
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ.

ПРИБОРЫ

УДК 621.384.668.8 + 543.544

© И. А. Краснов, Е. П. Подольская, М. З. Мурадымов, М. В. Апацкая,
Я. И. Лютвинский, С. В. Фиронов, А. В. Витин, К. А. Беляев, Д. И. Корнев,
А. А. Каюмов, А. В. Подтележников, Л. Н. Галль, Н. В. Краснов

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ВВОДА НАНОКОЛИЧЕСТВ
ПРОБЫ В МАСС-СПЕКТРОМЕТР**

Настоящая работа посвящена разработке отечественной nano-LC-MS аналитической системы. Основными функциональными блоками такой системы являются: хроматографическая установка на основе HPLC микроколоночной технологии, блок ионизации nano-ESI и времяпролетный анализатор (TOF). Реализована данная система на базе отечественного масс-спектрометра MX-5310 (ИАНП РАН). В статье представлены результаты исследования полученной экспериментальной установки, а также проведено сравнение основных параметров с параметрами отечественных ЖХ-МС установок. Полученная установка позволяет работать с нанокolicествами исходного материала. В разработанной системе хроматографическая капиллярная колонка непосредственно используется в качестве наноэмиттера, что приводит к уменьшению количества приборных узлов и снижает неизбежные потери анализируемых образцов. Система ввода установки отличается простотой исполнения, очень экономична в использовании растворителей и других расходных материалов.

ВВЕДЕНИЕ

За последние 15 лет масс-спектрометрия стала мощным и удобным методом анализа макромолекул и биологических веществ [1–3].

Минимизация внутреннего диаметра распылительной иглы привела к появлению micro- и nano-ESI-источников, которые позволяют работать со скоростью потока в несколько десятков нанолитров в минуту. Nano-ESI — усовершенствованный метод распыления небольших количеств образцов низкой концентрации (наномоль/мл). Метод обладает повышенной толерантностью к высокоакватированным растворам и солевым загрязнениям [4, 5]. Спектры могут быть получены из пикограмма образца, при этом не требуется специальной очистки. Переход от обычного ESI-MS к nano-ESI-MS повысил чувствительность анализа до аттомолей при идентификации белка при скоростях потока 1–4 нл/мин [4]. Повышение чувствительности и уменьшение количества анализируемого вещества считаются важнейшими преимуществами nano-ESI-источника.

Особого внимания заслуживает то, что основной проблемой, стоящей перед исследователями, является малое количество анализируемого вещества, поскольку количество пробы, особенно полученной из биологического материала, ограничено и зачастую не превышает нескольких пикомолей, причем количество компонент, содержащихся в образце, может составлять тысячи и десятки тысяч. Решением этой проблемы становится сочетание нанохроматографа с масс-спектрометром,

снабженным nano-ESI источником ионизации. В настоящее время существуют решения по созданию комплексов nano-LC-ESI-MS как в нашей стране, так и за рубежом [7–10]. Эти комплексы оказываются либо слишком дороги, особенно в таких расходных материалах, как хроматографические колонки, либо обладают рядом недостатков, к которым относятся размывание пробы после элюирования ее с колонки и высокая скорость потока (100–150 мкл/мин), требуемая для успешного хроматографического анализа, но усложняющая работу источника ESI.

На сегодняшний день единственным отечественным комплексом, сочетающим жидкостной хроматограф и масс-спектрометр, снабженный источником ионов ESI, является тандем Милихром А02 (Институт хроматографии, Новосибирск)—MX-5310 (ИАНП РАН, СПб.). Данный комплекс позволяет успешно анализировать сложные смеси при условии, что в пробе содержится примерно 200 пМ анализируемого вещества, при этом минимальная скорость потока элюента, обеспечивающая эффективное разделение соединений, составляет 150 мкл/мин. Для того чтобы получить качественное распыление такого потока требуется нагрев спутного газа в источнике ионов до 150 °С. Все перечисленное значительно усложняет процедуру анализа и не позволяет проводить анализ образцов, содержащих единицы пМ соединений.

Таким образом, возникает необходимость создания отечественного комплекса nano-LC-nano-ESI-MS, который позволял бы эффективно проводить анализ сложных биологических проб, отли-

чался простотой в использовании и был экономичен в расходных материалах.

Решение данной задачи может быть реализовано путем создания системы ввода пробы, которая обладала бы следующими преимуществами:

- 1) проведение анализа как в режиме хроматографирования, так и в изократическом режиме;
- 2) возможность проведения анализа при содержании в образце 1–5 пМ анализируемого вещества;
- 3) снижение скорости потока до 100–200 нл/мин;
- 4) отсутствие нагрева и спутного газа;
- 5) отсутствие узла, приводящего к размыванию пробы.

Аналитическая система ввода нанокolicеств проб (АСВНП) предназначена для внедрения уникальной отечественной технологии анализа нанокolicеств образцов, имеющих биологическое происхождение, в рамках исследований, посвященных молекулярно-биологическим и физиолого-биохимическим процессам в живых системах. АСВНП представляет собой сочетание нанохроматографической системы, метода ионизации nano-ESI и времяпролетного анализатора

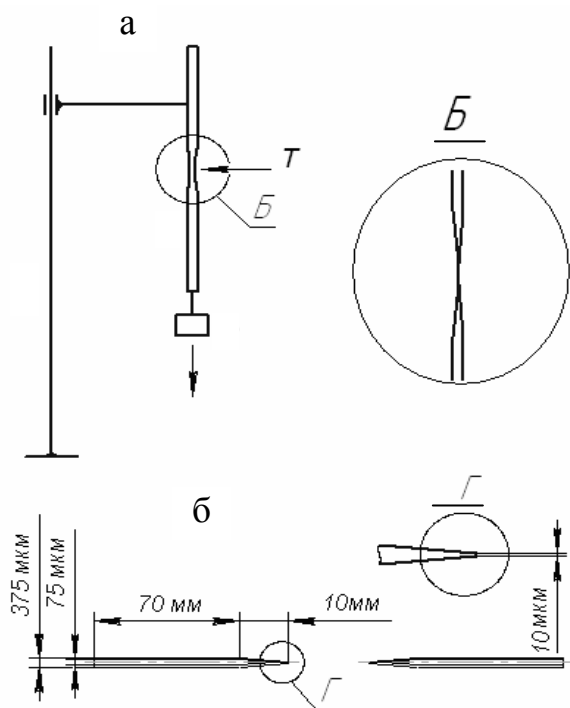


Рис. 1. Схема установки для получения капилляров с оттянутым носиком.
а — общая схема установки: капилляр с вытягивающим грузом в штативе под воздействием пламени газовой горелки Т; б — капилляр

(АСВНП-nano-ESI-TOF), при котором хроматографическая колонка непосредственно используется в роли наноэмиттера, а сама система полностью удовлетворяет вышеперечисленным параметрам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Насадочные колонки получали набивкой кварцевых капилляров (TSP075375, Polimicro Technologies) с ID = 75 мкм и OD = 375 мкм готовым коммерческим сорбентом Zorbax C18 (размер частиц 5–9 мкм в диаметре). Для удерживания сорбента в колонках применялось вытягивание конца капилляра под воздействием высокой температуры (рис. 1). Контроль диаметра выходящего отверстия колонки (рис. 1, б) проводился с помощью микроскопа, и этот диаметр был не более 3 мкм. Перед использованием сорбент промывали 3 раза

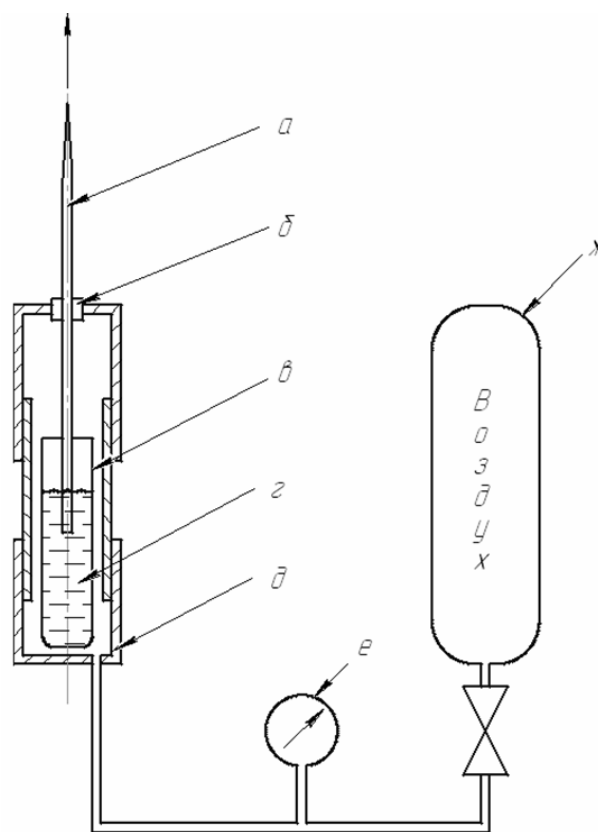


Рис. 2. Схема установки для набивки колонок гранулированным сорбентом.
а — капилляр, подготовленный для набивки гранулированным сорбентом; б — уплотнитель; в — виала, г — взвесь гранулированного сорбента (Zorbax C18) в 50% ацетонитриле; д — корпус установки для набивки капилляров; е — манометр; ж — баллон со сжатым воздухом

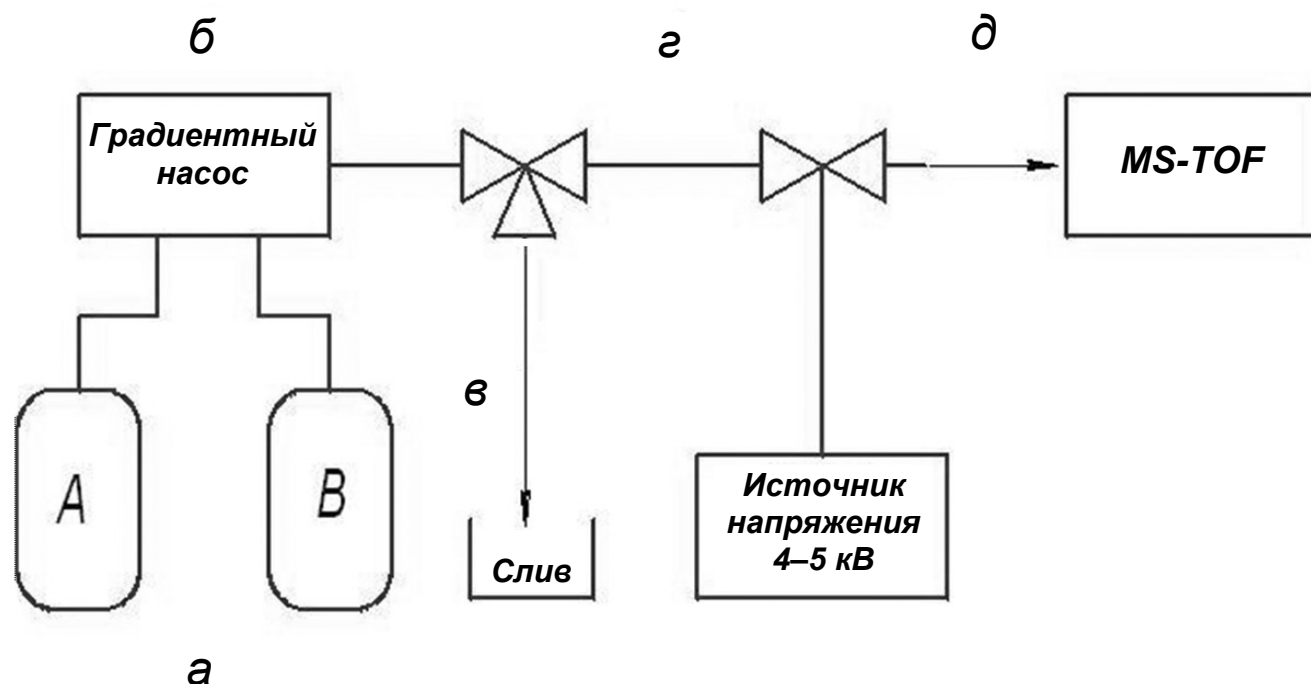


Рис. 3. Общая схема системы ввода нанокolicества пробы (АСВНП) в масс-спектрометр MX-5310.

а — растворители (А, В); **б** — насос; **в** — капилляр слива избытка растворителя; **г** — капилляр ввода образца в хроматографическую колонку; **д** — распыление пробы на входе масс-спектрометра

смесью вода—ацетонитрил (50:50) для удаления частиц менее 5 мкм. Набивка колонки проводилась в специально сконструированной установке (рис. 2). Установка представляет собой металлическую емкость, в которую подводился воздух под давлением 2 МПа. В это устройство помещалась виала, содержащая взвесь сорбента в 50 % растворе ацетонитрила в воде. Капилляр погружался входным концом в виалу с взвесью сорбента, с помощью специального уплотнителя (РЕАК) колонка зажималась в выходящем отверстии устройства. Под действием высокого давления жидкость с сорбентом поступала через колонку во вне установки, при этом частицы сорбента задерживались вытянутой частью капилляра, происходила набивка колонки. Далее полученная насадочная колонка промывалась 50 %-м раствором ацетонитрила в воде в течение 30 минут при скорости потока 200 мкл/мин и устанавливалась в систему ввода пробы в масс-спектрометр MX-5310 (рис. 3).

Система ввода пробы состоит из резервуаров (а) растворителей (в качестве подвижной фазы использовались А — 0.25 % HCOOH в воде и В — 0.25 % HCOOH в ацетонитриле); градиентного насоса (б) со скоростью подачи растворителя 10 мкл/мин; капилляра для отвода избыточного

потока растворителя (в); капилляра объемом 0.4 мкл для ввода образца в систему (г), заполненного на устройстве для заполнения колонок (в виалу вместо взвеси сорбента помещали образец) и полученной микроколонки (д) (рис. 1, б). Подведение напряжения порядка 4 кВ прямо в растворитель, подаваемый на колонку, обеспечивало распыление с эмиттера колонки на сопло масс-спектрометра MX-5310.

Модельный хромато-масс-спектрометрический анализ проводили как с использованием описанной установки (АСВНП—MX-5310), так и с использованием комплекса Милихром А02—MX-5310. В качестве модельного объекта исследования был выбран триптический гидролизат БСА [8]. Количество наносимого на колонки гидролизата составило 200 пМ для комплекса Милихром А02—MX-5310 и 1.8 пМ для комплекса АСВНП—MX-5310. При использовании комплекса АСВНП—MX-5310 спутный газ не подавался.

Анализ проводился в течение 10 мин в паре растворителей ацетонитрил—вода с линейным увеличением концентрации ацетонитрила в элюенте с 0 % до 70 %.

Спектры регистрировались с интервалом в 1 с в течение всего процесса хроматографирования.

Управление настройками и запись данных с масс-спектрометров проводили с помощью программы TOF control. Масс-спектры записывали с помощью программы TOF+ (программы разработаны в Лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии ИАНП РАН [13, 16]). При этом регистрировалась величина общего ионного тока в зависимости от времени. Полученный график рассматривается как хроматограмма (зависимость интенсивности общего ионного тока от времени).

Обработку спектров проводили при помощи программного обеспечения TOF explorer v.0.2 (ИАНП РАН). После определения центра масс масс-спектрометрических пиков к полученным данным был применен алгоритм разрешения зарядных и изотопных распределений IPeX (ИАНП РАН). Полученный список моноизотопных масс составляющих пробы был экспортирован в Excel для последующей интерпретации.

Поиск в базе SwisProt [11] осуществляли с помощью программного комплекса MASCOT [10] (Matrix Science, Великобритания), при этом использовали следующие параметры поиска: точность определения массы 50 ppm, возможные модификации — окисление метионина. Качество

проведенного масс-спектрометрического анализа оценивали по степени идентификации БСА методом PMF (Peptide Mass Fingerprint) [9], являющимся наиболее распространенным при идентификации белков. Как критерии рассматривались следующие параметры:

- количество обнаруженных пептидов, принадлежащих БСА;
- процент перекрывания аминокислотной последовательности;
- достоверность идентификации (Score);

Для выяснения качества проведения хроматографического анализа по полученным хроматограммам были определены параметры хроматографических пиков отдельных пептидов, такие как времена удерживания пептидов (t_r), ширина пиков на полувысоте (W_h). Из их значений было рассчитано число теоретических тарелок (ЧТТ) и высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), для капиллярной колонки [12, 13]:

$$N = 5.45(t_r / W_h)^2,$$

где N — число теоретических тарелок (ЧТТ), определенное для конкретного соединения;

Табл. 1. Результаты по идентификации БСА после обработки данных LC-MS-анализа

АСВНП—MX-5310	Минихром A02—MX-5310
<p>Probability Based Mowse Score Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 60 are significant ($p < 0.05$).</p> <p>1. <u>ALBU BOVIN</u> Mass: 71244 Score: 197 Expect: 1.2e-15 Queries matched: 41 <u>Serum albumin precursor - Bos taurus (Bovine)</u> Number of mass values matched: 41 Sequence Coverage: 71%</p> <pre> 1 MKWVTFISLL LFFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLI A 51 FSQYLQCCPF DEHVKLVNEL TEFKTKCVAD ESHAGCEKSL HILFGDELCK 101 VASLRETYGD MADCCKEQEP ERNECFLSHK DDSPDLPLK PDPNTLCDEF 151 KADEKKFVGK YLYEYARRHP YFYAPELILY ANKYNQVQEQ CCQAEKDGAC 201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCSAIQKFG ERALKAWVA RLSQKFPKAE 251 FVEVTKLVD LTRVHKCCCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLE 301 CDRPFLLEKS HCLAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAQDAFL 351 GSFLEYYSRR HPEYAVSVLL RLAKYEYATL EECCAKDDPH ACYSTVFDKL 401 KHLVDEPQNL IKQNCQFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPILVEVS 451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVIKCC 501 TESLVNRRPC FSNLTPDETY VPKAFDEKLF TEHADICTLP DTEKQIKKQT 551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENVAVFDK CCAADKREAC FAVEGPKLVV 601 STQTALA </pre>	<p>Probability Based Mowse Score Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 60 are significant ($p < 0.05$).</p> <p>1. <u>ALBU BOVIN</u> Mass: 71244 Score: 114 Expect: 2.5e-07 Queries matched: 44 <u>Serum albumin precursor - Bos taurus (Bovine)</u> Number of mass values matched: 40 Sequence Coverage: 67%</p> <pre> 1 MKWVTFISLL LFFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLI A 51 FSQYLQCCPF DEHVKLVNEL TEFKTKCVAD ESHAGCEKSL HILFGDELCK 101 VASLRETYGD MADCCKEQEP ERNECFLSHK DDSPDLPLK PDPNTLCDEF 151 KADEKKFVGK YLYEYARRHP YFYAPELILY ANKYNQVQEQ CCQAEKDGAC 201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCSAIQKFG ERALKAWVA RLSQKFPKAE 251 FVEVTKLVD LTRVHKCCCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLE 301 CDRPFLLEKS HCLAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAQDAFL 351 GSFLEYYSRR HPEYAVSVLL RLAKYEYATL EECCAKDDPH ACYSTVFDKL 401 KHLVDEPQNL IKQNCQFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPILVEVS 451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVIKCC 501 TESLVNRRPC FSNLTPDETY VPKAFDEKLF TEHADICTLP DTEKQIKKQT 551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENVAVFDK CCAADKREAC FAVEGPKLVV 601 STQTALA </pre>

$$H = L / N,$$

где H — высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ); L — длина колонки.

Полученные величины усреднялись и нормализовались:

$$N_{\text{ср}} = \left(\sum_1^i N_i / n \right),$$

где N_i — ЧТТ для каждого отдельного соединения;

n — число соединений;

$$N^* = 100 N / L,$$

где N^* — приведенное ЧТТ для колонки длиной в 1 м.

Эти данные сравнивались с данными стандартных колонок HPLC с обращенной фазой. В частности, сравнение проводилось с колонками Pronto-sil 120-5C18 (2/75 мм, зернение сорбента 5мкм), поставляющимися к хроматографу Милихром А02.

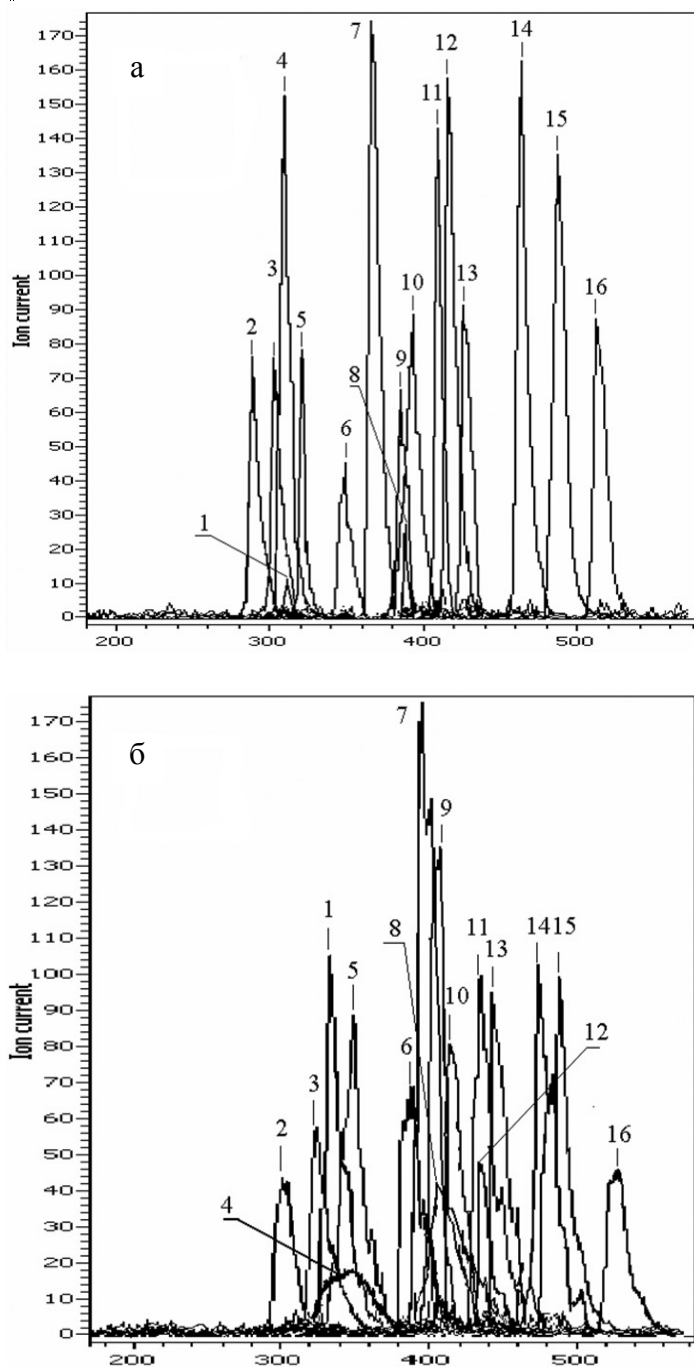


Рис. 4. Хроматограммы пептидов, принадлежащих БСА.

а — комплекс АСВНП—масс-спектрометр МХ-5310.

б — тандем Милихром А02—масс-спектрометр МХ-5310.

Пептиды, соответствующие хроматографическим пикам, представлены в табл. 2

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для выяснения основных параметров полученных капиллярных колонок, входящих в состав системы ввода нанокolicества пробы, был проведен тестовый хромато-масс-спектрометрический анализ смеси триптических пептидов альбумина при помощи комплексов АСВНП—МХ-5310 и Милихром А02—МХ-5310. В первую очередь проводилось сравнение полученных масс-спектрометрических данных по критериям, перечисленным выше. Результаты представлены в табл. 1. Как показано в таблице, качество анализа, проведенного с помощью комплекса АСВНП—МХ-5310 превышает качество анализа на комплексе Милихром А02—МХ-5310 по всем критериям, и особенно в надежности идентификации. Затем из числа пептидов, отнесенных к БСА, были выбраны те,

которые надежно воспроизвелись в обоих экспериментах. Из хроматограммы общего ионного тока были выделены пики, соответствующие выходу каждого выбранного пептида (рис. 4, табл. 2), и затем для каждого пика рассчитывались основные характеристики используемых колонок (табл. 3).

По результатам, представленным в табл. 3, видно, что при применении капиллярной колонки полуширина пиков уменьшается в среднем в 2 раза, соответственно во столько же повышается эффективность колонки для каждого пептида. Высота, эквивалентная теоретической тарелке, для капиллярной колонки составила 2.7 мкм, для Prontosil 120-5C18 — 13 мкм. Приведенные эффективности составили $2.8 \cdot 10^5$ и $0.7 \cdot 10^5$ ЧТТ/м для капиллярной колонки и Prontosil 120-5C18 соответственно (табл. 4).

Табл. 2. Общие идентифицированные пептиды сывороточного альбумина быка и времена их удерживания

№ пика	Время удерживания t_r , с		Молекулярная масса, Да	Аминокислотная последовательность
	Милихром А02	АСВНП		
1	338	281	688.3656	AWSVAR
2	307	312	1462.5817	TCVADESHAGCEK
3	332	305	1531.7738	LKECCDKPLLEK
4	348	310	1442.6347	YICDNQDTISSK
5	359	321	1248.6139	FKDLGEEHFK
6	387	352	1001.5757	LVVSTQTALA
7	398	365	1304.7088	HLVDEPQNLIK
8	407	389	926.4861	YLYEIAR
9	405	382	1638.9305	KVPQVSTPTLVEVSR
10	414	393	1438.8045	RHPEYAVSVLLR
11	434	411	1141.7070	KQTALVELLK
12	435	422	1418.6864	SLHTLFGDELCK
13	442	431	1162.6234	LVNELTEFAK
14	480	464	1478.7881	LGEYGFQNALIVR
15	492	489	1723.8273	MPCTEDYLSLILNR
16	530	520	2491.2570	GLVLIAFSQYLQPCPFDEHVK

Табл. 3. Числа теоретических тарелок для набивной капиллярной колонки и колонки Prontosil 120-5C18, определенные по отдельным пикам

№ пика	АСВНП—МХ-5310 (набивная капиллярная колонка)				Миличром А02—МХ-5310 (колонка Prontosil 120-5C18)			
	$t_{r,c}$	$W_{h,c}$	ЧТТ	ЧТТ _{ср.}	$t_{r,c}$	$W_{h,c}$	ЧТТ	ЧТТ _{ср.}
1	281	7	8782.397	13812.3	338	10	6226.298	5363.51
2	312	7	10827.04		307	14	2620.699	
3	305	7	10346.66		332	12	4171.672	
4	310	8	8183.516		348	32	644.5477	
5	321	7	11460.68		359	15	3121.784	
6	352	8	10551.2		387	14	4164.495	
7	365	8	11344.94		398	14	4404.601	
8	389	7	16830.6		407	24	1567.339	
9	382	8	12426.34		405	12	6207.891	
10	393	8	13152.3		414	12	6486.863	
11	411	8	14384.68		434	12	7128.751	
12	422	8	15164.97		435	9	12731.81	
13	431	8	15818.71		442	11	8799.453	
14	464	8	18333.8		480	14	6406.531	
15	489	8	20362.65		492	16	5153.316	
16	520	8	23026.25		530	16	5980.098	

Как известно, коэффициент разбавления в жидкостной хроматографии пропорционален длине колонки и квадрату ее диаметра. Для капиллярной колонки в связи с уменьшением ее диаметра концентрация компонента возрастает, что соответственно приводит к увеличению чувствительности обнаружения: концентрация определяемого компонента в максимуме пика примерно в 100 раз больше, чем для обычных колонок HPLC [19, 20]. При этом в новой системе практически автоматически происходит удаление мертвой зоны, всегда существующей в хроматографической системе, а также имеет место уменьшение времени анализа и как следствие — значительное уменьшение ширины пиков и увеличения разрешающей способности системы. Все перечисленные достоинства новой системы ввода пробы имеют особое значение при анализе сложных смесей биополимеров. К тому же наряду с набитой колонкой может быть также использован незаполненный капилляр, что позволяет проводить анализ в изократическом режиме без сложных манипуляций по отключению

хроматографа. И наконец, при использовании для анализа новой системы ввода пробы исчезает потребность в напуске спутного газа даже при распылении водных растворов образцов.

Таким образом, резюмируем.

1. Разработана новая система ввода нанокolicества пробы с набивной капиллярной колонкой (АСВНП), существенно расширяющая возможности уникального российского времяпролетного масс-спектрометра МХ-5310 при анализе биологических проб.

2. Система ввода отличается простотой исполнения, очень экономична в использовании растворителей и других расходных материалов, не нуждается в дополнительной системе поддува спутного газа для стабилизации распыления.

3. В разработанной системе непосредственно хроматографическая капиллярная колонка используется в качестве наноэмиттера, что приводит к уменьшению количества приборных узлов и снижает неизбежные потери анализируемых образцов.

Табл. 4. Сравнительные характеристики систем Милихром А02—МХ-5310 (колонка ProntoSil 120-5С18) и АСВНП—МХ-5310 (набивная капиллярная колонка)

Характеристики	Милихром А02—МХ-5310 (колонка ProntoSil 120-5С18)	АСВНП—МХ-5310 (набивная капиллярная колонка)
Объем пробы	50 мкл	0.4 мкл
Количество вещества, содержащегося в пробе	200 пМ	1.8 пМ
Скорость потока подвижной фазы	150 мкл/мин	~100–200 нл/мин
Нагрев спутного газа	Требуется	Спутный газ не используется
ЧТТ _{ср.} колонки	5363.51	13812.3
Высота, эквивалентная теоретической тарелке	13 мкм	2.7 мкм
Приведенная эффективность колонки	$0.7 \cdot 10^5$ ЧТТ/м	$2.8 \cdot 10^5$ ЧТТ/м
Коммерческие преимущества	Возможность приобрести коммерческий готовый продукт	1) возможность изготавливать колонки в ходе работы; 2) невысокие траты на расходные материалы

4. Хроматографические параметры капиллярной колонки превышают параметры отечественных колонок, используемых в современной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

5. Использование АСВНП при масс-спектрометрическом анализе позволяет значительно повысить качество получаемых результатов.

6. Использование АСВНП позволяет решить задачу анализа сверхмалых проб (пикоколичеств веществ), характерных для реальных задач работы с материалом, выделяемым из биологического сырья.

7. Система АСВНП легко тиражируется и может быть использована в масс-спектрометрах других типов аналогичного назначения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров М.Л., Галь Л.Н., Веренчиков А.Н., Краснов Н.В., Шкуров В.А. Исследование механизма образования катионов в масс-спектрометрии ЭРИАД // Научное приборостроение. 1991. № 2. С. 2–36.
2. Веренчиков А.Н., Краснов Н.В., Мурадымов М.З., Хасин Ю.И. Современное состояние приборов времяпролетной масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2001. Т. 11, № 3. С. 45–54.
3. Aebersold R., Mann M. Mass Spectrometry-Based Proteomics // Nature. 2003. V. 422, N 6928. P. 198–207.
4. Verentchikov A.N., Ens W., Standing K.G. Reflecting Time-of-Flight Mass Spectrometer with Electrospray Ion Source and Orthogonal Extraction // Anal. Chem. 1994. V. 66, N 1. P. 126–133.
5. Przybylski M., Glocker M. Electrospray // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1996. V. 35, N 8. P. 806–826.
6. Ramanathan R., Zhong R., Blumenkrantz N., Chowdhury S.K., Alton K.B. Response Normalized Liquid Chromatography Nanospray Ioniza-

- tion Mass Spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007. V. 18, N 10. P. 1891–1899.
7. *Lottspeich F.* Proteome Analysis: a Pathway to the Functional Analysis of Proteins // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1999. V. 38. P. 2476–2492.
 8. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* Mass Spectrometric Sequencing of Proteins Silver-Stained Polyacrylamide Gels // *Anal. Chem.* 1996. V. 68, N 5. P. 850–858.
 9. *Pappin D.J., Hojrup P., Bleasby A.J.* Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting // *Curr. Biol.* 1993. V. 3, N 6. P. 327–332.
 10. *Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S.* Probability-Based Protein Identification by Searching Sequence Databases Using Mass Spectrometry Data // *Electrophoresis.* 1999. V. 20, N 18. P. 3551–3567.
 11. *Bairoch A., Apweiler R.* The SWISS-PROT Protein Sequence Database and Its Supplement TrEMBL in 2000 // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28, N 1. P. 45–48.
 12. *Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В. и др.* Прямая стыковка микроколоночного жидкостного хроматографа с масс-спектрометром // *Биоорганическая химия.* 1984. Т. 10, № 5. С. 710–712.
 13. *Макаров В.В., Самокиш А.В., Лютвинский Я.И.* Метод извлечения значимой информации из масс-спектров пептидов // *Научное приборостроение.* 2004. Т. 14, № 2. С. 96–104.
 14. *Назимов И.В., Корчажникова М.Н., Русанов В.А. и др.* Аналитическая биотехнология генноинженерных лекарственных препаратов пептидной природы (инсулина человека, гормон роста человека) // *Тезисы докладов II-го Российского симпозиума по химии и биологии пептидов.* С.-Петербург, 2005. С. 95.
 15. *Назимов И.В., Веренчиков А.Н., Оксененко П.А., Новиков А.В., Краснов Н.В.* Использование тандема микроколоночный жидкостный хроматограф—масс-спектрометр в режиме on-line для контроля состава лекарственных средств // *2-я Всероссийская конференция "Аналитические приборы".* С.-Петербург, 2005.
 16. *Петров Д.М.* Способы унифицированного управления системами регистрации время-пролетного масс-спектрометра // *Научное приборостроение.* 2004. Т. 14, № 2. С. 92–103.
 17. *Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г.* Капиллярная жидкостная хроматография. Л.: Наука, 1987. 207 с.
 18. *Рудаков О.Б. и др.* Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж: Водолей, 2004. 528 с.
 19. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию / Под ред. Исии Д. Мир, 1991. 240 с.
 20. *Chichester E.D.* High Performance Liquid Chromatography: Principles and Methods in Biotechnology. UK: John Wiley & Sons, 1996. 522 p.
- Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Краснов И.А., Подольская Е.П., Мурадымов М.З., Апацкая М.В., Лютвинский Я.И., Фиронов С.В., Витин А.В., Беляев К.А., Корнев Д.И., Каюмов А.А., Галль Л.Н. Краснов Н.В.)*
- Университет Южной Дании, Центр экспериментальной биоинформатики, Лаборатория белковых взаимодействий, Оденс (Подтележников А.В.)*

Материал поступил в редакцию 16.09.2008.

NANOQUANTITY MASS-SPECTROMETRY LEAD-IN SYSTEM DEVELOPMENT

I. A. Krasnov¹, E. P. Podolskaya¹, M. Z. Muradimov¹, M. V. Apatskaya¹,
Ya. I. Lutvinsky¹, S. V. Fironov¹, A. V. Vitin¹, K. A. Belyaev¹, D. I. Kornev¹,
A. A. Kayumov¹, A. V. Podtelezhnikov², L. N. Gall¹, N. V. Krasnov¹

¹Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

²Protein Interaction Laboratory, Center for Experimental Bioinformatics, University of Southern Denmark, Odense

This paper deals with the development of domestic nano-LC-MS analytical system. The main functional blocks of the system are chromatography installation based on HPLC micro column techniques, nano-ESI ionization block and TOF analyzer. This system was realized on the bases of MX-5310 mass-spectrometer (IAI RAS). The article describes the main parameters of the developed system and compares them with those of domestic LC-MS systems. The developed system allows working with nano amounts of testing samples. Capillary column use as nano emitter increases quality of analysis and makes the system more economic in solvent consumption.