

УДК 543.51

*В.В. Янц^{1,2}, Н.В. Головкин^{1,2}, В.В. Терехин¹, О.Н. Харыбин^{3,2},
И.А. Попов^{4,2}, Е.Н. Николаев^{4,2}*

¹ Московский физико-технический институт (государственный университет)

² Институт энергетических проблем химической физики РАН

³ Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН

⁴ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Применение десорбционно-электроспрейной ионизации для анализа лекарственных веществ и веществ биологического происхождения

Метод десорбционно-электроспрейной ионизации (ДЭСИ) был изобретён группой Грэма Кука (Graham Cooks) в 2004 году. Он основан на получении вторичных ионов, которые образуются при взаимодействии микроскопических ионизированных капель растворов, получаемых электрораспылением смеси воды и растворителя из нанометрового капилляра, обдуваемого газообразным азотом, с молекулами, находящимися на исследуемой поверхности. Образовавшиеся вторичные ионы транспортируются в масс-спектрометр через стандартный атмосферный интерфейс. Такой метод ионизации представляет интерес из-за своей простоты и удобства использования, так как в нём нет необходимости проводить пробоподготовку. В статье приводятся результаты исследований, направленных на определение возможности применения метода ДЭСИ для анализа некоторых лекарственных веществ и веществ биологического происхождения.

Ключевые слова: десорбционно-электроспрейная ионизации, вторичные ионы, электрораспыление, нанометровый капилляр, масс-спектрометр, лекарственные и биологические вещества.

I. Экспериментальная установка

Стандартная схема экспериментальной установки, реализующей метод ДЭСИ [1], приведена на рис. 1.

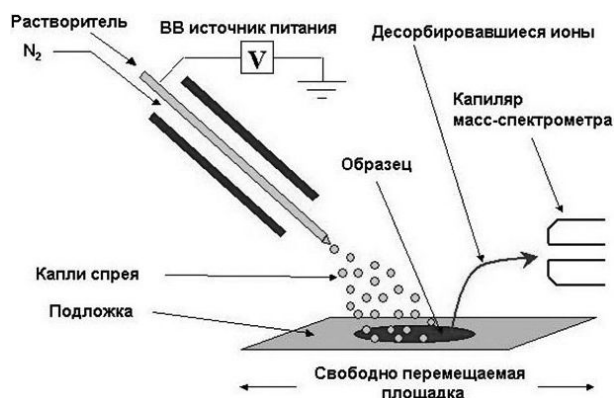


Рис. 1. Схема источника десорбционно-электроспрейной ионизации

Растворитель подаётся с помощью толкателя по капилляру, к которому приложено напряжение. С кончика капилляра

срывается поток заряженных капелек, который попадает на образец. Для образования стабильного потока используется вспомогательный нейтральный газ, обдувающий капилляр. За счёт столкновений первичных ионов (многозарядных капель) с образцом происходит экстракция исследуемого вещества, капли с экстрагируемым веществом аналита затем попадают в капилляр масс-спектрометра.

Потенциал, прикладываемый к распылительному капилляру, устанавливался в пределах 3–3,5 кВ. Температура десольвирующего капилляра 300–350 °С. Угол распыления 55–65°. Угол между образцом и входным капилляром масс-спектрометра 5–15°.

Эксперименты проводились на масс-спектрометрах Finnigan LTQ FT, Bruker Apex Qe и Finnigan LCQ DECA XP. Для использования ионизационной установки на масс-спектрометрах Bruker Apex Qe, Finnigan LCQ DECA XP нами была проведена её адаптация.

II. Экспериментальные результаты

II.1. Применение метода ДЭСИ для анализа лекарственных препаратов

На рис. 2 приведён масс-спектр лекарственного препарата Граммидин, полученный с помощью метода ДЭСИ. С высокой интенсивностью наблюдаются одно- и двухзарядные ионы основного действующего вещества (Грамицидин С, $M = 1141$ Да).

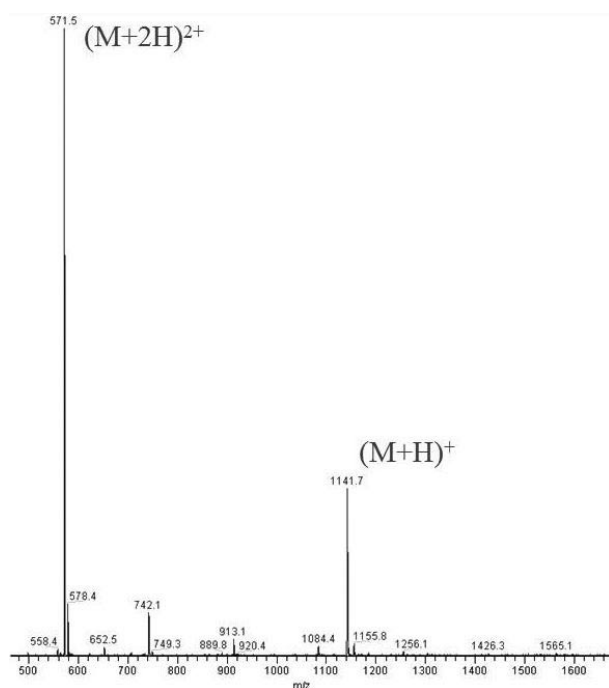


Рис. 2. Масс-спектр Граммидина. Десорбционно-электроспрейная ионизация

Было проведено сравнение метода ДЭСИ с методом электрораспылительной ионизации на этом же ИЦР масс-спектрометре.

В методе электрораспылительной ионизации [2] раствор исследуемого вещества пропускается через тонкий капилляр, к которому приложено напряжение. В результате образуются заряженные капли раствора, содержащие молекулы исследуемого вещества. Постепенное испарение растворителя из капель способствует увеличению кулоновских сил расталкивания и в момент, когда сила поверхностного натяжения и сила отталкивания ионов выравниваются, происходит распад капли на несколько капель меньшего радиуса. Этот процесс повторяется до полного испарения

растворителя и образования ионов в газовой фазе.

Разность потенциалов между распылительной иглой и входным капилляром 3,0 кВ, температура входного капилляра 300 °С.

Таблетку Граммидина растворили в водно-ацетонитрильной смеси до концентрации 1 мг/мл. Масс-спектр раствора приведён на рис. 3.

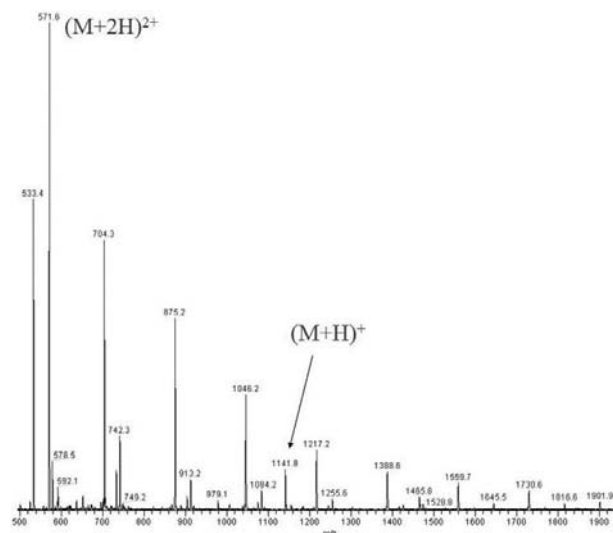


Рис. 3. Масс-спектр Граммидина. Электроспрейная ионизация

Действующее вещество здесь также представлено ($M = 571; 1141$ Да), но интенсивность однозарядного иона значительно ниже, чем в методе ДЭСИ. Помимо этого, видно, что в спектре доминируют ионы — продукты ионизации метилцеллюлозы, входящей в состав таблетки в качестве нейтрального наполнителя.

II.2. Применение метода ДЭСИ для анализа лекарственных препаратов и их метаболитов после приёма внутрь

Новой возможностью, недоступной другим методам атмосферной ионизации, является возможность прямого анализа *in vivo* биологических объектов. Метод ДЭСИ опробован нами для выяснения возможности детектирования лекарственных веществ, проникающих после приёма внутрь на кожные поверхности и в жидкости человеческого тела. Для проведения такого типа экспериментов был выбран препарат Кларитин (лоратадин) в виде таблетки. Сначала был получен масс-спектр при ионизации методом ДЭСИ самого лекарственного препарата. Таблетка

без предварительной пробоподготовки помещалась под спрей электрораспылительного источника (рис. 4). Полученный масс-спектр представлен на рис. 5а, пик максимальной интенсивности с массой 383,2 Да соответствует протонированной молекуле лоратадина — активного вещества лекарственного препарата.



Рис. 4. Разлом таблетки под спреем источника

Лекарственный препарат принимался внутрь и через два часа анализировалась поверхность пальца на наличие лоратадина. Палец пациента, заземленный специальным медным кольцом, подносился под спрей источника. После оптимизации параметров настроек источника и параметров эксперимента был получен масс-спектр с четко выраженным пиком активного вещества лоратадина (рис. 5б).

Для проведения проверки наличия активного вещества лекарственного препарата или его метаболитов в моче была выбрана обычная ацетилсалициловая кислота в виде таблетки. Сначала был получен масс-спектр непосредственно лекарственного препарата. Для этого без предварительной пробоподготовки таблетка помещалась под спрей электрораспылительного источника (рис. 4). Полученный масс-спектр представлен на рис. 6а.

Через час после приёма таблетки ацетилсалициловой кислоты внутрь была взята проба мочи. Для проведения анализа образец предварительно не подготавливался, им смачивалась ватная палочка и, не дожидаясь высыхания, она подносилась под спрей электрораспылительного источника. Полученный масс-спектр представлен на рис. 6б.

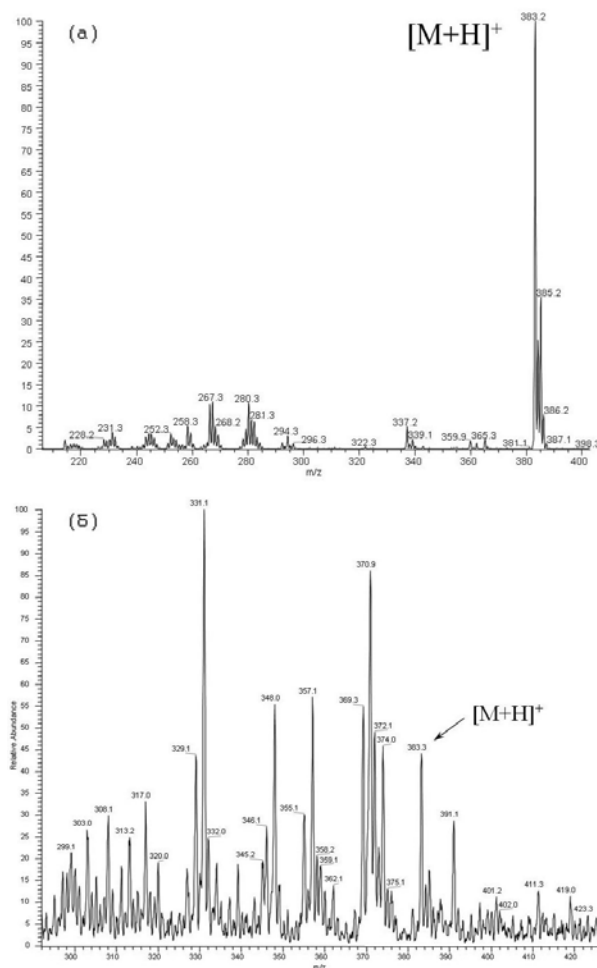


Рис. 5. Масс-спектры (а) таблетки Кларитин (лоратадин); (б) продуктов ионизации методом ДЕСИ поверхности пальца после приёма препарата

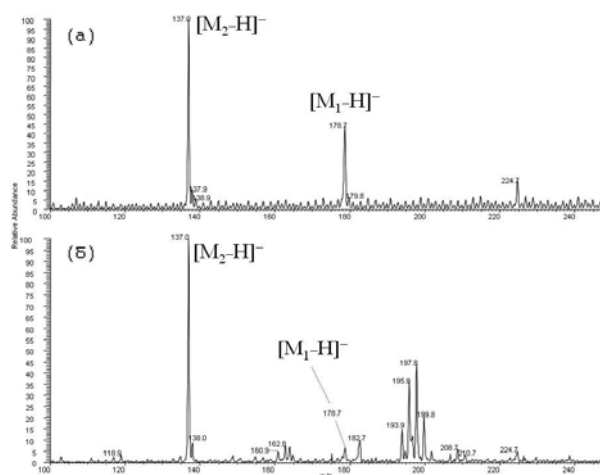


Рис. 6. Масс-спектры (а) таблетки ацетилсалициловой кислоты; (б) мочи после приёма препарата (M_1 — ацетилсалициловая кислота, M_2 — салициловая кислота)

На масс-спектрах хорошо видно, что пики, присутствующие в спектре самого препарата, присутствуют и в масс-спектре образца мочи.

Из результатов проведённых экспериментов видно, что масс-спектрометрия с десорбционно-электроспрейной ионизацией позволяет детектировать и идентифицировать лекарственные препараты и их метаболиты *in vivo*.

II.3. Применение метода ДЭСИ для анализа срезов тканей

В настоящее время для построения масс-спектрометрических изображений срезов тканей наиболее часто применяются методы SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) [3] и MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) [4]. В методе SIMS исследуемая поверхность бомбардируется пучком одно- или многоатомных ионов, обладающих энергией 5–25 кэВ. В результате этого с поверхности десорбируются заряженные и нейтральные частицы: атомы, кластеры атомов и молекулярные фрагменты. Эти заряженные частицы (вторичные ионы) транспортируются в масс-спектрометр для дальнейшего анализа. Из-за того, что энергия ионов в первичном пучке значительно (на 3–4 порядка) превосходит энергию связи в биоорганических соединениях, молекулы исследуемого вещества сильно фрагментируются. Плюсами этого метода являются возможность проводить построение масс-спектрометрического изображения с пространственным разрешением меньше микрона и высокой чувствительностью.

В методе MALDI исследуются ионы, получаемые в результате облучения лазером исследуемой поверхности. Впервые применение матрицы для увеличения выхода ионов при лазерном облучении было описано группой Хилленкампа [4] в 1985 году. Ими был измерен спектр смеси Аланина и Триптофана. Группа Танаки [5] показала спектры полимеров и протеинов массами до 100 кДа, используя металлическую пыль в качестве матрицы. Хотя метод и был открыт более 20 лет назад, точный механизм десорбции/ионизации не исследован до конца.

MALDI успешно используется для анализа распределения пептидов, протеинов, олигонуклеотидов и углеводов в тканях. Перед проведением опыта, на ткань наносится матрица, после чего проводится

сушка до образования кристаллов. Матрицей обычно является низкомолекулярная органическая молекула, которая хорошо поглощает лазерное излучение на выбранной длине волны. Пробоподготовка играет ключевую роль в данном методе ионизации. Для получения наилучшего сигнала необходимо равномерное покрытие всего образца матрицей. Разрешающая способность данного метода на порядок хуже, чем SIMS, но MALDI позволяет проводить мягкую ионизацию, получая масс-спектры интактных пептидов и протеинов.

Прежде чем провести эксперименты по ионизации тканей методом ДЭСИ, были выполнены эксперименты по ионизации этим методом веществ, присутствующих в тканях, *in vitro*. Для примера были взяты липиды. Раствор сфингомиелина наносился на стекло и после высыхания проводился анализ. При оптимизации параметров эксперимента было выяснено, что для получения удовлетворительной интенсивности сигнала необходимо распылять раствор с высоким процентным содержанием растворителя ($H_2O : MeOH = 1 : 8$), так как липиды плохо растворимы в воде, но хорошо растворимы с органических растворителях. В результате был получен масс-спектр, на котором присутствует пик сфингомиелина (рис. 7).

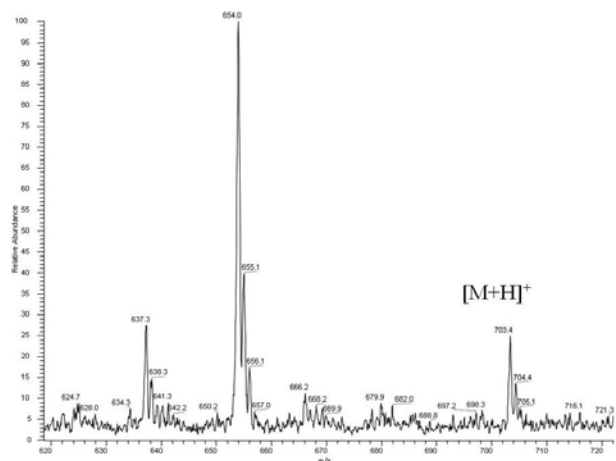


Рис. 7. Масс-спектр сфингомиелина

Таким же методом был проведён анализ смеси липидов, состоящей из диолеилфосфатидилсерина, сфингомиелина и холестерина. На полученном масс-спектре также присутствовал пик сфингомиелина, пики других липидов на спектре не присутствовали, видимо, из-за того, что они хорошо образуют комплексы, так как наи-

более интенсивные пики были в области больших масс (более 1000 Да) (рис. 8).

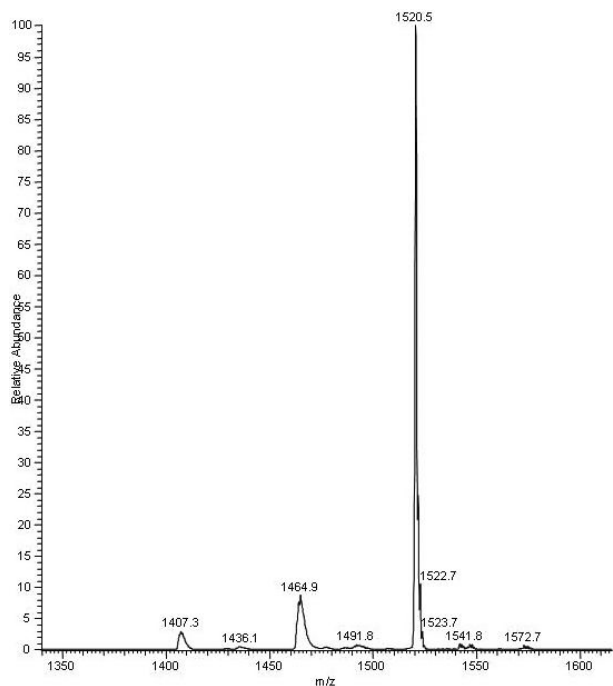


Рис. 8. Масс-спектр комплексов образовавшихся в смеси липидов

Из приведённых результатов следует, что метод ДЭСИ удовлетворительно работает с биологическими веществами, входящими в состав клеточных мембран.

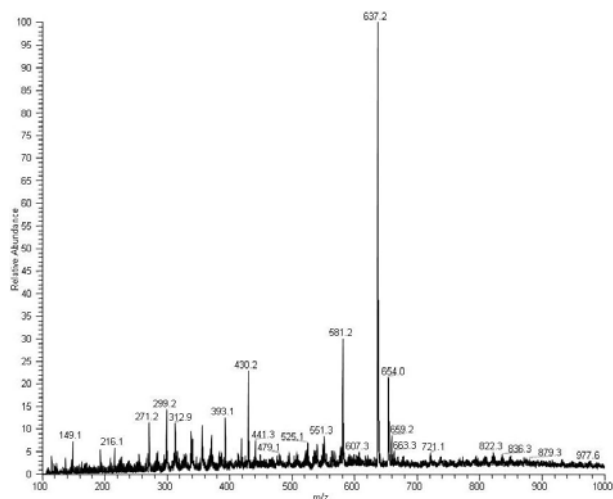


Рис. 9. Масс-спектр среза раковой ткани

Далее были проведены эксперименты со срезами тканей. В качестве образца взяли срезы раковых тканей кишечника толщиной 50 мкм, которые наносились на стеклянную подложку. Были получены первые масс-спектры (рис. 9), на которых присутствуют стабильные пики с постоянной интенсивностью, которые в дальнейшем могут помочь охарактеризовать ткань.

III. Выводы

Была продемонстрирована возможность применения метода десорбционного электроспрея для прямого анализа лекарственных средств и их детектирования и идентификации на поверхности кожи и жидкостях человеческого тела. Проведён анализ факторов, влияющих на чувствительность метода. Установлено, что важным параметром является давление вспомогательного газа (при значениях менее 5–6 атмосфер нарушается стабильность спрея и регистрация сигнала усложняется), температура капилляра (максимум интенсивности сигнала достигается при 350–400 °С, но при этом ионы некоторых веществ могут диссоциировать), разность потенциалов между распылительной иглой и капилляром. Угол распыления, при котором достигался сигнал максимальной интенсивности, был равен 55–65°.

Уровень сигнала достаточен для проведения MS/MS.

Экспериментально показано наличие дискриминации по десорбционной способности в этом методе в отличие от электрораспылительной ионизации.

Получен масс-спектр веществ на поверхности кожи после приёма внутрь лекарственного препарата кларитин (лоратадин), получен масс-спектр мочи после приёма внутрь ацетилсалициловой кислоты. Проведённые эксперименты показали, что масс-спектрометрия с десорбционно-электроспрейной ионизацией даёт удовлетворительные результаты при её использовании для определения присутствия активных веществ лекарственных препаратов или их метаболитов в коже или моче после приёма таблетки внутрь, причём, не требуется никакой предварительной пробоподготовки.

Начата работа со срезами тканей человеческого организма. Получены первые масс-спектры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takáts Z., Wiseman J.M., Gologan B., Cooks R.G. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization // Science. — 2004. — V. 306, N. 5695. — P. 471–473.
2. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. Electrospray

ionization for mass spectrometry of large biomolecules // *Science*. — 1989. — V. 246, I. 4926. — P. 64–71.

3. *Todd P.J., McMahon J.M., Short R.T., McCandlish C.A.* Organic SIMS of biologic tissue // *Anal. Chem.* — 1997. — V. 69, N. 17. — P. 529A-535A.

4. *Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F.* Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption

Mass Spectrometry of Organic Molecules // *Anal. Chem.* — 1985. — V. 57. — P. 2935–2939.

5. *Tanaka K., et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 1988. — V. 2, I. 8. — P. 151–153.

Поступила в редакцию 30.01.2008.