

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ

УДК 544.72;544.22;544.35

ПРИМЕНЕНИЕ СОЛЕЙ МЕДИ ДЛЯ ИНИЦИИРОВАНИЯ КЛАСТЕРООБРАЗОВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДАМИ “МЯГКОЙ” ИОНИЗАЦИИ

© 2020 г. И. С. Пыцкий¹, *, Е. С. Кузнецова¹, А. К. Буряк¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Ленинский проспект, 31, к. 4, Москва, 119071 Россия

*e-mail: ivanpic4586@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2018 г.

После доработки 07.11.2019 г.

Принята к публикации 14.11.2019 г.

Работа направлена на получение смешанных кластерных ионов аминокислот с солями меди мягкими методами ионизации. В работах авторов было показано, что молекулы аминокислот способны образовывать агрегаты, стабилизированные d-металлами. В частности, такие кластеры могут образовываться в присутствии солей серебра. В настоящей работе выявлено, что наиболее крупные кластерные ионы могут быть получены при использовании метода ионизации электрораспылением. Установлено, что при ионизации аминокислот (лейцина, аланина, пролина, тирозина, триптофана) в присутствии солей меди образуются кластерные ассоциаты массой до 1500 Да. Также обнаружено, что образование кластерных ионов сильно зависит от природы аминокислоты и полярности заряда в кластере.

DOI: 10.31857/S0044185620020205

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее активно развивающихся областей науки на сегодня является нанотехнология и синтез наносистем для целей производства, медицины, фармакологии, инженерии и многих других [1]. В связи с этим требуется углубление знаний в пограничных областях, а именно изучение наноразмерных систем, кластеров и агрегатов. Синтез таких систем проводится в различных условиях (фазовое состояние, температура, давление и т.д.) [2, 3]. В некоторых работах, в том числе и в работах авторов [4, 5] было показано, что источником для получения наноразмерных систем могут служить масс-спектрометры с “мягкой” ионизацией. Наиболее часто используют масс-спектрометры с ионизацией в электропрее (ЭС-МС, ESI-MS) и поверхностно-активированную лазерную десорбцию/ионизацию (ПАЛДИ-МС, SALDI-MS).

Первый вариант широко применяется в сочетании с жидкостным хроматографом для качественного и количественного определения компонентов сложных систем [6] и является вариантом ионизации при атмосферном давлении из жидкой фазы в электростатическом магнитном поле. Считается, что наиболее информативен в данном случае лишь пик молекулярного иона и

его точная масса, а дополнительные пики кластеров лишь затрудняют идентификацию.

Второй метод является разновидностью фотоионизации на поверхности в вакууме. Несмотря на технические различия в источниках ионов, кластерообразование неорганических солей протекает при использовании обоих вариантов [7]. Наиболее важной задачей в данном случае является получение знаний о сходствах и различиях в механизмах ионизации в капле (объеме жидкой фазы, метод ЭС-МС) и на поверхности в вакууме (метод МАЛДИ-МС). Также особо стоит отметить, что добавление неорганических солей в раствор органических соединений вероятно может вызывать агрегацию и кластерообразование.

Выяснение основных направлений кластерообразования при ионизации указанными методами является основной задачей работы. Помимо этого, получение кластерных ионов неорганических соединений открывает путь к упрощению идентификации органических соединений масс-спектрометрическими методами, так как помимо одного пика молекулярного иона можно получить набор кластерных ионов идентифицируемого соединения.

В настоящей работе будет выполнено сравнение масс-спектров ионизации методами ЭС-МС и ПАЛДИ-МС, и проведены параллели между на-

правлениями кластерообразования органических соединений на примере пяти аминокислот в присутствии солей меди. Аминокислоты для исследования выбраны как наиболее распространенные в анализе соединения, кроме того являющиеся цвиттер-ионами, способными при ионизации образовывать кластерные ионы в обоих полярностях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали два типа масс-спектрометров. Масс-спектрометр Bruker Maxis (Bruker, Германия) с ионизацией в электроспрее и устройством прямого ввода. Работа проводилась в режимах регистрации положительных ионов. При регистрации положительных ионов напряжение на капилляре составляло 4500 В, на скиммере – 500 В. Температура осушающего азота – 200°C, скорость потока – 7 л/мин, давление в распылителе – 1.4 бар. Также использовали масс-спектрометр с поверхностно-активированной лазерной десорбцией/ионизацией Bruker Ultraflex (Bruker, Германия). Параметры экспериментов (регистрация положительных ионов):

Выталкивающее напряжение – 25 кВ

Доускоряющее напряжение – 21.4 кВ

Напряжение на ионных линзах – 10 кВ

Напряжения на рефлектроне – 26.3 и 14.15 кВ.

Пробоподготовка для исследования методом ЭС-МС и ПАЛДИ-МС проводилась путем растворения сухой соли сульфата меди (Реахим, Россия) в воде Milli-Q. Отдельно растворяли аминокислоты: аланин, тирозин, лейцин, триптофан, пролин (Sigma Aldrich, Германия) – в смеси вода: ацетонитрил в соотношении 1 : 1 (ацетонитрил JT Baker, США). Раствор соли и аминокислоты смешивали в отдельной емкости в соотношении 1 : 1 и помещали в УЗ-баню (Elma, Германия) на 15 мин. Полученные растворы вводили в источник ионизации ЭС-МС напрямую. Для исследования методом ПАЛДИ-МС 1 мкл полученного раствора наносили на плашку из нержавеющей стали (Bruker, Германия). Образец закристаллизовывали на плашке путем сушки на воздухе в течение 10 мин. Полученные кристаллы вносили в источник ионов прибора.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования показали, что наиболее распространенный путь кластерообразования – это агрегация молекул аминокислот в ассоциаты из нескольких молекул. При этом количество таких молекул в ассоциате значительно зависит от природы аминокислоты, способа ионизации и, как определяющий параметр, от природы заряженного центра в ионе. Особенностью масс-спектро-

метрического исследования образующихся неравновесных кластеров является тот факт, что для обнаружения того или иного молекулярного образования требуется, чтобы эта структура имела заряд. Как известно, наличие заряда в молекулярных образованиях может значительно изменять и саму структуру равновесного состояния, в котором существует данный агрегат [8]. Благодаря быстройдействию масс-спектрометрического детектирования, авторами зафиксирован набор равновесных состояний заряженных ионов, образованных в результате ионизации.

Исследование смешанных кластеров аминокислот с медью

Как известно из работ по масс-спектрометрии аминокислот, последние активно образуют молекулярные ионы, причем, как в режиме регистрации положительных, так и в отрицательных ионах [9, 10]. Помимо молекулярных ионов часто образуются димеры аминокислот, то есть кластерные агрегаты из двух молекул аминокислоты с заряженным центром в виде протона или щелочного металла. При этом масс-спектры ЭС-МС значительно более насыщены пиками кластерных ионов. При таком варианте ионизации можно получать тримеры и тетрамеры аминокислот. Все эти утверждения верны и для пролина, однако при смешивании пролина с сульфатом меди характер масс-спектров значительно меняется (табл. 1). Не смотря на значительное количество катионированных аминокислот (пики 116, 138 и 154 Да), в масс-спектре ПАЛДИ присутствует новый тип катионированной аминокислоты с зарядом на атоме меди. Также образуются и димеры аминокислот, катионированные протоном и медью. В данном случае не происходит образования кластеров с щелочными металлами, что может объясняться активным конкурированием ионов меди. В то же время димерный кластер аминокислот способен к деструкции, что доказывается существованием иона 247 Да, соответствующего димеру, в котором одна молекула аминокислоты существует без карбоксильной группы.

При ионизации методом ЭС-МС кластерообразование идет в основном по пути агрегации аминокислоты в крупные кластерные ассоциаты, причем самые крупные ассоциаты образуются вокруг заряженного атома меди. Как показано по результатам исследования, вокруг одной меди может ассоциироваться до 4 молекул пролина. При продолжении агрегирования образуются ассоциаты уже с двумя атомами меди вплоть до шести молекул пролина.

При исследовании неразветвленных аминокислот характеры масс-спектров как ПАЛДИ, так и ЭС-МС могут значительно отличаться от масс-

спектров аминокислот более сложного строения. Так при исследовании аланина в смеси с сульфатом меди (табл. 2) показано, что масс-спектры ПАЛДИ насыщены в основном кластерами меди с водой и ацетонитрилом (растворителями, использованными в пробоподготовке, в таблице не приводятся). К информативным пикам можно отнести только пики с массами 153 и 217 Да, соответствующие катионированному медью аланину и катионированному калием димеру аланина. Этот результат показывает, что метод ПАЛДИ крайне деструктивен для низкомолекулярных соединений и кластерообразование меди с водой более энергетически выгодно нежели с молекулами аланина. Совершенно иначе происходит кластерообразование методом ЭС-МС. Несмотря на присутствие паразитных ионов 104 и 122 Да в масс-спектре наблюдается и протонированный ион (90 Да) и димер (179, 240 и 262 Да). Заряженные центрами выступают протон, щелочные металлы, медь. В области больших масс наблюдается широкий спектр кластерных ионов с двумя атомами меди. Размер таких ассоциатов достигает восьми молекул аланина. Можно предположить, что аминокислоты в таких ассоциатах существуют в виде солей меди, натрия и калия и образуются потерей кислого протона карбоксильной группы с замещением его на катион металла. Это соображение подтверждается тем, что медь в таких кластерах присутствует исключительно в степени окисления +2, хотя в виде кластеров с водой или одной-двумя молекулами аминокислот она может быть или нейтральной, или иметь заряд +1 (заряженный центр).

Схожие пути кластерообразования наблюдаются и для смеси лейцина с сульфатом меди (табл. 3). Для масс-спектров ПАЛДИ также характерно образование ионов меди с водой (в таблице не указаны) и полный набор катионированных молекул лейцина (132, 155, 171 и 195 Да). Следует, однако отметить, что наиболее интенсивный пик принадлежит декарбоксилированной молекуле аминокислоты, что свидетельствует об интенсивном разрушении лейцина под действием ионизирующего излучения. В случае ионизации ЭС-МС разрушение аминокислоты в значительной степени подавлено (пик 86 Да крайне низко интенсивен). Из масс-спектра видно, что основное направление кластерообразования, как и в случае с аланином, связано с образованием полимолекулярных ассоциатов лейцина в виде солей с медью, натрием и калием. Значительное отличие (как качественное, так и количественное) при сравнении масс-спектров ПАЛДИ и ЭС-МС лейцина и аланина как нельзя лучше иллюстрирует различие методов ионизации, которые называют "мягкими".

Данные, приведенные в табл. 1, наглядно показывают характерные отличия в кластерообразовании линейных и ароматических аминокис-

Таблица 1. Сравнительное кластерообразование методами ЭС-МС и МАЛДИ-МС раствора пролина в присутствии солей меди

<i>m/z</i> , Да	ЭС-МС	ПАЛДИ-МС
116	M + H ⁺	M + H ⁺
138		M + Na ⁺
154		M + K ⁺
178		M + Cu ⁺
201		M + Cu + Na ⁺
231	2M + H ⁺	2M + H ⁺
247	2M-COOH + Cu ⁺	2M-COOH + Cu ⁺
292	2M + Cu ⁺	2M + Cu ⁺
346	3M + H ⁺	
407	3M + Cu ⁺	
461	4M + H ⁺	
522	4M-H + Cu ⁺	
583	4M-3H + 2Cu ⁺	
637	5M-H + Cu ⁺	
698	5M-3H + 2Cu ⁺	
752	6M-H + Cu ⁺	
813	6M-H+2Cu ⁺	

лот. При ионизации тирозина (табл. 4) в смеси с сульфатом меди методом ПАЛДИ происходит лишь образование аддуктов с калием и медью. Основной же пик с массой 76 Да принадлежит продукту распада аминокислоты по связи C_α-C_β. Замечательно то, что данный продукт образуется исключительно при ионизации тирозина причем является самым интенсивным пиком в масс-спектре. Данный факт может объясняться стабилизацией ароматического интермедиата реакции за счет гидроксильной группы кольца и образования кето-енольной формы. Значительный распад аминокислоты происходит и при ионизации методом ЭС-МС. Однако в данном случае направления распада другие и связаны с потерей функциональных групп аминокислотой, что свидетельствует о значительном влиянии растворителя, присутствующего в ионизируемой капле и влияющего на процессы ионизации.

Триптофан, обладающий гетероциклической структурой радикала, более стабилен при ионизации ЭС-МС, однако ионизация в вакууме методом ПАЛДИ также приводит к значительной деструкции: наблюдаются продукты декарбоксилирования и распада аминокислоты по связи C_α-C_β (табл. 5). Тем не менее в отличие от C_α-C_β-распада в тирозине, заряд в данном случае остается на радикале, а не на функциональной части. Следо-

Таблица 2. Сравнительное кластерообразование методами ЭС-МС и МАЛДИ-МС раствора аланина в присутствии солей меди

<i>m/z</i> , Да	ЭС-МС	ПАЛДИ-МС	
90	M + H ⁺	M + Cu ⁺	
104	Cu + CH ₃ CN ⁺		
122	Cu + CH ₃ CN + H ₂ O ⁺		
153			
179	2M + H ⁺		
195	M-(M-COOH) + Cu ⁺		
217			2M + K ⁺
240	2M + Cu ⁺		
262	2M + Cu + Na ⁺		
329	3M + Cu ⁺		
501	4(M-H) + 2Cu + Na ⁺		
630	5(M-H) + 2Cu + Na + K ⁺		
742	6(M-H) + 2Cu + 2Na + K ⁺		
870	7(M-H) + 2Cu + 2Na + 2K ⁺		
981	8(M-H) + 2Cu + 3Na + 2K ⁺		

Таблица 3. Сравнительное кластерообразование методами ЭС-МС и МАЛДИ-МС раствора лейцина в присутствии солей меди

<i>m/z</i> , Да	ЭС-МС	ПАЛДИ-МС
86	M-COOH ⁺	M-COOH ⁺
132	M + H ⁺	M + H ⁺
155		M + Na ⁺
171		M + K ⁺
195		M + Cu ⁺
280	M-(M-COOH) + Cu ⁺	
325	2M + Cu ⁺	
347	2M + Cu + Na ⁺	
581	3(M-H)-(M-COOH) + Cu + K + H ⁺	
669	4(M-H) + 2Cu + Na ⁺	
841	5(M-H) + 3Cu ⁺	
904	5(M-H) + 4Cu ⁺	
994	6(M-H) + 3Cu + Na ⁺	
1164	7(M-H) + 3Cu + Na ⁺ + K ⁺	
1317	8M + 3Cu + Na + K + Na ⁺	

вательно, образование заряженного гетероцикла более энергетически выгодно в данном случае. Также молекула аминокислоты распадается и с потерей карбоксильной группы. Продукт при

Таблица 4. Сравнительное кластерообразование методами ЭС-МС и МАЛДИ-МС раствора тирозина в присутствии солей меди

<i>m/z</i> , Да	ЭС-МС	ПАЛДИ-МС
76		[NH ₂ -CH ₂ -COOH] ⁺
119	M-COOH-NH ₂ ⁺	
136	M-COOH ⁺	
147	M-NH ₂ -H ₂ O ⁺	
265	M-NH ₂ ⁺	
220		M + K ⁺
244		M + Cu ⁺
363	2M + H ⁺	

этом способен образовывать аддукты с ионами меди. При ионизации методом ЭС-МС самым интенсивным пиком является пик с массой 188 Да, опять же соответствующий продукту деструкции, но при этом в масс-спектре присутствует и молекулярный ион (205 Да). В отличие от тирозина, триптофан более активно образует кластерные ассоциаты, стабилизированные заряженной медью. При этом, как и при исследовании других аминокислот, с увеличением количества агрегированных молекул аминокислоты до четырех появляется кластер с двумя атомами меди.

Тандемная масс-спектрометрия

Подтверждение структуры получаемых кластерных ионов проводилось методом тандемной масс-спектрометрии с изменяемой энергией диссоциации. При ионизации методом ПАЛДИ проводили эксперимент по метастабильному распаду получаемых кластеров. Показано, что кластеры аминокислот, полученных методом ПАЛДИ, являются метастабильными и начинают равновесно распадаться уже в масс-анализаторе, то есть существовать в стабильном состоянии они не могут более 2–5 микросекунд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что получение стабильных кластерных ассоциатов возможно непосредственно в источнике ионизации масс-спектрометров. Продемонстрировано различие в путях ионизации и кластерообразования при сравнении метода атмосферной ионизации из раствора (ЭС-МС) и ионизации в вакууме из предварительно закристилизованного раствора (ПАЛДИ). На примере ряда аминокислот показано, что несмотря на одинаковые функциональ-

Таблица 5. Сравнительное кластерообразование методами ЭС-МС и ПАЛДИ-МС раствора триптофана в присутствии солей меди

m/z , Да	ЭС-МС	ПАЛДИ-МС
129		$M-NH_2-CH_2COOH^+$
159		$M-COOH^+$
188	$M-NH_2^+$	
205	$M + H^+$	$M + H^+$
222		$M-COOH + Cu^+$
228		$M + Na^+$
244		$M + K^+$
268		$M + Cu^+$
409	$2M + H^+$	
470	$2M + Cu^+$	
674	$3M + Cu^+$	
941	$4M + 2Cu^+$	

ные группы ионизация может зависеть от природы аминокислотного радикала.

Отмечено, что метод ПАЛДИ является более деструктивным и вызывает распад аминокислот как по функциональным группам, так и по связи $C_\alpha-C_\beta$. Для метода ПАЛДИ практически не характерно образование крупных кластерных ассоциатов (только димеры), но при этом образуется множество катионированных аддуктов с водородом, натрием, калием и медью. Метод ионизации ЭС-МС обладает уникальной способностью к получению крупных кластерных ионов. Если при обычной ионизации аминокислот получить ассоциаты более двух молекул редко удается, то при добавлении солей меди последняя выступает в качестве координационного центра для молекул аминокислот. Также надо отметить, что при ассоциировании до четырех молекул аминокислоты образуются ионы с одним атомом меди, а при увеличении количества аминокислот на первый план выходят ионы, стабилизированные двумя атомами меди. Метод ЭС-МС позволяет получить ассоциаты до восьми молекул аминокислоты. Подобное различие в получаемых масс-спектрах объясняется тем, что метод ПАЛДИ является фотоионизационным (более жестким), а метод ЭС-МС – полевым с последующей сушкой заря-

женных капель, что способствует агрегации вокруг заряженных центров.

Особо следует отметить влияние радикалов аминокислот на процессы ионизации. Так, наиболее крупные кластеры образуются из наиболее простых аминокислот (аланина, пролина, лейцина), что объясняется небольшим объемом этих радикалов и возможностью их агрегации вокруг одного заряженного центра. Также к образованию таких крупных ассоциатов способен триптофан, что может объясняться достаточно плоской структурой молекулы и возможностью образования межмолекулярных связей между молекулами аминокислоты в кластере.

Дальнейшее исследование проходящих при ионизации процессов может дать важную фундаментальную информацию о термодинамике и стабильности различных ассоциированных структур, полученных ионизационными методами. Кроме этого, использование тандемной масс-спектрометрии для определения основных путей распада таких кластерных ионов позволит ответить на вопрос об их стабильности. Исследование подобных структур – путь к получению новых наноразмерных систем с использованием ионизирующих методов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramsden J., *Applied nanotechnology: the conversion of research results to products*. London: William Andrew, 2018.
2. Razaq H., Qureshi R., Cabo-Fernandez L., Schiffrin D.J. // *J. Electroanal. Chem.* 2018. V. 819. № 1. P. 9.
3. Chu Y., Guo L., Xi B., Feng Z., Wu F., Lin Y., Xiong S. // *Adv. Mater.* 2018. V. 30. № 6. in print.
4. Пыцкий И.С., Кузнецова Е.С., Буряк А.К. // *Колл. Журн.* 2018. Т. 80. № 4. С. 445.
5. Iartsev S.D., Matyushin D.D., Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Buryak A.K. // *Surf. Innov.* 2018. V. 6. № 4–5. P. 244.
6. Huang L., Lu B., Qin R., Sun L. // *Clin. Lab.* 2018. V. 64. № 7. P. 1153.
7. Trimpin S., Lee C., Weidner S.M., El-Baba T.J., Lutomski C.A., Inutan E.D., McEwen C.N. // *Chem. Phys. Chem.* 2018. V. 19. № 5. P. 581.
8. Keese R.G., Castleman A.W. // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1986. V. 15. № 3. P. 1011.
9. Nadler W.M., Waidelich D., Kerner A., Hanke S., Berg R., Trumpp A., Rösl C. // *J. Proteome Res.* 2017. V. 16. № 3. P. 1207.
10. Boughton B.A., Thinagaran D., Sarabia D., Bacic A., Roessner U. // *Phytochem. Rev.* 2015. V. 15. № 3. P. 445.