

PACS: 68.49.Sf, 82.80.Ms, 61.66.Hq

ABOUT USING OF SECONDARY ION MASS SPECTROMETRY METHOD FOR RESEARCH OF BIOORGANIC OBJECTS

V.A. Litvinov, V.T. Koppe, V.V. Bobkov

V.N. Karazin Kharkiv National University

4 Svoboda Sq., Kharkiv, 61022

E-mail: vbobkov@mail.ru

Received December 11, 2015

The problems of application of secondary ion mass spectrometry (SIMS) with a liquid matrix for the study of objects of organic origin, as well as some aspects of the methodology of the liquid matrix using, in particular, for minimizing the effect of ion probe on the investigated object were considered. It was shown that the use of SIMS with the liquid matrix allowed to analyze reactions in a rather complicated bioorganic systems, including intermediate products of reactions, from the behavior of secondary ions characteristic for system components. Furthermore, after the necessary calibration procedure, the method permitted to determine the concentration of components during the reaction. The results of the study of the enzymatic oxidation of glucose were presented. It was shown that the use of SIMS with a liquid matrix allowed investigating the influence of radiation on materials of organic origin. The results of the study of radiation damage of molecules of arginine amino acids, glutamic acid and tryptophan under ultraviolet irradiation were represented.

KEY WORDS: secondary ion mass spectrometry, liquid matrix, biosensor for glucose, ultraviolet irradiation

ПРО ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ МАС-СПЕКТРОМЕТРІЇ ВТОРИННИХ ІОНІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ БІООРГАНІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

В.О. Літвінов, В.Т. Коппе, В.В. Бобков

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

м. Свободи 4, 61022, Харків

Розглянуто питання застосування методу мас-спектрометрії вторинних іонів (МСВІ) з використанням рідкої матриці для дослідження об'єктів органічного походження, а також деякі аспекти застосування методики рідкої матриці зокрема, питання мінімізації впливу іонного зонда на досліджувані об'єкти. Показано, що використання МСВІ з рідкою матрицею дозволяє аналізувати протікання реакцій у досить складних біоорганічних системах по поведінню вторинних іонів, характерних для компонентів системи, у тому числі для проміжних продуктів реакції. Крім того, після необхідних калібрувань методика дозволяє визначати концентрації компонентів у ході реакції. Наведено результати дослідження процесів ферментативного окислювання глюкози. Показано, що використання методу МСВІ з рідкою матрицею дозволяє досліджувати радіаційний вплив на матеріали органічного походження. Приводяться результати дослідження радіаційних ушкоджень молекул амінокислот аргініну, глутамінової кислоти й триптофану при ультрафіолетовому опроміненні.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мас-спектрометрія вторинних іонів, рідка матриця, біосенсор на глюкозу, ультрафіолетове опромінення.

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВТОРИЧНЫХ ИОНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИООРГАНИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

В.А. Литвинов, В.Т. Коппе, В.В. Бобков

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

пл. Свободы, 4, Харьков 61022

Рассмотрены вопросы применения метода масс-спектрометрии вторичных ионов (МСВИ) с использованием жидкой матрицы для исследования объектов органического происхождения, а также некоторые аспекты применения методики жидкой матрицы, в частности, вопросы минимизации влияния ионного зонда на исследуемые объекты. Показано, что использование МСВИ с жидкой матрицей позволяет анализировать протекание реакций в достаточно сложных биоорганических системах по поведению вторичных ионов характерных для компонентов системы, в том числе для промежуточных продуктов реакции. Кроме того, после необходимых калибровок методика позволяет определять концентрации компонентов в ходе реакции. Приведены результаты исследования процессов ферментативного окисления глюкозы. Показано, что использование метода МСВИ с жидкой матрицей позволяет исследовать радиационное воздействие на материалы органического происхождения. Приводятся результаты исследования радиационных повреждений молекул аминокислот аргинина, глутаминовой кислоты и триптофана при ультрафиолетовом облучении.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: масс-спектрометрия вторичных ионов, жидкая матрица, биосенсор на глюкозу, ультрафиолетовое облучение.

Метод анализа, основан на явлении вторичной ионной эмиссии – масс-спектрометрия вторичных ионов (МСВИ) с успехом используется для исследования поверхности твердых тел уже несколько десятков лет. Анализ ионной компоненты продуктов распыления (атомов, кластеров, молекул и молекулярных фрагментов), образующихся при бомбардировке твердых тел пучком ускоренных ионов (атомов), позволяет получать информацию, как об элементном, так и химическом составе поверхности. При этом можно исследовать физико-химические процессы, которые имеют место при воздействии различных факторов, как например, изменение

температуры образца или параметров окружающей газовой среды. Применение МСВИ в аналитических целях базируется на высокой чувствительности, селективности и относительной простоте метода. Данный метод позволяет регистрировать наличие атомов в количестве 10^{-4} - 10^{-6} атомных процентов, что дает возможность исследовать самые начальные стадии разнообразных физико-химических процессов. Это адсорбция, диффузия, сегрегация примесей, разные типы газовой коррозии и др. [1,2]. Способность интенсивных ионных пучков производить значительное распыляющее действие, позволяет решать ряд задач по определению профилей залегания примесей по глубине (ионный послойный анализ).

В числе отличительных особенностей метода – возможность определения молекулярной массы (элементного, изотопного состава), что в значительной мере исключает неоднозначности при идентификации химических соединений; высокая чувствительность, позволяющая анализировать весьма малые концентрации вещества; возможность определения абсолютных значений концентраций анализируемых компонентов после соответствующей калибровки. Метод МСВИ позволяет анализировать нелетучие и термически нестойкие соединения после помещения их в жидкую матрицу, что для ряда аналитических методов представляет серьезную проблему [3].

Наиболее широкое применение МСВИ получило при исследовании поверхности твердых тел – металлов, полупроводников, диэлектриков [4,5]. Однако более 30 лет назад была показана возможность применения метода для исследования органических соединений различного происхождения [6]. Так в настоящее время различные модификации метода МСВИ с успехом используются при исследовании белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот и пр. [7-18].

Одним из способов анализа биологических материалов методом МСВИ является способ, когда на металлической подложке создается мономолекулярный слой исследуемого вещества, а измерение ведется в статическом режиме. Такой режим характеризуется очень низкой плотностью тока первичного пучка и, соответственно, низкой распыляющей способностью. В статическом режиме отсутствует перекрытие столкновительных каскадов, порождаемых первичными частицами, что является необходимым условием того, чтобы вторичные ионы распылились из исходного, не нарушенного поверхностного слоя. За время измерения в статическом режиме, как правило, распыляется лишь малая часть исследуемого монослоя, соответственно, не происходит значительного накопления радиационных повреждений исследуемых молекул [1].

Другим способом анализа биологических материалов является способ, когда исследуемое вещество предварительно растворяется в слабо летучей жидкости (жидкой матрице) и анализу подвергается раствор. В качестве жидкой матрицы обычно используется глицерин, триглицерин или м-нитробензиловый спирт. Выбор именно этих материалов обусловлен тремя основными факторами: они имеют довольно малую упругость паров (при комнатной температуре 10^{-2} - 10^{-3} Па), являются хорошим растворителем многих органических веществ, а также обладают достаточно низкой вязкостью, чтобы не препятствовать диффузии.

Для зондирования жидкой матрицы, как правило, используют нейтральные ускоренные частицы (бомбардировка быстрыми атомами) [19-21]. Применение именно нейтральных частиц для бомбардировки диктуется необходимостью исключить возможность накопления заряда на исследуемой поверхности, что может иметь место при использовании заряженных бомбардирующих частиц. Такой заряд может искажать измеряемые масс-спектры, привнося дополнительный, трудно контролируемый, часто непостоянный потенциал в систему формирования пучка вторичных ионов. Однако, снимая вопрос о накоплении заряда, применение нейтральных частиц в качестве бомбардирующих, делает невозможным надежный контроль и управление параметрами первичного пучка. Вместе с тем, при условии достаточной проводимости жидкой матрицы с растворенной в ней пробой исследуемого вещества вместо бомбардировки быстрыми атомами вполне можно применять бомбардировку заряженными частицами – первичными ионами. Это значительно упрощает диагностику и управление первичным пучком, что в некоторых случаях имеет существенное значение для получения корректных результатов. К тому же механизмы образования вторичных ионов в случае бомбардировки и нейтральными и заряженными частицами считаются сходными [22]. Такая методика масс-спектрометрического анализа получила название вторичная ионная масс-спектрометрия с жидкой матрицей [23].

Использование МСВИ с жидкой матрицей позволяет применять существенно большие плотности тока первичного пучка (динамический режим) по сравнению со статическим режимом измерения, что позволяет значительно увеличить количество распыляемых вторичных ионов, а, следовательно, и повысить чувствительность методики. Возможность увеличения плотности тока первичного пучка обусловлена тем, что в жидкой матрице приповерхностный слой образца достаточно быстро обновляется за счет процессов диффузии. Устранение эффекта накопления фрагментов в анализируемой области выгодно отличает анализ жидкой матрицы от анализа тонких слоев на твердой подложке.

Применение методики МСВИ с жидкой матрицей, давая ряд преимуществ и положительных моментов, требует, однако, учета ряда факторов методического характера. Как показывает практика, при анализе вещества в жидкой матрице необходимо учитывать ряд специфических моментов, которые характерны для исследуемых органических систем. В частности, необходимо учитывать нелинейные эффекты влияния концентрации исследуемого вещества на вторичную ионную эмиссию. Кроме того, не всегда снимаются вопросы влияния

ионного зонда на изучаемый объект. При определенных, отличающихся для разных исследуемых объектов, плотностях тока первичных частиц процессы, приводящие к разрушению анализируемого слоя образца, могут стать весьма ощутимыми. При отработке методики измерений этим вопросам необходимо уделять серьезное внимание. Учет этих факторов при соответствующей нормировке позволяет проводить количественные измерения, что существенно повышает ценность получаемой информации при проведении исследований методом МСВИ с жидкой матрицей. Необходимо также учитывать конечное время жизни образца в вакуумных условиях, т.к. испарение материала матрицы ограничивает время корректных измерений.

Ниже рассмотрены различные аспекты использования методики МСВИ с жидкой матрицей для исследования органических объектов. Приведены результаты исследования процессов, протекающих в глицериновых растворах органических красителей при МСВИ анализе, рассмотрено влияние концентрационных эффектов и влияние плотности тока первичного пучка на вторичную ионную эмиссию. Приведены результаты исследования процессов взаимодействия компонентов в растворах, моделирующих биосенсор на глюкозу, а также результаты исследования влияния ультрафиолетового облучения на аминокислоты.

Цель работы - изучение объектов органического происхождения методом МСВИ с использованием жидкой матрицы, а также методических особенностей проведения подобных исследований.

МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на вторично эмиссионной масс-спектрометрической установке, включающей в себя в качестве основных функциональных элементов: ионную пушку, камеру мишени, электростатическую систему формирования пучка распыленных ионов, масс-анализатор, энергетический фильтр и систему регистрации. Энергетический фильтр, установленный после масс-анализатора, предназначен для выделения ионов в узком энергетическом диапазоне (на уровне нескольких эВ), что увеличивает разрешающую способность. Это позволяет с высокой точностью определять массовое число зарегистрированных вторичных ионов. В настоящей работе в качестве бомбардирующих частиц использовались ионы Ag^+ с энергией 8 кэВ при анализе положительных и 16 кэВ при анализе отрицательных вторичных ионов. Плотность тока первичных ионов в зависимости от требований эксперимента варьировалась в диапазоне 0,075 – 3,0 мкА/см². Исследуемый раствор наносился на фильтровальную бумагу, закрепленную на металлической подложке, и помещался в рабочую камеру.

При исследовании действия ультрафиолетового излучения на аминокислоты, образцы глицериновых растворов аминокислот, помещались в кварцевую кювету и облучались ртутной лампой ДРК-120, в спектре которой наиболее интенсивные линии расположены в спектральном диапазоне 2500-4000 Å (2654, 2895, 2967, 3016, 3126, 3343, 3667 Å). Доза регулировалась временем облучения. Далее, образцы подвергались МСВИ анализу.

Исследовались масс-спектры положительных и отрицательных вторичных ионов, распыленных из глицериновых растворов различных классов следующих органических веществ. Индикаторные красители, которые являются перспективными с точки зрения создания флуоресцентных биосенсоров: бромтимоловый синий, бромфеноловый синий, феноловый красный, родамин 6Ж, нейтральный красный, метиловый оранжевый, метиловый синий. Компоненты раствора, моделирующего биосенсор на глюкозу: глюкоза, глюкозооксидаза из *Aspergillus niger*, Na-фосфатный буфер, глюконолактон, глюконовая кислота. При изучении влияния ультрафиолетового облучения на биологические объекты в качестве примера исследовались аминокислоты аргинин, триптофан и глутаминовая кислота.

АНАЛИЗ МАСС-СПЕКТРОВ

Суть анализа биоорганических материалов методом МСВИ с жидкой матрицей заключается в измерении масс-спектров как положительных, так и отрицательных вторичных ионов, образующихся при бомбардировке пучком первичных ионов. Анализ полученных масс-спектров, интенсивностей эмиссий, а также зависимостей различных эмиссий от ряда параметров дает возможность судить о составе, структуре и концентрации вещества в исследуемом растворе. Естественно, что при бомбардировке растворов исследуемых объектов в жидкой матрице распыляются не только вторичные ионы, связанные с исследуемыми объектами, но и ионы, связанные с матрицей. А поскольку метод является деструктивным, то наряду с молекулярными ионами распыляется большое количество ионов фрагментов и матрицы и анализируемого вещества. Это является основанием для применения данной методики при исследовании химической структуры сложных молекул [1]. В результате, масс-спектры вторичных ионов представляют собой суперпозицию очень большого количества эмиссий, интерпретация которых иногда представляет немалую трудность. Как правило, масс-спектры положительных вторичных ионов содержат эмиссии протонированных молекул анализируемого вещества $[M+H]^+$, матрицы и их фрагментов, а масс-спектры отрицательных вторичных ионов содержат эмиссии депротонированных молекул $[M-H]^-$, матрицы и их фрагментов [24-26].

Выделить пики, характерные исключительно для анализируемого вещества, можно определив отношение нормированных интенсивностей эмиссий в масс-спектре исследуемого раствора к нормированным

интенсивностям соответствующих эмиссий в масс-спектре чистой жидкой матрицы. При этом масс-спектр чистой жидкой матрицы должен быть измерен в идентичных экспериментальных условиях. Нормировка производится на сумму интенсивностей всех эмиссий в рассматриваемом диапазоне масс. В результате этой операции для каждой массы определяется значение т.н. “коэффициента превышения” K . Коэффициент превышения – это фактически отношение процентных вкладов эмиссий для конкретного значения m/z . Чем больше величина такого коэффициента, тем в большей степени происхождение вторичного иона с данной массой связано именно с растворенным веществом. Такая обработка позволяет существенным образом упростить анализ масс-спектров [27]. Необходимо иметь в виду, что процедура определения характерных эмиссий, приведенная выше, дает правильные результаты только в случае отсутствия взаимодействия между анализируемым веществом и материалом матрицы. На рис. 1 приведены примеры такой обработки для масс-спектра положительных вторичных ионов раствора органического красителя нейтрального красного $C_{15}H_{17}ClN_4$ в глицерине (30 ммоль/л).

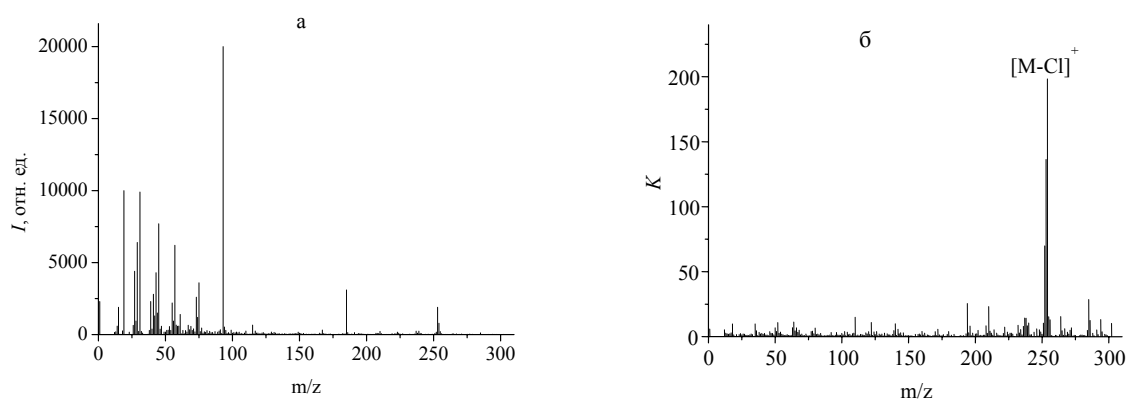


Рис. 1. Масс-спектр положительных вторичных ионов, распыленных из раствора нейтрального красного в глицерине (а) и коэффициенты превышения нейтрального красного (б).

Как видно из рис. 1а, эмиссии, характерные для растворенного материала, совершенно не выделяются среди эмиссий из материала матрицы. Однако после вышеуказанной процедуры (рис. 1б) появляется возможность совершенно однозначно определить характерные для органического красителя эмиссии. В приведенном случае это молекула красителя без хлора $[C_{15}H_{17}N_4]^+$ ($m=253$ а.е.м.). Видно также, что наряду с эмиссией родительских молекул в спектре имеются эмиссии вторичных ионов, соответствующих фрагментам (осколкам) родительских молекул. Необходимо иметь в виду, что такие фрагменты образуются в процессе распыления, в результате разрушающего действия первичного пучка.

Что касается собственно глицерина, то соответствующие масс-спектры и положительных и отрицательных вторичных ионов содержат эмиссии, соответствующие как целой молекуле (кластерам целых молекул), так и фрагментам целых молекул (кластеров). В качестве характерной для глицерина эмиссии, как правило, выбирали протонированную молекулу глицерина $[C_3H_8O_3+H]^+$ для положительного спектра и депротонированную молекулу $[C_3H_7O_3-H]^-$ для отрицательного.

КОНЦЕНТРАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ

Как отмечалось выше, методика МСВИ с жидкой матрицей после соответствующей калибровки дает возможность определения абсолютных значений концентраций анализируемого вещества в растворе. Определение концентрации может быть как самостоятельной задачей, так и необходимым условием при количественных исследованиях различных химических процессов. Диапазон концентраций глицериновых растворов, доступных для МСВИ анализа в зависимости от исследуемого органического объекта, составляет от сотых долей до сотен миллимоль на литр. Концентрация растворенного вещества определяется по интенсивности эмиссий характерных вторичных ионов. Однако необходимо иметь в виду, что линейная зависимость между концентрацией и интенсивностью имеет место не всегда. При достаточно высоких концентрациях может наблюдаться отклонение от линейности концентрационной зависимости выхода характерных (для растворенного вещества) вторичных ионов. В качестве примера ниже приведены результаты исследования концентрационных зависимостей для глицериновых растворов органических красителей бромфеноловый синий – $C_{19}H_{10}O_5Br_4S$ и бромтимоловый синий – $C_{27}H_{28}O_5Br_2S$. Концентрации растворов составляли от 0,02 ммоль/л до 100 ммоль/л (в зависимости от красителя). Наиболее интенсивными характерными эмиссиями для обоих красителей в отрицательном спектре являются Br^- , SO_3^- , SO_2^- и SO^- . На рис. 2 приведены зависимости интенсивности эмиссий характерных ионов красителя, а также эмиссии иона глицерина $C_3H_7O_3^-$ от концентрации C красителя в растворе [28, 29].

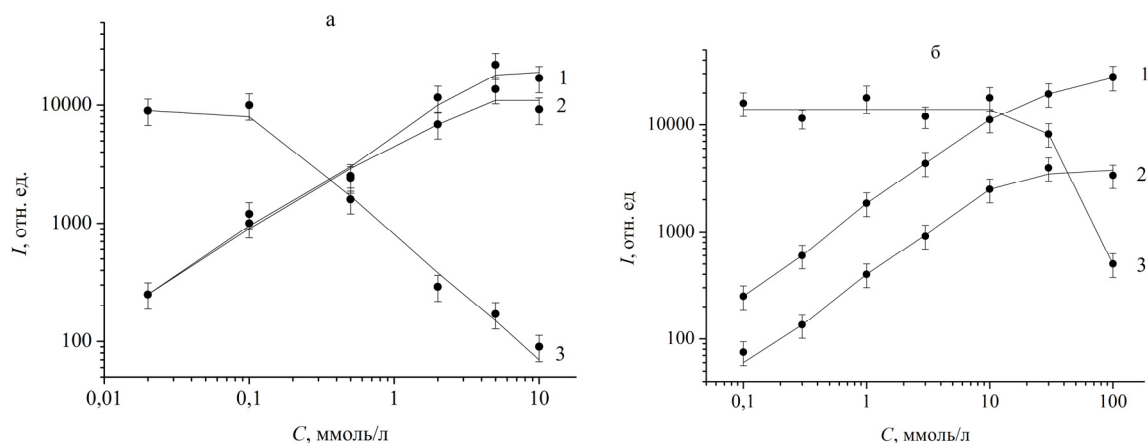


Рис. 2. Концентрационные зависимости интенсивностей эмиссии для раствора бромфенолового синего (а) и бромтимолового синего (б) в глицерине. Ионы: 1 – Br^- , 2 – SO_3^- , 3 – $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3^-$

Анализ показывает, что для бромтимолового синего (рис. 2а) характерные эмиссии Br^- и SO_3^- имеют заметную интенсивность уже при концентрации красителя 0,02 ммоль/л. При малых концентрациях красителя ($C < 0,1$ ммоль/л), выход ионов, характерных для глицерина, не зависит от концентрации растворенного материала. Затем, в диапазоне концентраций от 0,1 ммоль/л до 10 ммоль/л выход ионов, характерных для матрицы уменьшается пропорционально $1/C$ и при $C = 10$ ммоль/л уже на два порядка меньше, чем для чистого глицерина. В то же время, выход ионов Br^- и SO_3^- в достаточно широком интервале изменяется пропорционально концентрации красителя. Лишь при концентрациях красителя в растворе 5-10 ммоль/л наблюдается отклонение от линейности. Для бромфенолового синего (рис. 2б) ситуация подобна. Имеется диапазон, где наблюдается примерная пропорциональность между выходом ионов, характерных для красителя, и концентрацией. Для ионов глицерина, имеется диапазон, где выход не зависит от концентрации и диапазон, обратной пропорциональности от концентрации. Для других ионов, характеризующих краситель (SO_2^- , SO^-), концентрационные зависимости подобны. В случае растворов других органических красителей, изменения выходов характерных вторичных ионов при изменении концентрации раствора качественно подобны рассмотренным выше. Однако, в каждом конкретном случае для каждого конкретного красителя, имеются свои особенности в том числе и по диапазону концентраций.

Таким образом, для каждого из исследованных красителей имеется область концентраций раствора, при которых взаимное влияние красителя и матрицы невелико. В этой области изменение выхода ионов, характеризующих краситель, с концентрацией близко к прямо пропорциональному, а выход ионов, характеризующих матрицу, слабо зависит от концентрации. Эта область наиболее благоприятна для исследования методом МСВИ с жидкой матрицей. При концентрации раствора больше некоторой пороговой растворенное вещество начинает оказывать влияние на выход вторичных ионов матрицы. Причем, для различных материалов пороговые концентрации разные. Такое влияние свидетельствует либо о взаимодействии растворенного вещества с материалом растворителя, либо об изменении механизмов образования вторичных ионов. Результатом этого является уменьшение выхода ионов, характеризующих матрицу, а также отклонение от линейности выхода ионов красителя в зависимости от концентрации. Практика показывает, что возможность нелинейного изменения выхода вторичных ионов при изменении концентрации анализируемого вещества в растворе следует учитывать даже при миллимолярных концентрациях раствора.

ВЛИЯНИЕ ПЛОТНОСТИ ТОКА ПУЧКА БОМБАРДИРУЮЩИХ ЧАСТИЦ

Поскольку методика МСВИ является принципиально разрушающей, то весьма важным моментом применения этой методики является минимизация влияния ионного зонда на исследуемые объекты. С одной стороны, для повышения чувствительности МСВИ анализа плотность тока бомбардирующих ионов нужно выбирать как можно более высокую. При этом необходимо контролировать возможность накопления заряда на поверхности. С другой стороны, плотность тока первичного пучка не может быть слишком высокой, поскольку приповерхностная область, откуда эмитируются вторичные ионы, может быть настолько модифицирована первичными частицами, что полученные результаты нельзя будет относить к исследуемому объекту.

Критерием отсутствия влияния зонда на параметры исследуемого образца служит пропорциональность выхода характерных вторичных ионов плотности тока первичных ионов. В случае жидкой матрицы влияние зонда можно оценить несколько иным способом, позволяющим получить более полное представление о процессах, сопровождающих бомбардировку жидкой матрицы. В настоящей работе степень влияния первичного пучка определялась следующим образом [30-32]. При различных значениях плотности тока j_0

первичных ионов и установившемся значении тока характерных вторичных ионов первичный пучок отклонялся от образца на фиксированное время Δt_i (обычно 15 с). Затем пучок возвращался на мишень, и проводилось измерение зависимости тока вторичных ионов от времени $I(t)$ вплоть до установления стационарного (или близкого к нему) значения. При этом фиксировались: I_0 – величина тока вторичных ионов в момент подачи пучка на образец, I_{st} – величина стационарного тока вторичных ионов и вид зависимости $I(t)$. На рис. 3 приведены результаты таких измерений для раствора органического красителя метилового оранжевого $C_{14}H_{14}N_3O_3SNa$ в глицерине (концентрация 30 ммоль/л). Зависимости построены для одного из характерных положительных вторичных ионов для метилового оранжевого $C_{14}H_{14}N_3O_3S^+$ ($m = 306$ а.е.м.).

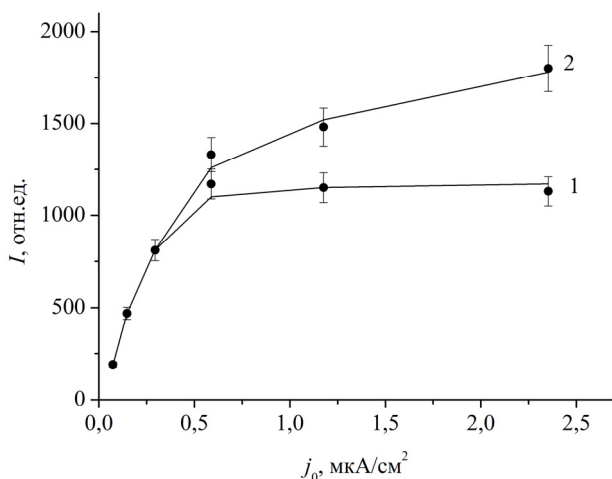


Рис. 3. Зависимости токов I_{st} (1) и I_0 (2) вторичных ионов $C_{14}H_{14}N_3O_3S^+$ от плотности тока первичных ионов для раствора метилового оранжевого в глицерине.

В области малых плотностей тока первичных ионов ($j_0 < 0.3$ мкА/см²) величины токов вторичных ионов I_0 и I_{st} совпадают, зависимость от плотности близка к прямо пропорциональной. При более высоких плотностях тока наблюдается различный ход зависимостей $I_0(j_0)$ и $I_{st}(j_0)$. Зависимость стационарного значения тока вторичных ионов выходит на насыщение, в то время как зависимость тока вторичных ионов в момент подачи пучка на мишень имеет растущий характер. Обработка временных зависимостей $I(t)$ при плотностях $j_0 > 0.3$ мкА/см² показывает, что переход от начальных значений I_0 к стационарным I_{st} происходит по экспоненциальному закону. Подобные результаты были получены и для ряда органических красителей: родамин 6Ж – $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$, нейтральный красный – $C_{15}H_{17}N_4Cl$, метиленовый синий – $C_{16}H_{18}N_3SCl$, феноловый красный – $C_{19}H_{14}O_5S$.

Полученные экспериментальные результаты можно интерпретировать следующим образом. Концентрация молекул исследуемого вещества в приповерхностном слое образца-раствора определяется конкуренцией процессов разрушения молекул исследуемого вещества первичным пучком и обновления этого слоя неповрежденными молекулами, диффундирующими из объема раствора. Фрагменты разрушенных молекул в свою очередь диффундируют в объем раствора. При малых плотностях тока пучка первичных ионов процессы диффузии превалируют над процессами разрушения молекул растворенного вещества, анализируемая зона раствора успевает полностью обновляться, качество раствора практически не меняется. В этом случае можно считать, что анализу подвергаются преимущественно неповрежденные молекулы растворенного вещества. Существует критическая плотность, выше которой процессы восстановления анализируемой зоны начинают отставать от разрушающего воздействия первичных ионов, при этом состав приповерхностного слоя раствора начинает изменяться. Концентрация неповрежденных молекул в растворе уменьшается, количество фрагментов целых молекул увеличивается. Так, при плотности тока первичных ионов 3.0 мкА/см² концентрация неповрежденных молекул в растворе родамина 6Ж и нейтрального красного уменьшается на порядок и более. Прекращение ионной бомбардировки приводит к восстановлению раствора в приповерхностном слое образца, тем более полному, чем больше время, на которое прекращена бомбардировка. Необходимо отметить, что аналогичная картина наблюдается и для молекул жидкой матрицы, в нашем случае глицерина.

Таким образом, при проведении МСВИ исследований с использованием жидкой матрицы для получения корректных результатов необходимо правильно выбирать рабочую плотность тока первичных ионов. Это позволит избежать эффектов изменения концентрации растворенного вещества в процессе анализа.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В СИСТЕМЕ, МОДЕЛИРУЮЩЕЙ БИОСЕНСОР НА ГЛЮКОЗУ

За последнее десятилетие биосенсорика стала объектом большого числа исследований как фундаментального, так и прикладного характера [33]. Работа биосенсоров, как одного из многообещающих классов биомолекулярных устройств, основывается на распознавании анализируемого вещества с помощью биологического элемента, связанного с трансдуктором (преобразователем сигнала) [34]. Одним из важных направлений разработки биосенсоров является создание анализаторов глюкозы, что, в частности, связано с постоянным ростом количества больных диабетом [35-37]. Несмотря на значительные усилия, направленные на создание биосенсоров для контроля глюкозы, до настоящего времени остается актуальной проблема разработки недорогих и простых в применении устройств. Для выяснения механизмов работы биосенсоров, желательна разработка новых методов диагностики, позволяющих прямо и однозначно анализировать взаимодействие компонентов в биосенсоре или в ячейке, моделирующей работу биосенсора.

Обычно в биосенсорах на глюкозу используется реакция окисления глюкозы. Эта реакция катализируется ферментом глюкозооксидазой. Промежуточным продуктом реакции окисления β -D-глюкозы в присутствии глюкозооксидазы является D-глюконолактон, который в последующем в результате спонтанного гидролиза, превращается в глюконовую кислоту. Ниже приведены результаты исследования взаимодействия компонентов в системе, моделирующей взаимодействие между компонентами биосенсора “глюкоза + глюкозооксидаза” в Na-фосфатном буфере, а также гидролиз глюконолактона [38-41]. Моделирование взаимодействия компонентов биосенсора на глюкозу осуществлялось в Na-фосфатном буфере с pH 7,3–7,4.

Предварительным этапом исследования процессов окисления глюкозы в модельной системе явилось измерение масс-спектров компонентов растворов, моделирующих биосенсор на глюкозу и определение характерных для каждой компоненты эмиссий. Как показали результаты предварительных измерений, масс-спектр положительных вторичных ионов относительно процессов, протекающих с образованием глюконовой кислоты, менее информативен по сравнению с масс-спектром отрицательных ионов, поэтому в ходе основных экспериментов измерялись и анализировались эмиссии отрицательных вторичных ионов.

Были измерены масс-спектры отрицательных вторичных ионов для собственно Na-фосфатного буфера (100 ммоль/л, pH 7,3–7,4.), для растворов в буфере глюкозооксидазы из *Aspergillus niger* (активность фермента – 181,5 ед./мг, концентрация $1,86 \cdot 10^{-3}$ г/мл), глюкозы $C_6H_{12}O_6$ (300 ммоль/л), а также глюконовой кислоты $C_6H_{12}O_7$ (300 ммоль/л). Во всех случаях пробы модельных растворов, а также растворов его компонентов в буфере для исследований методом МСВИ помещались в глицериновую матрицу в соотношении 1 : 5,6. Приготовление рабочих растворов и моделирование процессов в них выполнялись при комнатной температуре или при температуре 34°C, в зависимости от задачи исследования. Измерения во всех случаях выполнялись при комнатной температуре.

Наиболее информативными характерными отрицательными вторичными ионами для буфера, имеющими достаточно большие интенсивности пиков, являются ионы с $m = 63$ а.е.м. – PO_2^- , $m = 79$ а.е.м. – PO_3^- , $m = 97$ а.е.м. – $H_2PO_4^-$ (фрагменты молекул составляющих буферный раствор), а также ионы с $m = 189$ а.е.м. – $(C_3H_8O_3)H_2PO_4^-$, (комбинация молекулы глицерина и фрагмента $H_2PO_4^-$). Подчеркнем важную роль анализа масс-спектра вторичных ионов пробы буфера, поскольку при последующих измерениях масс-спектры вторичных ионов для тех или иных систем будут сравниваться преимущественно именно с этим масс-спектром [42].

Для глюкозооксидазы (масса целой молекулы более 160000 а.е.м.) к характерным отрицательным вторичным ионам в области малых масс можно отнести серию ионов, основными из которых являются ионы CN^- ($m = 26$ а.е.м.) и CON^- ($m = 42$ а.е.м.) [27,43]. В масс-спектре раствора глюкозы можно отметить только одну достаточно интенсивную эмиссию, связанную с глюкозой. Это эмиссия ионов $[(C_6H_{12}O_6) - H]^-$ ($m = 179$ а.е.м.) – депротонированная молекула глюкозы. Для глюконовой кислоты характерными вторичными ионами, наиболее подходящими для определения ее в модельном растворе, являются вторичные ионы депротонированной молекулы кислоты $[(C_6H_{12}O_7) - H]^-$ ($m = 195$ а.е.м.).

Важным моментом является то, что интенсивности эмиссий ионов с массой 195 а.е.м. в масс-спектре буферного раствора глюкозооксидазы и в масс-спектре буферного раствора глюкозы находятся на уровне их интенсивности в масс-спектре буфера. Таким образом, при исследовании реакции окисления глюкозы в присутствии глюкозооксидазы о ходе реакции можно судить по изменению интенсивностей эмиссий ионов с массой 195 а.е.м., характеризующих для рассматриваемой системы продукт реакции – глюконовую кислоту.

Модельный раствор создавался смешиванием буферных растворов глюкозооксидазы и глюкозы с заданными концентрациями, экспозицией полученного раствора при постоянной температуре и помещением его в глицериновую матрицу (в заданном соотношении). Исходный раствор D-глюкозы получали растворением навески глюкозы в Na-фосфатном буфере и выдерживанием раствора при комнатной температуре в течение 24 часов для полной мутаротации D-глюкозы [44].

Предварительно было исследовано влияние глицерина на протекание реакции в модельных системах. При этом смешивание буферных растворов компонентов проводилось непосредственно в глицерине. Полученная смесь выдерживалась при комнатной температуре в течение 60 мин и затем исследовалась с помощью метода МСВИ. В результате выяснилось, что интенсивность эмиссии ионов с $m = 195$ а.е.м. находится на уровне фоновых. Это свидетельствует о том, что реакция окисления глюкозы в среде глицерина не идет. Этот важный факт позволил фиксировать определенные времена взаимодействия между компонентами в модельной системе растворением пробы модельного раствора в глицерине.

Важным методическим моментом при анализе результатов является следующее. В наших исследованиях многочисленные измерения масс-спектров вторичных ионов глицериновых растворов различных органических материалов (при малых их концентрациях) показали, что выход ионов C^\pm ($m = 12$ а.е.м.) и CH^\pm ($m = 13$ а.е.м.) определяется глицериновой матрицей. Он очень слабо зависит от вида растворенного вещества и его концентрации (здесь и далее имеются в виду основные изотопы элементов) [39]. Для уменьшения влияния

неконтролируемых факторов на измеренные интенсивности эмиссий, а также с целью более корректного определения количественных изменений интенсивностей исследуемых эмиссий в зависимости от экспериментальных параметров проводилось нормирование масс-спектров по интенсивностям пиков для ионов с $m = 12$ а.е.м. и $m = 13$ а.е.м. Были измерены зависимости выхода продукта реакции (глюконовой кислоты) от времени экспозиции модельного раствора, т.е. от продолжительности реакции окисления глюкозы. На рис. 4 представлены результаты измерений. Увеличение времени реакции приводило к увеличению количества глюконовой кислоты с дальнейшим выходом на постоянный или близкий к нему уровень. Построение полученных кривых в полулогарифмическом масштабе позволяет показать, что увеличение концентрации продукта реакции со временем происходит по экспоненциальному закону, $C = C_0(1 - e^{-kt})$, где t – время выдержки раствора; C_0 и C – концентрации глюконовой кислоты при больших экспозициях раствора ($t \rightarrow \infty$) и при экспозиции, равной t . Величина коэффициента k в этом уравнении зависит от концентрации глюкозы в растворе. Если считать, что на участке насыщения вся глюкоза в результате реакции переходит в глюконовую кислоту, то приведение в соответствие интенсивности эмиссии с $m = 195$ а.е.м. концентрации (кривая 1 – 50 ммоль/л) позволяет определить концентрацию глюконовой кислоты на разных этапах взаимодействия.

На рис. 5 приведена зависимость выхода глюконовой кислоты от концентрации глюкозы. Видно, что количество глюконовой кислоты практически прямо пропорционально концентрации глюкозы в растворе (в измеренном диапазоне концентраций). Поскольку выход продукта ферментативной реакции подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен [45], то данный факт может свидетельствовать о том, что при данных экспериментальных условиях практически вся глюкоза успевает вступить в реакцию.

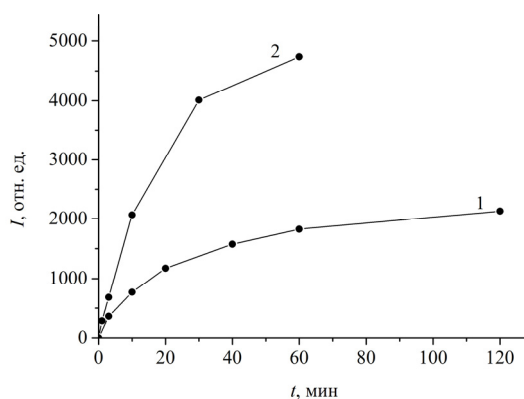


Рис. 4. Зависимость выхода глюконовой кислоты от времени выдержки модельного раствора при температуре 20-22°C. Концентрация глюкозооксидазы в растворе 12 мкмоль/л; глюкозы: 1 – 50 ммоль/л, 2 – 300 ммоль/л.

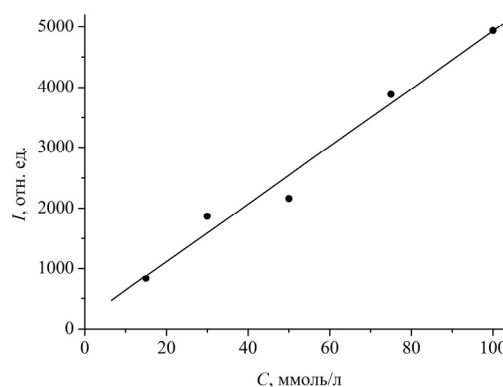


Рис. 5. Зависимость выхода глюконовой кислоты от концентрации глюкозы в модельном растворе. Концентрация глюкозооксидазы 12 мкмоль/л, время выдержки раствора 60 мин при температуре 20-22°C.

На рис. 6 приведена измеренная зависимость выхода глюконовой кислоты от концентрации глюкозооксидазы. Изменение концентрации глюкозооксидазы от 6 до 24 мкмоль/л (концентрация глюкозы – 50 ммоль/л, время экспозиции модельного раствора – 60 мин) приводит к незначительному изменению выхода глюконовой кислоты. Результаты измерений свидетельствуют о том, что для данной концентрации глюкозы используемых концентраций глюкозооксидазы вполне достаточно для того, чтобы реакция окисления прошла практически полностью.

Как было отмечено ранее, используемая нами методика позволяет исследовать не только конечный результат реакции окисления глюкозы, но также дает возможность получать информацию о промежуточной стадии рассматриваемой реакции. Как следует из схемы реакции ферментативного окисления глюкозы, промежуточным продуктом реакции окисления β -D-глюкозы в присутствии глюкозооксидазы является D-глюконолактон [46]. Таким образом, наличие или отсутствие в растворе глюконолактона (в частности, его количество) является хорошим индикатором промежуточной стадии реакции.

Предварительное измерение масс-спектра отрицательных ионов буферного раствора глюконолактона $C_6H_{10}O_6$ показало, что характерной эмиссией можно считать эмиссию, соответствующую депротонированным молекулам глюконолактона ($[C_6H_{10}O_6 - H]^-$, $m = 177$ а.е.м.).

Для этих экспериментов подготовка образцов проводилась следующим образом. Навеска глюконолактона растворялась в 100 ммоль/л Na-фосфатном буфере (pH 7,3–7,4) до концентрации 100 ммоль/л; раствор выдерживался в течение определенного времени при температуре 20-22°C и помещался в глицериновую матрицу. Полученный раствор и подвергался анализу. Результаты измерений зависимостей концентраций глюконолактона и глюконовой кислоты от времени выдержки глюконолактона в буферном растворе приведены

на рис. 7. Как видно, концентрация глюконолактона в буферном растворе снижается по мере роста экспозиции; концентрация глюконовой кислоты при этом возрастает. Это совершенно определенно свидетельствует о том, что при этих условиях происходит гидролиз глюконолактона с образованием глюконовой кислоты.

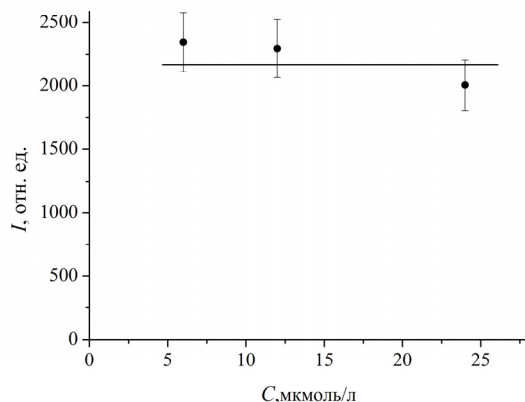


Рис.6. Зависимость выхода глюконовой кислоты от концентрации глюкозооксидазы в модельном растворе. Концентрация глюкозы 50 ммоль/л, время выдержки раствора 60 мин, температура 20-22°C.

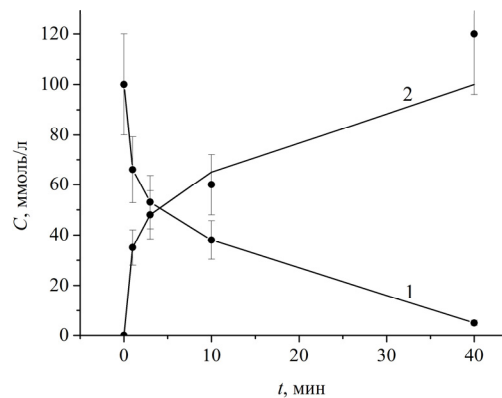


Рис.7. Зависимость концентрации глюконолактона (1) и глюконовой кислоты (2) от времени экспозиции в буферном растворе.

Таким образом, проведенные исследования показали, что методика, основанная на масс-спектрометрии вторичных ионов с применением жидкой матрицы, перспективна для исследования процессов в сложных биоорганических системах. Она позволяет анализировать протекание реакций в таких системах по поведению характерных вторичных ионов для компонентов системы, в том числе для промежуточных продуктов реакции. Кроме того, после необходимых калибровок такая методика позволяет проводить количественные измерения, т. е. определять концентрации компонентов в ходе реакции

ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ ПРИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ ОБЛУЧЕНИИ АМИНОКИСЛОТ

В основе биологического действия ультрафиолетового излучения (УФ) лежат химические изменения молекул биополимеров, вызванные поглощением ими квантов излучения. УФ облучение оказывает бактерицидное, мутагенное и канцерогенное действие, которое может привести к серьезному нарушению жизнедеятельности. В связи с этим механизмы влияния УФ излучения на объекты биологической природы является объектом постоянного изучения.

Ниже приведены результаты исследования методом МСВИ с жидкой матрицей радиационных повреждений молекул аминокислот аргинина, глутаминовой кислоты и триптофана при ультрафиолетовом облучении. В качестве жидкой матрицы был использован глицерин.

Исследовались образцы глицериновых растворов аминокислот аргинина - $C_6H_{14}N_4O_2$, триптофана - $C_{11}H_{12}N_2O_2$ и глутаминовой кислоты - $C_5H_9NO_4$ (концентрация растворов составляла 30, 30 и 50 ммоль/л соответственно). После облучения исследуемый раствор помещался в камеру анализатора. Измерения выполнялись при комнатной температуре. Записывались характерные участки масс-спектров положительных вторичных ионов, как исходных не облученных образцов, так и образцов после каждой дозы облучения [47, 48]. Плотность тока первичных ионов составляла $0.15 \text{ мкА}\cdot\text{см}^{-2}$. Масс-спектры отрицательных вторичных ионов для подобного рода исследований, как показали предварительные измерения, оказались менее информативными.

В процессе УФ облучения радиационному воздействию подвергаются не только молекулы исследуемого объекта (в данном случае аминокислот), но и молекулы глицериновой матрицы [49]. Это необходимо учитывать при интерпретации результатов. В связи с этим предварительно было изучено влияние УФ облучения на глицериновую матрицу, т.е. на чистый глицерин. Влияние УФ облучения на исследуемые объекты выяснялось путем сравнения масс-спектров положительных вторичных ионов, распыленных из растворов, подверженных облучению до различных доз, и исходного необлученного раствора, а также облученного до тех же доз чистого глицерина [50].

На первом этапе были определены вторичные ионы, характерные для каждой из исследованных аминокислот. На рис. 8-10 приведены характерные вторичные ионы (коэффициенты превышения) для исходных (не облученных) растворов аргинина, триптофана и глутаминовой кислоты.

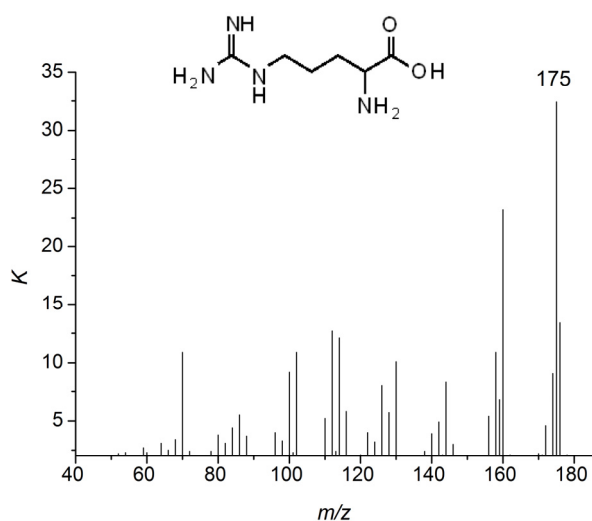


Рис. 8. Характерные вторичные ионы исходного раствора аргинина

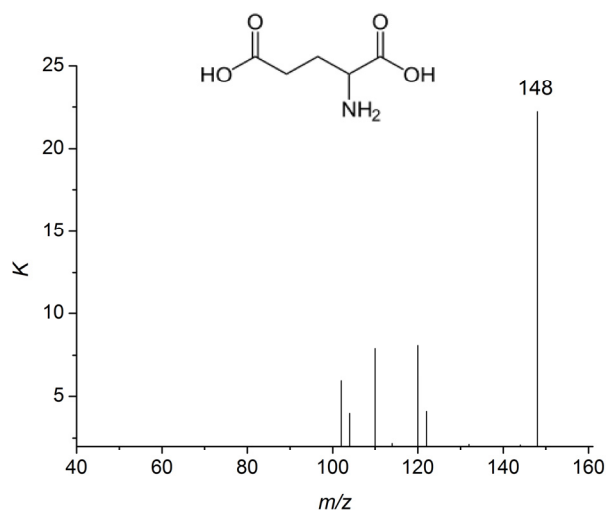


Рис. 9. Характерные вторичные ионы исходного раствора глутаминовой кислоты

Характерными вторичными ионами для исследованных аминокислот являются ионы, соответствующие как целой протонированной молекуле $[M+H]^+$ ($m=175$, 205 и 148 а.е.м. для аргинина, триптофана и глутаминовой кислоты соответственно), так и фрагментам целой молекулы. Среди характерных вторичных ионов, соответствующих фрагментам целой молекулы, для аргинина являются ионы с массами $m=160-158$, 156 , 144 , 142 , 130 , 128 , 126 , 116 , 114 , 112 , 102 , 86 , 70 а.е.м., для глутаминовой кислоты - $m=122$, 120 , 110 , 102 а.е.м., для триптофана - $m=188$, $160-158$, 156 , $144-142$, $132-130$, 118 а.е.м. Массовый состав спектров характерных ионов зависит от возможности фрагментации молекул аминокислот в результате разрыва связей с миграцией атомов водорода. Эмиссии с четными значениями массы достаточно уверенно могут быть интерпретированы как азотсодержащие (четноэлектронные) фрагменты целых молекул [51]. Примечательно, что большинство характерных ионов имеют четные значения массы, такая ситуация характерна для объектов биологической природы [52-54].

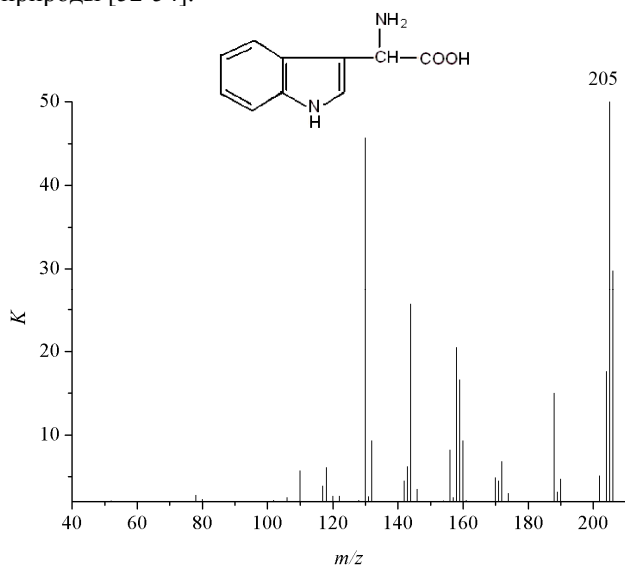


Рис. 10. Характерные вторичные ионы исходного раствора триптофана

Далее исследовалось собственно влияние ультрафиолетового облучения, т.е. измерялись и анализировались масс-спектры облученных растворов. Анализ результатов показал, что облучение чистого глицерина приводит к значительному уменьшению интенсивностей эмиссий, соответствующих целым протонированным молекулам глицерина $[C_3H_8O_3+H]^+$ ($m = 93$ а.е.м.), а также глицериновым комплексам $[(C_3H_8O_3)_2+H]^+$, $[(C_3H_8O_3)_3+H]^+$ ($m = 185$, 277 а.е.м.). Так облучение в течение 300 мин. приводит к снижению абсолютного вклада в общий спектр эмиссий, соответствующих целым протонированным молекулам глицерина, в 5 раз, а эмиссий, соответствующих целым глицериновым комплексам – в 10-12 раз. Одновременно имеет место увеличение (в разной степени) абсолютного вклада в общий спектр эмиссий, соответствующих

осколкам целой молекулы глицерина или глицериновых комплексов. Это свидетельствует об уменьшении концентрации целых молекул глицерина и об увеличении концентрации, т.е. накоплении фрагментов целых молекул.

В случае глицериновых растворов аминокислот ультрафиолетовое облучение, как и в случае чистого глицерина, приводит, прежде всего, к уменьшению абсолютного вклада в масс-спектр эмиссий вторичных ионов, соответствующих, как целым молекулам аргинина, триптофана и глутаминовой кислоты, так и их характерным фрагментам. Это прямо свидетельствует об уменьшении в растворе количества целых молекул

аминокислот, фрагментация которых первичным пучком и дает характерный спектр. На рис. 11 приведено изменение коэффициентов превышения характерных вторичных ионов аргинина от времени УФ облучения.

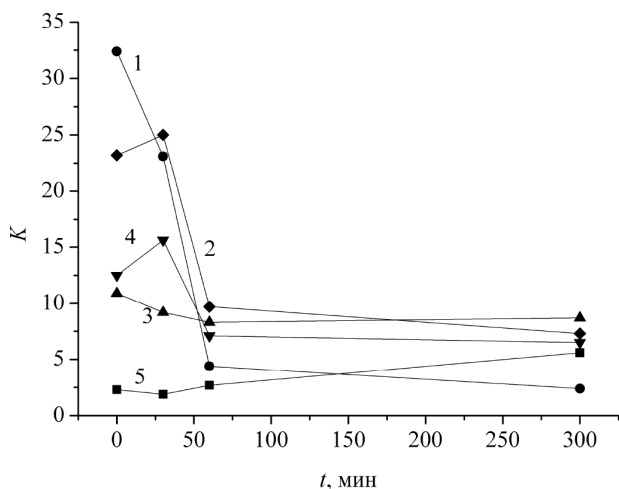


Рис. 11. Зависимость величины коэффициентов превышения от времени УФ облучения для характерных вторичных ионов аргинина с массами: 1 – 175, 2 – 160, 3 – 102, 4 – 70, 5 – 60 а.е.м

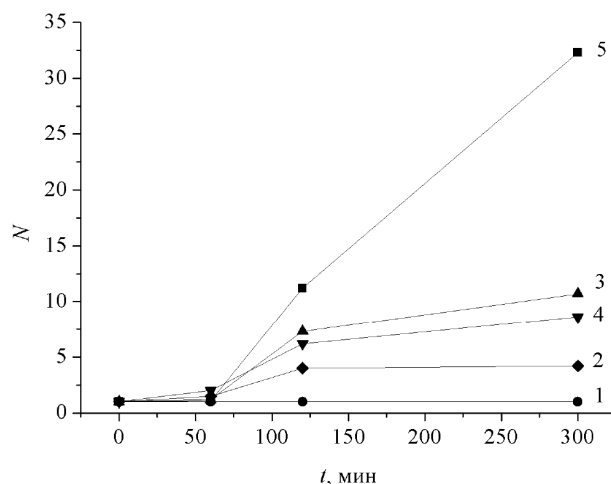


Рис. 12. Изменение удельного вклада в масс-спектр в зависимости от времени УФ облучения для характерных вторичных ионов аргинина с массами: 1 – 175, 2 – 160, 3 – 102, 4 – 70, 5 – 60 а.е.м.

Коэффициенты превышения получены делением нормированных интенсивностей эмиссий из облученного глицеринового раствора аргинина на нормированные интенсивности эмиссии из чистого глицерина, облученного до тех же доз. Из приведенных данных видно, что практически для всех характерных вторичных ионов коэффициенты превышения в конечном итоге падают. Исключение составляет фрагмент с массой $m = 60$ а.е.м. ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_3^+$). Для этого фрагмента коэффициент превышения вырастает вдвое.

Уменьшение абсолютного вклада в спектр различных характерных ионов происходит в разной мере, вклад одних характерных ионов падает быстрее, других медленнее, а для некоторых проходит через максимум. В результате для максимальной из исследованных доз в спектре характерных вторичных ионов доминирующей становится эмиссия ионов с $m = 102$ а.е.м. ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_3^+$).

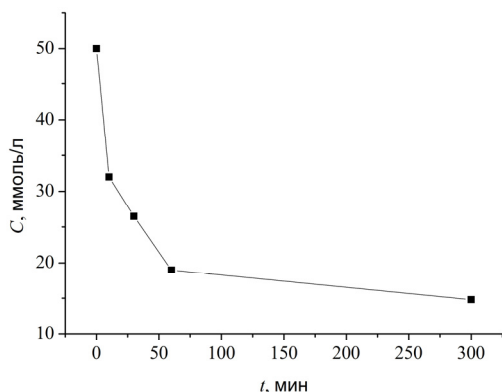


Рис. 13. Зависимость концентрации глутаминовой кислоты в глицерине от времени УФ облучения

Перераспределение удельного вклада в характерный масс-спектр аргинина различных эмиссий хорошо видно на рис. 12, где приведено изменение удельного вклада N ряда характерных фрагментов по отношению к протонированной молекуле $m = 175$ а.е.м. Похожая картина наблюдается для растворов триптофана и глутаминовой кислоты. Здесь необходимо подчеркнуть, что способ обработки экспериментальных результатов, а именно, деление нормированных интенсивностей эмиссии из облученных растворов аминокислот на таковые из облученного глицерина, позволяет учесть имеющийся вклад в эффект собственно глицериновой матрицы. Наблюдаемые изменения в спектрах вторичной ионной эмиссии растворов аминокислот свидетельствуют об уменьшении абсолютной концентрации целых молекул аминокислот по мере УФ облучения. Одновременно УФ облучение приводит к увеличению

удельной, по отношению к целым молекулам, концентрации фрагментов целых молекул. Если интенсивность эмиссии ионов, соответствующих целым молекулам, пропорциональна концентрации этих молекул в растворе (что не всегда справедливо), то после соответствующей нормировки можно проследить изменение их концентрации по мере облучения. На рис. 13 в качестве примера приведена зависимость концентрации целых молекул глутаминовой кислоты от времени облучения, здесь интенсивность эмиссии ионов $[\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 + \text{H}]^+$ (протонированная молекула глутаминовой кислоты) из исходного раствора сопоставлена с исходной концентрацией (50 ммоль/л).

Таким образом, облучение ультрафиолетом глицериновых растворов аминокислот аргинина, триптофана и глутаминовой кислоты приводит к существенному изменению масс-спектров вторичных ионов этих растворов.

За время облучения 300 мин. интенсивность эмиссий, соответствующих целым молекулам падает в

несколько раз. Поскольку интенсивность соответствующих эмиссий в данном диапазоне концентраций пропорциональна концентрации исследуемых объектов в растворе, то соответственно в несколько раз падает и концентрация этих аминокислот в растворе при облучении. Одновременно с уменьшением абсолютной концентрации целых молекул увеличивается удельная концентрация фрагментов целых молекул по отношению к концентрации целых молекул, т.е. наблюдается обогащение глицеринового раствора продуктами диссоциации аминокислот при УФ облучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные результаты наглядно показывают, что методика масс-спектрометрии вторичных ионов с применением жидкой матрицы, может быть с успехом использована для исследования, как собственно материалов органического происхождения, так и процессов в сложных биоорганических системах. При этом, однако, необходимо учитывать ряд факторов методического характера.

Проведенные исследования показали, что необходимо правильно выбирать плотность тока первичного пучка. Первичный пучок, оказывая разрушающее действие на образец, вносит изменения концентрации нефрагментированных (целых) молекул исследуемого объекта в растворе. Для получения корректных результатов необходимо, чтобы процессы диффузии фрагментов разрушенных молекул в объем раствора и диффузии неповрежденных молекул из объема раствора к поверхности превалировали над процессами разрушения молекул первичным пучком. Величина плотности тока первичного пучка для каждого исследуемого материала должна выбираться индивидуально.

Исследования также показали, что в экспериментах с жидкой матрицей необходимо обеспечить отсутствие взаимного влияния исследуемого материала и матрицы (в нашем случае глицерина). Необходимо выбирать диапазон концентраций исследуемого материала, в котором имеется линейная зависимость выхода ионов, характеризующих материал, от его концентрации, а выход ионов, характеризующих матрицу, от концентрации не зависит. При концентрации раствора больше некоторой пороговой растворенное вещество начинает оказывать влияние на выход вторичных ионов матрицы, что свидетельствует либо о взаимодействии растворенного вещества с материалом растворителя, либо об изменении механизмов образования вторичных ионов. Для различных материалов пороговые концентрации разные.

Как пример возможности использования методики МСВИ с жидкой матрицей для исследования сложных биоорганических систем, в работе приведены результаты исследования процессов ферментативного окисления глюкозы в системе, моделирующей биосенсор на глюкозу. В ходе исследований проводилось измерение масс-спектров компонентов растворов, моделирующих биосенсор на глюкозу и определение характерных для каждой компоненты эмиссий. Были измерены масс-спектры отрицательных вторичных ионов для Na-фосфатного буфера, для растворов в буфере глюкозооксидазы из *Aspergillus niger*, глюкозы, а также глюконовой кислоты. О ходе реакции окисления глюкозы в присутствии глюкозооксидазы судили по изменению интенсивностей эмиссий ионов, характеризующих продукт реакции – глюконовую кислоту. Были измерены зависимости выхода глюконовой кислоты от концентрации глюкозы, а также зависимости выхода глюконовой кислоты от концентрации глюкозооксидазы. О протекании реакции можно также судить по поведению вторичных ионов характерных для других компонентов системы, в том числе для промежуточных продуктов реакции.

Структурная чувствительность методики МСВИ делает ее полезной не только для определения состава материалов органического происхождения, но и для изучения процессов при радиационных воздействиях на органические и биоорганические объекты. Проведенные при помощи методики МСВИ с глицериновой матрицей исследования радиационных повреждений аминокислот при ультрафиолетовом облучении показали, что одним из механизмов влияния УФ излучения на объекты биологической природы является разрушение молекул аминокислот. Измерения показали, что УФ облучение приводит к уменьшению абсолютной концентрации целых, неповрежденных облучением молекул и одновременному увеличению концентрации фрагментов целых молекул, т.е. наблюдается обогащение глицеринового раствора продуктами диссоциации аминокислот при УФ облучении.

Авторы выражают благодарность канд. ф.-м. наук В.Н. Мельникову за большой вклад в масс-спектрометрические исследования объектов органического происхождения с использованием жидкой матрицы, которые в значительной степени использованы в настоящей работе. Авторы считают также отметить существенную роль проф. В.В. Товстяка в проведение совместных исследований, результаты которых используются в данной работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benninghoven A., Rüdenauer F.G., Werner H.W. Secondary Ion Mass Spectrometry: Basic Concepts, Instrumental Aspects, Applications, and Trends. - New York: Wiley, 1987. - 1227 p.
2. Fogel' Ya. M. Ion-ion emission - a new tool for mass-spectrometric investigation of processes on the surface and in the bulk of solids. // International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics. – 1972. - Vol. 9. - P. 109-125.
3. Kljuev N.A., Brodskij E.S. Sovremennye metody mass-spektrometricheskogo analiza organicheskikh soedinenij // Ros. Him. Zhurn. - 2002. - T. XLVI. – No. 4. - S. 57-63.

4. Mak-H'ju I.A. Metody analiza poverhnosti. Pod red. Zanderni. – M.: Mir, 1979. - S. 276-336.
5. Cherepin V.T. Ionnyj mikrozonodovyy analiz. - Kiev: Naukova Dumka, 1992. - 344 s.
6. Benninghoven A., Sichtermann W.K. Detection, identification and structural investigation of biologically important compounds by secondary ion mass spectrometry // *Anal. Chem.* - 1978. - Vol. 50. – No. 8. - P. 1180-1184.
7. Kempson I.M., Martin A.L., Denman J.A., French P.W., Prestidge C.A., Barnes T.J. Detecting the Presence of Denatured Human Serum Albumin in an Adsorbed Protein Monolayer Using TOF-SIMS // *Langmuir.* - 2010. - Vol. 26. – No. 14. - P. 12075-12080.
8. Saleem M., Galla H.J. Surface view of the lateral organization of lipids and proteins in lung surfactant model systems-A ToF-SIMS approach // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2010. - Vol. 1798. – No. 4. - P. 730-740.
9. Kim Y.P., Hong M.Y., Kim J., Oh E., Shon H.K., Moon D.W., Kim H.S., Lee T.G. Quantitative analysis of surface-immobilized protein by TOF-SIMS: effects of protein orientation and trehalose additive. // *Anal. Chem.* - 2007. - Vol. 79. – No. 4. - P. 1377-1385.
10. Mahoney C.M., Yub L., Faheya A., Gardella J.A. Jr. SIMS depth profiling of polymer blends with protein based drugs // *Applied Surface Science.* - 2006. - Vol. 252. – No. 19. - P. 6609-6614.
11. Volandri G., Menichetti L., Matteucci M., Kusmic C., Consumi M, Magnani A., L'Abbate A., Landini L., Positanof V. An image formation model for Secondary Ion Mass Spectrometry imaging of biological tissue samples // *Applied Surface Science.* - 2010. - Vol. 257. – No. 4. - P. 1267-1275.
12. Green F.M., Gilmorea I.S., Seah M.P. G-SIMS and SMILES: Simulated fragmentation pathways for identification of complex molecules, amino acids and peptides // *Applied Surface Science.* - 2008. - Vol. 255. – No. 4. - P. 852-855.
13. Aoyagi S., Inoue M. An orientation analysis method for protein immobilized on quantum dot particles // *Applied Surface Science.* - 2009 - Vol. 256. – No. 4. - P. 995-997.
14. Hellweg S., Jacob A., Hoheisel J.D., Grehl T., Arlinghaus H.F. Mass spectrometric characterization of DNA microarrays as a function of primary ion species // *Applied Surface Science.* - 2006. - Vol. 252. – No. 19. - P. 6742-6745.
15. Zheng L., McQuaw C.M., Baker M.J., Lockyer N.P., Vickerman J.C., Ewing A.G., Winograd N. Investigating lipid–lipid and lipid–protein interactions in model membranes by ToF-SIMS // *Applied Surface Science.* - 2008. - Vol. 255. – No. 4. - P. 1190-1192.
16. Chandra S. Subcellular imaging of RNA distribution and DNA replication in single mammalian cells with SIMS: the localization of heat shock induced RNA in relation to the distribution of intranuclear bound calcium // *J. of Microscopy.* - 2008. - Vol. 232. – No. 1. - P. 27-35.
17. Amaya K.R., Monroe E.B., Sweedler J.V., Clayton D.F. Lipid imaging in the zebra finch brain with secondary ion mass spectrometry // *Int. J. of Mass Spectrometry.* - 2007. - Vol. 260. – No. 2-3. - P. 121-127.
18. Cole M.A., Jasieniak M., Thissen H., Voelcker N.H., Griesser H.J. Time-of-flight-secondary ion mass spectrometry study of the temperature dependence of protein adsorption onto poly (N-isopropylacrylamide) graft coatings. // *Anal. Chem.* - 2009. - Vol. 81. – No. 16. - P. 6905-6912.
19. Tantsyrev G.D., Povolotskaja M.I. Vlijanie strukturi polimernih molekul na vtorichno-emiccionnie macc-spektri. Sbornik "Vzaimodejstvie atomnyh chastic s tverdim telom". Kharkov. – 1976. – S. 18-21.
20. Pokrovskii V.A., Mosin V.V. Fast atom bombardment in mass spectrometry: Method and applications // *Theoretical and Experimental Chemistry.* – 1987. – Vol. 23. – No. 1. – P. 58-73,
21. Barber M., Bordoli R.S., Elliott G.J., Sedgwick R.D., Tyler A.N. Fast atom bombardment mass spectrometry // *Anal. Chem.* - 1982. - Vol. 54. – No. 4. - P. 645A-657A.
22. Bertrand P., Delcorte A., Garrison B.J. Molecular SIMS for organic layers: new insights // *Applied Surface Science.* - 2003. - Vol. 203-204. - P. 160-165.
23. Surman D.J., Vickerman J.C. Fast atom bombardment quadrupole mass spectrometry // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* - 1981. – No. 7. - P. 324-325.
24. Benninghoven A. Some aspects of secondary ion mass spectrometry of organic compounds // *Int. J. of Mass Spectrometry and Ion Physics.* - 1983. - Vol. 53. - P. 85-99.
25. Adriaensen L., Vangaever F., Lenaerts J., Gijbels R. Comparative study of organic dyes with time-of-flight static secondary ion mass spectrometry and related techniques // *J. of Mass Spectrometry.* - 2005. - Vol. 40. – No. 5. - P. 615-627.
26. Takayama M., Tanaka Y., Nomura T. Competitive formation of M^+ and $[M + H]^+$ ions under fast atom bombardment conditions // *Organic Mass Spectrometry.* - 1993. - Vol. 28. – No. 12. - P. 1529-1535.
27. Melnykov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V., Tovstyak V.V. Issledovanie gljukozooksidazy metodom MSVI s ispol'zovaniem glicerinovoj matricy // *Vzaimodejstvie ionov s poverhnost'ju (VIP-2005). Mater. XVII Mezhdunar. konf. M.: Izd. MAI, 2005. – T. 1. – S. 411-414.*
28. Melnykov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V., Tovstyak V.V. Concentration effects in secondary ion emission for solutions of organic dyes in glycerol // 4th European Workshop on Secondary Ion Mass Spectrometry "SIMS Europe 2004". – Münster, September 26-29, 2004. – P. 91.
29. Melnykov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V., Koppe V.T., Tovstyak V.V. Issledovanie koncentracionnyh efektov pri analize rastvorov organicheskikh krasitelej v glicerine metodom VIMS//*Vzaimodejstvie ionov s poverhnost'ju (VIP-2005). Mater. XVII Mezhdunar. konf. M.: Izd. MAI, 2005. – T. 1. – C. 415-418.*
30. Melnykov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V., Tovstyak V.V. Issledovanie processov, protekajushchih v glicerinovyh rastvorah organicheskikh krasitelej pri MSVI analize // *Visnyk HNU. Ser. Fizychna "Jadra, chastinki, polja". – 2005. – No. 657. – S. 63-68.*
31. Melnykov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V., Alimov S.S. Some aspects of SIMS investigations of organic materials with use of glycerol matrix // *Proc. of the 22nd International Conference on Atomic Collisions in Solids. 21st to 26th July 2006, Berlin. – P. 59.*
32. Mel'nikov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V. Secondary Ion Mass Spectrometry of Organic Materials with the Use of a Glycerol Matrix // *Russian Journal of Physical Chemistry A. – 2009. - Vol. 83. – No. 6, - P. 979-983.*

33. Rich R.L., Myszk D.G. Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature // *J. of Molecular Recognition*. - 2008. - Vol. 21. – No. 6 - P. 355-400.
34. Vo-Dinh T., Cullum B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics // *Fresenius' J. of Anal. Chem.* - 2000. - Vol. 366. – No. 6-7. - P. 540-551.
35. Mehrvar M., Bis C., Scharer J.M., Moo M., Luong J. H. Fiber-Optic Biosensors-Trends and Advances // *Analytical Sciences*. - 2000. - Vol. 16. – No. 7. - P. 677-692.
36. Kong T., Chen Y., Ye Y., Zhang K., Wang Z., Wang X. An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the ZnO nanotubes // *Sensors and Actuators B: Chemical*. - 2009. - Vol. 138. – No. 1. - P. 344-350.
37. Nenkova R., Ivanova D., Vladimirova J., Godjevargova T. New amperometric glucose biosensor based on cross-linking of glucose oxidase on silica gel/multiwalled carbon nanotubes/polyacrylonitrile nanocomposite film // *Sensors and Actuators B: Chemical*. - 2010. - Vol. 148. – No. 1. - P. 59-65.
38. Melnikov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V. SIMS Study of the Processes in Buffer Solutions of Bioorganic Systems // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. - 2008. - Vol. 72. – No. 7. - P. 929-933.
39. Melnikov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V., Tovstiyak V.V. Ob ispol'zovanii metoda MSVI dlja issledovanija vzaimodejstvija komponentov biosensora na gljukožu // *Vestnik HNU. Ser. "Jadra, chasticy, polja"*. - 2006. – No. 721. - S. 95-100.
40. Melnykov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V., Tovstiyak V.V. SIMS study of processes in a system modeling glucose biosensor // *5th European Workshop on Secondary Ion Mass Spectrometry "SIMS Europe 2006"*, Münster, 2006. - P. 81.
41. Melnikov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V. Issledovanie processov v bufernyh rastvorah bioorganicheskikh sistem metodom MSVI // *Tr. XVIII Mezhdunar. Konf. VIP. M.: Izd-vo MAI, 2007. - T. 2. - C. 185-188.*
42. Melnykov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V. SIMS investigations of multicomponent bioorganic systems // *5th European Workshop on Secondary Ion Mass Spectrometry "SIMS Europe 2006"*, Münster, 2006. - P. 21.
43. Melnykov V.N., Litvinov V.A., Koppe V.T., Gamayunova L.A., Tovstiyak V.V. SIMS investigations of Glucose Oxidase, Rhodamine 6G and Glucose Oxidase + Rhodamine 6G system in the glycerol matrix // *4th European Workshop on Secondary Ion Mass Spectrometry "SIMS Europe 2004"*, Münster, 2004. - P. 95.
44. Davydova M.E., Kurova V.S., Suhacheva M.V., Kupletskaja M.B., Riabov A.D., Netrusov A.I. Stabil'nost' i kataliticheskie svoystva gljukožooksidazy iz penicillium funiculosum G-15 // *Vestn. Mosk. univ-ta. Ser.2 Himija*. - 2002. - T. 43. – No. 6. - S. 366-370.
45. Levi A., Sikevic S. *Struktura i funkcii kletki*. – M.: Mir, 1971. – 584c.
46. Peters D., Hayes J., Hieftje G. *Chimicheskoe razdelenie i izmerenie. Teorija i praktika analiticheskoy chimii*. – M.: Chimija, 1978. – 816 s.
47. Litvinov V.A., Koppe V.T., Bobkov V.V., Gamayunova L.A. Radiation damages of biological objects during SIMS studies // *6th European Workshop on Secondary Ion Mass Spectrometry "SIMS Europe 2008"*, Münster, 2008. - P. 81.
48. Litvinov V.A., Koppe V.T., Logachev Yu.E., Bobkov V.V. SIMS Investigation of the Influence of Ultraviolet Irradiation on Amino Acids // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. - 2010. - Vol. 74. – No. 2. - P. 183-187.
49. Keough T., Ezra F.S., Russell A.F. et al. Comparison of the stable products formed by fast atom bombardment and γ -irradiation of glycerol // *Org. Mass Spectrom.* – 1987. – Vol. 22. – No. 5. – P. 241-247.
50. Litvinov V.A., Koppe V.T., Logachev Ju.E., Bobkov V.V. Issledovanie metodom VIMS vlijanija ul'traioletovogo obluchenija na aminokisloty // *Tr. XIX Mezhdunar. Konf. VIP. M.: Izd-vo MAI, 2009. - T. 1. - C. 410-413.*
51. Zenkevich I.G., Ioffe B.V. *Interpretacija mass-spektrov organicheskikh soedinenij*. – Leningrad: Himija, 1986. 176 s.
52. Henry M., Dupont-Gillain C., Bertrand P. Conformation change of albumin adsorbed on polycarbonate membranes as revealed by ToF-SIMS // *Langmuir*. - 2003. - Vol. 19. - P. 6271-6276.
53. Benninghoven A., Jaspers D., Sichtermann W. Secondary ion emission of amino acids // *Applied Physics B*. - 1976. - Vol. 11. – No. 1. - P. 35-39.
54. Tamaki S., Sichtermann W., Benninghoven A. Static SIMS Investigation of Ag-Supported Amino Acids // *Jpn. J. Appl. Phys.* - 1984. - Vol. 23. - P. 544-549.