

02;02.2;02.4

Масс-спектрометрия молекул глутаминовой кислоты и глутамина в газовой фазе

© А.Н. Завилопуло, А.И. Булгакова

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

Поступило в Редакцию 9 июля 2019 г.

В окончательной редакции 9 июля 2019 г.

Принято к публикации 18 сентября 2019 г.

Описаны методика и результаты масс-спектрометрических исследований выхода положительных ионов в газовой фазе, образованных в результате диссоциативной ионизации молекул аминокислот глутаминовой кислоты и глутамина электронным ударом. Эксперимент проводился на установке с монополярным масс-спектрометром типа МХ-7304А в диапазоне массовых чисел 10–150 Da, исследовались масс-спектры этих молекул при разных температурах. Детально проанализированы особенности процессов образования ионов-фрагментов молекул глутаминовой кислоты и глутамина электронным ударом, а также исследована динамика выхода ионов-фрагментов в интервале температур испарения исходного вещества 310–430 К.

Ключевые слова: масс-спектр, аминокислота, диссоциативная ионизация, ион-фрагмент.

DOI: 10.21883/PJTF.2019.24.48801.17968

Аминокислоты — биологически важные органические соединения, которые являются структурными блоками белков, содержат аминную ($-\text{NH}_2$) и карбоксильную ($-\text{COOH}$) группы. Большинство белков состоит из комбинации девятнадцати так называемых „первичных“ аминокислот, т.е. содержащих первичную аминогруппу, и одной „вторичной“ аминокислоты пролина, или иминокислоты (содержит вторичную аминогруппу), которые называются стандартными, или протеиногенными, аминокислотами [1]. Аминокислоты обнаружены в межзвездных облаках, в метеоритах, что подтверждает одну из гипотез о внеземном происхождении жизни на Земле. Глутаминовая кислота является нейромедиаторной аминокислотой, одним из важных представителей класса „возбуждающих аминокислот“ [1]. Она, так же как глутамин, относится к группе заменимых аминокислот и играет важную роль в организме, особенно для иммунной системы. Глутамин, который в организме проникает через клеточные мембраны и поддерживает синтез белка, стабилизирует уровень жидкости внутри клеток, поставяет азот для синтеза пуринового кольца и других жизненно важных соединений, таких как нуклеотиды, глюкозамин, аспарагин.

Известно, что взаимодействие ионизирующего излучения с живыми организмами приводит к возникновению критических эффектов: деградации живых клеток с необратимыми изменениями и возникновением канцерогенных модификаций в живых тканях. Большинство подобных изменений вызвано низкоэнергетическими ($< 100 \text{ eV}$) электронами, которые разрушают молекулярных связей в живых клетках [2,3]. Именно поэтому взаимодействие медленных электронов со сложными молекулами, в том числе с молекулами

аминокислот, вызывает значительный интерес с точки зрения отслеживания преобразований в живых клетках под действием ионизирующего излучения. Несмотря на безоговорочную значимость изучения основных механизмов структурных изменений в молекулах аминокислот под действием низкоэнергетических электронов, данных такого рода довольно мало. Одним из важных методов исследования структуры вещества и физических процессов, происходящих в нем, является масс-

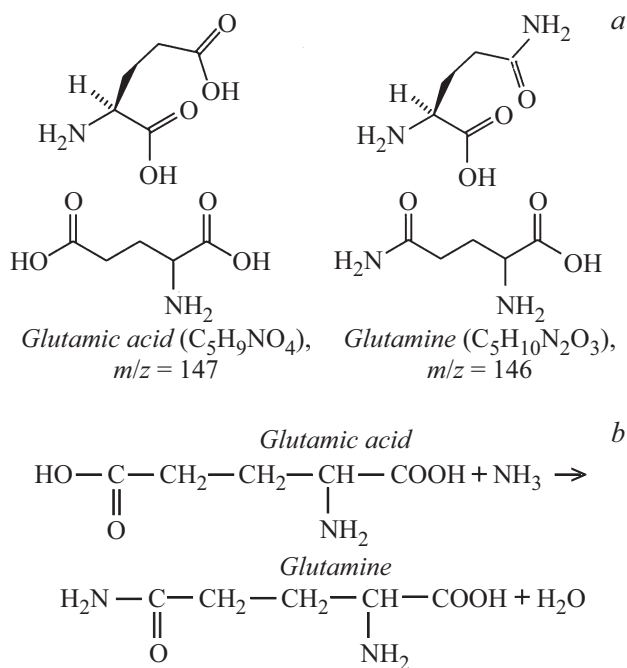


Рис. 1. Структурные схемы глутаминовой кислоты и глутамина (a) и схема реакции синтеза глутамина из глутаминовой кислоты (b).

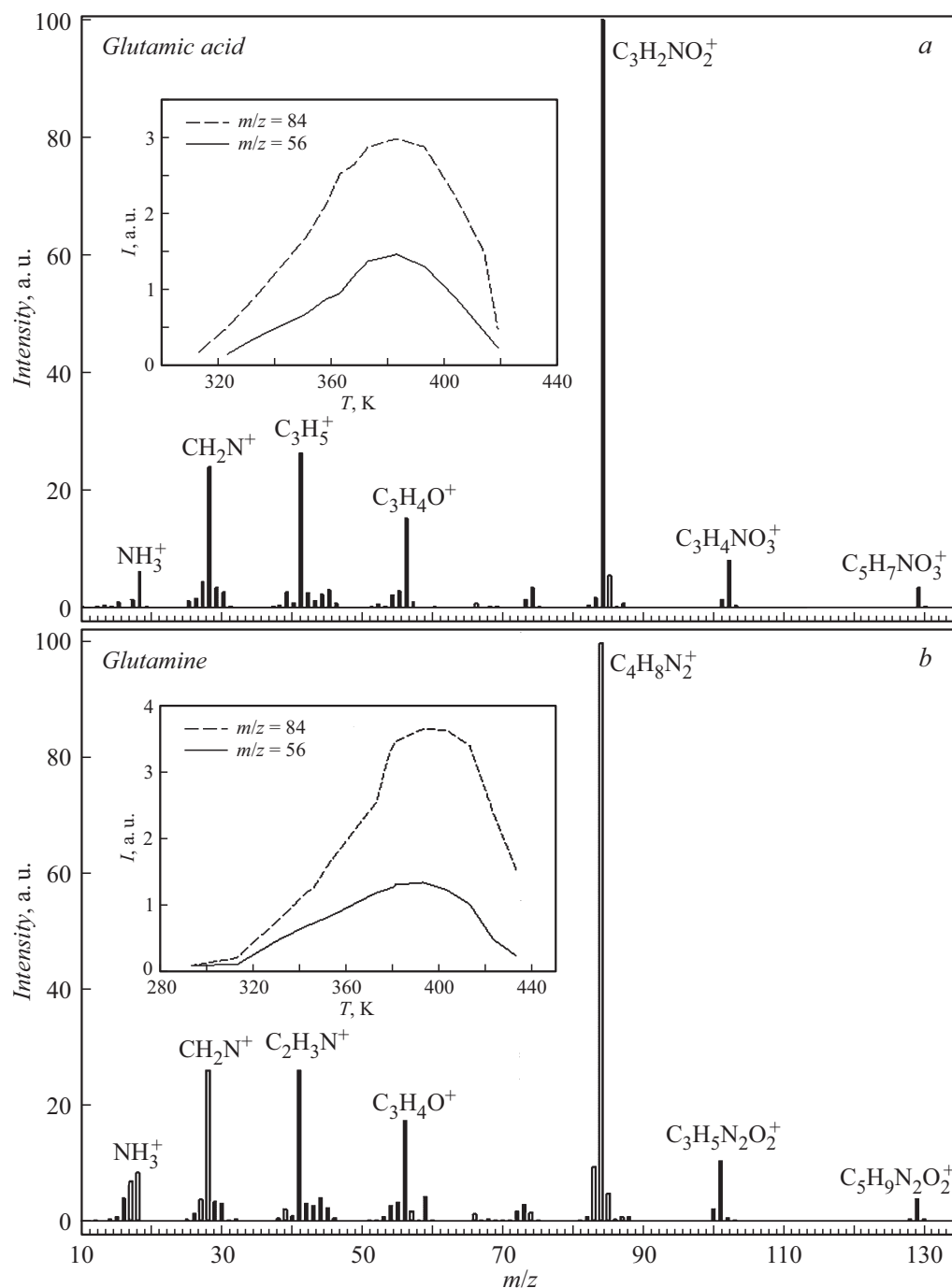


Рис. 2. Масс-спектры глутаминовой кислоты (a) и глутамина (b). На вставках — зависимости образования положительных ионов-фрагментов ($m/z = 84$ и 56) от температуры.

спектрометрический, который позволяет методом электронного удара получать всестороннюю информацию о фрагментации исходных молекул в газовой фазе [4].

Целью настоящей работы является исследование процесса ионизации глутаминовой кислоты и глутамина в газовой фазе масс-спектрометрическим методом при различных температурах испарения исходного вещества, а также измерение энергетических зависимостей образования положительных ионов материнской молекулы глутаминовой кислоты ($C_5H_9NO_4^+$) и глутамина ($C_5H_{10}N_2O_3^+$) электронным ударом.

Свойства белков определяются характеристиками входящих в их состав аминокислот, максимальный отрицательный заряд которых локализован на атомах кислорода карбоксильной группы и молекул воды. На всех же атомах водорода локализован положительный заряд.

На рис. 1, a представлены структурные схемы глутаминовой кислоты и глутамина, которые наглядно демонстрируют локализацию зарядов.

На рис. 1, a представлены структурные схемы глутаминовой кислоты и глутамина, которые наглядно демонстрируют локализацию зарядов.

стрируют отличительные особенности данных молекул (разница в молекулярном весе составляет всего 1 Da): в глутамине гидроксильная группа кислотного остатка глутаминовой кислоты заменена аминогруппой. На рис. 1, *b* показана реакция взаимодействия глутаминовой кислоты с аммиаком, благодаря которой образуется глутамин. Молекулы аминокислот существуют в виде различных конформеров. Карбоксильная группа может вращаться, а атом водорода может ориентироваться как в направлении азота, так и в обратном направлении. Кроме того, конформационная изменчивость молекул способствует переориентировке гибкой ($-\text{COOH}$) и аминной ($-\text{NH}_2$) групп, при этом образуются различные внутримолекулярные водородные связи, которые, например, связывают неразделенную пару атомов азота с водородом гидроксильной группы ($\text{N} \dots \text{HO}$) или же устанавливают связь между атомом водорода аминной группы и атомом кислорода карбонильной ($\text{NH} \dots \text{O}=\text{C}$) и гидроксильной ($\text{NH} \dots \text{OH}$) групп (рис. 1).

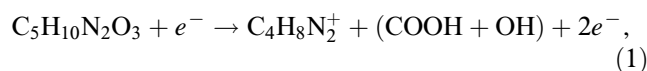
Нами ранее проведены масс-спектрометрические исследования для атомарных [5] и молекулярных объектов, в том числе для биомолекул [6,7]. Эксперимент выполнен на установке [8], где в качестве аналитического прибора использовался монополюсный масс-спектрометр MX 7304A с разрешением по массе ΔM не хуже 1 Da. Молекулярный пучок исследуемых молекул глутаминовой кислоты и глутамина (фирмы Sigma-Aldrich) формировался с помощью источника эффузионного типа, что обеспечивало концентрацию молекул в области пересечения с электронным пучком в пределах $5 \cdot 10^{10} - 10^{11} \text{ cm}^{-3}$. Источник ионов с электронной ионизацией работал в режиме стабилизации электронного тока и позволял получать пучки электронов с фиксированной энергией от 5 до 70 eV при токах 0.05–0.5 mA и разбросом по энергиям $\Delta E_{1/2} = 250 \text{ meV}$. Калибровка шкалы масс осуществлялась по изотопным пикам атомов Ar, Kr и Xe, а шкалы энергий электронов — по начальным участкам (4–15 eV) сечения ионизации атома Kr и молекулы N_2 . Эксперимент проводился в два этапа: на первом этапе исследовались масс-спектры (МС) при разных температурах, а на втором измерялись энергетические зависимости относительных сечений образования положительных ионов $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4^+$ и $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3^+$ в диапазоне энергий ионизирующих электронов 5–40 eV. После этого проводились многократные измерения МС таким образом, чтобы обеспечить точность на уровне 1.5%. При измерении температурных зависимостей образования положительных ионов-фрагментов специальное устройство с обратной связью позволяло поддерживать температуру молекул в газовой фазе с точностью $\pm 0.005 \text{ K}$.

На рис. 2 показаны МС глутаминовой кислоты и глутамина в диапазоне масс 10–135 Da, полученные при температуре источника молекул 380 и 420 K соответственно, энергия ионизирующих электронов $U_e = 70 \text{ eV}$. Большинство наблюдаемых масс-пиков характерно для

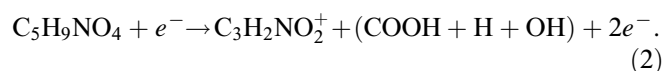
фрагментации молекул аминокислот [9], у которых доминантный канал фрагментации связан с потерей нейтрального радикала COOH . Общим для обоих МС является наличие интенсивного пика при $m/z = 84$. Однако при сравнении относительных интенсивностей наблюдается большое различие (см. таблицу): интенсивности пиков при $m/z = 16$ и 59 в МС глутамина более чем в 40 раз выше, чем в МС глутаминовой кислоты. Также существенное различие интенсивностей наблюдается для пиков $m/z = 17, 18, 44, 73, 83, 101$. С другой стороны, интенсивности пиков $m/z = 74$ и 102 в МС глутаминовой кислоты в 2 и 11 раз больше, чем для соответствующих пиков в МС глутамина.

Анализ полученных МС позволяет сделать заключение о механизмах образования наиболее интенсивных ионов-фрагментов при диссоциативной ионизации электронами. Заметим, что процесс ионизации приводит к ослаблению связей в молекулярном ионе по сравнению с нейтральной молекулой. Самый интенсивный ион-фрагмент с $m/z = 84$ может образовываться в процессе потери COOH и атомов водорода и кислорода:

в случае глутамина



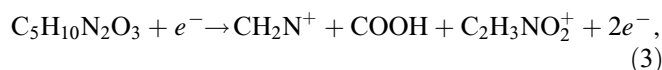
в случае глутаминовой кислоты



Далее в масс-спектре выделяются следующие пики.

Пик при $m/z = 28$. Этому пику могут соответствовать изобарные ионы CO^+ и CH_2N^+ . Однако предпочтение следует отдать последнему, поскольку образование именно фрагмента HC-NH является доминирующим в процессах диссоциации молекул аминокислот [2]:

в случае глутамина

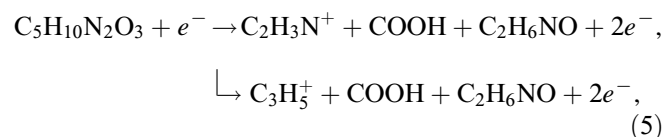


в случае глутаминовой кислоты

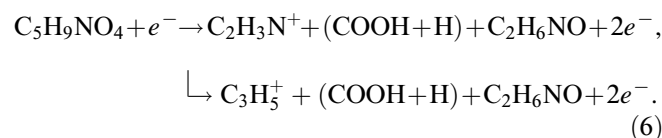


Пик при $m/z = 41$. Этому пику могут соответствовать изобарные ионы $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}^+$ или C_3H_5^+ :

в случае глутамина



в случае глутаминовой кислоты

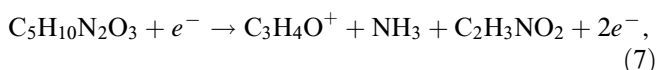


Относительные интенсивности ионов-фрагментов молекул глутамина и глутаминовой кислоты

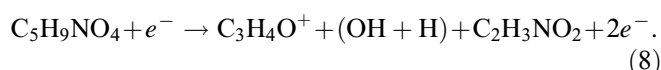
Ион	m/z , Da	Глутамин $C_5H_{10}N_2O_3$			Глутаминовая кислота $C_5H_9NO_4$		
		Наст. раб. $T = 420$ К	NIST [10] –	SDBS [11] $T = 430$ К	Наст. раб. $T = 380$ К	NIST [10] –	SDBS [11] $T = 413$ К
NH_2^+	16	4.96	4.69	4.7	0.1	0.1	
$NH_3^+(OH^+)$	17	6.96	6.69	6.7	1.38	1.3	1.8
CH_2N^+	28	25.99	26.09	26.1	24.5	24.7	26.7
CH_3N^+	29	2.82	3.39	3.4	3.4	3.49	3.5
CH_4N^+	30	2.48	3.7	3.4	2.6	2.7	2.7
$C_2H_3N^+(C_3H_5^+)$	41	24.99	26.49	26.5	26.2	27.7	27.7
$C_2H_4N^+$	42	2.22	3.09	3.1	2.6	2.5	2.5
$C_3H_7^+$	43	1.95	2.59	2.6	1.15	1.2	3.4
$COOH^+$	45	3.85	4.19	4.2	3.2	3.1	3.0
C_2HNO^+	55	2.79	3.49	3.5	2.9	2.8	2.8
$C_3H_4O^+$	56	17.86	18.69	18.7	15.2	15.3	15.3
$C_2H_5NO^+$	59	3.78	4.49	4.5	0.08	0.1	–
$C_2H_3NO_2^+$	73	2.78	2.99	3.0	1.35	1.4	1.4
$C_2H_2NO_2^+$	74	1.52	1.59	1.55	3.4	3.4	3.4
$C_3HNO_2^+$	83	8.91	9.69	9.7	1.67	1.7	1.7
$C_4H_8N_2^+(C_3H_2NO_2^+)$	84	100	100	100	100	100	100
$C_3H_3NO_2^+$	85	4.49	4.99	5.0	5.55	5.6	5.6
$C_3H_3NO_3^+$	101	10.35	10.39	10.4	1.28	1.3	1.3
$C_3H_4NO_3^+$	102	0.6	0.7		8.06	8.1	8.1
$C_3H_7NO_3^+$	129	4.11	4.09	4.1	3.4	3.5	3.5

Пик при $m/z = 56$. Фрагмент $C_3H_4O^+$ возникает в результате разрыва связи между атомами углерода в скелетной цепи молекулы (рис. 1):

в случае глутамина

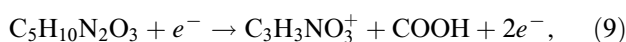


в случае глутаминовой кислоты

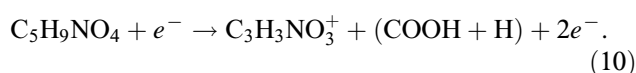


Отметим, что в оптических спектрах интенсивными являются линии, соответствующие молекулам азота, оксида углерода и циана из карбоксильной ($-COOH$) и аминной ($-NH_2$) групп [12]. Это свидетельствует о том, что наименьшую энергию имеют связи $C-C$, $N-C$, $C-O$, что приводит к появлению в масс-спектре ионов-фрагментов карбоксильной и аминногрупп. Действительно, пик при $m/z = 101$ может появляться при разрыве связи $C_\alpha - C_\beta$ и приводить к образованию молекулярного иона оксазолидиндиона $C_3H_3NO_3^+$:

в случае глутамина



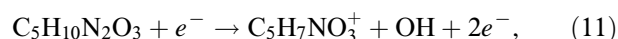
в случае глутаминовой кислоты



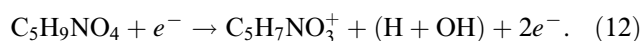
Следует обратить внимание на присутствие в МС пиков с массой $m/z = 129$, причем их относительные

интенсивности почти одинаковы (см. таблицу). Можно предположить, что под действием низкоэнергетических электронов образуется пироглутаминовая кислота $C_5H_7NO_3$:

в случае глутамина



в случае глутаминовой кислоты



Естественно, что более полный анализ процессов (1)–(12) можно провести с привлечением теоретических расчетов энергий связи. В случае процессов фотоионизации это сделано в [4].

В таблице наши результаты сравниваются с данными [10,11]. Наблюдается неплохое согласие приведенных относительных величин масс-пиков, причем температура испарения молекул глутамина приведена только в [11], где она равнялась 430 К, т.е. на 10 К больше, чем в нашем эксперименте.

Известно [6], что температура исследуемых молекул существенным образом влияет на процесс диссоциативной ионизации. Нами измерены температурные зависимости выхода положительных ионов-фрагментов. В качестве примера на рис. 2 показаны такие зависимости для двух интенсивных ионов-фрагментов: $C_3H_2NO_2^+$ ($m/z = 84$) и $C_3H_4O^+$ ($m/z = 56$). Ход температурных зависимостей подобен: на начальном участке интенсивность сигнала возрастает, затем следуют насыщение в

области температур 370–410 К и далее довольно резкий спад, связанный с началом разложения исследуемых веществ. Обращают на себя внимание особенности на измеренных зависимостях, которые следует отнести за счет описанных выше процессов (1)–(12).

Энергетические зависимости относительных сечений ионизации исходных молекул измерялись в интервале энергий налетающих электронов 5–70 eV: в припороговой области 5–15 eV с шагом по энергии 0.2 eV, а в области 15–70 eV с шагом 1.0 eV. При отключенных потенциалах на отклоняющих электродах масс-спектрометра измерялся полный (суммарный) ток ионов на коллектор. Таким образом регистрировалась энергетическая зависимость полного относительного сечения образования положительных ионов, полученных в результате ионизации исследуемых молекул электронами. Характерной особенностью энергетической зависимости являются довольно резкий рост сечения у порога и наличие особенностей в виде небольших изломов. По пороговым участкам кривой с помощью известной процедуры подгонки с использованием алгоритма Levenberg–Marquardt [7,13] определена энергия ионизации молекул глутамина ($E_{IE} = 8.8 \pm 0.25$ eV) и глутаминовой кислоты ($E_{IE} = 8.9 \pm 0.25$ eV).

В заключение отметим, что масс-спектрометрические исследования аминокислот методом электронного удара в газовой фазе дают богатую информацию об их уникальных свойствах, позволяют определить величину степени фрагментации в процессе взаимодействия с электронами, оценить параметры межмолекулярных связей.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Е.Ю. Ремете за полезные дискуссии при выполнении данной работы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1985. 75 с.
- [2] Sanche L. // *Rad. Phys. Chem.* 2016. V. 128. P. 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.05.008>
- [3] Christopher M.J., Bernier M., Carson E., Colyer K.E., Metz R., Pawlow A., Wischow E.D., Webb I., Andriole E.J., Poutsm J.C. // *Int. J. Mass Spectr.* 2007. V. 267. P. 54–62.
- [4] Bonner J., Lyon Y.A., Nellessen C., Julian R.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. P. 10286–10293. DOI: 10.1021/jacs.7b02428
- [5] Шпенник О.Б., Завилопуло А.М., Филиппинец О.В. // *Допов. Нас. Акад. Наук Укр.* 2018. № 5. С. 44–52. DOI: doi.org/10.15407/dopovidi2018.04.044
- [6] Zaviropulo A.N., Shpenik O.B., Mylymko A.N., Shpenik V.Yu. // *Int. J. Mass Spectr.* 2019. V. 441. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2019.03.008>
- [7] Ostroverkh A., Zaviropulo A., Shpenik O. // *Eur. Phys. J. D.* 2019. V. 73. P. 38. <https://doi.org/10.1140/epjd/e2019-90532-3>
- [8] Завилопуло А.Н., Шпенник О.Б., Филиппинец О.В. // *ЖТФ.* 2019. Т. 89. В. 1. С. 16–21.
- [9] Papp P., Shchukin P., Kočíšek J., Matejíček Š. // *J. Chem. Phys.* 2012. V. 137. P. 105101. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4749244>
- [10] NIST Standard Reference Database. <http://www.webbook.nist.gov>
- [11] Spectral Database for Organic Compounds SDBS. <https://sdb.sdb.aist.go.jp>
- [12] Мигович М.И., Кельман В.А. // *Оптика и спектроскопия.* 2016. Т. 121. В. 1. С. 69–74.
- [13] Fiegele T., Hanel G., Torres I., Lezius M., Märk T.D. // *J. Phys. B.* 2000. V. 33. P. 4263–4283.