

02;12

## Определение атомарного состава изобарных ионов при масс-спектрометрическом исследовании моногидрата L-аспарагина

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

Институт электронной физики НАНУ, Ужгород, Украина  
E-mail: alexander.snegursky@iep.org.ua

Поступило в Редакцию 14 ноября 2011 г.

В диапазоне массовых чисел от 10 до 50 а.е.м впервые исследован масс-спектр молекулы моногидрата L-аспарагина ( $C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$ ) электронным ударом при энергии 70 эВ. Предложена методика, с помощью которой определен наиболее вероятный атомарный состав продуктов фрагментации молекулы. Наибольшая погрешность определения массы фрагмента не превышала 0.04%. Анализатором масс служил магнитный масс-спектрометр МИ-1201, модернизированный на базе IBM PC и цифровой системы управления и развертки.

Важность исследования механизмов структурных изменений в биомолекулах, обусловленных взаимодействием с электронами, не вызывает сомнения [1], поскольку биомолекулы чрезвычайно чувствительны к ионизирующему излучению и это имеет фундаментальное значение для решения проблем мутагенеза и радиационной защиты. Аминокислоты являются простейшими биологически значимыми органическими молекулами и служат удобной модельной системой при изучении радиационных повреждений. L-аспарагин (L-Asn) — одна из 20 природных аминокислот — стабилен как в безводном, так и в гидратированном состоянии при стандартных условиях. В последнее время кристаллический L-аспарагина моногидрат (LAM) и его комплексы активно изучаются с целью применения их в качестве новых нелинейных оптических материалов [2–5], в связи с чем возникает проблема изучения термической и радиационной стабильности этого материала в процессе эксплуатации. Имеющиеся данные по диссоциативной ионизации молекул аминокислот немногочисленны и в значительной степени противоречивы. Основной причиной этого является тот факт,

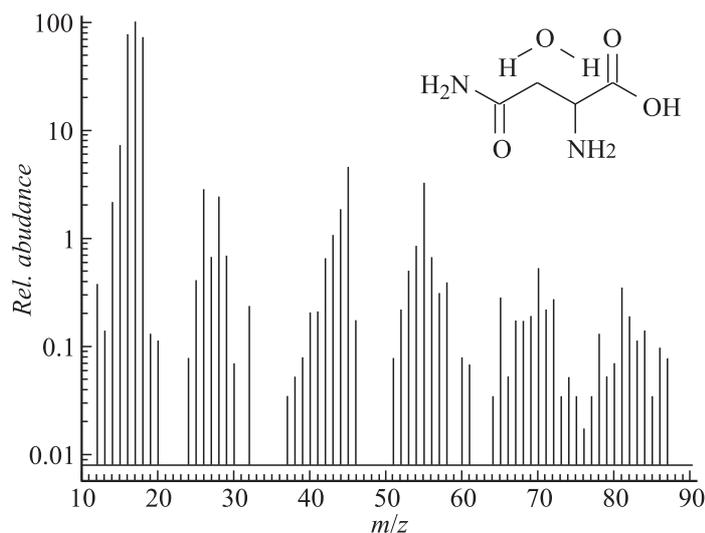
что биомолекулы при экспериментальном исследовании претерпевают фрагментацию как вследствие взаимодействия с налетающим электроном в процессе диссоциативной ионизации, так и в результате термической деструкции вещества при нагревании, необходимом для его перевода в газообразную фазу.

В данной работе приводятся первые результаты экспериментального исследования масс-спектра молекулы LAM при ее бомбардировке электронами, а также сделана попытка точного определения атомарного состава ионных фрагментов спектра в диапазоне масс от 12 до 46 а.е.м.

В качестве аналитического метода нами была применена техника масс-спектрометрии, позволяющая отождествлять продукты взаимодействия и изучать динамику их образования. Исследования выполнены при помощи магнитного масс-спектрометра МИ-1201, ранее подвергнутого существенной модернизации на базе ЭВМ с помощью системы цифрового управления и развертки масс-спектров [6]. Модернизированный масс-спектрометр МИ-1201 обладает стабильной во времени (дрейф нуля  $\sim 1 \text{ mV/h}$ ) и высокочувствительной ( $10^{-16} \text{ A}$ ) регистрацией ионного тока. Импульсная цифровая развертка обеспечивает сканирование спектра масс с минимальным шагом  $\Delta m \sim 0.0001 \text{ а.е.м.}$

Масс-спектры, полученные при постоянной энергии электронов 70 eV, записывались как в аналоговом канале регистрации ионного тока (растровые спектры), так и по точкам в цифровом канале с шагом развертки 0.004 а.е.м при постоянной интегрирования входного сигнала 0.1 с. На рисунке представлен нормализованный масс-спектр молекулы LAM, записанный в диапазоне масс (10–90) а.е.м при температуре источника ионов 160°C. Выход ионов на графике представлен в полугарифмическом масштабе, так как интенсивности пиков в спектре масс различаются в пределах двух порядков. Видно, что масс-спектр состоит из групп пиков, расположенных в пределах не более 8 а.е.м шкалы масс. В данной работе определялись точные массы пиков в группах (12–18), (25–32) и (39–46) а.е.м.

В базе данных NIST [7] не представлен масс-спектр молекулы LAM. Для безводного L-Asn [7] пики ощутимой интенсивности расположены в диапазоне масс от 12 до 90 а.е.м. Сравнение масс-спектров безводного L-Asn и его моногидрата показывает существенные различия в каналах диссоциативной ионизации этих молекул. Так, пик максимальной интенсивности (100%) в масс-спектре L-Asn соответствует отношению массы к заряду  $m/z = 87$ . В спектре LAM его относительная интен-



Нормализованный участок масс-спектра моногидрата L-аспарагина при энергии электронов 70 eV и температуре 160°C. На вставке — структурная формула молекулы  $C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$  ( $m = 150$  amu).

сивность составляет всего 0.09%. Кроме того, значительные различия наблюдаются и в диапазоне 50–70 amu.

Основной причиной отличий выхода фрагментов с одинаковыми целочисленными массами у молекул моногидрата и L-Asn, безусловно, является наличие в ЛАМ структурно связанной молекулы воды. Практическое отсутствие в спектре ЛАМ пика при  $m/z = 87$  amu дает основания предполагать, что молекула воды блокирует отрыв карбоксильной группы, образуя водородные связи с атомом кислорода карбоксильной группы и атомами водорода аминогруппы. Другой существенной причиной, влияющей на интенсивность наблюдаемых пиков, может быть различие в температурных условиях, при которых записывались спектры.

Видно, что масс-спектр ЛАМ характеризуется слабой селективностью. Наличие шести гетероатомов в исходной молекуле и множество возможных каналов фрагментации создают большие трудности при идентификации элементного состава фрагментов. Для гетероатомных органических молекул многим целочисленным пикам в спектре соот-

ветствуют различные составы атомов (изобарные ионы). Кроме того, некоторый вклад в интенсивность наблюдаемых пиков могут вносить и природные изотопы атомов, поэтому для определения элементарной формулы наблюдаемых пиков необходимы измерения массы ионных фрагментов с высокой точностью. Знание точного элементного состава фрагментных ионов необходимо для определения каналов и механизмов диссоциативной ионизации исследуемой молекулы. Одной из трудностей в достижении этой цели была недостаточная разрешающая способность масс-спектрометра МИ-1201, которая не позволила разделить пики изобарных ионов. Поэтому для идентификации наблюдаемых фрагментов необходимо было обеспечить хотя бы максимально возможную точность калибровки шкалы масс и определения центра пиков.

Предварительная калибровка шкалы спектрометра в диапазоне масс 10–50 amu выполнялась по целочисленным значениям масс ионов  $\text{H}_2\text{O}^+$  ( $m/z = 18$ ),  $\text{N}_2^+$  ( $m/z = 28$ ),  $\text{O}_2^+$  ( $m/z = 32$ ) и  $\text{Ar}^+$  ( $m/z = 40$ ). Далее, уже в более узких диапазонах масс, шкалы корректировались по точным значениям масс ионов-реперов. Например, для участка 11–19 amu это были ионы  $\text{C}^+$  ( $m/z = 12.000$ ) и  $\text{H}_2\text{O}^+$  ( $m/z = 18.010560$ ). Стабильность шкалы масс во времени после калибровки этого участка проверялась записью серии из 10 масс-спектров с интервалом в 20 min. Оказалось, что отклонение положения максимума пиков от среднего значения у всех семи фрагментов данного участка не превышало  $\pm 0.04\%$ .

Необходимо отметить, что калибровка шкалы масс и развертка спектров анализатора выполняются только в цифровом формате. При этом чем меньше массы наблюдаемых фрагментов, тем более точно может быть определена дробная часть массы. При регистрации спектров в цифровом канале, кроме раstra на мониторе, можно сохранить и таблицу данных о спектрах на диске в форматах: по шкале X — F8E4, по шкале Y — F7E4, а время записи каждой точки — в формате hh:mm:ss. Таким образом, система цифрового управления и развертки позволяет определять положение и амплитуду пиков с точностью  $\pm 1$  amu в четвертом знаке после запятой.

В случае регистрации выхода ионов в аналоговом канале прикладная программа сохраняет в памяти всю информацию о спектре только до тех пор, показ спектр сохраняется на мониторе. Спектр в растровом графическом виде может быть сохранен и на диске, но при записи нового аналогового спектра информация о предыдущем в памяти ЭВМ

Идентификация атомарного состава ионных фрагментов масс-спектра моногидрата L-аспарагина. Нулевые значения разности масс указаны для фрагментов-реперов, по которым калибровались шкалы масс

Массовое число пика	Формула фрагмента	Точная масса фрагмента, аму	Экспериментальная масса, аму	Разность масс, %
12	C <sup>+</sup>	12.0	12.0	0.0
13	CH <sup>+</sup>	13.0078225	13.0066	+0.009
14	N <sup>+</sup>	14.003074	14.0029	+0.002
15	NH <sup>+</sup>	15.010897	15.0111	-0.001
16	H <sub>2</sub> N <sup>+</sup>	16.0187194	16.0161	+0.016
17	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup>	17.0265420	17.0287	-0.013
18	H <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	18.010560	18.010560	0.0
25	C <sub>2</sub> H <sup>+</sup>	25.007822	25.007822	0.0
26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup>	26.015645	26.0143	+0.005
27	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> <sup>+</sup>	27.023467	27.0208	+0.0096
28	CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup>	28.018719	28.0146	+0.015
29	CH <sub>3</sub> N <sup>+</sup>	29.026542	29.0196	+0.024
30	CH <sub>4</sub> N <sup>+</sup>	30.034364	30.0243	+0.034
32	O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	31.98983	31.98983	0.0
39	C <sub>2</sub> HN <sup>+</sup>	39.010897	39.010897	0.0
40	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N <sup>+</sup>	40.018719	40.0158	+0.008
41	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N <sup>+</sup>	41.026542	41.0258	+0.002
42	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup>	42.034364	42.0386	-0.010
43	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sup>+</sup>	43.042187	43.0351	+0.023
44	CH <sub>2</sub> ON <sup>+</sup>	44.013634	44.0209	-0.017
45	CH <sub>3</sub> ON <sup>+</sup>	45.021457	45.0261	-0.010
46	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	46.005475	46.005475	0.0

теряется. Поэтому следует помнить, что растровые спектры на мониторе следует обрабатывать непосредственно в измерительной программе сразу после их записи. Отдельно, в каком-либо ином графическом редакторе, считывается информация только о растре спектра, и при этом на порядок теряется точность определения пика на мониторе.

В данных экспериментах записывались и обрабатывались аналоговые и цифровые масс-спектры молекулы LAM на участках 11–19, 24.5–32.5 и 38.5–46.5 аму. Каждый раз перед новой записью спектра точная калибровка шкалы масс повторялась. В качестве реперов в нашем случае использовались три пары пиков — 12 и 18, 25 и 32

и 39 и 46 а.м.у. Для аналоговых спектров путем установки маркера на мониторе в вершине пика инициировалась величина максимума ионного сигнала и положение пика с точностью  $\pm 1$  а.м.у. в третьем знаке после запятой. В цифровых же спектрах масса пика и его интенсивность вычислялись путем центровки на уровне половины его высоты (точность  $\pm 1$  а.м.у. в четвертом знаке после запятой). Поскольку результаты измерения массы конкретного пика могут зависеть и от относительного вклада изобарных ионов в суммарный сигнал и форму пика, то в результате этого его контур может быть асимметричным. Поэтому всегда существует некоторое различие в результатах обработки аналоговых и цифровых спектров, а именно положение максимума пика может несколько отличаться от положения его центра из-за асимметрии контура.

Кроме цифровой системы управления и развертки, идентифицировать фрагменты в масс-спектре молекулы LAM помогло и то обстоятельство, что пики с массами от 10 до 50 а.м.у. сосредоточены в трех группах и каждая из них лежит в пределах 8 единиц массы. Это обеспечило достаточно точную в этом случае калибровку шкалы масс и определение центра пиков. Наиболее вероятная формула для каждого конкретного ионного фрагмента спектра выбиралась по наименьшей разности масс, полученных экспериментально, и известных масс изобарных ионов. Экспериментальные значения масс ионных фрагментов получены путем анализа результатов обработки серии как цифровых, так и растровых спектров.

В таблицу сведены результаты определения элементного состава 22 ионных фрагментов LAM в диапазоне масс 12–46 а.м.у., где указаны наиболее вероятные изобарные ионы, их точные массы и экспериментально измеренные значения масс фрагментов. Видно, что экспериментальные значения отличаются от расчетных масс изобарных ионов на 0.034% только для одного фрагмента ( $m/z = 30$  а.м.у.). И только для двух фрагментов ( $m/z = 29$  и 43 а.м.у.) различие превышает величину 0.02%. Можно предположить, что указанные пики аддитивны и имеют место наложение контуров двух или более изобарных пиков.

В данной работе не изучались зависимости выхода ионных фрагментов молекулы LAM от энергии электронов, включая пороги появления, поэтому выяснение роли миграции атомов водорода и каскадной фрагментации, а также участие структурно связанной молекулы воды в ударной и термической фрагментации станут предметом дальнейших исследований.

**Список литературы**

- [1] Вукстич В.С., Имре А.И., Снегурский А.В. // Письма в ЖТФ. 2009. Т. 35. В. 23. С. 1–7.
- [2] Kripal Ram, Mishra Indrajeet, Gupta S.K., Arora Manju // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2009. V. 71. Is. 5. P. 1969–1972.
- [3] Fleck Michel, Petrosyan Aram M. // Crystal Growth. 2010. V. 312. Is. 15. P. 2284–2290.
- [4] Shakir, Ganesh V., Wahab M.A., Bhagavannarayana G., Kishan Rao K. // Materials Science and Engineering. B. 2010. V. 172. Is. 1. P. 9–14.
- [5] Shakir, Riscob B., Maurya K.K., Ganesh V., Wanab M.A., Bhagavannarayana G. // J. Crystal Growth. 2010. V. 312. Is. 21. P. 3171–3177.
- [6] Вукстич В.С., Имре А.И., Снегурский А.В. // Приборы и техника эксперимента. 2011. № 2. С. 1–7.
- [7] National Institute of Standards and Technology. Standard Reference. Databases, NIST Chemistry Webbook. <http://webbook.nist.gov/chemistry>.