



УДК 547.9:543.51

**ПЛАЗМЕННО-ДЕСОРБЦИОННАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ
ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ****I. ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА МЕТОДА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ
ДЛЯ АНАЛИЗА БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ**© 1996 г. Н. А. Резцова[#], М. А. Кулиш, А. Ф. Мионов*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,
117571, Москва, просп. Вернадского, 86*

Поступила в редакцию 05.12.94 г.

Рассмотрено применение плазменно-десорбционной масс-спектрометрии (PD MS) для анализа природных соединений. Особое внимание уделено практическому использованию этого метода в химии пептидов и белков (часть I). В части II (см. следующий выпуск журнала) рассмотрены результаты исследований нуклеотидов, углеводов, липидов и пигментов. Обзор охватывает литературу с 1982 по 1994 г.

Ключевые слова: плазменно-десорбционная масс-спектрометрия, пептиды, белки.

За последние годы в масс-спектрометрии произошли значительные изменения. Они связаны с улучшением систем регистрации и обработки данных, а также с разработкой новых и совершенствованием известных методов ионизации, таких, как FAB, SI, ESI, PD и MALD [1]. В результате стало возможным существенное повышение точности метода, увеличение определяемых масс ионов и расширение круга анализируемых соединений.

Настоящий обзор посвящен TOF PD MS, основанной на ионизации вещества осколками спонтанного деления ядер ²⁵²Cf.

Приборы, основанные на этом методе, были сконструированы в 1973 - 1974 гг. группой американских ученых под руководством R.D. Macfarlane [2], а затем и учеными других стран [3]. С 1984 г. было налажено производство таких масс-спектрометров фирмой BIO-ION Nordic (Швеция), а в 1989 - 90 гг. в СССР выпущены первые отечественные промышленные приборы, получившие название МС БХ (масс-спектрометр биохимический) [4]. Производителем их является Сумское научно-производственное объединение "Электрон" (SELMI, Украина). Времяпролетные масс-спектрометры на основе PD – одни из самых простых и дешевых.

Сокращения: ESI (electrospray ionization) – ионизация электрораспылением, FAB (fast-atom bombardment) – бомбардировка ускоренными атомами, MALD (matrix-assisted laser desorption) – лазерная десорбция, PD (plasma desorption) – плазменная десорбция, SI (secondary ion ionization) – ионизация вторичными ионами, MS (mass spectrometry) – масс-спектрометрия, TOF (time-of-flight) MS – времяпролетная масс-спектрометрия, $m/\Delta m$ (FWHM) (full width at half-maximum) – разрешение на полувысоте пика.

[#] Автор для переписки.

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА

Бомбардировка вещества на подложке осколками деления ²⁵²Cf может осуществляться со стороны, на которой расположено вещество ("на отражение") (рис. 1а), или с противоположной стороны ("на прострел") (рис. 1б) [4 - 6]. К подложке (и, следовательно, к образцу) прикладывается постоянное напряжение U (от ± 5 до ± 30 кВ). Образующиеся в процессе ионизации ионы разделяются в зависимости от величины m/z в соответствии с временем пролета. Метод PD MS позволяет регистрировать как положительные, так и отрицательные ионы. В прибор одновременно можно ввести несколько образцов [4 - 6].

В зависимости от конструкции, в особенности от устройства анализатора ионов, приборы PD MS различаются по разрешающей способности. При небольшой длине времяпролетной трубы (15 - 50 см) величина $m/\Delta m$ (FWHM), измеряемая для таких ионов, как $(\text{CsI})_n\text{Cs}^+$, составляет 300 - 1000 [3 - 6]. Использование времяпролетных анализаторов более совершенных конструкций позволяет повысить значение $m/\Delta m$ (FWHM), но обычно оно не превышает 3000, как, например, для приборов с анализатором, снабженным ион-рефлектором Мамырина [7] или с увеличенным до 1 - 8 м путем дрейфа ионов [2, 8, 9]. В последних устанавливаются специальное устройство, усиливающее пропускание ионов. Наличие дополнительной ионной оптики в виде отклоняющих или отражающих сеток не только увеличивает разрешение, но и позволяет изучать пути распада метастабильных ионов [10 - 12]. Имеются сообщения о создании приборов PD MS с тандемным ускорителем,

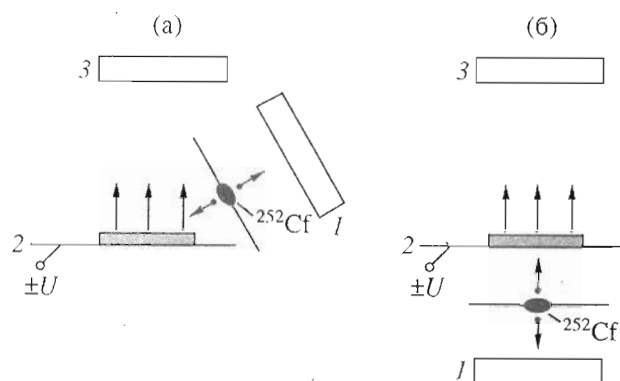


Рис. 1. Схема источника ионов PD MS с ионизацией "на отражение" (а) и "на прострел" (б) [6]. 1 – стартовый детектор, 2 – анализируемое вещество, 3 – стоповый детектор.

разрешение которых достигает более 8000 [13]. Конструктивные и технические особенности некоторых приборов, использующих PD, описаны также в обзорах [5, 6, 14].

Метод PD MS позволяет определять массы природных соединений, особенно пептидов и белков, в широком интервале, вплоть до 35 кДа [1, 3]. Имеется сообщение о регистрации иона кластерного соединения с m/z более 100000 [15].

При анализе масс-спектров в области высоких масс вследствие невысокой разрешающей способности TOF-масс-спектрометров, использующих PD, регистрируют среднеизотопную массу иона [16, 17]. Однако, если наряду с основным ионом образуются протонированные или депротонированные ионы, эта масса может отличаться от расчетной, но не более чем на 1 Да. Вследствие высокой точности метода (0.1% [3]) указанной разрешающей способности достаточно для решения значительного количества задач [17]. Пики в области низких масс для спектров природных соединений обычно не интерпретируются или используются как калибровочные [3, 5]*.

Обычно для получения PD-спектра достаточно 1 - 10 имоль индивидуального вещества [18 - 20]. Для пептидов и белков, однако, чувствительность метода может достигать менее 10 пмоль [20, 21], что обусловлено использованием для этих соединений специальной матрицы – нитроцеллюлозы.

В том случае, когда скорость распада ^{252}Cf в ионном источнике составляет 2000 - 3000 расп/с, для записи типичного спектра достаточно 5 - 10 мин

* Вообще говоря, TOF MS совсем не обязательно связана с PD-ионизацией. За последние годы наибольшее распространение получили MALD TOF-масс-спектрометры, конструкции которых быстро прогрессируют. Для промышленных образцов, выпускаемых многими фирмами (Bruker, Finnigan и др.), рутинными стали спектры биополимеров с M до 500 кДа, а разрешение давно превысило величину 10000 (Ларива, ред.).

[3], хотя в некоторых случаях требуется несколько часов.

В процессе десорбции теряется менее 1% вещества [22], что позволяет сохранить образец для дальнейших исследований или анализировать одну и ту же пробу многократно в течение длительного времени, например в различных режимах работы прибора.

Количественный анализ сложных смесей методом PD MS затруднен и используется редко. Известно лишь несколько примеров количественных исследований лекарственных препаратов, предварительно очищенных хроматографическими методами [23 - 30].

Большой интерес вызывает теоретическое и экспериментальное объяснение механизма PD, а также его сравнение с другими десорбционными методами масс-спектрометрии [13, 31 - 33]. В процессе PD переход молекул в газовую фазу осуществляется из поверхностного слоя или с участков адсорбции, а для пленок Ленгмюра–Блоджетта – из нескольких поверхностных слоев [31 - 33].

Для некоторых соединений, например иодида цезия [34], валина [35], родамина 6Ж [34], верапамила [23], хинидина [23], дактиномицина [26], пленок Ленгмюра–Блоджетта стеариновой, арахидиновой и других жирных кислот [36 - 38], бычьего трипсина и мелиттина [39], свиного инсулина [40, 41], исследована зависимость выхода ионов в процессе PD от количества нанесенного вещества. Кривая этой зависимости обычно имеет начальную восходящую часть, соответствующую увеличению количества вещества на поверхности десорбции, и горизонтальный участок, соответствующий последующему насыщению поверхности десорбции.

ПОДГОТОВКА ПРОБЫ

Успешное использование метода PD MS при анализе практически всех классов природных соединений, особенно пептидов и белков, в значительной мере связано с разработкой различных вариантов приготовления пробы для введения в масс-спектрометр.

Вещество, бомбардируемое осколками деления ^{252}Cf , можно наносить непосредственно на металлическую подложку – пластину из никеля, алюминия, серебра или золота [2 - 5]. Сигналы, полученные при исследовании самих металлических поверхностей, обсуждаются в работах [42 - 45].

Часто подложку покрывают одним или несколькими слоями матрицы, в качестве которой используют как низкомолекулярные соединения, так и синтетические или природные полимеры. Из синтетических полимеров часто применяют полипропилен [34, 46], полиэфир [40, 47], полиэтилентерефталат (милар) [34], фотоокисленный

милар [48, 49], а также сульфированный тефлон (нафион) [50] и кватернизированный нейлон (нитран) [51], содержащие ионообменные группы. Сигналы самих этих полимеров исследованы в работах [52 - 54].

Масс-спектрометрию соединений, содержащих полярные группы, можно проводить с применением в качестве матрицы поверхностно-активного вещества – хлорида тридецилметиламмония [55, 56].

Низкомолекулярные матрицы еще не нашли широкого применения в методе PD MS, хотя этой проблеме посвящены некоторые исследования. Например, недавно предложено использовать для PD MS новые матрицы: антрацен-9-карбоновую [57] или 3-(3-пиридил)акриловую кислоты [58]. Некоторые низкомолекулярные матрицы и добавки (например, глутатион Glu-Cys-Gly [59], октаацетат сахарозы [22, 29], уротропин [29], лимонная и другие органические кислоты [22, 60]) наносят одновременно с исследуемым веществом. После нанесения и высушивания раствора вещество оказывается включенным в слой матрицы.

Наиболее часто при PD MS используют нитроцеллюлозу, признанную наилучшей матрицей для исследования пептидов и белков [13, 21]. Поскольку к образцу необходимо подводить высокое напряжение, некоторые фирмы выпускают металлизированные пленки полимера, на которые нанесена нитроцеллюлоза [61, 62]. Обычно водный или водно-органический раствор вещества наносит на поверхность нитроцеллюлозы, предварительно промытую деионизованной водой, пробу высушивают в эксикаторе струей инертного газа, горячего воздуха или центрифугированием, а затем промывают водой или буферным раствором [22, 41, 63, 64]. В отдельных случаях перед нанесением исследуемого вещества поверхность нитроцеллюлозы промывают раствором NaI [61]. В работе [47] пробу покрывали вторым слоем нитроцеллюлозы, и при этом анализируемое вещество оказывалось заключенным между двумя слоями матрицы, получившей название “матрица-сэндвич”. Иногда на слой нитроцеллюлозы наносят слой другой матрицы, например тиоредоксина [65] или глутатиона [66 - 68]. Вопросы оптимизации приготовления образца на нитроцеллюлозной матрице – толщине слоя, концентрации раствора и скорости нанесения – посвящены работы [40, 41, 69, 70].

Вещество можно нанести на подложку или на матрицу либо в растворе [54 - 56, 63], либо в виде тонкоизмельченной суспензии [71]. Используют также электрораспыление, позволяющее получать тонкий слой вещества регулируемой толщины [35]. Для низкомолекулярных соединений, например аминокислот, различия в спектрах при нанесении образцов различными способами могут

не наблюдаться [72], однако для высокомолекулярных соединений предпочтительно использование электрораспыления на матрицу [3 - 5].

Электрораспылению поддаются растворы веществ в ряде растворителей – бензоле, хлороформе, четыреххлористом углероде, тетрагидрофуране, ацетоне, этаноле, метаноле, уксусной и трифторуксусной кислотах, пиридине, а также в водно-спиртовых растворах, содержащих до 50% воды [35]. Растворы с более высоким содержанием воды, а также гексановые растворы электрораспылению не поддаются [35].

Поскольку на процесс PD может влиять не только взаимодействие исследуемого вещества с матрицей, но и состояние вещества в пробе, в некоторых случаях образец до ионизации дополнительно подвергали УФ-облучению [73].

При определении молекулярной массы неизвестного соединения, т.е. при отнесении сигналов в масс-спектре к молекулярным фрагментным или иным типам ионов, целесообразно использовать различные варианты подготовки вещества к анализу.

ТИПЫ РЕГИСТРИРУЕМЫХ ИОНОВ

В области молекулярных масс в PD-масс-спектрах регистрируют истинно молекулярные ионы ($[M]^+$ и $[M]^-$) или ион-радикалы, содержащие нечетное количество электронов: $[M + H]^+$, $[M - H]^+$ и $[M + H]^-$, $[M - H]^-$. Относительная интенсивность изотопных сигналов этих ионов в условиях PD в литературе обсуждается редко, так как большинство измерений методом PD MS выполняется по среднеизотопной массе ионов.

Ион-радикалы $[M]^+$ и $[M]^-$ образуются в условиях масс-спектрометрии в полиненасыщенных молекулах с большим количеством сопряженных связей при использовании бомбардировки частицами с высокой энергией, в том числе образованных в результате распада ядер ^{252}Cf [74]. В условиях PD сигналы ионов $[M]^+$ и $[M]^-$ могут доминировать в масс-спектрах конденсированных ароматических соединений [75], сигналы ионов $[M]^+$ – в спектрах порфиринов [21], а сигналы ионов $[M]^-$ – в спектрах феофитина *a* [76, 77]. Однако для определения молекулярной массы хлорофилла *a* и феофитина *a* по спектрам положительных ионов целесообразно использовать сигналы ионов $[M + H]^+$, имеющие максимальную интенсивность [76, 77]. Определение молекулярной массы аминокислот, пептидов и белков также проводится по сигналам ионов $[M + H]^+$ [78 - 80]. Образование иона $[M - H]^+$ при использовании PD наблюдается крайне редко, например у холестерина [81].

В спектрах отрицательных ионов по сигналам $[M - H]^-$ определение молекулярной массы осуществляется для аминокислот, пептидов [2, 12],

олигонуклеотидов [7, 12, 82] и углеводов [83, 84]. При исследовании хлорофилла *a* для этой цели лучше использовать отрицательные ионы $[M + H]^-$ [76, 77].

В условиях PD можно зарегистрировать ионы $[M + X]^+$ и $[M + X]^-$, образованные в результате присоединения катиона или аниона к нейтральной молекуле, а также ионы более сложной структуры $[M - (n - 1)H + nX]^+$ [12, 80, 85, 86]. Из катионов особая склонность к образованию таких кластеров наблюдается для ионов Na^+ или K^+ , присутствующих в большинстве образцов [5, 12, 80]. Наблюдалось присоединение и таких ионов, как Li^+ [85], Cs^+ [46], Cd^{2+} [86] и Pb^{2+} [87], или устойчивых фрагментов органических молекул [88, 89]. Анионы X^- могут быть как органическими [88], так и неорганическими [90].

При определении молекулярной массы образование ионов $[M + X]^+$ и $[M + X]^-$ нежелательно, так как усложняет анализ. В предельных случаях сигнал молекулярного иона может вообще не детектироваться. Причиной таких процессов часто является присутствие неорганических примесей или избыточное количество вещества в пробе [12, 80, 89].

В отличие от других соединений для углеводов молекулярная масса определяется в спектрах положительных ионов по ионам $[M + Na]^+$ [15, 83, 84]. При тщательном обессоливании образцов углеводов в масс-спектрах плазменной десорбции регистрируют лишь сигналы фрагментных ионов [15].

В спектрах PD MS пептидов и белков кроме ионов $[M + H]^+$ регистрируются также многозарядные ионы общей формулы $[M + nH]^{n+}$ [79, 80], $[M - 2H]^{2-}$ [57]. Некоторые соединения образуют нековалентно связанные олигомерные (кластерные) ионы $[nM + H]^+$ [58, 78, 89], $[2M + Na]^+$ [78, 83, 91] и аналогичные отрицательные ионы [89]. Олигомерные ионы чаще всего регистрируются в спектре в виде минорных сигналов.

При анализе ионных соединений в спектрах, как правило, присутствуют ионы, составляющие соединение, и олигомерные ионы. Образование последних характерно для органических и особенно для неорганических солей [56, 89, 92]. Например, галогениды щелочных металлов общей формулы A^+B^- дают ионы $[(AB)_nA]^+$ или $[(AB)_nB]^-$ ($n = 1 - 4$) [56, 92].

Метод PD MS относят к неструктурным, "мягким" методам и наиболее часто применяют для определения молекулярной массы. Однако его можно использовать и для структурных исследований, связанных с изучением фрагментов молекул, особенно в случае соединений с небольшой и средней молекулярной массой [78, 89, 93].

Опыт по изучению направлений фрагментации, накопленный в области других методов масс-

спектрометрии, оказался полезным и при расшифровке спектров PD MS. Например, фрагментация пептидов [94 - 97] и олигонуклеотидов [82, 98] может быть описана схемами, установленными для FAB MS.

АНАЛИЗ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Исследованию PD MS индивидуальных аминокислот посвящены работы [2, 35, 72, 78, 84, 91], анализировались также их эквимольные смеси [99].

Наиболее широко метод PD MS используется при исследовании синтетических и природных пептидов и белков [79, 100 - 103]. PD MS успешно сочетается с традиционными методами анализа белков и пептидов, например применяется для идентификации фракций ВЭЖХ [94, 95] или электрофореза [104, 105] в режиме off-line. В некоторых лабораториях метод PD MS стал рутинным при анализе олигопептидов и низкомолекулярных белков благодаря высокой чувствительности, скорости анализа в сочетании с невысокой стоимостью прибора и простотой его обслуживания [79].

В настоящее время определились основные направления использования PD MS в химии белка: измерение молекулярной массы, установление структуры по фрагментным ионам и продуктам ферментного или химического расщепления, определение состава природной или синтетической смеси (пептидное картирование) и качественная оценка индивидуальности веществ.

При определении молекулярной массы белков метод PD MS успешно использовали даже в тех случаях, когда другие методы ионизации не давали желаемого результата, например ESI MS для пепсина свиньи [106] или метод FAB MS для протаминов [107].

Определение молекулярной массы пептидов с $M_r < 5000$ осуществляется по катиону $[M + H]^+$. Этот ион доминирует в масс-спектре брадикинина (M_r 1060) [48, 94], фрагмента (105 - 124) рибонуклеазы А быка (M_r 2274) [108], низина (M_r 3354) [64] и рилизинг-фактора гормона роста (M_r 5040) [66]. В масс-спектрах этих соединений могут быть зарегистрированы также менее интенсивные сигналы ионов $[M + 2H]^{2+}$. Типичный масс-спектр пептида представлен на рис. 2.

Образование нескольких многозарядных ионов повышает точность определения молекулярной массы, так как она вычисляется как средняя величина с учетом значений m/z нескольких ионов.

Для относительно небольших белков ($M_r > 5000$) регистрируют серии интенсивных многозарядных ионов $[M + nH]^{n+}$ ($n = 1 - 6$). Максимальное значение n меняется в зависимости от молекулярной массы белка. Например, зарегистрированы трехзарядные ионы для бычьего инсулина (M_r 5733)

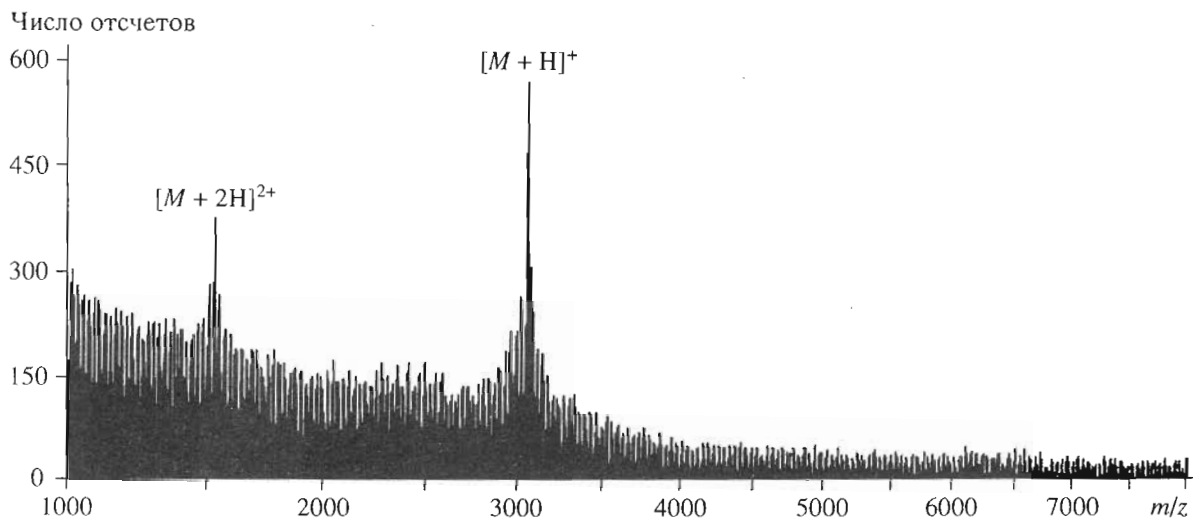


Рис. 2. Масс-спектр натрий-уретического гормона (третьего фактора) человека (M_r , 3080). Спектр зарегистрирован на приборе МС БХ [4], $m/\Delta m$ (FWHM) по ионам $(\text{CsI})_2\text{Cs}^+$ равна 500.

[17, 58, 109], бычьего проинсулина (M_r , 8681) [59] и тиоредоксина (M_r , 11673) [66], четырехзарядные для панкреатического спазмолитического фрагмента (M_r , 11711) [109], рибонуклеазы А (M_r , 13682) [97], лизоцима (M_r , 14315) [63] и белка рекомбинантного человеческого фактора (M_r , 14478) [110]. Пяти- или шестизарядные ионы зарегистрированы для папаина папайи (M_r , 23442) [97], рекомбинантного интерферона человека (M_r , 19269) [110], трипсина свиньи (M_r , 23463) [41], α -химотрипсина (M_r , 25700) [111] и протеиназы К (M_r , 28665) [97].

Соотношение интенсивности сигналов одно- ($n = 1$) и многозарядных ($n = 2 - 6$) ионов зависит от структуры матрицы [59], методики приготовления пробы [40, 41] и количества вещества на матрице [17, 39, 109], которое определяется концентрацией раствора и временем адсорбции вещества. Исследование этих закономерностей необходимо для однозначной интерпретации спектров.

Успех метода PD MS при исследовании пептидов и белков, особенно при определении их молекулярной массы, обусловлен прежде всего использованием в качестве матрицы нитроцеллюлозы. В спектрах, полученных при нанесении вещества на эту матрицу, регистрируются четкие интенсивные сигналы ионов $[M + n\text{H}]^{n+}$. Используют и низкомолекулярные матрицы – глутатион [59, 64, 66] и предложенные недавно антрацен-9-карбоновую [57] и 3-(3-пиридил)акриловую кислоты [58]. По некоторым параметрам эти матрицы превосходят нитроцеллюлозу. Однако применение глутатиона или антрацен-9-карбоновой кислоты может вызывать появление в масс-спектре дополнительных минорных сигналов ионов $[M + X + \text{Na}]^+$ или $[M + X + \text{H}]^+$, где X – масса глутатиона или антрацен-9-карбоновой кислоты [57, 64].

Для предотвращения образования ионов $[M + X]^+$ и $[M + 2X - \text{H}]^+$, где X = Na^+ или K^+ , в процессе подготовки образца к анализу необходимо использовать деионизованные растворители, исследуемое вещество обессоливать, а нитроцеллюлозную матрицу и пробу после нанесения образца промывать [41, 63]. В случае низкой сорбции вещества пробу не промывают. Избежать образования таких ионов удается и другими методами, например прибавлением в раствор исследуемого вещества октаацетата сахарозы, лимонной кислоты или смеси лимонной кислоты и глутатиона [22]. В некоторых случаях используют этерификацию пептида [22] или матрицу-сэндвич из нитроцеллюлозы [47, 112].

Молекулярную массу некоторых защищенных пептидов определяли по пикам ионов $[M + \text{Na}]^+$ [113 - 116], так как ионы $[M + \text{H}]^+$ этих соединений были недостаточно устойчивы вследствие блокирования всех амино- и гуанидиновых групп, являющихся участками протонирования. При полном удалении из пробы ионов щелочных металлов сигналы ионов $[M + \text{Na}]^+$ и $[M + \text{H}]^+$ имели низкую интенсивность [113]. Для N-ацетилированных аналогов брадикинина, не содержащих остатков аргинина, зарегистрированы необычные для пептидов ионы $[M]^{2+}$ [95]. Использование PD MS особенно важно для анализа защищенных пептидов, так как выбор методов их контроля ограничен.

Возможность регистрации ионов типа $[M + \text{Cd}^{2+} - \text{H}]^+$, $[M + 2\text{Cd}^{2+} - 3\text{H}]^+$, $[M + 3\text{Cd}^{2+} - 5\text{H}]^+$ и $[2M + 4\text{Cd}^{2+} - 5\text{H}]^+$, отражающих стехиометрию взаимодействия пептида с металлом, позволила исследовать кадмиевый комплекс синтетического 18-членного пептида с последовательностью аминокислот участка белка вируса иммунодефицита человека [86].

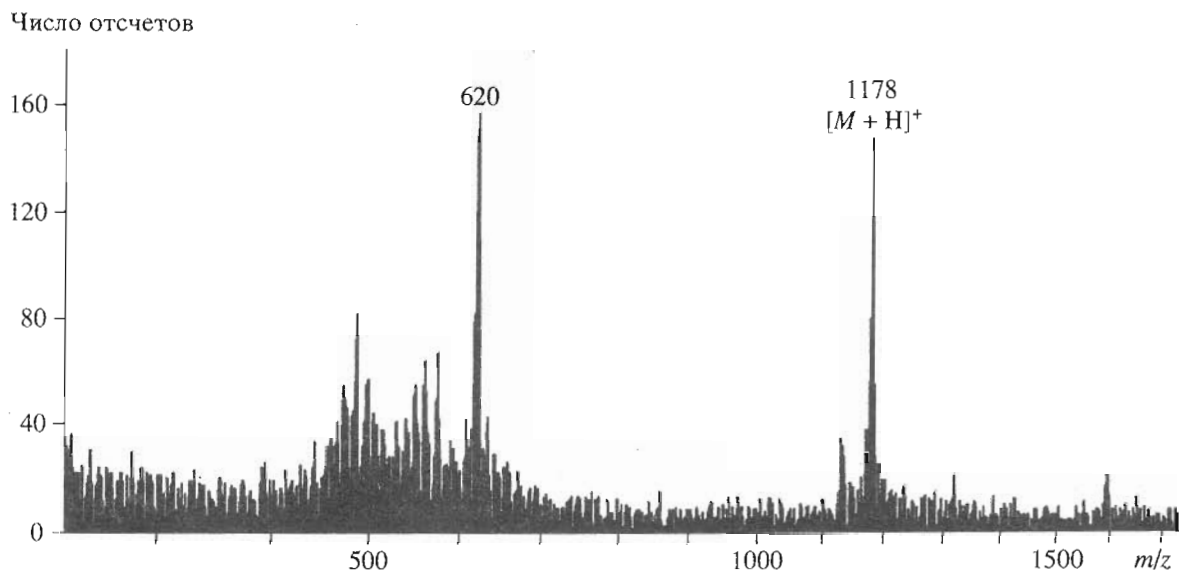


Рис. 3. Масс-спектр гемпептида H-Cys-Ala-Gln-Cys-His-OH последовательности цитохрома *c* дрожжей *Pihia membranoefasiencie* (M_r 1177) [122]. Спектр зарегистрирован нами на приборе МС БХ [4], $m/\Delta m$ (FWHM) по ионам $(\text{CsI})_2\text{Cs}^+$ равна 500.

Кроме ионов $[M + H]^+$ пептиды могут образовывать олигомерные ионы низкой интенсивности [116, 117]. Присутствие сигналов этих ионов в спектре обычно свидетельствует о низком качестве приготовленной пробы.

Спектры отрицательных ионов пептидов и белков в некоторых случаях используются для подтверждения результатов, полученных для положительных ионов [57, 94, 118], хотя интенсивность сигналов ионов $[M - H]^-$ и редко регистрируемых ионов $[M - 2H]^{2-}$ [57, 118] значительно ниже, чем у сигналов $[M + H]^+$.

Наличие фрагментных ионов позволяет получать информацию о структуре исследуемого вещества – модифицирующих, защитных, простетических и других группах, дисульфидных связях и аминокислотной последовательности. Интенсивность фрагментных ионов в спектре PD MS редко превышает интенсивность иона $[M + H]^+$. Такое превышение удается наблюдать, если фрагментные ионы имеют небольшую массу в сравнении с массой исследуемого соединения [96, 97] или при невысокой устойчивости иона $[M + H]^+$ в случае некоторых защищенных пептидов [113, 114].

В масс-спектрах защищенных пептидов могут присутствовать сигналы ионов, соответствующие отщеплению N-концевой Вос-группы [116], ацетильной группы [114] или ацетамидометильной группы остатка цистеина [119].

Применение PD MS при исследовании полярных моно- и дифосфорилированных пептидов позволило получить кроме пика молекулярного иона интенсивный пик с m/z 97 $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$, подтверждающий наличие фосфатного остатка [120].

В отдельных случаях при PD наблюдалось частичное расщепление дисульфидных связей, например у инсулина быка [57], α -химотрипсина [111] и фрагмента рекомбинантного белка [121].

Метод PD MS использовался нами для исследования цитохромов *c*, содержащих простетическую группу, и гемпептидов цитохромов *c* [122]. В масс-спектрах всех этих соединений зарегистрирована характерная серия сигналов фрагментных ионов в области m/z 400 - 650, связанная с распадом гемовой группы (рис. 3). Наиболее интенсивен пик с m/z 620, соответствующий разрыву тиоэфирных связей.

Сигналы фрагментных ионов в спектрах гликопептидов соответствовали расщеплению углеводной части молекулы [123].

Избирательная фрагментация связи пептид-полимер при анализе пептидилполимеров дает информацию о результатах твердофазного синтеза олигопептидов без предварительного отщепления продукта от полимерного носителя [71].

Основные типы фрагментации пептидной цепи в спектрах PD MS аналогичны фрагментации при других неструктивных (“мягких”) методах ионизации. Это образование N-концевых ионов A, B и C, C-концевых ионов X, Y и Z, а также ионов, образующихся при расщеплении не только пептидной, но и боковой цепи, таких, как D, V и W (схема) [124] (таблица).

Регистрация ионов типа D, V и W позволяет различить в последовательности пептида или белка остатки Le/Leu и Glu/Lys, обладающие одинаковыми массами, а также Leu/Asn/Asp, Gln/Glu/Pro/Val и

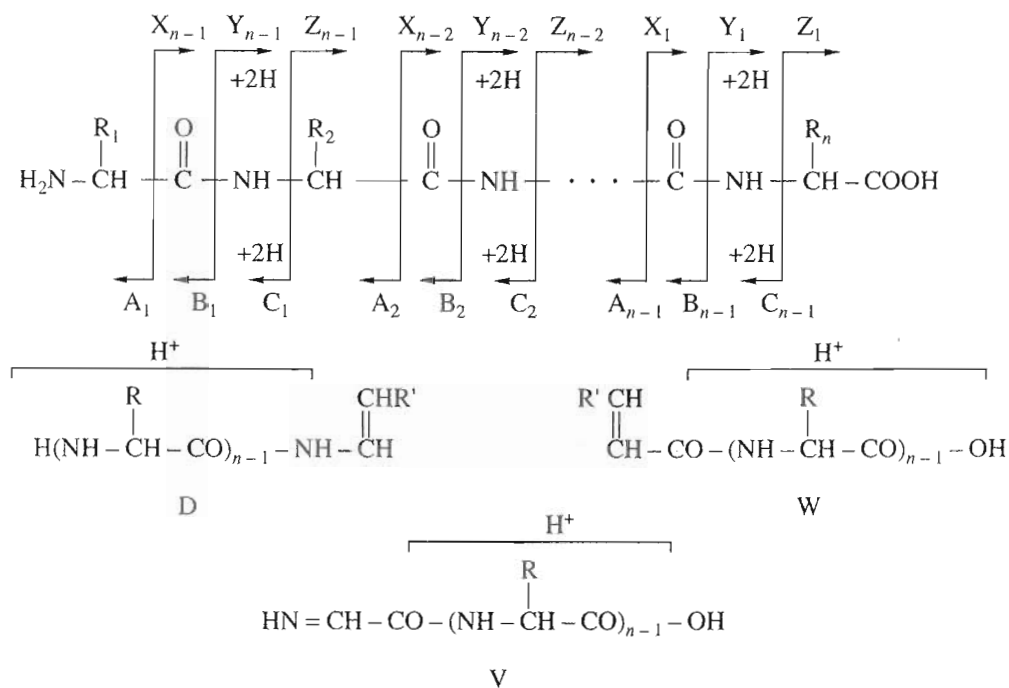


Схема.

Val/Thr, массы которых различаются на 1 - 2 единицы.

В последние годы исследованы некоторые закономерности фрагментации пептидной цепи в условиях PD. Обнаружена зависимость интенсивности фрагментных ионов от количества вещества в пробе [62, 127] и структуры матрицы [64]. Типы регистрируемых фрагментных ионов могут изменяться при промывании пробы [127], изменении структуры матрицы [65] или модификации пептида [95, 128]. Повышенная фрагментация пептидной цепи наблюдается для пептида, содержащего фрагмент $-(\text{GlySer})_2-$ [118], N-ацетилированных и N,O-перметилированных пептидов [113, 114].

Поскольку фрагментные ионы, приведенные на схеме, имеют чаще всего очень низкую интенсивность, для некоторых соединений обнаружить серии этих ионов возможно только при использовании приборов с достаточным разрешением. Так, проведено подробное исследование фрагментации брадикинина и его аналогов [94, 95]. С целью повышения интенсивности сигналов фрагментных ионов, а также для однозначного определения локализации остатка Lys авторы работы [128] предложили гуанидировать остаток этой аминокислоты. Используемая тактика перспективна и для структурных исследований других пептидов методом PD MS.

Оценить состав природных и синтетических смесей пептидов и белков, а в некоторых случаях и индивидуальность вещества без разделения на компоненты возможно вследствие высокой интенсивности сигналов ионов $[M + H]^+$ в спектрах

PD MS. Например, при анализе продуктов твердофазного синтеза кроме пика целевого вещества в спектрах присутствовали сигналы, относящиеся к побочным продуктам, образующимся при неполном отщеплении защитных групп [115, 129, 130], двойном присоединении аминокислот [125, 130], а также к соответствующим пептидам с модифицированными [115] или пропущенными аминокислотами [115, 125]. Вследствие незначительного отличия от структуры целевого вещества эти примеси иногда трудно обнаружить с помощью ВЭЖХ [115, 130], тогда как методом PD MS удастся не только обнаружить компоненты смеси, но и определить их структуру.

В работе [125] спектры, полученные методом PD MS, позволили установить на модельных пептидах средний выход побочных продуктов, целевого вещества и провести сравнение методов твердофазного пептидного синтеза [125].

При исследовании неочищенных обессоленных экстрактов эндокринных желез по результатам масс-спектрометрических измерений были идентифицированы тканевые пептидные гормоны и прогормоны анализируемой смеси [131]. С помощью масс-спектров экстрактов гипофиза быка после одностадийной очистки методом ВЭЖХ обнаружены также нейропептиды [132].

Еще одним примером успешного использования PD MS является анализ продуктов расщепления трипсином, химотрипсином и пепсином при пептидном картировании глюкагона [133]. В тех же смесях методом FAB MS обнаружены лишь немногие пептиды.

Фрагментные ионы некоторых пептидов*

Вещество (M_r)	Типы фрагментных ионов	Литература
[2,5,8- <i>D</i> -Ala]Ala ₁₀ -Val (827)	A, C, X	125
Фосфорилированный пептид LRRAS ^P G (852)	A, B, C, X, D	119
Брадикинин (1060) и аналоги	A, B, C, X, Y, Z, D, V, W	94, 95, 128
N-Ацетилированные N,O-перметилированные пептиды (795 - 2177)	A, B	113
	A, B, Y	114
Рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (1182)	A, Y, Z, V	65
Ангиотензин (1296)	A	62
[3,6,9,12,15,18- <i>D</i> -Ala]Ala ₂₀ -Val (1540)	A, C, X	125
Субстрат ренина (1759)	A	62
Пептиды α -нейротоксина змеи: B (1779), D (1848)	B, Y	119
Лейцин-парацельсин (1934)	B	62
Аламетицин (1963)	A, B, C	12
Мелиттин (2848)	Y	62
Пептиды поверхности легкого:		
SPB-5378 (2975)	A, Y	62
Pal-SPB (3214)	A, Y	62
SPC-134 (3548)	A	62
Pal-SPC (3787)	A	62
Низин (3354)	A, Z	64, 126
	A, B, C, X, Y	127
Глюкагон (3483)	A	62
Протамины (<3500)	A	107
Большой гастрин I (3850)	A	62
Пептид желто-зеленых клеток (8886)	A, D	96
Рибонуклеаза A (13682)	A, C, D	97
Папаин папайи (23422)	A, C, D	97
Протеиназа K (28665)	A, C, D	97

* Ионы с увеличенной массой, например C + 2 и другие, обозначены C.

Однако при анализе сложных смесей возможно "подавление" части сигналов при PD. Предложена методика подготовки проб для получения полной карты пептидов. Регистрируют масс-спектры положительных ионов смеси. При этом возможно "подавление" части сигналов и могут обнаружиться не все компоненты. Промыванием удаляют часть пептидов, спектр регистрируют повторно и результаты этих двух измерений сравнивают. По этой методике успешно проведено картирование продуктов триптического расщепления белка гормона роста человека [134]. Предложено также предотвращать "подавление" части сигналов этерификацией пептидов смеси. Одновременно получают информацию о количестве карбоксильных групп в этих пептидах по увеличению массы молекулярного иона [22].

При исследовании факторов, определяющих "подавление" ионизации пептидов в процессе PD,

лучшая корреляция результатов MS-анализа наблюдается по отношению к времени удерживания пептидов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖК [135, 136].

Вследствие использования нитроцеллюлозной матрицы и недеструктивного характера PD еще одну или две реакции можно проводить в той же пробе, в которой осуществлялись начальные измерения. К таким реакциям относятся ферментное расщепление карбоксипептидазами [108, 137], протеиназами [109, 138, 139], α -химотрипсином и трипсином [109], а также модификации химическими реагентами, например дитиотреитом [139 - 141] и аммиачным буферным раствором [138].

Указанные выше возможности PD MS позволили разработать стратегию определения расположения дисульфидных связей в пептидах с известной линейной структурой [140], идентифицировать модифицирующие группы и их расположение [129].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Burlingame A.L., Baillie T.A., Russell D.H.* // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 467R - 502R.
2. *Torgerson D.F., Skowronski R.P., Macfarlane R.D.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974. V. 60. P. 616 - 621.
3. *Cotter R.J.* // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. P. 781 - 793A.
4. *Knysh A.N., Savin O.R., Loschinin M.B., Kirianov G.J., Bondarenko P.V., Zubarev R.A., Rozynov B.V.* // *Proc. V Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Active Nat. Prod.* V. 2. Varna, 1989. P. 370 - 372.
5. *Sundqvist B., Macfarlane R.D.* // *Mass Spectrom. Rev.* 1985. V. 4. P. 421 - 460.
6. *Сысоев А.А., Артаев В.Б.* // *Журн. аналит. химии.* 1991. Т. 46. Вып. 1. С. 6 - 18.
7. *Geno P.W., Macfarlane R.D.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987. V. 77. P. 75 - 94.
8. *Macfarlane R.D., Torgerson D.F.* // *Science.* 1976. V. 191. P. 920 - 925.
9. *Geno P.W., Macfarlane R.D.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1986. V. 74. P. 43 - 57.
10. *Macfarlane R.D., Hill J.C., Jacobs D.L.* // *Anal. Instrum.* 1987. V. 16. P. 51 - 69.
11. *Della-Negra S., Le Beyec Y.* // *Anal. Chem.* 1985. V. 57. P. 2035 - 2040.
12. *Chait B.T.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1989. V. 92. P. 297 - 329.
13. *Sundqvist B.U.R., Hakansson P., Hedin A., Fenyó D., Roepstorff P., Johnson R.E.* // *NATO ASI Ser. Ser. B.* 1991. V. 269. P. 7 - 17.
14. *Macfarlane R.D.* // *Methods Enzymol.* 1990. V. 193. P. 263 - 280.
15. *McNeal C.J., Hughes J.M., Lewis G.J., Dahl L.F.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 113. P. 272 - 273.
16. *Riggi F.* // *Nuovo Cimento Soc. Ital. Fis., D.* 1987. V. 9. P. 275 - 282.
17. *Lindsey J.S., Chaudhary T., Chait B.T.* // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 2804 - 2814.
18. *Aduru S., Chait B.T.* // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 1621 - 1625.
19. *Demirev P.A.* // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1987. V. 14. P. 214 - 246.
20. *Kamensky I., Craig A.G.* // *Anal. Instrum.* 1987. V. 16. P. 71 - 91.
21. *Roepstorff P., Richter J.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1992. V. 118/119. P. 789 - 809.
22. *Schmitter J.M.* // *J. Chrom.* 1991. V. 557. P. 359 - 368.
23. *Jungclas H., Danigel H., Schmidt L.* // *Org. Mass Spectrom.* 1982. V. 17. P. 86 - 90.
24. *Jungclas H., Danigel H., Schmidt L., Dellbrugge J.* // *Org. Mass Spectrom.* 1982. V. 17. P. 499 - 502.
25. *Jungclas H., Danigel H., Schmidt L.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1983. V. 46. Part B. P. 197 - 200.
26. *Danigel H., Jungclas H., Schmidt L.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1983. V. 52. P. 223 - 240.
27. *Jungclas H., Danigel H., Schmidt L.* // *J. Chrom.* 1983. V. 271. P. 35 - 41.
28. *Jungclas H., Pfluger K.-H., Schmidt L.* // *The Analysis of Peptides and Proteins by Mass Spectrometry* / Ed. C.J. McNeal. N.Y.: Wiley, 1988. P. 197 - 201.
29. *Jungclas H., Pfluger K.-H., Schmidt L., Hahn M.* // *J. Phys. C.* 1989. V. 50. P. 41 - 46.
30. *Jungclas H., Schmidt L., Koehl P., Fritsch H.W.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1993. V. 126. P. 157 - 161.
31. *Сундквист Б.У.Р.* // *Биоорганич. химия.* 1991. Т. 17. С. 1313 - 1328.
32. *Sundqvist B.U.R.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1992. V. 118/119. P. 265 - 287.
33. *Johnson R.E.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1993. V. 126. P. 17 - 24.
34. *Macfarlane R.D., McNeal C.J., Martin C.R.* // *Anal. Chem.* 1986. V. 58. P. 1091 - 1097.
35. *McNeal C.J., Macfarlane R.D., Thurston E.L.* // *Anal. Chem.* 1979. V. 51. P. 2036 - 2039.
36. *Bolbach G., Della-Negra S., Deprum C., Le Beyec Y., Standing K.G.* // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1987. V. 1. P. 22 - 24.
37. *Bolbach G., Beavis R., Della Negra S., Deprum C., Ens W., Le Beyec Y., Main D.E., Schueler B., Standing K.G.* // *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B.* 1988. V. 30. P. 74 - 82.
38. *Bolbach G., Viari A., Galera R., Brunot A., Blais J.C.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1992. V. 112. P. 93 - 100.
39. *Craig A.G., Bennich H.* // *Anal. Chem.* 1989. V. 61. P. 375 - 382.
40. *Nielsen P.F., Roepstorff P.* // *Proc. of 4th International Conference on Ion Formation from Organic Solids (IFOS IV).* 1987 / Ed. A. Benningshoven. Chichester: Wiley, 1989. P. 87 - 90.
41. *Nielsen P.F., Klarskov K., Hojrup P., Roepstorff P.* // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1988. V. 17. P. 355 - 362.
42. *Krueger F.R., Wien K.* // *Z. Naturforsch., A.* 1978. V. 33. P. 638 - 643.
43. *Juvet R.S., Allmaier G.M., Schmid E.R.* // *Anal. Chim. Acta.* 1990. V. 241. P. 241 - 248.
44. *Juvet R.S., Allmaier G.M., Schmid E.R.* // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 2352 - 2357.
45. *Park M.A., Schweikert E.A., da Silveira E.F.* // *J. Chem. Phys.* 1992. V. 96. P. 3206 - 3210.
46. *McNeal C.J., Narang S.A., Macfarlane R.D., Hsiung H.M., Brousseau R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. P. 735 - 739.
47. *Allmaier G., Caparros M.R., Pittenauer E.* // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992. V. 6. P. 284 - 288.
48. *Macfarlane R.D., Hill J.C., Geno P.W., Mudgett P.D.* // *The Analysis of Peptides and Proteins by Mass Spectrometry* / Ed. C.J. McNeal. Chichester: J. Wiley, 1988. P. 239 - 247.
49. *Mudgett P.D., Hill J.C., Macfarlane R.D.* // *The Analysis of Peptides and Proteins by Mass Spectrometry* / Ed. C.J. McNeal. N.Y.: Wiley, 1988. P. 233 - 237.
50. *Jordan E.A., Macfarlane R.D., Martin C.R., McNeal C.J.* // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1983. V. 53. P. 345 - 348.
51. *Lacey M.P., Keough T.* // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 1482 - 1487.
52. *Quinones L., Schweikert E.A.* // *J. Vac. Sci. Technol., A.* 1988. V. 6. P. 946 - 949.
53. *Park M.A., Cox B.D., Schweikert E.A.* // *J. Vac. Sci. Technol., A.* 1991. V. 9. P. 1300 - 1306.
54. *Feld H., Leute A., Zurmuhlen R., Benninghoven A.* // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 903 - 910.

55. *McNeal C.J., Macfarlane R.D.* // Proc. of 4th International Conference on Ion Formation from Organic Solids (IFOS IV). 1987 / Ed. A. Benningshoven. Chichester: Wiley, 1989. P. 63 - 70.
56. *McNeal C.J., Macfarlane R.D.* // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 2132 - 2139.
57. *Wolf B., Macfarlane R.D.* // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1991. V. 2. P. 29 - 32.
58. *Allmaier G., Pitternauer E., Schmid E.R.* // Organ. Mass Spectrom. 1991. V. 26. P. 804 - 806.
59. *Alai M., Demirev P., Fenselau C., Cotter R.J.* // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 1303 - 1307.
60. *Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Mauriac C.* // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1993. V. 126. P. 163 - 177.
61. *Pinkston J.D., Hentschel R.T., Lacey M.P., Keough T.* // Fresenius J. Anal. Chem. 1992. V. 344. P. 447 - 452.
62. *Buko A.M., Sarin V.K.* // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1990. V. 4. P. 541 - 545.
63. *Roepstorff P., Nielsen P.F., Klarskov K., Hojrup P.* // The Analysis of Peptides and Proteins by Mass Spectrometry / Ed. C.J. McNeal. N.Y.: Wiley, 1988. P. 55 - 80.
64. *Nielsen P.F., Roepstorff P.* // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1988. V. 17. P. 137 - 141.
65. *Craig A.G., Bennich H., Derrick P.J.* // Organ. Mass Spectrom. 1991. V. 26. P. 1037 - 1038.
66. *Jardine I., Scanlan G.F., Tsarbopoulos A.* // Anal. Chem. 1988. V. 60. P. 1086 - 1088.
67. *Craig A.G., Bennich H.* // Anal. Chem. 1991. V. 63. P. 352 - 356.
68. *Дементьев А.А., Рябченко Н.Ф., Протасевич И.И., Гольицин П.Н., Степанов А.И., Орлов В.М., Пустобаев В.Н., Макаров А.А., Мусеев Г.П., Карпейский М.Я., Кирпичников М.П., Шляпников С.В.* // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. Вып. 6. С. 1338 - 1349.
69. *Jonsson G., Hedin A., Hakansson P., Sundqvist B.U.R.* // J. Phys. C. 1989. V. 50. P. 59 - 61.
70. *Bondarenko P.V., Zubarev R.A., Knysh A.N., Rozynov B.V.* // Biol. Mass Spectrom. 1992. V. 22. P. 323 - 330.
71. *Van Veelen P.A., Tjaden U.R., van der Greef J.* // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1991. V. 5. P. 565 - 568.
72. *Bondarenko P.V., Zubarev R.A., Knysh A.N., Rozynov B.V.* // Organ. Mass Spectrom. 1991. V. 26. P. 765 - 769.
73. *Macfarlane R.D., McNeal C.J., Jacobs D.L.* // J. Phys. C. 1989. V. 50. P. 21 - 25.
74. *Field F.H.* // Proc. of 10th International Mass-Spectrometry Conference. 1985. Swansea. 1986. P. 271 - 286.
75. *Zoeller J.H., Macfarlane R.D., Zingaro R.A.* // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1987. V. 77. P. 21 - 30.
76. *Chait B.T., Field F.H.* // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 5519 - 5521.
77. *Chait B.T., Field F.H.* // J. Am. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 1931 - 1938.
78. *Bouchonnet S., Denhez J.-P., Hoppilliard Y., Mauriac C.* // Anal. Chem. 1992. V. 64. P. 743 - 754.
79. *Roepstorff P., Klarskov K., Hojrup P., Nielsen P.F.* // Biochem. Soc. Trans. 1989. V. 17. P. 250 - 254.
80. *Roepstorff P.* // Analyst. 1992. V. 117. P. 299 - 303.
81. *Demirev P., Daya D., Barlo D.N., Brinkmalm G., Fenyoe D., Hakansson P., Sundqvist B.U.R.* // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1993. V. 123. P. 69 - 75.
82. *Viari A., Ballini J.P., Vigny P., Shire D., Dousset P.* // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1987. V. 14. P. 83 - 90.
83. *Wang R., Chen L., Cotter R.J., Qureshi N., Takayama K.* // J. Microbiol. Methods. 1992. V. 15. P. 151 - 166.
84. *Chait B.T., Agosta W.C., Field F.H.* // Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 1981. V. 39. P. 339 - 366.
85. *Blais J.-C., Viari A., Cole R.B., Tabet J.-C.* // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1990. V. 98. P. 155 - 166.
86. *Frankel A.D., Chen L., Cotter R.J., Pabo C.O.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 6297 - 6300.
87. *Maderstadt M., Ganson O.A., Pannel L.K., Vogtele F., Kiggen W.* // Nucl. Med. Biol. 1990. V. 17. P. 409 - 412.
88. *Yang Y.M., Sokoloski E.A., Fales H.M., Pannell L.K.* // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1986. V. 13. P. 489 - 494.
89. *Reztsova N.A., Sergeeva N.V., Evstigneeva R.P., Kulish M.A.* // Mendeleev. Commun. 1994. P. 140 - 141.
90. *McNeal C.J., Ogilvie K.K., Theriault N.Y., Nemer M.J.* // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 976 - 980.
91. *Riggi F., Spina R.M.* // Nuovo Cimento Soc. Ital. Fis., D. 1989. V. 11. P. 801 - 810.
92. *Сысоев А.А., Артаев В.Б.* // Письма в ЖТФ. 1989. Т. 15. С. 1 - 4.
93. *Van Veelen P.A., Tjaden U.R., van der Greef J.* // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1991. V. 110. P. 93 - 101.
94. *Bunk D.M., Macfarlane R.D.* // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1991. V. 2. P. 379 - 386.
95. *Bunk D.M., Macfarlane R.D.* // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1991. V. 111. P. 55 - 75.
96. *Van Veelen P.A., Tjaden U.R., van der Greef J.* // Organ. Mass Spectrom. 1991. V. 26. P. 345 - 346.
97. *Bunk D.M., Macfarlane R.D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 6215 - 6219.
98. *Viari A., Ballini J.P., Vigny P., Blonski C., Dousset P., Shire D.* // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. P. 3349 - 3352.
99. *Hoppilliard Y., Mauriac C.* // Organ. Mass Spectrom. 1993. V. 28. P. 977 - 982.
100. *Roepstorff R.* // NATO ASI Ser., Ser. C. 1992. V. 353. P. 213 - 227.
101. *Roepstorff P.* // Acc. Chem. Res. 1989. V. 22. P. 421 - 427.
102. *Roepstorff P., Nielsen P.F., Hojrup P.* // Biochem. Soc. Trans. 1987. V. 15. P. 155 - 158.
103. *Tsarbopoulos A.* // Pept. Res. 1989. V. 2. P. 258 - 266.
104. *Weinmann W., Baumeister K., Kaufmann I., Przybylski M.* // J. Chromatogr. 1993. V. 628. P. 111 - 121.
105. *Takigiku R., Keough T., Lacey M.P., Schneider R.E.* // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1990. V. 4. P. 24 - 29.
106. *Loo J.A., Edmonds C.G., Smith R.D., Lacey M.P., Keough T.* // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1990. V. 19. P. 286 - 294.
107. *Schindler P., Bitsch F., Klarskov K., Roepstorff P., Briand G., Wouters-Tyrou D., Sautiere P., Van Dorsse-laer A.* // Eur. J. Biochem. 1991. V. 195. P. 621 - 629.
108. *Klarskov K., Breddam K., Roepstorff P.* // Anal. Biochem. 1989. V. 180. P. 28 - 37.
109. *Jonsson G., Hedin A., Hakansson P., Sundqvist B.U.R.* // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1988. V. 2. P. 154 - 156.
110. *Tsarbopoulos A., Pramanik B.N., Nagabhushan T.L., Trotta P.P., Siegel M.M., Tsao R., Doelling V.W.* // Anal. Chim. Acta. 1990. V. 241. P. 315 - 320.
111. *Lacey M.P., Keough T.* // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1989. V. 3. P. 323 - 328.

112. Caparros M., Pittenauer E., Schmid E.R., de Pedro M.A., Allmaier G. // FEBS Lett. 1993. V. 316. P. 181 - 185.
113. Talbo G., Roepstorff P. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1990. V. 19. P. 589 - 596.
114. Talbo G., Hojrup P., Rahbek-Nielsen H., Andersen S.O., Roepstorff P. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 195. P. 495 - 504.
115. Chait B.T. // The Analysis of Peptides and Proteins by Mass Spectrometry / Ed. C.J. McNeal. N.Y.: Wiley, 1988. P. 21 - 39.
116. Chait B.T. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1987. V. 78. P. 237 - 250.
117. Kamensky I., Fohlman J., Hakansson P., Kjellberg J., Peterson P., Sundqvist B. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 1983. V. 46. P. 467 - 470.
118. Wang R., Cotter R.J., Tiao-Yin Lin, Laskowski M., Jr. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1988. V. 2. P. 71 - 73.
119. Hung Lam-Thanh, Deprum C., Le Beyec Y. // Rap. Commun. Mass Spectrom. 1990. V. 4. P. 41 - 42.
120. Craig A.G., Engstrom A., Bennich H., Hoffmann-Posorske E., Meyer E. // Biol. Mass Spectrom. 1991. V. 20. P. 565 - 574.
121. Tsarhopoulos A., Pramanik B.N., Reichert P., Siegel M.M., Nagabhushan T.L., Trotta P.P. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1991. V. 5. P. 81 - 85.
122. Журавлева Д.В., Кулиш М.А., Миронов А.Ф. Способ получения гемпептида цитохрома с: А. с. СССР 1768613 / Б. И. 1992. № 38. С. 81.
123. Jardine I. // The Analysis of Peptides and Proteins by Mass Spectrometry / Ed. C.J. McNeal. N.Y.: Wiley, 1988. P. 41 - 54.
124. Biemann K. // Mass Spectrometry of Biological Materials / Eds C.N. McEwen, B.S. Larsen. N.Y.: Marcel Dekker, 1990. P. 3 - 24.
125. Merrifield R.B., Singer J., Chait B.T. // Anal. Biochem. 1988. V. 174. P. 399 - 414.
126. Roepstorff P., Nielsen P.F., Kamensky I., Craig A.G., Self R. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1988. V. 15. P. 305 - 310.
127. Craig A.G. // Biol. Mass Spectrom. 1991. V. 20. P. 195 - 202.
128. Bunk D.M., Macfarlane R.D. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1993. V. 126. P. 123 - 136.
129. Chowdhury S.K., Chait B.T. // Anal. Biochem. 1989. V. 180. P. 387 - 395.
130. Fontenot J.D., Ball J.M., Miller M.A., David C.M., Montelaro R.C. // Pept. Res. 1991. V. 4. P. 19 - 25.
131. Andrews P.C., Alai M., Cotter R.J. // Anal. Biochem. 1988. V. 174. P. 23 - 31.
132. Feistner G.E., Hojrup P., Evans D.J., Barofsky D.F., Faull K.F., Roepstorff P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6013 - 6017.
133. Keough T., Lacey M.P., Lucas D.S., Grant R.A., Smith L.A., Jeffries T.C. // The Analysis of Peptides and Proteins by Mass Spectrometry / Ed. C.J. McNeal. N.Y.: Wiley, 1988. P. 115 - 133.
134. Chen L., Cotter R.J., Stults J.T. // Anal. Chem. 1989. V. 183. P. 190 - 194.
135. Wang R., Chen L., Cotter R.J. // Anal. Chem. 1990. V. 62. P. 1700 - 1705.
136. Allmaier G., Pittenauer E., Schmid E.R. // NATO ASI Ser., Ser. B. 1991. V. 269. P. 39 - 44.
137. Craig A., Engstrom A., Bennich H., Kamensky I. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1987. V. 14. P. 669 - 673.
138. Tsarhopoulos A., Gross M., Kumar R., Jardine I. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1989. V. 18. P. 387 - 393.
139. Nielsen P.F., Roepstorff P., Clausen I.G., Jensen A.B., Jonassen I., Svendsen A., Balschmidt P., Hansen F.B. // Protein Eng. 1989. V. 2. P. 449 - 457.
140. Serensen H.H., Thomsen J., Bayne S., Hojrup P., Roepstorff P. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1990. V. 19. P. 713 - 720.
141. Tsarhopoulos A., Becker G.W., Occolowitz J.L., Jardine I. // Anal. Biochem. 1988. V. 171. P. 113 - 123.

Plasma Desorption Mass Spectrometry of Natural Substances. Part I. Characteristics of the Method and Its Applications to the Analysis of Proteins and Peptides

N. A. Reztsova¹, M. A. Kulish, and A. F. Mironov

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

Abstract—Applications of plasma desorption mass spectrometry (PD MS) to the analysis of natural substances are reviewed with the special emphasis on its use in peptide and protein chemistry (Part I). PD MS of nucleotides, carbohydrates, lipids, and pigments will be reviewed in Part II (see the following issue of this journal). The review covers the literature from 1982 to 1994.

Key words: plasma desorption mass spectrometry, peptides, proteins.

¹ To whom correspondence should be addressed.