



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5:543.31

ФОРМИРОВАНИЕ ПУЧКОВ КВАЗИМОЛЕКУЛЯРНЫХ  
ИОНОВ ПЕПТИДОВ ИЗ РАСТВОРОВ

Александров М. Л.\*, Барам Г. И., Галль Л. Н.\*,  
Краснов Н. В.\*, Куснер Ю. С., Миргородская О. А.\*\*,  
Николаев В. И.\*, Шкуров В. А.\*

Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск;

\* Институт аналитического приборостроения Академии наук СССР, Ленинград;

\*\* Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт антибиотиков  
и ферментов медицинского назначения, Ленинград

Применение масс-спектрометрии для анализа биологически активных соединений до недавнего времени было ограничено двумя обстоятельствами: 1) большой молекулярной массой, малой летучестью и термической лабильностью этих веществ; 2) сложным характером их масс-спектров электронного удара, которые часто не содержат пиков молекулярных ионов. Разработанные в последние годы методы «мягкой» ионизации, такие, как, например, полевая десорбция, частично разрешили указанные проблемы [1], однако поиски новых возможностей продолжаются [2, 3].

В настоящем сообщении описывается и иллюстрируется принцип масс-спектрометрического анализа растворов биоорганических веществ, основанный на том, что молекулы многих таких веществ уже содержатся в растворах в виде квазимолекулярных ионов. Поэтому для масс-спектрометрического анализа достаточно экстрагировать имеющиеся в растворе ионы, и нет необходимости применять дополнительные физические методы ионизации.

Экспериментально обнаружено, что, если к капилляру радиуса  $R_0$ , по которому с расходом  $Q$  подается жидкость, приложить потенциал  $U$ , жидкость распыляется в виде микрокапель — кластеров [4]. Начальный радиус кластера  $r_0$  можно оценить, приравняв поверхностную энергию взаимодействия кластеров с электрическим полем:

$$r_0 = \frac{8\pi(\epsilon + 2)\gamma}{(\epsilon - 1)U^2} R_0^2 \quad (1)$$

Здесь  $\epsilon$ ,  $\gamma$  — диэлектрическая проницаемость и поверхностное натяжение раствора. Начальную скорость движения кластера можно оценить по уравнению неразрывности:

$$V_0 = \frac{Q}{\pi r_0^2} \quad (2)$$

Взяв для оценок экспериментальные условия работы [4]:  $R_0 = 2,5 \cdot 10^{-3}$  см,  $Q = 10^{-5}$  см<sup>3</sup>/с,  $U = 3000$  В,  $\gamma = 10$  дин/см,  $\epsilon = 20$ , получим по формулам (1), (2)  $r_0 = 10^{-5}$  см,  $V_0 = 3 \cdot 10^2$  см/с.

Разумно предположить, что растворенные в жидкости вещества, имеющие молекулярный размер меньший, чем  $r_0$ , не будут подвергаться разрушающему воздействию приложенного электрического поля. Это обстоятельство (решающее при извлечении ионов высокомолекулярных веществ из жидкости), а также справедливость формулы (1) проверены в эксперименте. В капилляр подавался раствор, содержащий бактериофаг Т7,

с начальной концентрацией  $10^{11}$  мл $^{-1}$ . Размер частиц бактериофага  $\sim 10^{-5}$  см. На рис. 1 показана зависимость концентрации прошедшего через капилляр раствора от величины приложенного напряжения. Видно, что жизнеспособность бактериофага начинает уменьшаться, когда вычисленный по уравнению (1) начальный размер кластера становится сопоставимым с размером бактериофага (для  $U=3,5$  кВ,  $r_0=5 \cdot 10^{-5}$  см).

Образовавшиеся кластеры движутся со скоростью  $V_0$  через покоящийся вспомогательный газ, имеющий давление  $P_0$  и температуру  $T_0$ , и испаряются при газокинетических столкновениях с молекулами вспомогательного газа, имеющего одинаковую с кластерами температуру. После прохождения расстояния  $l$ , такого, что

$$P_0 l \geq 12 \sqrt{k T_0 m_g} \left( \frac{V_0}{\alpha} \right) \left( \frac{\rho}{m} \right) r_0, \quad (3)$$

растворитель полностью испаряется. Здесь  $k$  — постоянная Больцмана,  $m_g$ ,  $m$  — масса молекул газа и растворителя соответственно,  $\rho$  — плотность жидкости,  $\alpha$  — коэффициент испарения при столкновении кластера и молекулы газа ( $\alpha \sim 10^{-3}$ , когда температура кластеров и молекул одинакова [5]). Как показано в работе [5], кластеры полностью испаряются при  $P_0=760$  мм рт. ст.,  $T_0=300$  К, когда  $l=1$  см, в хорошем согласии с формулой (3).

Извлеченные таким образом квазимолекулярные ионы вводятся в масс-спектрометр через газодинамическую систему с дифференциальной откачкой, подобную системе формирования газодинамического молекулярного пучка. Через сверхзвуковое сопло, критическое сечение которого находится на расстоянии  $l$  от торца капилляра, ионный пучок вместе со сверхзвуковой струей вспомогательного газа транспортируется в первую вакуумную камеру. При этом тяжелые ионы концентрируются на оси сверхзвукового потока [5], а затем через специальную коническую диафрагму (скиммер) транспортируются в высоковакуумную область анализатора масс-спектрометра. Таким образом, на всех стадиях процесса формирования ионного пучка растворенных в жидкости веществ используются воздействия с величиной энергии, не превышающей тепловую, что и обеспечивает получение линий квазимолекулярных ионов в масс-спектре.

Такой метод формирования ионного пучка был реализован в Институте аналитического приборостроения АН СССР на серийном масс-спектрометре высокого разрешения МХ1320 и назван ЭРИАД — экстракция ионов из раствора при атмосферном давлении [3]. Масс-спектры пептидов, получаемые методом ЭРИАД и методом электроразбрызгивания [2], в отличие от получаемых другими современными методами «мягкой» ионизации содержат только линии положительных одно-, двух- и трехзарядных квазимолекулярных ионов и не содержат линии осколков, причем вид спектра хорошо воспроизводится и не зависит от условий и длительности съемки спектра. На рис. 2 приведены масс-спектры нонапептида — брадикинина (молекулярная масса 1059), полученные в работе [6] методами: полевой десорбции с контролем полного ионного тока в процессе нагрева эмиттера (а); полевой десорбции при линейном нагреве эмиттера (б); методом ионизации пучком быстрых атомов ксенона через 10 с (в) и через 5 мин (г) после подготовки пробы; методом ЭРИАД (д). Количество брадикинина, затраченное на получение спектров: полевой десорбции — 0,5–1,0 нмоль; бомбардировки быстрыми атомами — около 5 нмоль [6]. В настоящей работе для получения спектра водно-метанольный раствор брадикинина с концентрацией  $10^{-3}$  М подавался с расходом  $1,4 \cdot 10^{-2}$  мкл/с;

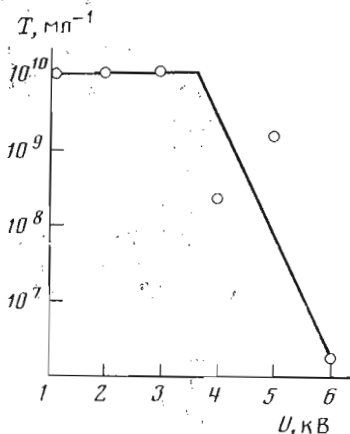


Рис. 1. Зависимость концентрации ( $T$ ) прошедшего через капилляр раствора, содержащего бактериофаг Т7, от потенциала, приложенного к капилляру

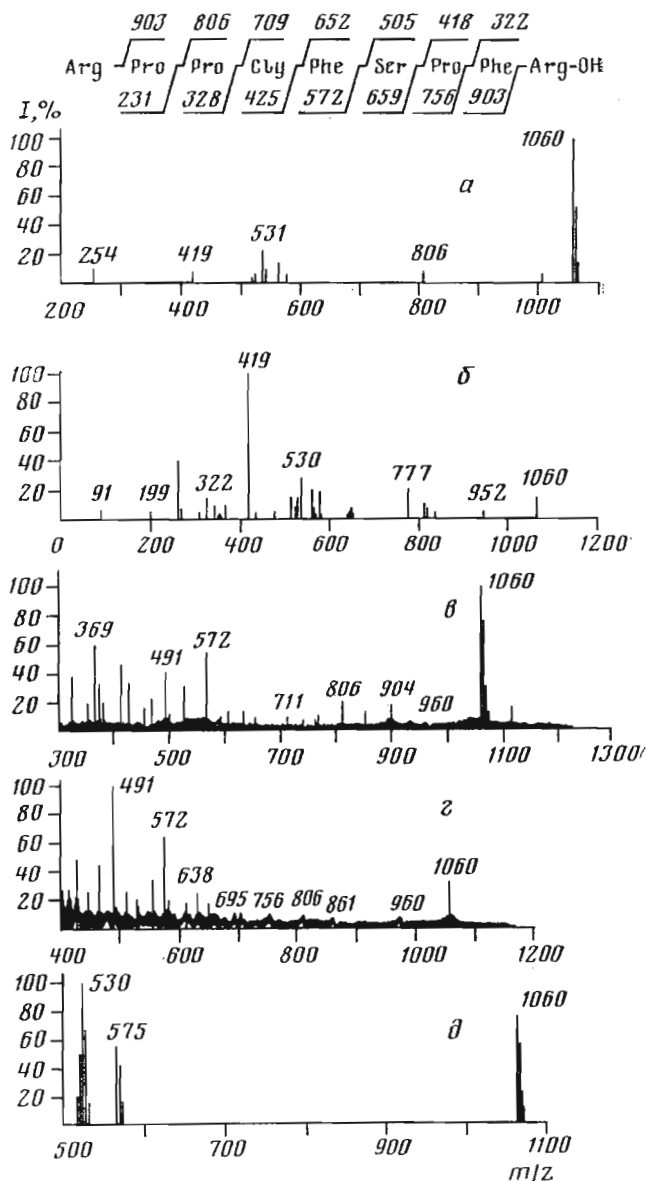


Рис. 2. Масс-спектры брадикинина, полученные с использованием полевой десорбции при стабилизации ионного тока в процессе нагрева эмиттера [6] (а); полевой десорбции при линейном нагреве эмиттера [6] (б); бомбардировкой быстрыми атомами, через 10 с после подготовки пробы [6] (в), бомбардировкой быстрыми атомами, через 5 мин после подготовки пробы [6] (г); метода ЭРИАД (настоящая работа) (д)

количество брадикинина на получение спектра (е) — около 100 пмоль. Масс-спектры рис. 2а–г существенно зависят от условий их получения, а эти условия индивидуальны для различных пептидов [6]; молекулярный ион не является наиболее интенсивным в спектрах. В спектре рис. 2д брадикинин представлен только одно- и двухзарядными ионами, поэтому однозначно определяется молекулярная масса пептида (пик квазимолекулярного иона  $M$  575 принадлежит, по-видимому, примеси и не обнаружен в других образцах брадикинина).

Метод ЭРИАД позволяет достаточно быстро идентифицировать пептиды и их производные в ходе реакции непосредственно в реакционной смеси. На рис. 3а приведена хроматограмма реакционной смеси в процессе дансильирования (часто используемой реакции  $N,N$ -диметиламинонафта-

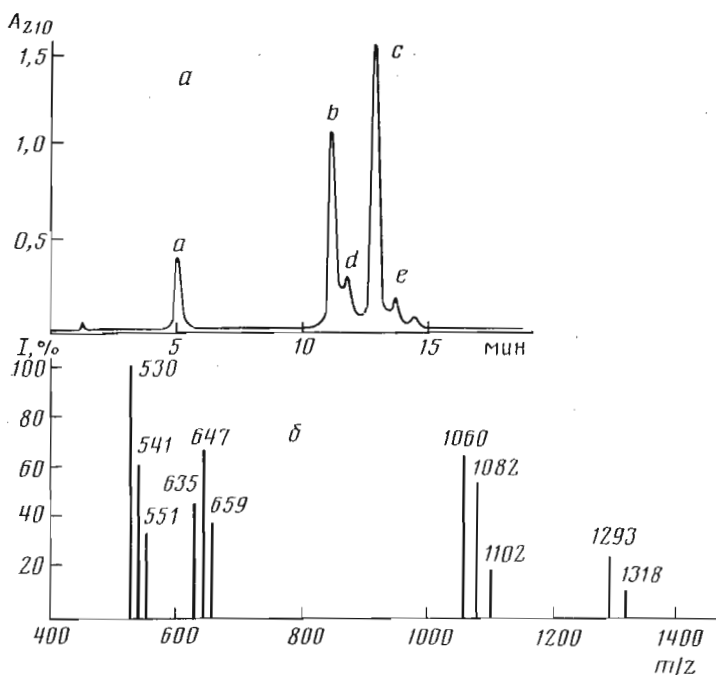


Рис. 3. Хроматограмма (а) и масс-спектр (б) реакционной смеси реакции дансильирования брадикинина

линсульфонилхлорида (Dns-Cl) с аминокруппами белков и пептидов) брадикинина в водно-метанольном растворе. Начальные концентрации брадикинина и Dns-Cl  $\sim 10^{-3}$  М. Хроматограмма получена на жидкостном хроматографе «Миличром» в градиенте 0,1% трифторуксусной кислоты и метанола по методике, описанной в работе [7]. Пики *a*, *b*, *c* хроматограммы принадлежат Dns-OH, брадикинину и дансилбрадикинину соответственно. Пики *d* и *e* хроматограммы не идентифицированы. На рис. 3б — масс-спектр этой же реакционной смеси (смесь также может подаваться и непосредственно из кюветы хроматографа в режиме «on-line» [7]). В масс-спектре реакционной смеси имеются две группы пиков и одно- и двухзарядных ионов. Линии спектра 1060, 530 и 1293, 647 принадлежат одно- и двухзарядным квазимолекулярным ионам брадикинина и дансилбрадикинина соответственно. Остальные линии масс-спектра — пики одно- и двухзарядных ионов побочных продуктов реакции брадикинина и примесей с дансилхлоридом; по-видимому, соединения с молекулярной массой 1317 (пики 1318 и 659) — дансильное производное соединения с массой 1081 (пики спектра 1082 и 541).

Описанный метод получения спектров пептидов не обладает какой-либо специфичностью и позволяет анализировать достаточно высокомолекулярные белки, например лизоцим [2]. Для получения квазимолекулярного пона биополимера требуется главным образом удачный подбор растворителя и рН среды.

Авторы благодарят Т. Г. Максимова (НИБХ СО АН СССР) за помощь в работе с бактериофагом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Soft ionization biological mass spectrometry/Ed. Morris H. R. London, Philadelphia, Rheine: Heyden, 1981, p. 1–155.
2. Gieniec J., Mack L. L., Nakamae K., Gupta C., Kumar V., Dole M. Biomed. Mass Spectrometry, 1984, v. 11, № 6, p. 259–268.
3. Александров М. Л., Галль Л. Н., Краснов Н. В., Николаев В. И., Павленко В. А., Шкуров В. А. Докл. АН СССР, 1984, т. 277, вып. 2, с. 379–383.
4. Куснер Ю. С., Николаев В. И., Николаев Г. Ф., Приходько В. Г., Ребров А. К., Шевченко С. И. Письма в ЖТФ, 1981, т. 7, № 5, с. 303–308.

5. Галль Л. Н., Краснов Н. В., Куснер Ю. С., Николаев В. И., Приходько В. Г., Симонова Г. В. Журн. техн. физики, 1984, т. 54, вып. 8, с. 1559-1571.
6. Przybylski M. Fresenius Z. Anal. Chem., 1983, B. 315, H. 5; S. 402-421.
7. Александров М. Л., Галль Л. Н., Краснов Н. В., Николаев В. И., Павленко В. А., Шкурюв В. А., Барам Г. И., Грачев М. А., Кнорре В. Д., Куснер Ю. С. Биоорганическая химия, 1984, т. 10, № 5, с. 710-712.

Поступило в редакцию  
14.VI.1984  
После доработки  
29.X.1984

## FORMATION OF BEAMS OF QUASI-MOLECULAR IONS OF PEPTIDES FROM SOLUTIONS

ALEXANDROV M. L.\*, BARAM G. I., GALL L. N.\*, KRASNOV N. V.\*,  
KUSNER Yu. S., MIRGORODSKAYA O. A.\*\*\*, NIKOLAEV V. I.\*,  
SHKUROV V. A.\*

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Division  
of Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk;*

*\* Institute of Analytical Instrumentation of Academy of Sciences  
of the USSR, Leningrad;*

*\*\* All-Union Institute for Research and Technology of Antibiotics  
and Enzymes for Medical Application, Leningrad*

A novel method of mass-spectrometric analysis is described which involves extraction of ions from solutions without any additional ionization. The method affords quasi-molecular ions of bio-organic compounds, particularly, of peptides, while not destructing high-molecular compounds. Mass-spectra of bradykinin obtained by means of field desorption, fast atoms bombardment and the new method are compared. Chromatographic peaks of peptide derivatives can be easily identified by the new method.