

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

А. О. Логвина

БИОХИМИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

*Рекомендовано
Учебно-методическим объединением
по естественно-научному образованию в качестве
учебно-методического пособия для магистрантов
учреждений высшего образования, обучающихся
по специальности «биохимия»*

МИНСК
БГУ
2023

УДК 577.121(075.8)

ББК 28.072я73

Л69

Рецензенты:

кафедра общей биологии и ботаники

Белорусского государственного

педагогического университета имени Максима Танка

(заведующий кафедрой кандидат сельскохозяйственных наук,

доцент *И. И. Жукова*);

кандидат биологических наук, доцент *О. В. Чижик*

Логвина, А. О.

Л69 Биохимия вторичных метаболитов : учеб.-метод. пособие /
А. О. Логвина. – Минск : БГУ, 2023. – 135 с.
ISBN 978-985-881-387-1.

Представлены теоретические основы биохимии вторичного метаболизма, общие принципы разработки подходов к биохимическому исследованию вторичных метаболитов и анализа полученных результатов, инструкции для выполнения экспериментальных работ и задания для практических занятий.

Для магистрантов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности «биохимия».

УДК 577.121(075.8)

ББК 28.072я73

ISBN 978-985-881-387-1

© Логвина А. О., 2023

© БГУ, 2023

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебно-методическое пособие нацелено на формирование представлений о закономерностях вторичного синтеза и его значении для организмов, продуцирующих вторичные метаболиты (растения, беспозвоночные животные, грибы, бактерии); рассмотрение подходов к классификации, структурных особенностей и биохимических характеристик основных групп вторичных метаболитов; ознакомление с современными методами разделения, качественного и количественного исследования соединений вторичной природы, стратегией разработки схем биохимического исследования вторичных метаболитов, а также принципов использования универсальных и метаболомных баз данных в расшифровании и интерпретации результатов экспериментов.

Сегодня возрастает интерес к использованию природных соединений, значительная доля которых представлена вторичными метаболитами. Благодаря высокой активности и уникальным свойствам вторичные метаболиты, полученные из различных организмов, используются в производстве лекарственных препаратов, косметических средств, в качестве пищевых добавок, красителей.

Широкое применение вторичных метаболитов в настоящем, перспективность их использования для будущих разработок определяют необходимость формирования углубленных знаний в области биохимии вторичного метаболизма. Курс «Биохимия вторичных метаболитов» дает целостное представление о структурном и функциональном разнообразии вторичных метаболитов, продуцируемых организмами различных царств – растениями, животными, грибами, бактериями, об особенностях классификации и биологической роли веществ вторичного происхождения, о взаимосвязи вторичного и первичного обменов.

Важность формирования у студентов представлений о стратегиях и целесообразности применения тех или иных методов биохимического анализа со знанием приборной базы и общепринятых техник исследований обусловлена необходимостью разработки оригинальных протоколов изучения вторичных метаболитов часто уникального строения.

Это определяет значительность раздела, в котором представлены современные сведения о методах исследования и инструментах анализа в биохимии вторичного метаболизма.

Основная цель издания – оказание методической помощи студентам в получении современных знаний по учебной дисциплине «Биохимия вторичных метаболитов», систематизации учебного материала в процессе подготовки к итоговой аттестации.

Автор выражает глубокую признательность рецензентам за конструктивный анализ и ценные замечания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография в tandem с масс-спектрометрией
ГХ – газовая хроматография
ГХ-МС – газовая хроматография в tandem с масс-спектрометрией
ЖХ – жидкостная хроматография
МИА – монотерпеновые индольные алкалоиды
МС – масс-спектрометрия
МЭ – матричный эффект
ПА – пирролизидиновые алкалоиды
СТЭ – смешанная твердофазная экстракция
ТСХ – тонкослойная хроматография
УВЭЖХ – ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография
УФ – ультрафиолетовый
APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization (химическая ионизация при атмосферном давлении)
APPI – Atmospheric Pressure Photoionization (фотоионизация при атмосферном давлении)
ESI – Electrosprey Ionisation (источник ионизации электрораспылением)
GMD – Golm Metabolome Database (база данных метаболома Голма)
HILIC – Hydrophilic Interaction Chromatography (хроматография гидрофильного взаимодействия)
LOD – Limit of Detection (предел обнаружения)
LOQ – Limit of Quantitation (предел количественного определения)
MMFF94s – Merck Molecular Force Field 94 (молекулярное силовое поле Merck)
MRM – Multiple Reaction Monitoring (мониторинг множественных реакций)
 m/z – отношение молекулярной массы вещества к заряду
RP-ВЭЖХ – Reversed Phase Chromatography (обращенно-фазовая ВЭЖХ)
TOF – Time of Flight (анализатор времени пролета)
QTOF – Quadrupole Time-of-Flight (гибридный квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр)

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. ОСНОВЫ БИОХИМИИ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

1.1. Характеристика процессов вторичного метаболизма

Под метаболизмом, или обменом веществ, понимают совокупность всех химических реакций в организме, обеспечивающих его веществами для построения тела и энергией для поддержания жизнедеятельности.

Метаболизм объединяет в себе реакции анаболизма (ассимиляция) – синтез сложных веществ из простых, для которого нужна энергия, и катаболизма (диссимиляция) – распад сложных веществ, при котором освобождается энергия.

Продукты метаболизма классифицируют на первичные и вторичные. Понятие первичных и вторичных компонентов клетки было введено в 1891 г. немецким биологом Альбрехтом Косселем.

Согласно другому подходу метаболиты можно разделить на промежуточные (подлежащие дальнейшим биотрансформациям) и конечные (не подлежащие дальнейшим биотрансформациям и выделяемые из организма).

К процессам первичного метаболизма относят дыхание, фотосинтез, синтез ДНК, РНК, белков, липидов. Первичные метаболиты – молекулы, присутствующие во всех клетках организма и необходимые для жизнедеятельности. Они образуются в процессе ассимиляции, т. е. превращения веществ, поступающих в организм извне, в вещества самого организма. К ним относятся пуриновые и пиримидиновые основания (нуклеотиды), белки, липиды, сахара, органические кислоты, витамины, ферменты.

Первичные метаболиты делятся на две группы в зависимости от возможности их участия в последующих биосинтетических процессах:

основные первичные метаболиты (primary essential metabolites); первично-конечные продукты метаболизма (primary metabolic end products) – конечные и побочные продукты многих реакций первичного метаболизма (этанол, ацетон, молочная кислота, бутанол и т. д.).

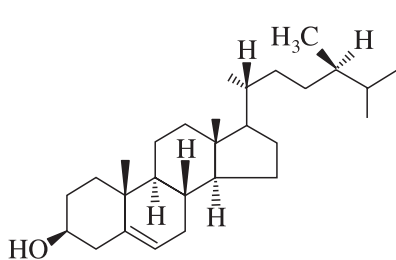
Вторичный метаболизм можно определить как сумму процессов, связанных с синтезом, превращением и деградацией вторичных метаболитов. Вторичные соединения образуются преимущественно у вегетативно малоподвижных групп организмов, а также у многих прокариот. Любой организм, способный к вторичному синтезу, всегда содержит сложный набор первичных и вторичных соединений. Первичные метаболиты присутствуют в каждой живой клетке и, помимо основных функций, служат основой для биосинтеза продуктов вторичного метаболизма.

Для отнесения метаболитов к типу вторичных полагаются на ряд следующих критериев:

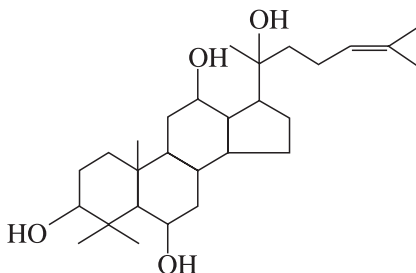
- характеризуются наличием биологической активности;
- как правило, имеют ограниченное распространение и могут быть найдены только в отдельных таксонах, иногда даже в одном биологическом виде (подвиде, штамме);
- часто имеют относительно низкий молекулярный вес, но при этом могут иметь сложную структуру;
- в большинстве случаев не обязательны для жизненного цикла самого продуцента;
- синтезируются из первичных метаболитов, но непосредственно не участвуют в первичном метаболизме.

Однако даже на основе комплекса критериев не всегда удается провести четкую границу между первичным и вторичным синтезом. Наиболее обоснованно отнести соединение к первичным или вторичным метаболитам можно только после выяснения его роли в жизнедеятельности организма, т. е. на основе его функциональной значимости.

Процессы первичного и вторичного метаболизма взаимосвязаны (рис. 1). Здесь необходимо привести несколько важных тезисов. Механизмы переключения путей метаболизма с первичного на вторичный не ясны. Вещества вторичного метаболизма не имеют собственных путей синтеза. Их биосинтез происходит на ответвлениях основных метаболических путей. Возможность осуществления вторичного метаболизма полностью определяется первичным метаболизмом. По химической структуре молекулы отличить вторичные метаболиты от первичных можно далеко не всегда.



Кампестерин
(первичный метаболит)



Протопанаксатриол
(вторичный метаболит)

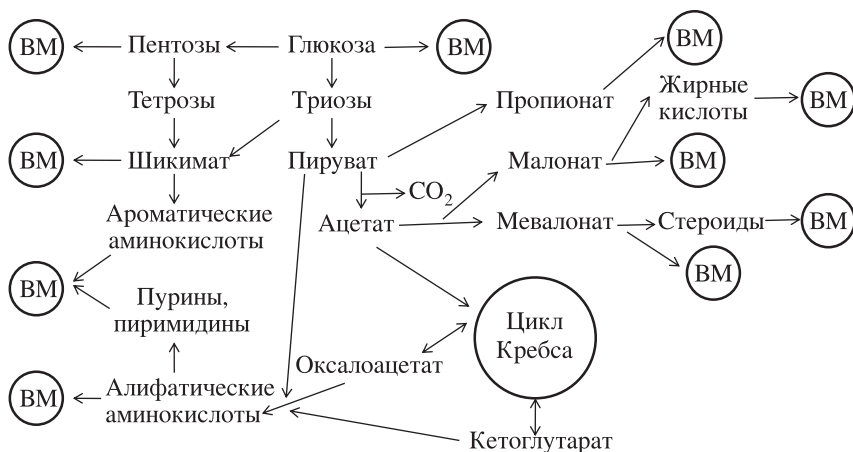


Рис. 1. Взаимосвязь между первичным и вторичным метаболизмами:
BM – вторичные метаболиты

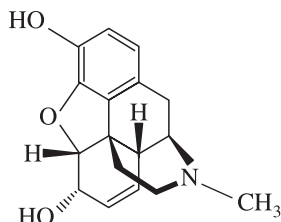
Продуцентами вторичных метаболитов являются микроорганизмы (грибы и бактерии), беспозвоночные животные и растения. Изучение вторичного метаболизма и его продуктов началось с растительных организмов как наиболее доступного и очевидного источника получения важных для человека веществ.

Считается, что первые изыскания в области растительных вторичных метаболитов были проведены в начале 1800-х гг. Так, Фридрих Вильгельм Сертурнер выделил морфин из опийного мака (рис. 2). Ранние исследования являлись попытками классификации вторичных расти-

тельных метаболитов. Более детальное изучение вторичного метаболизма началось во второй половине XIX в. Интерес к вторичным метаболитам многократно возрос после выяснения их свойств как физиологически активных веществ.



a



б

Рис. 2. Растение *Papaver somniferum* L.:

a – общий вид; *б* – структура морфина

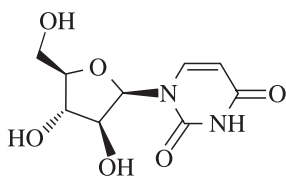
Исследование вторичных метаболитов микроорганизмов также было начато в XIX в., но активизировалось в XX в. с разработкой и внедрением антибиотиков.

Главными биологическими источниками природных соединений долгое время являлись высшие наземные растения и почвенные микроорганизмы, а после изобретения и широкого распространения легководолазной техники ими стали и морские организмы. Их изучение заметно расширило число известных природных соединений. В 1951 г. Вернер Бергман выделил необычные нуклеозиды спонготимидин и спонгоуридин из губки *Tectitethya crypta* (ранее *Cryptotethya crypta*) (de Laubenfels), собранных у побережья Флориды, что положило начало исследованиям вторичных метаболитов морских животных (рис. 3).

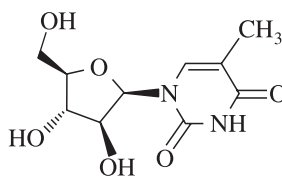
Все чаще проводятся крупномасштабные исследования, результатом которых становится не описание отдельных молекул, а большие массивы сложно организованных данных. Эта важная тенденция в современной биологии привела к появлению понятий «геном», «протеом» и пр. Метаболомикой называют науку, изучающую метаболомы. **Метаболом** – совокупность небольших молекул-метаболитов клетки, ткани или целого организма. В связи с этим возникновение понятия вторичного метаболома как совокупности молекул вторичных метаболитов было закономерным.



a



б



в

Рис. 3. Губка *Cryptotethya crypta* (de Laubenfels):

a – общий вид; *б* – структура спонгоуридина;

в – структура спонготимидана

Лаборатории, занимающиеся изучением вторичных метаболитов, распространены по всему миру, что связано с высокой ценностью многих соединений вторичной природы. Так, в Тихоокеанском институте биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук осуществляют поиск, изучение структуры и биомедицинских свойств морских природных соединений, продуцируемых микроорганизмами и морскими беспозвоночными животными. Вторичные метаболиты морских микроорганизмов также являются предметом изучения в Московском государственном университете им. М. В. Ломоносова, Индонезийском институте наук, Институте океанологии Фуджианского университета сельского хозяйства и леса, Римском университете, Университете Нового Южного Уэльса (Австралия), Лабораториях морской биотехнологии и Исследовательского центра морских биопроцессов Института Национального университета Пукенга (Южная Корея), Центра передо-

вых исследований в морской биологии Университета Анамалаи (Индия) и т. д. Намного более распространенными являются исследования вторичных метаболитов микроорганизмов (бактерий и грибов) и растений как более доступных объектов.

В нашей стране изучение вторичных метаболитов растений успешно проводят в Отделе биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси под руководством В. Н. Решетникова. Значительный вклад в изучение вторичных метаболитов растительного происхождения вносят также биологический факультет Белорусского государственного университета, лаборатории Института экспериментальной ботаники НАН Беларуси, фармацевтический факультет Витебского государственного медицинского университета.

Контрольные вопросы

1. Каковы критерии отнесения метаболитов к ряду вторичных?
2. Каким образом взаимосвязаны процессы первичного и вторичного синтеза?
3. Что такое вторичный метаболит?

1.2. Химизм реакций вторичного метаболизма

Интермедиа́т – промежуточное соединение, образующееся во время химического процесса до получения целевого продукта.

К интермедиа́там относятся промежуточные сравнительно короткоживущие соединения на пути синтеза конечного продукта в конкретной биохимической реакции. Также интермедиа́тами называют полноценные с точки зрения их функциональности соединения, на которых биохимический путь может не заканчиваться.

Интермедиа́ты первичного метаболизма – соединения, относящиеся к первичному метаболизму, при этом являющиеся начальными веществами в цепи синтеза вторичных метаболитов. Пример интермедиа́та первичного метаболизма – протеиногенная аминокислота фенилаланин (типичный первичный метаболит), который может вовлекаться в реакции образования пептидов и белков, а может дать начало шикиматному пути синтеза фенольных соединений, став непосредственным предшественником данных веществ вторичной природы.

Пути образования вторичных метаболитов:

1) из предшественника – первичного метаболита; их синтез – цепь реакций, модифицирующих исходное вещество;

2) из двух-трех предшественников, которые модифицируются и конденсируются с образованием сложных молекул;

3) олигомеризация или полимеризация близких по структуре мономеров через образование основной структуры, которая впоследствии может модифицироваться.

Базовая структура – это типичный «скелет» молекулы для определенного класса соединений. Модификации базовой структуры можно дифференцировать в зависимости от типа основной реакции:

- реакции в пределах «базовой» основы молекул вторичных соединений (присоединение, замена функциональных групп, изменение степени окисленности молекулы); в качестве функциональных групп часто используются гидроксильные, метильные либо метоксильные;

- образование конъюгатов: присоединение к базовой структуре «унифицированных блоков» (моно- или олигосахариды, органические кислоты или отдельные представители некоторых групп вторичных метаболитов);

- конденсация: объединение нескольких одинаковых или различных базовых структур (образование пренилированных фенольных соединений, димерных индольных алкалоидов).

Для разных групп вторичных метаболитов характерны специфические изменения структуры. Например, для алкалоидов характерно метоксилирование, но не гликозилирование; для изопреноидов, наоборот, типично гликозилирование, но не метоксилирование; у фенольных соединений наблюдаются оба типа этих модификаций.

Определенные модификации молекул имеют существенное функциональное значение. Многие из структурных преобразований значительно изменяют биологическую активность молекулы.

Контрольные вопросы

1. Назовите пути образования вторичных метаболитов.
2. Какие выделяют реакции модификации базовой структуры вторичных метаболитов?
3. Для каких групп вторичных метаболитов характерно метоксилирование?

1.3. Классификация вторичных метаболитов

Основными источниками вторичных метаболитов являются растения (80 %), бактерии, грибы и беспозвоночные животные (преимущественно морские). Некоторые группы вторичных метаболитов распространены очень широко в пределах таксонов, способных к вторичному синтезу. Другие же вторичные метаболиты образуются только конкретными видами (например, поликетид актинородин продуцируется только *Streptomyces coelicolor* (Müller 1908)).

Важнейшими функциями вторичных метаболитов являются: защитная; участие в симбиотических отношениях с другими организмами; агенты для транспортировки металлов; коммуникация между организмами; участие в размножении.

Выделяют несколько классификаций вторичных метаболитов:

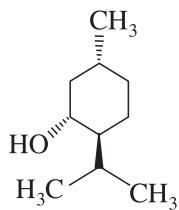
- эмпирическая (тривиальная) – наиболее древняя, основана на определенных свойствах вторичных метаболитов;
- химическая (структурная) – основана на признаках химической структуры вторичных метаболитов (наиболее разработана и распространена, хотя и не лишена недостатков);
- биохимическая – базируется на способах биосинтеза вторичных метаболитов (считается наиболее объективным подходом);
- функциональная – базируется на функциях вторичных метаболитов в организме продуцента.

Наличие нескольких вариантов классификации вторичных метаболитов приводит к определенным сложностям. В частности, при использовании разных признаков, применяемых при химической классификации, возможно «перекрытие» групп вторичных метаболитов.

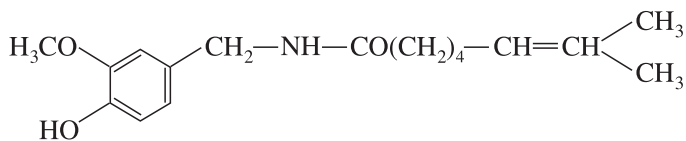
Известно не менее 150 000 вторичных метаболитов – совокупности базовых структур и всевозможных модифицированных форм.

Согласно одной из классификаций, учитывающей характерные особенности структуры и общности биосинтеза, выделяют следующие общие группы вторичных метаболитов:

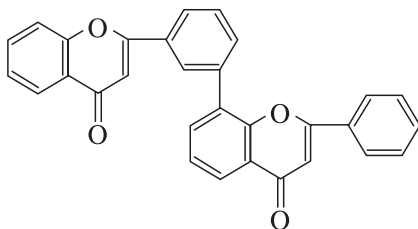
- изопреноиды;
- алкалоиды;
- фенольные соединения;
- производные жирных кислот и поликетиды;
- нерибосомальные полипептиды;
- минорные группы вторичных метаболитов.



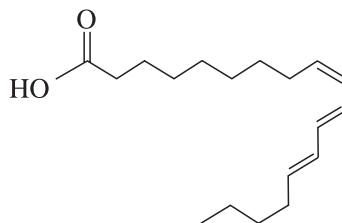
Ментол
(класс изопреноиды)



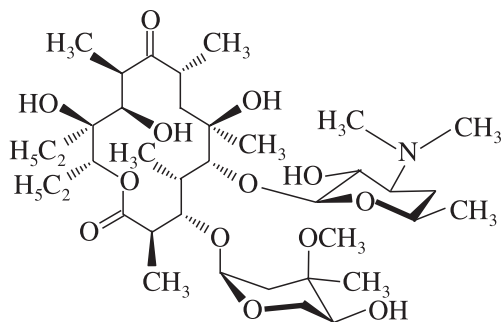
Капсаицин
(класс алкалоиды)



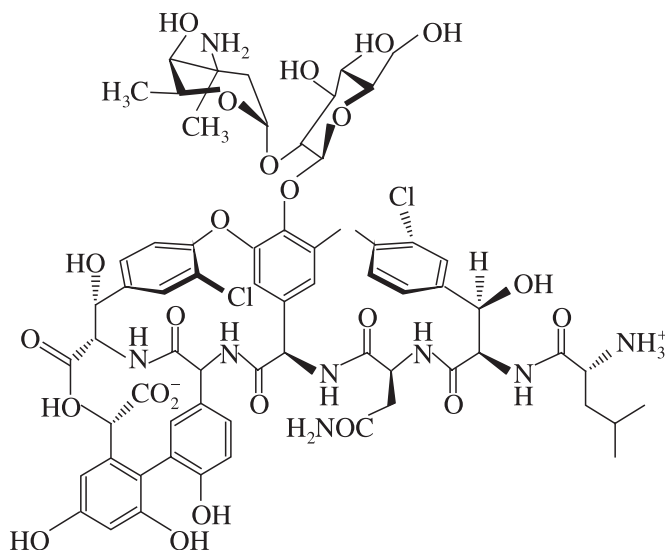
Бифлавоны
(класс фенольные соединения)



Олеостеариновая кислота
(класс жирные кислоты)



Эритромицин
(класс поликетиды)



Ванкомицин
(класс нерибосомальные пептиды)

Изопреноиды (терпеноиды). В настоящее время идентифицировано более 35 000 изопреноидов. Они представляют собой обширный класс соединений, включающий два подкласса – терпены и стероиды. Терпены объединяют большое разнообразие малосвязанных структур, в то время как стероиды имеют общий тетрациклический углеродный скелет и являются модифицированными терпенами, которые биосинтезируются из тритерпенового ланостерола.

Леопольд Ружичка (1921) сформулировал изопреновое правило, согласно которому изопреновый скелет служит гомологической разницей в ряду всех терпеноидов. Данное правило отражает принцип построения многих терпеноидов из исходной изопреноидной или изопентановой системы. Обязательное условие применимости правила Ружички – наличие активного изопрена. Поскольку терпены построены из изопренильных фрагментов $(C_5H_8)_n$, то было предположено, что схема их биосинтеза должна включать реакции взаимодействия активных изопренов между собой. Однако правило Ружички носит исключительно формальный характер, так как исходным соединением для биосинтеза изопреноидов выступает изопентенилпирофосфат.

Назовем пути образования изопентенилпирофосфата:

- 1) мевалонатный;
- 2) немевалонатный, или альтернативный.

Изопреноиды характеризуются следующими физико-химическими свойствами:

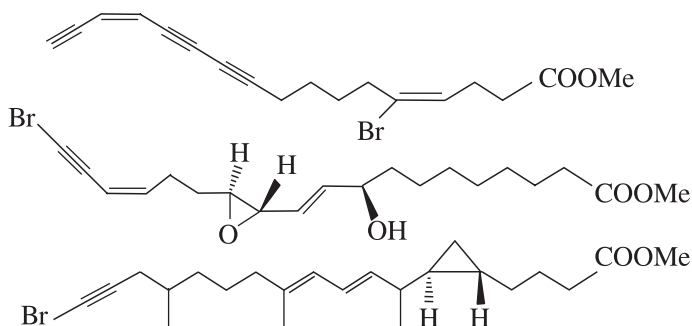
- имеют различное агрегатное состояние;
- имеют различную растворимость в воде;
- многие оптически активны;
- при нагревании легко изомеризуются;
- вступают в реакции гидрогенизации, полимеризации;
- при нагревании до очень высоких температур деполимеризуются до изопрена.

Алкалоиды. К данной группе вторичных метаболитов относятся азотсодержащие органические соединения природного происхождения (чаще всего растительного), преимущественно гетероциклические, обладающие свойствами слабого основания. К алкалоидам также причисляются некоторые биогенетически связанные с основными алкалоидами нейтральные и даже слабокислотные соединения.

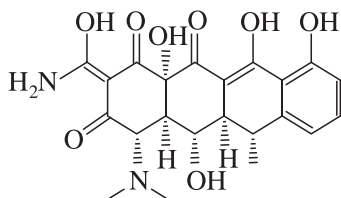
По химической классификации алкалоиды – это соединения, содержащие один или несколько атомов азота в молекуле, что и придает им щелочные свойства.

Производные жирных кислот и поликетиды. *«Необычные» жирные кислоты* встречаются лишь в организмах определенных таксономических групп. Отличаются от «обычных» жирных кислот длиной углеродной цепи, необычным расположением и количеством двойных связей, наличием дополнительных функциональных групп и циклов. Они не являются компонентами мембран клеток. Биосинтез данных соединений катализируется синтазой жирных кислот – сложным мультиэнзимным комплексом. Особое место среди необычных жирных кислот занимают кислоты с тройной связью, которые можно отнести к ацетиленовым производным.

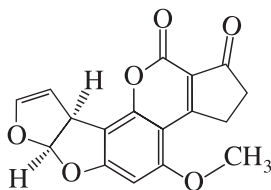
Поликетиды – поликарбонильные соединения, содержащие чередующиеся карбонильные и метиленовые группы. Образуются в клетках бактерий, грибов, животных и растений. Отличительной особенностью поликетидов является специфический биосинтез. Поликетиды синтезируются сложноорганизованными мультиферментными комплексами – поликетидсинтазами, которые напоминают эукариотические синтазы жирных кислот, но по размеру значительно их превышают.



Бромированные жирные кислоты,
выделенные из лишайников



Поликетид доксициклин

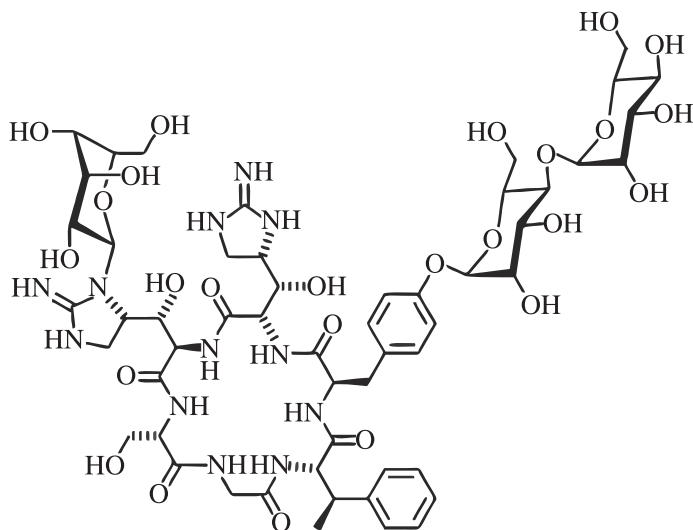


Поликетид афлатоксин В1

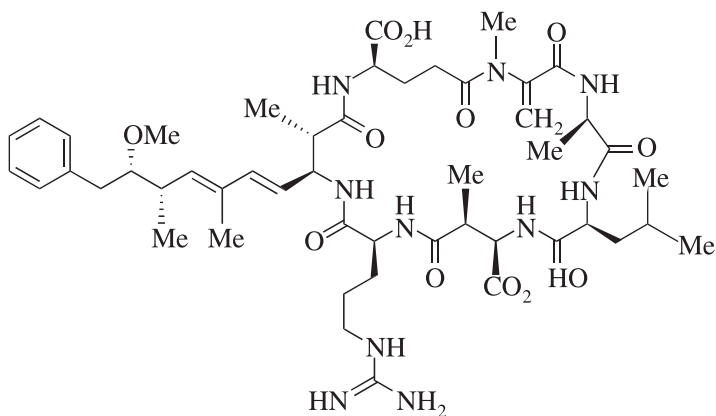
К данным соединениям относятся: важные антибиотики (макролиды, тетрациклины), иммунодепрессанты, противораковые химиотерапевтические агенты. Поликети́ды характеризуются чрезвычайно большим структурным разнообразием. Разделены на три типа: тип I – в основном макролиды; тип II – ароматические молекулы; тип III – небольшие ароматические молекулы, синтезируемые грибами.

Нерибосомальные пептиды. Синтезируются посредством особого биосинтетического механизма – нерибосомального пептидного синтеза: формирование пептидной связи происходит без участия рибосом; не требуются молекулярные адапторы (аминоацил-т-РНК).

Синтез метаболитов данной группы происходит при участии нерибосомальных пептидсинтетаз, представляющих большие мультиэнзимные системы. Конечные продукты нерибосомального пептидного синтеза – пептиды невысокого молекулярного веса. Нерибосомальные пептиды имеют структурные особенности, обеспечивающие эффективное взаимодействие с мишенью. Часто имеют циклические и/или разветвленные структуры, обладающие важным функциональным значением.



Маннопептимицин



Микроцистин

Нарушение циклической структуры приводит к потере биологической активности. Для нерибосомальных пептидов характерны определенные типы постсинтетических модификаций (например, образование гибридных систем с другими белками, образование циклических структур, гликозилирование, ацилирование, галогенирование, гидроксилирование).

Фенольные соединения. Это вещества ароматической природы, содержащие одну или несколько гидроксильных групп у ароматического кольца. Некоторые фенольные соединения участвуют в основном обмене (в частности, в процессах фотосинтеза и дыхания). При этом большинство – типичные вторичные метаболиты. Отличительной чертой фенольных соединений является формирование их огромного числа за счет модификаций молекулы и образования конъюгатов с разнообразными структурами.

Контрольные вопросы

1. Назовите подходы к классификации вторичных метаболитов.
2. Какие классы вторичных метаболитов выделяют в соответствии с классификацией, учитывающей характерные особенности структуры и общности биосинтеза?
3. Дайте характеристику класса производные жирных кислот и поликетиды.
4. Охарактеризуйте класс нерибосомальные пептиды.

1.4. Вторичные метаболиты растений

К настоящему времени на предмет присутствия вторичных метаболитов исследовано примерно 10–15 % всей флоры Земли, и перечень идентифицированных веществ растительного происхождения непрерывно пополняется.

Изопреноиды, фенольные соединения и алкалоиды – основные группы. Каждая из них подразделяется на многочисленные подгруппы.

Кроме основных групп, выделяют минорные классы вторичных метаболитов: небелковые аминокислоты, амины, цианогенные гликозиды, гликозиды горчичных масел, беталаины, необычные жирные кислоты, ацетиленовые производные, цианолипиды, ацетогенины, аллицины, тиофены, компоненты восков и кутина.

Приведем некоторые характеристики вторичного синтеза у растений:

- соединения вторичного обмена, как правило, распределены в тканях неравномерно; часто накапливаются в идиобластах, млечниках, железках, специальных каналах и ходах;
- поскольку вторичные метаболиты, как правило, отличаются высокой биологической активностью и могут вызвать повреждения клеточ-

ных структур, следовательно, у растений должны существовать механизмы их обезвреживания;

- в растениях имеются основные пути защиты от химически активных веществ: компартментация в пространственно разделенных клеточных органеллах или химическая модификация до относительно безвредных соединений.

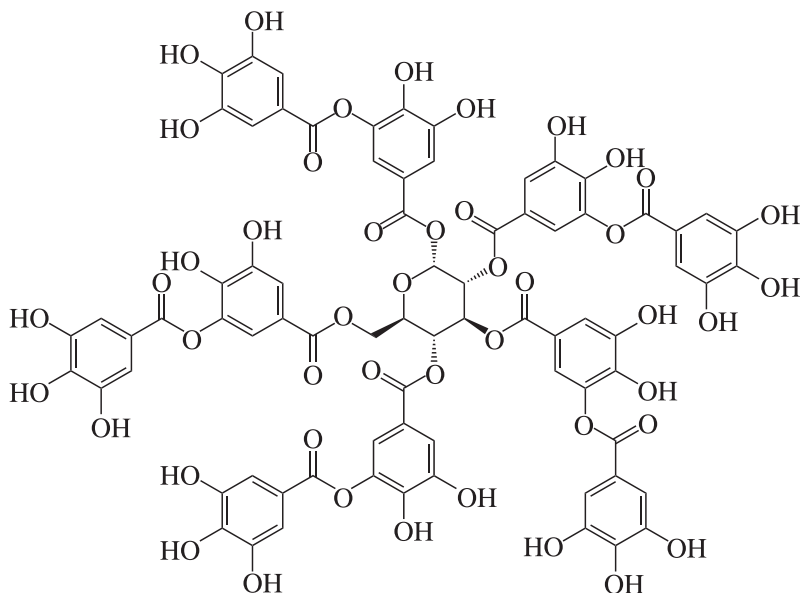
Разворачивание вторичного метаболизма во времени зависит:

- от вида растения;
- типа вторичного метаболита и его физиологической роли;
- внешних воздействий.

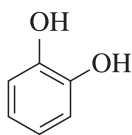
Рассмотрим функции вторичных метаболитов. Их основная функция в растениях – экологическая в широком смысле. Это те биохимические «рычаги», которыми растение, как прикрепленный организм, решает множество экологических проблем на протяжении всей своей жизни.

Многие вторичные метаболиты выполняют функции конститутивных, полуиндуцибельных или индуцибельных защитных соединений. Конститутивные соединения постоянно присутствуют в тканях и органах растения и относятся к «первому кругу» системы защиты (среди них монотерпены, дитерпены, карденолиды, алкалоиды, экдистериоды, гликоалкалоиды). Полуиндуцибельные соединения обычно работают на «втором круге» защиты (цианогенные гликозиды, глюкозинолаты, гликозиды *о*-коричных кислот). Индуцибельные соединения обычно участвуют в работе «третьего круга». Вторичные метаболиты, участвующие в работе «третьего круга» системы защиты, где происходит индукция синтеза мощных защитных веществ, – называются фитоалексинами (сесквитерпены, дитерпены, стильбены, изофлавоноиды, ацетиленовые производные). Их образование – важнейшая стадия реакции сверхчувствительности.

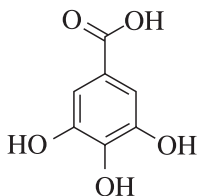
Фенольные соединения. Фенольные соединения представляют собой один из наиболее распространенных и многочисленных классов природных биологически активных веществ. Образование фенольных соединений – одна из характерных особенностей растительной клетки. В том или ином количестве они встречаются во всех растениях. Отличительной особенностью данной группы органических соединений является наличие свободного или связанного фенольного гидроксила. Некоторые фенольные соединения участвуют в основном обмене (в частности, в процессах фотосинтеза и дыхания), однако большинство из них – типичные представители вторичного метаболизма.



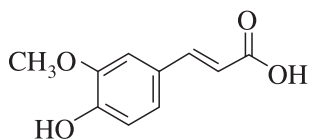
Танин



Пирокатехин



Галловая кислота



Феруловая кислота

Структурная классификация фенольных соединений:

1) мономерные:

- с одним ароматическим кольцом: C_6 -ряда, C_6-C_1 -ряда, C_6-C_2 -ряда, C_6-C_3 -ряда, C_6-C_4 -ряда;
- двумя ароматическими кольцами: $C_6-C_1-C_6$ -ряда, $C_6-C_2-C_6$ -ряда, $C_6-C_3-C_6$ -ряда;

2) олигомерные;

3) полимерные: дубильные вещества, лигнины, меланины.

К фенольным метаболитам C_6 -ряда относятся простые фенолы. По числу гидроксильных групп различают простые фенолы: одноатомные, двухатомные, трехатомные. Группа C_6-C_1 -соединений представлена фенольными кислотами (фенолокислотами). К этой же группе относятся фенолоспирты и альдегиды и их гликозиды. В подгруппу соединений C_6-C_2 -ряда входят фенолоспирты и фенилуксусные кислоты. К метаболитам C_6-C_3 -ряда (фенилпропаноиды) относят: оксикоричные кислоты и спирты, кумарины, хромоны. Фенольные метаболиты C_6-C_4 -ряда – нафтохиноны.

В соединениях $C_6-C_1-C_6$ -ряда два ароматических кольца соединены мостиком из одного углеродного атома: ксантоны, бензофеноны. К соединениям $C_6-C_2-C_6$ -ряда относятся стильбены и антрахиноны. Соединения $C_6-C_3-C_6$ -ряда включают два ароматических кольца, соединенных тремя атомами углерода. Представлены флавоноидами. Исходя из степени окисленности или восстановленности гетероциклического фрагмента, флавоноиды подразделяются на 10 типов: катехины, лейкоантоцианидины, антоцианидины, флаваноны, флаванолы, флавоны, халконы, ауруны, дигидрохалконы, флаваны.

Олигомерные фенольные соединения представлены лигнанами и неолигнанами. **Полимерные фенольные соединения** – дубильными веществами, лигнинами, меланинами. Дубильные вещества, или танины, делятся на два подкласса: гидролизуемые и конденсированные. В свою очередь гидролизуемые разделяют на галлотаннины и эллаговые. Меланины подразделяются на эумеланины и алломеланины.

Простые фенолы мало распространены. Фенол в небольшом количестве найден в хвое сосны, входит в состав эфирного масла смородины, табака и руты. Пирокатехин содержится в листьях тополя и эфедры, чешуе лука. Фенольные кислоты найдены практически у всех покрытосеменных растений. Салициловая кислота содержится в корнях дуба, ванильный альдегид (ванилин) – в плодах и ветвях ванильного дерева.

Флавоноидами богаты растения семейств Розоцветные, Бобовые, Гречишные, Сложноцветные, Яснотковые. Антоцианы содержатся практически во всех цветковых растениях. Производными флавана катехинами богаты акация катеху, камелия китайская (чайный куст). Конденсированные дубильные вещества содержатся в древесных растениях, например в дубе, иве, сосне, ели, эвкалипте.

Биосинтез фенольных соединений осуществляется по двум основным механизмам:

- шикиматный путь (исходными соединениями служат продукты углеводного метаболизма – фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат);
- ацетатно-малонатный, или поликетидный, путь (исходными соединениями являются ацетил-коэнзим А (-КоА) и малонил-КоА).

Подавляющее большинство известных фенольных соединений, а также ароматические аминокислоты образуются с использованием в качестве предшественника шикимовой кислоты. Шикиматный путь объединяет биосинтез ароматических аминокислот и начальные этапы биосинтеза фенольных соединений, поскольку фенилаланин является предшественником большинства полифенолов растительного происхождения.

Ацетатно-малонатный путь у высших растений сочетается с шикиматным в биосинтезе флавоноидов, а также некоторых антрахинонов. Кроме того, он широко распространен у грибов, лишайников и микроорганизмов, у растений является минорным и принципиально отличается от шикиматного. Связан с промежуточным синтезом поликетометиленовых предшественников. Исходное соединение – ацетил-КоА. При синтезе соединений по этому пути ацетил-КоА карбоксилируется с образованием малонилацетил-КоА. При постепенном наращивании углеродной цепи возникает поли-β-кетометиленовая цепочка. Циклизация поликетидной цепи приводит к образованию различных фенольных соединений. Таким способом синтезируются флороглюцин и его производные, некоторые антрахиноны.

Функции фенольных соединений:

- 1) участвуют в окислительно-восстановительных процессах;
- 2) играют важную защитную роль в реакциях растительного организма на разных уровнях при заболеваниях, механических повреждениях, против окислительного стресса, в качестве фотопротекторов;
- 3) являются регуляторами роста и развития растений;
- 4) некоторые действуют как активаторы или ингибиторы отдельных процессов и ферментов;
- 5) многие выполняют сигнальную функцию;
- 6) участвуют в процессе размножения растений;
- 7) могут выступать у некоторых растений в качестве аллелопатических веществ;

- 8) являются резервными веществами;
- 9) в случае компонентов клеточных стенок (лигнин, оксикоричные кислоты, суберин) выполняют структурную функцию.

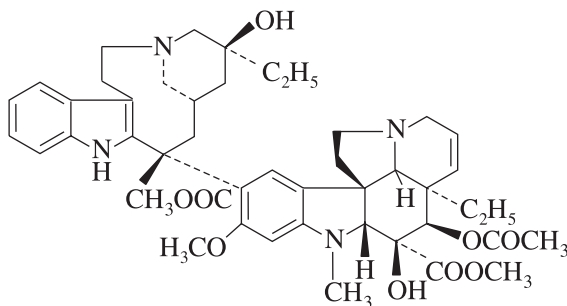
Алкалоиды. Данные вторичные метаболиты имеют следующие характеристики:

- содержат азот, чаще всего в составе гетероциклического кольца;
- большинство обладает основными свойствами;
- отличаются от других вторичных метаболитов наибольшим разнообразием химического строения и путей биосинтеза;
- большая часть образуется из аминокислот (аспарагина, орнитина, лизина, тирозина, триптофана и т. д.).

Считается, что истинный алкалоид должен соответствовать следующим требованиям:

- атом азота – часть гетероциклической системы;
- сложная молекулярная структура соединения;
- значительная фармакологическая активность.

Винбластин соответствует этим критериям:



Известно более 10 000 алкалоидов. Они найдены приблизительно у 20 % растений, наиболее распространены среди цветковых.

Содержание алкалоидов в растениях невелико – 0,001–2 %, однако известны уникальные растения, в которых оно достигает 10–18 % (например, хинное дерево, листья табака, трахелантус).

Большое разнообразие алкалоидов затрудняет их классификацию. В основе *классификации алкалоидов*, предложенной Александром Павловичем Ореховым, лежит строение углеводородного скелета и расположение атома азота.

По указанным признакам различают следующие группы алкалоидов:

- гетероциклические алкалоиды;
- алкалоиды – производные фенилалкиламинов;
- алифатические (ациклические) алкалоиды;
- алкалоиды стероидной структуры;
- алкалоиды дитерпеновой структуры;
- алкалоиды неуставленного строения.

Среди гетероциклических алкалоидов в зависимости от строения гетероцикла можно выделить следующие наиболее распространенные подгруппы:

- производные пирролидина и пирролизидина;
- производные пиридина и пиперидина;
- алкалоиды с конденсированным пирролидиновым и пиперидиновым кольцами (тропановые алкалоиды);
- производные хинолизидина;
- производные хинолина и изохинолина;
- производные индола;
- производные пурина.

Согласно наиболее распространенной классификации, основанной на особенностях строения углеродноазотного скелета молекулы, выделяют алкалоиды:

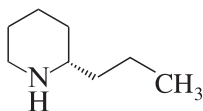
- изохинолиновые;
- пептидные;
- пиридиновые;
- пуриновые;
- хиназолиновые;
- хинолиновые.

Алкалоиды классифицируют также по филогенетическому признаку, объединяя в одну группу все соединения, выделенные из растений одного рода.

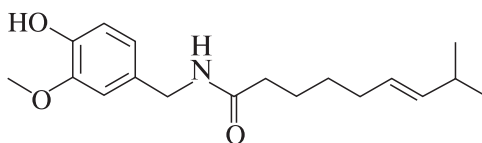
Иногда алкалоиды систематизируют по их биогенетическим предшественникам, различая группы алкалоидов, в биосинтезе которых участвуют орнитин и пролин, лизин, фенилаланин, триптофан, антралиловая кислота и гистидин.

Исследование путей биогенеза алкалоидов методом меченых атомов показали, что в большинстве случаев предшественниками алкалоидов являются аминокислоты. Это дало основание Роберту Хегнауэру разделить все алкалоиды на три группы: *истинные алкалоиды*, *протоалка-*

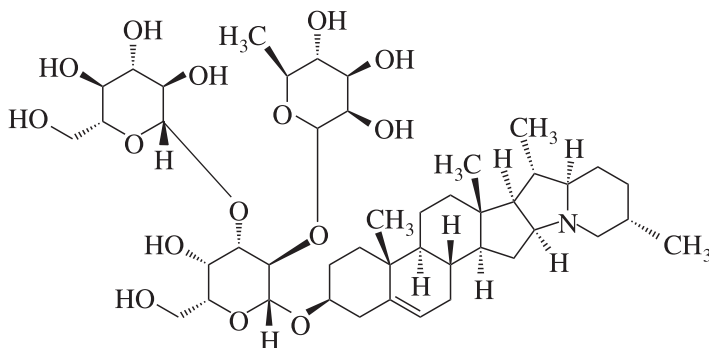
лоиды и псевдоалкалоиды. Сегодня данный подход к классификации широко используется. Пример типов алкалоидов в соответствии с классификацией по характеру предшественника и наличию N-гетероцикла:



Кониин
(истинный алкалоид)



Капсаицин
(протоалкалоид)



Соланин (псевдоалкалоид)

К истинным алкалоидам относятся N-гетероциклические алкалоиды, предшественниками которых являются аминокислоты.

Протоалкалоиды объединяют группы фенилалкиламинов и алифатических алкалоидов. Они не содержат N-гетероцикл, но их предшественники – также аминокислоты.

Псевдоалкалоиды имеют изопреноидную структуру. Содержат N-гетероцикл. Атом азота этих соединений не аминокислотной природы.

В целом наиболее широко алкалоиды распространены у двудольных растений. Истинный алкалоид атропин содержится в белене черной, скополамин – в дурмане обыкновенном и скополии карниолийской, морфин – в маке снотворном. Эфедрин является известным представителем протоалкалоидов, синтезируется некоторыми видами эфедры. Капсаицин, определяющий жгучий вкус стручкового перца, также относится к протоалкалоидам. Псевдоалкалоиды соланин и соласонин в значительных количествах находятся в семенах и зеленых органах картофеля, псевдоалкалоид томатин накапливается в семенах помидоров.

Физико-химические свойства алкалоидов:

- в растениях существуют обычно в виде солей органических кислот;
- как правило, представляют собой бесцветные кристаллические соединения, горькие на вкус;
- практически нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в органических растворителях – эфире, хлороформе, бензоле; соли алкалоидов, напротив, хорошо растворимы в воде, но не растворимы в органических растворителях.

Функции алкалоидов в растениях:

- являются транспортной формой азота и резервом аминокислот, образующихся при их распаде;
- синтез алкалоидов в корнях может служить одним из механизмов обезвреживания аммиака;
- выполняют защитную функцию, являясь частью токсической системы защиты;
- регулируют значение pH клеточного сока путем связывания органических кислот с образованием солей;
- участвуют в поддержании ионного баланса, являясь хелатообразователями;
- оказывают влияние на процессы дифференцировки и органогенеза.

Распространение алкалоидов ограничено определенными семействами и родами растительного царства. Наиболее широко алкалоиды распространены среди покрытосеменных растений класса Двудольные. Редки случаи, когда все виды семейства содержат алкалоиды, как, например, у представителей семейства маковые. Вместе с тем распространение сложных алкалоидов обычно ограничено одним видом или родом растений.

Химическая структура и содержание алкалоидов в растениях обычно сильно зависят от периода вегетации растения и места его произрастания. Алкалоиды находятся в листьях, коре, корнях, древесине, накапливаясь в активно растущих тканях, в клетках эпидермы и гиподермы, в обкладках проводящих пучков, в млечниках.

Биосинтез алкалоидов происходит в пластидах или в цитозоле. Образование алкалоидов тесно связано с общим азотным обменом клетки. Предшественниками являются аминокислоты, молекулы которых в процессе биосинтеза практически полностью встраиваются в структуру алкалоида. Общей схемы, демонстрирующей ход образования алкалоидов разного строения, не существует. При этом разные схемы биосинтеза алкалоидов унифицированы, имеют сходную последовательность реакций

и включают их одинаковые типы: декарбоксилирование, окислительное дезаминирование, альдольная конденсация.

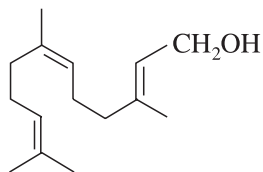
Биогенетические предшественники большинства алкалоидов – аминокислоты орнитин, лизин, фенилаланин, тирозин, триптофан.

Существует несколько характерных реакций, обязательно встречающихся на пути образования алкалоидов. Основные химические реакции, в которых происходит образование этих веществ, – реакция Манниха и образование оснований Шиффа. В реакции Манниха для образования алкалоида используется карбанион, амин, карбонильное соединение. Такое химическое превращение может происходить в самой клетке или между несколькими клетками.

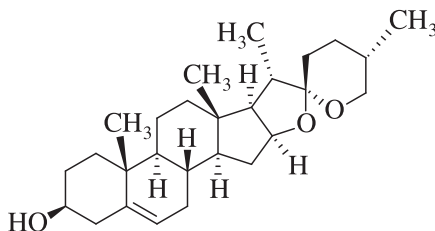
В образовании оснований Шиффа участвуют кетоны, амины и альдегиды. При этом именно указанная реакция – наиболее распространенный способ получения данных веществ.

На первом этапе синтеза происходит декарбоксилирование аминокислоты при участии соответствующей декарбоксилазы. Образовавшиеся биогенные амины подвергаются окислительному дезаминированию с участием аминоксидаз. Полученные аминокальдегиды или аминокетоны в результате серии последовательных реакций образуют ключевые гетероциклические соединения. Затем происходит модификация базовой структуры с участием разнообразных реакций – гидроксирования, метилирования и др. Биосинтез алкалоида включает от 3 до 15 реакций в зависимости от сложности структуры. Для ряда алкалоидов не только установлена схема синтеза, но охарактеризованы и выделены ферменты. Большинство ферментов синтеза не отличается специфичностью, и в качестве субстратов можно использовать различные соединения. При этом в последовательности реакций обязательно присутствуют высокоизбирательные ферменты, которые используют только один субстрат (или ряд очень близких субстратов) и выполняют специфическую реакцию.

Изопреноиды. Изопреноиды имеют большое разнообразие несвязанных структур, которые можно дифференцировать на терпены и стероиды. К терпенам относятся ненасыщенные углеводороды с числом углеродных атомов, кратным пяти, в то время как стероиды имеют общий тетрациклический углеродный скелет и являются модифицированными терпенами, которые синтезируются из тритерпенового ланостерола. Качественный состав изопреноидов в разных видах растений сильно варьирует.



Сесквитерпен фарнезол



Стероид ямогенин

Название «терпен» происходит от слова терпентин. Название класса – изопреноиды – указывает на ключевой фрагмент их структуры и ключевое номенклатурное слово – изопрен. Изопрен выделяется при термоллизе многих изопреноидов, иногда даже как главный продукт. Структура терпенов может быть графически разбита на изопреновые, а точнее, изопентановые фрагменты.

Физико-химические свойства изопреноидов:

- практически нерастворимы в воде;
- хорошо растворимы в неполярных органических растворителях;
- легко окисляются, полимеризуются, гидрируются, галогенируются, изомеризуются;
- ациклические терпеноиды легко превращаются в циклические;
- обратный переход осуществляется в более жестких условиях;
- имеют различное агрегатное состояние;
- многие оптически активны;
- при нагревании легко изомеризуются;
- при нагревании до очень высоких температур деполимеризуются до изопрена.

Существуют разные подходы к классификации терпеноидов. Разработана последовательная систематика с номенклатурой, рационально сочетающая тривиальную и систематическую классификации. Принятая классификация основана на том факте, что углеродный скелет всех изопреноидов имеет состав, кратный C₅: C₅ – Гемитерпены, C₁₀ – Монотерпены, C₁₅ – Сесквитерпены, C₂₀ – Дитерпены, C₂₅ – Сестертерпены, C₃₀ – Тритерпены, C₄₀ – Тетратерпены.

В настоящее время используется более логичная и систематичная терминология (пока еще как дополнительная), где C₅-фрагмент обозначен корневым словом «пренил», к которому добавляется числовой префикс.

Терпеноиды также разделяют на следующие группы: C5 – изопрен; C10 – компоненты эфирных масел; C15 – компоненты эфирных масел, абсцизовая кислота; C20 – компоненты смол, гиббереллины; C25 – компоненты смол; C30 – компоненты смол, стероиды; C40 – каротиноиды; политерпены – полипренолы, каучук, гутта.

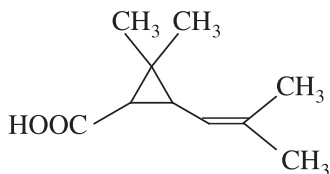
Типичным представителем алифатических монотерпенов является мирцен, содержащийся во многих эфирных маслах, в том числе в эфирном масле хмеля. Монотерпен ментол содержится в эфирном масле перечной мяты. Сесквитерпен хамазулен является основным действующим веществом эфирного масла ромашки аптечной, неролидон содержится в эфирном масле цветков. Дитерпены являются главными компонентами смол у голосеменных (ель, сосна, пихта, кедр). Дитерпен таксол содержится в коре тисса. Экдистероиды – стероиды с большим количеством гидроксильных групп, найдены у водорослей, мхов, папоротникообразных, голосеменных, покрытосеменных. Каучуком богаты растение гевея и корни сложноцветных кок-сагыза и тау-сагыза. Гутта содержится в эвкомии и бересклете.

Более глубокая структурная детализация терпеноидов связана с размерами циклов (циклопентановые, циклогексановые и т. д.) и характером полициклизации. Бициклогептановые монотерпены отличаются большим разнообразием: бицикло [2.2.1]-системы; бицикло [4.1.0]-системы; бицикло [3.1.1]-системы.

Внутри каждого класса терпеноидов классификация проводится в первую очередь по степени цикличности углеродного скелета на ациклические и циклические. В свою очередь циклические разделяются на моноциклические, бициклические, трициклические.

Химические характеристики терпеноидов: ключевыми являются углеводороды, как правило, ненасыщенные, степень ненасыщенности которых обратна степени циклизации; основные функциональные группы в природных изопреноидах построены на основе кислорода – спиртовые и фенольные, альдегидные и кетонные, карбоксильные, эфирные и сложноэфирные, встречаются перекисные и гидроперекисные производные. Изопреноидам свойственны функционализация, структурная и пространственная изомерия, «нарушения» изопреноидной структуры. Нарушения структуры могут появляться по ходу биосинтеза изопреноидов в результате деградации структуры, повышения углеродного содержания в скелете изопреноидов, а также изомеризационных процессов.

Структура хризантемовой кислоты (пример появления нарушений по ходу синтеза: один изопренильный остаток присоединен по срединной связи C2–C3 второго изопренильного фрагмента):



Приводя характеристику *биосинтеза изопреноидов*, важно учитывать следующие особенности.

В клетках животных и грибов все изопреноиды синтезируются по классическому мевалонатному пути. Мевалоновая кислота является исходным соединением в синтезе изопреноидов, образуясь из трех молекул ацетил-СоА. Далее из мевалоновой кислоты формируется изопентенилдифосфат, преобразования которого приводят к синтезу изопреноидов.

Ряд микроорганизмов, в том числе многие цианобактерии и зеленые водоросли, используют другой вариант образования изопентенилдифосфата. В данном случае его предшественником является 1-дезоксигулулозо-5-фосфат, который синтезируется из пирувата и глицеральдегид-3-фосфата. Это альтернативный, или немевалонатный, путь синтеза изопреноидов.

Удлинение молекул изопреноидов происходит за счет присоединения изопренильных фрагментов. Таким образом образуются изопреноиды различной длины.

Растения используют оба варианта образования изопреноидов: в цитозоле синтез идет по классическому пути, в пластидах – по альтернативному. При этом возможно дублирование синтеза одних и тех же изопреноидов в разных компартментах клетки.

Синтез базовых изопреноидных структур осуществляют всего два типа ферментов: пренилтрансферазы, которые наращивают длину изопреноидов, и циклазы, которые формируют соответствующий циклический скелет молекулы. Каждый тип структуры формирует специфическая циклаза.

Функции большинства терпеноидов еще не изучены, и на данный момент нет данных, чем объясняется образование в растениях такого огромного количества соединений данной группы. Известно, что некоторые представители терпеноидов играют очень важную роль в растительном организме. Это прежде всего вещества, обладающие фитогормональной

активностью. К терпеноидам принадлежит ксантоксин – ингибитор роста растений. Стероиды, каротиноиды являются терпеноидами, хлорофилл содержит С20-терпеноид фитол, пластохинон и убихинон имеют боковые цепи терпеноидной природы. Производные полипренолов участвуют в биосинтезе целлюлозы. Функции перечисленных важнейших соединений хорошо изучены.

Каучук и гутта выполняют защитную функцию, затягивая раны в коре и древесине растений, защищают их от вредителей. Также многие летучие терпеноиды служат аллелопатическими веществами и выполняют защитную функцию. Стероиды (например, ситостерол) являются важными компонентами мембран растительных клеток.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте общие особенности вторичного синтеза у растений.
2. Какие функции выполняют вторичные метаболиты растений?
3. Дайте характеристику структурных особенностей фенольных соединений, изопреноидов и алкалоидов.

1.5. Вторичные метаболиты морских беспозвоночных животных

Морские организмы составляют около 50 % от общего биоразнообразия на Земле. В 2015 г. Джон В. Блант с соавторами подсчитали, что за последние 50 лет из морской среды было получено более 20 000 природных биологически активных соединений.

В морских организмах исключительно редко находили ранее известные соединения. Биохимия их вторичного обмена существенно отличается от таковой наземных обитателей. Главное объяснение этого – существенные таксономические различия между наземными и морскими животными, растениями и микроорганизмами.

Продуцентами вторичных метаболитов среди морских беспозвоночных животных являются представители типов Губки (*Porifera*), Стрекающие (*Cnidaria*), Моллюски (*Moluska*), Мшанки (*Ectoprocta* или *Bryozoa*) и типа Иголокожие (*Echinodermata*)

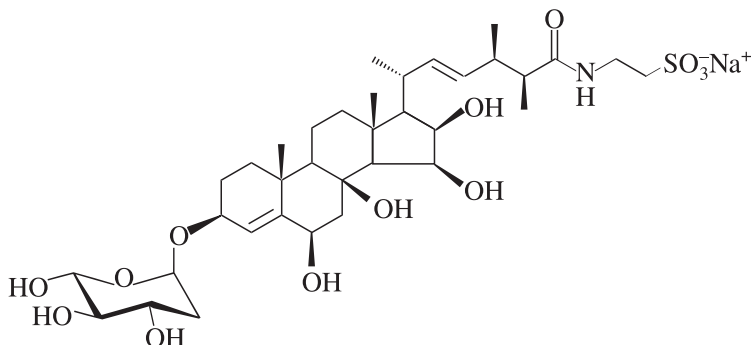
Основные характеристики вторичного синтеза у морских животных: 1) мозаичный тип биосинтеза; 2) образование «горячих метаболитов» (короткоживущие интермедиаты).

Мозаичный тип биосинтеза – типичная схема образования вторичных метаболитов морских беспозвоночных – характеризуется следующими особенностями:

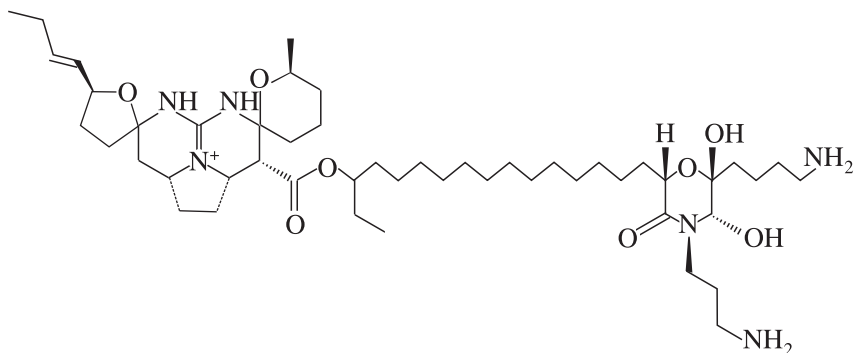
- превращения происходят параллельно, с различными предшественниками;
- последовательность превращений может быть неодинаковой для трансформируемых промежуточных соединений;
- большинство промежуточных метаболитов являются минорными и в организме-продуcente, как правило, не сохраняются, быстро трансформируясь в конечные продукты;
- в результате формируется сложная сеть реакций взаимосвязанных веществ, из которых накапливаются только конечные продукты.

Поскольку биосинтез многих соединений в морских беспозвоночных животных протекает мозаичным путем, это приводит к повышению сложности смесей родственных метаболитов, а следовательно, и к трудностям в их разделении и получении индивидуальных веществ. Предполагаемая схема биосинтеза тритерпеновых гликозидов в голотуриях служит примером биосинтеза мозаичным путем, когда образование конечных продуктов происходит не в цепи последовательных превращений одного вещества в другое, а в параллельных реакциях (рис. 4, 5).

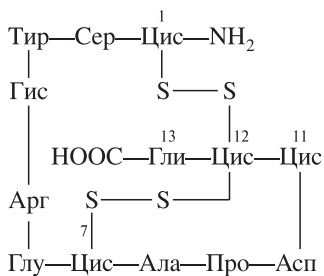
Большинство вторичных метаболитов, обнаруженных в морских животных, относятся к алкалоидам и изопреноидам и их гликозидам. Иногда встречаются соединения иной химической природы: преимущественно меротерпеноиды, рибозиды, нерибосомальные пептиды.



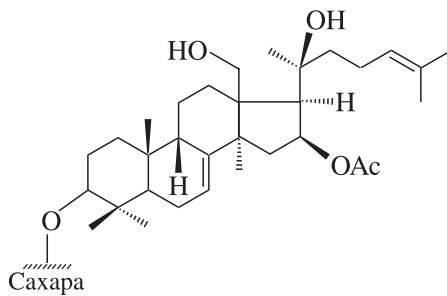
Полярный стероидный гликозид фишерииозид А
(продуцент – дальневосточная морская звезда
Leptasterias fisheri)



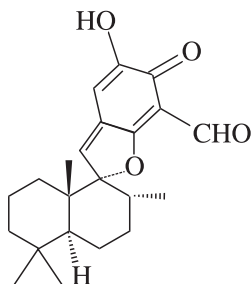
Пентациклический гуанидиновый алкалоид монанхоцидин
(продукт – дальневосточная морская губка *Monanchora pulch*)



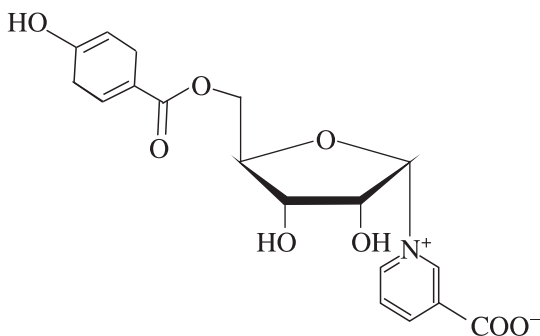
Пептид конотоксин
(продукт – тихоокеанский моллюск
Conus magnus)



Тритерпеновый гликозид кукумариозид A8
(продукт – голотурия *Eupentacta fraudatrix*)



Меротерпеноид кораллидиктиал В
(продуцент – морская губка *Aka coralliphaga*)



Пиридиновый рибозид неопетрозид А
(продуцент – губка *Neopetrosia* sp.)

Алкалоиды – известный своим структурным разнообразием и биологическими активностями класс низкомолекулярных природных соединений, биосинтезируемых из аминокислот и других биосинтетических предшественников. Среди морских алкалоидов найдены противоопухолевые агенты, мощные токсины (батрахотоксин, тетродотоксин и др.), антимикробные и иммуностимулирующие соединения. Индолилкарбазольный и индолофенантридиновый алкалоиды недавно найдены в морской губке *Penares* sp., собранной во вьетнамских водах. Данные алкалоиды имеют ранее неизвестные скелетные системы.

Изопреноиды и их гликозиды. В течение последних лет было открыто много новых терпеноидов из губок, голотурий и морских микроорганизмов.

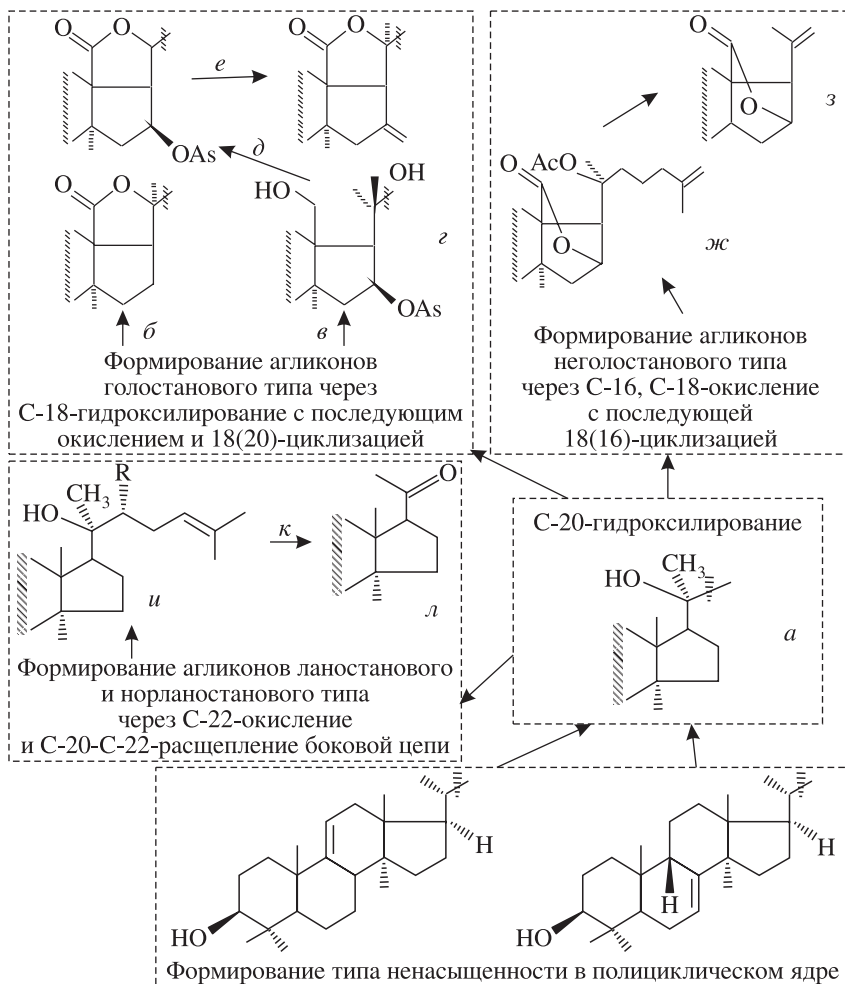


Рис. 4. Предполагаемая схема мозаичного синтеза
тритерпеновых гликозидов в голотуриях:

а – гликозиды; *б* – C-18-окисление, 18(20)-циклизация;
в – C-16, C-18-окисление; *г* – кукумариозид А5; *д* – 18(20)-циклизация;
е – C-16-окисление; *ж* – псолосозид В; *з* – гликозиды; *и* – R=OH или OAc,
гликозиды; *к* – расщепление боковой цепи; *л* – гликозиды

Источник: Сильченко А. С., Авилов С. А., Калинин В. И.

Тритерпеновые гликозиды голотурий: химическая структура, биологическая
активность и некоторые закономерности биосинтеза // Исследования
природных соединений в Тихоокеанском институте биоорганической
химии им. Г. Б. Елякова. Владивосток : Дальнаука, 2013. С. 54–55.

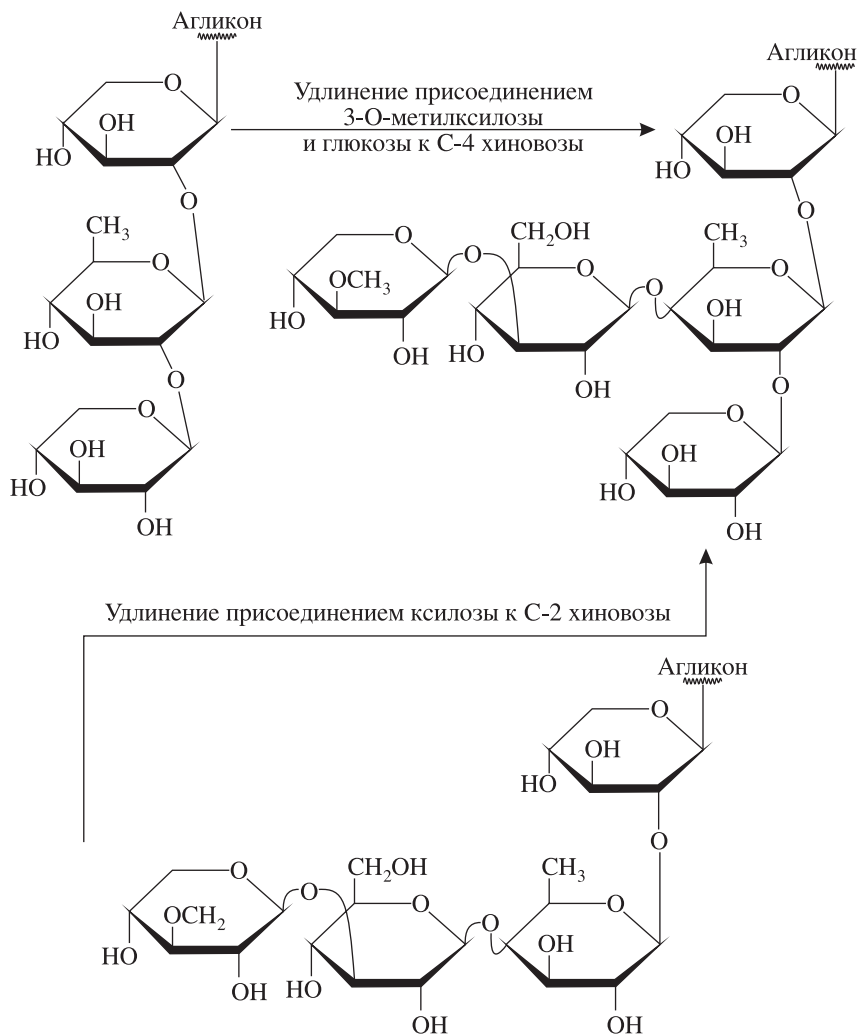


Рис. 5. Варианты мозаичного синтеза
пентасахаридных углеводных цепей в *Eupentacta fraudatrix*

Источник: Сильченко А. С., Авилов С. А., Калинин В. И.

Тритерпеновые гликозиды голотурий: химическая структура, биологическая
активность и некоторые закономерности биосинтеза // Исследования
природных соединений в Тихоокеанском институте биоорганической
химии им. Г. Б. Елякова. Владивосток : Дальнаука, 2013. С. 54–55.

Например, из экстрактов морской губки *Heterofibria sp.* была выделена серия дитерпеноидов спонгианового ряда, причем некоторые из них ингибируют биосинтез ДНК, но стимулируют биосинтез РНК в эмбрионах морских ежей.

Многие полярные стероиды, типичные вторичные метаболиты морских звезд, стимулируют рост отростков нервных клеток (нейритов). Эти вещества усиливают действие белковых биорегуляторов, функционирующих в организме человека. Стероиды обладают нейропротекторными свойствами, поддерживая выживание клеток в условиях кислородного голодания и недостатка глюкозы. Циклические стероидные гликозиды, недавно выделенные из морской звезды *Echinaster luzonicus* (Gray), относятся к группе весьма редких стероидных метаболитов (рис. 6).

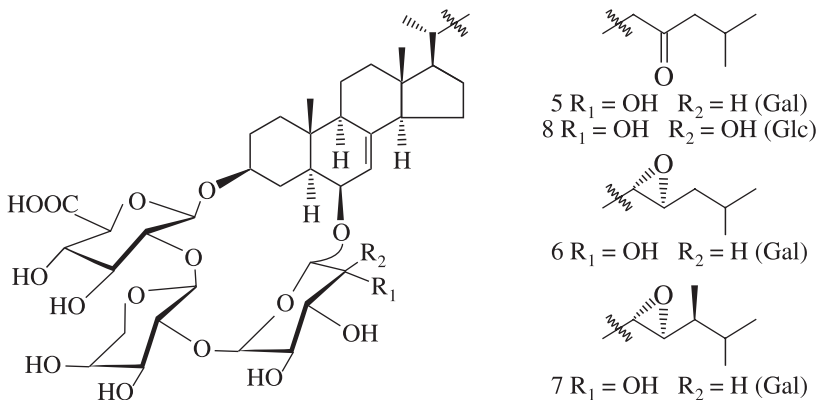


Рис. 6. Циклические стероидные гликозиды из морской звезды *Echinaster luzonicus*

Разнообразие морских полярных стероидов является следствием протекающих в морских организмах процессов биохимической трансформации различных стероидных субстратов. Эти процессы мало изучены, хотя анализ структур стероидных метаболитов указывает на ряд особенностей биохимических реакций в их продуцентах. По сравнению с метаболитами наземных организмов здесь имеются существенные структурные отличия.

Согласно классификации вторичных метаболитов морских животных по типу основной активности, выделяют соединения, обладающие свойствами:

- противоопухолевыми;
- обезболивающими;

- противовоспалительными и ранозаживляющими;
- антивирусными и противомикробными.

Создание на основе морских природных соединений медицинских препаратов нового поколения осложняется рядом моментов: 1) такие вещества часто труднодоступны; 2) соединения, демонстрирующие высокую активность в условиях *in vitro*, не всегда так же эффективны при введении в организм; 3) некоторые из них имеют серьезные побочные эффекты.

Контрольные вопросы

1. Каковы особенности вторичного синтеза у морских беспозвоночных животных?
2. На какие основные структурные группы разделяют вторичные метаболиты данных организмов?
3. Чем осложняется создание лекарственных препаратов на основе субстанций, выделенных из морских беспозвоночных организмов?

1.6. Вторичные метаболиты грибов

Грибное царство включает в себя многие виды с уникальными биохимическими путями. Продуктами реакций вторичного синтеза являются такие фармакологически важные соединения, как пенициллин, циклоспорин, станины; яды – афлатоксин, трихотецены.

Систематическое изучение вторичных метаболитов грибов началось в 1922 г. под руководством Гаролда Рэйстрика. Тогда охарактеризовали более чем 200 метаболитов плесеней.

Было обнаружено, что метаболиты грибов имеют различные физиологические проявления. В частности, ингибируют рост бактерий, грибов, протистов. Также обладают следующими эффектами: цитотоксическим, мутагенным, карциногенным, тератогенным, иммуносупрессивным.

Между 1993 и 2001 гг. были охарактеризованы около 1500 вторичных метаболитов грибов. Более половины из них обладали антибактериальными свойствами.

Подходы к классификации:

- по типу физиологической активности;
- типу предшественника – первичного метаболита;
- классам ферментов, вовлеченных в биосинтез.

К классам вторичных метаболитов грибов, согласно структурной классификации, относятся:

- поликетиды (афлатоксин и фумонизины),
- нерибосомальные пептиды (сиродесмин, перамин и сидерофоры, например, феррикроцин),
- терпеноиды (токсин Т-2, дезоксиниваленол),
- индольные алкалоиды (паксиллин и лолитремы).

Поликетиды – самый распространенный класс вторичных метаболитов среди грибов. Он наиболее изучен с точки зрения генетической регуляции синтеза. Основные ферменты путей синтеза поликетидов у грибов – поликетидсинтазы (PKSs). Последние имеют доменную организацию. Разнообразие метаболитов данной группы достигается за счет функционирования постполикетидной системы синтеза.

Нерибосомальные пептиды образуются из протеиногенных и не-протеиногенных аминокислот посредством функционирования мультимодульных ферментов – нерибосомальных пептидсинтаз. Каждый модуль содержит несколько доменов. Первая идентифицированная грибковая нерибосомальная пептидсинтаза – δ -(L- α -аминоадипил)-L-цистеинил-D-валинсинтаза – катализирует первый шаг в биосинтезе β -лактамных антибиотиков пенициллина и цефалоспорины.

Терпеноиды, синтезируемые грибами, включают ристолохены, каротиноиды, гиббереллины, индолдITERПЕНЫ, трихотецены. Терпенциклазы – определяющие ферменты в синтезе терпеноидов. Характеризуются структурной гомологией в пределах грибного царства.

Индольные алкалоиды в грибах обычно образуются из триптофана, но и другие аминокислоты могут выступать в качестве предшественников.

Функции вторичных метаболитов в грибах, которые их производят, до конца не изучены. Многие из этих грибов являются почвенными сапрофитами, и вторичные метаболиты могут обеспечивать защиту от других обитателей данной экологической ниши. Кроме этого, вторичные метаболиты гриба могут давать преимущество растению, с которым этот гриб находится в симбиотических взаимоотношениях.

Регуляция вторичного метаболизма у грибов является сложной, включающей в себя множество белков и комплексов, которые реагируют на различные раздражители окружающей среды.

В связи с результатами последних исследований значительный интерес представляют молекулярно-генетические аспекты биохимии вторичного метаболизма грибов. Активно развивается направление «грибковая

геномика». Установлено, что гены грибов имеют кластерную организацию. Последние достижения в области молекулярной биологии, биоинформатики и геномики показали, что гены, кодирующие специфические грибковые вторичные метаболиты, сгруппированы и часто расположены вблизи теломер. Кластеризация генов облегчает расшифровку генома и позволяет «предсказывать гены». При этом до сих пор неясны причины данного процесса.

Контрольные вопросы

1. Назовите подходы к классификации вторичных метаболитов, продуцируемых грибами.
2. Дайте характеристику классам вторичных метаболитов грибов.
3. Что такое грибковая геномика?

1.7. Вторичные метаболиты бактерий

Способность синтезировать вторичные метаболиты – обязательное свойство бактерий. Многие вторичные метаболиты бактерий представляют значительный практический интерес.

Противоопухолевые средства. К противоопухолевым соединениям, производимым актинобактериями, относятся: актиномицин D, антрациклины (даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, пирарубицин и валрубицин), блеомицин, митозаны (митомицин C), антраценоны (митрамицин, стрептозотоцин и пентостатин), энедины (калихеамицин), таксол, эпотилоны.

Нутрицевтические средства. Основное значение имеют метаболиты пробиотических бактерий. Каротиноиды микробного происхождения используются в качестве пищевых красителей, нутрицевтиков, косметических средств и антиоксидантов.

Ферменты и ингибиторы ферментов. Годовой объем продаж ферментов, производимых микроорганизмами, составляет 2,3 млрд долл. США: на долю ферментов, применяемых в моющих средствах, приходится 34 %, пищевых продуктах – 27 %, кормах – 16 %, текстильных изделиях – 10 %, целлюлозно-бумажной промышленности – 10 %. К промышленно значимым ферментам относятся: протеаза субтилизин, глюкозоизомераза, пенициллин-амидаза, нитрилаза, фитаза. Важным ингибитором ферментов является клавулановая кислота.

Сельскохозяйственные и ветеринарно-санитарные продукты.

Вторичные метаболиты находят широкое применение в области сельского хозяйства и охраны здоровья животных:

- касугамицин и полиоксины используются в качестве биопестицидов, никкомицин и спинозины – биоинсектицидов;
- биогербициды применяются в качестве биогербицидов;
- ивермектин и дорамектин – антигельминтики и эндектоциды;
- кокцидиостаты – стимуляторы роста жвачных животных.

Антибиотики. Среди вторичных метаболитов бактерий антибиотиков описано около 6000 соединений, из них 4000 выделены из актинобактерий. В группе прокариот наиболее значимыми продуцентами антибиотиков являются одноклеточные бактерии *Bacillus* и *Pseudomonas*. Основными участниками рынка антибиотиков являются *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces griseus* и *Bacillus subtilis*.

Различают следующие подходы к классификации антибиотиков:

- по типу продуцирующей бактерии: родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, других родов (*Micrococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Proteus*);
- механизму биологического действия: нарушающие синтез клеточной стенки бактерий; нарушающие функции мембран; подавляющие синтез нуклеиновых кислот; подавляющие синтез белков; ингибирующие процессы клеточного дыхания; антиметаболического действия; с иммунокорректирующей активностью;
- спектру действия: противобактериальные узкого спектра действия, активные в отношении грамположительных бактерий; противобактериальные широкого спектра действия; противотуберкулезные; противогрибковые; противоопухолевые; антипротозойные.
- химической структуре: β -лактамы; антибиотики-антрациклины; антибиотики-гликопептиды; металлосодержащие антибиотики; аминогликозидные антибиотики (стрептомицин, канамицин, гентамицин и др.); тетрациклины; макролидные антибиотики; нзамицины; полипептидные антибиотики; соединения с иной структурой.

Приведем основные группы антибиотиков по химической природе.

Важной группой антибиотиков являются продукты нерибосомального синтеза. Известно более 300 соединений, которые относятся к антибиотикам с пептидной структурой.

Отличия полипептидных антибиотиков от обычных белков заключаются в том, что их молекулярная масса не превышает 3000, в их составе

обнаруживаются необычные аминокислоты, например в D-форме, метилированные или оксиаминокислоты; они склонны к циклизации или ги-перциклизации.

В группе антибиотиков, образующихся путем конденсации ацетатных и пропионатных единиц, обнаруживаются разные по структуре молекулы: изолированные или конденсированные ароматические, хиноны, макролиды, анзамицины. Реакции их образования сходны с реакциями образования жирных кислот. Синтез происходит при участии мультиферментного комплекса и молекулы-затравки, которая связывается с ним. Структура такого антибиотика определяется главным образом длиной цепи и степенью ее восстановленности. Если цепь образована исключительно из ацетатных единиц и группы C=O не восстановлены, то образуются поликетидные структуры. В соответствии со стерическими представлениями образуются шестичленные кольца ароматической природы. Если карбонильная группа восстанавливается частично и циклизация затруднена, то получаются линейные структуры или макроциклы.

Рассмотрим *регуляцию синтеза* антибиотиков. Ферменты, участвующие в синтезе вторичных метаболитов, характеризуются меньшей субстратной специфичностью по сравнению с ферментами первичного метаболизма.

Ферменты, участвующие в биосинтезе антибиотиков, могут быть разделены на три группы:

- 1) образующие и модифицирующие промежуточные продукты метаболизма, которые являются исходными для синтеза данного антибиотика;
- 2) катализирующие образование первичных предшественников;
- 3) образующие первичные метаболиты, которые затем включаются в синтез вторичных.

Морские бактерии как продуценты уникальных вторичных метаболитов. Исследования морских видов бактерий сталкиваются с некоторыми ожидаемыми проблемами: 1) таксономия морских видов очень плохо определена; 2) неясно, по каким критериям относить бактерии к морским видам; 3) при выращивании морских микроорганизмов возникают технические проблемы; 4) ожидается высокая непредсказуемость результатов.

Существуют разные подходы к обнаружению новых видов морских бактерий. Случайный подход использует любой доступный материал для выделения микроорганизмов, в то время как использование морских организмов более высокой организации имеет целью выделение из них морских бактерий.

Особенности структуры вторичных метаболитов морских бактерий:

- сера идентифицирована в 13 % из 258 соединений;
- доминирующим галогеном является хлор, а не бром;
- азотированные и ацетатсодержащие продукты представляют собой основные классы вторичных метаболитов;

- некоторые классы соединений, распространенные у морских беспозвоночных, до сих пор не найдены в морских микроорганизмах;

- терпены в основном представлены сесквитерпенами и дитерпенами;
- терпеноиды, обнаруженные в микроорганизмах, характеризуются чрезвычайно слабым разнообразием скелета по сравнению с беспозвоночными или водорослями;

- производные малоната включают алифатические, алициклические или лактонизированные ацетогенины, метаболиты смешанного ацетат-пропионатного происхождения и макролиды;

- среди азотированных соединений преобладают амины и амиды, индольные алкалоиды и циклические пептиды.

Бактерии, продуцирующие **пигменты**, распространены повсеместно и присутствуют в различных экологических нишах. Актинобактерии характеризуются высокой продуктивностью в отношении пигментов. Основные продуценты: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Rhodococcus*, *Kitasatospora*. Бактерии производят широкий спектр пигментов, таких как меланин, виолацеин, родигиозин, пиоцианин, актинородин, зеаксантин и др.

Бактериальные пигменты применяются в различных отраслях. В *текстильной промышленности* используется около 1,3 млн т синтетических красителей и предшественников красителей.

Пигменты, такие как каротиноиды, меланины, флавины, хиноны и др., проявляют *антибактериальные свойства*.

Природные красители из бактерий играют значительную роль в качестве *пищевых красителей* благодаря своему дешевому производству, более легкому извлечению, высокому выходу, отсутствию недостатка сырья и сезонных колебаний. Например: красный пигмент из *Monascus* sp., астаксантин из *Xanthophyllomyces dendrorhous*, рибофлавин из *Ashbya gossypii*, β -каротин из *Blakeslea trispora*, ликопин из *Erwinia uredovora*.

Микробные пигменты, такие как каротиноиды и нафтахинон, проявляют *антиоксидантную активность*.

Многие микробные пигменты демонстрируют *противоопухолевую активность*. Например продигозин обладает цитотоксичностью в отношении лейкозных клеток U937.

Кроме того, пигменты могут использоваться в качестве *биоиндикаторов*. Флуоресцентные пигменты бактерий могут быть использованы для проверки хода специфических реакций. Ключевым примером является фикоэритрин, который применяется для прогнозирования скорости поглощения пероксирадикалов в плазме крови человека.

Таким образом, учитывая разнообразие структур и свойств вторичных метаболитов, недостаточную изученность некоторых классов вторичных соединений, систематическое обнаружение ранее неизвестных метаболитов, крайне важным является разностороннее изучение вторичных метаболитов с привлечением передовых и высокоэффективных методов и инструментов биохимии и биоорганической химии.

Контрольные вопросы

1. Назовите подходы к классификации вторичных метаболитов бактерий.
2. Какие выделяют основные группы антибиотиков по химической природе?
3. Назовите области применения бактериальных пигментов.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

2.1. Общая характеристика этапов анализа

Начальными этапами исследования вторичных метаболитов являются пробоподготовка образца, при необходимости «тушение» метаболизма и выделение метаболитов. Особенно важен этап «тушения» метаболизма в случае построения метаболомных карт микроорганизмов. Экстракция метаболитов – извлечение эндогенных метаболитов из сырья продуцентов. Метод экстракции метаболитов выбирают исходя из структурно-функциональных особенностей исследуемого объекта: устойчивости мембраны (или наличия клеточной стенки) клетки, химических свойств исследуемых соединений и активности ферментов. Выбирая подход к экстракции, следует помнить, что при проведении данной процедуры должно извлекаться максимально возможное количество соединений, не подвергаясь модификации, а полученный образец должен быть совместимым с выбранным методом анализа.

Существует множество методов экстракции метаболитов. Чаще всего используют охлажденные органические растворители: ацетонитрил, метанол, этанол, смесь спиртов с водой в различных соотношениях, хлороформ и т. д. Кроме того, экстракция метаболитов проводится путем значительного изменения pH в образце. При работе с бактериальными клетками для экстракции используют высокие концентрации щелочи (KOH или NaOH) или кислоты (хлорной, соляной или трихлоруксусной), однако обработка клеток сильными кислотами и щелочами может быть сопряжена с химическим изменением исследуемых метаболитов. Также применяют обработку горячим этанолом или метанолом, перхлоратом или смесью метанол/хлороформ. Для извлечения метаболитов из клеток, кроме обработки специальным реагентом, применяют дополнительную процедуру последовательного замораживания и размораживания клеток. При исследовании грамотрицательных бактерий, характеризующихся наличием двух мембран, используют дополнительное ультразвуковое воздействие.

После проведения экстракции органические растворители обычно удаляют путем испарения в вакууме. Осадок ресуспендируют в небольшом объеме выбранного растворителя, центрифугируют, надосадочную жидкость сохраняют при низких температурах до анализа соответствующим аналитическим методом. Предельно допустимый срок хранения образцов экстрактов определяется температурой хранения: чем ниже температура, тем дольше может храниться образец. В случае необходимости в длительном хранении периодически проводится проверка сохранности образцов. При температуре 4–6 °C рекомендуемый срок хранения образцов на основе спиртов составляет не более одного месяца.

Следующий этап анализа – разделение полученной смеси метаболитов. Наиболее часто его проводят с применением жидкостной хроматографии (ЖХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) и газовой хроматографии (ГХ). Реже используют капиллярный электрофорез.

Разделение метаболитов методом капиллярного электрофореза основано на физико-химических различиях в размерах и зарядах молекул. Основным преимуществом данного метода, в отличие от хроматографического разделения, является возможность одновременной регистрации катионов и анионов в малом объеме пробы. Основной недостаток заклю-

чается в сложности совмещения капиллярного электрофореза с последующей масспектрометрической детекцией из-за отсутствия потока переносящей жидкости. Кроме того, по сравнению с методом хроматографического разделения капиллярный электрофорез имеет существенно меньшую разрешающую способность. В связи с указанными недостатками данный подход не получил широкого распространения в биохимических исследованиях.

Газовая хроматография – метод фракционирования летучих компонентов смеси при перераспределении их между подвижной фазой, представленной инертным газом (газ-носитель), и неподвижной фазой, закрепленной на колонке. Это метод эффективного разделения метаболитов, позволяющий проводить высоковоспроизводимые измерения. Он используется для разделения как летучих, так и нелетучих соединений. Последние приобретают летучие свойства посредством процедуры предварительной дериватизации – процесса химического превращения исходного соединения с целью придания ему определенных аналитических свойств, например летучести или термической устойчивости.

Одним из самых эффективных методов разделения смеси метаболитов, который сегодня наиболее широко используется и подходит для разделения различных смесей, является метод ЖХ. Рассмотрим его основные принципы подробнее.

Контрольные вопросы

1. Каков принцип выбора метода экстракции вторичных метаболитов?
2. Какие существуют методы экстракции вторичных метаболитов?
3. Назовите методы разделения смеси метаболитов.

2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Общая характеристика метода. Высокоэффективная жидкостная хроматография, или жидкостная хроматография высокого давления, – это специфическая форма колоночной хроматографии. В настоящее время данный метод – один из самых мощных инструментов в аналитической химии и биохимических исследованиях. Он обладает способностью разделять, идентифицировать и количественно определять соединения, присутствующие в любом образце, который может быть растворен

в жидкости. Отметим, что ВЭЖХ – наиболее точный аналитический метод, часто применяемый и для количественного, и для качественного анализа метаболитов.

Общий принцип колоночной хроматографии, в том числе ВЭЖХ, заключается в том, что раствор образца вводят в колонку из пористого материала (неподвижная фаза), а жидкость (подвижная фаза) прокачивают под высоким давлением через колонку. Разделение пробы основано на различиях в скоростях движения веществ через колонку, возникающих из-за различного распределения компонентов пробы между неподвижной и подвижной фазами.

Прибор ВЭЖХ состоит из колонки (в ней находится неподвижная фаза), насоса (перемещает подвижную фазу через колонку) и детектора (показывает время удерживания молекул в колонке) (рис. 7).

Время удерживания варьирует в зависимости от взаимодействия неподвижной фазы, молекул исследуемых образцов и используемого растворителя. Анализируемый образец вводится в небольшом объеме в поток подвижной фазы и замедляется специфическими химическими или физическими взаимодействиями со стационарной фазой (рис. 8).

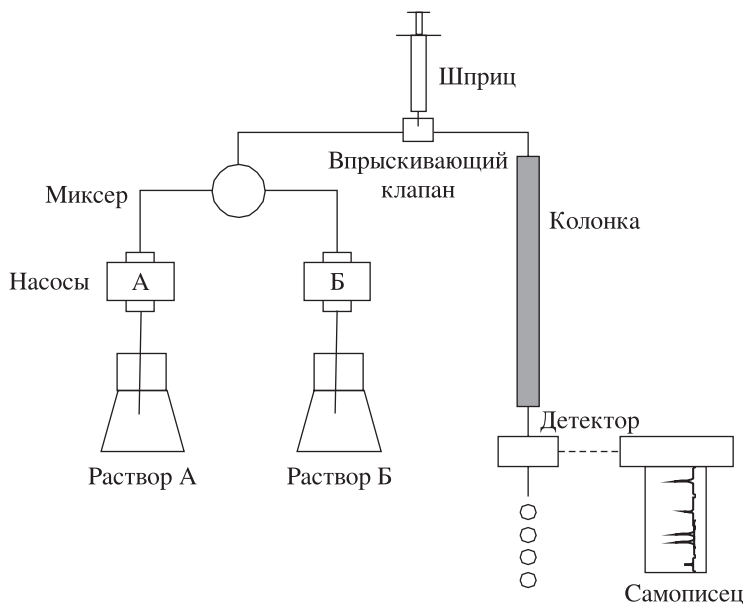


Рис. 7. Схема устройства прибора ВЭЖХ

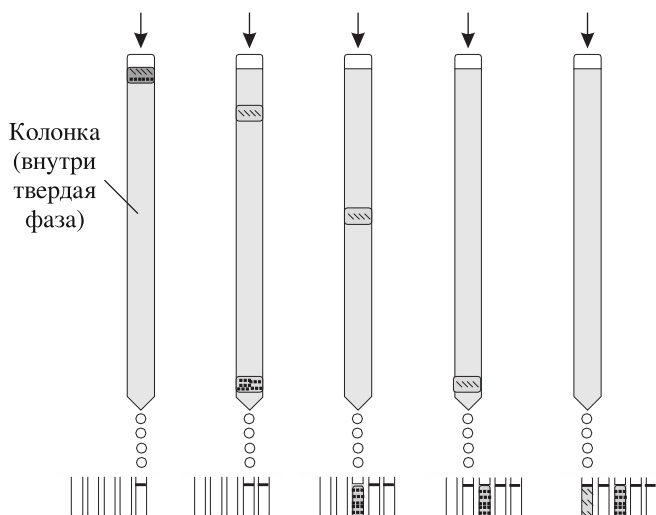


Рис. 8. Прохождение раствора, включающего молекулы метаболитов (обозначены узорами), через колонку

Метаболиты движутся по колонке с разной скоростью, так как неодинаково эффективно взаимодействуют со стационарной фазой.

Соединение с большим сродством к неподвижному слою будет перемещаться медленнее и на меньшее расстояние по сравнению с соединениями с меньшим сродством, которые перемещаются быстрее и на большее расстояние.

В целом степень замедления движения метаболита по колонке зависит от природы анализируемого вещества и состава как неподвижной, так и подвижной фазы. Время, в течение которого конкретный аналит элюируется (выходит из конца колонки), называется временем удерживания. Обычно используемые растворители включают любые смешивающиеся комбинации воды и органических жидкостей (наиболее распространенные – метанол и ацетонитрил).

Разделение, производимое при изменении состава подвижной фазы во время анализа, – это градиентное элюирование. Градиент разделяет смеси веществ в зависимости от сродства анализируемого вещества к текущей подвижной фазе. Выбор растворителей, добавок и градиента зависит от природы неподвижной фазы и анализируемого вещества.

Следует заметить, что ВЭЖХ более универсальна, чем ГХ, поскольку не ограничивается летучими и термически стабильными образцами, и выбор подвижных и неподвижных фаз шире.

Преимущества ВЭЖХ перед другими методами разделения:

- одновременный анализ множества соединений;
- высокое разрешение;
- высокая чувствительность;
- хорошая воспроизводимость;
- возможность легко фракционировать и очищать образец.

Хроматография в нормальной фазе (NP-ВЭЖХ). При обычной фазовой хроматографии подвижная фаза является неполярной, а стационарная – полярной. Следовательно, стационарная фаза сохраняет полярный аналит. Увеличение полярности молекул растворенного вещества повышает адсорбционную способность, что приводит к увеличению времени элюирования. Химически модифицированный диоксид кремния (цианопропил, аминопропил и диол) используется в качестве стационарной фазы при данном типе хроматографии. Например, типичная колонка имеет внутренний диаметр около 4,6 мм и длину в диапазоне от 150 до 250 мм. Полярные соединения в смеси, пропускаемые через колонку, будут дольше присоединяться к полярному диоксиду кремния, чем неполярные, которые, в свою очередь, будут быстрее проходить через колонку.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ (RP-ВЭЖХ). При таком подходе применяются неполярная стационарная фаза и полярная или умеренно полярная подвижная фаза. Метод RP-ВЭЖХ основан на принципе гидрофобного взаимодействия. В смеси компонентов те анализируемые вещества, которые являются относительно менее полярными, будут удерживаться неполярной стационарной фазой дольше, чем относительно более полярные. Именно поэтому наиболее полярный компонент будет элюироваться первым.

Хроматография с исключением размера. Хроматография с исключением размера (Size-exclusion chromatography, SEC), также называемая гель-проникающей или гель-фильтрационной хроматографией, в основном разделяет частицы на основе размера. Она применима для определения третичной и четвертичной структуры белков и аминокислот, широко используется для определения молекулярной массы полисахаридов.

Ионообменная хроматография. В ионообменной хроматографии удержание основано на притяжении между ионами растворенного ве-

щества и заряженными участками, связанными со стационарной фазой. Ионы с одинаковым зарядом исключаются. Эта форма хроматографии широко используется при очистке воды, лигандообменной хроматографии, ионообменной хроматографии белков, анионообменной хроматографии углеводов и олигосахаридов с высоким рН и т. д.

Преимущества и недостатки ВЭЖХ как рутинного метода. Подходящая комбинация колонки, растворителя и детектора в ВЭЖХ позволяет отделить один тип молекул от других. Метод ВЭЖХ может быть использован для быстрого разделения и очистки образцов, а также для идентификации и одновременного количественного определения многих компонентов сложной смеси (например, смесей аминокислот, стероидов или метаболитов лекарств), что дает ему большое преимущество перед радиоиммуноанализом или эквивалентными методами, в которых потребовалось бы большое число отдельных тестов. В отличие от радиоиммунологического анализа ВЭЖХ позволяет выявить в анализируемом образце непредполагаемые компоненты. При этом ВЭЖХ плохо применим в одновременном анализе большого количества образцов (в отличие от радиоиммунологического анализа). Немногие методики ВЭЖХ могут быть выполнены менее чем за полчаса для одного образца, но, если количество образцов ограничено, хорошая производительность достигается с помощью автоматизированных систем подачи проб.

Еще один недостаток ВЭЖХ заключается в том, что, будучи чувствительным аналитическим методом, он также чувствителен к загрязнению образца или растворителя, а это может привести к появлению артефактов или к тому, что кажущийся успешным метод будет непригодным для обычного анализа. Использование растворителей высокой чистоты и соответствующая предварительная подготовка образцов в большинстве случаев позволяют преодолеть эти трудности.

Клиническое применение. Метод ВЭЖХ имеет значительный спектр применений как в исследованиях, так и в обычном клиническом анализе. Способность ВЭЖХ разделять близкородственные молекулы делает его основным методом выбора для детального исследования многих врожденных нарушений обмена веществ или заболеваний.

Интересен пример применения ВЭЖХ в диагностике ряда заболеваний: лейциноза (разветвленнопочечная кетонурия, болезнь мочи с запахом кленового сиропа, «болезнь кленового сиропа») и фенилкетонурии. Лейциноз вызван дефицитом декарбоксилаз оксокислот с разветвленной

цепью, что приводит к накоплению лейцина и часто – изолейцина и валина, что в общем-то может быть обнаружено и с помощью более простых методов: бумажной, тонкослойной хроматографии или электрофореза. Это касается и обнаружения повышенных концентраций фенилаланина в плазме крови. Однако для выявления причин патологий необходим аминокислотный профиль. Концентрация фенилаланина сама по себе может быть повышена, как при фенилкетонурии, либо может увеличиваться вследствие гипертирозинемии или генерализованной гипераминоацидемии. Метод с высоким разрешением, такой как ВЭЖХ, может различать эти состояния с помощью одного и того же базового подхода к разделению. На рис. 9, *а* представлен аминокислотный профиль, полученный из неразбавленной нормальной плазмы. Пики 3, 9 и 21 не встречаются в природе, но были добавлены в качестве стандартов. Аминокислотный профиль, представленный на рис. 9, *б*, получен из разбавленной (в четыре раза) плазмы субъекта с «болезнью кленового сиропа». Пики 3, 9 и 21 были добавлены в качестве стандартов. Обратите внимание на относительно высокие пики 19, 23 и 24 (валин, изолейцин и лейцин) по сравнению с другими аминокислотами.

Смеси веществ могут быть разделены на отдельные молекулы с помощью ВЭЖХ для получения метаболического профиля. Одна из основных областей, в которых используется ВЭЖХ, – мониторинг поведения терапевтических препаратов в организме.

Мониторинг полезен при различных обстоятельствах, например, когда терапевтическая доза близка к токсической; признаки токсичности трудно обнаружить клинически; скорость метаболизма у разных пациентов сильно различается; метаболизм лекарств нарушен из-за дисфункции органов или изменен другими лекарственными средствами.

Препараты, которые обычно контролируются с помощью ВЭЖХ, включают противоастматические средства (теофиллин и его активные метаболиты, включая кофеин), противосудорожные (карбамазепин, фенобарбитон, фенитоин, этосуксимид, примидон и вальпроат), трициклические антидепрессанты и кардиоактивные препараты (прокаинамид и пропранолол). Во многих случаях лекарственное средство может контролироваться с помощью радиоиммунологического анализа, но если антитела к лекарственному средству (или метаболиту) отсутствуют либо требуется одновременное измерение смеси лекарственных средств или метаболитов, то ВЭЖХ является более эффективным методом.

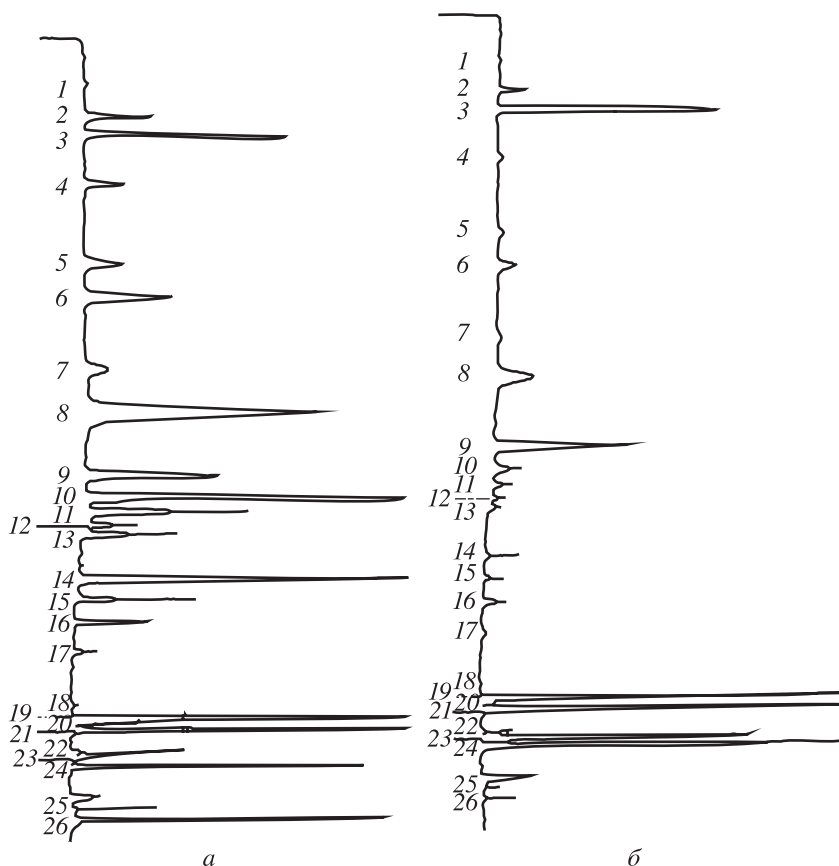


Рис. 9. Профили обращенно-фазовой ВЭЖХ аминокислот плазмы нормальных и патологических аминокислот субъектов

после химической модификации с использованием орто-фталальдегида:

- 1 – аспаргат; 2 – глутамат; 3 – гомоцистеиновая кислота; 4 – цистеин;
 5 – аспарагин; 6 – серин; 7 – гистидин; 8 – глутамин; 9 – гомосерин;
 10 – глицин; 11 – треонин; 12 – цитруллин; 13 – аргинин; 14 – аланин;
 15 – таурин; 16 – тирозин; 17 – аминок-н-бутират; 18 – этаноламин;
 19 – валин; 20 – метионин; 21 – норвалин; 22 – фенилаланин;
 23 – изолейцин; 24 – лейцин; 25 – орнитин; 26 – лизин

Источники: *Blundell G., Brydon W. G. High performance liquid chromatography of plasma amino acids using orthophthalaldehyde derivatisation // Clin. Chim. Acta. 1987. Vol. 170. P. 79–84.*

Перспективы развития ВЭЖХ. Практический предел эффективности ВЭЖХ задается твердой фазой. Повышение эффективности колонок на основе диоксида кремния маловероятно, поскольку уменьшение размера частиц твердой фазы до 5 мкм приводит к чрезмерно высоким противодавлениям, поэтому для улучшения требуются новые типы твердых фаз. Недавно были успешно разработаны высокопористые гранулы органических смол, к ним можно присоединять функциональные группы. Такие колонки обеспечивают разделение, аналогичное обычным колонкам, но при гораздо меньшем давлении. Колонки, сформированные из дисков на основе целлюлозного волокна, к которым прикреплены функциональные группы, также обеспечивают более низкое противодавление, чем обычные.

Также разрабатываются альтернативные формы стационарной фазы на основе диоксида кремния. К ним присоединены хиральные функциональные группы, способные избирательно связывать другие хиральные молекулы. Многие лекарственные средства активны только в одной из двух возможных хиральных форм, и эта разработка имеет большое клиническое значение.

Контрольные вопросы

1. На чем основан общий принцип колоночной хроматографии?
2. В зависимости от чего варьирует время удерживания молекул в колонке в колоночной хроматографии?
3. Чем отличаются нормально-фазовая и обращенно-фазовая ВЭЖХ?

2.3. Процесс разработки метода ВЭЖХ

Разработка нового метода ВЭЖХ предполагает понимание физико-химических свойств молекулы исследуемого вещества и включает следующие этапы:

- 1) выбор хроматографических условий;
- 2) подготовка образца;
- 3) оптимизация метода;
- 4) валидация метода.

Изучение физических свойств, таких как растворимость, полярность, pK_a и pH молекулы лекарственного средства, поможет аналитику опре-

делить растворитель и состав подвижной фазы. Выбор подвижной фазы или растворителей основан на растворимости анализируемого вещества. Анализируемые соединения должны быть растворимы в растворителях и не должны вступать в реакцию ни с одним из его компонентов.

Выбор правильного значения pH для ионизируемых аналитов позволяет получить симметричные и резкие пики в ВЭЖХ, необходимые при количественном анализе для достижения оптимальных пределов обнаружения, низких стандартных отклонений.

В анализе конкретного соединения существует перечень параметров, специфичных для ВЭЖХ данного соединения. Изменение этих параметров (условий разделения) может сильно повлиять на результат, тогда потребуется разработка нового подхода в измененных условиях.

Наиболее часто используемые параметры – внутренний диаметр колонки, размер частиц, размер пор, давление насоса. Для различных соединений параметры могут быть изменены в зависимости от их природы и химических свойств.

Выбор хроматографических условий. Первым и наиболее важным шагом в разработке метода является *выбор стационарной фазы/колонки*. Во избежание проблем, связанных с невоспроизводимым удержанием образца во время разработки метода, важно, чтобы колонки были стабильными и воспроизводимыми. Колонка C18, изготовленная из специально очищенного, менее кислого диоксида кремния и разработанная специально для разделения основных соединений, как правило, подходит для всех образцов.

Выбор буфера определяется желаемым значением pH. Типичный диапазон pH для обращенной фазы в колонке на основе кремнезема составляет от 2 до 8. Важно, чтобы pK_a буфера был близок к желаемому значению pH, поскольку буфер лучше всего контролирует pH при их pK_a . Необходимо выбирать буфер со значением $pK_a < 2$ единиц от требуемого значения pH соответствующей подвижной фазы.

При выборе и хранении буфера полезно учитывать общие соображения:

- 1) фосфат более растворим в метаноле/воде, чем в ацетонитриле/воде или ТГФ/воде;
- 2) некоторые солевые буферы гигроскопичны, и это может привести к изменениям в хроматографии, таким как повышенное содержание основных соединений и, возможно, различия в селективности;

3) соли аммония, как правило, более растворимы в органических/водных подвижных фазах;

4) трифторуксусная кислота со временем может разлагаться; она летучая и поглощает при низких длинах волн ультрафиолетового излучения;

5) микробный рост может быстро происходить в забуференных подвижных фазах, которые содержат мало органического модификатора или вообще не содержат его; нарост скапливается на входе колонки и может ухудшить хроматографические характеристики;

6) при pH более 7 фосфатный буфер ускоряет растворение диоксида кремния и сильно сокращает срок службы ВЭЖХ-колонок на основе диоксида кремния;

7) буферы на основе бикарбоната аммония обычно подвержены изменениям pH и, как правило, стабильны только в течение 24–48 ч; pH данного буфера может меняться из-за выделения углекислого газа;

8) после приготовления буферов их следует отфильтровать через фильтр толщиной 0,2 мкм;

9) подвижные фазы должны быть дегазированы.

Как правило, *концентрация буфера* 10–50 мМ является достаточной для малых молекул. Фосфорная кислота и ее натриевые или калиевые соли – наиболее распространенные буферные системы для ВЭЖХ с обращенной фазой. Сульфатные буферы могут заменить фосфатные при анализе фосфорорганических соединений.

Изократический режим разделения включает постоянный состав элюента, когда условия равновесия в колонке и фактическая скорость соединений, движущихся через колонну, постоянны. Пиковая пропускная способность невелика, и чем дольше компонент удерживается в колонке, тем шире результирующий пик.

Градиентный режим разделения включает в себя значительное увеличение разделительной способности системы, главным образом за счет увеличения кажущейся эффективности (уменьшения ширины пика). Ширина пика изменяется в зависимости от скорости изменения состава элюента. При принятии решения, требуется градиентный или изократический режим, выполняется начальный прогон градиента и вычисляется соотношение между общим временем градиента и разницей во времени градиента между первым и последним компонентом. Вы-

числяемый коэффициент $< 0,25$ при изократическом режиме является адекватным.

Внутренний диаметр колонки ВЭЖХ считается критическим аспектом, определяющим количество анализируемого вещества, которое может быть загружено в колонку, а также влияющим на чувствительность. Колонки большего размера обычно используются в промышленности, например в очистке лекарственного средства для последующего использования. Колонки с маленьким внутренним диаметром обладают улучшенной чувствительностью и меньшим расходом растворителя.

Что касается *размера частиц*, то большинство традиционных методов ВЭЖХ выполняется со стационарной фазой, прикрепленной снаружи к небольшим сферическим частицам кремнезема (очень мелким гранулам). Они бывают разных размеров, наиболее часто используются гранулы размером 5 мкм. Более мелкие частицы обычно обеспечивают большую площадь поверхности и лучшее разделение, но давление, необходимое для оптимальной линейной скорости, увеличивается обратно пропорционально квадрату диаметра частиц. Более крупные частицы используются в препаративной ВЭЖХ, где диаметр колонок находится в диапазоне от 5 до 30 см, а также для применений, не связанных с ВЭЖХ, таких как твердофазная экстракция.

Многие стационарные фазы являются пористыми для обеспечения большей площади поверхности. Мелкие поры обеспечивают большую площадь поверхности, в то время как больший *размер пор* имеет лучшую кинетику, особенно для более крупных анализируемых веществ. Размер пор определяет способность молекул анализируемого вещества проникать внутрь частицы и взаимодействовать с ее внутренней поверхностью. Это особенно важно, поскольку отношение внешней поверхности частицы к внутренней составляет около 1 : 1000. Поверхностное молекулярное взаимодействие в основном происходит на внутренней поверхности частиц.

Выбор подвижной фазы влияет на разрешение, селективность и эффективность ВЭЖХ. Мобильный фазовый состав играет важную роль в разделении RP-ВЭЖХ.

Ацетонитрил, метанол и тетрагидрофуран являются наиболее часто используемыми растворителями в RP-ВЭЖХ, они смешиваются с водой. Смесь ацетонитрила и воды – наилучший исходный выбор для подвижной фазы при разработке способа (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика подвижных фаз

Тип хроматографии	Используемая подвижная фаза	Тип анализируемых соединений
Обратно-фазовая	Вода/буфер, ацетонитрил, метанол	Нейтральные или неионизированные соединения, растворимые в смеси вода/органический растворитель
Нормально-фазовая	Органические растворители	Соединения, нерастворимые в смеси вода/органический растворитель
Ионно-обменная	Вода/буфер	Неорганические ионы, белки, нуклеиновые кислоты, органические кислоты
С исключением размера	Вода, тетрагидрофуран, хлороформ	Высокомолекулярные соединения

Важно также учитывать *давление насоса*. Производительность насосов различается по давлению и определяется их способностью выдавать постоянный и воспроизводимый расход. Современные системы ВЭЖХ были усовершенствованы для работы при гораздо более высоких давлениях и, следовательно, позволяют использовать в колонках частицы гораздо меньшего размера (< 2 мкм).

Инъекция образца производится следующим образом. В приборе имеются перегородочные форсунки, с помощью которых вводится раствор образца. Образец может быть введен, когда подвижная фаза течет или остановлена. Для получения воспроизводимых результатов можно использовать новый усовершенствованный поворотный клапан и петлевую форсунку.

В зависимости от целей эксперимента выделяют препаративную и аналитическую ВЭЖХ. Препаративную ВЭЖХ используют при выделении и очистке соединений, аналитическую ВЭЖХ – для получения информации о соединении. Выходные данные детектора регистрируются в виде серии пиков, каждый из которых представляет соединение в смеси, проходящее через детектор и поглощающее УФ-свет. Площадь под пиком пропорциональна количеству вещества, которое пропускается через детектор, и эта область может вычисляться автоматически компьютером, подключенным к дисплею.

В ВЭЖХ движение соединений и загрязняющих веществ через колонку должно осуществляться с разной скоростью, чтобы была возможность собирать чистое целевое соединение без одновременного выделения нежелательных веществ. Параметры разделения должны быть такими, чтобы на хроматографе наблюдался чистый пик известного образца. Идентифицируемый пик должен быть хорошо отделен от посторонних пиков на уровнях обнаружения, на которых будет проводиться анализ.

Выбор детектора зависит от химической природы анализируемых веществ, потенциальных помех, требуемого предела обнаружения, наличия и/или стоимости детектора. Различают следующие типы детекторов:

- детектор УФ/видимого излучения – универсальный двухволновой детектор поглощения для ВЭЖХ, обладает высокой чувствительностью, необходимой для рутинных применений на основе УФ-излучения, для идентификации примесей низкого уровня и количественного анализа; его интегрированное программное обеспечение и оптические инновации определяют высокую хроматографическую и спектральную чувствительность;
- детектор флуоресценции флуоресцентных соединений;
- детектор проводимости заряженных соединений, таких как неорганические ионы и органические кислоты;
- электрохимический детектор легкоокисляемых соединений, таких как хинины или амины;
- детектор показателя преломления света;
- детектор испарительного рассеяния света.

Подготовка образца. Подготовка образца является неотъемлемой частью анализа ВЭЖХ, предназначенного для получения воспроизводимого и гомогенного раствора, пригодного для введения в колонку. Цель подготовки образца – получение аликвоты, которая относительно свободна от сопутствующих соединений, не повреждает колонку и совместима с предполагаемым методом ВЭЖХ, т. е. растворитель образца будет растворяться в подвижной фазе, не влияя на удержание компонентов образца. Подготовка начинается в точке сбора и продолжается до введения образца в колонку ВЭЖХ.

Оптимизация метода. Следует определить слабые места метода и оптимизировать его с помощью экспериментального проектирования. Необходимо установить эффективность метода при различных условиях, настройках прибора и образцах. Оптимизация осуществляется после обнаружения слабых мест.

Валидация метода. Валидация – это процесс оценки эффективности метода и демонстрации его соответствия определенным требованиям, что подтверждается путем проверки и предоставления объективных доказательств выполнения предъявляемых требований при предполагаемом использовании метода.

Во время валидации методов могут быть проверены типичные аналитические характеристики:

- 1) точность;
- 2) линейность;
- 3) предел обнаружения;
- 4) предел количественного определения;
- 5) специфичность;
- 6) диапазон;
- 7) надежность;
- 8) воспроизводимость.

Точность – это близость измеренного значения к истинному или принятому. Практическая точность указывает на отклонение между найденным средним и истинным значением, определяется путем применения метода к образцам, в которые были добавлены известные количества анализируемого вещества. Затем точность вычисляется по результатам теста в процентах от количества анализируемого вещества, выделенного в результате анализа.

Воспроизводимость выражает близость соответствия (степень разброса) между сериями измерений, полученных при многократном отборе одной и той же однородной пробы при заданных условиях. Состоит из двух компонентов: повторяемость и промежуточная точность. Повторяемость – это измерение, проводимое одним аналитиком на одном инструменте. В нем не устанавливаются различия между измерениями, зависящие от прибора или системы и от процесса подготовки образца. Во время валидации повторяемость определяется путем проведения повторных разделений того же образца с использованием того же аналитического метода. Промежуточная точность – это разница в пределах лаборатории, например, при проведении теста в разные дни, с разными приборами и разными аналитиками. Затем точность выражается как относительное стандартное отклонение.

Линейность – это свойство аналитической процедуры отражать результат, прямо пропорциональный концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце. Если метод линейный, то результаты теста

прямо или с помощью четко определенного математического преобразования пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образцах в пределах заданного диапазона. Линейность обычно выражается как доверительный предел вокруг наклона линии регрессии.

Предел обнаружения определяется как наименьшая концентрация анализируемого вещества в образце, которая может быть обнаружена, но не определена количественно. Показатель выражается как концентрация при заданном соотношении сигнал/шум, обычно 3 : 1. *Предел количественного определения* – это наименьшая концентрация анализируемого вещества в образце, которая может быть определена с приемлемой точностью при указанных условиях эксплуатации метода. Для предела количественного определения соотношение сигнал/шум равно 10 : 1.

Специфичность – это способность однозначно оценивать аналит при наличии компонентов, присутствие которых можно ожидать. Обычно они могут включать примеси, разлагающие вещества, матрицу и т. д. Отсутствие специфичности отдельной аналитической процедуры может быть компенсировано другими вспомогательными аналитическими процедурами: идентификация для обеспечения идентичности анализируемого вещества; тесты на чистоту, т. е. на присутствие родственных веществ, тяжелых металлов, остаточных количеств растворителей и т. д.; анализ, направленный на точное определение содержания или активности анализируемого вещества в образце.

Диапазон метода представляет собой интервал между верхним и нижним количественными уровнями анализируемого вещества, которые были установлены с приемлемой точностью, воспроизводимостью и линейностью. Он определяется либо на линейной, либо на нелинейной кривой отклика (т. е. там, где задействовано более одного диапазона) и обычно выражается в тех же единицах, что и результаты испытаний.

Надежность аналитической процедуры является мерой ее способности оставаться неизменной при преднамеренных небольших изменениях параметров метода.

Контрольные вопросы

1. Какие этапы включает разработка методики ВЭЖХ?
2. Какой информацией о разделяемых веществах необходимо владеть до начала проведения разработки методики ВЭЖХ?
3. На чем основывается выбор условий проведения разделения методом ВЭЖХ?

2.4. Характеристика тандемной масс-спектрометрии

Объединение ВЭЖХ с масс-спектрометрическим анализом (ВЭЖХ-МС) было очевидным и ожидаемым прогрессом, однако не получало должного развития на протяжении многих лет. Только в 1950-х гг. с помощью коммерческих приборов было разработано несколько интерфейсов, которые были громоздкими и ненадежными в использовании, что ограничивало возможности их применения в лабораториях. Ситуация изменилась в 1980-х гг. с разработкой Джоном Фенном источника ионов с электрораспылением. В дальнейшем быстро развивались изобретения приборов, оснащенных источниками электрораспыления и оказавших большое влияние на исследования в биохимии. Дж. Фенн был удостоен Нобелевской премии в 2002 г. совместно с Коичи Танакой, разработавшим матричную лазерную десорбционную ионизацию, еще один полезный метод МС-ионизации для анализа биологических молекул. К середине 1990-х гг. производительность приборов ВЭЖХ-МС увеличилась до такой степени, что лаборатории клинической биохимии смогли воспользоваться преимуществами новой технологии. В первую очередь это относится к биохимической генетике, где основным ранним применением стал анализ образцов засохшей крови новорожденных на наличие ряда врожденных нарушений метаболизма. Причины выбора ВЭЖХ-МС вместо ВЭЖХ с обычными детекторами – высокая специфичность и способность обрабатывать сложные смеси.

Принцип работы масс-спектрометров. Масс-спектрометры работают по принципу преобразования молекул анализируемого вещества в заряженное (ионизированное) состояние с последующим анализом ионов и любых фрагментарных ионов, которые образуются в процессе ионизации, на основе отношения их массы к заряду (m/z). Для обоих вариантов доступно несколько различных технологий ионизации и ионного анализа, в результате чего появилось множество типов масс-спектрометров с различными комбинациями этих процессов.

Источники ионов. Перечислим основные источники ионов и приведем их краткую характеристику.

Источник ионизации электрораспылением (ESI). Дж. Фенн превратил *ESI* в надежный источник ионов и продемонстрировал его применение к ряду важных классов биологических молекул.

Следует отметить, что ESI хорошо работает с умеренно полярными молекулами и подходит для анализа многих метаболитов и ксенобиотиков. Жидкие образцы прокачиваются через металлический капилляр, поддерживаемый при 3–5 кВ и распыляются на кончике капилляра с образованием мелкой струи заряженных капель. Капилляр обычно расположен перпендикулярно или вне оси входа в масс-спектрометр, чтобы свести к минимуму загрязнение. Капли быстро испаряются под воздействием тепла и сухого азота, и остаточный электрический заряд на каплях переносится к анализируемым веществам. Затем ионизированные анализируемые вещества переносятся в масс-спектрометр с помощью серии небольших отверстий. Источник ионов и последующая ионная оптика могут использоваться для обнаружения положительных или отрицательных ионов, может выполняться переключение между этими двумя режимами в рамках аналитического цикла.

При нормальных условиях ESI считается «мягким» источником ионизации, т. е. анализируемому веществу передается относительно мало энергии, и, следовательно, происходит незначительная фрагментация, в отличие от других источников ионов МС, например, источника электронного удара, обычно используемого в ГХ, который вызывает обширную фрагментацию. Можно увеличить фрагментацию ESI в источнике путем увеличения напряжений внутри источника для увеличения числа столкновений с молекулами азота. Это было использовано в анализе ВЭЖХ-МС для идентификации компонентов с общими структурными особенностями. Например, гликаны в гликопептидах могут быть фрагментированы в источнике с образованием репортерных ионов с m/z , равной 204.

Фрагментация в источнике ограничена для некоторых анализируемых веществ, и требуются более последовательные методы, такие как диссоциация, вызванная столкновением, чтобы вызвать обширную фрагментацию, необходимую для структурных исследований и тандемного анализа.

Малые молекулы (< 500 Да) с единственной функциональной группой, способной переносить электрический заряд, дают преимущественно однозарядные ионы. Можно также вызвать добавление протона к анализируемому веществу ($M + H^+$), когда источник ионов работает в режиме положительных ионов, или провоцировать потерю протона ($M - H^-$) при работе в режиме отрицательных ионов. Появление катионов (например, $M + NH_4^+$, $M + Na^+$, $M + K^+$) и анионов (например, $M + \text{формиат}^-$, $M + \text{ацетат}^-$) может происходить при наличии солей. Более крупные молекулы и молекулы с несколькими функциональными группами, несущи-

ми заряд, такие как белки и пептиды, могут проявлять многократный заряд, в результате чего образуются ионы, такие как $M + 2H^{2+}$, $M + 3H^{3+}$. В случае белков это приводит к образованию оболочки из ионов с различными зарядовыми состояниями. Это свойство может быть использовано для точного определения аналитов с высокой молекулярной массой, включая белки до 100 кДа, на масс-спектрометрах.

Хотя ESI является наиболее широко используемым источником ионов для биологических молекул, нейтральные и низкополярные молекулы, такие как липиды, не могут быть эффективно ионизированы этим методом. Ниже описаны два альтернативных метода ионизации, разработанных для указанных выше анализируемых веществ.

Источник химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). При APCI, как и при ESI, жидкость прокачивается через капилляр и распыляется сквозь наконечник. Разряд подается вблизи кончика капилляра, первоначально ионизируя газ и молекулы растворителя, присутствующие в источнике ионов. Затем эти ионы вступают в реакцию с анализируемым веществом и ионизируют его посредством переноса заряда. Данный метод применим в ионизации небольших, термически стабильных молекул, которые плохо ионизируются ESI. Например, свободные стероиды плохо ионизируются с помощью ESI, потому что они являются нейтральными и относительно неполярными молекулами, лишенными функциональной группы, способной переносить заряд. Именно поэтому APCI был использован для повышения чувствительности ВЭЖХ-МС при анализе свободных стероидов. В отличие от ESI, появление множественных зарядов не является особенностью APCI, где доминируют однозарядные ионы. Метод также был применен к липидам и жирорастворимым витаминам.

Фотоионизация при атмосферном давлении (APPI). Фотоионизация при атмосферном давлении использует фотоны для возбуждения и ионизации молекул после распыления. Энергия фотонов выбирается таким образом, чтобы свести к минимуму одновременную ионизацию растворителей и газов - источников ионов. Техника также дает преимущественно однозарядные ионы и используется для анализа нейтральных соединений, таких как стероиды.

Масс-анализаторы. *Квадрупольный анализатор* состоит из набора из четырех параллельных металлических стержней (рис. 10). Комбинация постоянного и переменного (радиочастотного) напряжения позволяет передавать узкую полосу значений m/z вдоль оси стержней.

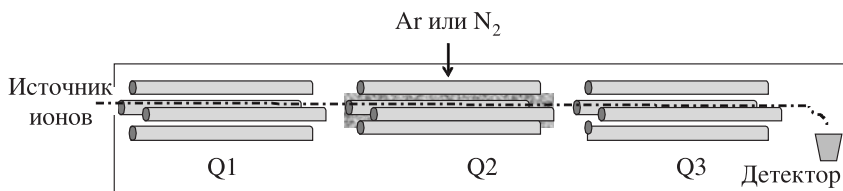


Рис. 10. Тройной квадрупольный масс-спектрометр:
Q1, Q3 – массовые фильтры; Q2 – коллизийная ячейка,
содержащая инертный газ низкого давления

Изменяя напряжение с течением времени, можно сканировать значения m/z , в результате чего получается масс-спектр. Обычно масс-спектрометры работают с разрешением на единицу массы, значит, точность измерения массы редко превышает 0,1 m/z .

В качестве альтернативы сканированию квадруполь можно настроить на мониторинг определенного значения m/z , а затем – на мониторинг другого значения m/z и т. д. Это достигается путем пошагового изменения напряжений.

Данный метод полезен для улучшения пределов обнаружения целевых аналитов, поскольку больше времени детектора может быть потрачено на обнаружение конкретных ионов вместо сканирования по ионам, которые не образуются анализируемым веществом. Пошаговое выполнение может занять несколько миллисекунд, и панель значений m/z может быть пошаговой для обнаружения нескольких анализируемых веществ.

Ионы могут подвергаться фрагментации при столкновении с инертным газом, таким как азот или аргон, – это диссоциация, вызванная столкновением. Одним из типов коллизийных ячеек является квадруполь, который был разработан для поддержания низкого давления ударного газа, необходимого для диссоциации, и передачи большей части образующихся фрагментарных ионов. Особенно полезная конфигурация масс-спектрометра получается при размещении коллизийной ячейки между двумя квадрупольными масс-анализаторами. Эта комбинация называется тройным квадрупольным масс-спектрометром и является примером tandemного МС, в котором независимо применяются две или более стадии масс-анализа.

Преимущество tandemного МС – значительно увеличенная специфичность анализа по сравнению с одноступенчатым масс-анализом. Например, 25-гидроксивитамин D3 производит во время ESI основной ион $M + H^+$ 401 m/z , который теряет воду во время диссоциации, вызванной столкновением, с образованием основного ионного продукта 383 m/z .

Высокоспецифичное обнаружение 25-гидроксивитамина D3 достигается, если первый и третий квадруполь настроены на пропускание ионов только 401 и 383 m/z соответственно. Этот метод называется мониторингом одиночной реакции, а фрагментация обозначается как 401 > 383. Только анализируемые вещества с этой комбинацией ионов (предшественник/продукт) будут обнаружены.

В сложном биологическом образце могут быть и другие компоненты, которые создает ион-предшественник с 401 m/z во время ESI, но существует низкая вероятность того, что они также будут фрагментировать до иона-продукта с 383 m/z . Первый и третий квадруполь также могут быть одновременно ступенчатыми до различных значений m/z , и панели пары ионов предшественник/продукт могут быть созданы для специфического обнаружения большого количества целевых аналитов. Этот процесс, называемый мониторингом множественных реакций (MRM), обычно используется в анализах ВЭЖХ-МС. Для тройных квадрупольных масс-спектрометров доступен ряд других полезных режимов работы (табл. 2).

Таблица 2

**Операционные модели тройных
квадрупольных масс-спектрометров**

Режим работы	Первый квадруполь	Третий квадруполь	Применение
Сканирование продуктов	Фиксированные	Сканированные	Изучение структуры, идентификация неизвестных соединений, подтверждение спектрального соответствия со стандартами
Сканирование предшественников	Сканированные	Фиксированные	Детектирование структурно родственных аналитов, производящих общий ионный фрагмент
Сканирование нейтральных потерь (или приобретений)	Сканированные	Сканированные с фиксированным смещением относительно первого квадруполь	Детектирование структурно родственных аналитов, исключающих (или приобретающих) при столкновении общую нейтральную молекулу

Режим работы	Первый квадруполь	Третий квадруполь	Применение
Мониторинг множественных реакций	Фиксированные	Фиксированные	Высокочувствительное детектирование панели целевых аналитов

Большинство приборов имеют возможность сбора данных, т. е. можно переключаться между различными режимами работы в течение цикла на основе получаемых результатов. Например, если определенный сигнал MRM обнаружен выше установленного порогового значения, затем может быть получено ионное сканирование продукта для подтверждения идентификации.

Ионное сканирование продукта не только содержит структурную информацию об анализируемом веществе, но и действует как отпечаток пальца, который можно использовать для подтверждения идентификации с большой уверенностью, например, если требуется подтверждение присутствия какого-либо вещества. Этот процесс аналогичен идентификации ГХ-МС, однако внешний вид продукта ионного сканирования сильно различается между разными приборами, и, в отличие от ГХ-МС, стандартизировать условия на разных платформах приборов сложнее.

Таким образом, хотя можно запустить стандарты и создать собственную библиотеку спектров ионов продуктов для компьютерного поиска, сложно использовать эту библиотеку на других приборах. Это затрудняет создание больших библиотек, аналогичных сформированным на основе данных ГХ-МС.

Применение ВЭЖХ-МС получило широкое распространение благодаря простоте сканирования и качественным количественным данным. Довольно популярны анализаторы и других типов, некоторые из наиболее часто встречающихся описаны ниже.

Анализатор времени пролета (TOF) работает за счет ускорения ионов с помощью высокого напряжения. Скорость ионов и, следовательно, время, необходимое для прохождения по летной трубе до детектора, зависит от их m/z . Если начальное ускоряющее напряжение является импульсным, выходной сигнал детектора в зависимости от времени может быть преобразован в масс-спектр. Анализатор TOF может получать спектры чрезвычайно быстро и с высокой чувствительностью. Он также

обладает высокой точностью определения массы, что позволяет определять молекулярные формулы для малых молекул.

Анализаторы ионных ловушек используют три гиперболических электрода для улавливания ионов в трехмерном пространстве с использованием статических и радиочастотных напряжений. Затем ионы последовательно выбрасываются из ловушки на основе их значений m/z для создания масс-спектра.

Альтернативно конкретный ион может быть выделен в ловушке путем приложения возбуждающего напряжения, в то время как другие ионы выбрасываются. В ловушку также может быть введен инертный газ для индуцирования фрагментации. Интересной особенностью этих анализаторов ионных ловушек является способность фрагментировать и выделять ионы несколько раз подряд, прежде чем будет получен окончательный масс-спектр.

Также используются *гибридные анализаторы*. Были разработаны тандемные масс-спектрометры, использующие комбинации различных масс-анализаторов. Ниже описаны конфигурации, которые особенно полезны для ВЭЖХ-МС.

Третий квадруполь тройного квадрупольного МС может быть заменен анализатором TOF для получения гибридного квадрупольного времяпролетного (QTOF) масс-спектрометра. Приборы QTOF широко используются в области протеомики, но их возможности более ограничены в сканирующих функциях, чем тройные квадрупольные приборы.

Явление подавления ионов. Одновременное присутствие более чем одного компонента в источнике ионов может привести к конкуренции в процессе ионизации и последующему уменьшению сигналов МС, т. е. сигнал компонента в смеси будет меньше, чем сигнал данного чистого вещества в той же концентрации. Это явление называется подавлением ионов и может быть ограничением конечной чувствительности любого метода ВЭЖХ-МС. Соли и некоторые другие компоненты снижают чувствительность анализа в методах прямой инъекции. Буферы и другие добавки подвижной фазы также служат источниками подавления.

Сравнение характеристик площади пика для чистых стандартов, калибраторов, изготовленных в подвижной фазе, образцов с внесением стандартов в известных концентрациях может быть использовано для изучения эффектов подавления ионов. Переменные компоненты матрицы

(например, лекарственные средства, физиологические изменения в уровнях эндогенных метаболитов) могут вызвать различия в подавлении между образцами, что приводит к недостоверным количественным результатам. Если не используются внутренние стандарты стабильных изотопов, необходимо прибегать к стратегиям подготовки образцов, позволяющим свести к минимуму влияние источников подавления.

Методы прямого впрыска. При высокоспецифичном детектировании, таком как тандемный МС, часто возможно непосредственно вводить образцы в источник ионов без какого-либо хроматографического разделения и измерения анализируемых веществ в сложной матрице. Обычно это делается с помощью многократного мониторинга реакций для анализируемых веществ и внутренних стандартов и имеет преимущество в сокращении времени выполнения, обычно до двух минут или меньше. В своей самой крайней форме образцы иногда могут быть просто разбавлены внутренними стандартами и проанализированы, это так называемые методы разбавления и отбора.

В большинстве анализов методом прямой инъекции используется та или иная форма подготовки образца, при которой удаляются компоненты матрицы, такие как белки и соли. Даже после их удаления большинство биологических образцов по-прежнему содержат сложную смесь компонентов, а эффекты подавления ионов обычно ограничивают применение метода прямого введения анализируемых веществ с относительно высокими концентрациями. Пределы обнаружения сильно зависят от природы анализируемого вещества, его фрагментации и матрицы образца, но, как правило, анализируемые вещества трудно обнаружить в концентрации $< 0,1$ мкмоль/л с использованием методов прямого впрыска. Другим ограничением методов прямой инъекции является невозможность различения изомеров, например, изомерные аминокислоты лейцин, изолейцин и алло-изолейцин имеют очень похожие спектры и не могут быть дифференцированы с использованием метода прямой инъекции МС.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип работы масс-спектрометров?
2. Назовите способы ионизации молекул.
3. Опишите явление подавления ионов.

2.5. Подход к созданию протокола ВЭЖХ-МС

Современные источники ионов работают с широким диапазоном скоростей потока и составов подвижных фаз, поэтому существующее разделение ВЭЖХ часто может быть непосредственно связано с масс-спектрометром. Однако ряд факторов способен повлиять на качество данных МС, и для улучшения производительности анализа может потребоваться некоторая модификация разделения ВЭЖХ.

Характеристики разделения. Рассмотрим основные характеристики.

Скорость потока. В то время как стандартные источники ESI обычно обрабатывают скорость потока до 1 мл/мин, более низкие скорости потока в диапазоне от 0,05 до 0,2 мл/мин приводят к повышению чувствительности. Колонки диаметром 1,0 или 2,1 мм хорошо подходят для прямого соединения с этими источниками ионов. Еще более высокую чувствительность и разрешение можно получить с помощью капиллярных колонок со скоростью потока менее мкл/мин.

Мобильная фаза. Типичные растворители, используемые в ВЭЖХ с обратной и нормальной фазой (например, вода, ацетонитрил, метанол, этанол, хлороформ), совместимы с ESI. Следует отметить, что класс растворителя (включая воду), который подходит для обычного разделения ВЭЖХ, не всегда может быть пригоден для разделения на основе ВЭЖХ-МС, например, растворитель может быть прозрачным для ультрафиолетового излучения до 210 нм, но содержать следы соединений, влияющих на качество измерения ВЭЖХ. Так, в одном исследовании были обнаружены большие различия между коммерческими сортами метанола.

При использовании буферов, содержащих неорганические ионы, следует избегать применения фосфатов и ацетата натрия. Они вызывают значительное подавление ионов, могут создавать избыточные аддукты натрия и калия и быстро загрязнять источник ионов.

Обычно возможна замена буферов на более совместимые с МС, например, буферы на основе ацетата аммония, формиата аммония или бикарбоната аммония. Однако надо принимать во внимание, что указанные буферы все равно вызывают подавление ионов, поэтому концентрация используемого буфера должна быть минимальной, необходимой для получения удовлетворительной хроматографии. Реагенты для ионного сопряжения, такие как трифторуксусная кислота и другие фторированные карбоновые кислоты, также вызывают подавление ионов, следовательно

но, их концентрации должны быть сведены к минимуму, насколько это практически возможно.

Более высокое содержание органики в подвижной фазе может привести к повышению эффективности ионизации в ESI, что, вероятно, повлияет на выбор режима разделения. Например, полярные молекулы плохо удерживаются на колонках с обратной фазой и элюируются в начале хроматограммы с низким содержанием органических веществ. Это приведет к относительно низкой эффективности ионизации и в результате вызовет подавление ионов. Один из способов преодоления данного эффекта – использование хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC), в которой полярные анализируемые вещества удерживаются и элюируются с более высоким содержанием органики в подвижной фазе.

В методах ВЭЖХ-МС важно использовать добавки подвижной фазы для улучшения ионизации. Добавление кислотных модификаторов, таких как слабые кислоты (муравьиная и трифторуксусная кислоты), очень распространено в подобных методах. При различных концентрациях некоторые добавки, например, трифторуксусная кислота, могут определять подавление ионов и снижать чувствительность в некоторых методах ВЭЖХ-МС.

Разрешение и сквозной ввод. В ВЭЖХ-МС часто используются более короткие колонки с более низким разрешением, что сокращает время операции, хотя эффекты подавления ионов могут быть ограничением.

Другой подход для ускорения аналитического процесса заключается в использовании коротких колонок с небольшими размерами частиц (< 2 мкм) и специальных насосных систем высокого давления (так называемый ультраэффективный ВЭЖХ). Такие колонки также способны генерировать хроматограммы с высоким разрешением и лучшим соотношением сигнал/шум, чем колонки с большими размерами частиц.

Хроматографическое разрешение также влияет на скорость сканирования масс-спектрометра. Для достижения точного интегрирования желательно провести не менее 10 сканирований по всему хроматографическому пику. Скорее всего, возникнет необходимость в использовании высоких скоростей сканирования с высоким разрешением пиков, что повлечет за собой снижение чувствительности при сканировании нескольких ионов. Данный эффект можно до некоторой степени свести к минимуму, разделив хроматограмму на меньшие окна и используя меньшие панели ионов, специфичных для анализируемых веществ, элюирующих в этих окнах.

Количественное определение. Сложно проводить количественные определения с использованием абсолютных ответов МС. Это связано с большим количеством факторов, влияющих на абсолютный отклик МС, таких как чистота источника ионов, ионная оптика и коллизионная ячейка, подавление ионов, скорости потока источника ионов, давление коллизионной ячейки и предельный вакуум МС. Трудно контролировать перечисленные факторы, и, как следствие, результаты могут быть подвержены значительным ежедневным колебаниям.

Для получения надежных и точных количественных результатов обычно требуются внутренние стандарты. Стабильные изотопные версии анализируемого вещества являются идеальными внутренними стандартами, поскольку они имеют почти идентичные химические свойства, но их легко отличить во время МС. Кроме того, они исправляют любые потери или неэффективность в процессе подготовки образцов и с поправкой на подавление ионов. Данный метод называется разбавлением стабильных изотопов и способен обеспечить очень точные и точные анализы (рис. 11). По этим причинам анализы ВЭЖХ-МС с разбавлением стабильных изотопов часто используются в качестве эталонных методов.

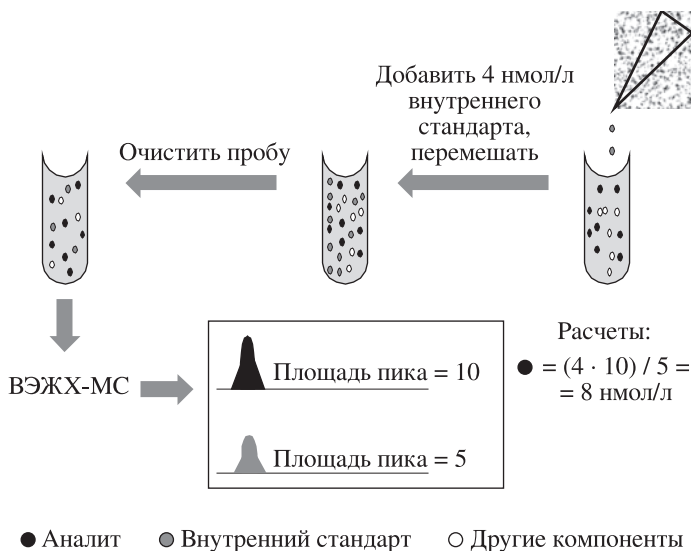


Рис. 11. Принцип разбавления стабильных изотопов

В начале анализа добавляют 4 мл внутреннего стандарта, фиксируя соотношение внутреннего стандарта : аналит (в данном случае 1 : 2). Аналит и внутренний стандарт теряются на последующих этапах очистки пробы, но соотношение остается прежним.

Из рис. 11 следует, что количественное определение без калибровки возможно при знании количества добавленного внутреннего стандарта. Однако этот подход основан на том, что внутренний стандарт стабильного изотопа абсолютно чист. Для получения точных результатов по-прежнему требуются калибровочные кривые, отображающие соотношение аналит : внутренний стандарт в зависимости от концентрации аналита.

Оптимизация способа. При настройке анализа ВЭЖХ-МС необходимо учитывать и оптимизировать значительное количество условий и параметров. Фактические условия сильно зависят от температуры анализируемого вещества и разделения ВЭЖХ, что затрудняет определение общих условий. Каждый анализируемый элемент требует индивидуальной оптимизации. Хотя опубликованные методы являются ценной отправной точкой, эффективность анализа и оптимальные условия могут существенно различаться в зависимости от инструментов и матриц образцов. Чувствительность сильно зависит от прибора и условий анализа.

Производители приборов постоянно совершенствуют чувствительность своих масс-спектрометров и предлагают широкий ассортимент моделей с различной чувствительностью. Именно поэтому важно оценить, обладает ли прибор необходимой чувствительностью для достижения желаемых пределов обнаружения.

Природа анализируемого вещества в значительной степени определяет оптимальный метод ионизации и используемую полярность. Обнаружение некоторых аналитов также может быть улучшено путем дериватизации. Например, свободные стероиды дают относительно слабые ответы при использовании ESI, потому что им не хватает функциональной группы, способной переносить заряд. Кето-группа кето-стероидов, таких как 17 α -гидроксипрогестерон, может быть получена с помощью групп, которые дают гораздо более высокую реакцию при электрораспылении, что приводит к более низким пределам обнаружения.

Параметры источника ионов и энергия столкновения могут быть оптимизированы во время непрерывной инфузии разбавленного раствора анализируемого вещества, предпочтительно в той же подвижной фазе, что используется в разделении ВЭЖХ. Выбор фрагмента иона для мо-

ниторинга требует некоторого размышления, поскольку наиболее распространенный фрагмент не всегда лучший выбор. Если встречаются другие значительные фрагменты ионов, рекомендуется также оценить их, поскольку они могут фактически обеспечить более чистые хроматограммы с улучшенным соотношением сигнал/шум. Также желательно контролировать второй фрагмент иона, чтобы проверить наличие возможных помех. Если присутствует интерференция, соотношение двух фрагментных ионов отличается от стандартного.

Некоторые аспекты оптимизации метода проиллюстрированы на рис. 12 через измерение метилмалоната в тканях мышц. Образцы были дериватизированы бутилированием для повышения чувствительности.

Дериватизация с образованием бутиловых эфиров использовалась для улучшения чувствительности. Некоторая аддукция аммония ($248\ m/z$) из буфера с ацетатом аммония, используемого для разделения ВЭЖХ-МС, обнаружилась с помощью одной МС (рис. 12, а). При этом $M + H^+$ ($231\ m/z$) был наиболее распространенным ионом и использовался для тандемного МС. Затем напряжения источника ионов и энергия столкновения были оптимизированы для получения фрагмента иона $119\ m/z$ в спектре ионов продукта (рис. 12, б). Второй MRM для метилмалоната ($231 > 175$) также проводился в качестве проверки на наличие помех (рис. 12, в).

Соотношение ответов $231 > 119$ и $231 > 175$ MRM для пика метилмалоната на 9,46 мин было аналогичным спектру ионов продукта, тогда как такое же соотношение для пика сукцината на 9,23 мин было совершенно иным. Небольшой пик при 9,23 мин обусловлен сукцинатом, изомером метилмалоната.

Ранняя часть хроматограмм с обратной фазой часто содержит большое количество солей и других потенциальных загрязняющих веществ. Отвод этой части хроматограммы в «шумы» может быть полезен для минимизации загрязнения источника ионов при анализе загрязненных образцов. При использовании высокоспецифичного целенаправленного анализа, такого как MRM, присутствие этих и других компонентов в образце обычно не очевидно, поскольку хроматограммы часто содержат один хорошо разрешенный пик с минимальным фоновым шумом. Это может заставить аналитика думать, что образцы чище, чем они есть на самом деле. Фактически же возможно значительное элюирование материала совместно с веществом, представляющим интерес, что приводит к подавлению ионов и плохим пределам обнаружения.

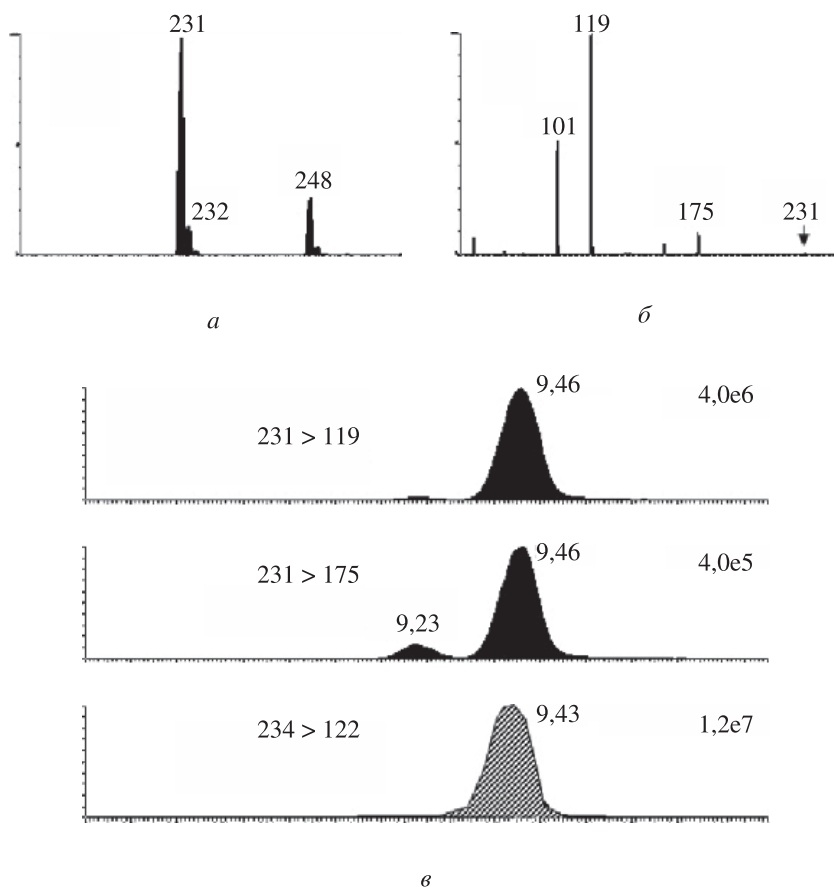


Рис. 12. Пример ВЭЖХ-МС анализа метилмалоната из почки мыши: а – однократный масс-спектр метилмалоната ($M + H^+ = 231$) в буфере с ацетатом аммония; б – тандемный масс-спектр метилмалоната; в – хроматограммы мониторинга множественных реакций (MRM) метилмалоната ($231 > 119$ и $231 > 175$) и внутреннего стандарта, 2Н3-метилмалоната ($234 > 122$)

Подавление ионов может быть оценено путем сравнения абсолютных характеристик внутреннего стандарта в стандартах и образцах. Если реакция в образцах намного ниже, это указывает на значительное подавление, и может возникнуть необходимость изменить пробоподготовку или метод хроматографии, чтобы свести к минимуму совместное вымывание подавляющих факторов. Хотя подавление ионов может отрицатель-

но влиять на конечный предел обнаружения анализа, все же возможно получить приемлемые количественные данные при условии использования подходящих внутренних стандартов стабильных изотопов и наличия достаточного сигнала.

Другое предположение заключается в том, какую следует использовать МС: одиночную или tandemную. Tandemная МС фактически приводит к уменьшению абсолютного сигнала из-за потерь в ячейке столкновения и того факта, что сигнал может быть распределен по нескольким фрагментам. Преимущество tandemной МС – очень высокая специфичность, т. е. химический шум значительно снижается, а отношение сигнал/шум, как правило, превосходит единичные МС, несмотря на уменьшение сигнала. Однако, если наблюдается значительное снижение сигнала из-за того, что анализируемый фрагмент плохо фрагментируется или образуется много фрагментов низкой интенсивности, отношение сигнал/шум в tandemе МС может быть ниже, чем в одиночном.

Мониторинг производительности. На текущую производительность систем ВЭЖХ-МС влияют многие факторы. Следует иметь протоколы для обнаружения отклонения от нормальной производительности. Мониторинг абсолютного отклика, формы пика и времени удержания внутренних стандартов – это простой способ проверки чувствительности масс-спектрометра и целостности ВЭЖХ-системы. Применение формальных правил контроля качества к внутреннему стандартному отклику может быть непрактичным из-за больших ежедневных колебаний абсолютного отклика МС, но важно визуально проверять графики отклика, чтобы обнаружить снижение чувствительности, которое может указывать на необходимость очистки источника ионов или ионной оптики.

Еще один способ обнаружения проблем с отдельными образцами – проверка внутреннего стандартного отклика каждого образца в партии. Чистота реагентов и растворителей оказывает значительное влияние на качество результатов и должна оцениваться при оптимизации метода и при использовании различных источников. Пластиковая посуда (например, пробирки для первичных проб, пластины для микротитрования), используемая в любом месте аналитического процесса, – также потенциальный источник помех.

Несмотря на то что производительность и надежность систем ВЭЖХ-МС улучшаются, они по-прежнему требуют большего внимания, чем обычные системы ВЭЖХ. Кроме того, эксплуатация и техническое обслуживание систем ВЭЖХ-МС предполагают относительно высококвалифицированный персонал.

Контрольные вопросы

1. Каким образом проводится количественное определение содержания вещества в ходе ВЭЖХ-МС?
2. Для чего проводится оптимизация метода ВЭЖХ-МС?
3. Что включает мониторинг производительности системы ВЭЖХ-МС?

2.6. Пример разработки методики ВЭЖХ-МС для скрининга фармакологически значимых растительных индольных алкалоидов

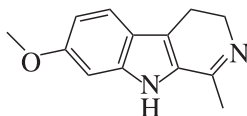
Рассмотрим пример создания методики ВЭЖХ-МС по исследованию вторичных метаболитов. Важно отметить, что каждая методика ВЭЖХ-МС разрабатывается индивидуально с учетом имеющегося оборудования, реактивов, химических особенностей исследуемой группы метаболитов, объекта. В большинстве случаев имеются ранее апробированные подходы к ВЭЖХ-МС для этой же или родственной группы метаболитов, тем не менее обычно требуется корректировка метода под имеющиеся условия. При этом доступные успешно апробированные методики можно взять за основу и адаптировать под собственные цели и возможности. При создании новых методов ВЭЖХ с различными детекторами крайне важен этап валидации.

Исследование, которое рассматривается ниже, было посвящено созданию метода УВЭЖХ-МС/МС для скрининга фармакологически значимых растительных индольных алкалоидов (Д. Тарковска (D. Tarkowská), 2020).

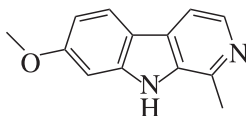
В исследовании применяли УВЭЖХ в сочетании с тандемной МС. Преимущества УВЭЖХ по сравнению со стандартной ВЭЖХ – значительная экономия растворителя и повышение пропускной способности прибора, в результате чего уменьшается время анализа каждой отдельной пробы.

Был разработан быстрый и надежный метод экстракции, предварительного концентрирования и определения четырех алкалоидов с индольным скелетом – гармина, гармалина, йохимбина и аджмалицина, с помощью сверхвысокой производительности УВЭЖХ в сочетании с тандемной МС. Указанные алкалоиды относятся к группе монотерпеновых индольных алкалоидов (МИА). Соответственно, данный метод при соблюдении тех же условий может быть использован и в анализе иных

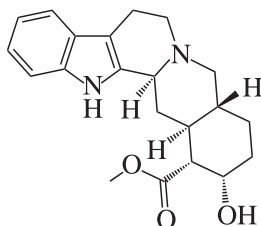
алкалоидов той же группы. Применимость метода была продемонстрирована для тканей растений *Nicotiana tabacum* и *Tribulus terrestris*, семян *Peganum harmala* и экстракта из коры *Pausinystalia johimbe*.



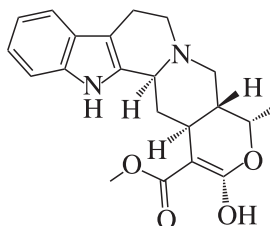
Гармалин



Гармин



Йохимбин



Аджмалицин

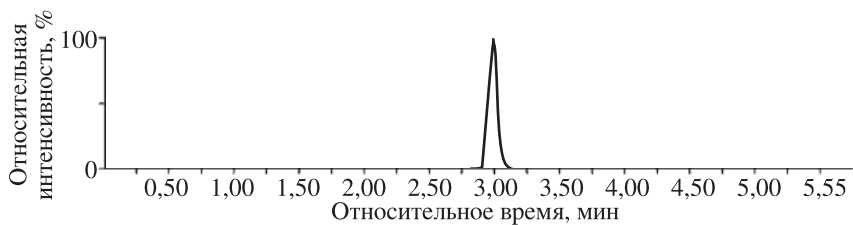
Важный этап любого аналитического метода – выделение и очистка целевой группы метаболитов из исходного сырья. Процедура экстракции и очистки была разработана с учетом как относительно гидрофобного (индольное кольцо), так и щелочного характера изучаемых соединений (их константа диссоциации (pK_a) находится в диапазоне от 6,31 у аджмалицина до 9,55 у гармалина). Вещества экстрагировали из растительного материала с использованием 60%-го метанола (приемлемый растворитель для относительно гидрофобных веществ), содержащего 0,25%-й аммиак (щелочная добавка).

Для очистки неочищенных экстрактов, содержащих МИА, использовали сорбент для смешанной твердофазной экстракции (СТЭ) Bond Elut Plexa PCX, обладающий катионообменными свойствами, для эффективного удержания МИА на сорбенте, в то время как вещества с кислотными свойствами и нейтральные вещества удалялись из образцов вытяжек. Ионообменная группа используемого катионообменного сорбента СТЭ была связана с полимерной матрицей, обеспечивая ее стабильность в широком диапазоне pH (1–14) и предназначалась для веществ с pK_a 6–10, что соответствовало диапазону констант диссоциации интересующих веществ.

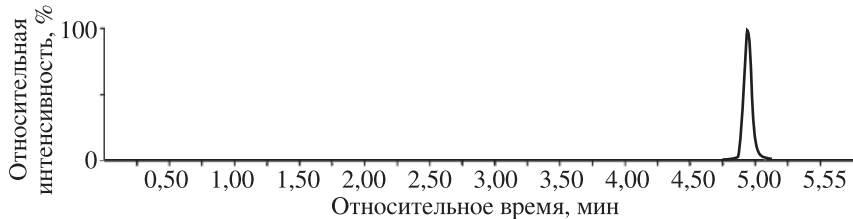
Поскольку выбранный экстракционный растворитель содержал основание (аммиак), было необходимо удалить его из образца путем выпаривания до полного высыхания перед нанесением образца на катионообменный СТЭ, так как удержание основания происходит на катионообменной смоле в кислой среде, где функциональные группы сорбента заряжены отрицательно и анализируемые вещества заряжены положительно. Чтобы создать кислую среду после выпаривания до высыхания, для загрузки образцов, содержащих МИА, был выбран раствор, содержащий 60%-й метанол с 2%-й муравьиной кислотой. После удерживания основных веществ гидрофобные интерференты удаляли из сорбента промывкой 100%-м метанолом, в то время как кислотные и нейтральные вещества пропускали через колонку без удерживания. Для элюирования основных веществ, в том числе исследуемых алкалоидов, был выбран элюирующий раствор, содержащий 60%-й метанол с добавлением 5%-го аммиака. При использовании процедуры экстракции и очистки были обнаружены следующие значения извлечения для четырех стандартов контролируемых алкалоидов из сорбента РСХ: гармин – 87,86 %; гармалин – 51,13 %; йохимбин – 80,55 % и аджмалицин – 68,38 %.

Анализ МИА методом ВЭЖХ-МС. Для ВЭЖХ-разделения четырех интересующих МИА были протестированы две колонки с обращенной фазой: колонка для УВЭЖХ с сорбентом, содержащим фенилгексильную группу, которая избирательно удерживает полиароматические соединения посредством π - π взаимодействий (Acquity UPLC Phenyl-Hexil® CSH™, 2,1 × 50 мм, 1,7 мкм), и колонку УВЭЖХ с частицами C18, изготовленную по технологии, обеспечивающей удовлетворительную форму пика для основных соединений в условиях подвижной фазы со слабой ионной силой (Acquity UPLC® CSH™, 2,1 × 50 мм, 1,7 мкм). Эффективность ионизации и форма пика были признаны удовлетворительными, когда в качестве компонентов подвижной фазы использовали ацетонитрил (растворитель А) и 10мМ-й раствор ацетата аммония. В этих условиях время удерживания было удовлетворительным и на колонке CSH составляло от 2,15 (гармалин) до 5,38 мин (аджмалицин) и от 2,24 до 4,97 мин на колонке фенилгексил CSH (рис. 13).

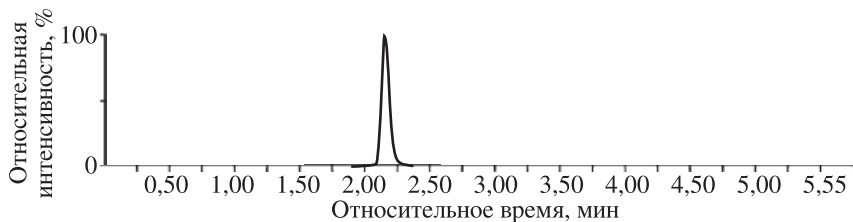
Анализ экстрактов индольных алкалоидов методом УВЭЖХ-МС/МС. Для количественного определения МИА использовалась система Acquity UPLCTM (Waters), состоящая из модулей управления бинарными растворителями и образцами, соединенных с трехступенчатым квадрупольным масс-спектрометром Xevo® TQ MS (Waters MS Technologies),



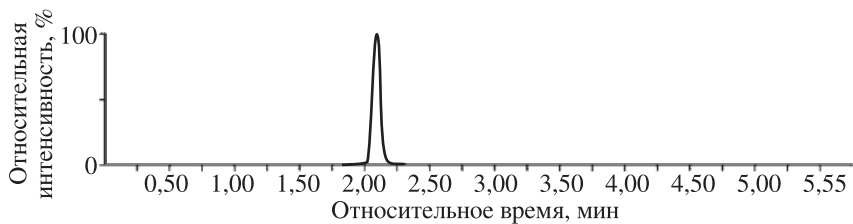
a



б



в



г

Рис. 13. Профили УВЭЖХ-МС/МС используемых МИА,
применяемых в качестве стандартов (колонка CSH Phenyl–Hexyl;
подвижная фаза – ацетонитрил, 10 мМ ацетат аммония; pH 10,0):
a – йохимбин (355,02 > 143,82); *б* – аджмалицин (352,94 > 144,07);
в – гармин (212,94 > 198,00); *г* – гармалин (214,89 > 199,89)

Источники: *Tarkowska D.* A Fast and Reliable UHPLC–MS/MS-Based Method
for Screening Selected Pharmacologically Significant Natural Plant Indole
Alkaloids // *Molecul.* 2020. Vol. 25, 3274. DOI: 10.3390/molecules25143274

оснащенным интерфейсом ESI и коллизионной ячейкой Scan Wave. Вся система УВЭЖХ-МС/МС контролировалась программным обеспечением Masslynx™ (версия 4.1). После очистки картриджами PCX СПЭ высушенные образцы восстанавливали в 50 мкл 100%-го метанола. Затем по 2 мкл каждого образца вводили в колонку УВЭЖХ с обращенной фазой (Phenyl-Hexil Acquity CSH, 2,1 × 50 мм, 1,7 мкм, 130 Å; Waters), подключенную к ЭСИ-МС/МС; МИА анализировали в режиме положительных ионов как $[M + H]^+$. Представляющие интерес МИА отделяли (см. рис. 13) линейным градиентом ацетонитрила (А) и 10 мМ ацетата аммония, рН 10,0, скорректированным водным раствором аммиака (Б) при скорости потока 0,3 мл/мин, 0–1 мин, 30 : 70 (А : В) – 15 мин, 100 : 0 (А:В) – 15–16 мин, 100 : 0 (А:В). В этих условиях представляющие интерес вещества элюировались в течение 5 мин.

Далее колонку промывали 100%-м ацетонитрилом в течение 1,5 мин и восстанавливали равновесие до исходных условий (30 : 70 А:В) в течение 1,5 мин. Термостат колонки был запрограммирован на 40 °С, а температура внутри автосамплера поддерживалась на уровне 4 °С. Капиллярное напряжение, напряжение конуса, энергия ячейки столкновения и температуры источника ионов были оптимизированы для каждого отдельного соединения с использованием одной и той же установки. Настройки масс-спектрометра были следующими: напряжение на капилляре 0,5 кВ; напряжение на конусе 40 В; температура источника 100 °С; температура газа для десольвации 350 °С; расход газа на конусе 70 л/ч, расход газа для десольвации (азот) 500 л/ч; расход ударного газа (аргон) 0,15 л/ч. Время задержки каждого канала MRM было рассчитано таким образом, чтобы обеспечить 16 точек сканирования на пик с межканальной задержкой 0,1.

Однако две важные хроматографические характеристики ухудшились при разделении на колонке CSH по сравнению с колонкой фенилгексил CSH. Разрешение критической пары гармина и гармалина значительно снизилось с 90 до 70 %, а средняя ширина всех пиков увеличилась на 27 % на колонке CSH по сравнению с фенилгексильным аналогом (наибольшая разница в ширине пика была обнаружена для гармалина – 36 %). По этим причинам фенилгексильная колонка была выбрана для дальнейшей оптимизации разделения МИА. При оптимизации кислотности подвижной фазы готовили 10мМ-й раствор ацетата аммония, доведенный до различных уровней рН. При рН ниже 8,0, когда все анализируемые вещества были положительно заряжены, наблюдалось значительное

увеличение ширины пика. В частности, ширина пика гармалина была на 25 % больше при использовании 10 мМ ацетата аммония с рН 7,0, чем у той же подвижной фазы, скорректированной до рН 8,6. Более того, при рН 7,0–8,6 для этого соединения наблюдался большой пиковый хвост. Симметрия этого пика была достигнута путем увеличения рН подвижной фазы до значения 10,0. Такое поведение могло быть связано с константой диссоциации гармалина, которая была самой высокой из всех контролируемых, составляя 9,55. Следовательно, для успешного разделения данных основных веществ на этом типе неподвижной фазы необходимо было регулировать рН подвижной фазы таким образом, чтобы разделяемые вещества были в нейтральной форме.

Валидация метода. Характеристики валидации метода оценивались с использованием международных руководящих принципов. Были проведены следующие исследования эффективности, чтобы доказать пригодность разработанного метода для рутинного анализа отдельных МИА в биологических образцах: калибровка и линейность, предел обнаружения и предел количественного определения, аналитическая точность, прецизионность и матричный эффект.

Калибровка метода и калибровочные кривые линейности создавались путем приготовления растворов, содержащих различные количества каждого немеченого МИА и известное фиксированное количество метил-13С, D3-йохимбина в качестве внутреннего стандарта в диапазоне концентраций от 5 до 100 пМ/2 мкл инъекции. Четыре отдельные пробы тестировали для получения результирующих калибровочных кривых, которые были линейными в выбранном диапазоне концентраций для всех четырех исследованных соединений МИА (коэффициент корреляции, R², полученные значения находились в диапазоне от 0,9910 до 0,9985; табл. 3).

Предел обнаружения и количественное определение. Предел обнаружения (LOD) оценивался с использованием подхода, основанного на стандартном отклонении (sb) калибровочной кривой и ее наклоне и кривой регрессии k ($LOD = 3 \cdot sb/k$). Предел количественного определения (LOQ) оценивали с использованием подхода отношения стандартного отклонения/наклона ($LOQ = 10 \cdot sb/k$). В табл. 3 обобщены LOD и LOQ для МИА. Самый низкий LOD/LOQ был обнаружен для йохимбина (0,01/0,05 пг), в то время как алкалоид с основными свойствами гармалин показал самые высокие значения LOD/LOQ (0,31/1,04 пг).

Таблица 3

Показатели валидации предложенного метода

Соединение	Время удерживания (мин)	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент корреляции R_2	LOD (нг)	LOQ (нг)	Динамический концентрационный диапазон (пмоль)
Гармалин	$2,13 \pm 0,01$	$\log y = 0,9707(\log x) - 0,9819$	0,9958	0,31	1,04	5–100
Гармин	$2,16 \pm 0,01$	$\log y = 0,7374(\log x) - 0,2451$	0,9935	0,18	0,60	5–100
Йохимбин	$2,98 \pm 0,01$	$\log y = 1,0147(\log x) - 0,3091$	0,9910	0,01	0,05	5–100
Аджмалицин	$4,94 \pm 0,01$	$\log y = 0,8678(\log x) - 0,2006$	0,9985	0,11	0,36	5–100

Аналитическая точность. Аналитическая точность разрабатываемого метода УВЭЖХ-ЭСИ-МС/МС для определения избранных МИА оценивалась стандартным методом добавления с использованием двух наборов образцов: очищенных экстрактов ткани *Nicotiana tabacum* (5 мг свежего веса 9-го листа – в 1 мл экстракционного раствора, шесть повторов) с добавлением 125 и 250 пМ аутентичных стандартов МИА перед одноэтапной очисткой образца с помощью СТЭ. Концентрацию каждого анализируемого вещества рассчитывали с использованием стандартного метода изотопного разбавления для каждого растительного экстракта, добавленного перед экстракцией, и сравнивали с концентрацией соответствующего стандартного раствора. Значения аналитической точности варьировали от 97,7 до 102,0 % от истинного количества. Аналитическая точность была определена в диапазоне от 1,5 до 3,5 %.

Матричный эффект (МЭ). Является известным фактором в МС-анализе образцов биологического происхождения, который вызывает изменения эффективности ионизации анализируемого вещества в источнике

ионов из-за наличия сопутствующих веществ, находящихся в биологической матрице образца. Матричный эффект, иногда называемый неспектральными интерференциями, представляет собой ряд явлений, вызывающих изменения сигнала в зависимости от качественного и количественного состава анализируемой пробы, а также дрейф сигнала во времени. Данный эффект может проявляться на всех этапах анализа, начиная с распыления пробы и заканчивая прохождением системы ионной оптики.

Матричный эффект проявляется в обнаружении меньшего количества анализируемых веществ, чем это имеет место на самом деле, что существенно влияет на результаты количественного анализа. Отметим, что МЭ имеет большое значение, особенно при определении веществ, встречающихся в следовых количествах, но он также наблюдается для более распространенных веществ, которые относятся к группе вторичных метаболитов растений, включая вещества алкалоидного характера. Целью данного этапа валидации было вычислить оптимальную массу биологического материала (растительной ткани) для определения этих веществ, т. е. выяснить, какое оптимальное количество ткани приводит к максимальному отклику отдельных МИА при анализе ВЭЖХ-МС, на которые будут в минимальной степени влиять побочные вещества из матрицы (экстракта). Анализ был проведен на коммерчески доступном экстракте *Pausinystalia yohimbe*, для которого доказано присутствие МИА, особенно йохимбина и аджмалицина. Образцы были извлечены и очищены с использованием одноэтапной процедуры на основе СТЭ. Затем присутствие йохимбина и аджмалицина было подтверждено анализом с использованием разработанного метода УВЭЖХ-МС/МС, при этом также был обнаружен гармин. Гармалин в этой растительной ткани обнаружен не был. Самая высокая концентрация всех контролируемых веществ была обнаружена для йохимбина, его содержание было на уровне мкг/мг сухого веса, в то время как два других обнаруженных алкалоида присутствовали на уровне пг/мг сухого веса, что примерно в тысячу раз меньше.

Влияние матрицы на уровень алкалоидов наблюдалось для гармина и йохимбина, где их количество уменьшалось с увеличением массы образца. Однако для аджмалицина тенденция была противоположной. Уровень стабильного изотопно меченного йохимбина варьировал от 67,62 % на 5 мг суточной массы биологического образца до 50,53 % на 15 мг, что четко представляло МЭ.

Матричный эффект может быть дополнительно показан в виде матричного коэффициента – величины, рассчитанной как отношение площади пика для каждого анализируемого вещества в присутствии ионов растительной матрицы и площади пика в отсутствие матрицы, умноженного на 100. Для изучения этого эффекта, характерного для образцов биологического происхождения, стандартную смесь МИА (125 пмоль каждый) добавляли к чистому экстракционному растворителю (60%-й водный метанол, содержащий 0,25 % аммиака) и к экстрактам свежей ткани *Nicotiana tabacum* (9-й лист) весом 5, 10 и 15 мг сырой массы после процесса СТЭ.

Исследования показывают, что самый сильный МЭ можно наблюдать для образцов с 15 мг сырой массы (среднее значение матричного коэффициента $\approx 61,1 \%$), в то время как для образцов с 5 мг сырой массы МЭ был на треть ниже (матричный коэффициент $\approx 81,1 \%$).

Контрольные вопросы

1. Исходя из каких соображений разрабатывали процедуру экстракции МИА из растительного сырья?
2. Анализ каких характеристик включает валидация описанного выше метода?
3. В чем заключается матричный эффект?

2.7. Обработка данных и интерпретация результатов анализа метаболитов.

Применение баз данных в исследовании вторичных метаболитов

Первый этап анализа результатов состоит из обработки исходных данных, объединения данных нескольких измерений и поиска отличий между группами данных. Этап интерпретации обработанных данных включает в себя идентификацию метаболитов и, в случае постановки соответствующей цели, – выявление метаболических путей, участвующих в различных механизмах регуляции клетки.

Поскольку в настоящее время биохимические исследования вторичных метаболитов обязательно включают этапы разделения и идентификации, то важно затронуть вопрос обработки и интерпретации данных, полученных в ходе ВЭЖХ (ГХ) с детекторами, в частности МС. Результаты анализа МС как метаболитов, так и метаболома в целом представляют со-

бой файлы с набором данных. Один файл с данными анализа ВЭЖХ-МС является коллекцией последовательно записанных гистограмм, каждая из которых представляет наборы сигналов от ионизированных молекул на детекторе за небольшой промежуток времени. Гистограмма состоит из набора m/z значений и интенсивности соответствующих сигналов. Основная цель обработки данных состоит в преобразовании исходных данных в файлы в таком представлении, которое облегчает доступ к характеристикам каждого наблюдаемого иона. Эти характеристики включают m/z – время удерживания иона и интенсивность сигнала в каждый момент времени. Затем приступают к процессу обработки данных, состоящему из нескольких этапов: фильтрации шума, обнаружения пиков соответствующих ионам метаболитов, выравнивания ионных хроматограмм и нормализации спектров. Далее проводят статистический сравнительный анализ обработанных данных разных групп образцов (рис. 14).

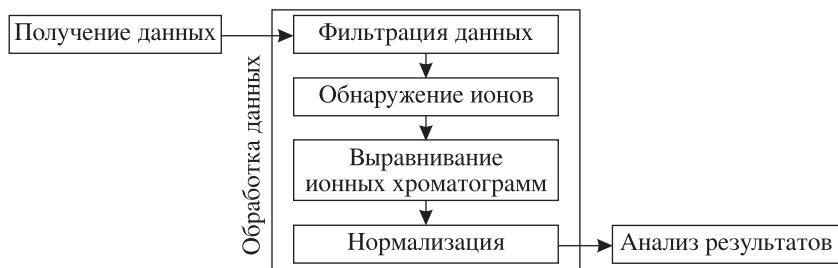


Рис. 14. Алгоритм обработки масс-спектрометрических данных

В современной биохимии анализ данных предполагает изучение сведений, ранее полученных другими авторами для тех же или родственных соединений. Эту информацию предоставляют общедоступные базы данных. Как правило, они содержат большое количество инструментов, позволяющих не только расшифровать полученные результаты, но и, например, построить карты биосинтетических путей, выявить семантические связи, что делает их незаменимыми инструментами в биохимических исследованиях.

Перечислим наиболее востребованные базы данных, полезные для анализа вторичных метаболитов:

- KEGG, BioСус – универсальные биохимические базы данных (общие), содержат информацию о биохимических путях, ферментах, метаболитах этих путей (точная информация и структура);

- LipidMaps, SphinGOMAP, Lipid Bank – базы данных для анализа липидома, являются более специализированными;

- PubChem, CAS – общие химические базы данных, содержат большой объем информации о химии метаболитов всех классов и служат очень важными инструментами в биохимических исследованиях;

- базы данных для определения химической структуры неизвестных соединений: Merck Index – для обнаружения неизвестных загрязнителей воды; база данных метаболома Голма (GMD) – содержит информацию о масс-спектрах, индексах удержания метаболитов (MSRI) и ГХ-МС метаболитические профили образцов растений; METLIN – предоставляет данные о метаболитах и ссылки на общие химические базы данных, МС/МС спектры, полученные в различных условиях ионизации, и ЖХ-МС профили метаболитов в образцах плазмы и мочи человека; база данных метаболитов человека HMDB, KEGG и BioCyc – содержат информацию о биохимических путях и метаболитах, участвующих в этих путях.

Каждая из приведенных баз данных используется для расшифровки и/или интерпретации тех или иных сведений, полученных в ходе биохимического исследования. Использование баз данных позволяет визуализировать метаболитические пути, их взаимосвязь, ферменты, катализирующие реакции и получить подробную информацию о каждом элементе метаболитического пути, включая точную массу метаболита и его структуру.

Контрольные вопросы

1. Из каких этапов состоит обработка масс-спектрометрических данных?
2. Каким образом в исследованиях вторичных метаболитов используются универсальные и химические базы данных?

2.8. База данных PubChem

База данных PubChem является общедоступным хранилищем информации о химических веществах и их биологической активности (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). С момента запуска в 2004 г. в качестве компонента Карты молекулярных библиотек (Molecular Libraries Roadmap Initiatives) Национального института здравоохранения США (NIH) PubChem быстро превратился в ключевой информационный ресурс по химии, который используется научными сообществами во мно-

гих областях, таких как химинформатика, химическая биология, медицинская химия и открытие лекарств.

Данные PubChem предоставлены более чем 350 организациями, включая университетские лаборатории, правительственные учреждения, фармацевтические компании, поставщиков химических веществ, издателей и ряд ресурсов по химической биологии. Сведения, предоставленные этими авторами, охватывают не только малые молекулы, но также миРНК (малые интерферирующие РНК), микроРНК, углеводы, липиды, пептиды, химически модифицированные макромолекулы и др. Также здесь собрана информация о химических структурах, идентификаторах, химических и физических свойствах, биологической активности, патентах, данных о здоровье, безопасности, токсичности и др.

Ссылки на патентную информацию указываются благодаря данным, представленным растущим числом организаций, включая IBM и SureChEMBL (ранее известный как SureChem). В результате PubChem предлагает ссылки примерно на 6 млн патентных документов и более чем 16 млн уникальных химических структур, при этом более 329 млн ссылок на описание химических веществ и патенты включают патентные документы США, Европы и Всемирной организации интеллектуальной собственности, опубликованные с 1800 г.

Таким образом, рассматриваемая база данных содержит один из самых больших массивов общедоступной химической информации. По состоянию на сентябрь 2015 г. в ней содержится более 157 млн описаний химических веществ, 60 млн уникальных химических структур и 1 млн описаний биологических методов, около 10 тыс. уникальных последовательностей белков-мишеней. Этот огромный объем информации в PubChem систематизирован в трех взаимосвязанных базах данных:

- 1) вещество (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>);
- 2) соединение (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>);
- 3) биологический анализ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcassay>).

База данных по веществам хранит информацию, предоставленную вкладчиком, из которой извлекаются уникальные химические структуры и сохраняются в базе данных соединений. База данных методик хранит описания биологических методов исследования химических веществ. Основными идентификаторами для баз данных веществ, соединений и биологических методов являются SID (SubstanceID), CID (CompoundID) и AID (AssayID) соответственно.

В дополнение к текстовому поиску через Entrez, PubChem также позволяет пользователям выполнять различные нетекстовые поисковые запросы (поиск идентификационных данных, молекулярных формул, субструктуры/суперструктуры, 2-D- и 3-D-поиск сходства) с помощью инструмента поиска химической структуры.

Для повышения эффективности работы с данными PubChem предоставляет различные инструменты и услуги. Многие из них используют понятие молекулярного сходства. Несмотря на широкое применение, основанные на «отпечатках пальцев» методы 2-D-подобия часто не позволяют обнаружить структурное сходство между молекулами с аналогичной биологической активностью, что можно легко сделать с помощью методов анализа 3-D-подобия. PubChem3D – это расширение для PubChem, которое предоставляет пользователям 3-D-альтернативу существующим инструментам и сервисам 2-D-подобия.

Стандартизация в PubChem – это проверка и определение уникальной химической структуры, используемая для описания соединения на основе одной или нескольких представленных записей о веществах, и нормализация информации о химических свойствах соединения. Стандартизация является частью конвейера загрузки PubChem для отправленных записей с допустимыми химическими структурами, что позволяет отображать на одной странице всю представленную информацию о соединении (например, для аспирина она включает сведения из многих записей о веществах, входящих в его структуру, и т. д.).

Для текстового поиска используется инструмент Entrez: поиск запускается с домашней страницы PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), который также предоставляет точки запуска для различных сервисов, инструментов, справочных документов и др. В качестве альтернативы можно начать поиск с домашней страницы NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). По умолчанию, если конкретная база данных не выбрана в меню поиска, Entrez выполняет поиск по всем доступным базам данных Entrez и перечисляет количество записей в каждой из них. Выбрав одну из трех баз данных PubChem, можно увидеть результат запроса, специфичный для конкретной базы данных. Если поиск Entrez возвращает несколько записей, они отображаются в отчете сводки документов (DocSum).

Если поиск по составной базе данных возвращает одну запись, отображается страница сводки по этой записи. Страница «Сводная информа-

ция о соединениях» предоставляет обобщение всей известной информации о конкретном химическом веществе из различных источников. Если поиск по базе данных веществ дает информацию по одному соединению, отображается страница «Сводки по веществу», на которой отображается информация, предоставленная автором данных для этой записи.

Поскольку Entrez является прежде всего текстовой поисковой системой, ее нельзя использовать для поиска, связанного с типами данных, специфичными для PubChem, такими как химические структуры. Инструмент поиска химической структуры позволяет запрашивать и подмножествовать базу данных соединений, используя различные типы поиска химической структуры, включая поиск идентичности, подструктуры/суперструктуры, молекулярной формулы и 2-D- и 3-D-подобия.

В поиске 2-D-подобия сходство между химическими структурами определяется количественно с использованием уравнения коэффициента (индекса) Танимото (также применяется для определения степени подобия двух множеств) в сочетании с «молекулярным отпечатком пальца» субструктуры PubChem. В трехмерном поиске сходства форма Танимото (ST) и цвет-Танимото (СТ) используются для оценки сходства между конформерами в трехмерной форме и ориентации функциональной группы соответственно. Две трехмерные меры подобия (ST и СТ) рассчитываются с использованием метода наложения гауссовой формы Гранта и Пикапа, реализованного в программе быстрого наложения химических структур (ROCS).

Трехмерный поиск подобия реализован как часть проекта PubChem3D (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/release3d.html>), который представляет собой информационный ресурс на основе теоретических трехмерных структур молекул, содержащихся в базе данных соединений. PubChem генерирует трехмерную модель конформера для каждого соединения в базе, если соединение удовлетворяет следующим условиям: не слишком большое и не слишком гибкое ($c \leq 50$ неводородными атомами и ≤ 15 вращающимися связями), имеет только одну ковалентную единицу (т. е. не является солью или смесью), состоит только из элементов H, C, N, O, F, Si, P, S, Cl, Br и I, содержит только типы атомов, поддерживаемые Молекулярным силовым полем Merck (MMFF94s), имеет пять или меньше неопределенных стереоцентров. Около 90 % соединений в PubChem удовлетворяют этим условиям и имеют сгенерированные с помощью вычислений модели, которые содержат до 500 конформеров для каждого соединения.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные области использования базы данных PubChem.
2. Наличие каких инструментов делает базу данных PubChem крайне эффективной в анализе результатов биохимических исследований?

2.9. База данных GOLM

База данных метаболома Голма (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/search.aspx>) облегчает поиск и распространение эталонных масс-спектров биологически активных метаболитов, количественно определенных с помощью ГХ-МС. Исследования профилирования методом ГХ-МС, направленные на идентификацию соединений из сложных биологических смесей, зависят от сравнения наблюдаемых масс-спектров и времени удерживания с эталонными библиотеками, такими как GMD. Она включает масс-спектры и индексы времени удерживания чистых эталонных веществ и часто наблюдаемые масс-спектральные метки (MST – масс-спектр, связанный с хроматографическим удерживанием) еще не идентифицированных метаболитов.

Отметим, что GMD включает количественные данные об изменениях размера пула метаболитов и представляет собой систему хранения данных, обеспечивающую доступ к вычислительным методам, основанным на результатах анализа.

Таким образом, GMD облегчает ортогональное профилирование метаболитов, т. е. профилирование одного метаболита в нескольких экспериментальных условиях или профилирование всех метаболитов в рамках одной экспериментальной установки. Используя этот уникальный набор данных в качестве эталона, GMD классифицирует неизвестные метаболитические признаки в отношении видов и экспериментальных факторов.

Эксперимент по профилированию метаболитов можно считать междисциплинарным, включающим области биологических, аналитических и хемоинформационных знаний. Биолога обычно интересует фактический метаболит, который является исследуемым биологически активным веществом и который также относится к метаболитическим путям или сигнальным явлениям. Однако для проведения профилирующего анализа ГХ-МС экстракты полярных метаболитов должны быть химически преобразованы, т. е. дериватизированы в менее полярные и летучие соединения, так называемые анализируемые вещества. Для

этой цели можно использовать N-метил-N-триметилсилилтрифторацетамид (MSTFA) или другие подходящие реагенты для дериватизации, такие как N, O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (BSTFA), N-метил-N-бис(трифторацетамид) (MBTFA) или бортрифторид (BF₃).

Часто стадию метоксиаминирования применяют перед силилированием, чтобы уменьшить количество сигналов, возникающих в результате изомеризации гликона. Затем полученные анализируемые вещества подвергаются воздействию газового хроматографа, соединенного с масс-спектрометром, который регистрирует масс-спектр и время удерживания, связанное с анализируемым веществом. Таким образом, измеряется модифицированная форма фактического метаболита – аналит. Кроме того, метаболиты часто не могут быть получены в их соответствующем нативном биологическом состоянии. Например, эталонные соединения органических кислот могут быть приобретены только в виде солей. Поскольку аналитическая степень и чистота эталонного вещества могут варьировать, предоставляется также коммерческая информация о приобретении (поставщик, код поставщика и номер партии). Сопоставление анализируемых веществ и метаболитов ($A \leftrightarrow M$), а также метаболитов и эталонных веществ ($M \leftrightarrow R$) по своей природе является отношением «многие ко многим». На стадии химической дериватизации может быть получено более одного варианта и существовать более одного эталонного соединения, поскольку можно заказать несколько эталонных веществ одного и того же метаболита. Например, метаболит путресцин имеет набор различных ассоциированных аналитов, все с полными масс-спектральными и удерживающими дескрипторами. Путресцин связан в GMD с тремя различными продуктами силилирования этого метаболита. В редких случаях один аналит может содержать два или даже более связанных метаболита, которые химически нестабильны и превращаются в один и тот же аналит при заданных условиях анализа.

Фактически измеренные данные представляют собой свойства, связанные с анализируемыми веществами, а они, в свою очередь, могут быть идентифицированы, когда их фактически измеренные данные можно сопоставить с эталонными веществами. В противном случае они могут иметь статус неидентифицированных. Ввиду отношений «многие ко многим» ясно, что этап аннотации на основе сопоставления нетривиален и подвержен ошибкам. Проводится отслеживание потенциальных ошибок, вызванных загрязнением эталонных веществ. Повторные масс-спектры и их характеристики определяются эмпирически с использованием

различных MS-технологий, например, времени пролета, определения массы на основе квадрупольных или ионных ловушек, а также вариаций газовых хроматографических систем.

В GMD разрешается загрузка справочной библиотеки масс-спектров, поддерживаются различные форматы электронных файлов (рис. 15).

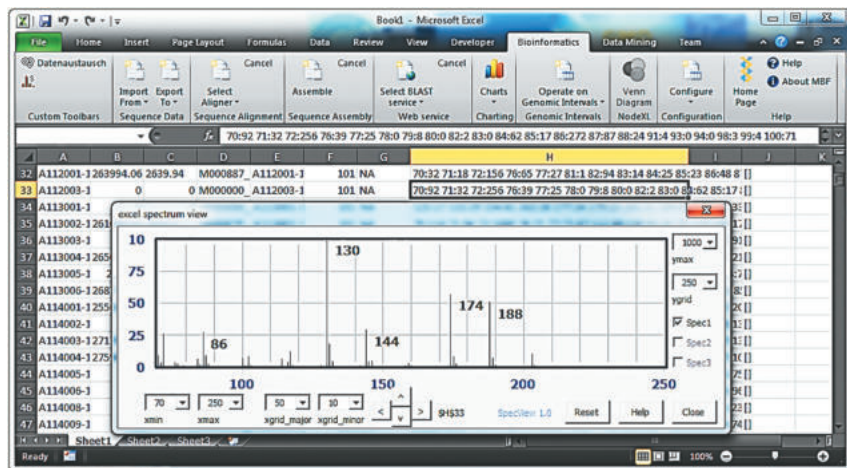


Рис. 15. Изображение масс-спектра, загруженного в Excel

Библиотеки с различным форматом состоят из базовых пиковых нормализованных консенсусных спектров отдельных анализируемых веществ и содержат массы в диапазоне от 70 до 600 а. е. м.

Контрольные вопросы

1. Какую информацию предоставляет база данных GMD?
2. Каким образом осуществляется профилирующий анализ?

2.10. База данных KEGG

Биохимические исследования сегодня не отделимы от молекулярно-генетических. Многие общие базы данных предлагают инструменты поиска данных по вторичным метаболитам и построению семантических сетей, отражающих взаимосвязь между структурой, свойствами, ферментами, активностями метаболитов и генетической регуляцией их синтеза.

Киотская энциклопедия генов и геномов (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) – веб-ресурс, предоставляющий доступ к ряду биологических баз данных и инструментам анализа биологической и медицинской информации. Веб-ресурс KEGG был создан в 1995 г. в Японии при поддержке Лаборатории Канехиса (Kanehisa Laboratories) Института химических исследований Киотского университета в рамках проекта «Геном человека». Появление KEGG было обусловлено необходимостью создания справочной базы данных для биологической интерпретации информации, закодированной в геномах различных существ, в том числе человека. Интегрируя гены, белки, малые молекулы, реакции, взаимодействия, KEGG является электронным представлением биологических систем. В целом KEGG представляет собой попытку компьютеризировать все данные молекулярной и клеточной биологии. Ресурс KEGG широко используется для анализа геномных данных, транскриптома, протеома, гликома, метаболома и метагенома различных живых организмов. Изначально KEGG была разработана в качестве справочной базы для выявления функций на клеточном и организменном уровнях исходя из последовательностей генома и других молекулярных наборов данных. Это достигается с помощью процедуры отображения KEGG, работающей на основе концепции функциональных ортологов (гены-ортологи – гомологи, которые разошлись в результате видообразования).

На момент запуска в 1995 г. KEGG включала всего четыре типа данных:

- карты метаболических путей, составленные вручную;
- каталоги генов, взятые из последовательностей генома;
- ферменты;
- химические соединения, обнаруженные в реакциях.

Эталонные (общие) карты метаболических путей были созданы в виде сетей и узлов с номерами EC (The Enzyme Commission Number, EC number), представляющих собой схему числовой классификации ферментов, основанную на химических реакциях, которые они катализируют. В номенклатуре ферментов номер EC был идентификатором для связывания геномов с метаболическими путями. Данный подход являлся оригинальной концепцией картирования KEGG с помощью функциональных ортологов, включающий присвоение номеров EC генам ферментов в геноме, что позволило связать и визуализировать специфические для организма метаболические пути с узлами генного продукта.

К 2000 г. номер ЕС был заменен идентификатором ортологов, позже названным идентификатором КО (KEGG Orthology) за его роль в KEGG. Он позволил отобразить сигнальные и другие неметаболические пути. В настоящее время все карты путей KEGG, а также классификации семейства белков BRITE и модули KEGG создаются в виде сетей идентификаторов КО, также называемых номерами К, и отображение KEGG включается путем присвоения номеров К генам в геноме.

Также доступно прямое картирование KEGG без преобразования с помощью функциональных ортологов, включая метаболиты, сопоставленные с метаболическими путями, лекарственные средства и болезни, сопоставленные с иерархическими классификациями BRITE, и клеточные организмы и вирусы, сопоставленные с таксономией Национального центра биотехнологической информации (The National Center for Biotechnology Information, NCBI).

На данный момент KEGG насчитывает 16 баз данных, для удобства поиска разделенных на четыре категории: системная информация (метаболические пути, модули генов и т. д.), геномная информация (отдельные гены, геномы различных существ, ортологичные группы), химическая информация (химические реакции, происходящие в живых организмах) и информация, связанная непосредственно со здоровьем человека (болезни, лекарства и т. д.). Также KEGG предоставляет ряд инструментов для удобной работы с базами данных и анализа хранящейся в них информации (рис. 16).

Базы данных KEGG непрерывно обновляются и дополняются. Практическая ценность проекта KEGG состоит в интеграции полученной геномной информации, данных о биологических и химических процессах в живых организмах, знаний о человеческих болезнях и открытых лекарствах в единое целое для понимания высокоуровневой организации различных биологических систем, таких как клетка, организм или экосистема.

Доступ к данным KEGG предоставляет веб-сайт. Главная страница сайта содержит список ссылок на базы данных, для удобства поиска разделенных на основные и вторичные, а также на различные инструменты для анализа биологической и медицинской информации. Ссылки ведут на страницы с подробным описанием каждой базы данных/инструмента и с интерфейсом поиска/работы. По ссылке KEGG можно найти полный перечень всех баз данных и программных средств ресурса, в том числе

тех, которые доступны на сайте GenomeNet (базы данных MGENOME, MGENES, EXPRESSION и OC; инструменты анализа BLAST/FASTA, KAAS, SIMPCOMP и т. д.). Поиск данных на сайте KEGG можно осуществлять непосредственно в основных базах данных (табл. 4), по субъ-ектам (табл. 5) и по организмам.

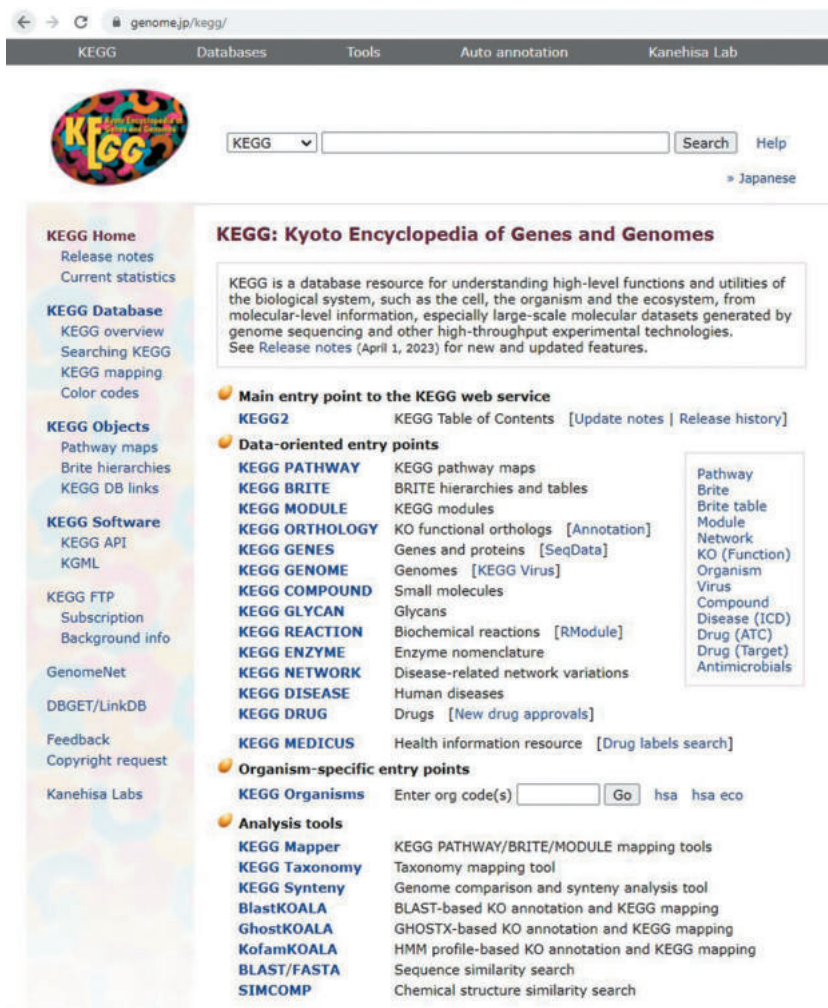


Рис. 16. Стартовая страница сайта базы данных KEGG с перечнем предлагаемых инструментов

Таблица 4

Основные базы данных KEGG

Категория	База данных	Содержание
Системная информация (Systems information)	PATHWAY	Карты метаболических и регуляторных путей
	BRITE	Классификация биологических объектов и явлений
	MODULE	Модули (функциональные единицы) генов и путей
Геномная информация (Genomic information)	ORTHOLOGY (KO)	Семейства ортологичных генов
	GENOME	Секвенированные геномы различных живых организмов
	GENES	Последовательности генов и белков
	SSDB	Выявленные сходства генных последовательностей
Химическая информация (Chemical information)	COMPOUND	Данные о малых молекулах
	GLYCAN	Информация об известных гликанах (полисахаридах)
	REACTION	Информация об известных биохимических реакциях в живых организмах
	RCLASS	Классы химических реакций в живых организмах
	ENZYME	Номенклатура известных ферментов
Информация, связанная со здоровьем человека (Health information)	DISEASE	Информация обо всех известных человеческих болезнях
	DRUG	Данные об открытых лекарствах
	DGROUP	Существующие группы лекарств
	ENVIRON	Вещества, связанные со здоровьем человека

Поиск по субъектам в базе данных KEGG

База данных	Описание
Cancer	Поиск по различным типам рака
Pathogen	Поиск по болезням и патогенам
Virus	Поиск по вирусам
Plant	Поиск по растениям
Glycan	Поиск по гликанам
Annotation	Поиск по КО-аннотации генов и белков
RModule	Строение метаболических путей
SeqData	Поиск по коллекциям секвенированных данных

Категория «Системная информация» включает три базы данных: PATHWAY, BRITE and MODULE. Она содержит основные сведения о высокоуровневых системных функциях клеток и организмов в целом, в том числе разных клеточных процессах, таких как метаболизм, функции организма и человеческие болезни.

База данных ORTHOLOGY из категории «Геномная информация» содержит сведения о функциях клеток на молекулярном уровне. В этой же категории содержатся базы GENOME и GENES, данные которых частично получены из баз данных RefSeq, Genbank and NCBI Taxonomy; SSDB – вспомогательная база данных, используемая в основном для аннотации базы GENES. Категория «Химическая информация» включает базы данных COMPOUND, GLYCAN, REACTION, RCLASS и ENZYME, где хранится информация об известных химических реакциях в живых организмах и о веществах, участвующих в различных процессах. Категория «Информация, связанная со здоровьем человека» содержит базы DISEASE, DRUG, DGROUP и ENVIRON, а также две внешние базы данных с обозначениями лекарств: японские названия лекарств, полученные из базы JAPIC, и обозначения FDA, полученные из DailyMed.

Рассмотрим наиболее важные для биохимических исследований базы данных KEGG.

Энциклопедию метаболических путей KEGG PATHWAY можно назвать центром ресурса. Это база данных, содержащая данные о генных продуктах, связанных в сети белок-белковых взаимодействий, ферментов и регуляторов генов. База данных PATHWAY представлена в виде диаграмм, называемых картами, соответствующих определенным сетям. Существуют карты для клеточных и организменных функций. Данные представлены в виде графических диаграмм, включающих большинство метаболических и некоторые из наиболее известных регуляторных путей. В KEGG есть интерактивные схемы клеточных процессов (метаболические реакции, мембранный транспорт, передача сигналов и др.), метаболические сети и сети белок-белковых взаимодействий.

Карты метаболических путей в базе KEGG PATHWAY объединяют два вида данных: о веществах, претерпевающих изменения, и о генах, которые кодируют ферменты, катализирующие соответствующие реакции. Базы данных в данной категории вместе называются KEGG LIGAND. Сегодня они включают KEGG COMPOUND (для химических соединений), KEGG REACTION (для химических реакций), KEGG ENZYME (для реакций из номенклатуры ферментов), KEGG GLYCAN (для гликанов) и две вспомогательные базы данных – RPAIR (выравнивание пар реагентов, патерны структурных преобразований; с помощью этой базы можно предсказывать новые реакции и новые ферменты) и RCLASS (классы реакций).

База KEGG COMPOUND содержит информацию о малых молекулах, биополимерах и других химических веществах, относящихся к биологическим системам. Каждый элемент идентифицирован C-числом (например, C00047 для L-лизина (L-lysine), включая химическую структуру и соответствующую информацию), различные ссылки на другие базы KEGG и внешние базы. В базу данных интегрирован сервис KEGG Chemical Function (KCF), позволяющий получить изображение интересующей химической структуры. Структура изображается в виде графа, в котором узлы – атомы, а ребра – ковалентные связи.

База KEGG COMPOUND интегрирована с KEGG GLYCAN – базой данных структур карбогидратов (углеводов). Диаграммы метаболических путей карбогидратов и сложных липидов связаны с индивидуальными структурами из KEGG GLYCAN. Каждая запись GLYCAN идентифицируется номером G (например, G00197 для CD65). Большинство записей – структуры из банка данных CarbBank. Роль гликанов в различ-

ных клеточных процессах может рассматриваться совместно с другими картами путей в базе KEGG PATHWAY, такими как:

- сигнальные молекулы и взаимодействия;
- клеточные взаимодействия.

База KEGG REACTION содержит схемы химических, в основном ферментативных реакций, включая все реакции, которые имеются в картах метаболических путей KEGG, а также дополнительные реакции, которые встречаются в номенклатуре ферментов. Каждая запись идентифицируется номером R и является уникальной реакцией, состоящей из наборов реагентов и продуктов, взятых из KEGG COMPOUND и KEGG GLYCAN. Схемы реакций взяты из KEGG ENZYME. Класс реакций (Reaction Class, RC) представляют собой функционально значимые сходные группы реакций. Классы реакций отвечают модулям KEEG.

KEGG RCLASS включает классификацию реакций, основанную на химической структуре модели трансформации пар субстрат – продукт.

KEGG ENZYME содержит номенклатуру ферментов с ресурса, связанную ссылками с базами данных KEGG.

KEGG DRUG – информационный ресурс о лекарственных препаратах, одобренных в Японии, США и Европе, имеющих единую химическую структуру и/или иные химические компоненты и связанные с ними таргеты, ферменты метаболизма и другую информацию о системах молекулярных взаимодействий. Каждый препарат KEGG DRUG идентифицируется D-номером, который включает:

- название, связанное с химической структурой;
- торговое название;
- связь с FDA;
- химическую структуру, химический компонент, белковую последовательность;
- класс лекарства в KEGG DGROUP;
- терапевтическую категорию, АТС-код, химическую группу в KEGG DGROUP;
- молекулы-таргеты в контексте карты путей KEGG;
- иные взаимодействия молекул, включая геномные биомаркеры, CYP индукторы/ингибиторы;
- информацию о вредоносном взаимодействии лекарственных препаратов;
- историю разработки препаратов в виде карты в KEGG DRUG;

- классификацию информации о лекарствах в иерархии BRITE;
- связь с внешними базами данных.

KEGG DGROUP – новая база данных, разрабатываемая для структурно и функционально взаимосвязанных групп препаратов, особенно с точки зрения сетей их взаимодействия. Препараты в KEGG DGROUP делятся на химические группы, содержащие основные химические структуры с незначительными отличиями в структуре солей и состояниях гидратации.

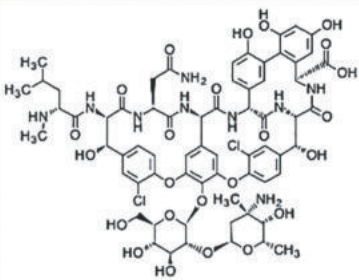
KEGG ENVIRON – база данных, содержащая информацию о веществах, имеющих отношение к здоровью человека, но не являющихся компонентами одобренных лекарственных препаратов. Данная база включает преимущественно информацию об эфирных маслах и других веществах – вторичных метаболитах растений. Каждый препарат определяется Е-числом и соответствующим ему химическим компонентом,

← → ↺ 🏠 🔒 genome.jp/entry/C06689



COMPOUND: C06689

Help

Entry	C06689	Compound
Name	Vancomycin	
Formula	C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O ₂₄	
Exact mass	1447.4382	
Mol weight	1449.2536	
Structure	 C06689 Mol file KCF file DB search	
Remark	Same as: D00212	
Reaction	R10933	
Pathway	map01055 Biosynthesis of vancomycin group antibiotics map01100 Metabolic pathways map01110 Biosynthesis of secondary metabolites map01502 Vancomycin resistance map02020 Two-component system	
Enzyme	2.4.1.322	

All links

Pathway (5)
 KEGG PATHWAY (5)

Drug (3)
 KEGG DRUG (1)
 ChEMBL (2)

Chemical substance (7)
 PubChem (1)
 ChEBI (1)
 HMDB (1)
 HSDB (1)
 KnapSack (1)
 LIPIDMAPS (1)
 NIKKAI (1)

Chemical reaction (2)
 KEGG ENZYME (1)
 KEGG REACTION (1)

Gene (3)
 KEGG GENES (3)
 All databases (20)

[Download RDF](#)

Рис. 17. Отображение информации в базе данных KEGG по запросу «ванкомицин»

информацией об эффективности. В KEGG ENVIRON выделяют три основные категории:

1) Crude drugs (препараты неочищенные, натурального происхождения);

2) Essential oils (эфирные масла);

3) Medicinal herbs (лекарственные травы).

В качестве смежного ресурса используется база KEGG COMPOUND, которая содержит информацию о веществах, загрязняющих окружающую среду или вредных для здоровья человека:

- Endocrine disrupting compounds (соединения, нарушающие работу эндокринной системы);

- Pesticides (пестициды);

- Carcinogens (канцерогены);

- Natural toxins (естественные токсины).

Запросы необходимо вводить на английском языке. При введении запроса в поисковую строку отображается вся имеющаяся на веб-ресурсе информация, дифференцированная в зависимости от ее типа на подразделы. Дальнейшую работу можно вести в пределах нужного подраздела, переходя по активным ссылкам. Например, для ванкомицина можно найти информацию о генетической регуляции и реакциях биосинтеза, ферментах, структуре, биохимических характеристиках, номере в других базах данных, точном молекулярном весе и др. (рис. 17).

Контрольные вопросы

1. К какому типу баз данных относится KEGG? В чем ее уникальность?

2. Какие инструменты предлагает база данных KEGG для анализа результатов биохимических исследований?

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭКСТРАКТОВ

Цель: приготовить экстракты из сухого сырья лекарственных трав.

Материалы и оборудование: сухое измельченное сырье трех лекарственных трав или трех разных органов избранного лекарственного растения, дистиллированная вода, 96%-й раствор этанола, стеклянные конические колбы на 100 мл, мерные цилиндры на 100 мл, стеклянные стаканы на 200–300 мл, воронки стеклянные, автоматические дозаторы на 1 мл, пластиковые наконечники на дозаторы, весы, аналитические весы, фольга, мерные ложки, шпатели, водяная баня, фильтровальная бумага.

На эффективность извлечения биоактивных соединений из сырья влияют многие факторы: природа извлекаемых химических веществ, полный биохимический состав образца, метод экстракции, химическая природа и полярность растворителей, размер частиц образца, соотношение твердых веществ и растворителя и физические условия экстракции. При одинаковых времени и температуре растворитель является наиболее важным параметром экстракции метаболитов.

Растворители с разной полярностью извлекают различные химические соединения, поэтому качество и скорость экстрагирования во многом зависят от выбора растворителя. Полярные органические растворители (метанол, этанол, этилацетат, ацетон и их комбинации с водой) обычно используются для экстракции фенольных соединений и их гликозидов, полярных изопреноидов терпеноидов, алкалоидов, полиацетиленов, стеринов. Вода в водных растворах растворителей улучшает экстракцию углеводов, органических кислот и аминокислот. Неполярные растворители, такие как петролейный эфир, гексан, толуол, применяются для извлечения неполярных соединений, в частности неполярных изопреноидов.

Фенольные соединения представляют собой вторичные метаболиты, состоящие из одного или нескольких ароматических колец с одной или несколькими гидроксильными группами. Вариации в характере гидроксирования, стереохимии в трех хиральных центрах, а также расположение и тип межфлавановой связи, степень метоксилирования, гликозилирования и галлоилирования приводят к разнообразию фенольных структур, как следствие, полярность фенольных соединений сильно варьирует.

Смеси этанола и воды более полярны по сравнению с абсолютным этанолом (что может положительно влиять на выходы свободных фенольных соединений). И хотя не существует универсальной процедуры, которая была бы пригодна для извлечения фенольных веществ всех подгрупп, как правило, хорошие результаты демонстрирует использование в качестве экстрагента водно-спиртового раствора с преобладанием доли спирта.

Ход работы

На аналитических весах отмерьте 0,50 г сухого растительного сырья исследуемых трав. Сырье перенесите в стеклянные колбы на 100 мл. Колбы подпишите. Готовьте 70%-й раствор этанола с учетом того, что может потребоваться больший его объем ввиду возможной необходимости компенсации потерь растворителя после нагревания растворов. К сырию осторожно добавьте 25 мл 70%-го этанола. Содержимое аккуратно перемешайте. Частицы сырья должны быть полностью погружены в раствор. Колбы взвесьте на аналитических весах. Запишите точную массу каждой колбы с содержимым для последующего контроля возможной потери веса. Колбы плотно закройте фольгой и поместите на 40 мин на термостатируемую водяную баню с температурой воды 70 °С (уровень воды в бане должен покрывать уровень раствора в колбах). По истечении указанного времени снимите колбы с водяной бани. Дайте им остыть 5 мин, после чего снимите с колб фольгу и протрите их досуха фильтровальной бумагой. Проведите повторное взвешивание колб с содержимым. В случае потери веса компенсируйте его 70%-м раствором этанола. Нужный объем раствора внесите дозатором.

Далее проведите фильтрацию экстрактов через бумажный фильтр в новые колбы (нужно подписать колбы заранее). Колбы плотно закройте резиновыми пробками, обернутыми фольгой, и поместите в холодильник (4–6 °С) для хранения до последующих экспериментов.

Задание. Получите водно-спиртовые экстракты лекарственных растений и заполните таблицы.

**Взаимосвязь между химической природой экстрагента
и классом извлекаемых соединений**

Тип экстрагента	Химическая природа экстрагируемых соединений	Класс экстрагируемых соединений
Вода		
Метанол		
Этанол		
Ацетон		
Петролейный эфир		
Гексан		

Характеристики экстракции

Объект	Масса навески, г	Объем растворителя, мл	Соотношение экстрагент : сырье	Точная масса колбы с содержимым до нагревания, г (<i>a</i>)	Точная масса колбы с содержимым после нагревания, г (<i>b</i>)	Потеря в весе колб (<i>a-b</i>), г	Масса растворителя, которую необходимо внести в колбы для компенсации потери в весе, г
1							
2							
3							

Контрольные вопросы

1. На чем основывается выбор экстрагента для экстракции тех или иных соединений?
2. Почему важно проводить оптимизацию метода экстракции?
3. Почему экстракты необходимо хранить в темноте и при низкой положительной температуре?
4. На извлечение каких соединений нацелен используемый в данной работе подход к экстракции?

Лабораторная работа 2

АНАЛИЗ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ

Цель: получить спектры поглощения водно-спиртовых тестируемых экстрактов лекарственных растений и провести их анализ с точки зрения качественного состава экстрактов.

Материалы и оборудование: ранее приготовленные водно-спиртовые экстракты лекарственных растений, дистиллированная вода, 96%-й раствор этанола, мерные цилиндры на 100 мл, спектрофотометр, стеклянные стаканы на 100–200 мл, стеклянные пробирки, автоматические дозаторы на 1 мл, пластиковые наконечники на дозаторы, кюветы с толщиной слоя 1 см, штатив для пробирок, фильтровальная бумага.

Анализ формы спектральных кривых экстрактов позволяет получить представление о принадлежности оптически активных компонентов исследуемых объектов к тем или иным классам соединений, а также об их вероятном количественном соотношении.

Фенольные соединения представляют собой один из наиболее распространенных и многочисленных классов природных биологически активных веществ. Их образование – отличительная особенность растительной клетки. Многие фенольные соединения участвуют в основном обмене (в частности, в процессах фотосинтеза и дыхания), однако большинство из них – типичные представители вторичного метаболизма. Фенольные соединения преимущественно являются оптически активными веществами с характеристическими областями поглощения, поэтому при их исследовании часто используются методы прямой спектрофотометрии. Информативен анализ спектров поглощения как отдельных компонентов фенольных комплексов, так и цельных экстрактов.

Согласно данным научной литературы, интенсивная полоса поглощения при 200–240 нм объясняется высоким содержанием в экстрактах простых фенолов с боковой цепью в пара-положении или с насыщенными пара-заместителями, поглощающими свет в данной области спектра (табл. 6). Наличие коротковолновой полосы 254–275 нм при максимуме 265–270 нм обусловлено присутствием в смеси фенольных кислот и главным образом – галловой кислоты (максимум поглощения около 270 нм) и ее производных, по химическому строению представляющих собой полигаллоилглюкозы и обозначаемых как галлотанины. Основной максимум поглощения катехинов также приходится на указанную область спектра.

Таблица 6

**Характеристические максимумы
спектров поглощения фенольных соединений**

Максимум поглощения	Группа фенольных соединений
250–275 нм	Фенольные кислоты
315–325 нм	Фенолкарбоновые кислоты
240–270 и 320–380 нм	Флавоноиды
278 и 310 нм	Кумарины
350–450 нм	Ауруны
496–546 нм	Антоцианы

Наличие полос в более длинноволновой части спектра может определяться оптическими свойствами нескольких классов фенолов, в первую очередь флавоноидами, которые обнаруживают основную полосу поглощения при 320–380 нм. Кроме того, поглощая свет во второй характерной для них полосе (240–270 нм), они в некоторой степени могут усиливать интенсивность поглощения экстрактов в этой области. С₆-С₃-фенолкарбоновые кислоты демонстрируют основной максимум при 315–325 нм, поэтому, вероятно, также вносят свой вклад в проявление оптических свойств экстрактов. Спектры кумаринов содержат две главные полосы при 278 и 310 нм, а поглощение света в области 350–450 нм может быть обусловлено присутствием аурунов.

Сведения о спектральных особенностях различных классов фенолов позволяют сделать предположение о том, какие группы фенольных соединений могут доминировать в составе фенольных комплексов экстрактов (выраженные максимумы или широкие области поглощения), а какие присутствуют в низком содержании (слабовыраженные области поглощения).

Ход работы

Приготовьте 20 мл 70%-го раствора этанола. Он будет использоваться в качестве нулевого для обнуления спектрофотометра, а также для разведения экстрактов. На спектрофотометре активируйте инструмент «SCAN». Кювету промойте дистиллированной водой, внесите в нее нулевой контроль. Обнулите спектрофотометр на нулевой раствор. Внесите в кювету экстракт. Пропишите спектр поглощения экстракта в диапазоне длин волн 200–700 нм, сохраните его на рабочий стол компьютера. Проведите визуальную проверку качества спектра. В случае если значения оптической плотности пиков спектра превышают рамки 1 отн. ед. (ось 0Y),

необходимо провести разведение экстракта. Для этого в стеклянную пробирку внесите 2 мл 70%-го раствора этанола и 2 мл исследуемого экстракта (разведение в два раза), перемешайте раствор. Внесите в кювету разведенный экстракт и проведите определение спектра поглощения. Оцените полученный спектр и при необходимости проведите дальнейшее разведение. На спектре выведите информацию о максимумах поглощения. Процедуру повторите для всех тестируемых экстрактов.

На рис. 18 представлен пример спектров поглощения водно-спиртовых экстрактов.

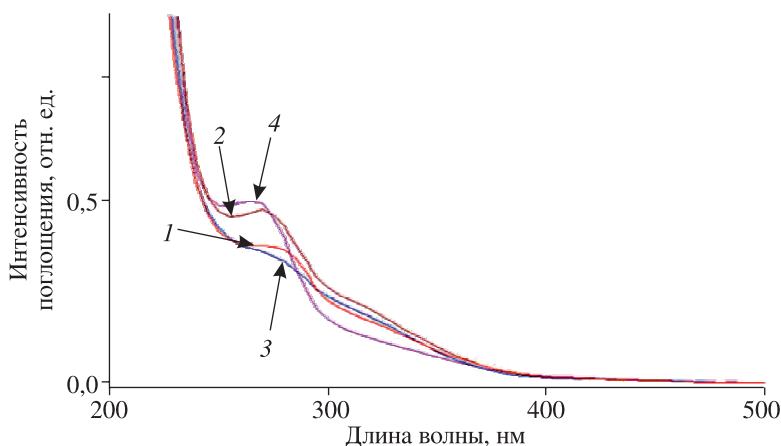


Рис. 18. Спектры поглощения водно-спиртовых экстрактов 4-х каллусных линий пажитника греческого

Задание. Проанализируйте полученные спектры поглощения водно-спиртовых экстрактов. Заполните таблицу с использованием сведений о спектральных особенностях фенольных соединений, приведенных в табл. 6, и сделайте выводы о предположительном доминировании в исследуемых экстрактах тех или иных фенольных соединений.

Характеристика спектров поглощения исследуемых экстрактов

Объект	Область и/или максимум поглощения	Вероятная группа вторичных метаболитов
1		
2		
3		

Контрольные вопросы

1. Что такое оптически активные соединения?
2. Какие классы метаболитов характеризуются оптической активностью?
3. Каким образом можно использовать свойство оптической активности в идентификации соединений?
4. Почему характеристики оптической активности разных соединений могут сильно различаться?

Лабораторная работа 3 ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ ЭКСТРАКТОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Цель: провести разделение и предварительную идентификацию компонентов экстрактов лекарственных трав методом тонкослойной хроматографии.

Материалы и оборудование: ранее приготовленные водно-спиртовые экстракты лекарственных растений, дистиллированная вода, толуол, этанол, ледяная уксусная кислота, имеющиеся в наличии стандарты фенольных соединений (например, галловая кислота, феруловая кислота, рутин, кверцетин), хроматографические пластинки на основе силикагеля, мерные цилиндры на 100 мл, стеклянные стаканы на 100 мл, вертикальная хроматографическая камера с крышкой, фильтровальная бумага.

В целях предварительной идентификации фенольных соединений во фракциях водно-спиртовых экстрактов каллусов можно применять метод хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ). В ходе анализа хроматограмм с разделенными компонентами экстрактов для каждого пятна рассчитывают значения коэффициента подвижности R_f – отношение расстояния от центра пятна до стартовой линии к расстоянию, пройденному растворителем от стартовой линии до линии фронта растворителя.

Оптически активные соединения при их разделении имеют различную окраску в УФ-свете, что также позволяет провести предварительную дифференциацию веществ в зависимости от их принадлежности к определенному классу метаболитов, а также более достоверно идентифицировать вещество по стандарту. Фенольные соединения, флуоресцирующие желтым цветом, а после обработки парами аммиака – оранжевым или коричневым, являются, скорее всего, агликонами флавоноидов. Вещества, демонстрирующие оранжевую или коричневую флуоресценцию и желто-зеленую окраску в УФ-свете после обработки парами ам-

миака, могут быть отнесены к гликозидам флавоноидов. Синяя окраска в УФ-свете, остающаяся неизменной после обработки парами аммиака либо переходящая в синюю, фиолетовую, зеленую, оранжевую или коричневую флуоресценцию, свойственна различного рода фенольным кислотам и фенилпропаноидам. На основании данных о характере свечения разделенных веществ в УФ-свете можно сделать обоснованное предположение о том, метаболиты каких групп доминируют в пробах. Данная информация служит основанием для разработки наиболее эффективного подхода к разделению веществ методом ВЭЖХ-МС.

Ход работы

Приготовьте систему растворителей состава толуол : этанол : уксусная кислота (45 : 8 : 4). Хроматографическая камера должна быть чистой и сухой. Приготовление системы нужно проводить под вытяжкой. В мерный цилиндр на 100 мл поочередно наливаете толуол, этанол и ледяную уксусную кислоту в соответствии с приведенными выше пропорциями (при необходимости объемы всех компонентов смеси можно увеличить в два раза) и аккуратно выливаете полученный раствор в хроматографическую камеру. Камеру герметично закрываете для насыщения парами растворителя.

Растворы стандартов фенольных соединений готовят, учитывая их растворимость в различных растворителях (информацию об этом можно найти на электронных ресурсах, например на сайтах производителей химических реактивов). Концентрация растворов стандартных веществ должна составлять не менее 0,1 мг/мл.

После приготовления растворов стандартов необходимо подготовить хроматографическую пластинку. Возможно, ее нужно будет обрезать, подогнав под линейные размеры хроматографической камеры. На расстоянии 2 см от нижнего края пластинки нанесите карандашом стартовую линию, на которую будут наноситься пробы. Точками на стартовой линии наметьте места нанесения проб. Расстояние от крайних проб до краев справа и слева пластинки должно составлять не менее 7 мм, как и расстояние между пробами. В верхней части пластинки подпишите пробы напротив каждой нанесенной точки.

Нанесение растворов проб (экстрактов и стандартов) производите стеклянными капиллярами. Каждую пробу необходимо сконцентрировать на как можно меньшей площади. Все пробы наносите как минимум 10 раз. Повторно наносите пробу на высохшее пятно, иначе оно растечется. Пятна проб должны быть небольшими и не соприкасаться с раствором системы растворителей. Если все же пятна получились слишком

большими и перекрывают друг друга и/или предположительно будут соприкасаться с системой растворителей, то нанесение проб необходимо провести повторно на новой пластинке.

Последующая работа также ведется в условиях включенного вытяжного шкафа. Подготовленную пластинку с нанесенными пробами поместите в насыщенную парами элюента хроматографическую камеру и герметично ее закройте. Постоянно контролируйте высоту поднятия системы растворителей по пластинке. Когда она достигнет расстояния 1 см от верхнего края пластинки, откройте камеру, аккуратно достаньте пластинку и поместите ее на горизонтальную поверхность. Отметьте карандашом линию фронта растворителя.

Когда пластинка высохнет, проведите обнаружение веществ в УФ-свете до и после обработки парами аммиака (рис. 19). Обнаруженные пятна обведите карандашом, запишите их цвет. Для каждого пятна рассчитайте значение коэффициента подвижности R_f .

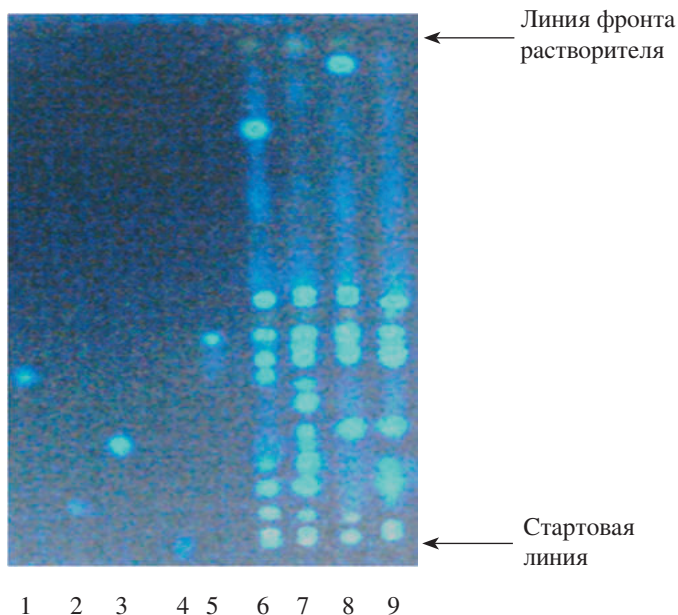


Рис. 19. Хроматограмма водно-спиртовых экстрактов в УФ-свете (366 нм) до обработки парами аммиака: 1–5 – стандарты; 6–9 – экстракты

Задание. Полученные данные внесите в таблицу. Отметьте наличие пятен в пробах знаком «+» или «-». Таблица такого вида позволяет систематизировать данные ТСХ, увидеть сходства и различия в составе фенольных комплексов экстрактов. Сделайте выводы о разнообразии фенольных соединений в составе каждого исследуемого экстракта, а также о вероятном присутствии веществ, используемых в качестве стандартов. Соотнесите данные ТСХ с результатами, полученными в ходе анализа спектров поглощения экстрактов.

**Хроматографическая характеристика
стандартов фенольных соединений
и компонентов водно-спиртовых экстрактов**

Rf	Характеристика пятна	Стандарт					Экстракт		
		1	2	3	4	5	I	II	III
0,1	Цвет в УФ-свете								
	Цвет в УФ-свете после обработки парами аммиака								
0,2	Цвет в УФ-свете								
	Цвет в УФ-свете после обработки парами аммиака								
<...>									

П р и м е ч а н и е. Рекомендуемые обозначения цветов: Г – голубой, Ж – желтый, ЖЗ – желто-зеленый, ЗГ – зелено-голубой, К – коричневый, О – оранжевый, С – синий, Ф – фиолетовый.

Контрольные вопросы

1. По какому принципу при проведении хроматографии выбирают систему растворителей?
2. Почему даже при небольшом изменении состава системы растворителей или типа стационарной фазы у разделяемых веществ меняются значения коэффициента подвижности?
3. О чем свидетельствует то, что пятна на хроматограммах имеют одинаковые значения Rf и при этом характеризуются разным цветом свечения в УФ-свете?

Лабораторная работа 4

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

Цель: провести количественное определение суммы фенольных соединений в исследуемых экстрактах методом Фолина – Чокальтеу.

Материалы и оборудование: ранее приготовленные водно-спиртовые экстракты лекарственных растений, дистиллированная вода, реактив Фолина – Чокальтеу, соль карбоната натрия, 96%-й раствор этанола, мерные цилиндры на 100 мл, стеклянные стаканы на 100–200 мл, стеклянные конические колбы на 100 мл, стеклянные пробирки, штатив для пробирок, спектрофотометр, автоматические дозаторы на 1 и 5–10 мл, пластиковые наконечники на дозаторы, кюветы с толщиной слоя 1 см, фильтровальная бумага.

При анализе вторичных метаболитов важным этапом исследования является проведение их количественного определения. На данный момент наиболее широко используемым спектрофотометрическим методом определения суммарного содержания фенольных соединений является метод Фолина – Чокальтеу. Полифенольные соединения окисляются реактивом Фолина – Чокальтеу, состоящим из смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот, который, в свою очередь, восстанавливается в смесь окислов вольфрама и молибдена голубого цвета, максимум поглощения которых лежит в области 750–765 нм. Интенсивность окраски в указанном диапазоне длин волн линейно возрастает с увеличением концентрации фенолов в анализируемых пробах.Преимущества метода – высокая воспроизводимость результатов, удовлетворительная чувствительность, возрастающая при увеличении содержания фенолов в анализируемых объектах, относительная дешевизна необходимых реактивов, отсутствие ограничений при выборе объектов. Несмотря на некоторые недостатки, это наиболее распространенный и широко применяемый для определения суммы фенолов в исследуемых объектах метод.

Ход работы

Приготовьте по 20 мл 70%-го раствора этанола и 20%-го водного раствора карбоната натрия. Колбы с приготовленными растворами закройте пробками. Эксперименты проведите в трехкратной повторности для каждого тестируемого экстракта. Для приготовления опытных проб

в стеклянные пробирки с помощью дозаторов последовательно внесите по 0,1 мл 70%-х водно-спиртовых экстрактов, 1,7 мл дистиллированной воды, 0,1 мл реактива Фолина – Чокальтеу. Через 5 мин в пробирки добавьте 0,3 мл 20%-го раствора карбоната натрия и хорошо перемешайте. Контроль готовьте описанным выше способом, но вместо экстракта внесите 0,1 мл 70%-го раствора этанола. Полученную смесь выдержите в темноте при комнатной температуре. По прошествии 1 ч в пробирки добавьте по 2 мл дистиллированной воды и определите оптическую плотность опытных растворов на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 750 нм. Если значения оптической плотности превышают 1,0 отн. ед., проведите разведение пробы дистиллированной водой. Далее разведение будет учитываться при расчетах.

Содержание фенольных соединений в пробах выражают в эквиваленте галловой кислоты. Для построения калибровочной кривой приготовьте растворы стандарта различной концентрации (0,01–0,1 мг/мл) с использованием 70%-го раствора этанола. Полученная калибровочная кривая приведена на рис. 20.

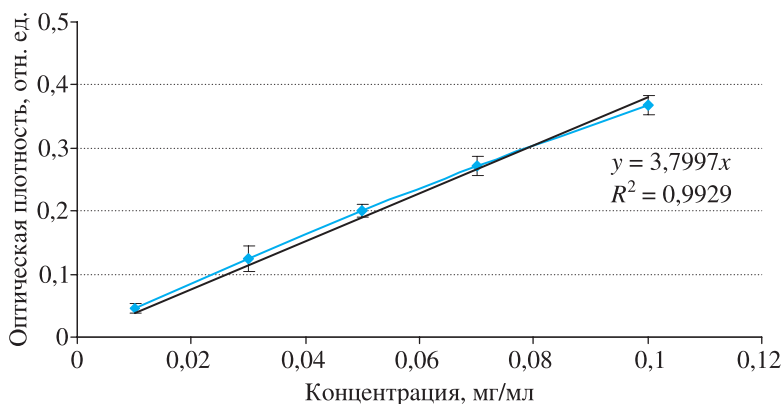


Рис. 20. Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации галловой кислоты

Расчет количественного содержания суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту проведите по формуле

$$C = R \cdot DF \cdot V \cdot M^{-1},$$

где C – общее содержание фенольных соединений, мг/г сухой массы в эквиваленте галловой кислоты (мг ГК/г сух. м.); R – содержание галловой

кислоты в аликвоте экстракта, соответствующее измеренной оптической плотности и найденное из калибровочного графика, мг/мл; DF – степень разведения (если такое проводилось); V – объем экстракта, мл; M – масса навески растительного материала, взятая для экстракции, г.

Полученные результаты введите в Excel и проведите статистическую обработку: найдите среднее значение и ошибку средней величины.

Задание. Определите содержание фенольных соединений методом Фолина – Чокальтеу и проведите статистическую обработку результатов. Полученные данные внесите в таблицу. На их основании постройте диаграмму; проранжируйте объекты в зависимости от содержания в них суммы фенольных соединений.

Общее содержание фенольных соединений в объектах

Объект	Оптическая плотность (при 750 нм), отн. ед.	Общее содержание фенольных соединений, мг/г сух. м.	Среднее общего содержания фенольных соединений, мг/г сух. м.	Ошибка средней величины
1				
2				
3				

Контрольные вопросы

1. Каков принцип спектрофотометрических методов определения содержания вторичных метаболитов?
2. На чем основан механизм окрашивания фенольных соединений реактивом Фолина – Чокальтеу?
3. В чем заключаются преимущества метода Фолина – Чокальтеу?

Лабораторная работа 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Цель: провести определение антирадикальной активности исследуемых экстрактов методом DPPH.

Материалы и оборудование: ранее приготовленные водно-спиртовые экстракты лекарственных растений, дистиллированная вода, свежеприготовленный 0,3мМ-й спиртовой раствор DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), 96%-й раствор этанола, мерные цилиндры на 100 мл, стеклянные стаканы на 100–200 мл, стеклянные пробирки, штатив для пробирок, спектрофотометр, автоматические дозаторы на 1 и 5–10 мл, пластиковые наконечники на дозаторы, кюветы с толщиной слоя 1 см, фильтровальная бумага.

Помимо определения структурных особенностей, химических свойств и функций в организме продуцента, важное место в исследованиях вторичных метаболитов занимает изучение их биологических активностей и фармакологических характеристик. Фенольные соединения являются одной из важнейших групп природных антиоксидантов, по своей активности опережающих такие мощные антиоксиданты, как витамины С, Е и бета-каротин. Именно поэтому можно предположить, что фенольные соединения составляют основу антиоксидантных комплексов экстрактов. Антирадикальная активность – один из показателей антиоксидантного потенциала экстрактов. В определении антирадикальной активности экстрактов хорошо себя зарекомендовал метод DPPH (DPPH – стабильные свободные радикалы, спиртовой раствор которых окрашен в ярко-фиолетовый цвет). Молекула DPPH содержит неспаренный электрон, отвечающий за характерный максимум поглощения при 515–520 нм. При взаимодействии с антиоксидантами образуется восстановленный 2,2-дифенил-1-пикрилгидразин, что влечет за собой обесцвечивание раствора. Это отражается в изменении его оптической плотности, регистрируемой в области максимума поглощения, что используется для определения процента нейтрализованных молекул радикала. Данный метод позволяет получить достаточно достоверную информацию об антирадикальных свойствах тестируемых экстрактов или (при необходимости) их отдельных компонентов. К его преимуществам можно отнести относительную дешевизну, быстроту и простоту получения и обработки результатов. При проведении экспериментов в опреде-

ленных условиях (комнатная температура, затемнение) радикалы DPPH стабильны. Кроме того, метод не является селективным для каких-либо конкретных соединений и применяется в оценке радикалингибирующей активности образцов независимо от их полярности.

Ход работы

При определении антирадикальной активности методом DPPH применяют свежеприготовленный раствор свободных радикалов. Раствор DPPH должен находиться в темном стеклянном флаконе. Пробы после добавления реактива должны выдерживаться в темноте на протяжении эксперимента.

Приготовьте 20 мл 70%-го раствора этанола. Как и в определении общего содержания фенольных соединений, эксперименты проводят в трехкратной повторности для каждого тестируемого экстракта. Негативный контроль также готовят в трехкратной повторности. Эксперимент предполагает приготовление контролей двух типов: нулевого и негативного. Для приготовления нулевого контроля, на который будет проводиться обнуление спектрофотометра, в стеклянных пробирках смешивают 3 мл 96%-го и 0,5 мл 70%-го этанола. Негативный контроль, значение оптической плотности которого используется в расчетах антирадикальной активности, включает 1 мл 0,3ММ-го раствора DPPH, 2 мл 96%-го и 0,5 мл 70%-го этанола. Для приготовления опытных проб в стеклянные пробирки внесите 0,5 мл 70%-го водно-спиртового экстракта, 2 мл 96%-го раствора этанола и 1 мл 0,3ММ-го свежеприготовленного спиртового раствора DPPH. Все пробирки поместите на 30 мин в условия темноты при комнатной температуре. По истечении указанного времени начинайте измерения оптической плотности растворов на спектрофотометре при 520 нм. Обнуление прибора проведите по нулевому контролю. Далее измеряйте оптические плотности растворов негативных контролей и опытных проб. Полученные значения введите в Excel и рассчитайте процент ингибирования радикалов DPPH и антрадикальную активность в мг/г сухой массы в эквиваленте аскорбиновой кислоты.

Процент ингибирования радикалов DPPH определите по формуле

$$C = (A - B) \cdot A^{-1} \cdot 100,$$

где C – ингибирование радикалов DPPH, %; A – оптическая плотность негативного контроля, отн. ед.; B – оптическая плотность исследуемого образца, отн. ед.

Далее антирадикальную активность проб выразите в эквиваленте аскорбиновой кислоты. Для построения калибровочной кривой приготовьте растворы стандарта различной концентрации (0,001–0,01 мг/мл) с использованием 70%-го раствора этанола (рис. 21).

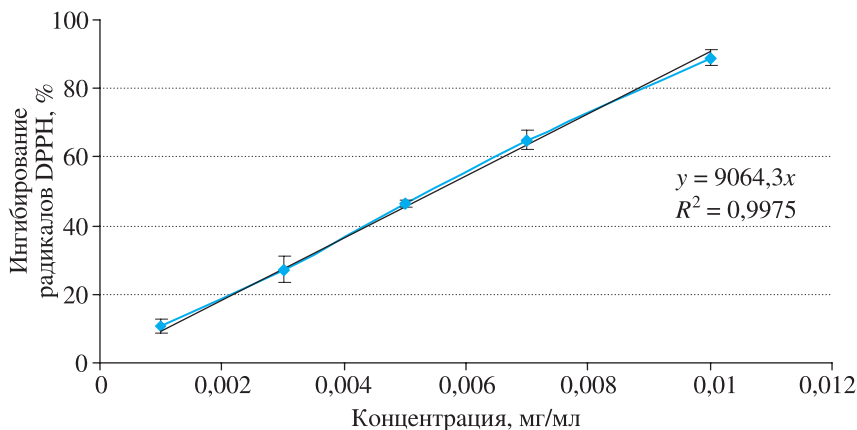


Рис. 21. Калибровочный график зависимости процента ингибирования радикалов DPPH от концентрации аскорбиновой кислоты

Расчет антирадикальной активности объектов в эквиваленте активности аскорбиновой кислоты произведите по формуле

$$C = I \cdot V \cdot M^{-1},$$

где C – антирадикальная активность, мг/г сухой массы в эквиваленте аскорбиновой кислоты (мг АК/г сух. м.); I – антирадикальная активность аликвоты экстракта в эквиваленте аскорбиновой кислоты, соответствующая проценту ингибирования радикалов DPPH и найденная из калибровочного графика, мг/мл; V – объем экстракта, мл; M – масса навески растительного материала, взятая для экстракции, г.

Задание. Проведите определение антирадикальной активности экстрактов (процент ингибирования радикалов DPPH и антирадикальная активность в эквиваленте активности аскорбиновой кислоты) и статистическую обработку результатов. Полученные данные внесите в таблицу. На основании полученных данных постройте диаграмму; проранжируйте объекты в зависимости от выраженности антирадикальной активности; проведите анализ взаимосвязи общего содержания фенольных соединений и антирадикальной активности экстрактов.

**Антирадикальная активность
водно-спиртовых экстрактов исследуемых объектов**

Объекты	Оптическая плотность, отн. ед. (при 520 нм)	Ингибирование радикалов DPPH, %	Антирадикальная активность, мг АК/г сух. м.	Среднее антирадикальной активности	Ошибка средней величины
1					
2					
3					
Негативный контроль	1	Среднее значение, отн. ед.			
	2				
	3				

Контрольные вопросы

1. Какие существуют показатели антиоксидантной активности экстрактов?
2. На чем основан метод определения антирадикальной активности с использованием реактива DPPH?
3. С какой целью в данном тесте используется негативный контроль?

**Лабораторная работа 6
АНАЛИЗ МЕТОДОВ ВЭЖХ-МС**

Цель: провести анализ представленных ниже методов ВЭЖХ-МС (определение пирролизидиновых алкалоидов в кормах, фенольных соединений в некоторых лекарственных травах, промежуточных продуктов изопреноидного пути).

Задание. Проанализируйте приведенные методы ВЭЖХ-МС. Выявите сходства и различия между подходами. Объясните причины обнаруженных различий. Заполните таблицу с использованием материала, представленного в п. 2, и на основании информации о предложенных методах 1–3.

Характеристика методов ВЭЖХ-МС

Номер анализируемого метода	Класс исследуемых метаболитов	Особенности химической структуры данных метаболитов	Полярность	Приборы ВЭЖХ-МС	Тип МС-детектора	Параметры колонки	Состав подвижной фазы	Скорость потока	Объем инъекции	Градиент	Тип ионизации
1											
2											
3											

Метод 1. Использование ВЭЖХ-МС для определения пирролизидиновых алкалоидов в кормах

Метод был предложен в 2018 г. Э. Ковальчик (E. Kowalczyk) и К. Квятэк (K. Kwiatek) (DOI:10.2478/jvetres-2018-0028). Пирролизидиновые алкалоиды (ПА) являются вторичными метаболитами, продуцируемыми многими видами растений. Из-за своей токсичности ПА могут представлять опасность для здоровья людей и животных. Для обнаружения токсичных соединений в сырьевых материалах был разработан чувствительный и селективный метод определения ПА, основанный на ВЭЖХ-МС.

Для анализа использовались разделительные модули серии ВЭЖХ 1200 от Agilent Technologies. Эти модули состояли из системы дегазации, бинарного насоса, автоматической форсунки и термостата колонки. Также использовался одиночный квадрупольный МС-детектор (6140 Agilent Technologies). Разделение алкалоидов проводили на колонке Gemini 3 мкм NX-C18, 150 мм × 4,6 мм (Phenomenex). Колонку термостатировали при температуре 30 °С. Подвижную фазу, содержащую

0,2 % муравьиной кислоты в воде (А) и смесь метанола и ацетонитрила (1 : 1) (В), использовали в градиентном режиме следующим образом: 0–2 мин, 5,5 % В; 2–8 мин, 12 % В; 8–11 мин, 20 % В; 11–12 мин, 30 % В; 12–15 мин, 40 % В; 17–16 мин, 70 % В; 16–17 мин, 85 % В; и 17–23 мин, 5,5 % В. Скорость потока составляла 0,6 мл/мин, объем инъекции – 5 мкл. Электрораспылительная ионизация использовалась в положительном режиме, напряжение на капилляре было установлено на уровне 2000 В. Почти 41 % проанализированных образцов корма были положительными на наличие по крайней мере одного ПА.

Метод 2. Анализ фенольных соединений методом ВЭЖХ-МС в некоторых лекарственных травах

Метод был предложен в 2015 г. А. О. Матеи (A. O. Matei), Ф. Гатеа (F. Gatea) и Г. Л. Раду (G. L. Radu) (DOI: 10.1093/chromsci/bmu177). Цель исследования состояла в том, чтобы предложить простую и эффективную процедуру экстракции и разработать инновационный и селективный метод ВЭЖХ-МС для выделения фенольных соединений из экстрактов трав.

Анализ проводился на ВЭЖХ-оборудовании Shimadzu. Система была соединена с МС-детектором Shimadzu 2010 EV, оснащенным интерфейсом APCI. Данные МС были обработаны с использованием операционной системы LC–MS Solutions.

Разделение проводили с помощью колонки Kromasil C18 (5 мм, 150 мкм). Для оптимизации условий разделения тестировали различные составы подвижных фаз (вода/муравьиная кислота : метанол/муравьиная кислота при pH 2,7; вода/муравьиная кислота : метанол/муравьиная кислота при pH 3,5; 0,5 % муравьиная кислота/вода : муравьиная кислота/ацетонитрил/вода; 0,5 % муравьиной кислоты в воде : 0,5 % муравьиной кислоты в ацетонитриле при pH 4,0). Было обнаружено, что подвижная фаза состава вода + муравьиная кислота (А) : ацетонитрил + муравьиная кислота (В) при pH 4,0 является наиболее подходящей системой элюирования. Градиентные условия были следующими: 0–20 мин от 5 до 50 % В; 10 мин с 50 % В; 30–50 мин от 50 до 80 % В; 50–60 мин от 80 до 5 % В. Колонку уравнивали в течение 15 мин перед каждым анализом. Скорость потока составляла 0,2 мл/мин, объем вводимого раствора образца – 10 мл. Анализ проводили при температуре 35 °С. Усло-

вия, использованные для МС для источника АРСІ, были следующими: расход распыляющего газа (N_2) 1,5 л/мин, напряжение изогнутой линии десольвации 25 В; температура 250 °С; тепловой блок 250 °С, напряжение детектора 1,5 кВ, напряжение интерфейса 25 кВ. Для анализа с полным сканированием МС спектры записывались в отрицательном режиме в диапазоне m/z 50–700.

Метод 3. ВЭЖХ-МС исследование промежуточных продуктов изопреноидного пути

Метод предложили в 2020 г. Т. Краузе (Т. Krause), М. Райхельт (М. Reichelt), Дж. Гершензон (J. Gershenzon), А. Шмидт (А. Schmidt) (DOI: 10.1002/рса.294). Целью данного исследования была разработка чувствительного и точного аналитического метода для обнаружения и количественного определения IDP и DMADP, а также их монофосфатных производных в неочищенных растительных экстрактах. Предложенный метод ВЭЖХ-МС/МС LC впервые позволил проводить абсолютную количественную оценку уровней изопентинилдифосфата и диметилаллилдифосфата в растительных образцах. Этот метод также подходит для анализа образцов бактерий и животных, а также ферментативных анализов.

Анализ проводился на системе ВЭЖХ Agilent 1260, подключенной к триплеквадрупольному масс-спектрометру API 5000. Для разделения использовали колонку Astec Cyclobond I 2000 (4,6 мм × 250 мм, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из 50мМ-го водного раствора ацетата аммония (рН 6,5; растворитель А) и ацетонитрила (растворитель В) при скорости потока 1,0 мл/мин и температуре колонки 20 °С. Колонка была кондиционирована в соответствии с протоколом производителя перед использованием. Разделение достигали с помощью градиента, начинающегося с 20 % А, выдерживаемого в течение 15 мин, увеличивающегося до 60 % А через 15 мин, выдерживаемого в течение 7 мин, и изменения его обратно до 20 % А, выдерживаемого в течение 10 мин. Объем впрыска для образцов и стандартов составлял 5 мкл; температура авто-сэмплера составляла 4 °С. Масс-спектрометр использовался в режиме отрицательной ионизации. Оптимальные настройки были определены с использованием стандартов. Напряжение ионного распыления поддерживалось на уровне 4200 В. В качестве внутреннего стандарта использовался DMASDP. Для мониторинга образования исходного иона

анализируемого вещества в ион продукта использовали MRM. Анализ данных проводился с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 Build 1569 (AB Sciex Instruments).

Контрольные вопросы

1. Почему метод ВЭЖХ-МС подходит для анализа метаболитов разных групп?
2. На каком основании выбираются условия проведения ВЭЖХ-МС?
3. Чем отличается ВЭЖХ от ГХ?

Лабораторная работа 7 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАЗ ДАННЫХ В АНАЛИЗЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Цель: ознакомиться с работой баз данных KEGG и PubChem и выяснить запрашиваемую информацию о рутине.

Возможности, описание архитектуры и инструментов некоторых баз данных, востребованных в исследованиях вторичных метаболитов, приводятся в п. 2.

Задание. Изучите инструменты баз данных KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) и PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Заполните таблицу (для KEGG). Подготовьте отчет в электронном виде (для PubChem), выполнив поиск информации по рутину.

Характеристики рутина в универсальной базе данных KEGG

Характеристика	Рутин
Варианты соединений рутина	
Варианты гликозидов	
Ферменты	
Код в KEGG	
Код в PubChem	
Лекарственные препараты, содержащие рутин	
Молекулярная масса	
Точная масса	

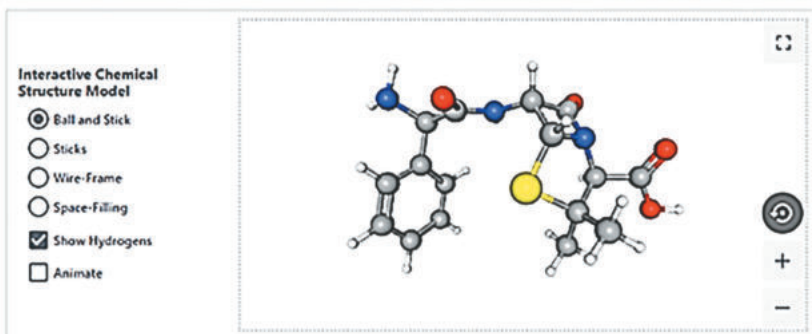


Рис. 22. Изображение модели структуры ампициллина в базе данных PubChem

4.3.3 LC-MS



Showing 2 of 84 View More

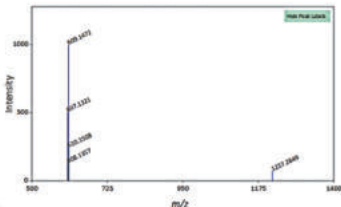
Accession ID	MSBNK-BS-BS003074
Authors	Plant Biology, The Noble Foundation, Andmore, OK, US/Dennis Fine, Daniel Wheritt, and Lloyd Sumner
Instrument	Bruker impact HD
Instrument Type	LC-ESI-QTOF
MS Level	MS
Ionization Mode	NEGATIVE
Ionization	ESI
Column Name	Waters Acquity BEH C18 1.7um x 2.1 x 150 mm
Retention Time	295.2 sec
Top 5 Peaks	609.1472 999 607.1321 506 610.1508 244 608.1357 131 1217.2849 71
SPLASH	splash10-0a4i-0000009000-270308e3f77a0404dea8
Thumbnail	

Рис. 23. Изображение спектра ВЭЖХ-МС в базе данных PubChem

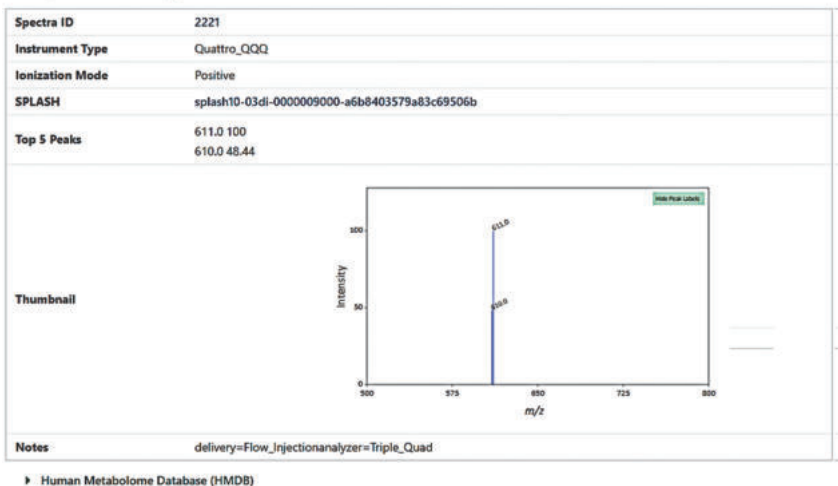
Showing 2 of 8 View More 

Рис. 24. Изображение спектра MC-MS
в базе данных PubChem

Для выполнения задания необходим персональный компьютер и устойчивое соединение с интернетом.

Отчет в электронном виде должен содержать:

- изображения моделей структуры рутина, которые присутствуют в данной базе данных (вкладка «Structures»: инструменты Ball and Stick, Sticks, Wire-Flame, Space-Filling, Show Hydrogens), выше приведен пример представления изображения моделей (рис. 22);
- перечень синонимов;
- название IUPAC;
- описание химических и физических свойств;
- образцы ВЭЖХ-МС и спектров MC-МС (изображения страниц с необходимыми спектрами приведены на рис. 23, 24).

Контрольные вопросы

1. Какие типы баз данных можно выделить?
2. В каких исследованиях применяются химические и универсальные базы данных?

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ И КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

Работа с базами данных метаболитов

1. В базе данных KEGG найдите номер в уникальном численном идентификаторе веществ, внесенных в реестр Chemical Abstracts Service (CAS) и точную массу метаболитов:

- 1) антибиотика ванкомицина;
- 2) алкалоида 4-метил-5-(2-гидроксиэтил)-тиазола;
- 3) арокаротиноида сорголактона;
- 4) флавоноида маритиметина.

2. В базе данных GMD найдите моноизотопную молекулярную массу и идентификатор MPIMP ID метаболитов:

- | | |
|----------------|--------------------------|
| 1) диосгенина; | 3) винбластина сульфата; |
| 2) триолеина; | 4) доксициклина. |

Закрытые тестовые вопросы

1. Какие типы продуктов метаболизма выделяют:

а) первичные;	в) конечные;
б) промежуточные;	г) вторичные?
2. Отметьте пути образования вторичных метаболитов:

а) путем олигомеризации или полимеризации близких по структуре мономеров через образование основной структуры, которая впоследствии может модифицироваться;
б) из предшественника – первичного метаболита, который претерпевает структурные модификации в ходе одной или нескольких реакций;
в) из двух-трех предшественников, которые модифицируются и конденсируются с образованием сложных молекул.
3. Организмы какой таксономической группы являются основными источниками вторичных метаболитов:

а) растения;	в) грибы;
б) бактерии;	г) беспозвоночные животные?

4. Какие выделяют группы вторичных метаболитов в соответствии с классификацией, учитывающей характерные особенности структуры и общности биосинтеза:

- а) фенольные соединения;
- б) нерибосомальные полипептиды;
- в) минорные группы вторичных метаболитов;
- г) изопреноиды;
- д) алкалоиды;
- е) пигменты;
- ж) производные жирных кислот и поликетиды?

5. Выберите характеристики, относящиеся к поликетидам:

- а) поликарбонильные соединения, содержащие чередующиеся карбонильные и метиленовые группы;
- б) поликарбонильные соединения, содержащие чередующиеся карбонильные и карбоксильные группы;
- в) синтезируются сложноорганизованными мультиферментными комплексами – поликетидсинтазами;
- г) синтезируются из предшественника при участии поликетидизомеразы;
- д) к этим соединениям относятся нерибосомальные пептиды;
- е) к этим соединениям относятся макролиды.

6. Какие выделяют основные группы вторичных метаболитов растений:

- а) цианогенные гликозиды; г) необычные жирные кислоты;
- б) изопреноиды; д) поликетиды;
- в) фенольные соединения; е) алкалоиды?

7. По какому пути осуществляется образование фенольных соединений:

- а) шикиматному; в) ацетатно-малонатному;
- б) мевалонатному; г) поликетидному?

8. Какая из функций вторичных метаболитов не относится к фенольным соединениям:

- а) участие в окислительно-восстановительных процессах;
- б) участие в регуляции роста и развития растений;
- в) транспортная форма азота;
- г) защитная;
- д) сигнальная;
- е) структурная?

9. По какому пути синтезируются изопреноиды в клетках животных и грибов:

- а) мевалонатному;
- б) шикиматному;
- в) ацетатно-малонатному;
- г) немевалонатному;
- д) поликетидному?

10. Отметьте основные характеристики вторичного синтеза у морских животных:

- а) происходит мозаичным путем;
- б) происходит немозаичным путем;
- в) образуются короткоживущие интермедиаты;
- г) образуются универсальные интермедиаты.

11. Какие выделяют подходы к классификации вторичных метаболитов грибов:

- а) по классам ферментов, вовлеченных в биосинтез;
- б) по типу физиологической активности;
- в) по типу предшественника – первичного метаболита?

12. В соответствии со структурной классификацией к вторичным метаболитам грибов относятся:

- а) поликетиды;
- б) нерибосомальные пептиды;
- в) необычные фенольные соединения;
- г) терпеноиды;
- д) индольные алкалоиды.

13. В ходе исследования бактерий морских видов, продуцирующих важные вторичные метаболиты, возникают следующие проблемы:

- а) таксономия бактерий морских видов крайне плохо разработана;
- б) при выращивании морских микроорганизмов в лабораторных условиях часто возникали технические вопросы поддержания оптимальных условий выращивания;
- в) высокая непредсказуемость ожидаемых результатов.

14. Отметьте характеристики обращенно-фазовой ВЭЖХ:

- а) применяются неполярная стационарная фаза и полярная или умеренно полярная подвижная фаза;
- б) применяются полярная стационарная фаза и неполярная подвижная фаза;

- в) основана на принципе гидрофильного взаимодействия;
 - г) основана на принципе гидрофобного взаимодействия;
 - д) наиболее полярный компонент анализируемой смеси будет элюироваться из колонки первым;
 - е) наиболее полярный компонент анализируемой смеси будет элюироваться из колонки последним.
15. Разработка нового метода ВЭЖХ включает следующие этапы:
- а) валидация метода;
 - б) подготовка образцов;
 - в) оптимизация метода;
 - г) выбор хроматографических условий.
16. Охарактеризуйте явление подавления ионов в ВЭЖХ-МС:
- а) сигнал компонента в смеси меньше, чем сигнал данного чистого вещества в той же концентрации;
 - б) может быть ограничением конечной чувствительности любого ВЭЖХ-МС анализа;
 - в) источниками подавления могут быть буферные растворы.

ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ И ТВОРЧЕСКИХ СООБЩЕНИЙ

1. Способы получения вторичных метаболитов растений. Способы повышения продукции вторичных метаболитов в культуре клеток.
2. Шикиматный путь биосинтеза растительных фенолов.
3. Ацетатно-малонатный путь биосинтеза фенольных соединений растений.
4. Особенности синтеза фенольных соединений разных групп. Ферменты биосинтетических путей фенолов и их локализация. Регуляция процессов образования фенольных соединений.
5. Алкалоиды: особенности структуры, химические свойства, локализация в растениях, распространенность, функции в растениях.
6. Эфирные масла, сапонины, сердечные гликозиды, смолы, каучук и гутта: химические свойства, локализация, физиологическая роль, способы получения и практическое применение.
7. Морская метагеномика. Различия в биохимии вторичных метаболитов наземных и морских организмов.

8. Морские природные соединения с противоопухолевыми свойствами. Уникальность их химической природы. Источники получения.

9. Вторичные метаболиты морских животных с обезболивающими свойствами. Пептидные токсины. Механизм действия.

10. Вторичные метаболиты морских животных с противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами.

11. Антивирусные и противомикробные вторичные метаболиты, продуцируемые морскими животными: источники получения.

12. Генетическая регуляция биосинтеза вторичных метаболитов морских животных. Особенности биохимии наиболее практически важных вторичных метаболитов.

13. Кластерный принцип организации генов, ответственных за вторичный синтез у грибов. Биоинформатика и предсказание генов синтеза вторичных метаболитов грибов.

14. Вторичные метаболиты бактерий: распространенность, функции, значение.

15. Методы и принципы выделения вторичных метаболитов из сырья. Выбор технологии экстракции.

16. Особенности извлечения вторичных метаболитов из микроорганизмов. Тушение метаболизма и экстракция метаболитов. Требования к процедуре тушения. Выбор метода тушения.

17. Масс-спектрометрическое детектирование с использованием квадрупольных масс-спектрометров (Q, QQQ) и ионных ловушек (i-TRAP).

18. Масс-спектрометрическое детектирование с использованием высокоточного времяпролетного масс-спектрометра (TOF), масс-анализатора ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (FTICR).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барам, Г. И. ВЭЖХ для всех : курс лекций / Г. И. Барам. – Новосибирск : ЭкоНова, 2007. – 117 с.

Биохимия растений / Л. А. Красильникова [и др.]. – Ростов н/Д ; Харьков : Феникс : Торсинг, 2004. – 224 с.

Блажей, А. Фенольные соединения растительного происхождения / А. Блажей, Л. Шутый. – М. : Мир, 1968. – 239 с.

Вольнец, А. П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений / А. П. Вольнец. – Минск : Беларус. навука, 2013. – 283 с.

Желдакова, Р. А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов : учеб.-метод. комплекс / Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2004. – 111 с.

Лукнер, М. Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных / М. Лукнер. – М. : Мир, 1979. – 548 с.

Основы биохимии вторичного обмена растений : учеб.- метод. пособие / Г. Г. Борисова [и др.] ; под общ. ред. Г. Г. Борисовой. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2014. – 128 с.

Основы масс-спектрометрии органических соединений / В. Г. Заикин [и др.]. – М. : Наука, 2001. – 286 с.

Рогожин, В. В. Практикум по биологической химии : учеб.-метод. пособие / В. В. Рогожин. – СПб. : Лань, 2006. – 256 с.

Стоник, В. А. Морские природные соединения. Путь к новым Лекарственным препаратам. Обзоры / В. А. Стоник // Acta Naturae. – 2009. – № 2. – С. 16–27.

Филипцова, Г. Г. Биохимия растений : учеб. пособие / Г. Г. Филипцова. – Минск : БГУ, 2022. – 251 с.

Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – М. : Медицина, 2005. – 832 с.

Шатц, В. Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / В. Д. Шатц, О. В. Сахартова. – Рига : Зинатне, 1988. – С. 390.

Яковлев, Г. П. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения (3-е издание) / Г. П. Яковлев. – СПб. : СпецЛит, 2013. – 847 с.

Analysis of the isoprenoid pathway intermediates, di-methylallyl diphosphate and isopentenyl diphosphate, from crude plant extracts by liquid chromatography tandem

mass spectrometry / T. Krause [et al.] // *Phytochemical Analysis*. – 2020. – Vol. 31, iss. 6. – P. 770–777. – DOI: 10.1002/pca.2941.

Badal, S. Pharmacognosy. Fundamentals, Applications and Strategies / S. Badal, R. Delgoda. – Academic Press, 2017. – 738 p.

Biomimetic synthetic studies on meroterpenoids from the marine sponge *Aka coralliphaga*: Divergent total syntheses of siphonodictyal B, liphagal and corallidictyals A–D / K. K. W. Kuan [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 27, iss. 12. – P. 2449–2465. – DOI: 10.1016/j.bmc.2019.02.038.

Bird, I. M. High Performance Liquid Chromatography: Principles and Clinical Applications / I. M. Bird // *British Medical Journal*. – 1989. – Vol. 299, iss. 6702. – P. 783–787.

Demain, A. L. The natural functions of secondary metabolites / A. L. Demain, A. Fang // *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. – 2000. – Vol. 69. – P. 1–39.

Fox, E. M. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology / E. M. Fox, B. J. Howlett // *Current Opinion in Microbiology*. – 2008. – Vol. 11. – P. 481–487.

GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database / J. Kopka [et al.] // *Bioinformatics*. – 2005. – Vol. 21, iss. 8. – P. 1635–1638. – DOI: 10.1093/bioinformatics/bti236.

Hanson, J. R. Natural Products: the Secondary Metabolites / J. R. Hanson. – Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 2003. – 157 p.

Hanson, J. R. The Chemistry of Fungi. 1st Edition / J. R. Hanson. – Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 2008. – 240 p.

High performance liquid chromatography: a short review / R. Malviya [et al.] // *Journal of Global Pharma Technology*. – 2010. – Vol. 2, iss. 5. – P. 22–26.

Kanehisa, M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes / M. Kanehisa, S. Goto // *Nucleic acids research*. – 2000. – Vol. 28. – P. 27–30.

Kedare, S. B. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay / S. B. Kedare, R. P. Singh // *J. Food Sci. Technol.* – 2011. – Vol. 48, № 4. – P. 412–422. – DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1.

Keller, N. Fungal secondary metabolism – From biochemistry to genomics / N. Keller, G. Turner, J. W. Bennett // *Nature Reviews Microbiology*. – 2006. – Vol. 3, № 12. – P. 937–947.

Kim, S. PubChem Substance and Compound databases / S. Kim, P. A. Thiessen, J. Chen // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, iss. D1. – DOI: 10.1093/nar/gkv951.

Kowalczyk, E. Use of a new LC-MS method for the determination of pyrrolizidine alkaloids in feeds / E. Kowalczyk, K. Kwiatek // *J Vet Res*. – 2018. – № 62. – P. 183–191. – DOI: 10.2478/jvetres-2018-0028.

Lohvina, H. Effect of ethanol solvents on total phenolic content and antioxidant properties of seed extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties and

determination of phenolic composition by HPLC-ESI-MS / H. Lohvina, S. Makai, M. Wink // *Diversity*. – 2022. – Vol. 14 (1). – P. 7. – DOI: 10.3390/d14010007.

Matei, A. O. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC–MS / A. O. Matei1, F. Gatea1, G. L. Radu // *Journal of Chromatographic Science*. – 2015. – № 53. – P. 1147–1154. – DOI: 10.1093/chromsci/bmu177.

McMurry, J. E. Organic chemistry with biological applications / J. E. McMurry // *Secondary Metabolites: An Introduction to Natural Products Chemistry*. – Stamford, USA : Cengage Learning Ltd. – 2015. – P. 1016–1046.

Pitt, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry / J. J. Pitt // *Clin Biochem Rev*. – 2009. – Vol. 30. – P. 19–34.

Slinkard, K. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods K. Slinkard, V. L. Singleton // *American journal of enology and viticulture*. – 1977. – Vol. 28. – P. 49–55.

Tanabe, M. Using the KEGG Database Resource / M. Tanabe, M. Kanehisa // *Current protocols in bioinformatics*. – 2012. – Vol. 38, iss. 1. – P. 1.12.1–1.12.43. – DOI: 10.1002/0471250953.bi0112s38.

Tarkowska, D. A Fast and Reliable UHPLC–MS/MS-Based Method for Screening Selected Pharmacologically Significant Natural Plant Indole Alkaloids / D. Tarkowska // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, iss. 14, 3274. – DOI: 10.3390/molecules25143274.

Vidushi, Y. A review on HPLC method development and validation / Y. Vidushi, B. Meenakshi // *RJLBPCS*. – 2017. – Vol. 2, iss. 6. – P. 166–178. – DOI: 10.26479/2017.0206.12.

Vijayakumar, R. Secondary Metabolites: Sources and Applications / R. Vijayakumar, S. S. S. Raja. – London : IntechOpen, 2018. – 137 p.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. ОСНОВЫ БИОХИМИИ	
ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА	6
1.1. Характеристика процессов вторичного метаболизма.....	6
1.2. Химизм реакций вторичного метаболизма	11
1.3. Классификация вторичных метаболитов	13
1.4. Вторичные метаболиты растений.....	19
1.5. Вторичные метаболиты морских беспозвоночных животных.....	32
1.6. Вторичные метаболиты грибов.....	39
1.7. Вторичные метаболиты бактерий.....	41
2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ.....	45
2.1. Общая характеристика этапов анализа	45
2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография	47
2.3. Процесс разработки метода ВЭЖХ	54
2.4. Характеристика тандемной масс-спектрометрии	62
2.5. Подход к созданию протокола ВЭЖХ-МС	70
2.6. Пример разработки методики ВЭЖХ-МС для скрининга фармакологически значимых растительных индольных алкалоидов.....	77
2.7. Обработка данных и интерпретация результатов анализа метаболитов. Применение баз данных в исследовании вторичных метаболитов.....	85
2.8. База данных PubChem	87
2.9. База данных GOLM	91
2.10. База данных KEGG.....	94

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1	
ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭКСТРАКТОВ.....	103
Лабораторная работа 2	
АНАЛИЗ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ.....	106
Лабораторная работа 3	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ ЭКСТРАКТОВ	
МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	109
Лабораторная работа 4	
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ФЕНОЛЬНЫХ	
СОЕДИНЕНИЙ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ	113
Лабораторная работа 5	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ	116
Лабораторная работа 6	
АНАЛИЗ МЕТОДОВ ВЭЖХ-МС	119
Метод 1. Использование ВЭЖХ-МС для определения	
пирролизидиновых алкалоидов в кормах	120
Метод 2. Анализ фенольных соединений методом ВЭЖХ-МС	
в некоторых лекарственных травах	121
Метод 3. ВЭЖХ-МС исследование промежуточных продуктов	
изопреноидного пути	122
Лабораторная работа 7	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАЗ ДАННЫХ	
В АНАЛИЗЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ	123
ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ	
И КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ.....	126
Работа с базами данных метаболитов	126
Закрытые тестовые вопросы.....	126
ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ И ТВОРЧЕСКИХ СООБЩЕНИЙ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131

Учебное издание

Логвина Анна Олеговна

**БИОХИМИЯ
ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ**

Учебно-методическое пособие

Редактор *Ж. В. Запартыко*
Художник обложки *М. А. Сарасек*
Технический редактор *В. П. Явуз*
Компьютерная верстка *С. Н. Егоровой*
Корректор *А. О. Самойленко*

Подписано в печать 15.03.2023. Формат 60×84/16.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 7,90.
Уч.-изд. л. 8,37. Тираж 60 экз. Заказ 108.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.