

6

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

УТВЕРЖДАЮ
Председатель СПбНЦ РАН
академик

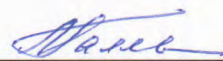

Ж. И. Алфёров

О Т Ч Е Т

**по теме «Разработка нового масс-спектрометрического метода
для моделирования метаболизма экологических и живых
систем по основным метаболическим реакциям с помощью
ионизации электрораспылением и его реализация в виде
аппаратно-методического комплекса»
по Государственному заданию СПбНЦ РАН в 2014–2016 гг.**

Этап 2014 года

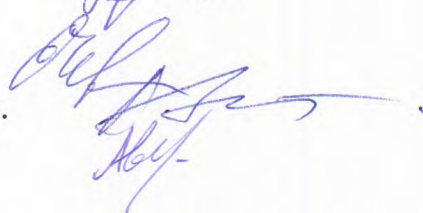

Научный руководитель
д.ф.м.н., проф. Л.Н.Галль



Санкт-Петербург

Список исполнителей.

1. Галль Л.Н. в.н.с., д.ф.м.н.
2. Масюкевич С. В., вед. специалист.
3. Кулешов Д.О., м.н.с.
4. Русских Я.В., в.н.с, к.х.н.
5. Чернова Е.Н. инж.
6. Фотиади А.Э., в.н.с., д.ф.м.н.
7. Аверин И.А., м.н.с.



Календарный план проведения работ по теме: Разработка нового масс-спектрометрического метода для моделирования метаболизма экологических и живых систем по основным метаболическим реакциям с помощью ионизации электрораспылением и его реализация в виде аппаратно-методического комплекса на 2014-2016г.г.

Этап - 2014 год:

1. Проведение расчетов движения заряженных частиц (капель и ионов) в области пробоотбора масс-спектрометра (СПБПУ).

2. Выбор конструкции микрореактора, способов его термостатирования и подачи пробы, выбор способа смешивания пробы с ацетонитрилом (ИАП РАН); измерение модельных образцов (НИЦЭБ РАН).

3. Будет подготовлена 1 научная статья в российском или международном научном журнале.

1. Введение.

Человечество в целом и каждый человек в отдельности в числе своих главных приоритетов всегда выделяет проблему здоровья, поскольку именно оно определяет как качество жизни и ее продолжительность, так и реальную возможность осуществления всех намеченных жизненных планов. В последние десятилетия медицина, опираясь на новые знания, на технические и фармацевтические достижения, совершила гигантский скачок вперед, благодаря чему продолжительность жизни в большинстве стран мира существенно выросла. Однако одновременно в мире существенно изменилось состояние среды обитания и человека, и биоты в целом, связанные с развитием промышленности и энергетики современных высокоразвитых стран. Экологические факторы, такие как гигантское загрязнение среды, в основном, промышленно развитых стран, микропримесями разнообразных химических веществ и внедрение в их жизнь фактора электромагнитного загрязнения окружающей среды приводят к пока плохо понимаемым последствиям в отношении их пролонгированного действия на организм человека. Поиски ответа на поставленные вопросы требуют проведения фундаментальных исследований, поскольку из-за малости указанных экологических факторов их действие на живой организм происходит в нелинейной области воздействий и в большинстве биофизических экспериментов напрямую не наблюдается или же наблюдается в виде парадоксальных последствий и только на биотестах.

В связи с этим особо актуальным является разработка физического метода, позволяющего в прямом эксперименте наблюдать действие внешних слабых физических факторов на ход метаболических химических реакций, характерных для живой системы и моделировать тем самым реакцию живого организма на аналогичные факторы окружающей среды. Результаты таких экспериментов совместно с основными теоретическими представлениями о физических процессах, протекающих на межмолекулярном уровне в живых системах, позволят построить модели межмолекулярных управляющих процессов в живых системах для их последующего использования в медицинской физиологии.

2. Краткий обзор состояния проблемы. Постановка задачи исследования.

То, что живые организмы любой сложности, от человека до одноклеточных, реагируют на изменение внешних факторов среды своего обитания, является объективным фактом, отмеченным во всех проведенных в настоящее время научных исследованиях, основанных как на прямых экспериментах, так и на обработке статистических, медицинских и экологических, данных. Как правило, однако, все упомянутые источники

данных об указанной проблеме являются экспериментально-описательными, а их обзоры также не содержат теоретических обобщений рассматриваемых результатов или же предлагают теории, не подтвержденные физическими моделями. Одновременно во всех обзорах этого направления подтверждается, что проблемы метаболизма в экологических и биофизических процессах, место в живых организмах, безусловно, являются наиболее важными, особенно в условиях нарастания техногенных химических и физических факторов, действующих на биологические системы в современных высокоразвитых странах. Постоянно на биотестах показывается, что скорости метаболических химических реакций непредсказуемо изменяются при изменении внешних физических факторов: температуры, электромагнитных полей, ионизирующего излучения, в том числе – ультрафиолетового диапазона, модулированных магнитных полей с переменной амплитудой, ультразвуковых воздействий и т.д. В попытках прямого изучения метаболических процессов и реакций используется весь арсенал современных физических методов: хроматографических, спектрофотометрических, масс-спектрометрических и т.д., но эти методы позволяют лишь зафиксировать факт реакции, иногда - определить ее продукты, но не дают данных о кинетике реакции и о возможном влиянии на нее внешних слабых и сверхслабых факторов. Тем самым вопрос о влиянии внешних физических факторов на живые системы по-прежнему остается в области важнейших, но не решенных фундаментальных проблем современной биофизики.

Впервые в мире диагностика неспецифической резистентности живой системы по скорости метаболической реакции тиол-дисульфидного превращения в живом организме была предложена и апробирована В.В.Соколовским [1,2]. В комплексе исследований, проводимых В.В. Соколовским с соавторами в течение 50 лет, показано, что окислительно-восстановительные (редокс) реакции и процессы в живом организме, играющие главенствующую роль во всех первичных (базисных) механизмах регуляции жизнедеятельности, обнаруживают свою связь как с вариациями солнечной активности, так и с другими космофизическими флюктуациями. Поскольку, как показано в современной физиологии, ключевую позицию в сложной иерархии редокс-процессов живого организма занимает тиол-дисульфидная система, эта система, выбранная В.В. Соколовским еще в 70-х годах в качестве тестовой для характеристики действия космофизических факторов, показала себя весьма представительным универсальным тестом неспецифической резистентности организма. Реакция тиол-дисульфидных превращений в организме является обратимой: при окислительном стрессе любого происхождения концентрация дисульфидных групп нарастает за счет снижения концентрации тиоловых групп. Далее, за счет антиоксидантной активности организма, имеет место обратный процесс: восстановление концентрации тиолов при снижении концентрации дисульфидов. В связи с этим тиол-дисульфидное отношение (ТДО), измеряемое для биологических

тканей и жидкостей, является высокочувствительной и высоко показательной характеристикой для регистрации отклика организма *in vivo* на любые стрессовые воздействия.

Критерием высокой резистентности (сопротивляемости) любого живого организма является высокая концентрация тиолов в его тканях и биологических жидкостях на фоне относительно невысокой концентрации дисульфидов, т. е. высокие значения тиол-дисульфидного отношения (ТДО). Патологические состояния, возникающие в процессе заболевания, травмы, радиоактивного облучения или любого стресса организма, всегда сопровождаются окислением тиолов свободными радикалами и эндотоксинами, что приводит к снижению ТДО организма. Уменьшение величины ТДО, таким образом, объективно свидетельствует о тяжести заболевания и понижении в связи с этим общей неспецифической резистентности организма. Это позволило использовать определение величины ТДО и его динамики как объективный тест состояния организма в процессе лечебных мероприятий в заболеваниях самых различных патологий [3].

Важной частью исследований В.В.Соколовского [4,5], а также независимых параллельных исследований С.Э.Шноля [6] явилось экспериментальное подтверждение снижения ТДО организма в результате действия сверхслабых внешних физических факторов, в качестве которых рассматривалось действие нерукотворных космофизических событий, связанных с изменением Солнечной активности («космическая погода»). Для изучения действия космофизических факторов на живой организм В.В.Соколовским был предложен и обоснован уникальный по наглядности и воспроизводимости тест *in vitro*, состоящий в измерении скорости окисления унитиола¹ нитритным ионом в водном растворе [4,5]. За количественную характеристику реакции было принято время полуокисления унитиола $t_{50\%}$. Было показано, что изменение величины $t_{50\%}$ в этой реакции полностью воспроизводит колебания тиол-дисульфидного отношения для живого организма при тех же внешних условиях. Это позволило в дальнейшем использовать унитиоловый тест при исследованиях корреляций биологических процессов с изменениями Солнечной активности и другими космофизическими феноменами. Для примера на рис.1 приведена корреляционная зависимость (обработка экспериментальных данных проведена С.Э.Шнолем) между среднегодовыми флюктуациями времени полуокисления унитиола $t_{50\%}$ (на рисунке этот параметр обозначен $\sigma\%$ и характеризует скорость окисления унитиола, т.е. величину, обратную $t_{50\%}$) и уровнем солнечной активности (по числам Вольфа) за период 30 лет (три цикла солнечной активности), свидетельствующая о, казалось бы, невероятном — о влиянии Солнца на кинетику тиоловой реакции, происходящей в земной лаборатории! Обращает на себя внимание очевидная

¹ Унитиол (димеркаптопропансульфат натрия, масса 210 а.е.м.) — химический низкомолекулярный антидот, имеющий в структуре две тиоловые группы —S—H.

зеркальная корреляция величин, приведенных на рисунке: высокая активность Солнца ведет к увеличению скорости окисления тиолов, и, как уже говорилось, тот же эффект имеет место и в живом организме. Это означает, что усиление Солнечной активности увеличивает стрессовые процессы любого живого организма, что и является биологической основой всех корреляционных процессов между космофизическими процессам («Солнечными бурями») и их «эхом» на Земле.

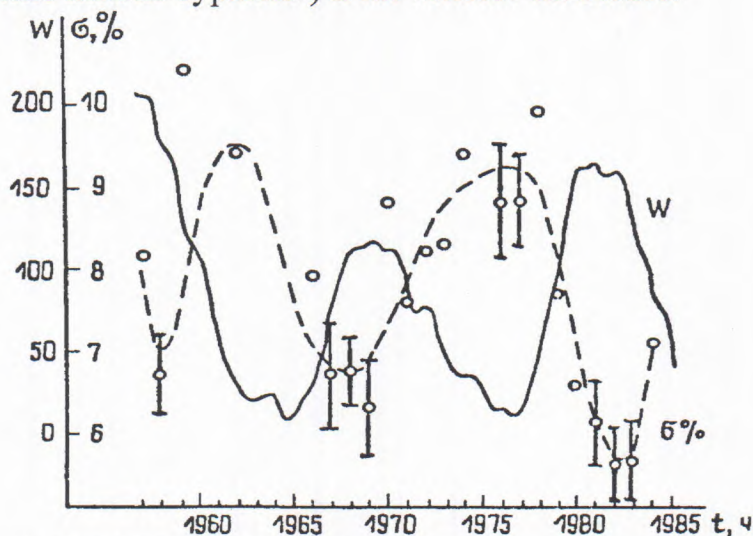


Рис. 1. Сопоставление изменений относительной амплитуды разброса результатов измерений унитиолового теста σ , % (пунктирная кривая) с ходом солнечной активности W (сплошная кривая) за период 1957–1985 г.г. (обработка данных В.В.Соколовского и собственных данных проведена С.Э.Шнолем).

В качестве измерительного метода в работах В.В.Соколовского и его группы использовалось амперометрическое детектирование продуктов реакции: метод крайне трудоемкий, связанный с ручным титрованием растворов и имеющий, к тому же, слишком большие погрешности в получении результатов. Тем не менее, в этих работах было показано, что скорость окисления унитиола зависит от внешних акустических и электромагнитных полей. Учитывая установленный факт схожести поведения этой реакции с реакцией тиол-дисульфидного превращения в живом организме можно считать, что изучение влияния внешних физических условий на реакцию окисления унитиола позволит изучать их действие и на метаболизм в исследуемой живой системе.

Однако до настоящего времени не было предложено метода, позволяющего в автоматизированном режиме отслеживать кинетические характеристики реакций при действии на них внешних физических факторов, т.е. проводить физические исследования без непосредственного участия оператора. Основное препятствие — участники реакций, как правило, нелетучие нестабильные соединения, для регистрации которых не существует надежных физических методов. Мы считаем, что таким методом может являться масс-спектрометрия с электрогазодинамическим распылением растворов в режиме ЭРИ АД. (ЭРИАД — экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении). Именно на использовании этого

метода в необходимой модификации основан предлагаемый новый метод изучения действия физических факторов на метаболические процессы в экологических и живых системах.

3. Экспериментальные работы, проведенные на 1 этапе работы в обосновании нового метода изучения влияния внешних факторов на метаболизм живого организма.

В соответствии с календарным планом работ по теме, экспериментальные работы, проводимые на первом этапе исследований (2014 год), включали в себя следующие подэтапы:

- 3.1. Подготовка масс-спектрометра ХЖ-МХ3303 к проведению экспериментов с унитиолом и мероприятия по его модернизации;
- 3.2. Разработка термостатированного реактора для проведения реакции окисления унитиола (или любого тиолсодержащего вещества) в условиях, позволяющих осуществление контролируемого внешнего физического воздействия;
- 3.3. Разработка масс-спектрометрической методики изучения кинетики окисления унитиола в режиме электрораспыления (ЭРИ АД).

- 3.1. Подготовка масс-спектрометра ХЖ-МХ3303 к проведению экспериментов с унитиолом и мероприятия по его модернизации.

Основным инструментом для проведения исследований является масс-спектрометр с двойной фокусировкой ХЖ-МХ3303 с источником ионов ЭРИАД. Разрешающая способность масс-спектрометра в режиме ЭРИАД не превышает нескольких тысяч, но является достаточной для исследований унитиола, молекулярная масса которого составляет 232,93 а.е.м.

Метод ЭРИАД позволяет вводить в высоковакуумную область масс-спектрометра ионы нелетучих веществ без их разрушения в результате электрораспыления растворов этих веществ в области перед газодинамическим интерфейсом прибора. Схема области распыления и интерфейса ЭРИАД, реализованного в масс-спектрометре ХЖ-МХ3303, представлена на рис.2.

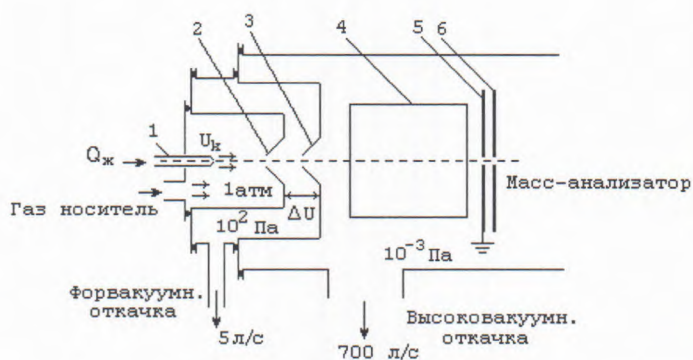


Рис. 2. Схема газодинамического интерфейса ЭРИАД: 1 — капилляр; 2 — сопло; 3 — скиммер; 4 — формирующая оптика; 5 — выходная диафрагма интерфейса; 6 — объектная цель масс-анализатора.

Метод ЭРИАД исторически являлся первым из спрей-методов, использующих электрораспыление для получения и последующего ввода ионов нелетучих веществ для масс-анализа [7,8]. По сумме положительных качеств (удобство реализации, возможность управления процессом распыления, достаточная чувствительность) ЭРИАД является наиболее удобным методом для проведения экспериментов с унитиоловым тестом, поскольку он крайне прост по конструкции интерфейса и не отягощен многочисленными усовершенствованиями, применяемыми в новейших масс-спектрометрах с электрораспылением для увеличения чувствительности и борьбы с микрокаплями недораспыленного раствора.

В методе ЭРИАД, как и в других методах с электрораспылением раствора, образец подаётся через капилляр со скоростью порядка 1 мкл/мин. При распылении раствора при атмосферном давлении в электрическом поле на конце капилляра образуется так называемый конус Тейлора. Этот конус образуется у самого выхода из капилляра из-за частичного разделения положительно и отрицательно заряженных частиц жидкости в соответствии с приложенным внешним полем. На ионы действует вытягивающее электрическое поле, сила воздействия которого противодействует силе поверхностного натяжения жидкости. В итоге, на выходе из капилляра жидкость вытягивается в конус с полууглом $49,3^\circ$. Заряженные капли эмитируются либо непосредственно с острия этого конуса, либо с вытянутой «шейки» конуса, и форма облака распыления зависит от величины приложенного электрического поля, дополнительных элементов конструкции узла капилляра и температуры потока газа, обтекающего конус распыления. При движении заряженной капли от капилляра к соплу происходят соударения с молекулами газа, обеспечивающие постоянный подвод энергии к капле, необходимый для эффективного испарения растворителя. Когда силы кулоновского расталкивания зарядов внутри капли превысят силы поверхностного натяжения, капля распадается на две и более капель меньшего размера. После нескольких таких распадов капли раствора анализируемого вещества, присутствующего в них в виде, как правило, протонированных молекулярных ионов (положительная мода) или

молекулярных ионов, захвативших электрон (отрицательная мода), становится очень маленькой (радиус порядка 10 нм).

Напряжение между капилляром и соплом составляет 3-5 кВ, и на пути от капилляра происходит полный распад начальных капель и выход из них ионов исследуемых веществ. Вместе с потоком газа-носителя ионы попадают в пространство между соплом и скиммером, между которыми приложено управляющее напряжение, изменяющееся в диапазоне от 0 до 1000 В.

Для приготовления анализируемого образца (раствора) в методе ЭРИАД используются смешанные водно-органические растворители. Обычно концентрации исследуемых веществ в растворе не превышают 10^{-6} М/л, а проводимость раствора находится в пределах 10^{-4} – 10^{-6} Ом/см. Скорость подачи раствора в интерфейс масс-спектрометра не превышает 1 мкл/с. Эти параметры вполне удобны для работы с интерфейсом ЭРИАД, и его использование позволило установить, что унитиол и продукты реакции его окисления достаточно хорошо распыляются и их масс-спектр регистрируется на коллекторе масс-спектрометра.

Однако в процессе записи масс-спектров было установлено, что колебания максимума интенсивности молекулярного пика унитиола в масс-спектре существенно превышают величину 1%, необходимую для реализации масс-спектрометрического метода измерения кинетических характеристик химических редокс-реакций.

Для изучения причин колебания интенсивности амплитуды ионного тока при электрораспылении раствора были предприняты исследования процесса распыления, в результате которых были выявлены причины наблюдаемой нестабильности. Были исследованы осцилляции, возникающие при электрораспылении жидкости с различной величиной электропроводности. Проводились измерения спектров осцилляций с одновременной визуализацией формы мениска в интервале напряжений типичном для использования в масс-спектрометрии. Было показано, что в спектре имеется ведущая частота, на которую приходится ориентировочно 80% мощности осцилляций и набор обертонов. Величина основной частоты меняется в диапазоне 200-800 Гц и растет с ростом напряжения распыления вплоть до срыва, непосредственно после которого распыление переходит в наиболее стабильный режим.

С научных позиций, электрораспыление является частным случаем полевой нестабильности поверхности раздела жидкость-газ или жидкость-жидкость, которые сами по себе являются объектом длительного теоретического [9] и экспериментального [10-11] изучения. Но поскольку на сегодня нет общей теории, которая охватывала бы все практически значимые случаи этих процессов, так важны в научном и практическом планах их экспериментальные исследования.

Основные причины, по которым электрораспыление жидкости является очень трудным для изучения – это сильная зависимость процесса от ряда факторов, которые, в свою очередь, можно разделить на три группы. Это:

внешние параметры, при которых проходит процесс, параметры самого распыляемого образца и внутренние свойства распыляемой системы, определяемые наличием нелинейных связей между формой мениска, объемным зарядом в межэлектродном промежутке, возможным образованием заряженных пленок на электродах и т.п. Именно параметры, третьей группы определяют непосредственно состояние системы, а параметры первых двух групп оказывают лишь косвенное влияние из-за существенно нелинейных процессов.

Электрораспыление происходит тогда, когда мениск жидкости, вытекающей из распылительного капилляра, вытягивается внешним электрическим полем и преобразуется в конус с острой вершинкой, известный как конус Тейлора [12]. Вершина конуса, в свою очередь, выступает как концентратор силовых линий поля, под действием которого с нее происходит эмиссия заряженных микрокапель. По сути, конус Тейлора выступает как своеобразная электрохимическая ячейка, обеспечивающая поставку ионов одного знака в газовую фазу и нейтрализацию ионов противоположного знака на поверхности подводящего ток электрода.

Осцилляции тока при электроспрее исследовались рядом научных групп причем общепринятой является точка зрения, что они являются следствием нестабильностей конуса, и имеется развитая теория, подтверждающая эту точку зрения. Однако эта теория не учитывает ни роль объемного заряда, создаваемого ионами, каплями и наночастицами, движущимися между капилляром и противоэлектродом, ни роль поверхностного заряда, покрывающего поверхности противоэлектрода и капилляра. Проведенные оценки показали, что основной вклад в возникновение осцилляций вносит не объемный заряд в пространстве между капилляром и противоэлектродом, а изменению потенциала противоэлектрода из-за возникающей на нем плохо проводящей пленки. Этот вывод хорошо согласуется с наблюдаемой в эксперименте сильной зависимостью протекающих процессов от изменения потока распыления и от изменения электропроводности жидкости.

На рис.3 представлена схема экспериментальной установки, на которой проводились исследования колебаний тока заряженных частиц (микрокапель и ионов) при электрораспылении. Эксперименты проводилось при атмосферном давлении. Диаметр распылительного капилляра составлял 180 мкм, расстояние до противоэлектрода, имевшего размер 100x100 мм варьировалось в диапазоне от 7 до 10 мм, поток жидкости (водно-метанольный раствор состава 2:8 с добавлением серной кислоты для увеличения проводимости) изменялся в диапазоне 7–10 мкл/мин. Капилляр располагался напротив центральной части противоэлектрода, горизонтально по отношению к Земле. Вся распылительная система помещалась внутри металлического экрана, уменьшавшего сетевые наводки примерно на 40 db.

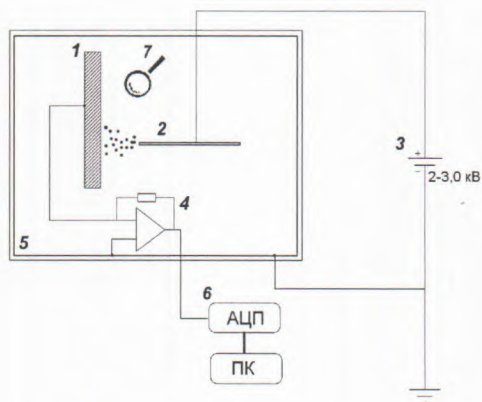


Рис.3. Функциональная схема экспериментальной установки: 1- металлический противоэлектрод; 2- распылительный капилляр; 3- управляемый блок высокого напряжения; 4- входной усилитель сигнала электрического тока; 5- двойной экранирующий корпус, находящийся под потенциалом Земли; 6- аналого-цифровой преобразователь с выходом к персональному компьютеру, 7 - цифровой микроскоп для записи формы конуса Тейлора.

Исследования проводились при изменении основных внешних параметров: расстояния до вытягивающего электрода, скорости подачи растворителя. Регистрация частотных характеристик тока производилась на ПК с помощью ADC 780M L-Card, причем данные отбирались как в виде первичных осцилляций, так и в виде спектра, получаемого в результате оконного преобразования Фурье. Одновременно проводилось запись формы конуса Тейлора с помощью цифрового микроскопа.

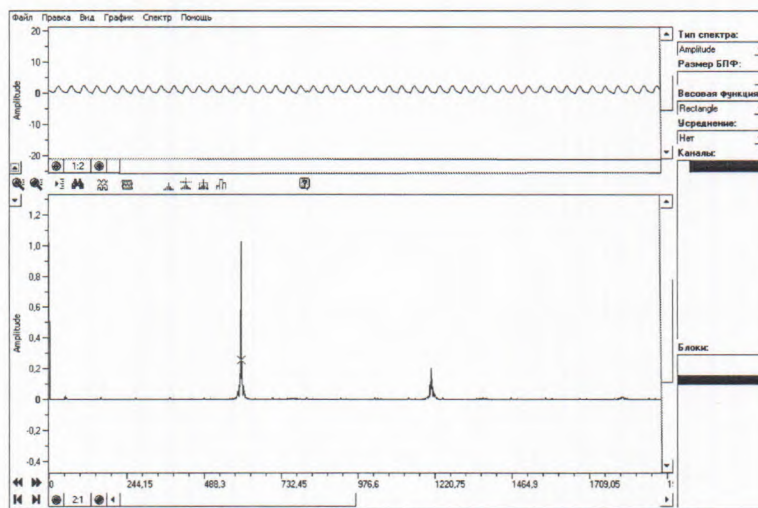


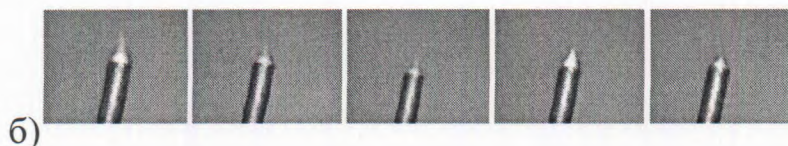
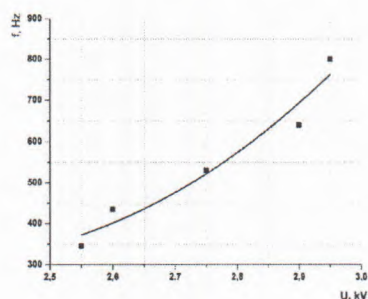
Рис.4. Окно программы для интерпретации результатов, получаемых с АЦП экспериментальной схемы: по оси X отложена частота осцилляций, по оси Y – интенсивность осцилляций в относительных единицах. В верхнем окне представлена форма наблюдаемых осцилляций, величина распыляемого потока 2 мкл/мин, $U=2,6$ кВ, $I=30$ нА .

Колебания тока распыления наблюдались в диапазоне напряжений от 2,45 до 3,0 кВ, увеличиваясь от 200 Гц при 2,45 кВ до 900 Гц при 3,0 кВ. Ширина линий осцилляций на полувысоте составляла не более нескольких герц; сама линия имела форму, близкую к Лоренцову контуру, что определялось спектральными свойствами программы PowerGraph, обеспечивающей быстрое Фурье-преобразование. По мере роста частоты колебаний длина конуса Тейлора постепенно уменьшалась, ток распыления оставался почти неизменным. При напряжении порядка 3,05 кВ колебания резко исчезали; это соответствовало увеличению тока распыления примерно в 2 раза и стабилизации конуса Тейлора практически на срезе капилляра с длиной порядка 100 мкм (рис.5). В этом состоянии распыление могло продолжаться в течение многих минут. Все описанные процессы наблюдаются в относительно узком диапазоне распыляемых потоков: при уменьшении потока ниже 0.5 мкл/мин наблюдение осцилляций становится затруднительным, а при увеличении выше 15 мкл/мин распыление становится макроскопически неустойчивым и нестационарным.

Очень важным представляется наличие задержки в интервале 25 – 40 секунд, имеющей место между моментом начала распыления, регистрируемого по возникающему току, и установлением спектра колебаний. В промежуточные времена спектр был существенно нестабильным, в нем более или менее хаотично появлялись и исчезали пики, хотя внешний вид конуса Тейлора остается практически неизменным. После завершения переходных процессов спектр устанавливался и оставался неизменным вплоть до смены режима, т.е. изменения вытягивающего напряжения или перемещения среза капилляра относительно противоэлектрода.

При добавлении в распыляемый раствор 0,1% серной кислоты ее проводимость резко повышалась до ~1500 мкСм\см. Общий ток распыления увеличивался в ~2 раза для любой точки $I(U)$. При этом колебания и их высокочастотные гармоники исчезли: время переходного процесса оказывалось менее чем 1с, т.е. при изменении напряжения режим постоянного тока устанавливался практически сразу.

а)



б)

Рис.5. Экспериментальные результаты по исследованию частоты тока электрораспыления: а) кривая, демонстрирующая увеличение частоты тока электрораспыления по мере возрастания ускоряющего напряжения; б) увеличенное изображение формы конуса Тейлора для каждой точки измерений от 320–800 Гц (слева–направо)

Таким образом, экспериментально найденные условия генерации осцилляций при электрораспылении жидкости и их спектр, имеющий место при изменении ее проводимости в широком интервале. Предложенная модель, связывающая эти осцилляции с объемным зарядом на противоэлектроде, зависящем от проводимости жидкости, позволит найти режим повышения стабильности электрораспыления, используемого для стабилизации сигнала унитиола в процессе регистрации кривых его окисления.

3.2 Разработка термостатированного реактора для проведения реакции окисления унитиола (или любого тиолсодержащего вещества) в условиях, позволяющих осуществление контролируемого внешнего физического воздействия.

Для экспериментального исследования на масс-спектрометре модельной реакции окисления унитиола нитритом натрия был разработан и сконструирован специальный прибор, включающий в себя термостатированный реактор и систему подачи продуктов реакции в режиме реального времени в интерфейс масс-спектрометра. При разработке учитывались следующие требования:

1. Поддержание постоянной температуры реактора с точностью $0,5^{\circ}\text{C}$;
2. Непрерывность и стабильность скорости подачи продуктов реакции;
3. Корпус прибора должен был изготовлен из такого материала, который позволял бы различными задаваемыми физическими факторами влиять на скорость протекания реакции. К таким физическим факторам относятся: магнитное и электромагнитное поле, электромагнитное излучение (УФ, видимый диапазон, ИК), звук и ультразвук. Схема разработанного термостата представлена на рис. 6.

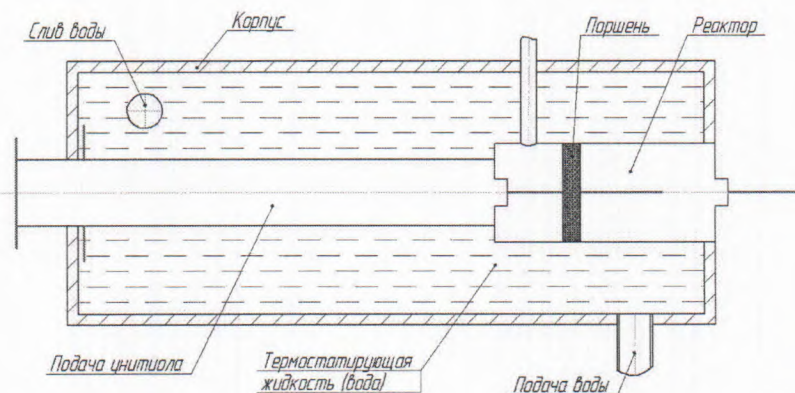


Рис. 6. Схема термостата с реактором.

Прибор состоит из корпуса, изготовленного из кварцевого стекла и имеющего вход и выход для термостатирующей жидкости, в качестве которой была использована вода, шприца для ввода исследуемого вещества в область реактора и собственно реактора с поршнем, также изготовленных из кварцевого стекла. Поршень может перемещаться по игле шприца и работает за счет давления, создаваемого водой, поступающей из специального поршневого насоса. Данное конструктивное решение позволило убрать на удаленное расстояние поршневой насос, электрическая система питания которого может оказывать влияние на ход реакции за счет электромагнитного поля. Термостатирование в приборе осуществляется за счет циркуляции воды с постоянной температурой.

Преимущество такой схемы заключается в исключении действия на протекание реакции любых физических факторов, кроме температуры термостатирующей жидкости, а также какого-либо контакта реагирующих веществ с воздухом, что крайне нежелательно. Однако в процессе подсоединения прибора к масс-спектрометру выяснился ряд недостатков конструкции термостата: необходимость полностью разбирать его для очистки от продуктов реакции, неконтролируемость процесса перемешивания реагентов, влияющее на ход и результат реакции. В результате проведенных испытаний было принято решение о разработке нового реактора.

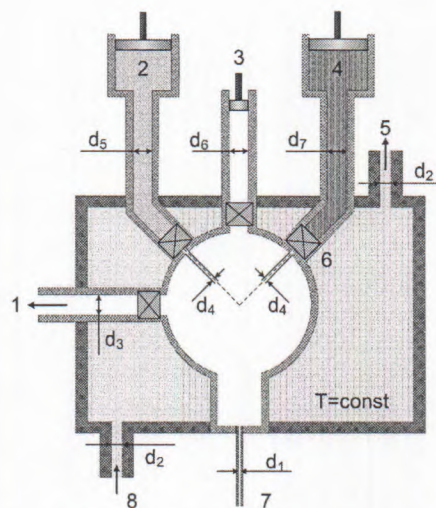


Рис.7. Схема модернизированного прибора с реактором для моделирования метаболизма. 1- патрубок и клапан системы откачки пространства реактора; 2,4 – патрубки ввода модельного вещества и окислителя с клапанами; 6 – реактор; 3,7 – поршень и капилляр для ввода смеси в масс-спектрометр; 5,8 – вход и выход термостатирующей жидкости.

На рис.7 представлена схема исследовательского реактора из кварцевого стекла, предназначенного для реализации перечисленных требований к проведению моделирования метаболизма. В новой схеме сохранены все положительные свойства первоначальной конструкции, но обеспечены условия полного перемешивания реагентов без использования механических мешалок, за счет пересечения струй растворов вводимых

реагентов. Предположительный механизм работы реактора представлен на рис 8.

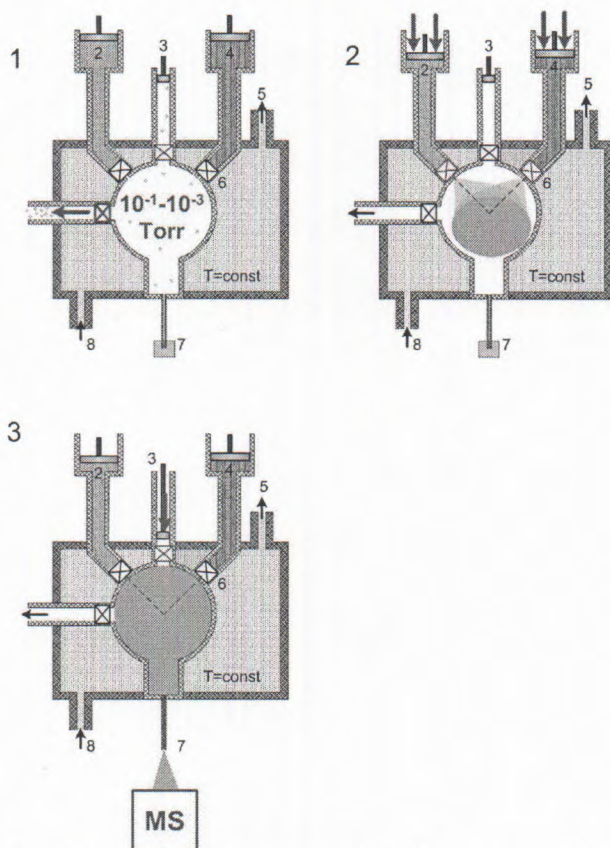


Рис.8. 1 – реактор откачен; 2 – реактор заполняется смесью реагентов; 3 – смесь реагентов распыляется перед соплом входа в интерфейс масс-спектрометра.

Реактор должен обеспечивать высокий уровень перемешивания реагентов без использования механических средств и отсутствие контакта реагентов с кислородом воздуха, поскольку все изучаемые биоактивные вещества являются быстро окисляемыми. Изготовление и испытания нового реактора в соответствии с календарным планом будут проводиться на втором этапе работы в 2015 году.

3.3. Разработка масс-спектрометрической методики изучения кинетики окисления унитиола в режиме электрораспыления (ЭРИ АД).

Электрораспыление как в методе ЭРИАД, так и в методе «электроспрей» происходит при взаимодействии сильного электростатического поля с поверхностью жидкости на конце капиллярной трубки и относится к мягким методам ионизации. Ключевой методической задачей был подбор условий электрораспыления, оптимальных для получения информации, поскольку нелинейные процессы, протекающие в области мениска, способны привести к существенному искажению масс-спектра [4]. Литературный поиск показал, что в литературе отсутствуют сведения о применении метода электрораспылительной ионизации для

анализа или изучения унитиола; имеются лишь сведения [5] о распылении комплексов ртути с унитиолом. В этой работе масс-спектрометрические измерения были эффективными при режимах регистрации и положительных, и отрицательных ионов, хотя использование режима регистрации отрицательных ионов оказалось более информативным.

Поскольку целью данной работы является разработка метода изучения окислительно-восстановительных превращений тиоловых соединений под действием внешних физических факторов, используя масс-спектрометрию с электрораспылением, основной упор на первом этапе был направлен на разработку надежной и воспроизводимой методики фиксирования хода реакции окисления выбранного тиолового соединения по скорости убывания-возрастания ее продуктов.

Задачи, решаемые для достижения поставленной цели, включают в себя:

- 1) выбор наиболее пригодной модели тиолдисульфидной системы,
- 2) подбор условий электрораспыления, оптимальных для получения информации,
- 3) получение стабильно воспроизводимых молекулярных пиков исходного соединения,
- 4) выбор условий для проведения окислительно-восстановительной реакции,
- 5) получение молекулярных пиков продуктов реакции,
- 6) построение кинетических кривых для исходного соединения и продуктов реакции,
- 7) определение времени полуокисления вещества.

Первоначально работа проводилась в ИАП РАН на масс-спектрометре ХЖ-МХ3303, где было показано, что унитиол в режиме ЭРИАД дает достаточно интенсивный молекулярный пик. Однако в связи с недостаточной стабильностью амплитуды пика, рассмотренной в разделе 3.1, в дальнейшем работы проводились на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения LCMS-IT-TOF (Shimadzu) в ЦЭБ РАН.

Хромато-масс-спектрометр высокого разрешения LCMS-IT-TOF представляет собой комбинацию жидкостного хроматографа, ионной ловушки и времяпролетного масс-анализатора. Ионы растворенного вещества, вводимого в масс-анализатор, образуются в процессе электрогазодинамического распыления раствора. Масс-спектрометр LCMS-IT-TOF позволяет проводить измерения с разрешением до 10000 и точностью определения массового числа $\sim 5 \cdot 10^{-6}$.

В качестве образца для исследования был взят фармацевтический препарат в ампулах, содержащий 5% раствор унитиола, рН=3,5-4,5. Для проведения окисления использовался 3% раствор перекиси водорода.

Первым этапом работы было подтверждение возможности электрораспыления унитиола. Измерения проводились с использованием водного раствора унитиола с концентрацией 50 мкг/мл. Раствор готовился

путем разведения фармацевтического препарата унитиола в 1000 раз бидистиллированной водой. На ввод в масс-спектрометр подавалось 2 мкл раствора. Регистрировались масс-спектры как в положительной, так и в отрицательной моде.

В результате проведения анализа в положительной моде был зарегистрирован масс-спектр унитиола с характерными значениями молекулярных пиков m/z – 232,93 и 234,93, соответствующих изотопному распределению серы для соединения $[C_3H_7O_3S_3Na_2]^+$, и масс-спектр в отрицательной моде с характерными значениями m/z – 186,95 и 188,95 соединения $[C_3H_7O_3S_3]^-$. Полученные типичные масс-спектры представлены на рис. 9.

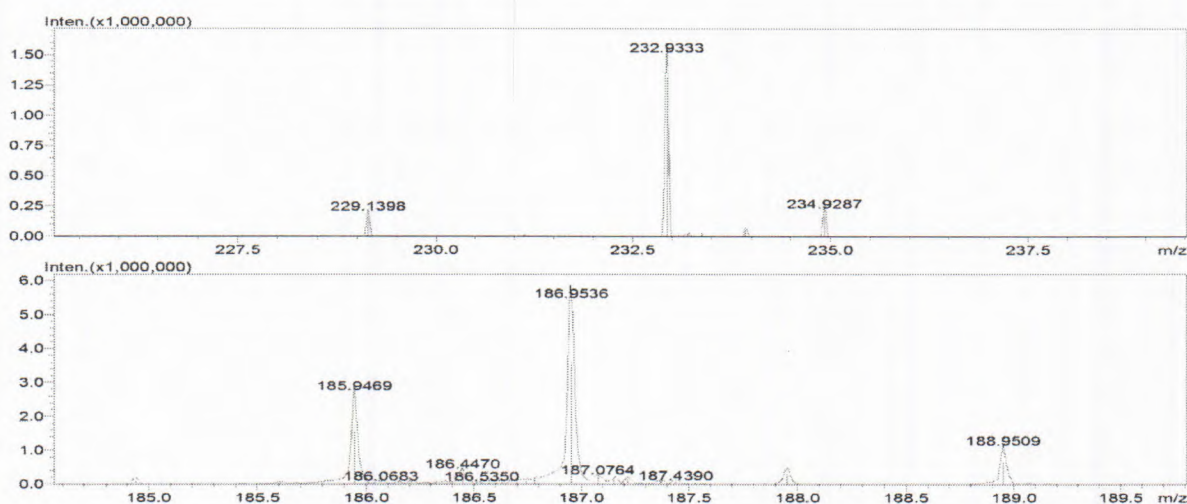


Рис.9. Масс-спектры высокого разрешения для раствора унитиола, полученные при электрораспылительной ионизации в режимах регистрации положительных (верхний спектр) и отрицательных (нижний спектр) ионов.

Следующим этапом была проверка возможности изучения кинетики окисления унитиола. Окисление унитиола может протекать с образованием внутримолекулярной дисульфидной связи, а также с образованием межмолекулярных дисульфидных связей, в результате чего образуются димеры, тримеры, либо олигомеры.

Первоначально предполагалось, что в ходе реакции будет протекать, в основном внутримолекулярное окисление с образованием соединения $C_3S_3O_3H_5Na$. Для проведения экспериментов была приготовлена реакционная смесь объемом 10 мл с концентрацией унитиола 2,4 мг/мл и концентрацией окислителя - перекиси водорода 6,3 мг/мл. Эксперимент проводился следующим образом. 1 мл смеси переносили в виалу и помещали в систему пробозабора. Каждые 20 минут с помощью термостатированного автосамплера отбиралось 2 мкл реакционной смеси и проводилось измерения ионного тока для выбранного диапазона m/z . Начальные значения ионных токов для выбранных значений m/z были получены из раствора, полученного аналогичным способом, но без добавления перекиси водорода.

В ходе измерений не удалось зафиксировать пиков с m/z , отвечающих

продуктам внутримолекулярного окисления. На основании полученных масс-спектров (рис. 10) можно сделать вывод, что реакция окисления протекает, в основном, по межмолекулярному механизму с образованием димеров. Определение унитиола проводилось по пику $m/z=232,93$ в положительной моде, определение продуктов проводилось по пикам $m/z=184,94$ и $392,86$ в отрицательной моде, соответствующим двухзарядному иону димера $[C_6H_{10}O_6S_6]^{-2}$ и однозарядному иону димера $[C_6H_{10}O_6S_6Na]^{-}$.

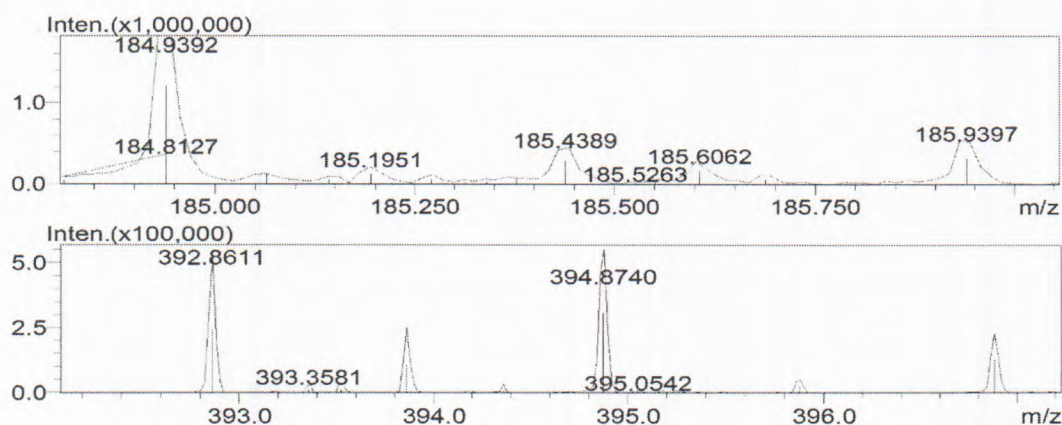


Рис 10. Масс-спектры высокого разрешения для продуктов реакции окисления унитиола, полученные при электрорапылительной ионизации в режиме регистрации отрицательных ионов. Верхний масс-спектр соответствует двухзарядному молекулярному иону димера, нижний – однозарядному молекулярному иону димера.

По полученным значениям была построена зависимость интенсивности аналитического сигнала для $m/z=232,93$; $m/z=184,94$; $m/z=392,86$ от времени (рис.11). Найденное по кривой для $m/z=232,93$ время полуокисления унитиола составило $t_{0,5}(Un)=(45\pm 2)$ мин.

Таким образом, в результате проделанной работы было показано, что унитиол, выбранный в качестве модельного вещества, хорошо ионизируется при использовании электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов, давая в масс-спектре стабильно воспроизводимые молекулярные пики с $m/z=232,93$ ($[C_3H_7O_3S_3Na_2]^+$) и $m/z=186,95$ ($[C_3H_7O_3S_3]^-$), соответственно. Для проведения реакции окисления были использованы следующие концентрации «с» реагентов: (Унитиол), $c=2,4$ мг/мл, (H_2O_2) $c=6,3$ мг/мл; $pH \approx 6,5$. Продукты реакции при режиме регистрации отрицательных ионов дают стабильно воспроизводимые пики, соответствующие молекулярным двухзарядному ($m/z=184,94$, $[C_6H_{10}O_6S_6]^{-2}$) и однозарядному ($m/z=392,86$, $[C_6H_{10}O_6S_6Na]^-$) ионам димера.

Определение динамики изменения концентрации унитиола проводилось по молекулярному пику $[C_3H_7O_3S_3Na_2]^+$ $m/z=232,93$, определение динамики изменения концентрации продуктов реакции проводилось по молекулярным пикам $m/z=184,94$ ($[C_6H_{10}O_6S_6]^{-2}$) и $m/z=392,86$ ($[C_6H_{10}O_6S_6Na]^-$). По полученным данным были построены кинетические кривые реакции окисления. Время полуокисления унитиола $t_{0,5}(Un)=(45\pm 2)$ мин. Стабильно воспроизводилось в серии последовательных

экспериментов.

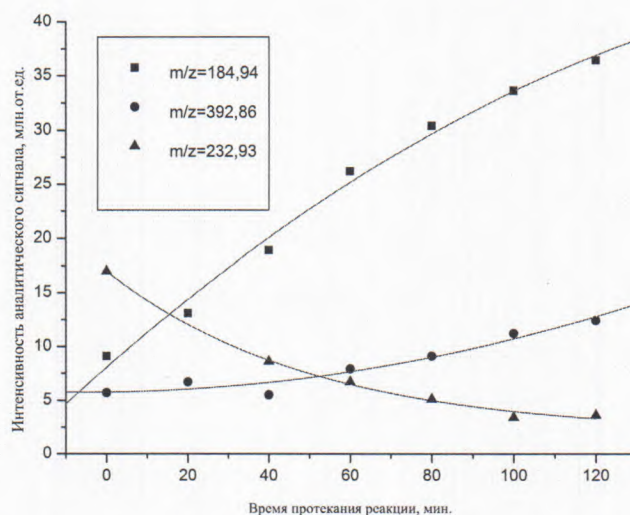


Рис. 11. Зависимости интенсивностей аналитического сигнала для исходного вещества и продуктов реакции.

Выводы.

Таким образом, задачи первого этапа выполнены полностью:

1. Найдены условия увеличения стабильности ионного тока в режиме электрораспыления, необходимые для обеспечения точности нового метода моделирования метаболизма живого организма;
2. Разработана новая схема термостатированного реактора, объединяющая в себе точность подготовки реакционной смеси с возможностью воздействовать на смесь физическими факторами магнитной, электромагнитной, световой и звуковой природы. Реализация реактора будет проведена в 2015 году на втором этапе работы.
3. Найдены условия, позволяющие получать информативные спектры реагентов унитиолового теста в режиме электрораспыления.
4. Результаты исследований представлены в двух публикациях, подготовленных в 2014 году:

1).Статья: Фомина Н.С., Масюкевич С.В., Галль Л.Н.Ю Галль Н.Р. Осцилляции тока электрораспыления с одновременной визуализацией формы конуса Тейлора. Направлена в журнал «Масс-спектрометрия»

2).Доклад на конференции «Неделя Науки СПбПУ», Санкт-Петербург, 1-6 декабря 2014.

Т.Э. Березкина, Д.О. Кулешов, Е.Н. Чернова, Я.В. Русских, Л.Н. Галль, Н.Р. Галль. "Измерение скорости окисления унитиола с использованием масс-спектрометрии с электрораспылением". Устный доклад. Тезисы конференции, с.76.

План работ 2 этапа: 2015 год.

1. Изготовление макета микрореактора с термостабилизацией и экспериментального образца смесителя потока (ИАП РАН);
2. Проведение измерений экологических проб (НИЦЭБ РАН);
3. Проведение расчетов механизмов испарения заряженных капель и оптимизация работы интерфейса (СПБПУ).
4. Подготовка 2 научных статей для публикации в российских или международных научных журналах, заявка на полезную модель.
5. Будет защищена 1 магистерская диссертация.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколовский В.В. Тиолдисульфидная система и биоритмы // Сборник избранных трудов IV Международного Конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – 2006. – с. 121-131.
2. Соколовский В.В. Тиолдисульфидная система в реакции организма на факторы окружающей среды. – СПб. Наука. – 2008.
3. В.В. Соколовский О биохимическом механизме реакций живых организмов на изменения солнечной активности. // Проблемы космической биологии, 1982, т. 43, с. 180-193.
4. В.В. Гедерим, В.В. Соколовский, Э.С. Горшков, С.Н. Шаповалов, О.А. Трошичев Периодические изменения некоторых гематологических показателей, характеризующих процесс адаптации в организме человека и вариации гравитационного поля. // Биофизика, 2001, т. 46, вып. 5, с. 833-834.
5. V.V. Ivanov, V.V. Sokolovsky, E.S. Gorshkov, S.N. Shapovalov, and O.A. Troshichev Periodical Changes in the Human Urinary Thiol Content as Related with Cosmophysical Factors. // Biophysics, 2004, Vol. 49, Suppl. 1, pp. S115-S118.
6. Н.В. Удальцова, В.А. Коломбет, С.Э. Шноль Возможная космофизическая обусловленность макроскопических флуктуаций в процессах разной природы. Пуццино, НЦБИ АН СССР, 1987, 96 с.
7. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Николаев В.М., Павленко В.А., Шкуров В.А. Экстракция из растворов при атмосферном давлении- новый метод масс-спектрометрического анализа // ДАН СССР. 1984. Т. 277, №2. С. 379-383
8. Галль Л.Н. Физические основы масс-спектрометрии и ее применение в аналитике и биофизике. – СПб.: Изд-во Политехн. Унив-та. – 2010., 112с.
9. Григорьев А.И., Ширяева С.О. Классификация режимов электродиспергирования жидкостей // ЖТФ. 2012. Т.82., № 10. с. 717.

10. Фомина Н.С., Кренинина А.В., Масюкевич С.В., Булович С.В., Лапушкин М.Н., Галль Л.Н., Галль Н.Р. Исследование транспорта ионов и заряженных капель из области атмосферного давления в газодинамический интерфейс // Масс-спектрометрия. 2012. Т.9, №4. С. 261-268.
11. David B. Bober and Chuan-Hua Chen Pulsating electrohydrodynamic cone-jets: from choked jet to oscillating cone // *J. Fluid Mech.* 2011. Vol. 689. P. 552-563.
12. Taylor G. Disintegration of water drops in electric field // *Proc. Roy. Soc.* 1964. Vol. 280, №1382. P 383-397.