

УДК 577.32

**КОМПЛЕКСЫ ЭДТА, ТИМИДИНА И ИОНОВ Cu^{2+}
ПО ДАННЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ****С.В. Пастон, А.И. Николаев, П.А. Ушков***Санкт-Петербургский государственный университет, Физический факультет, Россия*

E-mail: svpaston@list.ru

Статья поступила 11 мая 2016 г.

Методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем изучены растворы тимидина в присутствии ионов меди и ЭДТА. Показано существование комплексов тимидин—ЭДТА в отсутствие CuCl_2 в растворе, а также комплексов тимидин—ЭДТА— Cu^{2+} в растворе тимидина, содержащем CuCl_2 и ЭДТА. Определена стехиометрия наблюдаемых комплексов.

DOI: 10.15372/JSC20170225

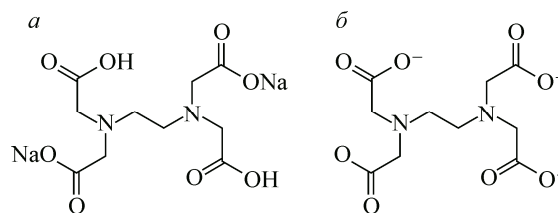
Ключевые слова: азотистые основания ДНК, ионы меди(II), ЭДТА, хелатные комплексы, масс-спектрометрия, электроспрей.

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) — четырехосновная кислота, важнейший представитель комплексонных соединений, образующих прочные соединения-хелаты с ионами металлов. Одна молекула ЭДТА координирует один ион металла двумя атомами азота и тремя или четырьмя карбоксильными группами [1]. Благодаря этой способности образовывать прочные полидентатные комплексы с ионами металлов ЭДТА широко применяется в аналитической химии, в медицине в качестве антидота при отравлениях тяжелыми металлами, для растворения и предотвращения образования различных отложений, для очистки сточных вод, в сельском хозяйстве и пищевой промышленности и других отраслях [1—3]. Комплексы ЭДТА с Cu^{2+} используют при синтезе полиоксометаллатов — гибридных материалов с интересными каталитическими, оптическими и магнитными свойствами [4].

Весьма актуальным является изучение взаимодействия ЭДТА и ее комплексов с ДНК. ЭДТА входит в состав буферных растворов для гель-электрофореза и для хранения образцов нуклеиновых кислот [5, 6]. Семенов с соавт. [6] методом ИК спектроскопии в пленках наблюдали признаки комплексообразования ЭДТА с фосфатными группами и азотистыми основаниями ДНК без нарушения вторичной структуры макромолекулы. Авторы полагают, что группы OH и C=O ЭДТА замещают молекулы воды в гидратной оболочке ДНК. В последнее время комплексы ЭДТА с двухвалентными катионами рассматривают как искусственные ДНК-нуклеазы [7, 8].

В серии работ [9—11] изучали растворы и пленки, содержащие ДНК, Cu^{2+} , а также ряд люминесцирующих лигандов на основе фенантролина, содержащих ион Ru^{2+} . Бороздочное связывание [11], а также частичная интеркаляция [9—11] лигандов такого типа в двойную спираль ДНК приводит к сильному росту интенсивности люминесценции. Введение ионов Cu^{2+} в систему, содержащую сформировавшийся комплекс лиганд—ДНК, приводит к тушению люминесценции лиганда, а последующее добавление в раствор ЭДТА — к ее восстановлению.

Рис. 1. Динатриевая соль ЭДТА ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$) (а); полностью депротонированная форма ЭДТА (Y^{4-}) [2] (б)



Тушение люминесценции лиганда, находящегося в комплексе с ДНК, как полагают авторы [9—11], возникает вследствие связывания ионов Cu^{2+} с ДНК. Известно, что ионы меди могут связываться с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК, а также с азотистыми основаниями [12]. В работах [9—11] предполагается, что при добавлении ЭДТА к существующему комплексу лиганд—ДНК— Cu^{2+} все катионы меди в системе переходят с ДНК в хелатные комплексы ЭДТА— Cu^{2+} , что приводит вновь к восстановлению комплекса лиганд—ДНК и, как следствие, к прежней интенсивности люминесценции лиганда. Следует, однако, отметить, что это допущение сделано при отсутствии прямых данных о разрушении комплекса ДНК— Cu^{2+} в системах, содержащих эквимольное с $[\text{Cu}^{2+}]$ количество ЭДТА. В работе [10] отмечено, что на люминесценцию связанного с ДНК лиганда влияет введение в раствор уже сформированного комплекса ЭДТА— Cu^{2+} , но объяснения этому эффекту не дано.

В настоящей работе для выявления возможных комплексов ионов меди, ЭДТА и азотистых оснований ДНК было проведено исследование растворов, содержащих тимидин, CuCl_2 и ЭДТА, методом масс-спектрометрии (ионизация электроспреем). Появление сложных комплексов азотистых оснований с Cu^{2+} и ЭДТА можно ожидать на участках ДНК с дестабилизированной вторичной структурой, которые могут возникать как в результате тепловых движений интактной ДНК, так и в ДНК, связанной с лигандами [13].

В данной работе использовали динатриевую соль ЭДТА ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (рис. 1). Устойчивость комплексов ЭДТА с ионами металлов тем выше, чем больше заряд и меньше радиус катиона. Константа устойчивости комплекса металла М и ЭДТА определяется согласно [1]:

$$K_1 = \frac{[\text{M—ЭДТА}]}{[\text{M}][\text{ЭДТА}]}$$

Все катионы, кроме щелочных, образуют с ЭДТА комплексы, обладающие достаточно высокими константами устойчивости, чтобы их можно было определять методом комплексонометрического титрования. Для катионов, использованных в данной работе, $\lg K_1(\text{Na}^+) = 1,7$ и $\lg K_1(\text{Cu}^{2+}) = 18,8$ [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали тимидин (Sigma, США), соль CuCl_2 марки ХЧ, динатриевую соль ЭДТА в виде стандарт-титра $\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ для приготовления 1 л 0,05 М раствора. Раствор ЭДТА был приготовлен в соответствии с [14]. Растворы готовили простым сливанием исходных растворов компонентов, перед измерением выдерживали в течение суток. Все растворы были приготовлены в деионизованной воде.

Масс-спектры водных растворов регистрировали на масс-спектрометре Bruker maXis HRMS-ESI-QTOF (High-Resolution Mass-Spectrometer / ElectroSpray Ionization / Quadrupole-Time-of-Flight). Фиксировали спектры положительных ионов. Обработку масс-спектров проводили в программном пакете Bruker Compass DataAnalysis 4.0, поставляемом производителем оборудования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления возможности образования комплексов азотистых оснований с Cu^{2+} и ЭДТА на участках макромолекулы с нарушенной вторичной структурой, которые могут образовываться в ДНК в физиологических условиях, в частности, при взаимодействии с белками и низкомолекулярными лигандами [13], мы предприняли изучение растворов нуклеозида тимидина (Thy) в присутствии ионов меди и ЭДТА методом масс-спектрометрии. Связывание различных

нуклеотидов и нуклеозидов с комплексом $[\text{Fe}^{3+}\text{—ЭДТА}]^-$ было обнаружено в работе [15], причем некоторые тройные комплексы образуются с участием иона H^+ .

Электроспрей — сравнительно мягкий способ ионизации образца, исследуемого в масс-спектрометре. Положительно заряженный молекулярный ион образуется из нейтральной молекулы M чаще всего в результате ее протонирования, либо взаимодействия с другим положительно заряженным катионом из раствора, таким как Na^+ , K^+ , NH_4^+ . Эти катионы неизбежно присутствуют в водных растворах, которые хранились в стеклянной посуде [16]. Формулы образующихся ионов можно представить в общем виде как $[\text{M}\times n\text{H}]^{n+}$, $\text{M}\times\text{Na}^+$, $\text{M}\times\text{K}^+$, $\text{M}\times\text{NH}_4^+$ и т.д. [16, 17]. Если в исследуемом растворе уже существовали ионы, то они могут попасть в анализатор без дополнительной модификации [18]. При ионизации методом электроспрея фрагментация молекул практически отсутствует [17]. Этот способ ионизации широко используется в масс-спектрометрии для исследования комплексообразования ДНК и нуклеозидов с биологически активными соединениями и ионами, в частности, для определения стехиометрии комплексов [19—22].

На рис. 2 показан масс-спектр (МС) тимидина в воде. Вопрос о величине заряда каждого иона, появляющегося на масс-спектре, решается рассмотрением изотопных пиков [17]. В случае тимидина, как и для многих других органических соединений, в масс-спектре четко проявляется замена одного из атомов углерода ^{12}C на более тяжелый изотоп ^{13}C (так называемый изотоп $A+1$, где A обозначает атомную массу наиболее распространенного изотопа). В зависимости от источника анализируемого образца содержание ^{13}C в нем может колебаться в диапа-

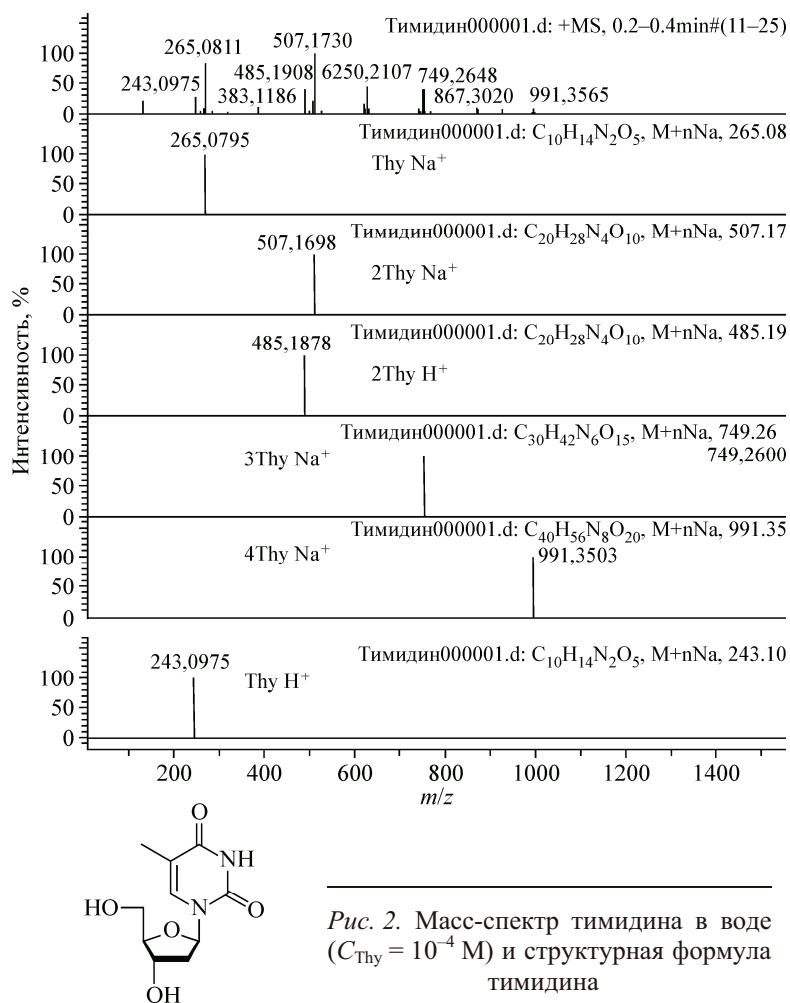


Рис. 2. Масс-спектр тимидина в воде ($C_{\text{Thy}} = 10^{-4}$ М) и структурная формула тимидина

зоне 1,08—1,12 % от содержания ^{12}C . Чем больше атомов углерода в молекуле, тем больше вероятность замены одного и более атомов ^{12}C на ^{13}C и тем больше интенсивность изотопных пиков. Разница в массе ионов в соседних изотопных пиках равна 1. Поэтому если разница в положении изотопных пиков на оси абсцисс $\Delta(m/z) = 1$, то заряд иона $z = 1$, если $\Delta(m/z) = 0,5$, то заряд $z = 2$, и т.д. Для более точного учета изотопного эффекта был использован программный пакет Bruker Compass DataAnalysis 4.0, который позволяет моделировать интенсивность и положение изотопных пиков по заданной брутто-формуле молекулы. С его помощью проводили идентификацию линий в масс-спектрах, полученных в данной работе.

На рис. 2 приведены результаты расшифровки тех линий в спектре тимидина, для которых получено надежное соответствие с изотопным распределением. Все эти ионы являются однозарядными. Интересно отметить наличие ассоциатов из двух и более молекул тимидина. Явление самоассоциации пиримидинов и пуринов в водных растворах известно и широко изучается [23—27], константы димеризации лежат в области ниже 10 M^{-1} [26, 27]. Наличие в масс-спектре линий, отвечающих подобным слабосвязанным ассоциатам (см. рис. 2), позволяет судить о чувствительности данного метода для обнаружения комплексов, существующих в растворе. Следует отметить, что относительные интенсивности линий разных ионов в масс-спектре определяются не только соотношением концентраций соответствующих молекул или комплексов в растворе, но и их способностью образовывать ионы в растворе и в процессе электрораспыления. Понятно, что способность к ионизации различна для разных соединений и зависит от ионного состава раствора [18, 22]. Поэтому оценки количественного соотношения различных комплексов в растворе по данным масс-спектрометрии следует делать с осторожностью и желательно подкреплять результатами других исследований [20, 22]. В настоящей работе мы не делали оценок концентрации наблюдаемых комплексов в исследуемых растворах.

На рис. 3 приведен масс-спектр раствора тимидина с CuCl_2 . По сравнению со спектром чистого тимидина удалось идентифицировать только одну дополнительную линию 546,1014. Этот пик соответствует иону с зарядом $z = 1+$ — депротонированному комплексу $\text{Thy} \cdot \text{Cu}^{2+} - \text{H}^+$.

На рис. 4 представлены масс-спектры растворов ЭДТА в присутствии CuCl_2 и ЭДТА в воде. Нейтральную форму динатриевой соли ЭДТА можно представить в виде $[\text{Y}^{4-}]\text{2Na}^+\text{2H}^+$. Молекулярная масса аниона $[\text{Y}^{4-}]$ — 288,2 г/моль (для усредненного изотопного состава). В водном растворе при нейтральных pH могут присутствовать следующие анионы: $[\text{Y}^{4-}]\text{2H}^+$, $[\text{Y}^{4-}]\text{2Na}^+\text{H}^+$, $[\text{Y}^{4-}]\text{Na}^+\text{2H}^+$, $[\text{Y}^{4-}]\text{2Na}^+$, которые могут приобрести положительный заряд за счет протонирования или связывания с Na^+ .

Эти однозарядные катионы можно наблюдать на масс-спектре (рис. 4, а, б). По сравнению со спектром динатриевой соли ЭДТА в воде, в ее спектре в присутствии CuCl_2 наблюдаются

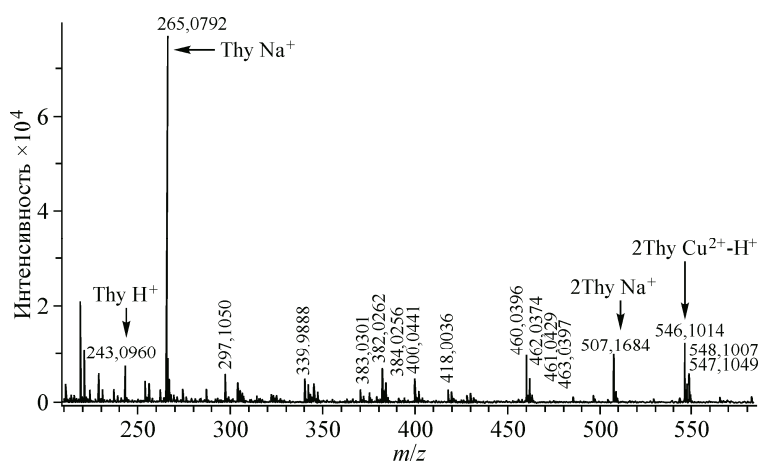


Рис. 3. Масс-спектр тимидина в воде в присутствии CuCl_2 .

$$C_{\text{Thy}} = 10^{-4}\text{ M}, C_{\text{CuCl}_2} = 10^{-5}\text{ M}$$

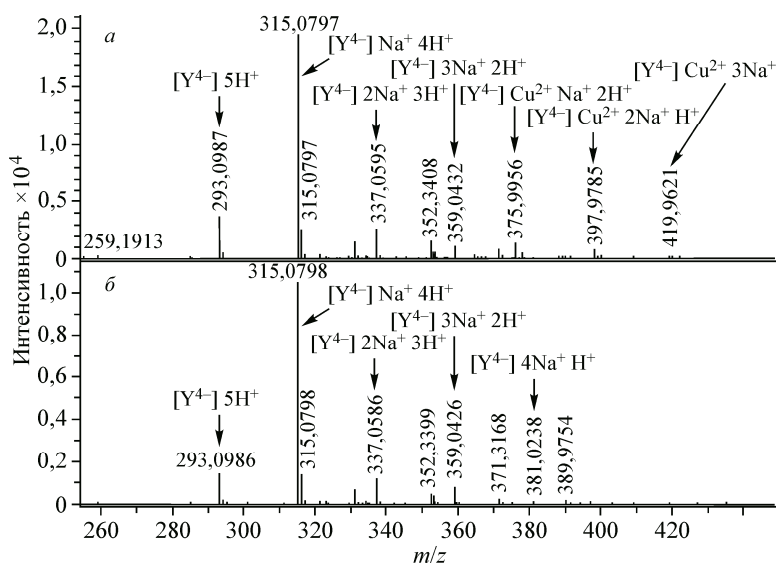


Рис. 4. Сравнение масс-спектров ЭДТА в растворе CuCl₂ (а) и ЭДТА в воде (б).
C_{ЭДТА} = 10⁻⁴ М, C_{CuCl₂} = 10⁻⁵ М

дополнительные линии, которые можно интерпретировать как комплексы ЭДТА, содержащие Cu²⁺ (см. рис. 4, а).

На рис. 5 приведен масс-спектр тимидина в присутствии ЭДТА. На этом спектре можно увидеть линии, присутствующие в спектре чистого тимидина (265,0796 и 507,1693), а также линии, присутствующие в спектре чистой ЭДТА (315,0792, 337,0570 и 359,0432), которые были расшифрованы ранее. Удалось интерпретировать две новые линии в масс-спектре смеси тимидина с ЭДТА (выделены стрелками на рис. 5). Они соответствуют ионам с зарядом 2+, которые представляют собой сложные комплексы с участием нескольких молекул тимидина и ЭДТА: 3Thy[Y⁴⁻]2H⁺4Na⁺ (стехиометрическое отношение Thy:[Y⁴⁻] = 3:1) и димер 2{Thy[Y⁴⁻]3Na⁺2H⁺} (Thy:[Y⁴⁻] = 1:1).

Масс-спектр раствора тимидина с CuCl₂, к которому добавили ЭДТА, показан на рис. 6. На этом спектре можно заметить линии, ранее наблюдавшиеся в спектре тимидина (265,0796 и 507,1693) (см. рис. 2), и линии, наблюдавшиеся в растворе ЭДТА с CuCl₂ (375,9930, 397,9749

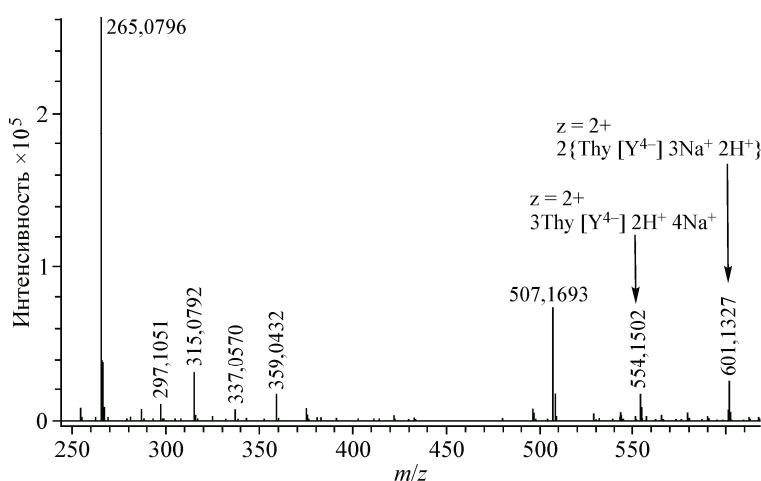


Рис. 5. Масс-спектр тимидина в присутствии ЭДТА. C_{Thy} = C(ЭДТА) = 10⁻⁴ М.
Линии 265,0796 и 507,1693 встречаются в МС тимидина в воде (см. рис. 2), линии 315,0792, 337,0570 и 359,0432 встречаются в МС ЭДТА в воде (см. рис. 4, б)

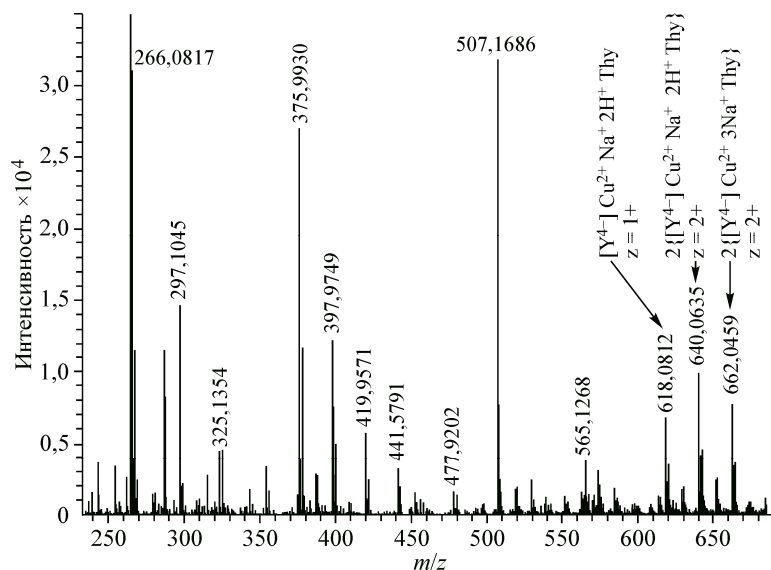


Рис. 6. Масс-спектр раствора тимидина с $CuCl_2$, к которому добавлен раствор ЭДТА. $C_{CuCl_2} = 10^{-5}$ М, $C_{Thy} = C_{ЭДТА} = 10^{-4}$ М.

Линии 265,0796 и 507,1693 встречаются в МС тимидина в воде (см. рис. 2), линии 375,9930, 397,9749 и 419,9571 встречаются в МС ЭДТА в растворе $CuCl_2$ и соответствуют комплексам ЭДТА с Cu^{2+} (см. рис. 4, а)

и 419,9571) (см. рис. 4, а), которые соответствуют различным комплексам ЭДТА с Cu^{2+} . Интересно отметить отсутствие линий, наблюдавшихся в растворе чистой ЭДТА. По сравнению с уже рассмотренными спектрами более простых систем удалось расшифровать три новые линии (выделены стрелками на рис. 6). Эти линии соответствуют сложным комплексам тимидина ЭДТА и Cu^{2+} разного состава: однозарядный ион $[Y^4]Cu^{2+}Na^+2H^+Thy$ и два двузарядных иона — димеры $2\{[Y^4]Cu^{2+}Na^+2H^+Thy\}$ и $2\{[Y^4]Cu^{2+}3Na^+Thy\}$. Во всех наблюдаемых комплексах выполняется стехиометрическое отношение $Thy:[Y^4]:Cu^{2+} = 1:1:1$.

Таким образом, масс-спектрометрические исследования показывают наличие комплексов тимидина с ЭДТА в отсутствие Cu^{2+} в растворе, а также тройных комплексов тимидин—ЭДТА— Cu^{2+} . Можно предположить, что такие комплексы могут образовываться на одноцепочечных участках ДНК.

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ "Методы анализа состава вещества".

Авторы благодарят сотрудников РЦ Е.А. Бессонову и В.В. Карпенко за помощь в измерении и расшифровке масс-спектров.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 15-08-06876) и СПбГУ (11.37.290.2015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Перрин Д. Органические аналитические реагенты. — М.: Мир, 1967.
2. Дятлова Н.М., Темкина В.Я., Попов К.И. Комплексоны и комплексонаты металлов. — М.: Химия, 1988.
3. Пришибил Р. Аналитические применения этилендиаминтетрауксусной кислоты и родственных соединений. — М.: Мир, 1975.
4. Liu H., Xu L., Gao G.-G., Li F.-Y., Yang Y.-Y., Li Z.-K., Sun Yu. // J. Solid State Chem. — 2007. — **180**. — P. 1664.
5. Brody J.R., Kern S.E. // *Analyt. Biochem.* — 2004. — **333**. — P. 1.
6. Семенов М.А., Большух Т.В., Красницкая А.А., Малеев В.Я. // Проблемы криобиологии. — 1994. — № 4. — С. 17.

7. Joyner J.C., Reichfield J., Cowan J.A. // J. Am. Chem. Soc. – 2011. – **133**. – P. 15613.
8. Desbouis D., Troitsky I.P., Belousoff M.J., Spiccia L., Graham B. // *Coordinat. Chem. Rev.* – 2012. – **256**. – P. 897.
9. Ji S., Chen M., Li H., Gan G., Li W. // *Spectrochim. Acta, Part A.* – 2012. – **88**. – P. 124.
10. Chen M., Li H., Li Q., Xu Zh. // *Spectrochim. Acta, Part A.* – 2010. – **75**. – P. 1566.
11. Gan G.-L., Chao H., Ji S.-B., Chen L.-L., Li H. // *Spectrochim. Acta, Part A.* – 2012. – **97**. – P. 297.
12. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1987.
13. Krueger A., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M.D. // *Biophys. J.* – 2006. – **90**. – P. 3091.
14. ГОСТ 10398-76 "Реактивы и особо чистые вещества. Комплексонометрический метод определения содержания основного вещества", 1977.
15. El-Sherif A.A., Shoukry M.M., Hosny W.M., Abd-Elmoghny M.G. // *J. Solution Chem.* – 2012. – **41**. – P. 813.
16. Henderson W., McIndoe J.S. *Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds.* – England, John Wiley & Sons Ltd., 2005.
17. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2003.
18. Snyder A. *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry;* ACS Symposium Series; American Chemical Society. – Washington, DC, 1996.
19. Banoub J.H., Limbach P.A. *Mass Spectrometry of Nucleosides and Nucleic Acids.* – CRC Press, Taylor and Francis Group, FL, 2009.
20. Rosu F., Gabelica V., Houssier C., De Pauw E. // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – **30**. – N 16. – P. e82.
21. Oehlers L., Mazzitelli C.L., Brodbelt J.S., Rodriguez M., Kerwin S. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2004. – **15**. – P. 1593.
22. Yen T.-Y., Charles M.J., Voyksner R.D. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 1996. – **7**. – P. 1106.
23. Peral F., Gallego E. // *J. Mol. Struct.: THEOCHEM.* – 1995. – **372**. – P. 101.
24. Armentano D., De Munno G., Di Donna L., Sindona G., Giorgi G., Salvini L. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2004. – **15**. – P. 268.
25. Nikolaev A.I., Paston S.V. // *J. Phys.: Conference Series.* – 2015. – **661**. – 012019.
26. Aradi F., Foldesi A. // *Magn. Res. Chem.* – 1989. – **27**. – P. 592.
27. Aradi F., Foldesi A. // *Magn. Res. Chem.* – 1987. – **25**. – P. 892.