

УДК: 539.184.5

PACS: 82.80.Ms

DOI: 10.24144/2415-8038.2018.44.148-153

О.В. Снігурський, Л.Г. Романова, О.В. Папп, В.С. Вукстич

Інститут електронної фізики НАН України, вул. Університетська, 21, 88017, Ужгород

e-mail: rappalex13@gmail.com

МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ ПРОЦЕСІВ ДИСОЦІАТИВНОЇ ІОНІЗАЦІЇ МОЛЕКУЛ ГЛУТАМІНУ

Здійснено експериментальне дослідження фрагментації молекул глютаміну електронами малих енергій. Основний акцент зроблено на механізмах утворення позитивно заряджених фрагментів із вихідних молекул. Головну увагу приділено енергетичним характеристикам виходу іонних фрагментів. Проведено інтерпретацію мас-спектру, та визначено хімічний склад основних іонних фрагментів.

Ключові слова: глютамін, іонізація, мас-спектр, потенціал появи.

Вступ

Амінокислоти – біологічно важливі органічні сполуки, які містять амінну ($-\text{NH}_2$) та карбоксильну ($-\text{COOH}$) групи, як правило, разом з бічним ланцюгом, специфічним для кожної амінокислоти.

Біля 20% людського тіла складається з білків. Білки відіграють вирішальну роль практично у всіх біологічних процесах, що відбуваються у живих організмах, а амінокислоти є їх структурними блоками. Оскільки більша частина наших клітин, м'язів та тканин складається з амінокислот, вони відповідальні за значне число важливих функцій організму, однією з найважливіших з яких є процеси метаболізму (обміну речовин).

Відомо, що взаємодія іонізуючого випромінювання з живими організмами має своїм наслідком ряд критичних ефектів, що відбуваються на генетичному рівні [1]. Деградація живих клітин пов'язана з прямою дією іонізуючого випромінювання високої енергії, з незворотними змінами при утворенні хімічно-активних радикалів у великій кількості, а також з виникненням канцерогенних змін у живих тканинах [2]. У той же час більшість подібних змін викликана саме вторинними, низько енергетичними ($< 100\text{eV}$) електронами, здатність яких до руйнування складових амінокислот призводить до фатальних розривів молекулярних зв'язків у живих

клітинах [3]. Саме тому взаємодія повільних електронів зі складними молекулами, в тому числі з молекулами амінокислот, викликає значний інтерес з точки зору відстеження перетворень у живих клітинах під дією іонізуючого випромінювання.

Не дивлячись на беззастережну важливість вивчення основних механізмів структурних змін у молекулах амінокислот під дією низькоенергетичного електронного удару, дані такого роду є далеко не повними та узгодженими. Згідно з базою даних Національного Інституту Стандартів США (NIST), наявні на сьогодні дані з деградації (фрагментації) молекул амінокислот є значною мірою суперечливими, у той час як відомості про потенціали іонізації "материнських" молекул та енергії появи їх іонізованих фрагментів взагалі викликають небезпідставний сумнів [4].

L-глютамін є заміною амінокислотою, а відповідно може утворюватися природним чином у організмі людини. Глютамін є найбільш поширеною амінокислотою в крові та інших рідинах організму людини [5]. Тим не менш, існують випадки (травми, або хвороби), коли потреби у глютаміні в організмі людини є більшими, ніж швидкість його утворення. Тому глютамін вважається умовно незамінною амінокислотою. Крім того, глютамін відіграє важливу роль для імунної системи та здоров'я кишечника (6).

Експеримент

Експериментальні дослідження проводилися з використанням мас-спектрометричного методу з використанням техніки молекулярного та електронного пучків, що перетинаються під кутом 90° з подальшою екстракцією продуктів іонізації та їх аналізу. Мас-спектрометричні вимірювання проводилися на експериментальній установці МИ1201. Магнітні мас-спектрометри МИ1201 отримали широке застосування в різних дослідницьких установах ще в 70–80-х роках минулого століття [7]. На сьогодні деякі елементи цих досить дорогих комплексів трохи застаріли і вичерпали свій ресурс. Тим не менше, за умови відповідної модернізації МИ1201, він може успішно експлуатуватися і надалі.

З метою покращення робочих параметрів вказаного приладу, а саме для реалізації нових схемних рішень, що мають на меті автоматизацію процесу мас-спектрометричного експерименту, які б забезпечували автоматичне керування розгорткою мас-спектру, роботою джерела іонів мас-спектрометра та реєстрацією ряду важливих параметрів експерименту (інтенсивності піків, відношення маси досліджуваних іонів до їх заряду – m/z , температури робочої речовини та елементів мас-спектрометра), було здійснено його суттєву модернізацію.

На рис. 1 зображено загальну блок-схему модернізованої системи реєстрації мас-спектрометра.

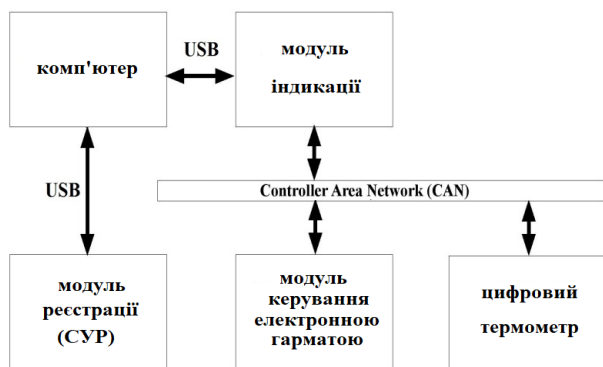


Рис. 1. Загальна блок-схема системи реєстрації.

У процесі експерименту зразок досліджуваної речовини був поміщений

ефузійну комірку циліндричної форми, яка знаходить у джерелі іонів мас-спектрометра. Джерела електронного та молекулярного пучків вводилися в оптимальні режими роботи. З метою дегазації внутрішніх стінок установки перед проведенням досліджень аналітичну частину та іонізаційну камеру установки прогрівали протягом 2 годин при температурі 150°C .

Ефузійне джерело розігрівалося до необхідної температури, останнє стабілізувалося цифровим термометром. Вимірювання температури проводилися із точністю $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Як вже згадувалося, амінокислоти можуть сильно потерпати від термічної деградації при зовнішньому нагріванні, тому вказані мас-спектри вимірювалися послідовно при різних значеннях температури. Проаналізовані дані показали, що оптимальним діапазоном значень температур є $60\text{--}120^\circ\text{C}$. Мас-спектри отримувалися при постійних значеннях температури ефузійної комірки і струму емісії іонізуючих електронів та були нормовані за основним (найбільш інтенсивний пік у спектрі) піком у спектрі. Крім мас-спектрів, також вимірювалися енергії іонізації вихідних молекул та потенціали (енергії) появи їх основних фрагментів. Вимірювання останніх проводилися у області енергій $8\text{--}12$ еВ. Експериментальні пороги іонізації вказаних об'єктів визначалися шляхом підгонки вимірюваних кривих іонізації з використанням алгоритму Маркуардта-Левенберга методу найменших квадратів.

Результати та їх обговорення

Вимірюваний мас-спектр молекули глутаміну представлений на рис. 2. На рис. 3–5 наведено порогові ділянки кривих виходу основних іонних фрагментів. Всі наведені криві демонструють подібну поведінку, та відрізняються тільки у нахилах у порогових ділянках, та у абсолютних значеннях потенціалів появи вказаних фрагментів.

Іонізація молекули глутаміну найімовірніше відбувається за рахунок неподіленої електронної пари атома азоту з подальшим розривом зв'язку з суміжним атомом вуглецю. Але відповідно до отриманого мас-спектру, видно, що

інтенсивність відповідних піків, а саме $m=16$ а.о.м., та $m=130$ а.о.м., є дуже мала. Подібна картина спостерігається і на мас-спектрах NIST[8]. Це може бути пов'язано з тим, що вищезгадані продукти іонізації не є позитивно заряджені та не можуть бути виявлені за допомогою мас-спектрометра та/або утворені позитивно заряджені фрагменти є нестабільними.

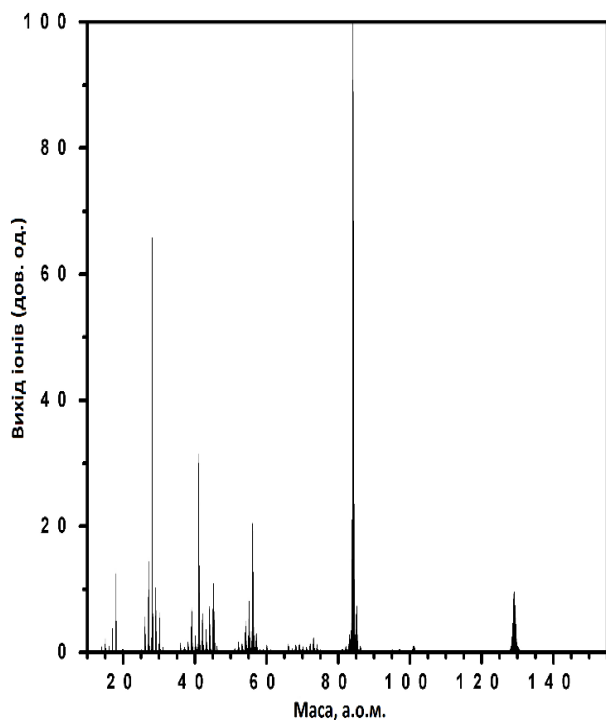
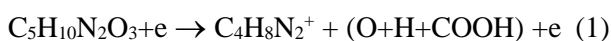


Рис. 2. Мас-спектр молекули глутаміну.

Найбільший пік мас-спектра глутаміну відповідає іону з масою $m=84$ а.о.м. Цей фрагмент може бути утворений у процесі втрати COOH та атомів водню і кисню, при дисоціації подвійного зв'язку карбонільної групи. Найімовірніше, що цей процес є не каскадним, тобто дисоціація відповідних зв'язків відбувається одночасно. Отже, канал утворення фрагмента $m=84$ а.о.м. можна записати так:



Значення енергії появи даного фрагмента було отримано експериментально, та склало 8.5 ± 0.2 eV.

Наступним інтенсивним піком у мас-спектрі є фрагмент масою $m=56$ а.о.м., що у випадку мінімальної кількості структурних перетворень відповідає фрагменту C_2H_4NO .

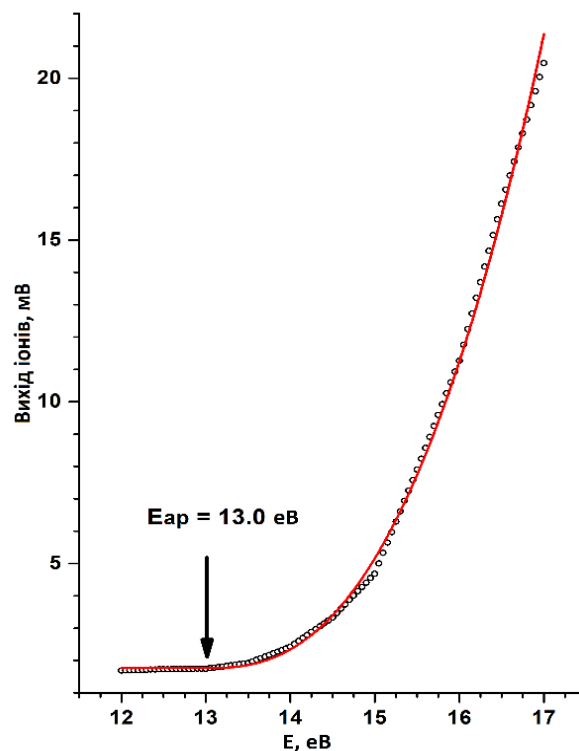


Рис. 3. Функція виходу іонного фрагмента $m=56$ а.о.м. Точки – дані експерименту. Суцільна крива – результат підгонки. Стрілка – положення порогу появи.

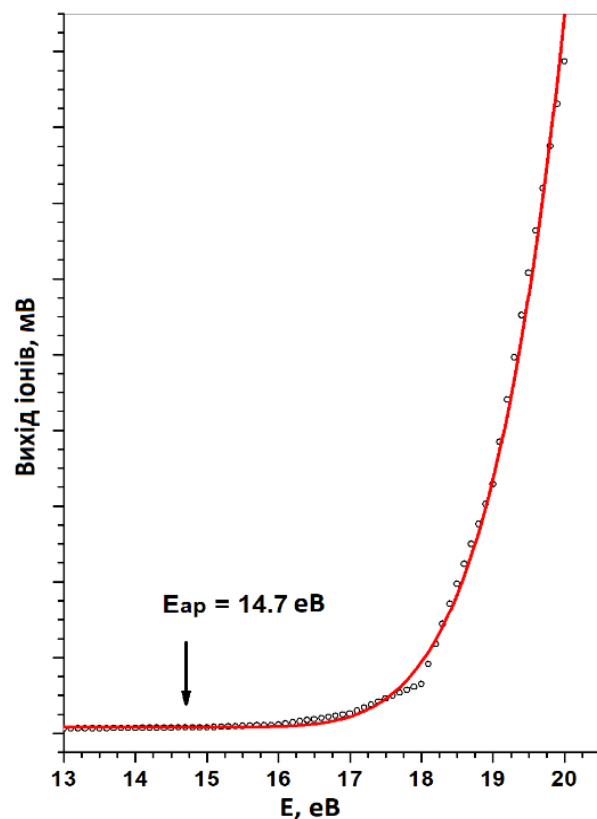


Рис. 4. Функція виходу іонного фрагмента $m=41$ а.о.м. Точки – дані експерименту. Суцільна крива – результат підгонки. Стрілка – положення порогу появи.

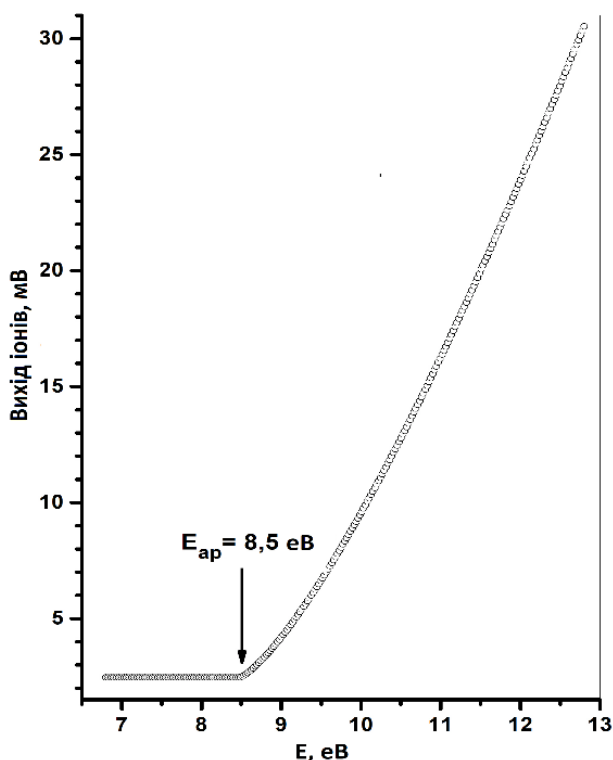


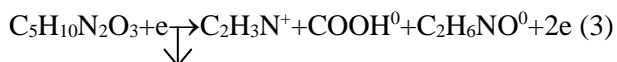
Рис. 5. Функція виходу іонного фрагмента $m=84$ а.о.м. Точки – дані експерименту. Суцільна крива – результат підгонки. Стрілка – положення порогу появи.

Цей фрагмент може утворитися за рахунок дисоціації зв'язку між атомами вуглецю скелетного ланцюга молекули за схемою:



Вимірне значення енергії появи фрагмента $m=56$ а.о.м. склало 13.0 ± 0.2 eV.

Катіон із масою $m=41$ а.о.м. може відповідати двом ізобарним іонам, а саме: C_3H_5 або C_2H_3N відповідно до наступних каналів дисоціації:



Пік з масою $m=28$ а.о.м. може бути пов'язаний з іонами HC-NH та CO. Потрібно наголосити, що саме HC-NH є характерним фрагментом при дисоціації молекул амінокислот. На рис.6 зображено схематично утворення фрагмента HC-NH.

Відповідно до наявних фотоелектронних спектрів [9] при взаємодії з низькоенергетичними електронами

глутамін утворює цикл та формує піроглутамінову кислоту, маса якої 129 а.о.м. Подальший розпад цієї структури під дією іонізуючого випромінювання призводить до утворення фрагментів із масами та інтенсивностями, аналогічними продуктам розпаду молекули глутаміну [8]. На рис.7 зображено структуру піроглутамінової кислоти.

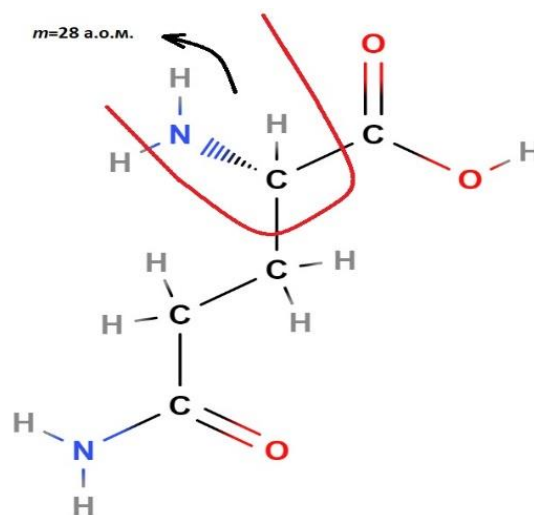


Рис.6. Схема утворення фрагмента $m=28$ а.о.м. з вихідної молекули глутаміну.

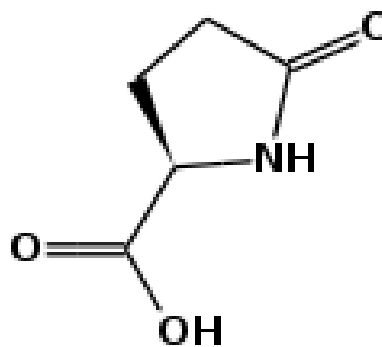


Рис.7. Структура піроглутамінової кислоти, $m=129$ а.о.м.

Даний іон присутній на отриманих нами мас-спектрах, тому, ймовірно, частина іонів у діапазоні мас 1-129 а.о.м. утворюється через вторинну дисоціацію піроглутамінової кислоти.

Висновки

У роботі представлено експериментальне дослідження можливих механізмів фрагментації молекул амінокислоти глутаміну повільними (<100

eV) моноенергетичними електронами. Отримано мас-спектри та значення енергій появи основних іонних фрагментів.

Аналіз мас-спектрів досліджуваної молекули глутаміну демонструє, що основним каналом її фрагментації є утворення іона $C_4H_8N_2^+$ масою $m=84$ а.о.м. Механізм його появи включає не тільки викид нейтрального фрагмента COOH, а також і одночасне відщеплення атомів водню та кисню.

Показано, що дисоціація найслабкішого зв'язку C-C $_{\alpha}$ не є основним каналом фрагментації молекули, та висунуто

припущення, що розрив останнього може призводити до утворення негативно заряджених та/або нестійких фрагментів, які не можуть бути відображені у мас-спектрі.

Присутність у мас-спектрі піка з масою $m=129$ а.о.м. може свідчити про утворення під дією низькоенергетичних електронів циклічної структури піроглутамінової кислоти і тому у діапазоні мас 1-129 а.о.м. фрагментні іони можуть бути утворені шляхом дисоціації як лінійної молекули, так і через вторинну дисоціацію циклічної структури.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Hong-Fang, J., Liang, S., Hong-Yu, Z.: Low lying energy levels of amino acids and its implications for origin of life. *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 756, 109–112 (2005).
2. Michael, B.D., O'Neill, P.A.: *Molecular biology. A sting in the tail of electron tracks.* Science, 287, 1603p (2005).
3. Doolittle, R.F.: Redundancies in protein sequences, in: Fasman, G. D., *Prediction of Protein Structures and the Principles of Protein Conformation*, New York: Plenum, pp. 599–623 (1989).
4. Black, A. (eds.): *The Molecular Origins of Life: Assembling Pieces of the Puzzle.*, Cambridge University Press (1998) 417p.
5. Krishna Rao, R.: Role of Glutamine in Protection of Intestinal Epithelial Tight Junctions. *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology*, 5(1), 47–54. (2012).
6. Kim, H.: Glutamine as an Immunonutrient. *Yonsei Medical Journal*, 52(6), 892. (2011)
7. Масс-спектрометр МИ 1201. Руководство по эксплуатации.: Завод электронных микроскопов, Сумы, 1973, 64 с.
8. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database. (<http://webbook.nist.gov>). Доступно 11 січня 2019.
9. Cannington, P. H., & Ham, N. S.: The photoelectron spectra of amino-acids : A survey. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 15(1), 79–82. (1979).

Стаття надійшла до редакції 08.01.2018 р.

А.В. Снегурский, Л.Г. Романова, А.В. Папп, В.С. Вукстич
Институт электронной физики НАНУ, ул. Университетская, 21, 88017, Ужгород, Украина

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ПРОЦЕССОВ ДИССОЦИАТИВНОЙ ИОНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ ГЛУТАМИНА

Осуществлено экспериментальное исследование фрагментации молекул глутамин электронами малых энергий. Основной акцент сделан на механизмах образования положительно заряженных фрагментов из исходных молекул. Главное внимание уделено энергетическим характеристикам выхода ионных фрагментов. Проведено интерпретацию масс-спектра, и определены химический состав основных ионных фрагментов.

Ключевые слова: глутамин, ионизация, масс-спектр, потенциал появления.

A.V. Snegursky, L.G. Romanova, A.V. Papp, V.S. Vukstich
Institute of Electron Physics. NAS of Ukraine, Voloshina Str., 54,88017, Uzhgorod, Ukraine

MASS SPECTROMETRY OF PROCESSES OF DISSOCIATIVE IONIZATION OF GLUTAMINE MOLECULES

Background: Recently the interest in the radiation-implication-study of amino acids has rapidly increased due to the fundamental importance of the molecules of amino acids. Amino acids belong to biologically relevant organic substances involved in the live organisms. They serve as building blocks of proteins and intermediates in metabolism. The chemical properties of amino acids determine the biological activity of the proteins. The latter do not only catalyze most of the reactions in living cells, they also control all cellular processes. In addition, proteins contain the necessary information needed to determine the structure and the stability of the human body. The availability of such experimental data is the basis for developing new or improving existing theoretical models.

Methods: The electron-impact ionization mass-spectrometric technique was used being combined with the method of normally crossed molecular and electron beams. The experiments were carried out using a modified magnetic МИ-1201 mass-spectrometer. The mass-spectra of the above molecules have been measured together with the energy dependences of their ionization and dissociative ionization cross-sections.

Results: The work represents the mass-spectra of the glutamine molecules measured at energy of ionizing electrons 70 eV. The principal mass-spectra peaks have been identified. Despite the low relative intensity of the fragment ions, the energy dependences of their yield and the ionization potentials (energies) have been measured and obtained, respectively. The absolute values of the appearance energies of the main ionic fragments of the molecules under study have been determined.

Conclusions: The paper presents new data on the electron-impact fragmentation of the amino acid glutamine molecule and they are presented as being related to the formation of the ionized products due to the influence of low-energy ionizing radiation on the above molecule. A series of the produced fragments have been identified. The absolute appearance energies for some of them have been measured experimentally

Key words: molecule, ionization, glutamine, mass-spectrometry.

PACS: 82.80.MS.

REFERENCES

1. Hong-Fang, J., Liang, S., Hong-Yu, Z.: Low lying energy levels of amino acids and its implications for origin of life. *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 756, 109–112 (2005).
2. Michael, B.D., O'Neill, P.A.: Molecular biology. A sting in the tail of electron tracks. *Science*, 287, 1603p (2005).
3. Doolittle, R.F.: Redundancies in protein sequences, in: Fasman, G. D., Prediction of Protein Structures and the Principles of Protein Conformation, New York: Plenum, pp. 599–623 (1989).
4. Black, A. (eds.): The Molecular Origins of Life: Assembling Pieces of the Puzzle., Cambridge University Press (1998) 417p.
5. Krishna Rao, R.: Role of Glutamine in Protection of Intestinal Epithelial Tight Junctions. *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology*, 5(1), 47–54. (2012).
6. Kim, H.: Glutamine as an Immunonutrient. *Yonsei Medical Journal*, 52(6), 892. (2011)
7. Mass-spectrometer МИ 1201. Users manual.: Electron optics factory, Symu, 1973, 64 p.
8. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database. (<http://webbook.nist.gov>). Доступно 11 січня 2019.
9. Cannington, P. H., & Ham, N. S.: The photoelectron spectra of amino-acids : A survey. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 15(1), 79–82. (1979).