

Российская академия наук
Институт энергетических проблем химической физики

На правах рукописи

УДК 543.51

ПОПОВ ИГОРЬ АЛЕКСЕЕВИЧ

**Использование новых методов ионизации и фрагментации органических
и биоорганических молекул для их идентификации**

01.04.17 – химическая физика, в том числе физика горения и взрыва

автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва, 2007г.

Работа выполнена в Институте энергетических проблем химической физики
Российской академии наук

Научный руководитель: Доктор физико-математических наук, профессор
Николаев Евгений Николаевич

Официальные оппоненты: Доктор физико-математических наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Веденов Александр Алексеевич

Доктор физико-математических наук, профессор,
Алимпиев Сергей Сергеевич

Ведущая организация:
Московский инженерно-физический институт (Государственный университет)

Защита состоится «14» ноября 2007г. в 12 час. 00 мин. на заседании
диссертационного совета Д 002.112.01 при Институте энергетических проблем
химической физики Российской академии наук по адресу: 119334, г. Москва,
Ленинской проспект, д. 38, корп.2, ИНЭП ХФ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической
физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук.

Автореферат разослан «12» октября 2007г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

Кандидат химических наук



М.И. Николаева

Общая характеристика работы

Введение. Актуальность проблемы.

Масс-спектрометрия с момента ее появления в начале 20-го века является одним из наиболее информативных физических методов исследования веществ во всех агрегатных состояниях. В последнее время масс-спектрометрия переживает бурное развитие. Прогресс в развитии масс-спектрометрии был связан с совершенствованием масс-анализаторов, детекторов ионов и, в первую очередь, с созданием и развитием методов ионизации. В первых масс-спектрометрах использовались методы ионизации веществ, находящихся в газообразном состоянии, такие как разряд и электронный удар. Эти методы позволяли анализировать газообразные вещества или вещества, которые могут быть переведены в газообразное состояние. Они в значительной степени покрывали потребности анализа воздуха, различных летучих веществ, в том числе и органического происхождения, в частности, продуктов переработки нефти, да и самой нефти при использовании методов пиролиза. В семидесятые годы прошлого века сильно активизировались исследования, направленные на поиск методов неразрушающей ионизации больших органических молекул с целью применить масс-спектрометрию для анализа биологических систем. Было открыто несколько методов неразрушающей ионизации биологических молекул с атомными весами до 10 кДальтон. Это полевая десорбция, вторичная ионная эмиссия из молекулярной матрицы (глицерин и подобные вещества, дающие протоны при ударе о них ускоренных ионов), бомбардировка быстрыми атомами (FAB), плазменная десорбция. Революционизирующим масс-спектрометрию событием стало открытие неразрушающих молекулы методов ионизации электроспрея (ESI) и лазерной десорбции ионизации из матрицы (MALDI), позволяющих ионизовать и вводить в масс-анализатор большие, в сотни Мегадальтон, молекулы биологического происхождения без их разрушения. Эти удостоенные Нобелевской премии открытия послужили толчком к бурному развитию биологической масс-спектрометрии.

Ионы могут быть образованы не только при ионизации нейтрального вещества в разном агрегатном состоянии, но и при диссоциации уже

образованных ионов. Процессы образования ионов при диссоциации ионизированных молекул оказались чрезвычайно важными при исследовании структуры молекул методами масс-спектрометрии, в особенности биологических молекул, таких как ДНК, РНК и белков, являющихся биополимерами. Наряду с фрагментацией молекулярных ионов, вызываемой столкновениями этих ионов с атомами или малоатомными молекулами (CID), в настоящее время при исследовании структуры биомолекул используется лазерный нагрев ионов – многофотонная лазерная инфракрасная диссоциация (IRMPD), рекомбинация со свободными электронами (ECD) и электронами, передаваемыми на исследуемые ионы (многозарядные положительные продукты ионизации электроспреем) от отрицательных ионов (ETD).

В данной работе основное внимание уделяется дальнейшему совершенствованию и поиску новых применений новых методов ионизации и фрагментации органических молекул – как синтетических низкомолекулярных (на примере взрывчатых веществ), так и природных – белки и пептиды.

Цель и задачи исследования.

Основной целью настоящих исследований была разработка новых масс-спектрометрических методов анализа органических молекул, позволяющих исследовать молекулы разного класса, для чего были решены следующие задачи:

- (1) Разработка масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье и ионным источником, работающим при атмосферном давлении.
- (2) Разработка чувствительного и селективного метода экспресс-обнаружения взрывчатых веществ в твердом состоянии, позволяющего избежать предварительной подготовки пробы или свести её к минимуму.
- (3) Разработка чувствительного метода количественного определения относительных концентраций пептидов с заменами аспарагиновой кислоты на её изо-форму.

(4) Применение метода количественного определения относительных концентраций пептидов с заменами аспарагиновой кислоты на её изоформу в случае работы с ионным источником на основе лазерной десорбции из матрицы (MALDI).

Научная новизна.

1. Впервые разработан и создан источник химической ионизации при атмосферном давлении с термодесорбционным вводом исследуемых веществ.
2. Впервые продемонстрирована возможность обнаружения взрывчатых веществ при помощи созданного ионного источника химической ионизации с термодесорбционным вводом анализа взрывчатых веществ, сорбированных на пыли и поверхностях, достигнута чувствительность на уровне 10 нг TNT.
3. Впервые создана методика распознавания и количественного определения относительного содержания в бинарных смесях изомерных замен аспарагиновой кислоты в пептидах с использованием CID и ECD фрагментации.
4. Впервые продемонстрирована возможность определения замен при помощи MALDI при атмосферном давлении.
5. Впервые в РФ создан масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с интерфейсом для ионных источников, работающих при атмосферном давлении.

Практическое значение работы.

Результаты, полученные в данной работе могут быть использованы при создании нового и дальнейшем совершенствовании существующего масс-спектрометрического оборудования, при разработке систем контроля безопасности различных объектов. Кроме того, описанные в диссертации методы, могут быть использованы при изучении молекулярных основ болезни Альцгеймера, а так же при создании новых методов биологических и

биохимических исследований, связанных с созданием новых подходов молекулярной медицинской диагностики.

Личный вклад автора.

Материал, представленный в диссертации получен при непосредственном участии автора, как в постановке задачи, так и при проведении исследований, обсуждении и анализе полученных результатов. Работа выполнена в Институте энергетических проблем химической физики Российской академии наук, часть работ одновременно выполнялось автором в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук и в Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук в период с 2003 по 2007 годы.

Апробация работы.

Результаты работы обсуждались на следующих Российских и международных конференциях: «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук» в 2003, 2004 гг.; 16я международная конференция по масс-спектрометрии, Эдинбург, Англия, 2003г.; 10я международная конференция «Десорбция – 2004», 2004г., Санкт-Петербург; 2я международная семинар-школа «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии», Москва, Россия, 4-7 октября, 2004; Третья международная конференция-школа «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии», Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007; Третий съезд ВМСО, 2-ая Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», 3-7 сентября 2007 г., Москва; Конференция по программе фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные науки-медицине», 2006г.; 4я Международная конференция «Фрагментация при захвате или передаче электрона – Фундаментальные аспекты и приложения», Гон-Конг, 2006г.; Третья международная конференция «Геномика, протеомика, биоинформатика и нанотехнологии в медицине», Новосибирск, 2006г.; 52я, 53я,

54я, 55я конференции Американского масс-спектрометрического общества в 2004, 2005, 2006, 2007гг.

Публикации.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах, список которых приводится в конце автореферата. Работы, результаты которых изложены в диссертации выполнены при поддержке РФФИ, INTAS, CRDF, в рамках программ Президиума РАН, ОХНМ РАН.

Объём и структура диссертации.

Диссертация изложена на 103 страницах, содержит 32 рисунка, 3 таблицы.

Содержание работы.

Масс-спектрометрия в настоящее время является одним из наиболее точных и чувствительных методов исследования вещества. Однако при проведении масс-спектрометрических исследований требуются громоздкие процедуры предварительной подготовки пробы, предварительного разделения, что делает этот метод зачастую недоступным для рутинного анализа, особенно при решении задач обнаружения микропримесей в воздухе, воде, в пыли, а так же на твердых поверхностях в реальном времени. Анализ органических молекул, особенно биологического происхождения – отдельная достаточно сложная задача, для решения которой требуется развитие специальных подходов – мягких неразрушающих методов ионизации. Одним из методов ионизации, который широко используется в настоящей работе, является ионизация электрораспылением в вакуум. Это метод мягкой ионизации, который работает при атмосферном давлении, поэтому его удобно использовать при сопряжении масс-спектрометра с жидкостным хроматографом. При анализе сложных органических молекул масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса предоставляет большие возможности благодаря своим высоким характеристикам по разрешающей способности, чувствительности, точности измерения масс. Однако измерительная часть масс-спектрометра ИЦР ПФ работает при сверхнизком давлении (ниже $1 \cdot 10^{-9}$ Торр), поэтому при создании подобных приборов необходимо обеспечить транспортировку ионов из атмосферы в область сверхвысокого вакуума. Отличительной особенностью масс-спектрометрии ИЦР ПФ является возможность проведения исследований структуры молекулярных ионов при помощи различных методов фрагментации: столкновительной (CID), фрагментации при захвате электронов (ECD), многофотонной лазерной инфракрасной диссоциации (IRMPD). С использованием подобных подходов можно исследовать структуру различных полимерных молекул, в том числе биологических полимеров. При исследовании структуры и функции белков и пептидов возникает серьезная проблема, связанная с определением первичной структуры таких молекул, а так же их

изомерного состава. В настоящей работе рассматриваются развитые новые подходы к ионизации и фрагментации молекул, позволяющие решать подобные задачи.

В главе I приводится литературный обзор, в котором кратко описаны принципы масс-спектрометрии ИЦР, наиболее распространенные конфигурации ионных источников электрораспыления в вакуум, MALDI при атмосферном давлении, химической ионизации в коронном разряде. Так же рассмотрены различные конфигурации атмосферных интерфейсов, масс-спектрометров ИЦР и масс-спектрометров на основе ионных ловушек. Кроме того, приводится обзор современных методов фрагментации органических молекул в масс-спектрометрах, а так же способов определения изомерных форм аминокислот в составе пептидов.

Среди основных видов атмосферных интерфейсов можно выделить следующие – конфигурации с нагреваемым металлическим капилляром и конфигурации со стеклянным капилляром и потоком нагретого нейтрального газа. Важным элементом атмосферного интерфейса является узел, позволяющий осуществить переход из камеры, в которой находится нагреваемый капилляр (как правило, это первая ступень откачки) в следующую вакуумную камеру (как правило, это вторая ступень откачки). Для осуществления эффективной транспортировки ионов используют различные электродинамические и газодинамические устройства. Из элементов, наиболее распространенных в настоящее время, можно выделить такие устройства как скиммер, скиммер в комбинации с одиночной линзой, электродинамическая ионная воронка. Особое внимание в литературном обзоре уделено сравнению конструктивных особенностей существующих атмосферных интерфейсов для ввода ионов в вакуумную камеру масс-спектрометра для обоснования конструкции прибора, описанной в главе II.

Атмосферный интерфейс для ввода ионов в вакуумную камеру масс-спектрометра является универсальным, поэтому с его помощью можно работать практически с любым атмосферным ионным источником. В настоящей работе описаны три типа ионных источников – атмосферный МАЛДИ, электроспрей,

наноэлектроспрей, а так же химическая ионизация при атмосферном давлении, в т.ч. с возможностью проведения ионно-молекулярных реакций.

Отдельно в литературном обзоре описаны возможные конструкции ионных источников с химической ионизацией, в т.ч. источников ионов при атмосферном давлении.

Глава II посвящена описанию созданного в Лаборатории ионной и молекулярной физики ИНЭП ХФ РАН масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионным источником электрораспыления в вакуум.

Основной сложностью, возникающей при создании приборов такого типа является необходимость обеспечения эффективной совместной работы ионного источника, работающего при атмосферном давлении, и масс-анализатора, в данном случае масс-спектрометра ИЦР ПФ, который работает в условиях высокого вакуума ($1 \cdot 10^{-8}$ Торр и ниже). Атмосферный интерфейс (рис.1) созданного прибора представляет собой нагреваемый металлический капилляр, радиочастотную ионную воронку, и систему транспорта ионов на основе радиочастотных квадруполь с дифференциальной откачкой.

Созданный источник ионов состоит из стеклянного шприца с толкателем, используемого для ввода раствора исследуемого вещества, тонкого (50-100 мкм внутренний диаметр) кварцевого остря, соединенного с иглой шприца и металлического нагреваемого капилляра. Нагреваемый капилляр служит переходным элементом между атмосферой и первой ступенью дифференциальной откачки.

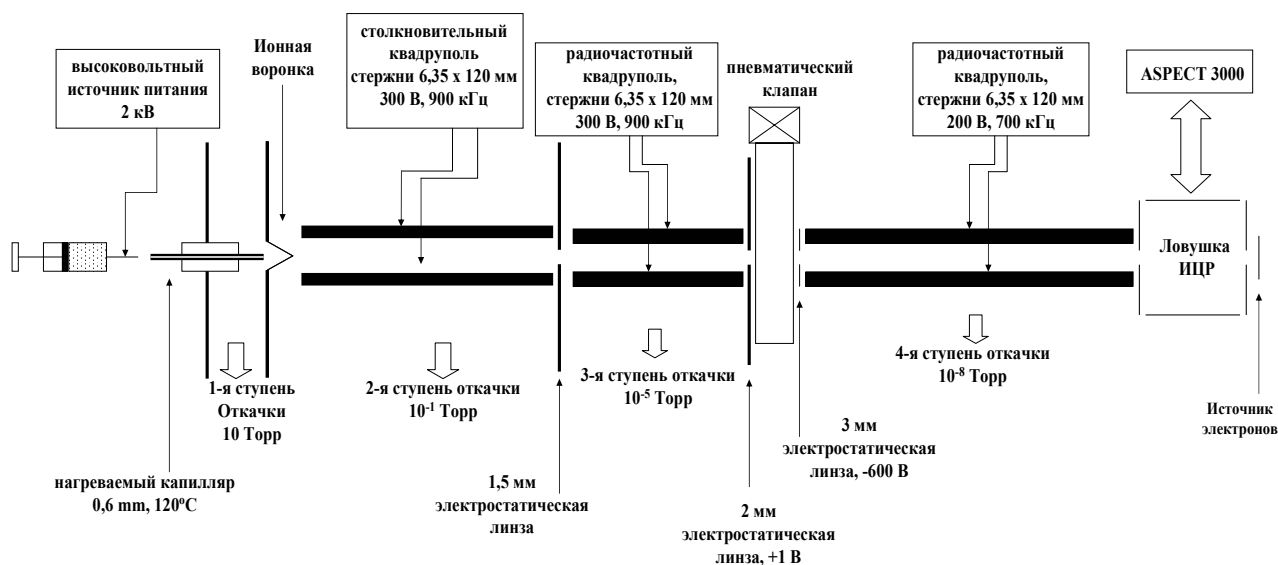


Рис. 1. Система радиочастотной транспортировки ионов

При ионизации электрораспылением высокое напряжение (2-5 кВ) прикладывается к игле шприца, через который проходит раствор исследуемого образца. Между образцом в кварцевом острие и металлическим нагреваемым капилляром возникает электрическое поле. Образующиеся заряженные капли под его воздействием попадают в нагреваемый капилляр, где в газовом потоке происходит их испарение и дробление, вплоть до образования ионов исследуемого вещества.

После нагреваемого капилляра ионы попадают в область с давлением $1 \cdot 10^{-1}$ Торр (первая ступень дифференциальной откачки). Для обеспечения эффективного транспорта ионов в следующую камеру системы дифференциальной откачки и фокуссировки ионов на выходе из нагреваемого капилляра была использована радиочастотная ионная воронка.

После радиочастотной ионной воронки установлена система транспорта ионов на основе трех линейных квадрупольей: первый квадруполь работает в вакуумной камере при давлении $1 \cdot 10^{-3}$ Торр (т.н. столкновительный квадруполь) и помимо транспортной функции обеспечивает дополнительную фокусировку ионного пучка; транспортный квадруполь, работающий при давлении $1 \cdot 10^{-5}$ Торр,

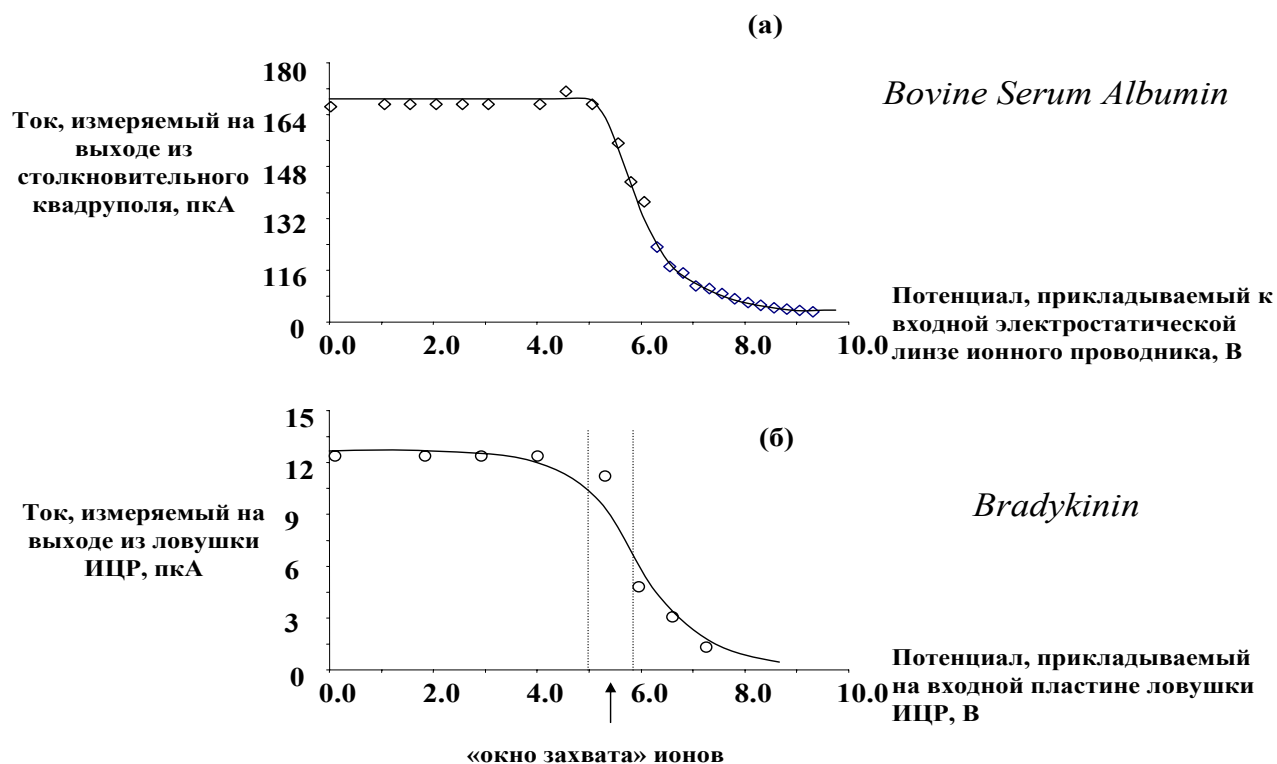


Рис.2. Экспериментальное энергетическое распределение различных ионов:
 (а) – на выходе из столкновительного квадруполь,
 (б) – на входе в ловушку ИЦР при столкновительном захвате.

который дополнительно может выполнять функцию накопительного квадруполь; транспортный квадруполь, работающий при давлении $1 \cdot 10^{-8} \div 1 \cdot 10^{-9}$ Торр, который обеспечивает транспортировку ионов в измерительную ячейку ИЦР, находящуюся в центре сверхпроводящего соленоида (на расстояние 1 метр). Вакуумные камеры описанной системы транспорта ионов отделяются друг от друга посредством металлических диафрагм, диаметр отверстий которых 1-2 мм, на которые подается постоянное напряжение, в результате чего они работают как электростатические линзы.

Захват ионов в измерительной ячейке ИЦР осуществлялся посредством столкновений ионов с молекулами остаточного газа, в результате которых ионы теряли кинетическую энергию за время их прохождения через ловушку (так называемый, накопительный захват ионов). При этом на входную удерживающую пластину ловушки подавался потенциал ниже максимума энергетического спектра распределения ионов (определяемого экспериментально – рис. 2), в то время как на

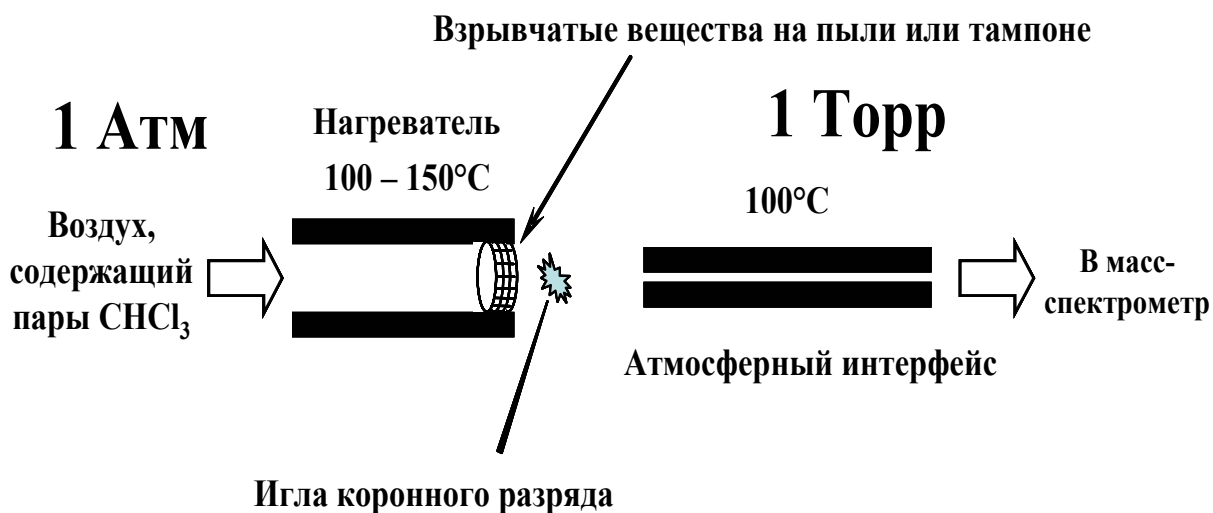


Рис. 3. Принципиальное устройство ионного источника химической ионизации при атмосферном давлении с термодесорбционным вводом

выходную пластину ловушки подавался потенциал выше этого максимума. Давление остаточного газа в ловушке было достаточно, чтобы ионы испытали несколько столкновений за время одного периода осевых колебаний между удерживающими пластинами и захватывались в поле удерживающего потенциала.

Созданный масс-спектрометр позволяет получать масс-спектры тяжелых молекул с разрешающей способностью до 50000.

Кроме этого, показано, что на созданном масс-спектрометре можно использовать различные методики, такие как продолжительное нерезонансное возбуждение, диссоциация индуцированная столкновением с электронами, позволяющие идентифицировать молекулы биополимеров и исследовать их структуру.

Глава III посвящена разработке чувствительного и селективного метода экспресс-обнаружения следовых количеств взрывчатых веществ в твердом состоянии. Для решения этой задачи был разработан и реализован ионный источник на основе химической ионизации при атмосферном давлении с термодесорбционным вводом. Описываются конструкция, принцип работы и характеристики ионного источника на основе химической ионизации при атмосферном давлении с термодесорбционным вводом.

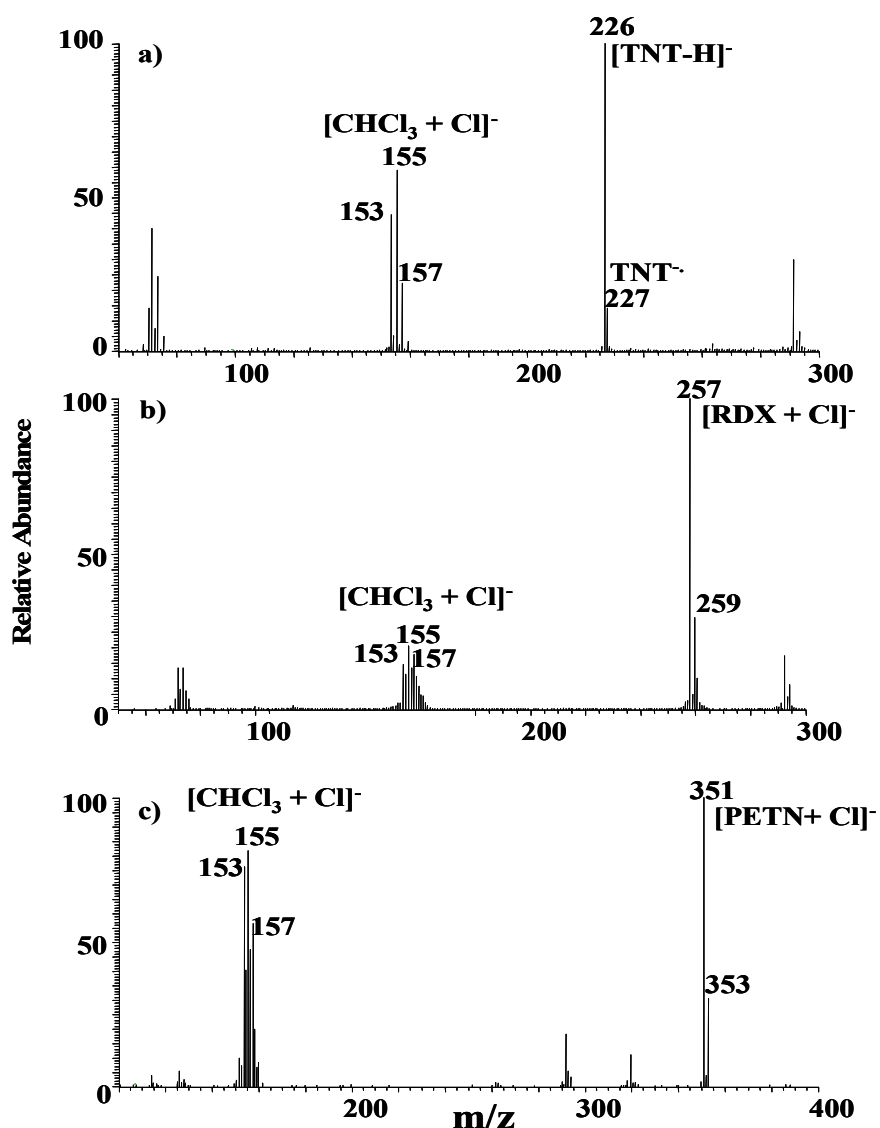


Рис. 4. Масс-спектры: а) TNT; б) RDX; и в) PETN с тампона при атмосферной термодесорбции/химической ионизации с использованием воздуха, содержащего $CHCl_3$.

С использованием описанного метода предполагается детектировать взрывчатые вещества с протирочных тампонов и пыли с использованием прямой термической десорбции в масс-спектрометр с ионизацией при атмосферном давлении. Специфичность обеспечивается методом МС/МС и ионно-молекулярными реакциями.

Большинство ВВ содержат несколько нитрогрупп и являются нелетучими соединениями с очень низким давлением паров при нормальных условиях (так давление насыщенных паров 1,3,5-тринитро-1,3,5-триазацилогексана (RDX) при комнатной температуре и атмосферном давлении около 5×10^{-9} Торр). Это

существенно затрудняет их анализ в газовой фазе. Для проведения анализа взрывчатых веществ в реальных условиях распространен отбор проб с твердых поверхностей или с пыли. С использованием данного метода демонстрируется возможность детектирования взрывчатых веществ, адсорбированных на пыли, или снятых с поверхностей тампоном с использованием метода термодесорбции с поверхностей с одновременной химической ионизацией при атмосферном давлении в коронном разряде.

Образцы с тампона или пыли пиролизовались в потоке воздуха, содержащего хлороформ (рис.3). Продукты пиролиза ионизовались коронным разрядом. Эксперименты выполнены на коммерческом масс-спектрометре LCQ (Thermo Finnigan San Jose, CA) с источником атмосферной ионизации в моде отрицательных ионов при напряжении на острие разрядника 3.0-4.0 кВ; температуре десольватирующего капилляра 100 °С. (В этих экспериментах может быть использован любой масс-спектрометр с атмосферным интерфейсом, в том числе и миниатюрный). Поток воздуха, содержащий хлороформ, получали либо внося в поток открытый флакон с хлороформом либо распыляя хлороформ со скоростью (10 млитров/мин). Стандартные образцы ВВ 2,4,6-тринитротолуола (TNT), RDX и пентаэритрита тетранитрата (PETN) были получены от Accoustandards Inc. (Connecticut, USA) в виде растворов (1.0 mg/mL в метанол/ацетонитриле). Тампоны были получены от Barringer Technologies Inc. (NJ, USA). Они применяются для проверки багажа в аэропортах на взрывчатку.

В результате экспериментов для TNT, RDX и PETN наблюдаются ионы $[\text{TNT-H}]^-$ (m/z 226), $[\text{RDX+Cl}]^-$ (m/z 257) и $[\text{PETN+Cl}]^-$ (m/z 351), соответственно. Предварительные результаты показывают, что предел детектирования (ПД) для этого метода при мониторинге отдельных ионов меньше 10 ng (TNT), 30 ng (RDX) и 10 ng (PETN) при использовании масс-спектрометра средней чувствительности (см. рис. 4).

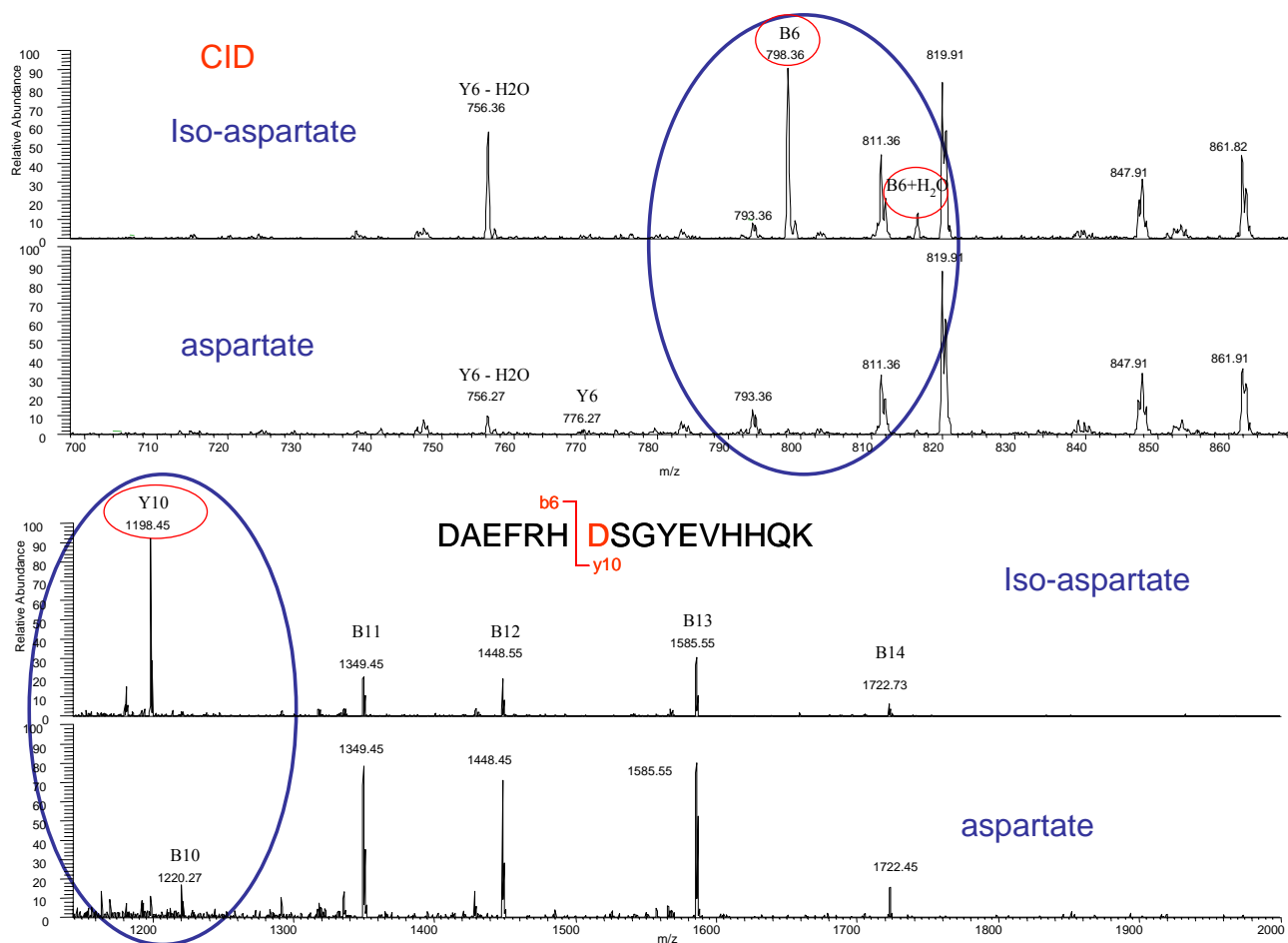


Рис. 5. Различия в масс-спектрах столкновительной фрагментации пептидов 1-16 бета-амилоида с заменой Asp-7 на изоформу

Селективность метода обеспечивается селективной ионизацией в присутствии паров хлороформа, а так же проведением ионно-молекулярных реакций с образованием комплекса Мейссенгеймера.

Глава IV посвящена задаче определения изомерного состава аминокислот, входящих в состав пептидов и детектированию сверхнизких концентраций пептидов, содержащих подобные замены.

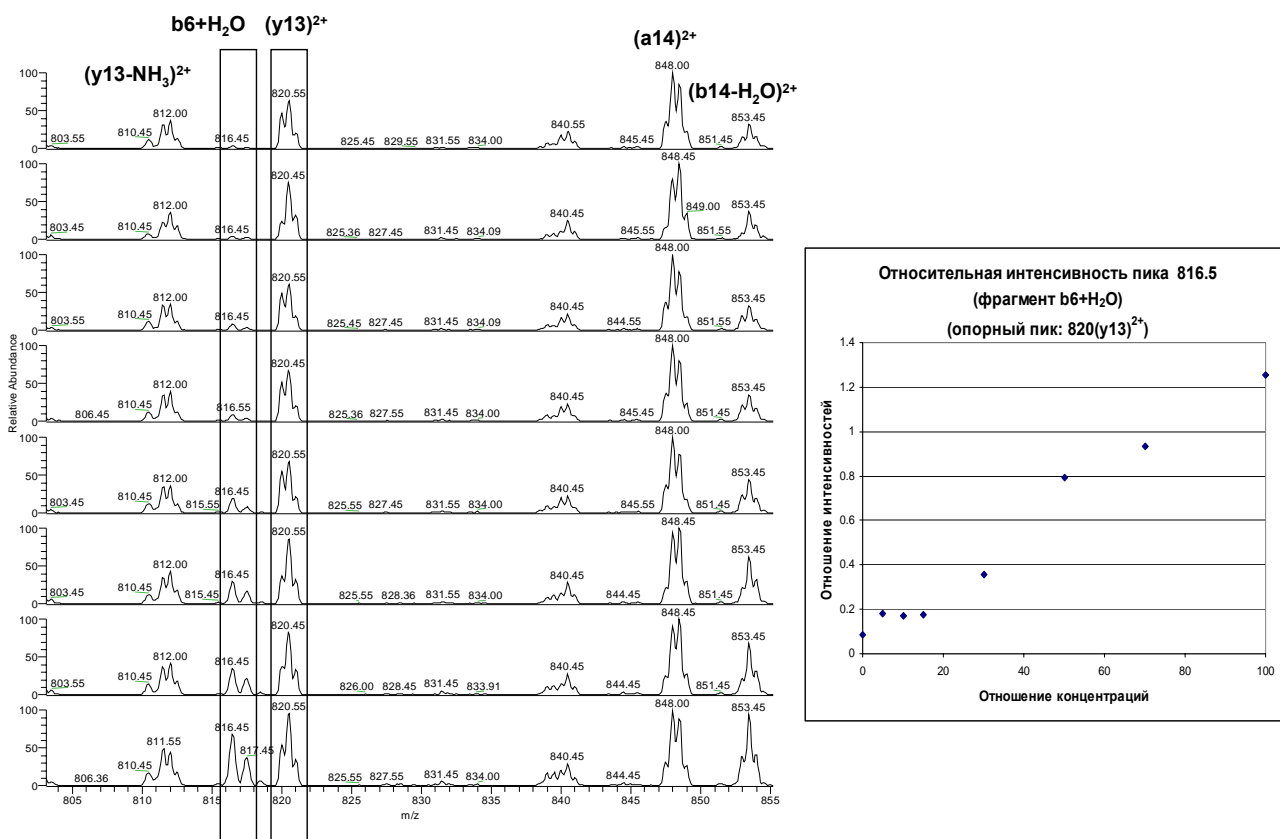


Рис.6. Зависимость относительной интенсивности реперных пиков фрагментов, образующихся при столкновительной фрагментации, от относительной концентрации пептидов 1-16 бета амилоида с различными изомерными формами аспарагиновой кислоты в бинарных смесях

Была исследована возможность распознавания замен аминокислот на их изомерные формы в пептиде, соответствующем фрагменту 1-16 бета-амилоида:

[ACE]D1AEFR5HDSGY10EVNHQ15K[NH₂] и

ACE[D1AEFR5H[isoD]SGY10EVNHQ15K[NH₂], а так же замен аминокислот на

их стереоизомеры и структурные изомеры в пептиде, соответствующем фрагменту 5-10 бета-амилоида:

R5H[isoD]SGY10 [NH₂], R5H[L form D]SGY10 [NH₂], R5H[D form D]SGY10

[NH₂].

Последовательность аминокислот во всех пептидах была подтверждена всеми доступными методами фрагментации – CID

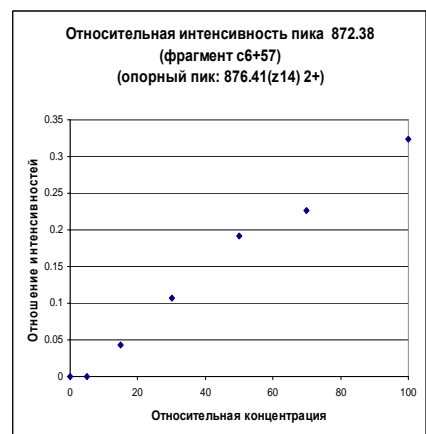
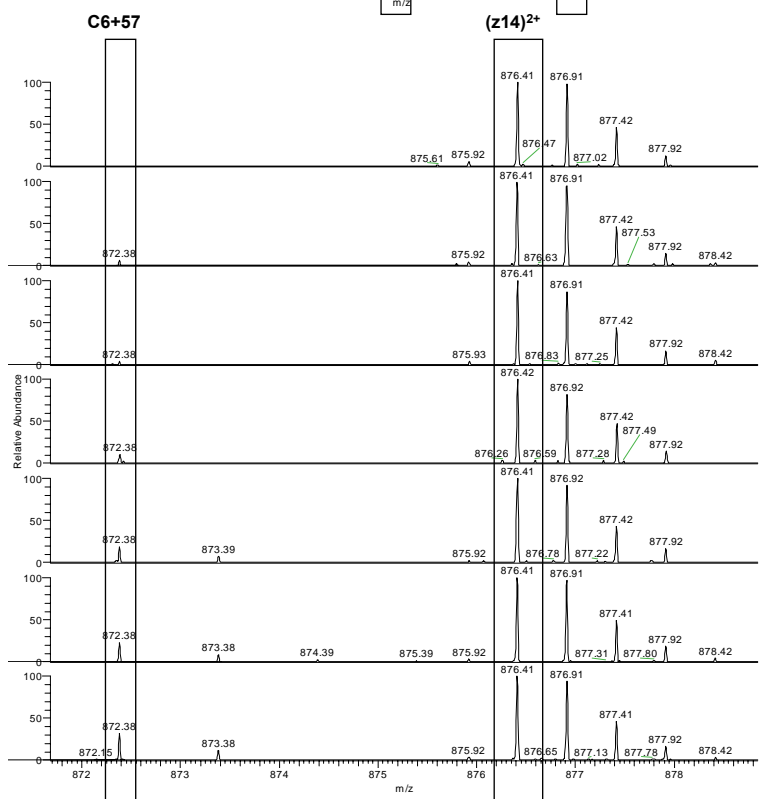
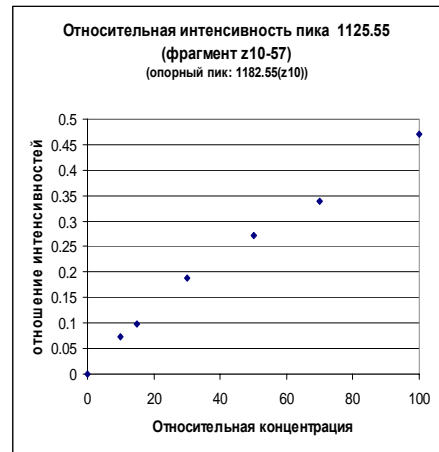
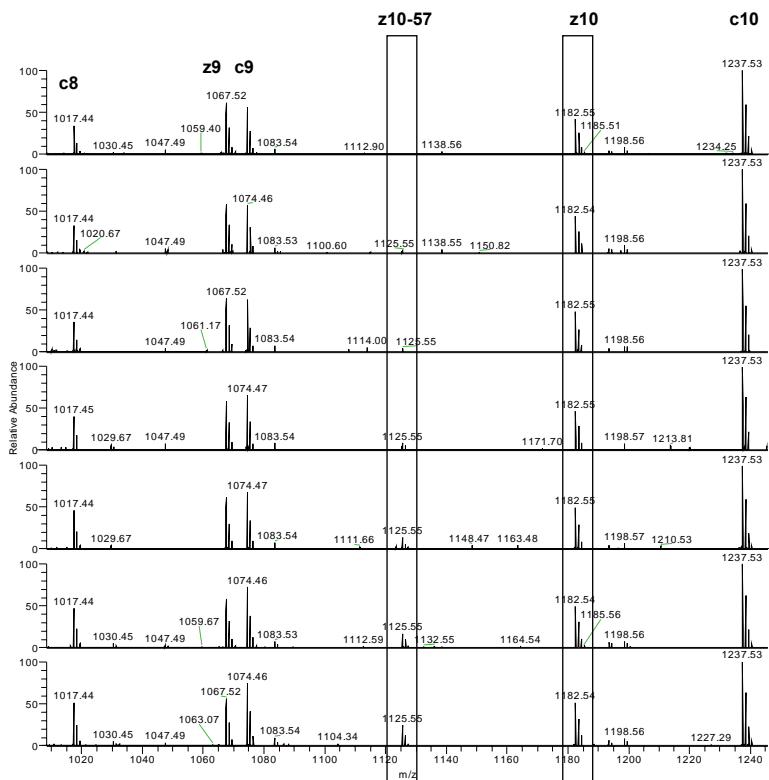


Рис. 7. Зависимость относительной интенсивности реперных пиков фрагментов, образующихся при фрагментации за счет захвата электронов, от относительной концентрации пептидов 1-16 бета амилоида с различными изомерными формами аспарагиновой кислоты в бинарных смесях

(фрагментация при столкновении с молекулами остаточного газа), ECD (фрагментация за счет захвата электрона), IRMPD (фрагментация за счет поглощения излучения инфракрасного лазера).

Проведен детальный анализ процессов фрагментации пептидов методами столкновительной диссоциации (CID), диссоциации при захвате электрона (ECD), фрагментация за счет поглощения излучения инфракрасного лазера (IRMPD). При проведении анализа параметры фрагментации (время и энергия) варьировались в широком диапазоне. В результате таких исследований были определены оптимальные параметры фрагментации (это достаточно широкий диапазон параметров), позволяющие получать наиболее существенные различия в масс-спектрах фрагментов исследуемых пептидов в зависимости от того, в какой изомерной форме находится аспарагиновая кислота.

При изучении возможности определения замен аспарагиновой кислоты в составе пептида на изо-аспарагиновую кислоту при помощи методов фрагментации CID, ECD и IRMPD обнаружены существенные различия в спектрах фрагментации, а именно – в спектрах ECD (рис.7) фрагментов пептидов, содержащих изо-форму аспарагиновой кислоты присутствуют пики, соответствующие фрагментам $sp+57$ и комплиментарные им фрагменты $zN-n-57$, где n – положение изоформы аспарагиновой кислоты в пептиде, а N - количество аминокислот в пептиде. В масс-спектрах ECD фрагментов пептидов, содержащих нормальную форму аспарагиновой кислоты подобные пики отсутствуют. Аналогично, в масс-спектрах CID (рис.5) фрагментов пептидов, содержащих изо-форму аспарагиновой кислоты присутствуют пики, соответствующие фрагментам b_n+H_2O , а в масс-спектрах CID и IRMPD фрагментов пептидов, содержащих нормальную форму аспарагиновой кислоты подобные пики отсутствуют.

Наличие такого существенного различия в масс-спектрах фрагментации ионов позволило создать методику количественного определения относительной концентрации пептидов (рис. 6,7), содержащих L-форму аспарагиновой кислоты или изо-форму аспарагиновой кислоты. Для определения чувствительности метода были проведены измерения масс-

спектров смесей модельных пептидов (амилоидов) с аминокислотами (аспарагиновая кислота) в разных изомерных формах (изо-, L- и D-) в широком диапазоне концентраций (1-100%) с концентрационным шагом, соответствующим воспроизводимости метода. Достигнутая в настоящее время чувствительность метода составляет 5-15 pmol/L.

В масс-спектрах фрагментации пептидов, содержащих L, D стереоизомеры и L-изоформу аспарагиновой кислоты так же были обнаружены существенные различия в относительных концентрациях образующихся фрагментов, например при фрагментации CID и IRMPD ((b5)2+) и 294.2(b2), при фрагментации ECD 426.2(c4) и 409.2(b3).

Были получены линейные калибровочные кривые во всем диапазоне концентраций для всех исследованных пептидов, позволяющие определять концентрации модифицированных пептидов с точностью порядка 0.5%. Линейность наблюдается для всех использованных методов фрагментации (ECD, CID и IRMPD).

Была продемонстрирована чувствительность метода на уровне 5-15 nM/L в нормальном режиме работы и на уровне 1 nM/L в режиме MRM (Мониторинг в режиме нескольких реакций). С использованием наноспрейного ионного источника для проведения анализа необходимо 10 микро литров раствора.

Для дальнейшего развития данного метода была продемонстрирована возможность анализа с использованием MALDI ионизации при атмосферном давлении (AP MALDI). Существенным отличием этого метода является то, что при MALDI ионизации образуются преимущественно однозарядные ионы исследуемого пептида, что существенно усложняет изоляцию материнских ионов и фрагментацию. Было продемонстрировано, что при использовании метода AP MALDI можно эффективно детектировать замену аспарагиновой кислоты в пептиде на изоаспарагиновую при концентрациях исследуемых пептидов выше чем 100 нМ/л.

Основные результаты и выводы.

1. Создан масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с интерфейсом для ионных источников, работающих при атмосферном давлении.
2. Разработан и создан источник химической ионизации при атмосферном давлении с термодесорбционным вводом исследуемых веществ.
3. Продемонстрирована возможность обнаружения взрывчатых веществ при помощи созданного ионного источника химической ионизации с термодесорбционным вводом анализа взрывчатых веществ, сорбированных на пыли и поверхностях, достигнута чувствительность на уровне 10 нг TNT.
4. Создана методика распознавания и количественного определения относительного содержания в бинарных смесях изомерных замен аспарагиновой кислоты в пептидах с использованием CID и ECD фрагментации.
5. Продемонстрирована возможность определения замен при помощи MALDI при атмосферном давлении.

Список публикаций:

1. М.В. Горшков, О.Н. Харыбин, А.Н. Вилков, В.В. Дривен, И.А. Попов, М.И. Даштиев, Е.Н. Николаев. *Масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса для биохимических исследований*. // Химическая физика, 2002, 21(4), 32-38.
2. И.А. Попов, М.В. Горшков, О.Н. Харыбин, А.И. Спасский, А.С. Кононихин, Д.Н. Брумирский, Е.Н. Николаев. *Способы увеличения интенсивности ионного тока в масс-спектрометре ИЦР*. // Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук. Труды конференции. 2003, т. IV, 58.
3. Д.Н. Брумирский, М.В. Горшков, О.Н. Харыбин, И.А. Попов, О.Н. Харыбин, И.А. Тарасова, Е.Н. Николаев. *Об эффективности фрагментации ECD в масс-спектрометрии ИЦР*. // Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук. Труды конференции. 2003, т. IV, 57.
4. И.А. Попов, И.В. Горшков, О.Н. Харыбин, А.И. Спасский, А.С. Кононихин, Д.Н. Брумирский, Е.Н. Николаев. *Исследование хиральности аминокислот в коротких пептидах с использованием столкновительной фрагментации*. // Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук. Труды конференции. 2003, т. IV, 59.
5. Eugene Nikolaev, Rui Zhang, Igor Popov, Mikhail Belov, Richard D. Smith. *Fast trapping of externally accumulated ions by strong DC defocusing inside ICR cell - "Radial kick"*. // 16th International Mass Spectrometry Conference. Edinburg, 2003. p.128.
6. И.А. Попов, О.Н. Харыбин, М.Е. Белов, Е.Н. Николаев. *Исследование захвата низкоэнергетических ионов в измерительной ячейке ИЦР*. // Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук. Труды конференции. 2003, т. IV, 21-23.
7. Spassky A.I., Kharybin O.N., Popov I.A., Gorshkov M.V., Kononikhin A.S., Brumirsky D.N., Nikolaev E.N. *Combination of high pressure matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) ion source and radio-frequency ion funnel* // Book of abstracts 10th International Conference "Desorption 2004" August 29 – September 2, Saint Petersburg, Russia. – 2004, p. 121
8. Попов И.А., Харыбин О.Н., Горшков М.В., Кононихин А.С., Спасский А.И., Брумирский Д.Н., Тарасова И.А., Дривен В.В., Николаев Е.Н. *Масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса для анализа*

- биополимеров. // Вторая международная школа-семинар «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии», Москва, Россия, 4-7 октября, 2004, стр. 119-120.*
9. Горшков М.В., Тарасова И.А., Брумирский Д.Н., Харыбин О.Н., Попов И.А., Кононихин А.С., Спасский А.И., Николаев Е.Н., Горшков А.В., Евреинов В.В. *Возможности структурного анализа синтетических полимеров методом масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса. // Вторая международная школа-семинар «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии», Москва, Россия, 4-7 октября, 2004, стр. 229-230.*
10. Попов И.А., Харыбин О.Н., Брумирский Д.Н., Кононихин А.С., Спасский А.И., Горшков М.В., Николаев Е.Н. *Идентификация хиральности аминокислот в составе пептидов с использованием столкновительной фрагментации. // Вторая международная школа-семинар «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии», Москва, Россия, 4-7 октября, 2004, стр. 243-244.*
11. А.И. Спасский, О.Н. Харыбин, И.А. Попов, М.В. Горшков, А.С. Кононихин, Д.Н. Брумирский, Е.Н. Николаев. *Ионный источник ЛДИМ высокого давления с использованием электродинамической ионной воронки. // Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук. Труды конференции. Москва, Россия, 2004, стр. 50.*
12. В. Горшков, О. Н. Харыбин, И. А. Попов, Д. Н. Брумирский, И. А. Тарасова, А.С. Кононихин, Е. Н. Николаев. *Новые методы фрагментации биополимеров для «скорострельной» протеомики. // Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук. Труды конференции. Москва, Россия, 2004, стр. 49.*
13. Spasskij A.I., Harybin O.N., Popov I.A., Kononikhin A.S., Brumirsky D.N., Chingin K.S., Driven V.V., Gorshkov M.V., Nikolaev E.N. *Intermediate pressure MALDI inside ion funnel for FTICR. // 51 th ASMS conference, Nashville, TN, USA May 2004. – 2004, on CD.*
14. Michael V. Gorshkov; Igor A. Popov; Oleg N. Kharybin; Dmitry N. Brumirskiy; Irina A. Tarasova; Vladimir V. Driven; Aleksey N. Kononikhin; Alexander I. Spassky; Eugene N. Nikolaev. *Towards Implementation of Electron Capture Dissociation Technique for Mass Spectrometers with Radio-Frequency Multipole Transmission Ion Guides // 52nd ASMS Conference, May 23 - 27, 2004, Nashville, Tennessee, USA.*

15. Popov I.A., Chen H., Kharybin O.N., Nikolaev E.N., Cooks R.G. *Detection of explosives on solid surfaces by thermal desorption and ambient ion/molecule reactions*// Chem Commun. (Camb). – 2005, v.15, pp. 1953-1955.
16. Nikolaev E.N., Kharybin O.N., Popov I.A. *Atmospheric pressure thermoionization of organics, Recognition of chirality by in situ probing*// Proceedings of the 53d ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2005
17. Popov I.A., Chen H., Kharybin O.N., Nikolaev E.N., Cooks R.G. *Detection of Some Explosives from Solid Surfaces by Thermal Desorption and chemical ionization in corona discharge and Ambient Ion/Molecule Reactions*// Proceedings of the 53d ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2005
18. Eugene N. Nikolaev, Igor A. Popov, Oleg N. Kharybin, Alexey S. Kononikhin, Marina I. Nikolaeva and Yuriy V. Borisov. *In situ recognition of molecular chirality by mass spectrometry: Hydration effects on differential stability of homo- and heterochiral dimethyltartrate clusters.* // International Journal of Mass Spectrometry, 2006 Vol. 265(2-3), pp. Pages 347-358
19. E.N. Nikolaev, I.A. Popov; S.A. Kozin; O.N. Kharybin; A.S. Kononikhin, E.F. Kolesanova, A.I. Archakov. *Recognition of individual amino acid isomeric form in peptides by FT ICR mass spectrometry. application to Alzheimer's disease peptides.* // The Third International Conference "Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanotechnologies for Medicine" Novosibirsk, Russia 12-16 July 2006.
20. Igor A. Popov; Sergey Kozin; Oleg N. Kharybin; Aleksey S. Kononikhin; Eugene N. Nikolaev. *Recognition of individual amino acid isomeric form in peptides by FT ICR mass spectrometry. Application to Alzheimer's disease peptides.* // The 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, May 28-June 1, 2006, Seattle, WA, USA
21. Igor A. Popov, Sergey A. Kozin, Aleksey S. Kononikhin, Ivan A. Boldin, Oleg N. Kharybin, Alexander I. Archakov, Eugene N. Nikolaev. *FT ICR mass spectrometry quantitative characterization of an isomerized beta-amyloid peptide using ECD, CID and IRMPD methods.* // 4th Uppsala International Conference on Electron Capture and Transfer Dissociation Mass Spectrometry - Fundamental and Applications". Hong Kong December 12-15, 2006.
22. P.S. Vinogradov; D.M. Avtonomov; I.A. Popov; E.N. Nikolaev. *An effect of plasma formation on mechanisms of ionization near a cathode in flow*

- technique mass spectrometry studies. // 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 3 - 7, 2007, Indianapolis, IN, USA.*
23. Igor A. Popov; Sergey A. Kozin; Aleksey S. Kononikhin; Ivan A. Boldin; Oleg N. Kharybin; Ekaterina F. Kolesanova; Alexander I. Archakov; Eugene Nikolaev. *Quantization of isomeric forms of aspartic acid in "Alzheimer peptide" by ECD, CID and IRMPD methods. // 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 3 - 7, 2007, Indianapolis, IN, USA.*
24. Aleksey S. Kononikhin; Igor A. Popov; Sergey A. Kozin; Eugene Nikolaev. *Recognition of aspartic acid isomeric forms in "Alzheimer peptide" using AP MALDI. // 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 3 - 7, 2007, Indianapolis, IN, USA.*
25. Е.Н. Николаев, А.С. Кононихин, В.Г. Згода, С.А. Мошковский, О.Н. Харыбин, И.А. Попов, Д.М. Автономов, И.А. Агрон, В.С. Курова, О.В. Демина, С.Д. Варфоломеев. *Разработка и применение метода точной массовой метки в масс-спектрометрии для хромато-масс-спектрометрического анализа протеома мочи // Фундаментальные науки- медицине. Материалы конференции, М.: Фирма «Слово», стр. 168-169, 2006г.*
26. Щиголев Б.А., Попов И.А., Кононихин А.С., Харыбин О.Н., Автономов Д.М., Козин С.А., Николаев Е.Н. *Определение предельной чувствительности детектирования замены аспарагиновой кислоты на её изо-форму в составе фрагмента 1-16 амилоида А-бета с использованием метода MRM // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.*
27. Лукин Б.М., Кононихин А.С., Попов И.А., Козин С.А., Николаев Е.Н. *Определение изомерных форм аминокислот в составе пептидов с использованием AP-MALDI // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.*
28. Д.М. Автономов, А.С. Кононихин, И.А. Попов, Е.Н. Николаев. *Поиск пост-трансляционных модификаций методами кластеризации масс-спектров триптических пептидов и статистики разностей масс для повышения достоверности идентификации исходных белков. // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.*

- 29.Харыбин О.Н., Згода В.Г., Кононихин А.С., Мошковский С.А., Попов И.А., Николаев Е.Н. *Исследование белкового состава мочи человека // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.*
- 30.Янц В.В, Головкин Н.В., Харыбин О.Н., Попов И.А., Кононихин А.С., Николаев Е.Н. *Десорбционно-электроспрейная ионизация для масс-спектра АРЕХ Qe // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.*
- 31.Рюмин П.А., Харыбин О.Н., Кононихин А.С., Попов И.А., Николаев Е.Н. *Термоионизация при атмосферном давлении для прямого масс-спектрального анализа // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.*
- 32.Попов И.А., Кононихин А.С., Янц В.В., Харыбин О.Н., Козин С.А., Николаев Е.Н. *О возможности применения прямых методов ионизации (десорбционно-электрораспылительная ионизация и МАЛДИ при атмосферном давлении) для исследования биологических объектов на примере пептида болезни Альцгеймера // Третий съезд ВМСО, 2-ая Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», 3-7 сентября 2007 г., Москва.*