



УДК 547.9 : 543.51

© 1991 г.

*Б. У. Р. Сундквист***ПЛАЗМЕННО-ДЕСОРБЦИОННАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ.
ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕСОРБЦИИ И ВОЗМОЖНОСТИ
ПРИМЕНЕНИЯ**

*Отдел физики ионов факультета радиационных наук
Уппсальского университета
(Абонементный ящик 535, S-751 21 Уппсала, Швеция)*

Описано применение масс-спектрометрии с десорбционной ионизацией ускоренными частицами для анализа биомолекул. Особое внимание уделено плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с бомбардирующими частицами, энергия которых измеряется величинами в десятки МэВ. Обсуждаются результаты экспериментального и теоретического изучения механизмов появления тяжелых молекулярных ионов в газовой фазе. Рассмотрены некоторые результаты практического применения метода плазменно-десорбционной масс-спектрометрии в химии белка.

Масс-спектрометрия основана на получении, ускорении, разделении по массам и последующем детектировании ионов в газовой фазе. Получение в газовой фазе молекулярных ионов тяжелых биомолекул сопряжено с определенными трудностями, и этим значительно ограничивается применение масс-спектрометрии в науках о жизни. Наибольшие успехи в масс-спектральном анализе биомолекул достигнуты благодаря применению бомбардировки твердых и жидких органических веществ энергетически богатыми ускоренными частицами [1—3]. Возможно, что для этих целей могут оказаться удобными методы, подобные термораспылению растворов [4]. Большое впечатление производят исследования, позволившие недавно получить в газовой фазе молекулярные ионы крупных белков с молекулярными массами в диапазоне 100 кДа методом масс-спектрометрии с электрораспылением растворов [5] и с десорбционной ионизацией лазерным УФ-излучением [6].

Настоящая статья посвящена исследованию процессов распыления молекул в условиях масс-спектрометрии десорбционной ионизации [7].

В масс-спектрометрии десорбционной ионизации используются два типа бомбардирующих частиц. Если скорости бомбардирующих частиц меньше скорости, которой в соответствии с «полуклассической» моделью Н. Бора обладает электрон в атоме водорода (так называемая боровская скорость электрона, равная $0,22 \text{ см} \cdot \text{нс}^{-1}$), то такие частицы носят название медленных и десорбируют органические молекулы, главным образом в результате столкновений с их ядрами. Такой вид десорбции получил название ядерного распыления. Частицы со скоростями большими боровской десорбируют органические молекулы в результате воздействия на их электронные оболочки. Десорбция молекул в результате торможения частиц за счет взаимодействия с электронами вещества носит название электронного распыления.

Плазменно-десорбционная масс-спектрометрия (ПДМС)

Нанесенные на твердую поверхность органические молекулы в вакууме бомбардируются осколками деления ядер радиоактивного калифорния-

Сокращения: МС — масс-спектрометрия, БУА — бомбардировка ускоренными атомами, ВИ — вторичные ионы, ПД — плазменная десорбция.

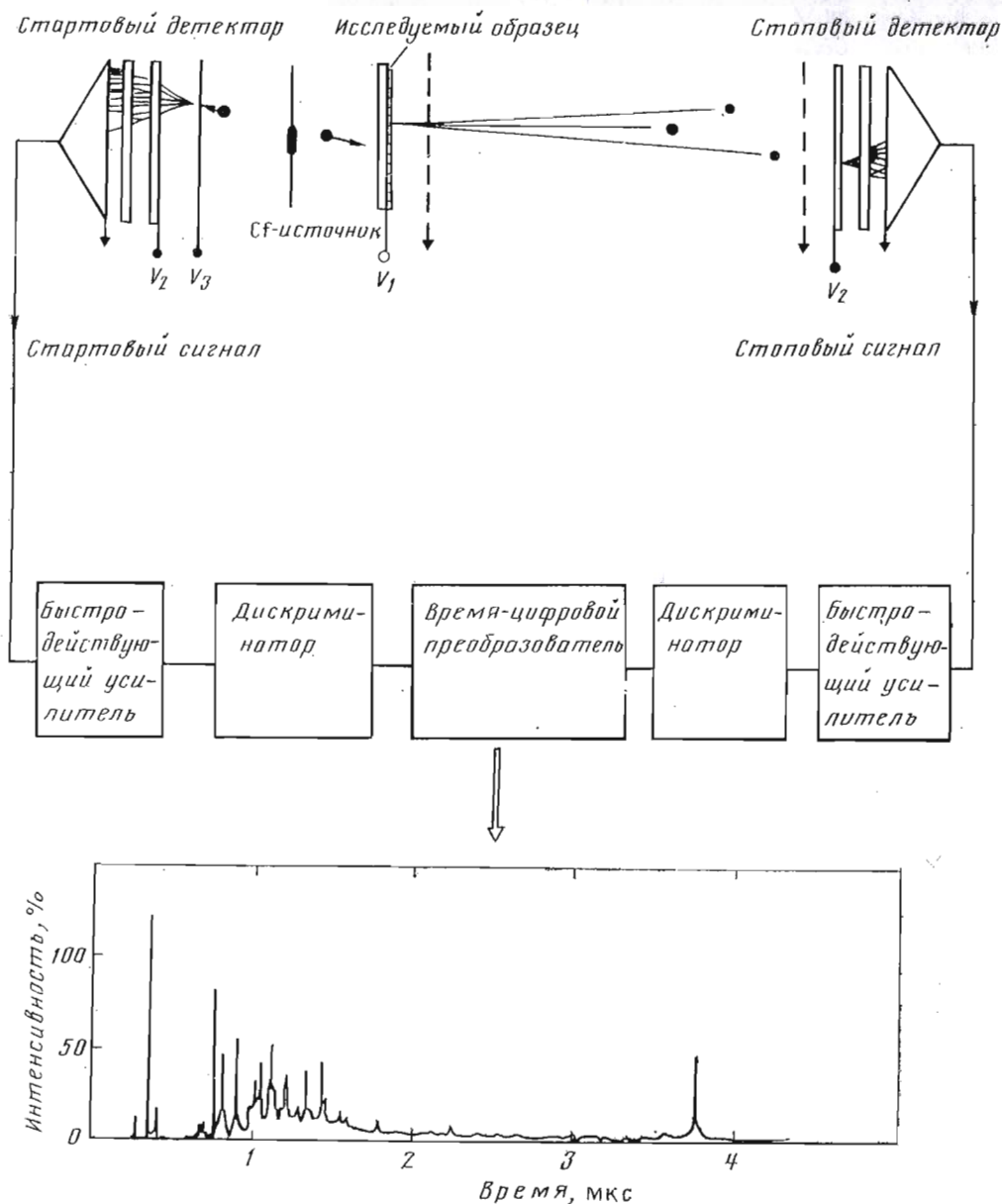


Рис. 1. Принципиальная схема устройства плазменно-десорбционного масс-спектрометра V_1 , V_2 и V_3 — напряжения в В на электродах

252. Как видно из рис. 1, при делении калифорния-252 образуются два примерно одинаковых осколка, разлетающихся в противоположных направлениях. Один осколок бомбардирует мишень с исследуемым веществом, а второй летит в сторону детектора первичных частиц, который носит название стартового (расстояние полета обоих осколков одинаково). Время достижения одним из осколков стартового детектора соответствует началу десорбции исследуемого органического вещества, вызываемой попаданием в мишень второго ядерного осколка.

В соответствии с приведенной выше квалификацией бомбардирующих частиц осколки деления ядер калифорния-252 следует считать быстрыми частицами.

Каждый ядерный осколок (первичный ион), попадая в мишень с пробой, вызывает выброс в газовую фазу определенного количества ионов исследуемого органического вещества, которые носят название вторичных ионов. Вторичные ионы после ускорения электрическим полем

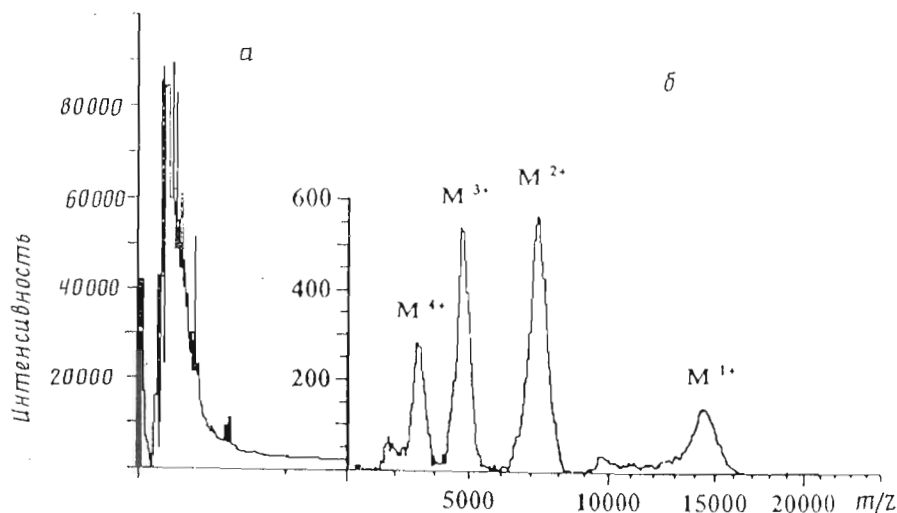


Рис. 3. ПД-масс-спектр положительных ионов лизоцима белка куриного яйца (а). б — область молекулярного иона после вычитания фона

коренными атомами (МСБУА) [3] и ПДМС, является, как это показано для лизоцима, возможность получения очень крупных молекулярных ионов.

Процесс распыления тяжелых молекул в свою очередь представляет серьезный фундаментальный теоретический интерес. Не менее важно и изучение механизма передачи энергии от налетающей частицы системе электронов органической молекулы с дальнейшим ее превращением в кинетическую энергию выбиваемых с поверхности при электронном распылении тяжелых молекул.

Выход нейтралей при электронном распылении твердых органических веществ

Большинство данных о распылении твердых органических веществ получено методом масс-спектрометрии при изучении вторичных ионов, а не нейтральных частиц, т. е. эти результаты основаны на измерении выходов вторичных ионов в процессах десорбционной ионизации молекул. Только ученым Уппсальского университета Салепуру и др. [10] и Хейдину и др. [11] удалось получить данные о выходах нейтральных частиц в процессах электронного распыления органических молекул. Они изучали процесс распыления многослойного твердого образца лейцина при комнатной температуре, бомбардируя его ионами ^{127}I с энергией 78,2 МэВ, которая соизмерима с энергиями осколков ядерного деления калифорния-252, и обнаружили, что при попадании в мишень каждого иона в газовую фазу переходит 1200 ± 200 неразрушенных молекул аминокислоты и что выход нейтральных молекул лейцина пропорционален третьей степени энергии их электронного возбуждения. При плотностях потоков энергии, создаваемых осколками ядерного деления, количества распыляемых в газовую фазу молекулярных ионов и нейтральных молекул находятся в соотношении примерно 1 : 10 000.

Данные о распылении молекул с массами до 160 кДа позволяют грубо оценить верхний предел масс молекул, которые, возможно, будут исследоваться методом ПДМС. Эта величина значительно превосходит массу овальбумина (M_r 45 000) — наиболее тяжелого из до сих пор анализируемых методом ПДМС белков [12].

Электронное распыление жирнокислотных пленок Ленгмюра — Блоджетта

Как было показано выше, осколок ядерного деления при попадании в мишень может вызвать выброс в газовую фазу примерно около 1000 молекул лейцина, которые составляют значительную долю объема распыляемого вещества. Естественно возникает вопрос: может ли в результате такого единичного акта распыления на поверхности вещества образоваться углубление в виде кратера и, если может, какова форма такого кратера? Основываясь на измерении выхода распыления ионами ^{127}I с энергией 78,2 МэВ и предположив, что форма кратера полусферическая, можно считать радиус кратера, который равняется 38 Å [13].

Для экспериментального доказательства образования кратеров Сейв и др. [14] и Больбах и др. [15] провели опыты по распылению пленки Ленгмюра—Блоджетта (ЛБ) из жирных кислот. Полученные результаты показали, что переходящие в газовую фазу молекулярные ионы жирных кислот частично образуются из молекул, расположенных в нижних слоях пленок. Эти опыты позволяют сделать вывод об образовании кратеров на поверхности жирнокислотных пленок. К такому же выводу пришли исследователи группы, работающей в Орси (Франция), которые проводили аналогичные эксперименты [15]. В настоящее время остается открытым вопрос о времени существования этих кратеров на поверхности пробы и о возможности их наблюдения с помощью микроскопа.

Энергетическое и угловое распределение вторичных ионов при электронном распылении органических молекул

Знание начального распределения выбрасываемых с поверхности мишени частиц по скоростям позволяет сделать определенный вывод о механизме распыления. Для электронного распыления нейтральных фрагментов такие данные пока отсутствуют. Правда, имеется ограниченное число данных по получению легких молекулярных и осколочных ионов в газовой фазе [16—18]. Для наиболее тяжелых органических молекулярных ионов таких данных явно недостаточно. Видиязейкейра и др. [19] и Якобс и др. [18] измеряли энергетическое и угловое распределение молекулярных ионов инсулина крупного рогатого скота (M_r 5733).

Недавно в Уппсале были получены данные о радиальном распределении по скоростям молекулярных и осколочных ионов инсулина [20]. На пути движения ионов в трубе дрейфа были установлены две пары отклоняющих пластин (силовые линии электрических полей между пластинами направлены по осям X и Y , т. е. под прямым углом друг к другу, как показано на рис. 4), сразу же после области ускорения, т. е. в начале свободного от полей района дрейфа времяпролетного масс-спектрометра. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 4, где изображен график зависимости интенсивности положительных молекулярного (1) и осколочного (2) C_nH_3^+ -ионов инсулина от величины напряжения на одной из пар отклоняющих пластин. Так же выглядят экспериментальные результаты, полученные при изменении напряжения на другой паре пластин. Интересно, что кривая зависимости интенсивности пика молекулярного иона инсулина от величины отклоняющего напряжения имеет минимум при нулевом значении отклоняющего потенциала.

В этом специфическом масс-спектрометре осколки деления ядер калифорния-252 (см. вставку в правом верхнем углу рис. 4) бомбардируют подложку со стороны, противоположной той, на которую нанесено исследуемое вещество, под различными углами, мало отличными от прямого.

На рис. 5 представлены графики радиального распределения скоростей молекулярных ионов белкового субстрата ренина (M_r 1801) при различных углах бомбардировки мишени ионами $^{127}\text{I}^{14+}$ с энергией 72,3 МэВ. Проведенные эксперименты показывают, что молекулярные ионы крупных молекул не покидают поверхности мишени под прямыми углами и не испаряются строго один за другим и что можно говорить

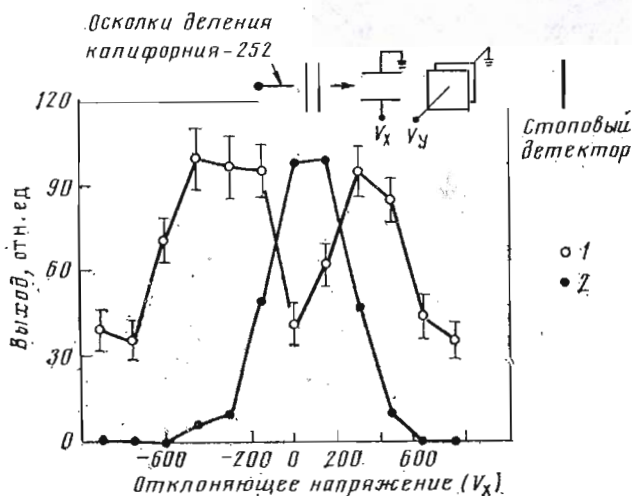


Рис. 4. Зависимость относительных выходов положительных молекулярных ионов инсулина крупного рогатого скота (1) и осколочных ионов CH_3^+ (2) от величины напряжения V_x , создающего электрическое поле между отклоняющими пластинами, силовые линии которого направлены перпендикулярно направлению движения вторичных ионов. Направление движения первичных ионов, которыми являются осколки деления радиоактивного калифорния-252, показано на вставке в правом верхнем углу рисунка

о некоторой функции распределения этих ионов по скоростям с максимумом в направлении перпендикуляра, восстановленного из центра поверхности мишени.

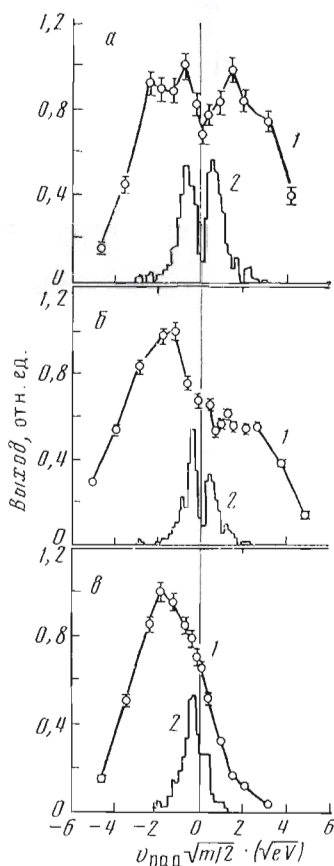
В последующих экспериментах Энса и др. [21] была тщательнейшим образом проверена правильность положения максимума этого распределения на перпендикуляре, восстановленном к центру поверхности мишени, и было обнаружено, что осколочные ионы распределяются симметрично вокруг этого направления. Никакого обратного эффекта струи вдоль направления трека, как предполагали Урбасек и др. [22], обнаружено не было.

То, что крупные, выбиваемые с поверхности органические молекулы «запоминают» направление налетающего пучка первичных частиц, указывает на простую передачу момента количества движения расширяющимся ядром трека со скоростью, соизмеримой со скоростями выбивания молекулы и распространения звука в твердых молекулярных образцах. Все это указывает на то, что процесс прямой передачи энергии молекулам, выбиваемым с поверхности мишени, в значительной степени напоминает энергопередачу в процессах, описываемых моделями механической ударной волны [23] или импульса давления [24].

Моделирование методом молекулярной динамики процессов электронного распыления крупных органических молекул

Для лучшего понимания процессов выбивания молекул с поверхности при электронном распылении органических веществ сделана попытка их компьютерного моделирования с использованием методов молекулярной динамики. Ранее Гаррисоном и др. [25, 26] были смоделированы процессы ядерного распыления органических веществ и выброса в газовую фазу полимеров при воздействии лазерного импульса, а процесс электронного распыления моделировался Хилфом и др. [27]. Модель, предложенная в Уппсале [28], основывается на предположении о том, что, проходя через вещество, быстрые ионы образуют в нем трек цилиндрической формы, который достаточно быстро расширяется. Это расширение трека может быть объяснено отдельно одним из трех предполагаемых процессов или их комбинированием: 1) кулоновскими взрывами в инфраструктурах тре-

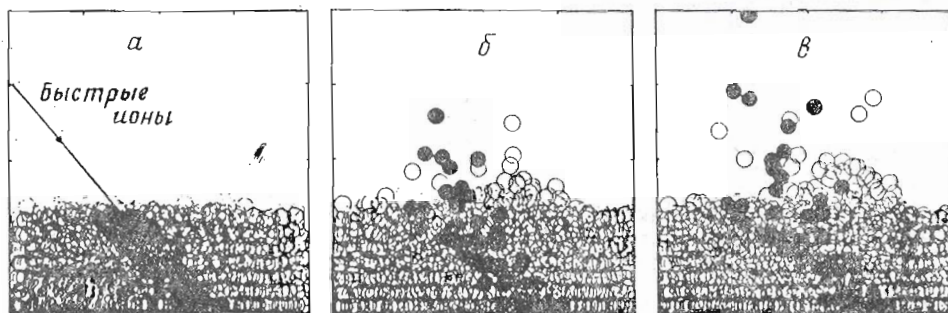
Рис. 5. Кривые радиального распределения по скоростям распыляемых молекул белкового субстрата ренина (M_r 1801), полученные экспериментально (1) и рассчитанные теоретически в предположении, что выбрасываемые с поверхности молекулы не расширяются (2). В опытах использовались пучки ионов $^{127}\text{I}^{14+}$ с энергией 72,3 МэВ с углами падения 0 (а), 10 (б) и 45° (в)



ка [29]; 2) распадом возбужденных молекул, образовавшихся сразу или в результате электронно-дырочных рекомбинаций, или переходом энергии возбуждения молекул в энергию их внутренних колебательных уровней [30]; 3) возбуждением нижних колебательных уровней низкоэнергетическими электронами, генерируемыми в инфраструктурах трека [31].

Расширение трека создает волну сжатия, которая будет распространяться в твердом теле, и по достижении его поверхности будет сбрасывать с нее молекулы органического вещества. Предполагается, что молекулы взаимодействуют друг с другом, как две механически сталкивающиеся частицы, поведение которых описывается потенциалом Леннарда — Джонса. Пока проведены расчеты лишь для нейтральных сферических молекул массой 10 кДа. С деталями моделирования процессов распыления можно познакомиться в недавно опубликованной работе Феньё и др. [32].

Из рис. 6, изображающих развивающийся во времени процесс распыления, ясно, что существует определенная асимметрия распределения нерасширяющихся молекул по углу выброса. При сравнении радиального распределения распыляемых молекул по скоростям, полученного при моделировании (2), с экспериментально измеренным (1) для трех различных углов падения (а — в) налетающих частиц [33] (рис. 5) видно, что результаты моделирования качественно воспроизводят экспериментально полученные данные. Количественные же различия можно объяснить тем, что при моделировании все распыляемые частицы рассматривались как незаряженные, а поверхность образца принималась идеально гладкой. Зависимость полного выхода распыления от куба величины энергии, передаваемой образцу, хорошо воспроизводится, по крайней мере для энергий наивысших плотностей. Моделирование подсказало вывод формулы для расчета количества распыляемых частиц в соответствии с моделью импульса сжатия.



Твердое
органическое
вещество

Рис. 6. Изображение моделируемых с применением ЭВМ процессов, протекающих при распылении молекул в момент образования бомбардирующей частицей трека цилиндрической формы ($t = 0$) (а), и соответственно через 30 (б) и 60 пс (в) после расширения этого трека. Угол падения бомбардирующих частиц 45° . Показана боковая проекция цилиндрического трека. Расширяющиеся и нерасширяющиеся молекулы обозначены соответственно закрашенными и незакрашенными кружками

Распыление крупных органических молекул импульсом сжатия

Недавно Джонсон и др. [24] применили понятие совокупности возбужденных пространственных объемных зон (сферических импульсов), создаваемых рядом способов, для описания распыления молекул в широком интервале значений dE/dx (тормозной способностью вещества). При низких энергиях возбуждения отдельные импульсы могут приводить к выталкиванию молекул, если действие этих импульсов простирается на ту область, размеры которой соизмеримы с размерами распыляемых молекул. Такой «линейный» режим процесса считается хорошо установленным в случае ядерного и электронного распылений. В тех случаях, когда зоны возбуждения одновременно сближены в пространстве, они могут действовать объединенно. При этом наблюдается известный из экспериментов «диффузный» пиковый режим распыления, выход которого пропорционален квадрату тормозной способности dE/dx .

Новым в этом подходе можно считать то, что при больших плотностях энергии доминирует механизм объемного выталкивания молекул. Создаваемый градиент энергии может стать причиной импульса сжатия, который сообщит направленный наружу радиальный момент определенному объему вещества на поверхности. Плотность энергии в твердом теле рассчитывается как суперпозиция энергетических вкладов каждой точки пространства вдоль трека. Для частиц с большой глубиной проникновения (трек цилиндрической формы), падающих по нормали к поверхности, была предложена приближенная формула для расчета выхода распыления и углового эффекта выталкивания молекул.

Если предположить, что выталкиваются с поверхности лишь те молекулы, которые обладают импульсом, величина которого больше некоторого критического значения, определяемого когезионными свойствами исследуемого вещества и материала мишени, то выход распыления (Y) материала бесконечной толщины можно описать следующим уравнением:

$$Y \approx \frac{1}{n_M} \left[\frac{\beta}{U} \left(\frac{dE}{dx} \right)_{\text{эфф}} \right]^3.$$

В этом уравнении n_M — молекулярная плотность, $dE/dx_{\text{эфф}}$ — эффективная тормозная способность вещества, $\beta = C_p/(C_v - 1)$ для газов, U — прочность когезии твердых тел, M — молекулярная масса исследуемого вещества. Зависимость выхода распыления от величины поглощенной веществом энергии и прочности его когезионных связей, рассчитанная на основании приведенного выше уравнения, аналогична полученной

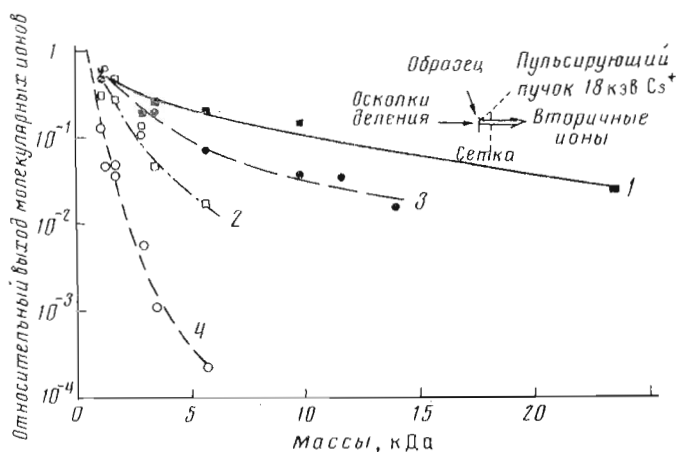


Рис. 7. Зависимости выходов положительных молекулярных ионов (нормализованных относительно выхода молекулярного иона [Leu]энкефалина) от молекулярных масс пептидов и белков, бомбардируемых осколками ядерного деления калифорния-252 с энергиями в десятки МэВ и ускоренными ионами Cs^+ с энергиями 18 кВ [35], при нанесении на нитроцеллюлозу (1 и 3) и при электронанпылении (2 и 4). Выход молекул в процессе распыления [Leu]энкефалина осколками ядерного деления в 10 раз выше, чем при бомбардировке ионами Cs^+

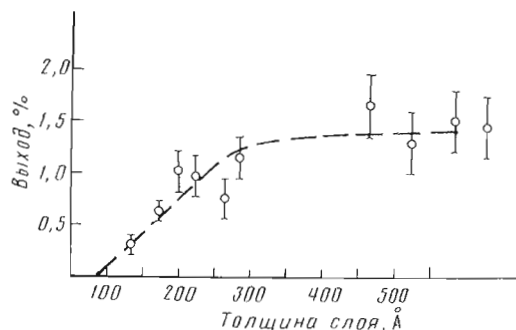


Рис. 8. Зависимость выхода протонированных молекулярных ионов инсулина крупного рогатого скота от толщины слоя нитроцеллюлозы, нанесенной на подложку при вращении. Штриховая линия проведена для удобства восприятия

методом компьютерного моделирования. Наличие зависимости между выходом процесса распыления и величиной тормозной способности вещества отражает влияние формы и размера трека на процесс распыления, тогда как количество выбрасываемого в газовую фазу с поверхности материала определяется природой процессов возбуждения его молекул. На основании сказанного выше для молекул на поверхности может быть выведено выражение для импульса в направлении выброса материала, которое качественно согласуется с результатами эксперимента.

Развитие описанных выше теоретических исследований в значительной мере основано на результатах первых работ по моделированию процессов распыления и расчетах на основании модели ударной волны, предложенной Парилсом и Битенским [23].

Сравнение распыления крупных органических молекул быстрыми и медленными частицами

При бомбардировке осколками ядерного деления единицей поверхности поглощается примерно в 10 раз больше энергии, чем в условиях МСВУА или МСВИ. Однако результаты опытов, представленные в предыдущем разделе, позволяют предположить, что масс-спектры, получаемые с применением разных методов, будут одинаковыми. Абсолютные выхо-

ды при разных способах распыления могут различаться, и поэтому особый интерес представляет изучение распыления наиболее тяжелых интактных молекул. Несмотря на то что две первичные частицы, с разными скоростями бомбардирующие поверхность вещества, образуют треки разных размеров, природа импульса сжатия, выбрасывающего молекулу с поверхности, в обоих случаях должна быть одинаковой.

К сожалению, имеется очень мало данных о процессах выбивания нейтральных молекул при бомбардировке поверхности первичными частицами с кэВ-энергиями. Некоторые данные о полном выходе распыления веществ из жидкого глицерина, приведенные в недавнем обзоре Сундквиста, не проясняют процесс распыления [34]. Тем не менее недавние эксперименты Энса и др., в которых проведено сравнение выходов молекулярных ионов пептидов и белков при распылении твердых образцов частицами кэВ- и МэВ-энергий, указывают на то, что приведенные выше рассуждения о подобности получаемых масс-спектров правильны [35].

Из вставки в первом верхнем углу рис. 7 видно, что в этих экспериментах осколки деления калифорния бомбардируют образец со стороны, обратной той, на которую нанесена проба, а пульсирующий пучок ионов Cs^+ с энергией 18 кэВ обстреливает поверхность под углом падения 66° со стороны вещества. Опыты проводились с двумя сериями проб: многослойной, приготовленной методом электрораспыления, и однослойной, нанесенной на поверхность нитроцеллюлозы [36]. Полученные таким образом масс-спектры оказались очень похожими, но выходы распыления молекул из этих проб были различны (рис. 7). Из этого сравнения можно сделать вывод, что бомбардировка осколками ядерного деления характеризуется большим выходом распыления. Ясно также, что в случае бомбардировки частицами кэВ-энергий лучше сравнивать результаты распыления монослойных образцов, на которых мало сказывается строение поверхности. При бомбардировке частицами МэВ-энергий образуется более глубокий кратер, в то время как площади поверхности отверстий кратеров не слишком различаются в обоих случаях. Эксперименты по бомбардировке частицами кэВ-энергий ЛБ-пленок, проведенные Большаком и др., укрепляют мысль о том, что при таких энергиях частицы воздействуют лишь на наружные слои пробы [37].

Таким образом, основные различия описанных выше исследований с использованием быстрых и медленных частиц состоят в образовании бомбардирующими частицами треков различных форм и размеров. Поэтому можно предположить, что процессы распыления, протекающие по механизму, который приводит к возникновению импульса давления, играют существенную роль и при бомбардировке частицами с кэВ-энергиями.

Изучение адсорбции белков нитроцеллюлозой комбинированием методов эллисометрии и ПДМС

Своему широкому практическому применению в настоящее время ПДМС в большой степени обязана использованию нитроцеллюлозы в качестве подложки для адсорбирования пептидов и белков [38].

Возможность анализировать вещества, адсорбированные на поверхности мишени, и отличительная особенность ПДМС, заключающаяся в расхождении очень малых количеств образца в процессе проведения анализа, позволяют многократно использовать образец в чередующихся исследованиях. Например, после предварительного определения молекулярной массы, используя набор подходящих фрагментов, можно известным образом расщепить белковую молекулу на ряд фрагментов и установить строение этих белковых фрагментов [38]. В настоящее время мы еще далеки от понимания «волшебных свойств» нитроцеллюлозы и пока не имеем других подложек, свойства которых были бы похожи на свойства нитроцеллюлозы. В большинстве случаев применяемая нитроцеллюлоза электрораспыляется на несущую твердую подложку, а на ее неровную шероховатую поверхность адсорбируют белки.

Проведение строго контролируемых экспериментов по изучению вы-

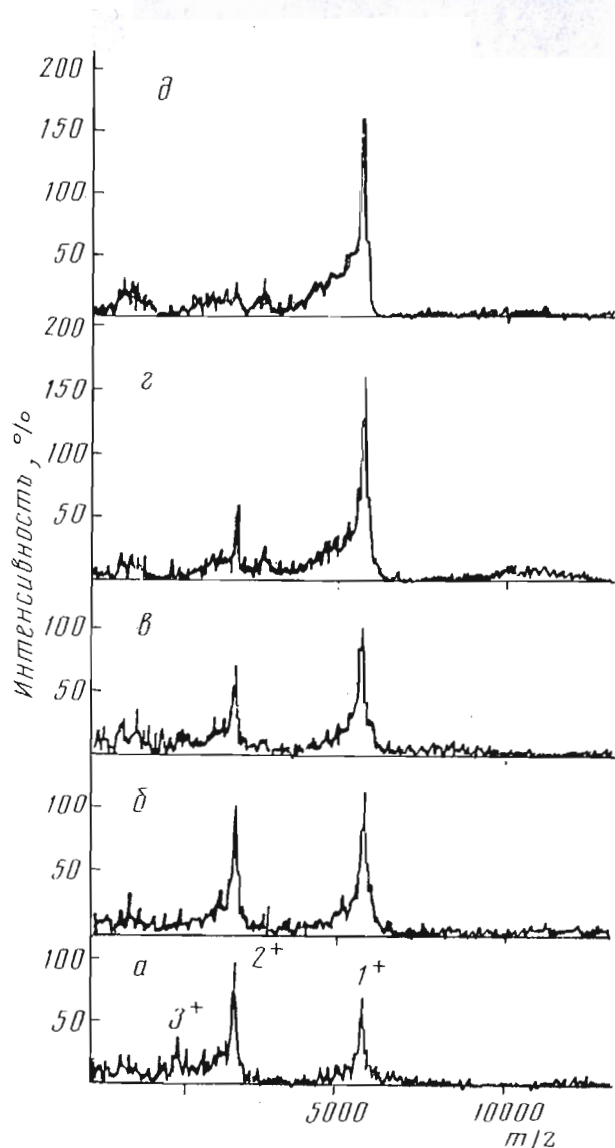


Рис. 9. Спектры положительных ионов инсулина крупного рогатого скота при нанесении на мишень 0,01 (а), 0,1 (б), 1,0 (в), 10 нмоль (г) и произвольного количества (д) инсулина с последующим промыванием

бывания и ионизации молекул требует четких знаний о первоначальном состоянии молекул исследуемого белка. На это направлены описанные ниже исследования, которые проводятся в настоящее время, и поэтому представленные в этом разделе результаты пока не являются окончательными.

Нитроцеллюлоза наносится на очень гладкую поверхность кремневых дисков путем прикапывания раствора на вращающийся диск [39]. Толщина образующегося при вращении диска слоя нитроцеллюлозы с довольно хорошей точностью может быть измерена методом эллипсометрии [40]. Однородность пленочного покрытия контролируется методами сканирующей электронной и туннельной микроскопий, которые позволяют различать мелкие детали структуры поверхности с разрешающей способностью вплоть до 50 Å.

Первые эксперименты с нитроцеллюлозными подложками заключались в измерении зависимости выхода молекулярных ионов инсулина, взятого в строго одинаковых количествах, от толщины подложки. Результаты таких измерений представлены на рис. 8. Как видно из рисунка, кривая

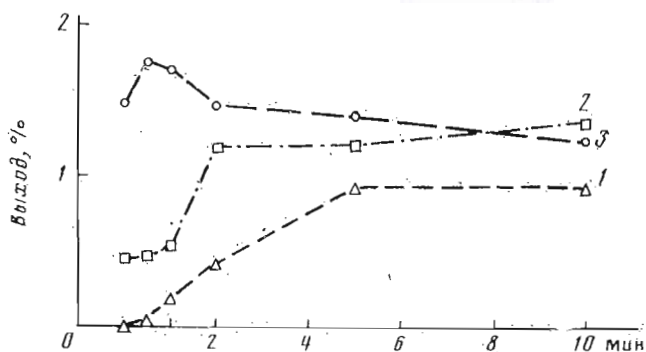


Рис. 10. Зависимость выхода протонированных молекулярных ионов $(M + H)^+$ инсулина крупного рогатого скота от времени адсорбирования поверхностью нитроцеллюлозы различных количеств нанесенной пробы: 0,01 (1), 0,1 (2) и 1 ммоль (3) [39]

выхода достигает насыщения при толщинах нитроцеллюлозной пленки, равных 200—300 Å [39]. Эти результаты хорошо согласуются с полученными ранее при изучении распыления пленок ЛБ. Полученные результаты показывают, что лишь до определенных пределов увеличение толщины нитроцеллюлозной пленки будет сказываться на поведении адсорбированных на пленке молекул инсулина, что находится в соответствии с общим представлением о механизме распыления, который был описан выше.

В следующих экспериментах исследовалась зависимость характера масс-спектров положительно и отрицательно заряженных ионов инсулина, полученных методом ПДМС, от количества нанесенного на подложку белка [39]. Для всех опытов была выбрана нитроцеллюлозная подложка одинаковой толщины, которая равнялась 450 Å. После нанесения на подложку определенного количества инсулина образец промывали. Количество инсулина, оставшегося на поверхности после промывки, т. е. адсорбированного поверхностью, устанавливалось эллипсометрически. На основании эллипсометрических данных можно построить калибровочный график, в котором по оси X откладывается количество инсулина, наносимого на подложку до промывания, а по оси Y — количество инсулина, оставшегося на поверхности мишени после ее промывания. На основании этого графика при записи масс-спектров (рис. 9) можно определить количество инсулина в мишени после промывания.

Из рис. 9 видно, что при нанесении 0,1—1,0 ммоль белка после промывки на мишени остается мономолекулярный слой вещества (10 ммоль) и поэтому характер масс-спектров b , $в$ одинаков. При нанесении большего количества инсулина (рис. 9 $г$, $д$) характер масс-спектра изменяется.

В описанных опытах время адсорбции инсулина нитроцеллюлозой, т. е. время от момента начала нанесения пробы до момента ее частичного смывания с поверхности нитроцеллюлозы, составляло 2 мин, но при этом большая часть нанесенного на поверхность вещества смывалась.

В третьей серии исследований изменяли время насыщения поверхности нитроцеллюлозы инсулином и нашли, что выход молекулярных ионов достигает постоянной величины даже при нанесении на подложку очень малых количеств белка, однако только через достаточно большие промежутки времени (см. рис. 10) [39]. Эти исследования показывают, что таким способом можно определять времена адсорбции различных белков нитроцеллюлозой.

Для спектров, представленных на рис. 9, характерна интересная тенденция, которая состоит в том, что, чем меньшие количества вещества наносятся на поверхность нитроцеллюлозы, тем большими становятся относительные интенсивности пиков многозарядных молекулярных ионов. Это можно объяснить тем, что адсорбированные нитроцеллюлозой отдельно друг от друга молекулы инсулина склонны к повышенному образованию многозарядных молекулярных ионов, тогда как при нанесении

на нитроцеллюлозу больших количеств белка, позволяющих молекулам инсулина взаимодействовать друг с другом (случай многослойной пробы), более предпочтительно образование молекулярных ионов с меньшим количеством зарядов. Интересно, что результаты изучения отрицательных молекулярных ионов говорят о том, что они образуются только в случае многослойных образцов. Эти выводы проверялись при изучении таких белков, как лизоцим, фосфолипаза А и трипсин. Отмеченные выше тенденции в образовании различно заряженных молекулярных ионов были аналогичны, но проявлялись они наиболее сильно в случае молекул инсулина, склонных к образованию ассоциатов [39].

Одно из возможных объяснений этих результатов состоит в том, что адсорбированные на поверхности нитроцеллюлозы отдельно друг от друга молекулы белка представляют собой многопротонированные ионы, с которыми по соседству располагаются небольшие по размерам ионы с противоположным зарядом. В случае многослойных образцов существенную роль играет обмен протонами между молекулами белков, который приводит к уменьшению числа многозарядных ионов и к образованию отрицательно заряженных (депротонированных) ионов. Для более полного понимания механизмов этих процессов необходимы специальные исследования, но уже эти проведенные эксперименты указывают на возможность применения МСВИ, в частности ПДМС, для изучения процессов адсорбции макромолекул различными поверхностями. Из этих результатов видно, что возможность десорбции/ионизации молекулы в значительной степени определяется энергией ее связывания поверхностью и может послужить предметом будущих исследований. Эти исследования также показывают, что, найдя необходимые подложки, можно будет получить более точные и надежные результаты по сравнению с теми, которые были получены до сих пор.

Применение ПДМС

До сих пор ПДМС используют преимущественно в химии белка, хотя известны и другие области ее применения [8]. Существуют три области научных исследований, в которых применение ПДМС оказалось наиболее продуктивным: 1) идентификация белков посредством определения их молекулярной массы; 2) структурные исследования природных пептидов и белков; 3) анализ продуктов химического синтеза пептидов и белков.

В некоторых лабораториях ПДМС заменяет методы электрофореза в натрийдодецилсульфатном геле или гельпроникающей хроматографии при определении молекулярных масс белков, если их величины не превышают достигнутого в настоящее время предела определения масс веществ методом ПДМС, составляющего 40 кДа [38]. Остановимся на одном из первых случаев таких измерений. В процессе определения первичной структуры белка кутикулы саранчи перелетной, *Locusta migratoria*, были обнаружены различия в величинах молекулярной массы этого белка, рассчитанных на основании данных о его аминокислотной последовательности (15 323 Да) и на основании данных электрофореза в натрийдодецилсульфатном геле (21 600 Да). Белок содержит несколько участков с повторяющейся аминокислотной последовательностью, и эта разница в молекулярных массах может указывать на то, что либо часть аминокислотной последовательности белка определена неверно, либо он содержит крупную группировку небелковой природы. Молекулярная масса белка, определенная методом ПДМС, оказалась равной $15\,329 \pm 50$ Да (рис. 11). Это значение совпало с тем значением молекулярной массы белка, которое было определено на основании данных о его аминокислотной последовательности, и позволило прийти к выводу, что молекулярная масса, определенная методом электрофореза в натрийдодецилсульфатном геле, имеет явно завышенное значение [41].

При создании современных методов определения аминокислотной последовательности белков и пептидов необходимо учитывать требования, связанные с постоянным уменьшением количества вещества, доступного

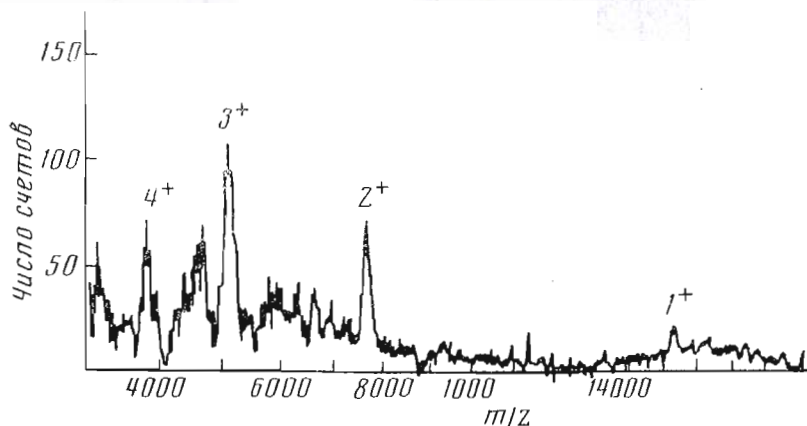


Рис. 11. Область пика молекулярного иона в спектре положительных ионов белка кутикулы насекомого (M_r 15 323), полученном методом ПДМС [41]

для изучения. Так, сегодня 100 пмоль белка 95 % или большей степени чистоты рассматриваются как «стандартное количество» для определения его первичной структуры, которое включает химическое и/или энзиматическое расщепление белка и хроматографическое разделение образовавшихся при этом пептидов до их структурного анализа. Анализируя методом ПДМС фракции пептидов, выделенные методом микроколоночной ВЭЖХ, аналитик может легко найти ту фракцию, которая содержит лишь один компонент и поэтому может быть анализируема дальше. Кроме того, предварительная оценка размера молекулы пептида, аминокислотную последовательность которого следует определить, оказывает значительную помощь в оценке количества операций, необходимых при его структурных исследованиях. Общепринятый метод определения аминокислотной последовательности часто комбинируют с ПДМС-анализом пептидов, в реакционной смеси до и после химического и/или энзиматического расщеплений [38].

Значительные успехи в синтезе пептидов достигаются использованием аналитической ВЭЖХ, аминокислотного и секвенаторного анализов. Хотя ВЭЖХ и является быстрым и универсальным методом анализа, требующим использования минимально возможного количества образца, в большинстве случаев возникает необходимость анализировать содержимое каждого хроматографического пика каким-либо другим методом. Часто при установлении компонентного состава предварительно не очищенных пептидных/белковых смесей, получаемых в результате химического синтеза, ПДМС оказывается более эффективной, чем аналитическая ВЭЖХ. Процесс подготовки проб в ПДМС достаточно прост, и анализ можно проводить сразу же после снятия синтезированного пептида с твердого носителя. В отличие от результатов, получаемых методом ВЭЖХ, записанный в течение нескольких минут ПД-масс-спектр содержит информацию не только о нужном веществе, но также и о наличии в реакционной смеси более коротких пептидов или пептидов, имеющих различные защитные группировки [42].

Заключение

Изучение распыления крупных органических молекул пучками ускоренных частиц продиктовано главным образом желанием усовершенствовать метод их масс-спектрометрического анализа, в особенности анализ биомолекул. Для распыления можно использовать как быстрые, так и медленные первичные частицы, но предпочтительны при анализе крупных молекул быстрые частицы. Пока исследования направлены главным образом на изучение механизма выбивания целых крупных молекул с поверх-

ности, являющегося составной частью процесса распыления. Эта проблема близка к пониманию в случае распыления достаточно больших объемных количеств вещества под воздействием градиентов энергии, создаваемых треками частиц с высокой плотностью энергии. Дальнейшее совершенствование модели процесса показало, что выход распыления сильно зависит от связи молекул с поверхностью. Это говорит о возможности использовать процессы распыления для изучения процессов связывания макромолекул с поверхностью в будущем. Процессы электронного распыления часто сопряжены с выбросом таких больших объемных количеств вещества, что приводят к образованию на его поверхности кратеров. Дальнейший прогресс в данной области исследований можно ожидать, когда появятся больше сведений о полных выходах процессов распыления нейтральных частиц. Такие исследования проводятся сейчас с использованием лазеров для дополнительной ионизации распыляемых при бомбардировке частицами нейтралей. До сих пор очень мало известно о происходящих при распылении процессах ионизации, и изучение ее механизмов должно стать важной областью будущих исследований.

Сочетанием методов ПДМС, эллипсометрии и адсорбции на поверхности нитроцеллюлозы было показано, что на процессы десорбции/ионизации белков сильно влияет (возрастает относительное количество многозарядных белковых ионов) ослабление межмолекулярного взаимодействия белков и что для образования их отрицательных молекулярных ионов, напротив, необходимо наличие межмолекулярного взаимодействия.

Недавно было показано, что метод лазерной десорбции с использованием матрицы позволяет получать молекулярные ионы крупных белков, подобных IgG, и обладает большими потенциальными возможностями для использования в химии белка.

Авторы считают своим приятным долгом поблагодарить докторов П. Хаканссона, А. Хедина, Д. Фенюю, Г. Джонсона, Р. Е. Джонсона и П. Роепсторффа за обсуждение и ценные критические замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Torgerson D. F., Skowronski R. F., Macfarlane R. D. // *Biophys. and Biochem. Res. Commun.* 1974. V. 60. P. 616—621.
2. Benninghoven A., Jaspers D., Sichtermann W. // *Appl. Phys.* 1976. V. 11. P. 35—43.
3. Barber M., Bordoli R. S., Sedgwick R., Tyler A. N. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981. P. 325—327.
4. Vestal M. L. // *Mass Spectrom. Rev.* 1983. V. 2. № 3. P. 447—465.
5. Meng M., Mann M., Fenn J. B. // *Z. Phys.* 1988. V. D10. P. 361—368.
6. Karas M., Hillenkamp F. // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. P. 2299—2301.
7. Sundqvist B. U. R. // *Sputtering by Particle Bombardment III* / Eds R. Behrish, K. Wittmaack. Springer Verlag, 1991. P. 123—132.
8. Sundqvist B. U. R., Macfarlane R. D. // *Mass Spectrom. Rev.* 1985. V. 4. № 4. P. 421—460.
9. Stryer L. *Biochemistry*. San Francisco: W. H. Freeman and Co., 1975. 877 P.
10. Salehpour M., Håkansson P., Sundqvist B., Widdiyasekera S. // *Nucl. Instrum. Meth.* 1986. V. B13. P. 278—283.
11. Hedin A., Håkansson P., Salehpour M., Sundqvist B. U. R. // *Phys. Rev.* 1987. V. B35. P. 7377—7381.
12. Jonsson G., Hedin A., Håkansson P., Sundqvist B. U. R., Bennich H., Roepstorff P. // *Rap. Commun. Mass Spectrom.* 1989. V. 6. № 1. P. 190—191.
13. Sundqvist B. U. R., Ariyaratne A., Ens W., Fenyö D., Hedin A., Håkansson P., Jonsson G., Widdiyasekera S. // *Proc. of Ion Formation from Organic Solid (IFOS IV)*. 1988. // Eds A. Benninghoven. Chichester: J. Wiley, 1989. P. 123—136.
14. Sève G., Håkansson P., Sundqvist B. U. R., Söderström E., Lindqvist S. E., Berg J. // *Appl. Phys. Lett.* 1987. V. 51. P. 22—25.
15. Bolbach G., Della-Negra S., Deprun C., LeBeyec Y., Standing K. G. // *Rap. Commun. Mass Spectrom.* 1987. V. 1. № 1. P. 22—25.
16. Fürstenau N., Knipperborg W., Krüger F. R., Weiss G., Wien K. // *Z. Naturforsch.* 1977. B. 32a. S. 711—718.
17. Dück P., Treu W., Frölich H., Galster W., Voit H. // *Surf. Science.* 1980. V. 95. P. 603—608.
18. Jacobs D. L., Macfarlane R. D. // 36th Ann. Conf. Mass Spectrom and Allied Topics. San Francisco, 1988. Book of Abstracts.
19. Widdiyasekera S., Håkansson P., Sundqvist B. U. R. // *Nucl. Instrum. Meth.* 1988. V. B33. P. 836—842.
20. Ens W., Sundqvist B. U. R., Hedin A., Håkansson P., Jonsson G. // *Phys. Rev.* 1989. V. B39. № 5. P. 763—769.

21. *Ens W., Sundqvist B. U. R., Håkansson P., Fenyő D., Hedin A., Jonsson G.* // J. Phys. 1989. V. C2. P. 9—14.
22. *Urbassek U. M., Michl J.* // Nucl. Instrum. Meth. 1987. V. B22. P. 480—487.
23. *Bilensky I. S., Parilis E. S.* // Nucl. Instrum. Meth. 1986. V. B21. P. 26—29.
24. *Johnson R. E., Sundqvist B. U. R., Hedin A., Fenyő D.* // Phys. Rev. 1989. V. B40. № 1. P. 49—53.
25. *Garrison G. J.* // Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 1983. V. 53. P. 243—255.
26. *Garrison G. J., Srinivasan R. J.* // Appl. Phys. 1985. V. 57. P. 2909—3003.
27. *Hilf E. R., Kammer H. F., Nitzschmann B.* // Proc. of Ion Formation from Organic Solids (IFOS IV). 1988 / Ed. A. Benninghoven. Chichester: J. Wiley, 1989. P. 132—141.
28. *Fenyő D., Sundqvist B. U. R., Karlsson B., Johnson R. E.* // J. phys. 1989. V. C2. P. 33—35.
29. *Hajf P. K.* // Appl. Phys. Lett. 1976. V. 29. P. 473—477.
30. *Johnson R. E., Sundqvist B. U. R.* // Int. J. Mass Spectrom. Ion. Phys. 1983. V. 53. P. 335—339.
31. *Williams P., Sundqvist B. U. R.* // Phys. Rev. Lett. 1987. V. 58. P. 1031—1034.
32. *Fenyő D., Sundqvist B. U. R., Karlsson B. R., Johnson R. E.* // Phys. Rev. Lett. 1990. V. B42. P. 1895—1902.
33. *Fenyő D., Hedin A., Håkansson P., Johnson R. E., Sundqvist B. U. R.* // Proc. of Ion Formation from Organic Solid (IFOS V), 1989 / Eds A. Hedin, B. U. R. Sundqvist, A. Benninghoven. Chichester: J. Wiley, 1990.
34. *Sundqvist B. U. R.* // Adv. in Mass Spectrom. 1989. V. 11A. P. 363—382.
35. *Ens W., Sundqvist B. U. R.* // Proc. of SIMS VI, Versailles 1987 / Eds A. M. Huber, A. Benninghoven, H. W. Werner, G. Slodzian. 1988. Chichester: J. Wiley. P. 321—324.
36. *Jonsson G., Hedin A., Håkansson P., Sundqvist B. U. R., Sæve G., Nielsen P., Roepstorff P., Johansson K.-E., Kamensky J., Lindberg M.* // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 1084—1087.
37. *Bolbach G., Beavis R., Ens W., Main D. E., Schueler E., Standing K. G.* // 33rd. Ann. Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics, San Diego, 1985. Book of Abstracts.
38. *Roepstorff P., Klarskov K., Højrup P.* // Methods in Protein Sequence Analysis // Ed. B. Wittmann-Liebold. Berlin: Springer Verlag, 1989. P. 191—199.
39. *Jonsson G., Brinkmalm G., Sundqvist B. U. R., Hedin A., Håkansson P.* // Internal Report TSL — ISV 21. P. 1—14.
40. *Azzam R. M. A., Bashara N. M.* Ellipsometry and Polarized Light. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1977. 325 p.
41. *Roepstorff P., Højrup P., Sundqvist B. U. R., Jonsson G., Håkansson P., Andersen S. O., Johansson K.-E.* // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1986. V. 13. P. 689—691.
42. *Lindeberg G., Engström A., Craig A. G., Bennich H.* // Proc. of Peptides 1988 / Eds G. Jung, E. Bayer, W. de Gruyter. New York, 1989. P. 121—127.

Поступила в редакцию
10.XII.1990

B. U. R. SUNDQVIST

PLASMA DESORPTION MASS SPECTROMETRY. STUDIES OF MECHANISMS AND APPLICATIONS

*Division of Ion Physics, Department of Radiation Sciences Uppsala University, Box 535,
S-751 21 Uppsala, Sweden*

Particle impact mass spectrometry and in particular the use of MeV particles as in plasma desorption mass spectrometry (PDMS) applied to biomolecules is described. Experimental and theoretical studies of the mechanisms involved for large molecular ion ejection are treated in some detail. Applications of PDMS mass spectrometry to proteins are discussed.