

02;12

## Масс-спектрометрическое исследование фрагментации молекулы триптофана электронным ударом

© В.С. Вукстич, Л.Г. Романова, И.Г. Мегела, А.В. Снегурский

Институт электронной физики НАН Украины, Ужгород, Украина  
E-mail: snegursky.alex@gmail.com

Поступило в Редакцию 8 июля 2013 г.

Масс-спектрометрическим методом исследовано образование ионных продуктов однократной и диссоциативной ионизации молекулы триптофана ( $C_{11}H_{12}N_2O_2$ ) электронным ударом. Получен и идентифицирован масс-спектр триптофана, измерены припороговые функции выхода ионов исходной молекулы и основного ионного продукта ее ударной фрагментации. Определены абсолютные значения энергии ионизации „материнской“ молекулы триптофана и пороговые энергии (потенциалы) появления ее основных фрагментов. Изучено влияние облучения молекул триптофана высокоэнергетическим пучком электронов от электронного ускорителя на результирующие масс-спектры исходной молекулы.

Ранее нами масс-спектрометрическим методом изучалось образование ионных фрагментов при взаимодействии медленных моноэнергетических электронов с молекулами аминокислот — глицина, метионина и аспарагина (см., например, [1–3]). В результате этих исследований были установлены основные продукты диссоциативной ионизации исходных молекул и измерены потенциалы их появления. В ряде наших последующих работ были определены геометрические параметры изучаемых молекул в нейтральном и ионизированном состоянии [4], предложены основные каналы их распада с учетом распределения зарядов по всем фрагментам.

Данная работа является логическим продолжением цикла выполняемых нами исследований, посвященных взаимодействию ионизирующего излучения с биологическими молекулами. Общеизвестно, что именно вторичные электроны низких энергий, являющиеся побочными продуктами взаимодействия высокоэнергетического ионизирующего излучения

с тканями живых организмов, ответственны за большинство мутагенных преобразований в клетках, подвергшихся подобному воздействию [5]. Поэтому важность и актуальность подобных исследований, по нашему мнению, не вызывает сомнений.

В работе исследовано ионизирующее воздействие электронов на молекулу триптофана — протеиногенной аминокислоты, которая входит в состав белков всех известных живых организмов. Она принадлежит к классу 22 стандартных аминокислот, являясь незаменимой для человеческого организма. Подобные процессы исследовались ранее в весьма небольшом количестве работ (см., например, [6–8]), в большинстве своем посвященных фотоионизации и диссоциативному прилипанию электронов. Информация по потенциалам появления фрагментов молекулы триптофана в литературе практически отсутствует, и даже база данных Национального института стандартов США [9] не приводит результаты этого рода. Поэтому ввиду того, что анализируемые данные по пороговым энергиям выхода ионных фрагментов данной молекулы получены нами впервые, к сожалению, какое-либо сопоставление их абсолютных значений с имеющимися данными других исследований не представляется возможным.

В данной работе приведены первые экспериментальные результаты исследования распада молекулы триптофана под воздействием электронного удара. Эксперименты проводились с использованием техники пересекающихся молекулярного и электронного пучков и масс-спектрометрического анализа продуктов взаимодействия с помощью магнитного масс-спектрометра МИ1201 [10], обладающего высокой чувствительностью и разрешающей способностью ( $m/\Delta m = 1100$ ) в широком (до 720 атомных единиц массы (amu)) диапазоне исследуемых масс. Пучок молекул триптофана формировался эффузионным источником с омическим нагревом рабочего вещества, обеспечивавшим плотность молекул в области взаимодействия с электронным пучком не менее  $10^{10}$  mol/cm<sup>3</sup>. Температура источника не превышала 200°C, что позволило достигать оптимальных параметров генерации молекулярного пучка, исключая возможность термической деградации исходного вещества в источнике и образования его кластеров. Пучок электронов формировался трехэлектродной электронной пушкой, ток пучка составлял 30–50 μA в диапазоне энергий 10–150 eV с энергетической неоднородностью не хуже 0.5 eV. Ионы, возникшие в области взаимодействия обоих пучков, разделялись по отношению их

массы к заряду и регистрировались электрометром. Система сбора, накопления, обработки и визуализации полезного сигнала, работавшая в режиме циклического накопления в реальном времени, управлялась от персонального компьютера. Давление в ионном источнике и анализаторе масс-спектрометра в процессе эксперимента составляло порядка  $10^{-6}$  Torr.

Процедура измерений включала в себя несколько последовательных этапов. Вначале записывались масс-спектры остаточного газа и молекулы триптофана при энергии ионизирующих электронов 70 eV, поскольку для большинства молекул этого типа сечение однократной ионизации электронным ударом достигает своего максимального значения именно в области 70–80 eV [11]. Вычитание указанных спектров позволяло получать результирующий масс-спектр исходной молекулы, отсекая влияние фона остаточного газа. Затем выбирались ее наиболее интенсивные фрагменты и измерялись зависимости выхода (числа) указанных ионов от энергии электронов вблизи порога, которые затем обрабатывались с использованием алгоритма подгонки по методу наименьших квадратов [2]. Калибровка энергетической шкалы электронов осуществлялась путем измерения порогов функций ионизации атомов аргона и молекулы азота и их сравнения с известными из литературы данными [13], точность определения энергии электронов составляла  $\pm 0.1$  eV.

Рассмотрим основные результаты проведенных нами экспериментальных исследований.

На рис. 1 приведен результирующий масс-спектр молекулы триптофана, иллюстрирующий общую картину выхода фрагментов молекулы  $C_{11}H_{12}N_2O_2$ . Он характеризуется обилием линий ионных фрагментов, подтверждающим многоканальность процесса распада молекулы под действием электронов. Обращают на себя внимание пики, соответствующие дробным массам  $m = 57.5, 64.5, 79.5$  и  $81.5$  amu (на рисунке выделены более насыщенным оттенком), свидетельствующие о выходе двухзарядных фрагментов. В масс-спектре доминирует пик, связанный с образованием ионного фрагмента  $C_9H_8N^+$  с массой 130 amu. Достаточной интенсивностью также обладают пик материнского иона  $C_{11}H_{12}N_2O_2^+$  при  $m = 204$  amu, пик при  $m = 77$  amu (ему могут соответствовать два изобарных фрагмента:  $C_7H_7^+$  и  $C_5H_3N^+$ ), а также пик при  $m = 103$  amu, появление которого можно связать с образованием ионного фрагмента  $C_7H_5N^+$ .

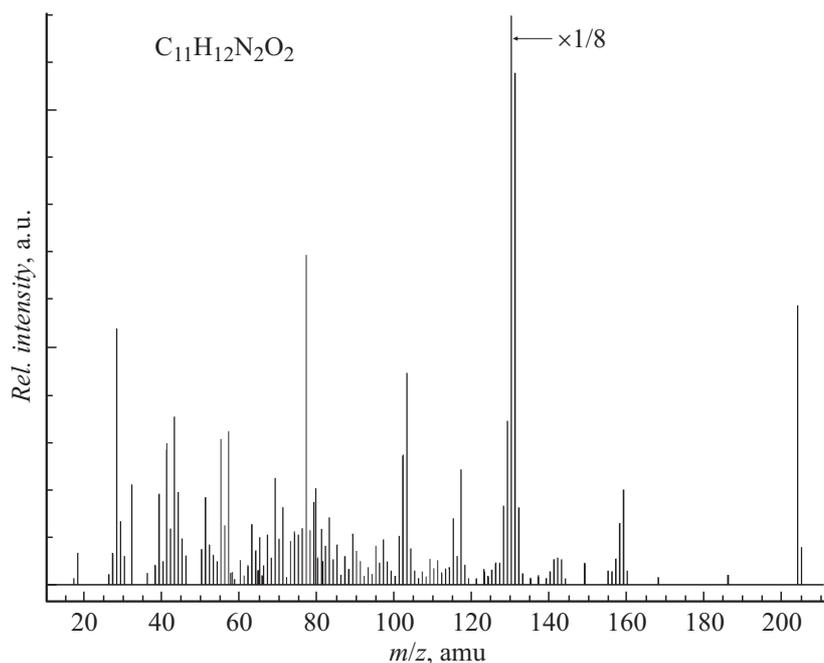


Рис. 1. Результирующий масс-спектр молекулы триптофана.

Структурно триптофан, как ароматическую аминокислоту, можно представить как индол-3-аланин, или 3-метилениндол, соединенный в  $C_\alpha$ -положении с остатком простейшей аминокислоты — глицина. Ион  $C_9H_8N^+$ , соответствующий доминирующему пику масс-спектра (рис. 1), образуется вследствие разрыва связи молекулы  $C_\alpha-C_\beta$ . Доля комплементарного иона с массой  $m = 74$  amu ( $C_2H_4NO_2^+$ ) составляет около 1% от основного пика. Таким образом, ионизация молекулы триптофана проходит главным образом за счет элиминирования электрона ароматической группой молекулы, на которой преимущественно локализуется заряд (рис. 2).

Разрыв связи между индольной группой и  $-CH_2-C(NH_2)-COOH$  также имеет место, однако этот канал диссоциации является неэффективным: интенсивность пика иона с  $m = 117$  amu, соответствующего

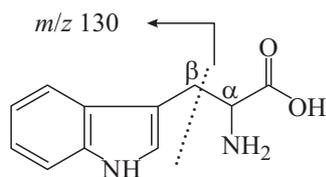
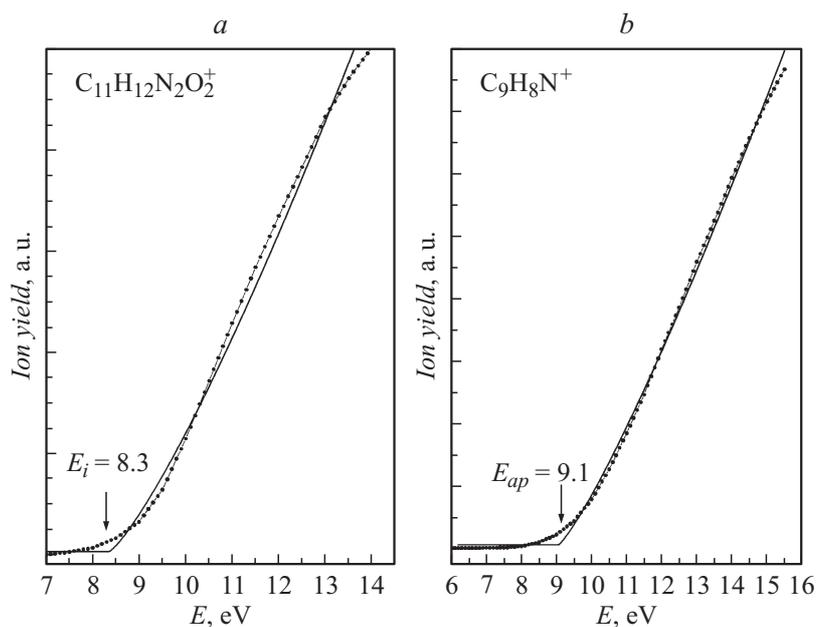


Рис. 2. Схема процесса ионизации молекулы триптофана.

молекуле индола, составляет не более 4% от основного пика в масс-спектре. Фрагменты с  $m = 103$  и  $77$  amu можно рассматривать как продукты вторичной фрагментации 3-метилениндола ( $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$ ,  $m = 130$ ), основные каналы диссоциативной ионизации которого приводят к появлению ионов с массами  $m = 103$  amu (10%) и  $77$  amu (14%) [9].

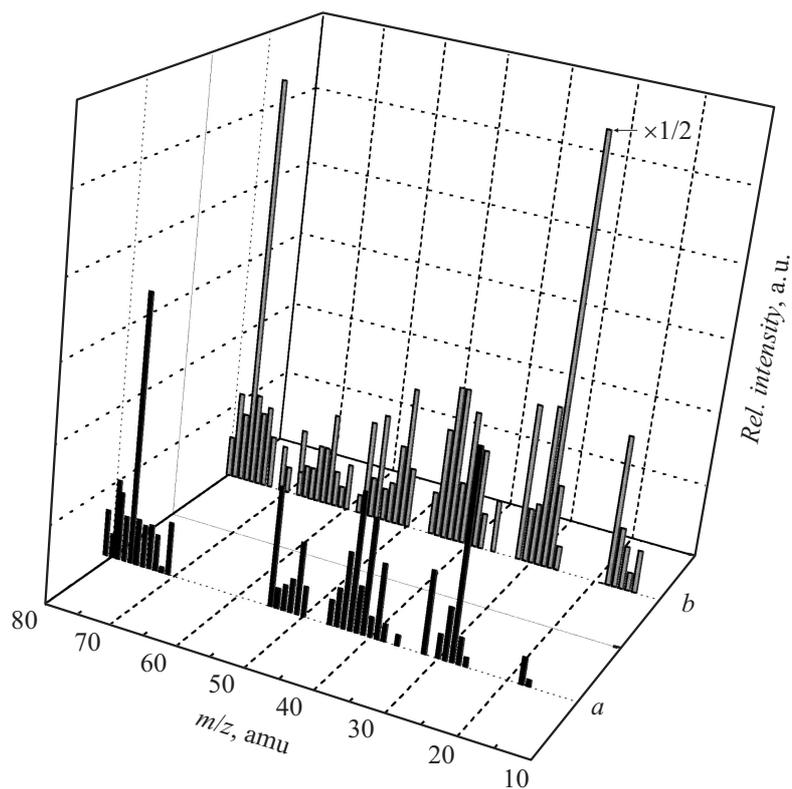
Нами также определены энергии появления наиболее интенсивных компонент масс-спектра. Для примера на рис. 3 приведены зависимости выхода „материнского“ иона  $\text{CH}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2^+$  ( $m = 204$  amu) (рис. 3, *a*) и иона-фрагмента  $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$  ( $m = 130$  amu) от энергии электронов (рис. 2, *b*). Энергия ионизации исходной молекулы, определенная нами, составляет  $8.3 \pm 0.1$  eV, что немного ниже полученных нами аналогичных величин для молекул других алифатических аминокислот [1–3]. Это может быть обусловлено наличием в молекуле триптофана ароматической боковой цепи с меньшим потенциалом ионизации, чем у  $n$ -орбитали атома азота. Известно [8], что фотоэлектронный спектр триптофана является комбинацией спектров индола и аланина, причем одна полоса при меньшей энергии содержит пики, соответствующие ионизации молекулярных орбиталей, локализованных на ароматических кольцах индола, а другая — пики, обусловленные несвязывающими электронами азота амино- и индольной групп. Две первых полосы фотоэмиссионного валентного спектра триптофана коррелируют с энергиями связи электронов 7.80 и 8.35 eV, соответствуя ионизации  $\pi_1$ - и  $\pi_2$ -орбиталей индольной группы. Энергетическая зависимость выхода иона  $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$  (рис. 3, *b*) позволила определить абсолютную величину потенциала его появления, значение которого ( $9.1 \pm 0.1$  eV) ждет своего подтверждения другими авторами.

Нами также измерен масс-спектр триптофана после взаимодействия с высокоэнергетичным пучком электронов. Целью этого исследования



**Рис. 3.** Энергетические зависимости интенсивностей выхода молекулярного иона  $C_{11}H_{12}N_2O_2^+$  (a) и ионного фрагмента  $C_9H_8N^+$  (b) исходной молекулы триптофана. Точки — экспериментальные данные, сплошная линия — результат подгонки методом наименьших квадратов. Стрелками указаны значения энергии ионизации ( $E_i$ ) молекулы триптофана и потенциала появления ( $E_{ap}$ ) ионного фрагмента.

ставилось выявление возможных необратимых структурных изменений в молекулах тканей живых организмов под действием высокоэнергетического ионизирующего излучения. Пучок электронов энергией 9.5 MeV генерировался ускорителем электронов — микротроном М-30. Присутствие тормозного излучения, безусловно, также вносило вклад в результирующий процесс. Интегральный поток составлял  $1.8 \cdot 10^{13}$  e/cm<sup>2</sup>, неоднородность поля облучения вблизи образца не превышала 1%. Облученный на микротроне образец затем исследовался с использованием описанной выше методики, т.е. измерялся его масс-спектр, который сопоставлялся с масс-спектром необлученного вещества (рис. 4). Для



**Рис. 4.** Сравнение масс-спектров необлученной (a) и облученной (b) молекул триптофана.

корректности сопоставления интенсивности пиков „материнского“ иона облученного и необлученного образцов приводились к одному значению.

В целом масс-спектр облученного образца весьма подобен исходному, однако интенсивности пиков некоторых его ионов оказываются (в ряде случаев — значительно) более высокими. Как видно, основными фрагментами спектра являются ионы  $\text{CH}_2\text{N}^+$  ( $m = 28$  amu), а также  $\text{C}_4\text{HN}_2^+$  и/или  $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}^+$  ( $m = 77$  amu). Бесспорно, возможно образование

и других изобарных фрагментов, соответствующих этим пикам, однако указанные представляются нам наиболее достоверными. Видно, что возрастание пика массой 28 аму вследствие высокоэнергетического облучения составило более 4 раз, а пика массой 77 аму — более 1.5 раза, т. е. выявленные нами эффекты вызваны стойкими изменениями структуры исходной молекулы.

Резюмируя, можно заключить, что нами исследована фрагментация молекулы триптофана электронами как малых, так и высоких энергий. Впервые измерены масс-спектры исследуемой молекулы при указанных энергиях, энергия ионизации исходной молекулы и потенциал появления ее основного ионного фрагмента. Отождествлены основные продукты фрагментации молекулы, показано, что воздействие ионизирующего излучения высокой (порядка 10 MeV) энергии и интенсивности вызывает стойкие изменения структуры молекул аминокислоты. По нашим данным подобные сведения в литературе в настоящее время отсутствуют.

Авторы признательны В.Т. Маслюку за поддержку и помощь в проведении исследований.

## Список литературы

- [1] Вукстич В.С., Имре А.И., Снегурский А.В. // Письма в ЖТФ. 2009. Т. 35. С. 1–8.
- [2] Tamuliene J., Romanova L.G., Vukstich V.S., Snesursky A.V. // Chem. Phys. 2012. V. 404. P. 74–81.
- [3] Вукстич В.С., Романова Л.Г., Снегурский А.В. // Письма в ЖТФ. 2012. Т. 38. С. 97–103.
- [4] Tamuliene J., Romanova L.G., Vukstich V.S., Snegursky A.V. // Nucl. Instrum. Meth. 2012. V. B 279. P. 128–134.
- [5] Jalkanen K.J., Elstner M.M., Suhai S. // J. Mol. Struct. (Theochem). 2004. V. 675. P. 61–77.
- [6] Abdoul-Carrime H., Gohke S., Illenberger E. // Chem. Phys. Lett. 2005. V. 405. P. 497–502.
- [7] Talbot F.O., Tivault T., Rodolphe A., Broyer M., Dugourd P. // J. Chem. Phys. 2005. V. 122. P. 074310-(1–5).
- [8] Plekan O., Feyer V., Richter R., Coeno M., Prince K.C. // Mol. Phys. 2008. V. 106. P. 1143–1153.

- [9] National Institute of Standards, Standard Reference Database: Chemistry Webbook. <http://webbook.nist.gov>.
- [10] Вукстич В.С., Имре А.И., Снегурский А.В. // ПТЭ. 2011. № 2. С. 66–72.
- [11] Ptasinska S., Candori P., Denifl S., Yoon S., Grill V., Scheier P., Maerk T.D. // Chem. Phys. Lett. 2005. V. 409. P. 270–276.
- [12] Hanel G., Gstir B., Fiegele T., Hagelberg F., Becker K., Scheir P., Snegursky A., Maerk T. // J. Chem. Phys. 2002. V. 116. P. 2456–2463.
- [13] Vurstich V.S., Imre A.I., Romanova L.G., Snegursky A.V. // J. Phys. 2010. V. 43. P. 185 208-(1–6).