

НОВИЈЕ ТЕХНИКЕ У МАСЕНОЈ СПЕКТРОМЕТРИЈИ (I ДЕО) НОВИ НАЧИНИ ЈОНИЗАЦИЈЕ

УВОД

Од свог почетка, пре стотинак година, масена спектрометрија постала је свеприсутно истраживачко оруђе без којег се не може замислити савремена наука и струка откриће изотопа, тачно одређивање атомских маса, квантитативна гасна анализа, брза идентификација трагова загађивача и многе друге ствари савремене хемије. Већ педесет година спектрометрија маса је незаменљива у органској хемији због кључног доприноса одређивању структуре молекула. После првог замаха, дуже времена је техника масене спектрометрије стагнирала, зато што је у том тренутку било немогуће анализирати молекуле релативне молекулске масе веће од 1000. Захваљујући новим техникама које су превазишле та ограничења, масена спектрометрија се задњих година све више примењује у биохемији за проучавање биомолекула. На **слици 1** су у виду блок шеме приказани основни делови масеног спектрометра.

Да би било анализирало у масеном спектрометру, једињење мора бити наелектрисано. Пошто су већина органских једињења неутрални молекули, неопходно их је јонизовати у јонском извору. Поред добијања једног или више наелектрисања по једном молекулу, при овом процесу се често дешава фрагментација јона на нове јоне, радикале и неутралне фрагменте. Надаље, јони се путем загревања, десорпције¹ или десолватације (а уз помоћ снажног вакуум система) преводе у гасну фазу. Пошто се овај чланак бави новијим начинима јонизације, вратиће се детаљније овоме касније.

Јоне настале таквим начина потребно је анализирати према односу маса/наелектрисање (m/z) у масеном анализатору. Постоји више начина да се то уради. Код класичног масеног анализатора јони се најпре убрзају у електричном пољу, а затим усмере кроз хомогено магнетно поље. Лоренцова сила их приморава да скрену са праволинијског пута. Скретање ће бити веће уколико је маса јона мања, а наелектрисање веће. На излазу из магнетног поља постављен је прорез кроз који могу проћи само јони са тачно дефинисаним односом m/z . Да би се добио масени спектар² потребно је постепено мењати јачину магнетног поља, тако да се по реду, сви јони (дакле и

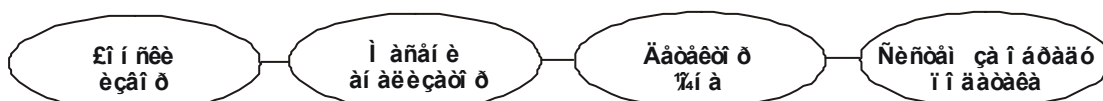
они са другим вредностима m/z) такође прошли кроз прорез и затим били детектовани.

На основу проучавања понашања наелектрисаних честица у променљивом електричном и магнетном пољу конструисано је неколико типова масених анализатора: најпре квадруполни анализатор, а у новије време јон-трап $\$1\theta$ и анализатор јон-циклотрон резонанције (детаљније видети у другом делу чланка). Постоји и масени анализатор који не користи никакво магнетно поље, већ функционише на основу различите брзине прелета јона од јонског извора до детектора ("TOF = time of flight" детектор). Он је једноставне конструкције и састоји се из електричног поља где се убрзавају јони и једне евакуисане цеви кроз коју се крећу равномерно праволинијски. До детектора у оваквим инструментима најпре стижу јони мање масе, док тежи, пошто се крећу мањом брзином, долазе касније.

Показало се да су извесни јонски извори компатибилни са тачно одређеним анализатором. Због тога поред више типова масених анализатора, постоји и више начина јонизације. Избор јонског извора зависи и од природе узорка и врсте информација које се желе добити. Најчешће се користе следећи:

- електронски удар (EI)
- хемијска јонизација (CI)
- десорпција пољем (FD)
- бомбардовање брзим атомима (FAB)
- "matrix assisted laser desorption" (MALDI)
- електроспреј јонизација (ESI)

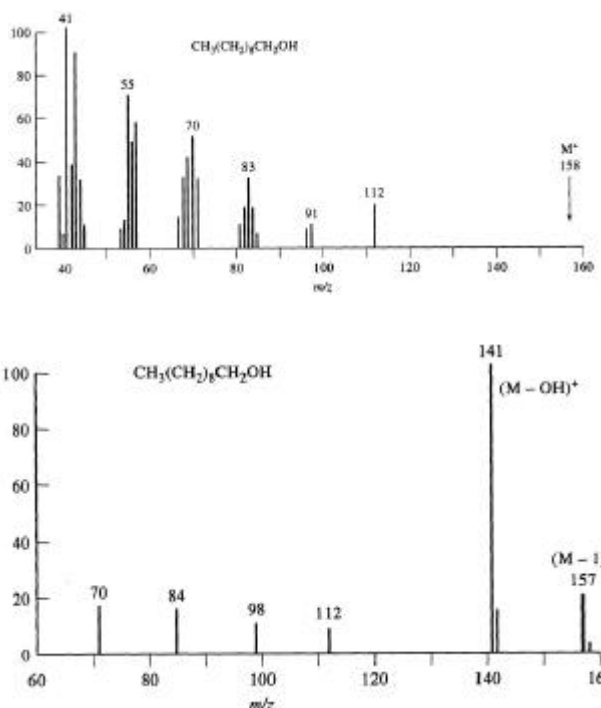
Метода јонизације електронским ударом спада у тзв. "тврде" методе зато што се молекул узорка јако фрагментира. У овом јонском извору се брзи електрони сударају са молекулима узорка при чему избијају један електрон из електронског омогача (добије се радикал-катјон), а вишак пренете енергије се користи за фрагментацију. Често се добију спектри у којима изостаје молекулски јон, па је за већину органских молекула немогуће на овај начин одредити молекулску масу. Нешто "мекша" је метода хемијске јонизације (види **слику 2**). Код ове технике наелектрисање се преноси посредно реакцијом са јонизованим гасом. Међутим са повећањем молекулске масе испитиване супстанце све је теже добити молекулски јон.



Слика 1. Основни делови масеног спектрометра

1 Узорак може бити адсорбован на чврстом носачу

2 У масеном спектру је на апсиси m/z вредноста на ординати обилност јона



Слика 2. Масени спектри 1-деканола добијени електронским ударом (EI), горе, и хемијском јонизацијом (CI), доле

ЕЛЕКТРОСПРЕЈ ЈОНИЗАЦИЈА (ESI)

Једињења са великом молекулском масом, која тешко испаравају или се распадају на повишеној температури немогуће је анализирати применом EI или CI јонизације. Тако се за анализу биомолекула морају користити још “мекше” методе, у првом реду MALDI и електроспреј јонизација. Предност ESI је у томе што је погодна за повезивање са течном хроматографијом, па се са великом успешношћу анализирају и јако компликоване смеше.

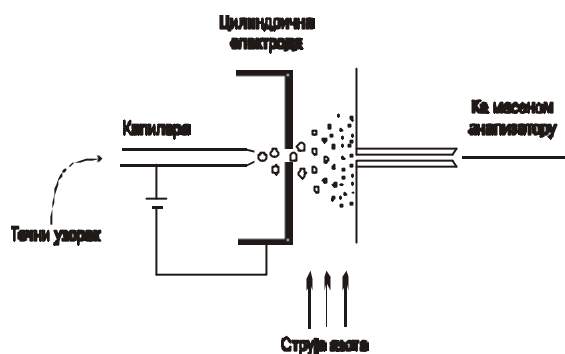
Прве експерименте са техником електроспреј јонизације извео је Чепман (Chapman) 1937. године ^{§2}, док је Доул (Dole) 1968. први пут применио за масену спектрометрију. ^{§3} Међутим, прави развој ESI-MS технике отпочиње осамдесетих година прошлог века радовима Фена (Fenn) и Мана (Mann). ^{§4} Они су успешно применили ову технику за јонизацију веома великих молекула. Данас истраживачи користећи ESI могу јонизовати протеинске комплексе, рибозоме, па чак и читаве вирусе. ^{§5} Због великих заслуга за развитак електроспреј јонизације, Фен је 2002. године био један од тројице добитника Нобелове награде за хемију.

ПРИНЦИП РАДА ЕЛЕКТРОСПРЕЈ ЈОНИЗАЦИЈЕ

Узорак за анализу се у ESI јонски извор увек уноси растворен у погодном поларном растварачу, меши растварача или пуферу. Ово је посебно погодно за биомолекуле, јер нема потребе за мукотрпним изоловањем из воденог раствора. Ако су у пита-

њу компликоване смеше, а не чиста једињења, тада се колона високоефикасне течне хроматографије (HPLC) директно повезује са са ESI јонским извором.

Раствор који треба анализирати убризгава се у металну капилару која се налази под напоном од 2-5 kV у односу на цилиндричну электроду (слика 3). Раствор унутар капиларе постаје наелектрисан, па се на излазу из капиларе распршује у ситне капи услед одбијања истоимених наелектрисања. Капљице садрже како молекуле растварача, тако и молекуле испитиване супстанце. Услед испаравања растварача, потпомогнутог струјом азота, капљице постају све мање, а концентрација истоименог наелектрисања на површини капљице све већа. Када Кулонове одбојне силе превагну над површинским напоном, капљица се распрши (“експлодира”). Ова “Кулонска експлозија” прави серију мањих, а још увек јако наелектрисаних капљица. Процес испаравања и експлозија се понавља све док се анализирани молекули потпуно не ослободи од молекула растварача и постане (најчешће) вишеструко наелектрисан јон.

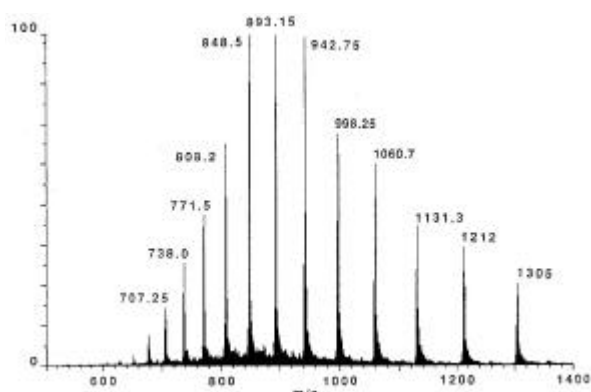


Слика 3. Шема електроспреј јонског извора

Јони које треба анализирати пролазе кроз мали отвор и преко коморе у којој влада високи вакуум улазе у масени анализатор.

АНАЛИЗА ESI МАСЕНОГ СПЕКТРА МИОГЛОБИНА

ESI је најмекша метода јонизације која се данас користи. Први спектри макромолекула добијени овом техником су јако збуњивали научнике. Био је присутан велики број пикова, а ова “мекка” метода није требала да произведе много разноврсних фрагментационих јона. Убрзо је разјашњено да уствари мноштво пикова не потиче од фрагмената различите масе, већ од молекулског јона са различитим бројем наелектрисања. ^{§6} Разноврсност и количина насталих јона зависи од кисело-базних особина молекула испитиване супстанце и растварача који се користи за припремање узорка. Наелектрисање може настати протоновањем, депротоновањем или додатком другог јона (најчешће Na^+ , K^+ , Li^+ који могу бити присутни у растварачу-пуферу и стакленм деловима апаратуре). Тако је и са спектром протеина миоглобина ^{§7}, приказаном на слици 4:



Слика 4. ESI масени спектар миоглобина

Сви присутни пикови потичу од вишеструко наелектрисаног молекулског јона, а не од фрагмената. Молекул миоглобина се лако протонује у присуству киселог пуфера при чему настаје серија вишеструко позитивно наелектрисаних јона. Дакле, немогуће је прочитати масу молекула директно из спектра (јер не знамо колико наелектрисања одговара којем пику), али се може израчунати. Изабере се било који пик и означи се као $(M+n)/n$. У бројиоцу је маса јона, односно маса молекула M увећана за масу протона n , док у имениоцу n представља наелектрисање јона. Суседни пик са мањим односом m/z одговара јону са једним наелектрисањем више и масом увећаном за једну јединицу, па се означава као $(M+n+1)/(n+1)$. На пример:

$$1131,3 = \frac{M+n}{n}$$

$$1060,7 = \frac{M+n+1}{n+1}$$

Решавањем ове две једначине добије се да је молекулска маса 16954,5, а број наелектрисања за одговарајући пик је $n=15$. Да би се израчунала још тачнија маса сличне једначине се могу поставити за сваки пик, а од добијених резултата се рачуна средња вредност.

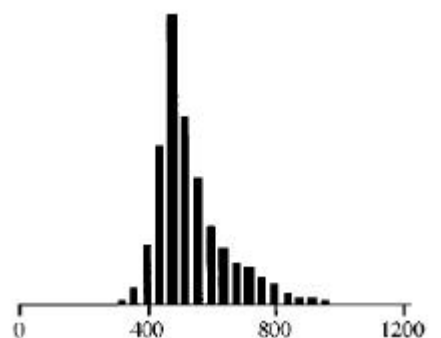
МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА ВИРУСА

Развој електроспреј јонизације је знатно проширио улогу масене спектрометрије у разним областима хемије и биохемије. На пример, омогућено је проучавање нековалентних интеракција између макромолекула, проучавање увијања протеина и као и интеракција између протеина и вирусног протеина.

Једна група научника је 1996. године успела да вирус који изазива мозаичну болест дувана (TMV) пропусти кроз масени спектрометар са ESI извором. TMV је састављен од око 2140 идентичних протеинских субјединица увијених у 300 nm дугу спиралу пречника 17 nm. У централном, цилиндричном делу налази се ланац РНК од 6395 нуклеотида. Дакле, читав вирус је био јонизован и, као такав, прошао кроз анализатор под високим вакуумом. Изненађујуће, на излазу апарата вирус је сакупљен неоштећен, и успешно коришћен да зарази лист дувана.^{§80} Када је

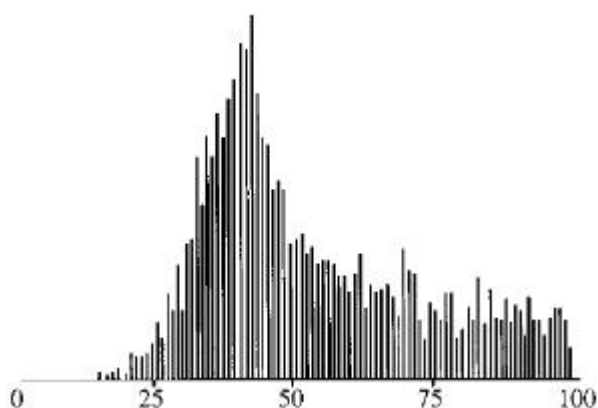
овај експеримент први пут направљен, било је технички немогуће регистровати масу реда величине милиона далтона, јер је то далеко превазилазило мерни опсег инструмента Тек је 2000. године развијена техника по којој се могу регистровати јони са јако великим масама и бројем наелектрисања. По тој методи истовремено се мери наелектрисање и однос маса/наелектрисање за сваки јон.^{§90}

На следеће две слике приказани су у виду хистограма расподеле броја наелектрисања и масени спектар поменутог вируса. Јони вируса поседују 300 до 1000 позитивних наелектрисања насталих протонањем базних места.



Слика 5. Хистограм који приказује расподелу броја наелектрисања TMV-а који је прошао кроз ESI-MS

Масени спектар TMV дао је масе између 39 и 42 милиона далтон, што је било у добром слагању са израчунатом молекулском масом која износи 40,5 милиона далтона. Још увек се ради на побољшању тачности мерења.



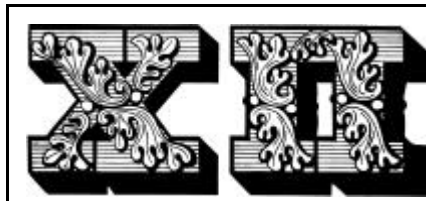
Слика 6. Хистограм који приказује масени спектар TMV (на апсциси су масе у милионима далтона)

Ови резултати отварају читав низ могућности за примену ESI-MS за детекцију и идентификацију вируса, њихове структуре и функције, па и клиничку примену.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Godjavec, *Hemijski pregled*, 44 (1), 2003, 2-6
2. S. Chapman, *Physical Review*, 10, 1937, pp 184-190
3. M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, *Journal of Chemical Physics*, 49, 1968, pp 2240-2249

- M. Yamashita, J.B Fenn, *Journal of Physical Chemistry*, 88, 1984, pp4451-4459
- Schweizerische Chemische Gesellschaft, *Chimia*, 57, 2003, 73-73
- J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse, *Science* 246, 1989, 64
- Methods in Enzymology*, 193, 1990, pp 422
- G. Siuzdak, B. Bothner, M. Yeager, C. Brugidou, C.M Fauquet, K. Hoey, C.M Chang, *Mass Spectrometry and Viral Analysis, Chemistry & Biology*, 1996, 3, p.45
- S. Fuerstenau, W. Benner, J. Thomas, C Brugidou, B Bothner, G. Siuzdak, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, No.3



ВЕСТИ из ШКОЛЕ ВЕСТИ за ШКОЛЕ

ЉИЉАНА ЂИТИЋ, Основна школа "Слободан Секулић", Ужице

СЦЕНАРИО ЗА РЕАЛИЗАЦИЈУ ЧАСА: БАЗЕ (ХИДРОКСИДИ)

Разред: VII

Тип часа: Обрада новоградива

Циљеви часа:

- Да ученици користећи претходно знање и искуство и кроз једноставне огледе науче својства, поделу и добијање база.
- Да ученици самостално састављају формуле база и да уочавају по чему се базе разликују од других неорганских једињења.

Материјал:

- Картице за поделу ученика у групе (асоцијације са појмовима везаним за тему часа)
- Папири већег формата (10 комада)
- Наставни листићи са задацима
- Посуђе, прибор и супстанце

Главни кораци:

- Формирање група и рад у групама
- Извештавање група
- Формирање експертских тимова
- Рад у групама
- Извештавање група и извођење закључака

Ток рада:

Корак 1. Ученици се деле у пет група извлачењем картица са појмовима који се односе на тему часа (1. формула база / OH^- , 2. подела база / Mg, 3. растворљивост база / Ca, 4. својства база / Na, 5. амонијак / NH_3). Групе добијају различите задатке

I група (формула база) – ученици имају задатак да на основу опште формуле база и објашњења датог на наставном листићу саставе формуле база чији су називидати и да дају називе базама на основу задатих формула;

II група (подела база) – ученици имају задатак да на основу упутства на наставном листићу о подели база према броју хидроксидних група, сврстају базе

чије су формуле дате у једнокиселе, двојкиселе и тројкиселе и да то прикажу табеларно;

III група (растворљивост база) – ученици имају задатак да на основу огледа и упутства на наставном листићу изведу закључак о подели база према растворљивости (NaOH , Ca(OH)_2 , Fe(OH)_3);

IV група (својства база) – ученици добијају три епрувете са раствором натријум-хидроксида и задатак да испитају и шематски прикажу промену боје следећих индикатора у базној средини: црвени лакмус, метил-отанж и фенол-фталеин;

V група (амонијак) – ученици имају задатак да путем огледа испитају како се мења боја индикатора у раствору амонијака, да изведу закључак зашто је амонијак сврстан у базе и да прикажу хемијским једначинама добијање амонијака и његову реакцију са водом.

Корак 2. На основу изведених закључака ученици припремају извештаје на великим папирима. Потом представници група лепе извештаје на таблу, саопштавају резултате рада осталим групама и одговарају на њихова питања.

Корак 3. Формирање експертских тимова.

Корак 4. Групе добијају различите експерименталне задатке:

I група (Na) – ученици на основу огледа (реакција између натријума и воде) треба да изведу закључак о начину добијања база и да реакцију прикажу хемијском једначином;

II група (Ca) – ученици на основу огледа (реакција између калцијум-оксида и воде) треба да изведу закључак о начину добијања база из њихових анхидрида и да реакцију прикажу хемијском једначином;

III група (Mg) – ученици на основу огледа (сагоревање магнезијума и реакција између насталог производа и воде) треба да изведу закључак о вези метал \rightarrow базни оксид \rightarrow база и да реакције представе хемијским једначинама;

IV група (NH_3) – ученици на основу огледа (реакција између гвожђе(III)-хлорида и натријум-хидроксида) треба да изведу закључак о начину добијања