

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ

УДК 544.72544.22544.35

### ОБРАЗОВАНИЕ И РАСПАД КЛАСТЕРНЫХ ЧАСТИЦ ПРИ ИОНИЗАЦИИ В ПОЛЯХ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ

© 2022 г. И. С. Пыцкий<sup>1</sup>, \*, Е. С. Кузнецова<sup>1</sup>, А. К. Буряк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное 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 21.07.2022 г.

После доработки 29.07.2022 г.

Принята к публикации 10.08.2022 г.

В работе приведены данные по масс-спектрометрическому исследованию аминокислот и дипептидов в условиях ионизации электрораспылением. Показано, что образование молекулярного иона зависит не только от природы ионизируемого соединения, но и от его концентрации в исследуемом растворе. При регистрации масс-спектров обнаружены продукты распада исследуемых молекул, а также продукты их взаимодействия друг с другом. Показано, что характер масс-спектра может меняться в зависимости от концентрации исследуемого соединения. Приведены основные выводы о физикохимии взаимодействия молекул в растворе между собой. Показано, что интенсивность деструкции и ассоциации различных молекул зависит от концентрации вещества в растворе и геометрии молекул.

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия, электрораспыление, аминокислоты, ионизация, кластеры

**DOI:** 10.31857/S0044185622060146

#### ВВЕДЕНИЕ

Физикохимия процессов ионизации – важная область прикладных и фундаментальных исследований. Процессы ионизации широко используются в области масс-спектрометрии для определения состава сложных смесей по их масс-спектрам [1]. В то же время, использование масс-спектров как физико-химической характеристики соединений значительно затрудняется при использовании мягких методов ионизации из-за значительного влияния межмолекулярных взаимодействий при росте концентрации соединений. Целью данной работы является поиск и установление закономерностей распада и образования заряженных частиц в условиях ионизации в полях высокой напряженности.

Общеизвестно, что ионизация в электроспрее дает весьма информативные масс-спектры индивидуальных соединений [2, 3], однако, качественный состав спектров зависит от множества параметров, что значительно затрудняет как аналитические исследования, так и физико-химические изыскания [4–7]. Одним из важных условий использования любого научного метода является воспроизводимость результатов. В настоящей работе будет показано, что при ионизации в электроспрее состав масс-спектров меняется также при изменении концентрации исследуемого со-

единения. В качестве объектов исследования выбраны пять аминокислот с радикалами различной природы для четкого выявления зависимости механизма ионизации от структуры.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения исследований использовали масс-спектрометр Bruker MAXIS IMPACT с источником ионизации в электроспрее. Параметры ионизации: скорость потока жидкой фазы – 0.25 мл/мин, состав жидкой фазы: вода–ацетонитрил 50 : 50. Напряжение на игле распылителя 4 кВ. Поток азота – 4 л/мин, температура – 200°C. В качестве устройства ввода пробы в систему использовали жидкостный хроматограф Agilent 1260 Infinity, ввод производили с использованием автосамплера и крана-дозатора на 200 мкл.

В качестве исследуемых соединений использовали аминокислоты и короткие пептиды: диглицин – представитель ряда дипептидов линейных аминокислот, тирозин – ароматическая замещенная аминокислота, триптофан – полигетероциклическая аминокислота. Концентрации аминокислот варьировались в диапазоне трех порядков аналитического интервала [8, 9] от 1 до 1000 мкг/л.

Масс-спектры получали в режиме постоянной регистрации потока со скоростью записи 3, 5, и

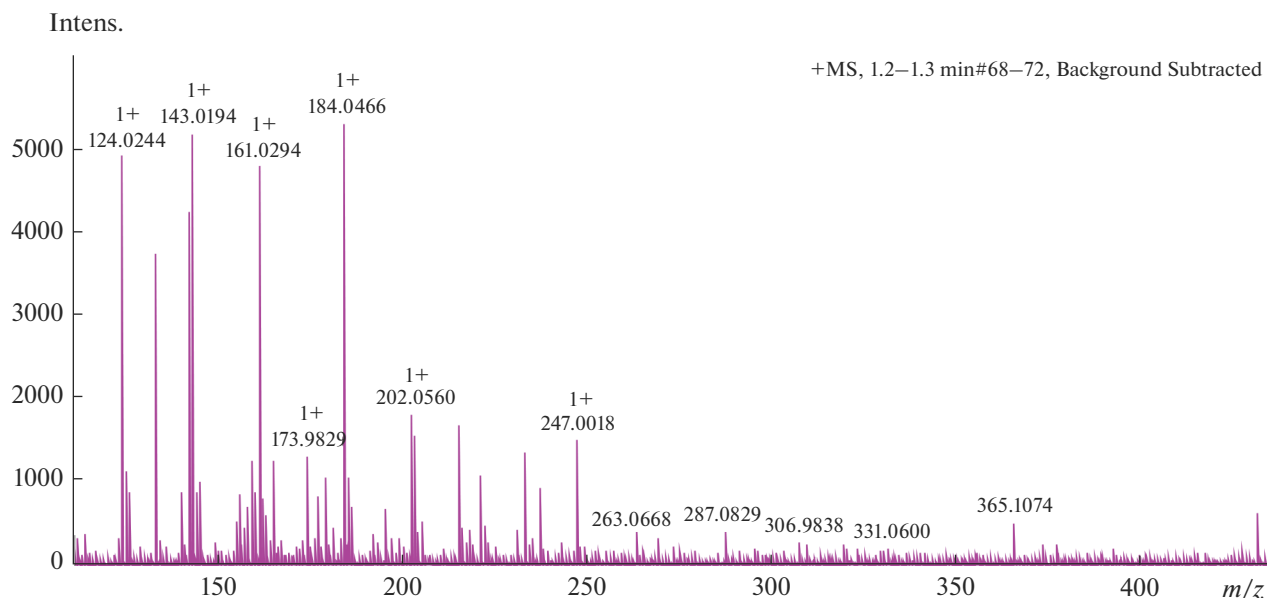


Рис. 1. Масс-спектр растворителя, использовавшегося для растворения и ввода пробы (вода–ацетонитрил – 50 : 50).

10 спектров в секунду. Было обнаружено, что при малой скорости происходит перегрузка пиков масс-спектров на высоких концентрациях, что приводит к сокращению ресурса детектора. В то же время, использование слишком большой скорости приводит к росту соотношения сигнал/шум на низких концентрациях и потери чувствительности. Поэтому для проведения эксперимента была выбрана скорость записи 5 спектров в секунду.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Влияние растворителя*

На рис. 1 приведен масс-спектр растворителя вода–ацетонитрил использовавшегося для вычитания фона при получении экспериментальных масс-спектров соединений.

Из рисунка видно, что растворитель содержит около десятка ионизируемых соединений в количествах менее нг/л (в пересчете на исследуемые соединения). Это количество вполне соответствует степени чистоты используемых растворителей, однако следует учитывать, что при проведении эксперимента возможно большое количество побочных реакций, которые могут влиять на ход эксперимента. В то же время в ходе эксперимента было показано, что величина напряжения на распылительном конусе может влиять на величину фона. При этом однако, подбор этого параметра производится индивидуально в каждом эксперименте и зависит от структуры и сечения ионизации конкретной аминокислоты.

### *Сечение ионизации*

Эксперимент по определению сечения ионизации показал, что при использовании мягкого метода ионизации кривые могут иметь ряд особенностей (рис. 2).

Из рис. 1 видно, что кривые ионизации глицин-глицина и триптофана имеют характерный перегиб в области концентрации 100–200 мкг/л. Такой перегиб крайне нехарактерен для “жестких” методов ионизации (например, электронного удара), которые работают в условиях высокого вакуума, в то время, как применяемый электрораспылительный метод работает при атмосферном давлении и в присутствии растворителя. Подобный перегиб говорит об изменении в путях кластерообразования при прохождении критической концентрации и начале образования многоатомных кластеров, что объясняется сокращением среднестатистического расстояния между молекулам аминокислот с ростом концентрации и наличием в них открытых ионогенных групп и/или  $\pi$ -сопряженной системы. В то же время следует отметить, что несмотря на различие в химическом строении исследуемых молекул интенсивность пиков протонированных ионов при одинаковых концентрациях соединений различается менее, чем на 15%. Можно утверждать, что при ионизации в присутствии избытка посторонних соединений (компонентов воздуха, растворителя) влияние геометрии молекул уходит на второй план и решающее значение в данном случае имеют именно побочные процессы.

### Деструкция соединений

Диглицин является линейной и наименее поляризованной молекулой, что объясняет его относительную стабильность в условиях ионизации. Основным направлением распада диглицина является дегидратирование с образованием иона 115.0505 Да (экспериментальная величина). Однако интенсивность этого иона составляет всего 2–3% от протонированной молекулы и не зависит от концентрации диглицина в исследуемом растворе.

В отличие от диглицина, тирозин и триптофан являются сильно поляризованными молекулами и значительно подвержены деструкции.

Из рис. 3 видно, что наиболее интенсивные пики в масс-спектре тирозина принадлежат продуктам декарбоксилирования (136.0761 Да) и дегидратирования (165.0552 Да) тирозина. Данные пики в 1.5–2 раза больше протонированного иона. Для триптофана еще более характерен процесс деструкции: продукт деаминирования аминокислоты в 6–8 раз больше протонированного иона и является самым интенсивным в масс-спектре. Таким образом, ионизация в присутствии растворителя приводит прежде всего к множеству побочных реакций, что в свою очередь вызывает значительную деструкцию исследуемых соединений.

### Кластерообразование

Следует отметить, что помимо процессов деструкции в процессе ионизации образуются также кластерные ионы. Наиболее четко этот процесс прослеживается при ионизации глицин-глицинового дипептида. Уже при концентрации в 10 мкг/л (рис. 3а) прослеживается образование димера с заряженным центром в виде иона натрия (пик с массой 287.0891 Да). При увеличении концентрации глицин-глицина увеличивается количество и размер образующихся кластеров.

Активное кластерообразование начинается уже при концентрации 2–10 мкг/л из-за уменьшения межмолекулярного расстояния в исследуемом растворе. При этом увеличивается вероятность столкновения и взаимодействия молекул вещества с образованием кластерных ассоциатов. С ростом концентрации увеличивается не только количество кластерных ионов, но и количество молекул в ассоциате, которое при наибольшей концентрации может достигать 10–12 молекул в одном кластерном ионе. Также стоит отметить, что при концентрации 200 мкг/л плотность заряда в растворе достигает таких величин, что происходит образование многозарядных кластерных ионов [10]. Так на рисунке 4 четко обнаруживаются двухзарядные ассоциаты из 11 и 13 молекул глицин-глицина. При этом максимальное число

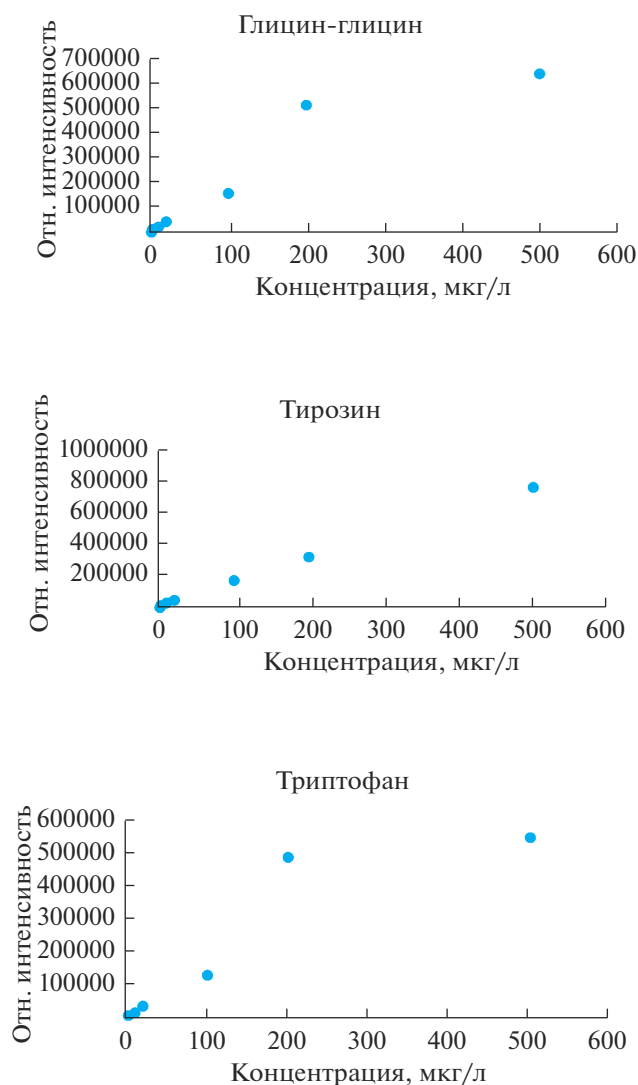
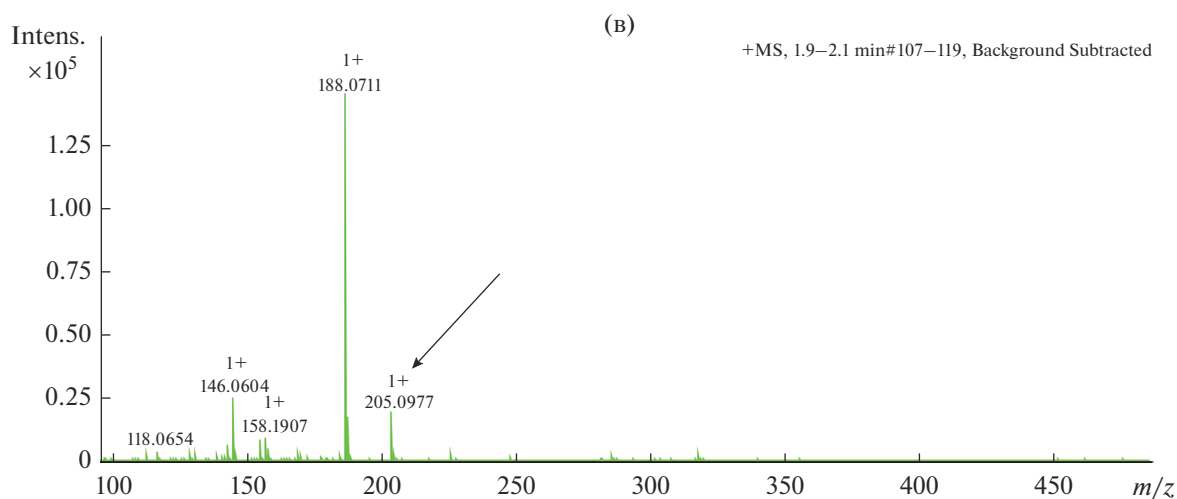
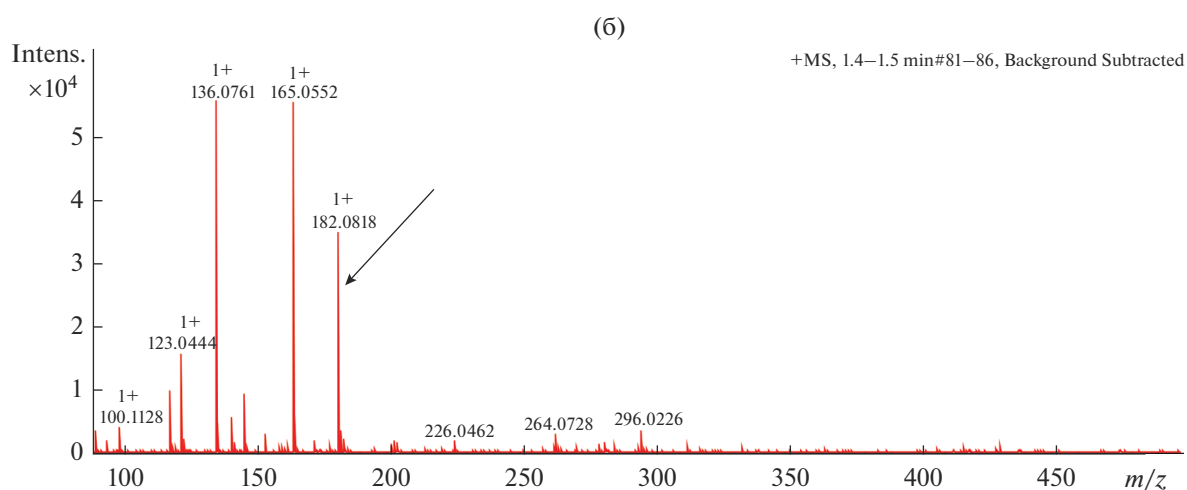
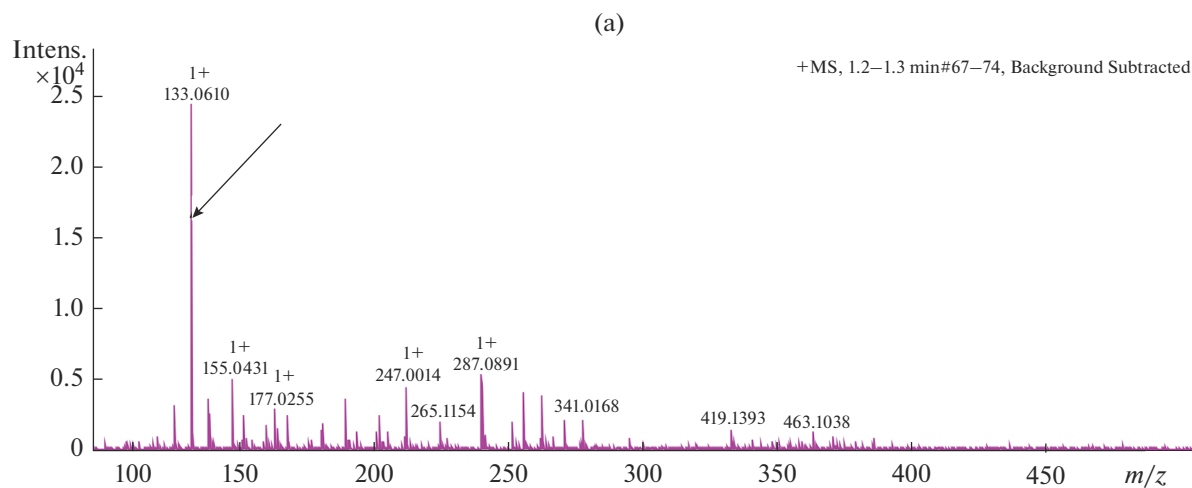


Рис. 2. Кривые ионизации исследуемых аминокислот в диапазоне от 1 до 1000 мкг/л: (а) глицин-глицин, (б) тирозин, (в) триптофан.

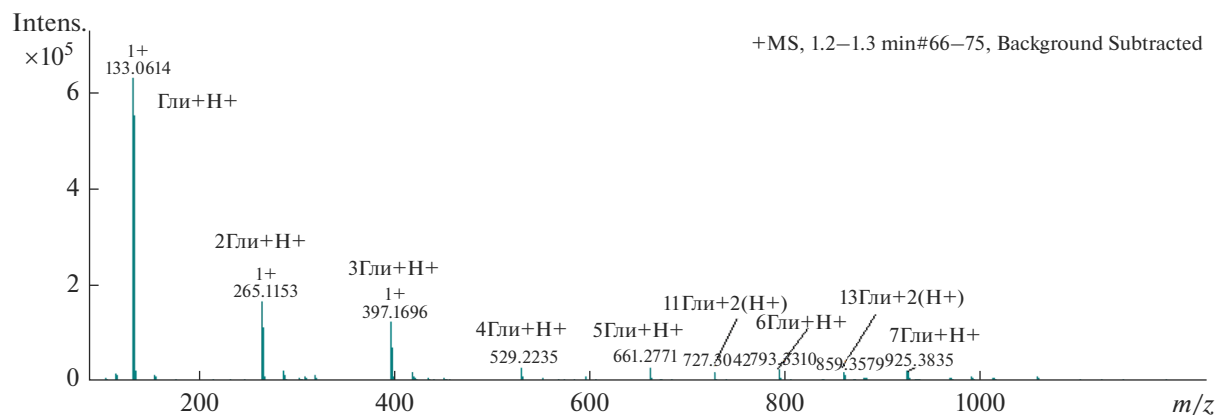
молекул глицин-глицина в двухзарядных ассоциатах может достигать 15–17 молекул.

Следует отметить, остальные исследуемые молекулы имеют значительно меньшее стремление к кластерообразованию. Так, молекула тирозина крайне склонна к деструкции и кластерообразованию для нее наименее характерно из-за крупного ароматического кольца в структуре. При этом кластерный ион больше димера получить не удается даже при максимальной концентрации аминокислоты (рис. 5).

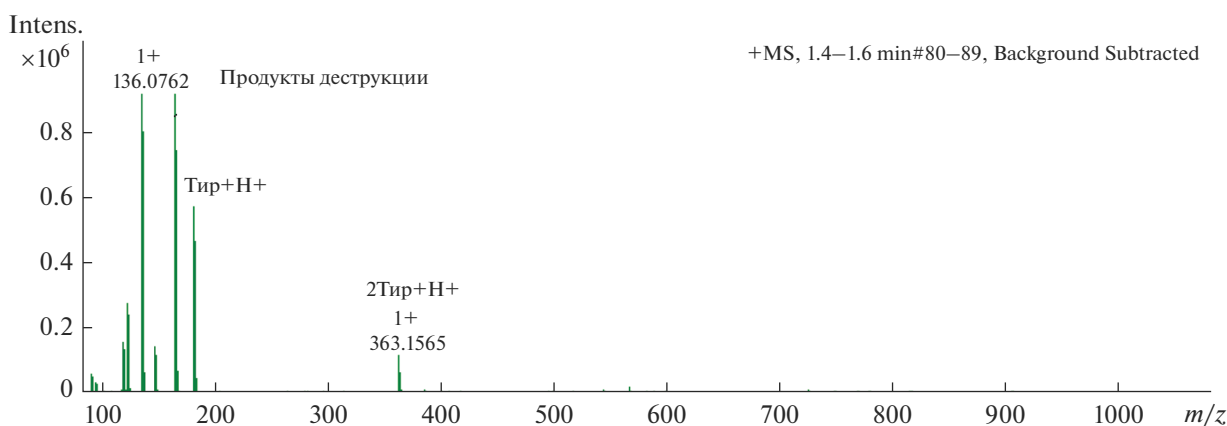
Затруднение в образовании кластерных ионов с большим количеством молекул аминокислоты обусловлено стерическими затруднениями из-за крупного ароматического кольца, которое включает возможность образования крупных заряженных кластеров.



**Рис. 3.** Масс-спектры в режиме регистрации положительных ионов исследуемых соединений в концентрации 10 мкг/л: (а) диглицина, (б) тирозина, (в) триптофана – стрелками указан протонированный ион соответствующего соединения.



**Рис. 4.** Масс-спектр раствора глицин–глицина в концентрации 1000 мкг/л в режиме регистрации положительных ионов. Гли – молекула глицин–глицина.



**Рис. 5.** Масс-спектр раствора тирозина в концентрации 1000 мкг/л в режиме регистрации положительных ионов. Тир – молекула тирозина.

Подобные процессы наблюдаются и при ионизации триптофана, который обладает сопряженной гетероциклической системой из двух ароматических колец.

При концентрации выше 50 мкг/л наблюдается образование димера триптофана (пик с массой 409.1892 Да). Более крупные кластерные ионы триптофана также не образуются.

Следует также отметить, что для ароматических аминокислот более характерна деструкция, чем кластерообразование, в то время как глицин глицин более стремится именно к молекулярной ассоциации.

#### *Ионизация аминокислот*

Настоящее исследование направлено на более углубленное изучение процессов ионизации и является частью большой работы авторов по исследованию физикохимии процессов ионизации в различных условиях [11–13].

Исследование направлено на поиск закономерностей в процессах ионизации аминокислот для повышения информативности масс-спектров подобных соединений и для аналитических целей. Следует отметить, что кластерообразование играет важную роль как в физикохимии ионизации, так и в анализе. Из результатов работы можно сделать ряд крайне важных выводов, как в области процессов ионизации, так и для прикладных целей. По результатам работы становится очевидным, что наиболее активно кластерообразования проходит в простых аминокислотах со стерически незатрудненными ионогенными группами, хотя, являясь цвиттер-ионом, любая аминокислота может образовывать кластерные ионы, в той или иной степени. Наличие открытых ионогенных групп и малого радикала в глицине обуславливает активное кластерообразование его при ионизации. Рисунок 4 показывает, что диглицин в ионизированном состоянии находится сразу во множестве форм, в том числе и многозарядных ионов. Очевидно, что в этом случае зна-

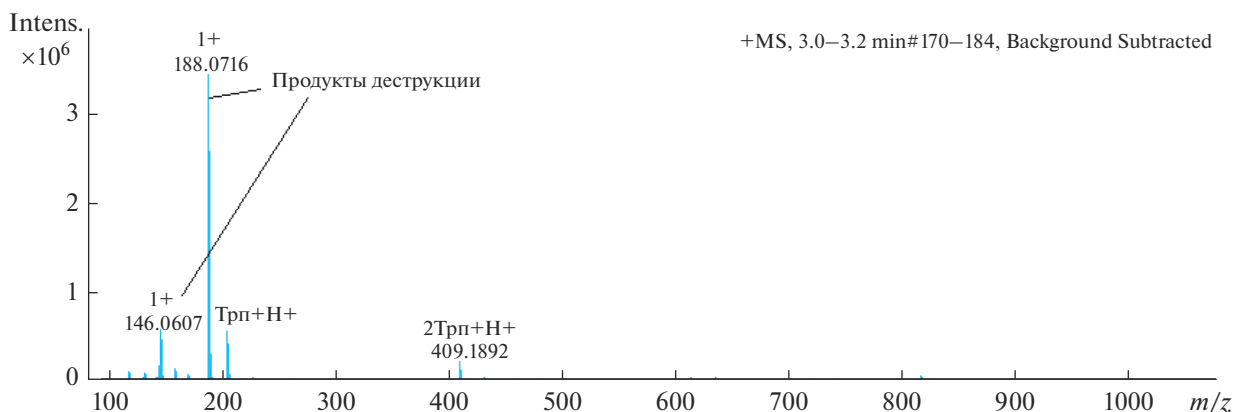


Рис. 6. Масс-спектр раствора триптофана в концентрации 1000 мкг/л в режиме регистрации положительных ионов. Трп – молекула триптофана.

чительно повышается информативность масс-спектра и надежность идентификации соединения на качественном уровне. Однако при этом сечение ионизации принимает сложную форму с перегибом и потому значительно затрудняется количественный анализ, необходимый при выполнении исследований, связанных с реальными образцами, содержащими целый набор соединений, в том числе искомых аминокислот.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследованы молекулы различного геометрического строения. Показано, что характер сечения ионизации практически не зависит от строения молекул. В то же время обнаружено, что при увеличении концентрации для крупных ароматических молекул наиболее характерны процессы деструкции, которые вызваны образованием стабильных заряженных продуктов распада благодаря стабилизации заряда ароматической системой. Помимо этого, увеличение концентрации раствора тирозина и триптофана не приводят к ассоциации и кластерообразованию, а ведут лишь к увеличению деструкции молекулярного иона, что может объясняться большим размером радикала и отсутствием заместителей в ароматическом кольце, стабилизирующих заряд.

Рассмотренный в работе пример глицин–глицина показывает совершенно иной характер процессов ионизации. Для линейных алифатических молекул, таких как глицин, менее характерна деструкция и очень активно происходит кластерообразование крупных (в том числе многозарядных) ассоциатов. Однако, следует отметить, что такое явление гораздо менее характерно для более тяжелых гомологов из-за роста размера радикала и, как следствие, стерических затруднений при ассоциации.

Продолжение исследования с расширенным набором образцов аминокислот и коротких пеп-

тидов позволит окончательно разобраться в процессах, протекающих при ионизации в различных условиях и выделить параметры наиболее заметно влияющие на ее эффективность.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kind T., Tsugawa H., Cajka T., Ma Y., Lai Z., Mehta S.S., Fiehn O. // *Mass Spectrom. Rev.* 2018. V. 37. № 4. P. 513–532.
2. Haglund A., Hedeland M., Arvidsson T., Pettersson C.E. // *J. Chromatogr. B.* 2018. V. 1084. P. 96–105.
3. Root K., Wittwer Y., Barylyuk K., Anders U., Zenobi R. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017. V. 28. № 9. P. 1863–1875.
4. Rajauria G., Foley B., Abu-Ghannam N. // *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2016. V. 37. P. 261–268.
5. Nuzzo G., Gallo C., d'Ippolito G., Manzo E., Ruocco N., Russo E., Fontana A. // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. № 1. P. 10.
6. Kumari S., Elancheran R., Kotoky J., Devi R. // *Food Chem.* 2016. Vol. 203. P. 521–529.
7. Ma Y., Kong Q., Qin C., Chen Y., Chen Y., Lv R., Zhou G. // *AMB Express.* 2016. V. 6. № 1. P. 79.
8. Haynes C.A. De Jesús V.R. // *Clin. Biochem.* 2016. V. 49. № 1–2. P. 161–165.
9. Ali H.M., El-Gizawy A.M., El-Bassiouny R.E., Saleh M.A. // *Food Chem.* 2016. V. 192. P. 879–885.
10. Moschou I.C., Dasenaki M.E., Thomaidis N.S. // *J. Chromatogr. B.* 2019. V. 1104. P. 134–140.
11. Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Buryak A.K. // *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* 2020. № 6. V. 56. P. 272–276.
12. Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Buryak A.K. // *Colloid J.* 2018. V. 80. № 4. P. 427–438.
13. Pytskii I.S., Petukhova G.A., Kuznetsova E.S., Khozina E.V., Buryak A.K. // *Surf. Innov.* 2017. V. 5. № 3. P. 179–187.