

3.3. Tudományos konferencián tartott előadások

1. J. Sztáray, S.P. Young, D. Il'yasova, D.S. Millington; Simultaneous detection of two biomarkers of oxidative stress using a novel UPLC-LC/ESI-MS/MS method. 2007, 25th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Hungary
2. J. Sztáray, S.P. Young, D. Il'yasova, D.S. Millington; Simultaneous detection of two biomarkers of oxidative stress using a novel UPLC-LC/ESI-MS/MS method. 2007, 55th American Society of Mass Spectrometry Conference, Indianapolis, UDA
3. J. Váik, L. Drahos, K. Vékey; Understanding Structure and Reactivity of Ion-Dipole Clusters. 2000, 19th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Hungary

3.4. Tudományos konferencián bemutatott poszterek

1. J. Sztáray, K. Vékey, L. Drahos; Modeling Fragmentation in Electrospray. 2005, 24th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Italy
2. J. Sztáray, L. Drahos, Á. Gömöry, P. Végh, K. Vékey; Theoretical Calculation of Isotope effects, Kinetic Energy Release and Effective Temperatures of Selected Systems. 2003, Gordon Research Conference on Gaseous Ions, Ventura, CA
3. J. Sztáray, B. Sztáray, R.E. Miller, T. Baer; Dissociation Dynamics of Triphenylmethanol Studied by Threshold Photoelectron Photoion Coincidence Spectroscopy. 2003, Gordon Research Conference on Gaseous Ions, Ventura, CA
4. J. Váik, J. Zádor, R. Szalay, D. Knausz; Silyl-substituted thiocarbamates. 1999, XIII. FECEM Conference on Organometallic Chemistry, Lisboa, Portugal

Doktori értekezés tézisei

Sztáray Judit

Protonált ionok disszociációjának modellezése

Témavezető:

Drahos László, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia, Kémiai Kutatóközpont,

Szerkezeti Kémiai Intézet



Kémia Doktori Iskola

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Inzelt György

Elmélet és fizikai kémia, anyagszerkezetkutatás doktori program

A doktori program vezetője: Prof. Dr. Surján Péter

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet

Budapest, 2009

3.2. *Reféréált tudományos folyóiratokban megjelent egyéb dolgozatok*

1. A.A. Tolun, H. Zhang, D. Il'yasova, **J. Sztáray**, S.P. Young, D.S. Millington; Allantoin in Human Urine Quantified by UPLC-MS/MS. Analytical Biochemistry, submitted on 10/26/2009.
2. H. Zhang, D. Il'yasova, **J. Sztáray**, S.P. Young, F. Wang, D.S. Millington; Quantification of the Oxidative Damage Biomarker 2,3-Dinor-8-Isoprostaglandin-F2 α in Human Urine Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Analytical Biochemistry, submitted on 10/12/2009.
3. F. Pollreisz, Á. Gömöröy, **J. Sztáray**, P. Végh, L. Drabos, A. Kiss, K. Vékey; Very high critical energy fragmentation observed in CID. International Journal of Mass Spectrometry, 243(1), 2005, 41-47
4. W.K. Lewis, B.E. Applegate, **J. Sztáray**, B. Sztáray, T. Baer, R.J. Bemish, R.E. Miller; Electron impact ionization in helium nanodroplets: Controlling fragmentation by active cooling of molecular ions. Journal of the American Chemical Society, 126 (36), 2004, 11283-11292
5. I. Bagyi, B. Balogh, A. Czajlik, O. Elias, Z. Gaspari, V. Gergely, I. Hudaky, P. Hudaky, A. Kalaszi, L. Karolyhazy, K. Keseru, R. Kiss, G. Krajsovszky, B. Lang, T. Nagy, A. Racz, A. Szentesi, T. Tabi, P. Tapolesanyi, **J. Vaik**, J.C.P. Koo, G.A. Chass, O. Farkas, A. Perczel, P. Matyus; Generation and analysis of the conformational potential energy surfaces of N-acetyl-N-methyl-L-alanine-N'-methylamide. An exploratory ab initio study. Journal of Molecular Structure – Theochem 625(1), 2003, 121-136

mények (95%-os konfidenciaszinten) a következők: $\Delta H = 1.14 \pm 0.05$ eV; $\log A = 11.0 \pm 0.5$, $\Delta S^\ddagger = -38.1 \pm 9.6$ J \cdot mol $^{-1}$ \cdot K $^{-1}$; ezek jelenleg a legjobb értékek a leucin enkefalin **b**₄⁺-disszociációjára.

Ez a munka további fontos tanulsággal is szolgál: megmutattam, hogy a disszociációs paramétereket többféle típusú tömegspektrumra meghatározva szélesebb hőmérséklet-tartományból nyerhető adatok, ezáltal jóval pontosabb disszociációs paraméterek határozhatóak meg.

3 Publikációk

3.1. A Ph.D. értekezéshez kapcsolódó, referált tudományos folyóiratokban megjelent dolgozatok

1. J. Sztáray, A. Membouef, L. Drahos, K. Vékey; Leucine Enkephalin – a mass spectrometry standard. Mass Spectrometry Reviews, 2009 accepted on 10/31/2009.
2. J. Naban-Maillet, D. Lesage, A. Bossee, Y. Gimbert, J. Sztáray, K. Vékey and J.C. Tabet; Internal energy distribution in electrospray ionization. Journal of Mass Spectrometry, 2005, 40(1), 1-8.
3. Á. Gömöry, P. Vég, J. Sztáray, L. Drahos and K. Vékey; Kinetic energy release of protonated methanol clusters using low-temperature fat-atom bombardment: experiment and theory combined. European Journal of Mass Spectrometry, 2004, 10 (2), 213-220.
4. L. Drahos, J. Sztáray, K. Vékey; Theoretical calculation of isotope effects, kinetic energy release and effective temperatures for alkylamines. International Journal of Mass Spectrometry, 2003, 225(3), 233-248.

1 Bevezetés és célkitűzések

A tömegspektrometria az analitikai kémia és a szerkezetkutatás egyik legfontosabb módszere, mind az alap-, mind pedig az alkalmazott bioanalitikai és proteomikai kutatásokban. A mért tömegspektrumok automatikus kiértékeléséhez szükség van a tömegspektróméterben lejátszódó folyamatok, mint például az ionizáció és fragmentáció alapos és kvantitatív megértésére. Ezt a kísérleti és a modellezési eredmények együttes felhasználásával lehet csak elérni.

Doktori munkámnak három kitűzött célja volt: (1) A disszociáló ionok legfontosabb tulajdonságainak vizsgálata, valamint ezeknek a tömegspektróméterben lejátszódó folyamatokra való hatásának feltérképezése. Ez teszi lehetővé a tömegspektrum legfontosabb paramétereinek, mint például az ionintenzitások vagy – metastabilis bomlások esetén – a csúcsalakok pontos elméleti meghatározását. (2) Néhány kiválasztott rendszer (protonált dimerek és oldószer-klaszterek) unimolekuláris disszociációja során észlelhető érdekességek, mint például a kinetikusenergia-felszabadulás (KER) vagy a kinetikus izotópeffektus (KIE) modellezése. (3) Ezen vizsgálatok közben a MassKinetics program tesztelése és továbbfejlesztése.

Az általam vizsgált rendszerek négy csoportba oszthatók: a) protonált alkil-aminok disszociációja; b) protonált benzil-piridinek és protonált aromás benzoészterek disszociációja; c) protonált metanol-klaszterek metastabilis disszociációja; és d) egy tömegspektrometriai standard oligopeptid, a leucin-enkefalin leggyakrabban vizsgált fragmentációs folyamata, a **b**₄⁺-ion képződése.

A modellezés során felhasznált kísérleti eredmények az irodalomból ill. a MTA Kémia Kutatóközpont Tömegspektrometria Osztályáról származnak. Mivel doktori munkám fő célja a tömegspektrumok modellezése volt, az eredményeket a modellezés szempontjából rendszereztem, és ezeket négy alfejezetben tárgyalom: a) a különféle vizsgált molekuláionok belsőenergia-eloszlásának modellezése a

tömegspektrométer különböző pontjain; b) a protonált alkil-amin és metanol-klasztérek kinetikussenergia-felszabadulásának modellezése; c) a protonált alkil-amin rendszerek kinetikus izotópeffektusának modellezése; d) a protonált leucin-enkefalín disszociációjáról közölt irodalmi adatok újraértékelése.

2 Eredmények és következtetések

2.1 Belsőenergia-eloszlás számítása

Bármely tömegspektrometriai kísérletben a belső energia valamint a belsőenergia-eloszlás fontos szerepet játszik a spektrum kialakulásában. Ezért kutatási munkám első témájaként a belsőenergia-eloszlást vizsgáltam néhány modellrendszer segítségével: az elektropray-forrásban keletkező protonált benzilpiridínium és protonált benzoosav-észter ionok disszociációját vizsgáltam. Ezen molekulákat gyakran használják a tömegspektrométerek energiaprofiljának meghatározására, mivel a pontos irodalmi adatokhoz megfelelően pontos kísérleti adatok határozhatók meg – ezért modelleztem én is ezen molekulákon disszociációját a MassKinetics program segítségével. Doktori munkám során a protonált alkil-amin dimerek disszociációját is modelleztem a kétféle kísérleti körülménynél meghatározott adatok segítségével.

1. A vizsgált benzilpiridínium és benzoosav-észter ionok laza átmeneti állapotban keresztül disszociálnak, és a két lehetséges fragmens-ion arányából meghatároztam az ún. „túlélési arány” (survival yield, SY). A kritikus energia és az átmeneti állapot közötti korrelációt vizsgálva megállapítottam, hogy a benzilpiridínium-sók esetében a SY és a kritikus energia logaritmusai egymással lineáris összefüggést mutat, tehát a fragmentáció a kritikus energia változása miatt változik. A benzoosav-észterek esetében azonban ez a korreláció kevésbé szignifikáns, ebből következően disszociációjuk mértéke az átmeneti állapotok közötti különbséget tükrözi.

folyamatát, a $MH^+ \rightarrow b_4^+$ fragmentációs reakcióját. Az irodalomban számos publikáció közölt disszociációs paramétereket erre a bomlásra, azonban ezek az adatok egymással nem mutatnak jó egyezést. A kísérletileg meghatározott aktiválási-energia-értékek 0.94 és 1.66 eV között mozognak, 0.25 eV-os standard deviációt mutatván. A publikált pre-exponenciális faktorok szintén széles tartományban vannak: az irodalmi $\log A$ értékek 9.1 és 15.7 között vannak.

1. Munkám során feldolgoztam az irodalomban közölt adatokat, és szoros összefüggést találtam az aktiválási energia és a pre-exponenciális faktor között: nagy aktiválási energiához laza átmeneti állapot tartozik (magas $\log A$ érték), míg alacsony aktiválási energiához szoros átmeneti állapot (alacsony $\log A$). Ez azt sugallja, hogy a publikált adatok közti nagy eltérés ellenére a különböző kísérletek hasonló szabadentalpiát mutatnak a vizsgált fragmentációs reakcióra. Az aktiválási entalpia és a pre-exponenciális faktor – ami az aktiválási entropiának felel meg – segítségével meghatároztam a szóbanforgó reakció szabadentalpiáját: $\Delta G^\ddagger = 0.134 \text{ eV} \pm 0.03 \text{ eV}$. (Ebben a kiértékelésben a reakció aktiválási entropiájának hőmérsékletfüggését nem vettem figyelembe.)

2. Következő lépésként az irodalomban közölt kísérleti adatokat felhasználva egy átfogó Arrhenius-ábrát szerkesztettem, hogy megvizsgáljam az adatok hőmérséklet, illetve belső energia függését. Ennek eredménye azt mutatja, hogy a számos különböző publikációból származó adatok következetesek, és a lineáris tendenciától nincs jelentős eltérés ($R^2 = 0.97$). Az Arrhenius-féle ábra segítségével meghatározott, a különböző kísérletek átlag hőmérsékletén (498 K-en) számított aktiválási entalpia 1.14 eV, a pre-exponenciális faktor pedig $10^{11.0} \text{ s}^{-1}$ lett; ez utóbbi $-38.1 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ aktiválási entropiának felel meg.

3. A szisztematikus hiba lehetőségét is megvizsgáltam: belevéve illetve kizárva egyes adatsorokat az adatelemzésből megállapítottam, hogy a szisztematikus hiba kismértékű, és hasonló mértékű a véletlen hiba hatásához. A végső ered-

le, valamint a klaszterméret növekedésével az átmeneti állapot hőmérséklete egyenlő lesz a klaszterek belső hőmérsékletével. Ennek alapján a metanol-klaszterek belső energiáját leíró hőmérséklet igen alacsony, kb. 210 K.

3. A KER görbékét a MassKinetics segítségével is modelleztem; reprodukáltam a háromdimenziós görbéket, valamint a számított átlagos KER értékeket, és a klasztermérettel monoton növekvő tendenciát kaptam.

2.3. A kinetikus izotópeffektus modellezése

Protonált alkil-amin dimerek disszociációját *Norman* és *MacMahon* tanulmányozta kísérletileg. A mért ionintenzitás-arány, tehát a deutert és nem deutert ionra vezető reakciók sebességének aránya (k_H/k_D) egy nagyobb értéket mutatott, mely normális másodlagos izotópeffektust jelez. Munkám során a kinetikus izotópeffektus-adatokat modelleztem a MassKinetics segítségével.

1. A nagy nyomású ionforrás esetében termikus kezdeti energiaeloszlást feltételezve az α -D szubsztituált aminok esetében jó egyezést kaptunk a kísérleti és a számított kinetikus izotópeffektus-adatok között. Ebben az esetben nem csak a másodlagos kinetikus izotópeffektus irányát, hanem a kismértékű változást is kiválóan megjósoltuk.

2. A β -D szubsztituált alkil-aminok esetében kísérletileg az α -D szubsztituálthoz hasonló effektust tapasztaltak, azonban a reakciók zérusponyi energiaszint-különbségei a kvantumkémiái számítások alapján kb. négyszer kisebbek, mint az α -D szubsztituált alkil-aminok esetében, így a számított kinetikus izotópeffektus is jóval alacsonyabbnak adódott, mint a kísérleti értékek.

2.4. A protonált leucin-enkefalin disszociációja

A protonált leucin-enkefalin a tömegspektrometriában az egyik leggyakrabban használt standard, ezért tanulmányoztuk a leggyakrabban vizsgált disszociációs

2. A SY-értéket a karakterisztikus hőmérsékletek meghatározására is felhasználtam, mely adatokból a molekulaion belső energia eloszlását számítottam ki. Az eloszlás jó egyezést mutatott egy adott hőmérsékleten számított termikus energiaeloszlással, és a különböző szubsztituált benzilpiridinekre és benzoesav-észterekre számított energiaeloszlások nagyon hasonlóak.

3. Az egyedi eloszlásokból meghatároztam az átlag belsőenergia-eloszlást, és megállapítottam, hogy a két átlagos eloszlás közel egyező alakú. Ez az eredmény megerősítette azt a feltevést, hogy az elektropray ionforrás hasonló belsőenergia-eloszlást eredményez hasonló méretű rendszerek esetében.

4. Vizsgáltam az ütközések hatását különböző energiaeloszlások számításával és ezek összehasonlításával: a kezdeti 353 K hőmérsékleten számolt termikus energiaeloszláshoz 20, illetve 40 ütközést hozzáadva kiszámítottam az új energiaeloszlást. Meghatároztam, hogy az így kapott eloszlások egy adott, magasabb hőmérsékleten számított termikus energiaeloszlással (790 K, és 1210 K) egyeznek meg. Megállapítottam, hogy az ion szerkezetétől függetlenül jó lineáris összefüggés van a küpfeszültség (skimmer-cone feszültség) és az átlagos belső energia között.

5. Meghatároztam a molekula ion disszociációjának belsőenergia-függő reakciósebességi görbét, valamint a megjelenési energia megállapításával illusztráltam a kinetikus eltolódás fontosságát e modellrendszeren.

A protonált alkil-amin dimerek esetében két kísérleti összeállításból (egy magasnyomású és egy alacsony-nyomású ionizációs forrás) származó eredményeket végtünk alapul a modellezési számításokhoz. MassKinetics modellezési számításokat végeztünk annak érdekében, hogy magyarázatot találjunk a kísérleti eredmények közötti jelentős eltérésre.

1. A nagy nyomású ionforrásból származó kísérleti adatokat sikeresen modelleztük kezdeti termikus energiaeloszlást feltételezve. A kísérletileg meghatározott ionintenzitás-arányokból ($I_H/I_D = KIE$), a kinetikus módszer alapján meghatároztuk az effektív hőmérsékletet (T_{eff}).

2. A kis nyomású ionforrásból származó kísérleti paraméterek alapján számított ionintenzitások és az effektív hőmérséklet adatok jelentősen különböztek a kísérleti eredményektől, így a kezdeti termikus energiaeloszlás feltételezése ebben az esetben nem helyes. A belsőenergia-eloszlást ezért alaposabban is megvizsgáltuk, és a kísérleti eredmények alapján megállapítottuk, hogy az ionok egy része nagy energiával rendelkezik, melyek intenzív fragmentációt eredményeznek. Ezzel együtt azonban a rendszer effektív hőmérséklete alacsony, tehát a fragmentációs küszöb feletti energiaeloszlás igen szűk.
3. Megállapítottuk, hogy a forráshőmérsékletnek nincs komoly hatása a kísérletileg meghatározott effektív hőmérsékletre, valamint a kinetikus izotópp-effektusra. Ennek oka, hogy a különböző forráshőmérsékleteken számított termikus energiaeloszlások nagy energiájú, fragmentációs küszöb feletti része hasonló. Ugyanakkor az alacsony nyomású ionforrás alkalmazása esetén az alacsonyabb forráshőmérséklet kisebb fragmentation-intenzitást eredményez, mivel az eloszlás nagy energiájú, fragmentációs küszöb feletti része arányban kevesebb.
4. Végezetül, a tömegspektrométerben fragmentáló ionpopuláció belsőenergia-eloszlását összehasonlítottam a termikus, egyensúlyi (magas nyomású határeset) körülmények között fragmentáló ionpopuláció energiaeloszlásával. A két belsőenergia-eloszlás több vizsgált rendszeren, több vizsgált hőmérsékleten is hasonló eredményt adott, mely azt mutatja, hogy a kinetikus módszer alkalmazása helytálló volt ebben az esetben.

2.2. A kinetikusenergia-felszabadulás modellezése

- Protonált alkil-amin dimerek valamint protonált metanol-klaszterek kinetikusenergia-felszabadulását (kinetic energy release, KER) modelleztem metastabilis iondisszociációs kísérletek eredményeinek felhasználásával.
1. Statisztikus energiapartíciót feltételezve, mindkét rendszer esetén kiváló egyezést kaptam a kísérleti eredményekkel, mely azt támasztja alá, hogy a

metastabilis csúcsok leírhatóak egy Gauss-függvénnyel. A modellszámítások eredményei alapján azt is megállapítottam, hogy a kinetikus energia Maxwell-Boltzmann-féle háromdimenziós eloszlást követ, tehát a kinetikusenergia-felszabadulás háromdimenziós transzlációs szabadsági fok segítségével írható le.

2. A metastabilis csúcsokból meghatároztam az átlagos kinetikusenergia-felszabadulás értékeket. Az eredmények az mutatják, hogy a $\langle \text{KER} \rangle \approx 3/2 k_B T_{\text{eff}}$, mely újabb bizonyíték arra, hogy a kinetikusenergia-felszabadulás három dimenziósként kezelhető. Fontos hangsúlyozni, hogy a számításokban felhasznált KER és effektív hőmérséklet adatok külön forrásból származnak, és közöttük nincs közvetlen összefüggés.

A protonált metanol-klaszterek alacsony hőmérsékletű FAB tömegspektrometriai kísérleti eredményeit felhasználva modelleztem a protonált molekulaionok vízvesztési folyamatait. Ezt a metastabilis disszociációt modellezve tanulmányoztam a kinetikusenergia-felszabadulás folyamatát.

1. Kiszámítottam a KER eloszlásgörbét, és ezeket két-, három- valamint négydimenziós Boltzmann-eloszlással hasonlítottam össze, és megállapítottam, hogy az eloszlás a háromdimenziós Boltzmann-eloszlással mutat egyezést. Az átlagos kinetikusenergia-felszabadulás értékeket kiszámítva megállapítottam, hogy az a klaszter méretével ($n = 1 - 7$) arányosan élesen növekszik, majd nyolcas klaszterméret körül megáll a növekedés.

2. Az átmeneti állapot hőmérsékletét három különböző elmélet alapján határoztam meg: Boltzmann-eloszlás, a termikus rendszer átlagos kinetikusenergia-eloszlását meghatározó egyenlet, valamint az ún. „finite heat bath” elmélet segítségével. A három különböző módszer alapján meghatározott hőmérsékleti adatok nagyon hasonlóak, és a klaszter méretével növekednek: a maximum $\langle \text{KER} \rangle$ érték kb. 25 meV, a hozzá tartozó átmeneti állapot hőmérséklete körülbelül 210 K. Ezek az eredmények szintén azt támasztják alá, hogy a kinetikusenergia-felszabadulás háromdimenziós transzlációval írható