

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АДСОРБЦИИ ГИСТАМИНА И АРГИНИНА НА РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ ПОВЕРХНОСТИ ПОРИСТОГО КРЕМНИЯ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИОННОЙ ИОНИЗАЦИИ

И.В. Шмыголь¹, О.В. Севериновская¹, Н.С. Васильева²,
С.А. Алексеев², В.А. Покровский¹

¹Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, 03164, Киев-164

²Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, 01033, Киев-033

В работе были исследованы различные виды поверхности пористого кремния для изучения свойств адсорбционных комплексов биомолекул на примере биогенного амина гистамина и аминокислоты аргинина методом лазерной десорбционной ионизации. Предложены возможные механизмы ионизации молекул анализируемых веществ с рассмотренных подложек. Показано, что ионообразование зависит от состава адсорбционных комплексов “исследуемое вещество/поверхность”.

In this work the possibility of using of different porous silicon surface for investigation of adsorptive complexes of biomolecules namely hystamine and arginine was presented by laser desorption/ionization mass spectrometry. Various ionization mechanisms of studied compounds were suggested. The dependence of ion formation from composition of adsorptive complexes was shown.

Введение

Масс-спектрометрия с лазерной десорбционной ионизацией (Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, LDI MS) на различных поверхностях интенсивно развивалась начиная с 70-х годов прошлого века. Тем не менее, метод не получил широкого применения из-за быстрой деградации исследуемых молекул под действием прямого лазерного излучения [1]. В то же время лазерная десорбционная ионизация может эффективно применяться для анализа биомолекул, поскольку при этом исключается рутинный процесс пробоподготовки образцов, влияние фонового спектра ионов матрицы и соответственно открывается возможность быстрого анализа исследуемых веществ. Однако поиски подходящей поверхности, которая в методе MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) [2] выполняла бы функции матрицы, способной захватывать молекулы анализируемых соединений и поглощать УФ-излучение, продолжались. Из обширного набора нанопористых материалов, таких как гранулированный пористый полистирол, наночастишки золота, нанотрубки и др. [3], только нанопористый кремний зарекомендовал себя как эффективная подложка для получения нефрагментированных ионов исследуемых веществ. Метод лазерной десорбционной ионизации на поверхности пористого кремния получил название Desorption Ionization on Porous Silicon (DIOS) [4]. Пористый кремний – полупроводник с высокой удельной площадью поверхности (сотни м²/см³), хорошо поглощающий УФ-излучение (коэффициент поглощения при использовании азотного лазера ($\lambda = 337$ нм)

составляет 10^5 см^{-1}) [3]. Значительный интерес к пористому кремнию вызван также его фотолюминесцентными свойствами, которые нашли широкое применение в электронных и оптоэлектронных приборах. Успешное применение пористого кремния для лазерной десорбционной ионизации в масс-спектрометрии биомолекул поставило ряд вопросов, связанных с механизмами десорбции и ионизации на поверхности этой специфической подложки. Во многих работах высказывались предположения о том, что определяющими факторами, влияющими на механизмы десорбции и ионизации, являются особенности наноструктурированной поверхности пористого кремния (диапазон размера пор 2 – 50 нм), что позволяет захватывать в поры молекулы остаточных газов, растворителя, исследуемого вещества, а также способность материала поглощать УФ-излучение, в результате чего происходит локальный разогрев поверхности, который можно оценить, используя уравнение [5]:

$$\Delta T_{нов} = (2I / K) \times (kt / \pi)^{1/2}, \quad (1)$$

где $\Delta T_{нов}$ – увеличение температуры поверхности, I – интенсивность лазерного излучения, K – теплопроводность, k – коэффициент температуропроводности, t – длительность лазерного импульса. Согласно этому уравнению температура разогрева может составлять 600 К и более. Такой температуры достаточно для свободного мигрирования молекулы анализируемого вещества по поверхности пористого кремния и, возможно, десорбции с нее.

В работе [6] были исследованы механизмы протонирования молекул анализируемых веществ, обладающих хорошо выраженными основными свойствами. Основная идея предлагаемой работы заключается в том, что исследуемые вещества с хорошо выраженными основными свойствами адсорбируются на поверхности пористого кремния, образуя водородные связи с силанольными группами поверхности. Вследствие лазерного облучения поверхность пористого кремния заряжается положительно, что сильно увеличивает кислотность силанольных групп, которые в этом случае выступают донорами протонов. Протоны могут свободно переходить на молекулу анализируемого вещества, обеспечивая, таким образом, ее ионизацию. Такой подход убедительно объясняет протонирование молекул исследуемых веществ с хорошо выраженными основными свойствами при лазерной десорбционной ионизации на поверхности пористого кремния, но вопросы о механизме ионизации молекул путем потери электрона (положительные ионы) или за счет его присоединения (отрицательные ионы) требуют, по нашему мнению, привлечения механизмов полевой ионизации и полевой десорбции. Присутствующие на поверхности пористого кремния наноразмерные вершины, образующиеся в процессе травления монокристаллического кремния, являются зонами высоких локальных электрических полей напряженностью 10^7 – 10^8 В/см, в которых, возможно, и происходит ионизация исследуемых веществ.

Модифицирование поверхности пористого кремния

Пористый кремний обычно получают электрохимическим травлением пластин монокристаллического кремния в растворе фтороводородной кислоты. Свежеприготовленный пористый кремний гидрофобен, поскольку на его поверхности присутствуют Si–H группы. При длительном хранении пористого кремния на воздухе поверхностные Si–H группы окисляются, превращаясь в силоксановые (Si–O–Si) или силанольные (Si–OH) группы.

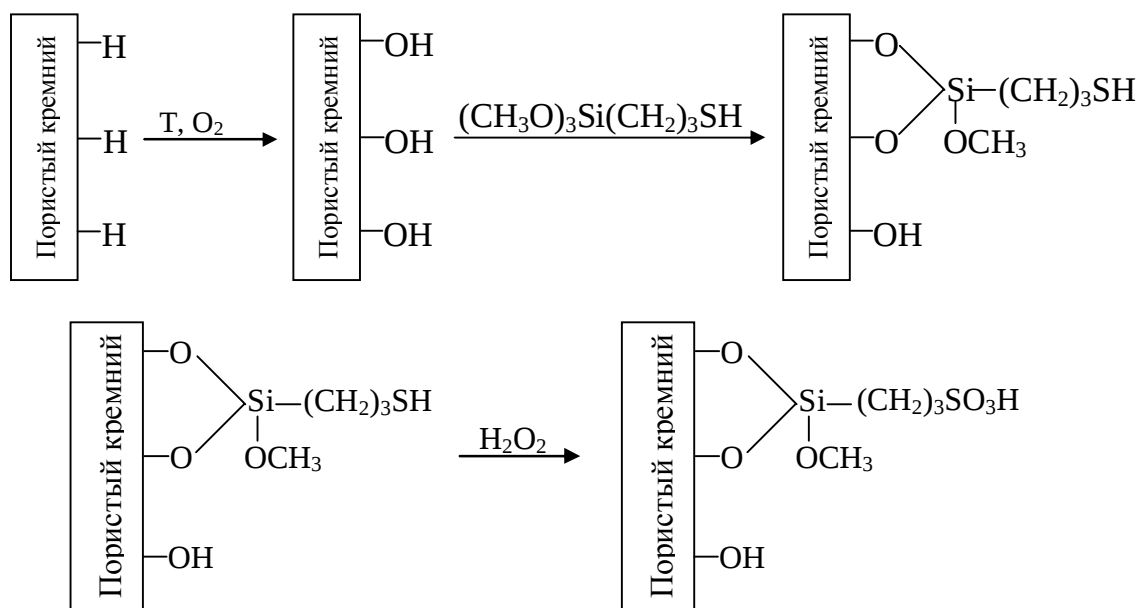
Проведение целенаправленного гидроксирования поверхности открывает возможность функционализировать поверхность пористого кремния различными группами. Хотя способность поверхности инициировать десорбционную ионизацию исследуемых веществ уменьшается с возрастанием степени окисдации поверхности, все же для большинства гидрофильных соединений более эффективными являются поверхности пористого кремния, слегка окисленные или модифицированные полярными функциональными группами. Таким образом, путем функционализирования поверхности пористого кремния можно получать модифицированные образцы с наперед заданными свойствами, оптимальные для анализа тех или иных исследуемых веществ. Так в работе [7] было показано, что поверхность пористого кремния, модифицированная перфторфенильными группами, наиболее эффективна для анализа гидрофобных веществ, в то время как модифицированная аминогруппами – для анализа гидрофильных.

Кроме придания поверхности пористого кремния гидрофильных или гидрофобных свойств, путем химического модифицирования можно привить на поверхность различные функциональные группы, обладающие селективностью к определенным классам веществ. Например, путем реакции конденсации Дильса-Альдера на поверхности пористого кремния получают аддукты Дильса-Альдера. В работе [8] показано, что в результате облучения этой поверхности лазерным излучением, происходит ретро-дильс-альдеровская фрагментация полученного аддукта, хорошо коррелирующая с термической цикловерсией этого аддукта в растворе. Предложенная реакция Дильса-Альдера для селективного связывания диена с модифицированной диенофилом поверхностью пористого кремния не сложна в проведении и проходит при комнатной температуре, но не каждое исследуемое вещество можно закрепить подобным образом на поверхности функционализированного пористого кремния.

Целью настоящей работы было исследование возможности применения различных видов пористого кремния для получения информации о строении адсорбционных комплексов биологически активных молекул на примере биогенного амина – гистамина и аминокислоты – аргинина методом лазерно-десорбционной ионизации. Выбор объектов исследования объясняется тем, что эти соединения играют важную роль в метаболизме человека и их качественное определение может иметь большое значение для решения некоторых медицинских проблем.

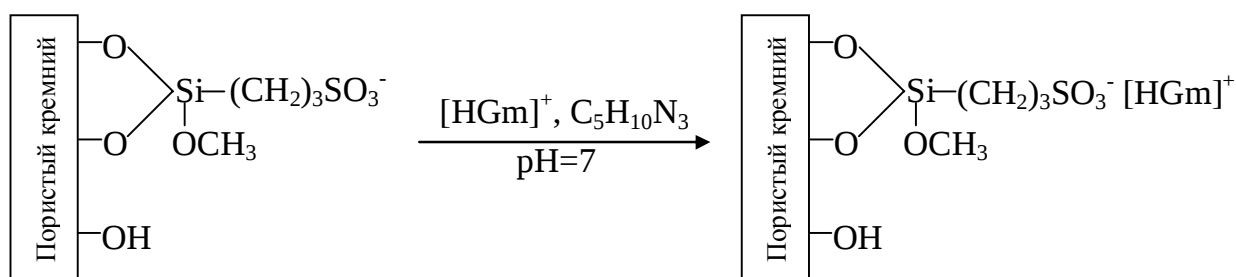
Гистамин (β -имидазоллил-4(5)-этиламин) образуется в результате декарбоксилирования аминокислоты гистидина (рис. 1) и представляет собой тканевый гормон, который в неактивной связанной форме присутствует практически во всех тканях организма. Он в значительном количестве освобождается при аллергиях, шоке, ожоге и является одним из ведущих участников формирования аллергических реакций.

Поскольку биогенные амины принадлежат к соединениям, участвующим в обмене веществ высших животных, они легко метаболизируют и поэтому обычно хорошо переносятся человеком, если их концентрация в пище находится в пределах допустимого уровня. Однако повышение уровня содержания биогенных аминов в пище, в частности в рыбе, может причинить вред здоровью. Содержание гистамина в пище нормируется во всех развитых странах и является важнейшим показателем свежести рыбы. Традиционный фотокolorиметрический метод контроля гистамина в рыбе трудоемок, занимает длительное время и характеризуется малой производительностью. Проведенные исследования показали, что для определения наличия гистамина в растворе возможно использование масс-спектрометрического метода MALDI.



В работе были использованы гистамин (Gm) (111 а.е.м.) и аргинин (Arg) (174 а.е.м.) производства “Fluka”, Швейцария, марки “х.ч.”. Были приготовлены водные растворы с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л. На поверхность НПК образцы наносились без предварительной пробоподготовки. В случае МПК pH растворов доводили до физиологического значения 7 путем добавления соляной кислоты. Адсорбция проводилась следующим образом: образец модифицированного пористого кремния помещали в раствор исследуемого вещества и перемешивали в течение 1 ч. Затем образец извлекали, многократно промывали водой для удаления остатков гистамина и аргинина, которые не адсорбировались на поверхности пористого кремния, высушивали и проводили масс-спектрометрические измерения.

На поверхности МПК вследствие диссоциации сульфогрупп скапливается отрицательный заряд, что приводит к образованию на ней комплекса с положительно заряженным при использованном значении pH гистамина $[\text{HGm}]^+$. Адсорбция гистамина на поверхности МПК проходит согласно схеме:

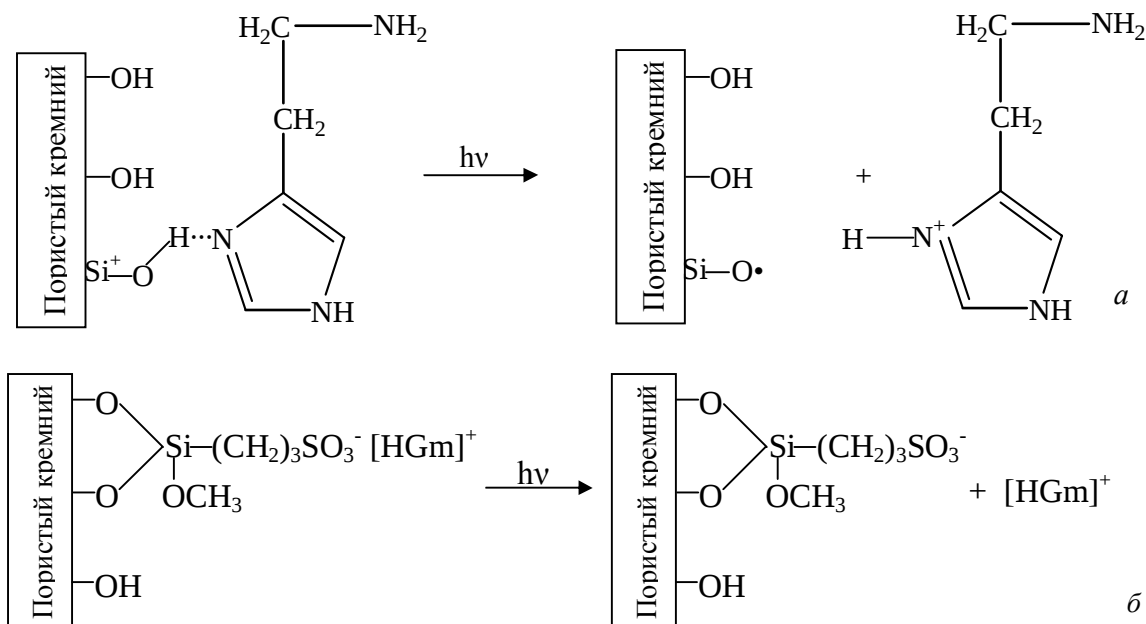


Адсорбция аргинина $[\text{HArg}]^+$ проходит по аналогичному механизму.

Масс-спектрометрические исследования проводились на приборе Autoflex II (Bruker Daltonics, Германия) в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов с использованием рефлекторного метода анализа. Образцы облучали импульсным УФ-лазером (азотный лазер, 337 нм, длительность импульса 3 нс, частота 20 Гц, энергия лазерного излучения 6 мкДж). Суммарный результат получали накоплением 100 отдельных масс-спектров.

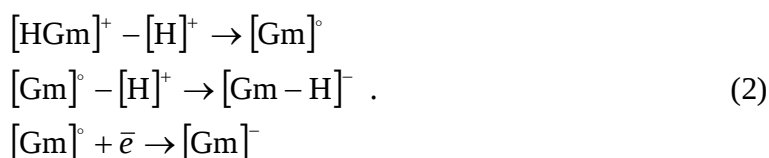
Результаты и обсуждение

С обоих типов подложек, использованных в работе при исследовании лазерной десорбционной ионизации гистамина и аргинина, информативные масс-спектры были получены только в режиме регистрации положительных ионов. Схемы реакции ионообразования на поверхности НМК (а) и МПК (б):



Адсорбционные комплексы гистамина и аргинина с ковалентно связанными сульфогруппами поверхности пористого кремния в условиях масс-спектрометрического эксперимента неустойчивы, и уже при относительно низких энергиях лазерного излучения (6 мкДж) гистамин и аргинин десорбируются с поверхности в протонированном виде.

Для получения отрицательных ионов необходимо прохождение следующих реакций в газовой фазе:



В режиме регистрации отрицательных ионов информативный масс-спектр исследуемых веществ получен не был. Отсутствие молекулярных пиков гистамина и аргинина в этом режиме свидетельствует о том, что вероятность протекания подобных процессов, при условии существования исследуемых веществ в протонированной форме, мала. Таким образом, на основании полученных масс-спектров можно утверждать, что образование адсорбционных комплексов на поверхности МПК происходит путем взаимодействия положительно заряженных протонированных молекул исследуемых веществ с отрицательно заряженными сульфогруппами поверхности.

При ионизации как с поверхности НПК, так и МПК наблюдались пики с $m/z=112$ (гистамин) и $m/z=175$ (аргинин) соответственно (рис. 3, 4). Было показано, что данные пики отвечают протонированным формам исследуемых веществ. В случае НПК на поверхность наносились образцы, находящиеся в нейтральной форме.

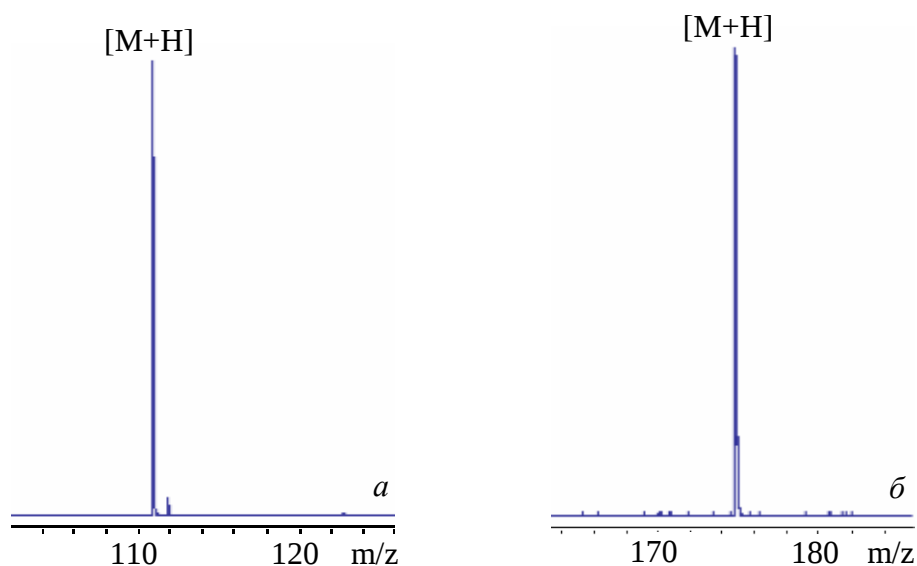


Рис. 3. Масс-спектры гистамина (*а*) и аргинина (*б*), полученные при лазерной десорбционной ионизации на поверхности модифицированного сульфогруппами пористого кремния.

Следует отметить, что для МПК при выбранных экспериментальных условиях в масс-спектрах не наблюдались пики фрагментов анализируемых веществ и их ассоциатов. В случае же лазерной десорбционной ионизации гистамина на поверхности НПК в отличие от МПК происходила заметная фрагментация, которой, возможно, предшествовало образование водородной связи между атомом азота имидазольного кольца анализируемого вещества и силанольной группой поверхности НПК. В результате лазерного облучения сама поверхность, а именно силанольные группы [6], могут выступать донорами протона, обеспечивая тем самым возможность протонирования гистамина. Так, в масс-спектрах гистамина (рис. 4) присутствуют пики с $m/z=95$ и $m/z=83$, которым отвечают фрагментные ионы $[M-NH_2]^+$ и $[M-NH_2-CH+H]^+$ соответственно (масс-спектры аргинина не приведены).

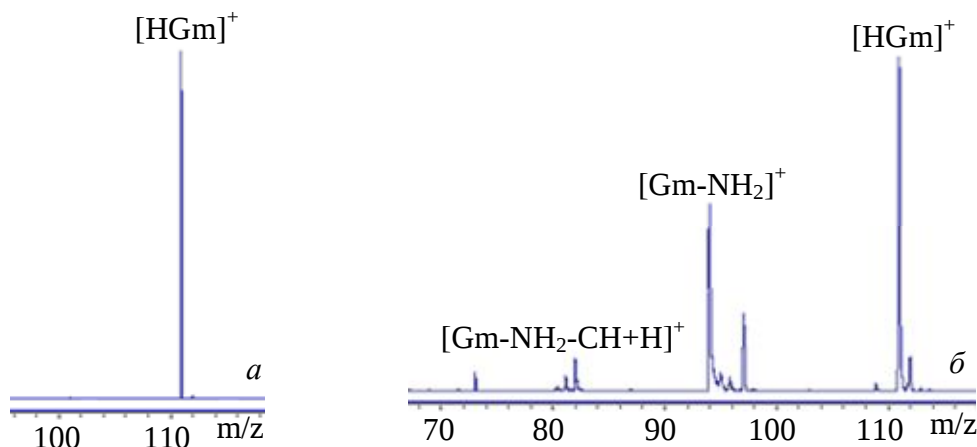


Рис. 4. Масс-спектры биогенного амина гистамина на МПК (*а*) и НПК (*б*).

Выводы

Установлена возможность успешного использования как немодифицированного, так и химически модифицированного пористого кремния в качестве подложек для масс-спектрометрических исследований биомолекул. Показано, что ионообразование зависит от строения адсорбционного комплекса и физико-химических характеристик

поверхности пористого кремния. Предложен предпочтительный механизм ионизации в режиме регистрации положительных ионов. Показано, что в случае МПК ионизация происходит в результате разрушения адсорбционного комплекса “протонированное исследуемое вещество/поверхность”, а в случае НПК – за счет захвата молекулой исследуемого вещества протона силанольной группы.

Литература

1. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М.: Бином, 2003. – 493 с.
2. Karas M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons // *Anal. Chem.* – 1988. – V. 60. – P. 2299 – 2301.
3. Surface modification and laser pulse length on internal energy transfer in DIOS / L. Guanghong, Chen Yong, G. Siuzdak, A. Vertes // *J. Phys. Chem. B.* – 2005. – V. 109. – P. 24450 – 24456.
4. Wei J., Buriak J.M., Siuzdak G. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon // *Nature.* – 1999. – V. 399. – P. 243 – 246.
5. On the mechanism of laser-induced desorption/ionization of organic compounds from etched silicon and carbon surface / S. Alimpiev, S. Nikiforov, M. Karavanskii, J. Diener, F. Koch // *Appl. Phys.* – 2001. – V. 115. – P. 1891 – 1901.
6. On the role of defects and surface chemistry for surface-assisted laser desorption ionization from silicon / S. Alimpiev, A. Grechnikov, J. Sunner, V. Karavanskii, Ya. Simanovsky, S. Zhabin, S. Nikiforov // *J. Chem. Phys.* – 2007 (in press).
7. High sensitivity and analyte capture with desorption/ionization mass spectrometry on silylated porous silicon / S. Trauger, E. Go, Z. Shen, J. Apon, B. Compton, E. Bouvier, M. Finn, G. Siuzdak // *Anal. Chem.* – 2004. – V. 76. – P. 4484 – 4489.
8. Cleavable linkers for porous silicon-based mass spectrometry / J. Meng, C. Averbuj, W. Lewis, G. Siuzdak, M. Finn // *Angew. Chem.* – 2004. – V. 43. – P. 1255 – 1260.
9. Справочник биохимика / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
10. Covalent grafting of ion-exchanging group on porous silicon for microsystem application / E. Mery, S. Alekseev, V. Zaitsev, D. Barbier // *Sensors and Actuators B: Chem.* – 2007. – V. 126. – P. 120 – 125.
11. Айлер Р. Химия кремнезема. Ч.1, 2. / Пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – 1127 с.