



УДК 577.112.3:543.51

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРА С ИОНИЗАЦИЕЙ БЫСТРЫМИ АТОМАМИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ, РАЗДЕЛЕННЫХ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА БУМАГЕ И В ТОНКОМ СЛОЕ*Танцырев Г. Д., Поволоцкая М. И., Сараев В. А.**Институт химической физики Академии наук СССР, Москва*

Показана возможность использования масс-спектрометра с ионизацией быстрыми атомами в качестве детектора для хроматографии в тонком слое и на бумаге. В масс-спектрометр вводится участок хроматограммы, на котором адсорбированы разделенные вещества. На примере аминокислот показано, что масс-спектры распыленных ионов разделенных веществ, полученные таким способом, идентичны масс-спектрам индивидуальных веществ, введенных в масс-спектрометр стандартным способом. Минимальное количество адсорбированной на хроматограмме аминокислоты, при котором регистрируется характерный для нее масс-спектр, составляет $\sim 10^{-7}$ г.

Хроматография на бумаге и в тонком слое широко применяется для исследования органических соединений. В обоих указанных методах при обработке хроматограмм приходится прибегать к тем или иным физическим или химическим способам идентификации разделенных веществ, а иногда и применять комбинацию нескольких способов. Для этих целей используется и масс-спектрометрия [1, 2]. Во всех известных случаях непосредственному применению масс-спектрометра предшествует выявление пятен на хроматограмме, вырезание пятна (в случае БХ) или соскабливание слоя сорбента (в ТСХ), элюирование содержащегося в пятне вещества и перенесение образца в ионный источник масс-спектрометра. В ионном источнике с ионизацией электронным ударом исследуемый образец, как правило, приходится сильно нагревать для того, чтобы перевести твердое вещество в газообразное состояние, что во многих случаях приводит к его деструкции. Поэтому получаемые таким способом масс-спектры характеризуют не столько само вещество, сколько продукты его деструкции, что сильно усложняет идентификацию соединения.

В последние годы широкое применение в масс-спектрометрических исследованиях труднолетучих органических соединений получил метод ионизации быстрыми атомами [3, 4]. Особенно эффективным он оказался при анализе органических соединений, обладающих биологической активностью. При использовании глицерина в качестве стабилизирующей жидкой матрицы [5] для этих веществ получают стабильные во времени характерные масс-спектры, которые несут в себе информацию о молекулярной массе соединения, элементном составе и строении молекулы. Техника измерений в масс-спектрометрии с ионизацией быстрыми атомами состоит в том, что исследуемое вещество в виде тонкой пленки наносится на подложку, вводится в ионный источник и подвергается бомбардировке пучком быстрых атомов. Образующиеся распыленные ионы разделяются по массам и регистрируются. Такой способ ионизации позволяет использовать в качестве облучаемого образца непосредственно хроматограмму с адсорбированными веществами после их разделения.

Цель настоящей работы — на примере простых объектов (аминокислот) выяснить возможности метода масс-спектрометрии с ионизацией

Использованные сокращения: БХ — хроматография на бумаге, ТСХ — хроматография в тонком слое.

быстрыми атомами при его использовании в комбинации с БХ и ТСХ. Выбор объекта обусловлен тем, что БХ и ТСХ аминокислот хорошо разработана [6], а вторично-эмиссионные масс-спектры их известны [5, 7].

В таблице приведены данные масс-спектров, полученных с бумажной хроматограммы смеси аминокислот — валина, треонина, лейцина и лизина (молекулярные массы кислот составляют соответственно 117, 119, 131 и 146), — содержащей по 300 мкг каждой кислоты. Спектры регистрировались с участков хроматограммы, занятых пятнами разделенных аминокислот (положение пятен на хроматограмме определялось по полученным значениям R_f). Там же приведены данные масс-спектров тех же аминокислот, полученные по стандартной методике, принятой в методе масс-спектрометрии вторичных ионов (см., например, [5]). Из приведенных данных видно, что спектры всех четырех аминокислот, полученные с хроматограммы, аналогичны спектрам индивидуальных соединений; наиболее интенсивными линиями в них являются линии, соответствующие ионам $(M+H)^+$.

С хроматограммы смеси, содержащей по 100 мкг каждой кислоты, для валина и лейцина также получены их характерные масс-спектры. В спектрах же, полученных с участков, занятых треонином и лизином, линии, характерные для этих веществ, оказались малоинтенсивными.

В масс-спектрометре, на котором производились измерения, диаметр бомбардирующего пучка составлял 2 мм, т. е. облучалась площадка размером $\sim 0,03$ см². В то же время площадь хроматографических пятен лизина и треонина составляла ~ 4 см². Это означает, что в рассмотренном случае для масс-спектрометрического анализа использовалась только малая доля хроматографированного вещества. Эффективность масс-спектрометрического детектирования можно существенно повысить, если все вещество после процедуры разделения сконцентрировать на площади, меньшей, чем площадь хроматографического пятна.

В таблице приведены данные масс-спектров лизина и треонина, полученные с хроматограммы смеси, содержащей по 100 мкг каждой кислоты после концентрирования пятен этих аминокислот (методику концентрирования см. в «Экспериментальной части»). Видно, что зарегистрированные в этом случае спектры аналогичны спектрам индивидуальных аминокислот и линии, соответствующие ионам $(M+H)^+$, являются для каждой из кислот максимальными в спектре.

Из масс-спектров, полученных с занятых пятнами разделенных веществ участков тонкослойной хроматограммы смеси валина и трипептида алацилглицилглицина (M_r 203), содержащей по 10 мкг каждого из компонентов, видно (рис. 1), что в спектрах валина и трипептида, полученных с хроматограммы на силикагеле, характерными являются ионы типа $(M+H)^+$, как и в спектрах индивидуальных аминокислот. Следует отметить, что поскольку размеры пятен на тонкослойной хроматограмме существенно меньше, чем на бумажной, надежно определяемое количество вещества без концентрирования здесь может быть существенно меньшим.

На рис. 2 приведен участок масс-спектра, полученного с пятна тонкослойной хроматограммы, в котором содержание валина составляло 2 мкг. Учитывая предельную чувствительность масс-спектрометрической установки, размер бомбардируемого участка ($\sim 0,03$ см²), количество валина ($2 \cdot 10^{-6}$ г) в пятне площадью ~ 1 см², можно оценить минимальное регистрируемое данным способом количество валина. Оно составляет $\sim 10^{-7}$ г.

Таким образом, полученные результаты показали, что масс-спектрометрия с ионизацией быстрыми атомами может успешно использоваться для идентификации хроматографически разделенных веществ, при этом регистрация спектров производится непосредственно с хроматограммы, введенной в масс-спектрометр.

Метод может быть использован не только для идентификации веществ в пятнах, но и для определения местоположения пятен на хроматограмме. Это может быть сделано по масс-спектрам, получаемым при сканировании бомбардирующего пучка по мишени, представляющей со-

Вторично-эмиссионные масс-спектры аминокислот, полученные по стандартной методике (а), регистрацией с хроматограммы (б) (по 300 мг каждой аминокислоты) и регистрацией после БХ и концентрирования (в)

m/z	III (M+H) ⁺ , %									
	Val		Thr			Leu		Lys		
	а	б	а	б	в	а	б	а	б	в
110	1,3	3,7	5,5	6,8	6,3	1,9	5,6	3,8	21,4	10,0
111	0,8	5,5	1,7	11,9	3,0	0,9	10,0	2,1	8,6	6,7
112	0,3	1,4	0,9	8,5	2,4	0,3	2,5	1,7	4,3	5,0
113	0,8	8,7	1,6	20,3	4,3	0,9	9,4	3,1	8,6	13,3
114	0,5	2,3	1,0	16,9	2,7	0,9	3,4	2,4	7,1	6,7
115	1,9	9,6	5,2	26,3	6,0	3,7	8,4	3,8	10,6	7,2
116	1,3	6,4	1,9	33,9	5,4	2,5	8,4	2,4	15,7	13,0
117	3,2	28,0	3,6	40,7	4,8	2,5	28,4	5,5	42,8	20,0
118	100	100	2,9	40,7	6,0	5,6	7,2	6,8	30,0	16,7
119			4,6	13,6	5,7	3,1	18,1	2,8	42,8	23,3
120			100	100	100	1,2	3,4	1,4	11,4	8,3
121						0,9	10,0	2,1	5,7	0,5
122						0,6	2,2	1,0	11,4	6,7
123						0,9	25,6	4,1	12,8	8,3
124						0,3	2,2	1,0	2,8	1,7
125						0,3	4,7	0,7	4,3	3,3
126						0,3	0,9	0,7	2,8	3,3
127						0,6	6,6	2,1	4,3	5,0
128						1,2	5,0	5,2	7,1	8,3
129						1,6	23,8	7,2	21,4	15,0
130						2,2	9,7	13,8	17,1	16,7
131						2,8	13,8	19,3	17,1	15,0
132						100	100	9,0	22,8	18,3
133								3,8	12,8	20,0
134								1,0	5,7	6,7
135								2,1	11,4	5,0
136								0,7	2,8	1,7
137								2,1	8,6	11,7
138								0,7	2,8	1,7
139								1,0	2,8	1,7
140								1,0	4,3	20,0
141								2,1	5,7	5,0
142								1,4	2,8	3,3
143								1,7	8,6	5,0
144								1,0	5,7	5,0
145								3,8	12,8	13,3
146								7,9	12,8	10,0
147								100	100	100

бой полоску, вырезанную из хроматограммы перпендикулярно стартовой линии. При таком сканировании будут регистрироваться два типа масс-спектров: масс-спектры с не занятых разделенными веществами участков хроматограммы и масс-спектры с участков, на которых эти вещества находятся. Появление масс-спектра, отличающегося от спектра незанятого участка хроматограммы, свидетельствует о том, что в данном месте находится хроматографическое пятно.

Таким образом, проведенные эксперименты показывают, что масс-спектрометрия с ионизацией быстрыми атомами, позволяющая использовать для идентификации веществ, разделенных методами БХ и ТСХ, непосредственно хроматограмму, по многим параметрам — информативности масс-спектров, универсальности, высокой чувствительности — выгодно отличается от традиционных масс-спектрометрических методов.

Экспериментальная часть

Масс-спектры получены на масс-спектрометре МИ 1201, переоборудованном для вторично-эмиссионных измерений, при следующих условиях: бомбардировка мишени пучком атомов Ag с энергией 3,6 кэВ; плотность пучка $\sim 10^{11}$ атом·см⁻²·с⁻¹; температура мишени $\sim 25^\circ$ С. Мишени пред-

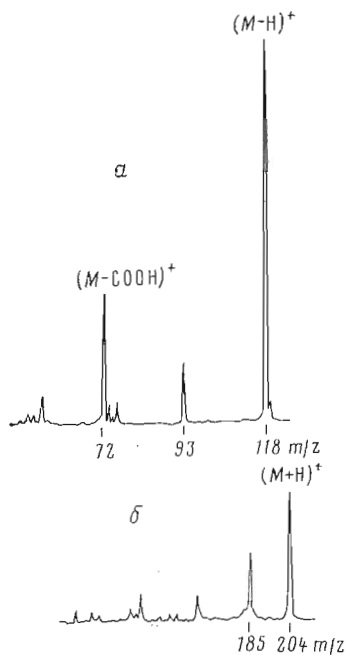


Рис. 1

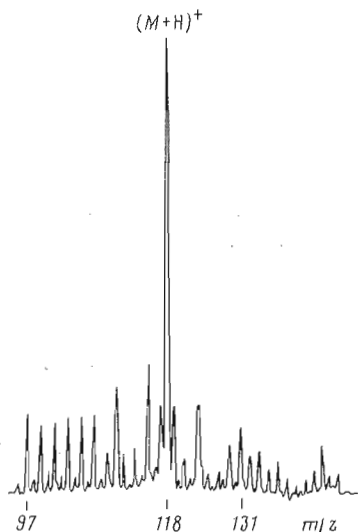


Рис. 2

Рис. 1. Масс-спектры валина (а) и аланилглицилглицина (б), полученные с соответствующих участков тонкослойной хроматограммы их смеси

Рис. 2. Участок масс-спектра валина, полученного с пятна на тонкослойной хроматограмме, содержащего $2 \cdot 10^{-6}$ г аминокислоты

ставляли собой либо закрепленные с помощью металлической пружины на подложке из нержавеющей стали полоски хроматографической бумаги, вырезанные из хроматограммы и содержащие пятна аминокислот, либо полоски с пятнами разделенных веществ, вырезанные из тонкослойной хроматограммы. Приготовленные таким способом мишени смачивали глицерином и через вакуумный шлюз вводили в ионный источник масс-спектрометра.

Хроматографирование смеси четырех аминокислот проводили на бумаге «Ватман 2» в смеси *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 6,5 : 1 : 2,5. Аминокислоты наносили в количестве 100–300 мкг в различных стартовых точках. Обнаружение веществ на контрольной хроматограмме раствором индигридина показало, что все компоненты смеси были полностью разделены, величины R_f составили для лизина 0,085, для треонина 0,20, валина 0,47, лейцина 0,63.

Тонкослойную хроматографию смеси валин — аланилглицилглицин (по 2–10 мкг) проводили на пластинках силуфол — UV₂₅₄ в смеси *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (15 : 3 : 10 : 4).

Концентрирование пятен лизина и треонина на бумажной хроматограмме проводили следующим образом: из хроматограммы, содержащей по 100 мкг каждой кислоты, вырезали два треугольника, полностью включающие в себя один — пятно лизина, а другой — пятно треонина. Затем основания треугольников помещали в воду вершиной вниз и выдерживали в таком положении до образования на ней капли. Вершины треугольников с каплями отрезали, высушивали, закрепляли на металлической подложке, смачивали глицерином и вводили в ионный источник масс-спектрометра.

ЛИТЕРАТУРА

- Down G. J., Gwyn S. A. J. Chromatogr., 1975, v. 103, № 2, p. 208–210.
- Fogy I., Allmaier G. M., Schmid E. R. Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 1983, v. 48, № 3, p. 319–322.

3. Barber M., Bordoli R. S., Elliot G. J., Sedgewick R. D., Tyler A. N. Anal. Chem., 1982, v. 54, p. 645A-657A.
4. Танцырев Г. Д., Поволоцкая М. И., Скурар В. Е. Ж. аналит. химии, 1979, т. 34, № 5, с. 964-969.
5. Танцырев Г. Д., Поволоцкая М. И., Сараев В. А. Хим. физика, 1983, № 6, с. 804-809.
6. Берлин А. Я. Техника лабораторной работы в органической химии. М.: Химия, 1973, с. 292.
7. Benninghoven A., Sichtermann W. Org. Mass Spectrom., 1977, v. 12, № 9, p. 595-597.

Поступила в редакцию
17.XI.1983

APPLICATION OF FAST ATOM BOMBARDMENT MASS SPECTROMETER
FOR IDENTIFICATION OF AMINO ACIDS AND PEPTIDES SEPARATED BY
PAPER AND THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

TANTSYREV G. D., POVOLOTSKAYA M. I., SARAIEV V. A.

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The possibility of using a fast atom bombardment (FAB) mass spectrometer as detector for thin layer and paper chromatography has been demonstrated. A part of the chromatogram containing the separated compounds is put directly into the mass spectrometer. As exemplified with amino acids, mass spectra of sputtered ions for separated compounds obtained in such a way are identical to the FAB mass spectra of the corresponding standards at conventional sample application. Minimal amount of the chromatogram-adsorbed amino acid required for registration of a characteristic mass spectrum is about 10^{-7} g.