

УДК: 577.3 : 546.212

НАБЛЮДЕНИЕ ЭФФЕКТОВ, СВЯЗАННЫХ С ГИДРАТАЦИЕЙ, В ОХЛАЖДЕННЫХ И ЗАМОРОЖЕННЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ ВТОРИЧНО-ИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

М.В. Косевич

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И.Веркина НАН Украины,
Харьков, 310164, пр. Ленина, 47, e-mail: mvkosevich@it.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 25 сентября 1998 г.

Дается анализ возможностей низкотемпературной масс-спектрометрии с бомбардировкой ускоренными атомами или ионами в изучении явлений, связанных с гидратацией в замороженных и охлажденных растворах. Описана модель образования низкотемпературных масс-спектров; выделены параметры спектров, в частности такие как качественный состав и количественное распределение кластерных ионов, которые несут информацию о типах межмолекулярных взаимодействий в образце, его агрегатном состоянии и фазовых переходах при изменении температуры. Показана возможность распыления гидратных кластеров из жидкой фазы водно-спиртовых смесей и формалина, существующей в узком диапазоне субнулевых температур при низком давлении, присущем условиям масс-спектрометрического эксперимента. В случае твердых образцов распыление ионов крайне затруднено для органических веществ, образующих сетку водородных связей (что является существенным препятствием в изучении органических кристаллогидратов), однако возможно для твердых образцов с преобладанием ван-дер-ваальсовых взаимодействий. К последнему типу относятся замороженные образцы олигомеров производных полиоксиметилена, образующихся при полимеризации в формалине, для которых впервые методом низкотемпературной масс-спектрометрии было зарегистрировано наличие сильно связанной воды в твердой фазе. Приводятся также примеры исследования кристаллогидратов неорганических солей при низких температурах. Обсуждаются возможности использования данных низкотемпературной масс-спектрометрии для оценки криопротекторных свойств различных соединений, связанных с особенностями их взаимодействия с водой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: низкотемпературная масс-спектрометрия, гидраты, кристаллогидраты, криопротекторы, спирты, полиоксиметилен, кластеры

Изучение изменения параметров межмолекулярных взаимодействий биомолекул и биологически активных соединений с водой при охлаждении и замораживании водных растворов необходимо для установления механизмов криповреждения биологического материала и разработки стратегии криопротекции. Эффекты, связанные с гидратацией, представляют также фундаментальный интерес для молекулярной криобиофизики. Связанная вода, стабильные гидраты, кристаллогидраты изучаются разнообразными экспериментальными методами [1-8], набор которых в последние годы пополнился низкотемпературной вторично-ионной масс-спектрометрией (НТ ВИМС) [9-18].

Метод НТ ВИМС (а также его вариант с бомбардировкой нейтральными быстрыми атомами, ББА) применялся ранее в ряде специализированных лабораторий, в основном, для получения и исследования кластеров простейших органических и неорганических соединений [20-26]. Однако попытки приложения метода к более сложным многокомпонентным системам встречали существенные трудности в связи с отсутствием адекватной модели для интерпретации масс-спектров. Модель, позволяющая устанавливать соответствие между характером масс-спектров (т.е. наличием в них определенных пиков и их интенсивностью) и структурой охлажденных и замороженных образцов, а также фазовыми переходами в них при изменении температуры была предложена недавно в серии работ [10-17]. Эта модель была с успехом использована при изучении методом НТ ББА ряда систем, представляющих собой замороженные растворы низкомолекулярных органических и неорганических соединений в воде и в некоторых органических растворителях. Было показано, что на основании ряда параметров НТ ББА масс-спектров можно делать выводы о характере некоторых процессов, представляющих интерес для криобиофизики: формировании сложной морфологии многокомпонентных образцов, фазовых переходах, образовании новых веществ в охлажденной системе, концентрировании веществ при замораживании, дегидратации биомолекул, защитной роли криопротекторов [10-19]. Практически во всех исследованиях, относящихся к водным растворам, наблюдались те или иные эффекты, связанные с гидратацией растворенного вещества. В связи с этим, целью настоящей работы явилась систематизация

данных о некоторых особенностях взаимодействия биологически активных соединений с водой при субнулевых температурах, накопленных к настоящему времени с помощью метода НТ ББА/ВИМС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Масс-спектрометрия

НТ ББА масс-спектрометрические эксперименты проводили с использованием магнитного масс-спектрометра МИ-1201Е (ПО «Электрон», Сумы, Украина), снабженного специализированным низкотемпературным вторичным источником ионов, описанным в [9]. Источник ионов содержал криогенный блок, охлаждаемый жидким азотом. Образец (обычно капля раствора объемом 2-5 мкл) замораживали на медной подложке, которую на штоке системы прямого ввода помещали в подогнанный паз криогенного блока. Температуру регулировали изменением потока азота и контролировали терморезистором, вмонтированным непосредственно в подложку. В качестве бомбардирующего агента использовали поток нейтральных атомов аргона с энергией первичного пучка 4 кэВ.

Часть измерений в режиме НТ ВИМС выполняли на двухсекторном масс-спектрометре VG-ZAB-SEQ («Микромасс», Манчестер, Англия). Бомбардировку образца проводили ионами Cs^+ с энергией 15-30 кэВ. Образец замораживали на стальном штоке системы прямого ввода; спонтанный отогрев штока (без термостатирования) обеспечивал скорость отогрева $\sim 5^\circ C/мин$, достаточную для регистрации спектров с помощью специализированной автоматизированной программы сбора и обработки данных, входящей в комплект данного прибора [17-18].

В работе использовали препараты производства фирмы «REANAL», Венгрия.

Модель для интерпретации низкотемпературных ВИМС/ББА масс-спектров

Модель, необходимая для адекватной интерпретации НТ ББА/ВИМС масс-спектров замороженных растворов, основана на учете гетерогенной морфологии образца, формирующейся вследствие фазового разделения при замораживании, а также фазовых переходов при изменении температуры [4-6, 10]. В самом общем случае, при охлаждении двухкомпонентных водных растворов, в соответствии с фазовой диаграммой данной конкретной системы, образуется структура, состоящая из кристаллитов воды и кристаллов (аморфных зерен) растворенного вещества, соотношение которых зависит от начальной концентрации раствора, а размеры - от режимов замораживания: при концентрации растворенного вещества ниже эвтектической (C_e) в образце будут присутствовать поликристаллический лед и эвтектическая фаза, состоящая из смеси более мелкодисперсных кристаллов льда и растворенного вещества; при концентрации выше C_e будут преобладать кристаллы растворенного вещества плюс эвтектика (заполняющая межкристаллитные пространства). Анализ имеющихся в литературе данных о геометрических размерах структурных элементов таких образцов [27-29] показал, что средние размеры кристаллитов, зерен, межкристаллитных каналов, составляющие 10^{-4} - 10^{-6} м, на несколько порядков больше зоны, возбуждаемой ударом одной бомбардирующей частицы (10^{-8} м) [30]. Именно этот факт весьма важен для интерпретации масс-спектров, поскольку каждый индивидуальный удар частицы будет выбивать ионы из зоны поверхности определенного химического состава, соответствующей индивидуальному веществу. Из этого следует, что суммарный результирующий спектр должен представлять собой суперпозицию спектров, характерных для индивидуальных компонентов системы, и при полном фазовом расслоении смешанные ассоциаты не могут образовываться по чисто стерическим причинам. Это позволяет объяснить отсутствие в спектрах таких образцов смешанных кластерных ионов, принимая во внимание, в частности, тот факт, что вода (лед) не сокристаллизуется (за редкими исключениями) с растворенными веществами [3, 5]. Однако, при замораживании в системе возможно образование новых веществ, например, кристаллогидратов [1-4], в которых «смешение» отдельных компонентов происходит на молекулярном уровне. Регистрация в спектрах смешанных кластеров свидетельствует о появлении в исследуемой системе таких новых веществ; образование гетероассоциатов возможно также в случае гомогенных аморфных образцов и, естественно, жидких растворов.

В контексте данного исследования наибольший интерес представляют гидратные кластеры, поскольку именно они могут служить свидетелями существования связанной воды в конденсированных замороженных образцах и стабильных гидратов в жидкой фазе.

Наряду с зависимостью характера спектров от геометрических (морфологических) параметров образца, метод НТ ББА/ВИМС проявляет чувствительность к различным типам межмолекулярных взаимодействий в образце и его агрегатному состоянию. Для *твердых образцов* можно выделить следующие различия:

- *ионная кристаллическая решетка* - спектры в широком диапазоне положительных и отрицательных температур содержат интенсивные пики катионов (анионов в режиме отрицательных ионов) и наборы кластеров катионов с анионами; примеры - галлоидные соли щелочных металлов [12];

Наблюдение эффектов, связанных с гидратацией ...

- **кристаллическая решетка с ионными и водородными связями** - НТ спектры содержат интенсивные сигналы катионов и ряды интенсивных смешанных кластеров различной стехиометрии; примеры - кристаллогидраты солей, кислот, щелочей (многие из которых существуют в этой форме только при низких температурах) [12];

- **решетка с преобладанием ван-дер-ваальсовых связей** - возможна регистрация спектров, содержащих молекулярные ионы и кластеры, начиная с азотной температуры; примеры - кремнийорганические соединения [23], параформ [14, 19];

- **решетка с водородными связями** - в случае простых неорганических соединений, таких как вода (лед), кластерные спектры регистрируются начиная с азотной температуры [9-13, 26]; органические же соединения являются наиболее сложным случаем, поскольку быстрое загрязнение поверхности продуктами разложения (под воздействием бомбардировки) не позволяет получить удовлетворительные спектры [11, 16, 30].

Жидкая фаза в составе образца может возникать вследствие плавления замороженного образца при его нагреве [14-19] и существовать в температурном интервале, «разрешенном» в соответствии с фазовой диаграммой данной системы при низком давлении [16]. В этом случае регистрируются хорошие интенсивные спектры кластерного типа, по своим параметрам не уступающие спектрам труднолетучих жидкостей при комнатной температуре. Наблюдается зависимость характера спектра от вязкости жидкости; в частности, увеличение вязкости при понижении температуры приводит к ухудшению качества спектра [25]. Примеры - глицерин [10, 25], первичные спирты [14-18, 21-25], формалин [19].

Газовая фаза достаточной плотности при низких температурах и низком давлении в установке может возникать в температурном интервале активной сублимации твердого образца (и испарения жидкости); это достаточно экзотический случай, и ионизация отдельных молекул может проходить по специфическому газофазному ББА механизму; примеры - сублимация воды [11-13] и испарение спиртов [15-18].

Как и любой другой экспериментальный метод, НТ ВИМС имеет свою область применимости и определенные ограничения. Последние связаны, в основном, с условиями эксперимента, такими как высокий вакуум и высокоэнергетичная бомбардировка образца. Условия низкого давления не позволяют проводить прямые корреляции с фазовыми диаграммами, полученными для многих систем в основном при атмосферном давлении, а также приводят к быстрому исчерпанию жидкой фазы и, в ряде случаев, сублимации твердой фазы. Интенсивная бомбардировка приводит к быстрому загрязнению поверхности твердых органических образцов продуктами деструкции как при низких, так и при высоких температурах, что затрудняет получение стабильных спектров [30]. Однако, при правильном учете этих эффектов при планировании эксперимента, методом НТ ББА/ВИМС можно эффективно решать достаточно большое число задач, представляющих криобиологический и криобиофизический интерес.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение гидратных кластерных ионов из жидкой фазы

Образцы в жидком состоянии могут существовать при низком давлении (10^{-5} - 10^{-7} Па), характерном для экспериментальных условий масс-спектрометрического эксперимента, если давление насыщенных паров исследуемой жидкости при данной температуре достаточно мало и, соответственно, скорость испарения невелика. Этим свойством обладает большинство веществ, используемых в качестве ББА матриц при комнатной температуре, наиболее употребительным из которых является глицерин [31]. Область существования жидкой фазы для ряда органических растворителей, легколетучих в нормальных условиях при комнатной температуре и атмосферном давлении, смещается в область более низких давлений при понижении температуры, благодаря чему их можно исследовать в условиях НТ ББА/ВИМС. Это условие, к сожалению, невыполнимо для воды и водного льда: ниже тройной точки для льда характерен фазовый переход непосредственно из твердой в газовую фазу (сублимация), который в условиях данных НТ ББА масс-спектрометрических экспериментов [10-14] завершается полным исчерпанием всего объема льда в образце при $-55 \pm 5^\circ\text{C}$. Следует отметить, что сублимации подвергаются не только относительно крупные кристаллы льда, но и мелкодисперсные кристаллиты из фазы эвтектики, в связи с чем при -55°C соотношение компонентов в образце нарушается и эвтектическая фаза исчезает как таковая. В связи с этим плавление эвтектики в условиях НТ ББА можно наблюдать только для тех образцов, у которых $T_3 < -55^\circ\text{C}$.

НТ ББА масс-спектры для жидкой фазы были зарегистрированы для систем, состоящих из воды и первичных спиртов метанола и этанола [15, 17, 18]. Серию образцов с различным соотношением воды и спирта замораживали со скоростью порядка $200^\circ\text{C}/\text{мин}$ и отогревали со скоростью $3^\circ\text{C}/\text{мин}$ в экспериментах на установке МИ-1201 [15] и $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ на установке VG-ZAB [17]. Примечательно, что характер изменения спектров с температурой был практически одинаков как в экспериментах на двух названных

установках, так и в более ранних работах [21-25], и не зависит от параметров конкретной установки, зарядового состояния и энергии бомбардирующих частиц. Данный факт свидетельствует о том, что ионы во всех экспериментах образуются по одним и тем же механизмам, а изменения в спектрах связаны с физическими процессами в самом образце.

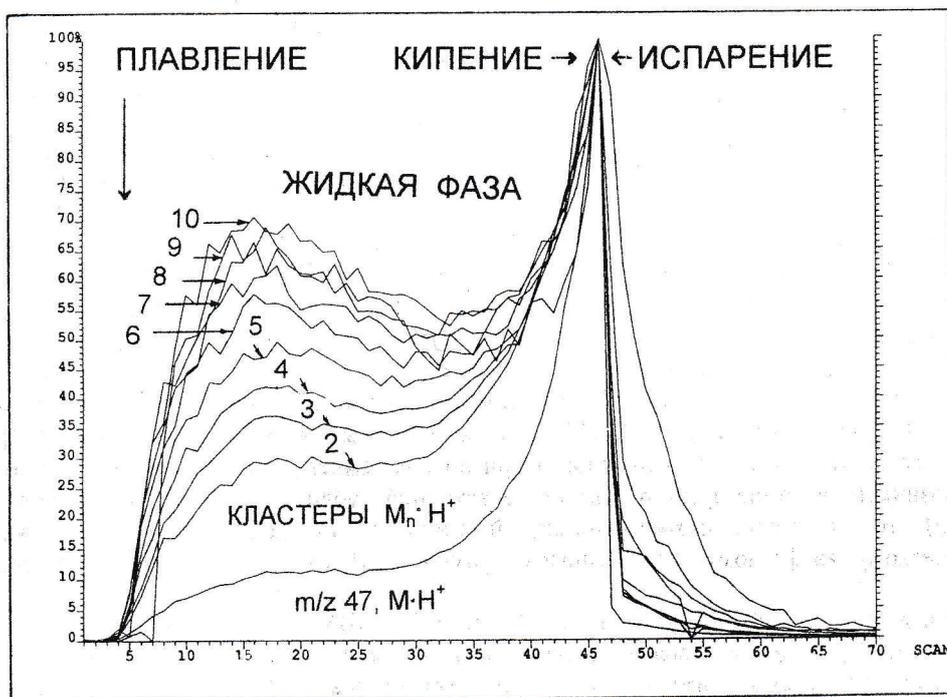


Рис. 1. Ионные термограммы, полученные при отогреве со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ образца замороженного дистиллированного этилового спирта на приборе VG-ZAB (см. пояснения в тексте). Приведены зависимости относительной интенсивности (I) ионных токов, соответствующих кластерам $M_n \cdot H^+$ при $n = 1-10$. Номера сканирования на оси X прямо пропорциональны времени, отсчитываемому от начала измерений и температуре образца; порог появления ионов соответствует примерно -130°C .

На рис. 1 приведены ионные термограммы (представляющие собой зависимость относительной интенсивности данного пика в масс-спектре от температуры образца) ряда ионов в НТ ВИМС масс-спектрах 95% (дистиллированного) этанола, полученные на установке VG-ZAB в режиме отогрева замороженного образца. Ранее в работе [16] были установлены корреляции между фазовыми диаграммами водно-спиртовых смесей и температурными изменениями в масс-спектрах, в соответствии с которыми порог появления кластерных ионов в масс-спектрах совпадает с температурой плавления водно-спиртовой эвтектики T_3 , т.е. появлением жидкой фазы в образце. Это заключение позволяет объяснить практически полное отсутствие зависимости характера спектров, зарегистрированных в первые минуты после «порога», от соотношения компонентов в исходном образце, поскольку эти спектры соответствуют одной и той же фазе эвтектического состава. При повышении температуры образца (рис. 1) наблюдается некоторая область стабильного распыления кластерных ионов, в конце которой интенсивность последних заметно возрастает, что можно связать с уменьшением вязкости жидкости и началом ее кипения, затем достигает максимума и резко спадает, что может быть обусловлено как исчерпанием всего объема образца, так и сильным переохлаждением его поверхности вследствие бурного испарения [18]. Узкий температурный диапазон существования жидкой фазы не позволяет наблюдать значительного изменения количественного состава жидкости вследствие плавления других компонентов системы. Близкая картина наблюдается и для водно-метанольной смеси [17, 18].

Таким образом, кластерные спектры водно-спиртовых смесей регистрируются только в том температурном диапазоне, в котором образцы находятся в жидком состоянии, и их НТ БА спектры по своим характеристикам близки к жидкостным спектрам других веществ при комнатной температуре [31]. Отсутствие распыления ионов из замороженных образцов спиртов в твердом состоянии связано с причинами, отмеченными выше для случая соединений, образующих водородные связи. Приведенное обсуждение агрегатного состояния образца необходимо для подтверждения того, что рассматриваемые ниже гидратные кластеры были получены из жидких растворов при низких температурах.

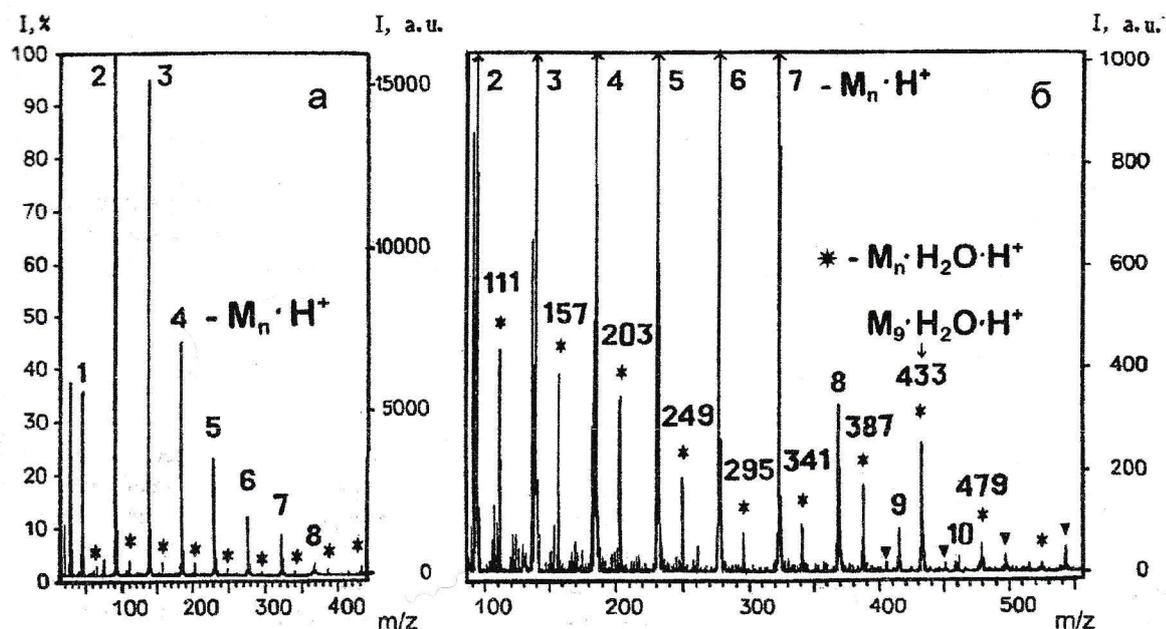


Рис. 2. Участки НТ ББА масс-спектров образца дистиллированного этанола, зарегистрированных на установке МИ-1201Е при температуре -125°C . Бомбардирующий газ - аргон, энергия первичного пучка 4 кэВ. Спектр содержит кластерные серии спирта $M_n \cdot H^+$ и гидратные кластеры $M_n \cdot (H_2O)_m \cdot H^+$ с $m = 1$ (*) и 2 (▼).

На рис. 2 представлены участки НТ ББА масс-спектров водно-этанольной эвтектики, зарегистрированные при температуре -125°C . Известно, что ББА и ВИМС спектры полярных растворителей, характеризуются набором протонированных ионов кластеров или ассоциатов, связанных водородными связями. В спектре на рис. 2, наряду с кластерами $M_n \cdot H^+$, состоящими исключительно из молекул спирта (М), присутствуют также смешанные водно-спиртовые кластеры $M_n \cdot (H_2O)_m \cdot H^+$, что свидетельствует о наличии воды в жидкой фазе при данной столь низкой температуре. Интересно, что распределение (состав и интенсивность) кластеров в НТ ББА масс-спектрах качественно совпадает с распределением, наблюдавшимся ранее другими методами в газофазных экспериментах [32, 33]. Для кластеров $M_n \cdot H^+$ наблюдается практически монотонный спад интенсивности с увеличением n , а для смешанных кластеров распределение носит более сложный характер. Огибающая максимумов пиков в кластерной серии моногидрата $M_n \cdot H_2O \cdot H^+$ имеет колоколообразную форму и распределение достигает максимума при $n = 9$ (m/z 433 на рис. 2), в то время как отношение интенсивности моногидратов (равно как и высших гидратов) к интенсивности кластеров из чистого этанола с тем же числом мономеров $M_{n+1} \cdot H^+$ монотонно возрастает с увеличением n . Пики дигидратов $M_n \cdot (H_2O)_m \cdot H^+$ становятся заметными в спектре при $n \geq 8$, тригидратов - при $n \geq 10$. Контрольный эксперимент на приборе VG-ZAB с большим массовым диапазоном позволил зарегистрировать гидратные кластеры, содержащие до 5 молекул воды и общей размерностью до 30 мономеров; гидратные серии имели «колоколообразное» распределение интенсивностей, максимум которых смещался в область больших n при увеличении m [17]. Общие качественные тенденции такого распределения соответствуют статистической вероятности включения двух типов частиц, имеющих в системе в определенных концентрациях, в ассоциаты размером $(n+m)$. Оценки величин параметров m и n [17] в гомогенных и смешанных кластерах показали, что молярное содержание воды в образце весьма близко к эвтектической концентрации (составляющей для данной системы 7,5% весовых [34]). Количественные соотношения интенсивностей пиков в сериях кластеров в спектрах, однако, несколько отличаются от соотношений, следующих из равновероятностного статистического распределения, что может быть связано как с существованием некоторых более выгодных структур (стабильных гидратов), так и с рядом особенностей поведения заряженных кластеров в условиях масс-спектрометрического эксперимента (таких как фрагментация и десольватация, различия в сродстве к протону, которые также, в конечном счете, определяются энергетикой межмолекулярных взаимодействий в ассоциатах [32, 33]). Вытекающие из этого количественные оценки в настоящий момент находятся на стадии дальнейшего изучения. В частности, представляется весьма интересным провести корреляции между существованием стабильных гидратов в водно-этанольных растворах и характером НТ ББА масс-спектров. Однако, в случае водно-этанольной смеси выделение эффектов, связанных с образованием стабильных гидратов, осложняется существованием азеотропного раствора, причем азеотропная концентрация этанола (95,5%

[34]) отличается от эвтектической (92,5% [35]) всего на ~2%. Характер испарения водно-этанольной смеси при низких температурах указывает на неизменность ее состава, а именно, соотношение интенсивностей спиртовых и гидратных кластеров не меняется с температурой и их интенсивности достигают максимума в одной и той же точке, указанной на рис. 1. Отметим, что противоположная ситуация, а именно увеличение со временем интенсивности гидратных кластеров вследствие изменения концентрации раствора при неазетропном кипении, наблюдалась для водно-метанольной смеси [18].

Интересно, что в случае глицерина, несмотря на его высокую гигроскопичность, гидратные кластеры в условиях ББА не были зарегистрированы ни при комнатной, ни при пониженных температурах [10, 25, 31], что коррелирует с отсутствием стабильных гидратов для данного многоатомного спирта в жидкой фазе. В то же время в газофазной смеси паров воды и глицерина образование смешанных водородно-связанных ассоциатов наблюдалось при использовании мягкого газофазного метода ионизации - ионизации полем [35]. Можно предположить что, поскольку глицерин не образует ни стабильных гидратов, ни азеотропной смеси с водой, то вода, присутствующая в образце, легко испаряется (отгоняется) из жидкости при низком давлении. Подтверждением тому служат данные для системы ($H_2SO_4 + H_2O$), также являющейся классическим объектом для изучения стабильных гидратов среди неорганических соединений. В работе [36] при использовании метода ББА при комнатной температуре было показано, что, вне зависимости от начального молярного соотношения H_2O и H_2SO_4 в растворе (которое варьировалось от 0,1 до 11), в спектре наблюдалось одно и то же распределение гидратных кластеров. По всей видимости, в этом случае происходило быстрое испарение воды до определенной равновесной (при данном давлении) концентрации. Для глицерина, как следует из масс-спектров, такая концентрация равна нулю.

Поиск систем, в которых методом масс-спектрометрии можно было бы наблюдать гидраты в жидкой фазе при низких температурах в настоящее время продолжается, и еще одним примером может служить обсуждающийся в следующем разделе раствор олигомеров полиоксиметилена.

Наблюдение сильно связанной воды в конденсированном состоянии

Сильно связанная вода, как известно, это вода, которая остается связанной с биомолекулами при низких температурах и не «вымораживается» в кристаллы льда, растущие при охлаждении и замораживании растворов [1-4, 8]. Одним из вариантов связывания воды является формирование регулярных кристаллогидратов, которые может образовывать ряд органических соединений [1, 2, 4, 6, 7]. При изучении данных объектов методом НТ ББА, однако, возникают заметные осложнения. Во-первых, как отмечалось ранее, твердые органические образцы с водородными связями практически не дают ББА масс-спектров; кроме того, возможно быстрое обезвоживание поверхностных слоев органического кристаллогидрата в условиях низкого давления. Во-вторых, диапазон масс, доступный для изучения методом ББА, ограничивается не столько массовым диапазоном выпускаемых приборов, сколько в принципе достижимой эффективностью распыления больших молекул в ионизированной форме данным способом, и составляет не более 10000 Да [37], что не позволяет изучать природные биополимеры.

Оба эти препятствия, однако, практически отсутствуют для образца специфического состава и структуры, для которого впервые при помощи метода НТ ББА удалось зарегистрировать наличие связанной воды в конденсированном состоянии при низких температурах. Таким объектом явился водный раствор олигомеров полиоксиметилена, образующихся при охлаждении водного раствора формальдегида [38, 39]. Явление полимеризации, качественный и количественный состав олигомеров изучался ранее разными методами [38-40].

При отогреве медленно замороженного на подложке формалина (40% водного раствора формальдегида) наблюдались три стадии эволюции спектров, которые с уверенностью можно связать с физическими процессами в образце. На первой стадии, начиная с азотной температуры, при которой образец находится в твердом состоянии, регистрировался спектр, подобный представленному на рис. 3а. Далее, при отеплении до примерно $-20^\circ C$ (соответствующих T_g [39]), наблюдалось резкое повышение интенсивностей всех пиков, связанное, по всей видимости, с появлением жидкой фазы в образце (рис. 3б). Дальнейшее повышение температуры сопровождалось существенным падением общего ионного тока, вызванным повторным затвердеванием образца вследствие испарения легколетучих компонентов жидкости, однако характерные пики продолжали присутствовать в спектре.

Основные серии пиков в спектрах соответствовали протонированным олигомерам - продуктам конденсации формальдегида - с разными типами терминальных групп и числом мономерных звеньев n в цепи до 9: $HO-(CH_2-O)_n-H$, $H-(CH_2-O)_n-H$, $H-(CH_2-O)_n-CH_3$. Названным сериям сопутствовали пики, соответствующие моно- и дигидратам олигомеров, причем они наблюдались как для твердофазного (рис. 3а) так и для жидкого (рис. 3б) состояния образца, но существенно теряли в интенсивности после формирования параформа выше $-20^\circ C$. Регистрация гидратов в расплавленном образце аналогична ситуации, описанной в предыдущем разделе для водных смесей; в то же время образование ионов гидратных кластеров полиоксиметилена при бомбардировке твердого образца является первым случаем

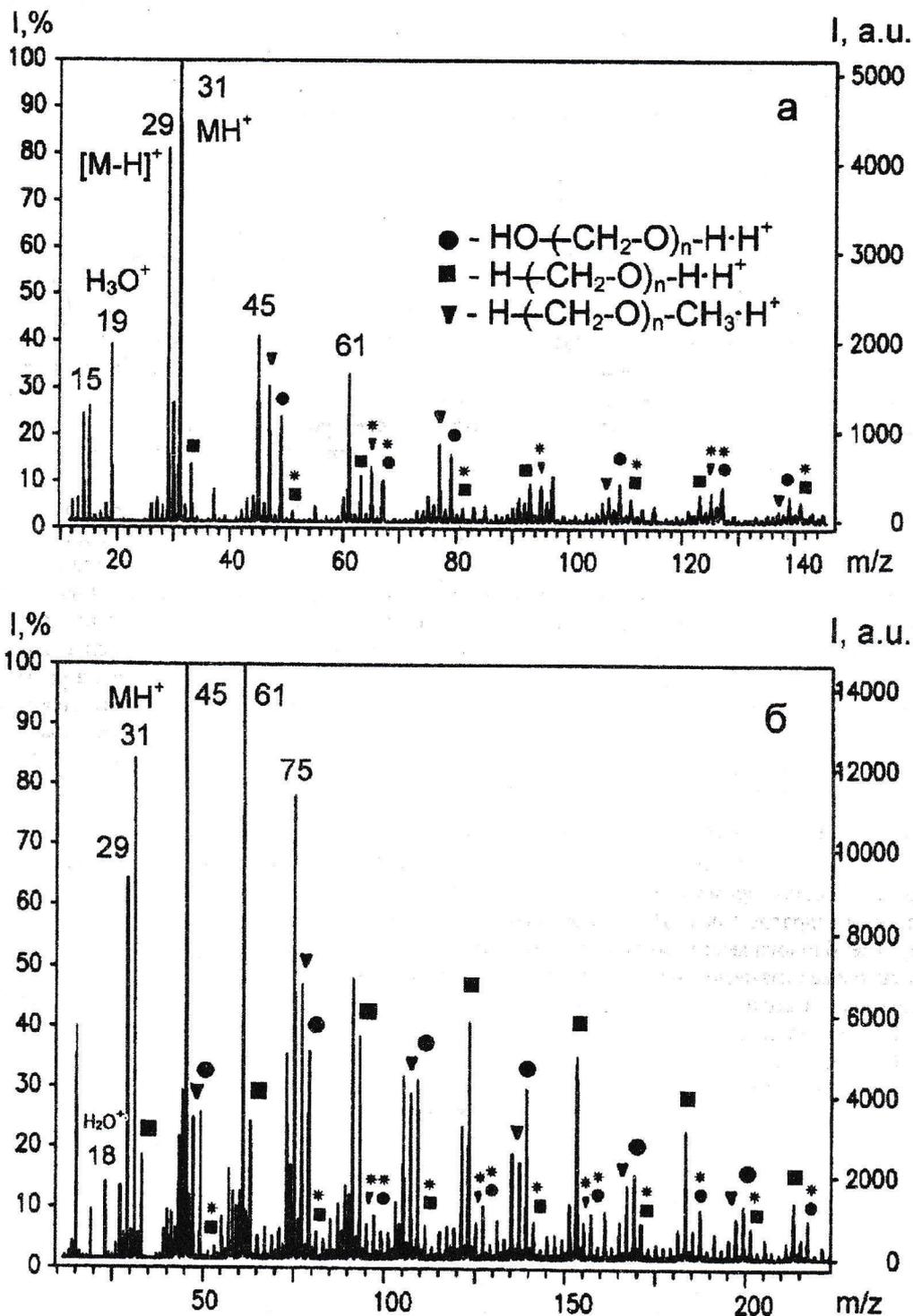


Рис. 3. НТ ББА масс-спектры замороженного раствора формалина, зарегистрированные для образца в твердой фазе при $T = -190^\circ\text{C}$ (а) и в жидкой фазе после плавления при $T = -20^\circ\text{C}$ (б). Пики, соответствующие олигомерам полиметиленоксидов с различными терминальными группами, обозначены как ●, ▼, ■, гидраты отмечены знаком *.

регистрации сильно связанной воды в замороженных растворах органических соединений посредством методом НТ ББА.

Примечательным является сам факт распыления ионов из твердофазных образцов данного типа, которое становится возможным благодаря преобладанию более слабых (в сравнении с водородными связями) ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Молекулы олигомеров полиоксиметилена представляют собой жесткие палочки [41], на периферии которых отсутствуют протонодонорные группы, необходи-

мые для образования водородных связей. В то же время молекулы воды могут образовывать Н-связи как с эфирными кислородами (создавая «сшивки» между цепями), так и с концевыми группами полимеров гликольного типа. Известно, что мономер формальдегида присутствует в растворах в форме гидрата [38-40]; было показано, что образующиеся при полимеризации олигомеры также гидратированы; при замораживании эти гидраты, по всей видимости, сохраняются в твердой фазе.

Отметим, что в НТ ББА масс-спектрах замороженного формалина отсутствуют кластерные серии воды, что указывает на отсутствие в образце сравнительно крупных кристаллов льда. При плавлении образца относительная интенсивность гидратных кластеров не увеличивается. На основании этих двух фактов можно заключить, что практически вся вода при замораживании либо связывается в форме гидратов, либо оказывается захваченной растущей полимерной сеткой (что ограничивает подвижность молекул воды и препятствует образованию крупных кристаллов льда). Именно такие трансформации воды в охлаждаемом растворе и ожидаются от эффективного криопротектора [28, 29]. Однако, полиоксиметилен на может применяться на практике вследствие высокой множественной токсичности его мономера формальдегида; в то же время его ближайший гомолог полиоксиэтилен (в форме полиэтиленгликоля) широко применяется в криопротекции [28, 29]. Таким образом, существуют определенные корреляции между некоторыми параметрами НТ ББА масс-спектров и криопротекторными свойствами раствора, что может быть использовано в дальнейшем для оценки эффективности различных криопротекторов.

Следует упомянуть также о явлении, противоположном гидратации, а именно, дегидратации, которая является одним из повреждающих факторов при замораживании биоматериала. Удаление молекул воды в растущие кристаллы льда уменьшает количество контактов растворенных молекул с растворителем; при полном фазовом расслоении происходит выделение безводной фазы растворенного вещества. Для образцов такого типа, как уже отмечалось выше, невозможно образование смешанных гидратных кластеров, что наблюдалось, например, для замороженных водных растворов азотистых оснований [11]. В то же время из затвердевших аморфно растворов органических молекул в растворителе с криопротекторными свойствами, например, глицерине, возможно распыление «сольватных» кластеров [11], что свидетельствует о сохранении водородных связей растворенного вещества с молекулами растворителя в твердой фазе - эффект, важный для сохранения тех конформационных особенностей биомолекул, которые обусловлены их взаимодействием с молекулами растворителя.

Вода, связанная в кристаллогидратах неорганических веществ

Для полноты картины возможностей НТ ББА масс-спектрометрии в изучении свойств связанной воды коротко опишем примеры ее приложения к исследованию неорганических кристаллогидратов, в частности, криогидратов солей. Данные объекты также имеют отношение к проблемам криопротекции, поскольку все биологические жидкости представляют собой солевые растворы, и неорганические компоненты также оказывают влияние на структуру замораживаемого образца.

Были изучены водные растворы NaCl [12] как основного солевого компонента физиологических жидкостей. Для серии растворов разных концентраций наблюдалось хорошее соответствие между структурой образца, определяемой фазовой диаграммой данной системы, фазовыми переходами при повышении температуры и характером НТ ББА масс-спектров. При охлаждении системы в ходе перитетической реакции ($T_n = +0,15^\circ\text{C}$, $C_n = 26,8\%$ [42]) образуется новое соединение - кристаллогидрат $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Замороженный образец содержит кристаллы льда и кристаллогидрата (соотношение и морфология которых зависят от начальной концентрации) и, в полном соответствии с моделью формирования НТ ББА масс-спектров, его спектр (рис. 4а) представляет собой суперпозицию серии кластеров воды $(\text{H}_2\text{O}) \cdot \text{H}^+$, распыляемых из кристаллитов льда и ряда ионов, связанных с фазой $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Na^+ , $(\text{NaCl})_m \cdot \text{Na}^+$ ($m = 1-3$), $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Na}^+$ ($n = 1-4$), $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot (\text{NaCl})_m \cdot \text{Na}^+$ ($n, m = 1, 2$) [12].

С повышением температуры в системе наблюдаются два типа фазовых переходов: сублимация кристаллов льда (фактически, сублимационная сушка образца) и обезвоживание кристаллогидрата. При этом наблюдать плавление эвтектики не представляется возможным, поскольку $T_e = -21,2^\circ\text{C}$ [42] лежит выше температуры сублимации льда в данных условиях. Соответствие гидратных кластеров фазе кристаллогидрата однозначно доказывается тем фактом, что после полной сублимации чистого льда и исчезновения из спектра кластерной серии воды смешанные гидратные кластеры продолжают присутствовать в спектре (рис. 4 б) и их абсолютная интенсивность понижается при последующем повышении температуры за счет обезвоживания поверхности кристаллогидрата. Смешанный тип водородных и ионных связей в неорганическом кристаллогидрате способствует достаточно интенсивному распылению кластерных ионов; фазовый переход от кристаллогидрата к безводной соли при положительных температурах, сопровождающийся структурной перестройкой кристаллической решетки в чисто ионную, приводит к падению абсолютной интенсивности кластеров $(\text{NaCl})_m \cdot \text{Na}^+$.

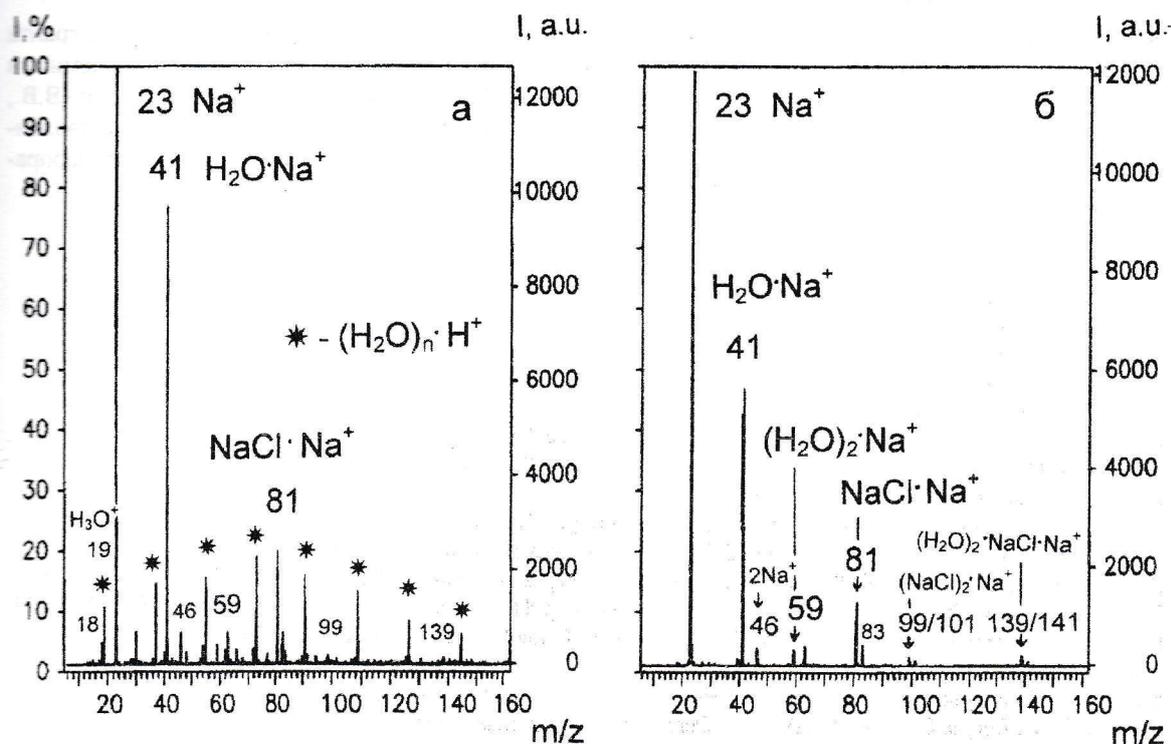


Рис. 4. НТ ББА масс-спектры замороженного 23% водного раствора NaCl. (а) $T = -175^{\circ}\text{C}$, образец содержит кристаллы льда, из которых распыляются кластеры воды $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$ (*), и кристаллогидрат $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в составе эвтектической фазы; (б) $T = -50^{\circ}\text{C}$, спектр соответствует фазе чистого кристаллогидрата, оставшегося после завершения сублимации воды из кристаллов льда.

Гидратные кластеры наблюдались и для водных растворов ряда других солей, образующих кристаллогидраты при низких температурах. Данная информация необходима для выделения ионов, относящихся к солям металлов, в НТ ББА масс-спектрах более сложных многокомпонентных растворах биомолекул. Отметим, что в плане криопротекции связывание части воды в составе кристаллогидратов, с одной стороны, уменьшает количество свободной воды, способной образовывать крупные кристаллы льда, а с другой стороны, снижает концентрацию ионов металлов в оставшейся жидкой фазе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный в данной работе анализ ряда результатов, полученных к настоящему времени с помощью метода НТ ББА, позволяет сделать вывод о том, какой круг объектов и явлений, связанных с гидратационными эффектами, можно эффективно изучать этим методом. Можно выделить три типа таких объектов: 1) твердофазные замороженные водные растворы органических веществ, в которых присутствует так называемая сильно связанная вода (пример - раствор олигомеров полиоксиметилена); 2) образцы, содержащие жидкую фазу в некотором интервале экспериментальных условий НТ ББА, в которых могут присутствовать стабильные гидраты (примеры - водно-спиртовые растворы); 3) кристаллогидраты неорганических соединений (примеры - криогидраты солей). Характер НТ ББА масс-спектров этих образцов определяется их агрегатным состоянием, однако общей чертой спектров является наличие в них интенсивных гидратных кластеров органического или неорганического компонента раствора. Распределение гидратных кластеров несет качественную и, в определенных пределах, количественную информацию о состоянии гидратной воды в образце. В случае полного фазового разделения при замораживании водного раствора гидратные кластеры не наблюдаются.

Область применения метода получения ионов с помощью ББА ограничена сравнительно низкомолекулярными соединениями. Можно ожидать, что более мощные, в сравнении с ББА, методы ионизации, такие как матричная лазерная десорбция, позволят в недалеком будущем зарегистрировать стабильные гидраты более крупных биомолекул, в частности, белков и пептидов. Экспериментальные приемы получения низкотемпературных масс-спектров, накопленные в работах с использованием ББА, и модель для интерпретации спектров могут быть использованы в таких перспективных исследованиях.

Благодарности. Часть результатов, приведенных в работе, получена в исследованиях в рамках гранта INTAS-96-0865 и программы межакадемического обмена между Украинской и Венгерской академиями наук. Автор выражает благодарность коллегам Боряку О.А., Шелковскому В.С., Орлову В.В., Благому Ю.П. за поддержку в работе, а также профессору К. Векею (Венгрия) за любезно предоставленную возможность проведения ряда измерений на оборудовании в его масс-спектрометрической лаборатории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bernal J.D. // J.Chim. Phys. et Phys.-Chim. Biol. 1953. V. 50. P. C1.
- Franks F. Water - A Comprehensive Treatise, Vol. 2. Water in crystalline hydrates. Aqueous Solutions of simple nonelectrolytes. New York. Plenum Press, 1973. 690 p.
- Франкс Ф. Вода и водные растворы при температуре ниже 0°C. Киев. Наукова Думка, 1985. - 388 с.
- Franks F. Water science reviews 2. Crystalline hydrates. Cambridge, Cambridge. University Press, 1986.
- Fletcher N.H. The chemical physics of ice. Cambridge, Cambridge. University Press, 1970. 265 p.
- Hamilton W.C., Ibers J.A. Hydrogen bonding in solids. New York. W.A.Benjamin Inc., 1968. 280 p.
- Clark J. Rev. Pure Appl. Chem. 1963. V. 13. P. 50.
- Габуда С.П. Связанная вода. Факты и гипотезы. Новосибирск. Наука, 1982. 160 с.
- Боряк О.А., Косевич М.В., Шелковский В.С. Приборы и техника эксперим. 1993. №6. С. 176-181
- Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P. Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1995. V. 9. P. 978-984.
- Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P. Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1996. V.10. P. 197-199.
- Boryak O.A., Stepanov I.O., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Orlov V.V., Blagoy Yu.P. Europ. Mass Spectrom. 1996. V. 2. P. 329-339.
- Kosevich M.V., Boryak O.A., Stepanov I.O., Shelkovsky V.S., Europ. Mass Spectrom. 1997. V. 3. P. 11-17.
- Kosevich M.V., Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Derrick P.S. Europ. Mass Spectrom. 1998. V. 4. P. 31-37.
- Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1977. V. 163. P. 177-184.
- Kosevich M.V., Europ. Mass Spectrom. 1997. V. 3. P. 320-322.
- Kosevich M.V., Czira G., Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Vekey K., Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997. V. 11. P. 1411-1416.
- Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Boryak O.A., Czira G., Vekey K. Proc. 16th Inform. Meeting on Mass Spectrom., 4-6 May 1998, Budapest, Hungary, 1998. P. 84-85.
- Boryak O.A., Limanskaya O.Yu., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., *Abstr. 14th Int. Mass Spectrom. Conf.*, 25-29 Aug., Tampere, Finland, 1997. P. 165.
- Michl J. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1983. V.53, P. 255-272.
- Katz R.N., Chaudhary T., Field F.H. J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 108. P. 3897-3903.
- Katz R.N., Chaudhary T., Field F.H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1987. V. 78. P. 85-97.
- Katz R.N., Field F.H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1989. V. 87. P. 95-104.
- Johnstone R.A.W., Wilby A.H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1989. V. 89. P. 249-264.
- Sunner J., Ikonoumou M.J., Kebarle P. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1988. V. 82. P. 221-237.
- Detter L.D., Hand O.W., Cooks R.G., Walton R.A., Mass Spectrom. Rev. 1988. V. 7. P. 465-502.
- Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А., Строна В.И., Репин Н.В. Влияние криопротекторов на биологические системы. Киев. Наук. Думка, 1989. 240 с.
- Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. М. Высшая школа, 1987. 80 с.
- Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. Киев. Наук. Думка, 1994. 432 с.
- Cherpin V. Secondary ion mass spectroscopy of solid surfaces. Utrecht. Science Press, 1987. 138 p.
- De Pauw W.E. Mass Spectrom. Rev. 1986. V. 5. P. 191-212.
- Stace A.J., Shukla A.K. J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 5314-5318.
- Karpf Z., Eiceman G.A., Harden C.S., Ewing R.G. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993. V. 4. P. 507-512.
- Третьяков Ю.Д., Олейников Н.Н., Можяев А.П. Основы криохимической технологии. М. Высшая школа, 1987. 143 с.
- Kosevich M.V., Shelkovsky V.S. Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1996. V. 10. P.435-438.
- Sharp T.R., Futrell J.H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1986. V. 90. P. 39-46.
- Siuzdak G. Mass spectrometry for biotechnology. San Diego. Academic Press, 1996. 162 p.
- Walker J.F. Formaldehyde. New York. Am. Chem. Soc. Monogr. Ser., 1953.
- Огородников С.К. Формальдегид. Ленинград. Химия. 1984. 280 с.
- Балашов А.Л., Данов С.М., Головкин А.Ю., Краснов В.Л., Пономарев А.Н., Борисова И.А. Журн. прикл. химии. 1996. Т.69. С. 190-192.
- Вундерлих Б. Физика макромолекул. Кристаллическая структура, морфология, дефекты. М. Мир, 1976. 624 с.
- Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некрасов Е.Ф. Краткий справочник по химии. Киев. Наук. Думка, 1987. 830 с.