В процессе электрораспыления раствор образца подаётся через капилляр со скоростью порядка 10 мкл/мин. При распылении раствора при атмосферном давлении в электрическом поле на конце капилляра образуется так называемый конус Тейлора. Этот конус образуется у самого выхода из капилляра из-за частичного разделения положительно и отрицательно заряженных частиц жидкости в соответствии с приложенным внешним полем. На ионы действует вытягивающее электрическое поле, сила воздействия которого противодействует силе поверхностного натяжения жидкости. В итоге, на выходе из капилляра жидкость вытягивается в конус с полууглом порядка 50°. Заряженные капли эмитируются либо непосредственно с острия этого конуса, либо с вытянутой «шейки» конуса, и форма облака распыления зависит от величины приложенного электрического поля, дополнительных элементов конструкции узла капилляра и температуры потока газа, обтекающего конус распыления. При движении заряженной капли от капилляра к соплу происходят соударения с молекулами газа, обеспечивающие постоянный подвод энергии к капле, необходимый для эффективного испарения растворителя. Когда силы кулоновского расталкивания зарядов внутри капли превысят силы поверхностного натяжения, капля распадается на две и более капель меньшего размера. После нескольких таких распадов капля раствора анализируемого вещества, присутствующего в них в виде, как правило, протонированных молекулярных ионов (положительная мода) или молекулярных ионов, захвативших электрон (отрицательная мода), становится очень маленькой (радиус порядка 10 нм).

Напряжение между капилляром и соплом составляет 3-6 кВ, и на пути от капилляра происходит полный распад начальных капель и выход из них ионов исследуемых веществ. Вместе с потоком газа-носителя ионы попадают в пространство между соплом и

скиммером, между которыми приложено управляющее напряжение, изменяющееся в диапазоне от 0 до 1000 В.

Основные причины, по которым необходим экспериментальный подбор оптимальных условий электрораспыления пробы – это сильная зависимость процесса от ряда факторов, которые, в свою очередь, можно разделить на три группы. Это: внешние параметры, при которых проходит процесс, параметры самого распыляемого образца и внутренние свойства распыляемой системы, определяемые наличием нелинейных связей между формой мениска, объемным зарядом в межэлектродном промежутке, возможным образованием заряженных пленок на электродах и т.п. Именно параметры, третьей группы определяют непосредственно состояние системы, а параметры первых двух групп оказывают лишь косвенное влияние из-за существенно нелинейных процессов [14].

Работа проводилась на масс-спектрометрах (LCMS-IT-TOF и LTQ Orbitrap), расположенных в ФГБУН Санкт-Петербургском научно-исследовательском центре экологической безопасности РАН.

2.1 МАСС-СПЕКТРОМЕТР ESI LCMS-IT-TOF

В работе использовался хромато-масс-спектрометр высокого разрешения LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Japan), который представляет собой комбинацию жидкостного хроматографа, ионной ловушки и времяпролетного масс-анализатора (рис. 2.1). В качестве ионного источника применяется элетрогазодинамическое распыление.

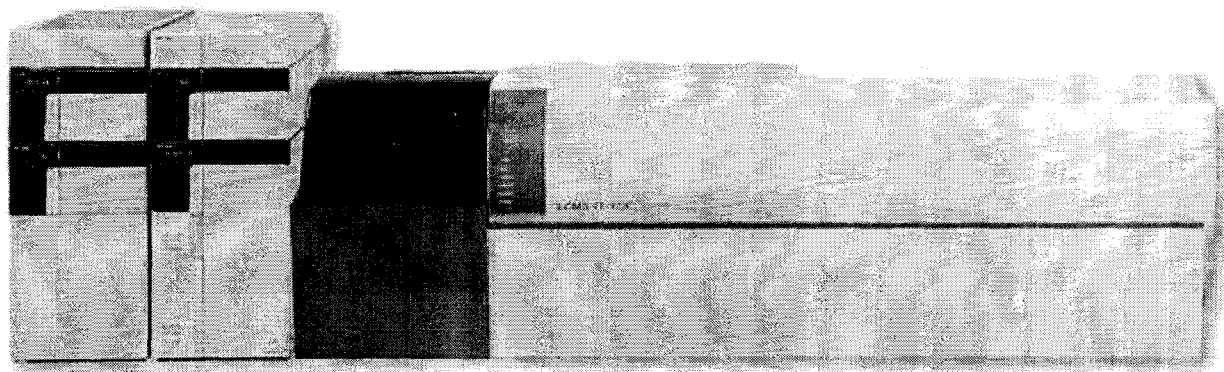


Рисунок 2.1. – Масс-спектрометр LCMS-IT-TOF.

Данный прибор обладает высоким разрешением, точностью, скоростью сканирования (регистрация спектра ~100 миллисекунд), чувствительностью (рис. 2.2). Двухступенчатый рефлектрон (DSR) и баллистическая экстракция ионов (BIE) обеспечивают высокое разрешение ($R > 10000$) и позволяют проводить измерения с высокой точностью определения массы иона ($\sim 5 \cdot 10^{-6}$) в различных режимах работы (МС,

МС² и МС³). Во время пролета в масс-спектрометре масс-рефлекторного типа обеспечивается фокусировка ионов по энергии за счет последовательного движения частиц в бесполом пространстве и в области электростатического зеркала (набор электродов). Разность во времени движения ионов в бесполом пространстве компенсируется временем пребывания их в отражателе. Подбором электрических потенциалов на электродах масс-анализатора достигается оптимальная фокусировка ионов. Компрессионная инжекция ионов в систему ионной оптики обеспечивает высокую эффективность ввода ионов в ионную ловушку и высокую чувствительность в МСⁿ-режимах.

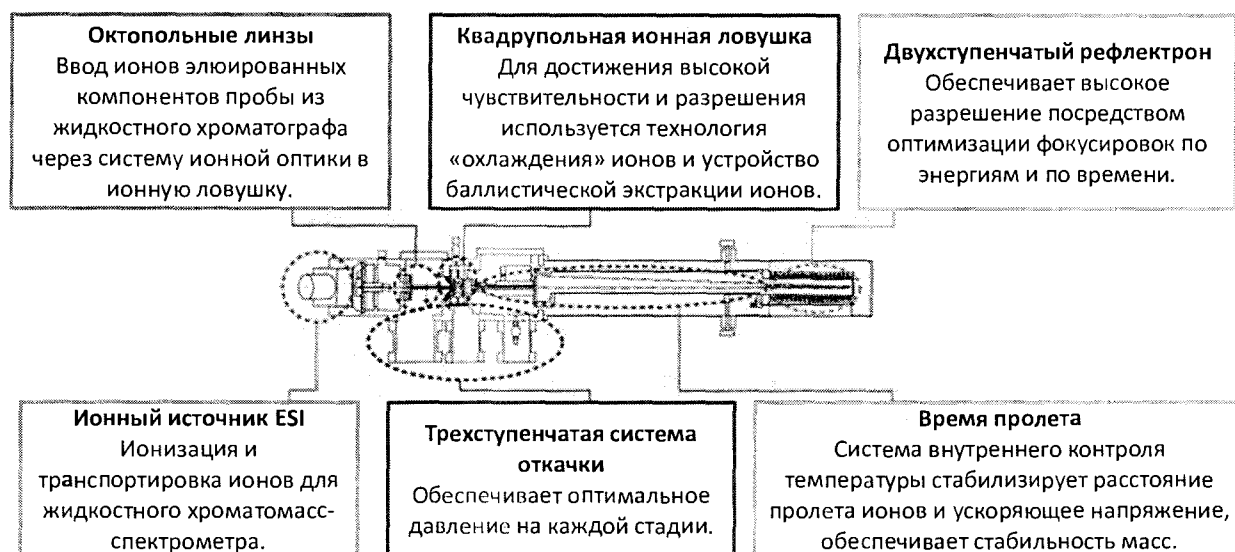


Рисунок 2.2. – Схема масс-спектрометра LCMS-IT-TOF.

2.2. МАСС-СПЕКТРОМЕТР LTQ ORBITRAP СОВМЕСТНО С ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМОЙ ACCELA

В ходе работы также был использован масс-спектрометр LTQ Orbitrap (Thermo Scientific, USA) совместно с хроматографической системой Accela (Thermo, USA) (рис. 2.3). LTQ Orbitrap – это комбинация линейной ионной ловушки Finnigan LTQ с масс-анализатором Orbitrap. Масс-спектрометр обладает выдающимися характеристиками в точности определения масс, разрешении и чувствительности МСⁿ анализа, которые делают его выигрышной альтернативой существующим гибридным системам с времяпролетными анализаторами (TOF). LTQ Orbitrap позволяет работать при высоком разрешении (60 000), обладает высокой чувствительностью (фемтомоль образца на колонку), позволяет определять массу ионов с точностью лучше 2 ppm, до трех MSⁿ сканирований могут быть выполнены за одну секунду. В приборе доступны следующие методы фрагментации ионов - столкновительной диссоциации (CID), высокоэнергетичной столкновительной

диссоциации (HCD) и диссоциации с переносом электрона (ETD). Выбор ионов-прекурсоров методом CID может осуществляться в линейной ловушке ионов, а их фрагментация в новой высокоэнергетичной ячейке соударений (HCD) с детектирование в орбитальной ловушке ионов.

Высокоскоростная хроматографическая система Accela обеспечивает быстрое и эффективное разделение. Accela автосамплер поддерживает инъекции под постоянным высоким давлением и фиксированной температурой ($0-60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Минимальная скорость потока составляет $0,1\text{ мкл/мин}$, а максимальная 1000 мкл/мин .

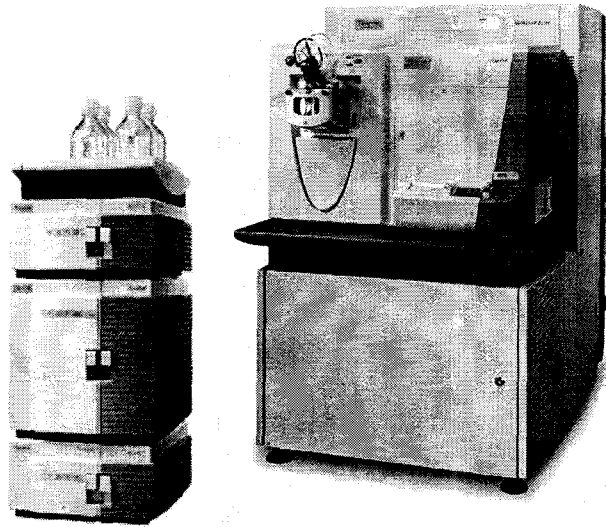


Рисунок 2.3. - Масс-спектрометр LTQ Orbitrap совместно с хроматографической системой Accela.

Анализ образца в масс-спектрометре начинается с ионизации пробы электрораспылением. Ионизация образца в LTQ Orbitrap происходит следующим образом: раствор поступает в иглу, к которой приложено высокое напряжение. При распылении часть образца попадает в сопло с помощью направляющего газа, и затем по транспортному капилляру переносится к скиммеру (рис. 2.4).

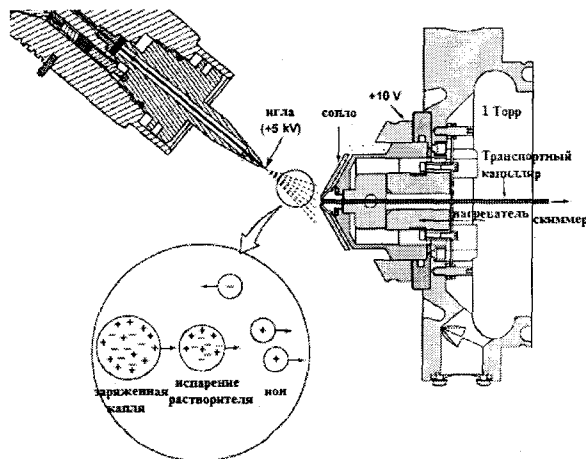


Рисунок 2.4. – Схема электрораспыления (ESI+).

После ионизации пробы ионы через систему ионной оптики попадают в линейную квадрупольную ловушку. Все или отобранные ионы выбрасываются из линейной ловушки в аксиальном направлении и направляются квадрупольной ионной линзой в ловушку C-Trap. Эта ловушка заполняется сухим газом (азотом), на электроды C-ловушки подается потенциал, ионы сжимаются, ускоряются ионно-оптическими электродами и выталкиваются в орбитальную ловушку. В ионной ловушке ионы закручиваются электрическим полем вокруг электрода и начинают когерентно осциллировать вдоль оси ловушки с частотой, зависящий от отношения массы к заряду (рис. 2.5).

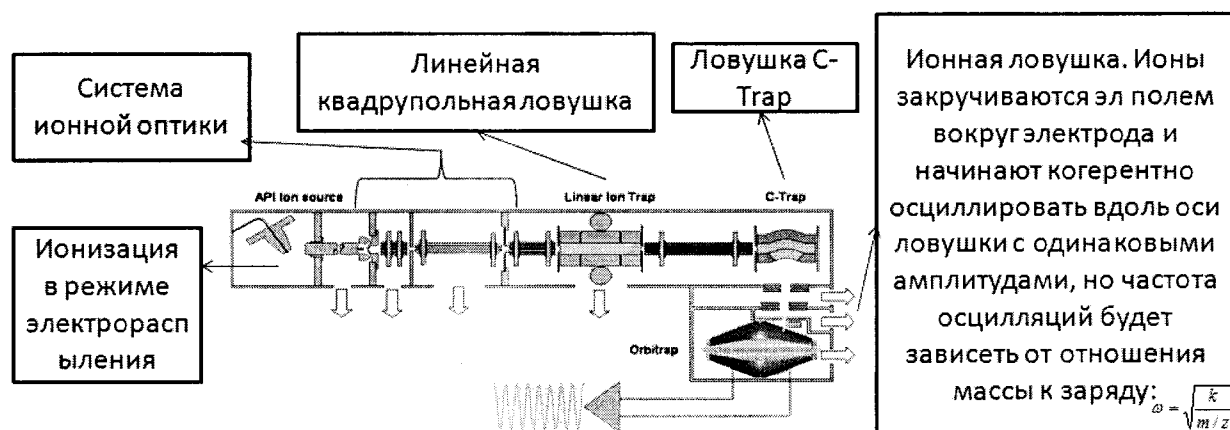


Рисунок 2.5. – Схема масс-спектрометра LTQ Orbitrap.

2.3 СПЕКТРОФОТОМЕТР СФ-26

Для спектрофотометрического анализа был использован спектрофотометр СФ-26 (ЛОМО, Россия, рис. 2.6). Прибор работает в спектральном диапазоне от 186 до 1100 нм. Основная погрешность измерений коэффициента пропускания в области спектра от 190 до 1100 нм – не более 1 %. Спектрофотометр состоит из монохроматора с измерительным прибором, кюветного отделения, камеры с фотоприемниками и усилителем и осветителя с источниками излучения и стабилизатором. Основные части монохроматора – зеркальный объектив, призма и кронштейн со щелями. Для работы спектрофотометра в широком диапазоне спектра используются два фотоэлемента и два источника излучения сплошного спектра. Сурьмяно-цезиевый фотоэлемент с окном из кварцевого стекла применяется для измерений в области спектра от 186 до 650 нм, кислородно-цезиевый фотоэлемент для измерений в области спектра от 600 до 1100 нм. Дейтериевая лампа предназначена для работы в области от 186 до 350 нм, лампа накаливания от 340 до 1100 нм.

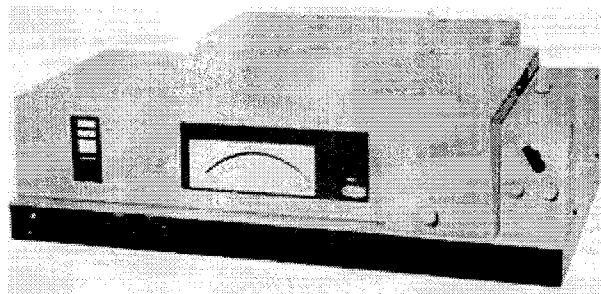


Рисунок 2.6. – Спектрофотометр СФ-26.

3. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ

3.1 ПОДБОР УСЛОВИЙ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Ключевой методической задачей был подбор условий электрораспыления, оптимальных для получения информации, поскольку нелинейные процессы, протекающие в области мениска способны привести к существенному искажению масс-спектра. Были исследованы и подобраны оптимальными следующие параметры интерфейса: напряжение между капилляром и соплом, напряжение и температура транспортного капилляра (между соплом и скиммером), ток распыления, угол наклона линз и поток распыляющего и направляющего газа (табл. 2.1, 2.2).

На ввод в масс-спектрометр LCMS-IT-TOF Shimadzu с электрораспылительной ионизацией подавалось 2 мкл раствора. Сканирование производилось в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов.

Таблица 1. – Условия электрораспыления для LCMS-IT-TOF.

Параметр	Значение
<i>В режиме регистрации положительных ионов</i>	
Напряжение в интерфейсе, кВ	4,5
Ток в интерфейсе, мкА	1,8
Температура в интерфейсе, °С	200
Распыляющий газ, л/мин	1,5
Напряжение на скиммере, В	4,5
Потенциал на фокусирующих линзах, В	-60
Время аккумулярования, мкс	1000
<i>В режиме регистрации отрицательных ионов</i>	
Напряжение в интерфейсе, кВ	-3,5
Ток в интерфейсе, мкА	1,8
Температура в интерфейсе, °С	200
Распыляющий газ, л/мин	1,5
Напряжение на скиммере, В	-5,5

Потенциал на фокусирующих линзах, В	85
Время аккумулярования, мкс	1000

Таблица 2. – Условия электрораспыления для LTQ Orbitrap.

Параметр	Значение
Напряжение капилляр-сопло, кВ	3,5
Ток распыления, мкА	3,5
Температура капилляра, °С	275
Напряжение сопло-скиммер (транспортного капилляра), В	25
Распыляющий газ (азот), arbitrary units	20
Направляющий газ (азот), arbitrary units	8
Потенциал на фокусирующих линзах, В	25

В ходе ВЭЖХ-анализа использовалась колонка SupelcoSil с фазой C18. Так как на ввод в масс-спектрометр образец попадает из хроматографической системы, то важно было подобрать подвижную фазу, пригодную для проведения количественных измерений и удовлетворяющую эксплуатационным требованиям прибора.

Для хроматографической системы LCMS Shimadzu применялся градиентный режим от 95% до 5% фазы А (Н₂О) и от 5% до 95% фазы В (ацетонитрил) в течении 20 минут. Для хроматографической системой Ассела использовался градиентный режим от 95% до 5% фазы А (Н₂О+0,05% муравьиной кислоты) и от 5% до 95% фазы В (ацетонитрил) в течении 12 минут.

3.2 ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ, ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОК

Образцы для исследования:

В качестве образца для исследования был взят чистый препарат L-глутатион (Вектон) отдельно в восстановленной и окисленной формах. Для определения возможности электрораспыления глутатиона на прямой ввод в масс-спектрометр подавался раствор глутатиона с концентрацией 30 мкг/мл и с добавлением 0,05% муравьиной кислоты.

Построение калибровочных зависимостей для восстановленного и окисленного глутатиона проводилось со следующими концентрациями: 10^{-4} М, $0,8 \cdot 10^{-4}$ М, $0,6 \cdot 10^{-4}$ М, $0,4 \cdot 10^{-4}$ М, $0,2 \cdot 10^{-4}$ М. Для приготовления растворов отбирались навески окисленного (0,003 г) и восстановленного (0,0061 г) глутатиона и растворялись добавлением 0,1 л бидистиллированной воды до концентрации 10^{-4} М. Затем полученный исходный раствор разводился до необходимых концентраций дистиллированной водой.

3.3 ВЫБОР РЕАГЕНТОВ И УСЛОВИЙ ДЛЯ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ГЛУТАТИОНА.

Выбор режима проведения реакции окисления был сложной задачей. Необходимо было соблюсти следующие условия:

а) использование мягкого окисления, не разрушающего скелет молекулы, но переводящего SH- группы в S-S группы

б) возможность проводить окисление без буфера

в) использование в реакции только летучих компонентов.

Для окисления глутатиона была выбрана перекись водорода H_2O_2 .

Для проведения экспериментов была приготовлена реакционная смесь объемом 10 мл с концентрацией восстановленного глутатиона 10^{-4} моль/л и концентрацией перекиси водорода 10^{-3} моль/л. 1 мл смеси переносили в виалу и помещали в систему пробозабора. Каждые 12 минут отбиралось 2 мкл реакционной смеси с помощью термостатированного автосамплера и проводилось измерения ионного тока для выбранного диапазона m/z . Начальные значения ионных токов для выбранных значений m/z были получены из раствора, полученного аналогичным способом, но без добавления перекиси водорода. Для проведения реакции окисления были использованы следующие параметры: c (Глутатион) = 10^{-4} моль/л, c (H_2O_2) = 10^{-3} моль/л, $pH \approx 7$.

4. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Спектрофотометрический анализ окисления глутатиона проводился как дублер масс-спектрометрического метода и с целью сопоставления результатов с литературными данными. Была разработана следующая методика спектрофотометрического определения скорости окисления глутатиона:

1. Приготовление фосфатного буферного раствора.

1) Готовили раствор двенадцативодного гидрофосфата натрия с концентрацией $C = 0,0667$ моль/л. Для этого в колбу объемом 0,5 л вносили 5,933 г навески и растворяли в воде.

2) Готовили раствор дигидрофосфата калия с концентрацией $C = 0,0667$ моль/л. Для этого в колбу объемом 0,5 л вносили 4,536 г навески и растворяли в воде.

3) Для получения буферного раствора $pH = 8$ в колбу объемом 500 мл наливали раствор дигидрофосфата калия объемом 15,5 мл и доводили до нужной концентрации раствором гидрофосфата натрия.

2. Приготовление раствора реактива Элмана

Реактив Элмана (5,5'-дитио-бис-2-нитробензойная кислота) – аналитический реагент с молекулярной массой 396,4 для определения свободных SH-групп, в том числе в белках и пептидах. Метод основан на взаимодействии реактива Элмана с субстратами при pH 8 по схеме, указанной на рисунке 4.1.



Рисунок 4.1. – Принцип действия реактива Элмана.

Для приготовления раствора отбирали навеску реактива Элмана массой 0,991 г, переносили в мерную колбу объемом 0,5 и растворяли фосфатным буфером с pH=8.

3. Приготовление раствора нитрита натрия

Для приготовления раствора нитрита натрия с концентрацией $C = 0,05$ моль/л отбирали навеску массой 1,725 г, переносили в мерную колбу объемом 0,5 л и растворяли в бидистиллированной воде.

4. Приготовление раствора глутатиона

Для приготовления раствора глутатиона с концентрацией $C = 10^{-3}$ моль/л отбирали навеску массой 0,0768 г, переносили в мерную колбу объемом 250 мл и растворяли бидистиллятом.

5. Приготовление калибровочных растворов

Для приготовления калибровочных растворов в шесть мерных колб объемом 10 мл помещали по 1 мл ранее приготовленного раствора реактив Элмана. Затем поочередно помещали по 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 раствора тиола. В шестую колбу раствора тиола не помещали. Затем все шесть колб доводили до риски фосфатным буфером pH=8, после чего проводили измерения на спектрофотометре на длине волны 412 нм. Измерения проводили относительно раствора из шестой колбы. По полученным данным строили калибровочную прямую.

6. Проведение реакции окисления

Предварительно готовили серию пробирок, в каждую из которых помещали 1 мл раствора реактива Элмана и 8 мл фосфатного буфера $pH = 8$. Количество пробирок выбиралось в зависимости от продолжительности окисления.

Для приготовления реакционной смеси в мерную колбу объемом 100 мл помещали 50 мл раствора тиола, затем необходимый объем окислителя и доводили до риски бидистиллятом. Сразу после приготовления реакционной смеси и каждые следующие 10 минут отбирали 1 мл реакционной смеси, помещали в ранее приготовленные пробирки и проводили измерения на спектрофотометре на длине волны 412 нм относительно ранее полученного холостого раствора.

5. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ТИОЛОВ В УСЛОВИЯХ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВНЕШНЕГО ФИЗИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

5.1 РАЗРАБОТКА ТЕРМОСТАТИРОВАННОГО РЕАКТОРА

Для экспериментального исследования на масс-спектрометре модельной реакции окисления тиолов перекисью водорода был разработан и сконструирован специальный прибор, включающий в себя термостатированный реактор и систему подачи продуктов реакции в режиме реального времени в интерфейс масс-спектрометра. При разработке учитывались следующие требования:

1. Поддержание постоянной температуры реактора с точностью $0,5^{\circ}C$;
2. Непрерывность и стабильность скорости подачи продуктов реакции;
3. Корпус прибора должен был быть изготовлен из такого материала, который позволял бы различными задаваемыми физическими факторами влиять на скорость протекания реакции. К таким физическим факторам относятся: магнитное и электромагнитное поле, электромагнитное излучение (видимый диапазон, ИК), звук и ультразвук. Схема разработанного термостата представлена на рисунке 5.1.

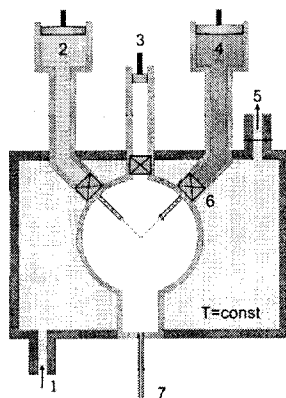


Рисунок 5.1. – Схема модернизированного прибора с реактором для моделирования метаболизма. 1 – вход термостатирующей жидкости; 2,4 – патрубки ввода модельного вещества и окислителя с клапанами; 6 – реактор; 3,7 – поршень и капилляр для ввода смеси в масс-спектрометр; 5 – выход термостатирующей жидкости.

Прибор состоит из корпуса, изготовленного из стекла и имеющего вход и выход для термостатирующей жидкости, в качестве которой была использована вода, шприца для ввода исследуемого вещества в область реактора и собственно реактора с поршнем. Поршень может перемещаться по игле шприца за счет механического воздействия. Термостатирование в приборе осуществляется за счет циркуляции воды с постоянной температурой. Преимущество такой схемы заключается в исключении действия на протекание реакции неконтролируемых физических факторов, кроме температуры термостатирующей жидкости.

Предположительный механизм работы реактора представлен на рисунке 5.2. Реактор должен обеспечивать высокий уровень перемешивания реагентов без использования механических средств. В дальнейшем планируется модифицировать приставку с целью предотвращения контакта реагентов с кислородом воздуха, поскольку все изучаемые биоактивные вещества являются быстро окисляемыми.

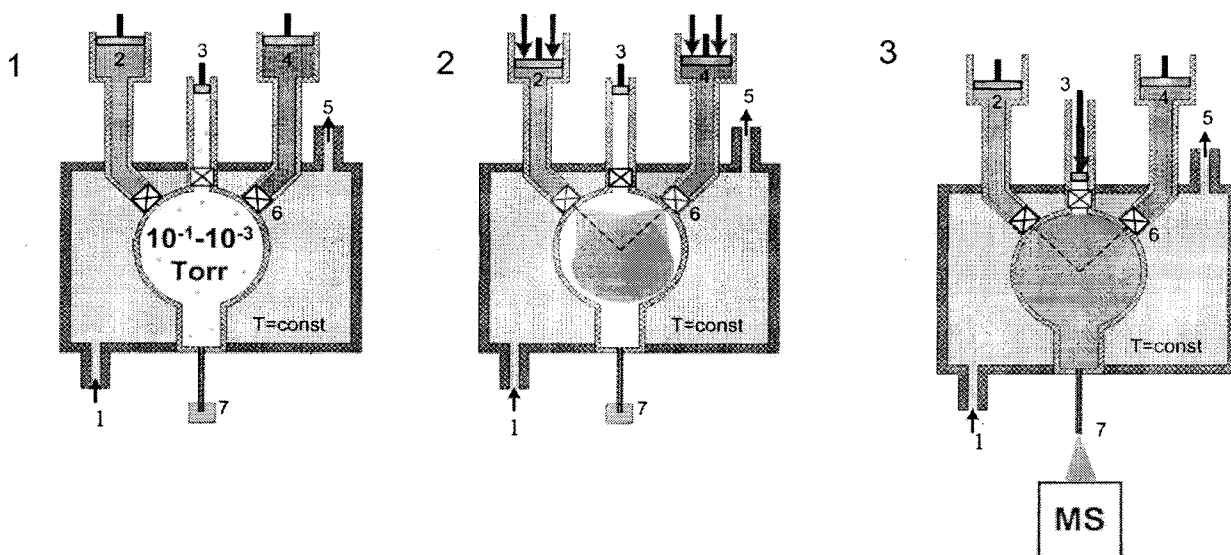


Рисунок 5.2. – 1 – реактор откачен; 2 – реактор заполняется смесью реагентов; 3 – смесь реагентов распыляется перед соплом входа в интерфейс масс-спектрометра.

5.2 ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ТИОЛОВ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ

В серии медико-биологических работ было показано, что проявление реакции живых организмов наблюдается при совместном действии постоянного МП и модулирующего его коллинеарного низкочастотного ЭМП [15]. Поэтому в наших экспериментах мы генерировали импульсное магнитное поле с интенсивностью $\sim 5 \cdot 10^{-6}$ Тл, примерно совпадающее по величине с типичным полем магнитной бури, которое обычно принимается равным или меньшим 10% от собственного МП Земли, т.е. от величины

$6 \cdot 10^{-5}$ Тл. Частота следования импульсов составляла 7,83 Гц, что соответствует волне Шумана: собственным колебаниям эффективного резонатора «Земля-ионосфера». Параметры катушки, создающей магнитное поле, были следующими: 200 витков, радиус намотки – 40 мм, толщина провода 2 мм, высота соленоида 400 мм.

Связь величин магнитного поля и тока определялась измерителем магнитной индукции Ш1-8, точность определения составляла 10^{-4} . Для создания выбранного магнитного поля использовались токи с величиной ~ 10 мА.

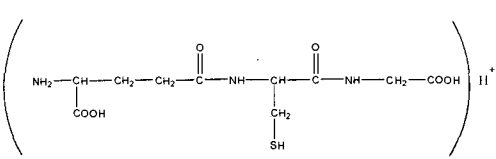
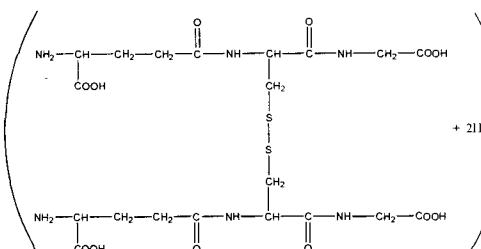
Реакции окисления тиолов в магнитном поле и без магнитного поля проводились параллельно. Реакционная смесь готовилась с использованием следующих концентраций: $c(\text{тиола}) = 10^{-4}$ моль/л, $c(\text{NaNO}_2) = 0,025$ моль/л, $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 10^{-3}$ моль/л. Сразу после приготовления реакционной смеси и каждые следующие 12 минут для масс-спектрометрического анализа и 10 минут для спектрофотометрического отбирали 1 мл реакционной смеси, помещали в ранее приготовленные пробирки и проводили измерения на масс-спектрометре и спектрофотометре.

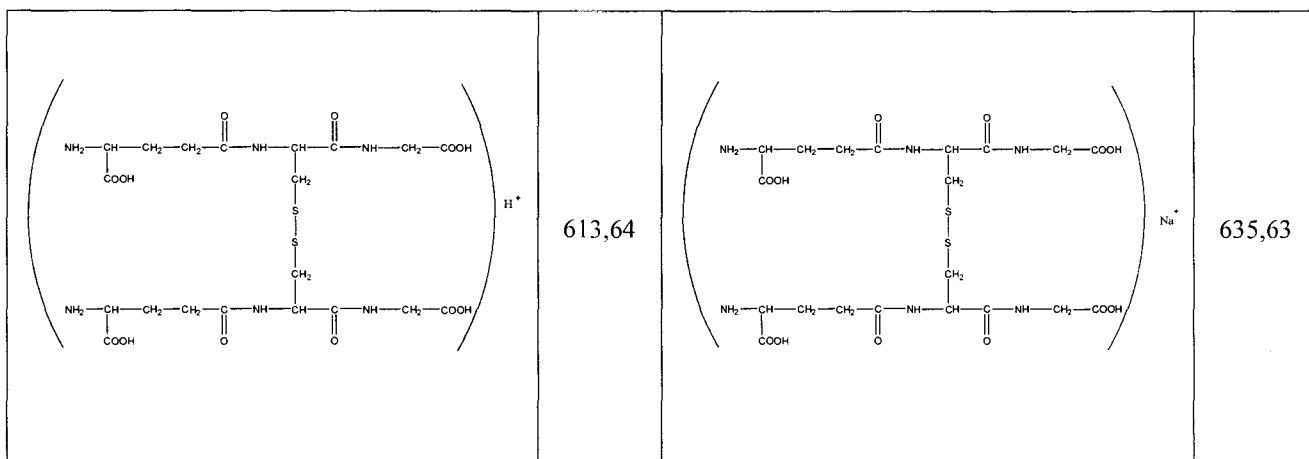
6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

6.1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В результате выполнения теоретической части построена сводная таблица 3.4, содержащая в себе информацию об ионах, которые предположительно получают в процессе анализа глутатиона с помощью масс-спектрометрии с электрораспылением.

Таблица 3. – Ожидаемые ионы.

Ион в положительной моде	m/z	Ион в положительной моде	m/z
	308,32		325,34



Произведен расчет в Fragment Ion Calculator (<http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>) структуры фрагментных ионов глутатиона (рис. 3.7) по номенклатуре Ропшторфа (X,Y,Z – заряд на C-конце, A,B,C – заряд на N-конце).

Sequence: ECG, pI: 3.99976

Fragment Ion Table, monoisotopic masses

Seq	#	A	B	C	X	Y	Z	# (+1)
E	1	102.05555	130.05046	147.07701	-	308.09168	291.06513	3
C	2	205.06473	233.05965	250.08620	205.02835	179.04908	162.02253	2
G	3	262.08620	290.08111	-	102.01916	76.03990	59.01335	1

Mass/Charge Table

	Mass	
	Mono	Avg
(M)	307.08385	307.32153
(M+H) ⁺	308.09168	308.32947
(M+2H) ²⁺	154.54977	154.66872
(M+3H) ³⁺	103.36914	103.44848
(M+4H) ⁴⁺	77.77882	77.83836

Структура фрагментных ионов глутатиона по номенклатуре Ропшторфа.

6.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ВЭЖХ-МС

Получены масс-спектры для восстановленной (рис. 3.8) и окисленной форм глутатиона (рис. 3.9). Выделены наиболее интенсивные пики: $m/z=308,05$ для восстановленного глутатиона ($[C_{10}H_{17}N_3O_6S+H]^+$), $m/z=307,30$, соответствующее двухзарядному димеру ($[C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2+H]^{++}$) и $m/z=613,22$ для однозарядного димера глутатиона

$([C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2+H]^+)$. Идентификация соединений для выделенных пиков подтверждена с помощью изотопного калькулятора Isotope Calculator (MS Interpreter Version 2.0, NIST Mass Spectral Search Program).

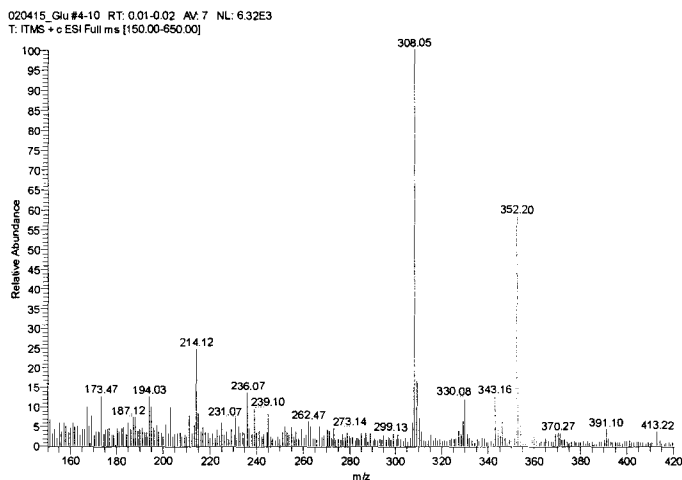


Рисунок 6.1. – Масс-спектр восстановленного глутатиона.

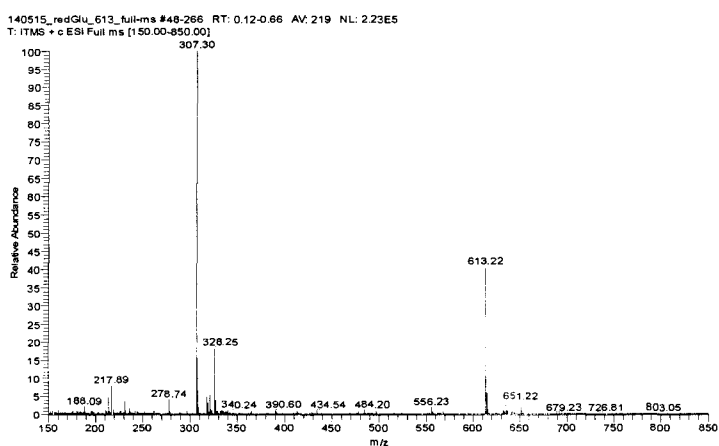


Рисунок 6.2. – Масс-спектр окисленного глутатиона.

Был произведен теоретический расчет массовых чисел для фрагментов глутатиона. Затем с помощью тандемного масс-спектрометрического анализа была показана экспериментальная фрагментация восстановленного (рис. 6.1) и окисленного глутатиона (рис. 6.2), совпадающая с теоретическим расчетом.

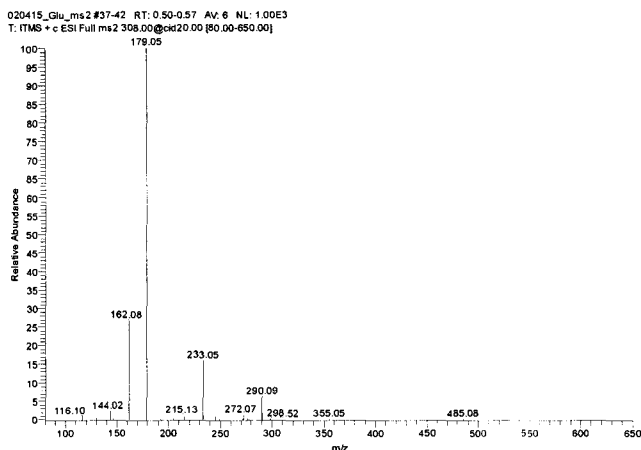


Рисунок 6.3.. – Масс-спектр фрагментированного восстановленного глутатиона после MS^2 -анализа CID 20% по 308 пику.

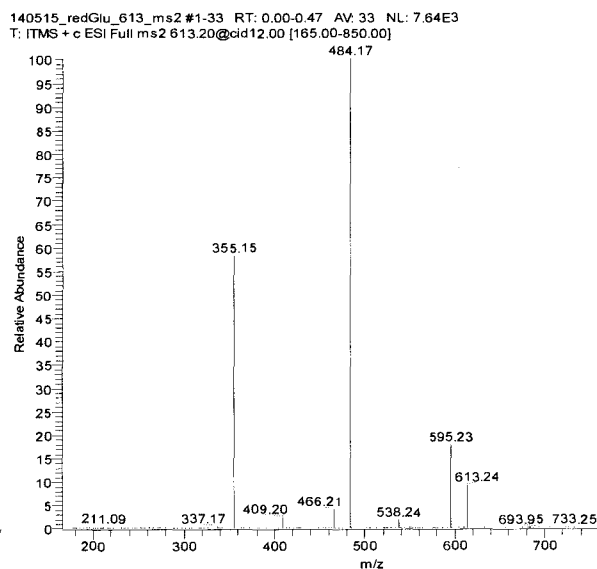
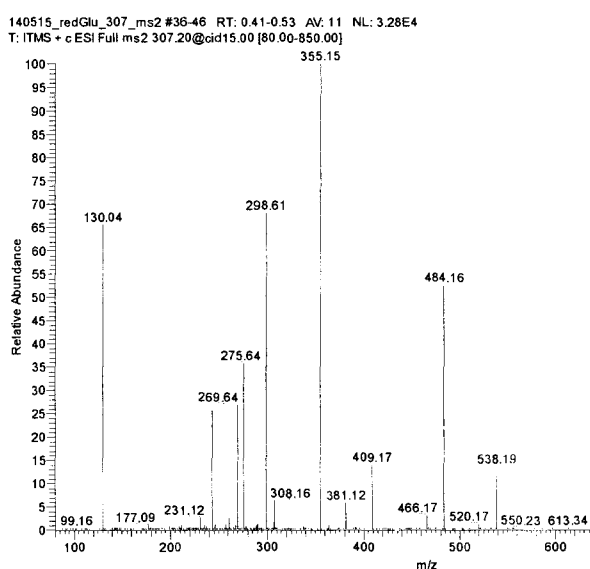


Рисунок 6.4. – Масс-спектр фрагментированного окисленного глутатиона после MS^2 -анализа CID 15% (слева – по 307 пику, справа - по 613 пику).

Качество спектров повышается добавками, вызывающими образование ионов при электрораспылении. Уменьшение pH приводит к увеличению интенсивности пиков в спектрах положительных ионов. На рисунках показаны масс-спектры для глутатиона, которому соответствует массовое число 308 (рис. 6.1), и глутатиона с добавлением муравьиной кислоты (рис. 6.5). На масс-спектре, полученным для раствора глутатиона с добавлением муравьиной кислоты, видно увеличение интенсивности 352 пика, который соответствует соединению глутатиона с муравьиной кислотой HCOOH.

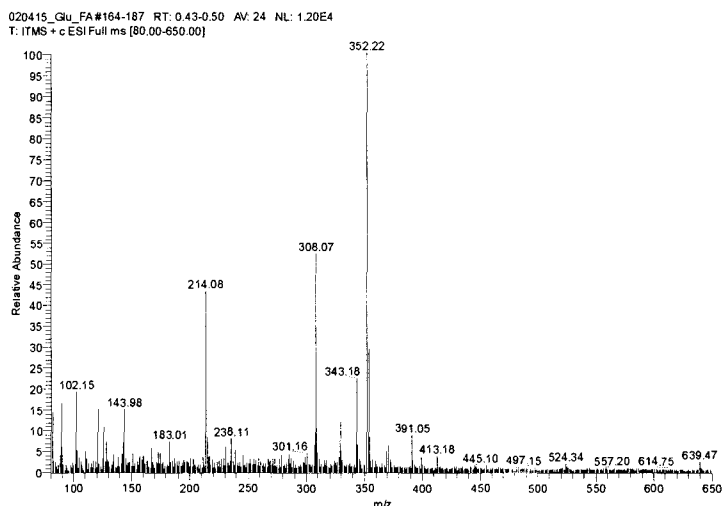


Рисунок 6.5. – Масс-спектр глутатиона с муравьиной кислотой.

Проведен ВЭЖХ-МС анализ растворов, содержащих окисленный, восстановленный глутатион и их смеси. Получены хроматограммы и характерные масс-спектры (рис 6.6 – 6.8), с наиболее интенсивными пиками, соответствующими выбранным ранее пикам для определения двух форм глутатиона. Построены калибровочные зависимости для отдельно восстановленного, окисленного глутатиона и для их смеси в равной пропорции по выделенным ионам (308, 307, 613) и по данным МС²-анализа для них (рис. 3.14, 3.15, 3.17, 3.18, 3.20, 3.21).

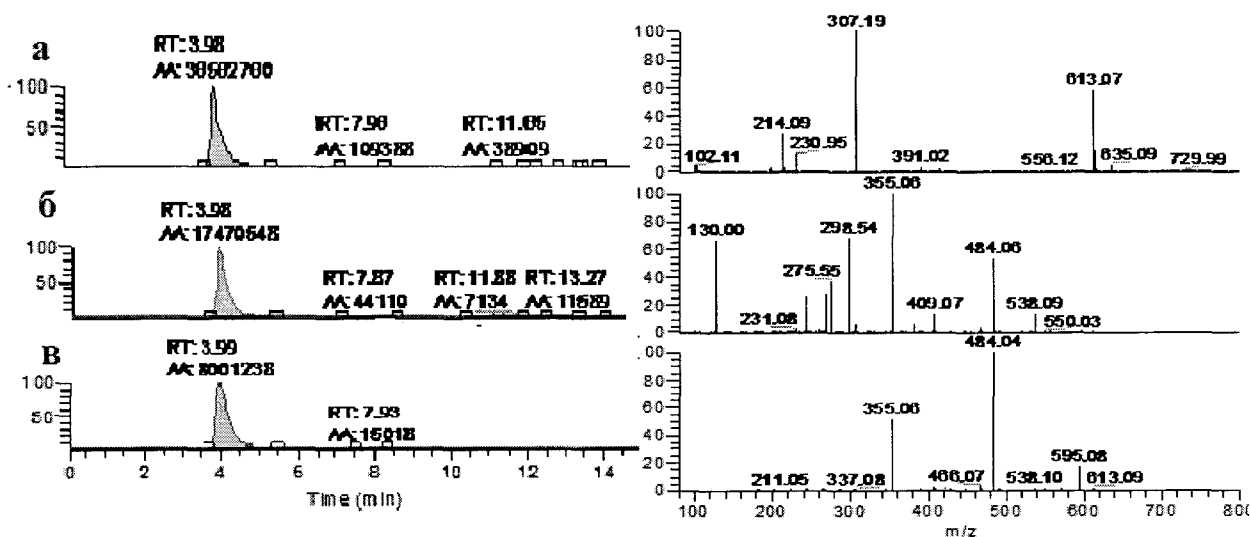


Рисунок 6.7. – Хроматографическое разделение с масс-спектрометрическим детектированием для полного спектра окисленного глутатиона (а) и для данных, полученных в результате МС²-анализа для ионов с массами 307 (б) и 613 (в).

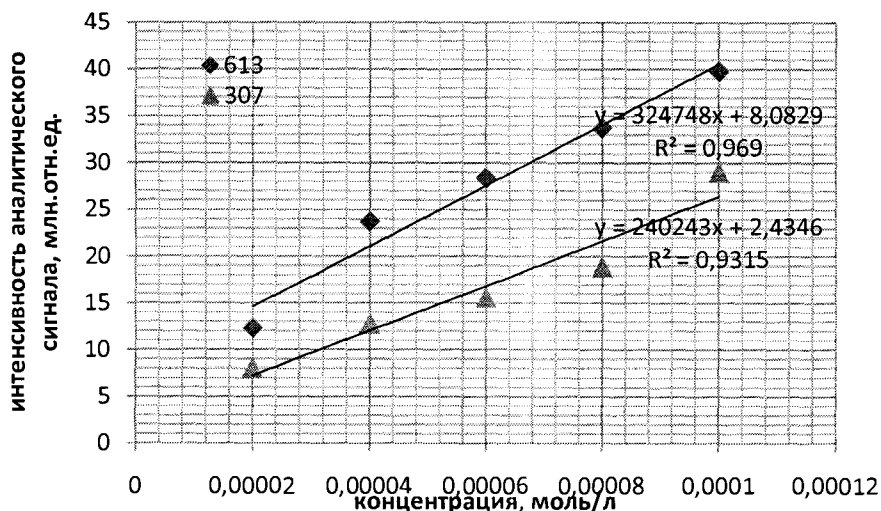


Рисунок 6.8. – Калибровочная зависимость для окисленного глутатиона по массовым числам 307 и 613.

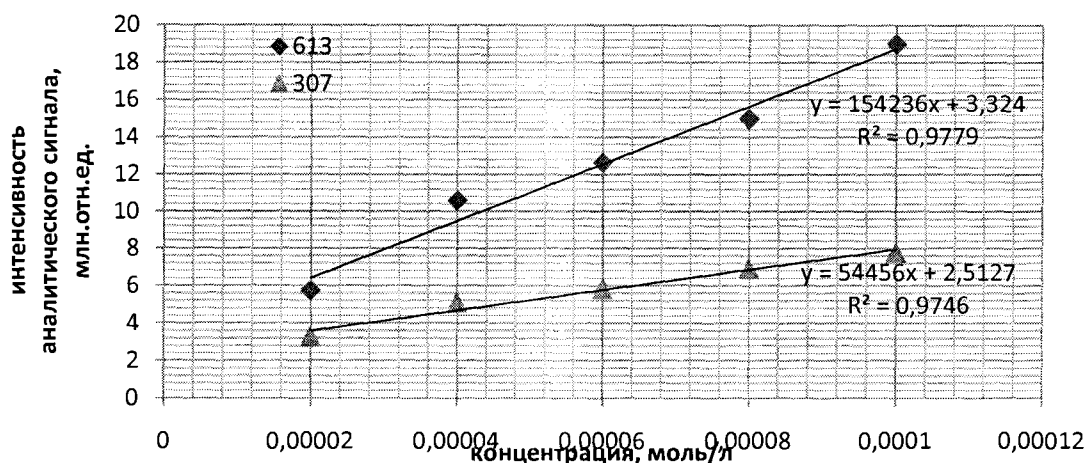


Рисунок 6.9. – Калибровочная зависимость для окисленного глутатиона по данным MS²-анализа для массовых чисел 307 и 613.

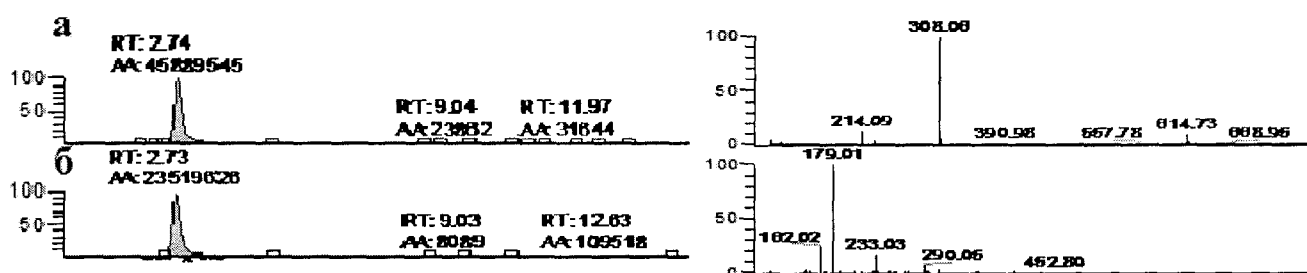


Рисунок 6.10. – Хроматографическое разделение с масс-спектрометрическим детектированием для полного спектра восстановленного глутатиона (а) и для данных, полученных в результате MS²-анализа для иона с массой 308 (б).

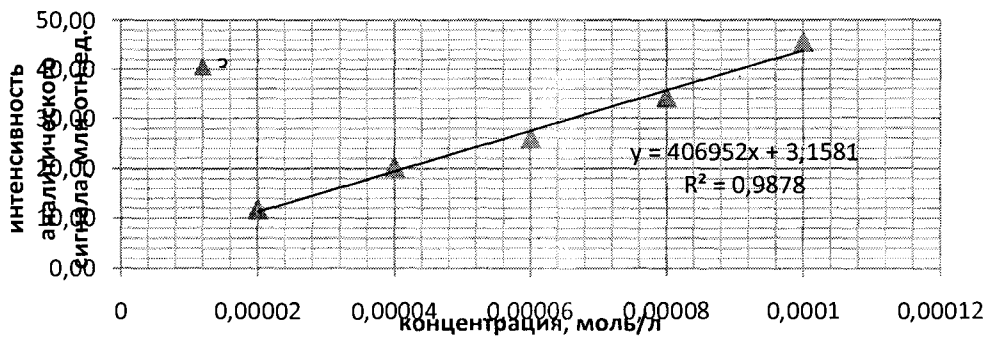


Рисунок 6.11. – Калибровочная зависимость для восстановленного глутатиона по иону с массой 308.

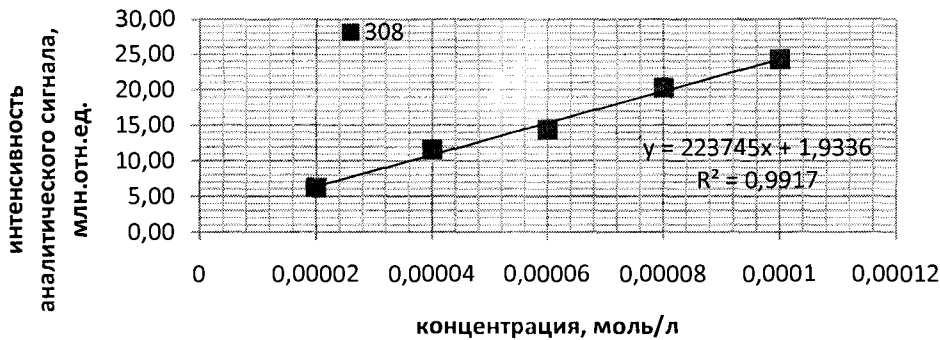


Рисунок 6.12. – Калибровочная зависимость для восстановленного глутатиона по данным MS²-анализа по иону с массой 308.

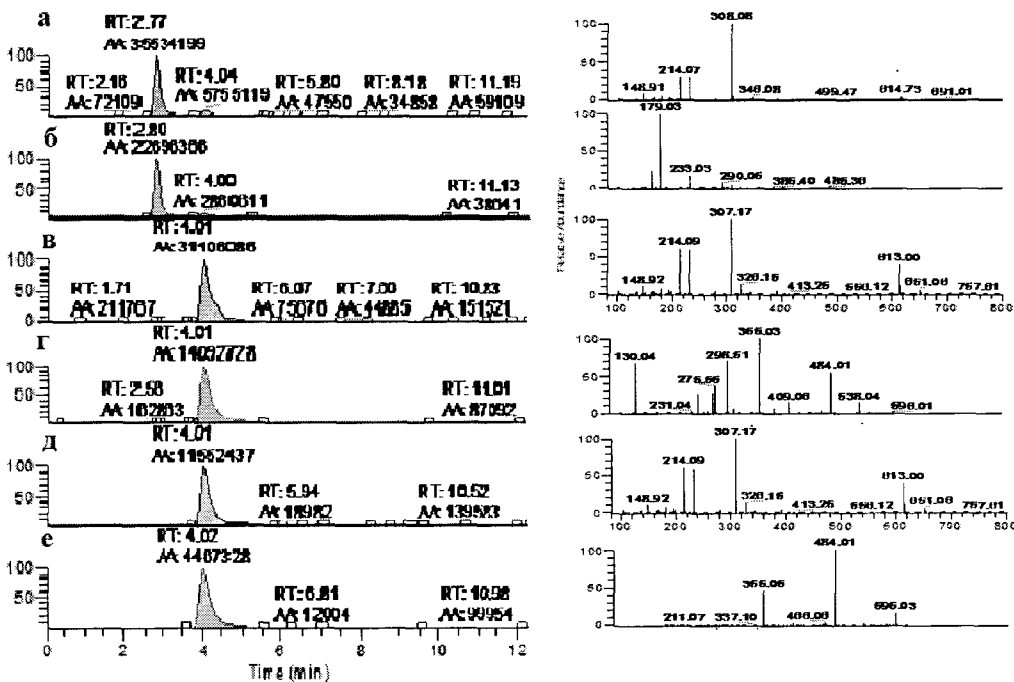


Рисунок 6.13. – Хроматографическое разделение с масс-спектрометрическим детектированием смеси восстановленного и окисленного глутатиона по 308 пику (а) и MS²-анализу для него (б), по 307 пику (в) и MS²-анализу для него (г), по 613 пику (д) и MS²-анализу для него (е).

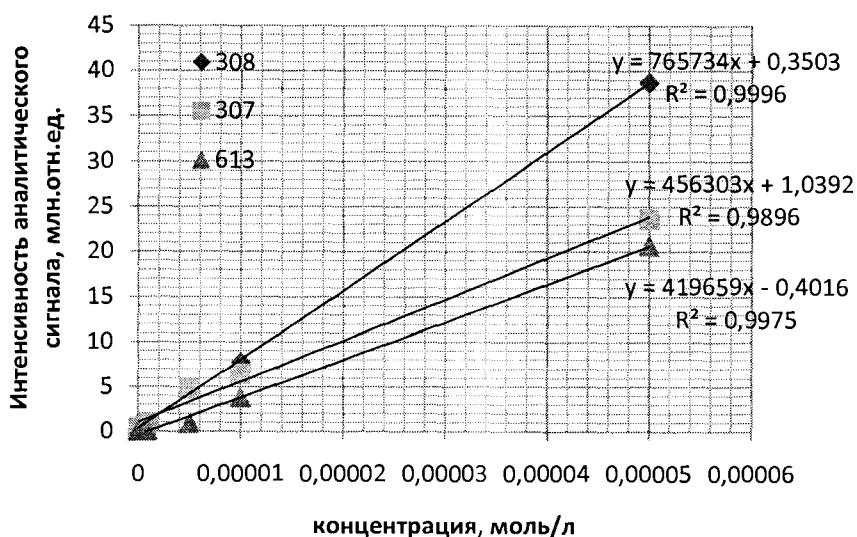


Рисунок 6.14. – Калибровочная зависимость для смеси восстановленного ($m/z=308$) и окисленного глутатиона (двухзарядный ион димера с $m/z=307$, однозарядный ион димера $m/z=614$).

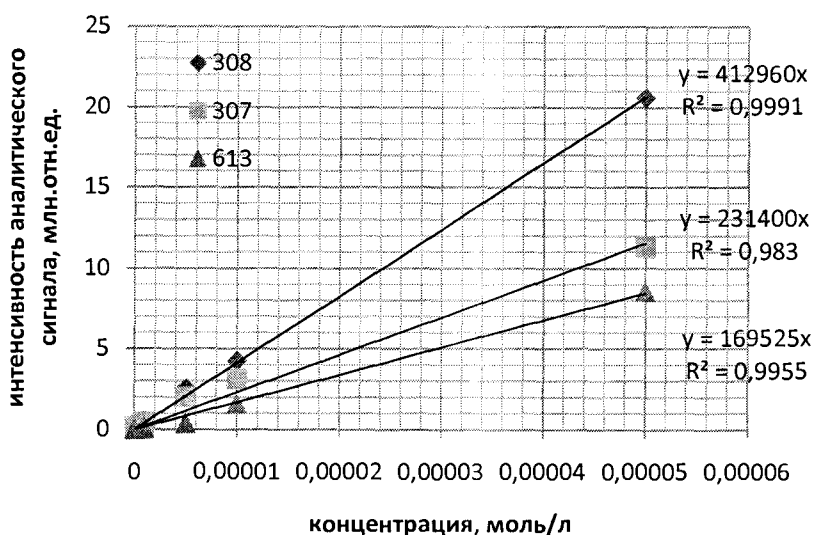


Рисунок 6.15. – Калибровочная зависимость для смеси восстановленного ($m/z=308$) и окисленного глутатиона (двухзарядный ион димера с $m/z=307$, однозарядный ион димера $m/z=614$) по данным MS^2 -анализа.

В ходе хроматографического анализа определено время удерживания на колонке с обращенной фазой восстановленного и окисленного глутатиона и основные пики, который в дальнейшем используется для идентификации исходного восстановленного глутатиона и продуктов его окисления. Определены параметры хроматографического разделения форм глутатиона и нижний предел детектируемых концентраций, который составил $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

Была проведена реакция окисления глутатиона кислородом воздуха, получены масс-спектры с наиболее интенсивными пиками на 325 и 352 массах. В ходе проведения

реакции окисления глутатиона наблюдается падение интенсивности пика 352, соответствующего соединению глутатиона и муравьиной кислоты, и рост интенсивности 325 пика (рис. 6.16).

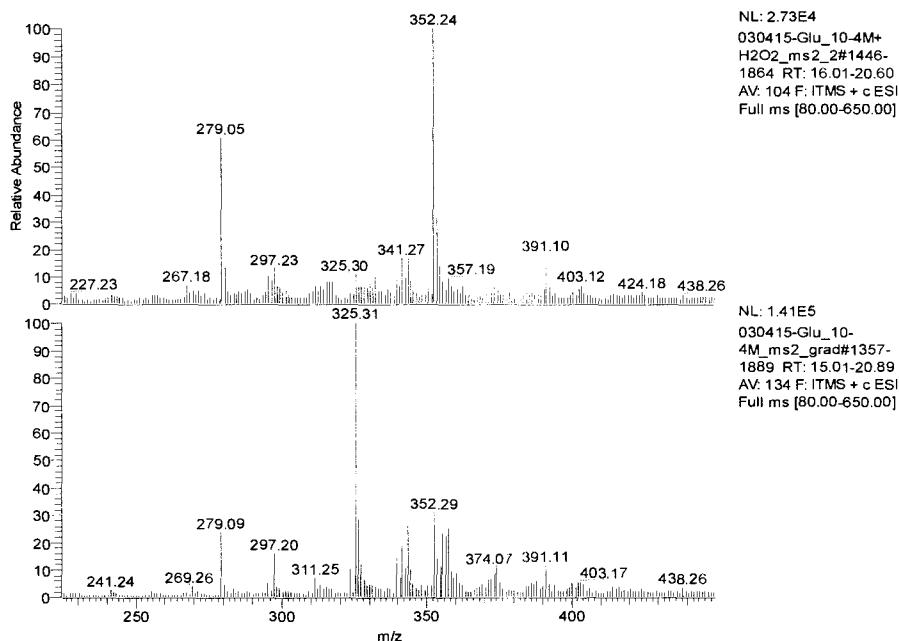


Рисунок 6.16. – Автоокисление глутатиона. Сверху – масс-спектр для свежего раствора, снизу – масс-спектр для раствора глутатиона, снятый через сутки после приготовления.

Для идентификации соединения, соответствующего 325 пику, был проведен MS²-анализ 343 пика (рис. 6.17), который также присутствует на масс-спектре, и 325 пика (рис. 3.24).

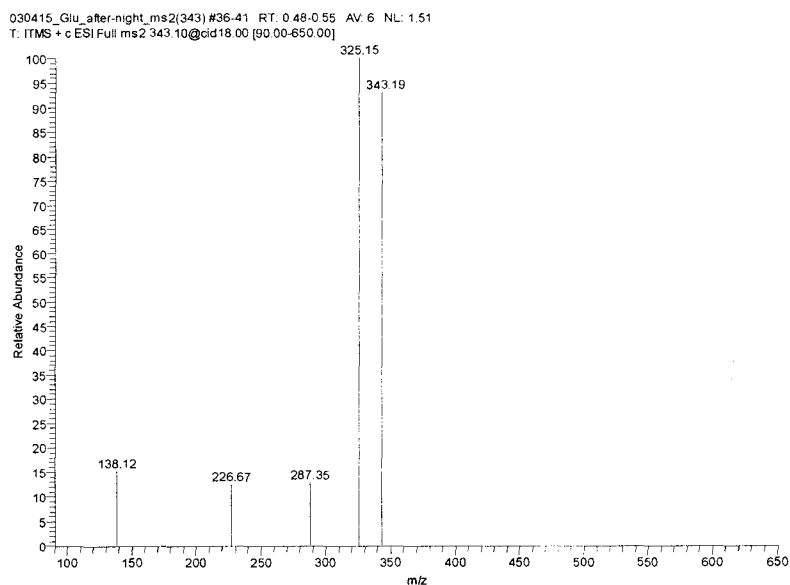


Рисунок 6.17. – MS²-анализ 343 пика, CID 18%.

Замечено, что данные ионы фрагментируются на соединения, отличающиеся от предшествующих на 18, что соответствует массе воды. Один из фрагментов распада 325

пика лежит на 307 массе, что соответствует двухзарядному димеру глутатиона. Соответственно, 325 пик определен как двухзарядный комплекс димера глутатиона и ВОДЫ.

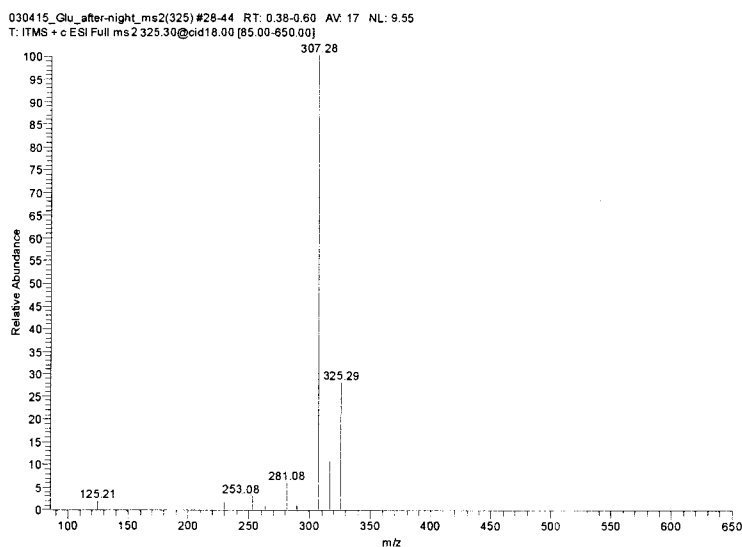


Рисунок 6.18. – MS²-анализ 325 пика, CID 18%.

В качестве окислителя была выбрана перекись водорода, которая является мягким окислителем, не разрушающим скелет молекулы, позволяющая проводить окисление без буфера, разлагается на летучие компоненты и вступает в реакцию аналогично реакции в живой системе. На масс-спектрах видно падение интенсивности пика исходного глутатиона 308 до следовых количеств с использованием избытка перекиси водорода в реакционном растворе (рис.6.19).

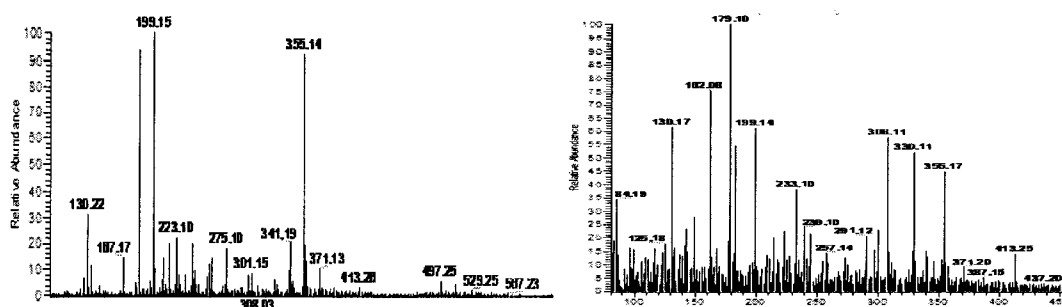


Рисунок 6.19. – Окисление глутатиона перекисью водорода. Слева - избыток H₂O₂ (10⁻³ моль/л) в реакционной смеси, справа - недостаток H₂O₂ (10⁻⁵ моль/л).

В ходе ВЭЖХ-МС анализа реакции окисления глутатиона наблюдается падение интенсивности аналитического сигнала для пика с m/z=308, соответствующего исходному восстановленному глутатиону GSH, и увеличение интенсивности пиков с m/z=613 (окисленный однозарядный глутатион GSSG) и с m/z=307 (окисленный двухзарядный

глутатион GSSG). По полученным данным составлена таблица 3.4. Для перевода аналитического сигнала в количественную характеристику, соответствующую концентрации, использована сформированная ранее калибровочная зависимость для смеси восстановленного и окисленного глутатиона.

Таблица 4. – Значения площадей хроматографических пиков, регистрируемых для разных массовых чисел в ходе реакции окисления глутатиона.

Время измерения, мин	Площадь хроматографического пика, млн.отн.ед.					
	m/z=308, RT=2,6		m/z=613, RT=3,7		m/z=307, RT=3,7	
	МС	МС ²	МС	МС ²	МС	МС ²
3	45,2	23,9	0,2	0,07	0,6	0,3
15	36,1	22,8	0,3	0,10	1,1	0,4
27	34,6	20,9	0,3	0,13	1,2	0,6
45	33,0	20,3	0,4	0,17	2,2	1,0
70	26,6	17,8	0,5	0,24	2,2	1,2

Построены кинетические кривые окисления глутатиона по ионам с m/z=308, m/z=613 и m/z=307 (рис. 3.26, 3.27) и определено ВПО (табл. 3.5).

Таблица 5. – ВПО глутатиона.

	МС-анализ	МС ² -анализ
Начальная концентрация ВПО (m/z=308)	5,8*10 ⁻⁵ моль/л 103 мин	5,8*10 ⁻⁵ моль/л 183 мин
Начальная концентрация ВПО (m/z=613)	4,8*10 ⁻⁷ моль/л 60 мин	4,2*10 ⁻⁷ моль/л 37 мин
Начальная концентрация ВПО (m/z=307)	1,2*10 ⁻⁶ моль/л 25 мин	1,2*10 ⁻⁶ моль/л 23 мин

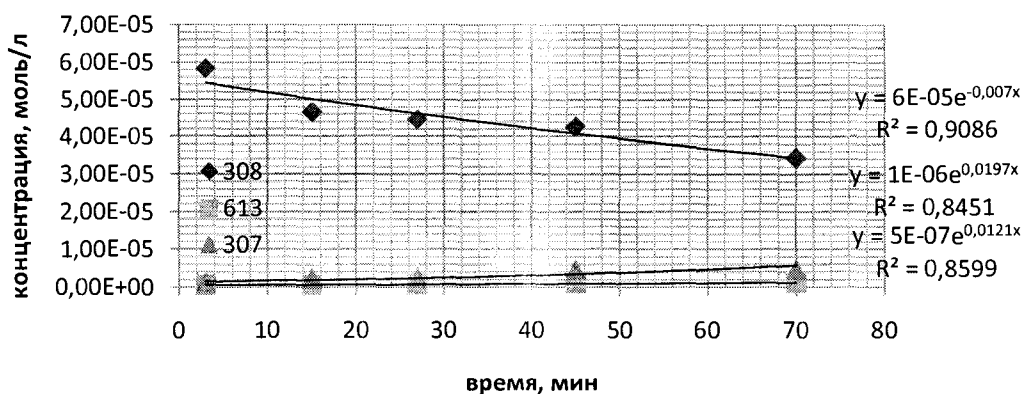


Рисунок 6.20. – Кинетика окисления глутатиона.

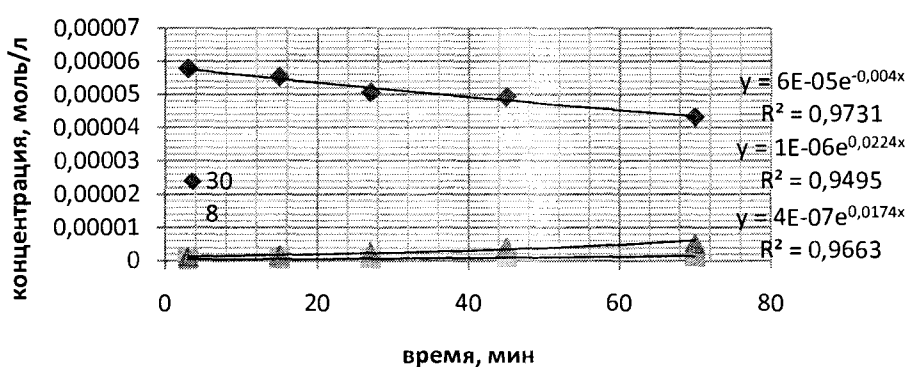


Рисунок 6.21. – Кинетика окисления глутатиона по данным MS²-анализа.

3.2.3 СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

По результатам измерений оптической плотности восстановленного глутатиона с разной концентрацией построена калибровочная зависимость (рис. 6.22). Проведена реакция окисления глутатиона нитритом натрия. Кинетика изучена с помощью спектрофотометрического анализа (рис.6.23). Время полуокисления составило ВПО=14,8±0,5 мин.

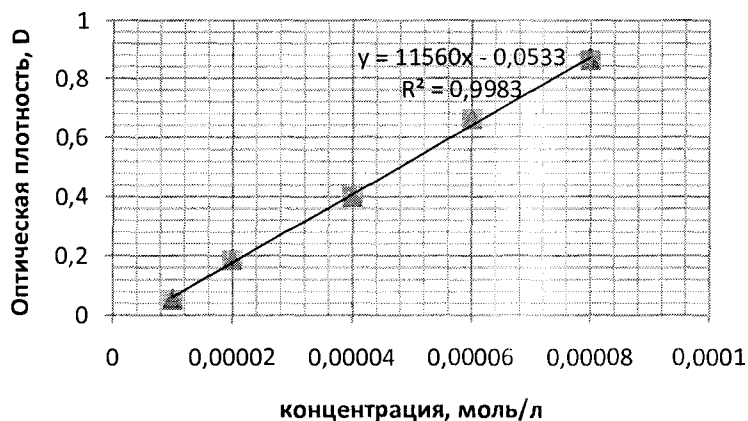


Рисунок 6.22. – Калибровочная зависимость для восстановленного глутатиона.

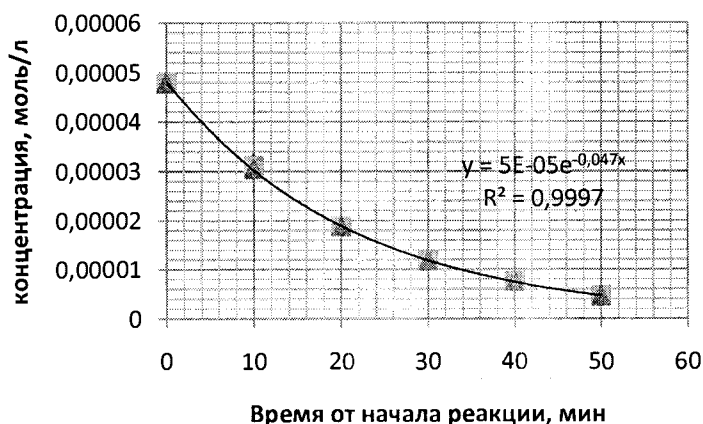


Рисунок 6.23. – Кинетика окисления глутатиона.

7. ДЕСТВИЕ ВНЕШНИХ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СКОРОСТЬ ОКИСЛЕНИЯ ТИОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

7.1 УСТРОЙСТВО ДЛЯ СОЗДАНИЯ УПРАВЛЯЕМОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

В качестве внешнего фактора, возможно влияющего на скорость окисления тиолов, выбрано влияние импульсным электромагнитным полем. Для воздействия на раствор тиолов сконструирован термостатированный реактор, состоящий из соленоида, намотанного на разработанную приставку для масс-спектрометра, и источника питания (рис.7.1). Приставка для масс-спектрометра позволяет вводить отдельно образец и окислитель в область для проведения реакции, и затем прореагировавшую смесь в сам масс-спектрометр для изучения кинетики окисления.

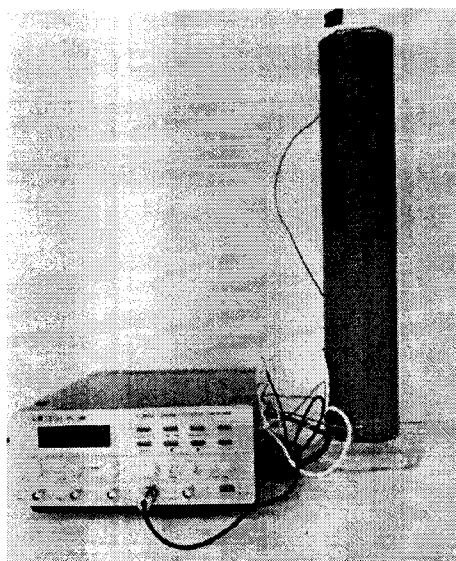


Рисунок 7.1. – Масс-спектрометрическая приставка для изучения влияния импульсного электромагнитного поля на скорость окисления тиоловых соединений.

При протекании тока по обмотке внутри катушки создаётся магнитное поле, направленное вдоль оси, которое однородно и для постоянного тока по величине равно $B=\gamma I$, где B – магнитное поле, I – постоянный ток, $\gamma=\mu_0 N/l$: N – число витков = 200, l – длина соленооида = 0,4 м, μ_0 – магнитная проницаемость = $1,3 \cdot 10^{-6}$ Гн/м. По измерениям, сделанным с помощью магнитометра, построена зависимость магнитного поля от тока, подаваемого на катушку (рис. 7.2). Определен коэффициент пропорциональности $\gamma=4,5 \cdot 10^{-4}$ Гн/м².

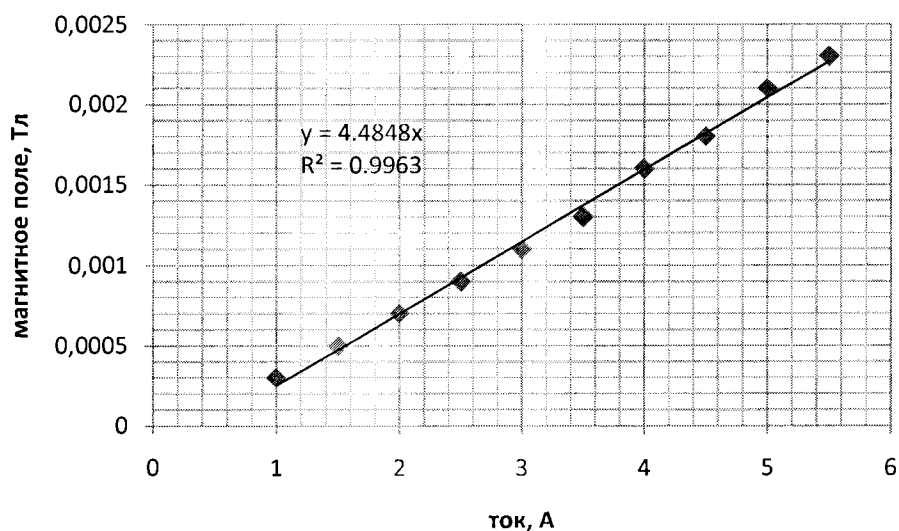


Рисунок 7.2. – Зависимость магнитного поля от тока, подаваемого на катушку.

Расчёт катушки и определение области однородности магнитного поля производился с помощью программы femm42 в осесимметричной системе координат (рис. 7.3 – 7.4).

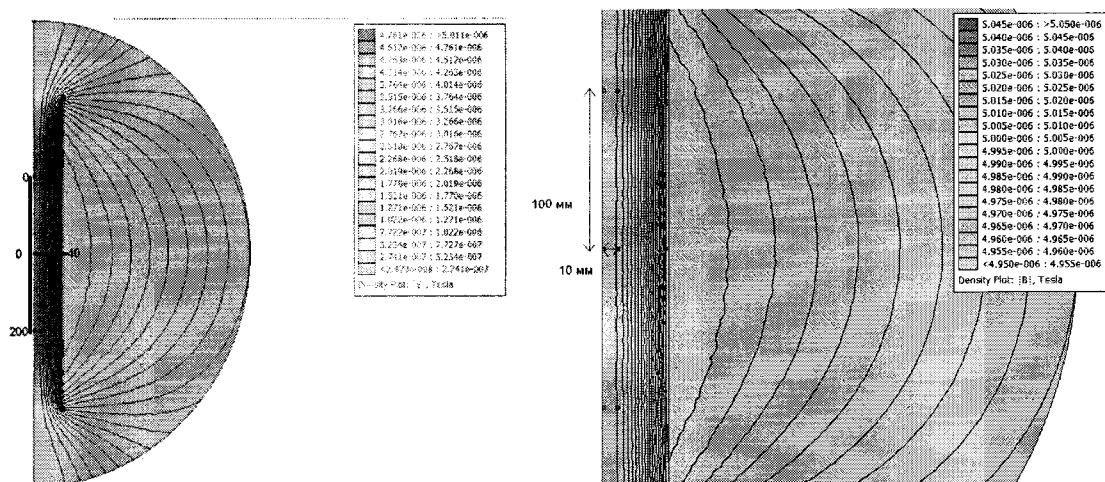


Рисунок 7.3. – Общий вид магнитного поля катушки и увеличенный масштаб для центра катушки.

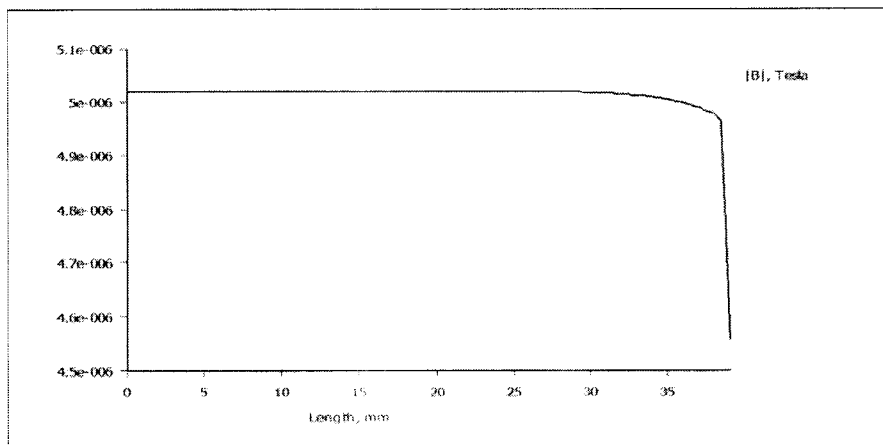


Рисунок 7.4. – Распределение магнитного поля по диаметру.

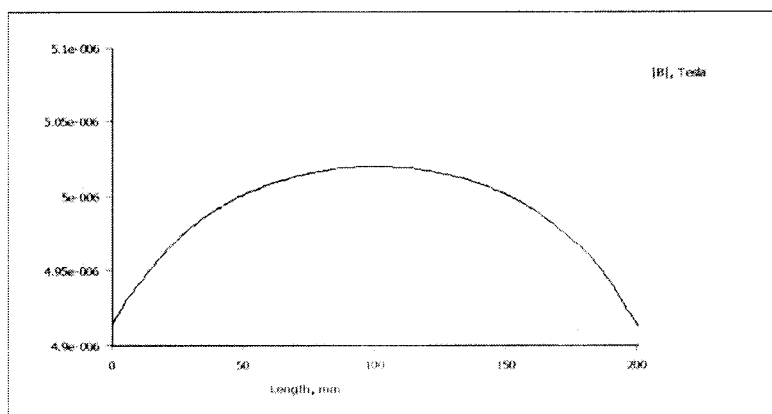


Рисунок 7.5. – Распределение магнитного поля по длине.

Для проведения окисления пробирка с реакционным раствором помещалась в рассчитанную область собранной приставки с однородным магнитным полем $5 \cdot 10^{-6}$ Тл.

7.2. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОКИСЛЕНИЯ ГЛУТАТИОНА В МАГНИТНОМ ПОЛЕ

В ходе ВЭЖХ-МС анализа окисления глутатиона в магнитном поле построены кинетические кривые (рис. 7.6 – 7.9). Значение ВПО (табл. 5) зависит от выбора пика, по которому он будет определяться. Возможно, это связано с наличием дополнительных химических взаимодействий и возникновением неучтенных в нашем эксперименте продуктов реакции окисления.

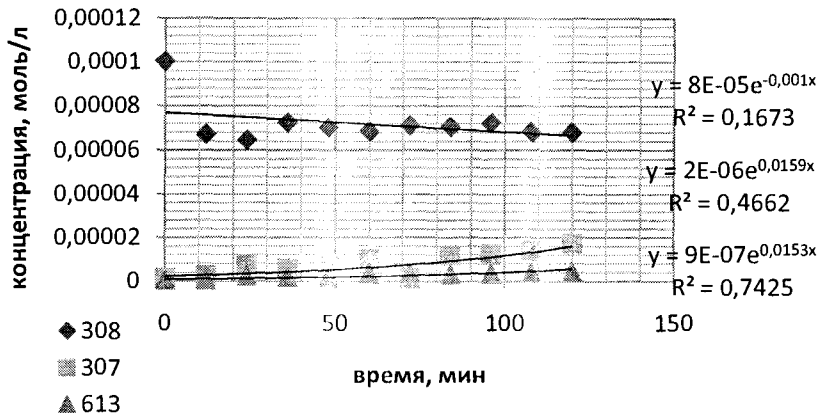
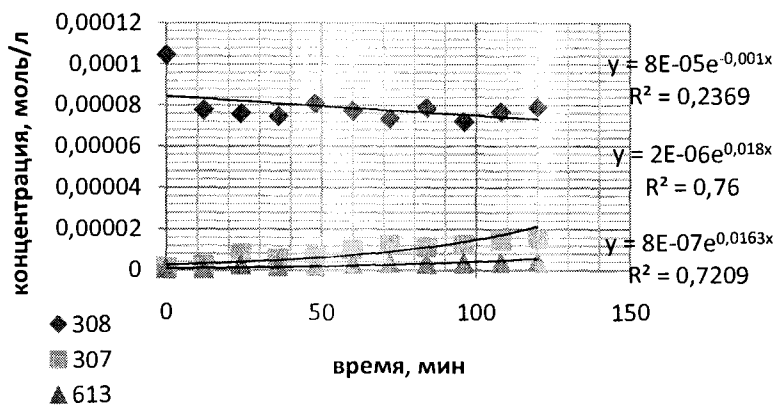


Рисунок 7.6. – Кинетика окисления глутатиона (измерение 1: MS и MS²-анализ).

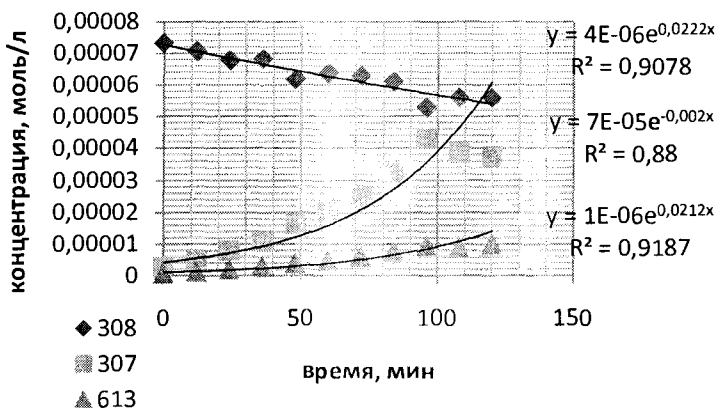
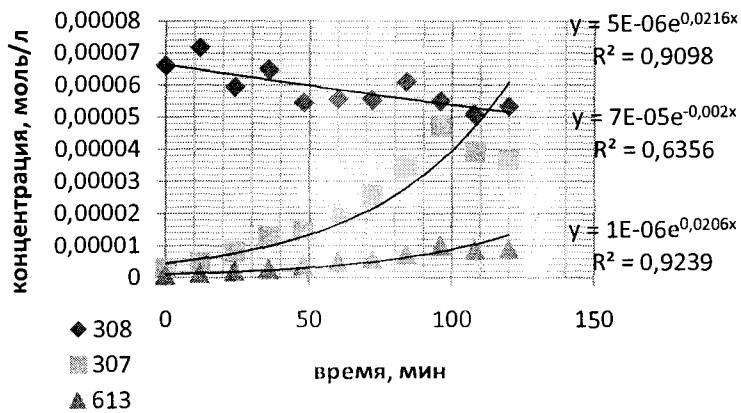


Рисунок 7.7. – Кинетика окисления глутатиона в магнитном поле (измерение 1: MS и MS²).

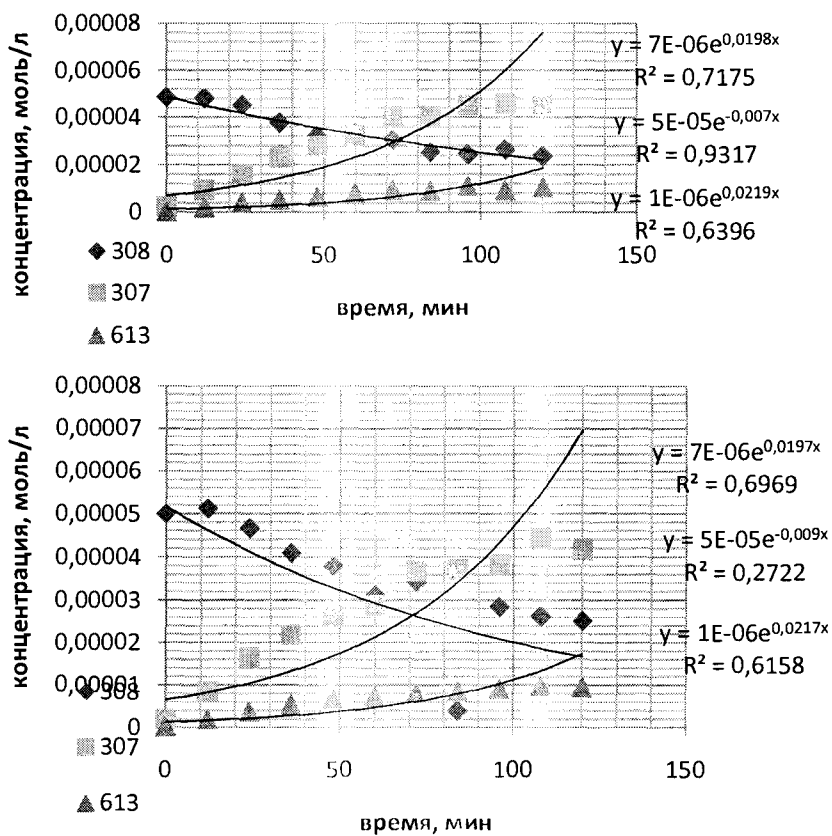


Рисунок 7.8. – Кинетика окисления глутатиона (измерение 2: МС и МС²).

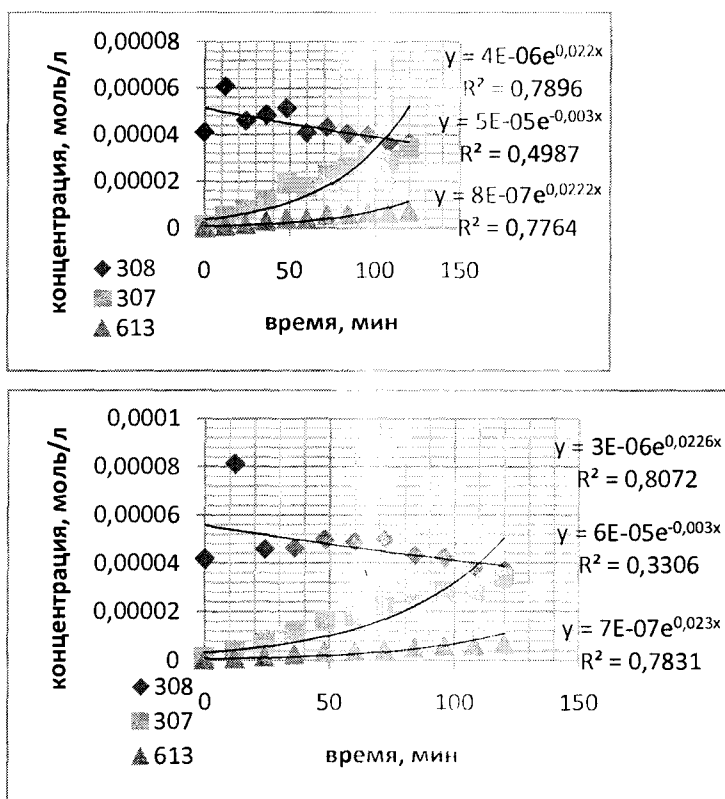


Рисунок 7.9. – Кинетика окисления глутатиона в магнитном поле (измерение 2: МС и МС²).

Таблица 6. – ВПО в зависимости от воздействия внешним фактором.

	Измерение 1	Измерение 1 (МС ² -анализ)	Измерение 2	Измерение 2 (МС ² -анализ)	Измерение 1 в МП	Измерение 1 в МП (МС ² -анализ)	Измерение 2 в МП	Измерение 2 в МП (МС ² -анализ)
Начальная концентрация ВПО (308)	1*10 ⁻⁴ моль/л 468 мин	1*10 ⁻⁴ моль/л 426 мин	4,9*10 ⁻⁵ моль/л 103 мин	5*10 ⁻⁵ моль/л 77 мин	6,6*10 ⁻⁵ моль/л 376 мин	7,3*10 ⁻⁵ моль/л 324 мин	4,1*10 ⁻⁵ моль/л 297 мин	4,2*10 ⁻⁵ моль/л 353 мин
Начальная концентрация ВПО (307)	1,4*10 ⁻⁶ моль/л 68 мин	1,2*10 ⁻⁶ моль/л 66 мин	2,2*10 ⁻⁶ моль/л 94 мин	1,9*10 ⁻⁶ моль/л 101 мин	3,1*10 ⁻⁶ моль/л 54 мин	2,7*10 ⁻⁶ моль/л 48 мин	1,3*10 ⁻⁶ моль/л 83 мин	1,2*10 ⁻⁶ моль/л 70 мин
Начальная концентрация ВПО (613)	5,1*10 ⁻⁷ моль/л 82 мин	4,6*10 ⁻⁷ моль/л 77 мин	2,8*10 ⁻⁷ моль/л 90 мин	2,5*10 ⁻⁷ моль/л 97 мин	7,8*10 ⁻⁷ моль/л 46 мин	6,9*10 ⁻⁷ моль/л 50 мин	2,9*10 ⁻⁷ моль/л 77 мин	2,3*10 ⁻⁷ моль/л 78 мин

Таким образом, во всех измерениях наблюдается выходящее за пределы ошибки действие импульсного магнитного поля на скорость окисления глутатиона. Величина измеряемого ВПО различна для различных продуктов, что соответствует представлениям о том, что окисление глутатиона (первичная реакция) и образование вторичных продуктов его окисления по-разному зависит от условий реакции. Очевидно, что кинетику окисления необходимо отслеживать по молекулярному иону глутатиона, а вторичные продукты позволяют контролировать правильность хода реакции.

На следующем этапе работы будут проведены систематические измерения зависимости кинетики окисления глутатиона от параметров магнитного поля в широком диапазоне интенсивностей поля и формы импульсов.

8. КРАТКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. На основе проведенного аналитического обзора биохимии глутатиона, показавшего его важную роль в функционировании антиоксидантной защиты живого организма, обосновано использование глутатиона в качестве модельного тиолового соединения, способного имитировать зависимость живого организма от внешних физических факторов.
2. Разработанная и обоснованная на первом этапе работы методика окисления тиолсодержащих веществ, совместимая с МС-анализом с электрораспылением, распространена на изучение глутатиона. Показано, что в масс-спектре глутатион представлен интенсивным молекулярным ионом 308 а.е.м., а также продуктами его автоокисления.
3. Проведены МС измерения скорости окисления глутатиона перекисью водорода, определен состав продуктов. Проведено обсуждение процессов, протекающих при измерениях, и их возможного влияния на получаемый результат.
4. Данные масс-спектрометрического анализа по измерению скорости окисления продублированы известным ранее спектрофотометрическим методом при использовании в качестве окислителя нитрита натрия. Показано, что нитрит натрия является удобным окислителем, но эта реакция требует для масс-спектрометрического измерения модификации системы распыления масс-спектрометра.
5. Разработан и изготовлен источник импульсного магнитного поля, создающий однородное поле в широком диапазоне величин и форм импульса. Изготовлен реактор, позволяющий проводить реакцию окисления в этом управляемом магнитном поле.
6. Показано, что на всех изученных продуктах реакции окисления глутатиона наблюдается воздействие импульсного магнитного поля с напряженностью $5 \cdot 10^{-6}$ Тл на скорость окисления, что свидетельствует о действительном наличии такого влияния. Анализ факторов, влияющих на кинетику окисления, будет проведен на этапе исследования 2016г.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Соколовский В. В. Тиолдисульфидная система в реакции организма на факторы окружающей среды // СПб. : Наука. – 2008.
2. Соколовский В.В. Тиол-дисульфидная система и биоритмы // Сборник избранных трудов IV Международного Конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – 2006. – С. 121 – 131.
3. В.В. Соколовский О биохимическом механизме реакций живых организмов на изменения солнечной активности // Проблемы космической биологии. – 1982. – Т. 43. – С. 180-193.
4. Newton G. L., Arnold K., Price M. S., Sherrill C., Delcardayre S. B., Aharonowitz Y., Cohen G., Davies J., Fahey R. C., Davis C. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes // J. Bacteriol. – 1996. – V. 178. – P. 1990–1995.
5. Смирнов Л. П., Суховская И.В. Роль глутатиона в функционирование систем антиоксидантной защиты и биотрансформации (обзор) // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2014. - № 6. – С. 35-40.
6. Meister A. Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects, Part A // Wiley, N.Y. – 1989. – P. 367-474.
7. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Биологическая роль глутатиона // Успехи современной биологии. – 1990. – Т. 110. – №. 1. – С. 4.; Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Система глутатиона. II. Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55. – № 4. – С. 365-379.
8. Meister A., Anderson M. E. Glutathione // Annual review of biochemistry. – 1983. – V. 52. – № 1. – P. 711-760.
9. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification // J Biol Chem. – 1988. – V. 263. – № 33. – P. 17205-17208
10. Е.В.Терешина Старение, окислительный стресс и антиоксиданты // Альманах «Геронтология и гериатрия». – 2005. – № 5.
11. Толпыгина О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор) // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2012. – №. 2-2.
12. Калинина Е. В. Роль окислительного стресса и глутатион-зависимых процессов в развитии клеточной лекарственной устойчивости и при терапии ряда заболеваний:

дисс. на соискание ученой степени д. биол. н.: спец. 03. 00. 04 «Биохимия» // Москва. – 2009.

13. Галль Л.Н., Краснов Н.В., Куснер Ю.С., Николаев В.И., Приходько В.Г., Симонова Г.Д., Шкуров В.А. Электрогидродинамический ввод жидких веществ в масс-спектрометр // ЖТФ. – 1984. – Т.54. – № 8. – С. 1559-1571.
14. Н.С.Фомина, Л.Н.Галль, С.В.Масюкевич, Н.Р.Галль. Низкочастотные осцилляции тока электрораспыления с одновременной визуализацией формы конуса Тейлора. «Масс-спектрометрия», 2015, т.12, №4, с.217-222.
15. Лобкаева Е. П., Девяткова Н. С., Комиссаров В. И. Обоснование подбора параметров импульсного магнитного поля для получения заданного биологического эффекта // Сб «Человек и электромагнитные поля», т.1.. – 2005. – С. 8-19.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Полученные в 2015 году результаты по теме оформлены в виде 2 публикаций, направленных в журналы «Научное приборостроение» и «Масс-спектрометрия»:

1. Низкочастотная индуктивная диэлькометрия – информативный метод для изучения структурирования воды в водных растворах.

Галль Л.Н.^{1,3}, Максимов С.И.¹, Скуридина Т.С.¹, Галль Н.Р.^{1,2}.

1 – Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург, Рижский пр., 26, hina_miste@mail.ru

2 - ФТИ им. А.Ф.Иоффе РАН, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 26

3- СПб НЦ РАН, г. Санкт-Петербург, Дворцовая набережная, 3.

2. Изучение 2,3-димеркаптопропан-1-сульфоната натрия и продуктов его мягкого окисления методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения

Денис Олегович Кулешов^{1,4*}, Татьяна Эдуардовна Березкина^{2,4}, Яна Владимировна Русских^{3,4}, Екатерина Николаевна Чернова^{3,4}, Зоя Андреевна Жаковская³, Сергей Владимирович Масюкевич¹, Лидия Николаевна Галль^{1,4}, Николай Ростиславович Галль^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения РАН

Россия, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А

E-mail: hellchemist@yandex.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН

Россия, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН

Россия, 197110, Санкт-Петербург, ул. Корпусная, 18

и доложены на 7 конференциях:

1. VII Международный конгресс “Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине”. Санкт-Петербург 07-11.09.2015.

1. Березкина Т.Э., Кулешов Д.О., Масюкевич С.В., Галль Л.Н., Галль Н.Р. Влияние низкочастотной магнитной обработки на скорость протекания реакции окисления глутатиона, *стендовый*. Научные труды конгресса, с.8.
2. Л.Н.Галль, И.Р.Галль, С.В.Масюкевич, Н.Р.Галль. Низкочастотная диэлькометрия разбавленных водных растворов щелочных металлов и органических соединений, *стендовый*. Научные труды конгресса, с.279.

2. I Всероссийская конференция с международным участием “Химический анализ и медицина” 09-12.ноябрь 2015, Москва.

1. Кулешов Д.О., Березкина Т.Э., Чернова Е.Н., Русских Я.В., Жаковская З.А., Галль Л.Н., Галль Н.Р. ВЭЖХ-МС² анализ окисленной и восстановленной форм глутатиона, *устный*. Сборник тезисов, С. 35-36.

3. II Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием. – Краснодар, окт. 2015..

1. Кулешов Д.О., Березкина Т.Э., Бобков Д.Е., Галль Л.Н., Галль Н.Р. Измерение скорости окисления глутатиона с применением ВЭЖХ-МС, *устный*. // Материалы конференции с. 122.

4. VI Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы». – ВМСО, пос. Московский, окт. 2015.

- 1.Кулешов Д.О., Березкина Т.Э., Чернова Е.Н. Разработка ВЭЖХ-МС-методики для изучения влияния внешних факторов на модельные системы тиол-дисульфидных превращений. *Устный*. Тезисы, с. 92.

5.XVIII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей, посвященная двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ. – СПб. 2015.

1. Березкина Т.Э., Кулешов Д.О., Бобков Д.Е. Определение глутатионового статуса и скорости окисления глутатиона методом ВЭЖХ-МС, *устный*. // Тезисы, с 77-78.

6. Неделя науки СПбГПУ: материалы научно-практической конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбГПУ.– СПб, 2015.

1. Березкина Т.Э., Кулешов Д.О., Чернова Е.Н., Жаковская З.А., Русских Я.В., Галль Л.Н., Галль Н.Р. Измерение скорости окисления унитиола с использованием масс-спектрометрии с электрораспылением, *устный*. Тезисы, с.78

7. LXXVI научно-практическая конференция «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины», СПбГМУ, сент. 2015.

1. Березкина Т.Э., Кулешов Д.О., Бобков Д.Е. Измерение глутатионового статуса с помощью HPLC-MS, *устный*. // Тезисы, с121.

По результатам исследований защищена 1 магистерская диссертация:

**Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»
Кафедра «Биофизика»**

Диссертация допущена к
защите
Зав. кафедрой, проф.
_____ Скворцов А.Н.
" _ " _____ 2015 г.

**ДИССЕРТАЦИЯ
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ МАГИСТРА
по теме:
ИЗУЧЕНИЕ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ МЕТОДОМ
ВЭЖХ-МС**

Направление: 011200.68 – Физика

Магистерская программа: 011200.68.02 – Биофизика

Выполнил студент гр. 63417

Т.Э. Березкина

(подпись)

Руководитель, д.ф.-м.н., проф.

Н.Р. Галль

(подпись)

Рецензент, к.б.н., доц.

А.Н. Савельев

(подпись)

Санкт-Петербург 2015