

**ПРИБОРОСТРОЕНИЕ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ**

УДК 543 + 544.173 + 504.064

© Е. Н. Чернова, Я. В. Русских, Е. П. Подольская, З. А. Жаковская

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОЦИСТИНОВ И АНАТОКСИНА-А МЕТОДОМ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
НИЗКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

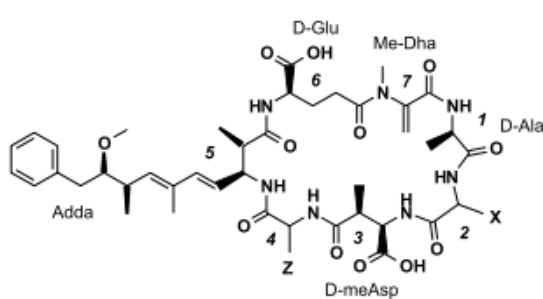
Предложен вариант метода детектирования микроцистинов и анатоксина-а, основанный на их специфической фрагментации при тандемном масс-спектрометрическом анализе, с применением масс-спектрометрии низкого разрешения. Приведены значения m/z , структура диагностических ион-продуктов и тандемные спектры для 9 вариантов наиболее распространенных микроцистинов. На основании полученных фрагментных масс-спектров и систематизированных литературных данных предложена новая классификация ион-продуктов микроцистинов, значительно облегчающая процедуру их идентификации и позволяющая по набору диагностических фрагментов установить структуру разных вариантов микроцистинов без использования стандартных соединений. Представленный метод исследования микроцистинов и анатоксина-а с помощью масс-спектрометрии низкого разрешения может быть рекомендован как для качественного, так и количественного определения указанных цианобактериальных метаболитов в биомассе цианобактерий, в природной и питьевой воде в отсутствие полного набора стандартных соединений.

Кл. сл.: микроцистины, анатоксин-а, жидкостная хроматография, тандемная масс-спектрометрия низкого разрешения, диагностические ион-продукты, идентификация

ВВЕДЕНИЕ

С каждым годом проблема цианобактериальных "цветений" становится все более значимой, особенно для водохранилищ, лагун и водоемов рекреационного использования европейской территории России. Активная вегетация сине-зеленых водорослей (цианобактерий) часто приводит к появлению в воде токсичных метаболитов

цианобактерий — цианотоксинов, опасных для здоровья и жизни людей и животных. В пресноводных водоемах европейской части России наиболее распространены цианобактериальные нейротоксины (анатоксины) и гепатотоксины (микроцистины) [1–7]. К микроцистинам (МЦ) относятся более 80 циклических гептапептидов (рис. 1) с молекулярными массами в интервале 900–1150 Да.



Положение в цикле	Возможные варианты аминокислот
1	Ala, Leu, Ser
2	Leu, Ala, Arg, Glu, H ₄ Tyr, Hil, Hph, Hty, Phe, Trp, Tyr
3	MeAsp, Asp
4	Ala, Aba, Arg, Glu, Har, Met, Phe, Tyr, Val
5	Adda, DMAAdda, ADMAAdda
6	Glu, MeGlu
7	MDha, MDhb, MeSer, Dhb

Рис. 1. Общая структура микроцистинов и установленные варианты аминокислотных последовательностей для каждой позиции пептидного кольца микроцистинов.

Вариабельные L-аминокислоты в положениях 2 и 4 на рисунке обозначены X и Z соответственно [8, 9]

Наиболее токсичным на сегодняшний день признан микроцистин MC-LR; рекомендуемая величина предельно допустимого его содержания в питьевой воде — 1 мкг/л; для рекреационных вод — 20 мкг/л [10]. Однако нормирование и определение содержания только одного представителя микроцистинов является не совсем правильным, т. к. другие микроцистины могут присутствовать в значительно большем количестве и обладать сравнимой суммарной токсичностью. Установлено, что токсичность различных представителей микроцистинов варьируется в диапазоне LD₅₀ (мышь, i. p.) от 50 мкг/кг (MC-LR) до более 1 мг/кг (для линейных структур MC) [11], причем смесь микроцистинов может обладать более токсичным действием, чем отдельные представители [12]. В связи с этим наряду с MC-LR целесообразно проводить детектирование и других представителей микроцистинов. Кроме того, среди нейротоксичных метаболитов наиболее часто встречается низкомолекулярный алкалоид анатоксин-а, который относят к соединениям, называемым "фактором быстрой смерти" [13], и при детектировании которого зачастую возникают затруднения [14].

В настоящее время опубликован ряд статей, описывающих различные подходы масс-спектрометрической идентификации и детектирования микроцистинов. Для количественного определения рассматриваемых токсичных соединений наиболее часто используют масс-спектрометрические методы [15, 16]. Метод определения микроцистинов и анатоксина-а с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения (30 000 и выше) хорошо подходит для исследовательских целей [17, 18]. Однако стоимость приборов высокого разрешения достаточно высока, поэтому для рутинного анализа чаще используют более доступные приборы низкого разрешения с возможностью регистрации тандемных масс-спектров [8, 19, 20]. В этом случае идентификацию обычно проводят с использованием режима мониторинга заданных реакций (МЗР-переходов, MRM), обеспечивающего высокую чувствительность и хорошую воспроизводимость анализа. Для проведения исследования с помощью масс-спектрометров низкого разрешения необходимы стандартные соединения. На настоящий момент коммерчески доступны стандарты только 10 микроцистинов, что значительно ограничивает возможности применения таких приборов для широкого скрининга микроцистинов.

В последнее время много внимания уделяется проблеме интерпретации масс-спектрометрических данных и получения надежных результатов [21, 22]. С учетом современных требований к проведению идентификации с использованием прибо-

ров низкого разрешения в режиме МЗР-переходов анализируемое соединение (аналит) считается идентифицированным при соблюдении трех критериев:

- его время удерживания на колонке совпадает с таковым для стандартного соединения;
- присутствует не менее двух диагностических (характеристичных) ион-продуктов (для количественного и подтверждающего переходов);
- величина соотношения интенсивностей выбранных сигналов совпадает с установленным для стандартного соединения для используемого прибора в выбранных условиях анализа [22].

Поскольку молекулы микроцистинов представляют собой циклические пептидные структуры, то в тандемном масс-спектре присутствует достаточное количество ион-продуктов с различной интенсивностью сигналов, зависящей от применяемого оборудования и его настроек. При оптимизации метода детектирования с помощью масс-спектрометров низкого разрешения осуществляется выбор диагностических ион-продуктов в применяемых условиях проведения анализа. В связи с этим была бы полезна максимально полная информация о наборе диагностических ион-продуктов и систематизация приведенных в литературе данных для разработки схемы идентификации различных вариантов микроцистинов.

Таким образом, целью нашей работы было предложить вариант метода определения MC в объектах окружающей среды, основанный на их специфической фрагментации с учетом структурных различий индивидуальных представителей микроцистинов, при использовании более доступных масс-спектрометров низкого разрешения. Также предполагалась разработка классификации ион-продуктов по структурным фрагментам для идентификации вариантов микроцистинов в отсутствие стандартных соединений.

Данное исследование выполнено на примере анатоксина-а и смеси наиболее распространенных в водоемах умеренных широт (MC-LR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp³]MC-LR и [D-Asp³]MC-RR, MC-LY, MC-LA, MC-LW, MC-LF) микроцистинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Используемые реактивы: ацетонитрил сорта "0" (Криохром); метанол марки LC-MS CHROMASOLV (Fluka); вода, очищенная с помощью системы Direct-Q (Millipore, электропроводность 0.056 мкСм/см при 250 °С); муравьиная кислота (Merck, 98–100 % для анализа). Стандарты: анатоксин-а-фумарат фирм A. G. Scientific, Inc. CA и TOCRIS bioscience UK,

смесь микроцистинов -LR, -RR, -YR (фирмы SigmaAldrich), а также стандартные соединения микроцистинов -LY, -LA, -LW, -LF, [D-Asp³]MC-LR и [D-Asp³]MC-RR (фирмы EnzoLifesciences Inc., New York, USA).

Работа выполнена с использованием линейной ионной ловушки хромато-масс-спектрометра LTQXLOrbitrap (ThermoFinnigan) для эмулирования режима низкого разрешения. Данный прибор является комбинацией высокоэффективного жидкостного хроматографа и тандемного масс-спектрометра, состоящего из двух видов ионных ловушек. Конфигурация прибора позволяет проводить разделение ионов как в линейной ионной (низкое разрешение, полный MCⁿ-спектр), так и в орбитальной ловушке с Фурье-преобразователем (высокое разрешение, полный MCⁿ-спектр с высокой точностью определения масс). Кроме того, линейная ионная ловушка может работать как отдельный прибор с низким разрешением, и с ее помощью можно получать информацию о фрагментации соединений [23, 24].

Подбор условий хроматографического разделения и оптимизацию параметров масс-спектрометрического детектирования проводили с использованием растворов стандартных соединений (100 нг/мл в метаноле). Для оптимального хроматографического разделения смеси микроцистинов на обращенно-фазовой колонке лучше всего подходит модифицирующая добавка трифторуксусной кислоты (ТФУ). Однако ТФУ может вызывать подавление ионизации при масс-спектрометрическом анализе [25, 26], поэтому в данной работе применяли в качестве подвижной фазы смесь воды и ацетонитрила с добавкой 0.05 об.% муравьиной кислоты, которая не оказывает влияния на ионизацию [27]. Так как микроцистины представляют собой группу соединений, отличающихся по своим физико-химическим свойствам, их разделение проводили в градиентном режиме в широком интервале органического компонента подвижной фазы на хроматографической колонке Thermo Hypersil Gold 100 × 3 мм, 3 мкм. Первые десять минут хроматографирования применяли изократический режим при 5 % органической фазы для элюирования анатоксина-а с дальнейшим нарастанием органического компонента до 75 % за 18 мин, затем для очистки колонки от гидрофобных матричных соединений содержание ацетонитрила повышали до 95 %. Уравновешивание колонки проводили при начальных условиях анализа в течение 7 мин. Скорость потока составляла 0.2 мл/мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили в условиях электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов. Масс-хроматограмма была разделена на 2 сегмента. Сканируемый диапазон масс (полный ионный ток) (*m/z*) в первом сегменте составлял 160–200,

во втором — 510–550 и 970–1100. Температура ионного источника 320 °С, поток газа-носителя (азот) 25 arb un., напряжение ISpray 3.2 кВ. В режиме эмулирования низкого разрешения масс-спектрометрический анализ проводили с использованием линейной ионной ловушки. Фрагментацию проводили с использованием ДИС-режима ("диссоциация, индуцируемая соударениями"). Величина энергии фрагментации (в %) и напряжение на линзах составляли 35 % и 20 В — для анатоксина-а, 25 % и 35 В — для аргинин-содержащих микроцистинов, 35 % и 45 В — для лейцин-содержащих. Масс-спектры записывали в двух режимах: сканирование ионного тока в выбранных диапазонах *m/z* и регистрация полных тандемных масс-спектров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура микроцистинов

Общая структура микроцистинов содержит цикл из семи аминокислот, пять из которых постоянны в составе соединений этого класса, включая характеристическую Adda-кислоту (3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеновая кислота), а две L-аминокислоты в положениях 2 и 4 переменны (рис. 1). Общепринятые аббревиатуры переменных аминокислот указываются в качестве суффикса в названии микроцистина. Так, в структуре наиболее известного и токсичного представителя микроцистинов MC-LR (молекулярная масса 994) присутствуют лейцин (Leu → L) во втором положении и аргинин (Arg → R) в четвертом.

В структуре других представителей микроцистинов могут содержаться следующие L-аминокислоты: тирозин (Tyr, Y), гомотирозин (Hty), фенилаланин (Phe, F), метионин (Met, M), триптофан (Trp, W), аланин (Ala, A) или гомоаргинин (Hag) (рис. 1) [8, 9]. В десяти из установленных структур встречаются модификации в Adda-кислоте в пятом положении: либо деметилирование по метокси-группе (DMAdda), либо ее замена на ацетокси-группу (ADMAdda). Другие модификации в структуре микроцистинов могут быть вызваны деметилированием метилдегидробутирина (methyldehydrobutyrine, Mdha) в 7 положении, с образованием дегидробутирина (dehydrobutyrine, Dhb), замена на N-метилсерин (methylserine, MeSer); деметилированием в третьем положении метиласпарагиновой кислоты (MeAsp). Модификации в положениях 1, 3, 5, 6 и 7 отражаются в названии микроцистинов введением стандартной аббревиатуры замещающей аминокислоты с указанием номера ее положения в кольце. Например, [D-Asp³]MC-LR [28].

Табл. 1. Возможные варианты детектируемых наиболее интенсивных молекулярных ионов микроцистинов при электрораспылительной ионизации [29]

Микроцистин	Регистрируемые значения m/z	Детектируемый ион
MC-LR	995.56	$[M+H]^+$
$[D-Asp^3]MC-LR$	981.54	$[M+H]^+$
MC-RR	519.78 / 1038.57	$[M+2H]^{2+}$, $[M+H]^+$
$[D-Asp^3]MC-RR$	512.78 / 1024.56	$[M+2H]^{2+}$, $[M+H]^+$
MC-YR	1045.54	$[M+H]^+$
MC-LF	986.52 / 1008.51	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$
MC-LY	1002.52 / 1024.50	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$
MC-LW	1025.53 / 1047.52	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$

Условно микроцистины разделяют на две группы — по содержанию в них аргинина в четвертом положении, поскольку это оказывает значительное влияние на их физико-химические свойства. Так, содержащие аргинин проявляют гидрофильные свойства, а не содержащие — гидрофобные. К гидрофобным, например, относят микроцистин MC-LF (m/z 986) и MC-LW (m/z 1025), в структуре которых аргинин в положении 4 заменен соответственно на фенилаланин Phe (F) и триптофан Trp (W).

Масс-спектрометрическое детектирование микроцистинов

Вследствие различий в структурах микроцистинов ионизация их молекул может протекать по-разному. В масс-спектрах большинства микроцистинов регистрируется преимущественно достаточно интенсивный сигнал, соответствующий протонированной молекуле ($[M+H]^+$). В масс-спектре микроцистинов, содержащих в своей структуре два аргинина (микроцистин-RR и его метилированные и деметилированные формы), чаще наблюдается наиболее интенсивный сигнал, соответствующий двузарядному молекулярному иону ($[M+2H]^{2+}$).

При выполнении масс-спектрометрического анализа возможно образование различных заряженных аддуктов, например с натрием, поэтому необходимо учитывать, что при ионизации молекулы аналита не всегда наибольшую интенсивность имеет сигнал протонированного молекулярного иона. Так, для ряда "гидрофобных" микроцистинов некоторые исследователи отмечают ин-

тенсивный сигнал с m/z , соответствующий ионному аддукту молекулы с натрием ($[M+Na]^+$) (табл. 1) [29].

С целью установления наиболее интенсивных сигналов, соответствующих молекулярному иону, анализировали раствор стандартов с концентрацией каждого соединения 100 нг/мл (ввод 10 мкл) при сканировании полного ионного тока в вероятном диапазоне масс для изучаемых соединений (m/z 510–550 для двузарядных молекулярных ионов микроцистинов и m/z 970–1100 — для однозарядных ионов и возможных ионных аддуктов с натрием). Наиболее интенсивные сигналы двузарядных молекулярных ионов были отмечены для MC-RR и $[D-Asp^3]MC-RR$. Для остальных изучаемых соединений наблюдали максимальные сигналы однократно протонированных молекул. Интенсивных сигналов, соответствующих ионным аддуктам с натрием, детектировано не было.

При анализе растворов стандартных веществ были установлены времена удерживания аналитов. Пример разделения смеси микроцистинов и полученные значения площадей пиков аналитов представлены на рис. 2. Как видно из приведенной масс-хроматограммы с обращенно-фазовой хроматографической колонки, в примененном градиентном режиме сначала элюируются "гидрофильные", а затем "гидрофобные" микроцистины. Установленный порядок удерживания будет соблюдаться при использовании обращенно-фазовой колонки и выбранной подвижной фазы. Следует отметить, что при равных концентрациях в растворе стандартов регистрируемая площадь сигналов аналитов в режиме сканирования полного ионного тока отличалась, что подтверждает необходимость

применения стандартных растворов для проведения количественного анализа. Максимальная площадь сигнала отмечалась для дважды протонированных молекул MC-RR и [D-Asp³]MC-RR. В то же время масс-спектрометрические сигналы молекулярных ионов гидрофобных микроцистинов обладали сравнительно меньшей интенсивностью по сравнению с сигналом молекулярного иона MC-LR.

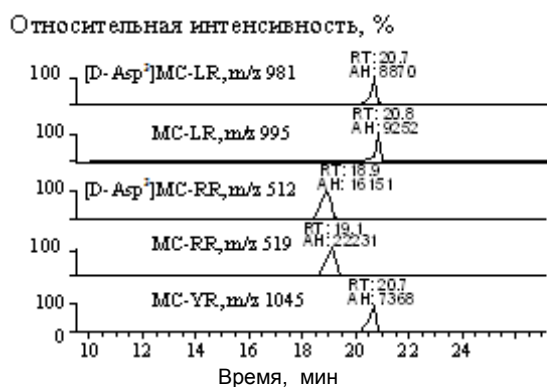
Фрагментация микроцистинов

В настоящей работе обсуждается фрагментация микроцистинов, полученная с использованием ли-

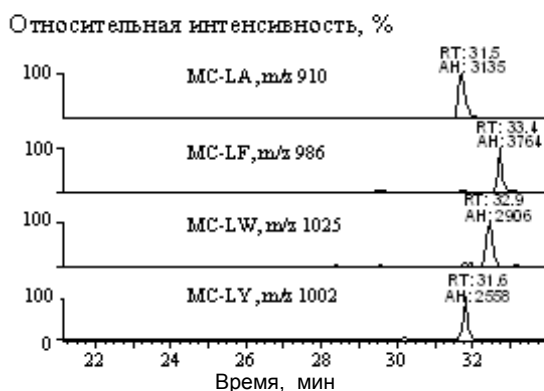
нейной ловушки низкого разрешения LTQOrbitrap в режиме сканирования полного масс-спектра ион-продуктов. Примеры полученных спектров представлены на рис. 3, 4. Рассмотрим фрагментацию микроцистина-LR, признанного наиболее токсичным [8] (рис. 3, а). Некоторые ион-продукты, расположенные в области масс-спектра до m/z 450, характерны для всех микроцистинов с немодифицированной Adda-кислотой. Например, m/z 135, соответствующий отщеплению PhCH₂CH(OCH₃)-фрагмента Adda-кислоты [C₉H₁₁O]⁺; m/z 155 [Mdha-Ala+H]⁺; m/z 163 [C₁₁H₁₅O]⁺; m/z 213 [Glu-Mdha+H]⁺; m/z 284 [Ala-Mdha-Glu+H]⁺; m/z 375 [C₁₁H₁₅O-Glu-Mdha]⁺, m/z 446 [C₁₁H₁₅O-Glu-Mdha-Ala]⁺ [20, 23]. Однако не все они обладают достаточной интенсивностью сигнала для использования в качестве ион-продукта для количественного перехода. Поэтому некоторые исследователи проводят количественный расчет по сигналу, соответствующему заряженной молекуле, а диагностические ион-продукты, получаемые в МЗР, используют только для подтверждения [19]. Однако такой подход применим только в том случае, когда в матрице не присутствуют близкие к аналитам по молекулярной массе соединения.

Другими диагностическими ион-продуктами MC-LR (структура фрагмента включает и Leu, и Arg) являются m/z 682 [Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg+H]⁺, m/z 553 [Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg+H]⁺, m/z 525 [Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg+H-CO]⁺ и m/z 470 [Ala-Leu-MeAsp-Arg+H]⁺ или [Arg-Adda+H]⁺. Поскольку аминокислота аргинин присутствует в структуре MC-LR, его масс-спектр фрагментации также содержит диагностические ионы аргинин-содержащих "гидрофильных" микроцистинов при m/z 866 [Arg-Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu+H]⁺ или [Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-Adda+H]⁺, m/z 728 [MeAsp-Arg-Adda-Glu+H]⁺, m/z 710 [MeAsp-Arg-Adda-Glu+H-H₂O]⁺, m/z 599 [Arg-Adda-Glu+H]⁺, m/z 571 [Arg-Adda-Glu+H-CO]⁺, m/z 286 [MeAsp-Arg+H]⁺ и m/z 174 [Arg-NH₃+H]⁺.

Характеристические ион-продукты, образующиеся в результате отщепления малых молекул от MC-LR с m/z 978 [M+H-NH₃]⁺, m/z 977 [M+H-H₂O]⁺, m/z 967 [M+H-CO]⁺ и m/z 951 [M+H-CO₂]⁺, отличаются наиболее интенсивными сигналами в фрагментарном спектре MC-LR. Однако такая фрагментация может протекать для любой органической молекулы такой же массы и имеющей в своем составе гидрокси-, амино- и карбонильные функциональные группы (что



а



б

Рис. 2. Хромотограммы раствора смеси стандартов микроцистинов (MC-LR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp³]MC-LR, [D-Asp³]MC-RR, MC-LY, MC-LA, MC-LW, MC-LF).

Масс-хроматограммы зарегистрированы по соответствующим выделенным протонированным молекулам. Разделение проводили в градиентном режиме на колонке ThermoHypersilGold 100×3 мм, 3 мкм, при скорости потока 0.2 мл/мин. Подвижные фазы — вода и ацетонитрил, обе с добавкой муравьиной кислоты.

Масс-спектрометрический анализ: электрораспылительная ионизация в режиме регистрации положительных ионов при сканировании полного ионного тока

вполне вероятно для органической молекулы), поэтому подобные ион-продукты не рекомендуется выбирать в качестве диагностических.

Аналогичным образом был проведен анализ полученных тандемных масс-спектров для остальных исследуемых микроцистинов. Так как закономерности фрагментации "гидрофильных" (рис. 3) и "гидрофобных" (рис. 4) представителей микроцистинов значительно отличаются, получаемые фрагментарные ионы условно можно разделить на несколько групп:

- принадлежащие большинству микроцистинов

(фрагмент содержит аминокислоты, не являющиеся переменными, т. е. все кроме аминокислот в положениях 2 и 4), исключая метилированные и деметилированные формы;

- фрагменты, содержащие аминокислоты либо в положении 2 лейцин ("гидрофобные"), либо в положении 4 аргинин ("гидрофильные");
- диагностические фрагменты, характеризующие индивидуального представителя.

То есть, исходя из структуры возможных диагностических ион-продуктов и значений их m/z , все

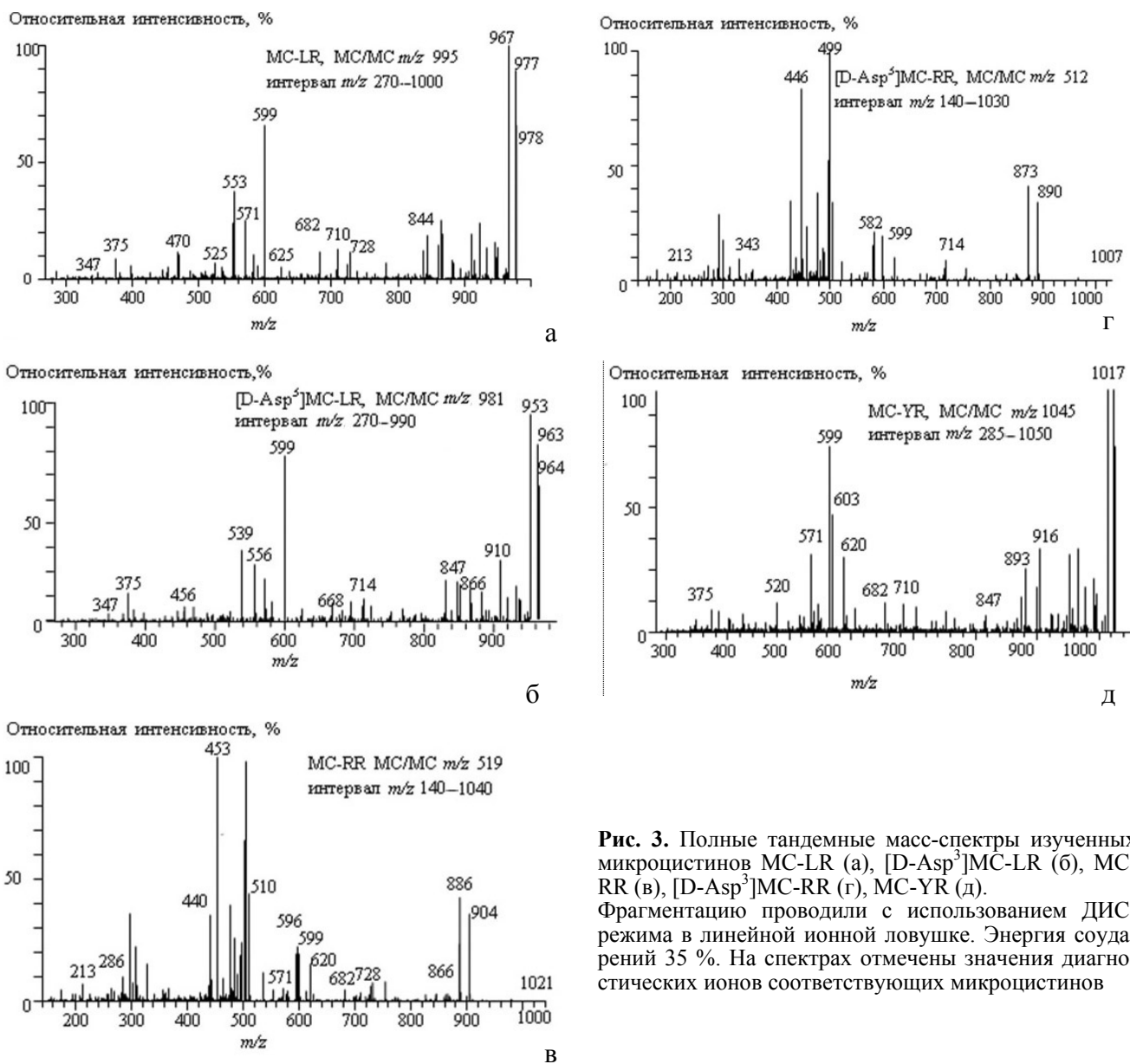


Рис. 3. Полные тандемные масс-спектры изученных микроцистинов MC-LR (а), [D-Asp⁵]MC-LR (б), MC-RR (в), [D-Asp⁵]MC-RR (г), MC-YR (д). Фрагментацию проводили с использованием ДИС-режима в линейной ионной ловушке. Энергия соударений 35 %. На спектрах отмечены значения диагностических ионов соответствующих микроцистинов

диагностические ион-продукты можно разделить по группам, представленным в табл. 2, 3. При интерпретации фрагментных масс-спектров следует учитывать, что вследствие различной интенсивности сигналов, представленных в таблицах ионов, не все перечисленные сигналы могут присутствовать в спектрах соответствующей им группы мик-

роцистинов. Модификации в рассматриваемой аминокислотной последовательности (например, деметилирование аспарагиновой кислоты в положении 3) будут изменять набор значений m/z диагностических фрагментов (вследствие изменения модифицированного участка фрагмента).

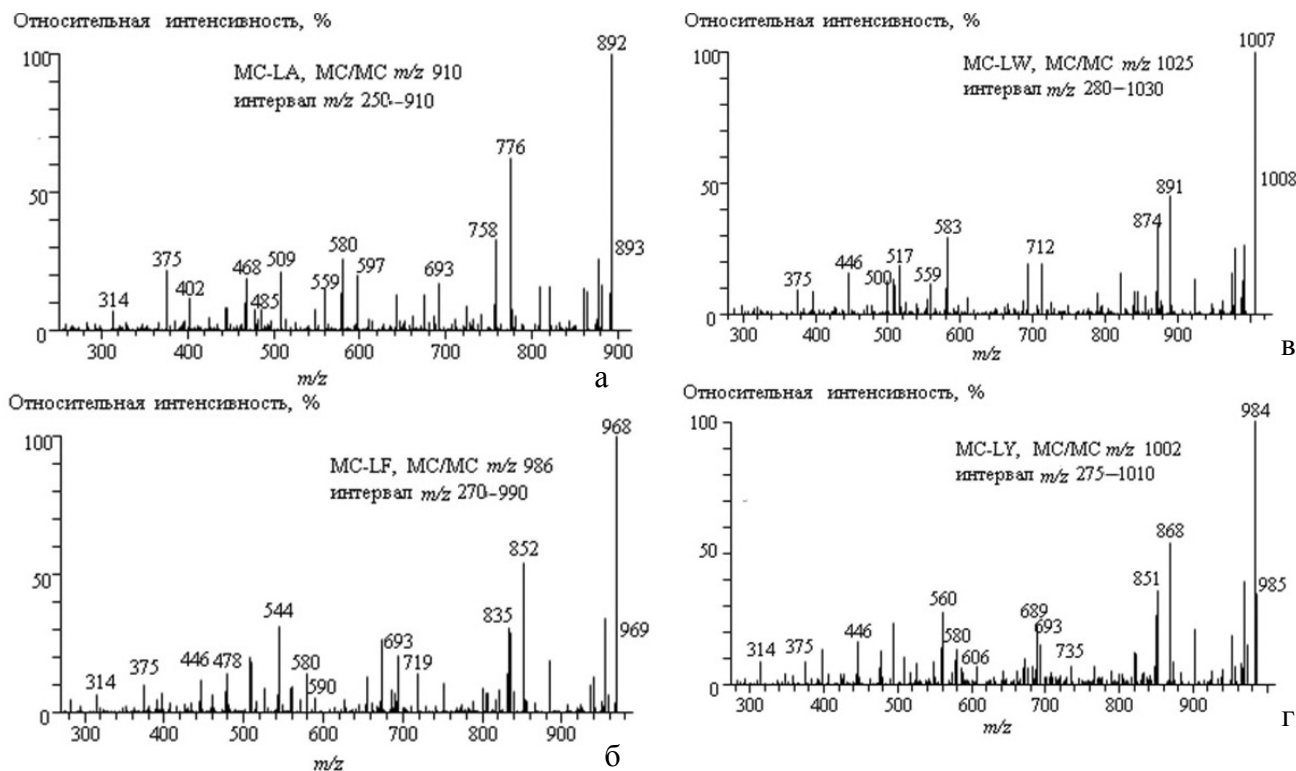


Рис. 4. Полные тандемные масс-спектры изученных микроцистинов MC-LA (а), MC-LF (б), MC-LW (в), MC-LY (г). Фрагментацию проводили с использованием ДИС-режима в линейной ионной ловушке. Энергия соударений 35 %. На спектрах отмечены значения диагностических ионов соответствующих микроцистинов

Табл. 2. Диагностические ион-продукты с рассчитанной величиной m/z для идентификации MC

Для всех MC с немодифицированной Adda-кислотой			
m/z	Фрагментный ион	m/z	Фрагментный ион
580	$[Adda-Glu-Mdha-Ala+H]^+$	509	$[Adda-Glu-Mdha+H]^+$
446	$[C_{11}H_{15}O-Glu-Mdha-Ala]^+$	375	$[C_{11}H_{15}O-Glu-Mdha]^+$
284*	$[Ala-Mdha-Glu+H]^+$	213*	$[Glu-Mdha+H]^+$

Табл. 2. Продолжение

Для всех МС с немодифицированной Adda-кислотой			
<i>m/z</i>	Фрагментный ион	<i>m/z</i>	Фрагментный ион
163*	$[C_{11}H_{15}O]^+$	155*	$[Mdha-Ala+H]^+$
135*	$[C_9H_{11}O]^+$	–	–
Для лейцинсодержащих МС			
693	$[Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu+H]^+$	559	$[C_{11}H_{15}O-Glu-Mdha-Ala-Leu]^+$
Для аргининсодержащих МС			
728	$[MeAsp-Arg-Adda-Glu+H]^+$	710	$[MeAsp-Arg-Adda-Glu-H_2O+H]^+$
682	$[Arg-Adda-Glu-Mdha+H]^+$	599	$[Arg-Adda-Glu+H]^+$
470	$[Arg-Adda+H]^+$	453	$[Arg-Adda+H-NH_3]^+$

Примечание. * — значения *m/z* описаны в литературных данных [8, 23, 28], но не были детектированы в тандемных масс-спектрах, полученных в условиях нашего исследования

Табл. 3. Диагностические ион-продукты с вариабельной величиной *m/z* для идентификации МС

Для индивидуального представителя аргининсодержащего микроцистина (значение <i>m/z</i> зависит от массы заместителя в R2-положении)	
$[Arg-Adda-Glu-Mdha-Ala-R2+H]^+$	$[Mdha-Ala-R2-MeAsp-Arg-NH_2+H]^+$
$[Mdha-Ala-R2-MeAsp-Arg+H]^+$	$[Mdha-Ala-R2-MeAsp-Arg-Adda+H]^+$
$[Ala-R2-MeAsp-Arg+H]^+$	–
Для индивидуального представителя, включая лейцинсодержащие микроцистины (значение <i>m/z</i> зависит от массы заместителя в R4-положении)	
$[R4-Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu+H]^+$	$[Mdha-Ala-Leu-MeAsp-R4-Adda+H]^+$
$[R4-Adda-Glu-Mdha+H]^+$	$[Mdha-Ala-Leu-MeAsp-R4+H]^+$
$[R4-Adda-Glu+H]^+$	$[Mdha-Ala-Leu-MeAsp-R4+H-NH_2]^+$
$[R4-Adda+H]^+$	$[C_{11}H_{15}O-Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp-R4]^+$
$[MeAsp-R4-Adda-Glu+H]^+$	$[C_{11}H_{15}O-Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp-R4-NH_3]^+$
$[MeAsp-R4-Adda-Glu+H-H_2O]^+$	$[MeAsp-R4-C_{11}H_{15}O-Glu-Mdha-Ala]^+$
$[Ala-Leu-MeAsp-R4+H-NH_2]^+$	$[Ala-Leu-MeAsp-R4+H]^+$

На основе предложенной классификации ион-продуктов и интенсивности сигналов этих ионов в примененных условиях детектирования были выбраны диагностические ионы для изучаемых представителей микроцистинов. В связи с тем, что интенсивность получаемых откликов ион-продуктов зависит от типа используемого масс-спектрометра и приборных настроек, выбранные диагностические ион-продукты и соотношение интенсивностей их сигналов могут отличаться. Например, при использовании режима фрагментации "диссоциация, индуцируемая соударениями" (ДИС-фрагментация) в линейной ловушке Orbitrap в полном фрагментном масс-спектре однозарядного иона MC-LR ион-продукт с m/z 135 не регистрируется, поскольку при данном механизме фраг-

ментации в ловушке не удерживаются массы фрагментов менее 28 % от массы ион-прекурсора (так называемое "правило 1/3"). В то же время фрагментные масс-спектры этого микроцистина, полученные при помощи тандемного квадрупольного масс-спектрометра (тройного квадрупольного масс-спектрометра), содержат достаточно интенсивный сигнал указанного характеристического иона [8, 19, 20].

В настоящей работе для идентификации MC были предложены ион-продукты с большими величинами m/z (табл. 4). Для "гидрофильных" микроцистинов одним из диагностических ион-продуктов является фрагментный ион с m/z 599 [Arg-Adda-Glu+H]⁺. Он присутствовал в каждом

Табл. 4. Диагностические ион-продукты для детектирования индивидуальных представителей микроцистинов

MC	Ион-прекурсор		Ион-продукт для количественного расчета		Диагностические ион-продукты для подтверждения идентификации	
	m/z	Ион	m/z	Детектируемый ион	m/z	Детектируемый ион
MC-LR	995	[M+H] ⁺	599	[Arg-Adda-Glu+H] ⁺	375 553 861	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺ [Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg+H] ⁺ [M+H-134] ⁺
[D-Asp ³]- MC-LR	981	[M+H] ⁺	599	[Arg-Adda-Glu+H] ⁺	375 539 847	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺ [Mdha-Ala-Leu-D-Asp-Arg+H] ⁺ [M+H-134] ⁺
MC-RR	519	[M+2H] ²⁺	599	[Arg-Adda-Glu+H] ⁺	453 596 904	[Arg-Adda+H-NH ₃] ⁺ [Mdha-Ala-Arg-MeAsp-Arg+H] ⁺ [M+H-134] ⁺
[D-Asp ³] MC-RR	512	[M+2H] ²⁺	599	[Arg-Adda-Glu+H] ⁺	582 499 890	[Mdha-Ala-Arg-D-Asp-Arg+H] ⁺ [Ala-Arg-D-Asp-Arg+H] ⁺ [M+H-134] ⁺
MC-YR	1045	[M+H] ⁺	599	[Arg-Adda-Glu+H] ⁺	375 603 911	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺ [Mdha-Ala-Tyr-MeAsp-Arg+H] ⁺ [M+H-134] ⁺
MC-LA	910	[M+H] ⁺	375	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	559 693 776	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha-Ala-Leu] ⁺ [Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu+H] ⁺ [M+H-134] ⁺
MC-LF	986	[M+H] ⁺	375	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	544 693 852	[Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Phe+H] ⁺ [Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu+H] ⁺ [M+H-134] ⁺
MC-LY	1002	[M+H] ⁺	375	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	560 689 868	[Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Tyr+H] ⁺ [Tyr-Adda-Glu-Mdha +H] ⁺ [M+H-134] ⁺
MC-LW	1025	[M+H] ⁺	375	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	583 693 891	[Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Trp+H] ⁺ [Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu+H] ⁺ [M+H-134] ⁺

тандемном масс-спектре данной группы микроцистинов, но его относительная интенсивность была значительно ниже для микроцистина MC-RR и его метилированных и деметилированных форм по сравнению с MC-LR. Вторым диагностическим ионом для идентификации может быть выбран ион-продукт, характеризующий индивидуального представителя гидрофильных микроцистинов. Так, например, для идентификации [D-Asp³]MC-RR были выбраны следующие ион-продукты: диагностический фрагмент с m/z 599 и ион-продукт с m/z 499 [Ala-Arg-D-Asp-Arg+H]⁺, сигнал которого обладал наибольшей интенсивностью в тандемном спектре и указывал на отсутствие метильной группы в положении 3 в аспарагиновой кислоте.

В фрагментных масс-спектрах "гидрофобных" микроцистинов (MC-LA, MC-LF, MC-LY, MC-LW) в примененных условиях детектирования (линейная ловушка Orbitrap) наиболее интенсивным сигналом обладали диагностические ион-продукты [M-134+H]⁺, образовавшиеся в результате отщепления фрагмента Adda-кислоты [C₉H₁₁O]⁺ от молекулярного иона и характеризующие индивидуального представителя микроцистинов. Все фрагментные спектры "гидрофобных" микроцистинов содержали сигнал ион-продукта с m/z 375 примерно одинаковой интенсивности. Как пример можно привести идентификацию гидрофильного MC-LA с m/z 910 [M+H]⁺, для которого были выбраны ион-продукты с m/z 375 [C₁₁H₁₅O+Glu+Mdha]⁺, являющийся диагностическим для микроцистинов как подтверждающий принадлежность к исследуемому классу соединений, и с m/z 852 ([M-134+H]⁺), избирательно характеризующий данного представителя микроцистинов.

Таким образом, при отсутствии стандартных соединений микроцистинов их идентификация может быть проведена по набору диагностических ионов, соответствующих определенным фрагментам структур (таблицы 2, 3 и 4).

Идентификация анатоксина-а в присутствии матричных соединений

При идентификации аналитов с низкими молекулярными массами, фрагментные масс-спектры которых зачастую не содержат достаточного количества интенсивных характеристических фрагментов и являются непредставительными, могут возникать затруднения. Так, например, при анализе анатоксина-а вероятен ложно-положительный результат из-за наличия в объектах окружающей среды биогенной аминокислоты — фенилаланина [14], имеющей близкую массу с анатоксином-а (Δ 0.05 Да).

Пример хроматографического разделения анатоксина-а и фенилаланина и фрагментные масс-спектры приведены на рис. 5.

По литературным данным для анатоксина-а характерными являются ион-продукты с m/z 149 [M+H-NH₃]⁺, m/z 131 [M+H-NH₃-H₂O]⁺ [30], m/z 107 [M+H-NH₃-COCH₃]⁺ и m/z 91 [C₇H₇]⁺ [31]. При фрагментации в линейной ловушке Orbitrap в масс-спектре надежно детектировались ион-продукты с m/z 149 и m/z 131, которые были выбраны в качестве диагностических (рис. 5, е). При этом соотношение интенсивностей приведенных ионов в выбранных условиях проведения анализа для стандартного вещества составляло примерно 3/1. Сигналы ион-продуктов с меньшими величинами m/z в тандемных спектрах при фрагментации в линейной ловушке Orbitrap были малоинтенсивны.

В то же время для фенилаланина диагностической является пара сигналов: высокоинтенсивный с m/z 120 [M+H-HCO₂H]⁺ и менее интенсивный — с m/z 131 [M+H-NH₃-H₂O]⁺ [30] (рис. 5, д). Таким образом, для надежной идентификации недостаточно совпадения одного характеристического фрагментного иона, что подтверждается и данными масс-хроматограммы по выделенному ионному току для m/z 166 (рис. 5, а), где регистрируется присутствие двух соединений с временами удерживания 3.65 и 4.57. По данным тандемного анализа (рис. 5, б, в, г) при фрагментации иона-прекурсора с m/z 166 детектируются ион-продукты с m/z 131, m/z 120 и m/z 149. Причем, масс-хроматографические пики ион-продукта с m/z 131 детектируются при двух указанных временах удерживания, т.е. присутствуют в тандемных спектрах обоих соединений. Ион-продукт с m/z 149 принадлежит соединению со временем удерживания на колонке 3.65 мин, а фрагмент с m/z 120 — соединению со временем удерживания 4.57 мин.

Стоит отметить, что даже при несовпадении хотя бы одного из трех критериев в используемой схеме идентификации вероятность получения ложноположительного результата значительно увеличивается. Так, например, при проведении анализа в режиме низкого разрешения с использованием линейной ловушки Orbitrap образца природной воды из Куршского залива было детектировано соединение, для которого наблюдалось совпадение со стандартным соединением анатоксина-а времен удерживания и отмечалось присутствие в тандемных масс-спектрах обоих диагностических ионов с m/z 131 и m/z 149. Однако соотношение интенсивностей пиков диагностических ионов в фрагментном масс-спектре значительно отличалось от установленной величины для стандартного соединения. С целью проверки полученных результатов был проведен масс-спектрометрический анализ этого же образца с использованием орбитальной ловушки высокого

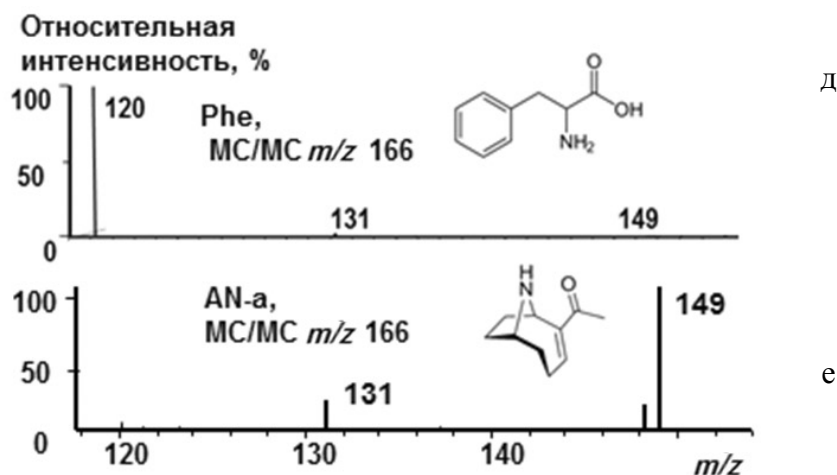
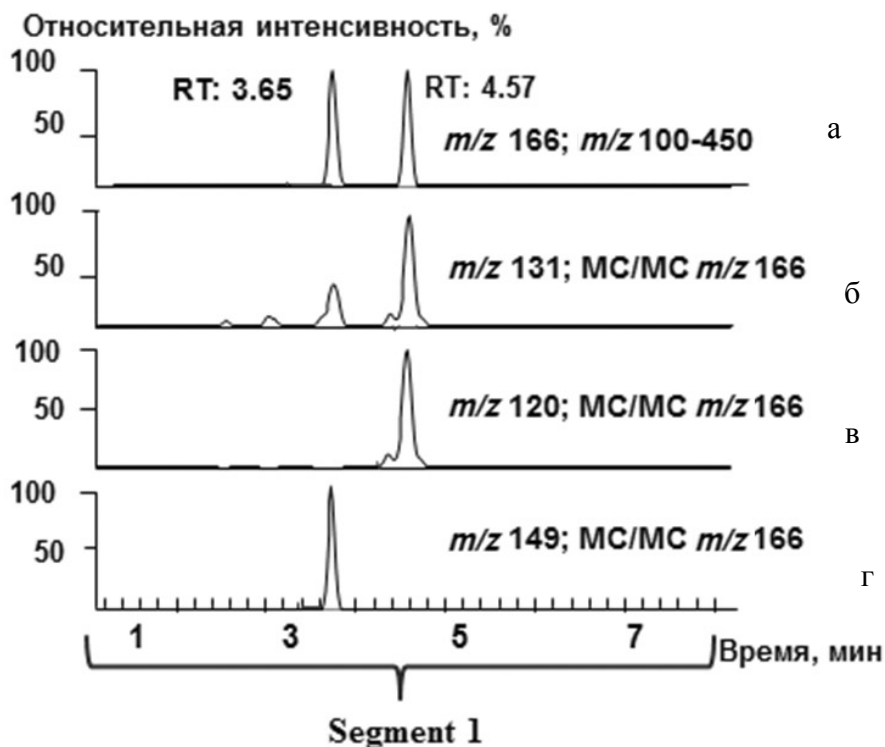


Рис. 5. Масс-хроматограммы и тандемные масс-спектры анатоксина-а и фенилаланина, полученные из экстракта пробы природной воды.

а — масс-хроматограмма по выделенному ионному току для m/z 166 из полного ионного тока; б, в, г — экстрагированные масс-хроматограммы для соответственно m/z 131, m/z 120 и m/z 149 из полного тандемного масс-спектра для иона-предшественника с m/z 166; д, е — тандемные масс-спектры для фенилаланина и анатоксина-а соответственно. Фрагментацию проводили с использованием ДИС-режима в линейной ионной ловушке. Энергия соударений 25 %

разрешения при узком интервале выделения родительского иона (0.4 Да) в режиме детектирования полного спектра фрагментных ионов. Это позволило исключить фрагментарные ионы соединений, имеющих молекулярные массы, близкие к аналиту. В полученных спектрах были установлены точные массы для ион-прекурсоров и ион-продуктов и сопоставлены их значения с m/z ионов для стандартного соединения.

Установленная чувствительность к детектируемому в пробе соединению составила 20 ppb, что превышает установленную погрешность точности определения масс при идентификации соединений методом масс-спектрометрии высокого разрешения (5 ppb). Кроме того, значения m/z фрагментарных ионов в тандемном масс-спектре также отличались более чем на 20 ppb. Следовательно, полученные данные указывали на отсутст-

вие анатоксина-а в исследуемой пробе воды и наличие маскирующего матричного соединения с близкой массой и совпадающим временем удерживания.

Таким образом, для получения достоверных результатов в случае масс-спектрометрического анализа низкомолекулярных соединений требуется наличие стандартов и соблюдение трех критериев надежной идентификации (время удерживания, не менее двух диагностических ион-продуктов и соотношение интенсивностей их сигналов).

Оценка содержания микроцистинов и анатоксина-а в объектах окружающей среды

Стоит отметить, что использование режима низкого разрешения позволяет не только идентифицировать микроцистины при отсутствии полного набора стандартных соединений, но и проводить полуколичественную оценку их содержания, основанную на градуировочных зависимостях как минимум двух основных представителей класса.

Для метода масс-спектрометрического детектирования микроцистинов и анатоксина-а в условиях низкого разрешения и выбранных в данной работе условиях проведения анализа были определены пределы обнаружения масс-спектрометрического метода (LOD), которые составили 0.15–0.22 нг на ввод для растворов стандартов аналитов. В случае наличия всего набора стандартов микроцистинов градуировочные зависимости строятся по диагностическому иону, имеющему максимальную интенсивность в тандемном спектре. Построенные градуировочные зависимости для стандартных растворов анатоксина-а и 9 микроцистинов были линейными ($R^2 = 0.985–0.998$) в диапазоне концентраций от 5 до 500 нг/мл. Величина относительного стандартного отклонения (RSD) < 12 % ($N = 10$) показывает хорошую точность данного метода.

В случае, когда полный набор стандартов недоступен, проводить полуколичественное определение содержания микроцистинов возможно при наличии хотя бы двух стандартных соединений MC-LR и MC-RR. Необходимость применения двух стандартов обусловлена значительным различием в интенсивностях получаемых сигналов ион-продуктов для количественного перехода для двузарядных и однозарядных молекулярных ионов микроцистинов. В этом случае градуировочные зависимости получают для стандартных растворов MC-LR, используя величины площадей пиков выбранных ион-продуктов для количественных МЗР-переходов, m/z 599 — для расчета гидрофильных и m/z 375 — для гидрофобных микроцистинов (предпосылки выбора ион-продуктов для количественных переходов подробно обсуждены в разделе "Фрагментация микроцистинов"). Расчет про-

изводных MC-RR (деметилированные и метилированные формы) проводят, по возможности, по градуировочной зависимости для ион-продукта m/z 599, регистрируемого в фрагментном масс-спектре MC-RR. Градуировочные зависимости были линейными ($R^2 = 0.981–0.989$) в диапазоне концентраций от 10 до 500 нг/мл.

Для оценки изменения чувствительности прибора в течение дня и между разными днями измерений к каждому раствору или экстракту добавляли одинаковое количество аналитического стандарта. В качестве такого аналитического стандарта выбирают соединение, которое заведомо отсутствует в пробе, хорошо ионизуется в применяемых условиях анализа и имеет время удерживания на колонке, близкое к анализируемым соединениям. В нашей работе в качестве внешнего стандарта использовали $^{13}\text{C}_6$ -диклофенак.

В то же время при оптимизации метода масс-спектрометрического количественного определения искомых соединений в объектах окружающей среды необходимо учитывать возможное влияние матричных компонентов [32], которое может проявляться не только в изменении интенсивности получаемого сигнала молекулярного иона, но и в полном перекрывании сигналов аналита маскирующими соединениями. В этом случае тандемный масс-спектр может содержать сигналы фрагментных ионов различной интенсивности матричных соединений с близкими к определяемым веществам молекулярными массами. В таком случае для корректного определения следовых количеств микроцистинов в образце выбирают характеристичные ион-продукты с сигналами подходящей интенсивности из области масс-спектра с минимальным химическим шумом в соответствии с табл. 4. В связи с этим для оценки матричных эффектов рекомендуется оптимизация метода анализа на модельных системах (например, введение смеси имеющихся стандартных веществ в объем природной воды из изучаемого водоема, не содержащей исследуемых соединений [25, 26, 32]).

В данной работе влияние матричных эффектов учитывали путем построения градуировочных зависимостей, полученных с использованием аликвот экстракта матрицы, заведомо не содержащей аналита, в которые вводят стандарты микроцистинов и анатоксина-а различных концентраций. Экстракты матрицы природной воды для модельной системы готовили в соответствии с процедурой пробоподготовки для анализа микроцистинов и анатоксина-а, описанной ранее [33]. Установленное влияние матричных эффектов проявилось в снижении интенсивности регистрируемого сигнала аналитов по сравнению с раствором стандартов, при этом величины LOD для различных водоемов составили 0.25–0.63 нг на ввод. Пределы количественного определения (LOQ) составили

0.5–1.2 нг на ввод для анатоксина-а и смеси микроцистинов в экстрактах модельных систем. Построенные градуировочные зависимости были линейны в диапазоне концентраций 25–500 нг/мл микроцистинов в экстракте матрицы. При данном уровне чувствительности метода обеспечивается определение микроцистинов и анатоксина-а в воде в концентрациях, составляющих не более 5 % от величины ориентировочно безопасного уровня содержания анатоксина-а [13] и микроцистинов по рекомендации ВОЗ [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенной работы нами предложен вариант метода анализа микроцистинов и анатоксина-а, основанный на их специфической фрагментации с применением тандемной хромато-масс-спектрометрии низкого разрешения.

Представленный вариант анализа микроцистинов методом жидкостной хроматографии / тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения позволяет проводить идентификацию микроцистинов без использования стандартов изучаемых соединений в режиме записи полного фрагментного масс-спектра и сопоставления диагностических ионов, отнесенных к характерному фрагменту структуры изучаемого класса соединений. Для надежной идентификации аналитов с малой массой, например анатоксина-а, желательна наличие стандартного соединения.

На основании полученных фрагментных масс-спектров и систематизированных литературных данных предложена новая классификация ион-продуктов микроцистинов, значительно облегчающая процедуру их идентификации и позволяющая по набору диагностических фрагментов установить структуру разных вариантов МС.

Показано, что в отсутствие полного комплекта стандартов микроцистинов можно проводить полуколичественную оценку содержания микроцистинов при наличии хотя бы двух стандартов: МС-LR, считающегося наиболее токсичным и нормируемого согласно WHO [10], и МС-RR, интенсивность сигналов диагностических ион-продуктов которого значительно отличается от интенсивности сигналов ион-продуктов МС-LR.

Соответственно представленный метод исследования микроцистинов и анатоксина-а с помощью хромато-масс-спектрометрии низкого разрешения обладает уровнем чувствительности, достаточным для достоверного анализа цианобактериальных метаболитов, и может быть рекомендован для их качественного определения и количественной оценки в природных объектах и питьевой воде даже в отсутствие полного набора стандартов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Матишов Г.Г., Ковалева Г.В. Цветение воды в водоемах юга России и сбои в водоснабжении (на примере г. Волгодонска) // Вестник Южного научного центра РАН. 2010. Т. 6, № 1. С. 71–79.
2. Матишов Г.Г., Матишов Д.Г., Фуштей Т.В., Руднев М.И., Сойер В.Г., Зимаков Д.В. Обнаружение токсинов цианопрокариот в планктоне нижнего Дона методом масс-спектрометрии // Вестник Южного научного центра РАН. 2006. Т. 2, № 2. С. 75–78.
3. Ezhova E., Lange E., Russkikh Y., Chernova E., Zhakovskaya Z. Dynamics of toxic HABs in the Curonian Lagoon, Baltic Sea during 2010–2013 // Book of abstracts. ICES Annual Science Conference (ASC) 15–19 September 2014, La Coruna, Spain. H26.
4. Корнева Л.Г., Соловьева В.В., Русских Я.В., Чернова Е.Н. Состояние фитопланктона и содержание цианотоксинов в Рыбинском, Горьковском и Чебоксарском водохранилищах в период аномально жаркого лета 2010 г. // Вода: химия и экология. 2014. № 8. С. 24–29.
5. Сиделев С.И., Зубишина А.А., Бабаназарова О.В., Кутузова В.Ю., Мартынов О.В. Мониторинг содержания цианотоксинов микроцистинов в водоемах Верхней Волги: молекулярно-генетический и аналитический подходы // Вода: химия и экология. 2014. № 8. С. 88–94.
6. Сиделев С.И., Голоколенова Т.Б., Чернова Е.Н., Русских Я.В. Анализ фитопланктона Цимлянского водохранилища (Россия) на наличие генов синтеза цианобактериальных гепато- и нейротоксинов // Микробиология. 2015. Т. 84, № 6. С. 1–11.
7. Чернова Е.Н., Русских Я.В., Воякина Е.Ю., Жаковская З.А. Исследования природных экотоксикантов — метаболитов сине-зеленых водорослей в разнотипных водоемах Северо-запада России // Региональная экология. 2014. Т. 35, № 1-2. С. 88–95.
8. Mazur-Marzec H., Spoof L., Kobos J., Pliński M., Meriluoto J. Cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularins, in fresh and brackish waters of the Pomeranian Province, northern Poland // Oceanological and Hydrobiological Studies International Journal of Oceanography and Hydrobiology. 2008. Vol. 37, no. 46. P. 3–21. Doi: 10.2478/v10009-008-0014-0.
9. Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection. Ed. L.M. Botana. Second Edition. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. 941 p.
10. WHO. Guidelines for Drinking Water Quality. 4th ed: World Health Organization. 2011. URL: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en (дата обращения: 15.11.2015).
11. Sivonen K., Jones G. Cyanobacterial toxins // Toxic cyanobacteria in water: A guide to their Public health Consequences, Monitoring and Management. Eds. I. Chorus, J. Bartram. London: E & FN Spon, 1999. P. 41–111.
12. Pflugmacher S., Jung K., Lundvall L., Neumann S., Peuthert A. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of Alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress // Environ-

- mental Toxicology and Chemistry. 2006. Vol. 25. P. 2381–2387. Doi: 10.1897/05-615R.1.
13. Fawell J.K., Mitchell R.E., Hill R.E., Everett D.J. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a // Hum. Exp. Toxicol. 1999. Vol. 18. P. 168–173. Doi: 10.1191/096032799678839833.
 14. Dimitrakopoulos I.K., Kaloudis T.S., Hiskia A.E., Thomaidis N.S., Koupparis M.A. Development of a fast and selective method for the sensitive determination of anatoxin-a in lake waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and phenylalanine-d⁵ as internal standard // Anal. Bioanal. Chem. 2010. Vol. 397. P. 2245–2252. Doi: 10.1007/s00216-010-3727-3.
 15. Kaya K., Sano T., Inoue H., Takagi H. Selective determination of total normal microcystin by colorimetry, LC/UV detection and/or LC/MS // Anal. Chim. Acta. 2001. Vol. 450. P. 73–80. Doi: 10.1016/S0003-2670(01)01391-5.
 16. Brittain S.M., Wang J., Babcock-Jackson L., Carmichael W.W., Rinehart K.L., Culver D.A. Isolation and characterization of microcystins, cyclic heptapeptidehepatotoxins from a Lake Erie Strain of *Microcystis aeruginosa* // J. Great Lakes Res. 2000. Vol. 26. P. 241–249. Doi: 10.1016/S0380-1330(00)70690-3.
 17. Чернова Е.Н., Русских Я.В., Подольская Е.П., Жаковская З.А. Оптимизация параметров масс-спектрометрического анализа цианотоксинов на гибридном хромато-масс-спектрометре LTQ Orbitrap XL (ThermoFinnigan) // Научное приборостроение. 2013. Т. 23, № 1. С. 20–29. URL: <http://213.170.69.26/mag/2013/full1/Art2.pdf>.
 18. Мильман Б.Л., Русских Я.В., Некрасова Л.В., Жаковская З.А. Подход к масс-спектрометрической идентификации цианобактериальных пептидов. Пример деметилмикроцистина-LR // Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8, № 1. С. 51–60.
 19. Neffling M.-R., Spoof L., Quilliam M., Meriluoto J. LC-ESI-Q-TOF-MS for faster and accurate determination of microcystins and nodularins in serum // J. Chromatogr. B. 2010. Vol. 878, № 26. P. 2433–2441. Doi: 10.1016/j.jchromb.2010.07.018.
 20. Spoof L., Vesterkvist P., Lindholm T., Meriluoto J. Screening for hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography—electrospray ionization mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2003. Vol. 1020. P. 105–119. Doi: 10.1016/S0021-9673(03)00428-X.
 21. Duncan M.W. Good mass spectrometry and its place in good science // J. Mass Spectrom. 2012. Vol. 47, no. 6. P. 795–809. Doi: 10.1002/jms.3038.
 22. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды. М.: Техносфера, 2013. 632 с.
 23. Mayumi T., Kato H., Imanishi S., Kawasaki Y., Hasegawa M., Harada K. Structural Characterization of Microcystins by LC/MS/MS under Ion Trap Conditions // J. Antibiot. 2006. Vol. 59, no. 11. P. 710–719. Doi: 10.1038/ja.2006.95.
 24. Zweigenbaum J.A., Henion J.D., Beattie K.A., Codd G.A., Poon G.K. Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry // J. Pharm. Biomed. Anal. 2000. Vol. 23, no. 4. P. 723–733. Doi: 10.1016/S0731-7085(00)00354-X.
 25. Gosetti F., Mazzucco E., Zampieri D., Gennaro M.C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Review // J. Chromatogr. A. 2010. Vol. 1217. P. 3929–3937. Doi: 10.1016/j.chroma.2009.11.060.
 26. King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C., Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2000. Vol. 11, no. 11. P. 942–950. Doi: 10.1016/S1044-0305(00)00163-X.
 27. Neffling M.-R., Spoof L., Meriluoto J. Rapid LC-MS detection of cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularins - comparison of columns // Anal. Chim. Acta. 2009. Vol. 653, no. 2. P. 234–241. Doi: 10.1016/j.aca.2009.09.015.
 28. Diehnelt C.W., Dugan N.R., Peterman S.M., Budde W.L. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer // Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 501–512. Doi: 10.1021/ac051556d.
 29. TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Eds. J. Meriluoto, G.A. Codd. ÅboAkademi University Press (Turku), 2005. 149 p.
 30. Furey A., Crowley J., Hamilton B., Lehane M., James K.J. Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning // J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1082. P. 91–97. Doi: 10.1016/j.chroma.2005.05.040.
 31. Sanchez J.A., Otero P., Alfonso A. et al. Detection of Anatoxin-a and Three Analogs in *Anabaena* spp. Cultures: New Fluorescence Polarization Assay and Toxin Profile by LC-MS/MS // Toxins. 2014. No. 6. P. 402–415. Doi: 10.3390/toxins6020402.
 32. Urban J., Hrouzek P., Štys D., Martens H. Estimation of ion competition via correlated responsivity offset in linear ion trap mass spectrometry analysis: Theory and practical use in the analysis of cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR in extracts of food additives // BioMed Research International. 2013. Vol. 2013. Article ID 414631. 14 pages. Doi: 10.1155/2013/414631.
 33. Русских Я.В., Чернова Е.Н., Воякина Е.Ю., Никифоров В.А., Жаковская З.А. Определение цианотоксинов в водной матрице методом высокоэффективной жидкостной хроматографии—масс-спектрометрии высокого разрешения // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). 2012. Т. 17, № 43. С. 61–66.

Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН, Санкт-Петербург (Чернова Е.Н., Русских Я.В., Подольская Е.П., Жаковская З.А.)

Контакты: Чернова Екатерина Николаевна, s3561389@yandex.ru

Материал поступил в редакцию: 16.12.2015

Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург (Подольская Е.П.)

DETERMINATION OF MICROCYSTINS AND ANATOXIN-A USING LIQUID CHROMATO-MASS-SPECTROMETRY OF UNIT RESOLUTION

E. N. Chernova¹, Y. V. Russkikh¹, E. P. Podolskaya^{1,2}, Z. A. Zhakovskaya¹

¹Saint-Petersburg Scientific-Research Centre for Ecological Safety RAS (SRCES RAS), Saint-Petersburg, Russia

²Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia

We proposed the method for microcystins and anatoxin-a detection using tandem mass spectrometry of unit resolution. The method involves a unique fragment approach.

Diagnostic ions are suggested, and tandem spectra and fragmentation pattern of 9 most widespread microcystins and anatoxin-a obtained using LC/MS/MS under ion trap conditions were described. The approach used in this work is capable to carry out very reliable identification of known microcystins and to state the structural variants when standards are not available. Based on the fragment mass spectra and systematic literature data suggested a new classification of ion products microcystins, greatly facilitates the process of identifying them, and allows for a set of diagnostic fragments to determine the structure of different variants of MS without using standard compounds. The method of the determination of microcystins and anatoxin-a in the environmental samples and drinking water using tandem mass-spectrometry using the ion trap of unit resolution was described.

Keywords: microcystins, anatoxin-a, LC/MS/MS of unit resolution, diagnostic ion-products, identification

REFERENCES

1. Matishov G.G., Kovaleva G.V. [Blossoming of water in reservoirs of the South of Russia and failures in water supply (on the example of Volgodonsk)]. *Vestnik Yuzhnogo nauchnogo zentra RAN* [Bulletin of the Southern Russian Academy of Sciences scientific center], 2010, vol. 6, no. 1, pp. 71–79. (In Russ.).
2. Matishov G.G., Matishov D.G., Fushyey T.V., Rudnev M.I., Soyev V.G., Zimakov D.V. [Detection of toxins цианопрокариот in a plankton of the lower Don by a mass spectrometry method]. *Vestnik Yuzhnogo nauchnogo zentra RAN* [Bulletin of the Southern Russian Academy of Sciences scientific center], 2006, vol. 2, no. 2, pp. 75–78. (In Russ.).
3. Ezhova E., Lange E., Russkikh Y., Chernova E., Zhakovskaya Z. Dynamics of toxic HABs in the Curonian Lagoon, Baltic Sea during 2010–2013. *Book of abstracts. ICES Annual Science Conference (ASC) 15–19 September 2014, La Coruna, Spain. H26.*
4. Korneva L.G., Solov'eva V.V., Russkikh Y.V., Chernova E.N. [Condition of a phytoplankton and the maintenance of tsianotoksin in Rybinsk, Gorky and Cheboksary reservoirs in abnormally hot summer of 2010]. *Voda: chimiya i ekologiya* [Water: chemistry and ecology], 2014, no. 8, pp. 24–29. (In Russ.).
5. Sidelev S.I., Zubishina A.A., Babanazarova O.V., Kutuzova V.Yu., Mart'yanov O.V. [Monitoring of the maintenance of tsianotoksin of microcystines in reservoirs of the Top Volga: molecular and genetic and analytical approaches]. *Voda: chimiya i ekologiya* [Water: chemistry and ecology], 2014, no. 8, pp. 88–94. (In Russ.).
6. Sidelev S.I., Golokolenova T.B., Chernova E.N., Russkikh Ya.V. [The analysis of a phytoplankton of the Tsimlyansk reservoir (Russia) on existence of genes of synthesis the tsianobakterialnykh gepato- and neurotoxins]. *Mikrobiologiya* [Microbiologi], 2015, vol. 84, no. 6, pp. 1–11. (In Russ.).
7. Chernova E.N., Russkikh Ya.V., Voyakina E.Yu., Zhakovskaya Z.A. [Researches of natural ekotoksikant — metabolites of blue-green seaweed in polytypic reservoirs of Severo West of Russia]. *Regional'naya ekologiya* [Regional ecology], 2014, vol. 35, no. 1-2, pp. 88–95. (In Russ.).
8. Mazur-Marzec H., Spooof L., Kobos J., Pliński M., Meriluoto J. Cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and

- nodularins, in fresh and brackish waters of the Pomeranian Province, northern Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, 2008, vol. 37, no. 46, pp. 3–21. Doi: 10.2478/v10009-008-0014-0.
9. *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection*. Ed. L.M. Botana. Second Edition. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. 941 p.
 10. WHO. *Guidelines for Drinking Water Quality*. 4th ed: World Health Organization. 2011. URL: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en.
 11. Sivonen K., Jones G. Cyanobacterial toxins. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their Public health Consequences, Monitoring and Management*. Eds. I. Chorus, J. Bartram. London: E & FN Spon, 1999, pp. 41–111.
 12. Pflugmacher S., Jung K., Lundvall L., Neumann S., Peuthert A. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cyanobacterial cell-free crude extract on germination of Alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, vol. 25, pp. 2381–2387. Doi: 10.1897/05-615R.1.
 13. Fawell J.K., Mitchell R.E., Hill R.E., Everett D.J. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1999, vol. 18, pp. 168–173. Doi: 10.1191/096032799678839833.
 14. Dimitrakopoulos I.K., Kaloudis T.S., Hiskia A.E., Thomaidis N.S., Koupparis M.A. Development of a fast and selective method for the sensitive determination of anatoxin-a in lake waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and phenylalanine-d⁵ as internal standard. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, vol. 397, pp. 2245–2252. Doi: 10.1007/s00216-010-3727-3.
 15. Kaya K., Sano T., Inoue H., Takagi H. Selective determination of total normal microcystin by colorimetry, LC/UV detection and/or LC/MS. *Anal. Chim. Acta.*, 2001, vol. 450, pp. 73–80. Doi: 10.1016/S0003-2670(01)01391-5.
 16. Brittain S.M., Wang J., Babcock-Jackson L., Carmichael W.W., Rinehart K.L., Culver D.A. Isolation and characterization of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins from a Lake Erie Strain of *Microcystis aeruginosa*. *J. Great Lakes Res.*, 2000, vol. 26, pp. 241–249. Doi: 10.1016/S0380-1330(00)70690-3.
 17. Chernova E.N., Russkikh Y.V., Podolskaya E.P., Zhakovskaya Z.A. et al. [Analysis of cyanotoxines using an LTQ ORBITRAP (Thermo Finnigan): the optimization of mass-spectrometry method]. *Nauchnoe priborostroenie [Science Instrumentation]*, 2013, vol. 23, no. 1. pp. 20–29. (In Russ.). URL: <http://213.170.69.26/mag/2013/full1/Art2.pdf> (In Russ.).
 18. Mil'man B.L., Russkikh Y.V., Nekrasova L.V., Zhakovskaya Z.A. [Approach to mass-spectrometry identification cyanobacterial peptides. Demetil-microcystine-LR example]. *Mass-spektrometriya [Mass-spectrometry]*, 2011, vol. 8, no. 1, pp. 51–60. (In Russ.).
 19. Neffling M.-R., Spoof L., Quilliam M., Meriluoto J. LC-ESI-Q-TOF-MS for faster and accurate determination of microcystins and nodularins in serum. *J. Chromatogr. B*, 2010, vol. 878, no. 26, pp. 2433–2441. Doi: 10.1016/j.jchromb.2010.07.018.
 20. Spoof L., Vesterkvist P., Lindholm T., Meriluoto J. Screening for hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography—electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2003, vol. 1020, pp. 105–119. Doi: 10.1016/S0021-9673(03)00428-X.
 21. Duncan M.W. Good mass spectrometry and its place in good science. *J. Mass Spectrom.*, 2012, vol. 47, no. 6, pp. 795–809. Doi: 10.1002/jms.3038.
 22. Lebedev A.T. *Mass-spektrometriya dlya analiza ob'ektov okruzhayushchej sredy [Mass spectrometry for the analysis of objects of environment]*. Moscow, Tekhnosfera Publ., 2013. 632 p. (In Russ.).
 23. Mayumi T., Kato H., Imanishi S., Kawasaki Y., Hasegawa M., Harada K. Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions. *J. Antibiot.*, 2006, vol. 59, no. 11, pp. 710–719. Doi: 10.1038/ja.2006.95.
 24. Zweigenbaum J.A., Henion J.D., Beattie K.A., Codd G.A., Poon G.K. Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, vol. 23, no. 4, pp. 723–733. Doi: 10.1016/S0731-7085(00)00354-X.
 25. Gosetti F., Mazzucco E., Zampieri D., Gennaro M.C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Review. *J. Chromatogr. A*, 2010, vol. 1217, pp. 3929–3937. Doi: 10.1016/j.chroma.2009.11.060.
 26. King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C., Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 2000, vol. 11, no. 11, pp. 942–950. Doi: 10.1016/S1044-0305(00)00163-X.
 27. Neffling M.-R., Spoof L., Meriluoto J. Rapid LC-MS detection of cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularins - comparison of columns. *Anal. Chim. Acta.*, 2009, vol. 653, no. 2, pp. 234–241. Doi: 10.1016/j.aca.2009.09.015.
 28. Diehnelt C.W., Dugan N.R., Peterman S.M., Budde W.L. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 2006, vol. 78, pp. 501–512. Doi: 10.1021/ac051556d.
 29. *TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Eds. J. Meriluoto, G.A. Codd. ÅboAkademi University Press (Turku), 2005. 149 p.
 30. Furey A., Crowley J., Hamilton B., Lehane M., James K.J. Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. *J. Chromatogr. A*, 2005, vol. 1082, pp. 91–97. Doi: 10.1016/j.chroma.2005.05.040.
 31. Sanchez J.A., Otero P., Alfonso A. et al. Detection of anatoxin-a and three analogs in *Anabaena* spp. cultures: new fluorescence polarization assay and toxin profile by LC-MS/MS. *Toxins*, 2014, no. 6, pp. 402–415.

Doi: 10.3390/toxins6020402.

32. Urban J., Hrouzek P., Štys D., Martens H. Estimation of ion competition via correlated responsivity offset in linear ion trap mass spectrometry analysis: Theory and practical use in the analysis of cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR in extracts of food additives. *BioMed Research International*, 2013, vol. 2013. Article ID 414631. 14 pages. Doi: 10.1155/2013/414631.
33. Russkikh Y.V., Chernova E.N., Voyakina E.Y., Nikiforov V.A., Zhakovskaya Z.A. [Definition of cyanotoxin in a water matrix by method of a highly effective liquid chromatography—mass spectrometry of high resolution]. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo instituta (tehnicheskogo universiteta)* [News of the St. Petersburg state institute of technology (technical university)], 2012, vol. 17, no 43. pp. 61–66.

Contacts: Chernova Ekaterina Nikolaevna,
s3561389@yandex.ru

Article received in edition: 16.12.2015