

5.14. Матричная лазерная десорбционная ионизация, МЛДИ (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)

Настоящий прорыв к анализу сложнейших биоорганических молекул произошел с появлением матричной лазерной десорбционной ионизации. Впервые метод описан во второй половине 80-х годов XX века [177-179]. В 1988 г. были опубликованы результаты анализа белков с массами до 70 000 Да [180], а в 1990 г. —уже до 116000 Да [181]. Рекордные для масс-спектрометрии массы однозарядных ионов в несколько миллионов дальтон [182] были зарегистрированы именно с помощью матричной лазерной десорбционной ионизации. Одному из первооткрывателей метода Кончи Танаке в 2002 г. присуждена Нобелевская премия в области химии.

Метод заключается в облучении короткими лазерными импульсами образца, представляющего собой твердый раствор анализируемого соединения в органической матрице. Матрица выбирается таким образом, чтобы ее молекулы активно поглощали фотоны, эмитируемые УФ- или ИК-лазером. Над поверхностью образца создается плотная высокотемпературная плазма, в которой наряду с молекулами и ионами матрицы оказываются и молекулы анализируемого соединения. Ионизация последних путем поглощения энергии фотонов или в результате ионно-молекулярных реакций приводит к образованию положительных и отрицательных ионов, которые вытягиваются высоким потенциалом из области ионизации и направляются в анализатор. Метод характеризуется интенсивными пиками молекулярных ионов разного типа и низкой фрагментацией. Наиболее термолabile, труднолетучие, высокомолекулярные соединения стали доступны масс-спектрометрическому анализу. К настоящему времени методом МЛДИ успешно анализируются полипептиды, белки, нуклеотиды, полисахариды, синтетические полимеры, гуминовые кислоты, фуллерены, органические комплексные соединения и т. д. (рис. 5.9). Количество переменных в МЛДИ значительно больше, чем в других методах, поэтому анализ нового соединения является самостоятельной задачей, причем выбор условий эксперимента может привести как к успеху, так и полному провалу. Важнейшими параметрами метода являются природа матрицы, количественное соотношение матрица : анализируемое соединение, длина волны, долгота импульса и мощность лазерного излучения, способ пробоподготовки и т. д.

Матрица. Как и в методе бомбардировки быстрыми атомами, в МЛДИ важнейшую роль играет матрица, однако ее роль в этом случае значительно отличается. Правильный выбор материала является ключевым моментом для успешной регистрации масс-спектра. Количество самых разнообразных органических соединений, использованных в качестве матрицы, очень велико. Основные требования к материалу матрицы заключаются в его высокой способности поглощать лазерное излучение; кристаллизоваться с включением в структуру молекул анализируемого вещества; инертности по отношению к анализируемому веществу; хорошей растворимости в растворителях, используемых для пробоподготовки; низкой летучести в условиях вакуума. Наиболее широкое применение в качестве матриц нашли коричная кислота, 3-амино-4-гидроксибензойная кислота, нико-

тиновая кислота, α-циано-4-гидроксикоричная кислота, 2,5-дигидроксibenзойная кислота, 6,7-дигидроксикумарин, 2-(4-гидроксифенилазо)бензойная кислота, 3-гидроксипиколиновая кислота, 2,4,6-тригидроксиацетофенон и многие другие. Обычно раствор матрицы в подходящем растворителе (концентрация ~10 мг/мл) готовится ежедневно, поскольку он светочувствителен и подвержен фоторазложению. В качестве растворителей наиболее часто используются вода, этанол, ацетон, ацетонитрил, тетрагидрофуран, хлороформ и т. д. Источники МЛДИ с повышенным давлением позволяют использовать в качестве матрицы воду и ряд

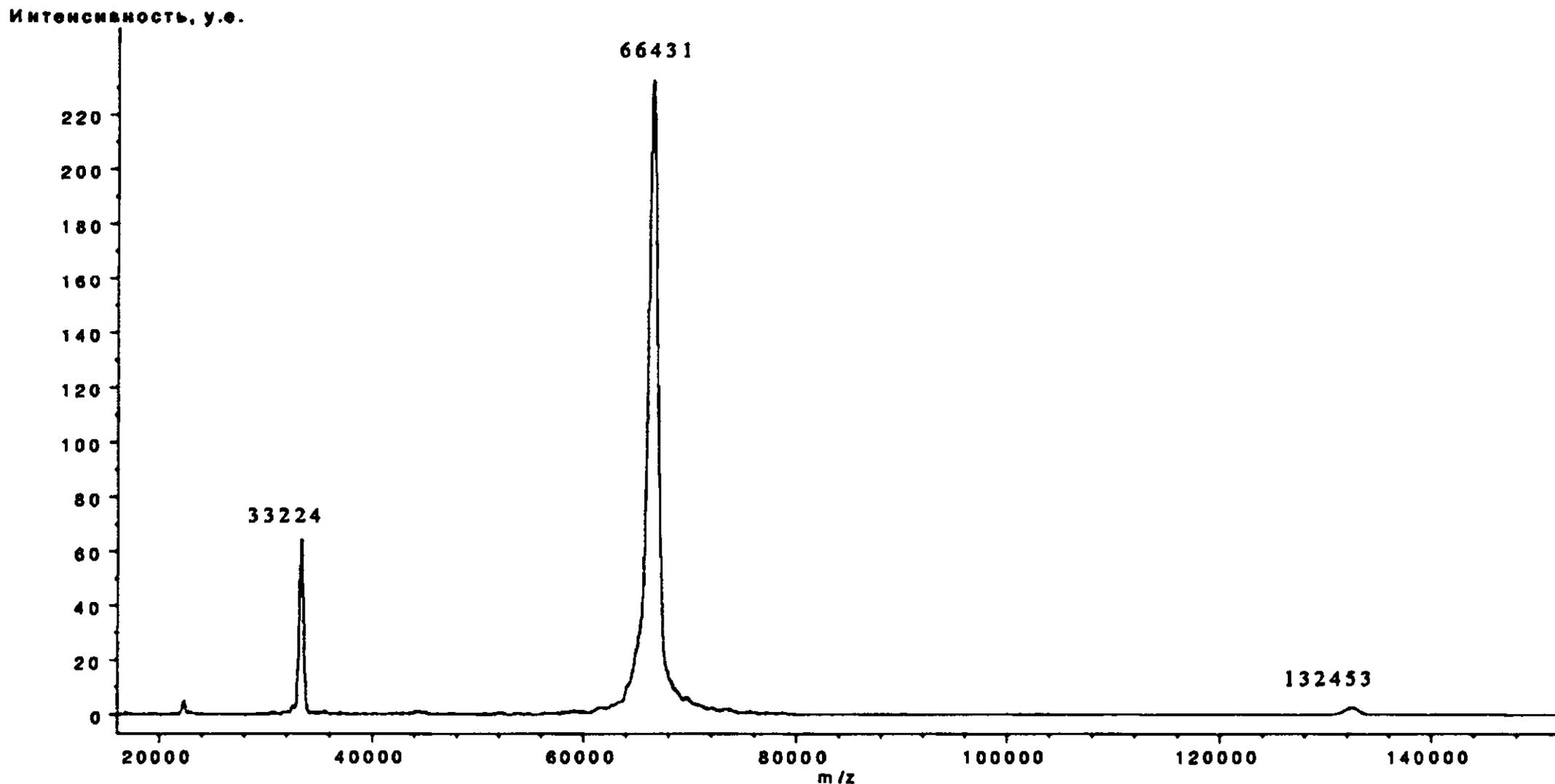


Рис. 5.9. Спектр МЛДИ мономера сыворотки бычьего альбумина. Максимальный пик (m/z 66431) принадлежит протонированному молекулярному иону. Более тяжелый пик (m/z 132453) обусловлен димером

других соединений. В этих условиях эффективность работы ИК-лазеров выше, чем УФ-лазеров [182].

Лазеры. В идеале лазер должен эффективно передавать образцу контролируемое количество энергии, причем во избежание термического распада эта энергия должна переноситься в кратчайший период времени. Два наиболее активно используемых типа лазера в коммерческих приборах — азотный и уголекислотный. Первый является ультрафиолетовым и характеризуется длиной волны 337 нм, энергией фотонов 3,68 эВ. Долгота его импульса составляет обычно от 0,1 до нескольких наносекунд. Второй является инфракрасным и характеризуется длиной волны 10,6 мкм, энергией фотонов 0,12 эВ. Долгота его импульса составляет от 100 нс до 1 мкс. Помимо этих лазеров используются неодимовые, эрбиевые, а также эксимерные (XeCl, ArF, KrF).

Пробоподготовка. Раствор анализируемого вещества в растворителе, который хорошо смешивается с растворителем матрицы, в концентрации 5-10 мг/мл добавляется к рабочему раствору матрицы. Молярное соотношение матрица/анализируемое вещество должно составлять от 100:1 до 50000:1 и оптимизироваться для каждого нового образца. После получения гомогенного раствора 0,5-2 мкл наносится на специальную плашку из нержавеющей стали и высушивается сначала при атмосферном давлении на воздухе, а затем при нагревании струей теплого воздуха в слабом вакууме. Природа взаимодействия матрицы с образцом пока недостаточно изучена. Во время высушивания происходит кристаллизация матрицы с включением молекул анализируемого вещества в кристаллическую решетку или же молекулы образца размещаются по поверхности быстро образующихся кристаллов матрицы. Образование и размер кристаллов в значительной мере зависят от природы матрицы и растворителя и в меньшей степени от природы образца, поскольку количество последнего значительно меньше.

Помимо соотношения матрица/анализируемое вещество на качество спектра сильно влияет наличие примесей и добавок. При работе с биологическими соединениями часто используются буферные растворы, соли, поверхностно-активные вещества. Эти соединения оказываются в растворе анализируемого образца и могут повлиять на качество спектров. Существенным преимуществом МЛДИ по сравнению с электрораспылением является толерантность метода по отношению к примесям и добавкам, хотя в некоторых случаях эти побочные соединения могут приводить к уменьшению интенсивности основного сигнала по разным причинам. Качество спектров, как правило, не ухудшается, а иногда чувствительность может возрасти за счет образования ионов $[M+\text{катион}]^+$. Поэтому, если количество примесей не является чрезмерным, образцы можно анализировать без предварительной очистки.

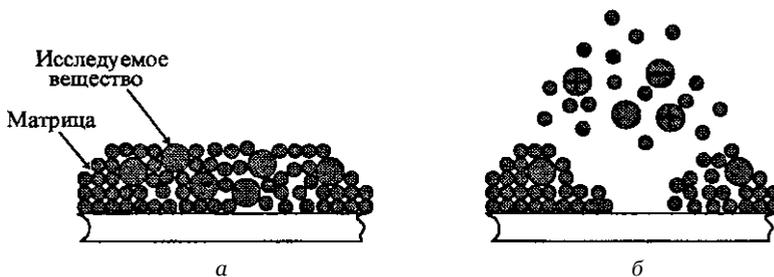


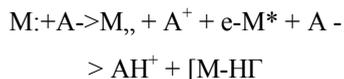
Рис. 5.10. Взаимодействие лазерного импульса с образцом МЛДИ: а — до лазерного импульса, б — после лазерного импульса

Проведение анализа. Ионизация. Короткий световой импульс лазера поглощается молекулами матрицы и разрушает ее кристаллическую структуру. Часть молекул отрывается от поверхности и образует высокотемпературный суперплотный газ (зона шлейфа), в котором помимо молекул, ионов и ассоциатов матрицы присутствуют молекулы анализируемого соединения (рис. 5.10). Поскольку энергия лазера поглощается матрицей, молекулы образца оказываются в зоне шлейфа, в газовой фазе, практически без приращения внутренней энергии, т. е. с сохранением исходной структуры.

Механизмы ионизации образца в условиях МЛДИ пока недостаточно изучены [183-185]. В масс-спектрах наблюдаются в основном пики однозарядных молекулярных ионов, причем катионы и анионы могут регистрироваться при простой смене полярности выталкивающего электрода. Помимо них часто наблюдаются пики однозарядных мультимеров (типа M_nH^+). Спектры образца оказываются очень похожими даже при использовании столь разных лазеров, как УФ и ИК. Этот факт указывает на общность механизмов ионизации для обоих вариантов.

Обычно разделяют процессы на первичные и вторичные. Первичная ионизация включает процессы возникновения заряда у молекулы образца в момент ее перехода из конденсированной в газовую фазу. Вторичная ионизация обусловлена взаимодействием молекул образца с ионами матрицы в газовой фазе. Поскольку доля образца по сравнению с долей матрицы очень мала, взаимодействия молекул и ионов образца друг с другом маловероятны и не имеют большой значимости.

Среди предложенных механизмов первичной ионизации можно выделить взаимодействие молекулы образца А с кластером молекул возбужденной матрицы M^* и протонирование молекулы образца возбужденной молекулой матрицы:



Одновременно с переходом молекулы образца в газовую фазу может осуществляться ее взаимодействие с катионом соли, присутствующей в пробе случайно или добавленной намеренно. В этом случае возникают ионы $[A+катион]^+$.

Значительно больше процессов ионизации предложено для молекул самой матрицы. Помимо указанных для молекул образца можно упомянуть двух- и полифотонную ионизацию, термическую ионизацию и диспропорционирование.

В зоне шлейфа образуется газовая плазма и протекают процессы вторичной ионизации. Механизмы этих реакций аналогичны описанным в разд. 5.2 и включают протонирование и депротонирование, перезарядку и присоединение аниона или катиона. Образовавшиеся молекулярные катионы и анионы образца разных типов (M^+ , MH^+ , $[M-H]^-$, $[M+катион]^+$ и т. д.) обладают невысокой внутренней энергией, т. е. их фрагментация незначительна.

Расширение образовавшейся газовой плазмы за область шлейфа приводит к последующим взаимодействиям молекул и ионов образца с молекулами и ионами плазмы. Возникают новые ионы, а внутренняя энергия ионов образца усредняется в результате многочисленных столкновений с молекулами матрицы.

Интересные предположения о механизме ионизации сделаны Карасом и др. [184]. Авторы приводят достаточно убедительные доводы в пользу того, что исходные ионы образца (например, пептиды, осажденные из раствора при $pH = 2$) являются многозарядными, а в источнике протекает их последовательная нейтрализация. Для положительных ионов уменьшение заряда обусловлено захватом тепловых электронов, образующихся в процессе фотоионизации молекул матрицы и присутствующих в достаточном количестве в области шлейфа. Для отрицательных ионов ключевую роль играют взаимодействия с протонированными молекулами матрицы. Результатом этих процессов является полная нейтрализация первичных ионов. Немногочисленные оставшиеся однозарядные ионы, однако, успевают покинуть реакционную зону и достичь детектора.

Нейтральные молекулы и частицы плазмы откачиваются насосами, а образовавшиеся ионы вытягиваются и ускоряются высоким потенциалом (~ 25 кВ) по направлению к анализатору. Практически во всех коммерческих приборах используется времяпролетный анализатор, поскольку он характеризуется неограниченным диапазоном масс (разд. 6.7), а основной задачей МЛДИ является как раз получение информации о молекулярной массе высокомолекулярных соединений. Кроме того, именно времяпролетные приборы лучше других работают с импульсными методами ионизации и обладают высочайшей чувствительностью, так как все образовавшиеся в результате ионизации ионы достигают детектора. После того как детектор достигнет наиболее тяжелый ион, производится новый лазерный импульс, и весь процесс ионизации и регистрации ионов повторяется. Спектры после каждого лазерного импульса могут суммироваться до получения качественной информации о молекулярной массе соединения. Обычно для приемлемого результата оказывается достаточно 30-50 лазерных импульсов.

Важным моментом является возможность направлять каждый последующий лазерный импульс в новую точку образца. В случае равномерного распределения анализируемого соединения в твердом растворе матрицы спектры будут идентичными. Однако поскольку идеальной равномерности достичь практически невозможно, концентрация молекул образца в каждом месте может несколько отличаться, и перемещением луча можно найти оптимальный участок поверхности.

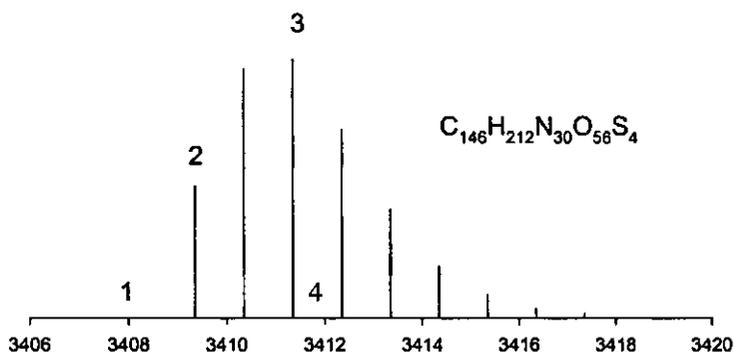
Для калибровки шкалы масс используются самые разнообразные соединения с точно известной массой. Среди наиболее широко используемых можно назвать грамицидин С (m/z 1141,5), бычий инсулин (m/z 5733,5), сыворотку бычьего альбумина (m/z 66430). Используют варианты как внешней, так и внутренней калибровки. В первом случае

калибровочный стандарт помещают на отдельной мишени, во втором — вместе с анализируемым соединением. Последний вариант приводит к увеличению точности определения массы примерно на порядок. Очень часто используют калибровку по двум точкам, когда в качестве реперов выбираются пик протонированного (депротонированного) молекулярного иона стандарта и пик его димера или двухзарядного иона. Используется также смесь двух стандартов. Важно, чтобы пик стандарта с известной массой располагался достаточно близко к пику молекулярного иона исследуемого соединения, но не накладывался на него. Хотя разрешающая способность времяпролетных анализаторов, как правило, не превышает 10-12 тысяч, точность измерения масс достаточно высока и достигает 0,01%.

Метод МЛДИ используется прежде всего для установления молекулярной массы соединения. Поскольку полностью избежать фрагментации не удастся, в спектре часто наблюдаются малоинтенсивные пики фрагментных ионов, не имеющие значимости для структурных исследований. Если же возникает вопрос об установлении структурных фрагментов соединения, необходимо использовать определенные модификации обычного варианта анализа. Для этого используют спектры метастабильных ионов (**post source decay**), полученные с помощью ре-флектрона [186], или спектры активации соударением с использованием техники ортогонального ускорения (разд. 6.7).

Вид спектра тяжелых молекул (рис 5.9) значительно отличается от классического вида спектра ЭУ. Когда речь идет о молекуле массой в несколько сотен тысяч дальтон, разрешающей способности любого масс-спектрометра оказывается недостаточно для разрешения всей изотопной картины в области молекулярного иона. Обычные правила работы со спектром ЭУ, описанные в гл. 4, неприемлемы для соединений с молекулярной массой более 2000 Да. Прежде всего это касается извлечения информации на основе интенсивностей изотопных пиков (разд. 4.2). Например, наличие в молекуле 100 атомов углерода приведет к интенсивности пика $M+1$ за счет присутствия одного атома ^{13}C 110% от интенсивности пика M^{+*} , обусловленного только атомами ^{12}C . Пики $M+2$ и $M+3$, обусловленные двумя и тремя атомами ^{13}C в молекуле будут иметь интенсивности 60 и 22% соответственно. Даже водород, который учитывается при расшифровке спектра ЭУ как A-элемент (разд. 4.2), поскольку природное

Рис. 5.11. Область молекулярного иона соединения $C_{146}H_{212}N_{30}O_{56}S_4$. 1 — номинальная масса (3408); 2 — моноизотопная масса (3409,3546); 3 — наиболее распространенная масса (3411,3613); 4 — средняя масса (3411,721)



содержание дейтерия составляет 0,015% от содержания протия, приведет к появлению значимого изотопного пика $M+1$, если число атомов водорода в молекуле более 100. Другие элементы, практически всегда присутствующие в составе биологических молекул (N, O, S), усложняют изотопную картину еще значительно. В результате огромное число изотопных пиков проявляется в масс-спектре в виде широкого сигнала, ширина которого может составлять сотни и тысячи дальтон (рис. 5.9).

Кроме того, для высокомолекулярных соединений кумулятивный эффект дефектов масс атомов (разд. 6.3) становится значительным и ведет к существенным отклонениям номинальной массы, рассчитанной на основе целочисленных атомных масс элементов, от регистрируемой массы.

В связи с этим для спектров тяжелых соединений приходится вводить еще несколько определений молекулярной массы (рис. 5.11).

Номинальная масса — масса, рассчитанная суммированием целочисленных атомных масс наиболее распространенных (легких) изотопов элементов.

Моноизотопная масса — масса, рассчитанная суммированием точных атомных масс (с учетом дефекта массы) наиболее распространенных (легких) изотопов элементов.

Наиболее распространенная масса — масса иона, пик которого наиболее интенсивен в кластере молекулярного иона.

Средняя масса — масса, рассчитанная суммированием усредненных атомных масс элементов.

На рисунке 5.11 отчетливо видно различие между этими вариантами величин молекулярной массы соединения. Пик молекулярного иона с номинальной массой 3408 Да в спектре отсутствует, поскольку суммарный дефект массы оказывается больше 1 Дальтона. Минимальную массу в спектре имеет пик с моноизотопной массой. Ее величина 3409,3546 Да. Интенсивность этого пика уступает интенсивности последующих трех пиков в связи с высокой вероятностью присутствия в молекуле 1-3 более тяжелых изотопов.

В частности, следующий за пиком с моноизотопной массой пик состоит из пяти индивидуальных неразрешенных пиков, обусловленных присутствием изотопов 2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{16}O , ^{33}S . Рассчитаем массы и относительные интенсивности этих пиков. Присутствие одного атома дейтерия в молекуле приведет к появлению пика иона с массой 3410,3580 Да и относительной интенсивностью (в сумме интенсивностей этих пяти пиков) 1,7%. Присутствие одного атома ^{13}C в молекуле приведет к появлению пика с массой 3410,3609 Да и относительной интенсивностью 89,2%. Присутствие одного атома ^{15}N в молекуле приведет к появлению пика с массой 3410,3517 Да и

относительной интенсивностью 6,2%. Присутствие одного атома ^{18}O в молекуле приведет к появлению пика с массой 3410,3588 Да и относительной интенсивностью 1,2%. Наконец присутствие одного атома ^{33}S в молекуле приведет к появлению пика с массой 3410,3540 Да и относительной интенсивностью 1,7%. Чтобы увидеть эти пять пиков отдельно, нужен прибор с разрешающей способностью (разд. 6.3) более 4 000000.

Следующий пик на рис. 5.11 с целочисленной массой 3411 (наиболее распространенная масса) состоит из 19 индивидуальных пиков, обусловленных одновременным присутствием в молекуле двух изотопов $A+1$ или одного изотопа $A+2$ (^{18}O или ^{34}S). Поскольку основной вклад, как и в предыдущем случае, вносит изотоп ^{13}C , центр масс этого составного пика будет находиться около 3411,3613 Да. Кстати, средняя молекулярная масса, рассчитанная из усредненных величин атомной массы элементов (разд. 5.12), находится рядом с этим пиком и составляет 3411,7210 Да. Видно, что пик с такой массой в спектре отсутствует, однако при получении спектров еще более тяжелых соединений, с массами в десятки тысяч дальтон, разрешающей способности любого прибора оказывается недостаточно для получения разрешенного кластера молекулярного иона. Пики ионов представляют собой огибающую шириной в сотни и тысячи дальтон, причем вершина этой кривой соответствует средней молекулярной массе соединения (рис. 5.9).

Вариантом МЛДИ является метод **поверхностной матричной лазерной десорбционной ионизации (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization, SELDI)**, впервые описанный Хатченсом [187, 188]. Метод позволяет резко повысить селективность анализа пептидов и белков благодаря модификации матрицы. К обычному материалу матрицы для МЛДИ добавляется соединение, которое может образовать химические связи с конкретным участком сложной молекулы. Если на этот подготовленный микрочип нанести раствор смеси биомолекул, то только те из них, которые имеют в своей структуре подходящие места связывания, образуют химические связи с молекулами модифицированной матрицы. Последующая промывка микрочипа удаляет все несвязанные молекулы. После высушивания образец подвергается МЛДИ анализу [189, 190].

Метод SELDI показал превосходные результаты в решении биохимических и медицинских проблем: установление структур белков, идентификация биомаркеров, установление мест связывания антигенов, клинические исследования по выявлению заболеваний (туберкулез, диабет, рак, панкреатит, болезнь Альцгеймера и т. д.), и многие другие [191-193].