

# Određivanje strukture aminokiselina u plinskoj fazi spektrometrijom masa

KUI 15/2005.  
Prispjelo 2. ožujka 2004.  
Prihvaćeno 30. studenog 2004.

M. Rožman i D. Srzić

Institut "Ruđer Bošković", Bijenička 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zbog uske povezanosti strukture biomolekule s biološkom funkcijom njezino je određivanje jedan od izazova u biokemiji. U posljednjih nekoliko desetljeća spektrometrija masa se sve češće rabi za dobivanje informacija o strukturi promatrane molekule. U ovom radu opisane su: ionska kromatografija, izmjena vodik/deuterij te kinetička metoda, tri najčešće primjenjivane tehnike za dobivanje informacija o sekundarnoj strukturi aminokiselina u plinskoj fazi.

Ključne riječi: *Struktura u plinskoj fazi, aminokiseline, spektrometrija masa, ionska kromatografija, izmjena vodik/deuterij, kinetička metoda*

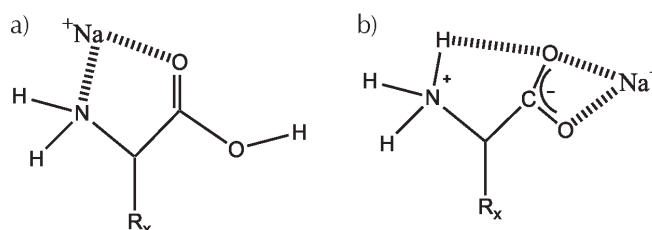
## Uvod

Zbog uske povezanosti strukture biomolekule s biološkom funkcijom njezino je određivanje jedan od izazova u biokemiji. Koncept strukture ima više razina, npr. za proteine: od primarne strukture, koja nam govori o redosljedju aminokiselina, sekundarne i tercijarne strukture, koja daje prostorni raspored molekule do kvaterne koja opisuje slaganje više polipeptidnih lanaca. Informacije o konformacijama molekula uobičajeno se dobivaju difrakcijskom analizom te nekim NMR tehnikama. U posljednjih nekoliko desetljeća spektrometrija masa sve se češće primjenjuje za dobivanje informacija o strukturi promatrane molekule. Spektrometrijom masa na biološkim molekulama u plinskoj fazi, osim određivanja primarne strukture prema izmjerenim molekulskim masama i fragmentaciji, moguće je dobiti informacije o sekundarnoj i tercijarnoj strukturi promatrane molekule.<sup>1,2</sup>

U ovom radu prikazat će se tri najčešće primjenjivane tehnike za dobivanje informacija o sekundarnoj strukturi promatrane molekule u plinskoj fazi: ionska kromatografija, izmjena vodik/deuterij te kinetička metoda. Uz prikaz svake od navedenih metoda bit će dani i primjeri u primjeni iste. Također, među primjerima bit će riječi o postojanju zwitteriona aminokiselina u plinskoj fazi. Poznato je da su u otopini i kristalima aminokiseline uglavnom u zwitterionskoj formi, međutim u plinskoj fazi zwitterionska forma je nestabilna i zamjenjuje je stabilnija neutralna struktura. Teorijski<sup>3,4</sup> i eksperimentalni<sup>5–8</sup> radovi pokazuju da zwitterionska forma aminokiselina ne postoji u plinskoj fazi. Međutim, ta zwitterionska forma u plinskoj fazi može biti dodatno stabilizirana dodatkom iona metala,<sup>9–12</sup> slika 1.

## Ionska kromatografija

Mobilnost iona u plinskoj fazi veličina je koja opisuje brzinu gibanja nabijene molekule zbog djelovanja slabog električnog polja kroz ćeliju ispunjenu sudarnim plinom pod tla-



Slika 1 – Struktura Na<sup>+</sup>-kationirane aminokiselina u plinskoj fazi: a) u formi solvatiranog naboja b) u zwitterionskoj formi

Fig. 1 – Gas phase structure of Na<sup>+</sup> cationized amino acid: a) charge solvation form b) zwitterionic form

kom. Malene, kompaktne molekule s manjim sudarnim presjecima gibaju se mnogo brže od molekula s velikim sudarnim presjecima, pa mjerenjem mobilnosti iona možemo dobiti vrijedne informacije o strukturi promatranih molekula. Ionska kromatografija je jedan od naziva te tehnike koji proizlazi iz mogućnosti razdvajanja smjese iona različitih sudarnih presjeka. Rezultati dobiveni tom tehnikom često nisu jednoznačni i rezultate mjerenja mobilnosti iona treba usporediti s rezultatima tj. strukturama dobivenim teorijskim računima.

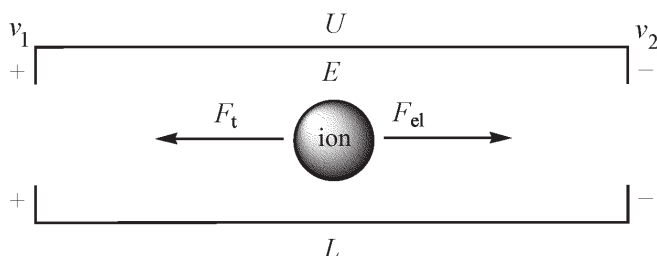
## Teorijska osnovica ionske kromatografije<sup>13</sup>

Promatrani ioni analita ulaze u sudarnu ćeliju duljine  $L$  od 4 do 20 cm koja je napravljena od bakra ili stakla te je najčešće ispunjena helijem pri tlaku od 100 Pa. Temperatura ćelije može se mijenjati od 80 K do 500 K. Unutar ćelije ioni dolaze pod utjecaj slabog, ali konstantnog električnog polja  $E$ ,

$$E = \frac{U}{L},$$

gdje je  $L$  duljina sudarne ćelije, a  $U$  razlika potencijala. Unutar ćelije javlja se i sila "trenja",  $F_t$ , koja potječe od sudara iona s neutralnim plinom. Zbog te dvije suprotne sile, slika 2, postoji jednoliko gibanje iona u smjeru električnog polja brzinom  $v_d$ ,

$$v_d = K \cdot E$$



Slika 2 – Prikaz sila u sudarnoj ćeliji

Fig. 2 – Depiction of forces in the buffer cell

a konstanta proporcionalnosti  $K$  obrnuto je proporcionalna tlaku neutralnog plina unutar sudarne ćelije i naziva se mobilnost iona. Uobičajeno se navodi reducirana mobilnost iona:

$$K_0 = K \frac{p}{p_0} \frac{T_0}{T},$$

gdje je  $p_0$  tlak od 101000 Pa, a  $T_0$  je temperatura od 273,15 K.

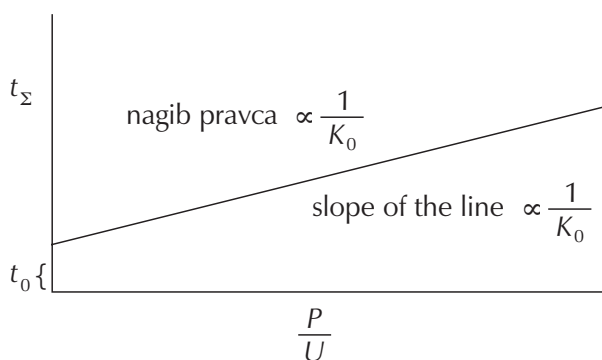
Vrijeme  $t_d$  koje ioni provedu unutar sudarne ćelije dano je izrazom:

$$t_d = \frac{L}{v_d} = \frac{L^2 T_0 p}{K_0 p_0 T V}.$$

Eksperimentalno dobiveno vrijeme ( $t_\Sigma$ ) je ukupno vrijeme provedeno u sudarnoj ćeliji,  $t_d$  i izvan ćelije,  $t_0$ .

$$t_\Sigma = t_d + t_0$$

Prikazom ovisnosti  $t_\Sigma$  o  $p/U$  možemo iz nagiba pravca dobiti vrijednost reducirane mobilnosti, slika 3.



Slika 3 – Vrijednost reducirane mobilnosti  $K_0$  određuje se pomoću nagiba pravca

Fig. 3 – The reduced mobility  $K_0$  is obtained from the slope of the line

Pomoću kinetičke teorije možemo povezati reduciranu mobilnost i sudarni presjek promatranog iona:

$$K_0 = \frac{3e}{16N_0} \left( \frac{2\pi}{\mu k_B T} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega},$$

gdje je  $e$  protonski naboj iona,  $N_0$  brojnosna gustoća sudarnog plina pri tlaku  $p_0$  i temperaturi  $T_0$ ,  $\mu$  reducirana masa iona i sudarnog plina,  $k_B$  je Boltzmanova konstanta, a  $T$  je eksperimentalna temperatura.

Iako je relativno lako odrediti eksperimentalni sudarni presjek, mnogo je teže odrediti odgovarajući presjek iz teorijske strukture proučavane molekule. Postoji više modela dobivanja teorijskih sudarnih presjeka molekula.<sup>11,13–19</sup> Najjednostavniji pristup je računanje prosječnog sudarnog presjeka modela uzimajući radijus-vektor svakog atoma u sustavu kao radijus-vektor čvrste sfere.<sup>13,19</sup> U poboljšanom modelu radijusi su opisani kao funkcije temperature te interakcijskih potencijala ion – sudarni plin.<sup>11,14</sup> Taj model je mnogo bolji za male molekule,<sup>11,14,15</sup> osobito u slučajevima kada imamo interakcije s velikim, polarnim molekulama sudarnog plina pri niskim temperaturama. U slučaju većih molekula (više od stotinu atoma) interakcijski je potencijal manje važan, te model čvrste sfere uz dodatnu kalibraciju daje dobre rezultate.<sup>17</sup>

### Eksperimentalni sustav

Jedna od osnovnih shema sustava za eksperimentalno određivanje mobilnosti iona prikazana je na slici 4. Proučavani ioni generiraju se u ionskom izvoru najčešće uporabom: ionizacije laserskom desorpcijom<sup>20–22</sup> (Laser desorption ionization, LDI), matricom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom<sup>23–26</sup> (Matrix assisted laser desorption ionization, MALDI), ionizacije elektroraspršenjem<sup>27,28</sup> (Electrospray ionization, ESI) te ionizacije udarom elektrona (Electron impact, EI).<sup>29</sup> Nakon formiranja ioni se selektiraju po masama u prvom analizatoru masa MS1 i nakon toga se uvode u sudarnu ćeliju ionskog kromatografa. Nakon prolaska kroz ćeliju ionima se ponovno analizira masa u drugom analizatoru masa MS2 te se detektiraju jednom od klasičnih tehnika brojanja iona. Analizatori masa primjenjeni u eksperimentima mjerenja mobilnosti iona mogu biti: kvadrupolni,<sup>30</sup> klasični (sektorski),<sup>30</sup> analizator masa ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju te analizator masa s vremenom proleta (Time of Flight, TOF).<sup>30</sup>

Združivanje ionske kromatografije i analizatora masa (najčešće TOF) naziva se i dvodimenzijski eksperiment<sup>31</sup> (mobilnost iona + masa). U toj postavi ioni se prvo razdvajaju na osnovi oblika, a zatim na osnovi kvocijenta mase i naboja. Povezivanje tih dvaju sustava tehnički je vrlo zahtjevno jer rade pri različitim tlakovima.

Povećanje rezolucije<sup>13,32</sup> u eksperimentima mjerenja mobilnosti iona postiže se sniženjem temperature unutar ćelije, povećanjem tlaka sudarnog plina te produljenjem sudarne ćelije. Budući da ioni ne mogu izravno iz vakuuma analizatora spektrometra masa biti uvedeni u sudarnu ćeliju ionskog kromatografa selekcija iona po masama prije ulaska u sudarnu ćeliju instrumenta s viskom rezolucijom nije moguća te se uklanja prvi analizator masa. U ovom slučaju ioni se linearno svrstavaju ispred sudarne ćelije te prolaze kroz ionska vrata koja razdvajaju nabijene od neutralnih mo-



Slika 4 – Osnovni sustav za izvođenje eksperimenta mobilnosti iona

Fig. 4 – Basic setup for the ion mobility experiments

lekula. Ionska vrata sprječavaju ulazak neutralnih molekula protustrujom helija, dok nabijene molekule analita ulaze u ćeliju pod utjecajem slabog električnog polja. Negativna posljedica povećanja tlaka unutar ćelije povećana je fragmentacija iona, dok u slučaju predugačke ćelije dolazi do gubitka iona zbog sudara sa stijenkama ćelije.

### Primjena ionske kromatografije u određivanju strukture biomolekula

Kao što je navedeno, informacije dobivene mjerenjem mobilnosti iona govore nam o sudarnom presjeku promatrane molekule, a samim time i o obliku tj. strukturi iona. Pojedine molekule u plinskoj fazi imaju složene plohe potencijalne energije na kojima postoji i nekoliko minimuma. Ukoliko se odgovarajuće strukture za pojedine minimume dovoljno razlikuju u sudarnim presjecima, moguće je kombinacijom podataka dobivenih mjerenjem mobilnosti iona i teorijskih računa izvesti vrlo precizne zaključke vezane uz strukturu promatrane molekule u plinskoj fazi.

Dimer bradikinina, polipeptida sekvence Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg, često se generira kao posljedica ionizacije elektroraspršenjem. Monomer  $[M + H]^+$  i dimer  $[2M + 2H]^{2+}$  nije moguće razlikovati u spektrometru masa budući da imaju jednake vrijednosti  $m/z = 1061$ , ali na temelju različitog sudarnog presjeka i time različite mobilnosti moguće ih je razdvojiti ionskom kromatografijom.<sup>33</sup>

Proučavanjem ionske mobilnosti kako protoniranih tako i  $Na^+$ -kationiranih oligoglicina  $Gly_n$  ( $n = 1-6$ ) čiji se sudarni presjeci zwitterionske i forme solvatiranog naboja razlikuju pokazano je da u plinskoj fazi nema zwitteriona.<sup>34</sup> Mjerenjem mobilnosti  $Na^+$ -kationiranog arginina, međutim, nađeno je da se u plinskoj fazi nalazi u formi zwitteriona.<sup>35</sup>

Jedna od mana ionske kromatografije je da sudarni presjeci proučavanih konformacija moraju biti različiti. Sudarni presjeci dobiveni ionskom kromatografijom za neke ione ponekad nisu jednoznačni jer su strukture (sudarni presjeci) pojedinih minimuma vrlo slični. Primjer takvog slučaja je

nemogućnost razlikovanja je li protonirani bradikinin u plinskoj fazi zwitterion ili u formi solvatiranog naboja jer obje forme imaju vrlo slične sudarne presjeke.<sup>36</sup> Slično je i s  $Na^+$ -kationiranim N- i C-metiliranim glicinom gdje zwitterionska i forma solvatiranog naboja imaju gotovo jednake sudarne presjeke.<sup>11</sup>

### Reakcije izmjene vodik/deuterij

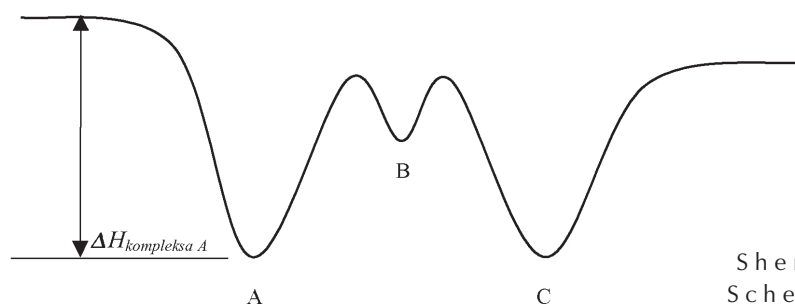
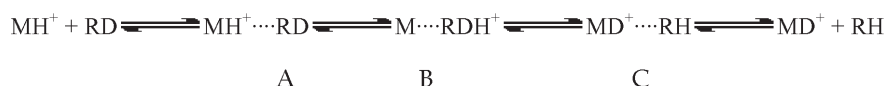
U spektrometriji masa izmjene vodik/deuterij u tekućoj fazi već se dulje vrijeme rabe kao pomoć u rješavanju reakcijskih mehanizama i strukturnih problema.<sup>37,38</sup> Izotopska izmjena je idealna za proučavanje spektrometrijom masa jer je detekcija promjene mase primarna funkcija instrumenta.

Dostupnost tehnika u spektrometriji masa za generiranje ionskih vrsta u plinovitom stanju, bez razaranja molekule te uvođenje suviška donora deuterija, omogućava proučavanje izmjene H/D u plinskoj fazi.<sup>39</sup> Reakcije izmjene H/D u plinovitom stanju mogu se izvoditi i na biološki presudnim molekulama (peptidi, nukleotidi).<sup>39,40</sup> Mogućnost dobivanja informacija o konformaciji iz eksperimenta na masenom spektrometru čini tu tehniku vrlo atraktivnom.

### Mehanizam izmjene vodik/deuterij

Reakcije izmjene vodik/deuterij uzrokovane su sudarima molekularnog iona uzorka s neutralnim molekulama deuteriranog reakcijskog plina (donora atoma deuterija).<sup>41-45</sup> Višestrukih sudari pritom su malo vjerojatni s obzirom na mali udjel jednih i drugih u plinskoj fazi. Smatra se da reakcija izmjene vodik/deuterij, nastala sudarom iona uzorka i neutralne molekule deuteriranog reakcijskog plina, ide u tri koraka, shema 1:<sup>41-46</sup>

1. formiranje ion-molekulskog kompleksa A povezanog slabom vodikovom vezom,
2. transfer protona unutar kompleksa B,
3. disocijacija ion-molekulskog kompleksa C.

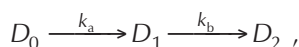
Shema 1  
Scheme 1

Krivulja energije reaktanata duž reakcijske koordinate koja opisuje reakciju prijenosa protona između iona i neutralne molekule ima tri minimuma odijeljena energijskim barijerama. Ova tri minimuma odgovaraju kompleksima A, B i C. Tijekom reakcije izmjene H/D molekularni ion uzorka reagira s donorom deuterija. Ako nastali prereakcijski kompleks A ima dovoljno energije da prijeđe barijeru potencijalne energije, nastat će kompleks C. Energija oslobođena nastankom kompleksa A mora biti dovoljna da kompleks B prijeđe barijeru internog transfera protona, koja ovisi o razlici protonskih afiniteta ( $\Delta PA$ ) između neprotonirane molekule uzorka i neprotoniranog reakcijskog plina ( $\Delta PA = PA_{molekule} - PA_{plina}$ ). Nekad se smatralo da u slučaju  $\Delta PA > 84$  kJ mol<sup>-1</sup> ne dolazi do izmjene.<sup>41</sup> Međutim, pokazano je da do izmjene vodik/deuterij dolazi i kada je  $\Delta PA > 210$  kJ mol<sup>-1</sup>.

Osim razlike u protonskim afinitetima, kod izmjene vodik/deuterij, bitno djelovanje imaju i strukturni učinci, npr. višestruke vodikove veze u reakcijskom kompleksu aminokiseline; donor deuterija snižuju energiju kompleksa te umanjuju utjecaj velike razlike protonskih afiniteta neprotonirane molekule uzorka i neprotoniranog reakcijskog plina.<sup>42–46</sup>

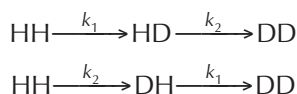
### Kinetika H/D izmjene

Postoje dva načina analize kinetike izmjene vodik/deuterij u plinskoj fazi. Prvi pristup je da se sustav promatra kao niz uzastopnih reakcija<sup>42–45,47</sup> s koeficijentima brzine reakcije izmjene  $k_a$ ,  $k_b$ , .... Na primjer, dan je sistem s mogućnošću izmjene dvaju atoma vodika:



u kojoj  $D_0$ ,  $D_1$ ,  $D_2$  označavaju molekule koje sadrže nula, jedan i dva deuterija na mjestu izmjenjivih vodikovih atoma.

Također je moguće sustav promatrati kao  $n$  nezavisnih mjesta za izmjenu<sup>44,48–50</sup> s koeficijentima brzine reakcije za specifično mjesto na molekuli. To su takozvane reakcije na specifičnom mjestu. Kinetička analiza takvog sustava bitno je drugačija jer se produkti kemijski ne razlikuju i imaju slične koeficijente brzine reakcije. U primjeru izmjene dvaju vodika:



kada je došlo do izmjene jednog deuterija, ukupna koncentracija  $D_1$  rezultat je izmjene na dvama različitim mjestima u molekuli HD i DH.

Određivanje koeficijenata brzine reakcije u oba pristupa generira skup povezanih diferencijalnih jednadžbi. Opći algoritam za određivanje koeficijenata brzine kemijske reakcije na specifičnom mjestu sastoji se od numeričkog rješavanja diferencijalnih jednadžbi, koje se dobivaju variranjem vrijednosti koeficijenata te usklađivanjem s eksperimentalnim podacima.<sup>48</sup>

Pri proučavanju izmjene vodik/deuterij plinoviti donor deuterija je u suvišku, tako da su u oba pristupa promatrane reakcije pseudo-prvog reda, a koeficijenti dobiveni analizom takvog sustava također su pseudo prvog reda.<sup>42–45,47–50</sup> Pravi koeficijenti brzine reakcije dobivaju se množenjem

koeficijenata pseudo-prvog reda s recipročnom vrijednošću brojnosne koncentracije plinovitog donora deuterija koja se računa iz jednadžbe stanja idealnog plina na temelju izmjerenih tlakova unutar vakuumske ćelije instrumenta. Najveći uzrok pogreške u provedenim mjerenjima je nemogućnost točnog mjerenja tlakova s obzirom na udaljenost mjerača tlakova od ćelije te različite brzine ispušavanja kod ćelije i mjerača tlaka, što može rezultirati pogreškom u mjerenju tlakova od oko 30 %.<sup>51</sup>

### Eksperimentalni sustav

Spektrometrija masa ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju kao i spektrometrija masa ionske klopke najpogodnije su tehnike za proučavanje reakcija izmjene vodik/deuterij u plinskoj fazi te određivanje koeficijenata brzine kemijske reakcije. Uz primjenu MALDI ili ESI, obje metode mogu zadržati ione u klopci na dulje vrijeme uz suvišak donora deuterija.

### Određivanje strukture kationiranih aminokiselina izmjenom vodik/deuterij

Pokazano je da promatranje sustava kao  $n$  nezavisnih mjesta za izmjenu daje bolji uvid u strukturu protoniranih aminokiselina. U radu *Marshalla* i sur.<sup>48</sup> nađeno je da protonirani glicin ima jedno brzo mjesto izmjene i tri ekvivalentna spora mjesta, što jasno ukazuje da su tri sporo izmjenjujuća protona iz protonirane amino-skupine, a da je brzo izmjenjujući proton iz karboksilne skupine. Neke aminokiseline, npr. triptofan, histidin itd. imaju više mogućih položaja protoniranja. Promatranje izmjene vodik/deuterij na specifičnim mjestima u kationiranim aminokiselinama (fenilalanin, histidin, prolin, tirozin i triptofan) pokazalo je da poznavanje reakcija na specifičnom mjestu u molekuli omogućuje jednostavno određivanje mjesta protoniranja tj. strukture protoniranih aminokiselina,<sup>50</sup> slika 5.

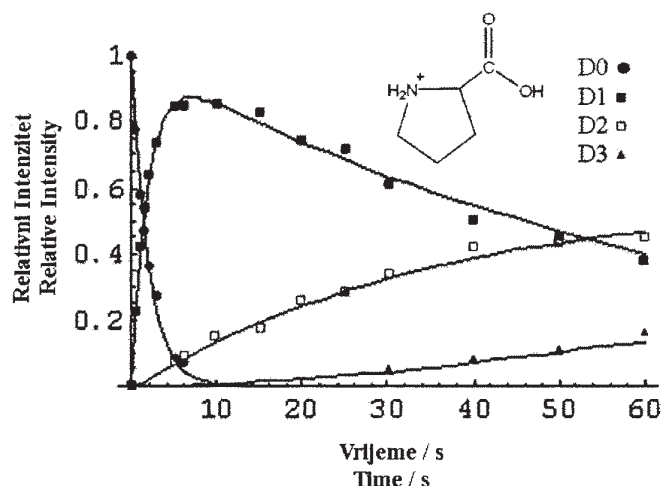
S obzirom na različitu strukturu Na<sup>+</sup>-kationirane aminokiseline u zwitterionskoj formi od one u formi solvatiranog naboja pokazano je da izmjena vodik/deuterij omogućuje razlikovanje tih dviju struktura,<sup>49</sup> slika 1. Na primjer, nađeno je<sup>49</sup> da se Na<sup>+</sup>-kationirani prolin tijekom izmjene vodik/deuterij u plinskoj fazi nalazi u formi zwitteriona, što je u skladu s teorijskim rezultatima,<sup>53</sup> slika 6.

Dakle, analizom rezultata izmjene vodik/deuterij u plinskoj fazi moguće je odrediti konstante brzine kemijske reakcije za različita mjesta u molekuli,<sup>40,44,48–50</sup> odrediti mjesto naboja u molekuli,<sup>48,50</sup> pratiti ovisnost reakcije izmjene o donoru deuterija<sup>44,50</sup> te razlikovati zwitterionsku formu kationirane aminokiseline od forme solvatiranog naboja.<sup>49</sup>

### Kinetička metoda

Reakcije disocijacije ionom vezanog klastera u spektrometru masa mogu se iskoristiti za dobivanje nekih termodinamičkih podataka te razjašnjenje strukture promatranih molekula. Metoda koja se temelji na kinetičkom praćenju disocijacije ionom vezanog klastera naziva se kinetička metoda i predložili su je Cooks i sur.<sup>54,55</sup> Kinetička metoda primjenjuje se u određivanju raznih ionskih afiniteta, ionizacijskih energija, bazičnosti u plinskoj fazi, a često se pomoću nje mogu razjasniti strukture promatranih molekula.



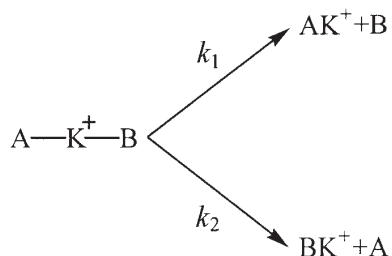


Slika 5 – Vremenska ovisnost relativnih intenziteta vrsta  $[M+H]^+$  u spektru masa i odgovarajuće krivulje dobivene određivanjem koeficijenta brzine reakcije izmjene na specifičnom mjestu za protonirani prolin uz uporabu  $D_2O$ . Dobiveni koeficijenti<sup>50</sup> ukazuju da protonirani prolin ima dva ekvivalentna sporo izmjenjujuća ( $k_1 = k_2 = 5,59 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ molekula}^{-1}$ ) te jedan brzo izmjenjujući proton ( $k_3 = 36,59 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ molekula}^{-1}$ ). Vidljivo je da se proton odgovoran za protoniranje prolina smjestio na imino-skupini, što se slaže s teorijskim predviđanjima.<sup>52</sup>

Fig. 5 – Time dependence of the experimental ion intensities and corresponding theoretical fit obtained by site-specific treatment of the H/D exchange in proline with  $D_2O$ . For protonated proline obtained coefficients<sup>50</sup> indicate two equivalent slow exchanging sites ( $k_1 = k_2 = 5.59 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ molecules}^{-1}$ ) and one fast exchanging site ( $k_3 = 36.59 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ molecules}^{-1}$ ). The latter indicates the imino group as site of protonation, in agreement with the calculated structure.<sup>52</sup>

### Teorijska osnovica kinetičke metode<sup>30</sup>

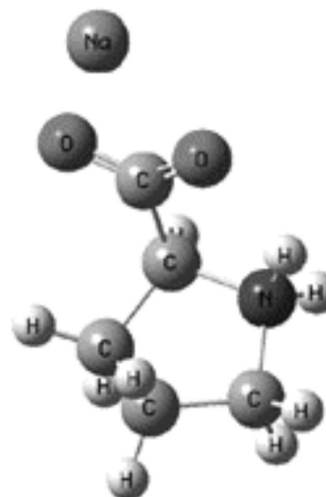
Eksperimenti vođeni primjenom kinetičke metode započinju stvaranjem kationom (ili pomoću nekog drugog iona) vezanog dimernog iona nastalog u asocijacijskoj reakciji između molekula A i B unutar reakcijske ćelije spektrometra masa. Nakon odvajanja novoformiranih iona dolazi do njihove sudarima izazvane disocijacije. Disocijacija odgovarajućeg dimera može se odvijati na dva međusobno konkurentna načina, gdje su  $k_1$  i  $k_2$  koeficijenti brzine disocijacije dimera, pri čemu nastaju ioni  $AK^+$  i  $BK^+$ ,



a omjer relativnih intenziteta  $[AK^+]$  i  $[BK^+]$  jednak je omjeru koeficijentata brzine disocijacije dimera  $k_1$  i  $k_2$ .

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[AK^+]}{[BK^+]}$$

Kinetička metoda pretpostavlja da je aktivacijska energija za povratnu reakciju zanemariva, pa vrijedi:



Slika 6 – Struktura  $Na^+$ -kationiranog prolina u plinskoj fazi. U eksperimentima izotopne izmjene opažena je zamjena dvaju protona deuterijem. Određeni koeficijenti<sup>49</sup> izmjene na specifičnim mjestima su jednaki ( $k_1 = k_2 = 4,37 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ molekula}^{-1}$ ) te je zaključeno da se ekvivalentni protoni nalaze na imino-skupini.

Fig. 6 – Gas phase structure of the  $Na^+$  cationized proline. Exchange of two protons is observed in the gas phase hydrogen/deuterium exchange experiments. Determined coefficients<sup>49</sup> indicate two equivalent exchanging sites ( $k_1 = k_2 = 4.37 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ molecules}^{-1}$ ) showing that equivalent protons are localized at the imino group.

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = \frac{\Delta(\Delta G)}{RT_{\text{eff}}} = \frac{\Delta(\Delta H)}{RT_{\text{eff}}} - \frac{\Delta(\Delta S)}{R},$$

gdje je  $\Delta(\Delta G)$  promjena Gibbsove energije vezanja metalnog iona,  $\Delta(\Delta H) = \Delta H(A) - \Delta H(B)$  je promjena afiniteta prema kationu (promjena entalpije vezanja), a  $T_{\text{eff}}$  efektivna temperatura aktiviranog dimera. Efektivna temperatura je temperatura Boltzmannove raspodjele aktiviranog dimernog iona koji bi disocijacijom dao jednak omjer intenziteta protoniranih molekulskih iona kao što je omjer tih iona opažen tijekom eksperimenta gdje populacija dimernog iona nema Boltzmannovu raspodjelu.<sup>56</sup> Pri određivanju afiniteta prema kationu jedna od molekula dimera ima poznati afinitet prema kationu.  $\Delta(\Delta S)$  je promjena entropije vezanja kationa te se u nekim slučajevima, kada je promjena reakcijske entropije tijekom oba disocijacijska puta slična, zanemaruje.<sup>57,58</sup> To npr. vrijedi za vezanje metalnih kationa za strukturno slične ligande, odnosno:

$$\ln\left(\frac{[AK^+]}{[BK^+]}\right) = \ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) \approx \frac{\Delta(\Delta H)}{RT_{\text{eff}}}$$

U slučaju kompleksnih sustava gdje je povratna reakcija moguća i/ili postoji više mjesta vezanja kationa pa su molekule u ionom vezanom klasteru strukturno različite, primjenjuje se egzaktni statistički tretman kinetičke metode dan u radu *P. B. Armentrouta*.<sup>59</sup>

### Eksperimentalni sustav

Najčešće primjenjivane ionizacijske tehnike u studijama kinetičke metode su: udar brzih atoma<sup>60,61</sup> (Fast Atom Bombardment, FAB), kemijska ionizacija<sup>62,63</sup> (Chemical Ioni-

zation, CI), LDI, ESI i MALDI u kombinaciji sa sektorskim analizatorom, analizatorom ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju, analizatorom ionske klopke te kvadrupolnim analizatorom masa.

### Primjena kinetičke metode u određivanju strukture kationiranih aminokiselina

Kinetička metoda je upotrijebljena za određivanje najstabilnijih tautomera Na<sup>+</sup>-kationiranih aminokiselina. Određena je energija vezanja kationa za aminokiseline i odgovarajuće metilne estere koji ne mogu biti u zwitterionskoj formi.

Uspoređene su vrijednosti Na<sup>+</sup>-afiniteta nekih aminokiselina i njihovih metilnih estera.<sup>64</sup> U slučaju da je aminokiselina u plinskoj fazi u zwitterionskoj formi, vrijednost Na<sup>+</sup>-afiniteta je veća za aminokiselinu. Ako se pak aminokiselina u plinskoj fazi nalazi u obliku solvatiranog naboja, veću vrijednost Na<sup>+</sup>-afiniteta ima metilni ester iste, jer dolazi do jačeg vezanja zbog činjenice da je metilna skupina jači donor elektrona od vodika.

Nažalost, određivanjem afiniteta prema kationu može se samo razlučiti: je li promatrana aminokiselina u zwitterionskom obliku ili u obliku solvatiranog naboja, ali ne i razlikovati dva različita izomera iste strukture.

### ZAHVALA

Dio istraživanja spomenutih u ovom radu provedeno je u okviru projekta Ministarstva znanosti i tehnologije broj 00980032.

### Popis kratica

#### List of abbreviations

CI	– kemijska ionizacija – chemical ionization
EI	– udar elektrona – electron impact
ESI	– ionizacija elektroraspršenjem – electrospray ionization
FAB	– udar brzih atoma – fast atom bombardment
LDI	– ionizacija laserskom desorpcijom – laser desorption ionization
MALDI	– matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom – matrix assisted laser desorption ionization
MS	– spektrometar masa – mass spectrometer
NMR	– nuklearna magnetska rezonancija – nuclear magnetic resonance
PA	– protonski afinitet – proton affinity
TOF	– vrijeme proleta – time of flight

### Popis literature

#### References

1. B. E. Winger, K. J. Light-Wahl, A. L. Rockwood, R. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 5897.
2. D. Suckau, Y. Shi, S. C. Beu, M. W. Senko, J. P. Quinn, F. M. Wamper, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90** (1993) 790.
3. Y. Ding, K. K. Jespersen, *Chem. Phys. Lett.* **199** (1992) 261.
4. J. H. Jensen, M. S. Gordon, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 8159.
5. L. Klasinc, *J. Electron Spectrosc.* **8** (1976) 161.
6. L. Klasinc, *Int. J. Quantum Chem., Quantum Biol. Symp.* **5** (1978) 373.
7. M. J. Locke, R. T. McIver, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 4226.
8. K. Iijima, K. Tanaka, S. Onuma, *J. Mol. Struct.* **246** (1991) 257.
9. P. D. Schnier, W. D. Price, R. A. Jockusch, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 7178.
10. R. A. Jockusch, W. D. Price, E. R. Williams, *J. Phys. Chem. A.* **103** (1999) 9266.
11. T. Wytttenbach, M. Witt, M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 3458.
12. S. Hoyau, K. Norrman, T. B. McMahon, G. Ohanessian, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 8864.
13. E. A. Mason, E. W. McDaniel, *Transport Properties of Ions in Gases*, Wiley, New York 1998.
14. T. Wytttenbach, G. Von Helden, J. J. Batka, D. Carlat, M. T. Bowers, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8** (1997) 275.
15. J. Gidden, A. T. Jackson, J. H. Scrivens, M. T. Bowers, *Int. J. Mass Spectrom.* **188** (1999) 121.
16. M. F. Mesleh, J. M. Hunter, A. A. Shvatsburg, G. C. Schatz, M. F. Jarrold, *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 16082.
17. A. A. Shvatsburg, M. F. Jarrold, *Chem. Phys. Lett.* **261** (1996) 86.
18. A. A. Shvatsburg, B. Liu, M. F. Jarrod, K. M. Ho, *J. Chem. Phys.* **112** (2000) 4517.
19. D. E. Clemmer, M. F. Jarrold, *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 577.
20. R. J. Cotter, *Anal. Chim. Acta* **195** (1987) 45.
21. D. M. Lubman, *Lasers and Mass Spectrometry*, Oxford University Press, Oxford, 1990.
22. L. Van Vaeck, W. Van Roy, H. Struyf, F. Adams, *Mass Spectrometry Review* **13** (1994) 189.
23. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2** (1988) 151.
24. F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **63** (1991) 1193A.
25. M. Rožman, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **54** (2003) 19.
26. S. Kazazić, S. Pečur, D. Srzić, *Kem. Ind.* **48** (1999) 181.
27. M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 4671.
28. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **246** (1989) 64.
29. A. E. Ashcroft, *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*, RSC Analytical Spectroscopy Monographs, Cambridge, 1997.
30. M. L. Gross, R. Caprioli, P. B. Armentrout (ur.), *The Encyclopedia of Mass Spectrometry Volume 1*, Elsevier Ltd. Oxford, 2003.
31. C. S. Hoaglund, S. J. Valentine, C. R. Spurler, J. P. Reilly, D. E. Clemmer, *Anal. Chem.* **70** (1998) 2236.
32. P. Dugourd, R. R. Hudgins, D. E. Clemmer, M. F. Jarrold, *Rev. Sci. Instr.* **71** (2000) 4078.
33. T. Wytttenbach, P. R. Kemper, M. T. Bowers, *Int. J. Mass Spectrom.* **212** (2001) 13.

34. T. Wytenbach, J. E. Bushnell, M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 5098.
35. T. Wytenbach, M. Witt, M. T. Bowers, *Int. J. Mass Spectrom.* **182/183** (1999) 243.
36. T. Wytenbach, G. Von Helden, M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 8355.
37. D. F. Hunt, S. K. Sethi, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 6953.
38. S. T. Graul, M. D. Brickhouse, R. R. Squires, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 631.
39. V. Katta, B. T. Chain, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5** (1991) 214.
40. J. R. Cushnir, S. Naylor, J. H. Lamb, P. B. Farmer, *Org. Mass Spectrom.* **4** (1990) 426.
41. P. Ausloos, S. G. Lias, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 3641.
42. E. Gard, M. K. Green, J. Bregar, C. B. Lebrilla, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5** (1994) 623.
43. M. K. Green, E. Gard, J. Bregar, C. B. Lebrilla, *J. Mass. Spectrom.* **30** (1995) 1103.
44. M. K. Green, C. B. Lebrilla, *Mass Spectrom. Rev.* **16** (1997) 53.
45. M. K. Green, C. B. Lebrilla, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.* **175** (1998) 15.
46. S. Campbell, M. T. Rodgers, E. M. Marzluff, J. L. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 12840.
47. E. Gard, D. Willard, J. Bregar, M. K. Green, C. B. Lebrilla, *Org. Mass Spectrom.* **28** (1993) 1632.
48. F. He, A. G. Marshall, *J. Phys. Chem. A* **104** (2000) 562.
49. M. Rožman, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2003.
50. M. Rožman, S. Kazazić, L. Klasinc, D. Srzić, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 2769.
51. J. E. Bartmess, R. M. Georgiadis, *Vacuum* **33** (1983) 149.
52. Z. B. Maksić, B. Kovačević, *Chem. Phys. Lett.* **307** (1999) 497.
53. S. Hoyau, K. Norrman, T. B. McMahon, G. Ohanessian, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 8864.
54. R. G. Cooks, T. L. Kruger, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 1279.
55. S. A. McLuckey, D. Cameron, R. G. Cooks, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 1313.
56. L. Drahos, K. Vekey, *J. Mass Spectrom.* **34** (1999) 79.
57. R. G. Cooks, J. S. Patrick, T. Kotiaho, S. A. Mc Luckey, *Mass Spectrom. Rev.* **13** (1994) 287.
58. R. G. Cooks, J. T. Koskinen, P. D. Thomas, *J. Mass Spectrom.* **34** (1999) 85.
59. P. B. Armentrout, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11** (2000) 371.
60. R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, *Science* **191** (1976) 920.
61. A. Benninghoven, W. K. Sichterhmann, *Anal. Chem.* **50** (1978) 1180.
62. M. S. B. Munson, F. H. Field, *J. Am. Chem. Soc.* **88** (1966) 2621.
63. S. Kazazić, S. Martinović, *Kem. Ind.* **53** (2004) 265.
64. J. M. Talley, B. A. Cereda, G. Ohanessian, C. Wesdemiotis, *Chem. Eur. J.* **8** (2002) 1377.

## SUMMARY

### Mass Spectrometric Determination of Gas Phase Structures of Amino Acids

*M. Rožman and D. Srzić*

In the past two decades mass spectrometry became an important tool in the structural investigations of biomolecules (amino acids). Although, the primary focus of mass spectrometry is on compound identification and sequence information (primary structure), some mass spectrometry based methods as ion chromatography, hydrogen/deuterium exchange, and kinetic method are able to determine secondary gas phase structure of the amino acids. For example, it is possible to distinguish the zwitterionic and charge solvated structures of the sodiated amino acid, figure 1.

#### Ion chromatography

The ion chromatography (also ion mobility) of a gas-phase ion is the quantity that describes how quickly the ion moves through a drift cell filled with a buffer gas under the influence of a weak electric field, figure 2. Basic setup for the ion mobility experiments is shown in figure 4. Measuring the mobility (collision cross section) of an ion yields information about its structure i. e. whether it is compact or extended. Based on this, some conclusions about gas phase structure of alkali cationized amino acids, are obtained. On the other hand some collision cross section data for ionic systems, obtained from the ion mobility experiments are often not conclusive when the shape of charge solvation is very similar to zwitterionic structures.

#### Hydrogen/deuterium exchange

In the typical hydrogen/deuterium experiment a cationized amino acid is exposed to gas phase of the deuterating reagent and the rate of the exchange is monitored by the mass spectrometer. The generally accepted mechanism for the hydrogen/deuterium exchange consists of three steps, scheme 1.

The information obtained from site specific reaction rate coefficients can give information about the number of exchangeable hydrogens, location of the ionization site, location of the reactive groups, structure hydrogen bonding and shape of the cationized amino acid (zwitterionic versus charge solvated). On the basis of such information, results for protonated and sodiated proline are given in figures 5 and 6.

#### Kinetic method

The kinetic method is a procedure for the determination of thermochemical properties based on the rates of competitive dissociations of mass selected cluster ions. It is widely used for thermochemical and ion structural determinations. For example the kinetic method is used for determination of the most stable conformation of sodiated amino acids. Relative alkali metal ion affinities of amino acid and the corresponding methyl ester are determined. Based on the difference of sodium affinity between zwitterionic and charge solvated structures of the gas phase sodiated amino acids, some structural conclusions can be obtained.

*Ruđer Bošković Institute,  
Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia*

*Received March 2, 2004  
Accepted November 30, 2004*