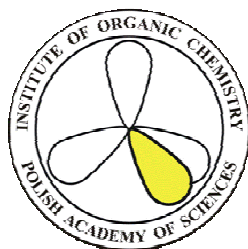


Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

Paweł Świder

Porównanie efektywności różnych technik jonizacji w badaniach struktury i reakcji porfirynoidów za pomocą spektrometrii mas

Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Witolda Danikiewicza



Warszawa 2012



B. Org. 337/12

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi, Prof. Witoldowi Danikiewiczowi, za zaproponowanie tematu badań, stałą opiekę, cierpliwość oraz wiele cennych uwag i pomysłów w trakcie wykonywania tej pracy.

Dziękuję Pani Prof. Dorocie Gryko, Panu Prof. Danielowi Gryko oraz Panu Prof. Stanisławowi Ostrowskiemu za cenne dyskusje oraz udostępnienie związków do badań, bez których ta praca nie mogłaby powstać.

Koleżankom i Kolegom z Zespołu Spektrometrii Mas Instytutu Chemii Organicznej PAN dziękuję za pomoc i stworzenie niezapomnianej atmosfery pracy.

Spis treści

1. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	8
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA	10
2.1. DLACZEGO PORFIRYNOIDY SĄ TAK INTERESUJĄCYM OBIEKTEM BADAŃ?	10
2.2. WYKORZYSTANIE RÓŻNYCH TECHNIK JONIZACJI W ANALIZIE PORFIRYNOIDÓW.	12
2.3. PRZYKŁADY REAKCJI FRAGMENTACJI OBSERWOWANYCH DLA PORFIRYNOIDÓW W SPEKTROMETRII MAS	19
2.4. PORFIRYNOIDY – SPEKTROMETRIA MAS W TRYBIE JONÓW UJEMNYCH	36
2.5. PRZYKŁADY STOSOWANIA TECHNIK HPLC-MS I HPLC-MS/MS W ANALIZIE ZŁOŻONYCH MIESZANIN ZAWIERAJĄCYCH PORFIRYNOIDY	40
3. BADANIA WŁASNE	45
3.1. WSTĘP	45
3.2. PORÓWNANIE TECHNIK JONIZACJI W ODNIESIENIU DO BADANYCH UKŁADÓW PORFIRYNOIDOWYCH	45
3.2.1. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA SYGNAŁÓW OBSERWOWANYCH W WIDMACH MS REJESTROWANYCH RÓŻNYMI METODAMI JONIZACJI ORAZ Z ZASTOSOWANIEM RÓŻNYCH ROZPUSZCZALNIKÓW	45
3.2.2. PORÓWNANIE CZUŁOŚCI TECHNIK JONIZACJI PRACUJĄCYCH POD CIŚNIENIEM ATMOSFERYCZNYM	48
3.2.3. GRANICE WYKRYWALNOŚCI METOD PRACUJĄCYCH POD CIŚNIENIEM ATMOSFERYCZNYM	70
3.2.4. ZNACZENIE METOD EI I FD W ANALIZIE PORFIRYNOIDÓW	72
3.3. CECHY CHARAKTERYSTYCZNE WIDM MS/MS WYBRANYCH PORFIRYNOIDÓW	75
3.3.1. WSTĘP.....	75
3.3.2. FRAGMENTACJE UKŁADÓW CHLORYNOWYCH ZAWIERAJĄCYCH PIERŚCIEŃ IZOKSAZOLINOWY	76
3.3.3. FRAGMENTACJE INNYCH PRZEBADANYCH UKŁADÓW.....	83
3.3.4. PODSUMOWANIE	88
3.4. WYKORZYSTANIE SPEKTROMETRII MAS DO IDENTYFIKACJI FOTOCHEMICZNYCH PRODUKTÓW ROZKŁADU KOROLI	89
3.4.1. WSTĘP.....	89
3.4.2. WPŁYW ROZPUSZCZALNIKA, PH I INNYCH CZYNNIKÓW NA TRWAŁOŚĆ KOROLI W ROZTWORZE.....	89

3.4.3. WYKORZYSTANIE TANDEMOWEJ SPEKTROMETRII MAS, HPLC-MS I INNYCH METOD DO IDENTYFIKACJI FOTOCHEMICZNYCH PRODUKTÓW ROZKŁADU KOROLI.....	106
3.4.4. BADANIA STRUKTURY PRODUKTÓW UTLENIEŃ NA PODSTAWIE WIDM MS/MS ORAZ WPŁYW PODSTAWNIKÓW OBECNYCH W POZYCJACH MEZO KOROLI NA TRWAŁOŚĆ TYCH UKŁADÓW.....	115
4. PODSUMOWANIE	119
5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	122
6. LITERATURA CYTOWANA	127

Wykaz skrótów i oznaczeń

ESI – jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym z ang. *Electrospray Ionization*

APCI – jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym z ang. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

APPI – fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym z ang. *Atmospheric Pressure Photoionization*

FD – desorpcja polem z ang. *Field Desorption*

EI – jonizacja elektronowa w języku angielskim nazywana *Electron Impact* lub *Electron Ionization*

PDT – terapia fotodynamiczna z ang. *Photodynamic Therapy*

LDI – jonizacja przez desorpcję laserową z ang. *Laser Desorption Ionization*

MALDI – jonizacja przez desorpcję laserową w matrycy z ang. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

FAB – bombardowanie szybkimi atomami z ang. *Fast-Atom Bombardment*

SIMS – spektrometria mas jonów wtórnych z ang. *Secondary Ion Mass Spectrometry*

LSIMS – spektrometria mas jonów wtórnych w ciekłej matrycy z ang. *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*

FT-ICR – analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników z ang. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*

PA – powinowactwo do protonu z ang. *Proton Affinity*

DFT – teoria funkcjonału gęstości z ang. *Density Functional Theory*

THF – tetrahydrofuran

MRM – monitorowanie wybranych fragmentacji z ang. *Multiple Reaction Monitoring*

LOD – granica wykrywalności z ang. *limit of detection*.

m/z – stosunek masy do ładunku, ang. *mass to charge ratio*

TOF – detektor czasu przelotu z ang. *Time of Flight*

HRMS – spektrometria mas wysokiej rozdzielczości z ang. *High Resolution Mass Spectrometry*

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa z ang. *High Performance Liquid Chromatography*

1. Założenia i cel pracy

Spektrometria mas spełnia ważną rolę w obszarze badań naukowych, gdyż jest potężnym narzędziem analitycznym, a obecnie musi sprostać niewiarygodnym wyzwaniom stawianym przez rozwijające się bardzo prężnie różne dziedziny nauki. Wyrazem istotności spektrometrii mas w badaniach naukowych jest, między innymi, Nagroda Nobla w dziedzinie chemii przyznana w 2002 roku dwóm uczonym zasłużonym w dziedzinie spektrometrii mas: Johnowi Fennowi i Koichiemu Tanace. Komitet Noblowski nagroził ich wkład w powstanie nowych metod jonizacji, umożliwiających przeniesienie do fazy gazowej dużych biocząsteczek, takich jak kwasy nukleinowe, polisacharydy, a przede wszystkim białka. Rozwiązanie problemu przenoszenia do fazy gazowej tak dużych cząsteczek umożliwia badanie ich struktur poprzez kontrolowaną fragmentację w spektrometrach mas. Dodatkowo, możliwość sprzęgania tychże spektrometrów z technikami chromatograficznymi sprawia, że spektrometria mas jest jednym z kluczowych narzędzi w badaniach biochemicznych.

W swojej rozprawie doktorskiej zamierzam przedstawić potencjał, jaki oferuje spektrometria mas w odniesieniu do określonej grupy związków chemicznych - porfirynoidów. Ta dość szczególna grupa związków jest obiektem zainteresowania wielu badaczy, głównie dzięki ogromnej liczbie możliwych zastosowań tych związków w różnych dziedzinach życia. Porfirynoidy posiadają zdolność tworzenia niezwykle trwałych kompleksów z kationami metali i to właśnie kompleksy tych związków są najczęściej aktywne biologicznie. Cały otaczający nas świat jest pełen porfirynoidów, gdyż zarówno rośliny zielone jak i my - organizmy cudzożywne - jesteśmy uzależnieni od chemii, jaką oferują nam porfirynoidy. Rośliny zielone produkują tlen przekształcając dwutlenek węgla dzięki układom opartym na związkach o budowie porfirynowej, z kolei ten sam tlen jest transportowany w naszej krwi dzięki związkom chemicznym opartym na tym samym szkielecie. Porfirynoidy to bardzo liczna rodzina związków o ogromnym znaczeniu biologicznym. Unikatowe właściwości jakie oferuje ta klasa związków sprawiły, że są one obiektem zainteresowania wielu uczonych. Na całym świecie powstała i powstaje na drodze syntetycznej imponująca liczba tego typu związków. Ich ogromna różnorodność sprawia, że trudno jest stosować jedną technikę jonizacji do wszystkich związków tej klasy, dlatego tak ważna jest ocena efektywności metod jonizacji spektrometrii mas w odniesieniu do wspomnianych układów.

Głównym celem niniejszej pracy jest porównanie szeregu metod jonizacji w odniesieniu do układów opartych na szkielecie porfirynowym i ich analogów. W swojej pracy podejmuję

się odpowiedzi na pytanie, która z metod jonizacji stosowanych w spektrometrii mas umożliwia nam analizę porfirynoidów w sposób najbardziej efektywny. Aby zrealizować ten cel dokonałem porównania czułości technik jonizacji pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym (jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym – ESI, jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym – APCI, fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym – APPI) oraz wykonałem szereg pomiarów oceniających przydatność metod FD (desorpcja polem) i EI (jonizacja elektronowa).

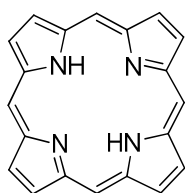
Kolejnym zagadnieniem, które zostanie poruszone w niniejszej rozprawie, jest opis procesów utleniania przebiegających w niektórych rozpuszczalnikach i obserwowanych podczas pomiarów MS dla mniej trwałych związków z grupy porfirynoidów. W ramach swojej pracy przeprowadziłem również, dla wybranych układów, analizę ścieżek fragmentacji obserwowanych w komorze zderzeń spektrometru mas.

Rozprawa ta nie tylko pokazuje różnice między technikami jonizacji spektrometrii mas. Pokazuje również w jaki sposób możemy badać porfirynoidy za pomocą spektrometrii mas oraz jakie informacje dzięki tej technice analitycznej możemy uzyskać, nie tylko przy badaniu struktury porfirynoidów, ale również w badaniu produktów ich rozkładu.

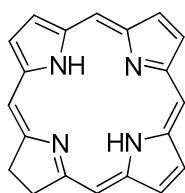
2. Część literaturowa

2.1. Dlaczego porfirynoidy są tak interesującym obiektem badań?

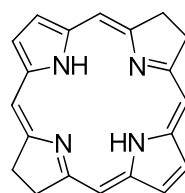
Porfirynoidy są obszerną grupą związków makrocyklicznych obejmującą przede wszystkim porfiryny i ftalocyjaniny. Do grupy tej zalicza się także korole, chloryny, bakteriochloryny, izobakteriochloryny i wiele innych pochodnych, m.in. układy nazywane „rozszerzonymi” gdzie makrocykl jest rozbudowany poprzez wprowadzenie nowych wiązań chemicznych pomiędzy jednostki pirolowe (np. porficyny) lub poprzez wprowadzenie dodatkowych jednostek pirolowych powiększających układ makrocykliczny (np. pentaafiryny i heksafiryny). Związki tego typu były dotychczas stosowane na dużą skalę jako barwniki, a obecnie coraz częściej są wykorzystywane jako katalizatory i sensory¹. Badania związków porfirykowych i ich analogów cieszą się ogromnym zainteresowaniem badaczy na całym świecie, o czym świadczy ogromna liczba artykułów dotyczących tego zagadnienia, które można odnaleźć w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Pod koniec ubiegłego wieku, w 1997 roku powstało czasopismo *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, które przez kilkanaście lat swojego istnienia z powodzeniem publikowało coraz więcej prac naukowych w tej dziedzinie.



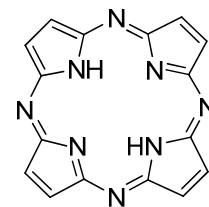
porfiryna



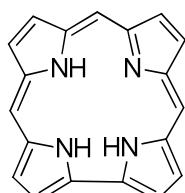
chloryna



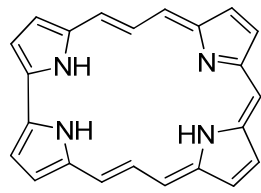
bakteriochloryna



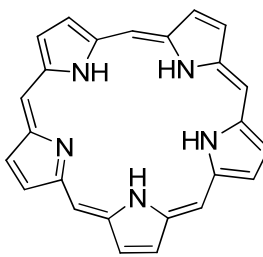
ftalocyjanina



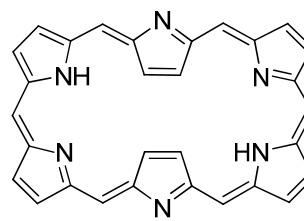
korol



rozszerzony korol



pentaafiryna



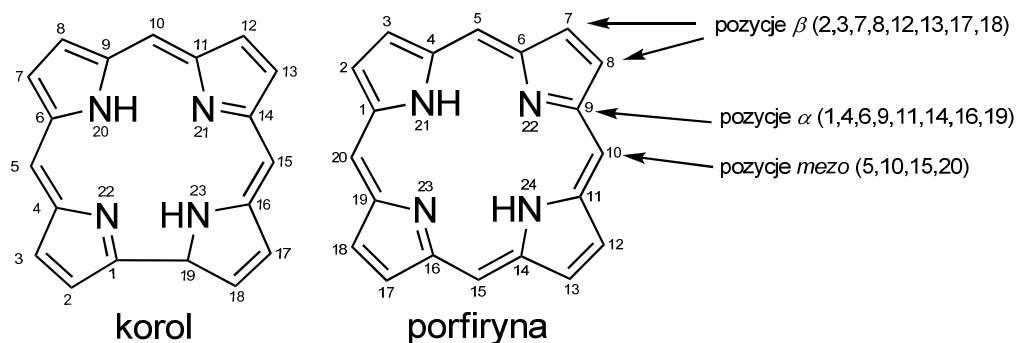
heksafiryna

Dzięki specyficznym właściwościom spektroskopowym, magnetycznym, luminescencyjnym, a przede wszystkim dzięki zdolności do fotoprzewodnictwa i fotoemisji, układy porfirykowe stały się niezbędnym elementem w procesie ewolucji organizmów żywych. Z tego właśnie powodu stanowią kluczowy element centrów aktywnych wielu białek obecnych w żywych organizmach. Białka te spełniają w przyrodzie różne funkcje: transport

i magazynowanie tlenu (hemoglobina i mioglobina), utlenianie substancji organicznych (peroksydazy i cytochrom P₄₅₀), transfer elektronów i redukcja wody do tlenu (cytochromy a, b i c łańcucha oddechowego) oraz fotosynteza (podjednostki białkowe zawierające chlorofile w fotosystemach I i II). To właśnie chęć naśladowania procesów biegnących w żywych organizmach jest powodem, dla którego badacze poświęcają tyle uwagi porfirynoidom.

Mówiąc o przeróżnych możliwościach wykorzystania porfirynoidów nie wypada nie wspomnieć o zastosowaniach w medycynie. Mam tu przede wszystkim na myśli to z czym układy porfiryne w medycynie są najbardziej kojarzone, tzn. terapię fotodynamiczną (PDT). Porfiryny mają tę właściwość, że selektywnie gromadzą się w komórkach nowotworowych i na tym właśnie opiera się terapia PDT. Podajemy choremu tzw. fotouczulacz, który w naszym przypadku jest pochodną lub mieszaniną pochodnych porfiryny. Następnie naświetlamy chore miejsce światłem o odpowiedniej długości fali i doprowadzamy do uaktywnienia fotouczulacza, który ulega wzbudzeniu pod wpływem światła i przekazuje nadmiar swojej energii do tlenu obecnego w komórkach. Taki transfer energii prowadzi do powstania bardzo aktywnej formy tlenu (tzw. tlenu singletowego), który uszkadza organella komórkowe i powoduje ich śmierć. W ten sposób selektywnie niszczone są tylko komórki rakowe. Jedynym negatywnym efektem jaki może występować przez pewien czas po terapii u chorego może być nadwrażliwość na światło.

Na końcu tego krótkiego wstępu do części literaturowej mojej rozprawy chciałbym zwrócić jeszcze uwagę na nazewnictwo pozycji w układach porfirykowych, gdyż będzie się ono przewijać w tekście mojej rozprawy, a objaśnienie podstawowej nomenklatury znacznie ułatwi zrozumienie niektórych zagadnień przez czytelnika. Rysunek 1 przedstawia pierścienie korolu i porfiryny z zaznaczoną numeracją i nazwami pozycji w tych pierścieniach. Kluczowe dla opisu porfirynoidów są pozycje β -pirolowe oraz pozycje *mezo* cząsteczki, gdyż są używane bardzo często do opisu położenia określonego podstawnika w układzie porfirykowym zamiast stosowania numeracji.



Rysunek 1. Numeracja atomów w cząsteczce porfiryny i korolu oraz oznaczenia określonych pozycji w cząsteczkach.

2.2. Wykorzystanie różnych technik jonizacji w analizie porfirynoidów.

Spektrometria mas, od momentu gdy zaczęto doceniać jej możliwości, stała się jednym z kluczowych narzędzi identyfikacji różnych grup związków chemicznych, w tym również porfirynoidów. Na temat analizy układów porfiryńowych za pomocą spektrometrii mas ukazał się w 2000 roku artykuł przeglądowy pod tytułem „*Mass Spectrometry of Porphyrins and Metalloporphyrins*” umieszczony w *The Porphyrin Handbook*.² Opisuje on bardzo dokładnie doniesienia literaturowe, które ukazały się do roku 1999 na temat wykorzystania różnych metod jonizacji spektrometrii mas w analizie dyskutowanych układów (418 odnośników literaturowych). Pierwszą historycznie techniką jonizacji w spektrometrii mas była jonizacja elektronowa (EI) i to właśnie ona jest prezentowana najobszerniej we wspomnianym przeglądzie. Liczne zalety tej techniki były nieodłącznie powiązane z jej ograniczeniami, które w przypadku porfirynoidów były szczególnie widoczne. Większość porfirynoidów to związki nielotne lub trudnolotne, a dodatkowo nietrwałe termicznie, co przy wymogach jonizacji EI związanych z lotnością próbki sprawiało, że analiza za pomocą tej metody jonizacji była często niemożliwa. Lotność dyskutowanych układów można oczywiście poprawić poprzez ich derywatyzację, co jednak komplikuje analizę tych związków chemicznych.³ Z powodu powyższych utrudnień obecnie bardzo rzadko stosuje się tę metodę jonizacji w odniesieniu do dyskutowanych układów.

Wraz z upływem lat w spektrometrii mas powstawały nowe techniki jonizacji, które starano się wykorzystywać w analizie porfirynoidów. Kolejną historycznie techniką jonizacji w spektrometrii mas była jonizacja chemiczna (CI), będąca modyfikacją jonizacji elektronowej. Ze względu na to, że jonizacja chemiczna ma podobne ograniczenia co jonizacja elektronowa, nie poszerzony został zakres stosowalności spektrometrii mas o związki o małej lotności. Pojawiły się natomiast nowe możliwości analityczne związane z jonizacją CI. Metoda EI dawała tylko szczątkowe informacje na temat struktury cząsteczek porfirynoidów, gdyż fragmentacji ulegały tylko podstawniki peryferyjne w pozycjach β i *mezo*. Natomiast metoda CI, choć uważana za dużo mniej destrukcyjną w porównaniu do EI, to w przypadku porfiryn w warunkach jonizacji CI - w obecności gazu reagującego (amoniak, wodór) - dochodzi do redukcji pierścienia makrocyklicznego i bardzo szczególnych reakcji fragmentacji. W oparciu o fragmenty powstałe w wyniku rozpadu cząsteczki w źródle jonów można określić ułożenie jednostek pirolowych obok siebie w cząsteczce. Można powiedzieć więc, że jest to metoda sekwencjonowania tetrapiroli. Istnieje tylko jedno ograniczenie:

jednostki pirolowe muszą się różnić podstawnikami w pozycji β . Dużo więcej informacji na temat reakcji fragmentacji znajdzie się w następnym podrozdziale (str. 32).

Na przełomie lat 60-tych i 70-tych ubiegłego wieku opracowano metodę jonizacji, umożliwiającą identyfikację za pomocą spektrometrii mas związków chemicznych, dla których nie możliwa była analiza za pomocą metod EI i CI. Była to desorpcja polem⁴ (FD), metoda jonizacji wykorzystująca efekt tunelowy, w wyniku którego cząsteczki poddane działaniu wysokiego gradientu pola elektrycznego wykazują tendencję do oddania jednego ze swoich elektronów walencyjnych. Ponieważ jest to łagodna metoda jonizacji, sygnały pochodzące od fragmentacji są obserwowane bardzo rzadko. Dlatego też nie uzyskujemy wielu informacji strukturalnych, a jedynie potwierdzenie masy cząsteczkowej analizowanego związku. Z tego właśnie powodu, tak naprawdę w literaturze nie ma szczegółowych doniesień na temat analizy układów porfiryńowych wykorzystujących tę metodę jonizacji. Co nie oznacza, że nie jest ona stosowana. Wręcz przeciwnie, wystarczy przejrzeć kilka artykułów w czasopismach opisujących syntezę porfiryńoidów, aby się przekonać, że w części eksperymentalnej wśród danych spektroskopowych ujrzymy skrót FD-MS.⁵ Co ciekawe, gdy jeszcze nie istniało dogodne połączenie HPLC-MS (nie istniały metody jonizacji pracujące pod ciśnieniem atmosferycznym) wykonywano wysokosprawną chromatografię, a wydzielone produkty były analizowane za pomocą jonizacji FD.⁶ Można również spotkać się z sytuacją, gdzie desorpcja polem jest używana wtedy, gdy inne znane metody jonizacji zawodzą.⁷

Wykonanie widma FD wymaga od operatora dużego doświadczenia. Jednak pomimo niedogodności związanych z wykonywaniem pomiaru, jonizacja FD jest dla porfiryńoidów wręcz idealna. Porfiryńoidy dzięki swojej unikalnej budowie (duży układ sprzężonych wiązań podwójnych) bardzo łatwo ulegają jonizacji tą metodą. Widma FD są proste i praktycznie pozbawione sygnałów pochodzących z tła. W przypadku porfiryńoidów obserwujemy zwykle jony M^+ , choć istnieją doniesienia literaturowe, gdzie obserwowano jony wielokrotnie naładowane M^{2+} i M^{3+} .^{5b} Jonizacja ta jest, można powiedzieć, "ostatnią deską ratunku" dla badacza, który nie uzyskał zadowalającego wyniku za pomocą obecnie bardzo popularnych metod „sprejowych” pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym (ESI, APCI) i nie ma dostępu do metod opartych na desorpcji laserowej (LDI, MALDI) lub opartych na bombardowaniu próbki za pomocą szybkich atomów (FAB) albo jonów (SIMS).

Zarówno FAB jak i SIMS powstały na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku. Występuje zasadnicze podobieństwo między tymi dwiema metodami jonizacji. Różnią się one jedynie tym, że w przypadku SIMS próbka bombardowana jest wiązką jonów, a w metodzie

FAB wiązką wzbudzonych atomów gazu szlachetnego. Metody FAB i SIMS są zaliczane do tzw. łagodnych metod jonizacji i przeznaczone są głównie dla związków polarnych, które jednocześnie są termicznie nietrwałe. Bardzo szybko jednak wykazano, że metody te dają również możliwość analizy układów porfiryńowych.⁸ Aby stworzyć znacznie korzystniejsze warunki desorpcji jonów próbkę rozpuszcza się w tzw. matrycy, którą mogą być niektóre ciekłe związki chemiczne o niskiej lotności np. alkohol 3-nitrobenzylowy (NBA). Obecność matrycy powoduje, że obserwujemy w widmach MS sygnały z nią związane, jak również istnieje możliwość tworzenia się adduktów analizowanego związku z matrycą. W widmach zwykle obserwujemy kombinację jonów M^{+} i $[M+H]^{+}$. Spotkać można również tzw. klastry czyli jony w formie „sklejonych” kilku cząsteczek, takie jak np. $[2M+H]^{+}$ czy $[3M+H]^{+}$.⁹ Bardzo interesującą pracę opublikowali Schäfer i Budzikiewicz w 2001 roku.¹⁰ Opisali oni zachowanie dwunaładowanych kationowych układów porfiryńowych w warunkach jonizacji FAB. Obserwowali w widmach przeróżne formy jonów: $[M^{2+} - H]^{+}$, $[M^{2+} + e^{-}]^{+}$, M^{2+} , $[M^{+} - H]^{+}$, $[M^{+} + matryca]^{+}$. Co ciekawe, istnieje również możliwość chelacji niektórych jonów metali przez układy porfiryńowe, jeżeli tylko do matrycy dodamy odpowiednią sól metalu.¹¹ W ten sposób możemy analizować za pomocą spektrometrii mas kompleksy metali bez konieczności ich syntezowania. W warunkach jonizacji LSIMS zaobserwowano również reakcję redukcji prowadzącą do powstawania jonów $[M+2H]^{+}$ i $[M+3H]^{+}$.¹² Metody te obecnie straciły na popularności, gdyż zostały w dużym stopniu zastąpione przez znacznie tańsze i prostsze technicznie metody jonizacji pracujące pod ciśnieniem atmosferycznym (np. ESI).

Istnieje jeszcze jedna metoda jonizacji - oprócz metod pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym - intensywnie wykorzystywana w analizie układów porfiryńowych. Jest to laserowa desorpcja i jonizacja próbki wspomagana matrycą (MALDI). Matryca ta musi silnie absorbować promieniowanie o długości fali emitowanej przez laser. Napromieniowanie laserem cząsteczek matrycy powoduje ich wzbudzenie. Można powiedzieć, że matryca stanowi medium pośredniczące w przekazaniu energii do analizowanej substancji i ułatwia jej jonizację. Dzięki tej metodzie można wykonywać widma MS dużych cząsteczek pochodzenia biologicznego, takich jak białka o masach przekraczających nawet 300000 Da. Metoda MALDI została opracowana i rozwinięta przez Karasa i Hillenkampa w połowie lat 80-tych.¹³ Pod koniec tej samej dekady Koichi Tanaka opublikował pracę dotyczącą zastosowania MALDI w analizie dużych cząsteczek jak białka, czy polimery.¹⁴ Podobną pracę, choć nieco później, opublikowali również Karas i Hillenkamp.¹⁵ W 2002 roku Komitet Noblowski

nagrodził Koichiego Tanakę Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii za zastosowanie jonizacji MALDI do analizy dużych biocząsteczek.¹⁶

MALDI zaliczane jest do metod łagodnej jonizacji, gdyż praktycznie nie obserwuje się fragmentacji w widmach MS. MALDI było z powodzeniem stosowane między innymi przy identyfikacji produktów fotochemicznego rozkładu pewnej chloryny, którą stosuje się w terapii fotodynamicznej.¹⁷ Suzuki i wsp. pokazali, że jest to skuteczna metoda w odniesieniu do chlorofili i porfiryn.¹⁸ Ponadto udowodnione zostało eksperymentalnie, że z racji swoich specjalnych własności układy porfiryne mogą być stosowane jako matryca w jonizacji MALDI.¹⁹ A skoro można używać porfiryne jako matrycy, to one same mogą być analizowane bez jakichkolwiek innych dodatków.²⁰ Taką metodę jonizacji nie nazywa się wtedy MALDI, tylko po prostu LDI. Jednak często ze względu na dużą labilność analizowanego związku, aby uzyskać pozytywny rezultat potrzebne jest dobranie odpowiedniej matrycy.²¹ Frauenkron i wsp. w 1997 opublikowali pracę porównującą wyniki uzyskane za pomocą MALDI, FAB i FD w odniesieniu do kilku układów porfiryne.²² Wniosek końcowy wynikający z materiału zamieszczonego w tej pracy był jednoznaczny: wszystkie te metody mają pewne niedoskonałości, ale świetnie spełniają swoje zadanie.

W 2002 roku Szwedzka Akademia Nauk przyznała Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii dwóm osobom za zastosowanie metod łagodnej jonizacji MS w badaniach wielkocząsteczkowych biopolimerów. Wspólnie ze wspomnianym już wyżej Koichim Tanaką uhonorowany został John Fenn - twórca jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym (*Electrospray Ionization*).¹⁶ Prostota i możliwość przenoszenia jonów z roztworu do fazy gazowej sprawiły, że cieszy się ona bardzo dużą popularnością. Mechanizm działania elektrospreju został już dokładnie zbadany, a na ten temat pojawiło się wiele doniesień literaturowych, które w sposób kompleksowy opisują mechanizmy towarzyszące jonizacji próbki.²³ Generalnie jonizacja ta polega na tym, że próbkę rozpuszczoną w polarnym rozpuszczalniku rozpyła się w silnym polu elektrycznym. Kropelki cieczy obdarzane są w ten sposób ładunkiem, a poprzez odparowanie rozpuszczalnika stają się coraz mniejsze. W pewnym momencie krople są tak małe, że dochodzi do ich rozerwania na grupę mniejszych kropelek. Taki kaskadowy proces powstawania coraz to mniejszych kropelek sprawia, że finalnie może dojść do desorpcji jonów z kropli w wyniku działania pola elektrycznego. Ten mechanizm jest skuteczny dla małych cząsteczek, a w ich widmach

ESI-MS obserwuje się na ogół jony pseudomolekularne* $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M-H]^-$, itp. Może też mieć miejsce tzw. wariant „odparowania do sucha”, gdzie powstają częściowo solwatowane jony naładowane wielokrotnie (mechanizm ten dotyczy dużych polarnych cząsteczek, a w widmach MS obserwowane są sygnały jonów typu $[M+nH]^{n+}$). Nemykin i wsp. w przypadku pewnych pochodnych porfiryny zawierających ferrocen w pozycji *mezo* zaobserwowali w warunkach jonizacji ESI i APCI sygnały typu $[M+O+H]^+$, $[M+O_2+H]^+$, a także dosyć nietypowy jon $[M+THF+H]^+$.²⁴ W przypadku wolnych zasad porfirynoidów zwykle obserwujemy jon $[M+H]^+$. W pewnych szczególnych okolicznościach może się zdarzyć, że w wyniku przyjęcia protonu cząsteczki będą się rozpadać do bardziej trwałych jonów z oderwaniem obojętnej cząsteczki, np. poprzez eliminację wody lub alkoholu będą powstawać jony typu $[M-ROH]^+$. Z taką sytuacją zetknęli się Akhigbe i wsp. podczas analizy pewnego porfolaktolu i jego acetalu w warunkach jonizacji elektrosprej.²⁵

W przypadku analizy kompleksów porfirynoidów z metalami mamy ciekawą sytuację. Okazało się bowiem, że źródło jonów ESI działa jak elektrolizer i jest możliwe jednoelektronowe utlenienie do kationorodnika. To właśnie identyfikacja kationorodnika dla kilku kompleksów oktaetyloporfiryny, była pierwszym przypadkiem jonu M^+ , jaki został zaobserwowany w warunkach jonizacji ESI i opisany w literaturze.²⁶ W rzeczywistości to przypadek opisany przez Van Berkela jest też pierwszym opisującym analizę porfiryn za pomocą tej metody jonizacji. Od tamtego czasu metoda elektrosprej z wielu względów odgrywała coraz to większą rolę w analizie dyskutowanych układów. Między innymi dzięki temu, że źródło ESI pracuje pod ciśnieniem atmosferycznym, istnieje możliwość bezpośredniego podłączenia wycieku z kolumny HPLC i analizowanie skomplikowanych mieszanin za pomocą spektrometrii mas. Tego typu analizy z udziałem porfirynoidów były wykonywane już na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku.²⁷ Pomimo że jonizacja ESI jest łagodną metodą jonizacji, spektrometry wyposażone w tego typu źródła posiadają zwykle możliwość fragmentacji wytworzonych jonów, dzięki czemu otrzymujemy dodatkowo pewne informacje strukturalne, na podstawie których możemy identyfikować analizowane związki. Tandemowa spektrometria mas, a to właśnie o niej jest wyżej mowa, była wielokrotnie używana w odniesieniu do porfirynoidów. Tematyce wykorzystania tandemowej spektrometrii mas i rozpadów za pomocą niej obserwowanych, poświęcony będzie następny podrozdział tej rozprawy.

* Termin „jon pseudomolekularny” jest obecnie unikany przez środowiska naukowe zajmujące się spektrometrią mas. Nie mniej jednak nie ma innego dobrego określenia dla dużego zbioru jonów typu $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M-H]^-$ itp., dlatego termin ten został wykorzystany w tej pracy.

Subtelność metody elektrosprej sprawia, że możemy obserwować nawet słabe oddziaływania międzycząsteczkowe. Przykładem wykorzystania metody ESI w tym obszarze jest badanie niekowalencyjnych oddziaływań, pomiędzy małymi oligonukleotydami a kationowymi porfirynami, opisane przez Ramos i wsp.²⁸ Autorzy we wspomnianej pracy przedstawiają jak kompleksowo można wykorzystać spektrometrię mas do opisu oddziaływań typu gospodarz-gość.

W ostatnich latach powstało kilka prac, w których donosi się o tworzeniu w trakcie jonizacji ESI jonów będących wynikiem procesów redoks. Barata i wsp. opisują możliwość generowania metalokoroli z mieszaniny odpowiedniej soli metalu i wolnej zasady korolu w źródle jonów ESI.²⁹ Obserwowali oni tworzenie się kompleksów z jonami Mn^{2+} , Cu^{2+} i Co^{2+} , natomiast nie obserwowali analogicznych sygnałów dla soli Mn^{3+} . Zaproponowany przez Baratę i wsp. mechanizm powstawania takich kompleksów oparty jest na procesach utleniania zachodzących w źródle jonów elektrosprej. Takie procesy nie są czymś szczególnie powszechnym jednak ze względów wspomnianych wyżej, budowa źródła jonów elektrosprej może sprzyjać powstawaniu takich produktów. Ramos i wsp. w 2007 roku zaprezentowali przykład procesów redukcji, jakie zaobserwowali w trakcie analizy kationowej porfiryny.³⁰ Oczekiwali oni, że sól typu MX_3 da głównie podczas analizy sygnał M^{3+} . Tak się też stało, jednak oprócz tego sygnału obserwowali jeszcze sygnały M^{2+} , M^+ i $[M+2H]^+$, które według nich mogą być wynikiem procesów redoks zachodzących w źródle jonów ESI. Oczywiście trudno oczekiwać, że w trybie jonów dodatnich w metalowej kapilarze źródła elektrosprej może dochodzić do efektywnej reakcji redukcji, gdyż warunki są sprzyjające wtedy dla reakcji utlenienia. Wymienieni autorzy postulują raczej, że procesy, w wyniku których powstają obserwowane sygnały zachodzą już po rozpyleniu próbki, a bezpośrednim sprawcą obserwowanych sygnałów są najprawdopodobniej jony jodkowe pełniące w tym przypadku rolę reduktora.

Elektrosprej nie jest jedyną metodą jonizacji pracującą pod ciśnieniem atmosferycznym. Bardzo podobną w działaniu do niej jest jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (z ang. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* - APCI). Różnice istnieją głównie w sposobie jonizacji próbki. W APCI próbka rozpuszczona w rozpuszczalniku organicznym jest rozpylana i ogrzewana w specjalnej dyszy, następnie już w formie gazowej trafia w obszar gdzie dochodzi do wyładowań koronowych, które inicjują cały szereg procesów prowadzących finalnie do jonizacji próbki. Można powiedzieć, że ESI i APCI są względem siebie komplementarne. APCI daje lepsze wyniki dla związków chemicznych o mniejszej polarności. Tak jak w przypadku ESI mamy też możliwość bezpośredniego podłączenia

wycieku z kolumny HPLC i analizowania skomplikowanych mieszanin z wykorzystaniem tej metody jonizacji. Przykładem wykorzystania jonizacji APCI sprzężonej z HPLC w analizie skomplikowanej mieszaniny zawierającej porfiryny może być praca zaprezentowana przez Rosell-Mele i wsp. w 1996 roku.³¹ Autorzy ci porównali również zachowanie spektrometrów przy pomiarach ilościowych z wykorzystaniem źródła ESI oraz APCI i stwierdzili, że w ich konkretnym przypadku APCI oferowało bardziej stabilną i powtarzalną odpowiedź spektrometru niż w przypadku jonizacji ESI. Z kolei Verzegnassi i wsp. analizując mieszaninę tetrapirolowych barwników zwrócili uwagę na to, że źródło APCI w trybie jonów ujemnych pracuje równie wydajnie, jak w trybie jonów dodatnich.³² Dodatkowo, w trybie jonów ujemnych, metoda APCI okazała się być bardziej łagodną metodą jonizacji i w tym dyskutowanym przypadku obserwowano w widmach mniej jonów fragmentacyjnych.

Niedawno ukazał się komunikat opublikowany przez Owena i wsp. opisujący wykorzystanie disiarczku węgla jako efektywnego rozpuszczalnika w analizie nietlonych i niepolarnych związków, w tym również porfiryn z wykorzystaniem źródła APCI.³³ Autorzy ci zapewniają, że użycie CS₂ daje pozytywne efekty nawet dla skwalenu i cholestanu. Jednocześnie dla kilku przypadków porównano wyniki uzyskane z użyciem polarnych rozpuszczalników (MeOH, H₂O) i zauważono, że jony pochodzące z fragmentacji analizowanych związków pojawiały się dużo częściej i wyraźniej z użyciem tych rozpuszczalników.

Ostatnią opisaną przeze mnie metodą jonizacji będzie fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym (APPI). Źródło jonów APPI pracuje w bardzo podobny sposób jak źródło APCI, jednak w tym przypadku nie dochodzi do wyładowań koronowych, a strumień gazów wylatujący z dyszy rozpylającej analit jest naświetlany światłem UV o dużej energii (zwykle kryptonowa lampa wyładowcza 10 eV). Kluczowe znaczenie w procesie jonizacji ma substancja pomocnicza wprowadzana równoległe z próbką do źródła jonów, nazywana dopantem. Jako dopant używa się substancje charakteryzujące się niską energią jonizacji, takie jak toluen lub aceton. Dopant ulega jonizacji pod wpływem lampy, a następnie, w wyniku interakcji z rozpuszczalnikiem lub próbką, dochodzi do jonizacji analizowanego związku. Oczywiście dopant nie jest konieczny, jeżeli chcemy analizować substancje, które charakteryzują się na tyle małą energią jonizacji, ażeby mogły być jonizowane bezpośrednio przez lampę UV. APPI jest stosunkowo młodą metodą jonizacji. Pierwsze doniesienia na temat wykorzystania fotojonizacji w spektrometrii mas pojawiły się w połowie lat osiemdziesiątych dwudziestego wieku wraz z eksperymentami związanymi z Ion Mobility

Mass Spectrometry.³⁴ Tak naprawdę źródła APPI, z którymi mamy dzisiaj do czynienia powstały około roku 2000 i od tego momentu zauważalnie wzrosło zainteresowanie tą metodą jonizacji. Tło historyczne powstawania tego źródła jonizacji, opis jego budowy i istniejących geometrii oraz nieco informacji teoretycznych można znaleźć w artykule przeglądowym z 2003 roku.³⁵

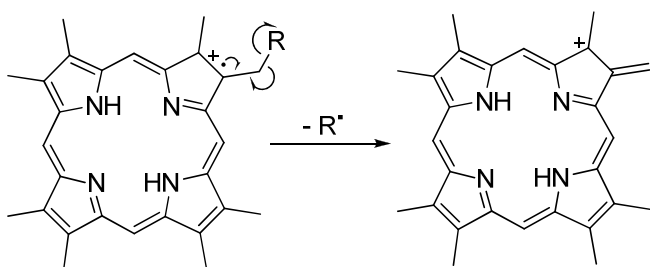
Ze względu na to, że APPI jest młodą techniką jonizacji, nie ma zbyt wielu doniesień literaturowych na temat wykorzystania tego źródła w analizie porfirynoidów. Pierwsze doniesienie literaturowe na ten temat, jakie udało mi się odnaleźć pochodzi z 2002 roku. Richeter i wsp. wykorzystali APPI do charakterystyki oligomerów składających z kilku jednostek porfiryńowych połączonych ze sobą za pomocą jonów palladu.³⁶ APPI jest techniką komplementarną do ESI oraz APCI i daje możliwość analizy niepolarnych układów, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, oferując przy tym niezwykłą czułość. Natomiast wspomniani autorzy pokazali, że jest to również bardzo łagodna metoda jonizacji. Ostatnio ukazało się kilka prac poświęconych analizie układów porfiryńowych w próbkach asfaltenów z wykorzystaniem spektrometrów z analizatorem FT-ICR.³⁷ We wszystkich cytowanych publikacjach autorzy podkreślają większą czułość źródła APPI w porównaniu do innych źródeł pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym w analizie badanych przez nich układów. Qian i wsp. postanowili również porównać odpowiedź aparatu pracującego ze źródłem APPI na konkretne związki.^{37c} W zaprezentowanym przez nich przykładzie można zobaczyć, że źródło APPI wykazuje większą czułość dla kompleksu wanadylowego porfiryny niż kompleksu niklowego.

2.3. Przykłady reakcji fragmentacji obserwowanych dla porfirynoidów w spektrometrii mas

Masa cząsteczkowa analizowanego związku to nie jedyna informacja, którą może dostarczyć spektrometria mas. Dzięki analizie fragmentacji obserwowanych w spektrometrii mas mamy możliwość uzyskania także informacji strukturalnych na temat analizowanych przez nas układów. Badania fragmentacji różnych klas związków są prowadzone od początku istnienia spektrometrii mas. Przebadane zostały ścieżki fragmentacji obserwowane dla różnorodnych klas związków i generowanych w różnych warunkach. Jonizacja EI ze względu na swój destrukcyjny charakter obfituje w reakcje fragmentacji. Natomiast jony generowane przez łagodne metody jonizacji poddaje się fragmentacji za pomocą tandemowych spektrometrów mas np. z wykorzystaniem komory zderzeń w analizatorach typu potrójny kwadrupol. Literatura opisująca fragmentacje porfirynoidów obserwowane w jonizacji EI jest

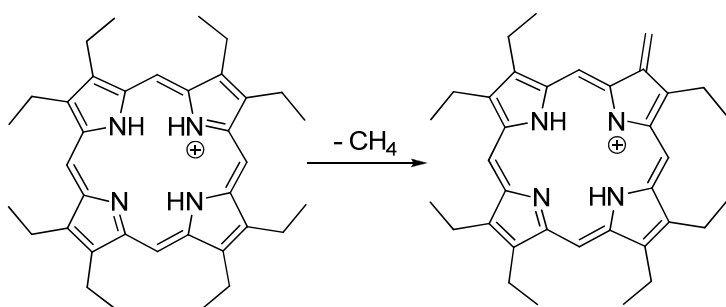
bardzo bogata. Takim obszernym przeglądem dotykającym również tej tematyki, jest jeden z rozdziałów wspomnianego już wcześniej *The Porphyrin Handbook*.² Zawiera on zwięzły opis szeregu reakcji fragmentacji obserwowanych dla różnych porfirynoidów, głównie w warunkach jonizacji EI, zamieszczonych w literaturze przed rokiem 1999.

Generalnie, najbardziej charakterystyczne dla porfiryn jest to, że fragmentacji ulegają tylko podstawniki peryferyjne, natomiast sam makrocykl nie ulega prawie nigdy rozpadowi na mniejsze elementy. Dla przykładu, podstawniki alkilowe w pozycji β pierścienia ulegają homolitycznemu rozpadowi wiązania z utworzeniem odpowiedniego produktu, tak jak pokazano na Schemacie 1.



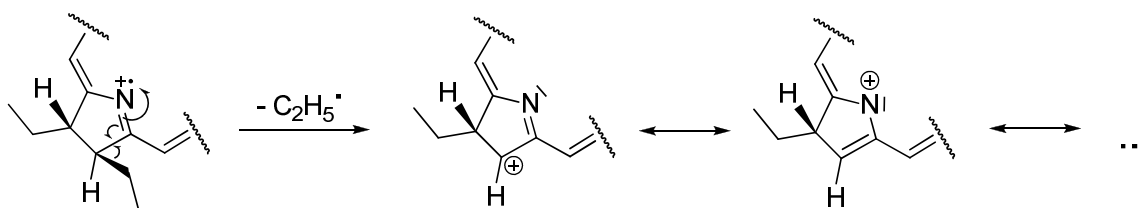
Schemat 1

W przypadku oktaetyloporfiryny mamy do czynienia z ośmioma kolejnymi rozpadowami tego typu z odszczepieniem za każdym razem rodnika metylowego.³⁸ Natomiast jeżeli poddamy fragmentacji jon protonowany oktaetyloporfiryny, otrzymany za pomocą, na przykład, źródła jonów FAB, możemy obserwować również utratę cząsteczki metanu (Schemat 2).³⁹



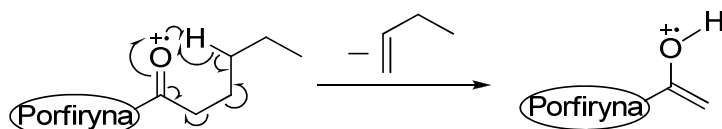
Schemat 2

Nieco inaczej wyglądają tego typu rozpady dla chloryn. W ich przypadku podstawniki alkilowe zaczepione do złącza chlorynowego ulegają całkowitemu oderwaniu z utworzeniem stabilizowanego rezonansem karbokationu (Schemat 3). Taka sytuacja ma miejsce głównie w przypadku izomeru *trans* chloryny. W przypadku izomeru *cis* obserwowana jest głównie eliminacja H_2 ze złącza chlorynowego z utworzeniem odpowiedniej porfiryny.



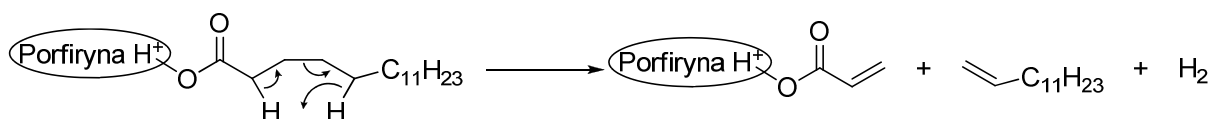
Schemat 3

Przestawione powyżej reakcje fragmentacji prostych grup alkilowych są możliwe dzięki powstawaniu w ich wyniku odpowiedniego produktu stabilizowanego rezonansem. Jeżeli cząsteczka będzie posiadać inne grupy funkcyjne, będziemy obserwować reakcje związane z obecnością tych grup i charakterystyczne dla nich. Fragmentacja innych grup funkcyjnych często przebiega bez żadnego wpływu ze strony układu porfirynowego na ten proces - na przykład przegrupowanie McLafferty'ego obserwowane dla pochodnych acylowych porfiryny. Wystarczy, że łańcuch alkilowy będzie wystarczająco długi ($\geq C_3$, Schemat 4).⁴⁰



Schemat 4

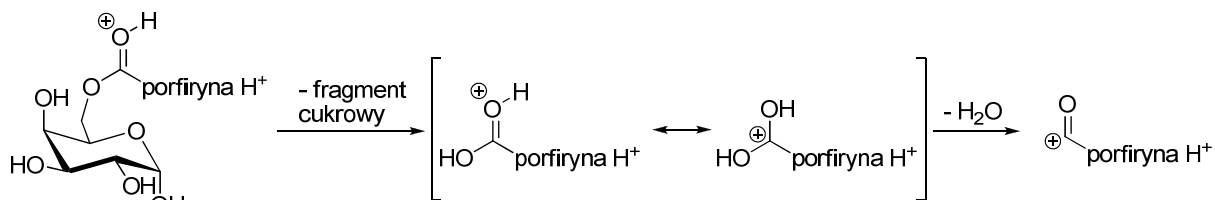
Podobnych przykładów można podać więcej. Domingues i wsp. opisali podobny proces zaobserwowany dla pochodnych tetrafenylporfiryny z dołączonymi długimi łańcuchami kwasów tłuszczowych.⁴¹ W tym jednak przypadku nastąpiło nie przegrupowanie, a eliminacja cząsteczki wodoru z równoczesnym odszczepieniem alkenu (Schemat 5).



Schemat 5

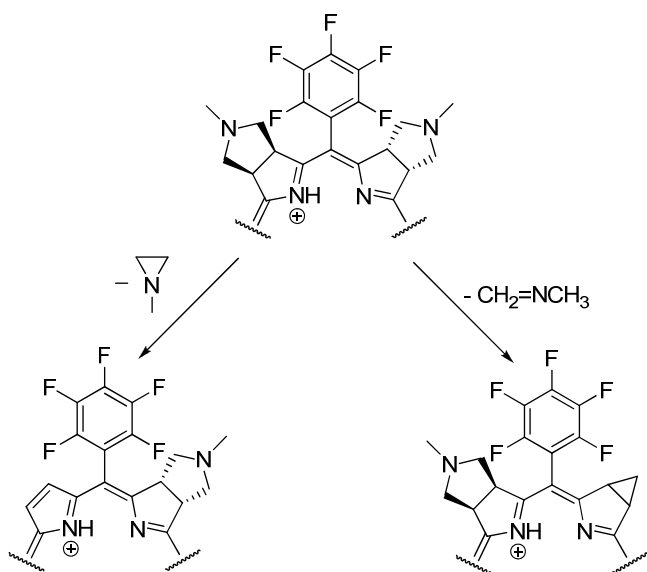
Do układów porfirynowych przyłączano nie tylko różne podstawniki, ale łączono je z różnymi klasami związków, jak na przykład z cukrami, tworząc tzw. związki hybrydowe. Takie glikoporfirynowe połączenia zostały przebadane za pomocą tandemowej spektrometrii mas.⁴² Wszystkie zarejestrowane sygnały w widmach fragmentacyjnych pochodziły z rozpadów biegnących w obrębie jednostki cukrowej połączonej z układem porfirynowym. Zaobserwowano jedynie drobne różnice we fragmentacjach pomiędzy jonami $[M+H]^+$ i $[M+2H]^{2+}$, które były wytwarzane za pomocą jonizacji ESI (Schemat 6). Dla jonu dwukrotnie protonowanego obserwowano po odszczepieniu fragmentu cukrowego dodatkowo eliminację wody, co nie było widoczne w przypadku jonu pojedynczo protonowanego. Taki

przebieg reakcji wskazuje na to, że na pewno jeden z protonów dających dodatni ładunek cząsteczce znajduje się na atomie tlenu grupy estrowej, łączącej porfirynę z jednostką cukrową. Brak takiej reakcji w przypadku jonu pojedynczo protonowanego może wskazywać na to, że głównym miejscem protonowania w cząsteczce jest jeden z atomów azotu układu porfirynowego.



Schemat 6

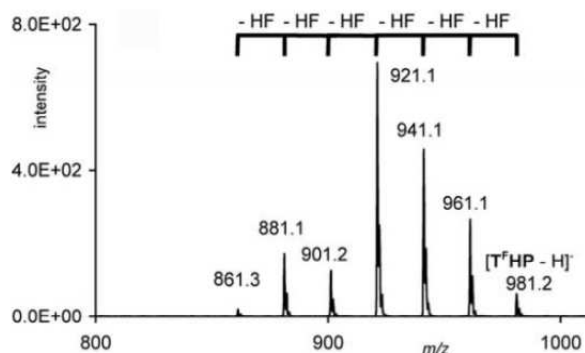
Izquierdo i wsp. opisali w 2004 roku fragmentację chloryn i izobakteriochloryn, które otrzymali na drodze 1,3-dipolarnej cykloaddycji porfiryn z ylidem $\text{CH}_2=\text{N}^+(\text{CH}_3)\text{CH}$.⁴³ Podczas fragmentacji obserwowali oni reakcję *retro* powyższej wersji cykloaddycji prowadzącą do eliminacji N-metyloazyrydyny (Schemat 7). Równocześnie obserwowali reakcję eliminacji N-metylometanoiminy, w wyniku której powstaje pierścień cyklopropanowy na złączu chlorynowym.



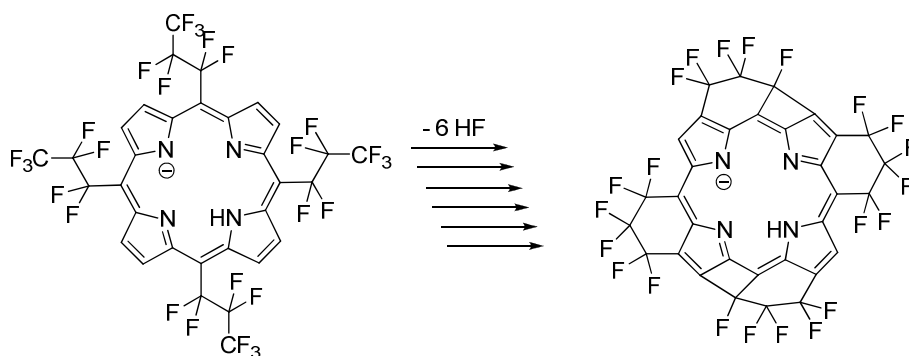
Schemat 7

Drugą grupą reakcji fragmentacji są te procesy, w których bezpośredni udział bierze makrocykl porfirynowy. W 2005 roku Lau i wsp. opublikowali analizę reakcji fragmentacji obserwowanych dla *mezo*-tetrakis(heptafluoropropylo)porfiryny.⁴⁴ Jon deprotonowany $[\text{M}-\text{H}]^-$ tej cząsteczki w wyniku fragmentacji tracił aż 6 cząsteczek HF (Rysunek 2). Autorzy publikacji zaproponowali, że każda kolejna eliminacja odbywa się na drodze oderwania

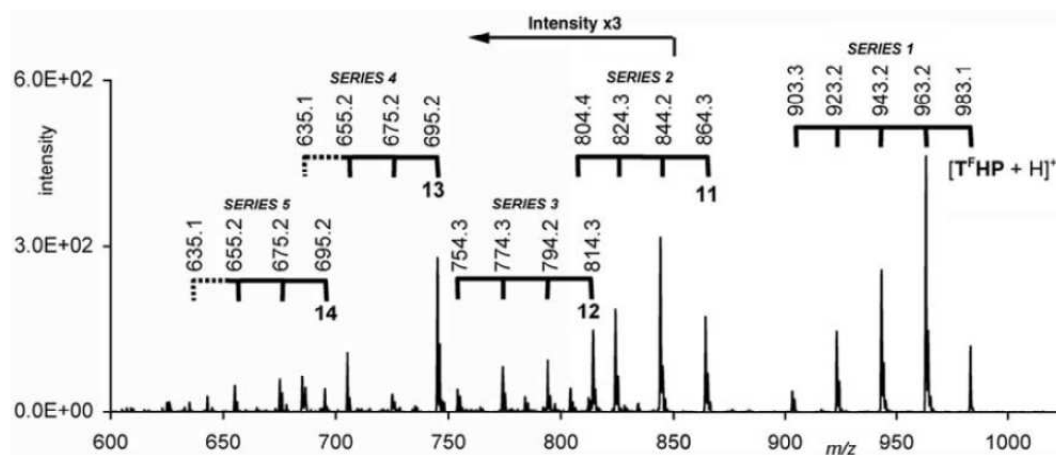
atomu wodoru z pozycji β pierścienia porfiryнового i atomu fluoru pochodzącego z krańcowej grupy perfluorowanego łańcucha alkilowego (Schemat 8).



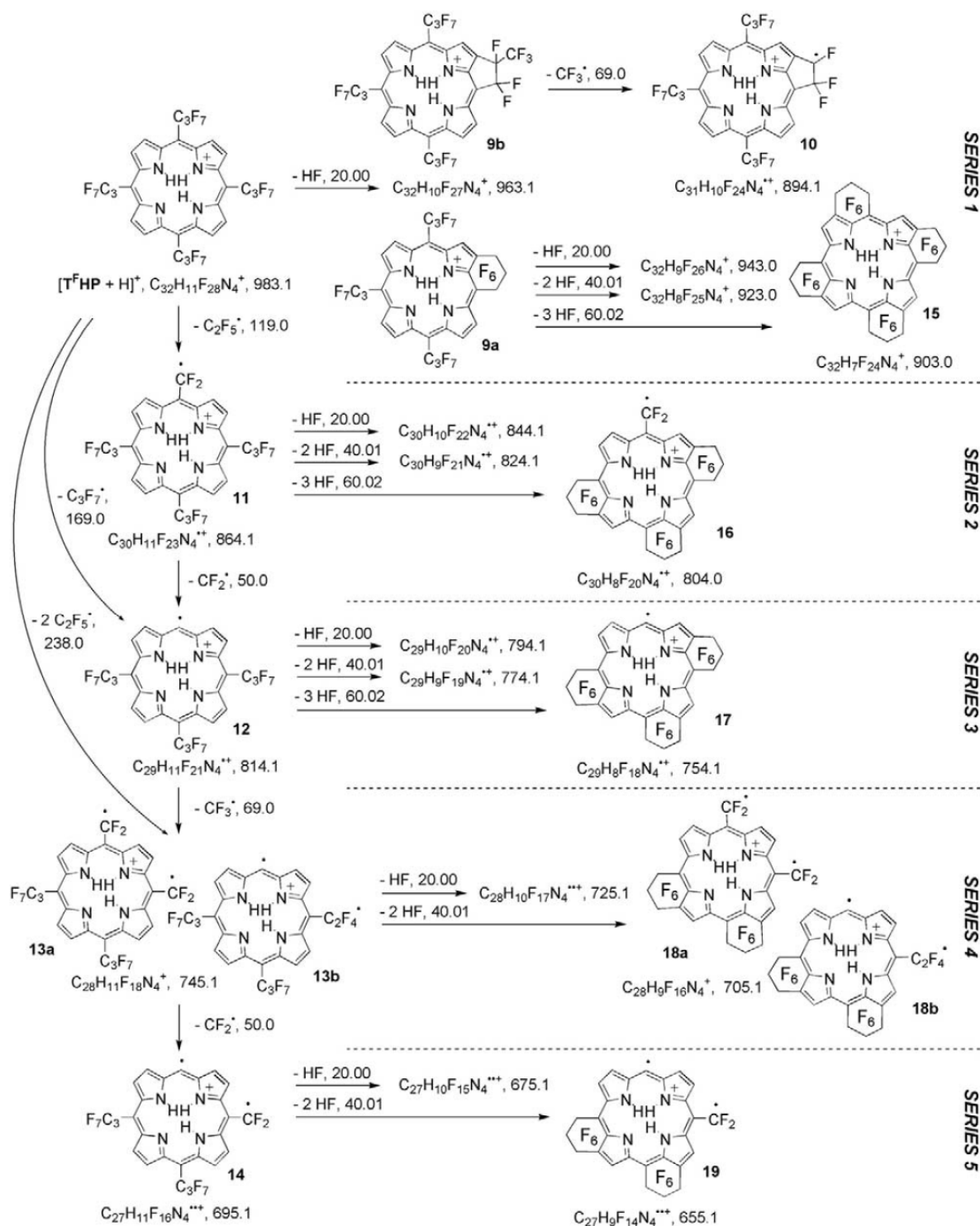
Rysunek 2. Widmo fragmentacyjne jonu $[M-H]^-$ *mezo*-tetrakis(heptafluoropropyl)porfiryny (kopia widma zamieszczonego w pozycji lit.⁴⁴).



Schemat 8



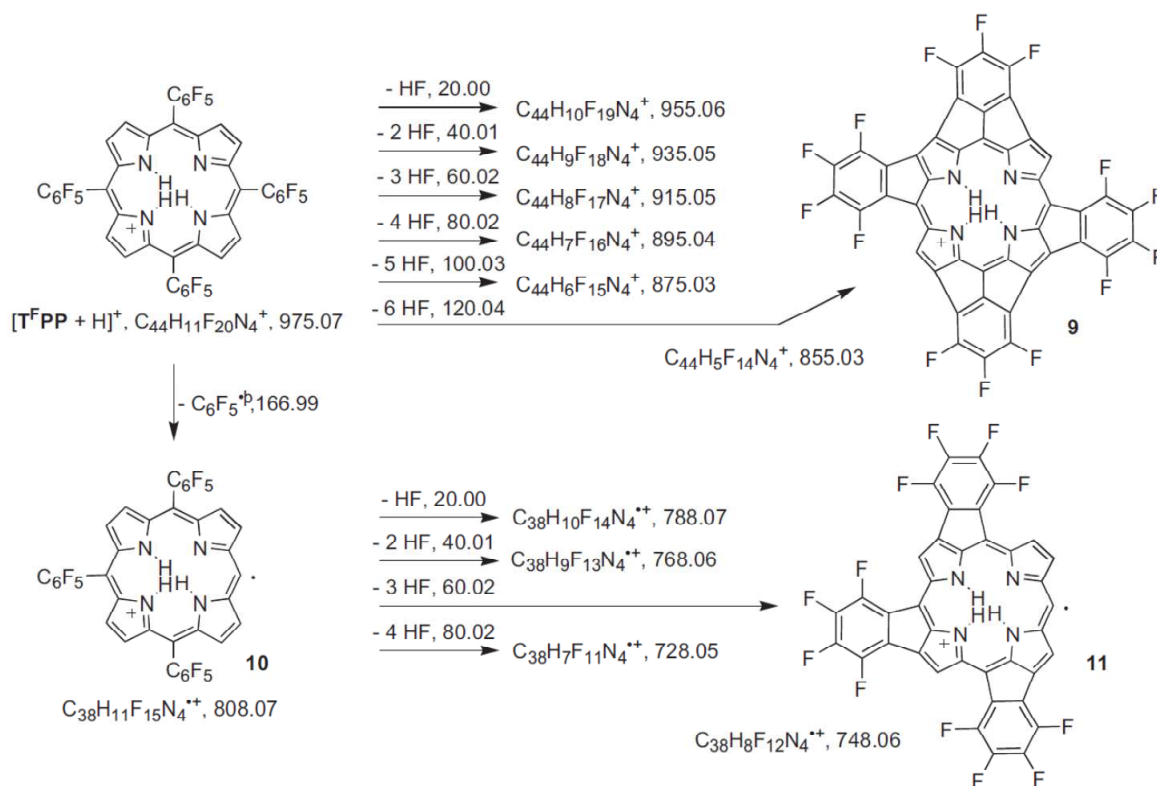
Rysunek 3. Widmo fragmentacyjne jonu $[M+H]^+$ *mezo*-tetrakis(heptafluoropropyl)porfiryny (kopia widma zamieszczonego w pozycji lit.⁴⁴).



Schemat 9. Schemat przedstawiający ścieżki fragmentacji jonu $[M+H]^+$ mezo-tetrakis(heptafluoropropyl)porfiryny (kopia schematu zamieszczonego w pozycji lit.⁴⁴).

W trybie jonów dodatnich, w widmie fragmentacyjnym jonu $[M+H]^+$ zaobserwowano o wiele większą liczbę sygnałów. Bardzo wyraźnie dało się zauważyć kilka serii eliminacji HF, pochodzących od różnych ścieżek fragmentacji (Rysunek 3). Autorzy w sposób przejrzysty rozpisali prawdopodobny przebieg tych wszystkich procesów (Schemat 9).

Dodatkowe ścieżki pojawiły się za sprawą eliminacji rodników $\text{CF}_3\text{CF}_2^\bullet$ i $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2^\bullet$ oraz kombinacji eliminacji tych dwóch rodników z protonowanej cząsteczki. Powstałe w ten sposób kationorodniki fragmentowały dalej poprzez eliminację kolejnych cząsteczek HF.

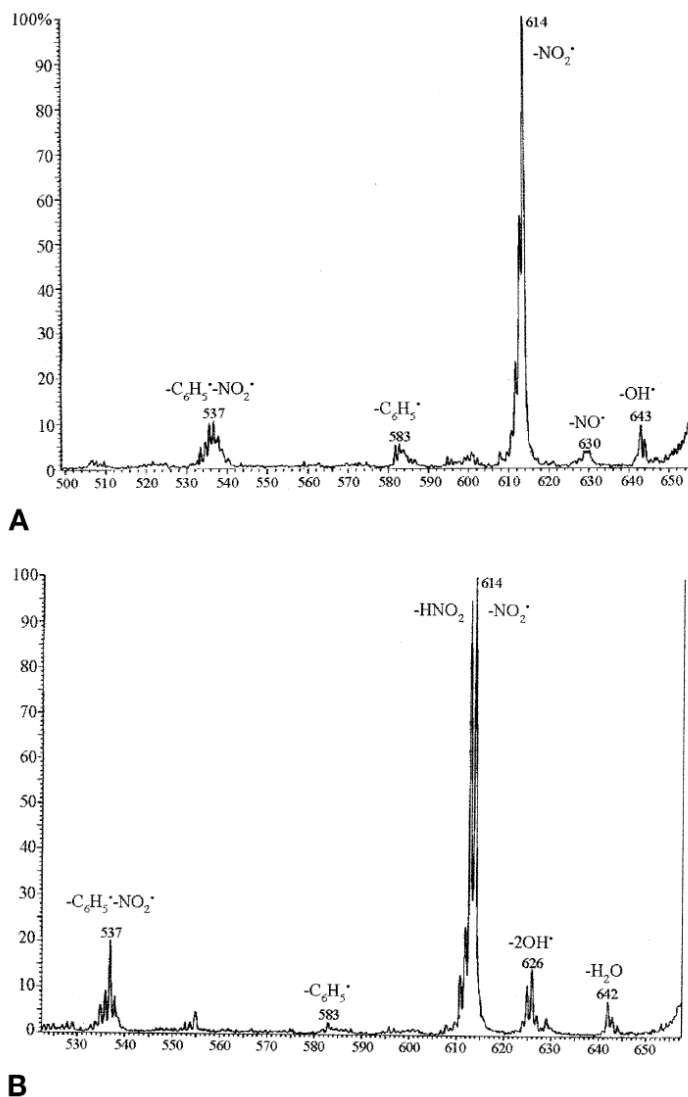


Schemat 10. Schemat przedstawiający ścieżki fragmentacji jonu $[\text{M}+\text{H}]^+$ mezo-tetrakis(pentafluorofenyl)porfiryny (kopia schematu zamieszczonego w pozycji lit.⁴⁵)

W tym momencie chciałbym zwrócić uwagę na bardzo ważną cechę reakcji fragmentacji obserwowanych dla układów porfiryńowych. W ogromnej większości przypadków jony parzystoelektronowe, takie jak np. $[\text{M}+\text{H}]^+$, mogą ulegać rozpadom tylko do innych jonów parzystoelektronowych poprzez eliminacje z układu obojętnej cząsteczki. Wariant rozpadu z homolitycznym rozerwaniem wiązania i utworzeniem rodnika oraz kationu nieparzystoelektronowego (kationorodnika) jest mało prawdopodobny, gdyż procesy takie są najczęściej silnie endotermiczne. Istnieją jednak wyjątki, do których niewątpliwie należy zaliczyć właśnie fragmentacje układów porfiryńowych. Ma to związek z ogromną trwałością powstałych na tej drodze kationorodników dystonicznych,[†] które są stabilizowane układem wiązań podwójnych makrocykla porfiryńowego. Z takim przypadkiem mamy do czynienia w omawianym wyżej schemacie fragmentacji.

[†]ang. *distonic ion* – kationorodnik lub anionorodnik, w którym ładunek i niesparowany elektron są zlokalizowane formalnie na różnych atomach w cząsteczce.

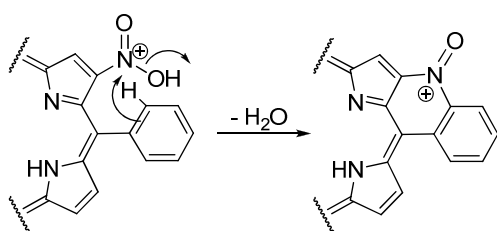
Ci sami autorzy rok później opublikowali opis fragmentacji korolu i porfiryny posiadających tym razem w pozycjach *mezo* perfluorowane pierścienie fenyłowe.⁴⁵ Reakcje fragmentacji przebiegały analogicznie. Następowaly kolejne eliminacje cząsteczki HF, a w trybie jonów dodatnich dodatkowo zaobserwowano drugą serię eliminacji HF, związaną z fragmentacją kationorodnika dystonicznego, powstałego po utracie z jonu protonowanego rodniczka $C_6F_5^+$ (Schemat 10). Podobne obserwacje poczynili Barata i wsp. analizując ścieżki fragmentacji koroli i ich kompleksów z metalami przejściowymi.²⁹



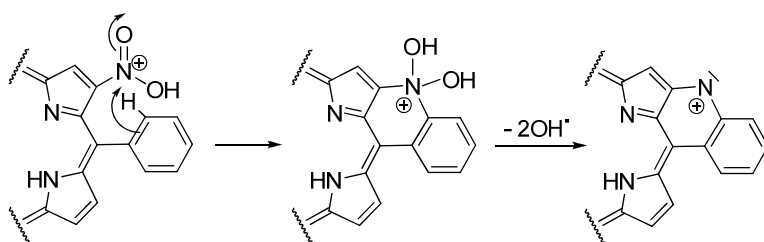
Rysunek 4. Widmo fragmentacyjne jonu $[M+H]^+$ 5-(4-nitrofenylo)-10,15,20-trifenyloporfiryny (widmo A) i β -nitrotetrafenyloporfiryny (widmo B) (kopie widm zamieszczonych w pozycji lit.⁴⁶).

Ciekawy przykład fragmentacji o dużym znaczeniu analitycznym opublikowali w 2001 roku Domingues i wsp.⁴⁶ Zaobserwowali oni drobne różnice w widmach fragmentacyjnych dwóch izomerów nitrotetrafenyloporfiryny: izomeru z grupą nitrową w pozycji para pierścienia fenyłowego (TPPNO₂) oraz izomeru z grupą nitrową w pozycji β makrocykla (TPP β NO₂). Najbardziej charakterystyczne sygnały fragmentacyjne, obserwowane dla

protonowanego sygnału TPPNO₂, to piki pochodzące od utraty rodników OH[•], NO[•] oraz NO₂[•] (Rysunek 4A). Można powiedzieć, że jest to standardowy zestaw sygnałów związanych z obecnością aromatycznej grupy nitrowej w cząsteczce. Inaczej prezentowało się widmo fragmentacyjne izomeru z grupą nitrową w pozycji β cząsteczki. Obserwowano utratę cząsteczki wody, dwóch rodników hydroksylowych, ditlenku azotu oraz wyraźną eliminację HNO₂ (Rysunek 4B). Autorzy publikacji znaleźli proste wytłumaczenie tych różnic. Odosobnienie grupy nitrowej w pierścieniu fenyłowym powoduje, że zachowuje się ona w sposób standardowy, natomiast umiejscowienie grupy nitrowej w pozycji β makrocykla indukuje złożone procesy sprawiając, że obserwujemy inne sygnały w widmie fragmentacyjnym. Schemat 11 pokazuje przypuszczalną ścieżkę reakcji fragmentacji prowadzącą do utraty cząsteczki wody. Z kolei Schemat 12 przedstawia ścieżkę prowadzącą do utraty dwóch rodników hydroksylowych. W obydwu przypadkach dochodzi do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji i powstania sześciocłonowego pierścienia zawierającego atom azotu pochodzącego od grupy nitrowej, która traci jeden lub obydwa atomy tlenu w wyniku tego procesu.

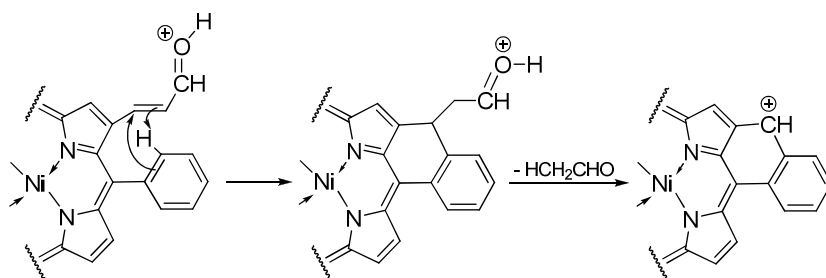


Schemat 11



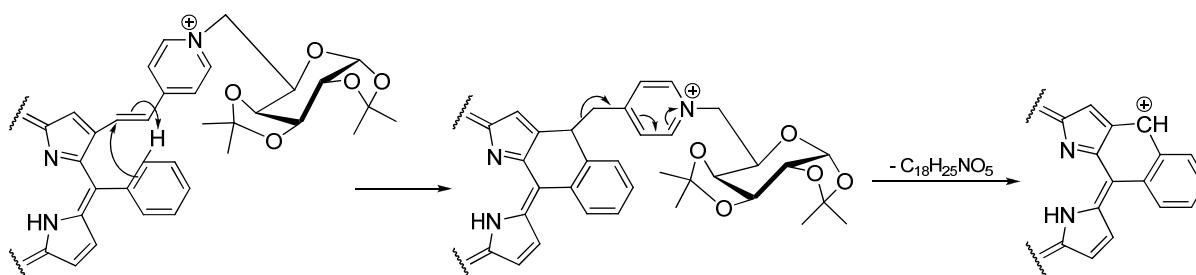
Schemat 12

Ci sami autorzy w publikacji z 2002 roku zaprezentowali kilka podobnych przykładów wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z udziałem innych grup funkcyjnych.⁴⁷ Schemat 13 przedstawia przebieg takiej reakcji cyklizacji w przypadku podstawnika propenalowego w pozycji β cząsteczki porfiryny. Odszczepieniu ulega aldehyd octowy i tworzy się bardzo trwały kation stabilizowany rezonansem.



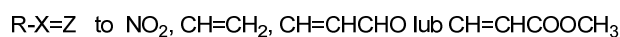
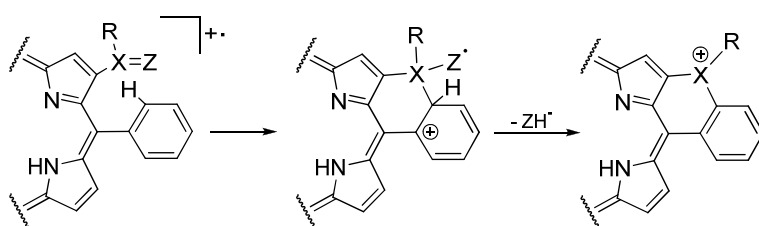
Schemat 13

Obojętnie jak duży będzie podstawnik w pozycji β i jeśli tylko posiada wielokrotne wiązanie sprzężone z układem porfirynowym będzie zachodzić reakcja fragmentacji według dyskutowanego schematu. Silva i wsp. w opublikowanej w 2006 roku pracy zaprezentowali fragmentację takiego dość dużego podstawnika zawierającego jednostkę cukrową i pierścień pirydynowy połączony z grupą winylową znajdującą się w pozycji β . Zaobserwowali i w tym przypadku w widmie fragmentacyjnym sygnał charakterystyczny dla takiego schematu rozpadu (Schemat 14).



Schemat 14

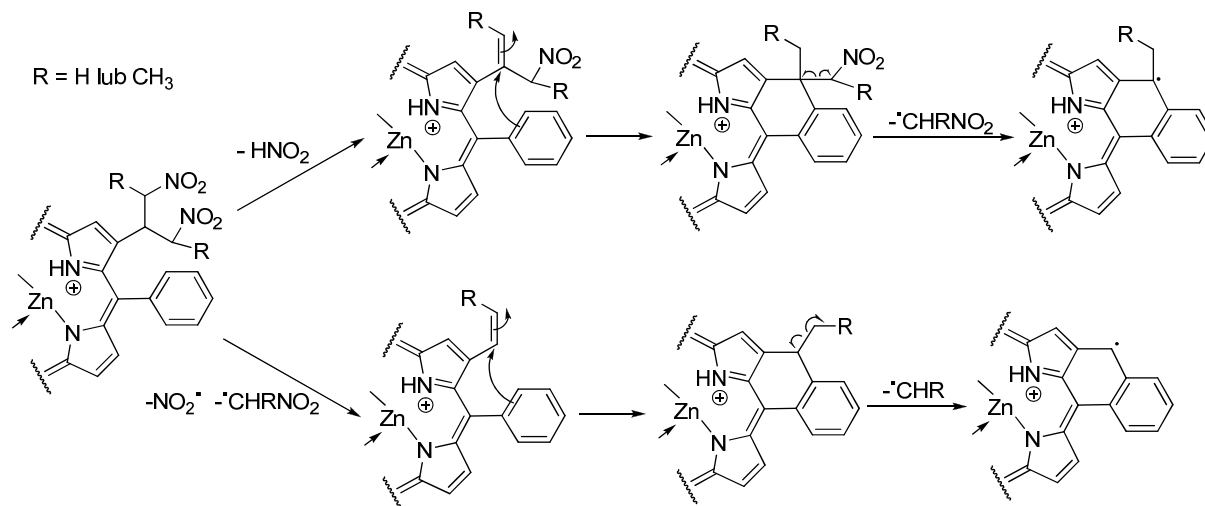
W sposób analogiczny zachowują się kationorodnik porfiryn, z tą różnicą, że po cyklizacji oderwaniu ulega rodnik. Poniżej przedstawiony został ogólny schemat dyskutowanej reakcji w przypadku tych jonów nieparzystoelektronowych.



Schemat 15

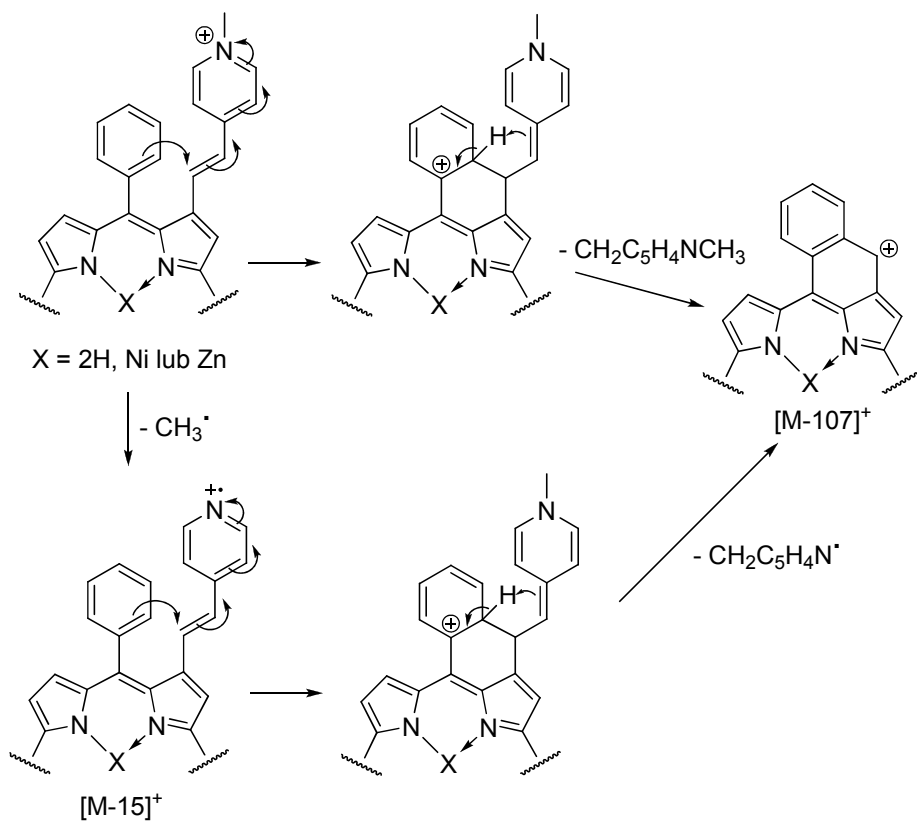
Następna praca, w której opisano reakcje fragmentacji podstawników umiejscowionych w pozycji β dotyczy zachowania się grupy 1,3-dinitroalkilowej.⁴⁸ Dzięki obecności grup nitrowych tak rozbudowany podstawnik prezentował bardziej bogate możliwości fragmentacji. Dwie przedstawione ścieżki fragmentacji (Schemat 16) prowadziły finalnie do

wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, tak jak miało to miejsce w poprzednich przykładach. Różnica polegała na tym, że tutaj powstawał kationorodnik dystoniczny, którego centrum rodnikowe, tak jak kation w prezentowanych wyżej przykładach, może być stabilizowane układem wiązań podwójnych makrocykla.

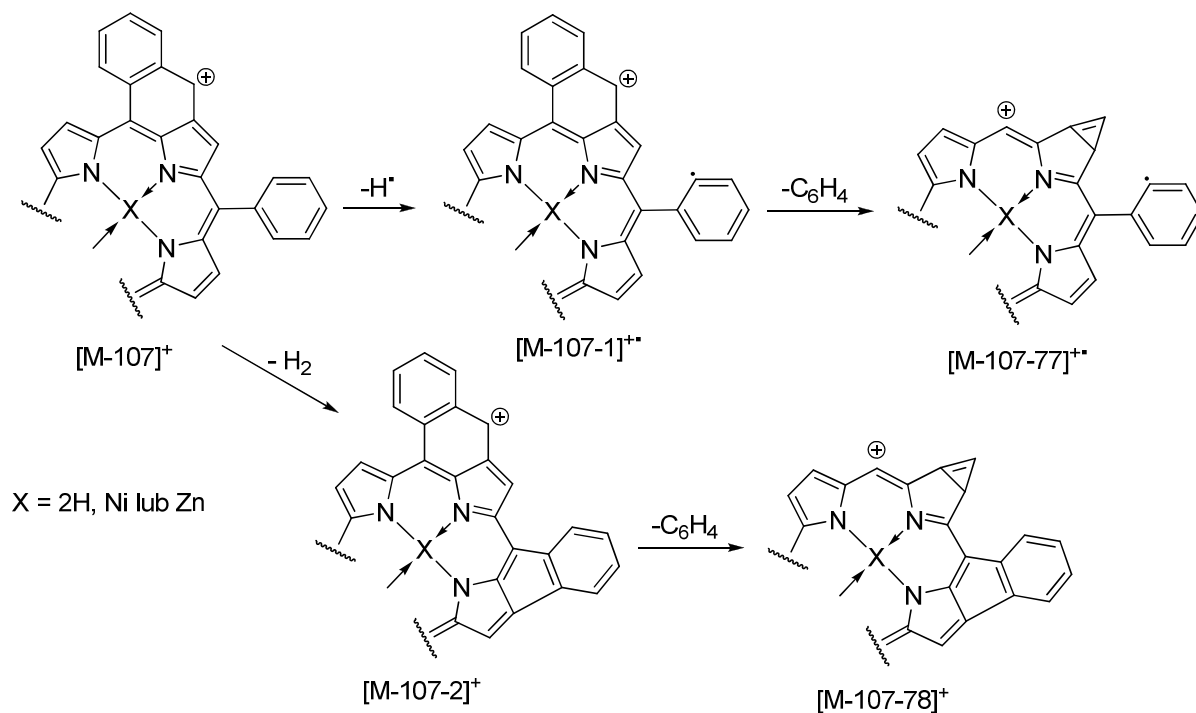


Schemat 16

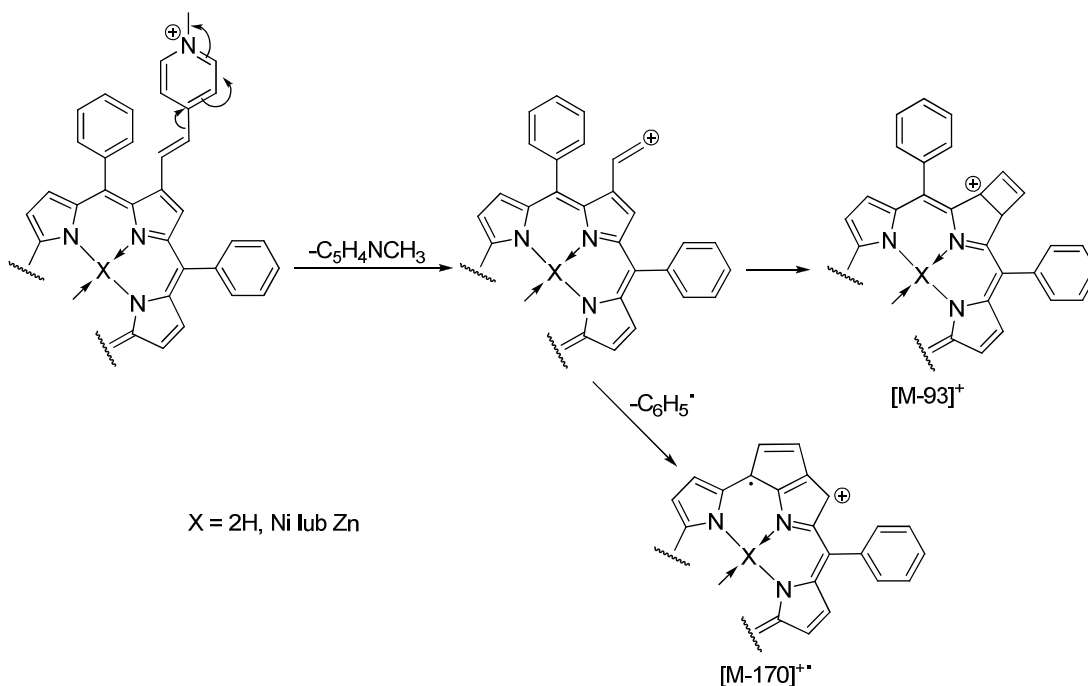
W 2007 roku ukazała się kolejna publikacja podejmująca zagadnienie związane z fragmentacją podstawników znajdujących się w pozycji β -pirolowej.⁴⁹ Autorzy tej publikacji podjęli się bardziej dogłębnej analizy fragmentacji w oparciu o układ zawierający zmetylowany pierścień pirydynowy zaczepiony do podstawnika winylowego znajdującego się w pozycji β -pirolowej. Dla tego konkretnego przykładu autorzy zaproponowali dwie ścieżki fragmentacji prowadzące do tego samego produktu (jonu $[M-107]^+$), będącego wynikiem wewnątrzcząsteczkowej reakcji cyklizacji z utworzeniem stabilizowanego rezonansem kationu (Schemat 17). Autorzy obserwowali też dalsze reakcje fragmentacji. Utworzony na drodze wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji jon fragmentował dalej, tracąc pierścień fenylowy (Schemat 18). Dodatkowo, widmo fragmentacyjne jonu molekularnego ujawniało jeszcze jedną możliwą ścieżkę fragmentacji. Najprawdopodobniej może też dochodzić do oderwania ugrupowania metylopirydylowego i cyklizacji z utworzeniem pierścienia czterocłonowego. Dla tak powstałego jonu autorzy zaobserwowali jeszcze możliwość utraty rodnika fenylowego. Całą tę ścieżkę fragmentacji prezentuje Schemat 19.



Schemat 17

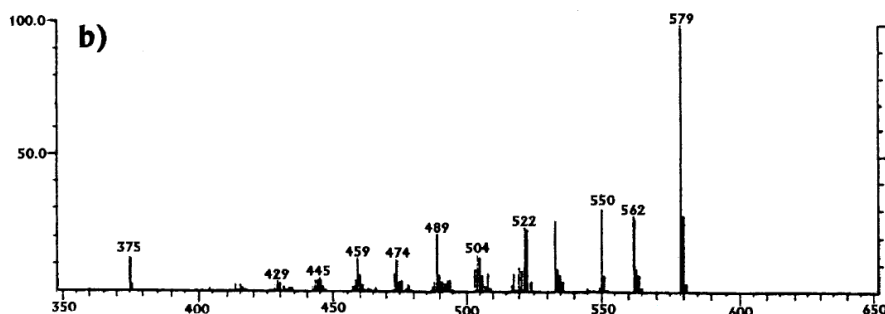


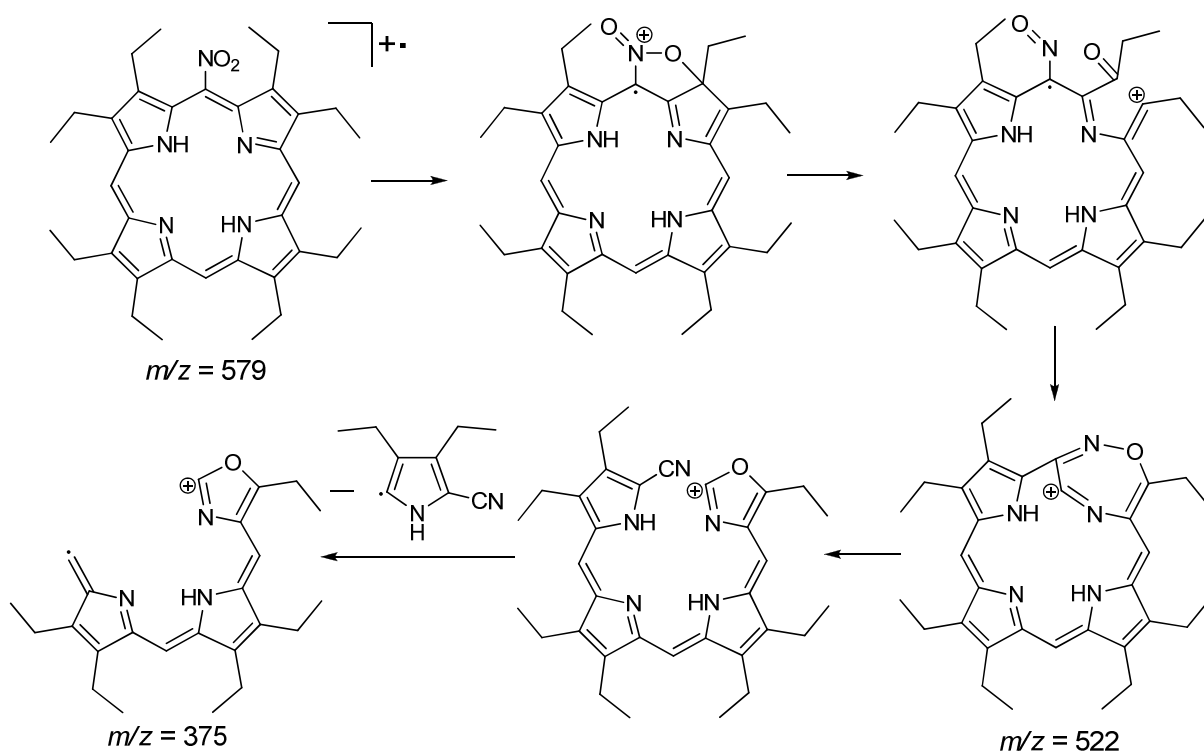
Schemat 18



Schemat 19

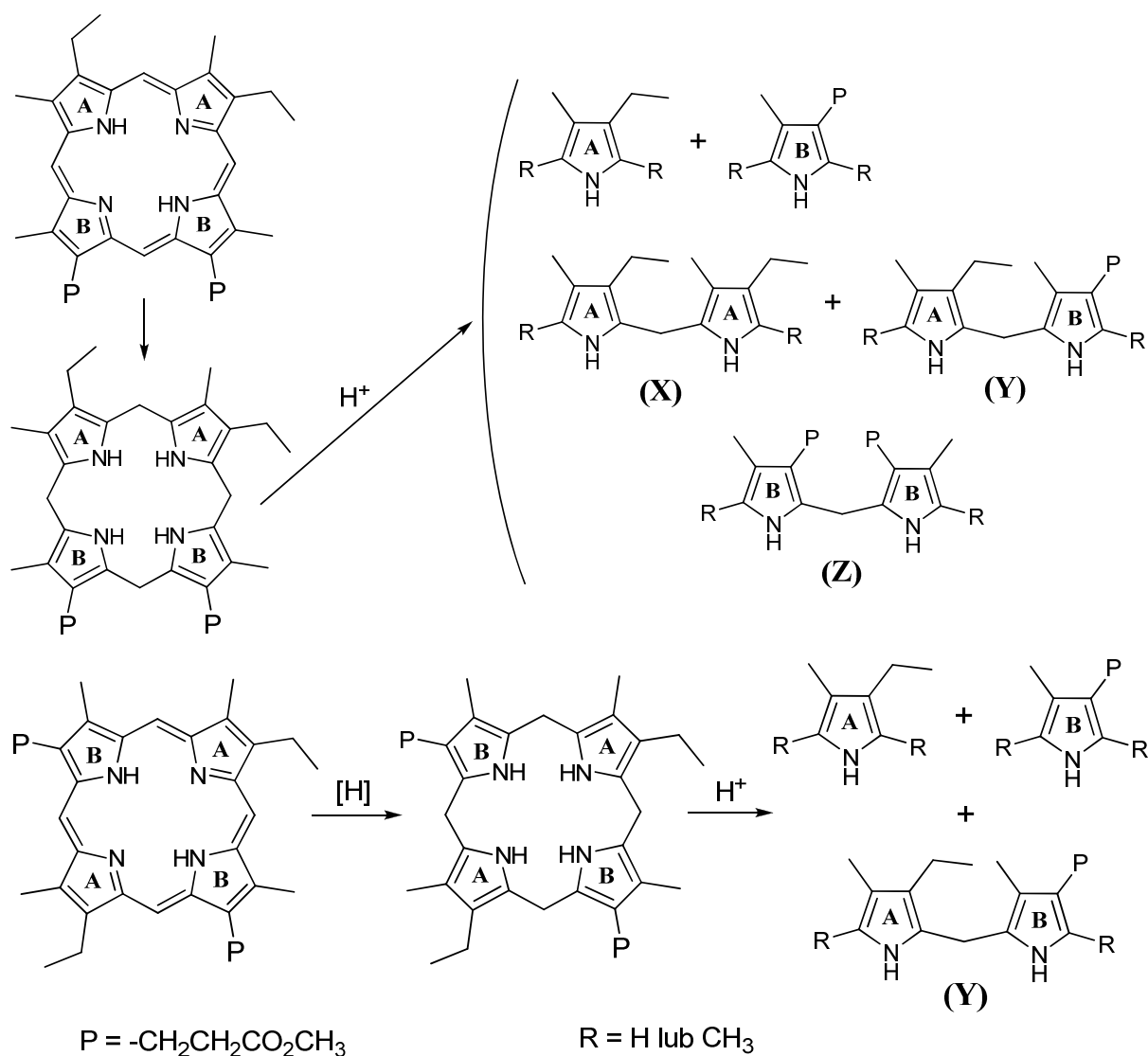
Na samym początku tego podrozdziału wspomniałem, że makrocykl porfiryrowy prawie nigdy nie ulega fragmentacji. W pewnych szczególnych przypadkach postuluje się rozpięcie makrocykla i fragmentację na mniejsze elementy. Takie rozpięcie makrocykla porfiryny i fragmentację zaobserwowali Laycock i wsp. dla *mezo*-nitrooktaetyloporfiryny.⁵⁰ Zaproponowali oni ścieżkę reakcji fragmentacji prowadzącą do dyskutowanego produktu (Schemat 20). Według tych autorów w wyniku dość skomplikowanych przekształceń dochodzi do „wypięcia się” jednej z jednostek pirolowych w postaci rodnika i utworzenia kationorodnika dystonicznego, obserwowanego w widmie EI przy $m/z = 375$ (Rysunek 5). Analogiczny sygnał dla cząsteczki nie posiadającej grupy nitrowej nie był obserwowany w widmie EI.

Rysunek 5. Widmo EI 5-nitrooktaetyloporfiryny (kopia widma zamieszczonego w pozycji lit.⁵⁰).



Schemat 20

Takim szczególnym przykładem fragmentacji makrocykla porfiryнового na mniejsze elementy jest wspomniana już wcześniej metoda sekwencjonowania tetrapiroli w warunkach jonizacji chemicznej. Shaw i wsp. opisali jakie informacje strukturalne można pozyskać wykorzystując jonizację chemiczną w analizie tej klasy związków.⁵¹ Dla przykładu, podczas analizy estru dimetylowego mezoporfiryny IX i estru dimetylowego mezoporfiryny II, otrzymano w wyniku fragmentacji takie same rodziny jonów monopirolowych, ale w rodzinie jonów dipirolowych wystąpiły duże różnice. Jak pokazuje Schemat 21 dla mezoporfiryny II możliwa jest jedna rodzina jonów dipirolowych (Y), a dla mezoporfiryny IX – aż trzy (X, Y, Z). Dla rodziny Y w przypadku obu mezoporfiryn możliwe są po dwa izomery, co jednak nie ujawnia się w widmie, ponieważ masy fragmentów są takie same. Mezoporfiryna IX jest tetrapirolem typu AABB, natomiast mezoporfiryna II jest tetrapirolem typu ABAB i, jak widać, na podstawie widma CI można ustalić, z którym z izomerów mamy do czynienia.



Schemat 21. Fragmentacja estru metylowego mezoporfiryny IX (wyżej) i mezoporfiryny II (niżej).

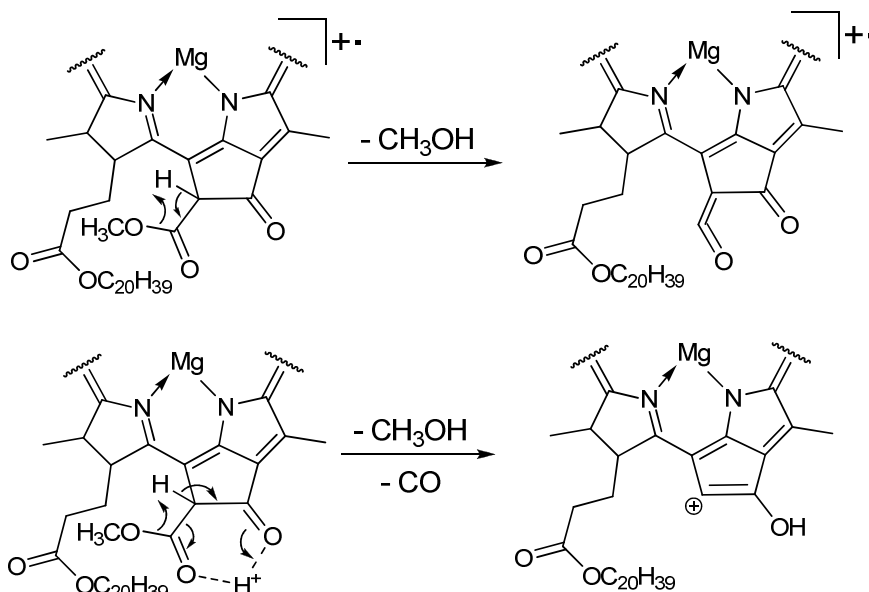
Kolejnym zagadnieniem, które chciałbym poruszyć w ramach tego podrozdziału mojej rozprawy doktorskiej jest fragmentacja układów bardziej złożonych, takich jak na przykład chlorofile. Tematyka związana z chlorofilami pojawia się bardzo często w literaturze dotyczącej spektrometrii ze względu na znaczenie tych związków. Obszerny opis fragmentacji tej klasy związków zawiera między innymi praca Grese i wsp., którzy z wykorzystaniem jonizacji FAB i tandemowej spektrometrii mas przeanalizowali ścieżki fragmentacji chlorofilu *a* i *b*, bakteriochlorofilu *a* oraz fragmentacje odpowiednich feofityn[‡].⁵² Autorzy ci opisali pokrótce, jakich głównych jonów fragmentacyjnych można oczekiwać w widmie CID chlorofilu *a* (Tabela 1).

[‡] Feofityny to pochodne chlorofilu pozbawione atomu magnezu.

Tabela 1. Opis widma fragmentacyjnego chlorofilu *a* (kopia tabeli zamieszczonej w pozycji lit.⁵²).

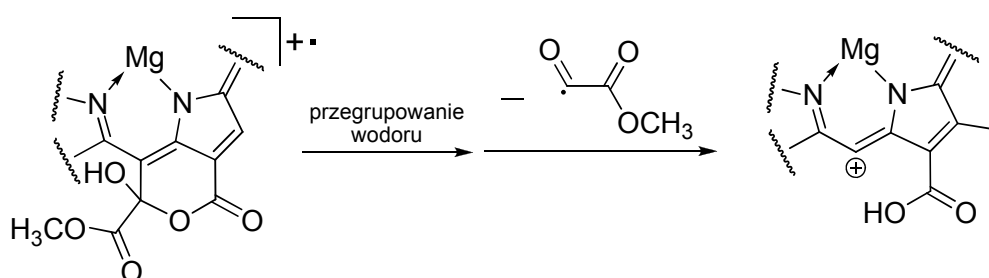
<i>m/z</i>	Relative abundance	Assignment
892		$M^{+\bullet}$
877	3	$[M - \cdot CH_3]^+$
860	2	$[M - \cdot CH_3OH]^+$
833	2	$[M - \cdot COOCH_3]^+$
614	100	$[M - C_{20}H_{38}]^{+\bullet}$
599	4	$[M - C_{20}H_{38} - \cdot CH_3]^+$
583	5	$[M - C_{20}H_{38} - HOCH_3]^{\bullet+}$
569	4	$[M - C_{20}H_{38} - \cdot COOH]^+$
555	16	$[M - C_{20}H_{38} - \cdot COOCH_3]^+$ or $[M - \cdot CH_2COOC_{20}H_{39}]^+$
540	7	$[M - \cdot CH_2CH_2COOC_{20}H_{39}]^+$
527	4	
509	6	
495	3	$[M - \cdot CH_2COOC_{20}H_{39} - CO - HOCH_3]^+$
481	27	$[M - \cdot CH_2CH_2COOC_{20}H_{39} - CO - HOCH_3]^+$
467	10	$[M - \cdot CH_2CH_2COOC_{20}H_{39} - CO - HOCH_3 - 14]^+$
453	7	
439	4	

Cząsteczka chlorofilu, z racji swojej skomplikowanej budowy, prezentuje bogatą fragmentację (Tabela 1). Nie ma potrzeby przytaczania tutaj kompleksowego opisu ścieżek fragmentacji, ale postaram się zwrócić uwagę na pewne istotne elementy tego opisu. Grese i wsp. zauważyli pewne różnice we fragmentacji pomiędzy jonami $M^{+\bullet}$ i $[M+H]^+$. W widmie obserwowano jednocześnie obydwa te jony, przez co trzeba się liczyć ze znacznym wkładem jonu izotopowego zawierającego węgiel ^{13}C sygnału $M^{+\bullet}$ do jonu protonowanego. Mimo to dało się wyraźnie zauważyć, że w przypadku jonu protonowanego sygnały jonów fragmentacyjnych pochodzących od utraty CH_3OH i $C_2H_4O_2$ ($-CH_3OH -CO$) są bardziej intensywne niż dla kationorodnika. Łatwo jest to zjawisko wytłumaczyć uwzględniając wpływ protonu na tę ścieżkę fragmentacji (Schemat 22).



Schemat 22

W tej samej publikacji opisano reakcję fragmentacji hydroksylaktonowej pochodnej chlorofilu, nieobecną w przypadku innych pochodnych. W wyniku tej fragmentacji dochodzi do przegrupowania atomu wodoru i odszczepienia rodnika C₃H₃O₃[•], tak jak pokazuje Schemat 23.

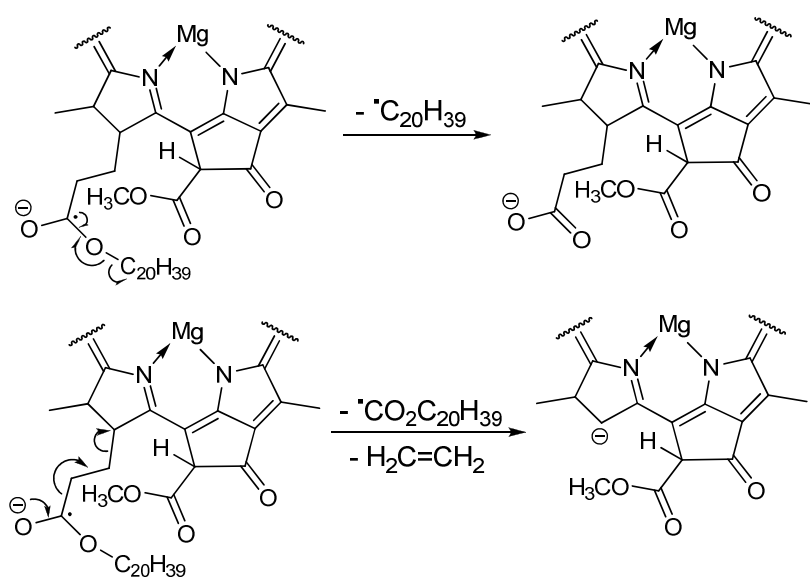


Schemat 23

Inne spojrzenie na analizę chlorofilu za pomocą MS ukazują prace opublikowane przez Verzeznassi i wsp.^{32, 53} Wykonali oni analizy całej gamy chlorofilu i ich pochodnych wykorzystując źródło APCI. Zaobserwowali, że w trybie jonów dodatnich często głównym sygnałem obecnym w widmie jest nie jon [M+H]⁺, lecz sygnał fragmentacyjny, odpowiadający utracie łańcucha fitylowego [M+H-C₂₀H₃₈]⁺. Jednocześnie zauważyli, że w trybie jonów ujemnych obserwuje się głównie anionorodnik, któremu towarzyszą czasami jony fragmentacyjne, ale w mniejszym stopniu, niż to ma miejsce w jonach dodatnich, co już było wspomniane we wcześniejszym rozdziale tej rozprawy.

2.4. Porfirynoidy – spektrometria mas w trybie jonów ujemnych

Wzmianki na temat spektrometrii mas jonów ujemnych w odniesieniu do różnych metod jonizacji już pojawiały się w poprzednich podrozdziałach mojej pracy. Postanowiłem w tym krótkim podrozdziale zgromadzić pozostałe elementy tego zagadnienia, żeby pokazać, że istnieje możliwość skutecznego analizowania wielu układów porfiryńowych właśnie w trybie jonów ujemnych. Dominująca większość pomiarów wykonywanych za pomocą spektrometrii mas dotyczy analiz, w których rejestruje się jony dodatnie. Wynika to z faktu, że dominująca do niedawna metoda jonizacji EI dostarcza niemal wyłącznie jonów dodatnich (wyjątki są nieliczne). Dopiero pojawienie się jonizacji chemicznej dało możliwość wytwarzania, a tym samym badania jonów ujemnych. Istnieje kilka doniesień, w których wykonywano pomiary jonów ujemnych z wykorzystaniem źródła CI w odniesieniu do układów porfiryńowych.⁵⁴ Jednak pomiary tego typu nie upowszechniły się ze względu na zbyt niską lotność porfiryń. Dużo częściej spotyka się doniesienia, w których wykorzystywano technikę FAB lub LSIMS. Wspomniana już przeze mnie praca dotycząca analizy chlorofilu i jego pochodnych przedstawia dodatkowo przykłady fragmentacji anionorodnika chlorofilu *a* uzyskanego za pomocą jonizacji FAB.⁵² Główny sygnał w widmie fragmentacyjnym anionorodnika obserwowany przy m/z 613 pochodzi od utraty łańcucha fitylowego, w wyniku której powstaje anion kwasu karboksylowego. Autorzy obserwowali również sygnał powiązany z utratą całego podstawnika zawierającego fragment fitylowy i przyłączonego do złącza chlorynowego z utworzeniem stabilizowanego przez pierścień chlorynowy anionu obserwowanego przy m/z 541 (Schemat 24).



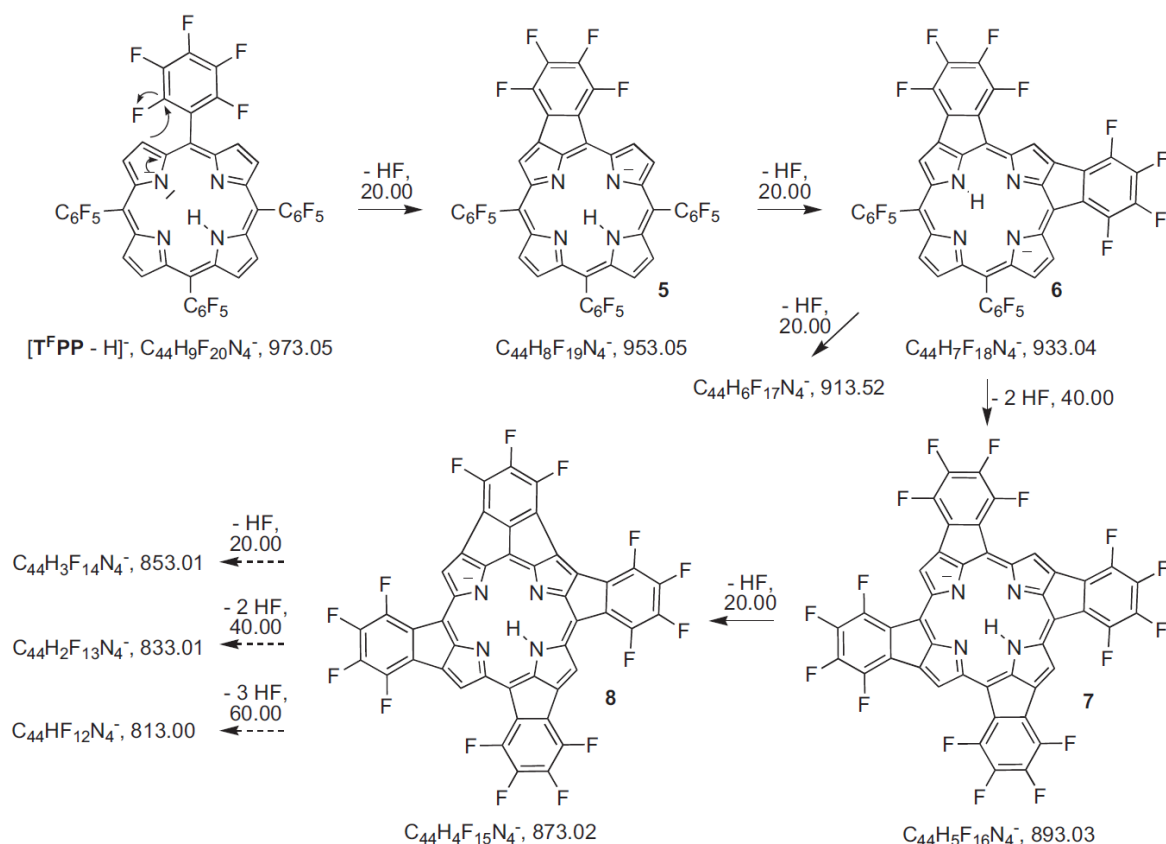
Schemat 24

Bardzo wiele doniesień literaturowych, opisujących jony ujemne obserwowane za pomocą spektrometrii mas, dotyczy kompleksów porfirynoidów z metalami przejściowymi. Wynika to z tego, że kompleksy z niektórymi metalami wykazują tendencję do generowania trwałego anionorodnika. Przykładem może być praca opublikowana przez Rubino i wsp. gdzie wykorzystując jonizację FAB przebadano kompleksy tetrafenylporfiryny (TPP) typu TPP(M)-X (gdzie X to aniony Cl⁻, I⁻, ClO₄⁻) z żelazem i manganem.⁵⁵ Obserwowano nie tylko sygnały pochodzące od jonów [TPP(M)]⁻, ale również od jonów [TPP(M)-X]⁻, czyli cząsteczek, które nie utraciły ligandu X podczas jonizacji. Potwierdzało to łagodny charakter metody jonizacji użytej do otrzymania tych jonów. Równie wydajna i łagodna okazała się technikę elektrosprej wykorzystana w analizie kompleksów korolu z metalami przejściowymi opisaną przez Baratę i wsp.²⁹

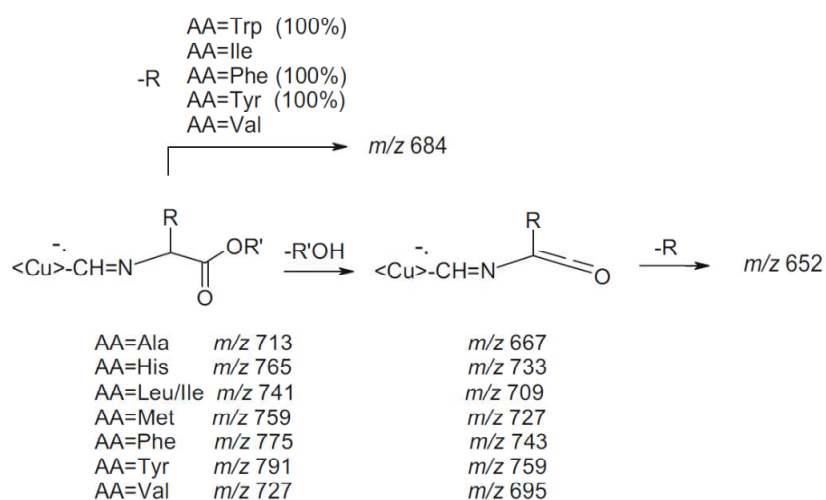
Na początku lat 90-tych poprzedniego wieku pojawiły się metody jonizacji pracujące pod ciśnieniem atmosferycznym, które ostatecznie zrewolucjonizowały obszar spektrometrii mas związany z jonami ujemnymi. Można było od tamtej pory w bardzo prosty sposób, z dużą wydajnością uzyskiwać widma związków w trybie jonów ujemnych. Generalnie należy podkreślić jedną ważną rzecz związaną z dyskutowanymi związkami. W przypadku wolnych zasad porfirynoidów z dużą łatwością jony ujemne tworzą głównie korole. Zostało pokazane, że korole charakteryzują się dużo większą kwasowością niż na przykład porfiryny, stąd dużo łatwiej tworzą jony ujemne.⁵⁶ Oczywiście uzyskanie jonów ujemnych dla porfiryn nie jest niemożliwe. Wystarczy, że układ będzie posiadał podstawniki elektronoakceptorowe, które zwiększą jego kwasowość. Mogą to być opisane już przez mnie porfiryny z podstawnikami heptafluoropropylowymi w pozycji *mezo*,⁴⁴ jak również układy posiadające perfluorowane pierścienie fenyłowe. Wcześniej opisałem fragmentację porfiryny z perfluorowanymi pierścieniami fenyłowymi w pozycji *mezo* obserwowane dla jonu protonowanego generowanego za pomocą jonizacji ESI. Dla jonu deprotonowanego ścieżka fragmentacji przebiega analogicznie: również dochodzi do wielokrotnej eliminacji cząsteczki HF (Schemat 25).⁴⁵

Bardzo interesującą pracę dotyczącą spektrometrii mas jonów ujemnych opublikowali Denekamp i wsp.⁵⁷ Otrzymali oni szereg koroli skompleksowanych miedzią i połączonych z estrami aminokwasów. Następnie wykorzystali oni zdolność kompleksów korolu do generowania anionorodnika podczas jonizacji i wykonali fragmentację uzyskanych na tej drodze jonów. Ponieważ w przypadku porfirynoidów fragmentacji ulegają głównie podstawniki peryferyjne, którymi w tym przypadku były przyłączone do korolu w pozycji β -pirolowej estry aminokwasów, wspomniani autorzy mogli obserwować rozpady indukowane

przez anionorodnik w obrębie przyłączonych ugrupowań. Uzyskanie podobnego efektu bez takiego połączenia chemicznego byłoby niemożliwe.

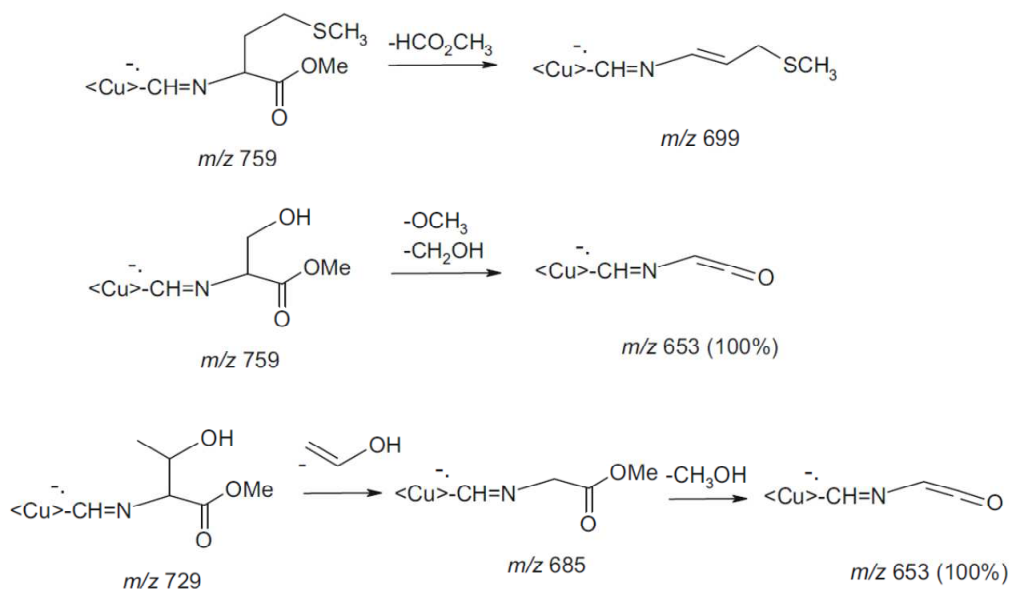


Schemat 25. Fragmentacja jonu [M-H]⁻ mezo-pentafluorofenyloporfiryryny (kopia schematu zamieszczonego w pozycji lit.⁴⁵).



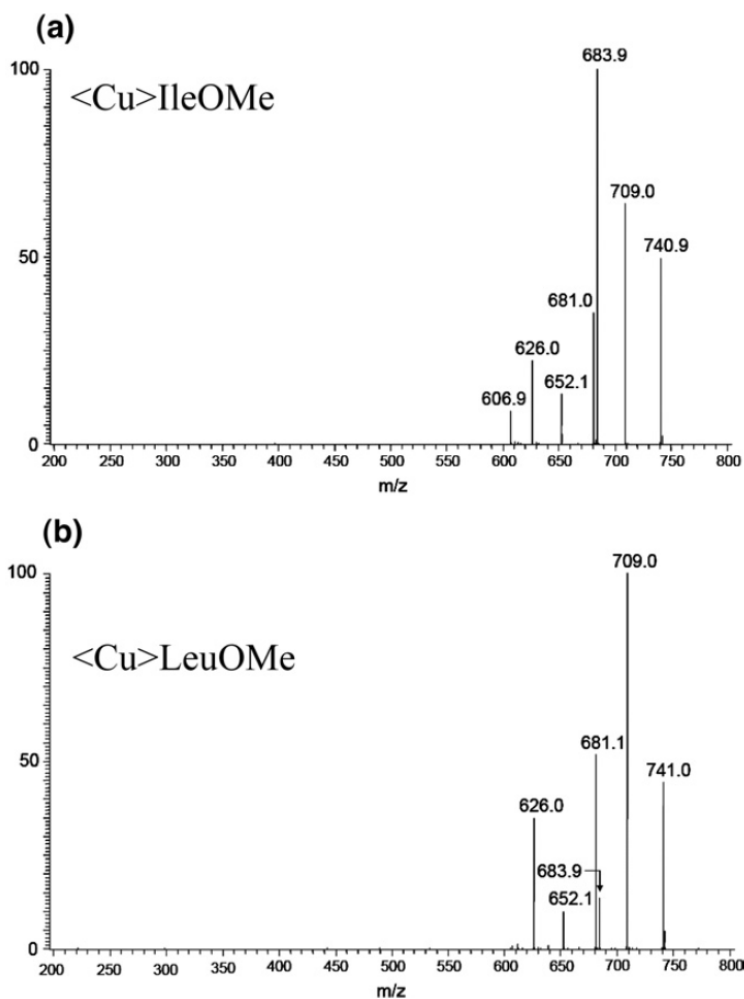
Schemat 26. Fragmentacje anionorodnika korolu połączonego z różnymi estrami aminokwasów (kopia schematu zamieszczonego w pozycji lit.⁵⁷).

Ze względu na zachowanie się podczas fragmentacji podzielono przebadane aminokwasy na dwie grupy: na te, które w wyniku fragmentacji wykazywały tendencję do rozpadu homolitycznego z odpadaniem rodnika R^{\cdot} , oraz na aminokwasy, które fragmentowały poprzez eliminację obojętnej cząsteczki alkoholu (Schemat 26). Schemat 27 natomiast prezentuje niektóre inne reakcje fragmentacji obserwowane dla diskutowanych połączeń chemicznych. Pokazana jest między innymi eliminacja estru metyloвого kwasu mrówkowego w przypadku metioniny i eliminacja formy enolowej aldehydu octowego w przypadku treoniny.



Schemat 27. Kilka reakcji fragmentacji obserwowanych dla różnych połączeń korolu z estrami aminokwasów (kopia schematu zamieszczonego w pozycji lit.⁵⁷)

Ponadto zauważono bardzo istotną różnicę w widmach fragmentacyjnych wykonanych za pomocą pułapki jonów dla pochodnych zawierających reszty leucyny i izoleucyny. Na widmach widać wyraźnie, że sygnał pochodzący od eliminacji rodnika butylowego obserwowany przy *m/z* 684 jest dużo bardziej intensywny w przypadku izoleucyny (Schemat 28). Stosunek sygnałów $M^{\cdot-} / [M-C_4H_9]^{\cdot-}$ dla leucyny i izoleucyny wynosi odpowiednio 3 i 0,5. Obserwacja ta ma duże znaczenie diagnostyczne i może być w przyszłości wykorzystywana do rozróżniania tych izomerycznych aminokwasów.



Schemat 28. Widma fragmentacyjne jonów M^+ uzyskane dla pochodnej korolu zawierającej resztę izoleucynową (a) oraz pochodnej zawierającej resztę leucynową (b) (kopie widm zamieszczonych w pozycji lit.⁵⁷).

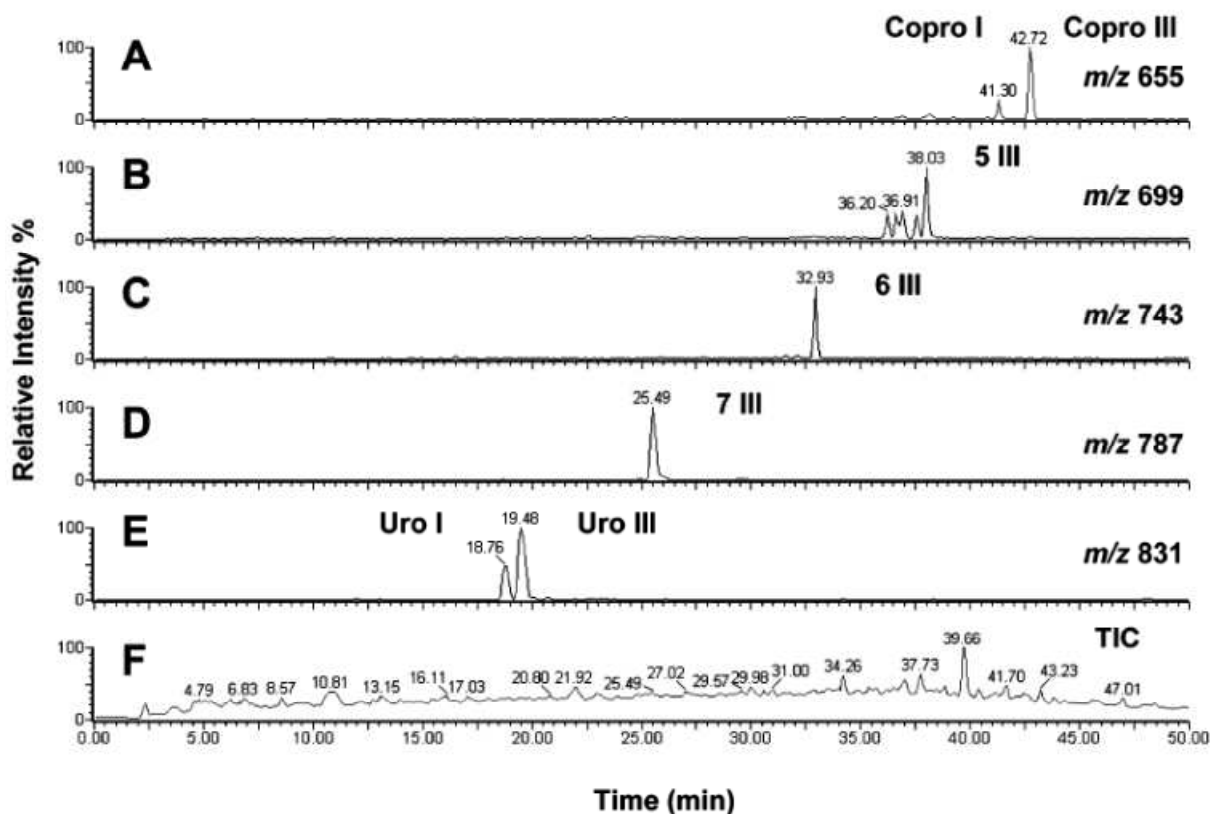
2.5. Przykłady stosowania technik HPLC-MS i HPLC-MS/MS w analizie złożonych mieszanin zawierających porfirynoidy

Sprzężenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas pozwoliło analizować w sposób bezpośredni złożone mieszaniny. Przed pojawieniem się technik jonizacji pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym analiza mieszanin zawierających porfirynoidy wiązała się zwykle z wydzieleniem poszczególnych składników i zbadaniem wyizolowanych frakcji za pomocą wybranej techniki spektrometrii mas.⁶ Po powstaniu technik pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym ten problem został rozwiązany - wyciek z kolumny chromatograficznej kieruje się bezpośrednio do spektrometru mas. Takie połączenie oferuje nam również możliwość bezpośredniej fragmentacji jonów uzyskanych w trakcie analizy, jeżeli tylko posiadamy tandemowy spektrometr mas.

Kompletując literaturę związaną z porfirynoidami i opisującą techniki jonizacji pracujące pod ciśnieniem atmosferycznym zauważyłem, że w zastosowaniach HPLC-MS techniki ESI i APCI są wykorzystywane praktycznie tak samo często. W przypadku mniej polarnych związków zdecydowano się na APCI ze względu na zakres stosowalności tej metody jonizacji. Jednak generalnie obydwie techniki spisują się całkiem dobrze w tego typu analizach. Oczywiście na dobór odpowiedniej metody jonizacji wpływ ma wiele czynników. Najważniejszym z nich jest wykorzystywana w analizie faza ruchoma, gdyż trzeba pamiętać, że nie w każdych warunkach dojdzie do jonizacji próbki. Mam tu na myśli głównie jonizację elektrosprej, która wymaga polarnego rozpuszczalnika do jonizacji próbki. Wykonanie analizy w układzie faz normalnych z wykorzystaniem techniki ESI mija się więc z celem, gdyż faza nie zjonizuje próbki. Jonizacja APCI jest pozbawiona tego ograniczenia, jednak ze względu na konieczność grzania roztworu w źródle jonów związki termolabilne mogą ulegać rozkładowi podczas jonizacji. Nie natknąłem się na przykłady analiz HPLC-APPI-MS, jednak charakter tej metody jonizacji jednoznacznie wskazuje na to, że bez problemu będzie można dokonywać analiz zarówno w odwróconym jak i normalnym układzie fazy ruchomej.

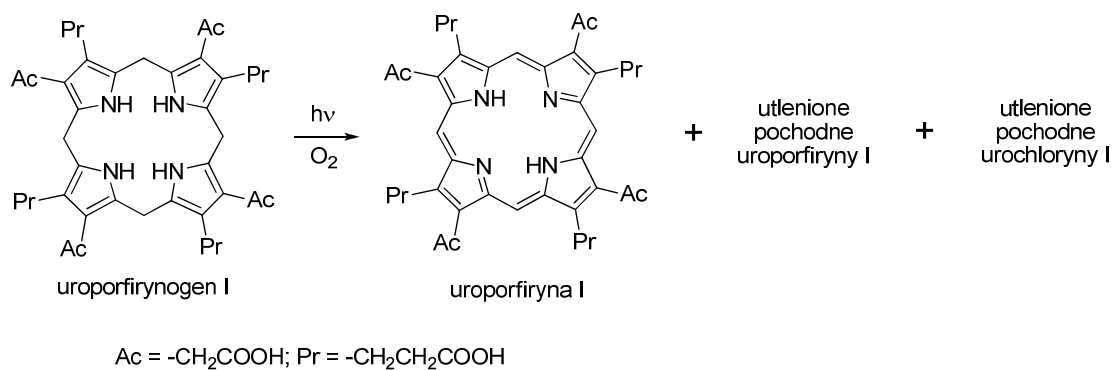
Dominująca większość analiz HPLC-MS z obszaru porfirynoidów dotyczy próbek o pochodzeniu naturalnym. Takim przykładem jest analiza HPLC-ESI-MS wykonana przez Lim i wsp. mieszaniny porfiryn wyekstrahowanych z wątroby myszy zatrutowanej dioksyną powodującą porfirię.⁵⁸ Porfirią jest chorobą związaną z zaburzeniami działania enzymów w szlaku syntezy hemu. Jeżeli któryś z enzymów w szlaku tej syntezy nie funkcjonuje prawidłowo, dochodzi do kumulowania się w komórkach prekursorów, które nie uległy przemianie w produkt katalizowany przez określony enzym. Jednym z fragmentów szlaku syntezy jest przejście od uroporfirynogenu do koproporfirynogenu poprzez kilka reakcji dekarboksylacji katalizowanych przez enzym dekarboksylazę. Uroporfirynogen posiada 8 grup karboksylowych, natomiast koproporfirynogen 4. Rysunek 6 przedstawia chromatogramy masowe otrzymane podczas wspomnianej wyżej analizy. Wyekstrahowano z całkowitego chromatogramu jony odpowiadające poszczególnym produktom kolejnych przemian związanych z konwersją uroporfirynogenu do koproporfirynogenu, które w wyniku utlenienia uległy przekształceniu w odpowiednie porfiryny. Mamy w tej analizowanej próbce obydwa izomery uroporfiryny, pochodną zawierającą 7 i 6 grup karboksylowych (7III i 6 III), kilka izomerów zawierających 5 grup karboksylowych (5III) oraz obydwa izomery koproporfiryny. W próbce kontrolnej nie było tych porfiryn, co jednoznacznie wskazuje na to, że dioksyna podawana myszy wywołała zaburzenia w szlaku syntezy hemu, a uzyskany wynik analizy jest tego dowodem. Dodatkowo obecność porfiryn typu I jest kolejnym

objawem stanu chorobowego, gdyż porfiryny tego typu pojawiają się tylko w warunkach patologicznych, takich jak na przykład porfiria erytropoetyczna.

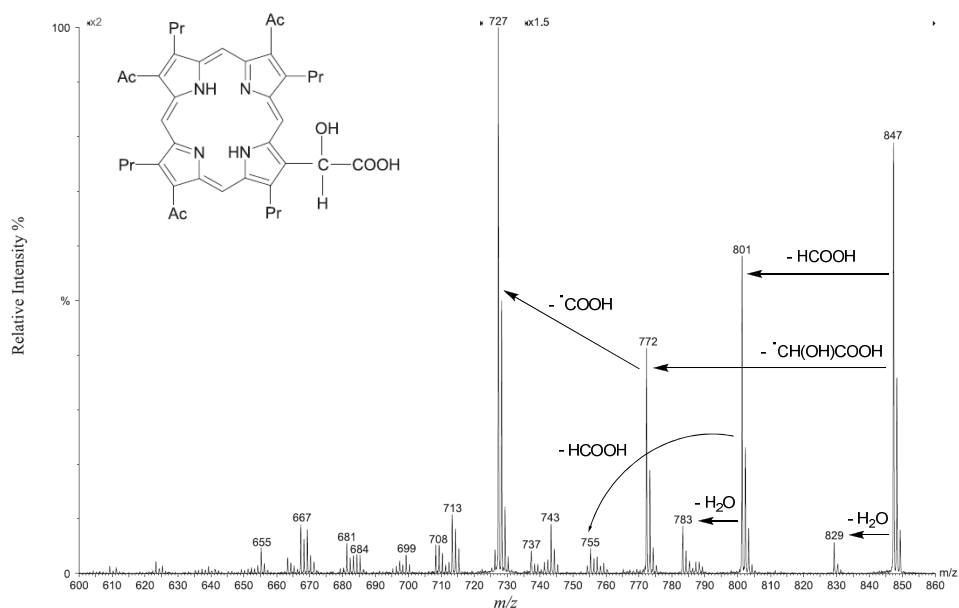


Rysunek 6. Chromatogramy masowe jonów $[M+H]^+$ dla kilku związków związanych z przemianą uroporfirynogenu w koproporfirynogen (kopia rysunku zamieszczonego w pozycji lit.⁵⁸)

Ogromną zaletą sprzężenia HPLC ze spektrometrem mas jest możliwość fragmentacji jonów obserwowanych w trakcie analizy. Pozwala nam to zdobyć dodatkowe informacje na temat struktury analizowanej, nieznannej substancji lub uzyskać potwierdzenie zakładanej struktury cząsteczki. Dla przykładu, Danton i wsp. wykonali analizę HPLC-MS mieszaniny hydroksylowanych pochodnych uroporfiryny i urochloryny powstałych na drodze fotochemicznego utlenienia porfirynogenu (Schemat 29).⁵⁹ Głównym produktem utlenienia była uroporfiryna zidentyfikowana na podstawie czasu retencji i widma fragmentacyjnego wzorca wykonanego przy okazji wcześniejszych analiz przeprowadzanych przez wspomnianych badaczy. Pozostałe produkty utlenienia również zidentyfikowano na podstawie czasów retencji, jednak z racji tego, że nikt nie prezentował wcześniej widm fragmentacyjnych tych związków, autorzy zdecydowali się dokonać opisu tych widm.



Schemat 29

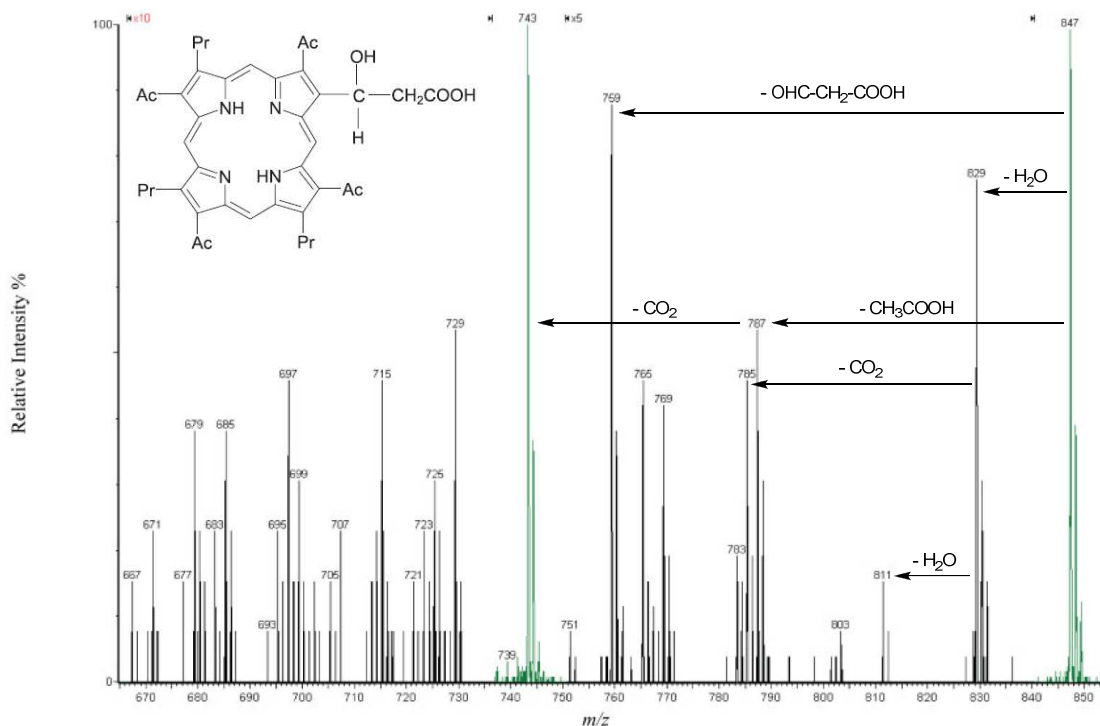


Rysunek 7. Widmo fragmentacyjne jonu $[\text{M}+\text{H}]^+$ kwasu hydroksooctowego uroporfiryny I wraz z opisem odpadających fragmentów (widmo pochodzi z pozycji lit.⁵⁹)

W swojej rozprawie przedstawię tylko dwa widma fragmentacyjne wraz z opisem. Rysunek 7 przedstawia widmo fragmentacyjne protonowanego sygnału pochodnej uroporfiryny (m/z 847) posiadającej grupę hydroksylową w obrębie podstawnika karboksymetylowego wraz z wzorem strukturalnym jak i opisem odpadających fragmentów. Kluczowy dla identyfikacji tego związku jest sygnał obserwowany przy m/z 772 związany z odszczepieniem w postaci rodnika podstawnika zawierającego grupę hydroksylową.

Drugi przykład dotyczy izomeru, w którym grupa hydroksylowa znajduje się w obrębie ugrupowania 2-karboksyetylowego. W tym konkretnym przypadku kluczowy jest sygnał przy m/z 759, który pochodzi od eliminacji kwasu formylooctowego (semialdehydu malonowego) z jonu protonowanego. Spektrometria mas oczywiście nie powie nam, czy dyskutowana pochodna zawiera grupę hydroksylową w pozycji α czy β względem grupy karboksylowej.

Jednak daje nam możliwość odpowiedzi na pytanie, czy grupa OH znajduje się w obrębie podstawnika karboksymetylowego czy 2-karboksyetylowego.



Rysunek 8. Widmo fragmentacyjne jonu $[M+H]^+$ kwasu β -hydroksypropionowego uroporfiryny I wraz opisem odpadających fragmentów (widmo pochodzi z pozycji lit.⁵⁹)

Przykładów tego typu analiz można by zaprezentować dużo. W ramach mojej rozprawy nie ma miejsca na rozwinięcie tego obszernego wątku. Na temat analizy układów porfiryńowych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej i sprzężonej z nią spektrometrii mas powstała niedawno monografia w ramach serii *Methods in Chromatography* pod tytułem „*High-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry of Porphyrins, Chlorophylls and Bilins*”.⁶⁰



Kompleksowe przedstawienie najnowszej literatury na temat spektrometrii mas porfiryńoidów mogłoby być tematem bardzo dużego przeglądu literaturowego. Moja rozprawa dotyczy dość szerokiego wachlarza zagadnień, dlatego w swojej pracy starałem się przedstawić zwięzły opis literatury dotyczącej podjętego zagadnienia, starając się przede wszystkim uwydatnić znaczenie spektrometrii mas jako techniki analitycznej, wnoszącej bardzo wiele do badań związanych z porfiryńoidami.

3. Badania własne

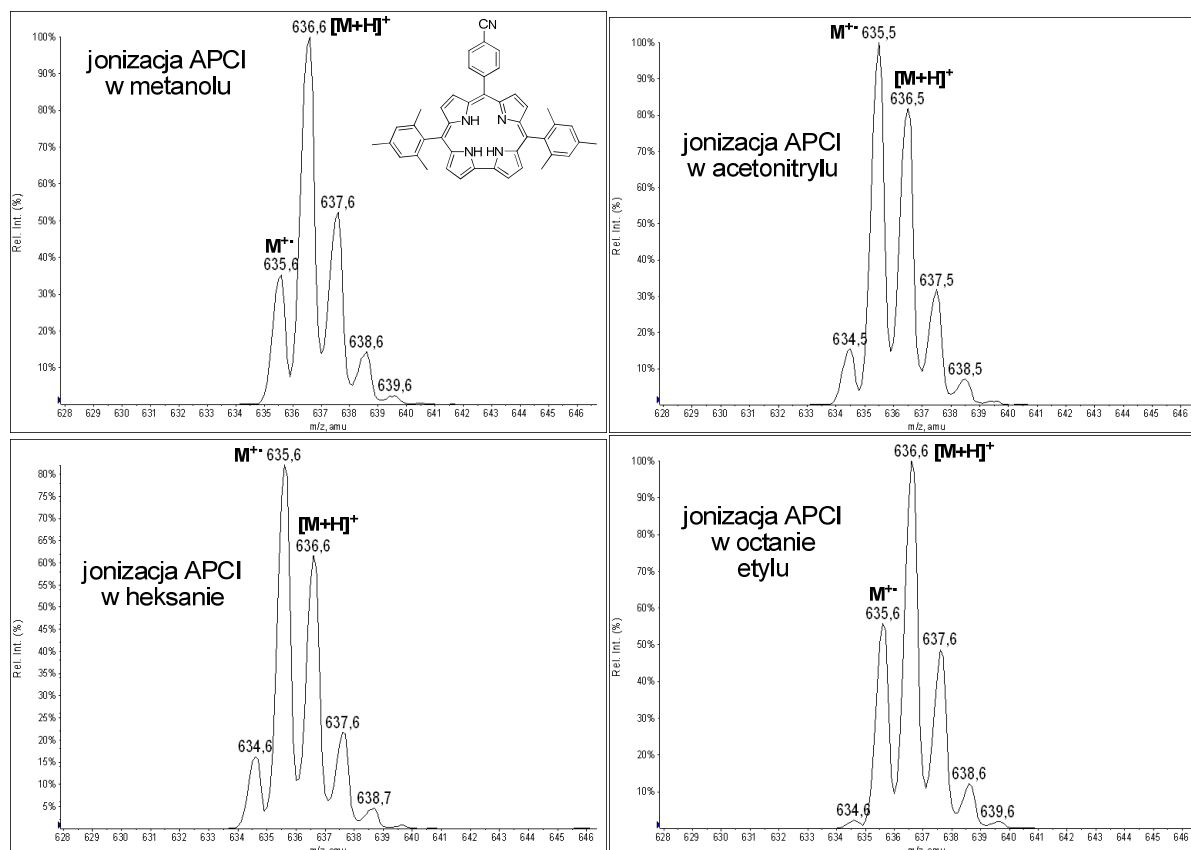
3.1. Wstęp

Wyniki badań, będących przedmiotem niniejszej rozprawy, zostały już częściowo opublikowane.⁶¹ Rozdział badań własnych składa się z trzech dużych podrozdziałów. Najpierw przedstawione zostaną wyniki, które nie zostały jeszcze opublikowane, dotyczące porównania metod jonizacji spektrometrii mas w odniesieniu do porfirynoidów oraz dotyczące ścieżek fragmentacji niektórych wybranych związków z tej klasy. W ostatnim podrozdziale opiszę materiał, który został opublikowany, dotyczący identyfikacji produktów utlenienia koroli.

3.2. Porównanie technik jonizacji w odniesieniu do badanych układów porfirynoidowych

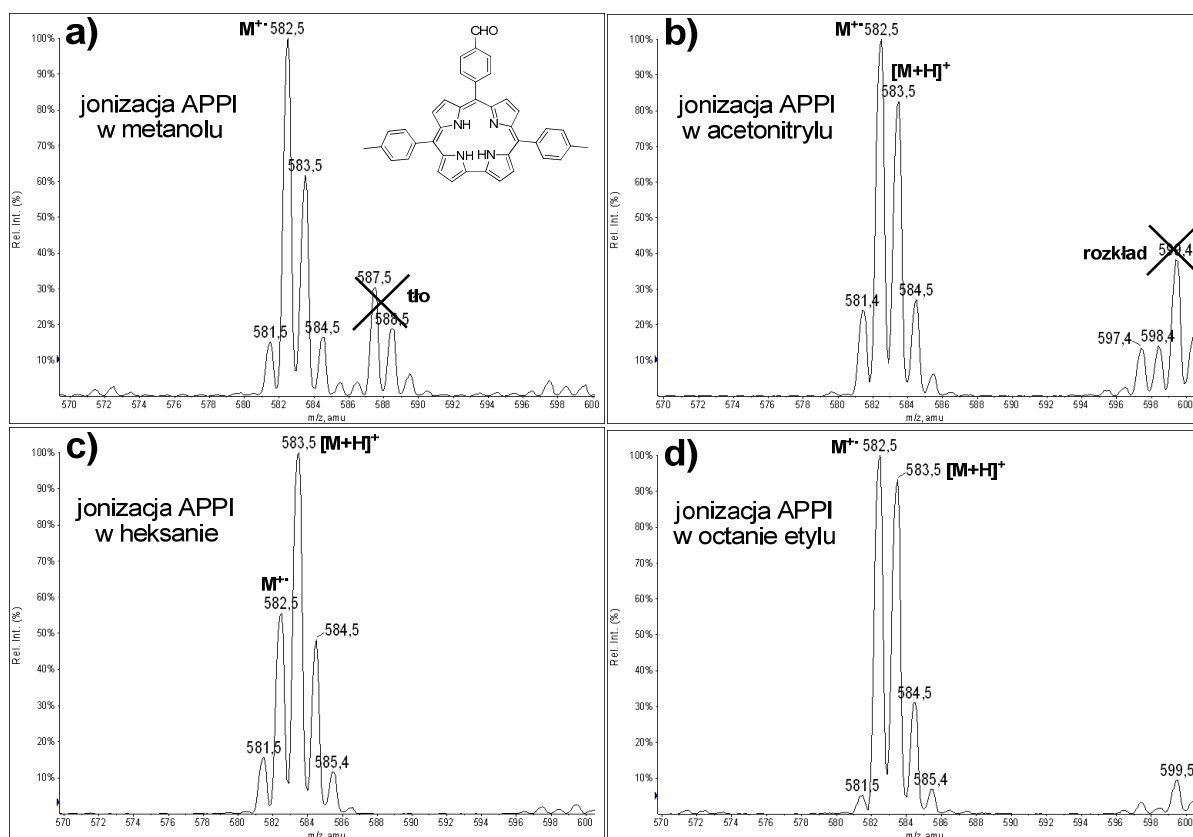
3.2.1. Krótka charakterystyka sygnałów obserwowanych w widmach MS rejestrowanych różnymi metodami jonizacji oraz z zastosowaniem różnych rozpuszczalników

Bardzo często obserwowanym elementem widocznym w widmach porfirynoidów, rejestrowanych metodami jonizacji pracującymi pod ciśnieniem atmosferycznym, jest obecność równocześnie kationorodnika M^+ i jonu $[M+H]^+$. Proporcje tych sygnałów w widmach zależą od wielu czynników, ale głównie od użytej metody jonizacji i rozpuszczalnika. Podobne zjawisko można spotkać w jonach ujemnych, gdzie równocześnie pojawia się sygnał anionorodnika M^- i jonu $[M-H]^-$, jednak nie jest ono tak powszechne jak w jonach dodatnich. Rysunek 9 przedstawia fragmenty widm MS zarejestrowanych metodą APCI dla 10-(4-cyjanofenylo)-5,15-dimezitylokorolu w metanolu, acetonitrylu, heksanie i octanie etylu. Jak widać, użycie protycznego rozpuszczalnika, takiego jak metanol, sprawia, że obserwuje się większą intensywność sygnału jonu protonowanego, który jest wtedy zwykle sygnałem dominującym w widmie. Natomiast rozpuszczalniki aprotyczne sprzyjały generalnie powstawaniu kationorodnika, choć na przykład dla octanu etylu obserwowany był dość silny sygnał jonu protonowanego.

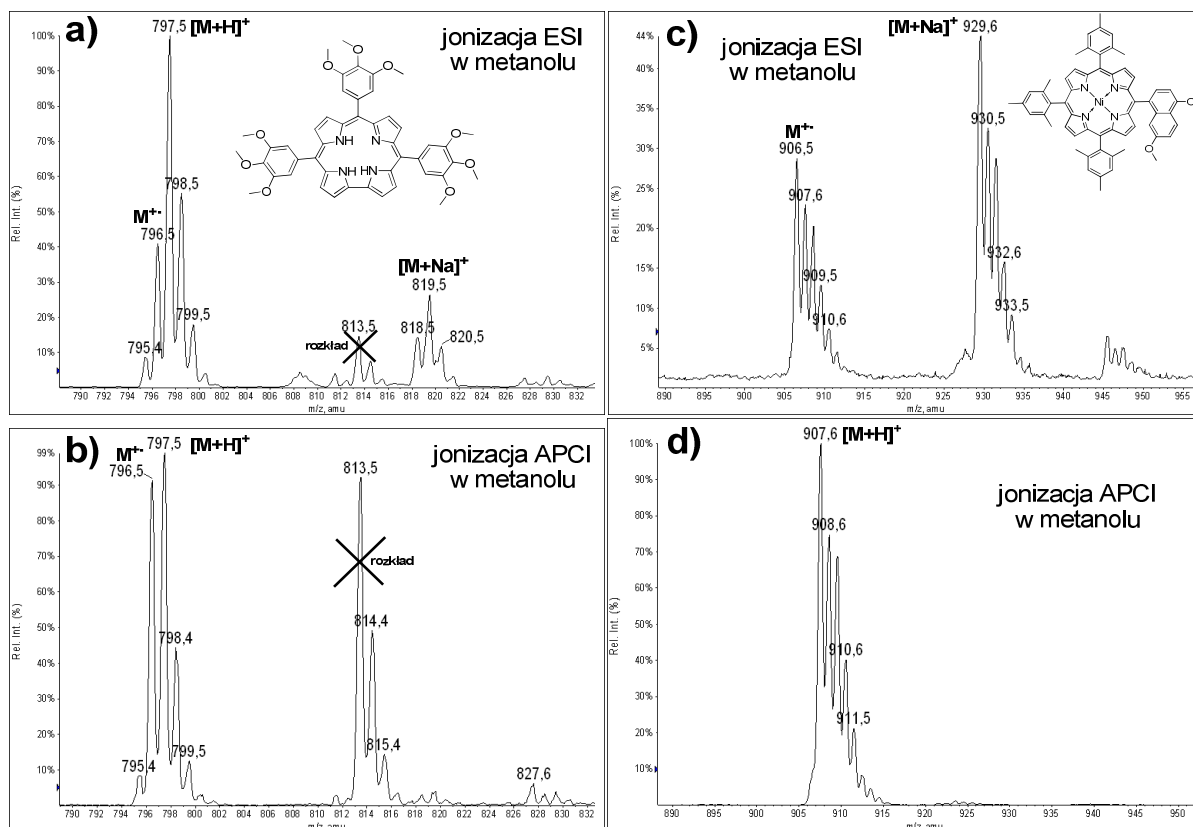


Rysunek 9. Widma APCI jonów dodatnich wykonane dla 10-(4-cyjanofenyl)-5,15-dimezitylokorolu z zastosowaniem różnych rozpuszczalników.

Niespodziewanie w jonizacji APPI (bez użycia dopanta), wykorzystując heksan jako rozpuszczalnik, obserwowałem duży udział jonu protonowanego (Rysunek 10c). Natomiast przy użyciu rozpuszczalników takich, jak metanol, acetonitryl czy octan etylu, kationorodnik był dominującym sygnałem (Rysunek 10a, b i d). Z sytuacją, gdzie obserwowany był dość silny sygnał jonu protonowanego obok kationorodnika z użyciem heksanu, spotkali się również Ghislain i wsp.⁶² Porównali oni działanie źródeł jonizacji ESI, APCI i APPI w analizie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Zwrócili uwagę na szczególne zachowanie heksanu w warunkach jonizacji APPI, pokazując również, że w niektórych przypadkach korzystniejsze jest użycie w analizie tylko heksanu bez wspomaganie dopantem. Postuluje się, że z racji niskiej energii jonizacji (dla heksanu wynosi 10,13 eV, a lampa kryptonowa emituje światło o energii 10,0 eV i 10,6 eV) heksan może wspomagać jonizację próbki tak jak dopant.⁶³



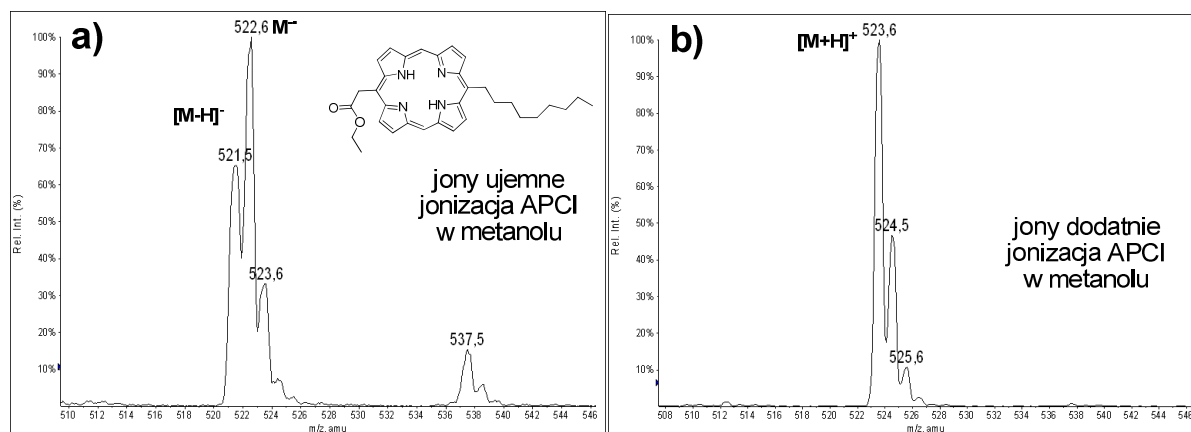
Rysunek 10. Widma APPI jonów dodatnich wykonane dla 10-(4-formylofenylo)-5,15-bis(4-metylofenylo)korolu z zastosowaniem różnych rozpuszczalników.



Rysunek 11. Widma ESI i APCI w metanolu dla przedstawicieli koroli [a] i b]) oraz porfiryn [c] i d]) posiadających atomy tlenu w cząsteczce (struktury związków zamieszczone na rysunku).

W widmach MS porfirynoidów nie obserwuje się zwykle jonów $[M+Na]^+$. Wyjątek stanowią związki posiadające w cząsteczce atomy tlenu, dla których w przypadku użycia metanolu jako rozpuszczalnika w jonizacji ESI zwykle obserwowane są jony sodowane (Rysunek 11). W metodzie APCI lub APPI nie spotkałem przypadku, w którym byłyby obserwowany jon sodowany.

Jak wspomniałem wcześniej, kwestia występowania równocześnie w obszarze jonu molekularnego sygnału jonu parzystoelektronowego i nieparzystoelektronowego nie odnosi się tylko do jonów dodatnich. Na przykład, stosując jonizację APCI dla 5-(etoksykarbonylo)metylo-15-nonyloporfiryny w trybie jonów ujemnych obserwowałem w widmie równocześnie jon deprotonowany i anionorodnik (Rysunek 12a). Natomiast w trybie jonów dodatnich obserwowałem tylko jon protonowany (Rysunek 12b).

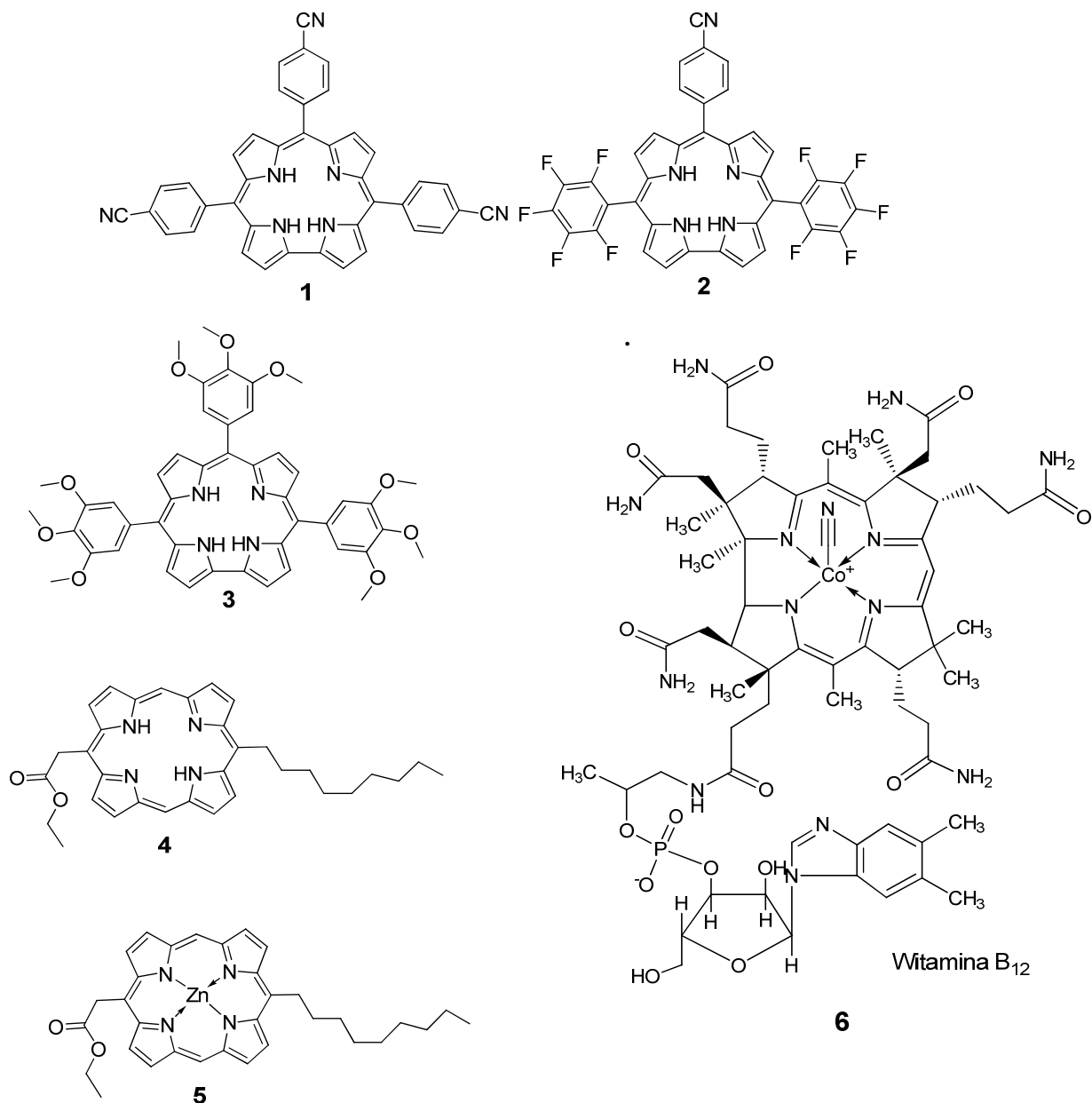


Rysunek 12. Widma APCI jonów dodatnich i ujemnych 5-(etoksykarbonylo)metylo-15-nonyloporfiryny.

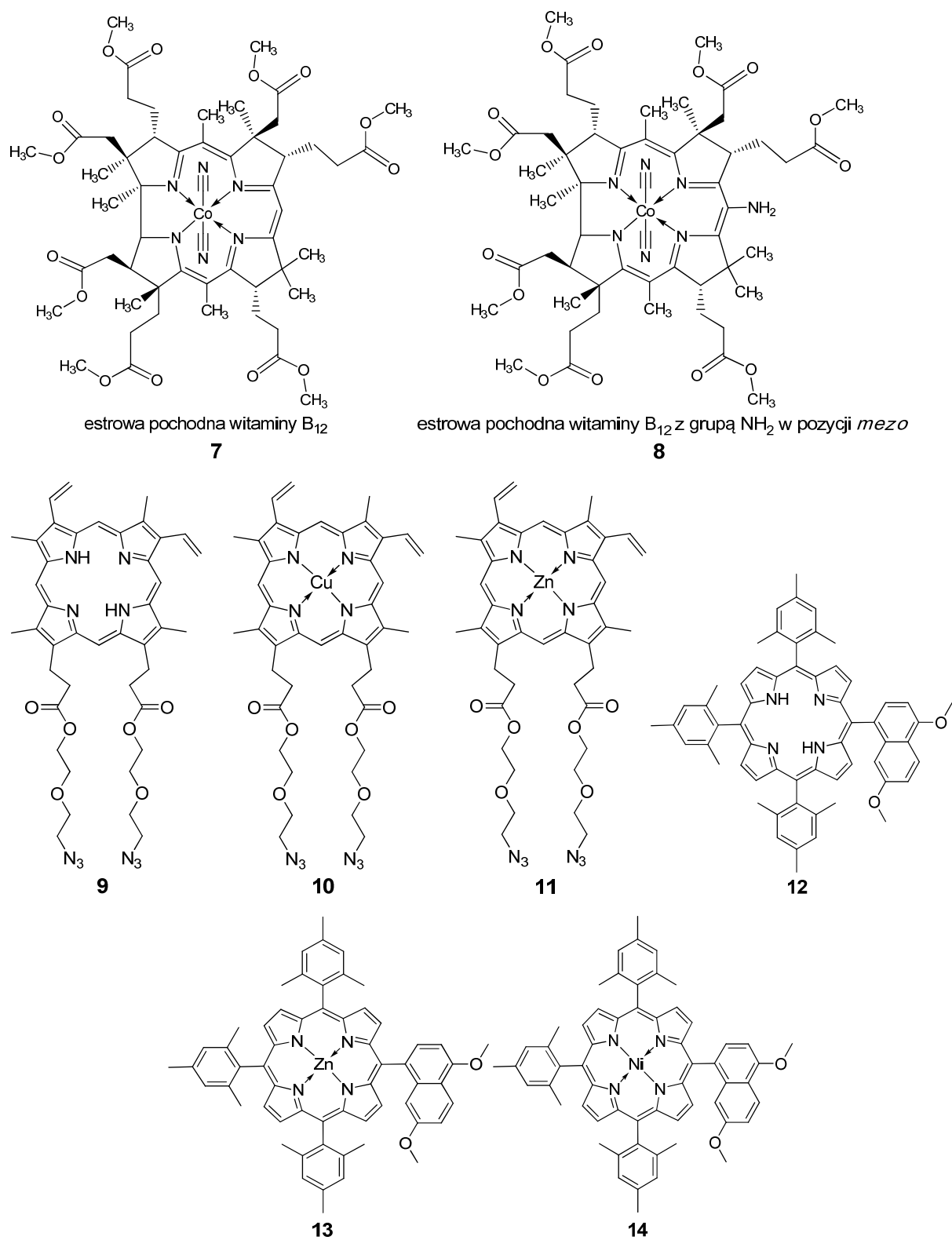
3.2.2. Porównanie czułości technik jonizacji pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym

Podejmując się problemu porównania efektywności różnych technik jonizacji w odniesieniu do analizowanej klasy związków, zastanawiałem się jak w sposób przejrzysty dać odpowiedź na pytanie: „Która metoda jonizacji jest najlepsza w odniesieniu do danego związku?”. Postanowiłem, że czułość oferowana przez te metody będzie najlepszym wskaźnikiem ich efektywności. Innym parametrem opisującym techniki jonizacji mogłaby być granica wykrywalności określonych związków przy użyciu danej metody. Jest ona wielkością otrzymywaną na drodze statystycznej, wymaga dużej liczby eksperymentów dla poprawnego jej oszacowania i zależnie od wybranej metodologii obliczania jej wartości możemy uzyskiwać różne wyniki. Jako ścisły parametr obrazujący faktyczne różnice między metodami jonizacji wybrałem czułość i uważam, że porównanie metod jonizacji za pomocą tego parametru będzie najlepiej przedstawiać różnice między nimi.

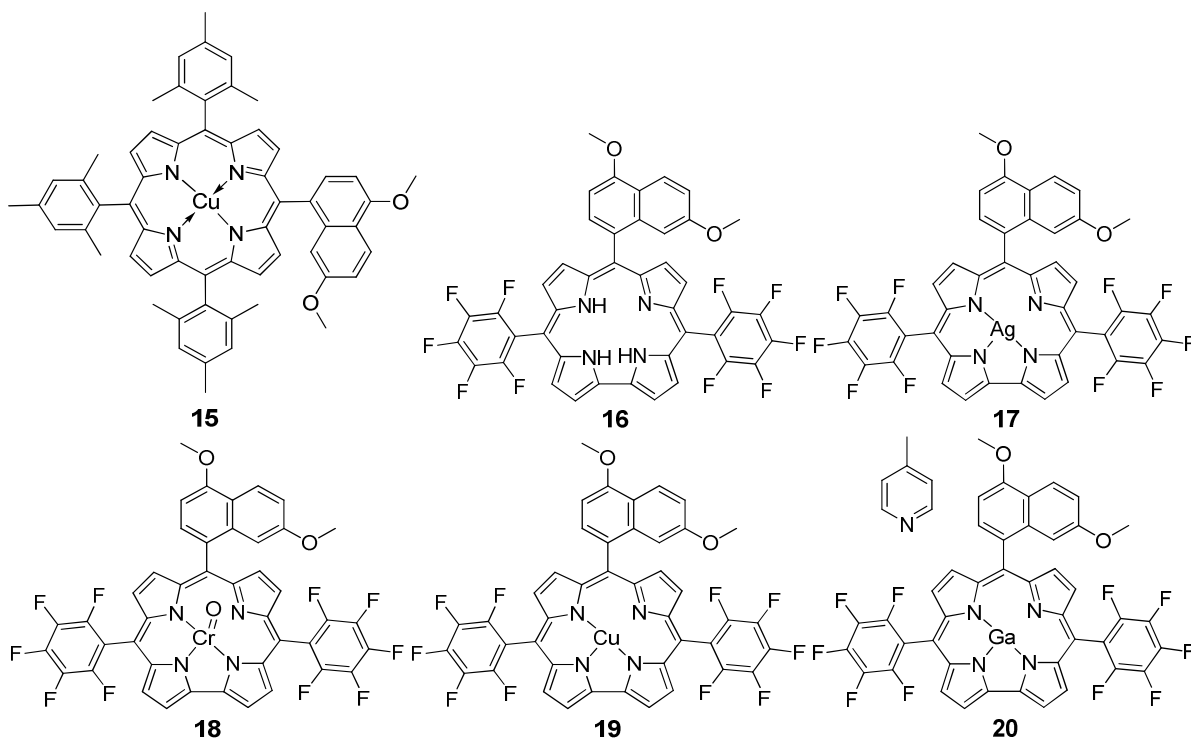
Na podstawie uzyskanych wyników podjąłem się również próby statystycznego oszacowania granicy wykrywalności badanych związków za pomocą wybranych metod jonizacji. Niestety wyniki okazały się mało spójne i nie oddające prawdziwego obraz sytuacji. Krótki opis i analiza uzyskanych wyników znajduje się w następnym podrozdziale tej rozprawy (Rozdział 3.2.3, str. 70).



Rysunek 13. Wzory związków użytych przy porównania czułości jonizacji ESI, APCI i APPI



Rysunek 14. Wzory związków użytych przy porównania czułości jonizacji ESI, APCI i APPI.



Rysunek 15. Wzory związków użytych przy porównania czułości jonizacji ESI, APCI i APPI.

Do porównania wybrałem 20 związków (Rysunki 13, 14 i 15) o różnej budowie i polarności, zarówno wolne zasady, jak i kompleksy z metalami grupy d układu okresowego. Przetestowałem trzy metody jonizacji pracujące pod ciśnieniem atmosferycznym: ESI, APCI i APPI z dopantem[§]. Dodatkowo uwzględniłem podczas badań metodę APPI bez dopanta. Wyniki uzyskane dla tego wariantu będą przedstawiał razem z pozostałymi metodami jonizacji. Starannie przygotowany zestaw roztworów o różnych stężeniach był wstrzykiwany za pomocą autosamplera zestawu HPLC do źródła jonów spektrometru mas. Zwykle nastrzyki zawierały się w przedziale od 1 pg do 10 ng związku. Jako rozpuszczalnika używałem metanolu o przepływie 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Tego samego dnia wykonywane były pomiary przy użyciu wszystkich metodach jonizacji dla tych samych roztworów.^{**} Spektrometr mas był ustawiony w trybie MRM^{††}, na wcześniej zoptymalizowane parametry pomiaru. Zwykle dobranych miałem kilka par MRM, a w wynikach uwzględniałem sygnał najsilniejszy. Dodatkowo nie ograniczyłem się tylko do jonów dodatnich - tam gdzie to było możliwe

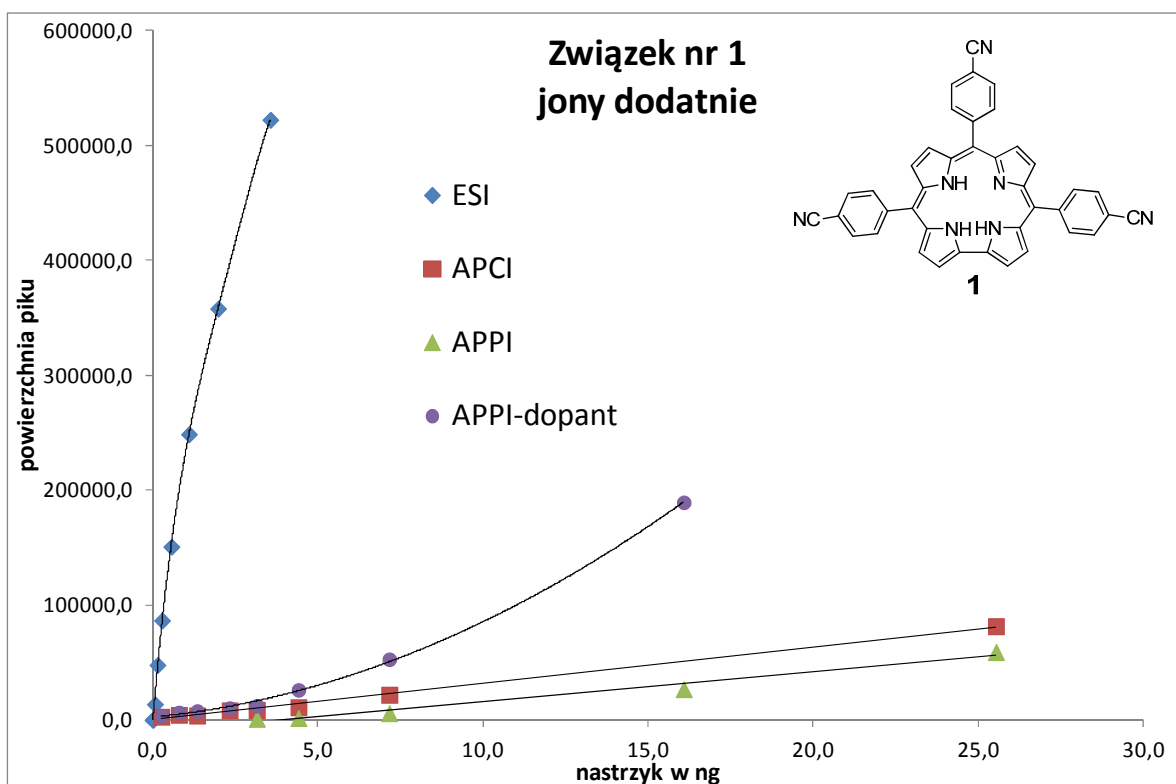
[§] Jako dopanta używałem toluenu.

^{**} Wszystkie pomiary były wykonywane na tym samym spektrometrze, posiadającym możliwość prostej wymiany źródła jonów.

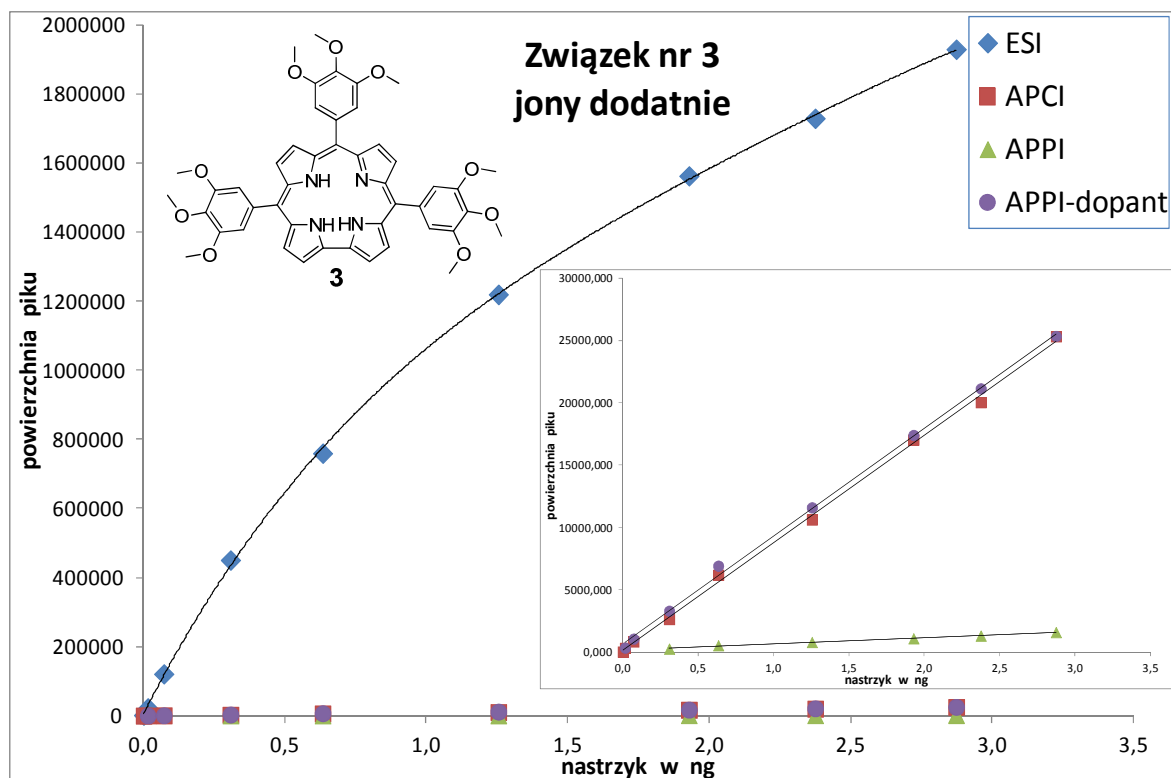
^{††} MRM – (z ang. *multiple reaction monitoring*) Jest to tryb pracy spektrometru mas, posiadającego potrójny kwadrupol jako analizator mas. Spektrometr tego typu w tym trybie w pierwszym kwadrupolu przepuszcza tylko jon molekularny (lub pseudomolekularny), w drugim dokonuje jego fragmentacji, a w trzecim przepuszcza do detektora tylko określony produkt rozpadu. Jest to tryb charakteryzujący się najwyższą czułością i szybkością. Ponadto poprzez monitorowanie określonej pary jonów (jon molekularny lub pseudomolekularny/jeden z produktów rozpadu) jest to pomiar specyficzny dla danego związku. W ciągu bardzo krótkiego odcinka czasu możliwe jest monitorowanie nawet kilkuset takich par.

wykonałem również pomiary jonów ujemnych. Na podstawie uzyskanych wyników sporządziłem wykresy przedstawiające odpowiedź aparatu na określone stężenia substancji analizowanej i obrazujące różnicę w czułości różnych technik jonizacji.

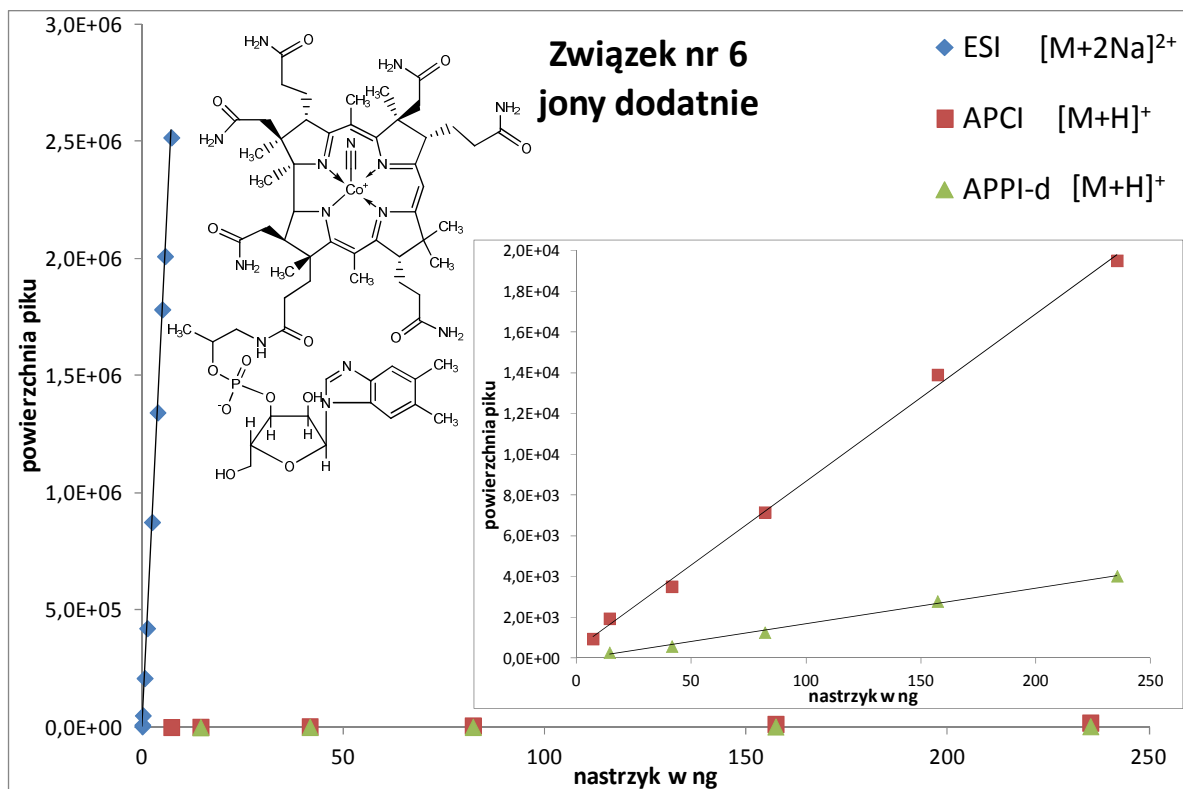
Otrzymałem cały szereg ciekawych wyników. Pierwszy wniosek ogólny, jaki dało się sformułować po przejrzeniu rezultatów uzyskanych dla jonów dodatnich, był taki, że metoda ESI jest idealna dla wolnych zasad i bardzo polarnych związków, takich jak pochodne witaminy B₁₂. Nie był to może zaskakujący wynik, jeżeli chodzi o pochodne witaminy B₁₂, które są bardzo polarne i są wręcz idealnie dopasowane do charakteru jonizacji ESI. Bardzo ważny jest wynik uzyskany metodą ESI wśród wszystkich wolnych zasad przebadanych koroli (**1-3**, **16**) i porfiryn (**4**, **9**, **12**). W obrębie tych klas związków pochodne różniły się znacznie polarnością, jak chociażby związek **1** (Rysunek 16) i **3** (Rysunek 17), a ESI oferowało najlepszą czułość we wszystkich wymienionych przypadkach. Różnice w czułościach poszczególnych metod jonizacji są bardzo wyraźne, gdyż w przypadku ESI mówimy o nastrzykach kilkudziesięciu pikogramów substancji, a w przypadku pozostałych metod jonizacji o nastrzykach rzędu nanogramów, aby uzyskać podobną odpowiedź.



Rysunek 16. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 1 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był sygnał $[M+H]^+$).



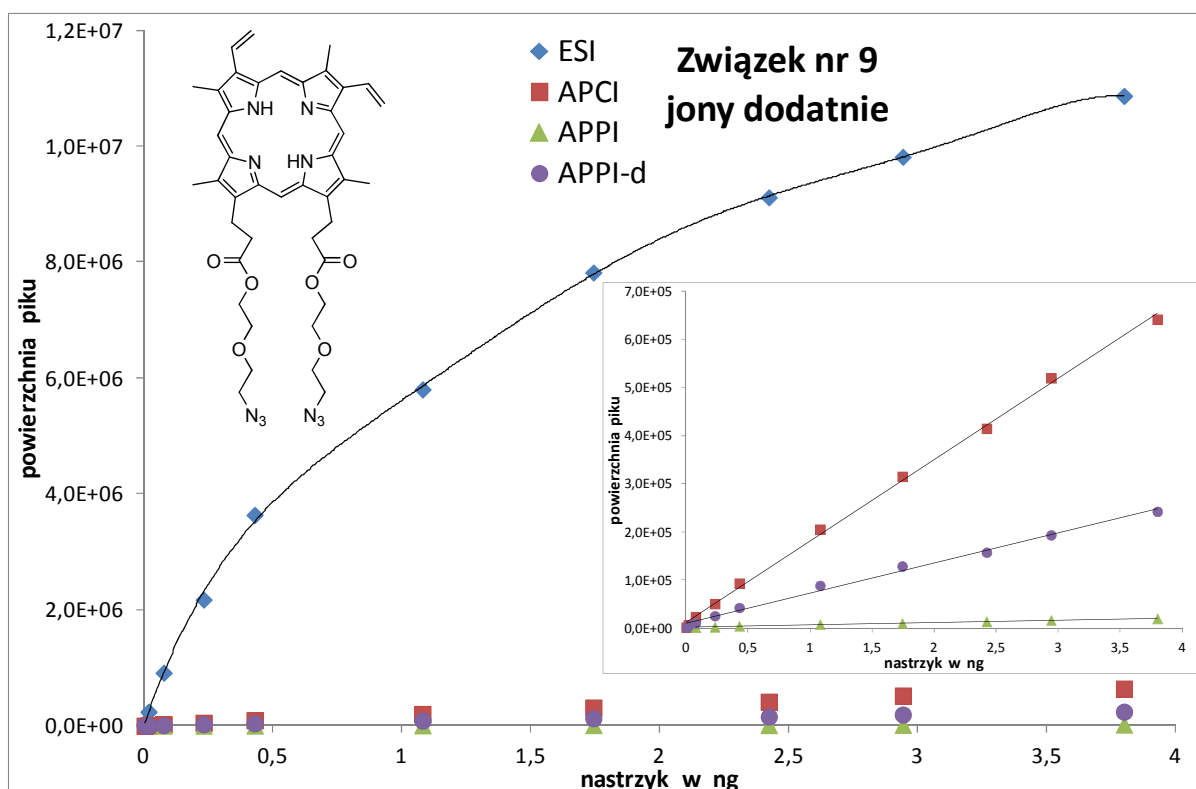
Rysunek 17. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 3 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był sygnał $[M+H]^+$).



Rysunek 18. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 6.

Techniki APCI i APPI z dopantem zachowywały się różnie. W przypadku wolnych zasad koroli zwykle obydwie techniki dawały podobne rezultaty. Może minimalnie lepsze wyniki uzyskałem przy użyciu APPI z dopantem w przypadku mniej polarnych pochodnych (**1** i **2**). W odniesieniu do pochodnych witaminy B₁₂ (związki **6** (Rysunek 18), **7** i **8**) oraz związku nr **9** (Rysunek 19) APCI oferowało lepszą czułość niż APPI z dopantem, co jednoznacznie sytuuje technikę APPI wśród metod, które najlepiej nadają się do analizy związków bardzo niepolarnych.

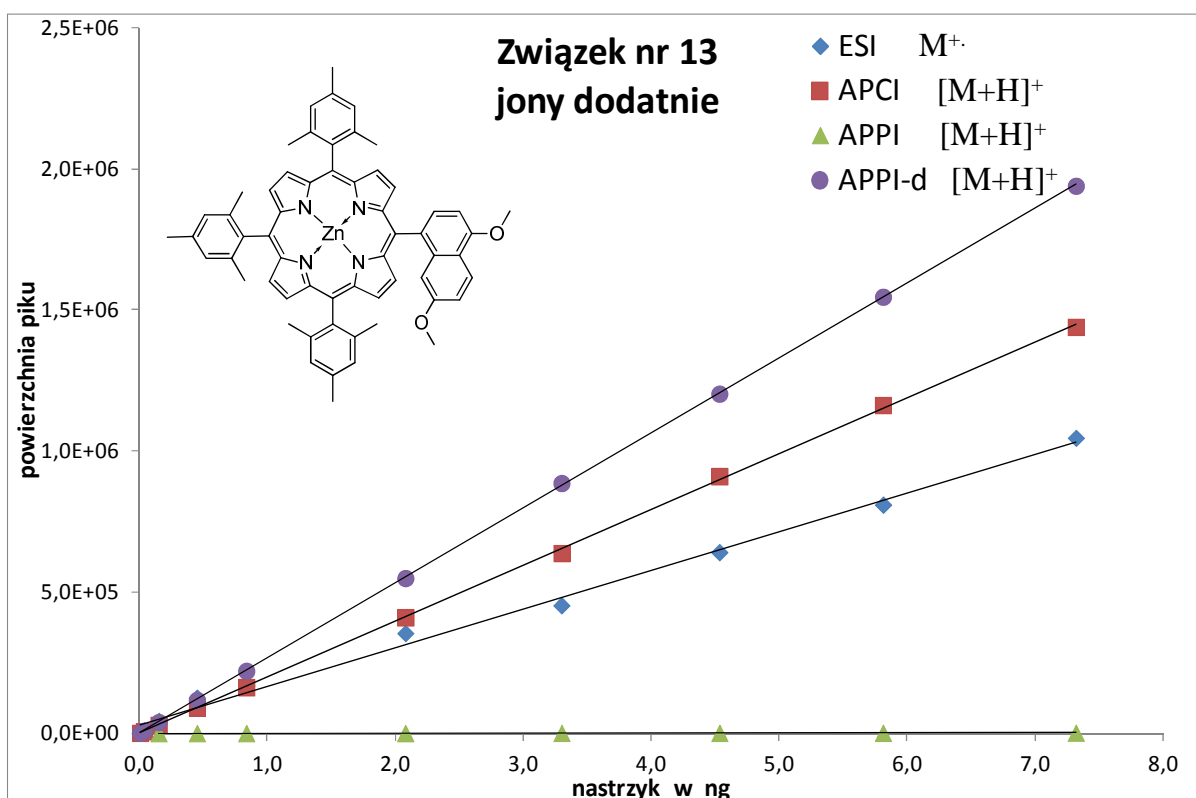
Kolejny element, który bardzo rzuca się w oczy na niektórych wykresach (dobrze to widać dla związków **1**, **3** i **9**) to fakt braku liniowości obserwowany głównie dla techniki ESI. Ewentualne błędy w przygotowaniu roztworów można wykluczyć, gdyż w analogicznych przypadkach inne metody jonizacji prezentują przebieg liniowy odpowiedzi aparatu, a pomiary były prowadzone z udziałem tych samych roztworów. Raczej trzeba się skłaniać ku temu, że w miarę wzrostu stężenia bieżą w źródle jonów elektrosprej dodatkowe procesy mające wpływ na odpowiedź aparatu.



Rysunek 19. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 9 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był sygnał $[M+H]^+$).

Na wszystkich wykresach zamieszczam również odpowiedź aparatu otrzymaną dla APPI bez dopanta. Prawie zawsze udawało mi się uzyskiwać chociażby znikomą odpowiedź aparatu dla tego wariantu jonizacji APPI. Takim przypadkiem, gdzie w przebadanym zakresie

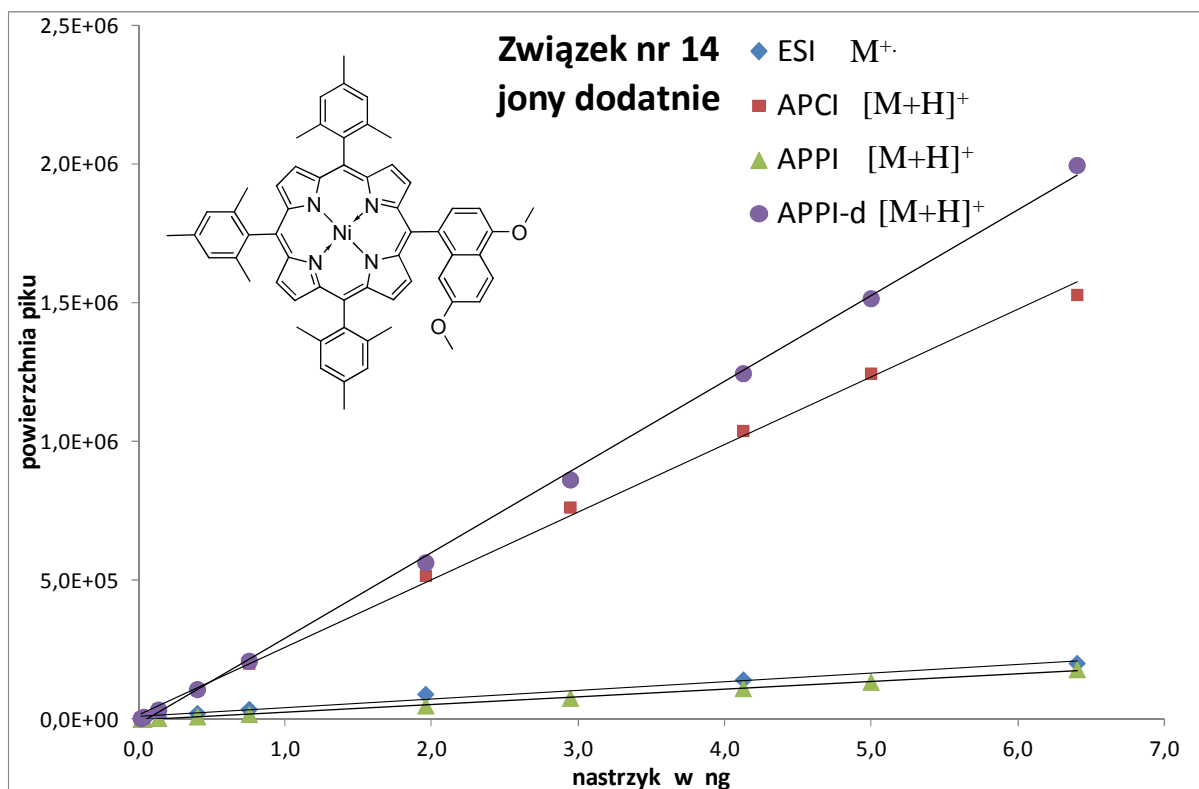
nie udało się uzyskać odpowiedzi aparatu była witamina B₁₂ (związek 6, Rysunek 18). Ktoś mógłby powiedzieć, że nie było sensu włączać tych wszystkich wyników do całkowitego opisu. Jednak sam fakt, że prawie wszystkie przebadane związki podlegają jonizacji APPI bez dopanta tylko pod wpływem lampy UV, jest informacją istotną. Oczywiście czułość w porównaniu do innych metod nie jest konkurencyjna i przy pomiarach HPLC-MS nie ma sensu jej stosować. Jednak przy pomiarach standardowych widm MS jonizacja APPI bez dopanta może być z powodzeniem stosowana w wielu przypadkach jeżeli tylko mamy odpowiednią ilość związku.



Rysunek 20. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 13 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

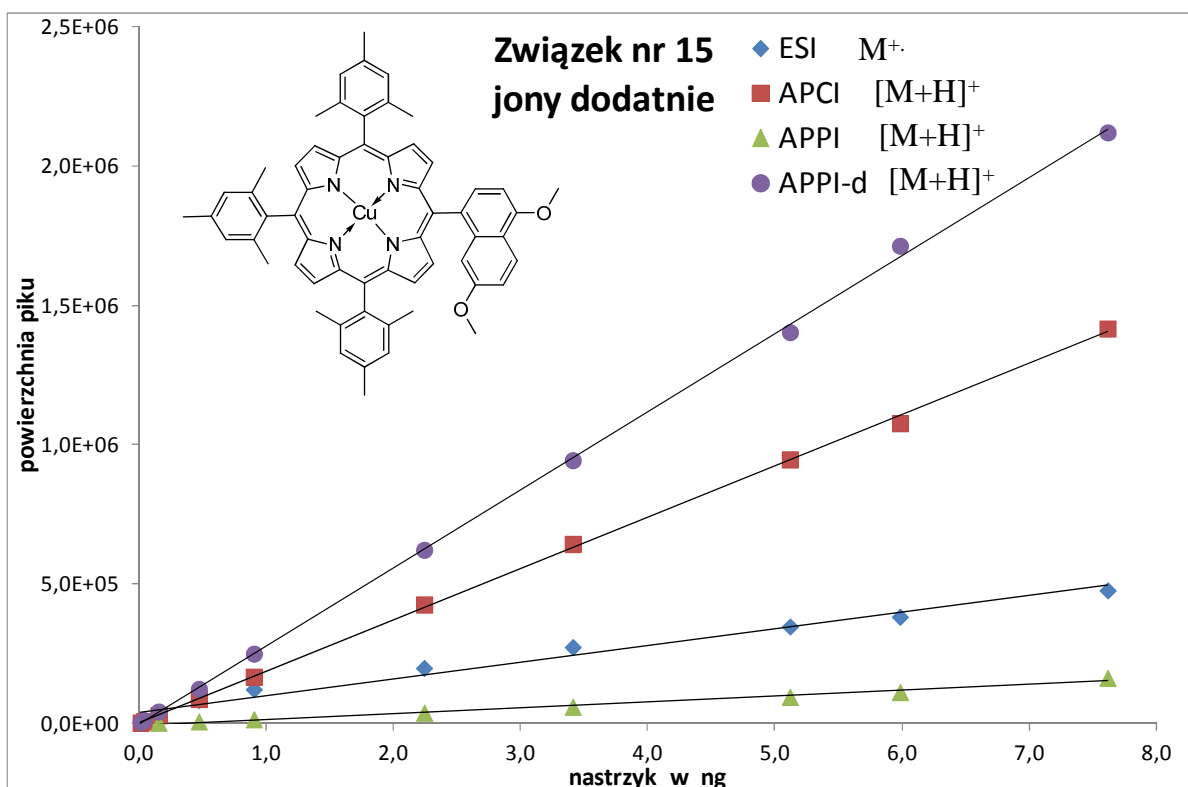
Całkowicie inaczej przedstawiały się wyniki obserwowane dla jonów dodatnich kompleksów koroli i porfiryń z metalami grupy d układu okresowego. Elementem charakterystycznym, zaobserwowanym dla niemal wszystkich kompleksów, było to, że w jonizacji ESI najlepszą odpowiedź dawała para MRM związana z kationorodnikiem, a w przypadku innych metod jonizacji była to para związana z sygnałem protonowanym. Dodatkowo, w wielu przypadkach metoda elektrosprej nie oferowała już najlepszej czułości. Prym wiodły metody APCI i APPI z dopantem, które wyraźnie lepiej spisywały się w analizie tego typu związków. Wśród kompleksów porfiryń dało się zauważyć, że jonizacja APPI z dopantem często konkurując o miano pierwszeństwa z jonizacją APCI, oferując nieco lepszą

czułość (przykłady: Rysunki 20 i 21). Na szczególną uwagę zasługuje przypadek kompleksu niklowego (związek **14**, Rysunek 21) gdzie bardzo słabo zaprezentowała się metoda ESI. W przypadku wszystkich przebadanych związków metoda APPI bez dopanta oferowała najniższą czułość i wyraźnie ustępowała innym metodom jonizacji. Jednak dla kompleksu z niklem uzyskano również bardzo słaby wynik metody ESI, która oferowała tylko nieznacznie lepszą czułość niż jonizacja APPI bez dopanta.

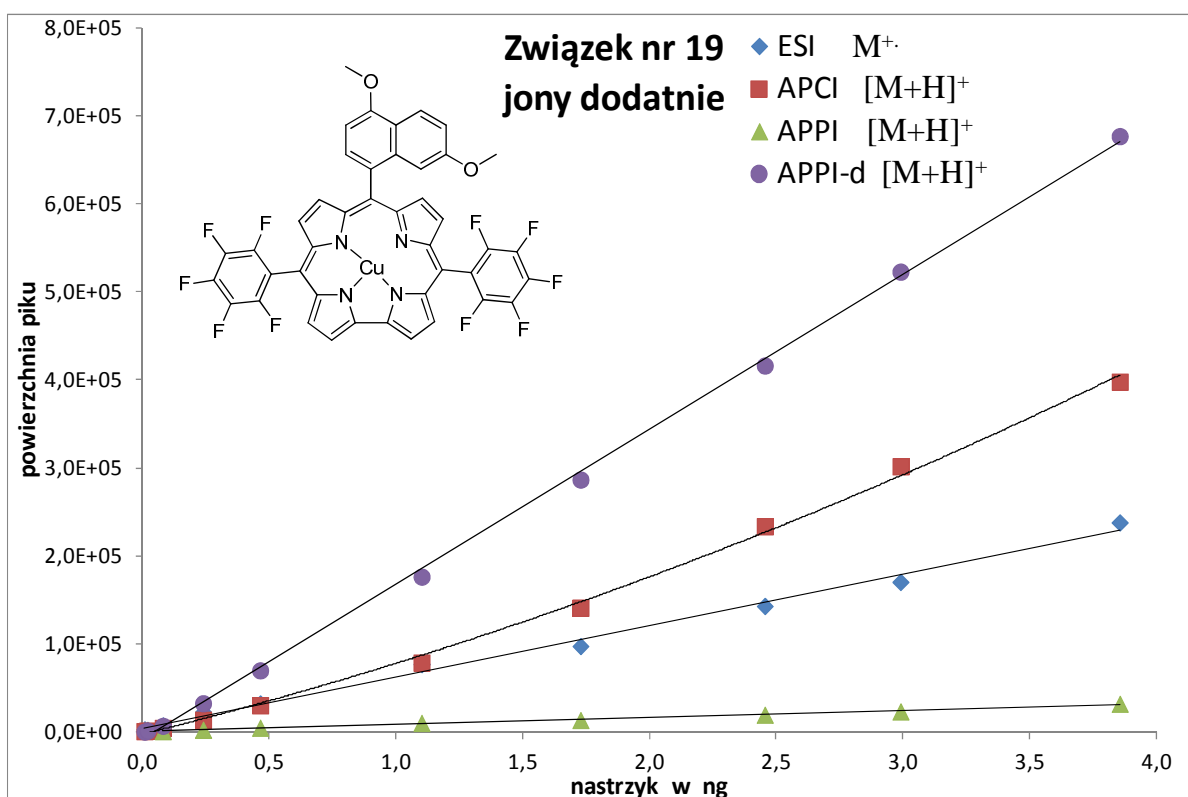


Rysunek 21. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 14 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

Dla kompleksu miedziowego **15** uzyskałem wyniki bardzo podobne do tych uzyskanych dla kompleksu cynkowego. Jednak w tym przypadku metoda APPI z dopantem przeważała nad APCI, a ESI ewidentnie ustępowało APCI (Rysunek 22). Niemal identyczne wyniki jak w przypadku powyżej zaprezentowanych skompleksowanych układów porfirynowych otrzymałem w przypadku miedziowego kompleksu korolu **19** (Rysunek 23). Dla tego układu również najlepszą metodą okazała się jonizacja APPI z dopantem, a wykres jest bardzo podobny do tego przedstawionego dla związku **15** (Rysunek 22).

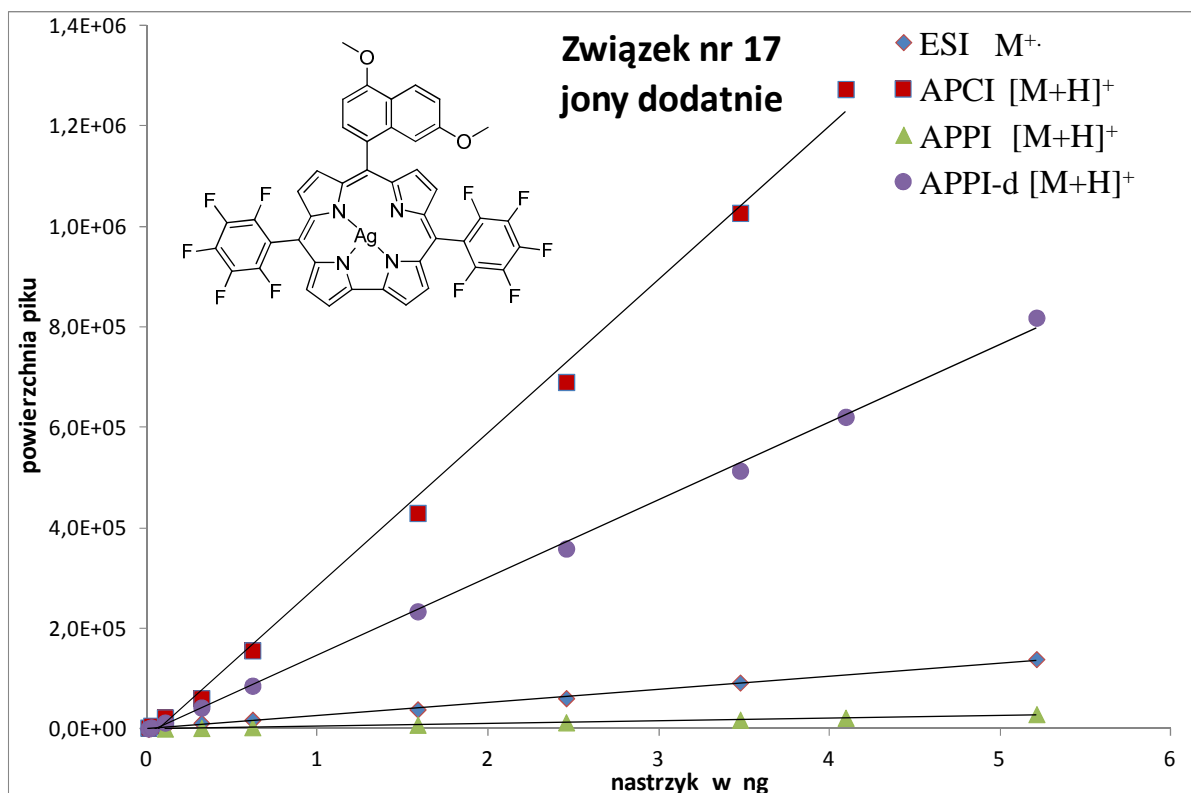


Rysunek 22. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 15 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

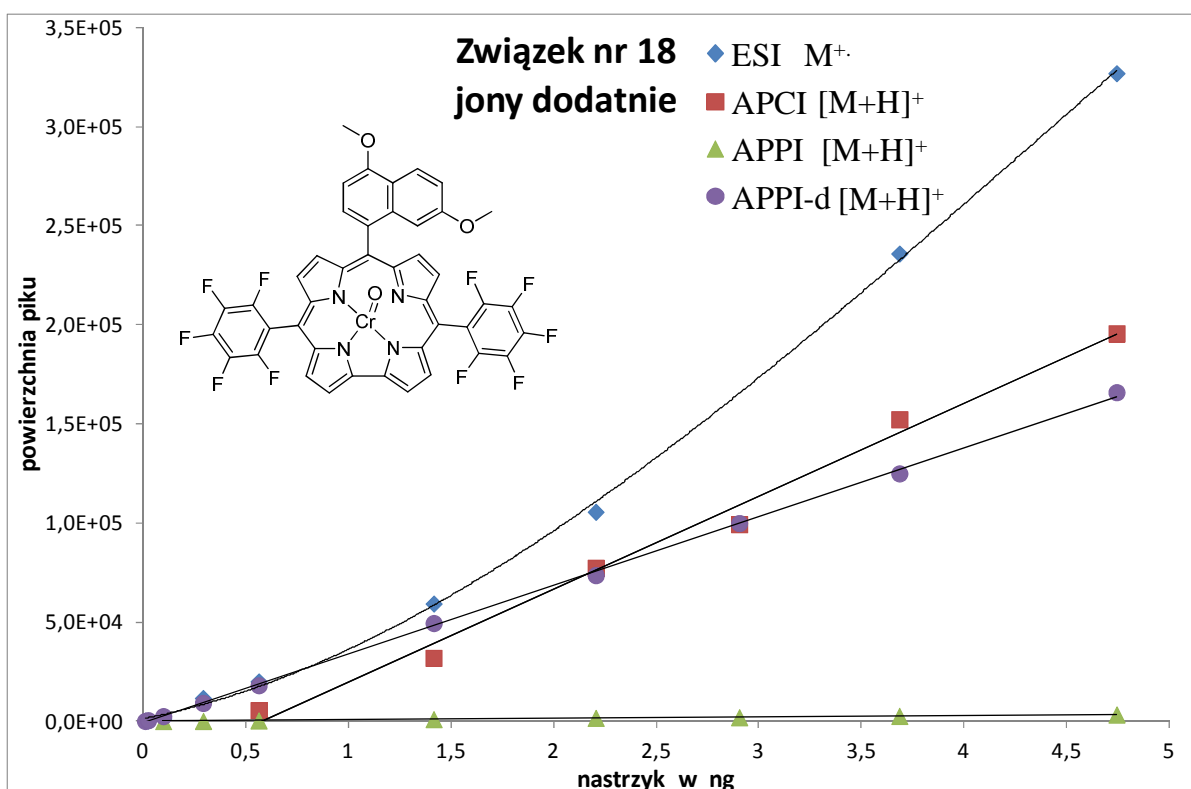


Rysunek 23. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 19 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

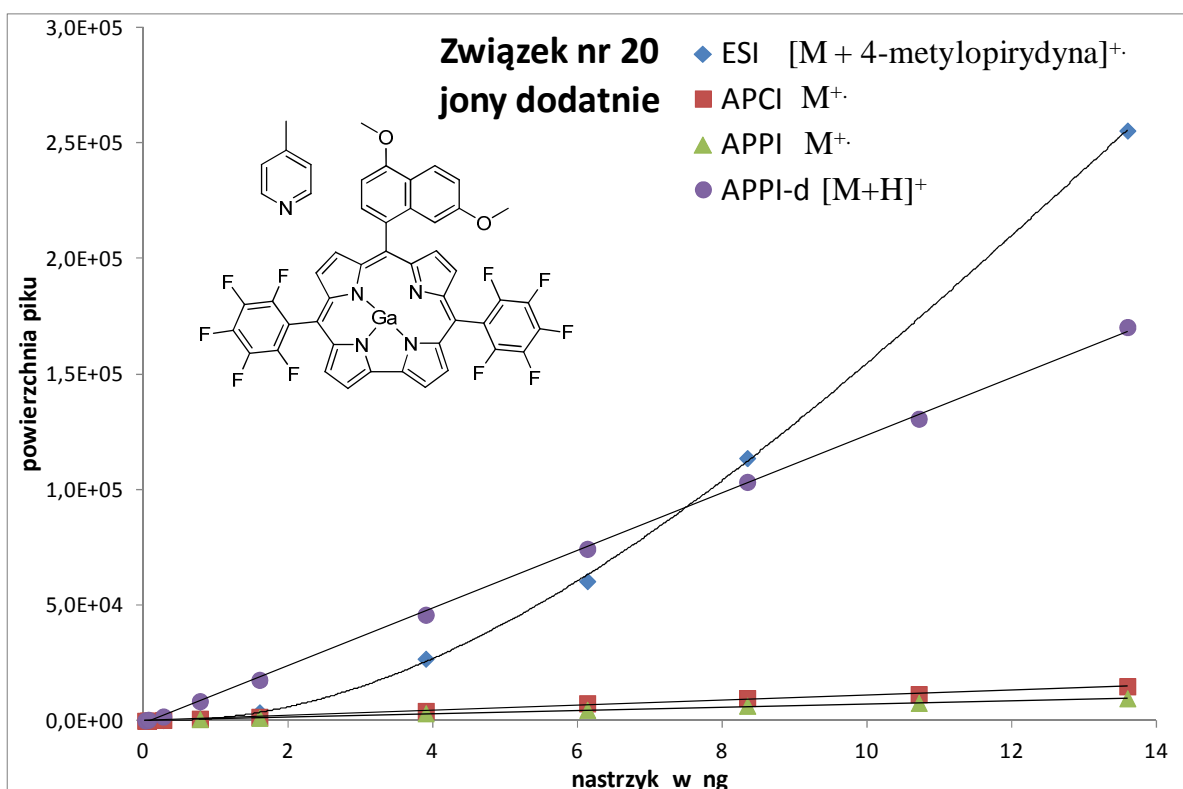
Kompleksy korolu **17**, **18** i **20** zachowały się całkowicie odmiennie. W przypadku związku **17** najlepiej spisywała się metoda APCI (Rysunek 24), a w przypadku związków **18** (Rysunek 25) i **20** (Rysunek 26) zaskakująco dobre wyniki - lepsze od innych metod jonizacji - uzyskiwałem metodą ESI. W przypadku związku **20** sprawa jest nieco dyskusyjna, ponieważ w zakresie mniejszych stężeń lepszą czułość oferowała metoda APPI z dopantem (Rysunek 26). Jednoznaczną ocenę komplikuje to, że dla związku **20** jonizacja ESI prezentowała nieliniowy przebieg zależności powierzchni piku od stężenia, natomiast pozostałe metody jonizacji prezentowały odpowiedź liniową. Podobnie sytuacja wyglądała dla związku **18**: brak liniowości dla jonizacji ESI, porównywalna odpowiedź aparatu w przypadku mniejszych stężeń dla ESI i APPI z dopantem, jednak wyraźnie lepsza czułość metody ESI w porównaniu z innymi metodami jonizacji w zakresie większych stężeń.



Rysunek 24. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 17 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

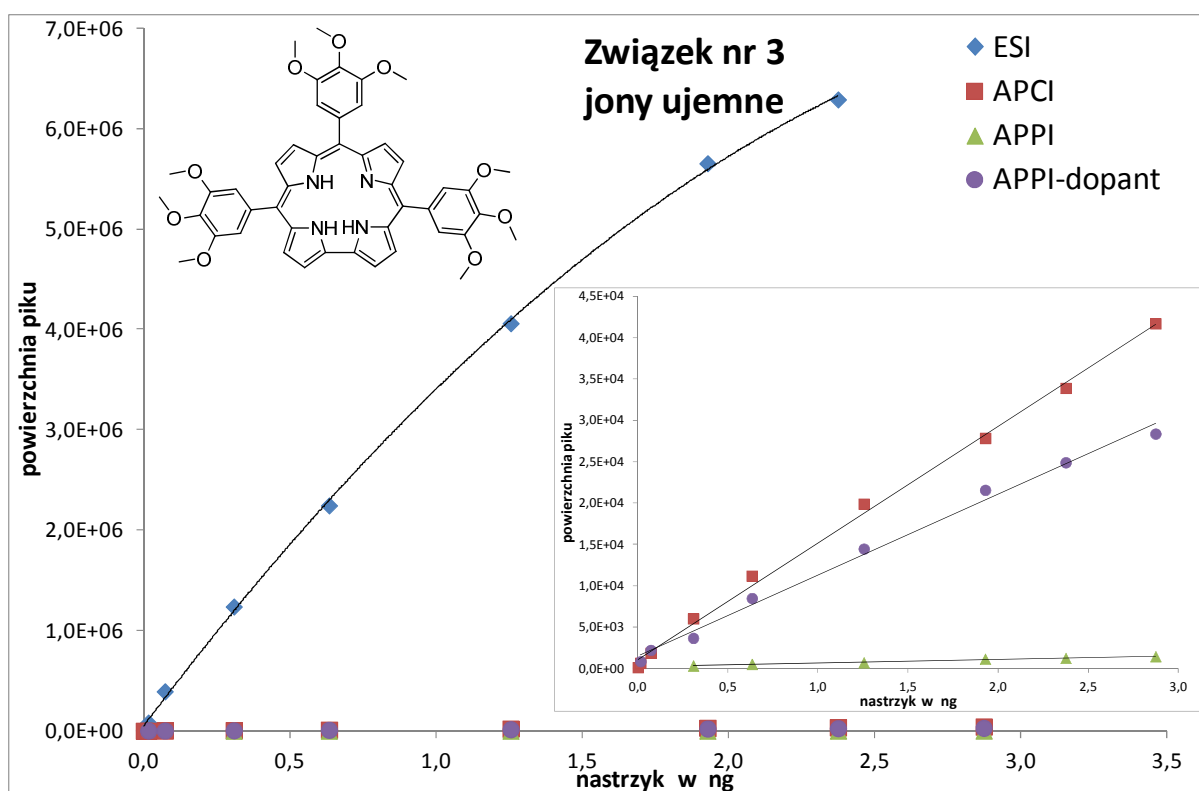


Rysunek 25. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 18 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

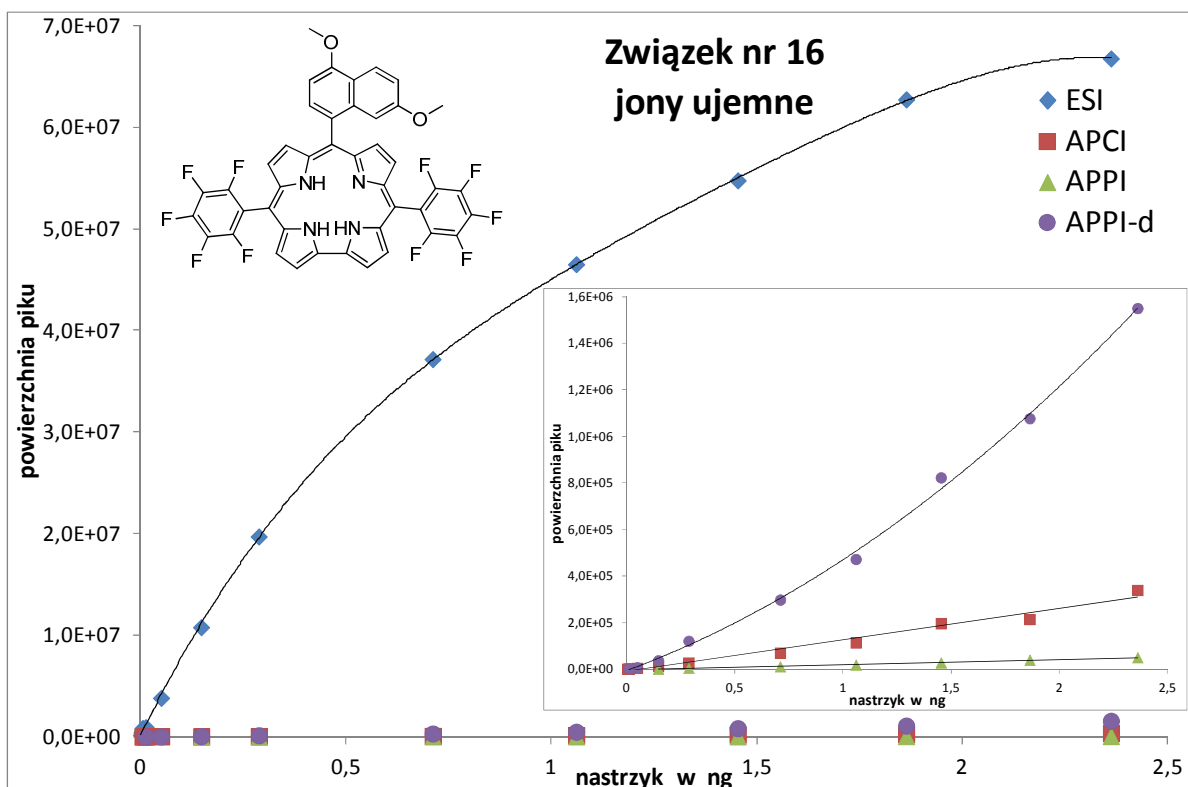


Rysunek 26. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 20 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

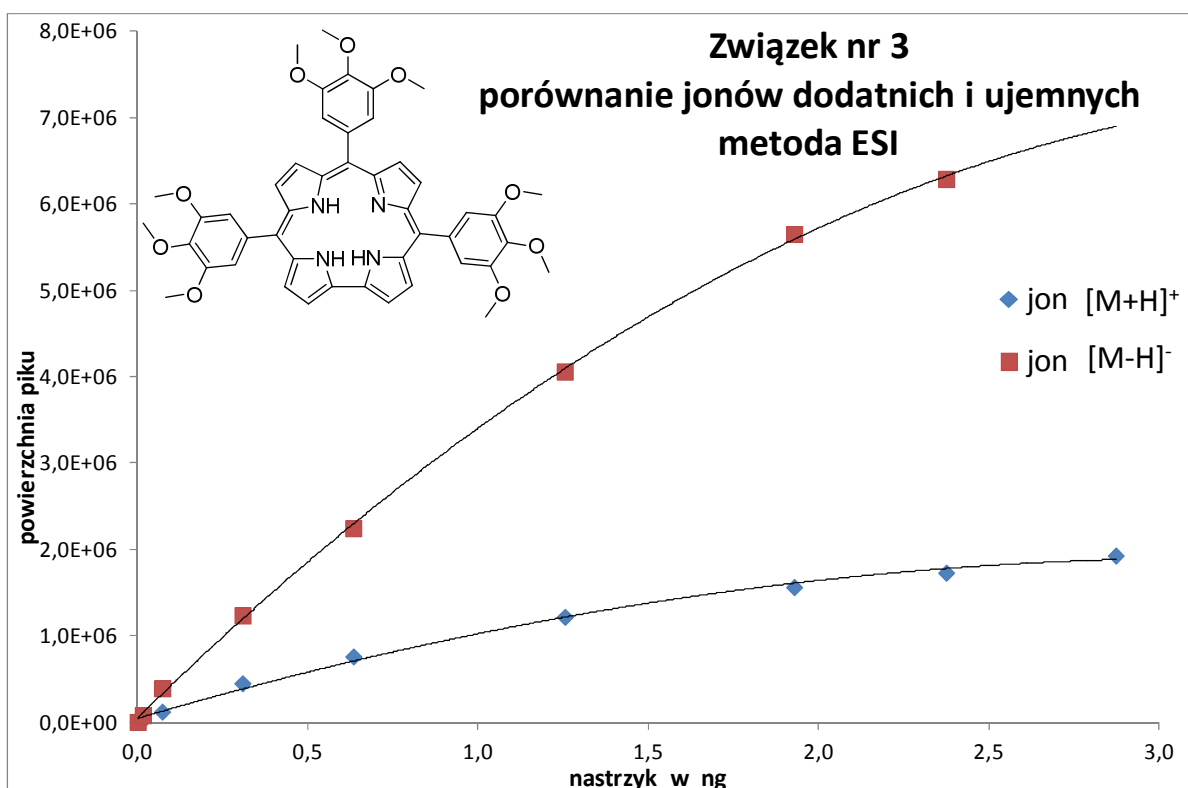
Jak wspomniałem na samym początku tego podrozdziału, nie ograniczyłem się w swoich badaniach tylko do porównania efektywności metod jonizacji w trybie jonów dodatnich. Równoległe do pomiarów prowadzonych dla jonów dodatnich przeprowadziłem takie same pomiary uwzględniające jony ujemne. W przypadku nieskompleksowanych związków najsilniejszą odpowiedź aparatu rejestrowałem dla sygnałów $[M-H]^-$. Wyjątkiem jest związek **12**, dla którego we wszystkich metodach jonizacji najsilniejszym sygnałem był sygnał anionorodnika. Dla kompleksów z metalami obserwowałem w przeważającej liczbie przypadków sygnał anionorodnika, a odstępstwem od reguły były sygnały $[M+Cl]^-$ obserwowane w metodzie ESI dla kompleksów z cynkiem. Pomijam w tej dyskusji wyniki otrzymane dla witaminy B₁₂ i jej pochodnych, gdyż odpowiedź aparatu na obserwowane sygnały była w wielu przypadkach znikoma i były to sygnały dość nietypowe takie jak: $[M-HCN]^-$, $[M-2CN-H]^-$.



Rysunek 27. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 3 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był sygnał $[M-H]^-$).



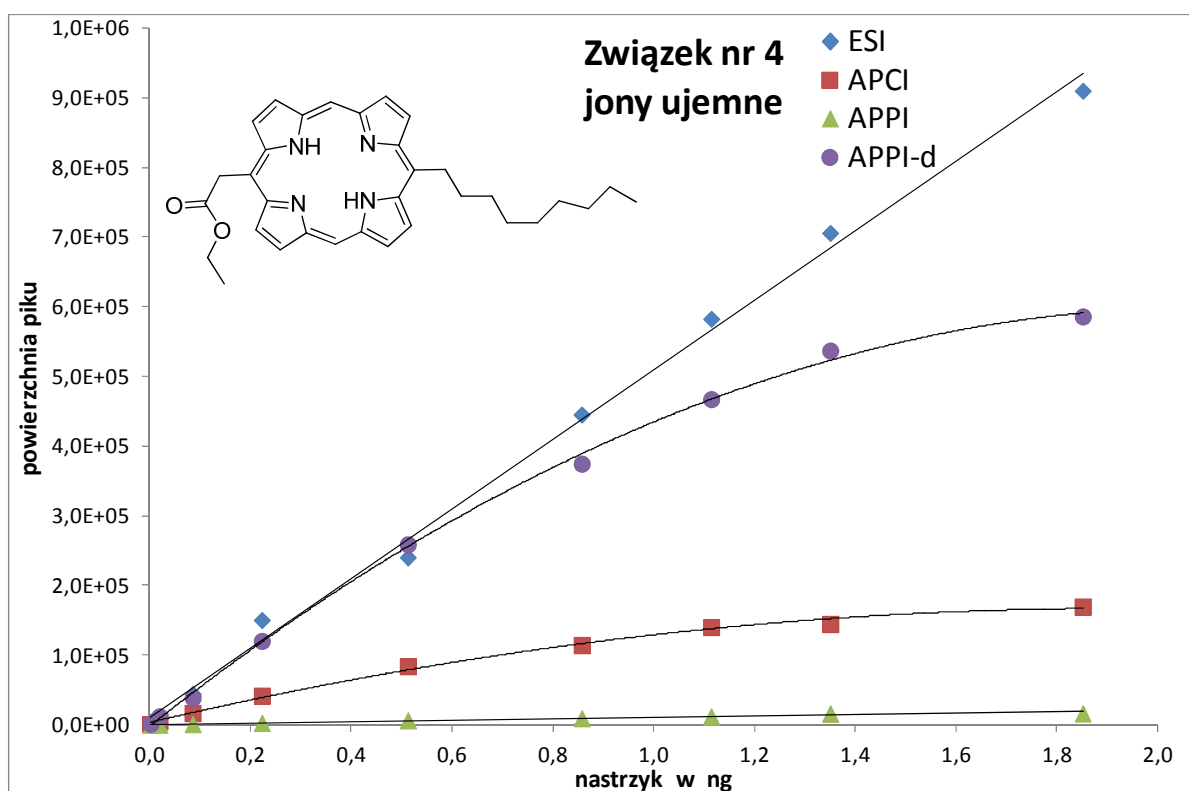
Rysunek 28. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 3 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był sygnał $[M-H]^-$).



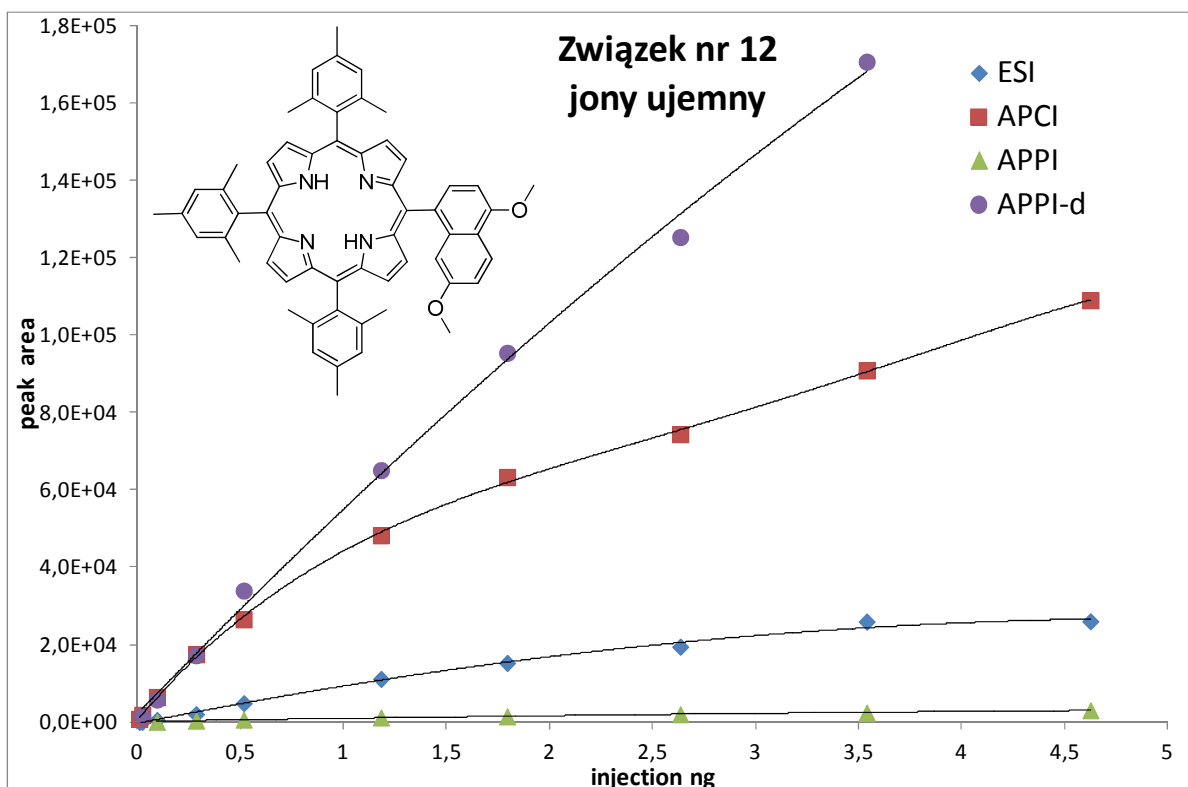
Rysunek 29. Porównanie czułości metody ESI w trybie jonów dodatnich i ujemnych dla związku nr 3 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

Wyniki uzyskane dla wolnych zasad koroli pokazują, że tak jak w przypadku jonów dodatnich tutaj również wyraźnie dominuje metoda elektrosprej (Rysunki 27 i 28). Przepaść dzieląca inne metody jonizacji od metody ESI jest ogromna. Tak samo zresztą przedstawiały się wyniki w przypadku jonów dodatnich. Można powiedzieć, że zgodnie z oczekiwaniem w metodzie ESI dla wszystkich wolnych koroli odpowiedź aparatu w przypadku jonów ujemnych była lepsza niż w jonach dodatnich. Taki wynik uzyskałem nawet dla związku **3**, który ze względu na obecność wielu podstawników elektronodonorowych jest najłagodniejszym kwasem w grupie przebadanych przeze mnie wolnych koroli. Mimo to, rejestrowałem dla tego związku około 4 razy większą odpowiedź aparatu w trybie jonów ujemnych na sygnał $[M-H]^-$ niż na jon $[M+H]^+$ w trybie jonów dodatnich (Rysunek 29).

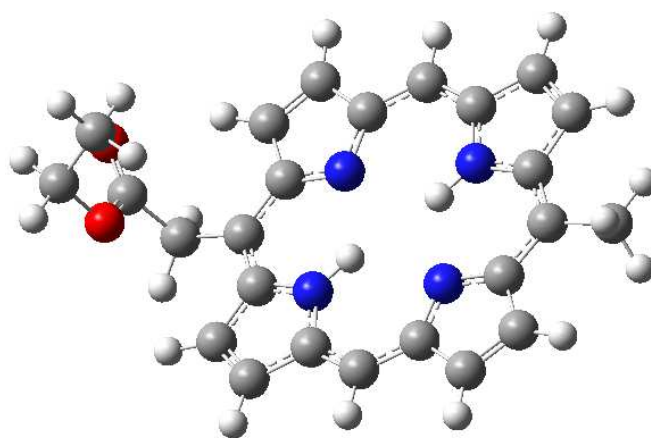
Wyniki dotyczące wolnych porfiryn pokazują, że nie można wskazać konkretnego kandydata na najlepszą metodę jonizacji. Dla związku **4** najlepsze wyniki uzyskałem metodą elektrosprej (Rysunek 30), natomiast dla związku **12** najlepiej spisywała się metoda APPI z dopantem (Rysunek 31). Należy podkreślić, że dla związku **4** obserwowałem sygnał $[M-H]^-$ natomiast w przypadku związku **12** sygnał anionorodnika. Różnica ta może mieć bezpośredni związek z otrzymanym przeze mnie wynikiem.



Rysunek 30. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 4 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był sygnał $[M-H]^-$).



Rysunek 31. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 12 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był sygnał M^+).



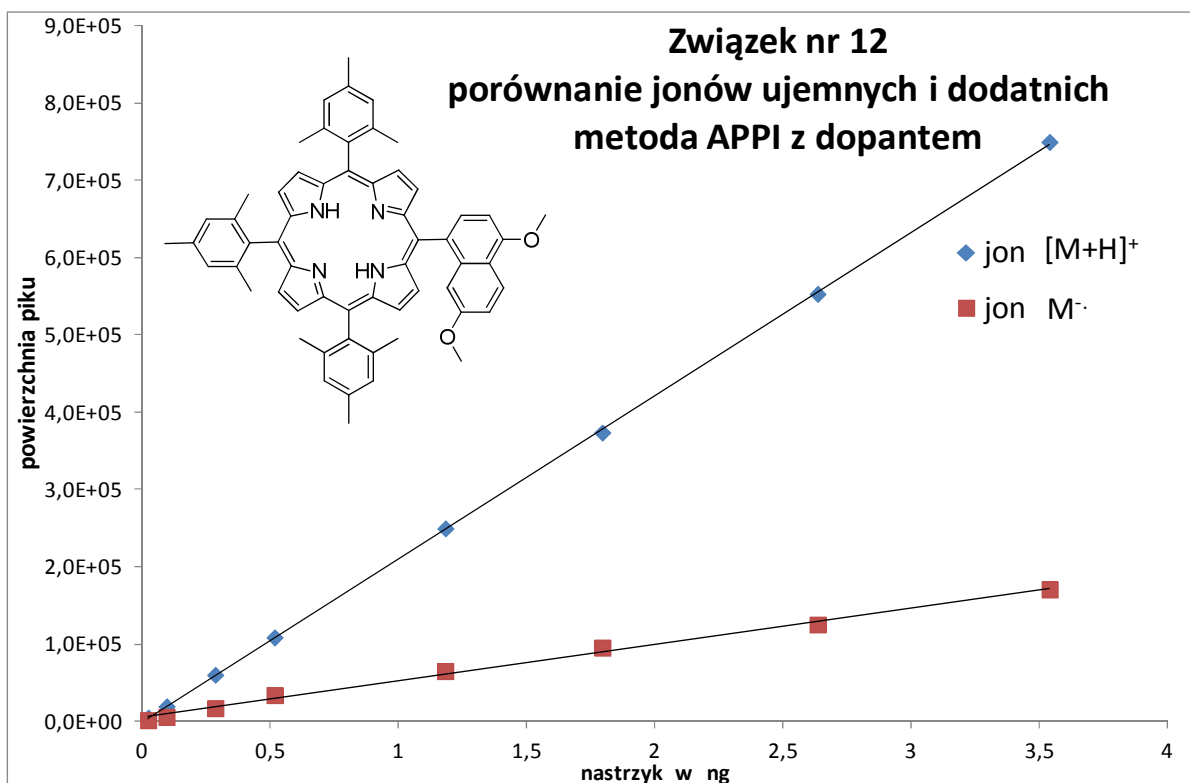
Rysunek 32. Geometria uproszczonego modelu porfiryny nr 4 wykorzystanego przy obliczeniach powinowactwa do protonu.

Chciałbym zaakcentować, że również w przypadku związku 4 jonizacja APPI z dopantem może być z powodzeniem stosowana do analizy tego związku, niewiele odbiegając od metody ESI w zakresie mniejszych stężeń. Dopiero przy przekroczeniu nastrzyku 1 ng związku zaczyna się rysować przewaga jonizacji ESI. Na uwagę zasługuje również jonizacja APCI, która, jak pokazuje przypadek związku 12, wraz z metodą APPI z dopantem wydaje się być wydajną metodą generowania anionorodników, jeżeli tylko związki analizowane przez te metody wykazują odpowiednie powinowactwo do elektronu.

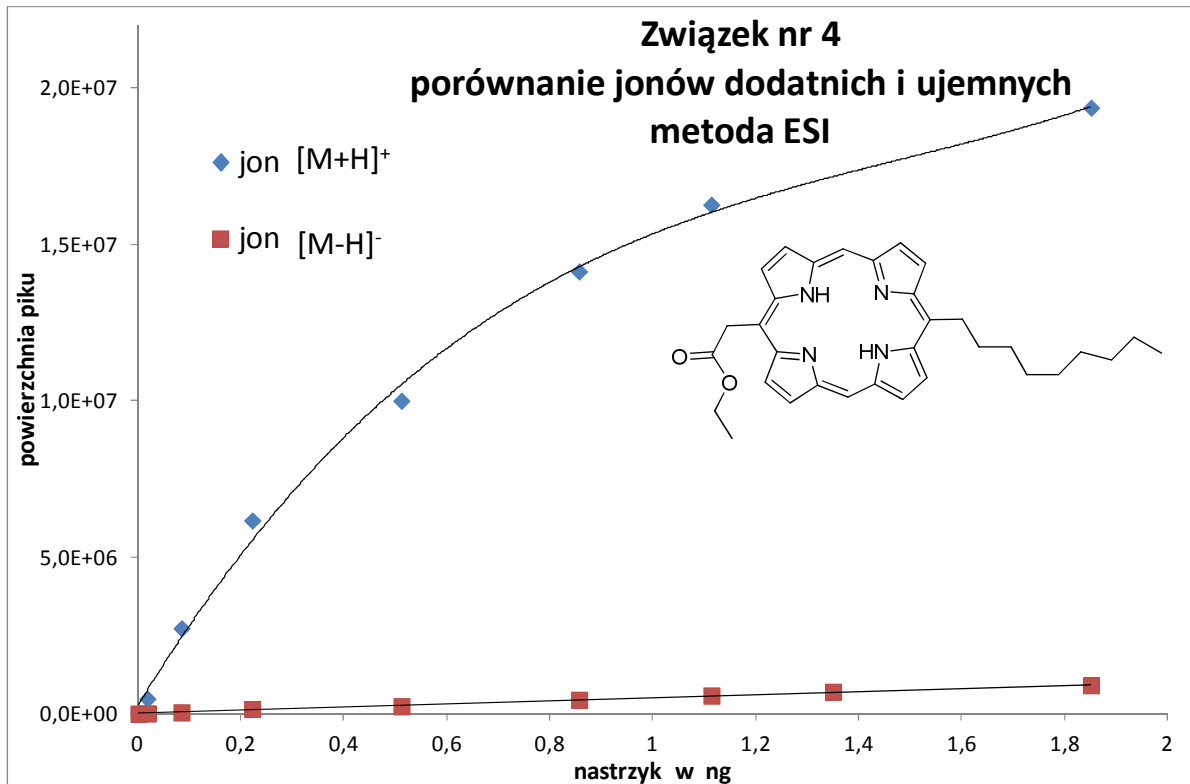
W przypadku wolnych porfiryn w jonach ujemnych nie uzyskujemy już tak intensywnych sygnałów jak dla koroli. Lepszą odpowiedź uzyskiwałem w jonach dodatnich. Dla przykładu dla związku **12** w jonizacji APPI z dopantem czułość w trybie jonów dodatnich jest mniej więcej siedmiokrotnie lepsza niż w trybie jonów ujemnych (Rysunek 33). Dla porfiryny **4** przewaga jonów dodatnich była jeszcze wyraźniejsza (Rysunek 34).

Z przeprowadzonych badań wynika, że w związku **4** dużą kwasowość wykazują protony węgla sąsiadującego z grupą estrową. Bezpośrednim dowodem na to jest obecność silnego sygnału $[M-H]^-$ dla kompleksu tego związku z cynkiem (związek nr **5**). Nie ma innej grupy protonów w cząsteczce związku **5**, które mogłyby w tak łatwy sposób ulegać oderwaniu. Postanowiłem, że potwierdzę moją hipotezę wykorzystując metody obliczeniowe chemii kwantowej, a konkretnie metodę M05-2X opartą na teorii funkcjonału gęstości elektronowej (DFT – *Density Functional Theory*). Wykonałem obliczenia powinowactwa do protonu odpowiednich anionów powstałych na skutek oderwania protonu od jednego z atomów azotu oraz od atomu węgla sąsiadującego z grupą estrową. W celu ułatwienia obliczeń i uniknięcia problemów konformacyjnych wykorzystałem uproszczony model cząsteczki porfiryny zawierający grupę metylową w pozycji *mezo* cząsteczki zamiast długiego łańcucha *n*-nonanowego (Rysunek 32). Wynik potwierdza moje założenia, gdyż powinowactwo do protonu anionu zlokalizowanego na atomie węgla wyniosło 341,5 kcal/mol i jest 12 kcal/mol niższe od uzyskanej wartości dla anionu umiejscowionego na atomie azotu gdzie $PA = 353,5$ kcal/mol. Tak duża różnica uzyskana na drodze obliczeń chemii kwantowej jednoznacznie potwierdza moją hipotezę.

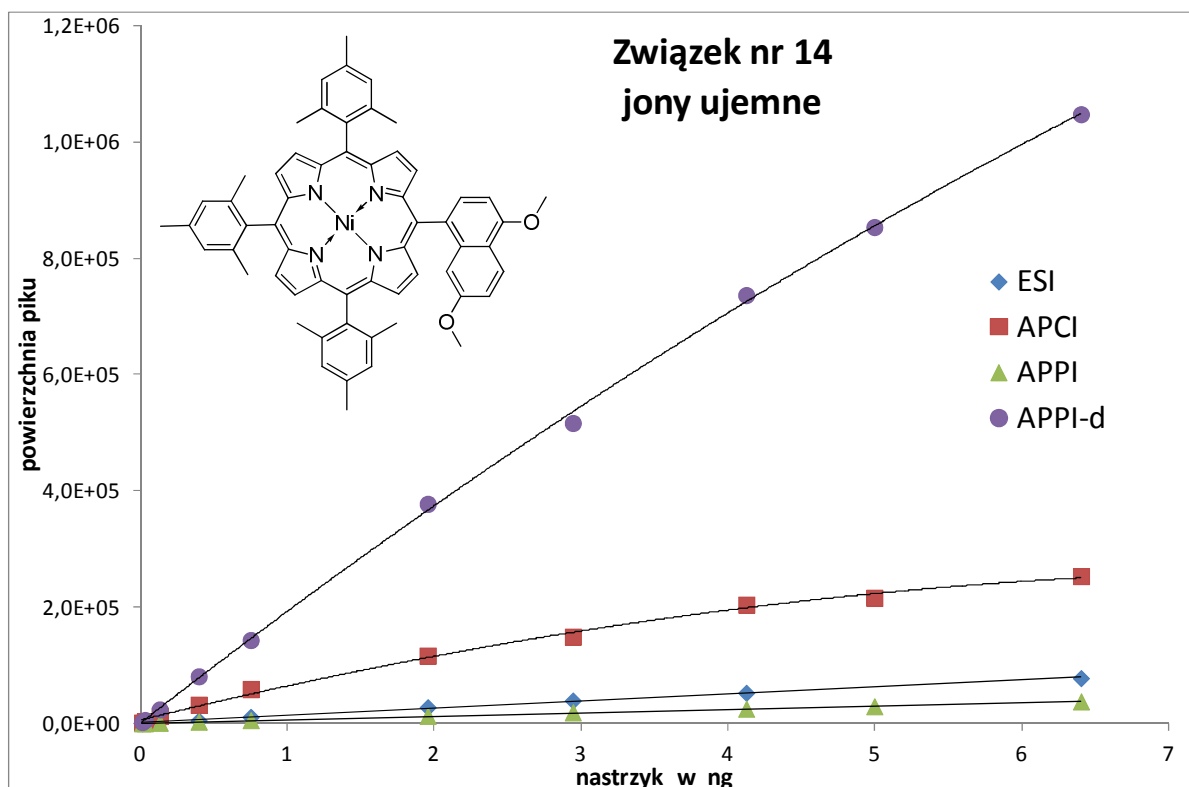
Wyniki uzyskane dla kompleksów z metalami przejściowymi są dość zróżnicowane, mimo to da się zauważyć pewne prawidłowości. Wśród kompleksów porfiryn na wyróżnienie zasługuje metoda APPI z dopantem, gdyż spisywała się najlepiej (dla przykładu wynik uzyskany dla związku **14** - Rysunek 35), z wyłączeniem kompleksów cynku **5** i **13**, gdzie w jonach ujemnych najlepsze wyniki uzyskiwała jonizacja ESI. Metoda elektrosprej bardzo słabo spisała się w jonach ujemnych dla kompleksu porfiryny z nikiem i miedzią (związki **14** i **15**), oferując czułość porównywalną z metodą APPI bez dopanta. Ponadto odpowiedzi otrzymywane dla tych kompleksów w APPI z dopantem może nie dorównują odpowiedziom uzyskiwanym w jonach dodatnich, lecz czułość jest tylko około 2 razy mniejsza w porównaniu do jonów dodatnich. Natomiast odpowiedzi uzyskiwane w jonach ujemnych w metodzie ESI dla kompleksów cynku (związki **5** i **13**) są porównywalne do tych uzyskanych dla ESI w jonach dodatnich.



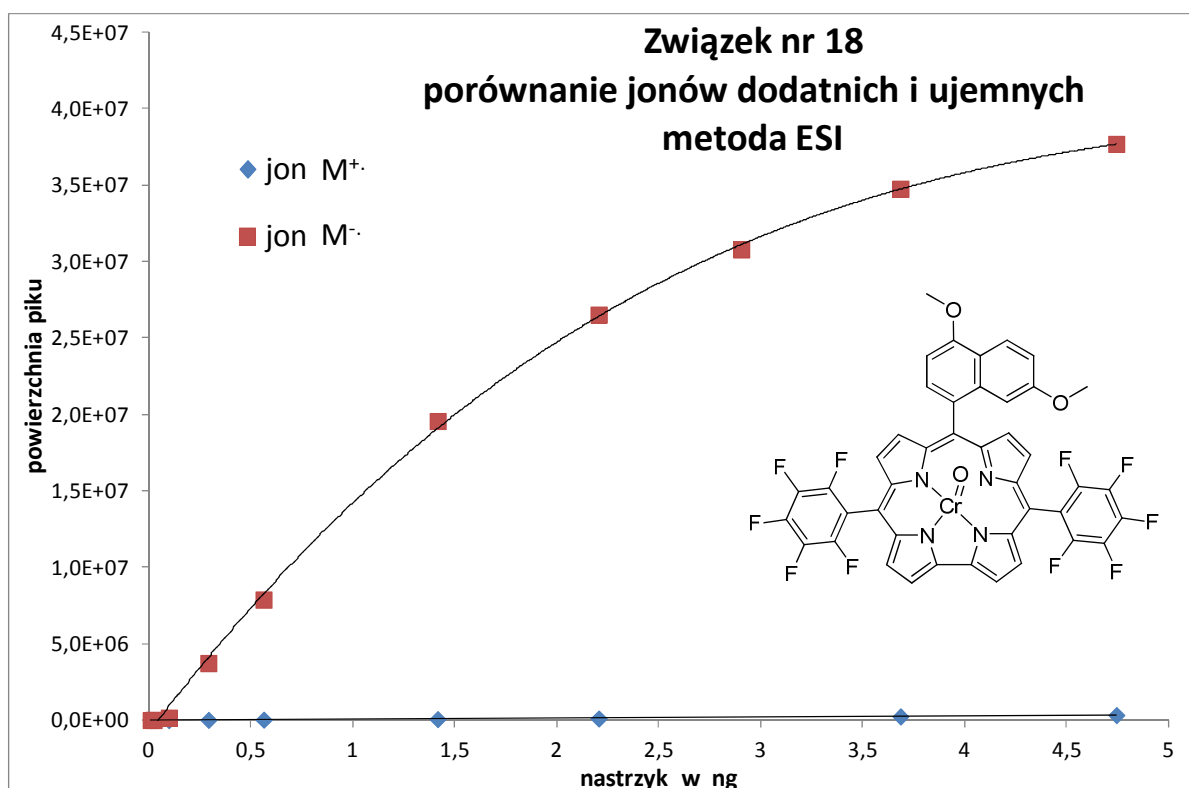
Rysunek 33. Porównanie czułości metody APPI z dopantem w trybie jonów dodatnich i ujemnych dla związku nr 12 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).



Rysunek 34. Porównanie czułości metody ESI w trybie jonów dodatnich i ujemnych dla związku nr 4 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

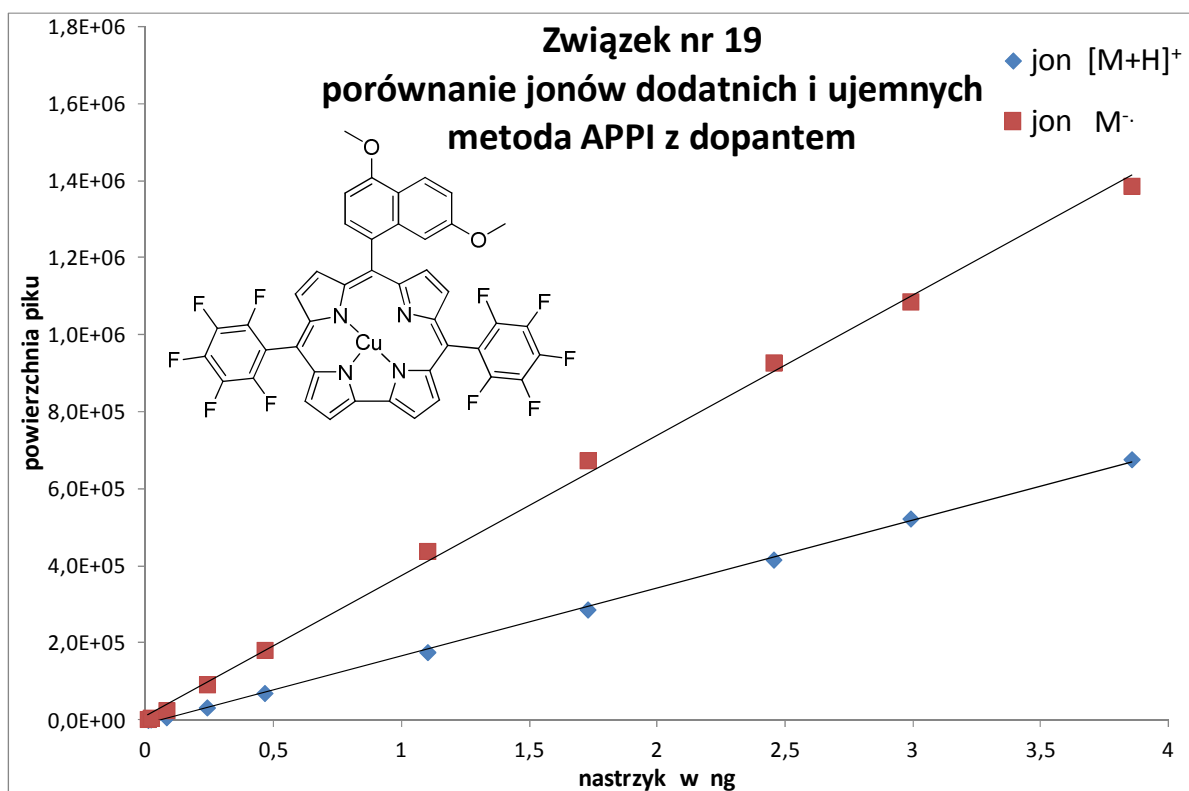


Rysunek 35. Porównanie czułości metod ESI, APCI i APPI wykonane dla związku nr 14 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był sygnał M⁻).



Rysunek 36. Porównanie czułości metody ESI w trybie jonów dodatnich i ujemnych dla związku nr 18 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

Z kolei wśród kompleksów koroli (związki **17**, **18**, **19** i **20**) należy wyróżnić jonizację elektrosprej, która oferowała w jonach ujemnych najlepszą czułość we wszystkich przebadanych przypadkach. Dodatkowo na uwagę zasługuje fakt, że jonizacja ESI dla kompleksów koroli dawała dużo lepsze odpowiedzi w trybie jonów ujemnych niż dodatnich. Zaprezentuję tę dominację jonów ujemnych na podstawie związków **18** i **19**. W przypadku kompleksu chromu **18** w obu trybach jonizacji najlepszą czułość oferowała jonizacja ESI, jednak, jak pokazuje Rysunek 36, różnica pomiędzy czułością aparatu w trybie jonów ujemnych i dodatnich jest bardzo duża. Z kolei dla kompleksu miedzi **19** w jonach dodatnich najlepszą czułość oferowała metoda APPI z dopantem, lecz gdybyśmy zestawili wynik uzyskany dla APPI z dopantem z jonów dodatnich i wynik uzyskany dla ESI w jonach ujemnych uzyskalibyśmy wykres identyczny jak ten pokazany dla związku **18** (Rysunek 36). Biorąc pod uwagę tylko rezultat uzyskany dla związku **19** w APPI z dopantem w obu trybach jonizacji również uzyskamy wykres, w którym czułość w jonach ujemnych jest lepsza niż w dodatnich (Rysunek 37), jednak już w tym przypadku czułość jonów ujemnych jest tylko niewiele ponad dwa razy większa.



Rysunek 37. Porównanie czułości metody APPI z dopantem w trybie jonów dodatnich i ujemnych dla związku nr 19 (w oparciu o parę MRM gdzie prekursorem był odpowiedni jon tak jak pokazano na rysunku).

Tabela 2. Tryb jonów dodatnich

Numer związku	ESI	APCI	APPI z dopantem	APPI bez dopanta	Komentarz
1					korole wolne zasady
2					
3					
4					porfiryra wolna zasada
5					kompleks porfiryryny
6				-----	witamina B ₁₂ i jej pochodne
7					
8					
9					porfiryra i jej kompleksy zawierające długie polarne łańcuchy
10					
11					porfiryra wolna zasada
12					
13					kompleksy porfiryryny 12
14					
15					
16					korol wolna zasada
17					kompleksy korolu 16
18					
19					
20					

Tabela 3. Tryb jonów ujemnych

Numer związku	ESI	APCI	APPI z dopantem	APPI bez dopanta	Komentarz
1					korole wolne zasady
2					
3					
4					porfiryra wolna zasada
5					kompleks porfiryryny
6				-----	witamina B ₁₂ i jej pochodne
7					
8					
9					porfiryra i jej kompleksy zawierające długie polarne łańcuchy
10					
11					porfiryra wolna zasada
12					
13					kompleksy porfiryryny 12
14					
15					
16					korol wolna zasada
17					kompleksy korolu 16
18					
19					
20					

Legenda: W tabelach kolor zielony oznacza, że dana metoda jonizacji oferowała najlepszą czułość, kolor czerwony odpowiada metodzie, która zajęła drugie miejsce pod względem oferowanej czułości, a kolor żółty miejsce trzecie.

Myślę, że dobrym podsumowaniem tego obszernego, ale bardzo istotnego dla mojej rozprawy podrozdziału, będą zbiorcze tabele porównujące wszystkie uzyskane wyniki dla przebadanej grupy związków. W tabelach kolor zielony oznacza, że dana metoda jonizacji oferowała najlepszą czułość, kolor czerwony odpowiada metodzie, która zajęła drugie miejsce pod względem oferowanej czułości, a kolor żółty miejsce trzecie. Jeżeli dwie metody jonizacji oznaczone są tym samym kolorem to znaczy, że oferowały porównywalną czułość. Kreskami (-----) oznaczono przypadki, gdzie w badanym zakresie stężeń nie uzyskano odpowiedzi aparatu lub była ona znikoma.

Tabela 2 przedstawia zbiorczą informację na temat rezultatów uzyskanych w trybie jonów dodatnich, natomiast Tabela 3 prezentuje rezultaty otrzymane w jonach ujemnych. Z analizy przedstawionych tabel i innych wyników zaprezentowanych w tym podrozdziale wynikają następujące wnioski:

- Jonizacja ESI oferowała najlepszą czułość w przeważającej liczbie przypadków. Ponadto jonizacja ESI nie ma sobie równych w odniesieniu do związków bardzo polarnych (pochodne witaminy B₁₂). Gorsze wyniki z wykorzystaniem tej metody jonizacji obserwowane były dla kompleksów z metalami przejściowymi grupy d (szczególnie dla kompleksów porfiryn).
- W przypadkach gdy dla jonizacji ESI obserwowane były słabsze czułości, dobrą czułość oferowała jonizacja APPI z dopantem. Mam tu na myśli przede wszystkim kompleksy porfiryn z metalami bloku d układu okresowego. Niewątpliwie jonizacja APPI z dopantem umożliwia uzyskanie najlepszych wyników dla tej grupy związków i powinna być uwzględniana w pierwszej kolejności przed innymi metodami jonizacji przy planowaniu analiz.
- Jonizacja APCI dawała słabe wyniki tylko w przypadku wolnych zasad porfiryn i koroli, natomiast w pozostałych przypadkach ustępowała tylko jonizacji ESI. Technika ta wydaje się być rozsądnym wyborem jeżeli analizujemy złożoną mieszaninę związków o różnej polarności.
- Należy podkreślić, że przy planowaniu analiz, dla koroli i ich kompleksów z metalami bloku d, należy rozważyć możliwość analizy tych układów w trybie jonów ujemnych, bo możemy uzyskać lepszą czułość niż w jonach dodatnich.

3.2.3. Granice wykrywalności metod pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym

W poprzednim podrozdziale przedstawiłem szereg wykresów obrazujących odpowiedź aparatury na określone stężenie analitu. Na ich podstawie można oszacować granicę wykrywalności metody jonizacji stosując odpowiedni model statystyczny i traktując je jako krzywe kalibracyjne. W swoich obliczeniach oparłem się na metodologii wykorzystywanej przy obliczaniu granicy wykrywalności przez Bogusz i wsp.⁶⁴ Obliczali oni granicę wykrywalności (z ang. LOD – *Limit of Detection*) stosując następujący wzór:

$$LOD = \frac{S_y t_{f,\alpha}}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}}$$

gdzie: S_y – względne odchylenie standardowe punktów od prostej (lub od paraboli)

N – liczba powtórzeń w obrębie jednego poziomu stężenia

\hat{N} – liczba poziomów

$t_{f,\alpha}$ – wartość parametru t-Studenta dla $f = \hat{N} - 2$ i $\alpha = 0,05$.

m – jest współczynnikiem kierunkowym prostej

Q_{xx} – odchylenie kwadratowe wszystkich wartości nastrzyku: $Q_{xx} = \sum(x_i - \bar{x})^2$

\bar{x} – wartość średnia z wszystkich nastrzyków

Tabela 4. Wartości granicy wykrywalności uzyskane w jonach dodatnich

Nr	wartość LOD w ng				Komentarz
	ESI	APCI	APPI	APPI-dopant	
1	0.10	1.46	13.47	1.30	korole wolne zasady
2	0.05	0.11	1.33	0.39	
3	0.03	0.15	0.80	0.28	
4	0.01	0.10	0.03	0.04	porfiryne wolna zasada
5	0.02	0.06	0.04	0.04	kompleks porfiryne
6	0.08	17.47	---	22.63	witamina B ₁₂ i jej pochodne
7	0.07	0.10	0.24	0.49	
8	0.04	0.12	2.64	0.20	
9	0.01	0.15	0.54	0.09	porfiryne i jej kompleksy zawierające długie polarne łańcuchy
10	0.01	0.12	1.69	0.52	
11	0.02	0.02	3.48	0.25	
12	0.06	0.06	0.19	0.02	porfiryne wolna zasada
13	0.52	0.06	0.42	0.02	kompleksy porfiryne 12
14	0.12	0.21	0.23	0.15	
15	0.03	0.10	0.39	0.09	
16	0.13	0.12	0.47	0.32	korol wolna zasada
17	0.16	0.22	0.15	0.15	kompleksy korolu 16
18	0.32	1.60	0.27	0.08	
19	0.27	0.22	0.23	0.11	
20	4.15	0.50	1.27	0.27	

Legenda: Kolor zielony - wartość granicy wykrywalności jest ≤ 0.1 ng. Kolor czerwony - wartość granicy wykrywalności jest ≥ 1 ng)

Tabela 5. Wartości granicy wykrywalności uzyskane w jonach ujemnych

Nr	wartość LOD w ng				Komentarz
	ESI	APCI	APPI	APPI-dopant	
1	0.02	0.45	23.06	3.08	korole wolne zasady
2	0.01	0.14	0.58	0.34	
3	0.02	0.18	1.25	0.28	
4	0.08	0.04	0.07	0.06	porfiryne wolna zasada
5	0.13	0.04	0.15	0.02	kompleks porfiryne
6	0.19	48.74	---	---	witamina B ₁₂ i jej pochodne
7	3.73	0.04	---	0.20	
8	0.32	---	---	---	
9	1.59	0.04	2.10	0.08	porfiryne i jej kompleksy zawierające długie polarne łańcuchy
10	2.71	1.75	---	1.79	
11	0.23	---	---	---	
12	1.22	0.04	1.58	0.10	porfiryne wolna zasada
13	0.38	0.15	---	1.46	kompleksy porfiryne 12
14	0.29	0.13	0.46	0.19	
15	0.21	0.05	0.22	0.21	
16	0.01	0.02	0.39	0.15	korol wolna zasada
17	0.01	0.15	0.12	0.09	kompleksy korolu 16
18	0.13	0.47	0.08	0.09	
19	0.03	0.09	0.26	0.11	
20	0.02	0.49	9.49	0.61	

Legenda: Kolor zielony - wartość granicy wykrywalności jest $\leq 0.1\text{ng}$. Kolor czerwony - wartość granicy wykrywalności jest $\geq 1\text{ng}$

W przypadkach, gdzie nie było liniowości, wykorzystałem funkcję kwadratową, a człon $\frac{S_y}{m}$ został zamieniony na wartość x wyliczoną dla funkcji kwadratowej dopasowanej do punktów na wykresie i podniesionej do góry o wartość błędu S_y , czyli dla funkcji: $y = ax^2 + bx + c + S_y$ (gdzie a , b i c są współczynnikami otrzymanymi dla pierwotnie dopasowanej funkcji).

Tabele 4 i 5 przedstawiają obliczone granice wykrywalności dla wyników uzyskanych odpowiednio w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Przedstawione wartości są obarczone dużym błędem ze względu na małą dostępną liczbę wyników wziętą do obliczeń. W mojej pracy jako główny cel obrałem sobie porównanie czułości metod jonizacji, a przy wyznaczaniu wartości LOD ograniczyłem się jedynie do oszacowania rzędu wielkości z jakim mamy do czynienia. Tabele pokolorowałem, aby pokazać gdzie uzyskana wartość granicy wykrywalności była mała (kolor zielony, wartości $\leq 0.1\text{ng}$) oraz duża (kolor czerwony, wartości $\geq 1\text{ng}$). Wyniki na poziomie 0.1ng nastrzyku lub mniej w jonach dodatnich odnotowane zostały prawie 30 razy. W jonach ujemnych tak dobrych wyników było nieco mniej, a wyników większych od 1ng (komórki wypełnione kolorem czerwonym) było dużo

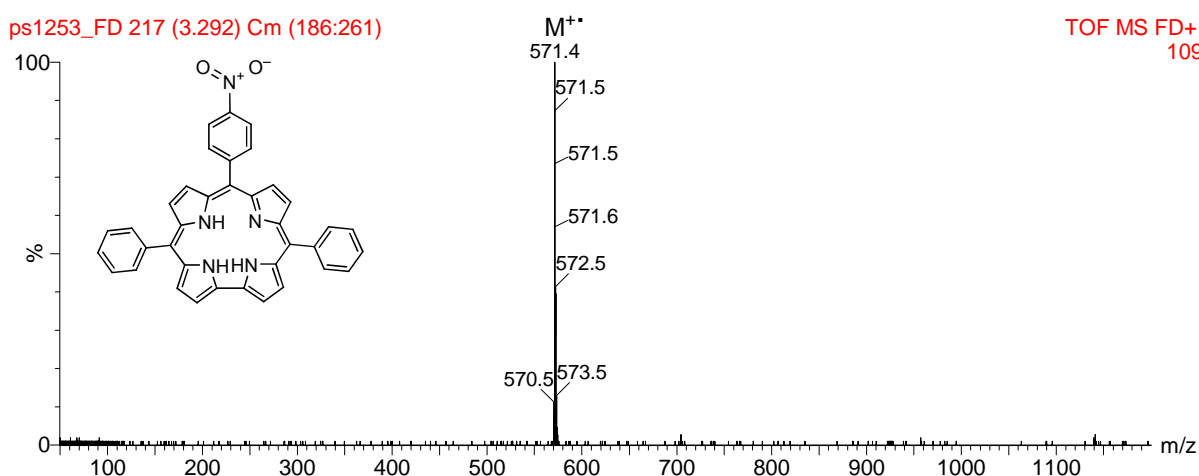
więcej niż w jonach dodatnich. W szczególności widoczne to jest dla związków od 6 do 11. Taki rezultat nie powinien dziwić, gdyż w przeważającej liczbie przypadków również czułość była niższa dla jonów ujemnych, co zostało pokazane w poprzednim podrozdziale. Jednak nie należy zapominać o możliwości wykorzystania jonów ujemnych podczas analiz, gdyż dla wielu układów głównie w jonizacjach ESI i APCI uzyskiwane były bardzo dobre wyniki w granicach setnych części nanograma (Tabela 5).

3.2.4. Znaczenie metod EI i FD w analizie porfirynoidów

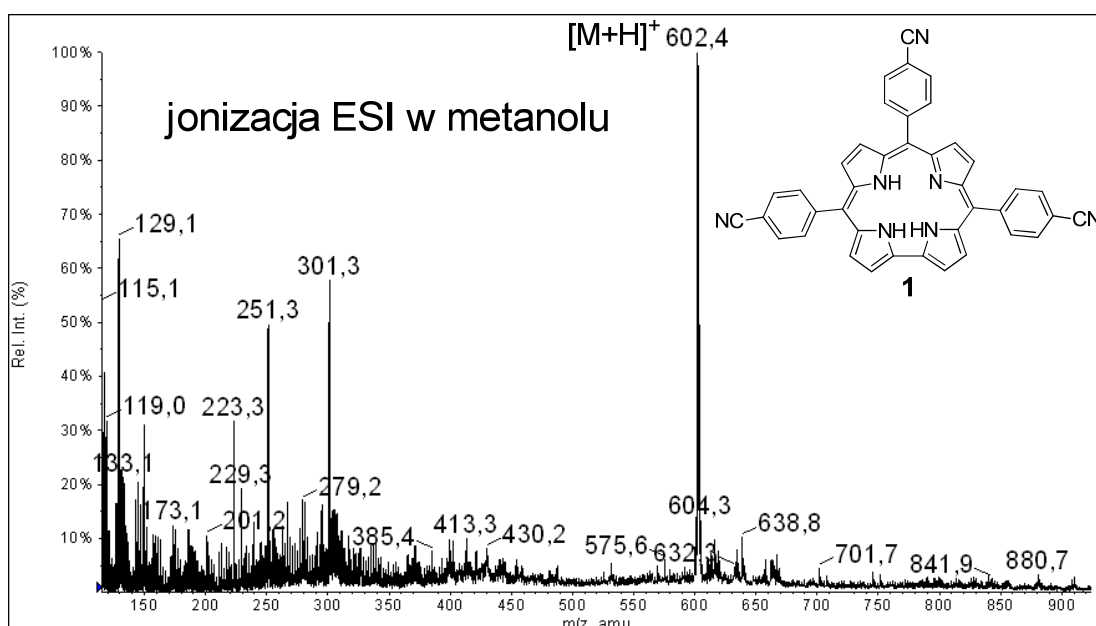
Kwestie związane z analizą układów porfirynowych za pomocą metody EI zostały szeroko omówione w części literaturowej niniejszej pracy. Problematyka tych pomiarów jest dość dobrze zbadana i opisana w literaturze. W początkowej fazie badań wykonałem znaczącą liczbę pomiarów z wykorzystaniem tej metody jonizacji, jednak rezultaty tych pomiarów nie wносиły nic nowego do dostępnej wiedzy na temat analiz EI układów porfirynowych. Dodatkowo duże ilości związku zużywane przy wykonaniu takich analiz sprawiły, że zaprzestałem pomiarów metodą EI i skoncentrowałem się na innych, mniej zbadanych w tym obszarze, metodach jonizacji, takich jak jonizacja FD.

Jonizacja poprzez desorpcję polem jest metodą jonizacji pracującą w warunkach wysokiej próżni. Na efekt końcowy, czyli widmo danego związku wpływ ma wiele czynników: ilość nałożonego związku, ustawienie sondy i wiele inne. Cały proces rejestrowania widma jest narażony na wiele zmiennych czynników i nawet jeśli wykonamy dwa pomiary z zachowaniem należytej staranności to i tak uzyskuje się często całkowicie różne intensywności sygnałów lub po prostu jeden z pomiarów będzie udany, a drugi nie. W laboratorium spektrometrii mas IChO PAN stosuje się tę metodę jonizacji dość często i nasza praktyka pokazuje, że w przypadku trudniejszych do zmierzenia próbek konieczne jest wykonanie kilku prób i czasem drobna nawet zmiana ustawienia sondy sprawia, że w końcu uzyskuje się widmo. Z tych powodów trudno jest mówić o powtarzalności eksperymentów w tej metodzie jonizacji. Pomimo tych mankamentów, które wymieniłem tutaj i całego szeregu innych wspomnianych w części literaturowej metoda FD jest dla porfirynoidów godna polecenia. Wykonanie widma często sprawia wiele trudności, ale odpowiednio doświadczony operator jest w stanie zarejestrować widmo FD dla prawie każdego związku z grupy porfirynoidów. Uzyskane widma zawierają zwykle tylko jon molekularny związku analizowanego. W przypadku porfirynoidów jest to zawsze kationorodnik, nie spotkałem się wykonując dużą liczbę pomiarów, aby obserwowane były dla porfirynoidów sygnały pseudomolekularne ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ lub inne). Rysunek 38 przedstawia widmo FD korolu

A₂B posiadającego grupę nitrową. W widmie widoczny jest praktycznie tylko jeden sygnał pochodzący od jonu molekularnego. Dodatkowo należy zaakcentować obecność sygnału $[M^+ - H^+]^+$ ($m/z = 570$), który w przypadku koroli bardzo często jest obserwowany w widmach, osiągając czasem pokaźne intensywności (osiągające w niektórych przypadkach prawie 50% intensywności jonu M^+). Często spotykanym sygnałem w widmach porfirynoidów jest także klaster $[2M]^{2+}$, nieobecny w przypadku prezentowanym niżej. Bardzo istotna w widmach FD jest ich prostota, a więc praktycznie tylko sygnał jonu molekularnego bez dodatkowych sygnałów tła, które często w dużej liczbie obserwuje się, na przykład, w widmach wykonanych za pomocą technik sprejowych (na przykład widmo ESI w metanolu związku nr 1 (Rysunek 39)).

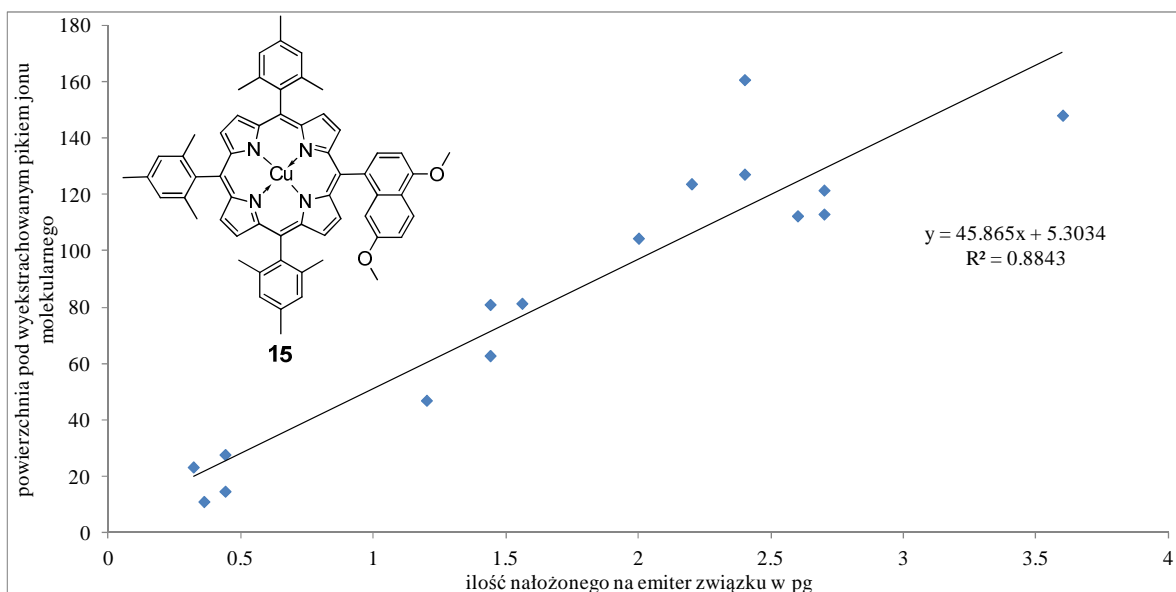


Rysunek 38. Widmo FD 10-(4-nitrofenylo)-5,15-difenylokorołu.



Rysunek 39. Widmo ESI w metanolu zarejestrowane dla związku nr 1.

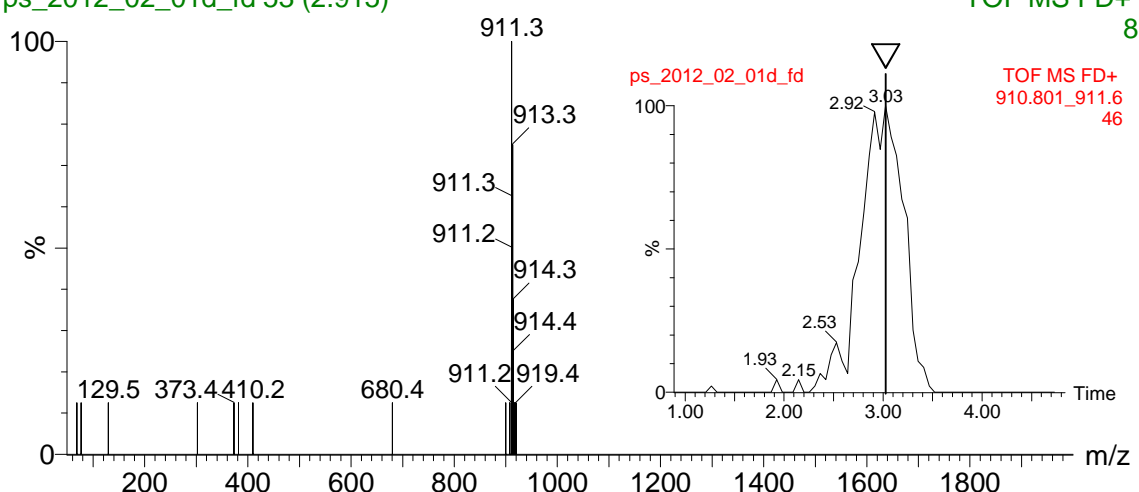
Mimo przeszkód związanych z powtarzalnością postanowiłem dla jednego związku spróbować oszacować rząd ilości związku potrzebny do wykonania widma FD-MS. Przygotowałem cztery roztwory związku nr 15 o różnych stężeniach, a następnie po jednej kropli każdego roztworu nakładałem za pomocą mikrostrzykawki na emiter i wykonywałem pomiar. Dla każdego stężenia wykonałem cztery takie pomiary. Oczywiście każda kropla była inna, lecz korzystając z podziałki na mikrostrzykawce mogłem w przybliżeniu odczytać ile roztworu za każdym razem nałożyłem na emiter. Jako odpowiedź aparatu postanowiłem wykorzystać powierzchnię pod pikem wyekstrahowanym dla jonu molekularnego. Uzyskany wynik przedstawiłem w postaci wykresu (Rysunek 40). Rozrzut punktów na wykresie potwierdza chaotyczność i brak powtarzalności metody. Jednak nie to jest w całym eksperymencie interesujące. Ciekawe jest to, że przy ilościach związku poniżej 0.5 pg udało się uzyskać zadawalające widma. Rysunek 41 przedstawia widmo pojedynczego skanu (skan odczytany w szczycie intensywności jonu molekularnego), otrzymanego dla pomiaru roztworu o jednym z najmniejszych stężeń. Szczytowa intensywność wyniosła 8 jednostek, co w porównaniu z szumami aparatuowymi, które w przypadku tego pomiaru nie przekraczały jednej jednostki jest całkiem dobrym wynikiem.



Rysunek 40

BD4; P. Swider

ps_2012_02_01d_fd 53 (2.915)



Rysunek 41

Kilka innych eksperymentów wykorzystujących metodę FD i akcentujących jej znaczenie w badaniu porfirynoidów zostanie przedstawionych w dalszej części pracy w rozdziale dotyczącym identyfikacji fotochemicznych produktów rozkładu koroli (str. 97).

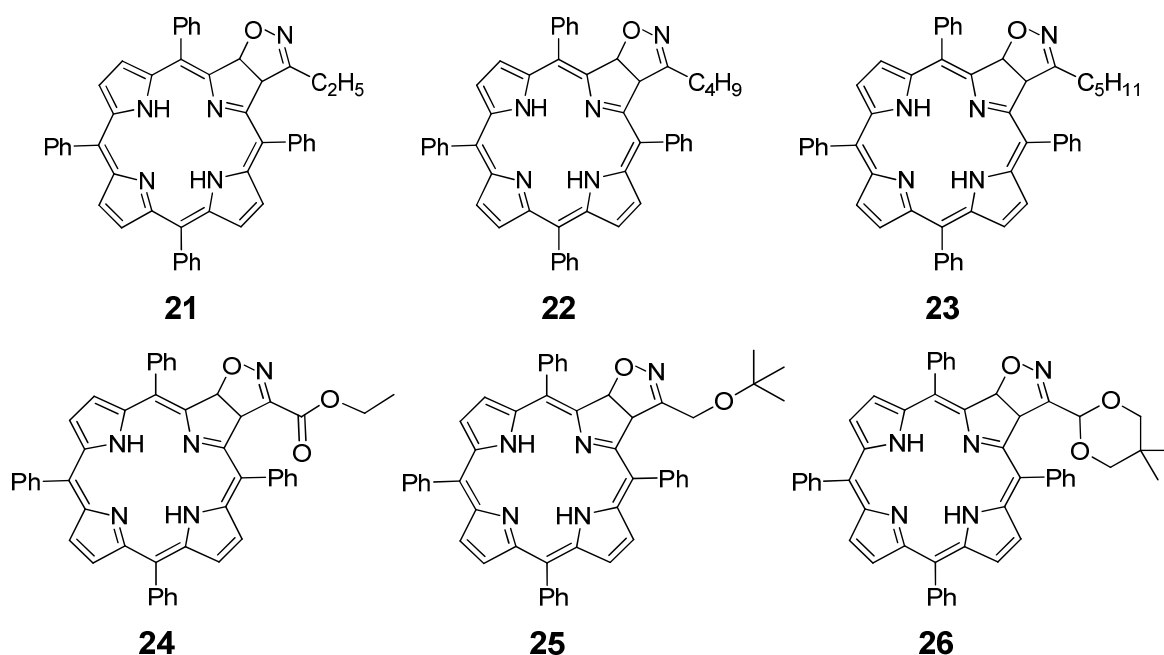
3.3. Cechy charakterystyczne widm MS/MS wybranych porfirynoidów

3.3.1. Wstęp

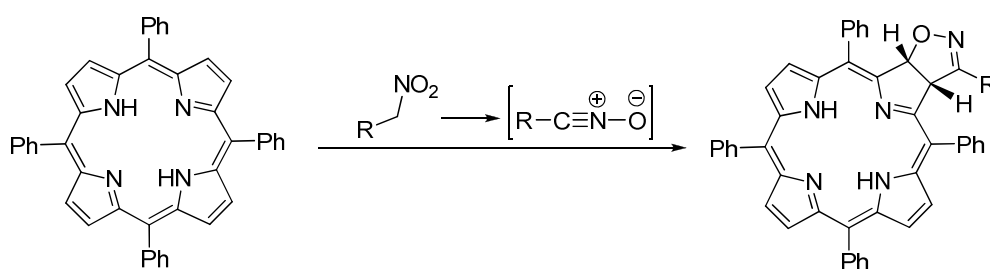
Istotną cechą tandemowej spektrometrii mas jest możliwość uzyskania informacji strukturalnej na drodze fragmentacji wyselekcjonowanego jonu wywoływanej za pomocą kolizji z gazem obojętnym. W ten sposób uzyskujemy widma fragmentacyjne, które zawierają istotne informacje strukturalne. Jony fragmentacyjne są charakterystyczne dla danego związku lub grupy związków, dlatego można przewidywać struktury lub pewne elementy budowy nieznanymi związków na podstawie widm fragmentacyjnych. W moim przypadku postaram się wnieść swój wkład do wiedzy na temat reakcji fragmentacji porfirynoidów i przedstawić zwięzły opis najważniejszych cech obserwowanych reakcji fragmentacji, który mógłby w przyszłości ułatwić analizę nieznanymi związków z grupy układów porfirynowych za pomocą spektrometrii mas.

3.3.2. Fragmentacje układów chlorynowych zawierających pierścienie izoksazolinowy

W tej części mojej pracy przedstawię reakcję fragmentacji układów opartych o szkielet chlorynowy tzn. układów posiadających przynajmniej jedno wiązanie nasycone pomiędzy atomami węgla β pierścienia pirolowego. Struktury powyższych związków są przedstawione na Schemacie 30. Przeanalizowane przeze mnie chloryny zostały otrzymane na drodze reakcji dipolarnej 1,3-cykloaddycji odpowiedniej porfiryny z tlenkami nitryli (związki **21** - **26**) (Schemat 31).⁶⁵ Związki te do badań udostępnił Zespół prof. Stanisława Ostrowskiego z Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego z Siedlec.

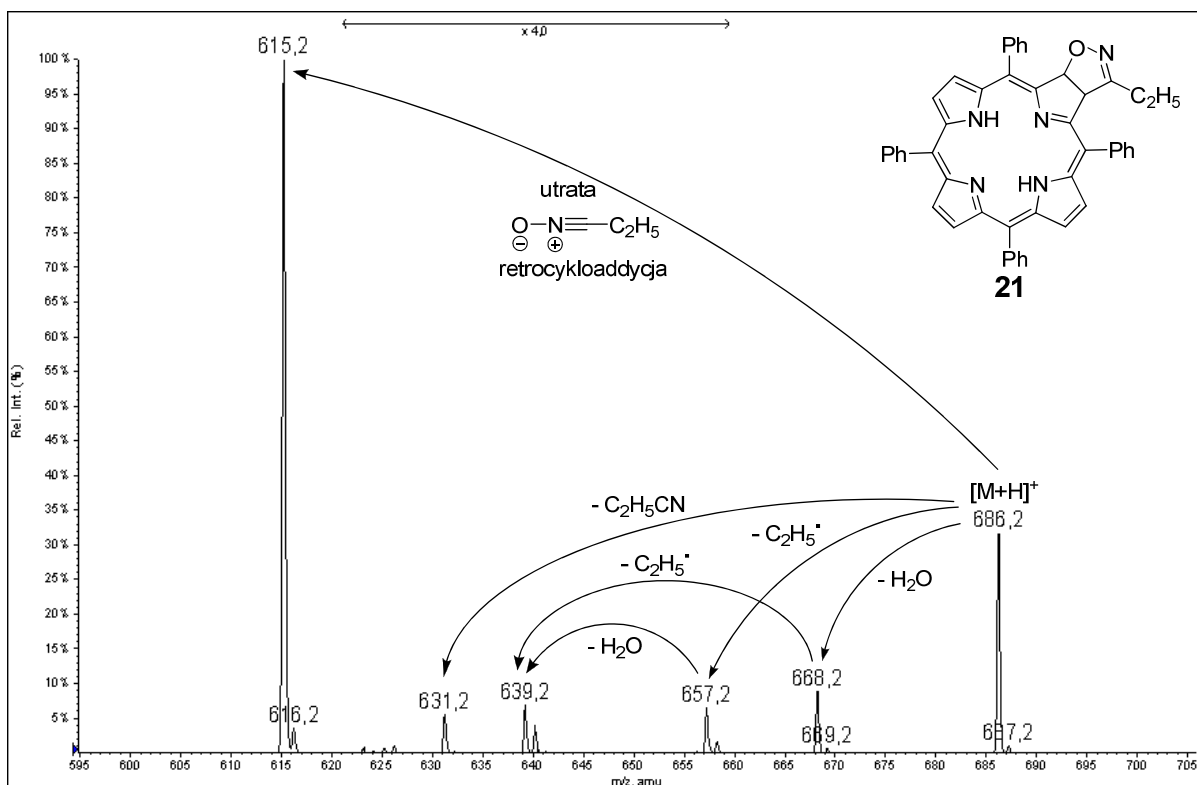


Schemat 30

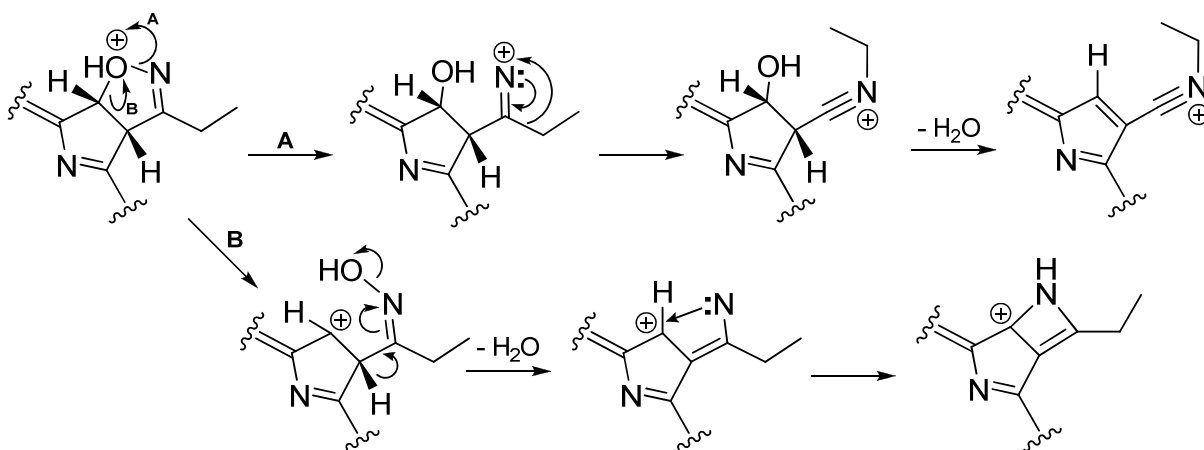


Literatura naukowa z dziedziny spektrometrii mas, opisująca fragmentacje pierścieni izoksazolinowych dotyczy głównie fragmentacji jonów nieparzystoelektronowych generowanych za pomocą źródła EI.⁶⁶ Udało mi się znaleźć dwa doniesienia literaturowe opisujące reakcje fragmentacji dla jonów $[M-H]^-$ generowanych w jonizacji CI⁶⁷ i ESI⁶⁸. W swojej pracy postanowiłem zbadać zachowanie pierścienia izoksazolinowego, połączonego z dużym układem wiązań podwójnych, w warunkach komory zderzeń spektrometru mas.

Fragmentacji poddałem jony parzystoelektronowe ($[M+H]^+$ lub $[M-H]^-$). W trybie jonów dodatnich w warunkach komory zderzeń dochodziło do reakcji retrocykloaddycji, która była procesem dominującym. Sygnał jonu odpowiadającego temu procesowi był głównym sygnałem w widmach fragmentacyjnych. Dla przykładu Rysunek 42 przedstawia widmo fragmentacyjne - najprostszego z tej grupy - związku **21**. Sygnał odpowiadający reakcji retrocykloaddycji obserwowany przy $m/z = 615$ jest głównym sygnałem w widmie fragmentacyjnym. Pozostałe sygnały (na widmie powiększone 4 razy), za wyjątkiem eliminacji cząsteczki wody, są słabo widoczne. Eliminacja wody jest zaskakującą i niespodziewaną reakcją fragmentacji w przypadku tego typu związków. Mimo to była już obserwowana w jonizacji CI w trybie jonów ujemnych.⁶⁷ Jest ona dobrze widoczna również w widmach fragmentacyjnych związków **22** i **23**. Obecność tego sygnału świadczy o przebiegu skomplikowanego procesu. Schemat 32 przedstawia dwie moje propozycje odnośnie przebiegu tej reakcji fragmentacji.



Rysunek 42. Widmo fragmentacyjne sygnału $[M+H]^+$ związku **21** wykonane przy energii kolizji CE = 40 eV.



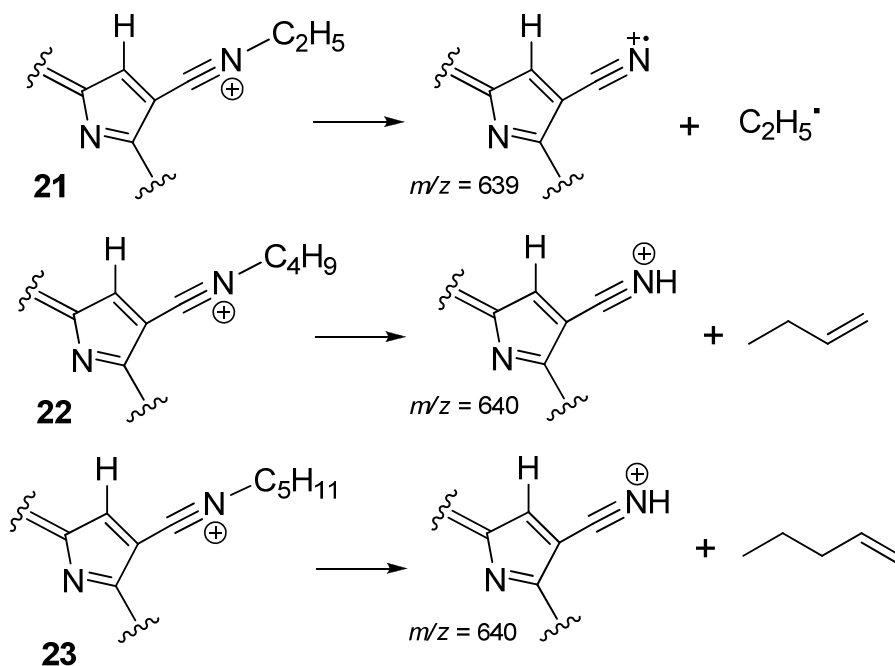
Schemat 32

Najprawdopodobniej atom tlenu pierścienia izoksazolowego podlega protonowaniu, a obecność ładunku dodatniego w tym położeniu może indukować procesy rozerwania pierścienia izoksazolowego. W wariacie **A** rozrywa się wiązanie tlen-azot, a grupa etylowa ulega przegrupowaniu na atom azotu z utworzeniem kationu N-etylonitrylowego. Następnie ze złącza chlorynowego eliminuje się woda, a utworzone wiązanie podwójne łączy wiązanie wielokrotne ugrupowania nitrylowego z układem wiązań sprzężonych makrocykla. W wariacie **B** rozerwaniu ulega wiązanie węgiel-tlen i tworzy się oksym, który traci jednocześnie grupę hydroksylową oraz atom wodoru umiejscowiony na złączu chlorynowym tworząc nitren, który następnie cyklizuje poprzez insercję do wiązania C-H.

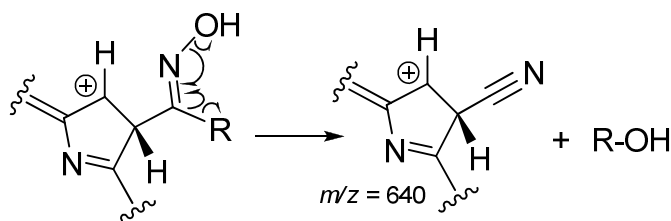
Obecność coraz dłuższego łańcucha alkilowego przyłączonego do pierścienia izoksazolinowego (związki **22** i **23**) nie wpływa znacząco na wygląd widma fragmentacyjnego. Można zauważyć jedną drobną różnicę w porównaniu do widma związku **21**: intensywność jonu $m/z = 640$ jest większa niż jonu $m/z = 639$, co sugeruje, że dla związków **22** i **23**, po odpadnięciu wody, eliminacji ulega głównie alken, a nie rodnik alkilowy, jak było w przypadku związku **21** (Schemat 33). Istnieje również inna ścieżka prowadząca do jonu $m/z = 640$, a mianowicie eliminacja odpowiedniego alkoholu z oksymu, który tworzy się pod wpływem protonowania tlenu pierścienia izoksazolinowego (Schemat 34).

Ponadto, mimo wydłużania łańcucha alkilowego niezależnie od tego czy jest to łańcuch czterowęglowy (związek **22**) czy pięciowęglowy (związek **23**) obserwowana jest eliminacja od jonu protonowanego rodnika etylowego (sygnał $[M-29]^+$ w widmach fragmentacyjnych). Utrata dłuższych fragmentów łańcucha nie była obserwowana w jonach dodatnich. Inną charakterystyczną reakcją obserwowaną dla wszystkich trzech wymienionych powyżej

związków była eliminacja obojętnej cząsteczki alifatycznego nitrilu objawiająca się na widmach fragmentacyjnych w postaci jonu $m/z = 631$.



Schemat 33

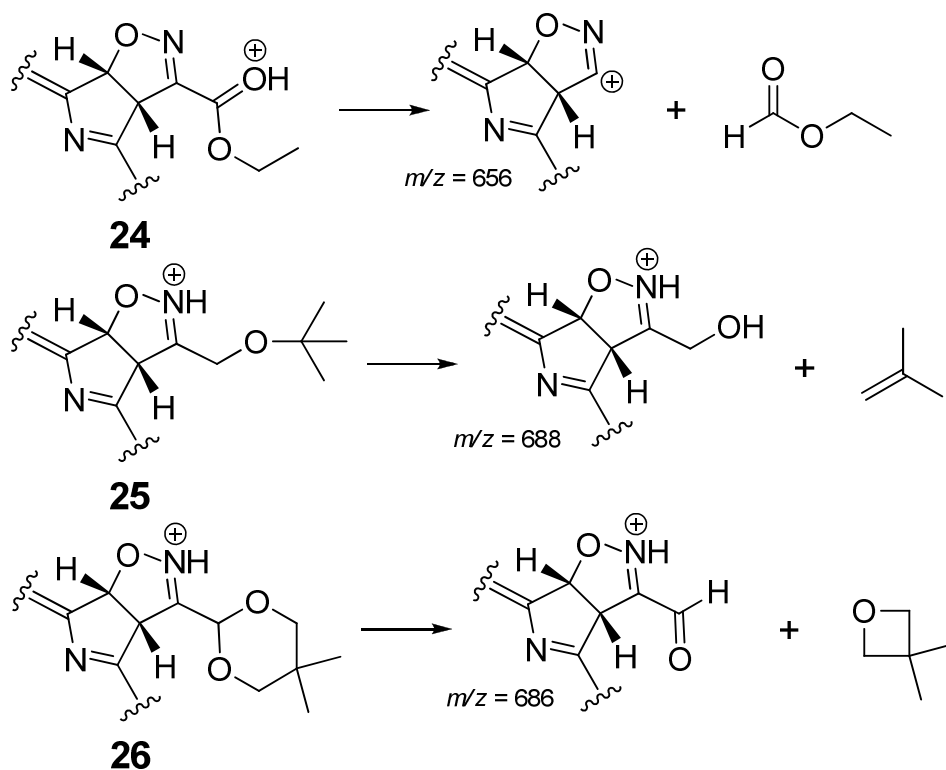


Schemat 34

Powróć jeszcze na chwilę do opisanego wyżej jonu $m/z = 640$. Jest on obserwowany również dla związków **24-26** i jest dużo lepiej widoczny niż jon $[M-18]^+$, którego dla tych trzech przypadków nie obserwuje się praktycznie wcale w widmie fragmentacyjnym.

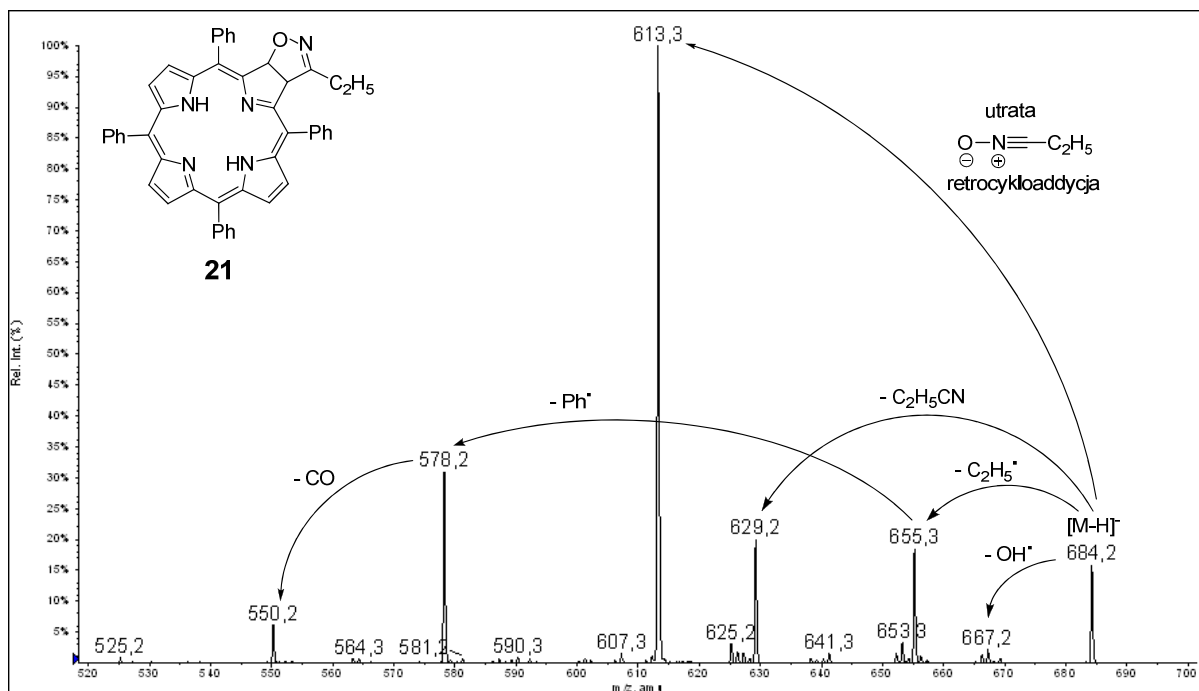
Związki **24**, **25** i **26** posiadają przyłączone do pierścienia izoksazolowego zamiast grupy alkilowej inne grupy funkcyjne, które w komorze zderzeń zachowują się w sposób charakterystyczny i potwierdzający ich obecność w cząsteczce (Schemat 35):

- w związku **24** w wyniku fragmentacji dochodzi do eliminacji obojętnej cząsteczki mrówczanu etylu,
- dla związku **25** obserwowana jest eliminacja cząsteczki izobutenu,
- w związku **26** jon protonowany ulega rozpadowi do odpowiedniego aldehydu, który jest obserwowany przy $m/z = 686$. Obojętnym produktem tej reakcji jest cząsteczka 3,3-dimetylooksetanu lub jego izomeru.



Schemat 35

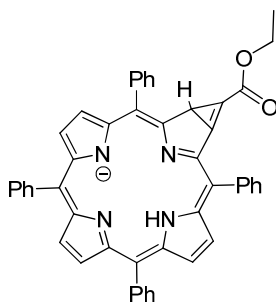
Przedstawiona powyżej analiza dotyczyła wyników uzyskanych w trybie jonów dodatnich dla jonów protonowanych. W dalszej części chciałbym omówić również reakcje fragmentacji obserwowane dla sygnałów $[M-H]^-$. Widma fragmentacyjne jonów ujemnych chloryn zawierających pierścień izoksazolowy są nieco bogatsze w sygnały niż te zarejestrowane w jonach dodatnich dla jonów $[M+H]^+$. Nadal dominującym sygnałem w widmie jest sygnał odpowiadający produktowi reakcji retrocykloaddycji, jednak pozostałe sygnały obecne w widmie są dużo intensywniejsze niż odpowiednie sygnały obserwowane w jonach dodatnich (np. jony $[M-C_2H_5]^{*+}$ i $[M-C_2H_5CN]^+$). Analizę ścieżek reakcji fragmentacji chciałbym dokonać również na przykładzie związku **21**. Utrata rodnika etylowego ($m/z = 655$), propionitrylu ($m/z = 629$) oraz tlenku propionitrylu ($m/z = 613$) są reakcjami, które obserwowałem również w jonach dodatnich (Rysunek 43). Nowością są jony $m/z = 578$ i $m/z = 550$. Jon obserwowany przy $m/z = 578$ powstaje w wyniku eliminacji rodnika fenyłowego z jonu $m/z = 655$. Zostało to potwierdzone przez eksperyment MS³. Struktura tego jonu jest pewną niewiadomą, gdyż eliminacja dwóch rodników prowadzi w tym przypadku do anionu, który ma dodatkowo dwa miejsca rodnikowe w różnych miejscach cząsteczki. Dalszy rozpad tego jonu i ekstruzja tlenku węgla prowadzi do jonu $m/z = 550$.



Rysunek 43. Widmo fragmentacyjne sygnału $[M-H]^-$ związku **21** wykonane przy energii kolizji CE = 50 eV.

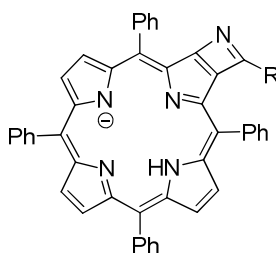
Wszystkie te wymienione jony ($m/z = 655, 629, 613, 578$ i 550) powtarzają się w widmach fragmentacyjnych pozostałych związków z tej grupy. Oczywiście pojawia się kilka innych jonów, które postaram się pokrótce wymienić i opisać:

- Przy dłuższym łańcuchu alkilowym przyłączonym do pierścienia izoksazolinowego obserwowane są reakcję rozpadu łańcucha. Dla przykładu, związek **23** posiada łańcuch pięciowęglowy, a w widmie fragmentacyjnym obserwujemy oprócz eliminacji rodnika $C_5H_{11}^+$ również eliminację rodników $C_4H_9^+$ i $C_3H_7^+$ (Rysunek 44). Dla przypomnienia, jon $[M+H]^+$ tego samego związku tracił w wyniku fragmentacji tylko rodnik $C_2H_5^+$.
- Niemal dla wszystkich związków z tej grupy w widmie fragmentacyjnym pojawia się sygnał $[M-H-31]$. W widmie CID związku **23** jest on ledwo zauważalny ($m/z = 695$), natomiast najlepiej widoczny jest dla związku **24** ($m/z = 697$, Rysunek 45). Jaka reakcja może dawać w efekcie jon o 31 Da mniejszy? Ponieważ masa ulega zmianie z parzystej na nieparzystą eliminacji ulega jakiś rodnik nie zawierający atomu azotu lub eliminuje się cząsteczka obojętna posiadająca azot. Zmieniającym się elementem struktury we wszystkich związkach z tej grupy jest podstawnik przyłączony do pierścienia izoksazolinowego, więc należy wykluczyć reakcje związane z tym podstawnikiem w kontekście tworzenia się jonu $[M-H-31]$. Wydaje mi się, że odpadającą w tej reakcji cząsteczką może być HNO , a przypuszczalnym produktem tej reakcji mógłby być jon pokazany na Rysunku 46.



Rysunek 46

- W wielu widmach fragmentacyjnych jonów $[M-H]^-$ zauważalny jest również sygnał $[M-18]$, który należy przypisać utracie cząsteczki wody. W tym przypadku również wyjaśnienie przebiegu takiej reakcji jest trudne, gdyż taki proces wymagałby nie tylko rozerwania pierścienia izoksazolowego, ale również przegrupowania jednego z atomów wodoru na atom tlenu i w ostatnim etapie eliminacji cząsteczki wody. Takim finalnym produktem tej reakcji mógłby być jon przedstawiony poniżej (Rysunek 47).



Rysunek 47

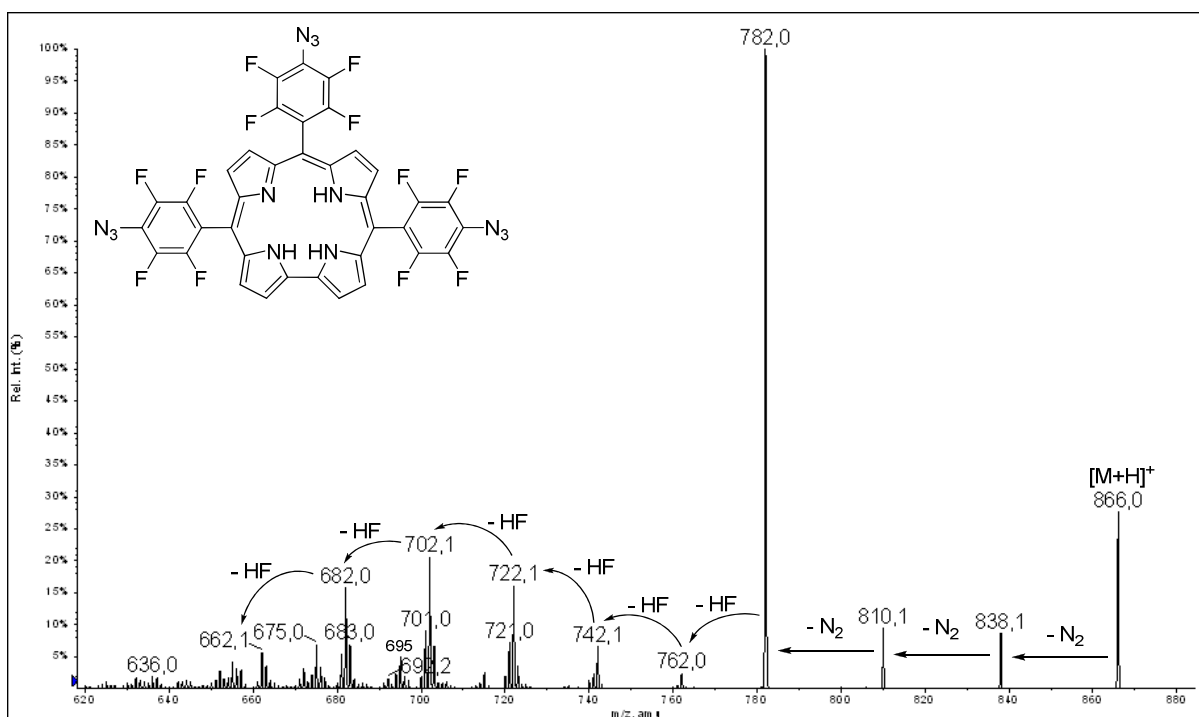
Struktury zaprezentowane na Rysunku 46 i Rysunku 47 są tylko propozycjami tego, jaką strukturę mogą posiadać obserwowane jony. Obecność grupy estrowej w strukturze jonu zamieszczonego na Rysunku 46 została częściowo potwierdzona eksperymentem MS^3 (jony $[M-72]$, $[M-73]$ i $[M-74]$ w eksperymencie MS^3 świadczą o obecności ugrupowania estru etylowego w cząsteczce), natomiast struktura anionu umieszczonego na Rysunku 47 jest tylko propozycją nie popartą żadnymi innymi pomiarami. Pewnym dodatkowym potwierdzeniem założonych struktur mógłby być pomiar MS/MS -TOF jednak nasze laboratorium nie posiada w tym momencie aparatury zdolnej do przeprowadzenia takiego pomiaru.

3.3.3. Fragmentacje innych przebadanych układów.

W trakcie swojej pracy wykonałem widma fragmentacyjne dla wielu innych związków z grupy porfiryńoidów. Uzyskane wyniki nie różniły się znacząco od wyników prezentowanych w części literaturowej pracy tzn. fragmentacji podlegają tylko podstawniki peryferyjne i nienaruszony zostaje rdzeń makrocykla. Z tego powodu nie będę dokonywał

szczegółowej analizy wyników uzyskanych dla tych związków, a zamieszczę tylko dwa najciekawsze, według mnie, przykłady.

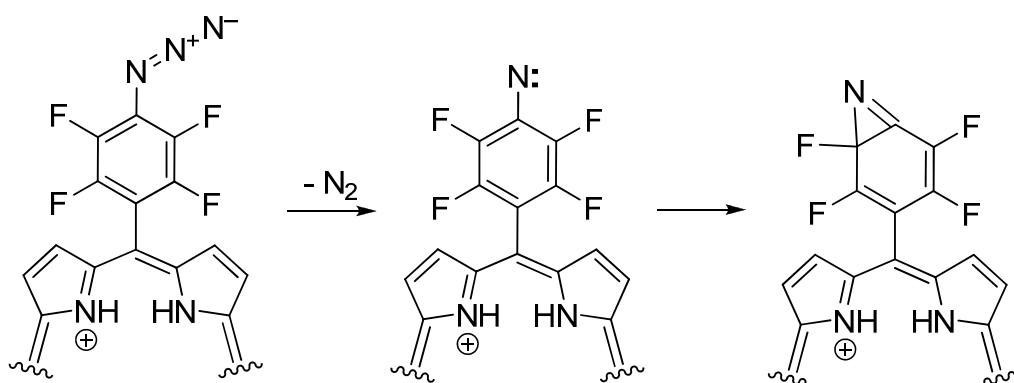
Pierwszy analizowany przypadek dotyczy widma fragmentacyjnego korolu posiadającego grupy azydkowe. Jest to związek bardzo nietrwały w roztworze, jednak udało się uzyskać jego sygnał jonu pseudomolekularnego zarówno w jonach dodatnich jak i ujemnych. Widmo fragmentacyjne jonu $[M+H]^+$ przedstawia Rysunek 48. Traci on w wyniku fragmentacji trzy cząsteczki N_2 , a następnie dochodzi do eliminacji sześciu cząsteczek fluorowodoru. Utrata cząsteczkowego azotu daje w efekcie nitren, który najprawdopodobniej cyklizuje tworząc pierścień azyrynowy, tak jak pokazuje Schemat 36. W przypadku tej cząsteczki mamy aż trzy takie cyklizacje ze względu na obecność trzech grup azydkowych. Natomiast atomy wodoru potrzebne do eliminacji cząsteczek fluorowodoru są odrywane z pozycji β cząsteczki w analogiczny sposób, jak było to opisane w części literaturowej pracy (Schemat 25).



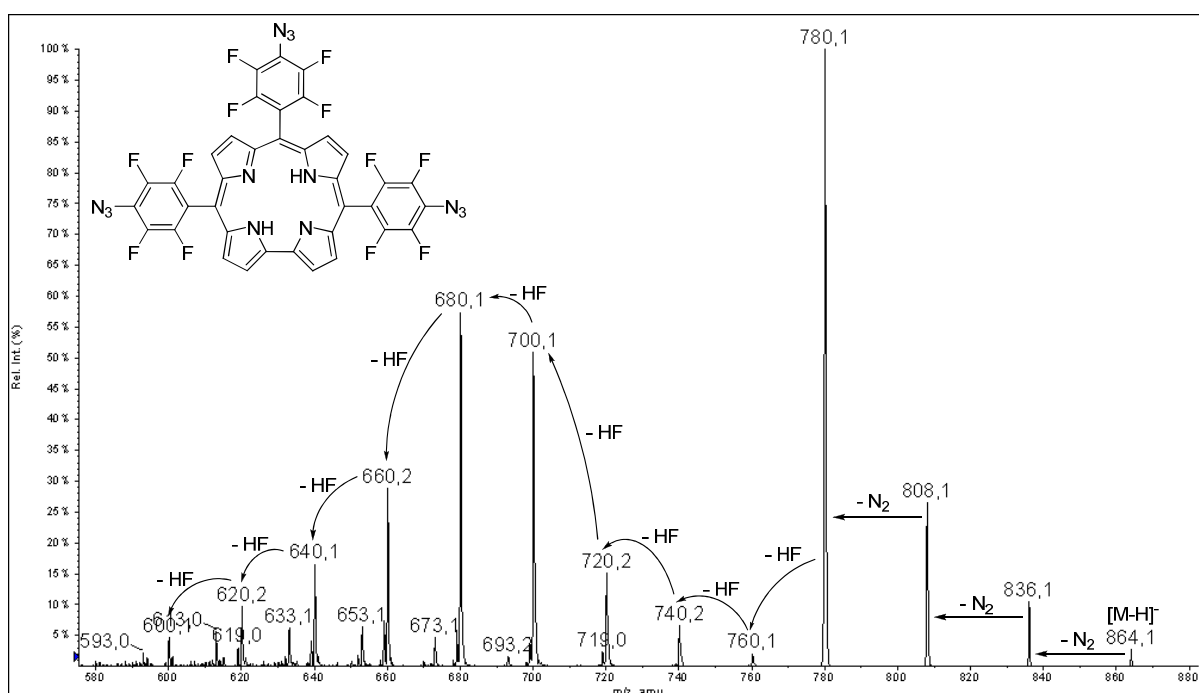
Rysunek 48

Najciekawszą obserwacją, dotyczącą tego związku, był wynik uzyskany dla jonu deprotonowanego. Widmo fragmentacyjne zamiast sześciu (tak jak było obserwowane dla jonu protonowanego) zawiera aż dziewięć kolejnych eliminacji fluorowodoru (Rysunek 49). Trudno sobie wyobrazić tak dalece idącą reakcję fragmentacji, szczególnie że w otoczeniu pierścieni *mezo* znajduje się tylko 6 atomów wodoru. Musi tutaj zachodzić dodatkowo jakaś inna reakcja, której ścieżka pokrywa się z diskutowanymi sygnałami, wymuszając obecność

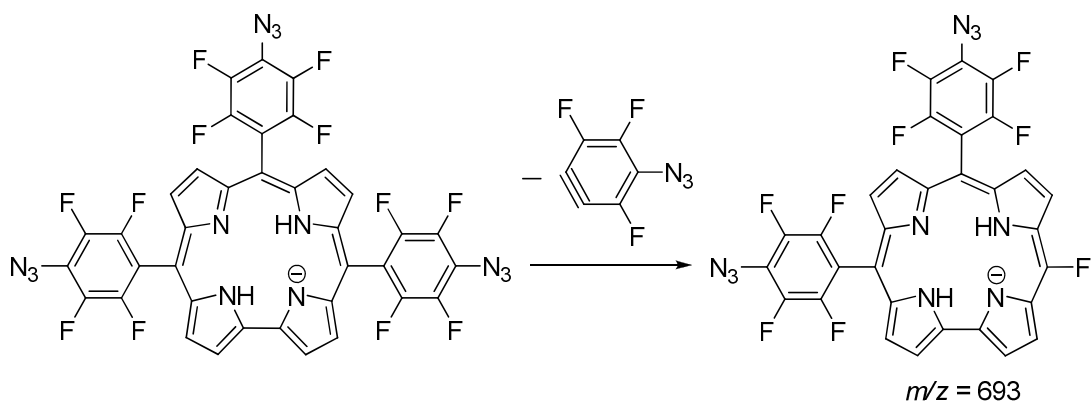
jonów przy $m/z = 640, 620$ i 600 . Brałem pod uwagę wiele różnych możliwości i nie jestem w stanie zaproponować ścieżki reakcji, która tłumaczyłaby obecność tych jonów. Odkryłem za to obecność innej reakcji fragmentacji związanej z obecnością jonu $m/z = 693$. Jon ten powstaje najpewniej w wyniku eliminacji benzynu z jonu deprotonowanego (Schemat 37), a następnie traci w wyniku dalszych reakcji pięć cząsteczek HF (jony $m/z = 673, 653, 633, 613$ i 593). Protonowany odpowiednik tego jonu był obserwowany również w jonach dodatnich ($m/z = 695$, Rysunek 48).



Schemat 36

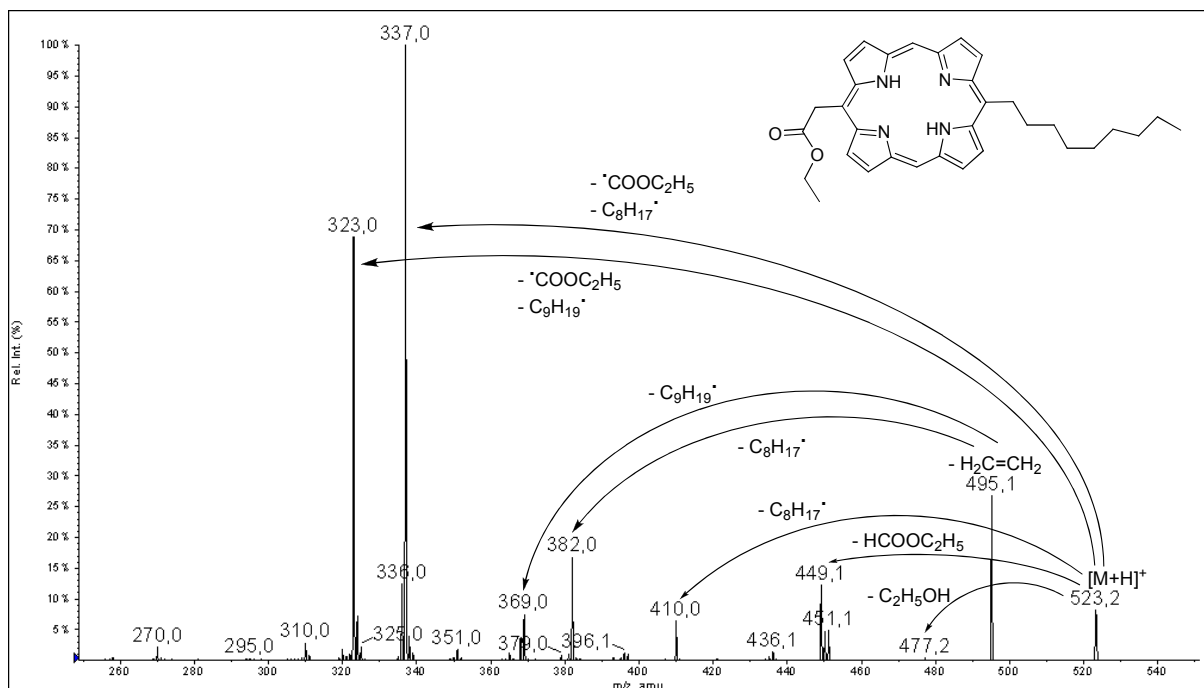


Rysunek 49

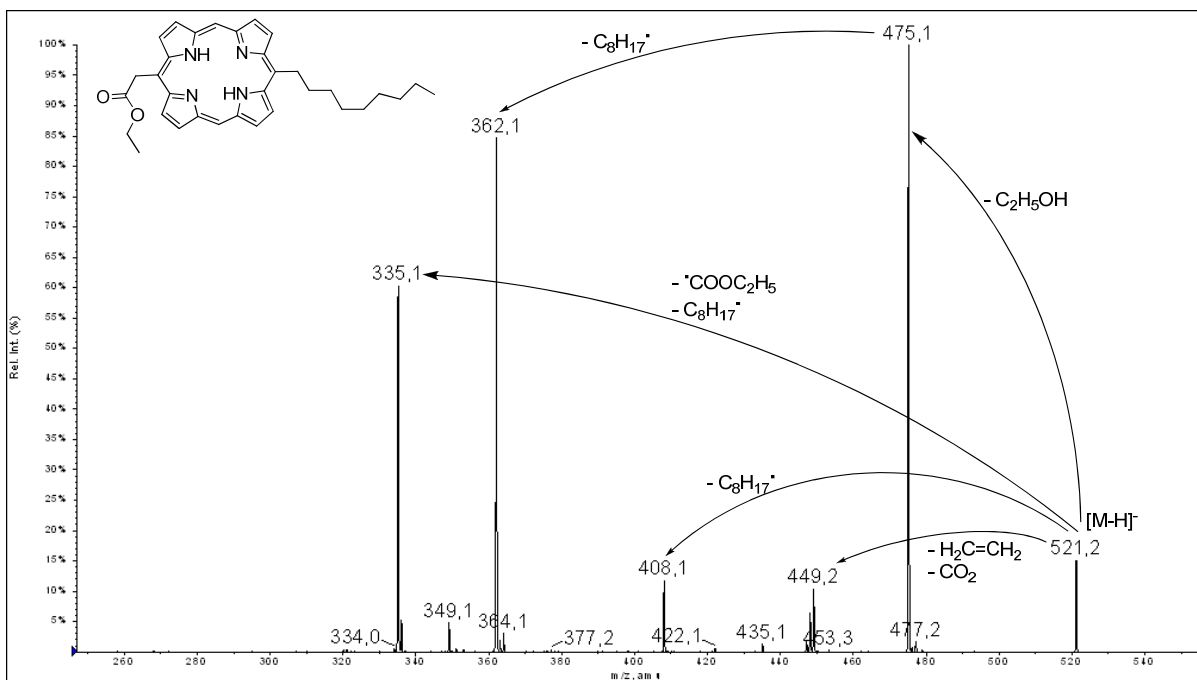


Schemat 37

Drugim analizowanym związkiem, którego fragmentację chciałbym zaprezentować, jest jedna z porfiryn przedstawiona już wcześniej przeze mnie (związek nr 4, Rysunek 13, strona 49).

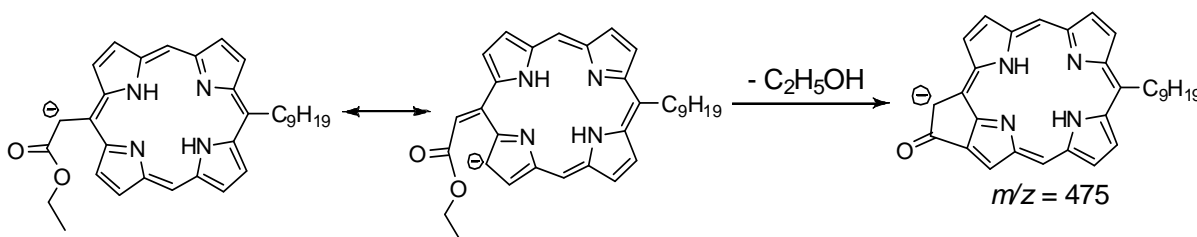


Rysunek 50. Widmo fragmentacyjne sygnału $[M+H]^+$ związku nr 4.



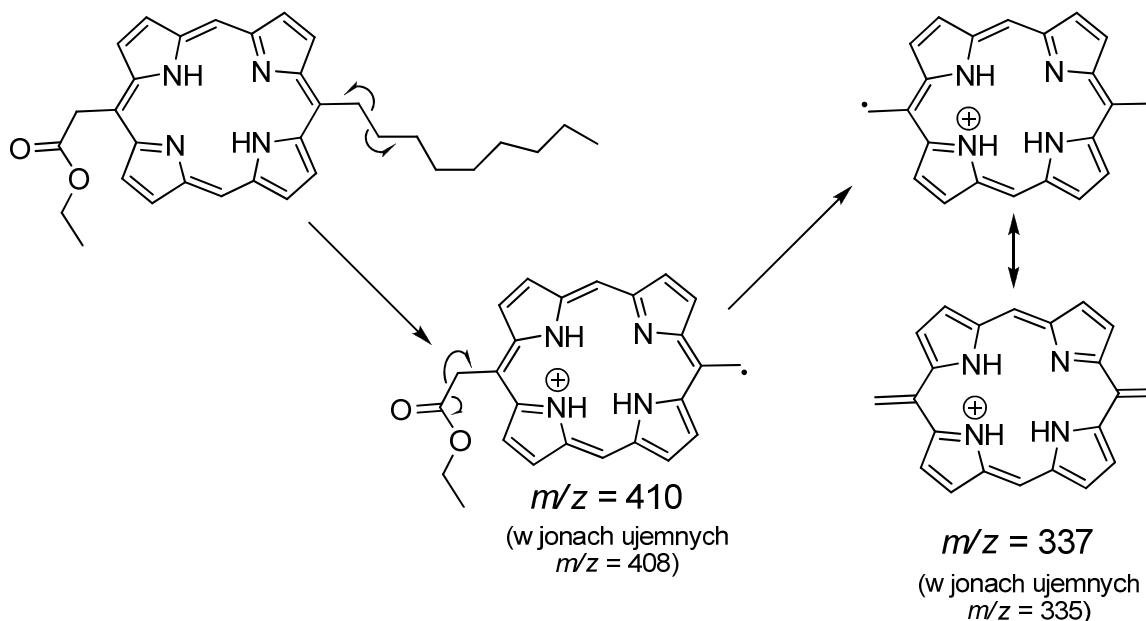
Rysunek 51. Widmo fragmentacyjne sygnału $[M-H]^-$ związku nr 4.

Widma fragmentacyjne tego związku zarówno w trybie jonów dodatnich (Rysunek 50) jak i ujemnych (Rysunek 51) zawierają liczne sygnały. Oczywiście układ porfirynowy pozostaje praktycznie nienaruszony, a fragmentacji podlegają podstawniki peryferyjne. Bardzo ważne są według mnie różnice we fragmentacji pomiędzy jonem protonowanym, a deprotonowanym. Zachowanie grupy estrowej jest inne w obu przypadkach. Jon protonowany traci fragment estrowy głównie przez eliminację obojętnej cząsteczki mrówczanu etylu ($m/z = 449$), natomiast jon deprotonowany poprzez eliminację etylenu i dekarboksylację ($m/z = 451$). Eliminacja alkoholu etylowego w widmie fragmentacyjnym jonu $[M+H]^+$ jest praktycznie niewidoczna natomiast w widmie fragmentacyjnym jonu $[M-H]^-$ eliminacja C_2H_5OH jest odpowiedzialna za główny sygnał w widmie ($m/z = 475$). Eliminacja alkoholu etylowego musi naruszyć układ porfirynowy tzn. oderwać proton z pozycji β cząsteczki. Konsekwencją eliminacji etanolu z cząsteczki jest cyklizacja i powstanie pięciocłonowego pierścienia (Schemat 38).



Schemat 38

Bardzo interesującą wspólną cechą obu widm fragmentacyjnych jest fakt, że eliminacja rodnika z jednej strony cząsteczki niejako indukuje oderwanie rodnika z drugiej strony układu porfirynowego. Analogiczne jony obserwowane są w obu trybach jonizacji.



Oczywiście możliwy jest również wariant, gdzie najpierw oderwaniu w postaci rodnika ulega fragment estrowy (jony dodatnie $m/z = 450$, Rysunek 50, w jonach ujemnych $m/z = 448$, Rysunek 51), a dopiero później łańcuch alkilowy.

3.3.4. Podsumowanie

Wybrałem według mnie najbardziej istotne ścieżki reakcji fragmentacji zaobserwowane w ramach przeprowadzonych badań. Poprzez analizę i opis reakcji fragmentacji chciałem przedstawić jak ważną diagnostycznie może być spektrometria mas przy potwierdzaniu struktury układów porfirynowych. Mam nadzieję, że tych kilka przykładowych wyników pokazało jak ważnym narzędziem przy identyfikacji i potwierdzaniu struktur analizowanych związków są widma fragmentacyjne oraz jak istotna jest wiedza na temat rozpadów obserwowanych w komorze zderzeń spektrometru mas.

3.4. Wykorzystanie spektrometrii mas do identyfikacji fotochemicznych produktów rozkładu koroli

3.4.1. Wstęp

Wyniki badań przedstawionych w tym rozdziale mojej pracy zostały opublikowane w grudniu 2010 roku w czasopiśmie *Journal of Mass Spectrometry*.⁶¹ Ten rozdział jest dokładnym odzwierciedleniem materiału przedstawionego w tej publikacji, poszerzonego o szereg innych wyników i obserwacji, które nie znalazły się w niej, a są bezpośrednio związane z tą tematyką.

Korole są analogami porfiryn pomniejszonym względem porfiryn o jeden atom węgla. Tak samo jak porfiryny posiadają 18- π elektronowy układ aromatyczny. W połączeniu z tym, że są to układy mniejsze o jeden atom węgla sprawia, że w porównaniu do porfiryn posiadają większą gęstość elektronową. W efekcie wykazują mniejszą stabilność na działanie tlenu atmosferycznego. Na temat różnic w stabilności układów opartych o szkielet korolu i szkielet porfiryny opublikowano wiele prac⁶⁹ a przy okazji zidentyfikowano szereg produktów rozkładu: pochodne *biliverdinu*,^{69f-i} izokorole^{69c} oraz połączone w pozycjach β - β dimery i trimery.^{69a}

Podczas moich badań dotyczących tej grupy porfirynoidów zauważyłem, że w pewnych określonych warunkach można obserwować postępujący bardzo szybko proces utlenienia koroli. Do zbadania tych procesów postanowiłem wykorzystać spektrometrię mas.

3.4.2. Wpływ rozpuszczalnika, pH i innych czynników na trwałość koroli w roztworze.

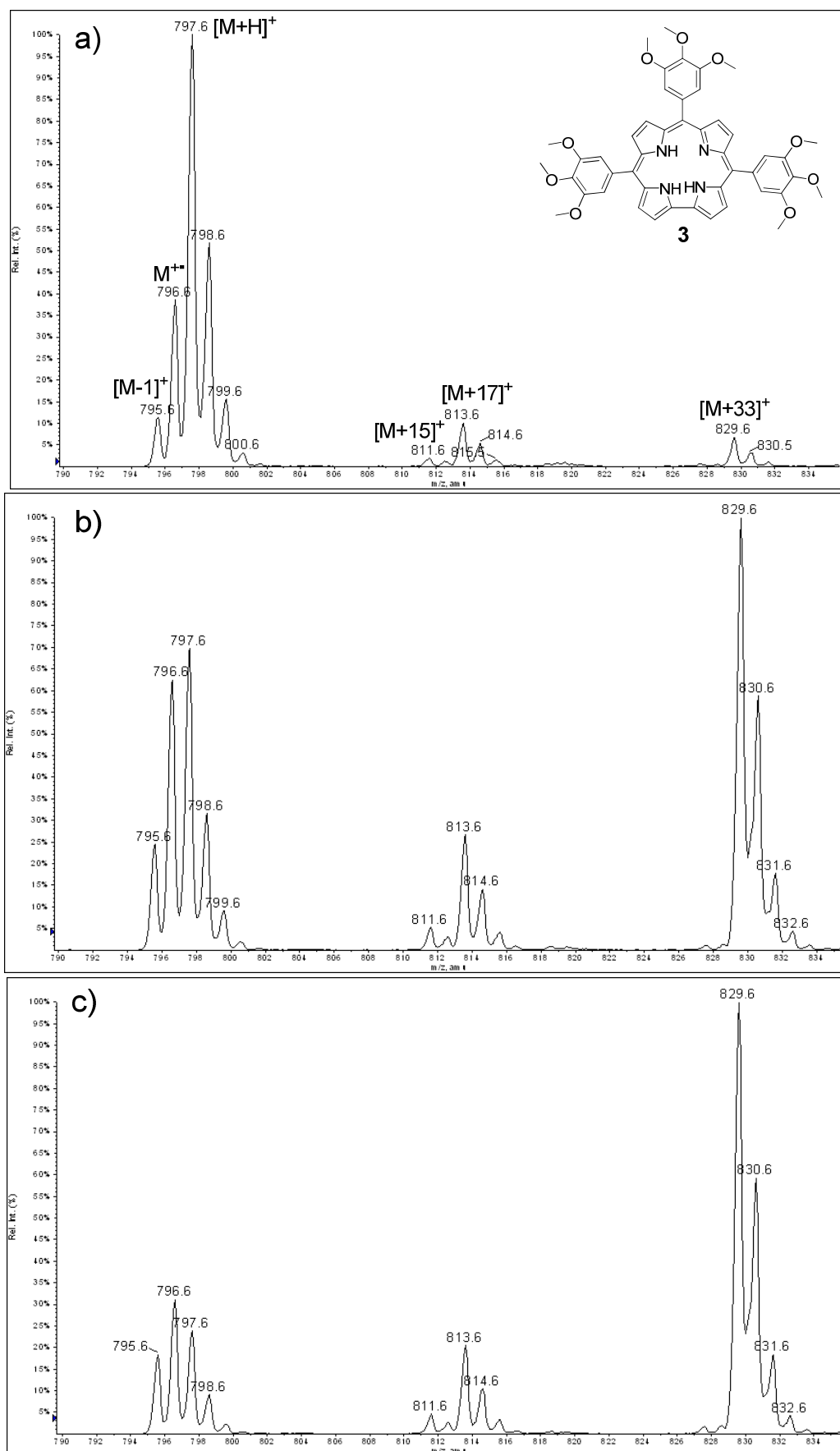
Podczas moich eksperymentów zauważyłem, że po rozpuszczeniu większości koroli w acetonitrylu i pozostawieniu na świetle słonecznym ulegają one bardzo szybkiemu rozkładowi. Można to było zobaczyć podczas pomiaru widm MS tych związków. W trakcie pomiaru po krótkim czasie dało się zauważyć pojawienie się dodatkowych sygnałów w widmach MS, a co najbardziej istotne, intensywność tych sygnałów systematycznie zwiększała się w trakcie pomiaru (Rysunek 52). Te dodatkowe sygnały to: $[M+17]^+$ czyli $[M+O+H]^+$, $[M+33]^+$ czyli $[M+2O+H]^+$, $[M-1]^+$ czyli najprawdopodobniej $[M^+-H]^+$ oraz $[M+15]^+$ czyli $[M^++O-H]^+$. Dokładniejsza analiza widm pokazała, że niektóre metody jonizacji są tak czułe, że można zobaczyć w widmach również inne produkty fotochemicznego rozkładu koroli, co zostanie opisane w dalszej części pracy.

Tabela 6

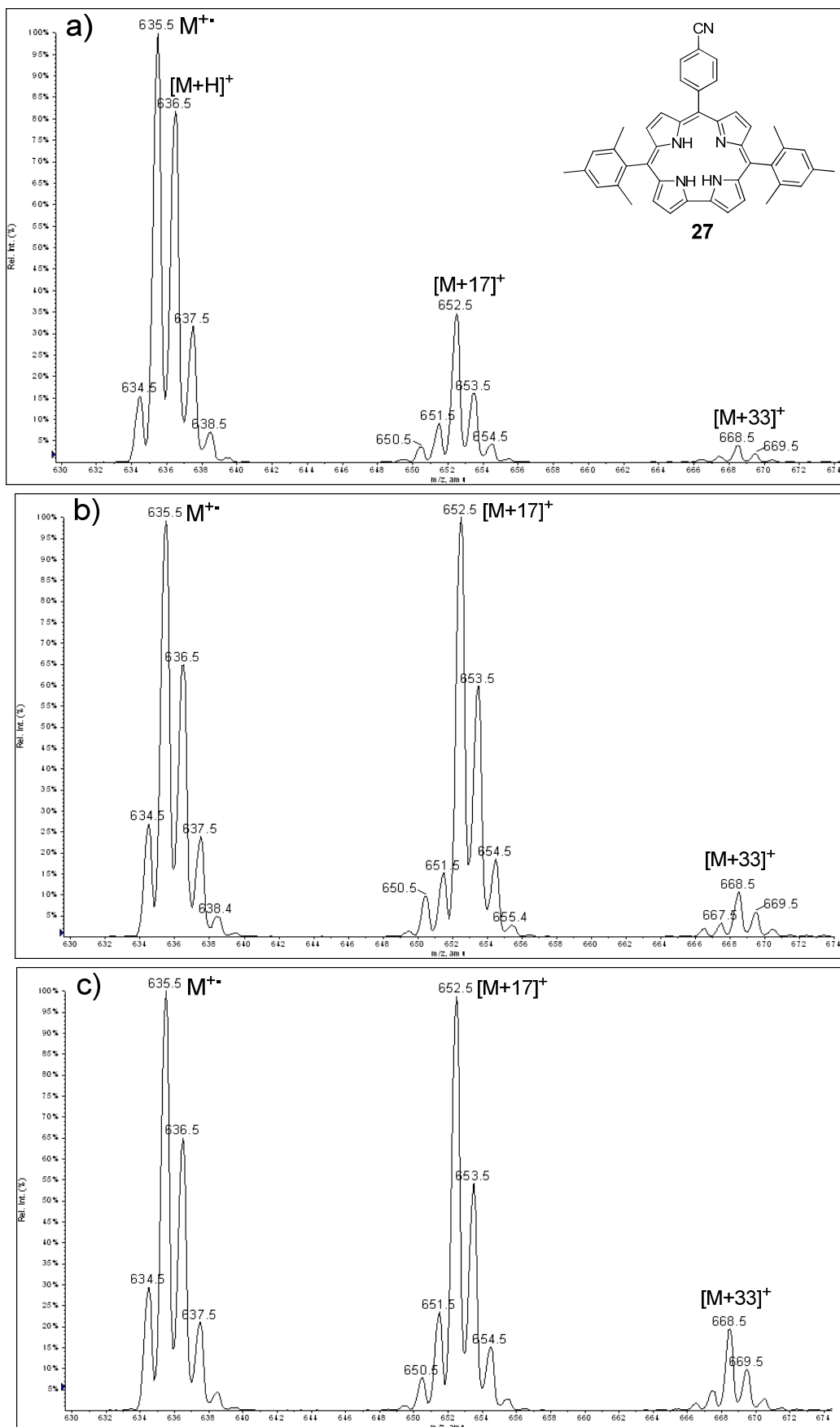
Rozpuszczalnik	Rozpuszczalność [O ₂] w mmol/L (0,213 bar O ₂)	Czas życia tlenu singletowego τ (¹ Δ _g) μs
octan etylu	1,9 (20°C)	-
acetonitryl	1,9 (24°C)	77,1
chloroform	2,4 (20°C)	229
dichlorometan	2,2 (20°C)	99
heksan	3,1 (20°C) 3,1 (25°C)	23,4
metanol	2,2 (20°C) 2,1 (25°C)	9,5

Korole są nietrwałe również w innych rozpuszczalnikach, jednak acetonitryl jest w tym przypadku szczególny ze względu na bardzo szybko postępujący proces utlenienia koroli, który dało się zaobserwować w widmach MS. Trudno jest wytłumaczyć te niezwykle właściwości tego rozpuszczalnika. Porównując na przykład rozpuszczalność tlenu, lub czas życia tlenu singletowego w różnych rozpuszczalnikach, acetonitryl nie wyróżnia się w taki sposób, który by wskazywał na szczególne preferencje tego rozpuszczalnika do wspomagania tego typu procesów (Tabela 6). Wręcz przeciwnie, w rozpuszczalnikach, w których rozpuszcza się więcej tlenu i czas życia tlenu singletowego jest dłuższy, korole były względnie trwałe (chloroform i chlorek metylenu).

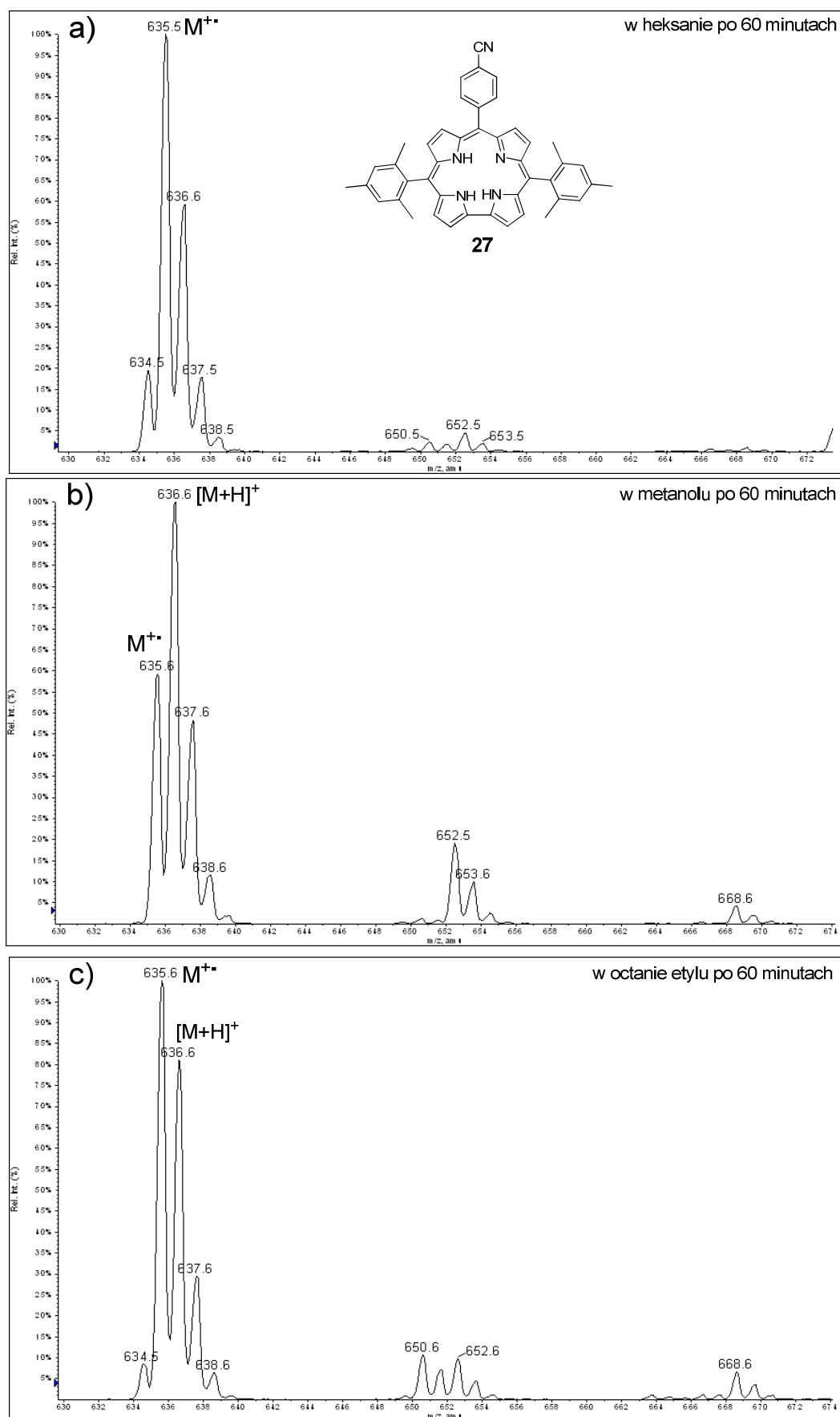
Jak już wspomniałem, korole są nietrwałe również w innych rozpuszczalnikach, nie tylko w acetonitrylu. Sygnały tych samych produktów utlenienia, jednak o zdecydowanie mniejszej intensywności, można obserwować w widmach MS wykonanych z użyciem metanolu i octanu etylu (Rysunek 54, dla porównania widma tego samego związku wykonane z użyciem acetonitrylu zostały pokazane na Rysunku 53). Heksan, mimo że dało się obserwować w niewielkim stopniu sygnały związane z procesem utlenienia, można uznać za rozpuszczalnik, w którym korole są względnie trwałe.



Rysunek 52. Widma jonów dodatnich związku nr 3 wykonane za pomocą jonizacji ESI w acetonitrylu zarejestrowane po: a) 5 minutach, b) 30 minutach, c) 60 minutach od rozpuszczenia próbki.



Rysunek 53. Widma APCI jonów dodatnich związku 27 wykonane: a) w acetonitrylu po 5 minutach, b) w acetonitrylu po 30 minutach, c) w acetonitrylu po 60 minutach.



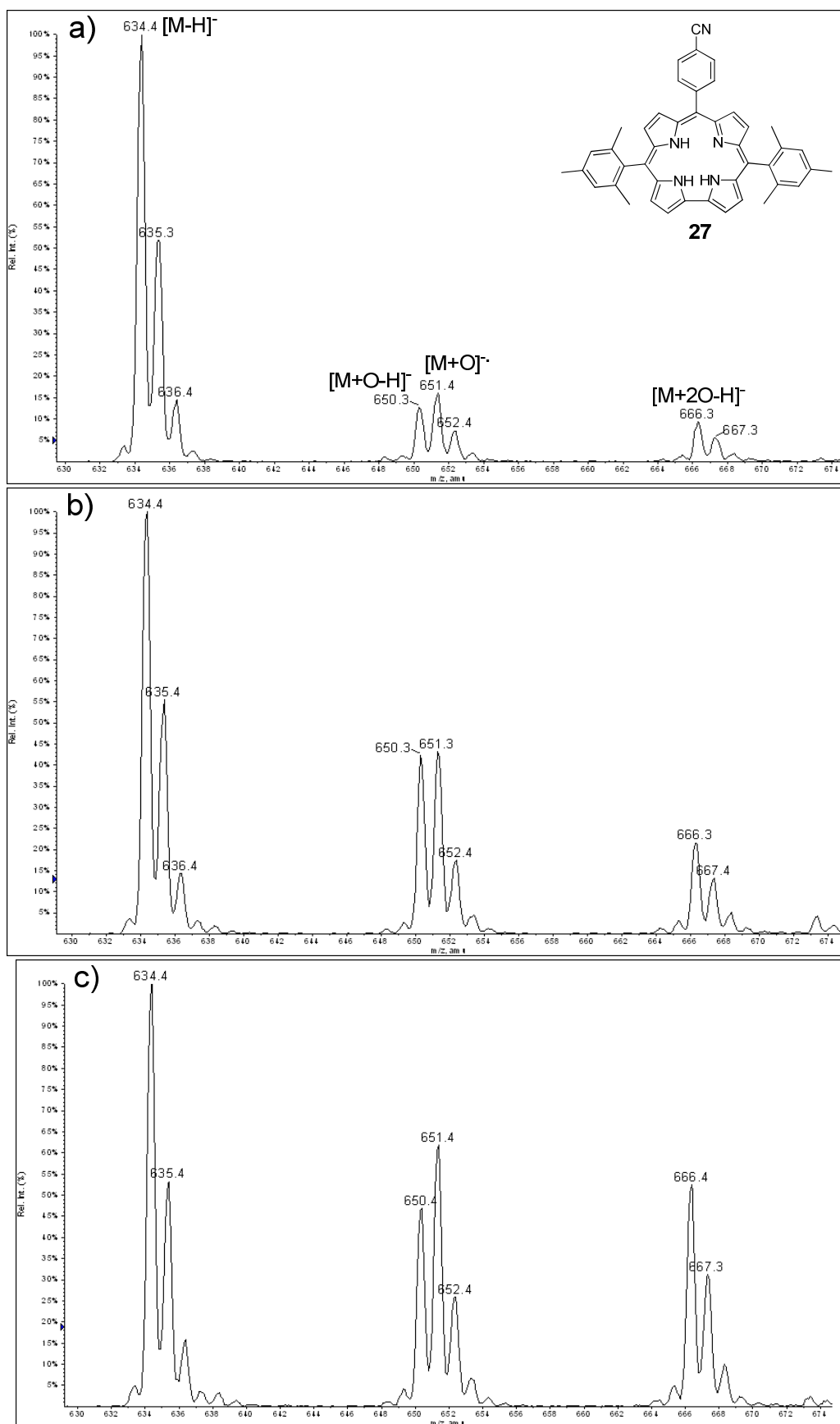
Rysunek 54. Widma APCI jonów dodatnich związku 27 wykonane: a) w heksanie po 60 minutach, b) w metanolu po 60 minutach, c) w octanie etylu po 60 minutach.

Wszystkie widma zamieszczone do tej pory w tym podrozdziale były rejestrowane w trybie jonów dodatnich. Trzeba podkreślić, że w źródłach jonów takich jak ESI, czy APCI w trybie jonów dodatnich, panują warunki utleniające. Należy więc założyć, że w jakimś stopniu sama praca źródła jonów może wpływać na pojawienie się dodatkowych sygnałów w widmie. Trudno jest jednak określić jaki jest wpływ tego czynnika na obraz widma uzyskiwany podczas pomiaru. W trybie jonów ujemnych natomiast mamy sytuację odmienną: w źródle jonów panują warunki redukujące. W przypadku koroli obserwowałem sygnały produktów utlenienia również w jonach ujemnych. Jest to dodatkowe potwierdzenie tego (oprócz zmian wyglądu widm w czasie), że mamy do czynienia z procesami zachodzącymi w roztworze, a nie w źródle jonów spektrometru.

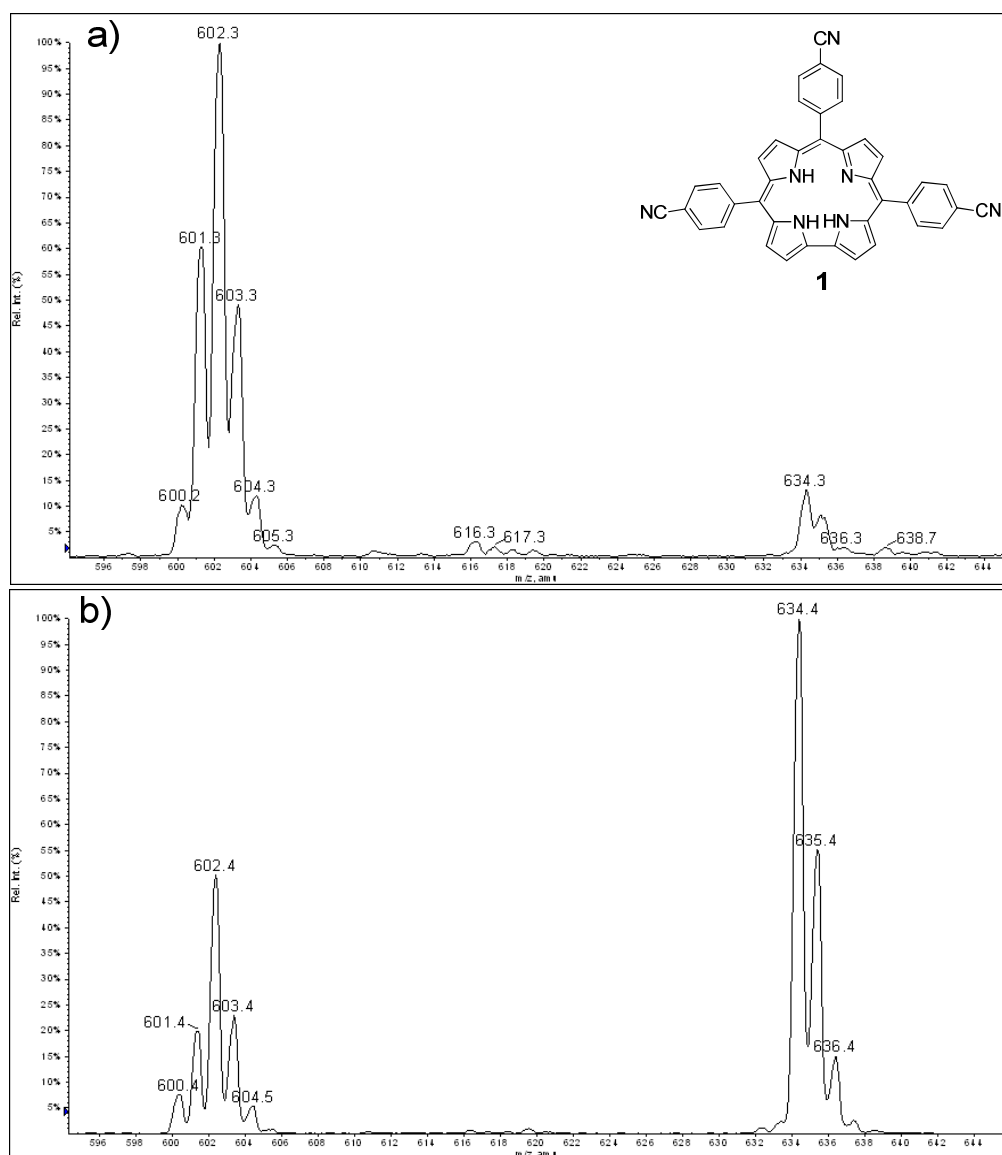
Obraz widma w jonach ujemnych przedstawia się niemal analogicznie jak w jonach dodatnich: dodatkowe sygnały w widmie MS związane z obecnością dwóch produktów utlenienia $[M+O]$ i $[M+2O]$. W tym konkretnym przypadku sygnał dla produktu $[M+O]$ jest mieszaniną dwóch sygnałów powstałych poprzez nałożeniem się jonu deprotonowanego $[M+O-H]^-$ z anionorodnikiem $[M+O]^-$.

Po przeanalizowaniu pewnej liczby związków i zauważeniu powtarzalności w otrzymanych wynikach zacząłem się zastanawiać nad naturą procesu, który obserwowałem. Ponieważ miałem do czynienia ze związkami światłoczułymi, postanowiłem wykonać pomiary MS bez obecności światła. Pomiary w ciemnym pomieszczeniu, w którym jedynym źródłem światła był monitor komputera zintegrowanego z aparaturą pomiarową (próbka była chowana na czas pomiędzy pomiarami w miejsce pozbawione światła) pokazały, że korole są trwałe w acetonitrylu pod nieobecność światła. Obserwacja ta niewątpliwie świadczy o fotochemicznym charakterze bieżących reakcji.

Po zbadaniu wpływu światła na diskutowane procesy, postanowiłem jeszcze sprawdzić jakie znaczenie ma dodatek kwasu lub zasady do roztworu zawierającego korol. Dodatek kwasu powoduje w dużym stopniu zahamowanie procesu utlenienia (Rysunek 56). Produkty utlenienia pojawiają się w widmach MS, jednak różnice pomiędzy widmem wykonanym w obojętnych warunkach i z dodatkiem kwasu są bardzo wyraźne.



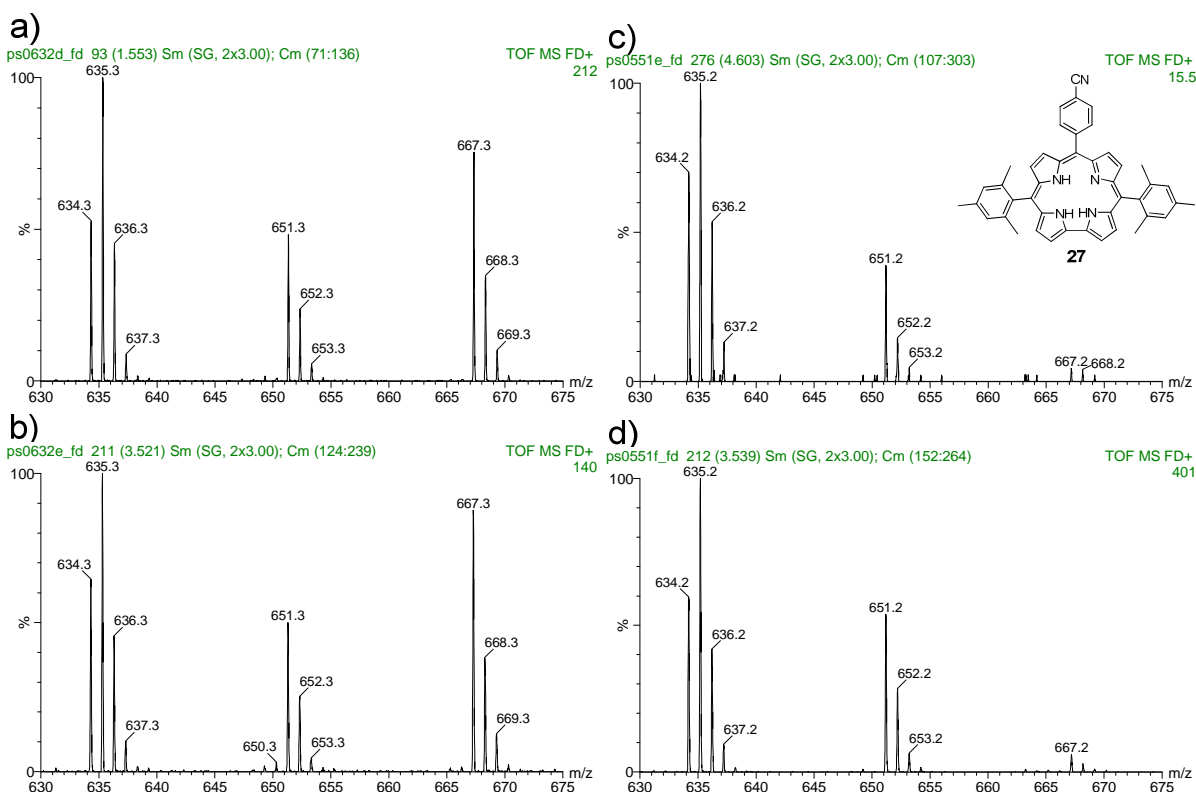
Rysunek 55. Widma jonów ujemnych związku nr 27 wykonane za pomocą jonizacji APCI w acetonitrylu zarejestrowane po: a) 5 minutach b) 30 minutach c) 60 minutach od rozpuszczenia próbki.



Rysunek 56. Widma związku nr 1 wykonane metodą ESI: a) po godzinie w acetonitrylu z dodatkiem kwasu mrówkowego b) po godzinie sam acetonitryl.

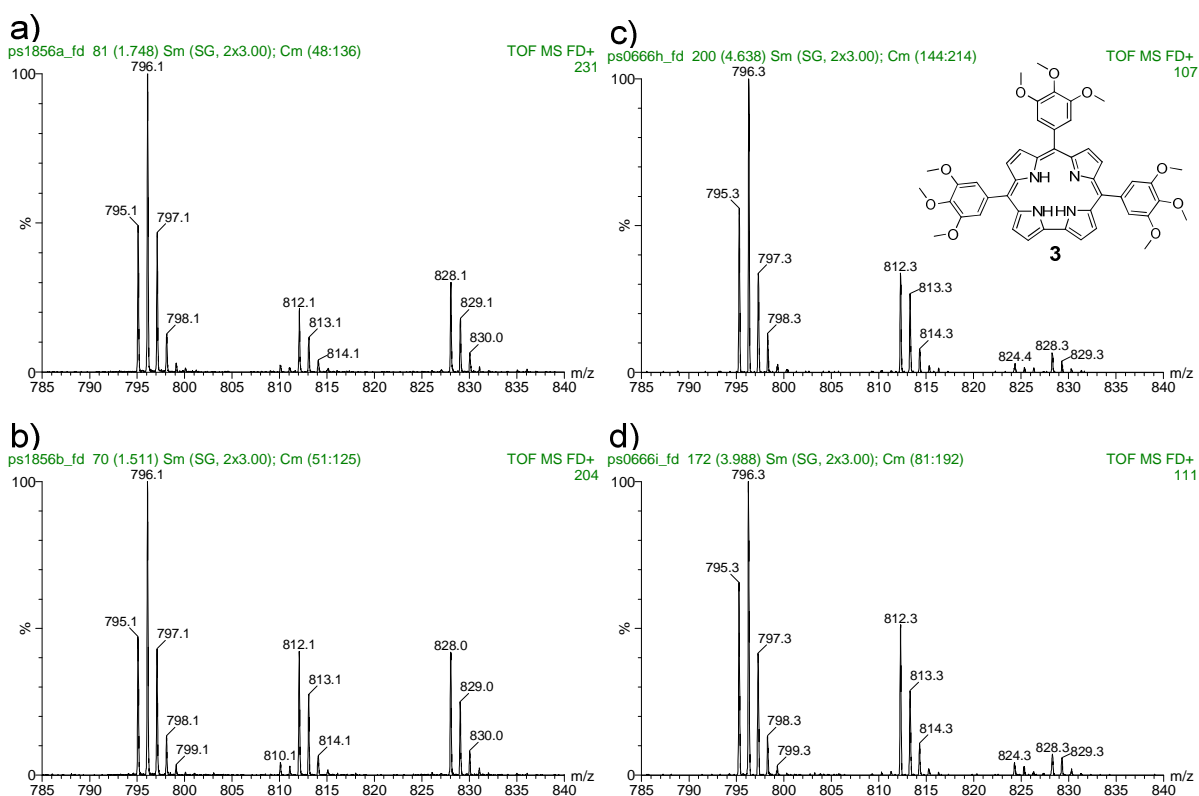
W przypadku dodania zasady (w swoich eksperymentach użyłem trietyloaminy) sytuacja była inna. Wykorzystując jonizację FD wykonałem szereg pomiarów rozłożonych w czasie roztworów koroli z dodatkiem i bez dodatku trietyloaminy. Dało się zauważyć pewną prawidłowość w tych widmach, a mianowicie sygnał $[M+2O]^{++}$ w widmach roztworów z dodatkiem Et_3N miał wyraźnie mniejszą intensywność w porównaniu do widm zarejestrowanych dla roztworów pozbawionych trietyloaminy (Rysunek 57 i Rysunek 58). Z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że obserwacja ta świadczy o selektywnym zahamowaniu reakcji prowadzącej do tego produktu. Trzeba pamiętać, że dodatek trietyloaminy może w jakiś sposób wpływać na jonizację dyskusowanego produktu w metodzie FD. Myślę jednak, że obecność zasady w roztworze analizowanym nie powinna

mieć aż tak drastycznego i selektywnego wpływu na faktyczny obraz próbki analizowanej za pomocą tej metody jonizacji.



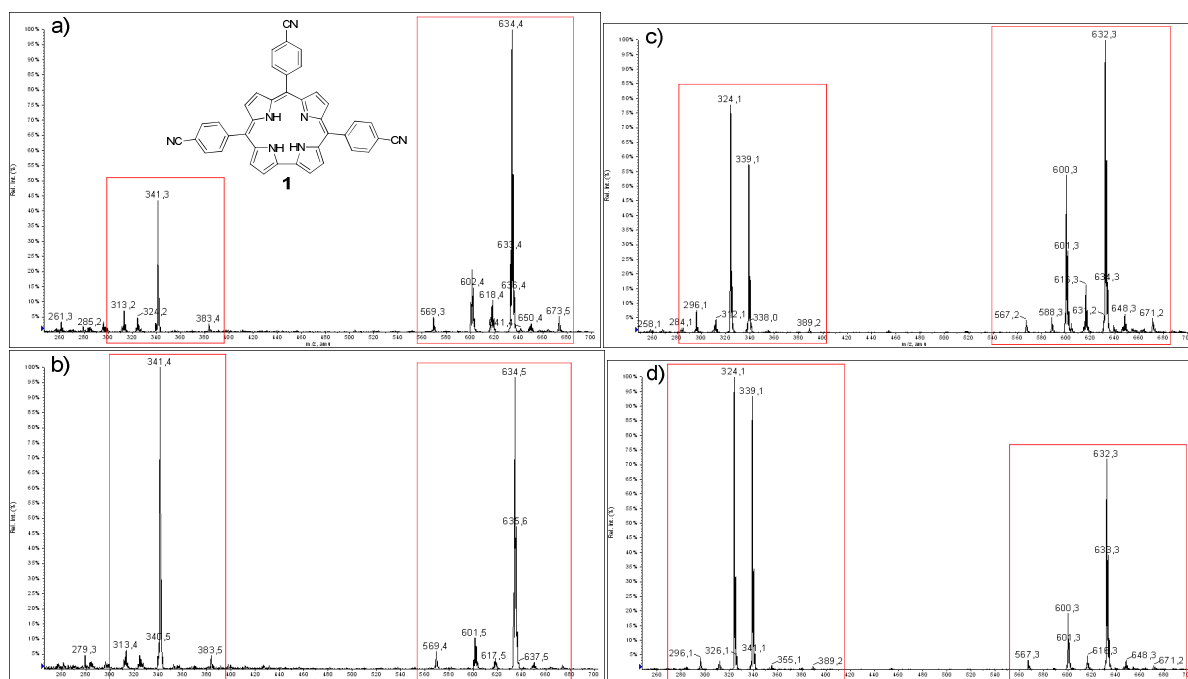
Rysunek 57. Widma FD związku nr 27: roztwór w acetonitrylu a) po 15 minutach od rozpuszczenia, b) po 60 minutach od rozpuszczenia próbki, oraz roztwory w acetonitrylu z dodatkiem trietyloaminy, c) po 30 minutach od rozpuszczenia, d) po 60 minutach od rozpuszczenia.

Przy okazji opisu tego materiału wróciła kwestia znaczenia metody FD w analizie tego typu związków. Jak widać jest to bardzo użyteczna metoda. Wyniki uzyskane w tej metodzie jonizacji dla tej konkretnej grupy związków mają szczególne znaczenie, gdyż źródło to pracuje w warunkach próżni i w trakcie jonizacji próbka nie ma kontaktu z tlenem atmosferycznym. Należy więc założyć, że wszystkie ewentualne efekty opisywane wcześniej dla technik takich jak ESI lub APCI (dotyczące warunków panujących w tych źródłach) nie występują w FD i to co obserwujemy w widmach desorpcji polem jest prawdziwym obrazem analizowanej próbki, a nie efektem dodatkowych procesów zachodzących w źródle jonów.



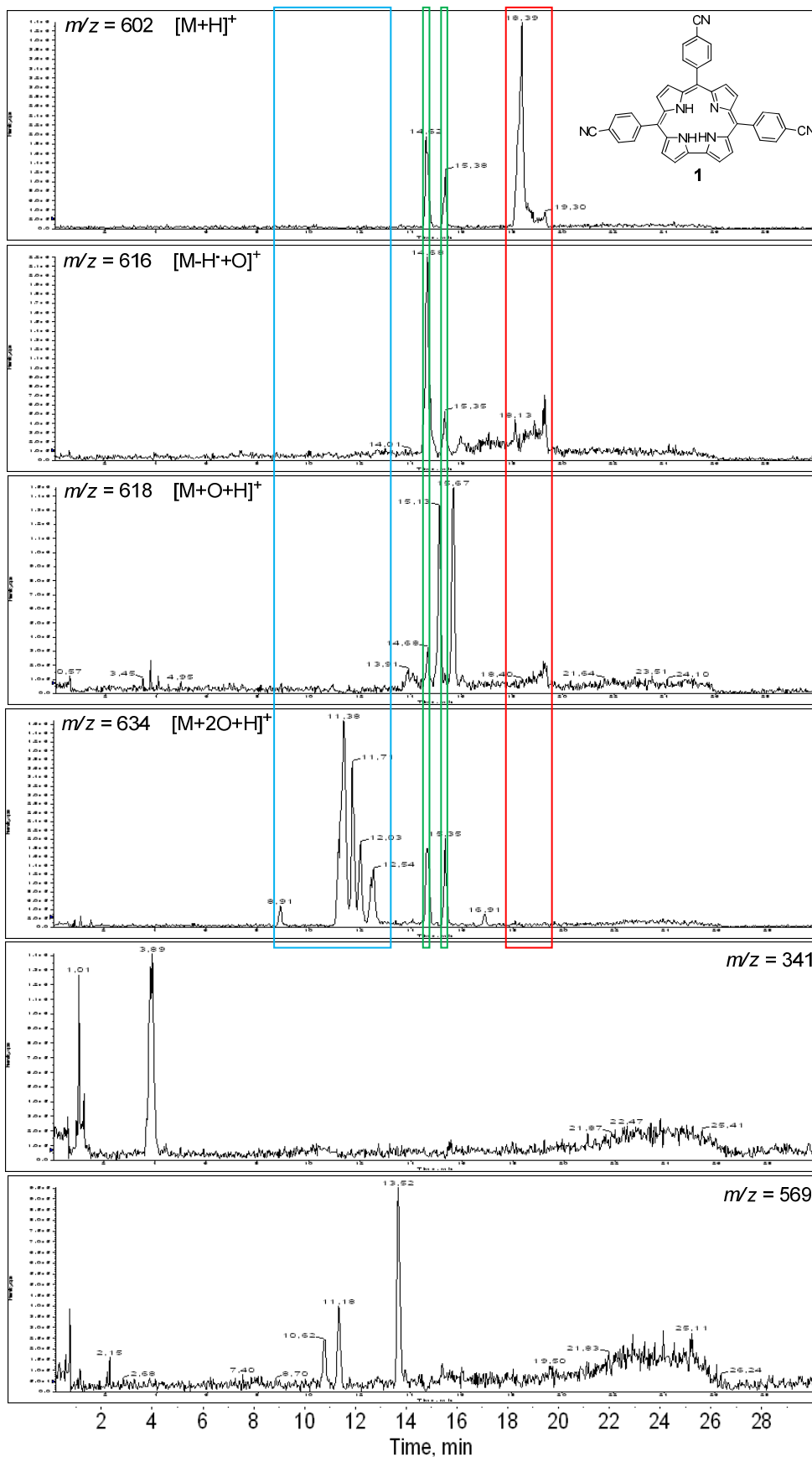
Rysunek 58. Widma FD związku nr 3 w acetonitrylu wykonane: a) po 30 minutach, b) po 60 minutach od rozpuszczenia oraz w acetonitrylu z dodatkiem trietyloaminy c) po 30 minutach, d) po 60 minutach od rozpuszczenia.

Przedstawione wyżej rozważania dotyczą wyłącznie wąskiej grupy produktów, które występują w próbkach najprawdopodobniej w znaczących ilościach i były łatwo zauważalne podczas analiz. Jednak niektóre wyniki, uzyskane między innymi z wykorzystaniem metody APCI, zdawały się potwierdzać obecność również innych produktów utlenienia. Rysunek 59 przedstawia widma APCI związku nr 1 wykonane w trybie jonów dodatnich i ujemnych w pewnych odstępach czasu. Widać wyraźnie, że oprócz sygnałów $[M+O]$ i $[M+2O]$ w widmie pojawiają się też następujące sygnały: $m/z = 341$ i 569 w jonach dodatnich oraz $m/z = 324$, 339 i 567 w jonach ujemnych. Intensywność tych sygnałów wzrasta w miarę upływu czasu względem jonów molekularnych: M^{++} (m/z 601) w trybie jonów dodatnich i $[M-H]^{-}$ (m/z 600) w trybie jonów ujemnych.



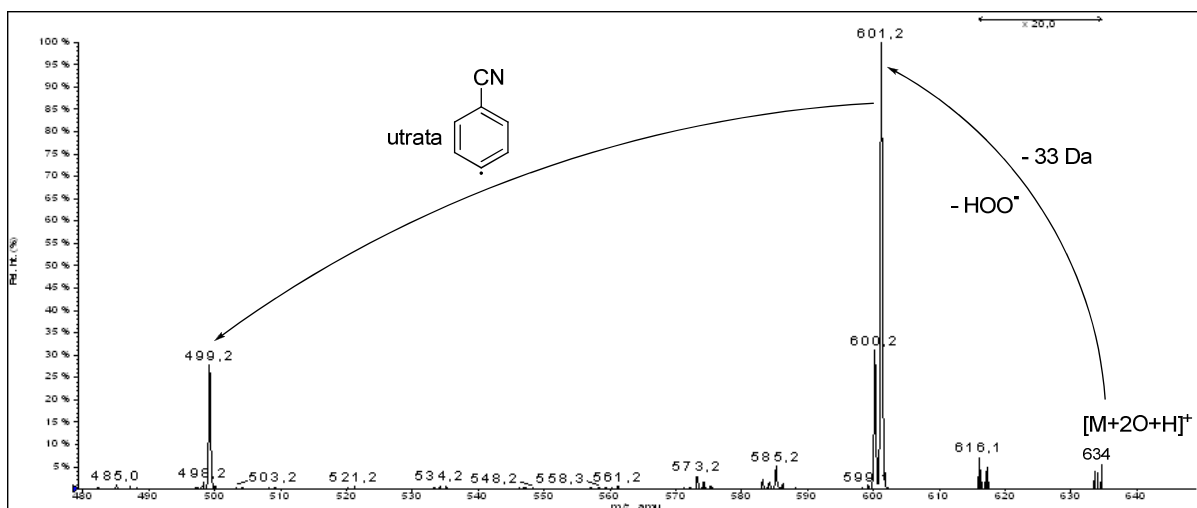
Rysunek 59. Widma APCI korolu nr 1 w acetonitrylu wykonane: a) w trybie jonów dodatnich 30 minutach po rozpuszczeniu, b) w trybie jonów dodatnich po 60 minutach po rozpuszczeniu, c) w trybie jonów ujemnych 30 minutach po rozpuszczeniu, d) w trybie jonów ujemnych po 60 minutach po rozpuszczeniu.

Przeprowadzone do tej pory eksperymenty pokazały, że mamy do czynienia z bardzo złożonym zjawiskiem prowadzącym do szeregu produktów rozkładu, dlatego postanowiłem zastosować wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrem mas. Wiązało się to oczywiście z opracowaniem odpowiedniej metody, która dawałaby możliwość szybkiego rozdziału i analizy diskutowanych produktów utlenienia. Dość szybko udało mi się opracować ogólną metodologię, która dawała dobre efekty (szczegóły w części eksperymentalnej mojej pracy, str. 126). Zastosowałem układ faz odwróconych: kolumna Gemini C6-Phenyl oraz układ acetonitryl/woda w gradiencie ze zwiększającym się udziałem acetonitrylu w trakcie analizy. Rozpuściłem niewielką ilość związku nr 1 w acetonitrylu i pozostawiłem na około 3 dni na słońcu, a następnie przystąpiłem do wykonania analiz. Udało mi się uzyskać satysfakcjonujący rozdział mieszaniny, tym bardziej, że jak się później okazało, poszczególne produkty rozkładu występują w postaci kilku izomerów o tych samych masach.

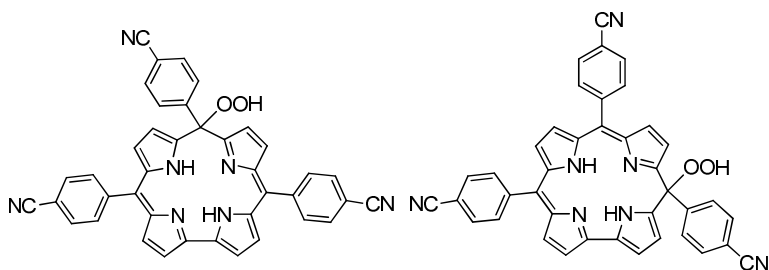


Rysunek 60. Wyekstrahowane chromatogramy jonowe niektórych jonów obserwowanych podczas analizy HPLC-MS w trybie jonów dodatnich.

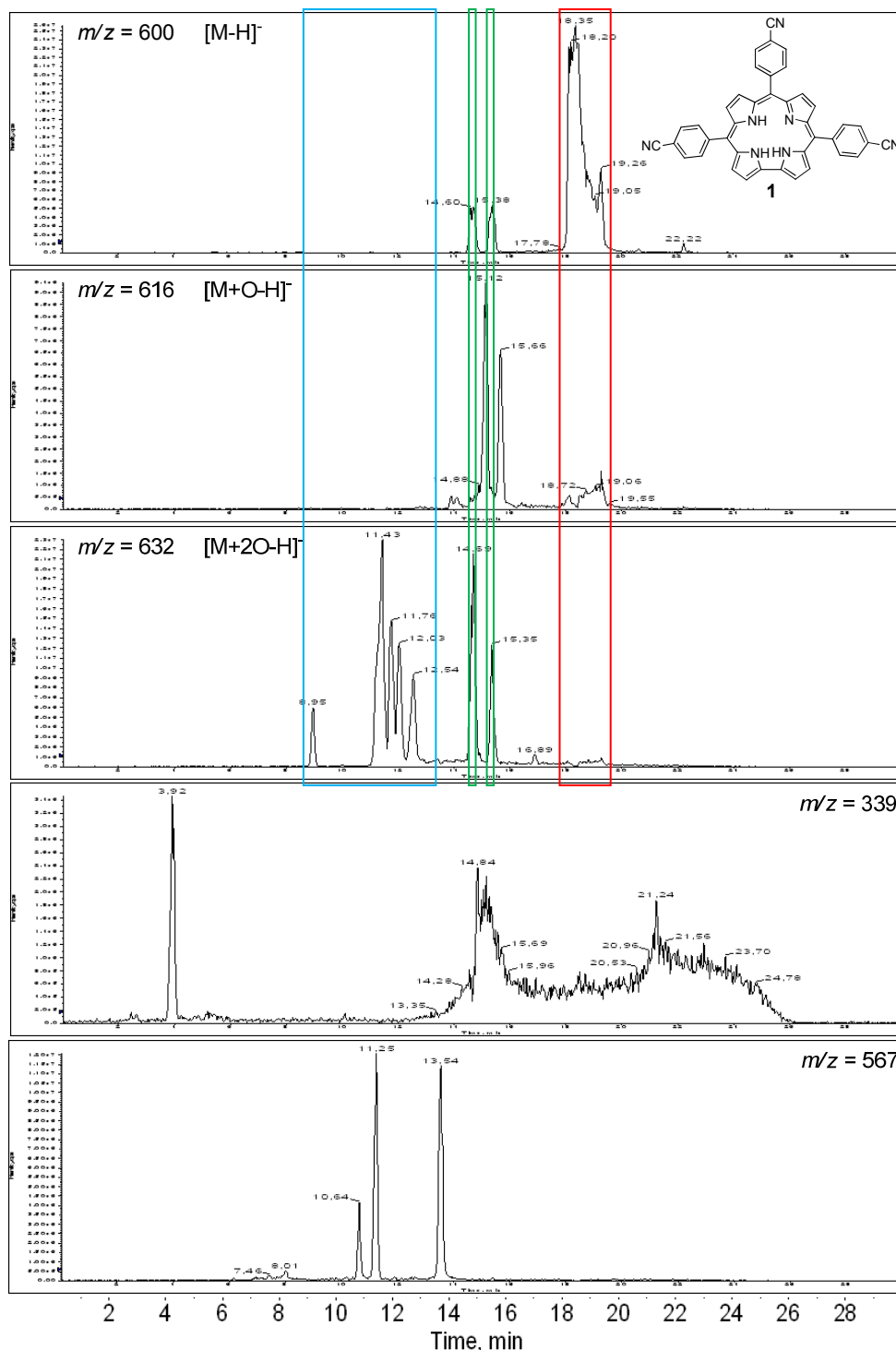
Rysunek 60 przedstawia wyekstrahowane chromatogramy jonowe (XIC – *Extracted Ion Chromatogram*) sygnałów zaobserwowanych podczas analizy HPLC-ESI-MS dla wspomnianej wcześniej mieszaniny powstałej w wyniku fotochemicznego utlenienia związku nr 1 na świetle w acetonitrylu. Rysunek ten zawiera wiele ciekawych wyników. Po pierwsze, w miejscu gdzie pojawia się korol (na rysunku ramka czerwona, między 18 a 20 minutą analizy) widoczne są również sygnały $m/z = 616$ i 618 . Bardzo podobnie wygląda sytuacja w jonach ujemnych (Rysunek 63) gdzie jednocześnie z sygnałem korolu ($m/z = 600$) pojawiają się podczas analizy sygnały $m/z = 616$ i 632 (czerwona ramka, Rysunek 63). Te sygnały mają niską intensywność, ale są powtarzalne i niestety trudno jest wytłumaczyć ich obecność. Gdyby związane to było z procesami utlenienia biegnącymi w źródle jonów, obserwowalibyśmy je tylko w przypadku jonów dodatnich, gdzie warunki w źródle jonów mają charakter utleniający, natomiast tutaj obserwowane są one również w jonach ujemnych.



Rysunek 61. Widmo fragmentacyjne zarejestrowane dla sygnału $m/z = 634$ przy czasie 14,6 min (energia kolizji CE = 60eV).



Rysunek 62



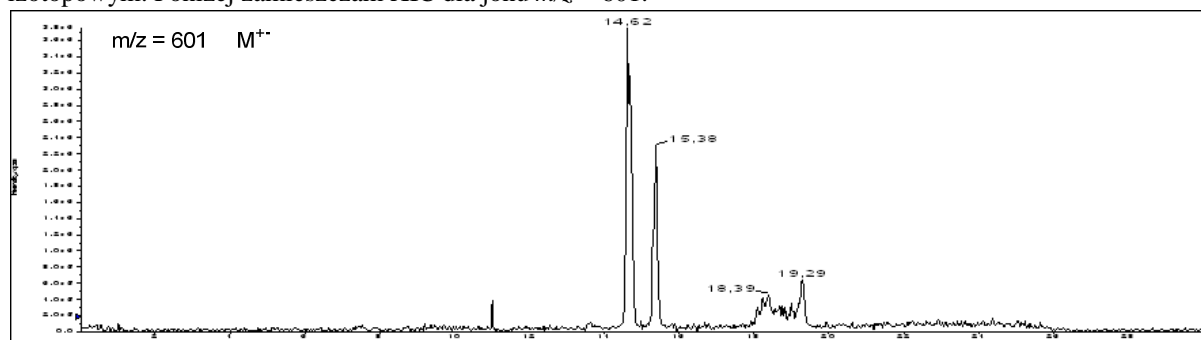
Rysunek 63. Wyekstrahowane chromatogramy jonowe niektórych jonów obserwowanych podczas analizy HPLC-MS w trybie jonów ujemnych.

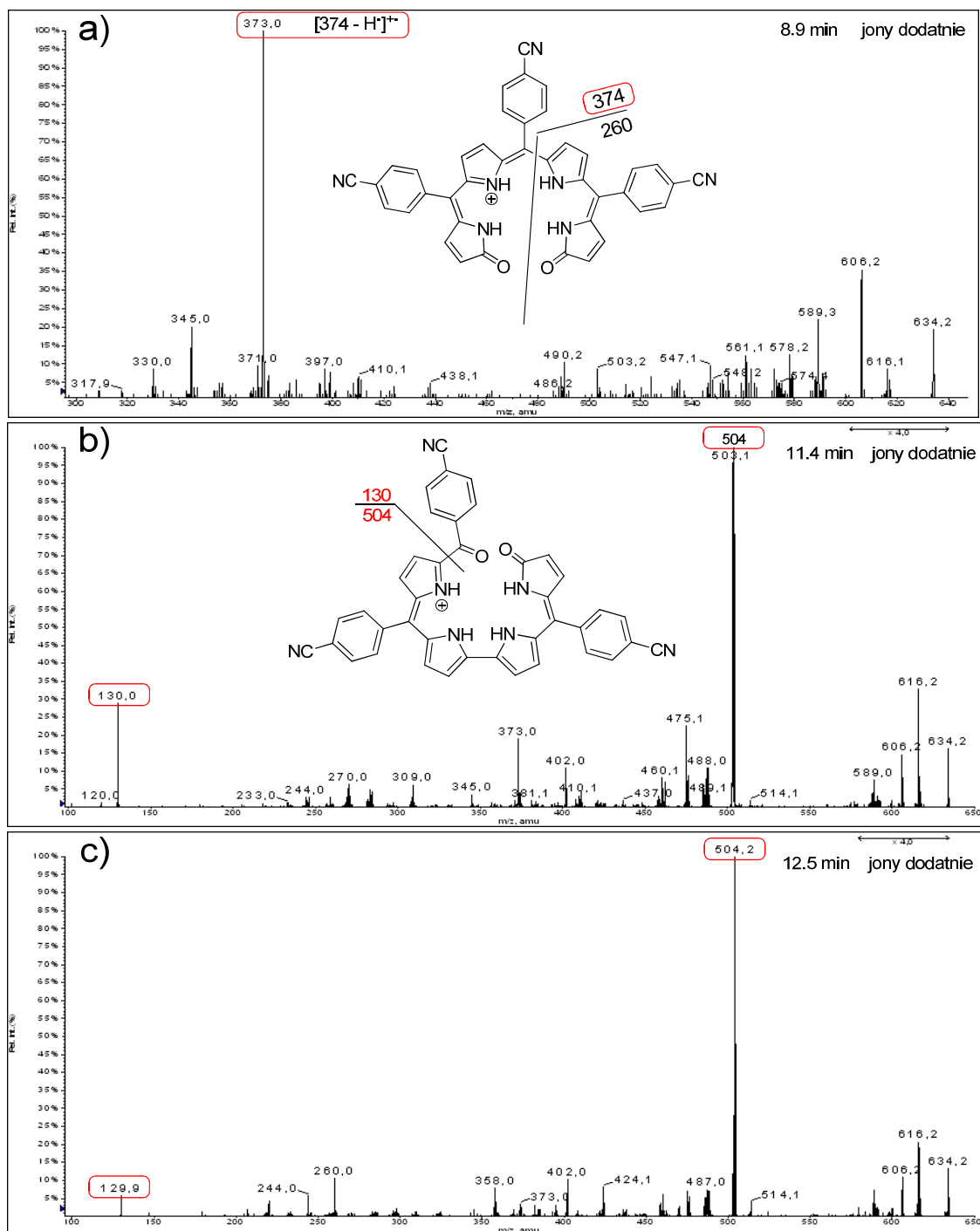
Drugą ciekawą obserwacją jest obecność w tym samym czasie sygnałów $m/z = 602$, 616 i 634 (dwa piki zaznaczone na rysunku ramkami zielonymi między 14 a 16 minutą). Obecność tych sygnałów można wytłumaczyć znając widma fragmentacyjne zarejestrowane dla jonu o $m/z = 634$ w tych dwóch miejscach. Rysunek 61 przedstawia widmo fragmentacyjne zarejestrowane dla sygnału $m/z = 634$ przy czasie 14,6 min. Widmo fragmentacyjne zarejestrowane dla analogicznego sygnału obserwowanego przy czasie

15,3 min. jest identyczne. Mamy tu do czynienia z dwoma izomerami o masie 634 Da, które w wyniku fragmentacji tracą 33 jednostki masy. Według mnie są to pochodne zawierające ugrupowanie wodoronadtlenkowe, przez co w widmach fragmentacyjnych obserwujemy eliminację rodnika HOO^\bullet . Te dwa izomery są najprawdopodobniej izokorolami posiadającymi w pozycji *mezo* cząsteczki grupy $-\text{OOH}$ (Rysunek 62). Związki te jonizując się w źródle jonów spektrometru najpewniej podlegają rozpadowi albo do wyjściowego korolu^{††} (jeżeli protonowaniu uległy atomy azotu rdzenia porfirynowego), albo do dość nietypowego kationu $[\text{M}-\text{H}^\bullet+\text{O}]^+$ przy $m/z = 616$, poprzez eliminację wody (jeżeli protonowaniu uległ atom tlenu podstawnika $-\text{OOH}$). Efektem wspomnianych wyżej procesów jest to co zaobserwowałem, czyli występowanie tych sygnałów ($m/z = 602, 616$ i 632) wspólnie w tym samym czasie podczas analizy HPLC-MS. Podobnie wyglądała sytuacja w jonach ujemnych (Rysunek 63). Między 14 a 16 minutą analizy zaobserwowałem dwa piki od sygnałów $m/z = 600$ i 632 pojawiające się w tym samym czasie. W tym przypadku jonizacja w spektrometrze indukowała uwolnienie tlenu cząsteczkowego z anionu wodoronadtlenku.

Po trzecie, analiza HPLC ukazała obecność wielu innych produktów typu $[\text{M}+2\text{O}]$. Oprócz dwóch opisanych powyżej sygnałów (z 14.6 i 15.3 minuty analizy), obserwowana była seria kilku innych o tej samej masie pomiędzy 8 a 13 minutą analizy (niebieska ramka, jony dodatnie Rysunek 60, jony ujemne Rysunek 63). Mając widma fragmentacyjne zarejestrowane dla tych pików, jestem w stanie zaproponować struktury tych produktów utlenienia. Rysunek 64 przedstawia widma fragmentacyjne zarejestrowane dla trzech jonów o $m/z = 634$ ($[\text{M}+2\text{O}+\text{H}]^+$) występujących pomiędzy 8 a 13 minutą analizy. Zaprezentowane są tylko dwie przypuszczalne struktury, gdyż okazało się, że grupa sygnałów pomiędzy 11 a 13 minutą posiada niemalże identyczną fragmentację (przykładowo zamieszczam dwie z nich, Rysunek 64a i c).

^{††} Docelowym produktem rozpadu jest kationorodnik $m/z = 601$. Rysunek 60 prezentuje wyekstrahowany chromatogram jonowy dla jonu $m/z = 602$ (jon protonowany), który w przypadku kationorodnika jest jonem izotopowym. Poniżej zamieszczam XIC dla jonu $m/z = 601$.

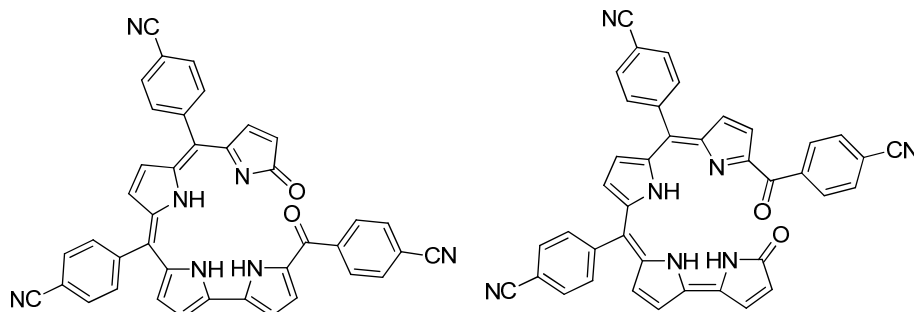




Rysunek 64. Widma fragmentacyjne jonów m/z 634 obserwowanych podczas analizy HPLC-MS związku nr 1.

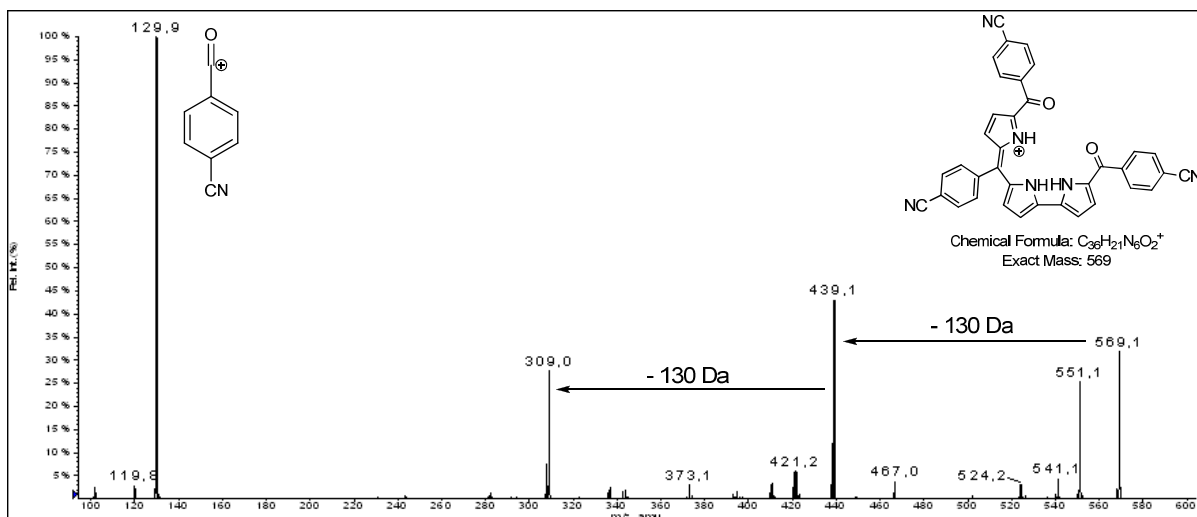
Fragmentacja sygnału obserwowanego przy czasie 8.9 minuty (Rysunek 64a) wskazuje na to, że układ uległ rozerwaniu do *biliverdinu*, czyli rozszczepienie nastąpiło pomiędzy bezpośrednio ze sobą połączonymi pierścieniami pirolowymi w cząsteczce korolu. Natomiast w przypadku sygnałów występujących pomiędzy 11 a 13 minutą analizy (Rysunek 64b i c) rozszczepienie nastąpiło w okolicy pozycji *mezo* cząsteczki. Rysunek 64b pokazuje strukturę tylko jednego z możliwych produktów rozszczepienia korolu w okolicy pozycji *mezo*

cząsteczki. Istnieją jeszcze dwie inne możliwe struktury (Rysunek 65), natomiast na chromatogramie zaobserwowałem 4 wyraźne piki (oczywiście jest możliwość, że inne sygnały mogą się na nie nakładać). Odpowiedź na pytanie, jak mogą wyglądać struktury pozostałych produktów znajdzie się w następnym podrozdziale tej pracy (str. 111).



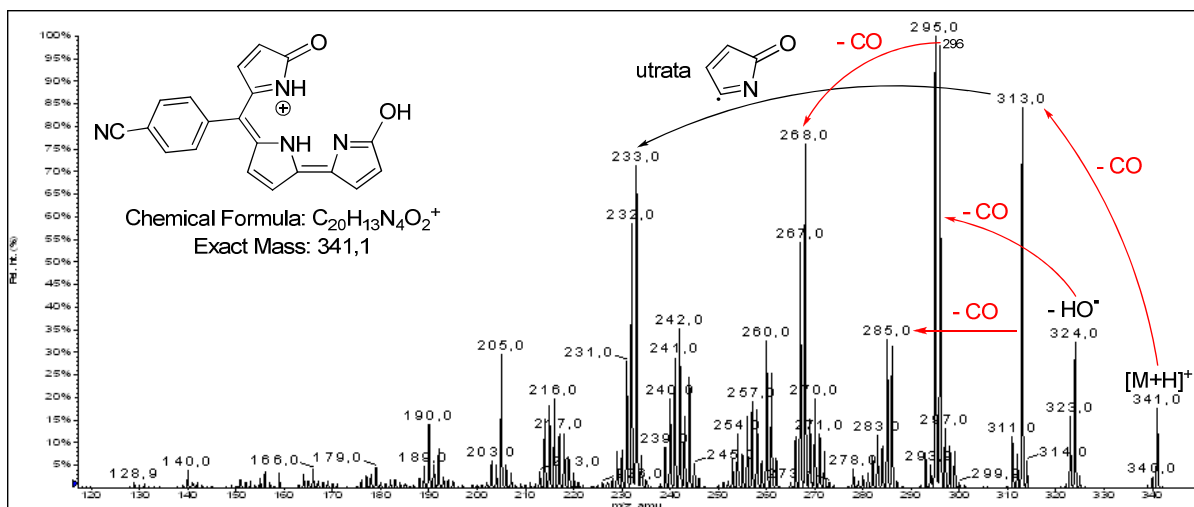
Rysunek 65

Przy okazji omawiania widm APCI korolu **1** (Rysunek 59, str. 99) zwróciłem uwagę na obecność innych sygnałów oprócz $[M+O]$ i $[M+2O]$. Dla jonów o $m/z = 341$ i 569 w jonach dodatnich ($m/z = 339$ i 567 w jonach ujemnych) przedstawiłem chromatogramy jonowe z analizy HPLC-ESI-MS (Rysunek 60 i Rysunek 63), żeby pokazać, że faktycznie produkty te są obecne w mieszaninie. Dla produktu obserwowanego w jonach dodatnich przy $m/z = 569$ podczas analizy za pomocą metody APCI wykonałem jego fragmentację i na tej podstawie zaproponowałem przypuszczalną strukturę (Rysunek 66). Jest to z dużą pewnością rozszczepiony korol pozbawiony jednej jednostki pirolowej.

Rysunek 66. Widmo fragmentacyjne jonu m/z 669 obserwowanego w widmie APCI korolu nr 1.

Podobnie w przypadku sygnału o $m/z = 341$, znając masę tego produktu utlenienia i jego widmo fragmentacyjne jestem w stanie zaproponować jego strukturę. Rysunek 67 przedstawia

widmo fragmentacyjne wraz opisem niektórych sygnałów oraz przypuszczalną strukturę dyskutowanego produktu utlenienia.



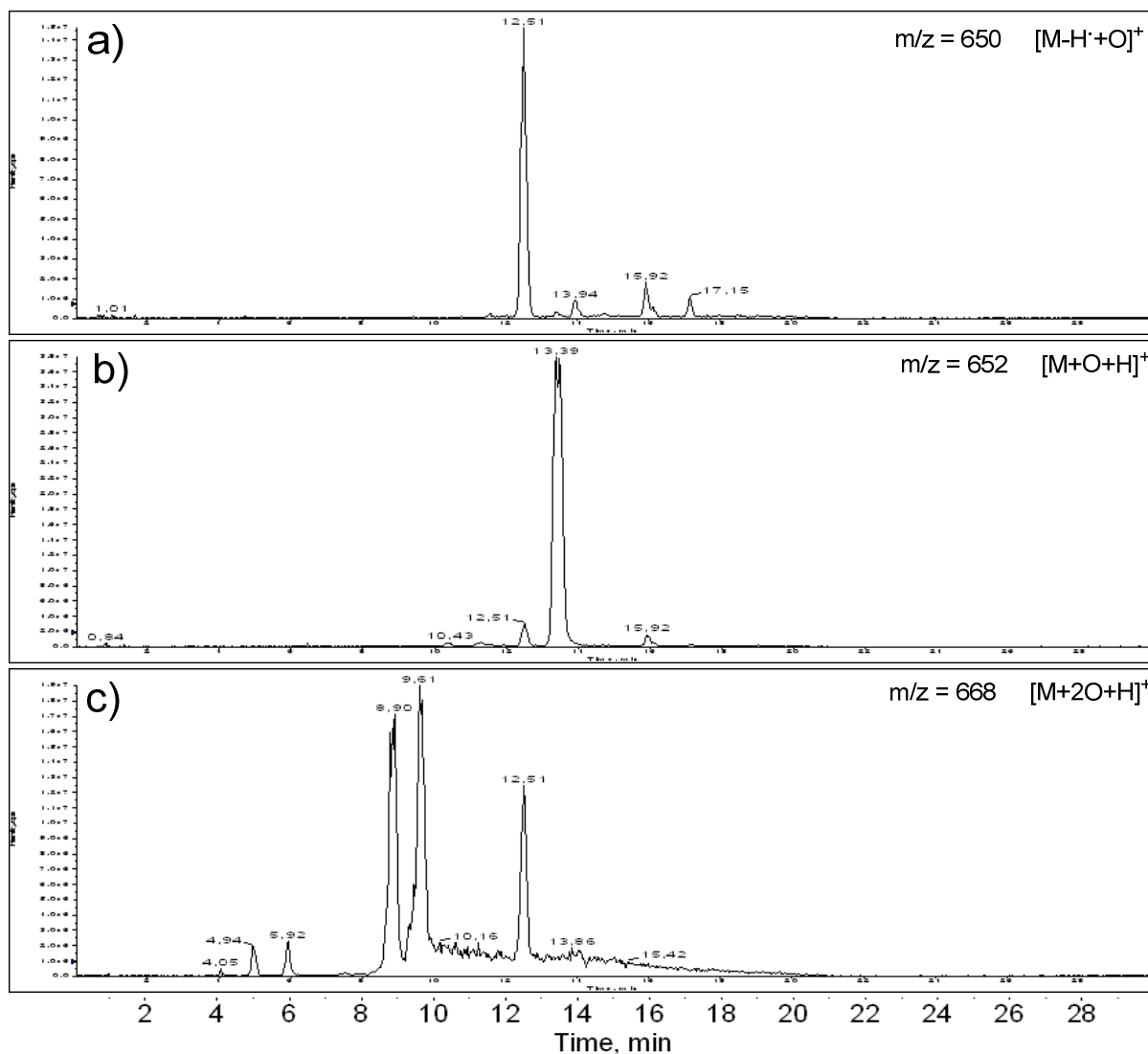
Rysunek 67. Widmo fragmentacyjne jonu m/z 341 obserwowanego w widmie APCI korolu nr 1.

3.4.3. Wykorzystanie tandemowej spektrometrii mas, HPLC-MS i innych metod do identyfikacji fotochemicznych produktów rozkładu koroli.

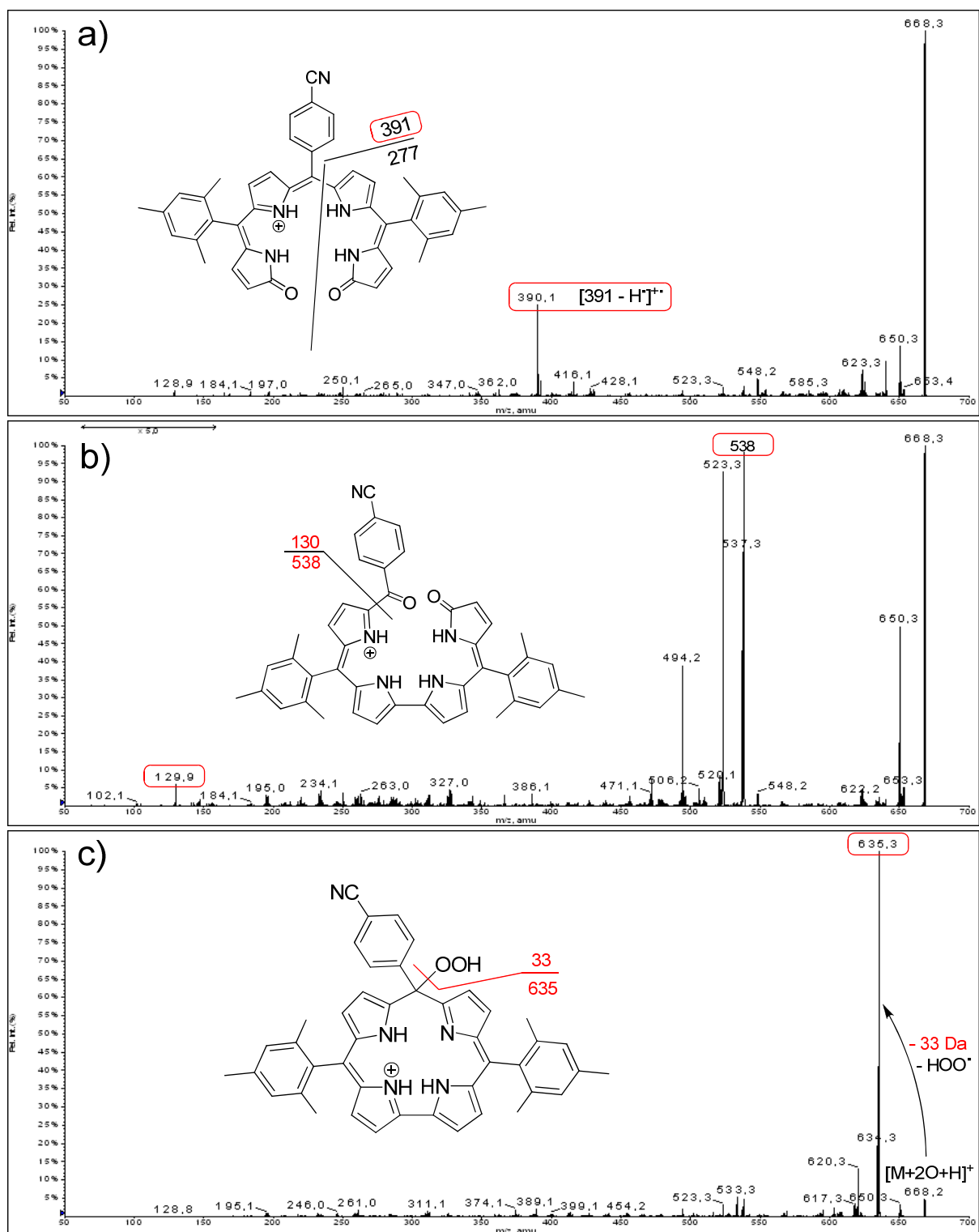
Wspólnie z Zespołem prof. Daniela T. Gryko postanowiliśmy zbadać dokładniej zachowanie się koroli w roztworze acetonitrylu, a przy okazji potwierdzić informacje, które do tej pory udało mi się zgromadzić na temat zaobserwowanego procesu.

Jako związek modelowy do eksperymentów wybraliśmy związek nr **27**. Związek ten dość szybko ulegał degradacji w acetonitrylu. Uwidaczniało się to nawet w postaci zmiany barwy roztworu tego korolu z fioletowej na zieloną. Na początek wykonałem szereg wstępnych analiz za pomocą HPLC-MS. Rozpuściłem niewielką ilość korolu **27** w acetonitrylu i pozostawiłem na świetle. Po około miesiącu wykonałem analizę HPLC-ESI-MS mieszaniny. Rysunek 68 przedstawia trzy chromatogramy jonowe pokazujące, gdzie podczas analizy pojawiły się w widmie MS sygnały pochodzące od produktów utlenienia ($[M^+ - H^+ + O]^+$, $[M + O + H]^+$, $[M + 2O + H]^+$, odpowiednio $m/z = 650$, 652 i 668). Okazało się, że dla tego związku również powstaje kilka izomerów produktu $[M + 2O + H]^+$ (czasy na chromatogramie: 4,94, 5,92, 8,9, 9,61 i 12,51 min.). Analizując widma fragmentacyjne wykonane dla sygnału o $m/z = 668$ zauważyłem podobną prawidłowość, jak w przypadku związku nr **1**, którego produkty utlenienia zostały opisane w poprzednim podrozdziale. Sygnały obserwowane pomiędzy 4 a 6 minutą analizy posiadają niemal identyczną fragmentację (Rysunek 69a), wskazującą na rozszczepienie makrocykla pomiędzy jednostkami pirolowymi bezpośrednio ze sobą połączonymi. Inaczej niż w przypadku związku **1**, rozszczepienie w sąsiedztwie pozycji *mezo* następowało tylko w obrębie jednej

z tych pozycji (dwa sygnały pomiędzy 8 a 10 minutą na Rysunku 68c, widmo fragmentacyjne identyczne dla obu sygnałów pokazane na Rysunku 69b). Podstawniki mezytylowe najpewniej skutecznie chroniły pozostałe pozycje *mezo* cząsteczki, blokując podejście tlenu i reakcję powodującą rozszczępienie makrocykla.



Rysunek 68. Wyekstrahowane chromatogramy jonowe niektórych jonów obserwowanych podczas analizy HPLC-MS w trybie jonów dodatnich.

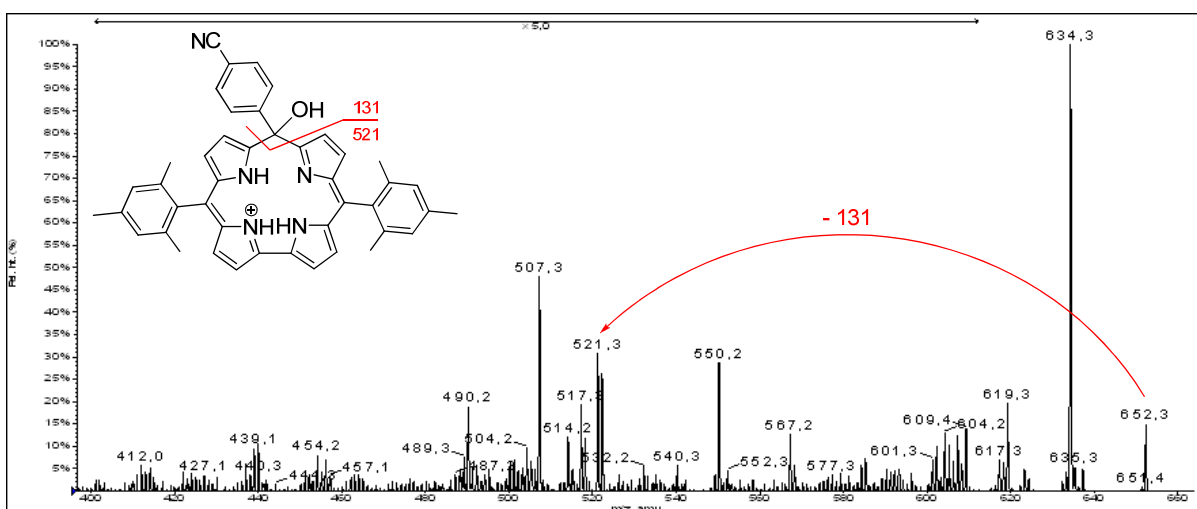


Rysunek 69. Widma fragmentacyjne jonów m/z 668 obserwowanych podczas analizy HPLC-MS związku nr 27.

Pomiędzy 8 a 10 minutą analizy widoczne są dwa izomery produktu $[M+2O+H]^+$, a fakt rozszczepienie makrocykla w okolicach pozycji *mezo* tylko w jednym miejscu wskazywały na to, że powinien być widoczny tylko jeden izomer. Odpowiedź na pytanie, dlaczego tak się

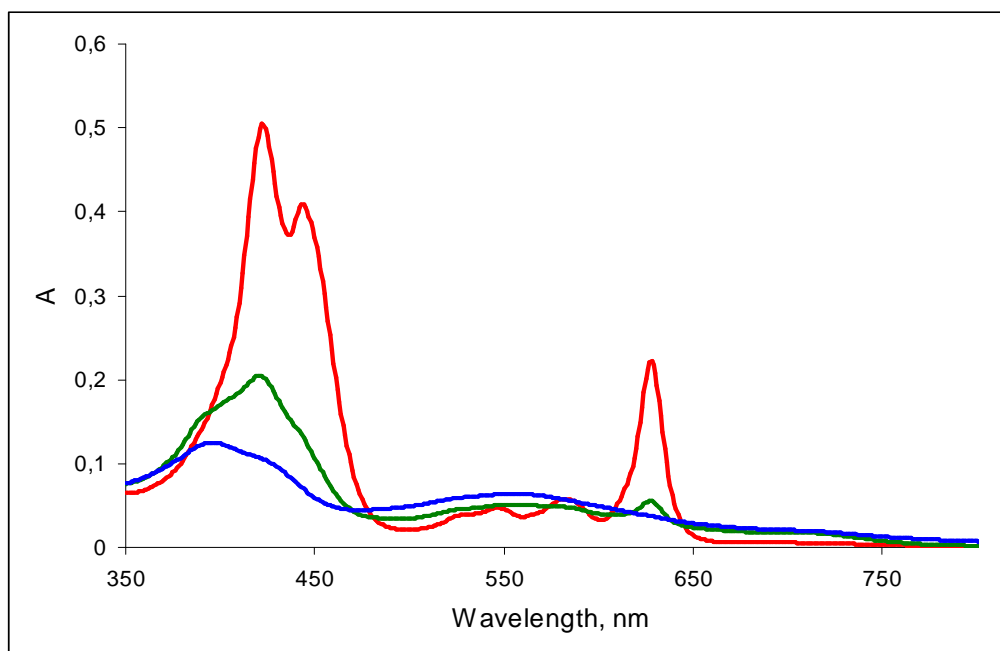
dzieje dały dopiero widma NMR wydzielonych w czystej postaci izomerów, co zostanie opisane w dalszej części tego rozdziału.

Ostatni sygnał dla produktu $[M+2O+H]^+$ obserwowany przy czasie 12,5 min. jest najprawdopodobniej, tak jak w przypadku związku **1**, pochodną wodoronadtlenkową. Świadczy o tym utrata 33 Da w widmie fragmentacyjnym (Rysunek 69c). Przy okazji eksperymentu HPLC-MS wykonałem również fragmentację sygnału $[M+O+H]^+$ ($m/z = 652$) obecnego przy czasie retencji 13,4 min. Najprawdopodobniej jest to izokorol zawierający grupę hydroksylową w pozycji 10 makrocykla. Jednym z dowodów potwierdzających taką strukturę produktu jest obecność jonu o $m/z = 521$ w widmie fragmentacyjnym (Rysunek 70).

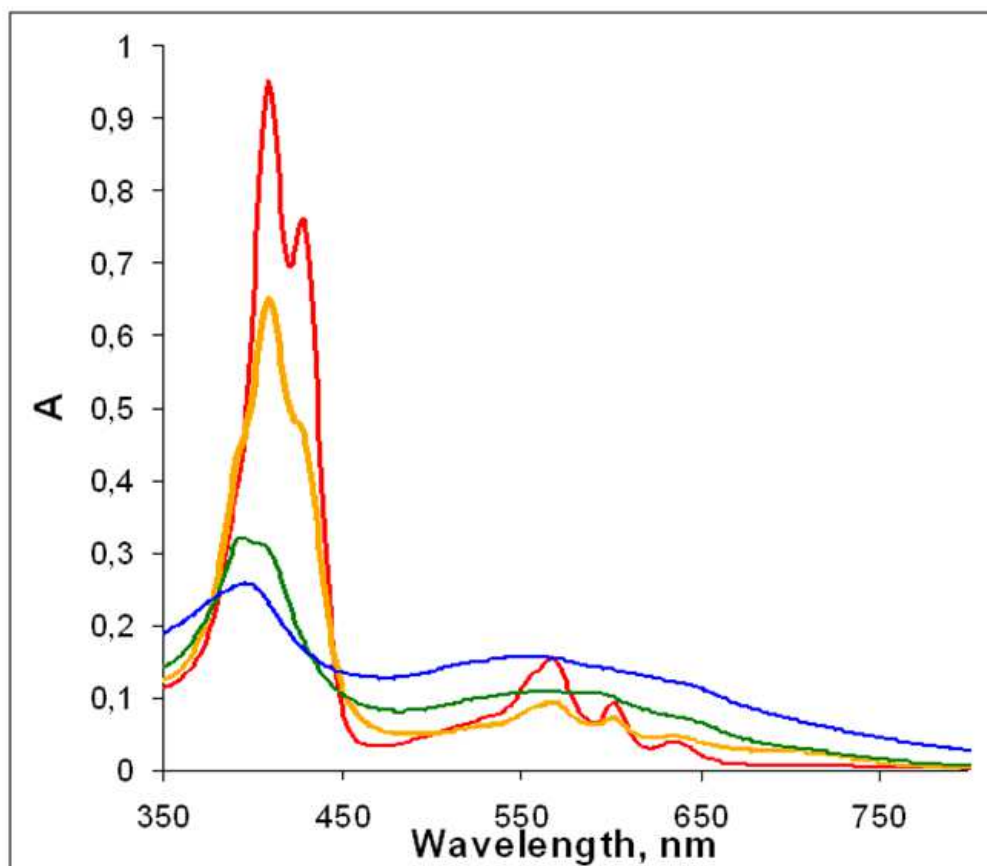


Rysunek 70. Widmo fragmentacyjne jonu m/z 652.

Równocześnie z pomiarami z udziałem spektrometrii mas zostały wykonane pomiary UV-Vis dla diskutowanego związku w acetonitrylu w różnych odstępach czasu. Pod nieobecność światła słonecznego nie obserwowano żadnych zmian w widmie absorbcyjnym. Natomiast w obecności światła obserwuje się szybkie zanikanie pasma Soreta i powstawanie szerokiego pasma około 550 nm. Dodatkowo wykonano identyczny eksperyment tylko z użyciem chlorku metylenu jako rozpuszczalnika (Rysunek 72). Zauważono, że rozkład w acetonitrylu postępuje dużo szybciej niż w chlorku metylenu.

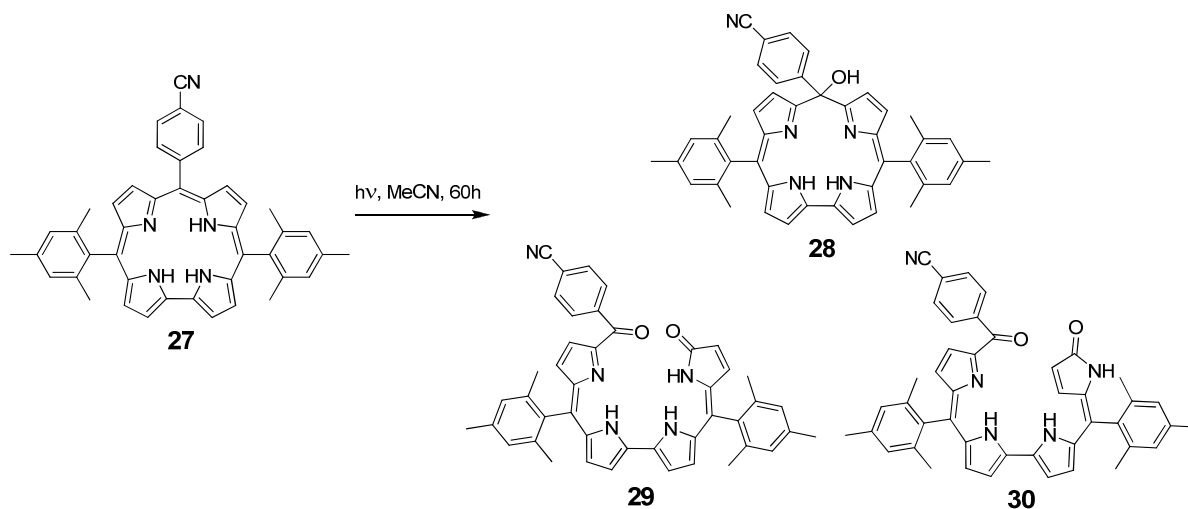


Rysunek 71. Zmiany widma absorbcyjnego roztworu korolu 34 w acetonitrylu wystawionego na działanie światła słonecznego: 0 min (czerwona linia), 5 min (zielona linia), 10 min (niebieska linia).



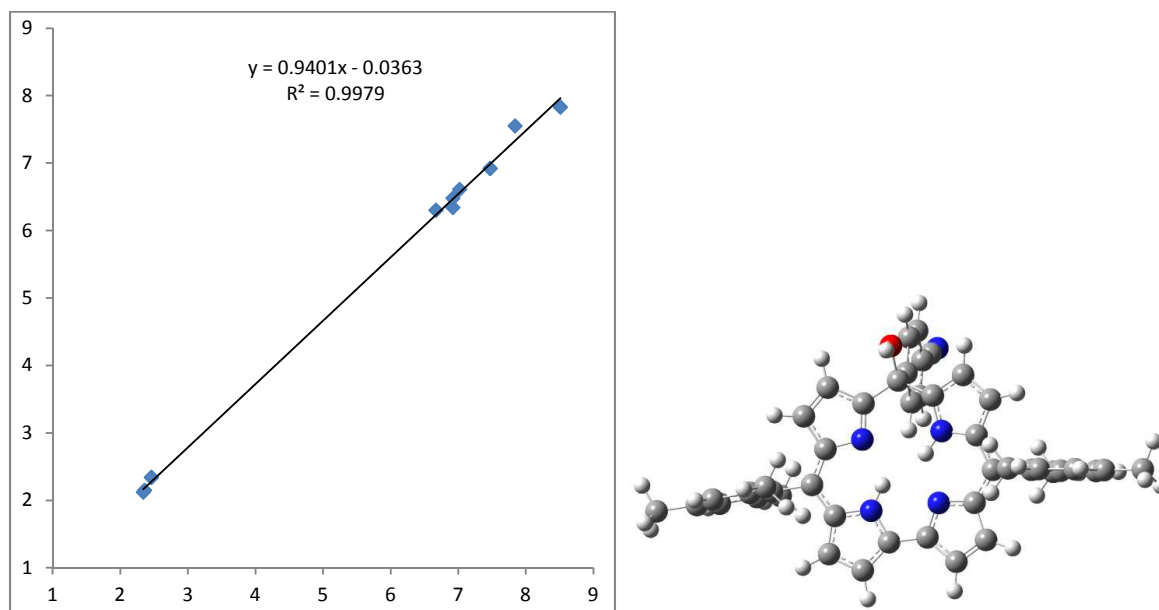
Rysunek 72. Zmiany widma absorbcyjnego roztworu korolu 34 w chlorku metylenu wystawionego na działanie światła słonecznego: 0 min (czerwona linia), 1h (pomarańczowa linia), 3h (zielona linia), 22h (niebieska linia).

Po wstępnych analizach wykonanych za pomocą spektrometrii mas i spektroskopii UV-Vis postanowiliśmy wykonać eksperyment w większej skali i wydzielić produkty rozkładu. W tym celu kilkadziesiąt miligramów korolu **27** zostało rozpuszczone w acetonitrylu i pozostawione na słońcu (łączy czas pozostawiania na świetle około 60h). Z powstałej w tym czasie mieszaniny udało się wyizolować 3 związki (nr **28**, **29** i **30**, Schemat 39) w ilościach, które pozwalały na charakterystykę tych produktów poprzez pomiar widm NMR (zarówno jedno-, jak i dwuwymiarowych).



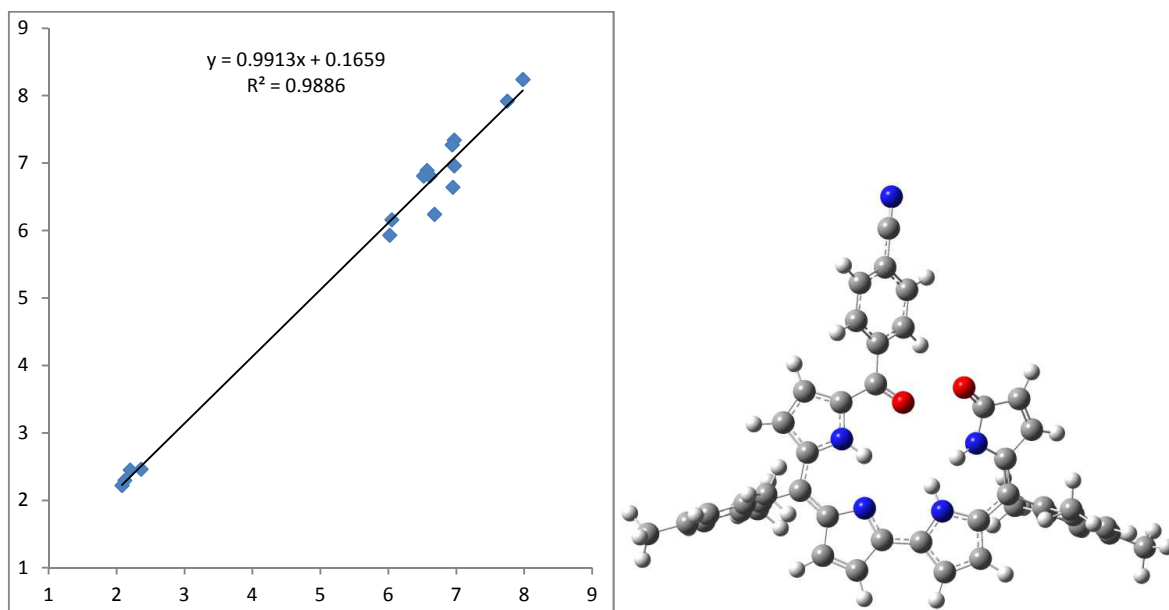
Schemat 39

Spośród tych trzech wyizolowanych produktów, bazując na widmach NMR, najłatwiej było zidentyfikować związek **28** (izokorol, w analizach MS obserwowany jak sygnał $[M+O+H]^+$). Widma NMR wskazywały jednoznacznie na to, że mamy do czynienia ze związkiem posiadającym płaszczyznę symetrii, co jednocześnie potwierdzało nasze przypuszczenia odnośnie miejsca, w którym znajduje się grupa hydroksylowa. Dodatkowo wyznaczyłem przesunięcia chemiczne ^1H NMR z zastosowaniem metod obliczeniowych i porównałem z uzyskanymi w eksperymencie NMR. Uzyskałem bardzo dobrą korelację wyników eksperymentalnych i obliczeniowych (Rysunek 73).

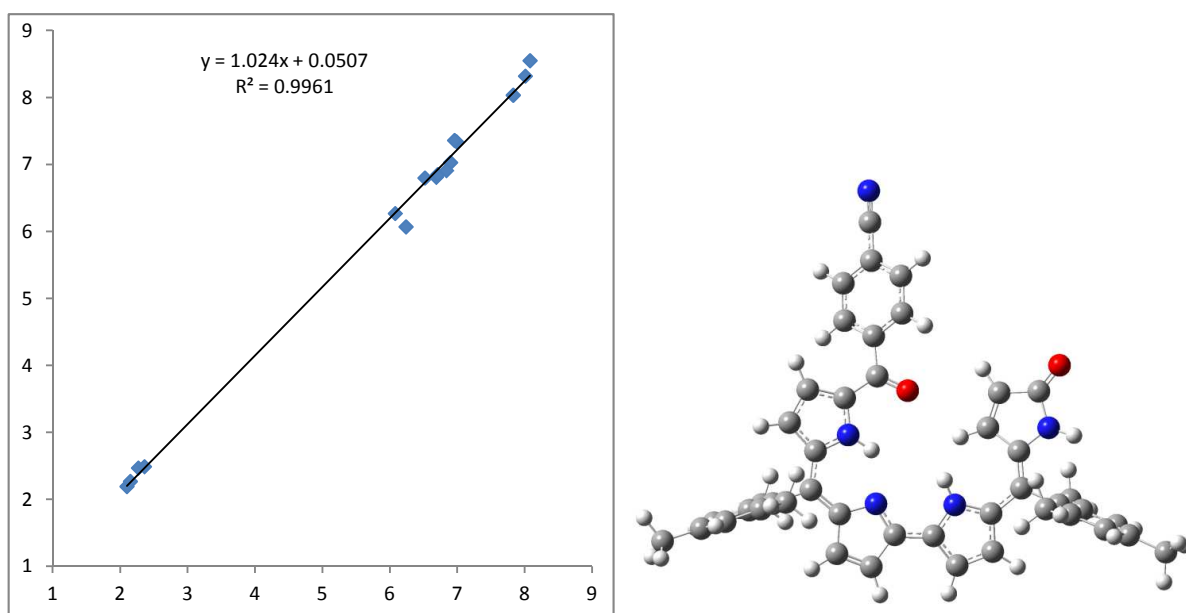


Rysunek 73. Obliczona geometria oraz korelacja pomiędzy eksperymentalnymi wartościami przesunięć chemicznych ^1H NMR z przesunięciami uzyskanymi na drodze obliczeniowej GIAO/B3PW91/6-311+g(d,p) dla związku nr 28 (szczegóły na temat obliczeń w części eksperymentalnej). Sygnały protonów NH zostały pominięte.

Pozostałe dwa związki było trochę trudniej zidentyfikować. Widma mas pokazały, że związki te posiadają identyczną masę cząsteczkową. Okazało się również, że widma fragmentacyjne tych związków są identyczne, co sugerowało, że mamy do czynienia ze związkami różniącymi się tylko nieznacznie budową i będącymi prawdopodobnie izomerami geometrycznymi. Opierając się na widmach NMR zaproponowaliśmy, że związek **30** jest rozszczepionym korolem, różniącym się od związku **29** konfiguracją jednego z wiązań podwójnych (izomery E/Z). Dla związku **29** protony NH występowały w postaci jednego szerokiego sygnału w widmie ^1H NMR (ok. 9 ppm), natomiast w przypadku związku **30** jeden z protonów był bardziej przesłaniany i znalazł się w widmie przy 6,7 ppm. Jednocześnie dla związku **29** wszystkie protony w pozycji β znalazły się w widmie ^1H NMR w zakresie 6 – 6,7 ppm, a w przypadku związku **30** jeden z protonów β był bardziej odslaniany i obserwowano go przy wartości przesunięcia 8,1 ppm. Dane te sugerowały, że jeden z pierścieni pirolowych jest obrócony o 180 stopni. Nasze sugestie poparliśmy dodatkowo obliczeniami DFT widm NMR (Rysunek 74 i Rysunek 75). Korelacja danych eksperymentalnych i obliczeniowych była dobra ($R^2 = 0,9886$ i $0,9961$), choć nie tak dobra jak w przypadku izokorolu. Związki te są bardziej labilne konformacyjnie w porównaniu z izokorolem, stąd może się brać ta gorsza zgodność wyników eksperymentalnych i obliczeniowych.



Rysunek 74. Obliczona geometria oraz korelacja pomiędzy eksperymentalnymi wartościami przesunięć chemicznych ^1H NMR z przesunięciami uzyskanymi na drodze obliczeniowej GIAO/B3PW91/6-311+g(d,p) dla związku nr 29 (szczegóły na temat obliczeń w części eksperymentalnej). Sygnały protonów NH zostały pominięte.

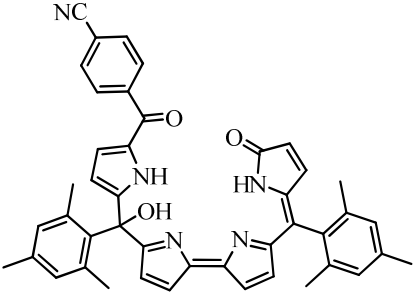
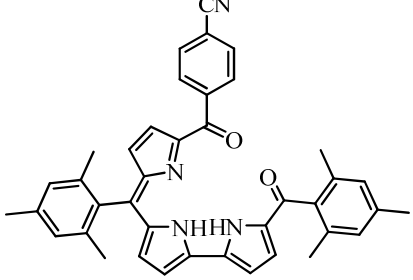
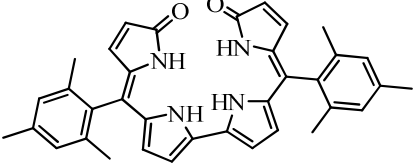


Rysunek 75. Obliczona geometria oraz korelacja pomiędzy eksperymentalnymi wartościami przesunięć chemicznych ^1H NMR z przesunięciami uzyskanymi na drodze obliczeniowej GIAO/B3PW91/6-311+g(d,p) dla związku nr 30 (szczegóły na temat obliczeń w części eksperymentalnej). Sygnały protonów NH zostały pominięte.

Opisane wyżej trzy produkty utlenienia były głównymi produktami, lecz nie jedynymi, powstałymi w czasie eksperymentu. Frakcje zawierające związki tworzące się w śladowych ilościach zostały przebadana przeze mnie za pomocą spektrometrii mas. Tabela 7 zawiera

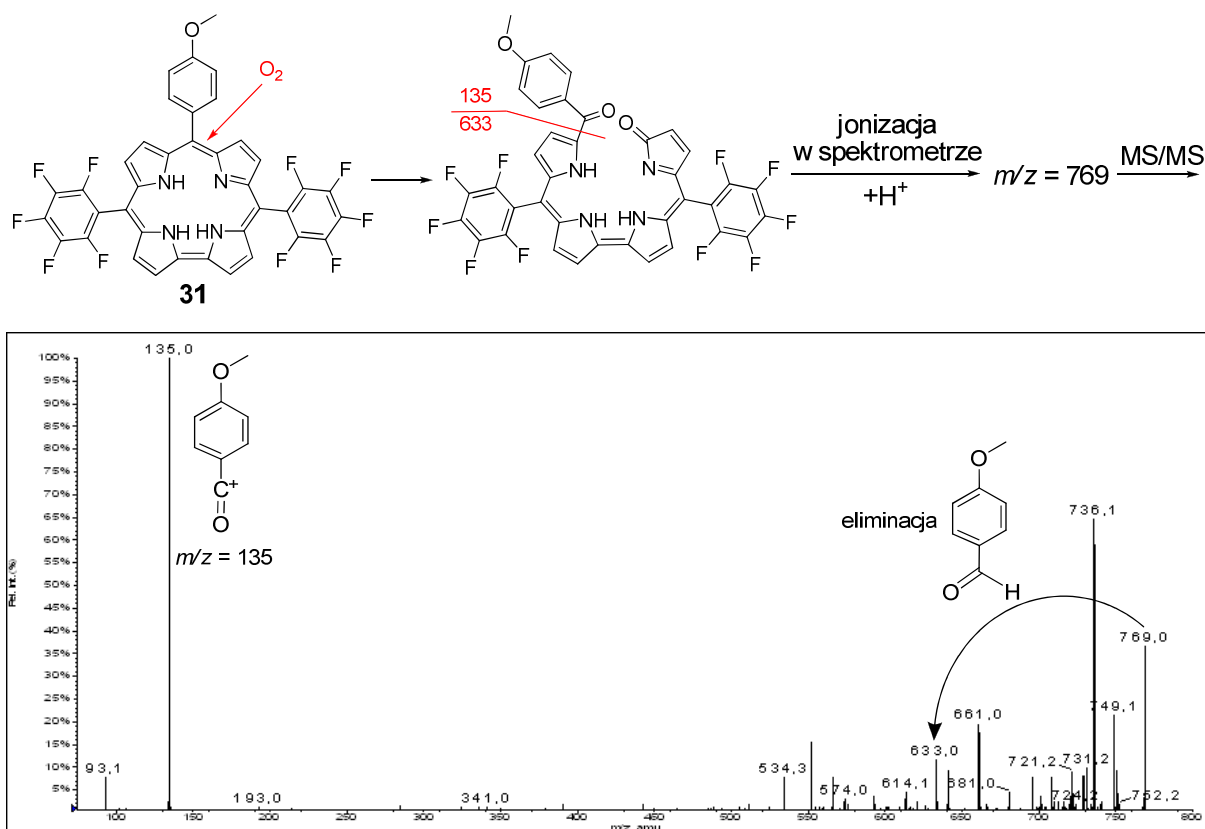
dane dokładnych pomiarów masy dla sześciu produktów tworzących się w śladowych ilościach. Dla trzech z tych produktów zaproponowałem również struktury.

Tabela 7

	<p>HRMS (FD): m/z obl. dla $C_{44}H_{37}N_5O_3$: 683.2896; zmierzone: 683.2891</p>
	<p>HRMS (ESI): m/z obl. dla $C_{40}H_{35}N_4O_2$: 603.2755; zmierzone: 603.2765</p>
	<p>HRMS (ESI): m/z obl. dla $C_{36}H_{34}N_4O_2$: 554.2676; zmierzone: 554.2699</p>
<p>$m/z = 796$ w FD, $m/z = 797$ i 819 w ESI</p>	<p>HRMS (ESI) zmierzone: 797.3235 $[M+H]^+$ prawdopodobny wzór sumaryczny: $C_{52}H_{41}N_6O_3$ m/z obl. dla $C_{52}H_{41}N_6O_3$: 797.3267 ; błąd = 4.02 ppm</p>
<p>$m/z = 709$ w FD, $m/z = 710$ i 732 w ESI</p>	<p>HRMS (ESI) zmierzone: 710.3155 $[M+H]^+$ prawdopodobny wzór sumaryczny: $C_{46}H_{40}N_5O_3$ m/z obl. dla $C_{46}H_{40}N_5O_3$: 710.3126 ; błąd = 4.16 ppm</p>
<p>$m/z = 639$ w FD, $m/z = 639$ i 640 w ESI</p>	<p>HRMS (ESI) zmierzone: 639.3080 $[M]^+$ prawdopodobny wzór sumaryczny: $C_{41}H_{41}N_3O_4$ and $C_{42}H_{37}N_7$ m/z obl. dla $C_{41}H_{41}N_3O_4$: 639.3092 ; błąd = -1.87 ppm m/z obl. dla $C_{42}H_{37}N_7$: 639.3105; błąd = -3.97 ppm</p>

3.4.4. Badania struktury produktów utlenienia na podstawie widm MS/MS oraz wpływ podstawników obecnych w pozycjach *mezo* koroli na trwałość tych układów.

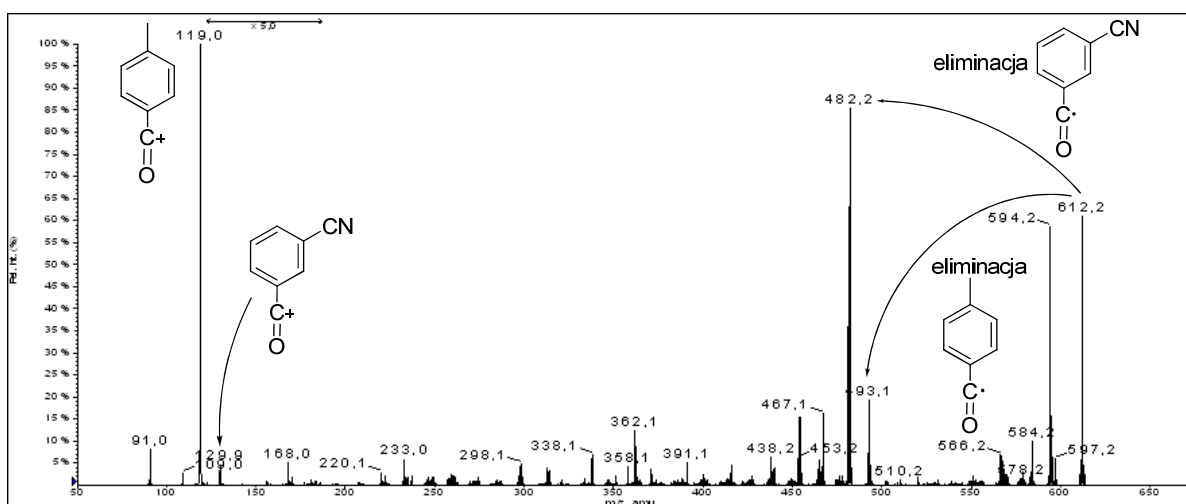
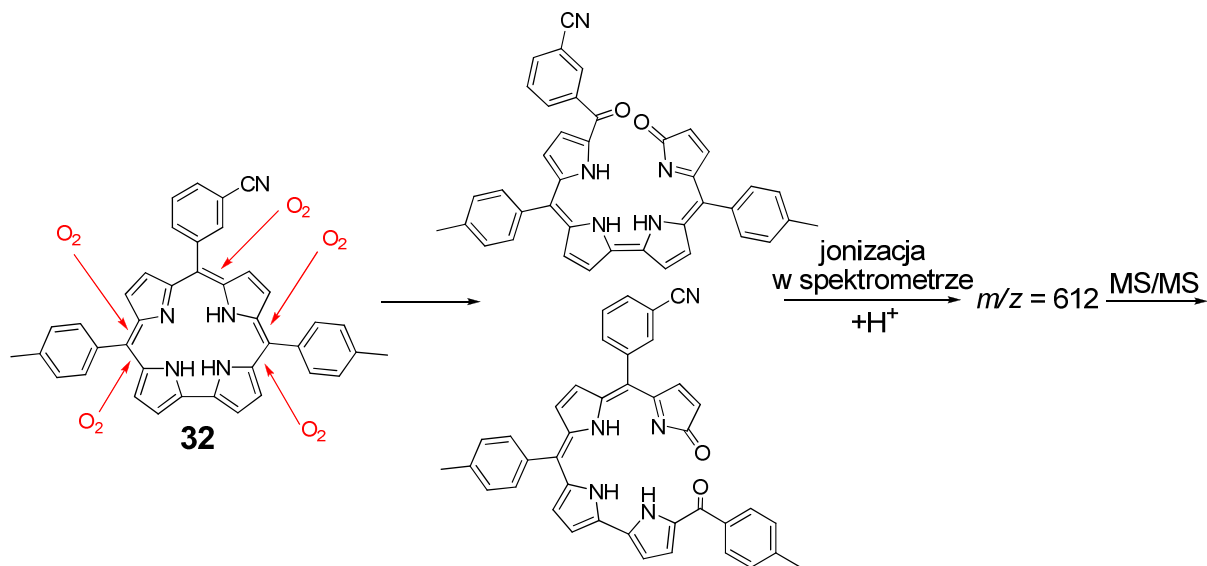
W ramach badań związanych z procesem utleniania koroli w acetonitrylu wykonałem cały szereg widm fragmentacyjnych dla sygnałów pochodzących od produktów utlenienia. Duża liczba przebadanych związków umożliwiła określenie, które podstawniki w cząsteczce wpływają dodatnio, a które ujemnie na trwałość korolu w roztworze. Chwilę po rozpuszczeniu korolu w acetonitrylu możemy obserwować za pomocą spektrometrii mas sygnały pochodzące od produktów utlenienia. Widma fragmentacyjne, jak to zostało już pokazane w poprzednich rozdziałach, dostarczają wielu informacji na temat struktury tych produktów. Bazując na fragmentacjach obserwowanych dla produktu $[M+2O]$ określony został wpływ podstawników znajdujących się w pozycji *mezo* cząsteczki. Dla koroli typu A_3 , gdzie wszystkie podstawniki w pozycji *mezo* cząsteczki są identyczne, nie ma możliwości rozróżnienia gdzie nastąpiło rozerwanie makrocykla w wyniku reakcji z tlenem. Natomiast dla koroli A_2B istnieje już taka możliwość.



Rysunek 76

Tylko w przypadku dwóch podstawników nie było obserwowane rozszczepienie makrocykla w bezpośrednim ich otoczeniu. Pierwszym był podstawnik mezytylowy, ze

względu na zawadę przestrzenną uniemożliwiającą podejście tlenu (co zostało pokazane w poprzednim podrozdziale). Drugim podstawnikiem, dla którego nie obserwowano reakcji z tlenem w jego bezpośredniej okolicy, był podstawnik perfluorofenyłowy. Przykładowo, w widmie MS/MS produktu $[M+2O]$ związku **31** (Rysunek 76) obserwowany jest jon $m/z = 135$, którego obecność jest bezpośrednim dowodem na rozszczepienie cząsteczki korolu w pozycji numer 10 pierścienia.

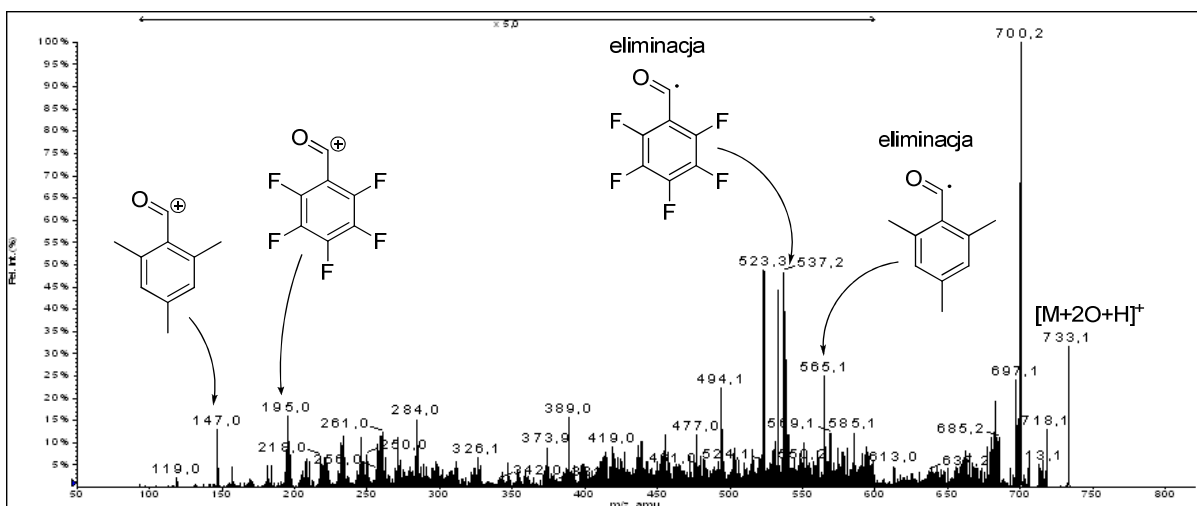
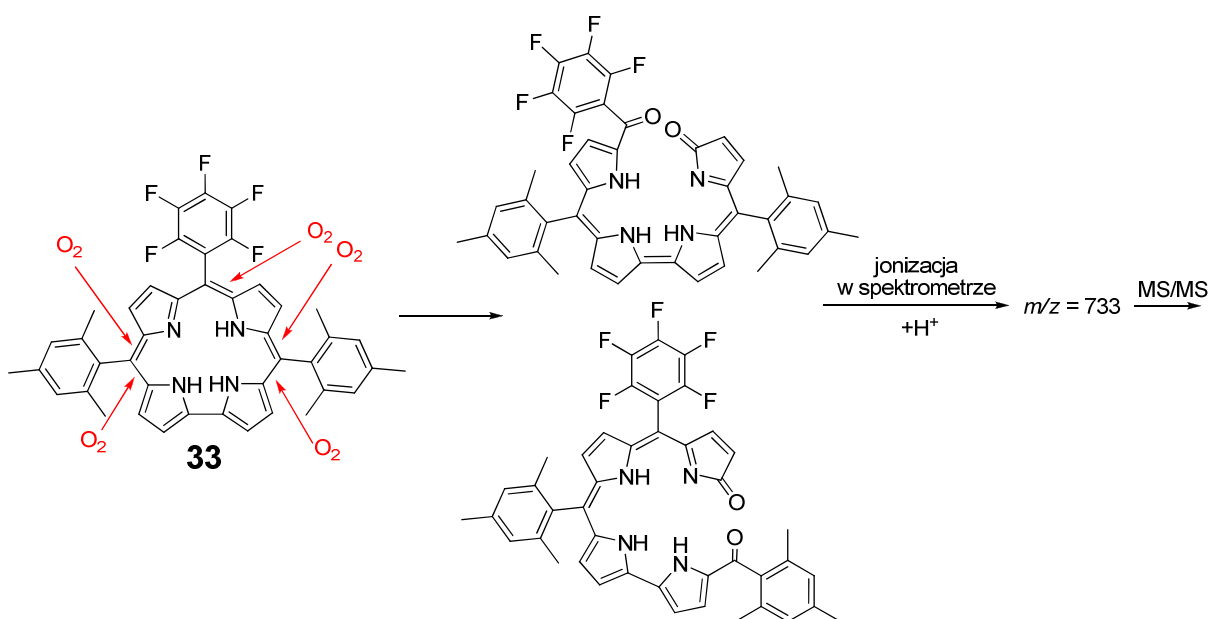


Rysunek 77

Dodatkowo obserwowana jest eliminacja odpowiedniego aldehydu (jon $m/z = 633$, Rysunek 76) i nie obserwuje się analogicznych sygnałów związanych z podstawnikiem pentafluorofenyłowym, mogących świadczyć o powstaniu produktu rozszczepienia w pozycji 5 lub 15. Oczywiście obserwowane widmo jest nałożeniem fragmentacji kilku izomerycznych produktów, które tworzą się w trakcie utlenienia, a spektrometria mas nie może nam powiedzieć, bez rozdzielenia mieszaniny, ile takich produktów o podobnej budowie powstało

w wyniku tego procesu. Potrafi natomiast wskazać, miejsce w cząsteczce gdzie w wyniku reakcji z tlenem korol uległ rozszczepieniu, dając nam odpowiedź na pytanie, jakie podstawniki w pozycji *mezo* wpływają dodatnio na stabilność tych nietrwałych układów.

Korole A₂B nie posiadające wymienionych podstawników w cząsteczce, narażone są na atak tlenu na wszystkie pozycje *mezo*. Przykładem może być związek **32**, który ulega rozszczepieniu w obrębie wszystkich pozycji *mezo*. Świadczy o tym widmo fragmentacyjne produktu [M+2O], w którym obecne są sygnały powiązane z obydwoma podstawnikami znajdującymi się w pozycji *mezo* (Rysunek 77).



Rysunek 78

Obecność w cząsteczce korolu zarówno podstawnika pentafluorofenyłowego, jak i mezytyłowego sprawia, że taki korol staje się bardzo trwały w roztworach. Po rozpuszczeniu związku **33** w acetonitrylu przez długi czas nie obserwuje się dodatkowych sygnałów

w widmach MS. Spektrometria mas jest jednak na tyle czułą metodą jonizacji, że po kilku godzinach udało się zaobserwować sygnał $[M+2O+H]^+$ i wykonać dla niego widmo fragmentacyjne (Rysunek 78). Analiza sygnałów obecnych w widmie MS/MS tego jonu wskazuje na to, że rozszczepienie korolu **33** w wyniku reakcji z tlenem może następować we wszystkich pozycjach *mezo*. Obecność w widmie odpowiednich kationów acylowych ($m/z = 147$ i 195) oraz sygnałów świadczących o eliminacji odpowiadających im rodników ($m/z = 537$ i 565) wskazuje na to, że w tym konkretnym przypadku tlen reaguje z cząsteczką korolu zarówno w otoczeniu podstawnika mezytylowego jak i pentafluorofenyłowego.

4. Podsumowanie

Głównym celem niniejszej pracy było porównanie szeregu metod jonizacji stosowanych w spektrometrii mas w analizie układów porfiryńowych i ich analogów. Celem pobocznym, ściśle związanym z tematyką porfiryńoidów, było przedstawienie potencjału spektrometrii mas w badaniu procesów utleniania przebiegających w niektórych rozpuszczalnikach i obserwowanych podczas pomiarów MS dla mniej trwałych związków z tej grupy. W ramach swojej pracy przeprowadziłem również, dla wybranych układów, analizę ścieżek fragmentacji obserwowanych w komorze zderzeń spektrometru mas. Ponieważ praca porusza wiele zagadnień, w tym miejscu przedstawiam krótką ich charakterystykę:

- Przedstawione zostało zachowanie porfiryńoidów w różnych metodach jonizacji spektrometrii mas. Zaakcentowany został wpływ rozpuszczalnika na wygląd widma w technikach pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym. W obszarze jonu molekularnego w trybie jonów dodatnich obserwowane były często równocześnie sygnał kationorodnika M^{+} i jonu protonowanego $[M+H]^+$. Podobne zjawisko występowało w trybie jonów ujemnych, gdzie równocześnie pojawia się sygnał anionorodnika M^{-} i jonu $[M-H]^{-}$, jednak nie jest ono tak powszechne, jak w trybie jonów dodatnich. Głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za proporcję sygnałów $[M+H]^+/M^{+}$ są zasadowość i potencjał jonizacji. Odpowiednio wysoka zasadowość oraz niski potencjał jonizacji badanych związków umożliwia obserwowanie pary tych jonów jednocześnie. Generalnie ich proporcje zmieniały się w zależności od rozpuszczalnika. Dla rozpuszczalników protonowych w trybie jonów dodatnich dominował jon protonowany, a w aprotonowych kationorodnik. Występowały wyjątki od tej reguły: na przykład w jonizacji APCI z użyciem octanu etylu lub w jonizacji APPI (bez dopanta) z użyciem heksanu obserwowany był dość silny sygnał jonu protonowanego. Jednocześnie dla niektórych porfiryńoidów (głównie dla koroli) obserwowana była duża kwasowość uwidaczniająca się w postaci intensywnych jonów $[M-H]^{-}$, powstających z dużą łatwością w trybie jonów ujemnych. Oprócz tego, sporadycznie obserwowana była sytuacja, gdzie w widmie obecny był jednocześnie jon $[M-H]^{-}$ i M^{-} . Obecność tego drugiego jonu świadczy o wysokim powinowactwie elektronowym niektórych przebadanych związków. Powinowactwo to było na tyle wysokie, że proces generowania anionorodnika, przy względnie niskiej kwasowości związku, był procesem dominującym podczas jonizacji próbki. Prawie wcale nie

obserwowano w widmach MS sygnałów sodowanych dla porfirynoidów. Spotykane były jedynie w jonizacji ESI dla związków posiadających atomy tlenu w cząsteczce.

- Porównana została czułość metod jonizacji pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym dla szeregu porfirynoidów o różnej budowie cząsteczek, posiadających i nie posiadających kationy metali z bloku d układu okresowego w swojej strukturze, zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych. Wykazano, że metoda ESI dla wolnych zasad koroli i porfiryn oraz pochodnych witaminy B₁₂ oferowała lepszą czułość, często wyraźnie przewyższając inne metody jonizacji. Trochę gorzej metoda ESI radziła sobie w przypadku kompleksów porfiryn i koroli z metalami grupy d układu okresowego. Dla tej specyficznej grupy związków najlepszą czułość oferowała metoda APPI. Jonizacja APCI nie dominowała w prawie żadnym zestawieniu, ale często plasowała się jako druga pod względem czułości ustępując jonizacji ESI lub APPI. Technika ta wydaje się być rozsądnym wyborem jeżeli analizujemy złożoną mieszaninę związków o różnej polarności. Otrzymane wyniki sugerują, że przy planowaniu analiz koroli i ich kompleksów z metalami bloku d układu okresowego należy rozważyć możliwość analizy tych układów w trybie jonów ujemnych, bo możemy uzyskać lepszą czułość niż w jonach dodatnich.

- Dokonane zostało oszacowanie granic wykrywalności metod jonizacji dla poszczególnych przebadanych związków. W dużej liczbie przypadków uzyskane LOD zawierało się poniżej 0,1 ng wprowadzonej próbki.

- Omówione zostało znaczenie metody desorpcji polem w analizie porfirynoidów. Technikę FD trzeba uznać za niezwykle istotną w badaniu porfirynoidów, mimo mankamentów związanych z trudnościami podczas wykonywaniem pomiarów. Doświadczony operator jest w stanie wykonać widmo FD niemal dla każdego związku z grupy porfirynoidów, często w warunkach kiedy inne metody jonizacji zawodzą. Z przeprowadzonych badań wynika, że można uzyskać dobre widmo dla bardzo małych ilości związku (rzędu pikograma) nałożonych na emiter.

- Omówione zostały ścieżki fragmentacji jonów obserwowanych w widmach MS/MS dla układów chlorynowych. Zaprezentowanych zostało wiele interesujących reakcji fragmentacji obserwowanych w trybie jonów dodatnich oraz w trybie jonów ujemnych. Zaproponowano strukturę dla wielu tworzących się jonów w oparciu o wynik eksperymentów. Między innymi opisana została reakcja utraty cząsteczki wody z układów chlorynowych zawierających pierścień izoksazolinowy.

- Bardzo szeroko opisane zostało zagadnienie trwałości koroli w roztworze acetonitrylu. Przedstawione w tej pracy analizy, z wykorzystaniem metody HPLC-MS/MS, miały istotne znaczenie przy gromadzeniu informacji strukturalnych na temat produktów utlenienia koroli. We współpracy z Zespołem prof. Daniela T. Gryko wydzielono trzy główne produkty utlenienia dla jednego ze związków. Dwa z tych związków okazały się być izomerami geometrycznymi. Bazując na wykonanych widmach NMR oraz obliczeniach widm NMR metodą DFT zaproponowano struktury tych tworzących się izomerów. Według nas dyskutowane izomery różniły się konfiguracją na jednym z wiązań podwójnych. Wykonane przeze mnie obliczenia widm NMR były dodatkowym potwierdzeniem struktur proponowanych przez nas izomerów E/Z. Ponadto bazując na fragmentacjach produktów utlenienia określono jaki wpływ mają podstawniki w pozycji *mezo* cząsteczki korolu na trwałość tych układów. W przypadku dwóch podstawników nie obserwowane było rozszczepienie makrocykla w bezpośrednim ich otoczeniu. Pierwszym był podstawnik mezytylowy, ze względu na zawadę przestrzenną uniemożliwiająca podejście tlenu. Drugim był podstawnik perfluorofenyłowy. Korole nie posiadające wymienionych podstawników w cząsteczce, narażone były na atak tlenu w pozycji *mezo*.

Otrzymane wyniki wnoszą wiele nowych istotnych informacji na temat metodologii postępowania z porfirynoidami podczas analiz wykonywanych z udziałem spektrometrii mas. Wyniki pokazane w rozdziale dotyczącym porównania czułości metod jonizacji umożliwiają nam dobór odpowiedniej metody jonizacji, pod kątem analizy określonej grupy porfirynoidów. Wiedza zamieszczona w rozdziale dotyczącym ścieżek reakcji fragmentacji chloryn może w przyszłości okazać się przydatna przy identyfikacji i potwierdzaniu struktur tego typu układów z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas. Wyniki dotyczące utleniania koroli pozwoliły nam lepiej zrozumieć szereg procesów biegnących w roztworach zawierających korole i dostarczyły informacji, które pomogą chemikom syntetykom w projektowaniu takich układów, opartych o szkielet korolu, które będą odznaczały się większą trwałością w roztworach.

5. Część eksperymentalna

Uwagi ogólne

Eksperymenty w ramach niniejszej pracy zostały wykonane z wykorzystaniem następujących spektrometrów:

- spektrometr 4000-QTRAP firmy Applied Biosystems (obecnie AB SCIEX) wyposażony w trzy wymienne źródła jonów: ESI, APCI i APPI. 4000-QTRAP jest spektrometrem typu potrójny kwadrupol z modyfikacją polegającą na tym, że zamiast trzeciego kwadrupola posiada liniową pułapkę jonową. W związku z tym umożliwia nie tylko rejestrowanie widm fragmentacyjnych MS/MS, ale również MS³. Spektrometr ten doskonale spisuje się w sprzężeniu z wysokosprawną chromatografią cieczową, umożliwiając analizę skomplikowanych mieszanin. Za jego pomocą wykonanych zostało większość eksperymentów do niniejszej pracy (porównanie czułości technik jonizacji pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym, analizy MS/MS oraz HPLC-MS).
- spektrometr Mariner (Perseptive Biosystem, obecnie AB SCIEX) wyposażony w źródło jonów elektrosprej i analizator czasu przelotu. Za jego pomocą wykonane zostały pomiary MS wysokiej rozdzielczości.
- spektrometr GCT Premier wyprodukowany przez firmę Waters. Umożliwia wykonywanie widm czterema metodami jonizacji: EI (jonizacja elektronowa), CI (jonizacja chemiczna), FD (desorpcja polem) i w połączeniu z chromatografem gazowym FI (jonizacja polem). Aparat wyposażony jest w analizator czasu przelotu, dzięki czemu umożliwia pomiary wysokiej rozdzielczości. W ramach wykonywania niniejszej pracy spektrometr ten był używany do pomiarów widm FD.

Wszystkie związki przebadane w niniejszej pracy zostały przekazane do badań przez Zespoły prof. Daniela Gryko i prof. nadzw. Doroty Gryko z Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie oraz przez Zespół prof. Stanisława Ostrowskiego z Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach. Użyto rozpuszczalników o czystości HPLC (dostępnych komercyjnie) bez dodatkowego ich oczyszczenia.

Jako gaz rozpylający i osłonowy wykorzystywany był azot pochodzący z generatora azotu firmy Peak Scientific. Roztwory analizowanych substancji podawane były do spektrometru przy pomocy pompki strzykawkowej Harvard 11 plus lub nastrożone poprzez zestaw HPLC LC-20 firmy Shimadzu.

Porównanie czułości technik pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym

Zestaw roztworów o różnych stężeniach dla każdego związku był wprowadzany do źródła jonów spektrometr 4000-QTRAP poprzez zestaw HPLC. Nastrzyki (10 µl każdy) zawierały się zwykle w zakresie 1 pg – 10 ng związku analizowanego. Wszystkie pomiary dla każdego ze związków wykonywane były tego samego dnia. Przepływ rozpuszczalnika (metanol) wynosił 200 µl/min. Przepływ dopanta (toluen) w metodzie APPI wynosił 30 µl/min. Spektrometr mas był ustawiony w trybie MRM, na wcześniej zoptymalizowane parametry pomiaru. Zwykle dobranych miałem kilka par MRM, a w wynikach uwzględniałem sygnał najsilniejszy. Tabela 8 zawiera pary MRM i szereg parametrów spektrometru zoptymalizowanych dla każdego związku i metody jonizacji.

Tabela 8

Nr	para MRM, CE(eV), CXP(V) jony dodatnie	para MRM, CE(eV), CXP(V) jony ujemne	parametry dla ESI	parametry dla APCI	parametry dla APPI z dopantem	parametry dla APPI bez dopanta
1	601/499, 59, 13 602/500, 59, 13	600/497, 80, -12	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 20 psi DP 150 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 30 psi DP 150 V	CUR 20 psi IS 1.4 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 150 V	CUR 20 psi IS 1.4 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 150 V
2	732/712, 50, 22 731/711, 60, 20	730/690, 70, -20	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 20 psi DP 150 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 30 psi DP 150 V	CUR 20 psi IS 1.4 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 150 V	CUR 20 psi IS 1.4 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 150 V
3	796/781, 55, 25 797/782, 55, 25	795/765, 58, -25	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 20 psi DP 150 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 30 psi DP 150 V	CUR 20 psi IS 1.4 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 150 V	CUR 20 psi IS 1.4 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 150 V
4	523/337, 65, 20	521/475, 45, -11 522/449, 45, -11	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 25 psi DP 90 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 300 °C GS1 30 psi DP 90 V	CUR 20 psi IS 1.1 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 90 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 90 V
5	585/511, 40, 14	583/537, 45, -14	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 25 psi DP 120 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 300 °C GS1 30 psi DP 90 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 90 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 90 V
6	700.3/657.8, 37, 17 1355.5/912.5, 100, 25 1377.5/930.5, 105, 25	1326.6/339, 105, -20 1353.6/1326.6, 55, -35	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 250 °C GS1 40 psi GS2 20 psi DP 100 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 40 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 100 V

7	1062.5/962.4, 85, 28 1036.5/948.4, 80, 28	1035.4/1003.4, 30, -30	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 300 °C GS1 40 psi GS2 20 psi DP 100 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 40 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.0 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 90 V
8	1126.5/891.4, 90, 25 1104.4/982.4, 70, 35 1077.4/891.4, 85, 25	1102.5/1016.4, 35, -20	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 20 psi DP 100 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 45 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.1 kV TEM 300 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.1 kV TEM 300 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 100 V
9	789.4/530.2, 45, 15 811.6/467.3, 50, 12	78.4/602.3, 45, -15	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 20 psi DP 100 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 40 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 2 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 2 psi DP 100 V
10	872.2/816.2, 40, 25 850.2/822.2, 20, 30	849.2/793.1, 35, -20	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 35 psi DP 80 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 50 psi DP 60 V	CUR 20 psi IS 1.1 kV TEM 300 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 60 V	CUR 20 psi IS 1.1 kV TEM 300 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 60 V
11	850.3/533.2, 50, 15 851.3/823.3, 28, 30 873.3/817.3, 40, 30	885.3/722.2, 35, -25	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 35 psi DP 100 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 40 psi DP 80 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 80 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 80 V
12	851.3/836.3, 80, 30	850.3/835.3, 60, -30	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 35 psi DP 100 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 50 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.5 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.5 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 100 V
13	912.3/897.3, 75, 30 913.3/898.3, 70, 30	947.3/915.3, 45, -30 912.3/897.3, 60, -30 912.3/881.3, 95, -30	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 350 °C GS1 30 psi GS2 30 psi DP 60 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 45 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 120 V
14	907.3/892.3, 70, 30 906.3/891.3, 75, 30	906.3/891.3, 60, -30 906.3/875.3, 90, -25	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 350 °C GS1 30 psi GS2 30 psi DP 60 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 35 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.6 kV TEM 300 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.6 kV TEM 300 °C GS1 40 psi GS2 2 psi DP 120 V
15	912.3/897.3, 75, 30 911.3/896.3, 75, 30	911.3/896.3, 60, -30 911.3/880.3, 90, -30	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 30 psi DP 40 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 50 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 100 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 350 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 100 V
16	817/797, 50, 25 816/801, 60, 25	815/800, 60, -25	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 400 °C GS1 40 psi GS2 30 psi DP 60 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 400 °C GS1 40 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 400 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.2 kV TEM 400 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 120 V
17	921/901, 50, 30 921/798, 70, 20 920/798, 70, 23	920/905, 60, -30	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 300 °C GS1 30 psi GS2 30 psi DP 120 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 350 °C GS1 30 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.4 kV TEM 300 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.4 kV TEM 300 °C GS1 35 psi GS2 2 psi DP 120 V

18	882/849, 60, 30 881/848, 70, 25	881/866, 65, -25	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 400 °C GS1 50 psi GS2 35 psi DP 150 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 400 °C GS1 30 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 120 V
19	876/830, 70, 20 877/846, 60, 30	876/861, 60, -30	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 30 psi DP 120 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 400 °C GS1 35 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 120 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 350 °C GS1 45 psi GS2 2 psi DP 120 V
20	975/882, 35, 30 882/852, 70, 25 882/685, 85, 20	899/884, 65, -30 913/898, 65, -30	CUR 20 psi IS 5.5 kV TEM 350 °C GS1 40 psi GS2 40 psi DP 100 V	CUR 20 psi NC 5 µA TEM 370 °C GS1 40 psi DP 150 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 400 °C GS1 309 psi GS2 2 psi DP 150 V	CUR 20 psi IS 1.3 kV TEM 400 °C GS1 309 psi GS2 2 psi DP 150 V

Legenda: **IS** – napięcie przyłożone do kapilary w źródle ESI oraz tzw. *Ion Transfer Voltage* w przypadku APPI, **CUR** i **GS1** – to odpowiednio ciśnienia gazu kurtynowego i rozpylającego, **GS2** – w przypadku ESI jest to ciśnienie gazu suszącego, w przypadku APPI jest to ciśnienie gazu pomocniczego lampy UV, **DP** – potencjał deklasteringu, **CE** – energia kolizji, **CXP** - Cell Exit Potential – potencjał wyjścia z komory zderzeń, **TEM** – temperatura gazu suszącego w ESI lub temperatura dyszy rozpylającej w jonizacji APCI i APPI.

Opis oprogramowania użytego w niniejszej pracy

Widma masowe przedstawione w tej pracy i uzyskane za pomocą spektrometru 4000-QTRAP zostały opracowane w programie Analyst (wersja 1.4.2), który służył również do zbierania danych eksperymentalnych. Widma FD zamieszczone w niniejszej pracy zostały przygotowane za pomocą oprogramowania MassLynx (wersja 4.0).

Obliczenia kwantowochemiczne zostały wykonane za pomocą pakietu Gaussian (Gaussian 09 Revision A.02, 64-bitowa wersja dla systemu Linux).⁷⁰ Struktury związków do obliczeń zostały przygotowane w programie GaussView (wersja 5.0.8). Obliczenia geometrii i powinowactwa do protonu opisane na stronie 63 zostały wykonane z zastosowaniem funkcjonału M05-2X i bazy funkcyjnej 6-31g(d). Do obliczenia przesunięć chemicznych ¹H NMR opisanych w rozdziale 3.4.3 został zastosowany funkcjonału B3PW91 i baza funkcyjna 6-311+g(d,p), a geometrie cząsteczek obliczone zostały z zastosowaniem tego samego funkcjonału lecz z bazą 6-31g(d).

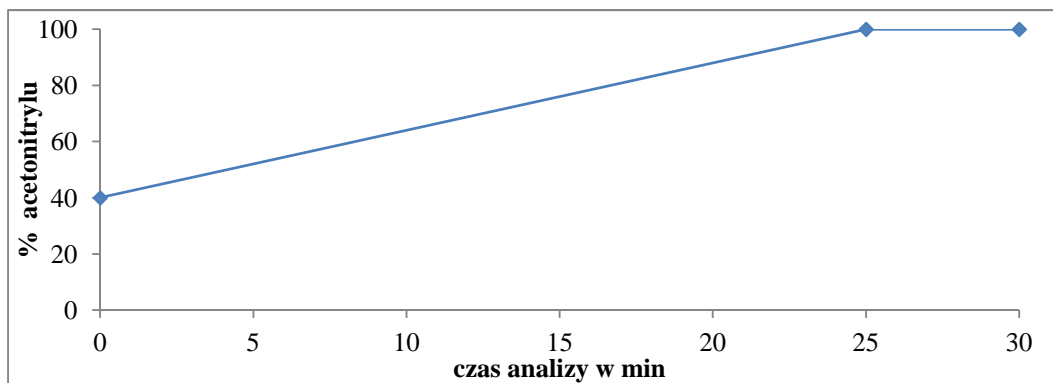
Pomiary HPLC-MS

Do przeprowadzenia eksperymentów wykorzystany został zestaw HPLC LC-20 Prominence firmy Shimadzu (pompy LC-20AD, autosampler SIL-20AD, detektor UV SPD-20A). Wszystkie analizy zostały wykonane w układzie faz odwróconych:

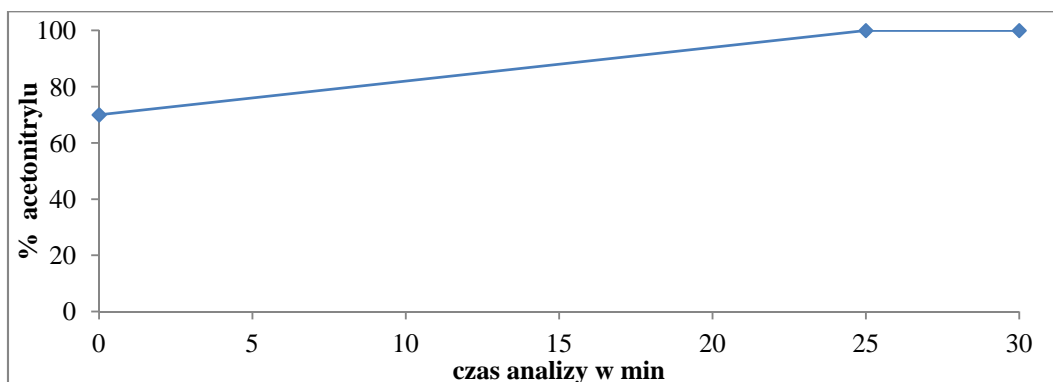
kolumna HPLC: Gemini C6-Phenyl (firmy Phenomenex), długość kolumny 150 mm, średnica kolumny 4,6mm, średnica ziaren 5 µm, średnica porów 110Å.

faza ruchoma: acetonitryl/woda

Rysunek 79 i 80 przedstawiają jak zmieniał się udział acetonitrylu względem wody w poszczególnych analizach HPLC zaprezentowanych w tej pracy.



Rysunek 79. Wykres przedstawiający zmiany procentowego udziału acetonitrylu względem wody w fazie ruchomej wykorzystane w analizie HPLC produktów rozkładu związku nr 1.



Rysunek 80. Wykres przedstawiający zmiany procentowego udziału acetonitrylu względem wody w fazie ruchomej wykorzystane w analizie HPLC produktów rozkładu związku nr 34.

przepływ fazy ruchomej: 2 ml/min

parametry spektrometru mas: **CUR** 20 psi , **IS** 5.5 kV, **TEM** 450 °C, **GS1** 70 psi, **GS2** 50 psi, **DP** 100 V.

6. Literatura cytowana

1. (a) Aida, T.; Inoue, S., Metalloporphyrins as Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. In *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: San Diego, CA, 2000; Vol. 6, pp 133–156; (b) Malinski, T., Porphyrin-Based Electrochemical Sensors. In *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: San Diego, CA, 2000; Vol. 6, pp 231-256.
2. Martin, J.; Quirke, E., Mass Spectrometry of Porphyrins and Metalloporphyrins. In *The porphyrin handbook*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: San Diego, Calif. ; London, 2000; Vol. 7, pp 371-422.
3. (a) Boylan, D. B.; Calvin, M., Volatile silicon complexes of etioporphyrin I. *J Am Chem Soc* **1967**, *89* (21), 5472-5473; (b) Chapman, J. R.; Elder, G. H., The mass spectra of the trimethylsilyl ethers of some hydroxylated di- and tetracarboxylic porphyrins. *Organic Mass Spectrometry* **1972**, *6* (9), 991-1001.
4. Beckey, H. D., Field ionization mass spectrometry. *Research/Development* **1969**, *20*(11), 26.
5. (a) Knör, G., Synthesis and Solution Spectral Properties of Antimony(III) Phthalocyanine and Dihydroxoantimony(V) Phthalocyanine Complexes. *Inorg Chem* **1996**, *35* (26), 7916-7918; (b) Bryant, G. C.; Cook, M. J.; Ryan, T. G.; Thorne, A. J., Synthesis and characterisation of some mesogenic mononuclear and multinuclear phthalocyanines. *Tetrahedron* **1996**, *52* (3), 809-824; (c) Schaferling, M.; Bauerle, P., Porphyrin-functionalized oligo- and polythiophenes. *J Mater Chem* **2004**, *14* (7), 1132-1141; (d) Schenning, A. P. H. J.; Benneker, F. B. G.; Geurts, H. P. M.; Liu, X. Y.; Nolte, R. J. M., Porphyrin Wheels. *J Am Chem Soc* **1996**, *118* (36), 8549-8552; (e) Tasior, M.; Gryko, D. T.; Pielacińska, D. J.; Zanelli, A.; Flamigni, L., Trans-A2B-corroles Bearing a Coumarin Moiety - From Synthesis to Photophysics. *Chemistry – An Asian Journal* **2010**, *5* (1), 130-140.
6. (a) DeFilippi, L. J.; Hultquist, D. E., High-pressure liquid chromatography and field desorption mass spectrometry of heme a, Heme a dimethyl ester and acetyl heme a dimethyl ester. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1977**, *498* (2), 395-402; (b) Schulten, H. R., Off-line combination of liquid chromatography and field desorption mass spectrometry: principles and environmental, medical and pharmaceutical applications. *Journal of Chromatography A* **1982**, *251* (2), 105-128.
7. (a) Foekema, J.; Schenning, A. P. H. J.; Vriezema, D. M.; Benneker, F. B. G.; Nørgaard, K.; Kroon, J. K. M.; Bjørnholm, T.; Feiters, M. C.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M., Synthesis of multiporphyrin arrays and study of their self-assembly behaviour at the air–water interface. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2001**, *14* (7), 501-512; (b) Spence, J. D.; Lash, T. D., Porphyrins with Exocyclic Rings. 14.1 Synthesis of Tetraacenaphthoporphyrins, a New Family of Highly Conjugated Porphyrins with Record-Breaking Long-Wavelength Electronic Absorptions. *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65* (5), 1530-1539.
8. (a) Barber, M.; Bordoli, R. S.; Elliott, G. J.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N., Fast atom bombardment mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1982**, *54* (4), 645A-657A; (b) Bazzaz, M. B.; Bradley, C. V.; Brereton, R. G., 4-vinyl-4-desethyl chlorophyll a: characterisation of a new naturally occurring chlorophyll using fast atom bombardment, field desorption and "in beam" electron impact mass spectroscopy. *Tetrahedron Lett* **1982**, *23* (11), 1211-1214; (c) Brereton, R. G.; Bazzaz, M. B.; Santikarn, S.; Williams, D. H., Positive and negative ion fast atom bombardment mass spectrometric studies on chlorophylls : Structure of 4-vinyl-4-desethyl chlorophyll B. *Tetrahedron Lett* **1983**, *24* (51), 5775-5778.
9. Lee, M.-R.; Liou, S.-T.; Cheng, R.-J., Study of adduct ions of meso-phenyl-substituted tetrabenzoporphyrins by fast-atom bombardment mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8* (1), 62-67.
10. Schäfer, M.; Budzikiewicz, H., A fast atom bombardment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry study of doubly charged porphyrins. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36* (9), 1062-1068.

11. Domingues, M. R. M.; Graça Santana-Marques, M.; Ferrer-Correia, A. J., Formation of metalloporphyrins and metallochlorins in the source of a mass spectrometer under fast atom bombardment. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, *165-166*, 551-559.
12. Domingues, M. R. M.; Santana-Marques, M. G. O.; Domingues, P.; Faustino, M. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Ferrer-Correia, A. J., Liquid secondary ion mass spectrometry of porphyrin dimers: reduction reactions and structural characterisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14* (21), 2025-2029.
13. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry* **1985**, *57* (14), 2935-2939.
14. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T., Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2* (8), 151-153.
15. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, *60* (20), 2299-2301.
16. Markides, K.; Gräslund, A., Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) applied to biological macromolecules. *Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002*.
17. Angotti, M.; Maunit, B.; Muller, J.-F.; Bezdetnaya, L.; Guillemin, F., Matrix-assisted laser desorption/ionization coupled to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a method to characterize temoporpin photoproducts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13* (7), 597-603.
18. Suzuki, T.; Midonoya, H.; Shioi, Y., Analysis of chlorophylls and their derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2009**, *390* (1), 57-62.
19. (a) Ayorinde, F. O.; Hambright, P.; Porter, T. N.; Keith, Q. L., Use of meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13* (24), 2474-2479; (b) Ayorinde, F. O.; Garvin, K.; Saeed, K., Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14* (7), 608-615.
20. Stulz, E.; Mak, C. C.; Sanders, J. K. M., Matrix assisted laser desorption/ionisation (MALDI)-TOF mass spectrometry of supramolecular metalloporphyrin assemblies: a survey. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2001**, (5), 604-613.
21. Aiello, I.; Di Donna, L.; Ghedini, M.; La Deda, M.; Napoli, A.; Sindona, G., Charge-Transfer Matrixes as a Tool To Desorb Intact Labile Molecules by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. Use of 2,7-Dimethoxynaphthalene in the Ionization of Polymetallic Porphyrins. *Analytical Chemistry* **2004**, *76* (20), 5985-5989.
22. Frauenkron, M.; Berkessel, A.; Gross, J. H., Analysis of ruthenium carbonyl-porphyrin complexes: a comparison of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight, fast-atom bombardment and field desorption mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *3* (6), 427-438.
23. (a) Kebarle, P.; Tang, L., From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1993**, *65* (22), 972A-986A; (b) Fenn, J. B., Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, *4* (7), 524-535; (c) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray ionization—principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, *9* (1), 37-70; (d) Gaskell, S. J., Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32* (7), 677-688; (e) Kebarle, P., A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35* (7), 804-817.

24. Nemykin, V. N.; Galloni, P.; Floris, B.; Barrett, C. D.; Hadt, R. G.; Subbotin, R. I.; Marrani, A. G.; Zanoni, R.; Loim, N. M., Metal-free and transition-metal tetraferrocenylporphyrins part 1: synthesis, characterization, electronic structure, and conformational flexibility of neutral compounds. *Dalton T* **2008**, (32), 4233-4246.
25. Akhigbe, J.; Ryppa, C.; Zeller, M.; Brückner, C., Oxazolochlorins. 2. Intramolecular Cannizzaro Reaction of meso-Tetraphenylsecochlorin Bisaldehyde†. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74* (14), 4927-4933.
26. Van Berkel, G. J.; McLuckey, S. A.; Glish, G. L., Electrospray ionization of porphyrins using a quadrupole ion trap for mass analysis. *Analytical Chemistry* **1991**, *63* (11), 1098-1109.
27. Van Berkel, G. J.; Quinones, M. A.; Quirke, J. M. E., Geoporphyrin analysis using electrospray ionization-mass spectrometry. *Energy & Fuels* **1993**, *7* (3), 411-419.
28. Ramos, C. I. V.; Barros, C. M.; Fernandes, A. M.; Santana-Marques, M. G.; Correia, A. J. F.; Tomé, J. P. C.; Carrilho, M. d. C. T.; Faustino, M. A. F.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S., Interactions of cationic porphyrins with double-stranded oligodeoxynucleotides: a study by electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40* (11), 1439-1447.
29. Barata, J. F. B.; Barros, C. M.; Santana-Marques, M. G. O.; Neves, M. G. P. M. S.; Faustino, M. A. F.; Tomé, A. C.; Ferrer Correia, A. J.; Cavaleiro, J. A. S., Study by liquid secondary ion and electrospray mass spectrometry of synthesized and formed-in-source metallocorroles. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42* (2), 225-232.
30. Ramos, C.; Marques, M.; Correia, A.; Serra, V.; Tomé, J.; Tomé, A.; Neves, M.; Cavaleiro, J., Reduction of cationic free-base meso-tris-*N*-methylpyridinium-4-yl porphyrins in positive mode electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (4), 762-768.
31. Rosell-Melé, A.; Carter, J.; Maxwell, J., High-performance liquid chromatography-mass spectrometry of porphyrins by using an atmospheric pressure interface. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, *7* (9), 965-971.
32. Verzeznassi, L.; Riffé-Chalard, C.; Kloeti, W.; Gülaçar, F. O., Analysis of tetrapyrrolic pigments and derivatives in sediments by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1999**, *364* (3), 249-253.
33. Owen, B. C.; Gao, J.; Borton, D. J.; Amundson, L. M.; Archibold, E. F.; Tan, X.; Azyat, K.; Tykwinski, R.; Gray, M.; Kenttämaa, H. I., Carbon disulfide reagent allows the characterization of nonpolar analytes by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, *25* (14), 1924-1928.
34. Leasure, C. S.; Fleischer, M. E.; Anderson, G. K.; Eiceman, G. A., Photoionization in air with ion mobility spectrometry using a hydrogen discharge lamp. *Analytical Chemistry* **1986**, *58* (11), 2142-2147.
35. Raffaelli, A.; Saba, A., Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22* (5), 318-331.
36. Richeter, S.; Jeandon, C.; Sauber, C.; Gisselbrecht, J.-P.; Ruppert, R.; Callot, H. J., Preparation, mass spectrometry and electrochemical studies of metal connected porphyrin oligomers. *J Porphyr Phthalocya* **2002**, *6* (6), 423-430.
37. (a) Qian, K.; Mennito, A. S.; Edwards, K. E.; Ferrughelli, D. T., Observation of vanadyl porphyrins and sulfur-containing vanadyl porphyrins in a petroleum asphaltene by atmospheric pressure photonization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22* (14), 2153-2160; (b) McKenna, A. M.; Purcell, J. M.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G., Identification of Vanadyl Porphyrins in a Heavy Crude Oil and Raw Asphaltene by Atmospheric Pressure Photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Mass Spectrometry. *Energy & Fuels* **2009**, *23* (4), 2122-2128; (c) Qian, K.; Edwards, K. E.; Mennito, A. S.; Walters, C. C.; Kushnerick, J. D., Enrichment, Resolution, and Identification of Nickel Porphyrins in Petroleum Asphaltene by Cyclograph Separation and Atmospheric Pressure

Photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2009**, *82* (1), 413-419.

38. Jackson, A. H.; Kenner, G. W.; Smith, K. M.; Aplin, R. T.; Budzikiewicz, H.; Djerassi, C., Pyrroles and related compounds—VIII : Mass spectrometry in structural and stereochemical problems—LXXXVI the mass spectra of porphyrins. *Tetrahedron* **1965**, *21* (10), 2913-2924.

39. Rosario, M.; Domingues, M.; Nemirovskiy, O.; Graço, M.; Marques, O.; Neves, M.; Cavaleiro, J.; Ferrer-Correia, A.; Gross, M., High- and low-energy collisionally activated decompositions of octaethylporphyrin and its metal complexes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9* (8), 767-774.

40. Jones, R. V. H.; Kenner, G. W.; Smith, K. M., Pyrroles and related compounds. Part XXXI. Porphyrin ketones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1974**, 531-534.

41. Domingues, M.; O. S.-Marques, M.; Vale, C.; Neves, M.; Cavaleiro, J.; Ferrer-Correia, A.; Nemirovskiy, O.; Gross, M., Do charge-remote fragmentations occur under matrix-assisted laser desorption ionization post-source decompositions and matrix-assisted laser desorption ionization collisionally activated decompositions? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10* (3), 217-223.

42. Domingues, M. R. M.; Domingues, P.; Reis, A.; Ferrer Correia, A. J.; Tomé, J. P. C.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S., Structural characterization of glycoporphyrins by electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39* (2), 158-167.

43. Izquierdo, R. A.; Barros, C. M.; Santana-Marques, M. G.; Correia, A. J. F.; Silva, A. M. G.; Tomé, A. C.; Silva, A.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S., Cycloreversion and other gas-phase reactions of neutral and cationic pyrrolidine-fused chlorins and isobacteriochlorins under ion bombardment and electrospray. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18* (22), 2601-2611.

44. Lau, K. S. F.; Sadilek, M.; Khalil, G. E.; Gouterman, M.; Brückner, C., Electrospray Ionization (ESI) Tandem Mass Spectrometric Analysis of meso-Tetrakis(Heptafluoropropyl)Porphyrin. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16* (12), 1915-1920.

45. Lau, K. S. F.; Sadilek, M.; Gouterman, M.; Khalil, G. E.; Brückner, C., Observation of Phenyl-Fused Porphyrinoids During the ESI Mass Spectrometric Analysis of meso-Pentafluorophenyl-Substituted Porphyrin and Corrole. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17* (9), 1306-1314.

46. Domingues, M. R. M.; Graça O. S.-Marques, M.; Domingues, P.; Graça Neves, M.; Cavaleiro, J. A. S.; Ferrer-Correia, A. J.; Nemirovskiy, O. V.; Gross, M. L., Differentiation of positional isomers of nitro meso-tetraphenylporphyrins by tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, *12* (4), 381-384.

47. Domingues, M.; Marques, M.; Alonso, C.; Neves, M.; Cavaleiro, J.; Ferrer-Correia, A.; Nemirovskiy, O.; Gross, M., Unexpected fragmentation of β -substituted meso-tetraphenylporphyrins induced by high-energy collisional activation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13* (12), 1427-1431.

48. Silva, E. M. P.; Domingues, M. R. M.; Barros, C.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Santana-Marques, M. G.; Cavaleiro, J. A. S.; Ferrer-Correia, A. J., Characterization of dinitroporphyrin zinc complexes by electrospray ionization tandem mass spectrometry. Unusual fragmentations of β -(1,3-dinitroalkyl) porphyrins. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40* (1), 117-122.

49. Izquierdo, R.; Barros, C.; Santana-Marques, M.; Ferrer-Correia, A.; Silva, E.; Giuntini, F.; Faustino, M.; Tomé, J.; Tomé, A.; Silva, A.; Neves, G.; Cavaleiro, J.; Peixoto, A.; Pereira, M.; Pais, A., Characterization of isomeric cationic porphyrins with β -pyrrolic substituents by electrospray mass spectrometry: The singular behavior of a potential virus photoinactivator. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (2), 218-225.

50. Laycock, J. D.; Ferguson, J. A.; Yost, R. A.; Quirke, J. M. E.; Rohrer, A.; Ocampo, R.; Callot, H., Electron ionization mass spectrometric analysis of 5-nitro octaethylporphyrin: evidence for scission of the porphyrin macrocycle. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32* (9), 978-983.

51. Shaw, G. J.; Eglinton, G.; Quirke, J. M. E., Structural analysis of tetrapyrroles by hydrogen chemical ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1981**, *53* (13), 2014-2020.
52. Grese, R.; Cerny, R.; Gross, M.; Senge, M., Determination of structure and properties of modified chlorophylls by using fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1990**, *1* (1), 72-84.
53. Verzeqnessi, L.; Riffé-Chalard, C.; Gülaçar, F. O., Rapid identification of Mg-chelated chlorins by on-line high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14* (7), 590-594.
54. (a) Dillow, G. W.; Gregor, I. K.; Guilhaus, M., Adduct ion formation by metal complexes under methane negative chemical ionization conditions. *Organic Mass Spectrometry* **1986**, *21* (3), 151-156; (b) Forest, E.; Ulrich, J.; Marchon, J. C.; Virelizier, H., Comparison of EI, FAB and DCI (electron capture mode) mass spectra of hydrolytically labile dihalogenotitanium (IV) porphyrins. *Organic Mass Spectrometry* **1987**, *22* (1), 45-48; (c) Dillow, G. W.; Gregor, I. K., Gas-phase reactions of electrons, halide ions and radicals with (meso-tetraphenylporphinato)metal(II) complexes under negative ion chemical ionization conditions. *Organic Mass Spectrometry* **1988**, *23* (11), 777-782.
55. Rubino, F. M.; Banfi, S.; Pozzi, G.; Quici, S., A study on the solution and gas-phase chemistry of Mn(III) and Fe(III) Tetraarylporphyrin Complexes by fast-atom bombardment mass spectrometry. : 1: Generation of molecular signals. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, *4* (3), 249-254.
56. Mahammed, A.; Weaver, J. J.; Gray, H. B.; Abdelas, M.; Gross, Z., How acidic are corroles and why? *Tetrahedron Lett* **2003**, *44* (10), 2077-2079.
57. Denekamp, C.; Rabkin, E., Radical induced fragmentation of amino acid esters using triphenylcorrole(CuIII) complexes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (4), 791-801.
58. Lim, C.-K.; Danton, M.; Clothier, B.; Smith, A. G., Dihydroxy-, Hydroxyspirolactone-, and Dihydroxyspirolactone-urochlorins Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Liver of Mice. *Chemical Research in Toxicology* **2006**, *19* (12), 1660-1667.
59. Danton, M.; Lim, C. K., High-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry of hydroxylated uroporphyrin and urochlorin derivatives formed by photochemical oxidation of uroporphyrinogen I. *Biomedical Chromatography* **2007**, *21* (5), 534-545.
60. Lim, C. K., *High-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry of Porphyrins, Chlorophylls and Bilins*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, 2010; Vol. 2.
61. Świder, P.; Nowak-Król, A.; Voloshchuk, R.; Lewtak, J. P.; Gryko, D. T.; Danikiewicz, W., Mass spectrometry studies on meso-substituted corroles and their photochemical decomposition products. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45* (12), 1443-1451.
62. Ghislain, T.; Faure, P.; Michels, R., Detection and Monitoring of PAH and Oxy-PAHs by High Resolution Mass Spectrometry: Comparison of ESI, APCI and APPI Source Detection. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2012**, *23* (3), 530-536.
63. Cai, S.-S.; Hanold, K. A.; Syage, J. A., Comparison of Atmospheric Pressure Photoionization and Atmospheric Pressure Chemical Ionization for Normal-Phase LC/MS Chiral Analysis of Pharmaceuticals. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (6), 2491-2498.
64. Bogusz, M. J.; Hassan, H.; Al-Enazi, E.; Ibrahim, Z.; Al-Tufail, M., Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *41* (2), 554-564.
65. Wyrębek, P.; Mikus, A.; Ostrowski, S., 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Porphyrin Systems with Functionalized Alkyl Nitrile Oxides — Synthesis of Isoxazoline-Fused Chlorins. *Heterocycles* **2012**, *85* (1), w druku.
66. (a) Barańskii, A.; Mikaya, A. I., Synthesis and properties of azoles and their derivatives. 25. Electron-impact mass spectra of nitro- and nitroalkyl-substituted 3-aryl- δ -isoxazolines. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1990**, *26* (7), 819-822; (b) Giorgi, G.; Ponticelli, F.; Czira, G.; Vékey, K., Characterization and differentiation of heterocyclic isomers. tandem mass spectrometry and molecular orbital calculations on 3-methylisoxazolo- and 2-

methyloxazolopyridines. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1995**, *6* (10), 962-971; (c) Giorgi, G.; Salvini, L.; Ponticelli, F., Gas phase ion chemistry of the heterocyclic isomers 3-methyl-1,2-benzisoxazole and 2-methyl-1,3-benzoxazole. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15* (7), 1005-1013.

67. Guarna, A.; Moneti, G., Reactivity in the gas phase. Behaviour of isoxazoles under negative ion chemical ionization conditions. *Organic Mass Spectrometry* **1989**, *24* (7), 490-496.

68. Zhang, J. Y.; Xu, F.; Breau, A. P., Collision-induced dissociation of valdecoxib metabolites: a novel rearrangement involving an isoxazole ring. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39* (3), 295-302.

69. (a) Barata, J. F. B.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Faustino, M. A. F.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S., How light affects 5,10,15-tris(pentafluorophenyl)corrole. *Tetrahedron Lett* **2010**, *51* (12), 1537-1540; (b) Mandoj, F.; Nardis, S.; Pomarico, G.; Stefanelli, M.; Schiaffino, L.; Ercolani, G.; Prodi, L.; Genovese, D.; Zaccheroni, N.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M.; Xiao, X.; Shen, J.; Kadish, K. M.; Paolesse, R., 6-Azahemiporphycene: A New Member of the Porphyrinoid Family. *Inorg Chem* **2009**, *48* (21), 10346-10357; (c) Nardis, S.; Pomarico, G.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G. H.; Paolesse, R., One-step synthesis of isocorroles. *Tetrahedron Lett* **2007**, *48* (49), 8643-8646; (d) Nardis, S.; Mandoj, F.; Paolesse, R.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M.; Prodi, L.; Montalti, M.; Battistini, G., Synthesis and Functionalization of Germanium Triphenylcorrolate: The First Example of a Partially Brominated Corrole. *Eur J Inorg Chem* **2007**, *2007* (16), 2345-2352; (e) Koszarna, B.; Gryko, D. T., Efficient Synthesis of meso-Substituted Corroles in a H₂O-MeOH Mixture. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71* (10), 3707-3717; (f) Gros, C. P.; Barbe, J.-M.; Espinosa, E.; Guilard, R., Room-Temperature Autoconversion of Free-Base Corrole into Free-Base Porphyrin. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (34), 5642-5645; (g) Geier, G. R.; Chick, J. F. B.; Callinan, J. B.; Reid, C. G.; Auguscinski, W. P., A Survey of Acid Catalysis and Oxidation Conditions in the Two-Step, One-Flask Synthesis of Meso-Substituted Corroles via Dipyrrromethanedicarbinols and Pyrrole. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69* (12), 4159-4169; (h) Paolesse, R.; Sagone, F.; Macagnano, A.; Boschi, T.; Prodi, L.; Montalti, M.; Zaccheroni, N.; Bolletta, F.; Smith, K. M., Photophysical behaviour of corrole and its symmetrical and unsymmetrical dyads. *J Porphyr Phthalocya* **1999**, *3* (5), 364-370; (i) Tardieux, C.; Gros, C. P.; Guilard, R., On corrole chemistry. An isomerization study and oxidative cleavage of the corrole macroring to a biliverdin structure. *J Heterocyclic Chem* **1998**, *35* (4), 965-970.

70. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J., Gaussian 09, Revision B.01. Wallingford CT, 2009.

B. Org. 337/12



