



УДК 543.226+547.93

© 2010

О. В. Севериновская, С. А. Алексеев, С. В. Гурская,  
О. Ю. Лавриненко, член-корреспондент НАН Украины В. Н. Зайцев

### Масс-спектрометрическое определение компонентов желчи методом DIOS с использованием модифицированного пористого кремния

*Отримано мас-спектри DIOS для білірубину, холестерину та таурохолату натрію з поверхні мезопоруватого кремнію, модифікованого різними органічними групами. Показано, що використання поруватого кремнію як підкладки для мас-спектрометричних вимірювань дає змогу отримати одиничний пік молекулярного іона досліджуваної речовини для біологічно активних сполук, зокрема для тих, що схильні до асоціації.*

Одной из перспективных областей применения пористого кремния (ПК) в аналитической практике является его использование в качестве ионизационной подложки при масс-спектрометрической идентификации биомолекул методом DIOS (Desorption/ionization on silicon). Развитие метода может привести к существенному прорыву в биохимическом анализе, так как DIOS позволяет с высокой чувствительностью (до  $10^{-16}$  моль) идентифицировать широкий круг биомолекул без стадии их разделения. Модифицирование ПК органическими фрагментами изменяет афинность его поверхности, что повышает надежность идентификации целевых аналитов методом DIOS за счет повышения селективности их концентрирования на поверхности ПК.

Авторами настоящего сообщения изучено влияние природы поверхности ПК на DIOS-спектры компонентов желчи (таурохолата натрия, холестерина и билирубина), качественное и количественное определение которых в составе биологических жидкостей может быть использовано для диагностики патологических состояний организма. В качестве ионизационной подложки для DIOS исследованы образцы ПК с ковалентно-закрепленным на его поверхности октадецемом (ПК-1) и октадецилдиметиламмоний хлоридом (ПК-2).

**Экспериментальная часть.** В ходе исследований брали таурохолат натрия с молекулярной массой 537,7, билирубин — 584,7, холестерин — 385,9 производства “Fluka” (Швейцария), а также использовали спиртовые растворы таурохолата натрия с концентрацией 20 ммоль/л, холестерина — 10 ммоль/л, билирубина — 10 мкмоль/л. Раствор билирубина сохраняли в темноте для предотвращения фотопревращений.

Адсорбцию проводили при комнатной температуре, помещая образцы ПК в раствор исследуемых веществ; через 30 мин их извлекали, промывали этиловым спиртом и высушивали на воздухе.

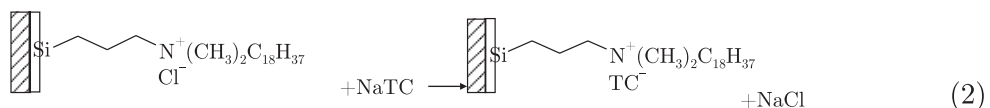
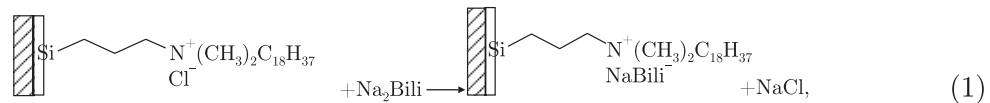
Масс-спектрометрические измерения выполняли с помощью прибора Autoflex II фирмы “Bruker Daltonics” (Германия), оборудованного азотным лазером ( $\lambda = 337$  нм) с программным обеспечением Flexcontrol 2.2 (“Bruker Daltonics”). Для этого применялись линейный и рефлектронный режимы разделения по массам для положительных и отрицательных ионов. Спектры анализировали с помощью программного обеспечения Flexanalysis (“Bruker Daltonics”). В качестве ионизационных подложек для измерений методом DIOS были использованы “свободные слои” ПК с различной природой поверхностного слоя, полученные методом анодного травления полированных с обеих сторон пластин кремния [1]. Для получения образцов ПК-ОХ с гидроксильной поверхностью ПК окисляли путем обработки смесью  $H_2O_2$  (35%) и  $H_2SO_4$  (3 : 7 по объему) в течение 15 мин при 90 °С, затем тщательно промывали водой. Поверхность образцов ПК-ОХ не содержит силановых групп, а толщина оксидного слоя, которую определяли методами гравиметрии и ИК-интерферометрии, составляет примерно 0,7 нм (для удельной площади поверхности 200 м<sup>2</sup>/г) [1].

Поверхность ПК модифицировали октадециленом по реакции гидросилилирования [1], а поверхность образцов ПК-ОХ — N-диметилоктадецил(триметоксисил)пропиламмоний хлоридом  $[(CH_3)_2(C_{18}H_{37})N^+(CH_2)_3Si(OCH_3)_3]Cl^-$  по реакции силанизирования [2].

**Результаты и их обсуждение.** Как следует из химических формул табл. 1, компоненты желчи: таурохолат натрия, холестерин и билирубин существенно различаются своей полярностью и биологической функцией. С учетом строения исследуемых биомолекул адсорбцию холестерина проводили на ПК-1, а билирубина и таурохолевой кислоты — на ПК-2.

Масс-спектрометрический анализ адсорбированного на ПК-2 билирубина показывает, что в его DIOS-спектре наблюдаются интенсивный пик с  $m/z = 607,7$  Да, который отвечает однозамещенной натриевой соли  $[M + Na]^-$ , и малоинтенсивный фрагментный пик с  $m/z = 580,5$  Да, отвечающий  $[M + Na - C_2H_3]^-$ . Фрагментация в области низких и высоких масс не наблюдается. Таурохолат натрия является природным ПАВ, которое в интервале концентраций 8–10 ммоль/л начинает формировать первичные мицеллы (димеры) за счет гидрофобного взаимодействия между стероидными частями молекул [3]. При исследуемой в данной работе концентрации таурохолата натрия в растворе преобладают его димеры. Тем не менее в масс-спектре таурохолата натрия, адсорбированного на ПК-2, наблюдается только молекулярный пик с  $m/z = 514,0$  Да, отвечающий молекулярному иону мономера, а пики фрагментных ионов и ассоциатов отсутствуют (рис. 1).

Наличие в масс-спектрах только упомянутых выше пиков адсорбированных билирубина и таурохолата на ПК-2 позволяет предположить, что взаимодействие этих компонентов желчи с адсорбционной подложкой имеет химическую природу и проходит по схеме ионного обмена:



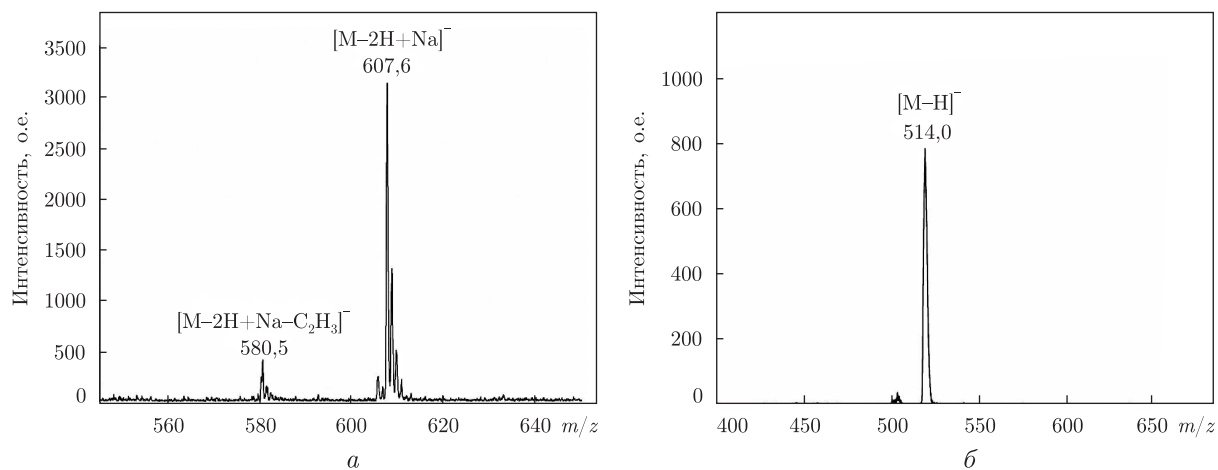


Рис. 1. DIOS масс-спектры билирубина (а) и таурохолата натрия (б), полученные с поверхности ПК, модифицированного  $-(CH_2)_3N^+(CH_3)_2C_{18}H_{37}Cl^-$ -группами, в режиме детектирования отрицательных ионов

Таблица 1. Ионизационные подложки, использованные для определения компонентов желчи

Подложка	Исследуемое вещество
	<p>Таурохолат натрия, <math>pK_a=2,68</math></p>
	<p>Билирубин, <math>pK_{a1}=5,4</math>, <math>pK_{a2}=6,0</math></p>
	<p>Холестерин</p>

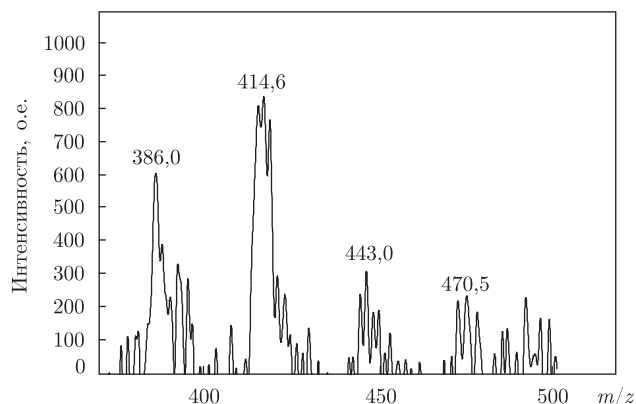


Рис. 2. Фрагмент масс-спектра холестерина ( $C = 10$  ммоль/л) в режиме детектирования отрицательных ионов

Такая схема обеспечивает селективность адсорбции ионогенных компонентов желчи на поверхности ПК-2, а одноточечность связывания приводит к тому, что десорбция и ионизация аналитов проходит только по месту химической связи, обеспечивая простой характер их масс-спектров DIOS и соответственно надежность идентификации.

Высокая гидрофобность холестерина препятствует его концентрированию на полярной поверхности ПК-ОХ, поэтому была исследована его адсорбция на поверхности ПК-1 (рис. 2). Значения массовых чисел и интерпретация пиков приведены в табл. 2.

Из данных рис. 2 и табл. 2 видно, что в спектре наряду с уширенным пиком молекулярного иона наблюдается значительная фрагментация биомолекулы как в области низких, так и в области высоких масс. Это свидетельствует о прочной, вероятно, многоточечной адсорбции холестерина на поверхности ПК-1. В этом случае энергия лазерного излучения распределяется по алкановым С–Н связям, что приводит к ионизации за счет присоединения или отрыва углеводородных фрагментов как в самой биомолекуле, так и за счет разрушения гидрофобного слоя ПК-1. Следовательно, ПК-1 имеет высокую аффинность к холестерину, которая обеспечивается многоточечным гидрофобным взаимодействием и препятствует формированию простого масс-спектра адсорбата в методе DIOS.

Таким образом, использование в качестве подложки для масс-спектрометрических измерений модифицированного ПК позволяет получить молекулярный ион для соединений с различными химическими свойствами путем подбора модификатора и условий адсорбции. Кро-

Таблица 2. Состав и номинальные значения масс фрагментов в масс-спектре холестерина

Состав фрагментов	Масса фрагментов, Да
$[C_{18}H_{35}]^-$	251,5
$[C_{18}H_{35} + CH_3]^-$	266,2
$[C_{18}H_{35} + CH(CH_3)_2]^-$	295,4
$[C_{27}H_{46}O - (CH_3(CH_2)_3)]^-$	328,4
$[C_{27}H_{46}O - (CH_3(CH_2)_2)]^-$	344,5
$[C_{27}H_{46}O - (CH_3CH_2)]^-$	358,9
$[C_{27}H_{46}O]^-$	386,0
$[C_{27}H_{46}O + (CH_3CH_2)]^-$	414,6
$[C_{27}H_{46}O + (CH_3(CH_2)_3)]^-$	443,0
$[C_{27}H_{46}O + (CH_3(CH_2)_5)]^-$	470,5

ме того, можно также получить единичный пик молекулярного иона для соединений, склонных к ассоциации (желчные кислоты), в отличие от масс-спектрометрических исследований методами MALDI и ESI, где наблюдается большое количество пиков, отвечающих ассоциатам различного состава [4, 5].

1. *Alekseev S., Lysenko V., Zaitsev V., Barbier D.* Application of Infra-Red Interferometry for Quantitative Analysis of Chemical Groups Grafted onto Internal Surface of Porous Silicon Nanostructures // *J. Phys. Chem. C.* – 2007. – **111**. – P. 15217–15222.
2. *Mery S., Alekseev S., Zaitsev V., Barbier D.* Covalent grafting of ion-exchanging groups on porous silicon for microsystem applications // *Sensors and Actuators B.* – 2007. – **126**. – P. 120–125.
3. *Funasaki N., Ueshiba R., Hada S., Neya S.* Stepwise self-association of sodium taurocholate and taurodeoxycholate revealed by chromatography // *J. Phys. Chem.* – 1994. – **98**. – P. 11541–11548.
4. *Rodriguez M. A., Yost R. A.* Interpretation of electrospray/ion trap mass spectra of bile acids and other surfactants // *Rapid Commun. of Mass Spectrometry.* – 2000. – **14**. – P. 1398–1403.
5. *Севериновская О. В., Снегур С. В., Власова Н. Н., Покровский В. А.* Исследование состава ассоциатов тауроcholата натрия методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией // *Масс-спектрометрия.* – 2007. – № 4 (2). – С. 99–102.

*Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко  
НАН Украины, Киев  
Киевский национальный университет  
им. Тараса Шевченко*

*Поступило в редакцию 24.12.2009*

**O. V. Severinovskaya, S. A. Alekseev, S. V. Gurskaya, O. Yu. Lavrinenko,**  
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **V. N. Zaitsev**

### **Mass-spectrometric determination of bile components by DIOS method using modified porous silicon**

*DIOS mass spectra for bilirubin, cholesterol, and sodium taurocholate using mesoporous silicon modified with various organic groups are obtained. It is shown that the use of porous silicon as a platform for DIOS mass spectrometric experiments allows one to obtain molecular ion peaks for the studied biologically active compounds, particularly for ones inclined to association.*