

PRACA
DOKTORSKA

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

Anna Troć

**Badanie struktury wybranych grup związków organicznych
i ich kompleksów z wykorzystaniem techniki pomiaru
mobilności jonów sprzężonej ze spektrometrią mas**

Promotor: prof. dr hab. Witold Danikiewicz

Promotor pomocniczy: dr Magdalena Zimnicka

A-21-6
K-C-123
K-C-124



Warszawa 2015

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.381/16





B. Org. 381/16

*Składam serdeczne podziękowania mojemu
Promotorowi, Prof. Witoldowi Danikiewiczowi,
za zaproponowanie tematu badań, życzliwość
oraz pomoc w trakcie realizacji niniejszej pracy*

*Wyrazy podziękowania kieruję również do
dr Magdaleny Zimnickiej za stałą opiekę,
cierpliwość oraz wiele cennych uwag
i pomysłów w trakcie wykonywania tej pracy*

*Dziękuję Prof. B. Furmanowi,
dr M. Ceborskiej oraz dr. M. Kwitowi za
udostępnienie związków do badań oraz
za możliwość współpracy*

*Koleżankom i Kolegom z
Zespołu Spektrometrii Mas
Instytutu Chemii Organicznej PAN
dziękuję za pomoc i życzliwą atmosferę w
trakcie wykonywania niniejszej pracy*

Spis treści

| | |
|---|-------------|
| Wykaz skrótów..... | 3 - |
| I . Wstęp i cel pracy..... | 7 - |
| II. Część literaturowa..... | 11 - |
| II.1 Technika ruchliwości jonów sprzężona ze spektrometrią mas (IM-MS) | 12 - |
| II.1.1 Rys historyczny | 12 - |
| II.1.2 Podstawy teoretyczne spektrometrii ruchliwości jonów | 13 - |
| II.1.3 Technika „wędrującej fali” (T-Wave IMS)..... | 15 - |
| a) Zdolność rozdzielcza | 19 - |
| b) Rozdzielczość | 20 - |
| c) Selektywność rozdziału | 20 - |
| d) Eksperymentalny przekrój czynny | 20 - |
| II.2 Wykorzystanie spektrometrii ruchliwości jonów do analizy związków organicznych oraz kompleksów niekowalencyjnych..... | 23 - |
| II.2.2 Rozdział związków organicznych za pomocą IM-MS..... | 23 - |
| a) Wpływ temperatury oraz ciśnienia na rozdział związków organicznych | 24 - |
| b) Wpływ gazu buforowego na rozdział związków organicznych | 27 - |
| c) Wpływ kationu metalu na rozdział związków organicznych | 32 - |
| d) Wpływ odczynnika chiralnego na rozdział związków organicznych | 35 - |
| II.2.2 Analiza strukturalna związków organicznych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów i obliczeń teoretycznych | 37 - |
| II.2.3 Analiza kompleksów niekowalencyjnych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów .. | 41 - |
| III. Badania własne..... | 45 - |
| III.1 Rozdział izomerycznych katechin za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów (IM-MS)..... | 47 - |
| III.1.1 Rozdział diastereoizomerów katechin: (+)-katechina/(-)-epikatechina | 48 - |
| III.1.2 Rozdział enancjomerów katechin: (+)-katechina/(-)-katechina oraz (+)-epikatechina/(-)-epikatechina | 66 - |
| III.1.3 Podsumowanie..... | 67 - |
| III.2 Rozdział izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów | 71 - |
| III.2.1 Początkowe badania nad rozdziałem izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych | 72 - |
| III.2.2 Wpływ gazu obojętnego na rozdział izomerów konstytucyjnych flawonoidów | 77 - |
| III.2.3 Wpływ kationu metalu na rozdział izomerów konstytucyjnych flawonoidów | 79 - |
| III.2.4 Wyznaczanie eksperymentalnych i teoretycznych przekrojów czynnych jonów typu $[M+X]^+$, gdzie $X = H^+, Li^+, Na^+ i K^+$ oraz jonów $[M-H]^-$ | 80 - |
| III.2.5 Podsumowanie..... | 86 - |
| III.3 Analiza diastereoizomerycznych β-laktamów za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi | 89 - |
| III.3.1 Wstępne pomiary ruchliwości jonów związków β -laktamowych..... | 90 - |
| III.3.2 Wpływ amplitudy (WH) oraz prędkości fali (WV) na rozdział diastereoizomerycznych związków β -laktamowych | 92 - |
| III.3.3 Wpływ temperatury źródła jonów (ST) oraz temperatury desolvatacji jonów (DT) na rozdział diastereoizomerycznych związków β -laktamowych | 94 - |
| III.3.4 Wpływ gazu buforowego na rozdział diastereoizomerycznych związków β -laktamowych | 95 - |
| III.3.5 Wpływ kationu metalu na rozdział diastereoizomerycznych związków β -laktamowych .. | 97 - |

| | | |
|--------------|--|----------------|
| III.3.6 | Wyznaczanie eksperymentalnych i teoretycznych przekrojów czynnych związków β -laktamowych | - 99 - |
| III.3.7 | Podsumowanie | - 103 - |
| III.4 | Analiza kompleksów niekowalencyjnych kwasu foliowego z α-, β- i γ-cyklodekstryną (CD)..... | - 105 - |
| III.4.1 | Wstępne pomiary za pomocą IM-MS | - 106 - |
| III.4.2 | Wyznaczanie teoretycznych przekrojów czynnych jonów odniesienia | - 107 - |
| III.4.3 | Wyznaczanie eksperymentalnych i teoretycznych przekrojów czynnych niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z cyklodekstrynami | - 110 - |
| III.4.4 | Podsumowanie | - 114 - |
| III.5 | Analiza strukturalna kaliksalenów oraz ich dimerycznych asocjatów za pomocą IM-MS..... | - 115 - |
| III.5.1 | Wstępne pomiary za pomocą IM-MS | - 116 - |
| III.5.2 | Wyznaczanie eksperymentalnych oraz teoretycznych przekrojów czynnych kaliksalenów..... | - 117 - |
| III.5.3 | Wyznaczanie eksperymentalnych oraz teoretycznych przekrojów czynnych jonów pochodzących od dimerycznych asocjatów kaliksalenów..... | - 119 - |
| III.5.4 | Podsumowanie | - 121 - |
| IV. | Wnioski | - 123 - |
| V. | Część eksperymentalna | - 127 - |
| V.1 | Uwagi ogólne | - 127 - |
| V.2 | Dane eksperymentalne z pomiarów IM-MS..... | - 129 - |
| V.2.1 | Rozdział izomerycznych katechin za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów | - 129 - |
| V.2.2 | Rozdział izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów | - 132 - |
| V.2.3 | Analiza diastereoizomerycznych β -laktamów za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi | - 135 - |
| V.2.4 | Analiza kompleksów niekowalencyjnych kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstryną (CD) | - 140 - |
| V.2.5 | Analiza strukturalna kaliksalenów oraz ich dimerycznych asocjatów za pomocą IM-MS..... | - 142 - |
| V.3 | Część obliczeniowa | - 144 - |
| V.3.1 | Rozdział izomerycznych katechin za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów | - 144 - |
| V.3.2 | Rozdział izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów | - 145 - |
| V.3.3 | Analiza diastereoizomerycznych β -laktamów za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi | - 147 - |
| V.3.4 | Analiza kompleksów niekowalencyjnych kwasu foliowego z α -, β -, γ -cyklodekstryną (CD) | - 149 - |
| V.3.4 | Analiza strukturalna kaliksalenów oraz ich dimerycznych asocjatów za pomocą IM-MS..... | - 150 - |
| VI. | Literatura..... | - 151 - |

Wykaz skrótów

MS (*Mass Spectrometry*) – spektrometria mas

IM (*Ion Mobility*) – ruchliwość/mobilność jonów

IM-MS (*Ion Mobility Mass Spectrometry*) – metoda ruchliwości jonów sprzężona ze spektrometrią mas/spektrometria ruchliwości jonów

T-WAVE IMS (*Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry*) – technika “wędrującej fali”

DT-IMS (*Drift Time Ion Mobility Spectrometer*) – liniowy spektrometr do badania ruchliwości jonów

FAIMS (*Field-Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometer*) – spektrometr mas wyposażony w komorę do badania ruchliwości jonów w asymetrycznym polu elektrycznym

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa

NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) – magnetyczny rezonans jądrowy

GC (*Gas Chromatography*) – chromatografia gazowa

CD (*Circular Dichroism*) – dichroizm kołowy

IR (*Infrared Spectroscopy*) – spektroskopia w podczerwieni

TG (*Thermogravimetry*) – termogravimetria

Tof (*Time of flight*) – detektor czasu przelotu

t_d (*drift time*) – czas dryfu

t_{dcorr} (*corrected drift time*) – czas dryfu uwzględniający czas, jaki jony spędzają poza komorą ruchliwości T-Wave zanim dotrą do detektora

R_p (*resolving power*) – zdolność rozdzielcza

R_{p-p} (*resolution*) – rozdzielczość

α (*separation selectivity*) – selektywność rozdziału

Ω (*collision cross section*) – przekrój czynny jonu

Ω_{corr} (*corrected collision cross section*) – skorygowany przekrój czynny jonu, w którym uwzględniony jest wpływ masy zredukowanej i ładunku na przekrój czynny jonu

Ω_{eksp} (*experimental collision cross section*) – eksperymentalny przekrój czynny wyznaczony na podstawie krzywej kalibracji

Ω_t (*theoretical collision cross section*) – teoretyczny przekrój czynny

Ω_{ref} (*collision cross section*) –przekrój czynny związku referencyjnego

PA (*Projection Approximation*) – jedna z metod stosowana do wyznaczania przekroju czynnego jonu

EHSS (*Exact Hard Sphere Scattering*) – jedna z metod stosowana do wyznaczania przekroju czynnego jonu

TJ (*Trajectory Method*) – jedna z metod stosowana do wyznaczania przekroju czynnego jonu

LOD (*Limit of Detection*) – granica wykrywalności

WV (*Wave Velocity*) – prędkość fali

WH (*Wave Height*) – amplituda fali

DtBP (*di-tert-butylpyridine*) – di-tert-butylopirydyna

DMMP (*dimethyl-methylphosphonate*) – metylofosfonian dimetylu

TNT (*trinitrotoluene*) – trinitrotoluen

2,4-DNT (*2,4-dinitrotoluene*) – 2,4-dinitrotoluen

CD (*cyclodextrin*) – cyklodekstryna

KF (*folic acid*) – kwas foliowy

FR (*Folate Receptor*) – receptor kwasu foliowego

Me – metyl

t-Bu – tert-butyl

MDA (*methylenedianiline*) – metylenodianilina

MD (*Molecular Dynamic*) – dynamika molekularna

MM (*Molecular Mechanic*) – mechanika molekularna

DFT (*Density Functional Theory*) – teoria funkcjonału gęstości

v_d – prędkością jonu

ω – szerokość piksu

K – współczynniki ruchliwości jonów lub stała ruchliwości jonów

K_0 – zredukowana ruchliwość jonów

E – natężenie pola elektrycznego

z – ładunek jonu

e – ładunek elektronu (1.6022×10^{-19} C)

N – gęstość gazu buforowego

k – stała Boltzmana

T – temperatura gazu

T_{eff} – temperatura efektywna jonu

μ – masa zredukowana

M – masa gazu buforowego

m – masa analizowanego jonu

m/z – stosunek masy do ładunku

p – ciśnienie

G – entalpia swobodna reakcji

H – entalpia reakcji

S – entropia reakcji

I. Wstęp i cel pracy

Spektrometria mas (MS) stanowi potężne narzędzie analityczne do pomiaru masy cząsteczkowej oraz do analizy związków organicznych ze względu na bardzo wysoką czułość, która umożliwia wykonanie pomiarów przy bardzo niskich stężeniach. Informacje uzyskane za pomocą spektrometrii mas są niezwykle użyteczne w wielu obszarach nauki, ze szczególnym uwzględnieniem chemii organicznej i bioorganicznej, do identyfikacji związków chemicznych. Jednakże dopiero w połączeniu z techniką ruchliwości/mobilności jonów (IM, *Ion Mobility*) wykazuje ona duży potencjał w dostarczaniu szczegółowych informacji na temat budowy przestrzennej jonów oraz wzbogaca możliwości analityczne tej metody. W dalszej części rozprawy będę posługiwać się dla zwięzłości terminem „spektrometria ruchliwości jonów” mając na myśli technikę ruchliwości jonów sprzężoną ze spektrometrią mas (IM-MS, *Ion Mobility Mass Spectrometry*).

Spektrometria ruchliwości jonów (IM-MS) jest metodą, w której jony są identyfikowane i rozdzielane na podstawie ich przekroju czynnego (Ω) pod wpływem pola elektrycznego i w obecności gazu buforowego (obojętnego). Przekrój czynny jonu jest wielkością opisującą kształt i rozmiar jonu. Znajomość budowy przestrzennej jonu jest niezwykle przydatna m. in. w projektowaniu i syntezie nowych leków oraz dostarcza informacji o stereochemii, topologii i oddziaływaniach pomiędzy różnymi układami. Potrzeba poznania dodatkowych aspektów związanych z trójwymiarową strukturą jonów sprawia, że spektrometria ruchliwości jonów jest ciągle rozwijana i doskonalona.

Unikalne informacje, jakie dostarcza technika ruchliwości jonów sprzężona ze spektrometrią mas (IM-MS) sprawiają, że jest ona eksploatowana w wielu dziedzinach nauki. Wykorzystywana jest do identyfikacji oraz analizy strukturalnej szerokiej gamy związków organicznych takich jak związki lipidowe, sacharydy, peptydy, metabolity.¹ Spektrometria ruchliwości jonów postrzegana jest również jako narzędzie uzupełniające w kontekście biologii strukturalnej, oferując jeszcze większy wgląd we właściwości dużych kompleksów białkowych, dostarczając informacji o stechiometrii, topologii i przekroju czynnym zespołów białkowych.² IM-MS stosowana jest do analizy kompleksów białek terapeutycznych³ oraz do analizy izomerycznych zespołów białkowych.⁴

Możliwości, jakie niesie ze sobą spektrometria ruchliwości jonów sprawiają, że stosunkowo szybko rozwinęły się jej zastosowania do badania dużych układów, przede wszystkim peptydów i białek. Znacznie wolniej postępowały prace dotyczące zastosowań IM-

MS do analizy małych cząsteczek. Nieliczne doniesienia literaturowe dotyczące tego zagadnienia sprawiły, że głównym obszarem mojego zainteresowania stały się małe izomeryczne związki organiczne.

Celem niniejszej pracy jest pogłębienie wiedzy w zakresie wykorzystania techniki ruchliwości jonów sprzężonej ze spektrometrią mas (IM-MS) do rozdziału oraz badania struktur wybranych grup związków organicznych. Jako modelowe związki do badań wybrałam istotne z punktu znaczenia i wykorzystania w medycynie flawonoidy oraz związki zawierające układ β -laktamowy. Związki te zostały wybrane również ze względu na powszechnie występującej w nich izomerię, zarówno konstytucyjną, jak i stereoizomerię. W ramach przedstawionej pracy technika IM-MS będzie również wykorzystana do scharakteryzowania budowy niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego (KF) z cyklodekstrynami (α -CD, β -CD i γ -CD), jak również do analizy strukturalnej kaliksalenów i ich dimerycznych asocjatów.

Badania nad zastosowaniem spektrometrii ruchliwości jonów do analizy niepodstawionych związków flawonoidowych oraz związków β -laktamowych nie były dotąd prowadzone, wobec czego ta część pracy ma charakter eksploracyjny.

W prezentowanej pracy doktorskiej został zbadany również wpływ różnych czynników m.in.: temperatura źródła jonów, temperatura desolvatacji, rodzaj gazu buforowego, obecność kationów metali a także dodatkowych specyficznych oddziaływań niekowalencyjnych na poprawę rozdziału badanych związków izomerycznych.

Technika ruchliwości jonów sprzężona ze spektrometrią mas jest metodą powiązaną z obliczeniami teoretycznymi. Dopiero porównanie teoretycznych przekrojów czynnych, obliczonych na podstawie modelowania geometrii cząsteczek, z eksperymentalnymi, pozwala na uzyskanie informacji na temat rzeczywistej trójwymiarowej struktury cząsteczki. Dlatego też pomiary IM-MS są dodatkowo wspierane przez metody obliczeniowe chemii kwantowej, wykorzystujące metody oparte na teorii funkcjonałów gęstości DFT, metodę dynamiki molekularnej (MD), jak również dokowanie molekularne. W związku z tym postanowiłam do pracy dołączyć płytę CD zawierającą najniższe energetyczne struktury przedstawione w niniejszej pracy, które zostały zapisane w układzie kartezjańskim.

Przedstawiona praca wpisuje się w obecnie szeroko dyskutowaną w literaturze problematykę dotyczącą zakresu wykorzystania techniki ruchliwości jonów sprzężonej ze spektrometrią mas do opisu trójwymiarowej struktury cząsteczek.

Badania nad zastosowaniem IM-MS do rozdziału i analizy związków flawonoidowych oraz β -laktamów były finansowe przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Preludium (Grant UMO-2012/07/N/ST4/01843).

Obliczenia kwantowo-chemiczne prowadzone były w ramach grantu obliczeniowego G50-4 w Interdyscyplinarnym Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego Uniwersytetu Warszawskiego.

Badania dotyczące analizy strukturalnej niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstryną oraz część dotycząca analizy strukturalnej kaliksalenów oraz ich dimerycznych asocjantów są wynikiem współpracy odpowiednio z dr Magdaleną Ceborską z Instytutu Chemii Fizycznej PAN oraz z dr. Marcinem Kwitem z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu/Instytutu Chemii Organicznej PAN.

Materiał przedstawiony w niniejszej dysertacji został częściowo opublikowany w następujących pracach:

1. M. Zimnicka, A. Troć, M. Ceborska, M. Jakóbczak, M. Koliński, W. Danikiewicz, „Structural Elucidation of Specific Noncovalent Association of Folic Acid with Native Cyclodextrins Using an Ion Mobility Mass Spectrometry and Theoretical Approach”, *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 4249-4255.
2. A. Troć, M. Zimnicka, W. Danikiewicz, „Separation of Catechin Epimers by Complexation Using Ion Mobility Mass Spectrometry”, *J. Mass Spectrom.*, **2015**, *50*, 542-548.
3. M. Petryk, A. Troć, B. Gierczyk, W. Danikiewicz, M. Kwit, „Dynamic Formation of Noncovalent Calixsalen Aggregates”, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 10318 – 10321.

II. Część literaturowa

Tematem mojej pracy jest badanie struktur wybranych grup związków organicznych i ich kompleksów z wykorzystaniem techniki pomiaru ruchliwości jonów sprzężonej ze spektrometrią mas. Spośród różnych metod analitycznych umożliwiających ustalenie budowy cząsteczek związków organicznych szczególne miejsce od dawna zajmuje spektrometria mas (MS). Jednakże dopiero w połączeniu z techniką ruchliwości/mobilności jonów (IM) stanowi ona potężne narzędzie analityczne, wykorzystywane do ustalania trójwymiarowej struktury jonu na podstawie przekroju czynnego (Ω). W spektrometrii ruchliwości jonów przekrój czynny jonu jest wielkością, na podstawie której jony są identyfikowane i rozdzielane zgodnie z ich prędkością w komorze wypełnionej gazem buforowym pod wpływem pola elektrycznego. Rozważania na temat budowy przestrzennej jonu oparte są na porównaniu eksperymentalnych przekrojów czynnych z przekrojami teoretycznymi, obliczonymi na podstawie modelowania geometrii cząsteczek. Połączenie techniki ruchliwości jonów z tandemową spektrometrią mas (IM-MS) dodatkowo wzbogaca możliwości analityczne tej metody. W dalszej części rozprawy będę posługiwać się często dla zwięzłości terminem „spektrometria ruchliwości jonów”, mając na myśli metodę sprzężoną IM-MS.

W związku z ciągle rosnącą potrzebą rozdziału, identyfikacji oraz analizy strukturalnej nowych związków organicznych oraz bardziej skomplikowanych układów opartych na oddziaływaniach niekowalencyjnych, które nie mogą być dokładnie scharakteryzowane za pomocą tradycyjnych metod tj. magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) czy krystalografii rentgenowskiej, IM-MS jest nieustannie rozwijana i staje się niekiedy jedyną metodą do uzyskania szczegółowych informacji na temat trójwymiarowych struktur badanych jonów. Pomimo wielu prac opublikowanych na świecie na temat ruchliwości jonów w polu elektrycznym, nadal tematyka ta nie jest wystarczająco dobrze poznana. W części teoretycznej mojej pracy postanowiłam omówić następujące zagadnienia z nią związane:

- ✓ podstawy teoretyczne techniki ruchliwości jonów sprzężonej ze spektrometrią mas (IM-MS);
- ✓ wykorzystanie IM-MS do analizy związków organicznych oraz kompleksów niekowalencyjnych.

W pierwszej części tego rozdziału przedstawiłam rozwój i główne założenia spektrometrii ruchliwości jonów, a także omówiłam dokładnie technikę „wędrującej fali”, którą wykorzystałam w przedłożonej pracy do rozdziału i analizy strukturalnej związków flawonoidowych, β -laktamów jak również niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstrynami oraz dimerycznych asocjatów kaliksalenów. Technikę tę scharakteryzowałam na tle dwóch innych technik stosowanych do badania ruchliwości jonów. W części tej omówiłam również podstawowe parametry opisujące możliwości spektrometrów IM do analizy i rozdziału jonów oraz zaprezentowałam metodę eksperymentalnego wyznaczania przekrojów czynnych.

W rozdziale drugim przedstawiłam zagadnienia dotyczące zastosowania spektrometrii ruchliwości jonów w analizie związków organicznych. W części tej omówiłam również wpływ temperatury, ciśnienia, gazu buforowego oraz różnych specyficznych oddziaływań na efektywność rozdziału jonów.

II.1 Technika ruchliwości jonów sprzężona ze spektrometrią mas (IM-MS)

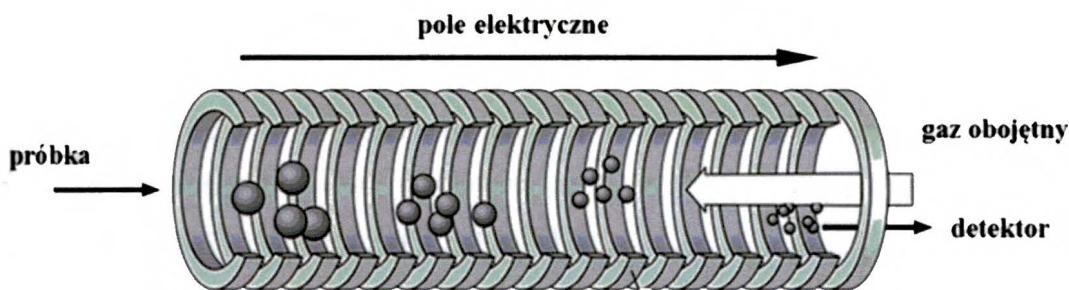
II.1.1 Rys historyczny

Rzeczony spektrometrii ruchliwości jonów jako metody analitycznej sięga końca XIX wieku, kiedy to badano procesy tworzenia i zachowania się jonów w gazach pod ciśnieniem atmosferycznym, jak również wpływ różnych czynników na ich ruchliwość, takich jak temperatura i ciśnienie.⁵ Na początku XX wieku (1903) Paul Langevin na podstawie rozważań teoretycznych oraz doświadczeń stwierdził, że jony mogą być rozdzielane zgodnie z ich prędkością w wyniku oddziaływań z gazem obojętnym w polu elektrycznym.⁶ Teoria Langevina stanowi więc podstawową zasadę współczesnej techniki ruchliwości jonów. Kolejnym ważnym momentem w rozwoju tej techniki było odkrycie przez Jamesa Lovelocka prostego detektora jonizacyjnego (detektor wychwyty elektronów, ECD), który był w stanie wykryć śladowe ilości zanieczyszczeń uwalnianych do atmosfery z przemysłu, wykorzystując zjawisko przewodzenia prądu elektrycznego.⁷ W kolejnych latach wzrost zainteresowania badaczy zagadnieniem ruchliwości jonów w fazie gazowej doprowadził do rozwoju nowych urządzeń umożliwiających rozdział i badanie reakcji jonów i małych cząsteczek w fazie gazowej. W latach 60. XX wieku Earl W. McDaniel skonstruował najprostsze urządzenie

wyposażone w komorę ruchliwości jonów pracujące w niskim polu elektrycznym.⁸ W drugiej połowie XX wieku spektrometry ruchliwości jonów były z powodzeniem wykorzystywane do wykrywania bojowych środków chemicznych, materiałów wybuchowych oraz narkotyków. Ostatnie 15 lat charakteryzują procesy komercjalizacji metod ruchliwości jonów oraz konstruowania nowych, ulepszonych spektrometrów mas przeznaczonych do badania ruchliwości jonów, oferujących poprawę czułości, selektywności oraz zdolności rozdzielczej. W obecnej chwili ta metoda jest wykorzystywana w bardzo wielu różnych dziedzinach naukowych, stając się komplementarnym lub samodzielnym narzędziem analitycznym do badań związków organicznych.

II.1.2 Podstawy teoretyczne spektrometrii ruchliwości jonów

Spektrometria ruchliwości jonów odnosi się do zjawiska ruchu (dryfu) jonów pod wpływem pola elektrycznego przez komorę wypełnioną gazem obojętnym (buforowym) (Rysunek 1).



Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie procesu ruchliwości jonów.⁹

Pole elektryczne kieruje jony w kierunku detektora, a gaz obojętny przepływa w kierunku przeciwnym do przelotu jonów. Prędkość dryfu jonów jest proporcjonalna do natężenia pola elektrycznego, zgodnie z Równaniem 1:¹⁰

$$v_d = K \cdot E \quad (1)$$

gdzie v_d jest prędkością jonów, K jest współczynnikiem ruchliwości jonów (lub stałą ruchliwości jonów), E jest natężeniem pola elektrycznego.



Współczynnikiem proporcjonalności w powyższym równaniu jest współczynnik ruchliwości jonów (K), zdefiniowany za pomocą równania Mason-Schampa:¹¹

$$K = \frac{3ze}{16N} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu kT}} \frac{1}{\Omega} \text{ [cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}\text{]} \quad (2)$$

gdzie z jest ładunkiem jonu, e oznacza ładunek elektronu (1.6022×10^{-19} C), N jest gęstością gazu buforowego, k oznacza stałą Boltzmana, T oznacza temperaturę gazu, μ oznacza masę zredukowaną ($\mu = \frac{mM}{m+M}$ gdzie M jest masą gazu buforowego, zaś m oznacza masę analizowanego jonu) oraz Ω to przekrój czynny jonu.

Należy również zaznaczyć, że oprócz natężenia pola elektrycznego na prędkość dryfu jonów wpływ mają także temperatura i ciśnienie.¹² Zależność tę opisuje poniższy wzór, w którym K_0 oznacza zredukowaną ruchliwość jonów, odnoszącą się do warunków normalnych (tj. temperatury $T_0 = 273,15$ K oraz ciśnienia $P_0 = 760$ Tor).

$$K_0 = K \frac{P}{P_0} \frac{T_0}{T} \quad (3)$$

Wielkością mierzalną w spektrometrii ruchliwości jonów jest czas, w jakim jon przebywa w komorze ruchliwości jonów o długości L , określane równaniem:

$$t_d = \frac{L}{v_d} \quad (4)$$

Wyznaczając czas dryfu jonu można zatem obliczyć jego przekrój czynny, przekształcając odpowiednio wzory 1 - 4, do następującego równania:

$$\Omega = \frac{3ze}{16N} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu kT}} \frac{t_d E}{L} \frac{760}{P} \frac{T}{273,15} \quad (5)$$

Przekrój czynny jonu zawiera informację o jego trójwymiarowej strukturze. Porównanie przekrojów czynnych wyznaczonych eksperymentalnie z obliczonymi teoretycznie dla modelowych związków pozwala na uzyskanie szczegółowych informacji na temat budowy przestrzennej jonu. Do obliczania przekrojów czynnych stosowane są trzy metody, wykorzystujące różne modele teoretyczne.

Metoda PA (*Projection Approximation*),¹³ zwana również „cieniem struktury jonu”, bazuje na modelu sztywnych kul,¹⁴ w którym jon oraz cząsteczka gazu obojętnego traktowane są jako sztywne kule o określonej średnicy ulegające zderzeniom elastycznym. Przekrój

czynny jonu podawany jest jako średnia wartość ze wszystkich możliwych geometrii utworzonych w wyniku zderzeń pomiędzy jonem a cząsteczkami gazu obojętnego. Algorytm ten jest wykorzystywany do obliczeń przekrojów czynnych jonów małych cząsteczek (≤ 200 Da).

W metodzie EHSS (*Exact Hard Sphere Scattering*),¹⁵ która również bazuje na modelu sztywnych kul, dodatkowo uwzględnione są kąty rozpraszania cząstek gazu buforowego w wyniku zderzenia z jonem. Model ten stosowany jest do obliczania przekrojów czynnych jonów dużych cząsteczek (> 1000 Da).

Ostatnim, najbardziej zaawansowanym algorytmem jest TJ (*Trajectory Method*),¹⁶ w którym jony traktowane są jako zbiory atomów opisywane za pomocą modelu potencjału 12-6-4.¹⁴ Model ten jest wynikiem połączenia modelu granicy polaryzacji¹⁴ oraz sił wzajemnego odpychania i przyciągania. Przekrój czynny obliczany jest przez zsumowanie wszystkich możliwych geometrii utworzonych w wyniku oddziaływań jonu z gazem obojętnym. Metoda ta stosowana jest do obliczania przekrojów czynnych średnich cząsteczek.

II.1.3 Technika „wędrującej fali” (T-Wave IMS)

W zależności od konstrukcji, jak również zastosowanego pola elektrycznego i ciśnienia możemy wyróżnić trzy typy komór ruchliwości jonów, wykorzystywanych w spektrometrach mas dedykowanych badaniom mobilności jonów w fazie gazowej. Tabela 1 przedstawia ogólną charakterystykę poszczególnych układów.

Tabela 1. Porównanie trzech podstawowych urządzeń stosowanych do badania ruchliwości jonów.¹⁷

| | DT-IMS (<i>Drift Time Ion Mobility Spectrometer</i>) | T-Wave IMS (<i>Traveling Wave Ion Mobility Spectrometer</i>) | FAIMS (<i>Field-Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometer</i>) |
|--|--|---|--|
| pole elektryczne | stałe, niskie | zmienne, pośrednie | naprzemiennie asymetryczne, wysokie oraz niskie |
| ciśnienie | atmosferyczne (~1 bar) lub zredukowane | zredukowane (0,025-3 mbar) | atmosferyczne (~1 bar) |
| regulacja temperatury | + | - | + |
| rozdzielczość | wysoka (>100) | niska (~45) | średnia (≤ ~100) |
| czułość | niska | wysoka | średnia |
| możliwość wyznaczenia Ω | + | + | - |
| kalibrant | - | + | - |
| dotatkowe informacje | Możliwość rozdzielenia jonów o bardzo podobnym przekroju ze względu na wysoką rozdzielczość. | Wysoka temperatura jonów (450 – 700 K) może wywołać zniekształcenia konformacyjne jonów lub nawet ich fragmentację. | Działa jak dodatkowy filtr ruchliwości jonów i stosowany jest najczęściej do wstępnego rozdzielenia jonów. |

Każda z powyższych metod posiada zarówno pewne zalety, jak i ograniczenia, które postaram się w sposób zwięzły przedstawić na tle techniki „wędrującej fali” (*Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry*, T-Wave IMS) zaimplementowanej w spektrometrze SYNAPT G2-S HDMS (Waters). Spektrometr ten był wykorzystany do przeprowadzenia badań opisanych w przedłożonej pracy. Spektrometr Synapt G2-S HDMS jest to hybrydowy spektrometr typu QToF (*Quadrupole Time-of-Flight*) o rozbudowanej, trzyczęściowej komorze zderzeń, przedstawionej schematycznie na Rysunku 2, składającej się z 3 głównych obszarów, a mianowicie:

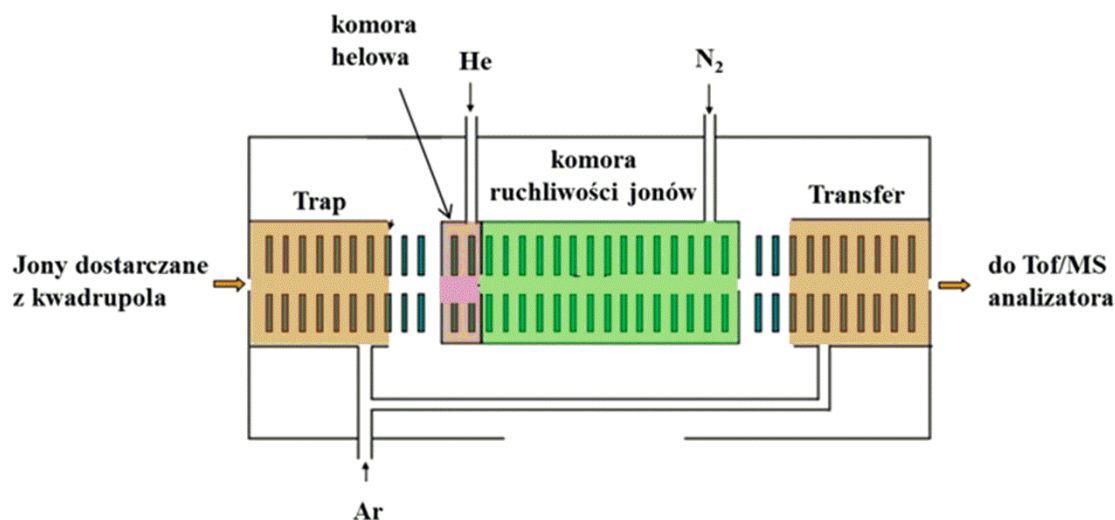
a) pułapki jonów (TRAP T-Wave), która wyłapuje jony i przekazuje je dalej do komory ruchliwości jonów. W komorze tej istnieje również możliwość przeprowadzenia fragmentacji jonów w wyniku zderzenia z gazem obojętnym (argonem),

b) komory ruchliwości jonów (T-Wave IM), która zapewnia powtarzalny rozdział jonów, na podstawie czasów dryfu,

c) komory TRANSFER T-Wave, kierującej jony do analizatora mas. Może ona również służyć jako komora zderzeń w badaniach fragmentacji wybranych jonów. Podobnie jak komora TRAP T-Wave wypełniona jest argonem.

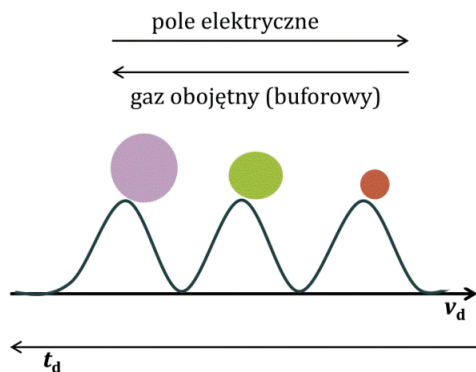
Wartym podkreślenia jest również fakt, że jony, zanim dostaną się do komory T-Wave, przechodzą przez tzw. komorę helową (*helium cell*), wypełnioną obojętnym gazem, helem,

którego zadaniem jest „spowolnienie” jonów wyrzuconych z komory TRAP T-Wave, zanim zostaną one wprowadzone do komory ruchliwości jonów.



Rysunek 2. Schemat trzyczęściowej komory zderzeń zastosowanej w spektrometrze Synapt G2-S HDMS.¹⁸

W spektrometrze wykorzystującym technikę T-Wave IMS jony są rozdzielane zgodnie z ich ruchliwością pod wpływem „wędrującej fali” pola elektrycznego w obecności obojętnego gazu buforowego. Jony „ślizgają” się po powierzchni fal pola elektrycznego, a ich prędkość zależy od przekroju czynnego związanego z geometrią i rozmiarem jonów. W związku z tym jony o większym przekroju czynnym w wyniku częstych zderzeń z gazem buforowym przemieszczają się przez komorę ruchliwości jonów wolniej w porównaniu do jonów o mniejszym przekroju czynnym, które rzadziej napotyka na swojej drodze cząsteczki gazu. Poniżej przedstawiłam schematyczny rysunek ilustrujący rozdział jonów o różnym przekroju czynnym (Ω) na podstawie różnicy w prędkości dryfu (v_d) i czasie dryfu (t_d) w komorze ruchliwości jonów T-Wave.



Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie rozdziału jonów o różnym przekroju czynnym (Ω) na podstawie różnicy w prędkości dryfu (v_d) i czasie dryfu (t_d) w komorze ruchliwości jonów T-Wave.

Urządzenia T-Wave IMS pracują w zmiennym polu elektrycznym w zakresie ciśnienia zredukowanego (0,025-3 mbar) w przeciwieństwie do DT-IMS (stałe, niskie pole elektryczne, ciśnienie atmosferyczne ~1 bar lub zredukowane) oraz FAIMS (naprzemiennie, asymetryczne, wysokie lub niskie pole elektryczne, ciśnienie atmosferyczne ~1 bar).¹⁷ Wszystkie powyższe parametry mają istotny wpływ na energię wewnętrzną jonów. Jej miarą jest tzw. temperatura efektywna jonów, która w T-Wave IMS osiąga wartość nawet do 700 K.¹⁹ Warto tutaj podkreślić, że w wyniku występujących efektów cieplnych jony ulegają dalszym procesom, np. dysocjacji, a także zmianom konformacyjnym, utrudniając tym samym analizę związków organicznych, a szczególnie układów opartych na specyficznych i słabych oddziaływaniach niekowalencyjnych. Odpowiedni dobór parametrów eksperymentalnych ma istotny wpływ na temperaturę jonów, a tym samym na analizę badanych związków organicznych.¹⁹

Parametrami określającymi zdolność różnych spektrometrów ruchliwości jonów do analizy i rozdziału jonów są: zdolność rozdzielcza (R_p), rozdzielczość (R_{p-p}), a także selektywność rozdziału (α), dla których ogólne definicje podałam poniżej. Rozważając te parametry, należy wziąć pod uwagę dwa aspekty: czynniki aparaturowe (temperatura, ciśnienie, natężenie pola elektrycznego, długość komory ruchliwości jonów) oraz charakter badanych jonów. W podrozdziale II.1.3 przedstawiłam krótką dyskusję na temat wpływu tych czynników na zdolność rozdzielczą spektrometru. W momencie gdy rozpatrujemy rozdzielczość oraz selektywność rozdziału, kluczową rolę odgrywa charakter badanych jonów. Ponieważ w spektrometrii ruchliwości jonów przekrój czynny jonu jest parametrem decydującym o rozdziale jonów, to przez zmianę konformacji jonów (a tym samym ich przekrojów czynnych) możemy mieć wpływ na rozdzielczość i selektywność rozdziału. Rozróżnienie strukturalne jonów możemy osiągnąć przez wprowadzenie dodatkowych czynników takich jak: oddziaływania z kationami metali lub/i chiralnymi związkami organicznymi. Oddziaływania te indukują szereg zmian konformacyjnych jonu, a w konsekwencji zmieniają ich przekrój czynny i ruchliwość.

a) Zdolność rozdzielcza

Zdolność rozdzielcza (R_p) określana jest jako stosunek czasu dryfu (t_d) do szerokości piku w połowie wysokości (ω_h), zgodnie z równaniem 6.²⁰

$$R_p = \frac{t_d}{\omega_h} \quad (6)$$

Na zdolność rozdzielczą spektrometrów ruchliwości jonów mają wpływ czynniki aparaturowe takie jak: natężenie pola elektrycznego (E), temperatura (T), długość komory ruchliwości jonów (L) oraz ciśnienie (P).²¹

W najprostszymi urządzeniach do badania ruchliwości jonów pracujących w stałym, niskim polu elektrycznym (DT-IMS) zdolność rozdzielcza wyrażana jest poniższym równaniem:

$$R_{DT} = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{zeEL}{kT \ln 2}} \quad (7)$$

W przypadku spektrometrów wykorzystujących technikę „wędrującej fali” (T-Wave IMS), pracujących w zmiennym polu elektrycznym, sytuacja jest bardziej skomplikowana, gdyż należy uwzględnić dodatkowe parametry wpływające na ruchliwość jonów takie jak: amplituda fali (WH) oraz jej prędkość (WV). Zdolność rozdzielcza w tym przypadku zdefiniowana jest Równaniem 8, zgodnie z którym jest ona zależna od współczynnika ruchliwości jonu (K) oraz stosunku amplitudy fali do jej prędkości. Zgodnie z poniższym wzorem zwiększenie tego stosunku powoduje zwiększenie zdolności rozdzielczej:

$$R_{T-wave} = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{2ze[WH][WL]EK}{[WV]kT \ln 2}} \quad (8)$$

Amplituda fali oraz jej prędkość odpowiedzialne są również za energię wewnętrzną jonów w komorze mobilności T-Wave, a tym samym za labilność konformacyjną badanych jonów. Dyskusję na temat wpływu WH oraz WV na energię wewnętrzną jonów przeprowadziłam w rozdziale II.2.

b) Rozdzielczość

Efektywność rozdziału w IM-MS może być określana zgodnie z Równaniem 9 na podstawie rozdziału dwóch sąsiadujących pików (R_{p-p}), gdzie t_{d1} i t_{d2} oznaczają czasy dryfu dla dwóch sąsiadujących pików, natomiast ω_{b1} i ω_{b2} są szerokościami pików przy podstawie.^{20b}

$$R_{p-p} = \frac{2(t_{d1}+t_{d2})}{\omega_{b1}+\omega_{b2}} \quad (9)$$

c) Selektywność rozdziału

Współczynnik selektywności rozdziału (α) definiowany jest zgodnie z Równaniem 10, gdzie t_{d2} jest czasem dryfu wolniej dryfującego jonu, zaś t_{d1} jest czasem dryfu szybciej dryfującego jonu.²²

$$\alpha = \frac{t_{d2}}{t_{d1}} \quad (10)$$

d) Eksperymentalny przekrój czynny

Przekrój czynny jonu może być obliczony bezpośrednio na podstawie parametrów doświadczalnych z Równania 5, przedstawionego w podrozdziale II.1.2, jedynie dla najprostszej, liniowej komory ruchliwości jonów, w której mamy do czynienia z jednorodnym i słabym polem elektrycznym. W przypadku komory ruchliwości T-Wave, która pracuje w wyższym i zmiennym polu elektrycznym, efekty z nim związane są jeszcze mało poznane i uniemożliwiają bezpośrednie wyznaczenie przekroju czynnego jonu na podstawie jego czasu dryfu. Dlatego też w układach tego typu przekroje czynne jonów wyznacza się pośrednio, w oparciu o związki o znanych przekrojach czynnych, na podstawie krzywej kalibracji. Związki wykorzystywane do kalibracji komory ruchliwości T-Wave powinny wykazywać podobieństwo strukturalne do badanych cząsteczek, jak również powinny mieć taki sam ładunek. Związki o szerokim zakresie możliwych, stabilnych konformacji, które zależą w dużym stopniu od warunków doświadczalnych, nie są odpowiednimi związkami kalibracyjnymi komory ruchliwości T-Wave. Dlatego też powszechnie stosowany w IM-MS kalibrant tj. polialanina,²³ ze względu na szeroki zakres

przekrojów czynnych i możliwość zastosowania zarówno w trybie jonów dodatnich oraz ujemnych, nie jest jednak najlepszym związkiem odniesienia w tym przypadku. Zastosowanie odpowiednich związków kalibracyjnych zmniejsza różnicę między przekrojami czynnymi wyznaczonymi doświadczalnie, a obliczonymi teoretycznie dla modelowych związków, umożliwiając tym samym precyzyjniejsze określenie trójwymiarowej struktury cząsteczek. Na podstawie przekrojów czynnych związków odniesienia oraz ich czasów dryfu wyznacza się krzywe kalibracyjne jako zależność $\Omega_{\text{corr}} = f(t_{\text{dcorr}})$. Ω_{corr} jest skorygowanym przekrojem czynnym, w którym uwzględniony jest wpływ masy zredukowanej i ładunku na przekrój czynny jonu, zaś t_{dcorr} jest czasem dryfu uwzględniającym czas, jaki jony spędzają poza komorą ruchliwości T-Wave, a więc zanim dotrą do detektora. Otrzymane krzywe kalibracyjne przypisuje się do dwóch typów równań: liniowego ($y = ax + b$) oraz potęgowego ($y = ax^b$) oraz wyznacza się parametry równań a i b. Na podstawie parametrów a i b oblicza się przekroje czynne analizowanych związków, zgodnie z Równaniem 11 (liniowy) lub Równaniem 12 (potęgowy).

$$\Omega = ((\mathbf{a} \cdot \mathbf{t}_{\text{dcorr}}) + \mathbf{b}) \cdot \mathbf{z} \cdot \left(\frac{1}{m_{\text{gaz}}} + \frac{1}{m_{\text{jon}}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (11)$$

$$\Omega = \mathbf{t}_{\text{dcorr}}^{\mathbf{b}} \cdot \mathbf{a} \cdot \mathbf{z} \cdot \left(\frac{1}{m_{\text{gaz}}} + \frac{1}{m_{\text{jon}}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

II.2 Wykorzystanie spektrometrii ruchliwości jonów do analizy związków organicznych oraz kompleksów niekowalencyjnych

Spektrometria ruchliwości jonów (IM-MS) od początku swojego powstania służyła do analizy jonów związków organicznych w gazach buforowych pod wpływem pola elektrycznego. Jony te wykazywały zmienną ruchliwość w zależności od przekroju czynnego, który powiązany jest z ich strukturą trójwymiarową. Cecha ta spowodowała, że metoda IM-MS przyczyniła się do identyfikacji, rozdziału oraz określania struktur przestrzennych badanych układów. Możliwości, jakie niesie ze sobą ta technika, zostały wykorzystane z powodzeniem do badania szerokiej gamy związków organicznych, m.in. związków wykazujących aktywność biologiczną,²⁴ metabolitów,²⁵ pestycydów,^{1a, 26} peptydów,^{1b, 23b, 27} sacharydów^{1c, 1d, 28} i związków lipidowych.^{1e, 29} Spektrometria ruchliwości jonów jest również potężnym narzędziem analitycznym w analizie białek.³⁰ W 2013 roku na łamach czasopisma *Mass Spectrometry Reviews* ukazał się artykuł przeglądowy autorstwa Crisa Laphorna, Franka Pullena, oraz Babur Z. Chowdhry'ego opisujący wybrane, najważniejsze doniesienia literaturowe na temat zastosowania spektrometrii IM-MS do analizy małych cząsteczek, które ukazały się do roku 2013.³¹

W tym rozdziale omówię wybrane przykłady opisujące możliwości, jakie niesie ze sobą spektrometria ruchliwości jonów, z uwzględnieniem wpływu różnych czynników na identyfikację i rozdział różnych związków chemicznych. Dodatkowo, uzupełnię powyższy przegląd o przykłady obrazujące zastosowanie spektrometrii ruchliwości jonów do analizy dużych układów opartych na oddziaływaniach niekowalencyjnych.

II.2.2 Rozdział związków organicznych za pomocą IM-MS

Rozdział cząsteczek za pomocą IM-MS następuje na podstawie różnicy w ich przekrojach czynnych (Ω). W zależności od tej wartości oraz od konstrukcji, jak również rozdzielczości i czułości zastosowanego spektrometru, możemy obserwować mniejsze lub większe zróżnicowanie czasów dryfu. Dla związków znacząco różniących się wartościami Ω rozdział jest ułatwiony, a jego stopień zależy od zdolności rozdzielczej spektrometru ruchliwości jonów. Problem pojawia się w momencie, gdy mamy do czynienia z jonami, które posiadają podobne przekroje czynne, a tym samym wykazują niewielkie zróżnicowanie strukturalne. W tym przypadku proces rozdziału jest utrudniony lub wręcz niemożliwy.

Dlatego też istnieje potrzeba ciągłego rozwoju tej techniki i poszukiwania dodatkowych czynników, które mają wpływ na zwiększenie efektywności rozdziału badanych jonów. Poniżej przedstawiłam wybrane przykłady obrazujące rolę takich czynników jak: temperatura, ciśnienie, polaryzowalność gazu oraz różnych specyficznych oddziaływań na proces separacji.

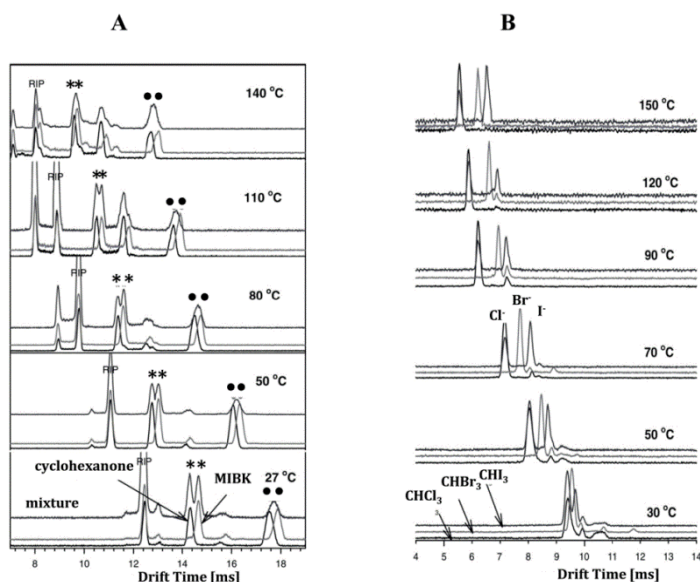
a) Wpływ temperatury oraz ciśnienia na rozdzielanie związków organicznych

Temperatura i ciśnienie są kluczowymi parametrami w spektrometrii ruchliwości jonów, wpływającymi na efektywność rozdzielania związków. Temperatura wewnątrz komory ruchliwości jonów bezpośrednio wpływa na energię wewnętrzną jonów, w związku z tym wpływa również na rozkład możliwych konformacji jonu i tym samym na jego przekrój czynny. Zakres tego wpływu ściśle zależy od natury badanych związków.

Różnorodny wpływ temperatury na rozdzielanie jonów w komorze IM został m.in. przedstawiony i omówiony przez M. Tabrizchiego, na przykładzie wybranych związków karbonylowych oraz halogenowych, tj.: bromoformu, chloroformu, jodku metylu.³² Na podstawie przeprowadzonych badań autor zaobserwował dwa możliwe przypadki. Pierwszy z nich został przedstawiony na Rysunku 4A, na którym widzimy, że wraz ze wzrostem temperatury następuje pogorszenie rozdzielania jonów $[M+H]^+$ (*) pochodzących od cykloheksanonu oraz ketonu metylo-izobutyloвого (MIBK). Zaobserwowany efekt jest zgodny z teorią (Równanie 2, podrozdział II.1.2). W przypadku jonów $[2M+H]^+$ (•) autor nie zaobserwował żadnego wpływu temperatury na ich rozdzielanie, co tłumaczy powstawaniem mieszanego dimeru. Ciekawym przypadkiem okazały się badania ruchliwości anionów halogenkowych (Cl^- , Br^- oraz I^-) wytworzonych w źródle jonów z $CHCl_3$, $CHBr_3$ oraz CHI_3 , których wyniki obrazuje Rysunek 4B. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów Tabrizchi wykazał, że wzrost temperatury powoduje znaczącą poprawę stopnia rozdzielania badanych anionów. Autor fakt ten tłumaczy obecnością dodatkowych efektów, tj. zmniejszeniem stopnia asocjacji jonów z obojętnymi cząsteczkami chlorowców oraz zmniejszeniem stopnia uwodnienia w wyższych temperaturach. W związku z tym struktura analizowanych jonów zmienia się w całym zakresie temperatur, powodując znaczące zmiany w ich czasach dryfu wraz ze wzrostem temperatury.

Podobne eksperymenty dla związków halogenowych, m.in. fluoro-, chloro-, bromo- oraz jodoheksanu przeprowadzili Borsdorf i Mayer.³³ Na podstawie analizy zebranego materiału wykazali oni, że efekty związane z asocjacją i uwodnieniem jonów mają wpływ na

ich zachowanie się w komorze ruchliwości jonów, powodując zwiększenie stopnia rozdzielania wraz ze wzrostem temperatury. Dodatkowo autorzy zaobserwowali, że dla fluoroheksanu oraz chloroheksanu czynniki te mają większy wpływ na ich zróżnicowanie w komorze ruchliwości jonów niż to ma miejsce dla dwóch pozostałych halogenoheksanów.



Rysunek 4. Widma ruchliwości jonów dla **A)** jonu $[M+H]^+$ (*) dla cykloheksanonu oraz ketonu metylowo-izobutyloвого, a także dla ich dimerycznych klastrów (•) **B)** dla chlorowców zarejestrowane w różnych temperaturach.³²

Wszystkie powyższe przykłady obrazują wpływ temperatury na czasy dryfu jonów dla najprostszych spektrometrów ruchliwości jonów, gdzie temperaturę panującą wewnątrz komory można regulować i kontrolować.

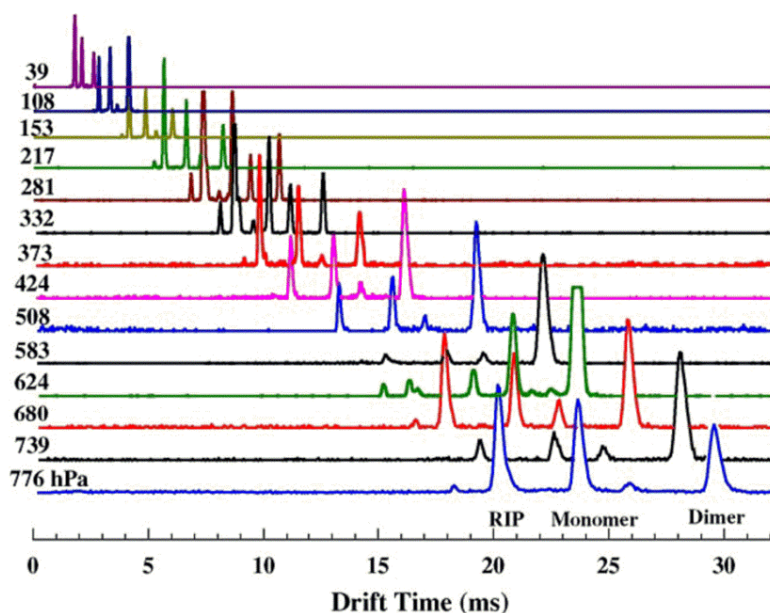
W przypadku T-Wave IMS, gdzie bezpośrednia regulacja temperatury w komorze ruchliwości jonów nie jest możliwa, a jej monitorowanie jest utrudnione ze względu na podwyższone, zmienne pola elektryczne, miarą energii wewnętrznej jonu jest jego temperatura efektywna (T_{eff}), zdefiniowana za pomocą równania: $T_{\text{eff}} = T_{\text{gazu}} + T_{\text{pola}} = T_{\text{gazu}} + \frac{M}{3k} v_d^2$, gdzie v_d oznacza prędkość jonu, M oznacza masę gazu buforowego, k - stałą Boltzmanna.^{19b} Zgodnie z powyższym równaniem temperatura efektywna zależy od prędkości jonu (v_d). W spektrometrach wykorzystujących technikę „wędrującej fali” na prędkość jonów mają wpływ amplituda fali (WH) i jej prędkość (WV). Do wyznaczania T_{eff} wykorzystywane są tzw. termometry chemiczne jonów, dla których energetyka dysocjacji jest bardzo dobrze scharakteryzowana.

Dokładna dyskusja na temat temperatury efektywnej jonu w T-Wave IMS oraz wpływu WH, WV, p na jej wartość została przeprowadzana w badaniach prowadzonych przez

Gabelicę i wsp., gdzie *p*-metoksybenzylpirydyna została wykorzystana jako chemiczny termometr jonów.^{19b} Na podstawie procesów dysocjacji, przebiegających w komorze ruchliwości jonów, autorzy stwierdzili, że T_{eff} wzrasta wraz ze wzrostem amplitudy fali i zmniejszeniem ciśnienia gazu buforowego, zgodnie z Równaniem 1 ($v_d = K \cdot E$). Ciekawym zjawiskiem, zaobserwowanym przez autorów, było zmniejszenie T_{eff} wraz ze wzrostem prędkości fali. Według autorów zależność ta wskazuje, że średnia prędkość jonów maleje, kiedy WV wzrasta, czyli jony nie zawsze mają czas na osiągnięcia stanu równowagi, opisanego powyższym równaniem. Na tej podstawie podkreślili, że w T-Wave IMS powinno się brać pod uwagę następującą zależność $v_d \leq K \cdot E$, a nie tę opisaną w Równaniu 1. Wyznaczyli oni również T_{eff} dla *p*-metoksybenzylpirydyny, która mieściła się w zakresie 500-800 K, w zależności od warunków pomiaru.

Ciśnienie panujące w komorze ruchliwości jonów jest również istotnym parametrem, który wpływa na efektywność rozdzału. Zgodnie z Równaniem 2 (podrozdział II.1.2) ruchliwość jonów jest odwrotnie proporcjonalna do gęstości gazu buforowego (N), która jest z kolei proporcjonalna do ciśnienia (p). W związku z tym zmiana ciśnienia powinna powodować znaczące różnice w czasach dryfu jonów.

Wpływ ciśnienia na zdolność rozdzielczą (R_p), rozdzielczość (R_{p-p}) oraz współczynnik selektywności (α) został dokładnie przebadany przez Tabrizchiego i Rouholahnejada.^{21a} Badania przeprowadzili dla ketonu metylo-izobutyloвого oraz cykloheksanonu w zakresie ciśnień od 32 hPa (29 Tor) do wartości ciśnienia atmosferycznego za pomocą spektrometru ruchliwości jonów, w którym jonizację osiągnięto przez wyładowania koronowe. Wyniki otrzymane przez autorów przedstawia Rysunek 5, obrazujący zmianę czasów dryfu badanych jonów w zależności od ciśnienia panującego w komorze ruchliwości jonów dla protonowanego monomeru oraz dimeru pochodzącego od ketonu metylo-izobutyloвого. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy wykazali, że spadek ciśnienia powoduje zmniejszenie różnicy pomiędzy czasami dryfu badanych jonów, a tym samym pogorszenie zdolności rozdzielczej (R_p) oraz rozdzielczości (R_{p-p}), zaś współczynnik selektywności pozostaje niezmienny. Te obserwacje są zgodne z przedstawioną powyżej teorią.



Rysunek 5. Widma IM dla jonów $[M+H]^+$ oraz $[2M+H]^+$ obserwowanych dla ketonu metyloizobutyloowego zarejestrowane przy różnych wartościach ciśnienia.^{21a}

Analogiczną zależność R_p oraz R_{p-p} od ciśnienia zaobserwowali Davis i wsp. dla di-*tert*-butylopirydyny (DtBP), metylofosfonianu dimetylu (DMMP), trinitrotoluenu (TNT) oraz 2,4-dinitrotoluenu (2,4-DNT).³⁴ Badania przeprowadzili oni w skonstruowanym przez siebie wysokociśnieniowym spektrometrze ruchliwości jonów, wyposażonym w puszkę Faradaya. Zgodnie z wcześniejszymi wnioskami uzyskanymi przez Tabrizchiego oraz Rouholahnejada^{21a} również i w tym przypadku autorzy zaobserwowali zmniejszenie zdolności rozdzielczej (R_p) oraz rozdzielczości (R_{p-p}) wraz ze spadkiem ciśnienia.

b) Wpływ gazu buforowego na rozdział związków organicznych

Oprócz typowych czynników aparaturowych (temperatury oraz ciśnienia) dobór odpowiedniego gazu buforowego może mieć również istotny wpływ na proces rozdziału jonów, ze względu na oddziaływanie jonu z gazem obojętnym w komorze ruchliwości jonów, leżące u podstaw metody. Parametrami, które musimy wziąć pod uwagę rozpatrując wpływ rodzaju gazu buforowego, są jego masa cząsteczkowa oraz polaryzowalność. Masa cząsteczkowa gazu buforowego jest częścią składową masy zredukowanej, która zgodnie z Równaniem 5 ma wpływ na przekrój czynny jonu, a tym samym na jego czas dryfu. Jeśli masa badanego jonu jest mniejsza bądź równa masie gazu buforowego, wtedy gaz buforowy będzie mieć większy wpływ na czasy dryfu jonów niż w momencie, gdy masa jonu jest znacznie wyższa od masy gazu buforowego. Najczęściej stosowanymi gazami

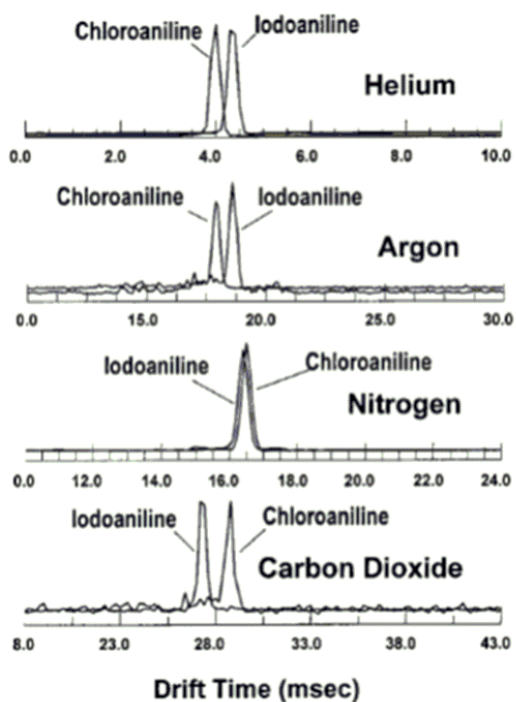
buforowymi w IM-MS są: hel, azot, argon oraz dwutlenek węgla, dla których wartości mas i polaryzowalności są przedstawione w poniższej Tabeli 2.

Tabela 2. Wartości mas oraz polaryzowalności dla helu, argonu, azotu i dwutlenku węgla.³⁵

| gaz buforowy | masa [Da] | polaryzowalność (10^{-24} cm ³) |
|-----------------|-----------|--|
| hel | 4 | 0,205 |
| argon | 40 | 1,641 |
| azot | 28 | 1,740 |
| dwutlenek węgla | 44 | 2,911 |

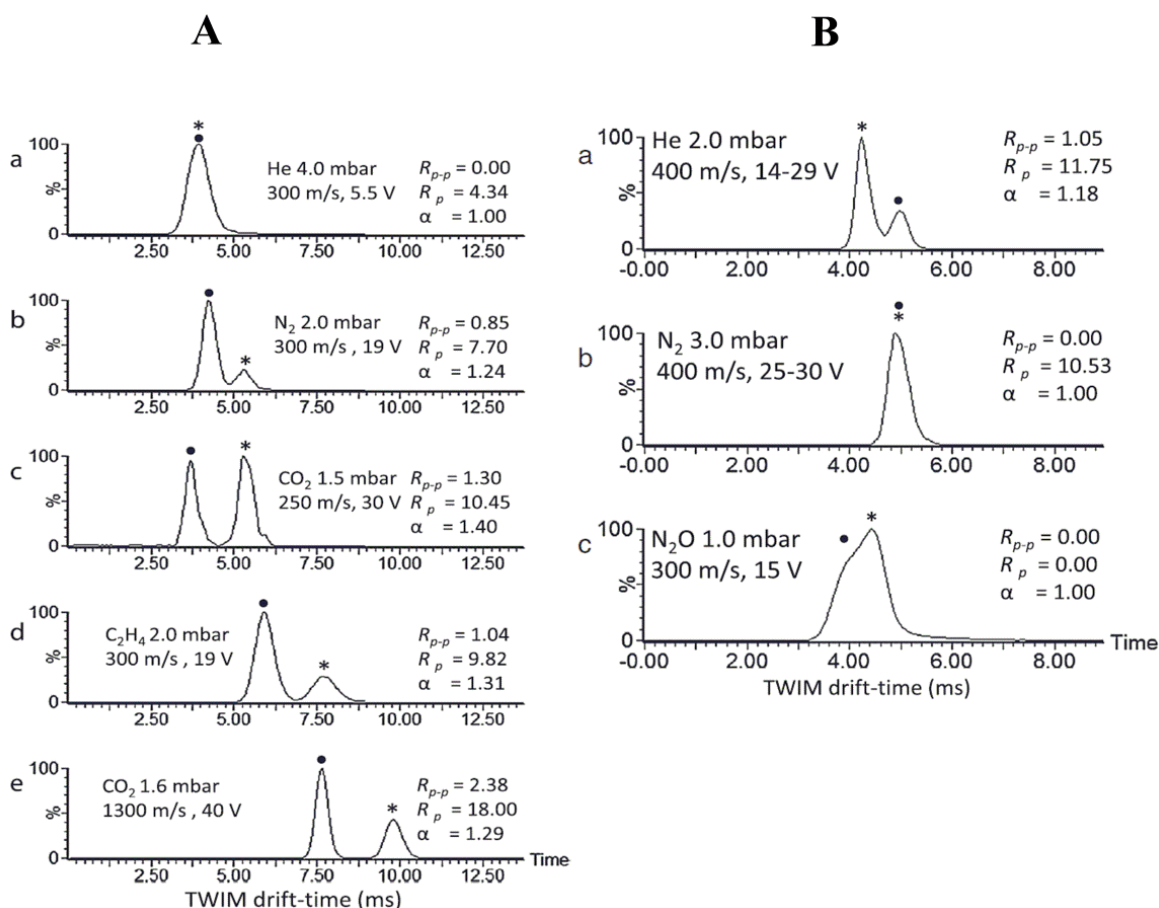
Innym ważnym czynnikiem, który odgrywa istotną rolę w badaniach nad wpływem gazu buforowego na rozdział jonów, jest charakter analizowanych związków. Dlatego też ogólnie przyjęte stwierdzenie, że użycie cięższych gazów o większej polaryzowalności powoduje zwiększenie stopnia separacji, nie zawsze jest prawdziwe.

Jednym z dowodów na nieprawdziwość przytoczonego stwierdzenia jest praca opublikowana w 2000 roku, w której Hill i Asbury zbadali wpływ czterech różnych gazów o szerokim zakresie polaryzowalności (He, N₂, Ar, CO₂) na rozdział aniliny i jej chlorowcopochodnych, a także aminobenzonitrylu, heksyloaminy oraz związków peptydowych za pomocą skonstruowanego przez nich spektrometru ruchliwości jonów sprzężonego z kwadrupolowym spektrometrem mas.³⁵ Rysunek 6 przedstawia wpływ powyższych gazów na rozdział chloroaniliny oraz jodoaniliny. Analizując zebrane dane badacze podkreślili, że wzrost masy i polaryzowalności gazu obojętnego znacząco zmienia różnicę w czasach dryfu między badanymi związkami chlorowcowymi, prowadząc do zmniejszenia ich rozdziału (N₂) oraz odwrócenia kolejności dryfowania jonów przez komorę IM wraz ze znaczącą poprawą rozdziału w momencie zmiany gazu z helu na dwutlenek węgla (CO₂). Fakt ten autorzy wyjaśnili mniejszą wartością masy zredukowanej dla chloroaniliny w porównaniu z jodoaniliną w cięższych gazach buforowych.



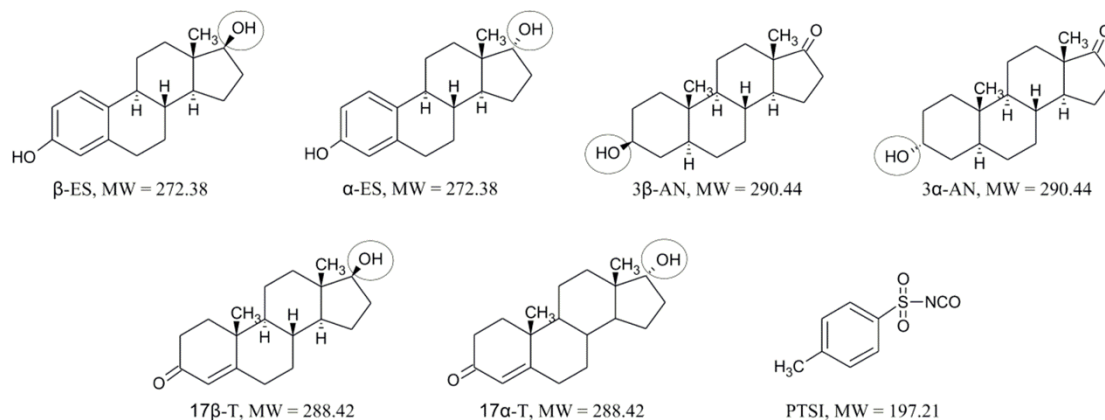
Rysunek 6. Widma ruchliwości jonów chloroaniliny oraz jodoaniliny zarejestrowane dla czterech różnych gazów obojętnych.³⁵

Analogiczne badania przeprowadzone zostały przez Lalli i wsp. dla *N*-butyloaniliny oraz *p*-butyloaniliny oraz dla kationorodnika imidazolu i podwójnie naładowanego kationu diimidazolu z wykorzystaniem techniki „wędrującej fali” (T-Wave IMS).³⁶ Jak wynika z Rysunku 7A, odnoszącego się do *N*-butyloaniliny oraz *p*-butyloaniliny, autorzy zaobserwowali znaczące zróżnicowanie czasów dryfu, a tym samym wzrost R_{p-p} oraz R_p wraz ze wzrostem polaryzowalności gazu buforowego. Odmienną sytuację przedstawia Rysunek 7B, na podstawie którego badacze stwierdzili, że w przypadku kationorodnika imidazolu oraz podwójnie naładowanego kationu diimidazolu wzrost polaryzowalności gazu buforowego powoduje pogorszenie ich rozdzielności oraz odwrócenie kolejności ich przemieszczania się przez komorę ruchliwości jonów. Efekt ten autorzy wyjaśniają zwiększonymi siłami dalekiego zasięgu jon-gaz buforowy w bardziej polaryzowalnych gazach buforowych dla podwójnie naładowanego kationu diimidazolu w porównaniu do kationorodnika imidazolu.

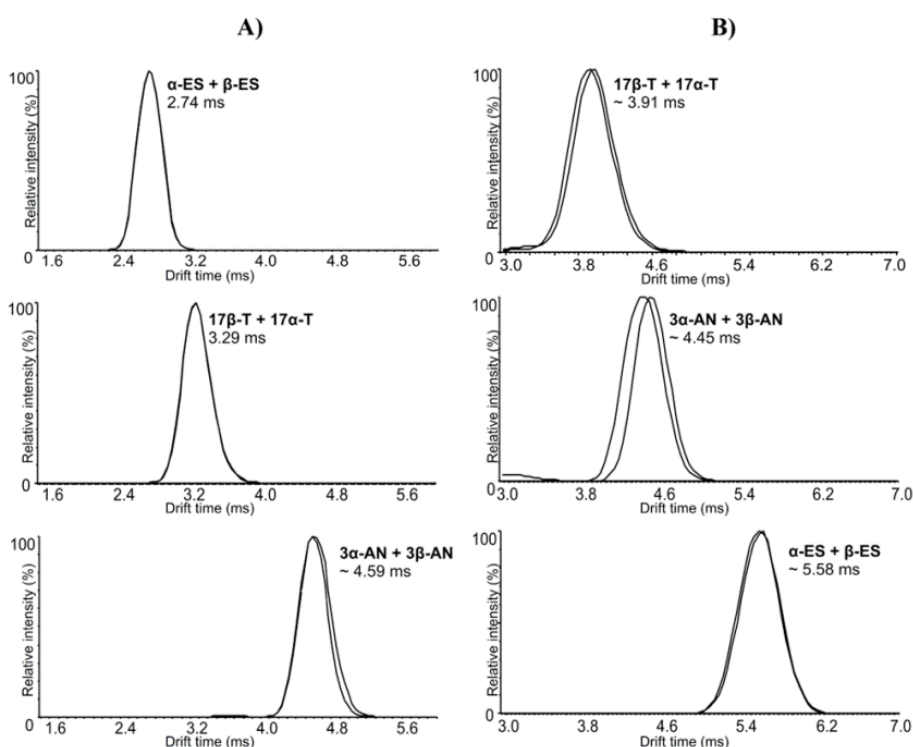


Rysunek 7. Widma ruchliwości jonów dla **A)** równomolowej mieszaniny *N*-butyloaniliny (•) oraz *p*-butyloaniliny (*) oraz dla **B)** równomolowej mieszaniny kationorodnika imidazolu (•) oraz podwójnie naładowanego kationu diimidazolu (*) zarejestrowane dla różnych gazów buforowych.³⁶

Kolejnym przykładem, obrazującym wpływ gazu obojętnego na rozdział jonów, jest praca opublikowana w 2013 roku przez Ahonena i wsp., w której autorzy wykorzystali technikę T-Wave IMS do analizy związków steroidowych oraz ich pochodnych, powstałych w wyniku reakcji z odczynnikiem derywatyzującym (izocyjanian tosyłu, PTSI), przedstawionymi na Rysunku 8.³⁷ W pracy tej badacze zaobserwowali, że dla związków steroidowych, różniących się jedynie konfiguracją na jednym centrum stereogenicznym, zastosowanie CO₂ powoduje minimalną poprawę rozdziału lub jego brak, w zależności od analizowanych związków, w porównaniu z N₂, jak obrazuje Rysunek 9. Gdy jednak grupa hydroksylowa obecna na centrum stereogenicznym steroidu została dodatkowo zabezpieczona odczynnikiem PTSI, zmiana gazu buforowego z N₂ na cięższy i bardziej polaryzowalny CO₂ spowodowała znaczne pogorszenie rozdziału. Wyniki otrzymane przez badaczy dla pochodnych steroidowych przedstawia Tabela 3, zawierająca wartości R_{p-p} dla CO₂ oraz N₂.



Rysunek 8. Struktury izomerycznych steroidów oraz odczynnika derywatyżującego (PTSI).³⁷



Rysunek 9. Wybrane widma ruchliwości jonów dla izomerycznych steroidów zarejestrowane dla **A)** N_2 oraz **B)** CO_2 .³⁷

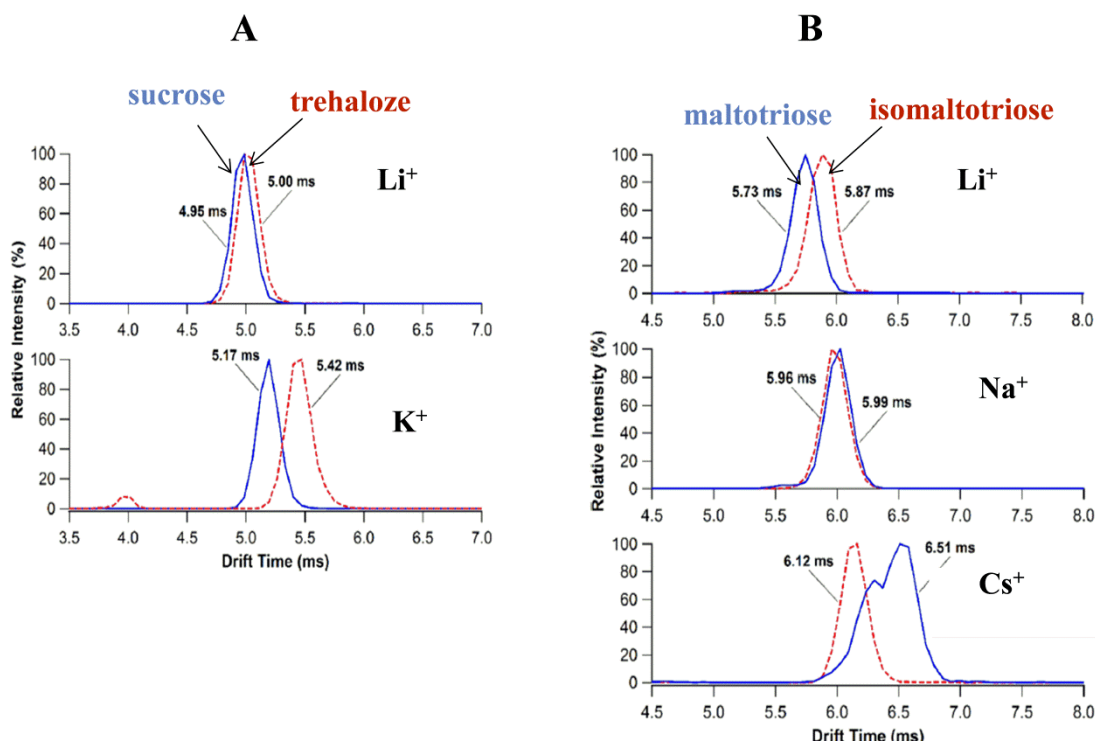
Tabela 3. Wartości $R_{p,p}$ dla PTSI podstawionych związków steroidowych dla N_2 oraz CO_2 .³⁷

| Isomer pair | CO_2 | | N_2 | | |
|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1.0 mbar | 1.3 mbar | 2.0 mbar | 2.5 mbar | 3.0 mbar |
| α -ES & β -ES | 0 | 0.55 | 0.68 | 0.77 | 0.78 |
| 3 α -AN & 3 β -AN | 0.90 | 0.98 | 0.92 | 1.08 | 1.24 |
| 17 α -T & 17 β -T | 0.60 | 0.61 | 0.74 | 0.93 | 0.84 |

c) Wpływ kationu metalu na rozdział związków organicznych

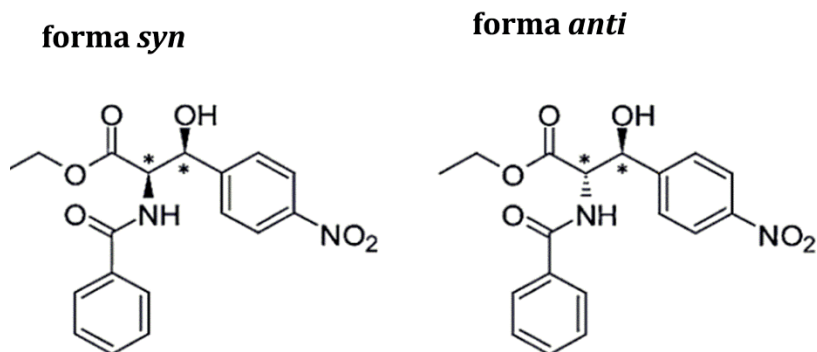
Kolejnym zagadnieniem, które chciałabym poruszyć w ramach tego podrozdziału, jest rola kationu metalu w rozdziale związków organicznych w IM-MS. Oddziaływanie kationu metalu - obojętna cząsteczka mogą powodować duże zmiany konformacyjne badanych układów, umożliwiając rozdział strukturalnie podobnych związków. Efekt ten zależy jest zarówno od rozmiaru kationu metalu, jak i od natury analizowanych jonów.

Zależność tę bardzo dokładnie przedstawia praca opublikowana przez Huanga i Doddsa w 2013 roku, w której autorzy zbadali wpływ kationów litowców (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ oraz Cs^+) na rozdział związków cukrowych, wykorzystując technikę T-Wave IMS.³⁸ Analizie poddane zostały cztery grupy zawierające: pięć izomerycznych disacharydów, cztery izomeryczne trisacharydy, dwa izomeryczne pentasacharydy oraz dwa izomeryczne heksasacharydy. Dla każdej z badanych grup wyciągnęli oni różne wnioski. W przypadku disacharydów, dla których widma ruchliwości jonów przedstawione są na Rysunku 10A, poprawę rozdziału autorzy zaobserwowali dla kompleksów z jonem potasu, $[\text{M}+\text{K}]^+$. Odmianą sytuację obserwowali dla trisacharydów, dla których większe zróżnicowanie czasów dryfu widoczne jest dla asocjacji z kationami litu. W przypadku kompleksów z Cs^+ pomimo znaczącej różnicy w t_d , ich analiza była utrudniona ze względu na obecność dwóch możliwych konformacji dla jednego z trisacharydów. Autorzy stwierdzili również, że obecność kationu Cs^+ powoduje jednocześnie odwrócenie kolejności czasów dryfu dla badanych związków w porównaniu z kompleksami Li^+ . Wyniki otrzymane dla trisacharydów przedstawia Rysunek 10B. Dla pentasacharydów oraz heksasacharydów najlepszy rozdział badacze uzyskali dla kompleksów z jonami Na^+ .



Rysunek 10. Widma ruchliwości jonów dla asocjatów powstałych w wyniku oddziaływania **A)** disacharydów z jonami Li⁺ oraz K⁺, [M+Li]⁺ oraz [M+K]⁺ **B)** trisacharydów z jonami Li⁺, Na⁺ oraz Cs⁺ [M+Li]⁺, [M+Na]⁺ oraz [M+Cs]⁺.³⁸

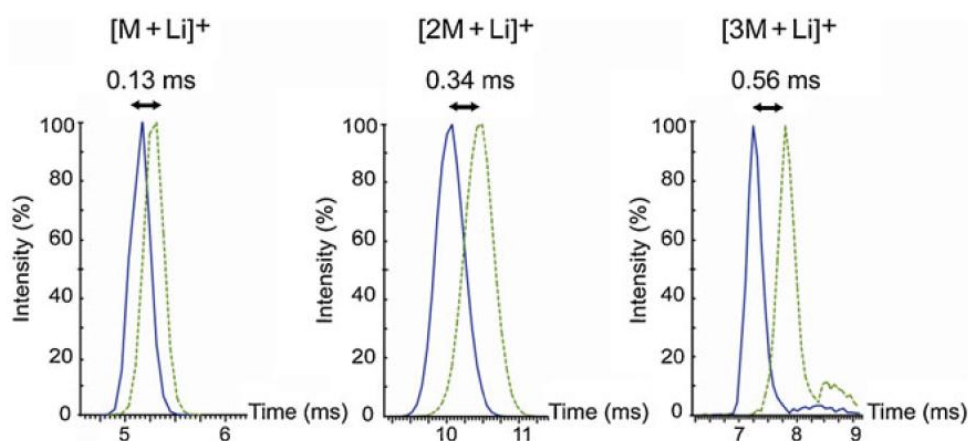
Podobne badania przeprowadzili Afonso i wsp. w roku 2013. Zbadali oni wpływ kationów litowców na rozdział wybranych diastereoizomerów, przedstawionych na Rysunku 11, wykorzystując technikę T-Wave IMS.³⁹ Na podstawie przeprowadzanych pomiarów autorzy wykazali, że największą rolę w różnicowaniu czasów dryfu dla jonów [M+metal]⁺ odgrywa kation sodu, w porównaniu do innych metali. Otrzymane przez nich wyniki obrazuje Tabela 4, która zawiera wartości przekrojów czynnych wyznaczonych eksperymentalnie (Ω_{eksp}) dla jonów [M+metal]⁺ badanych diastereoizomerów oraz różnice w ich czasach dryfu (Δt_d). Dodatkowo autorzy zaobserwowali, że w przypadku klastrów typu [2M+metal]⁺ oraz [3M+metal]⁺ największy wpływ na rozdział badanych jonów ma kation litu. Ponadto stwierdzili, że dla kationu Li⁺ wzrost różnic pomiędzy czasami dryfu rośnie zgodnie z kolejnością: [M+X]⁺ < [2M+X]⁺ < [3M+X]⁺, jak przedstawia Rysunek 12.



Rysunek 11. Struktury analizowanych diastereoizomerów.³⁹

Tabela 4. Wartości eksperymentalnych przekrojów czynnych (Ω_{eksp} (\AA^2)) dla jonów $[\text{M}+\text{metal}]^+$ badanych diastereoizomerów oraz różnice między Ω_{eksp} i czasami dryfu dla analizowanych jonów.³⁹

| | $[\text{M}+\text{H}]^+$ | $[\text{M}+\text{Li}]^+$ | $[\text{M}+\text{Na}]^+$ | $[\text{M}+\text{K}]^+$ | $[\text{M}+\text{Cs}]^+$ | $[\text{M}+\text{Rb}]^+$ |
|---|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| m/z | 359,12 | 365,13 | 381,11 | 397,08 | 443,03 | 491,02 |
| Ω_{eksp} (\AA^2) dla formy <i>syn</i> | 110 | 115 | 118 | 120 | 121 | 121 |
| Ω_{eksp} (\AA^2) dla formy <i>anti</i> | 111 | 117 | 120 | 121 | 122 | 122 |
| $\Delta \Omega_{\text{eksp}}$ (\AA^2) | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Δt_d (ms) | 0,07 | 0,13 | 0,14 | 0,06 | 0,07 | 0,07 |



Rysunek 12. Widma mobilności jonów dla jonów $[\text{M}+\text{Li}]^+$, $[\text{2M}+\text{Li}]^+$, $[\text{3M}+\text{Li}]^+$. Linia ciągła: diastereoizomer *syn*. Linia przerywana: diastereoizomer *anti*.³⁹

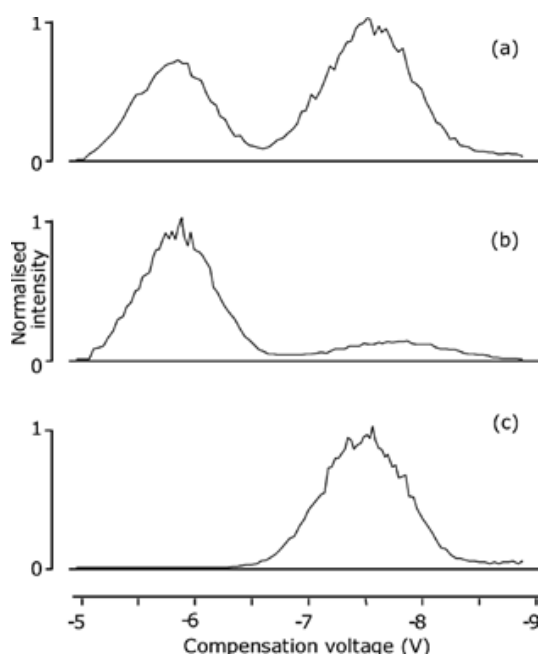
Na uwagę zasługuje również najnowsze doniesienie literaturowe, w którym Flick i wsp. uzyskali poprawę rozdzielności dla adduktów *cis*- i *trans*-hydroksyproliny oraz *cis*- i *trans*-fluoroproliny z jonami Li^+ w porównaniu do innych kationów metali tj.: Na^+ , K^+ oraz Cs^+ .⁴⁰

Wpływ rozmiaru metalu oraz charakteru badanych cząsteczek został również dokładnie przebadany dla metali przejściowych oraz metali ziem alkalicznych przez Dwivediego i wsp.^{1d} Do badań wykorzystali kationy Na^+ , Ag^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} oraz anomeryczne glikozydy metylowe (MeMan, MeGal, MeGlc). Wykazali oni, że rozmiar

kationu ma istotne znaczenie dla poprawy rozdzielności, przy czym wpływ ten jest różny dla każdej pary związków.

d) Wpływ odczynnika chiralnego na rozdział związków organicznych

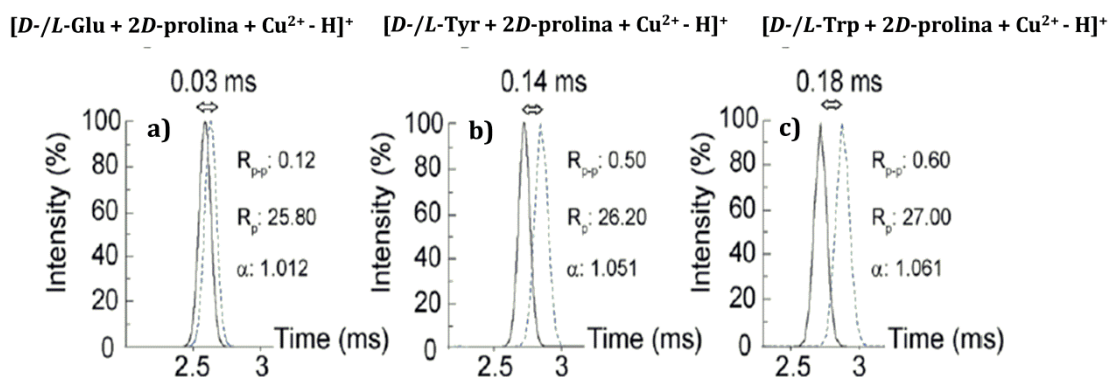
Nową, obiecującą metodą zwiększenia efektywności rozdzielności jonów za pomocą spektrometrii IM-MS jest utworzenie specyficznych, niekowalencyjnych oddziaływań z chiralnymi ligandami i/lub jonami metali, które mogą dodatkowo indukować zmiany konformacyjne powstałych asocjatów, prowadząc do poprawy ich rozdzielności. Podejście to zostało wykorzystane przez Mie i wsp. do rozdzielności enancjomerycznych aminokwasów za pomocą techniki FAIMS-MS.⁴¹ Na podstawie przeprowadzonych pomiarów autorzy wykazali, że rozdzielność badanych aminokwasów możliwa jest jedynie dla kompleksów typu $[D-/L\text{-aminokwas} + 2L\text{-Ref} + M^{2+} - H]^+$, gdzie M^{II} oznacza jon metalu dwuwartościowego, $L\text{-Ref}$ jest chiralnym odczynnikiem (aminokwas). Rysunek 13 przedstawia rozdzielność D -, L -tryptofanu jako kompleksu $[D-/L\text{-tryptofan} + 2L\text{-asparagina} + Ni^{2+} - H]^+$.



Rysunek 13. Widma FAIMS dla trimerycznych kompleksów typu $[D-/L\text{-tryptofan} + 2L\text{-asparagina} + Ni^{2+} - H]^+$ dla **a)** mieszaniny L -tryptofanu oraz D -tryptofanu, **b)** L -tryptofanu oraz **c)** D -tryptofanu.⁴¹

Identyczne badania zostały przeprowadzone przez tę samą grupą badawczą w 2008 roku dla enancjomerów terbutaliny.⁴² Podobnie jak to miało miejsce wcześniej, rozróżnienie enancjomerów autorzy osiągnęli dla kompleksów typu [terbutalina + 2*L*-tryptofan + Cu²⁺ - H]⁺ utworzonych w wyniku oddziaływania (+)- i (-)-terbutaliny z kationami miedzi oraz *L*-tryptofanem.

W jednym z najnowszych doniesień literaturowych Domalain i wsp. wykorzystali powyższy sposób do rozdziału alifatycznych oraz aromatycznych aminokwasów z wykorzystaniem techniki T-Wave IMS.⁴³ Autorzy wykazali, że badane aminokwasy takie jak: *D*- i *L*-fenyloalanina, *D*- i *L*-tryptofan oraz *D*- i *L*-tyrozyna, mogą być z powodzeniem rozdzielone w wyniku utworzenia kompleksów z jonami miedzi (II) oraz z *D*-proliną jako chiralnym odczynnikiem, posiadających postać [aminokwas + 2*D*-prolina + Cu²⁺ - H]⁺. Ponadto autorzy wykazali, że największą różnicę w czasach dryfu osiągnięto dla aromatycznych aminokwasów tj. tryptofanu oraz tyrozyny, jak przedstawia Rysunek 14.



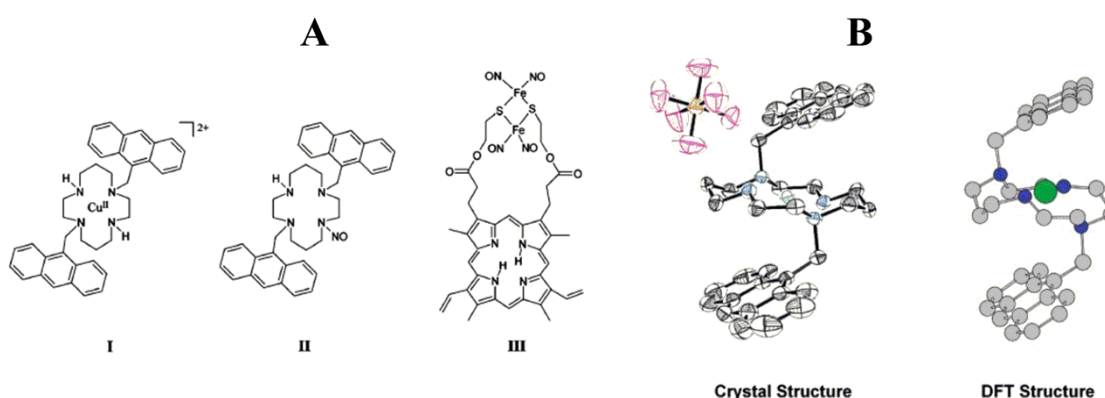
Rysunek 14. Widma mobilności jonów dla kompleksów typu [Cu^{II}(*D*-Pro)₂(*D*/*L*-M)-H]⁺ dla **a**) kwasu glutaminowego **b**) tyrozyny oraz **c**) tryptofanu.⁴³

Przedstawiony sposób został wykorzystany również przez naszą grupę badawczą do rozdziału (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny za pomocą techniki T-Wave IMS.⁴⁴ Na podstawie przeprowadzonych pomiarów wykazaliśmy, że spośród różnych badanych kombinacji tylko kompleksy mające postać [2M+*D*-aminokwas+Cu²⁺-3H]⁺ (M oznacza odpowiednią katechinę) wykazują poprawę rozdziału badanych związków. Pozytywne wyniki otrzymaliśmy jedynie dla hydrofobowych aminokwasów tj. *D*-alaniny, *D*-leucyny oraz *D*-proliny. Praca ta została szczegółowo opisana w części: **Badania własne**.

II.2.2 Analiza strukturalna związków organicznych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów i obliczeń teoretycznych

Zgodnie z Równaniem 5, przedstawionym w podrozdziale II.1.2, czas dryfu jonów można powiązać z przekrojem czynnym (Ω) analizowanych cząsteczek. W wyniku porównania eksperymentalnych przekrojów czynnych z teoretycznymi, obliczonymi na podstawie modelowania geometrii cząsteczek, można określić budowę przestrzenną badanych układów. Przykłady obrazujące wykorzystanie IM-MS do charakterystyki strukturalnej związków organicznych przedstawiłam poniżej.

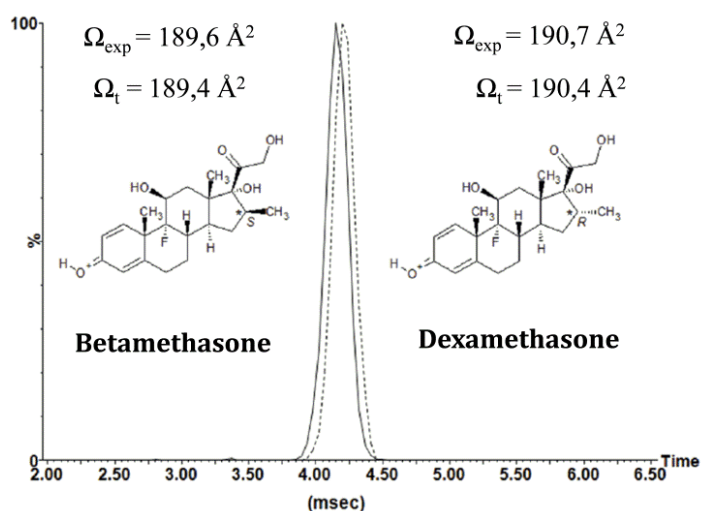
Technika ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi została wykorzystana m. in. do badania struktur trzech wybranych chromoforów, przedstawionych na Rysunku 15A.⁴⁵ Na podstawie uzyskanych wyników autorzy stwierdzili, że kompleks $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAC-H})]^+$ (**I**) występuje w postaci pojedynczego konformeru, w którym jedna z grup antracenyłowych znajduje się poniżej pierścienia cyklamowego oraz drugiej grupy antracenyłowej. Wykazali oni również, że obserwacje te są zgodne z danymi ^1H NMR oraz ze strukturą krystalograficzną, przedstawioną na Rysunku 15B. W przypadku związku **II** badacze stwierdzili, że może on występować w postaci dwóch konformerów: pierwszy z nich jest podobny do struktury $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAC-H})]^+$, natomiast drugi posiada dwie grupy antracenyłowe ułożone po tej samej stronie pierścienia cyklamowego. Według autorów PPIX-RSE (**III**) przybiera dwie „wygięte” konformacje, w których pierścienie porfiryne oraz Fe_2S_2 znajdują się pod różnymi kątami względem siebie.



Rysunek 15. A) Schematyczne struktury $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAC})^{2+}$ (**I**), DAC-NO (**II**) oraz PPIX-RSE (**III**). B) Struktura krystaliczna związku **I** oraz najniższa energetycznie struktura dla jonu $(\text{I-H})^+$ obliczona za pomocą DFT. Struktura krystalograficzna zawiera również jedną cząsteczkę anionu PF_6^- . W strukturze DFT atomy węgla zaznaczono na szaro, atomy azotu na niebiesko, kation Cu^{2+} na zielono.⁴⁵

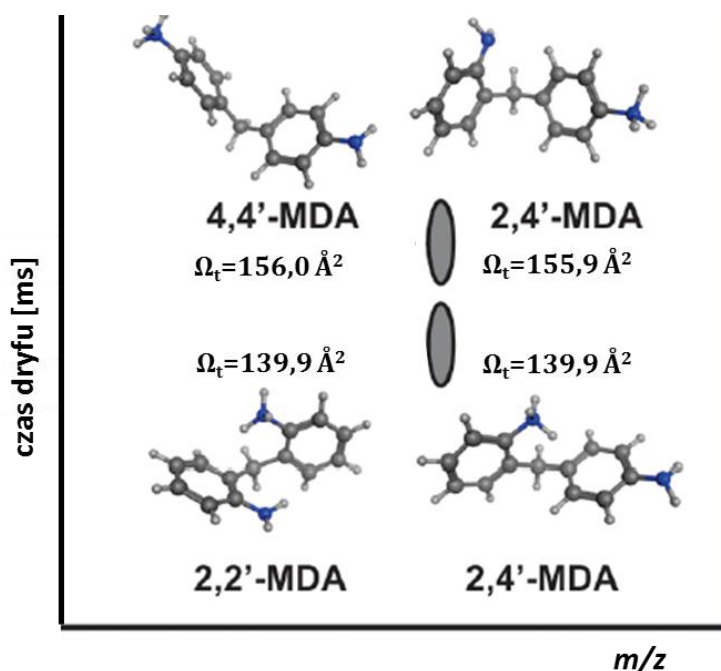
W 2012 roku Iain Campuzano i wsp. wyznaczyli wartości przekrojów czynnych dla związków lekopodobnych tj.: *N*-etyloaniliny, acetaminofenu, alprenololu, ondansetronu,

N-tlenku klozapiny, kolchicyny, werapamilu oraz rezerpiny w wyniku połączenia IM-MS oraz obliczeń DFT.⁴⁶ Pomiary ruchliwości jonów zostały przeprowadzone przy użyciu spektrometru wykorzystującego technikę „wędrującej fali”. Związki te w kolejnym etapie posłużyły autorom jako związki referencyjne do określenia wartości Ω_{eksp} dla dwóch diastereoizomerycznych związków, różniących się konfiguracją tylko na jednym centrum stereogenicznym: betametazonu oraz deksametazonu. Autorzy wykazali również bardzo dobrą zgodność eksperymentalnych i teoretycznych przekrojów czynnych, obliczonych dla najniższych energetycznie struktur badanych związków, otrzymanych na podstawie analizy strukturalnej z wykorzystaniem odpowiednich funkcjonałów gęstości elektronowej (DFT). Dodatkowo stwierdzili, że pomimo niewielkich różnic pomiędzy przekrojami czynnymi dla badanych izomerów, istnieje możliwość ich rozdzielenia za pomocą T-Wave IMS. Otrzymane przez autorów wyniki przedstawia Rysunek 16.



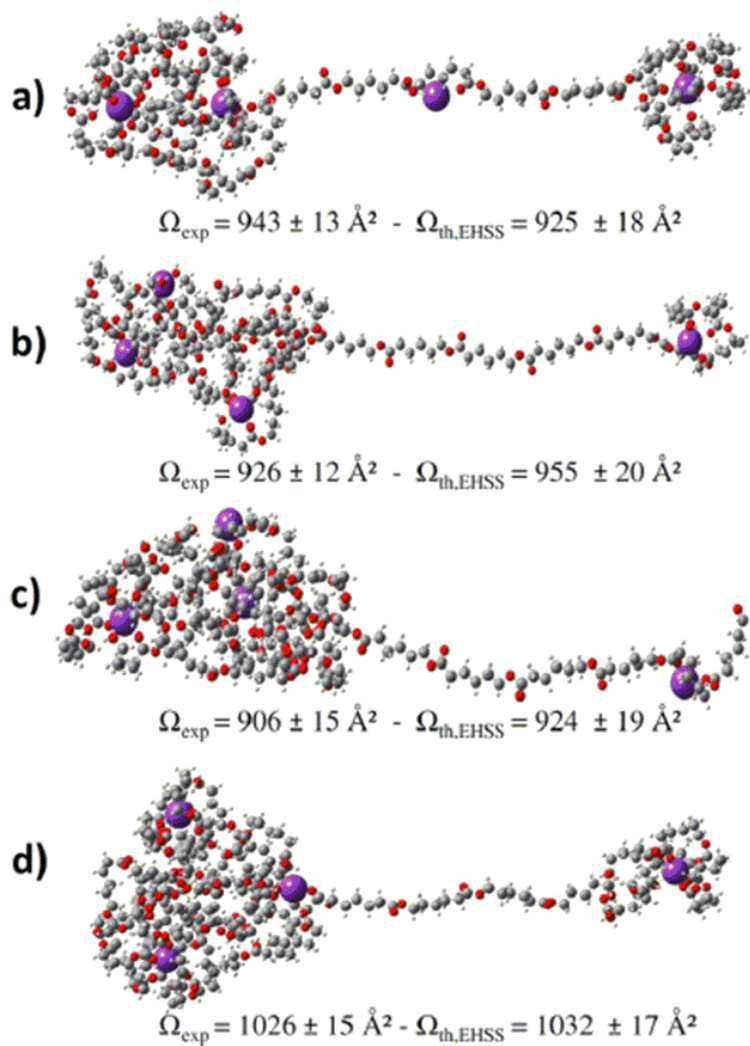
Rysunek 16. Widma ruchliwości jonów dla betametazonu oraz deksametazonu.⁴⁶

Połączenie spektrometrii ruchliwości jonów z obliczeniami teoretycznymi zostało również wykorzystane do charakterystyki strukturalnej regioizomerów metylenodianilina (2,4'-MDA, 2,2'-MDA oraz 4,4'-MDA) za pomocą DT-IMS oraz metody DFT.⁴⁷ W wyniku porównania danych eksperymentalnych z teoretycznymi badacze wykazali, że regioizomer 2,2'-MDA przyjmuje dwie możliwe konformacje o wartościach Ω wynoszących $139,9 \text{ \AA}^2$ oraz $155,9 \text{ \AA}^2$, które wykazują podobieństwo do regioizomeru 2,2'-MDA ($139,9 \text{ \AA}^2$) oraz do 4,4'-MDA ($156,0 \text{ \AA}^2$), jak obrazuje Rysunek 17.



Rysunek 17. Najniższe energetycznie struktury oraz przekroje czynne regioizomerów metylenodianiliny.⁴⁷

Interesujące badania przeprowadzili Morsa i wsp. wykorzystując metodę IM-MS oraz obliczenia teoretyczne do analizy strukturalnej poly- ϵ -kaprolaktonów (PCL), występujących w postaci kompleksów m.in. z kationami potasu.⁴⁸ Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą techniki T-Wave IMS oraz dynamiki molekularnej (MD) autorzy wykazali obecność dwóch głównych konformacji dla adduktów badanych cząsteczek z kationami potasu w fazie gazowej. Konformacje te są przedstawione na Rysunku 18. Pierwsza z nich scharakteryzowana została jako liniowy układ z lekko naładowanymi łańcuchami polimerowymi, będący wynikiem odpychania elektrostatycznego, występującego między skoordynowanymi metalami. Strukturę tę, przedstawioną na Rysunku 18a, zakwalifikowali oni do rodziny F_3 , w której kation K^+ zlokalizowany jest w następujący sposób: 2-1-1. Natomiast drugą konformację opisali jako sferyczny, silnie naładowany układ należący do rodziny F_2 , dla której kation K^+ skoordynowany jest według rozkładu 3-1, jak przedstawiają Rysunki 18b, c oraz d.



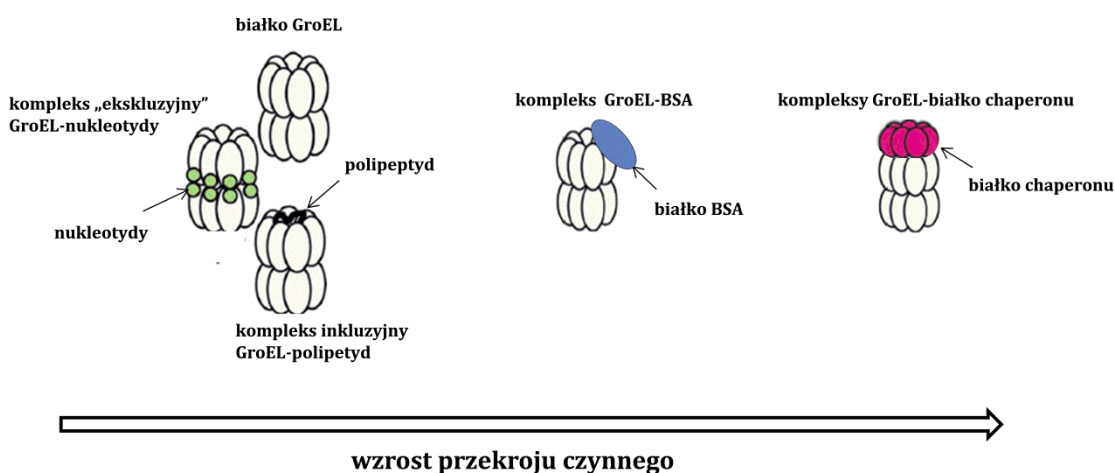
Rysunek 18. Skoordynowane struktury polimerów z kationami K^+ otrzymane za pomocą obliczeń MD dla **a)** liniowego 36-meru, **b)** 4-ramiennej gwiazdy 36-meru, **c)** 6-ramiennej gwiazdy 36-meru oraz **d)** liniowego 48-meru.⁴⁸

II.2.3 Analiza kompleksów niekowalencyjnych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów

W ostatnich latach spektrometria ruchliwości jonów w połączeniu ze spektrometrią mas oraz obliczeniami teoretycznymi została z powodzeniem wykorzystana do analizy strukturalnej specyficznych, niekowalencyjnych asocjatów. Metoda ta jest często jedynym możliwym sposobem na uzyskanie szczegółowych informacji strukturalnych dla prostych cząsteczek lub bardziej złożonych układów, które nie mogą być jednoznacznie scharakteryzowane za pomocą tradycyjnych metod takich jak: krystalografia rentgenowska, magnetyczny rezonans jądrowy lub spektroskopia w podczerwieni.

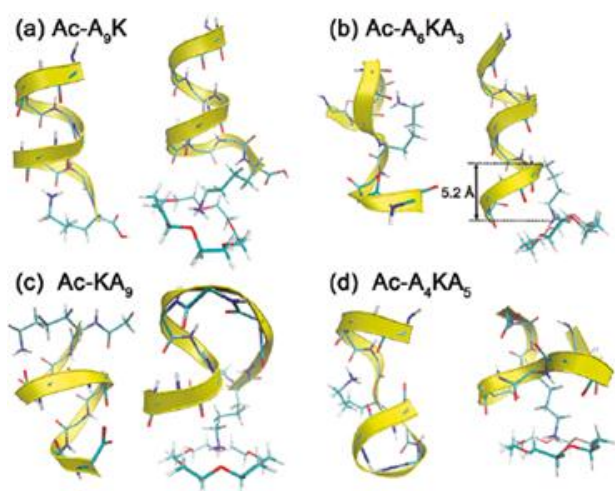
Jednym z przykładów wykorzystania IM-MS do analizy niekowalencyjnych kompleksów jest praca opublikowana w 2009 roku, w której autorzy przeprowadzili charakterystykę strukturalną kompleksów α - i β -cyklodekstryn (α - i β -CD) z kwasami *o*-, *m*- i *p*-kumarynowymi (CA), występujących w postaci jonów $[\text{CD}+\text{CA}]^-$, $[(\text{CD})_2+\text{CA}]^-$ i $[\text{CD}+\text{CA}]_2^{2-}$.⁴⁹ Na podstawie różnic w przekrojach czynnych badanych kompleksów oraz nieskompleksowanych cyklodekstryn autorzy wykazali, że układy te wykazują tendencję do tworzenia kompleksów inkluzyjnych, w których cząsteczka kwasu kumarynowego zlokalizowana jest we wnętrzu cyklodekstryny.

Na szczególną uwagę zasługuje również praca dotycząca analizy strukturalnej dużych niekowalencyjnych kompleksów chaperonin typu gość-gospodarz złożonych z białka GroEL (gospodarza) oraz cząsteczek pełniących rolę tzw. „gościa”.⁵⁰ W wyniku porównania danych eksperymentalnych z teoretycznymi autorzy stwierdzili, że białko GroEL, w zależności od zastosowanego ligandu, wykazuje tendencję do tworzenia trzech różnych kompleksów, mianowicie: kompleksów inkluzyjnych z polipeptydami, kompleksów „ekskluzyjnych” z nukleotydami oraz kompleksów będących wynikiem niespecyficznych oddziaływań z innym białkiem chaperonu, BSA. W przypadku asocjacji chaperonu z GroEL tworzą się kompleksy binarne, powodując zwiększenie objętości GroEL. Kompleksy te zostały przedstawione na Rysunku 19. Wyniki uzyskane z modelowania molekularnego oraz pomiarów IM-MS wykazały zgodność z rezultatami otrzymanymi za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej oraz NMR.



Rysunek 19. Schematyczne podsumowanie wyników uzyskanych z pomiarów IM-MS dla niekowalencyjnych kompleksów chaperonin z nukleotydami, polipeptydami i białkiem chaperonu.⁵⁰

Innym przykładem badania kompleksów typu gość-gospodarz, wykorzystującym IM-MS w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi, jest praca opublikowana w 2011 roku przez Hugh I. Kima *et al.*⁵¹ W ramach tego badania rolę gospodarza pełnił eter koronowy (18C6), natomiast funkcję gościa pełniły peptydy typu $\text{Ac-Ala}_{9-n}\text{-LysH}^+\text{-Ala}_n$ ($n = 0, 1, 3, 5, 7, \text{ i } 9$). Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazano, że badane związki posiadają tendencję do tworzenia tzw. helisy, gdzie peptyd łączy się w sposób niekowalencyjny w wyniku oddziaływań C-terminalnej grupy karbonylowej peptydu z grupami metylenowymi eteru. Otrzymane przez autorów wyniki przedstawia Rysunek 20.



Rysunek 20. Najniższe energetycznie struktury otrzymane za pomocą dynamiki molekularnej (MD) a) $\text{Ac-Ala}_9\text{-LysH}^+$ b) $\text{Ac-Ala}_6\text{-LysH}^+\text{-Ala}_3$ c) $\text{Ac-LysH}^+\text{-Ala}_9$ d) $\text{Ac-Ala}_5\text{-LysH}^+\text{-Ala}_5$ (lewa strona) oraz ich odpowiednich kompleksów z 18C6 (prawa strona).⁵¹

Połączenie T-Wave IMS oraz obliczeń teoretycznych, w tym metody dokowania, zostało wykorzystane przez naszą grupę badawczą do szczegółowej analizy niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstrynami.⁵² Dodatkowo, metoda IM-MS została wykorzystana do analizy strukturalnej dimerycznych asocjatów kaliksalenów. Wnioski z badań prowadzonych nad tymi specyficznymi układami zostały szczegółowo opisane w części: **Badania własne**.

III. Badania własne

Celem mojej pracy było pogłębienie wiedzy w zakresie wykorzystania spektrometrii ruchliwości jonów (IM-MS) do rozdziału oraz analizy strukturalnej wybranych grup związków organicznych. Spośród różnych metod analitycznych stosowanych do identyfikacji związków organicznych, szczególne miejsce zajmuje spektrometria ruchliwości jonów. Ze względu na możliwość szybkiego rozdziału jonów oraz określania ich trójwymiarowej struktury, metoda ta jest nieustannie rozwijana i staje się niekiedy jedyną metodą do uzyskania szczegółowych informacji na temat budowy przestrzennej badanych jonów.

W pierwszej i drugiej części mojej pracy przedstawiłam wyniki badań, w których spektrometria ruchliwości jonów została wykorzystana do rozdziału związków flawonoidowych. Dodatkowo w tej części pracy zbadalam wpływ gazu buforowego oraz kompleksowania z metalami lub/i z chiralnymi ligandami na rozdział izomerycznych związków flawonoidowych. Flawonoidy są grupą związków organicznych szeroko rozpowszechnioną w przyrodzie. Związki te pełnią funkcję barwników, przeciwutleniaczy oraz wykazują liczne interesujące właściwości biologiczne.⁵³ Ze względu na ogromną różnorodność związków flawonoidowych, jak i powszechnie występującą w nich izomerię, od izomerii konstytucyjnej po izomerię optyczną, istnieje ciągle zapotrzebowanie na rozwój nowych metod analitycznych do ich identyfikacji i strukturalnej charakterystyki. Najczęściej stosowanymi metodami do analizy związków flawonoidowych są wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS),⁵⁴ chromatografia gazowa (GC),⁵⁵ magnetyczny rezonans jądrowy (NMR)⁵⁶, dichroizm kołowy (CD)⁵⁷ oraz spektroskopia w podczerwieni (IR)⁵⁸. Chociaż dostępne metody analityczne zapewniają wysoką czułość analizy, niekiedy nie są one wystarczające do rozdziału izomerycznych flawonoidów. Dlatego też postanowiłam sprawdzić zarówno zalety, jak i wady IM-MS do analizy wybranych flawonoidów reprezentujących różne rodzaje izomerii.

W trzeciej części przedstawiłam wyniki badań dotyczące rozdziału i analizy strukturalnej diastereoizomerycznych związków β -laktamowych za pomocą IM-MS. Dodatkowo zbadalam wpływ kationów metali, gazu buforowego oraz czynników aparaturowych tj. prędkość fali (WV) oraz jej amplitudy, temperatury źródła jonów oraz temperatury desolvatacji na rozdział diastereoizomerycznych β -laktamów. Związki β -laktamowe są szeroko stosowaną i intensywnie badaną grupą związków heterocyklicznych, wykazujących silne działanie przeciwdrobnoustrojowe. Ze względu na ich wysoką aktywność

biologiczną stosowane są jako tzw. antybiotyki β -laktamowe⁵⁹ oraz pełnią rolę cennych półproduktów syntetycznych.⁶⁰ Związki te są badane za pomocą różnych metod chromatograficznych, takich jak wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS),⁶¹ HPLC z detekcją fluorescencyjną⁶² oraz chromatografia par jonowych.⁶³ Innymi metodami, umożliwiającymi analizę związków β -laktamowych są spektroskopia UV-VIS,⁶⁴ kalorymetria,⁶⁵ dichroizm kołowy⁶⁶ oraz magnetyczny rezonans jądrowy.⁶⁷ Ze względu na właściwości biologiczne związków β -laktamowych, syntetyzowane są coraz to nowsze układy zawierające to ugrupowanie, wykazujące różną stereoizomerię na centrach stereogenicznych. Dlatego też istnieje ciągła potrzeba rozwoju nowych metod analitycznych, które umożliwiłyby szybką analizę tych związków. Do tej pory związki te nie były badane za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów.

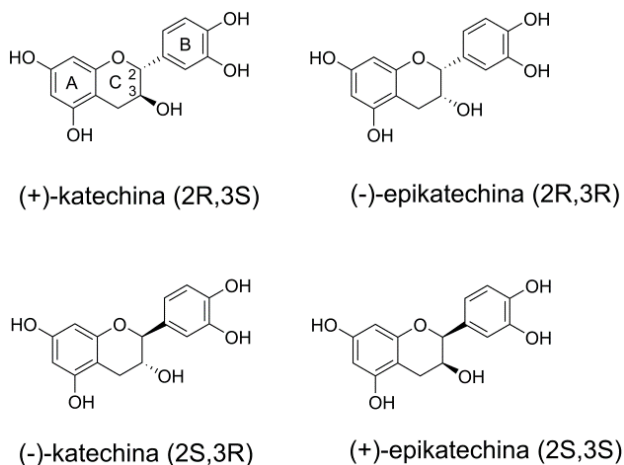
W ostatniej części przedstawiłam możliwości, jakie niesie ze sobą IM-MS, do określenia trójwymiarowych struktur niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -, β - oraz γ -cyklodekstrynami oraz dimerycznych asocjacji kaliksalenów powstałych w wyniku ich samoorganizacji.

Wyniki badań, będące przedmiotem przedłożonej rozprawy doktorskiej zostały już częściowo opublikowane. W rozdziale poświęconym badaniom własnym, zostały zaprezentowane wyniki będące treścią tych publikacji. Ze względu na próby szczegółowego ujęcia uzyskanych wyników, w przedstawionej części znajdują się również elementy do tej pory nieopublikowane.

Ważnym elementem pracy są widma zarejestrowane podczas analizy poszczególnych grup związków organicznych za pomocą IM-MS. Warunki pomiarów przeprowadzonych za pomocą IM-MS, tzn. amplituda fali (WH), prędkość fali (WV) oraz ciśnienia gazów buforowych stosowanych w komorze ruchliwości jonów oraz ciśnienie gazu w komorze helowej, dla wszystkich widm ruchliwości jonów (zwanym również mobilogramami) przedstawionych w niniejszej pracy, zostały umieszczone w części eksperymentalnej. Większość eksperymentów prowadzono z użyciem azotu jako gazu buforowego. Jeśli w eksperymentach stosowany był inny gaz buforowy niż azot, informacja ta została umieszczona w opisie widma. W części eksperymentalnej zostały również przedstawione czasy dryfu oraz wartości przekrojów czynnych związków odniesienia stosowanych w niniejszej pracy, ogólna procedura kalibracyjna oraz krzywe kalibracyjne, na podstawie których zostały wyznaczone eksperymentalne przekroje czynne jonów. Dokładne opisy dotyczące optymalizacji geometrii cząsteczek wybranych związków organicznych i ich jonów zostały przedstawione w części eksperymentalnej.

III.1 Rozdział izomerycznych katechin za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów (IM-MS)

Katechiny należą do związków flawonoidowych, których podstawą struktury są dwa pierścienie fenolowe oznaczone literami A i B (Schemat 1.1). Pierścienie A i B połączone są mostkiem, który poprzez atom tlenu zamykany jest w trzeci pierścień oznaczony literą C. Związki te posiadają dwa centra stereogeniczne w cząsteczce na atomach węgla C2 oraz C3. W związku z tym mogą występować w postaci czterech stereoizomerów, przedstawionych na Schemacie 1.1.

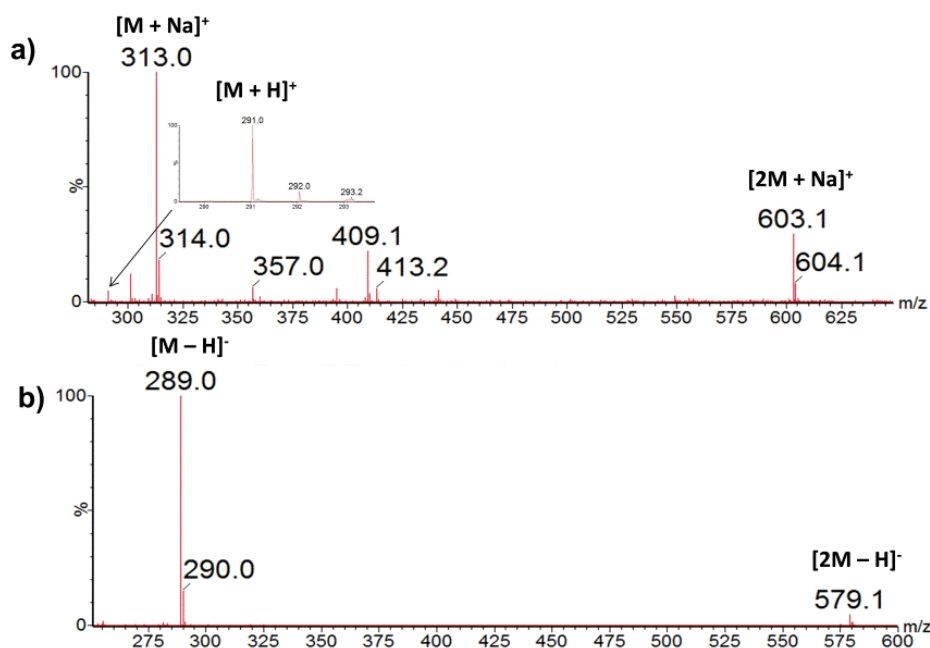


Schemat 20.1. Struktury izomerycznych katechin.

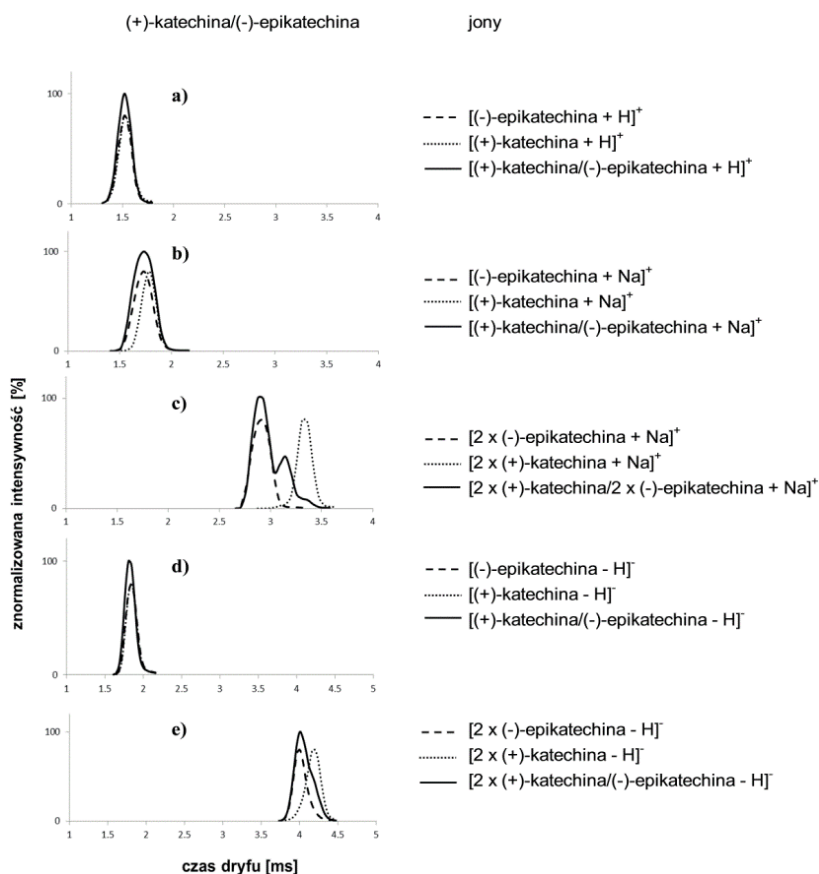
Pomiary ruchliwości jonów przeprowadziłam dla epimerów (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny. Ponadto przeprowadziłam próby rozdziału enancjomerów: (+)-katechina/(-)-katechina oraz (+)-epikatechina/(-)-epikatechina z dodatkiem chiralnego odczynnika. Wyniki badań otrzymane dla epimerów oraz enancjomerów zostały umieszczone odpowiednio w podrozdziale III.1.1 oraz III.1.2.

III.1.1 Rozdział diastereoizomerów katechin: (+)-katechina/(-)-epikatechina

W widmach masowych wykonanych za pomocą techniki elektrosprej dla roztworów związków modelowych (ESI-MS) obserwowałam piki odpowiadające jonom protonowanym $[M+H]^+$, sodowanym $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$ w trybie jonów dodatnich, oraz sygnały pochodzące od deprotonowanych epimerycznych katechin $[M-H]^-$ i $[2M-H]^-$, charakterystyczne dla trybu jonów ujemnych. Przykładowe widma ESI-MS przedstawiłam na Rysunku 1.1. Widma ruchliwości (mobilogramy) poszczególnych rodzajów jonów, zarejestrowane dla roztworów epimerycznych katechin i ich równomolowej mieszaniny zostały przedstawione na Rysunku 1.2. Wartości czasów dryfu (t_d) i rozdzielczości (R_{p-p}) uzyskane na podstawie tych mobilogramów zostały zebrane w Tabeli 1.1.



Rysunek 1.1. Widma ESI-MS zarejestrowane dla roztworów epimerycznych katechin wykonane w trybie jonów **a)** dodatnich i **b)** ujemnych.



Rysunek 1.2. Mobilogramy jonów: **a)** $[M+H]^+$, **b)** $[M+Na]^+$, **c)** $[2M+Na]^+$, **d)** $[M-H]^-$ i **e)** $[2M-H]^-$ zarejestrowane dla roztworów epimerycznych katechin i ich równomolowej mieszaniny (linia ciągła).

Tabela 5.1. Czasy dryfu (t_d) [ms] i wartości rozdzielczości (R_{p-p}) jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M-H]^-$ oraz $[2M-H]^-$ epimerycznych katechin.

| jon | m/z | czas dryfu, t_d [ms] | | R_{p-p} |
|-------------|-------|------------------------|------------------|-----------|
| | | M= (-)-epikatechina | M= (+)-katechina | |
| $[M+H]^+$ | 291,0 | 1,52 | 1,52 | 0,00 |
| $[M+Na]^+$ | 313,0 | 1,74 | 1,79 | 0,16 |
| $[2M+Na]^+$ | 603,1 | 2,93 | 3,31 | 1,30 |
| $[M-H]^-$ | 289,0 | 1,85 | 1,85 | 0,00 |
| $[2M-H]^-$ | 579,1 | 4,00 | 4,20 | 0,47 |

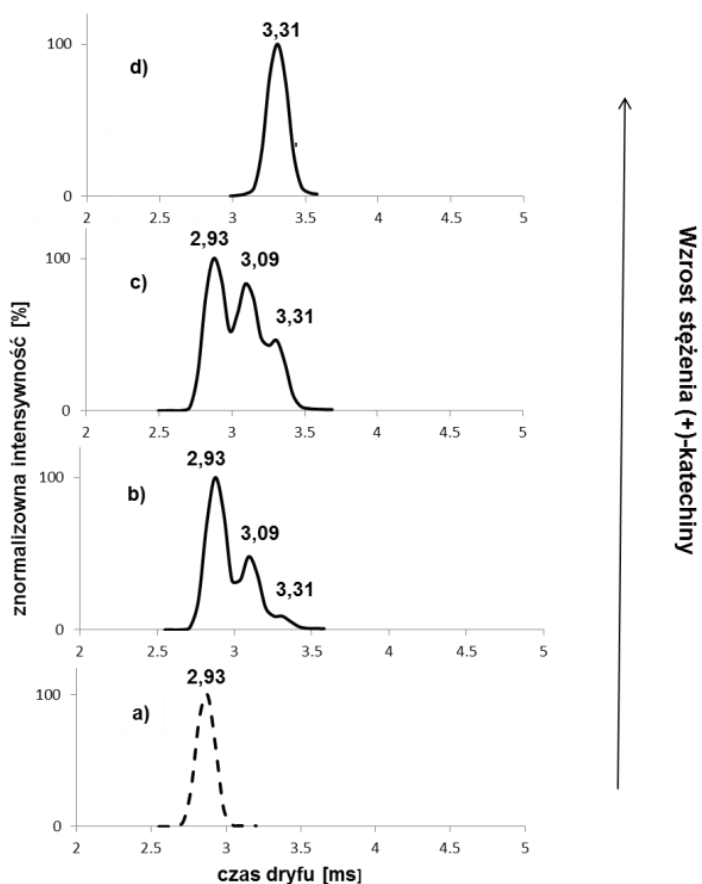
Różnice w czasach dryfu jonów naładowanych dodatnio: protonowanych $[M+H]^+$ i sodowanych $[M+Na]^+$, jak również jonów naładowanych ujemnie: $[M-H]^-$ i $[2M-H]^-$ dwóch epimerycznych katechin nie są wystarczające, aby można było je rozróżnić za pomocą techniki T-Wave IMS.

Jak wspomniałam w części literaturowej, czas dryfu jest wielkością ściśle powiązaną z przekrojem czynnym jonu, a tym samym z jego trójwymiarową strukturą. Możliwości spektrometrów ruchliwości jonów do rozdziału związków organicznych o zbliżonych przekrojach czynnych są ściśle związane ze zdolnością rozdzielczą spektrometru. W przypadku spektrometrów ruchliwości jonów charakteryzujących się niską zdolnością

rozdzielczą (np. dla spektrometru SYNAPT G2 HDMS wynosi ona $\sim 45^{68}$) niewielkie różnice w przekrojach czynnych jonów uniemożliwiają ich rozróżnienie.

Brak rozdziału badanych jonów może więc wynikać z niedostatecznej zdolności rozdzielczej spektrometru i niewielkich różnic w przekrojach czynnych (Ω) między jonami (+)-katechiny i (-)-epikatechiny. Szczegółowa analiza strukturalna i obliczenia teoretycznych wartości przekrojów czynnych dla badanych związków, omówione przeze mnie w dalszej części mojej pracy, wskazują jednoznacznie na małą różnicę w przekrojach czynnych (+)-katechiny i (-)-epikatechiny wynoszącą $\sim 1 \text{ \AA}^2$.

Na mobilogramie jonu $[2M+Na]^+$ zarejestrowanym dla równomolowej mieszaniny katechin (Rysunek 1.2.c), oprócz pików pochodzących od poszczególnych epimerów o czasach dryfu 2,93 ms ((-)-epikatechina) oraz 3,31 ms ((+)-katechina), obserwowałam także dodatkowy pik o czasie dryfu 3,09 ms. Aby wyjaśnić pochodzenie tego dodatkowego sygnału wykonałam pomiary ruchliwości jonu $[2M+Na]^+$ dla roztworów epimerycznych katechin o różnym stosunku molowym (+)-katechiny do (-)-epikatechiny. Stężenie (-)-epikatechiny utrzymywałam na stałym poziomie, natomiast stężenie (+)-katechiny sukcesywnie zwiększałam. Wyniki tych pomiarów ilustruje Rysunek 1.3. Wraz ze wzrostem stężenia (+)-katechiny zwiększa się intensywność pików o czasach dryfu 3,09 ms oraz 3,31 ms. W związku z tym, prawdopodobnym wyjaśnieniem obecności dodatkowego pików na mobilogramie jonu $[2M+Na]^+$ jest powstawanie mieszanego dimeru AH^+B ($t_d = 3,09 \text{ ms}$), gdzie A oznacza (-)-epikatechinę, zaś B oznacza (+)-katechinę.



Rysunek 1.3. Mobilogramy jonu $[2M+Na]^+$ zarejestrowane dla roztworów o różnym stosunku molowym (-)-epikatechiny do (+)-katechiny: **a)** 1:0, **b)** 1:1, **c)** 1:3 i **d)** 0:1.

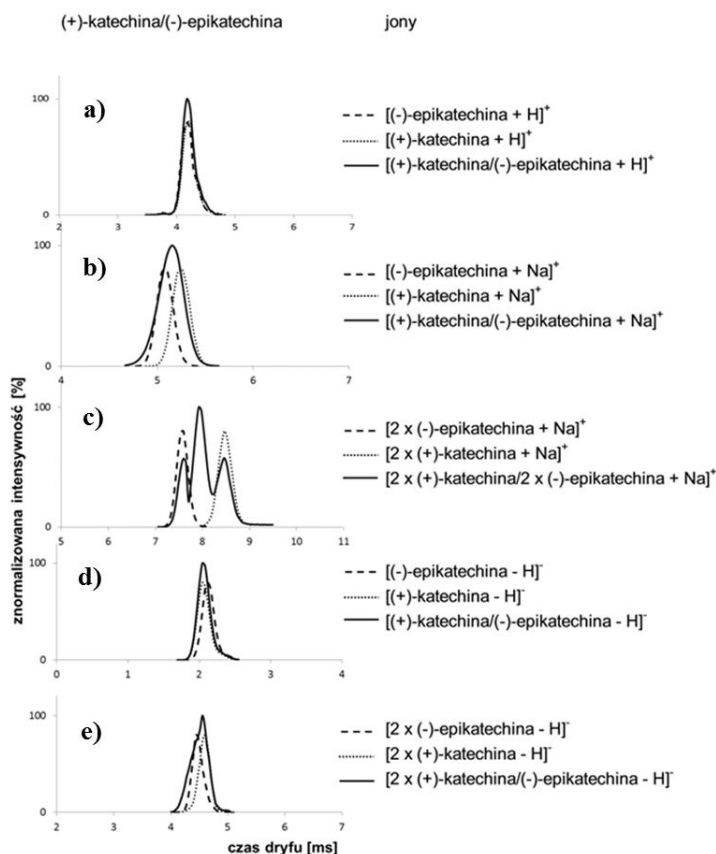
Zgodnie z przedstawionymi w części literaturowej informacjami istnieje kilka sposobów umożliwiających poprawę rozdzielności związków posiadających bardzo podobne czasy dryfu w skali pomiarów ruchliwości jonów. Może to być zmiana gazu buforowego, a także wytworzenie specyficznych oddziaływań analizowanych cząsteczek z kationami metali lub/i z chiralnymi ligandami. Oddziaływania te mogą indukować rozróżnienie strukturalne cząsteczek - czyli zwiększyć różnice przekrojów czynnych odpowiadających im jonów, umożliwiając tym samym ich rozdzielanie. Jednakże, aby wywołać rozróżnienie strukturalne, ligandy powinny w specyficzny sposób oddziaływać z badaną cząsteczką, jak również kompleksy powinny tworzyć się selektywnie, tzn. cząsteczka w wyniku różnego typu oddziaływań międzycząsteczkowych z ligandem powinna preferować tworzenie jednego z dwóch lub większej liczby możliwych izomerycznych kompleksów. Ponadto, ze względu na zwiększone ciśnienie w komorze ruchliwości jonów, kompleksy powinny charakteryzować się wysokimi stałymi asocjacji i wysoką stabilnością w fazie gazowej, aby zachować czułość analizy na wystarczającym poziomie.

W celu otrzymania odpowiednich asocjatów spełniających powyższe warunki przeprowadziłam badania przesiewowe epimerycznych katechin z kationami metali lub/i chiralnymi ligandami takimi jak: *D*- i *L*-aminokwasy. Ponadto przeprowadziłam również badania z chiralnym eterem koronowym oraz heptakis-(2,6-di-O-metylo)- β -cyklodekstryną. Tabela 1.4 (str. 60) przedstawia wszystkie kombinacje, które zostały przetestowane pod kątem uzyskania rozdziału dla pary (-)-epikatechina/(+)-katechina.

a) Wpływ gazu buforowego na rozdział izomerycznych katechin

Do badań wpływu rodzaju gazu buforowego na rozdział epimerycznych katechin wybrałam azot oraz dwutlenek węgla, różniące się masą i polaryzowalnością (Tabela 2, część literaturowa). Widma ruchliwości jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M-H]^-$ oraz $[2M-H]^-$ zarejestrowane dla CO₂ jako gazu buforowego przedstawiłam na Rysunku 1.4. W Tabeli 1.2 zebrałam wartości czasów dryfu (t_d) i rozdzielczości (R_{p-p}) uzyskane na podstawie zarejestrowanych widm.

Zastosowanie CO₂ spowodowało zwiększenie wartości R_{p-p} dla jonów $[M+Na]^+$ z 0,16 dla N₂ (Tabela 1.1) do 0,36 dla CO₂ (Tabela 1.2). Wzrost ten nie był jednak wystarczający do rozróżnienia epimerycznych katechin w ich równomolowej mieszaninie. W przypadku jonów $[2M+Na]^+$ (Rysunek 1.4.c) rozdział epimerycznych katechin został zakłócony obecnością piku pochodzącego od dimeru mieszanego.



Rysunek 1.4. Mobilogramy jonów: **a)** [M+H]⁺, **b)** [M+Na]⁺, **c)** [2M+Na]⁺, **d)** [M-H]⁻ i **e)** [2M-H]⁻ zarejestrowane dla roztworów epimerycznych katechin i ich równomolowej mieszaniny (linia ciągła). CO₂ – gaz buforowy.

Tabela 1.2. Czasy dryfu (*t_d*) [ms] i wartości rozdzielczości (*R_{p-p}*) jonów [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [2M+Na]⁺, [M-H]⁻ oraz [2M-H]⁻ dla epimerycznych katechin. CO₂ – gaz buforowy.

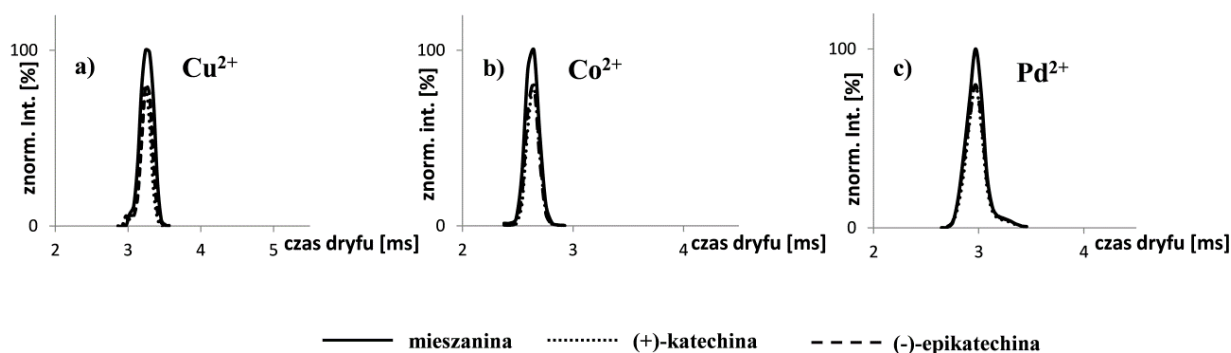
| jon | <i>m/z</i> | czas dryfu, <i>t_d</i> [ms] | | <i>R_{p-p}</i> |
|----------------------|------------|---------------------------------------|-------------------|------------------------|
| | | M= (-)-epikatechinal | M= (+)-katechinal | |
| [M+H] ⁺ | 291,0 | 4,17 | 4,17 | 0,00 |
| [M+Na] ⁺ | 313,0 | 4,95 | 5,26 | 0,36 |
| [2M+Na] ⁺ | 603,1 | 7,79 | 8,68 | 1,85 |
| [M-H] ⁻ | 289,0 | 2,11 | 2,04 | 0,08 |
| [2M-H] ⁻ | 579,1 | 4,43 | 4,59 | 0,45 |

b) Wpływ metali przejściowych na rozdział izomerycznych katechin.

W kolejnym etapie zastosowałam kationy metali przejściowych: Cu²⁺, Cu⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Pd²⁺ oraz Sr²⁺ do wytworzenia specyficznych oddziaływań kation metalu - obojętna cząsteczka, które mogłyby wprowadzić rozróżnienie izomerycznych katechin.

W widmach ESI-MS obserwowałam piki pochodzące od kompleksów typu [(+)-katechinal/(-)-epikatechinal + Metal²⁺ - 3H]⁻, gdzie Metal²⁺ oznacza Cu²⁺, Co²⁺ oraz Pd²⁺. Dla kationów cynku i strontu nie zaobserwowałam sygnałów pochodzących od odpowiednich

asocjatorów. Widma ruchliwości jonów zarejestrowane dla wyżej wymienionych kompleksów przedstawiłam na Rysunku 1.5. Czasy dryfu jonów [(+)-katechyna/(-)-epikatechyna + Metal²⁺ - 3H]⁻ są identyczne dla epimerycznych katechin i wynoszą odpowiednio, 3,25 ms, 2,75 ms i 2,93 ms, w zależności od rodzaju kationu metalu. Otrzymane wyniki wskazują, że epimeryczne katechiny w wyniku oddziaływań z badanymi kationami metali przyjmują konformacje charakteryzujące się bardzo zbliżonymi przekrojami czynnymi. Podsumowanie otrzymanych wyników zostało przedstawione w Tabeli 1.4 (str. 60)



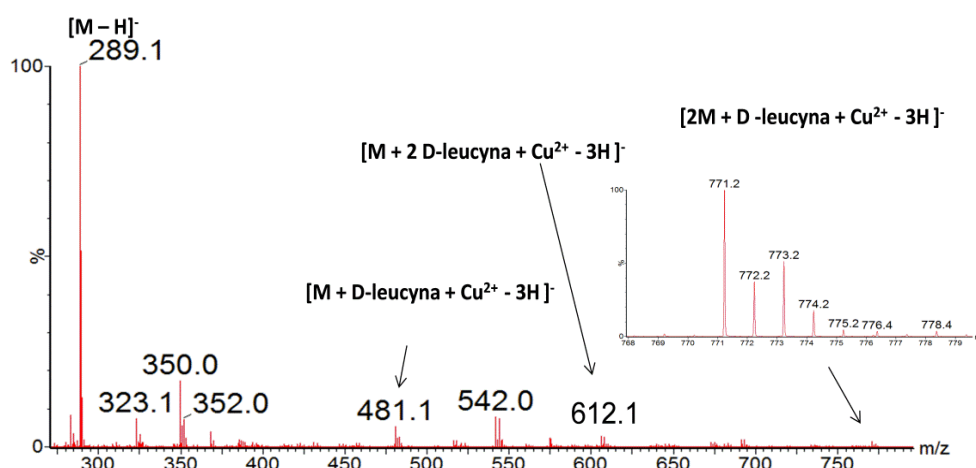
Rysunek 1.5. Mobilogramy jonów typu [(+)-katechyna/(-)-epikatechyna + Metal²⁺ - 3H]⁻, gdzie Metal²⁺ oznacza a) Cu²⁺, b) Co²⁺ oraz c) Pd²⁺ zarejestrowane dla roztworów epimerycznych katechin oraz ich równomolowej mieszaniny.

c) Wpływ oddziaływań z chiralnymi związkami oraz kationami metali na rozdział diastereoizomerycznych katechin

Opisane wcześniej eksperymenty wykazały, że oddziaływanie diastereoizomerycznych katechin z kationami Cu²⁺, Co²⁺ oraz Pd²⁺ nie prowadzi do ich rozdzielenia. W związku z tym postanowiłam dodatkowo wprowadzić chiralny związek, który mógłby selektywnie i specyficznie łączyć się z badanymi katechinami, różnicując ich czasy dryfu. Chiralnymi związkami o potencjalnych właściwościach różnicujących czasy dryfu katechin były następujące aminokwasy: *D*-, *L*-alanina; *D*-, *L*-leucyna; *D*-, *L*-prolina; *D*-, *L*-kwas glutaminowy; *D*-, *L*-arginina. Związki te wybrałam do badań ze względu na ich dostępność w postaci enancjomerycznie czystej oraz ze względu na różnorodną budowę łańcucha bocznego połączonego z węglem α.

Aby dowiedzieć się, czy kompleksy między epimerycznymi katechinami, jonami metali oraz *D*-, *L*-aminokwasami tworzą się i są stabilne w fazie gazowej, w pierwszej kolejności wykonałam pomiary za pomocą techniki elektrosprej. W widmach ESI-MS wykonanych

w trybie jonów dodatnich obserwowałam jedynie sygnały odpowiadające jonom $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$ epimerycznych katechin i aminokwasów. W widmach masowych zarejestrowanych w trybie jonów ujemnych oprócz jonów $[M-H]^-$ katechin zaobserwowałam dodatkowo jony pochodzące od następujących asocjatów: $[M + D-/L\text{-aminokwas} + \text{Metal}^{2+} - 3H]^-$, $[2M + D-/L\text{-aminokwas} + \text{Metal}^{2+} - 3H]^-$ oraz $[M + 2D-/2L\text{-aminokwas} + \text{Metal}^{2+} - 3H]^-$. Na Rysunku 1.6 przedstawiłam przykładowe widmo ESI-MS zarejestrowane dla kompleksów epimerycznych katechin z *D*-leucyną oraz jonami Cu^{2+} . Dla każdego jonu zostały przeprowadzone pomiary wysokiej rozdzielczości (HR), które potwierdziły, że obserwowane sygnały pochodzą od wyżej wymienionych kompleksów: m/z 481,1 – $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{NO}_8\text{Cu}$ (błąd pomiaru -0,6 ppm), m/z 612,1 – $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Cu}$ (błąd pomiaru -0,7 ppm), m/z 771,2 – $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{NO}_{14}\text{Cu}$ (błąd pomiaru -0,9 ppm). Ponadto dla każdego jonu została przeprowadzona fragmentacja, która dodatkowo potwierdziła powstawanie wyżej wymienionych kompleksów.

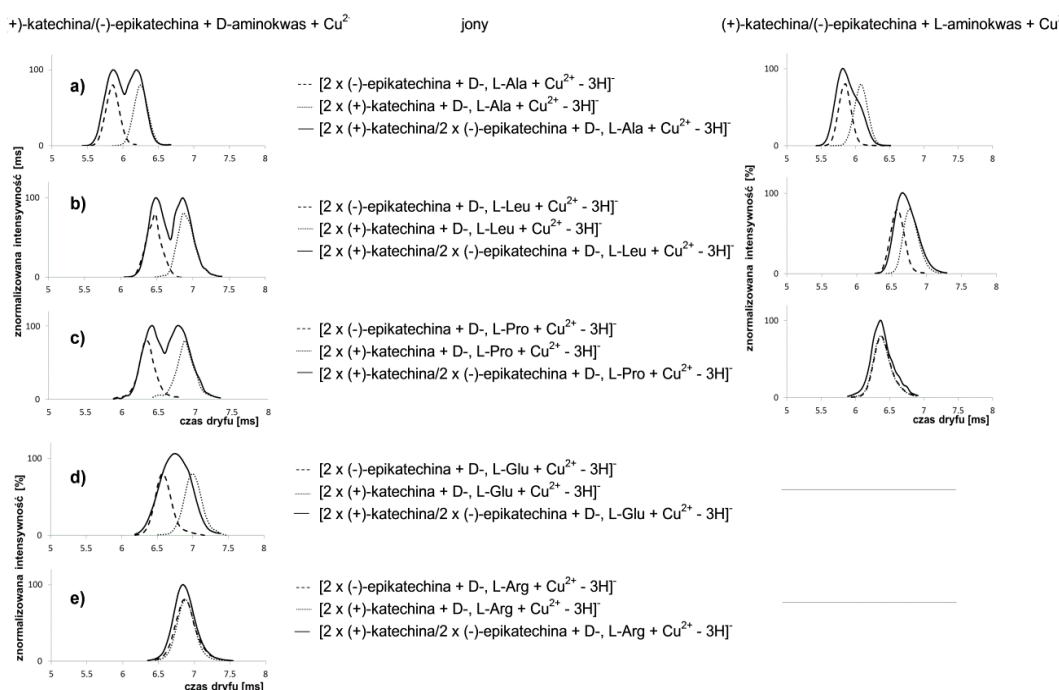


Rysunek 1.6. Widmo ESI-MS zarejestrowane w trybie jonów ujemnych dla kompleksów epimerycznych katechin z *D*-leucyną oraz jonami Cu^{2+} .

Pomiary ruchliwości jonów odpowiadających obserwowanym w widmie masowym asocjatom wykazały, że tylko dla kompleksów typu $[2M + D\text{-alanina} + \text{Cu}^{2+} - 3H]^-$, $[2M + D\text{-leucyna} + \text{Cu}^{2+} - 3H]^-$ oraz $[2M + D\text{-prolina} + \text{Cu}^{2+} - 3H]^-$ widać wyraźne zróżnicowanie czasów dryfu między poszczególnymi katechinami, umożliwiające ich rozdział w mieszaninie. Widma ruchliwości jonów odpowiadających asocjatom typu $[2M + D\text{-, } L\text{-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3H]^-$ zostały przedstawione na Rysunku 1.7. Dodatkowo w Tabeli 1.3 zestawiałam czasy dryfu (t_d) oraz wartości R_{p-p} dla tych kompleksów, dla których rozdział był obserwowany, tzn. wartość R_{p-p} była większa bądź równa 0,60. Wartym podkreślenia jest również fakt, że czasy dryfu kompleksów odpowiadających wzorom ogólnym $[M + D-/L\text{-$

aminokwas + $\text{Cu}^{2+} - 3\text{H}^-$ oraz $[\text{M} + 2\text{D-}/2\text{L-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}^-]$ zarówno dla (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny były identyczne. Przykładowe mobilogramy jonów dla powyższych kompleksów przedstawiłam na Rysunku 1.8. Wyniki badań nad wpływem obecności *D*-, *L*-aminokwasów i kationów metali na rozdział epimerycznych katechin są zebrane w Tabeli 1.4 (str. 60). Asocjaty zawierające kwas *L*-glutaminowy (Rysunek 1.7.d) oraz *L*-argininę (Rysunek 1.7.e) nie były obserwowane. Ze względu na brak rozdziału dla kompleksów z kwasem *D*-glutaminowym oraz *D*-argininą w dalszej części pracy przedstawiłam wyniki tylko dla *D*-, *L*-alaniny, *D*-, *L*-leucyny oraz *D*-, *L*-proliny.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że tylko aminokwasy hydrofobowe, takie jak *D*-alanina, *D*-leucyna oraz *D*-prolina oddziałują selektywnie z poszczególnymi katechinami oraz jonami miedzi, tworząc kompleksy o różnych strukturach, które można rozróżnić za pomocą IM-MS. Obecność jonów miedzi w powstałych kompleksach związana może być z jej dużym powinowactwem do aminokwasów.⁶⁹ Właściwość ta jest wykorzystywana do analizy enancjomerycznych *D*-, *L*-aminokwasów za pomocą metod kinetycznych.⁷⁰



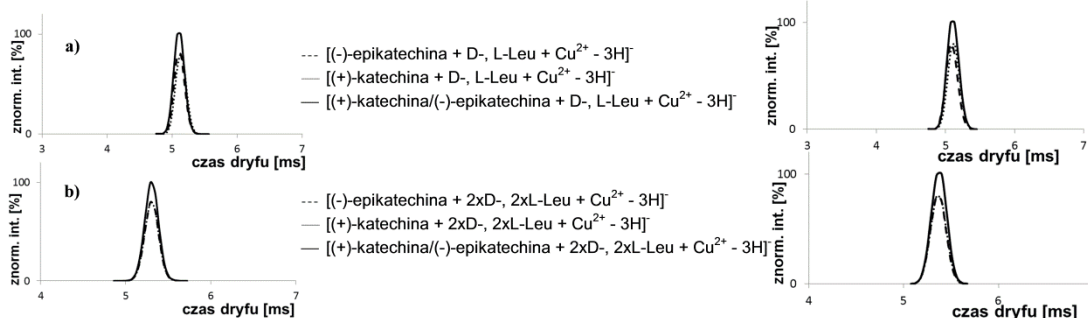
Rysunek 1.7. Mobilogramy jonów $[2\text{M} + \text{D-}/\text{L-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}^-]$ zarejestrowane dla roztworów zawierających epimeryczne katechiny (1:1), Cu^{2+} i a) *D*-, *L*-alaninę, b) *D*-, *L*-leucynę, c) *D*-, *L*-prolinę, d) kwas *D*-glutaminowy oraz e) *D*-argininę.

Tabela 1.3. Czasy dryfu (t_d) [ms] oraz wartości rozdzielczości (R_{p-p}) dla kompleksów typu $[2M + D\text{-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$. t_{d1} oraz t_{d2} są czasami dryfu jonów odpowiadających kompleksom odpowiednio z (-)-epikatechiną i (+)-katechiną.

| jon | czas dryfu, t_d [ms] | | R_{p-p} |
|--|------------------------|----------|-----------|
| | t_{d1} | t_{d2} | |
| $[2M + D\text{-alanina} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ | 5,86 | 6,29 | 0,61 |
| $[2M + D\text{-leucyna} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ | 6,48 | 6,86 | 0,71 |
| $[2M + D\text{-prolina} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ | 6,43 | 6,75 | 0,60 |

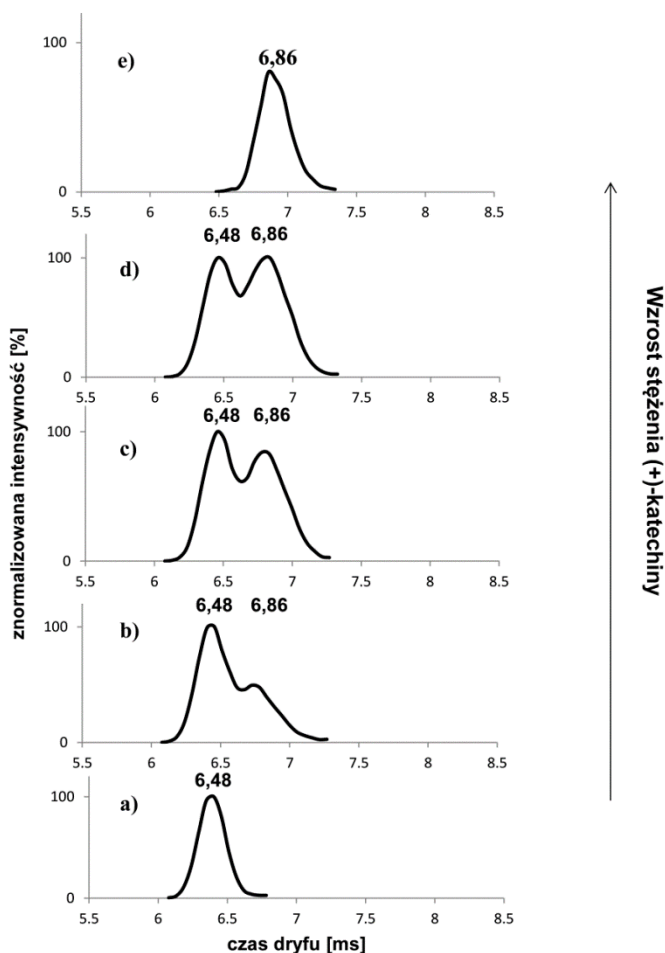
(+)-katechina/(-)-epikatechina + D-aminokwas + Cu^{2+} jony

(+)-katechina/(-)-epikatechina + L-aminokwas + Cu^{2+}



Rysunek 1.8. Przykładowe mobilogramy jonów **a)** $[M + D\text{-}/L\text{-leucyna} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ oraz **b)** $[M + 2D\text{-}/L\text{-leucyna} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$.

Analizując mieszaninę epimerycznych katechin, należy wziąć pod uwagę możliwość tworzenia mieszanego kompleksu. Aby mieć pewność, że tworzenie kompleksu następuje selektywnie między dwiema identycznymi diastereoizomerycznymi katechinami przeprowadziłam eksperymenty dla kompleksów epimerycznych katechin z *D*-leucyną oraz z jonami Cu^{2+} , w których stężenie (-)-epikatechiny utrzymywałam na stałym poziomie zaś stężenie (+)-katechiny odpowiednio zwiększałam. Wyniki z otrzymanych pomiarów przedstawiłam na Rysunku 1.9. Poniższe widma ruchliwości jonów wyraźnie wskazują, że zwiększenie stężenia (+)-katechiny w obecności nadmiaru (-)-epikatechiny nie prowadzi do powstawania piku odpowiadającego mieszanemu kompleksowi, jak to miało miejsce w przypadku jonów $[2M+\text{Na}]^+$ przedstawionych na Rysunku 1.3. Na tej podstawie mogę stwierdzić, że mieszany dimer nie tworzy się w omawianym przypadku.



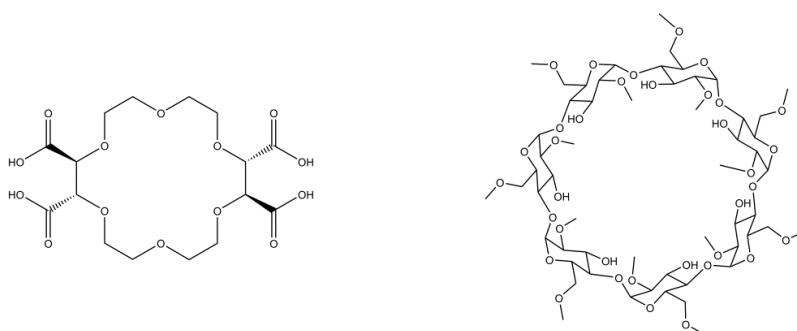
Rysunek 1.9. Mobilogramy jonów $[2M + D\text{-leucyna} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ zarejestrowane dla roztworów o różnym stosunku molowym (-)-epikatechiny do (+)-katechiny **a)** 1:0, **b)** 1:0,2, **c)** 1:0,5, **d)** 1:1 i **e)** 0:1.

d) Wpływ kompleksowania z eterem koronowym oraz cyklodekstryną na rozdział izomerycznych katechin

Kontynuacją powyższych badań było kompleksowanie epimerycznych katechin z chiralnym eterem koronowym oraz cyklodekstryną. Etery koronowe oraz cyklodekstryny stosowane są w chemii supramolekularnej do rozpoznania molekularnego.⁷¹ Ze względu na podwójny charakter hydrofobowo-hydrofilowy cząsteczek cyklodekstryn, posiadają one zdolność do rozpoznawania molekularnego w wyniku tworzenia kompleksów inkluzyjnych (typu „gospodarz-gość”) z różnymi ligandami. Zdolność (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny do tworzenia kompleksów inkluzyjnych z β -cyklodekstryną była szczegółowo zbadana za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego, mikrokalorymetrii oraz modelowania molekularnego.⁷² Obliczenia teoretyczne wykazały, że (+)-katechina oraz (-)-epikatechina mogą tworzyć z β -CD różne kompleksy inkluzyjne, w zależności od konformeru katechin.

W swoich badaniach zastosowałam kwas (-)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarboksylowy (eter koronowy) oraz heptakis-(2,6-di-O-metylo)- β -cyklodekstrynę (DiMe- β -CD) przedstawione na Schemacie 1.2. Na widmach ESI-MS obserwowałam sygnały pochodzące od jonów $[M + \text{eter koronowy} + H]^+$, $[M + \text{DiMe-}\beta\text{-CD} + H]^+$ w trybie jonów dodatnich oraz $[M + \text{eter koronowy} - H]^-$, $[M + \text{DiMe-}\beta\text{-CD} - H]^-$ w trybie jonów ujemnych.

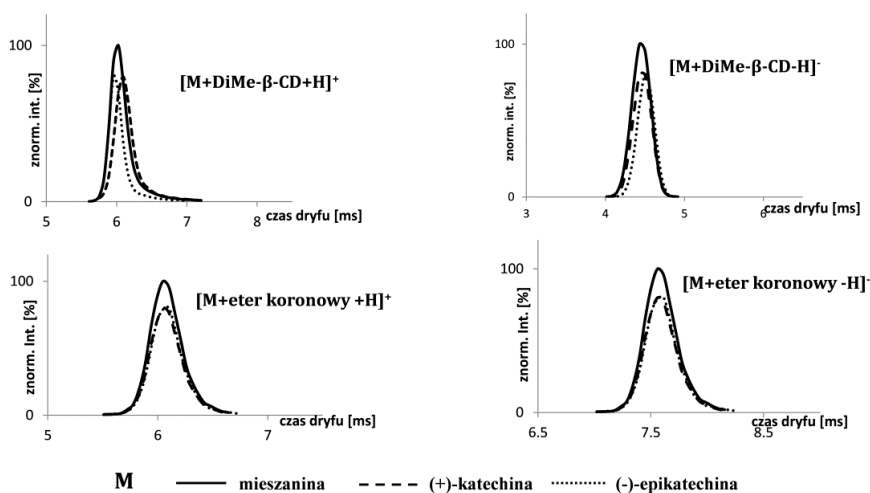
Pomiary IM-MS dla powyższych jonów zilustrowałam na Rysunku 1.10. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że pomimo wielu możliwości wiązania (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny przez cyklodekstrynę ich rozdział nie jest możliwy, ze względu na zbliżone lub identyczne czasy dryfu, a tym samym przekroje czynne jonów. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku kompleksowania katechin z eterem koronowym.



kwas (-)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarboksylowy

heptakis-(2,6-di-O-metylo)- β -cyklodekstryna

Schemat 1.2. Struktury wybranych związków makrocyklicznych.



Rysunek 1.10. Mobilogramy jonów $[M + \text{DiMe-}\beta\text{-CD} + H]^+$, $[M + \text{DiMe-}\beta\text{-CD} - H]^-$, $[M + \text{eter koronowy} + H]^+$ oraz $[M + \text{DiMe-}\beta\text{-CD} - H]^-$.

Wszystkie kombinacje oraz ich wyniki, które przeprowadziłam pod kątem uzyskania rozdziału dla pary (+)-katechyna/(-)-epikatechyna przedstawiłam w Tabeli 1.4. Czerwonym

kolorem zaznaczyłam te przypadki, dla których uzyskałam pozytywny wynik, tzn. rozdział diastereoizomerycznych katechin.

Tabela 1.4. Wpływ obecności różnych związków chiralnych i/lub kationów metali na rozdział epimerycznych katechin.

| chiralny ligand | kation metalu | jony | <i>m/z</i> | rozdziel |
|------------------|------------------------|--|---------------|----------|
| | Cu ²⁺ | [M+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 349,99 | - |
| | Cu ⁺ | [M+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 349,99 | - |
| | Co ²⁺ | [M+Co ²⁺ -3H] ⁻ | 345,99 | - |
| | Zn ²⁺ | - | - | - |
| | Pd ²⁺ | [M+Pd ²⁺ -3H] ⁻ | 392,99 | - |
| | | [2M+Pd ²⁺ -3H] ⁻ | 683,04 | - |
| | Sr ²⁺ | - | - | - |
| D-leucyna | Cu²⁺ | [M+D-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 481,08 | - |
| | | [M+2D-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 612,17 | - |
| | | [2M+D-leucyna+Cu²⁺-3H]⁻ | 771,16 | + |
| D-leucyna | Cu⁺ | [M+D-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 481,08 | - |
| | | [M+2D-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 612,17 | - |
| | | [2M+D-leucyna+Cu ¹⁺ -3H] ⁻ | 772,06 | - |
| | | [2M+D-leucyna+Cu²⁺-3H]⁻ | 771,16 | + |
| D-leucyna | Co ²⁺ | [M+D-leucyna+Co ³⁺ -4H] ⁻ | 476,08 | - |
| | | [M+2D-leucyna+Co ³⁺ -4H] ⁻ | 607,17 | - |
| D-leucyna | Pd ²⁺ | [M+D-leucyna+Pd ²⁺ -3H] ⁻ | 524,05 | - |
| | | [M+2D-leucyna+Pd ²⁺ -3H] ⁻ | 655,15 | - |
| | | [2M+D-leucyna+Pd ²⁺ -3H] ⁻ | 814,13 | - |
| D-leucyna | Sr ²⁺ | - | - | - |
| D-leucyna | Zn ²⁺ | - | - | - |
| L-leucyna | Cu ²⁺ | [M+L-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 481,15 | - |
| | | [M+2L-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 612,16 | - |
| | | [2M+L-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 771,24 | - |
| L-leucyna | Cu ⁺ | [M+L-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 481,15 | - |
| | | [M+2L-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 612,17 | - |
| | | [2M+L-leucyna+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 771,24 | - |
| L-leucyna | Co ²⁺ | [M+L-leucyna+Co ³⁺ -4H] ⁻ | 476,08 | - |
| | | [M+2L-leucyna+Co ³⁺ -4H] ⁻ | 607,17 | - |
| L-leucyna | Pd ²⁺ | [M+L-leucyna+Pd ²⁺ -3H] ⁻ | 524,25 | - |
| | | [M+2L-leucyna+Pd ²⁺ -H] ⁻ | 655,15 | - |
| | | [2M+L-leucyna+Pd ²⁺ -3H] ⁻ | 814,13 | - |
| L-leucyna | Sr ²⁺ | - | - | - |
| L-leucyna | Zn ²⁺ | - | - | - |
| D-prolina | Cu²⁺ | [M+D-prolina+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 465,05 | - |
| | | [2M+D-prolina+Cu²⁺-3H]⁻ | 755,13 | + |
| D-prolina | Cu ⁺ | [M+D-prolina+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 465,05 | - |
| | | [2M+D-prolina+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 755,13 | + |
| D-prolina | Co ²⁺ | [M+D-prolina+Co ²⁺ -3H] ⁻ | 461,05 | - |
| | | [M+2D-prolina+Co ²⁺ -3H] ⁻ | 576,11 | - |
| | | [M+2D-prolina+Co ³⁺ -3H] ⁻ | 575,11 | - |
| D-prolina | Pd ²⁺ | [M+D-prolina+Pd ²⁺ -3H] ⁻ | 508,02 | - |
| | | [M+2D-prolina+Pd ²⁺ -3H] ⁻ | 623,08 | - |
| L-prolina | Cu ²⁺ | [M+L-prolina+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 465,05 | - |
| | | [M+2L-prolina+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 580,11 | - |
| | | [2M+L-prolina+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 755,13 | - |
| L-prolina | Cu ⁺ | [M+L-prolina+Cu ²⁺ -3H] ⁻ | 465,05 | - |

| | | | | |
|-------------------------|------------------------|--|---------------|----------|
| | | $[2M+L\text{-prolina}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 755,13 | - |
| L-prolina | Co ²⁺ | $[M+L\text{-prolina}+Co^{2+}-3H]^-$ | 461,05 | - |
| | | $[M+2L\text{-prolina}+Co^{2+}-3H]^-$ | 576,11 | - |
| | | | | |
| L-prolina | Pd ²⁺ | $[M+L\text{-prolina}+Pd^{2+}-3H]^-$ | 508,02 | - |
| | | $[M+2L\text{-proline}+Pd^{2+}-3H]^-$ | 623,09 | - |
| | | | | |
| D-alanina | Cu²⁺ | $[M+D\text{-alanina}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 439,00 | - |
| | | $[2M+D\text{-alanina}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 729,10 | + |
| L-alanina | Cu ²⁺ | $[M+L\text{-alanina}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 439,00 | - |
| | | $[2M+L\text{-alanina}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 729,10 | - |
| D-kwas glutaminowy | Cu ²⁺ | $[M+D\text{-kwas glutaminowy}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 497,00 | - |
| | | $[2M+D\text{-kwas glutaminowy}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 787,10 | - |
| L-kwas glutaminowy | Cu ²⁺ | - | - | - |
| D-arginina | Cu ²⁺ | $[M+D\text{-arginina}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 524,10 | - |
| | | $[M+D\text{-arginina}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 698,20 | - |
| | | $[2M+D\text{-arginina}+Cu^{2+}-3H]^-$ | 814,20 | - |
| L-arginina | Cu ²⁺ | - | - | - |
| chiralny eter koronowy* | | $[M+eter+H]^+$ | 731,20 | - |
| | | $[M+eter-H]$ | 729,20 | - |
| DiMe-β-CD** | | $[M+DiMe\text{-}\beta\text{-CD}+H]^+$ | 1621,68 | - |
| | | $[M+DiMe\text{-}\beta\text{-CD}-H]^-$ | 1619,65 | - |

*kwas (-)-(18-korona-6)-2,3,11,12-tetrakarboksyłowy

** heptakis-(2,6-di-O-metylo)-β-cyklodekstryna

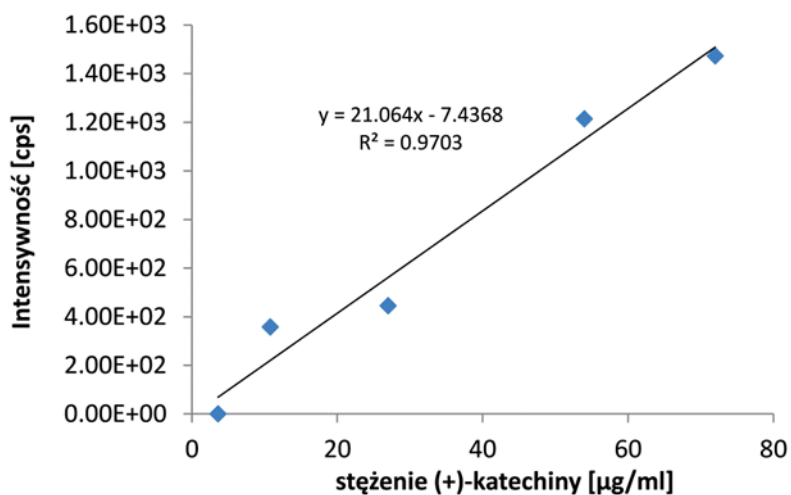
+ oznacza rozdział dla $R_{p-p} \geq 0,60$

- oznacza brak rozdziału

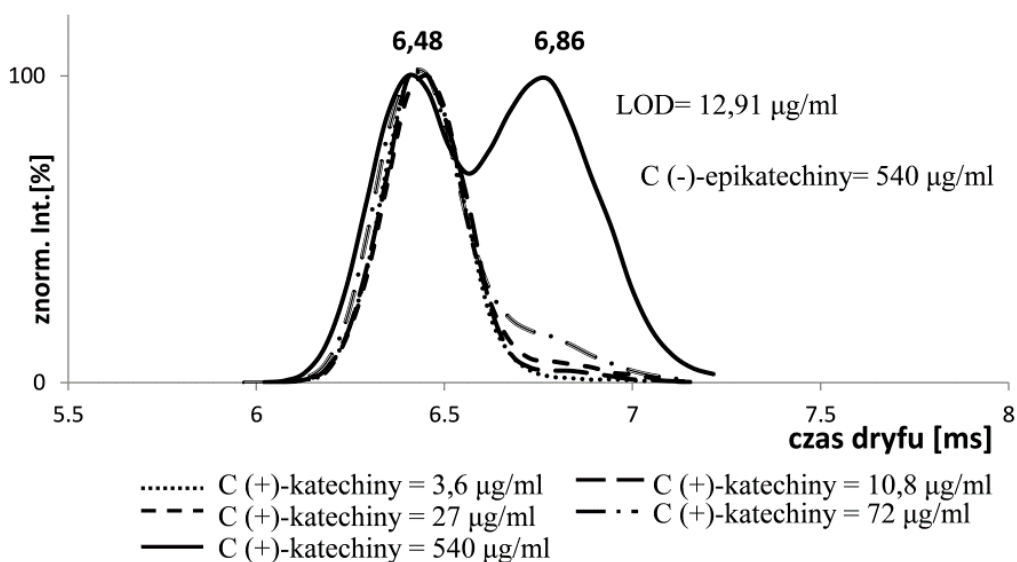
d) Wyznaczanie granicy wykrywalności (LOD) metody IM-MS

Aby ocenić zdolność metody IM-MS do analizy badanych kompleksów, oszacowałam granicę wykrywalności (*Limit of Detection*, LOD), czyli najmniejszego stężenia substancji jakie jest możliwe do wykrycia za pomocą danej metody z określonym prawdopodobieństwem. Obliczenia wykonałam w oparciu o następujące równanie $LOD = 3SD/a$, gdzie SD jest odchyleniem standardowym, natomiast a opisuje nachylenie krzywej kalibracyjnej.

Pomiary wykonałam w trybie IM/MS² dla kompleksu typu $[2M + D\text{-leucyna} + Cu^{2+} - 3H]^-$. Krzywa kalibracji, na podstawie której wyznaczyłam LOD, została przedstawiona na Rysunku 1.11. Stężenie (+)-katechiny mieściło się w zakresie 3,6 - 72 µg/ml, przy stałym stężeniu (-)-epikatechiny wynoszącym 540 µg/ml. Względne odchylenie standardowe (RSD) dla pięciu roztworów z trzykrotnym powtórzeniem dla każdego stężenia wyniosło 2,55%. Dla analizowanego kompleksu wartość LOD wyniosła 12,9 µg/ml, co stanowi mniej niż 2,4% całkowitego stężenia (-)-epikatechiny. Widma kalibracyjne dla kompleksu $[2M + D\text{-leucyna} + Cu^{2+} - 3H]^-$ przedstawiłam na Rysunku 1.12.



Rysunek 1.11. Krzywa kalibracyjna ukazująca zależność intensywności od stężenia (+)-katechiny przy stałym stężeniu (-)-epikatechiny (540 µg/ml) otrzymane dla IMS/MS².



Rysunek 1.12. Widma kalibracyjne dla kompleksu $[2M + D\text{-leucyna} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$. Stężenie (+)-katechiny zmieniane było w zakresie 3,6-72 µg/ml.

e) Wyznaczenie eksperymentalnych i teoretycznych przekrojów czynnych

Aby uzyskać szczegółowy wgląd w struktury epimerycznych katechin konieczne było wyznaczenie eksperymentalnych wartości przekrojów czynnych i porównanie ich z teoretycznymi przekrojami czynnymi, wyznaczonymi na podstawie modelowania geometrii cząsteczek.

Do wyznaczenia eksperymentalnych przekrojów czynnych jonów $[M+H]^+$ oraz $[M+Na]^+$ konieczne było zastosowanie związków odniesienia o znanych wartościach przekrojów czynnych. Jako kalibrant zastosowałam polialaninę. Przekroje czynne wzorcowych jonów $[poliala_n+H]^+$ gdzie $n = 3-9$ zestawiałam w Tabeli E5.1 w części eksperymentalnej. Tam też przedstawiłam ogólną procedurę kalibracyjną, przykładowe krzywe kalibracyjne (Rysunek E5.1) oraz czasy dryfu jonów odniesienia, na podstawie których wyznaczono krzywe kalibracji (Tabela E5.6). Wyznaczone przekroje czynne (Ω_{eksp}) jonów $[M+H]^+$ oraz $[M+Na]^+$ pokazałam w Tabeli 1.5. Wartości Ω_{eksp} są średnią z pomiarów ruchliwości jonów dla czterech różnych zestawów parametrów. Wartość odchylenia standardowego dla wyznaczonych przekrojów czynnych wyniosła poniżej 0,5%. Ponadto, każdy eksperyment powtórzyłam cztery razy, a odchylenie standardowe wyników tych poczwórnych pomiarów wyniosło poniżej 0,4%.

Katechiny mogą przyjmować dwie konformacje: pseudoaksjalną (A-konformer) oraz pseudoekwatorialną (E-konformer). W literaturze szeroko dyskutowane jest zagadnienie związane z zachowaniem się katechin w roztworze oraz w fazie gazowej.⁷²⁻⁷³ Przyjmuje się, że występują one jako mieszanina konformerów z przewagą E-konformera zarówno dla (+)-katechiny jak i (-)-epikatechiny. Badania teoretyczne potwierdziły, że najniższy energetycznie konformer w przypadku obojętnych cząsteczek występuje w postaci pseudoekwatorialnej.^{73a} Jednakże, wpływ czynników takich jak temperatura oraz oddziaływania z innymi reagentami mogą zmieniać ten stosunek, prowadząc do różnych mieszanin konformacyjnych.

Szczegółowa analiza konformacyjna obojętnych cząsteczek (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny za pomocą metod obliczeniowych chemii kwantowej wykazała, że w obu przypadkach najniższym energetycznie konformerem jest E-konformer, zgodnie z literaturą. Opis optymalizacji geometrii epimerycznych katechin został przedstawiony w części eksperymentalnej w podrozdziale V.3.1. Różnica w energiach między konformacją pseudoekwatorialną a pseudoaksjalną dla obojętnych cząsteczek (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny wyniosła odpowiednio 3 kJ/mol oraz 2 kJ/mol. W przypadku jonów $[M+H]^+$

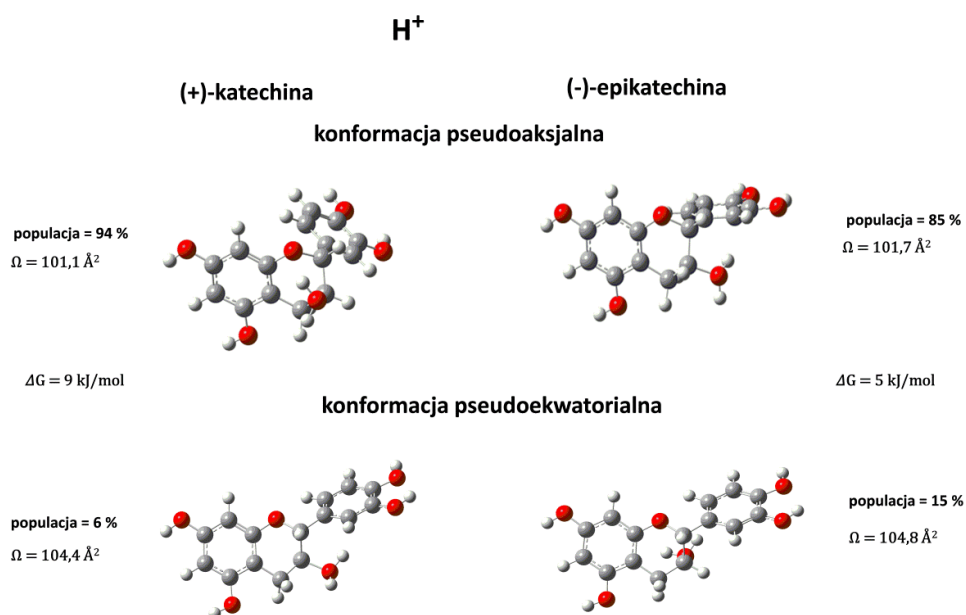
oraz $[M+Na]^+$ faworyzowaną energetycznie konformacją dla (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny była konformacja pseudoaksjalna. Różnice w energiach między A-konformerem oraz E-konformerem dla jonów protonowanych wynosiły 9 kJ/mol ((+)-katechyna) oraz 5 kJ/mol ((-)-epikatechyna) co stanowiło odpowiednio 94% oraz 85% ogólnej populacji możliwych konformerów w $T = 500$ K. W przypadku jonów $[M+Na]^+$ różnice te wynosiły 5 kJ/mol ((+)-katechyna) oraz 3 kJ/mol ((-)-epikatechyna) co odpowiada 84% oraz 76% ogólnej populacji możliwych konformerów w $T = 500$ K. Dla pozostałych konformerów różniących się umiejscowieniem protonu oraz kationu sodu w cząsteczce (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny różnice te wynosiły 20 – 85 kJ/mol.

Najniższe energetycznie struktury wyżej wymienionych jonów dla obu konformerów (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny jak również różnice w energiach między tymi konformacjami oraz przekroje czynne przedstawiłam na Rysunkach 1.13 oraz 1.14. Wartości Ω_t zostały otrzymane za pomocą ogólnie dostępnego programu Mobcal,¹⁶ wykorzystując metodę PA. W przypadku zastosowania metody TJ różnice między przekrojami czynnymi eksperymentalnymi a teoretycznymi były znacznie wyższe, rzędu 9%. Istnieją doniesienia literaturowe obrazujące lepszą zgodność między Ω_{eksp} oraz Ω_t stosując metodę PA w porównaniu z TJ zarówno dla małych i dużych cząsteczek.⁷⁴ Różnice między przekrojami czynnymi jonów $[M+H]^+$ oraz $[M+Na]^+$ obliczonymi dla (+)-katechiny i (-)-epikatechiny bez względu na możliwą konformację wyniosły ok. 1 Å². Jest to bardzo mała wartość i prawdopodobnie dlatego rozdział badanych jonów nie był obserwowany.

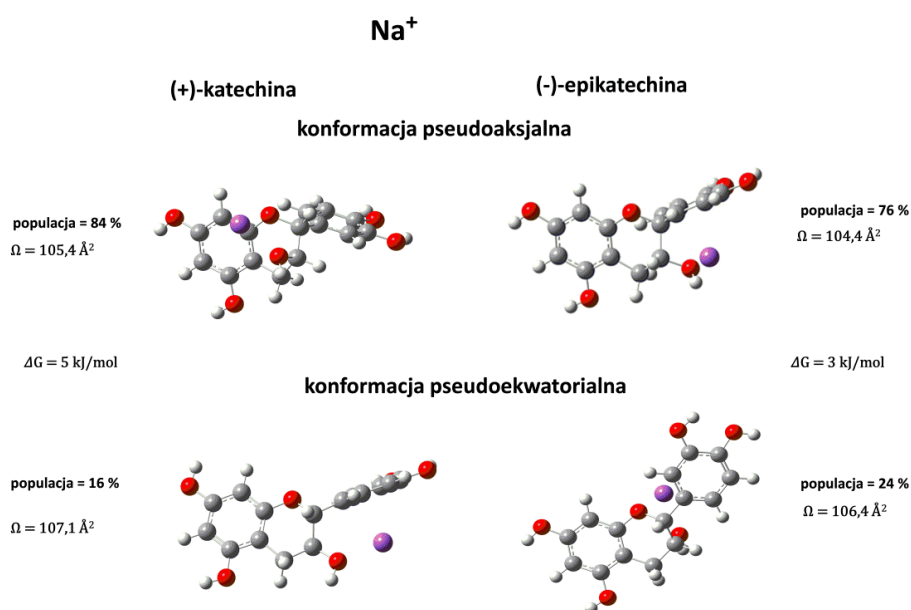
W przypadku jonów $[M+H]^+$, proton w obu katechinach przyłącza się do grupy hydroksylowej w pierścieniu C flawonoidu, dla której wartość powinowactwa do protonu wynosi 693,3 kJ/mol dla obu katechin i jest o 33,1 - 74,1 kJ/mol większa w porównaniu z innymi miejscami protonowania. Wartości powinowactwa do protonu dla wszystkich możliwych miejsc protonowania przedstawiłam w Tabeli E5.22 w części eksperymentalnej. Kation sodu jest natomiast solwatowany przez atom tlenu, pochodzący od grupy hydroksylowej w pierścieniu C oraz przez pierścień fenolowy (A) lub przez pierścień fenolowy (B).

W Tabeli 1.5 zestawiałam eksperymentalne oraz teoretyczne przekroje czynne dla możliwych konformacji (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny jak również dla mieszaniny A- oraz E-konformerów z uwzględnieniem populacji. Wartości te, były w dobrej zgodności z wartościami eksperymentalnymi przekrojów czynnych. Jednakże, biorąc pod uwagę różnice między Ω_{eksp} a Ω_t , które wyniosły ok. -2,5 – 4,2% w zależności od rodzaju jonu oraz konformacji katechin jak również powtarzalność metody IM-MS, która wyniosła ok. 2,6%

stwierdziłam, że nie można jednoznacznie określić za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów, z którym konformerem mamy do czynienia w fazie gazowej.



Rysunek 1.13. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+H]^+$ dla A- oraz E-konformerów (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny zoptymalizowane za pomocą metody m05-2x/6-31+g(d,p).



Rysunek 1.14. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+Na]^+$ dla A- oraz E-konformerów (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny zoptymalizowane za pomocą metody m05-2x/6-31+g(d,p).

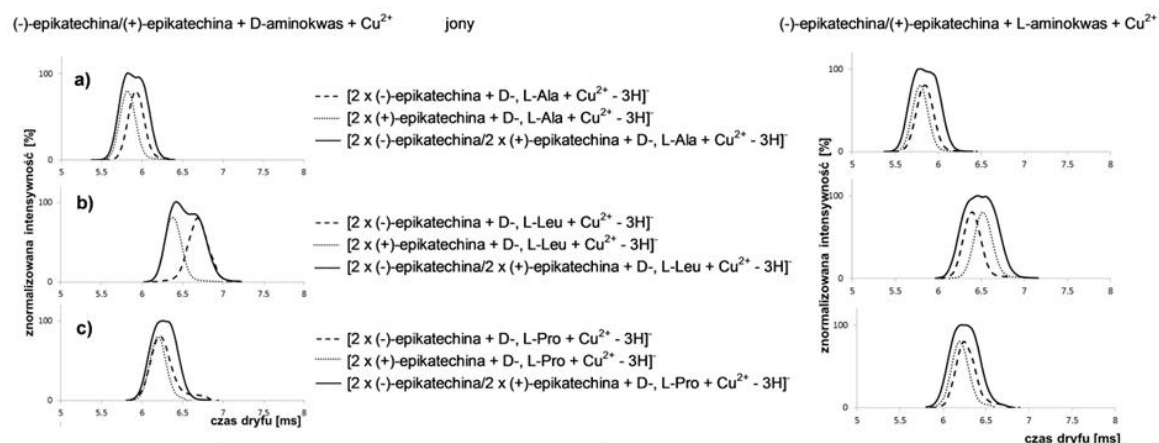
Tabela 1.5. Eksperymentalne i teoretyczne przekroje czynne (\AA^2) jonów $[\text{M}+\text{H}]^+$ i $[\text{M}+\text{Na}]^+$ oraz różnice (Δ) między tymi wartościami wyrażone w %. Ω_t obliczono za pomocą metody PA dla struktur zaprezentowanych na Rysunkach 1.13 oraz 1.14.

| Jon | m/z | (+)-katechina | | | (-)-epikatechina | | |
|---|-------|---|-------------------------------|--------------|---|-------------------------------|--------------|
| | | konformacja pseudoaksjalna | | | | | |
| | | Ω_{eksp} (\AA^2) | Ω_t (\AA^2) | Δ [%] | Ω_{eksp} (\AA^2) | Ω_t (\AA^2) | Δ [%] |
| $[\text{M}+\text{H}]^+$ | 291,1 | 100,4 | 101,1 | 0,7 | 100,3 | 101,7 | 1,4 |
| $[\text{M}+\text{Na}]^+$ | 313,1 | 108,1 | 105,4 | -2,5 | 107,0 | 104,5 | -2,4 |
| | | | | | | | |
| konformacja pseudoekwatorialna | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| $[\text{M}+\text{H}]^+$ | 291,1 | 100,4 | 104,4 | 3,8 | 100,3 | 104,8 | 4,2 |
| $[\text{M}+\text{Na}]^+$ | 313,1 | 108,1 | 107,1 | -0,9 | 107,0 | 106,4 | -1,3 |
| | | | | | | | |
| mieszanka konformacji pseudoaksjalnej oraz pseudoekwatorialnej (z uwzględnieniem populacji) | | | | | | | |
| | 291,1 | 100,4 | 101,3 | 0,9 | 100,3 | 102,1 | 1,8 |
| $[\text{M}+\text{Na}]^+$ | 313,1 | 108,1 | 105,7 | -2,3 | 107,0 | 104,8 | -2,1 |

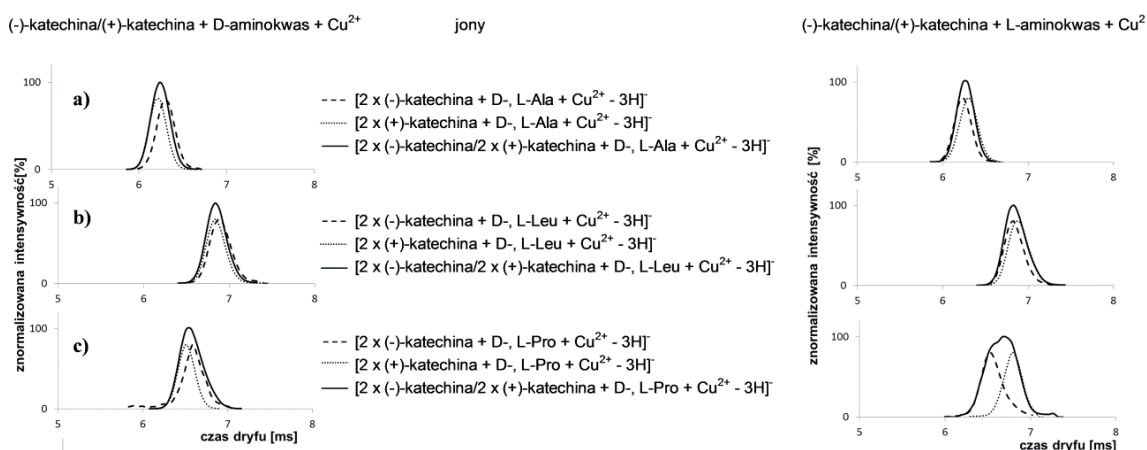
III.1.2 Rozdział enancjomerów katechin: (+)-katechina/(-)-katechina oraz (+)-epikatechina/(-)-epikatechina

Szczególny przypadek stanowią pary enancjomerycznych katechin: (-)-epikatechina/(+)-epikatechina oraz (-)-katechina/(+)-katechina, dla których wyniki z pomiarów IM-MS zostały przedstawione poniżej. W celu rozróżnienia enancjomerycznych katechin konieczne było przeprowadzenie kompleksowania z jonami miedzi oraz z chiralnym ligandem.

Rysunek 1.15 oraz Rysunek 1.16 przedstawiają widma ruchliwości jonów odpowiadających asocjatom enancjomerycznych par: (+)-epikatechina/(-)-epikatechina oraz (+)-katechina /(-)-katechina z jonami Cu^{2+} oraz z *D*-aminokwasami (prawy panel) oraz *L*-aminokwasami (lewy panel). W przypadku kompleksów (-)-epikatechiny/(+)-epikatechiny oraz (-)-katechiny/(+)-katechiny z *D*-, *L*-aminokwasami oraz jonami Cu^{2+} znaczący wzrost różnicy między czasami dryfu obserwowaliśmy jedynie dla kompleksów odpowiednio z *D*-leucyną ($R_{p-p} = 0,44$) oraz z *L*-proliną ($R_{p-p} = 0,40$). Oznacza to, że tylko *D*-alanina oraz *L*-prolina oddziałują selektywnie z enancjomerycznymi katechinami.



Rysunek 1.15. Mobilogramy jonów $[2M + D/L\text{-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ zarejestrowane dla roztworów zawierających enancjomeryczne katechiny (1:1), Cu^{2+} i **a)** *D*-, *L*-alaninę, **b)** *D*-, *L*-leucynę oraz **c)** *D*-, *L*-prolinę.



Rysunek 1.16. Mobilogramy jonów $[2M + D/L\text{-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ zarejestrowane dla roztworów zawierających epimeryczne katechiny (1:1), Cu^{2+} i **a)** *D*-, *L*-alaninę, **b)** *D*-, *L*-leucynę oraz **c)** *D*-, *L*-prolinę.

III.1.3 Podsumowanie

Wyniki z pomiarów IM-MS dla epimerów (+)-katechiny oraz (-)-epikatechiny zostały przedstawione w Tabeli 1.7.

W przypadku analizy pary epimerów (+)-katechiny/(-)-epikatechiny nie obserwowałam rozdziału jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M-H]^-$ oraz $[2M-H]^-$ z wykorzystaniem azotu jako gazu buforowego. W związku z tym, zastosowałam dodatkowe modyfikacje, które umożliwiłyby rozdział diastereoizomerycznych katechin. Zmiana gazu buforowego na dwutlenek węgla spowodowała wzrost R_{p-p} dla jonów $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$, w porównaniu z azotem. Jednakże wzrost ten nie był wystarczający do rozdziału

poszczególnych katechin w ich równomolowej mieszaninie. Rozdział epimerycznych katechin zaobserwowałam dla kompleksów typu $[2M + D\text{-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$, dla których wartość R_{p-p} była większa bądź równa 0,60.

W przypadku enancjomerycznych katechin wzrost wartości R_{p-p} zaobserwowałam dla kompleksów (-)-epikatechiny/(+)-epikatechiny z *D*-leucyną oraz jonami Cu^{2+} ($R_{p-p} = 0,44$) jak również dla kompleksów (-)-katechiny/(+)-katechiny z *L*-proliną oraz z jonami miedzi ($R_{p-p} = 0,40$).

Brak rozdziału jonów $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ oraz $[\text{M}-\text{H}]^-$ stosując azot jako gaz buforowy jest wynikiem małych różnic między Ω , które wynoszą ok. 1 \AA^2 . Podczas porównywania Ω_{eksp} oraz Ω_{t} należy wziąć pod uwagę błąd doświadczalny, który związany jest z tym, że Ω_{eksp} zostały wyznaczone dla N_2 jako gazu buforowego, stosując związki odniesienia o Ω_{ref} wyznaczonych dla helu. Jest to powszechnie stosowana metoda do wyznaczania przekrojów czynnych jonów za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów, ze względu na fakt, że większość dostępnych przekrojów czynnych jonów odniesienia wyznaczona jest dla helu jako gazu buforowego.⁷⁵ Ponadto, Ω_{t} obliczono za pomocą metody PA, która jest sparametryzowana na hel jako gaz buforowy, ponieważ najlepiej wpisuje się on w model twardej kuli, na którym opiera się metoda PA (patrz część literaturowa). Sukces pomiarów zależy od doboru odpowiednich związków odniesienia, które charakteryzują się strukturą podobną do analizowanych związków oraz takim samym ładunkiem jonów.

Analiza strukturalna kompleksów typu $[2M + D\text{-}, L\text{-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ ze względu na oddziaływania występujące między katechinami, *D*-, *L*-aminokwasami oraz jonami Cu^{2+} nie jest trywialnym zadaniem i wymaga zastosowania zaawansowanych metod obliczeniowych. Dlatego też obliczenia teoretyczne będą przedmiotem odrębnych badań.

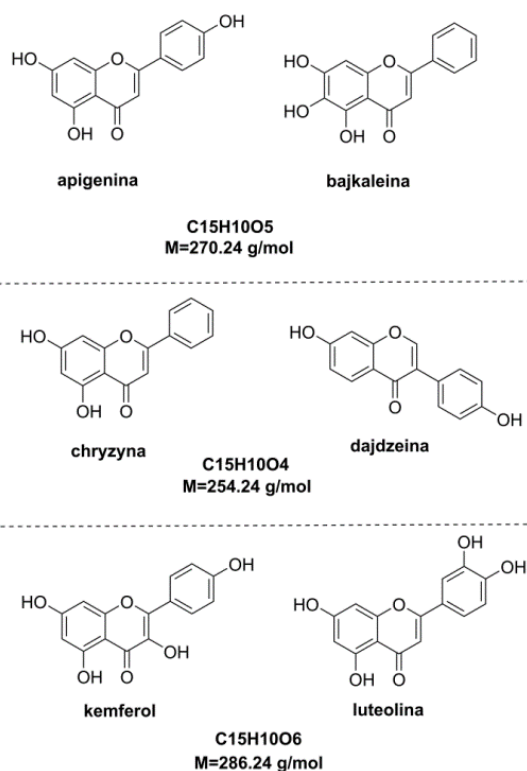
Częściowe wyniki dotyczące badań nad (+)-katechiną oraz (-)-epikatechiną zostały opublikowane w *Journal of Mass Spectrometry*.⁴⁴

Tabela 1.17. Podsumowanie uzyskanych wyników dla diastereoizomerycznych katechin.

| jon | diastereoizomery (Roz. III.1.1) | |
|---|---|---------------------|
| | (+) -kat / (-) -epikat | |
| | N ₂ | CO ₂ |
| [M+H] ⁺ | 0,00 | 0,00 |
| [M+Na] ⁺ | 0,16 | 0,36 |
| [2M+Na] ⁺ | 1,30 | 1,85 |
| [M-H] ⁻ | 0,00 | 0,08 |
| [2M-H] ⁻ | 0,47 | 0,45 |
| umożliwienie rozdziału w wyniku kompleksowania z jonami Cu ²⁺ i wybranymi aminokwasami | <i>D</i> -alanina <i>D</i> -leucyna <i>D</i> -prolina | $R_{p-p} \geq 0,60$ |

III.2 Rozdział izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów

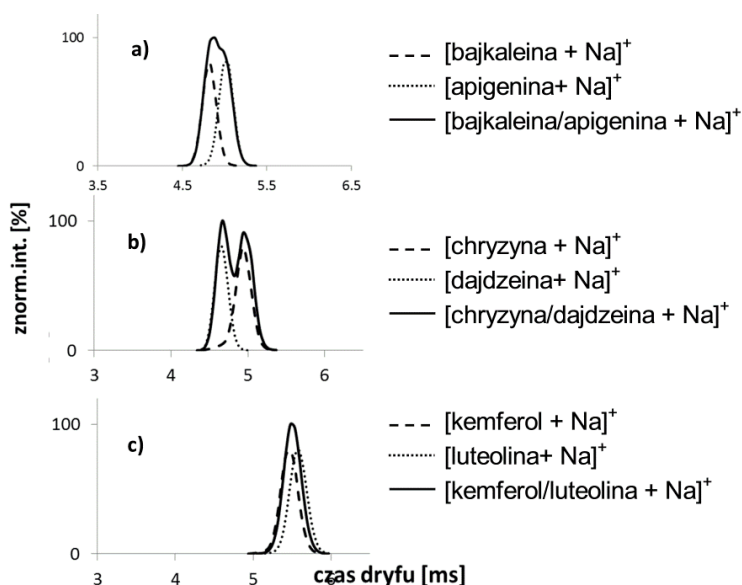
Izomeria konstytucyjna (zwana dawniej strukturalną) jest również częstym typem izomerii występującej w związkach flawonoidowych. Wybrane flawonoidy posiadające ten typ izomerii, przedstawione na Schemacie 2.1, zostały przebadane pod kątem możliwości ich rozróżnienia za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów. Związki te są podobne do katechin, jednak obecność wiązania podwójnego między atomami węgla C2 oraz C3, a tym samym brak centrów stereogenicznych sprawia, że są one sztywnymi cząsteczkami o ograniczonej liczbie możliwych konformacji.



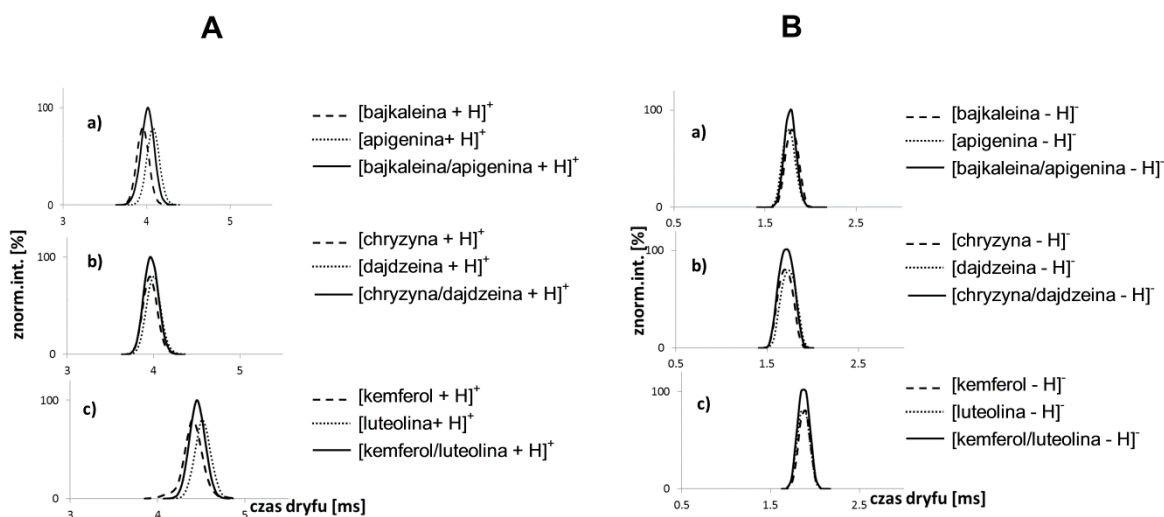
Schemat 2.1. Struktury wybranych izomerycznych związków flawonoidowych.

III.2.1 Początkowe badania nad rozdzieleniem izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych

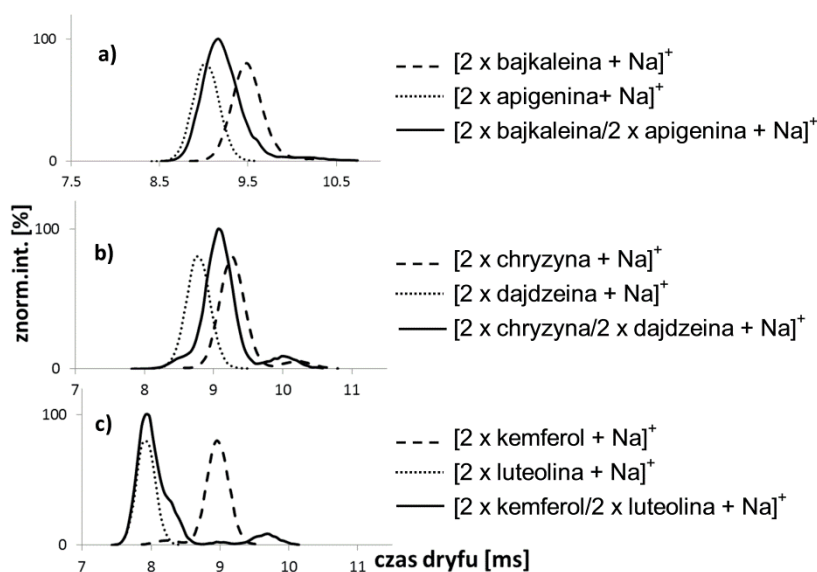
Dla każdej pary izomerycznych flawonoidów przedstawionych na Schemacie 2.1 w widmach ESI-MS obserwowałam sygnały pochodzące od jonów protonowanych $[M+H]^+$, sodowanych $[M+Na]^+$, dimerów sodowanych $[2M+Na]^+$ w trybie jonów dodatnich oraz jonów powstałych w wyniku deprotonowania izomerycznych flawonoidów $[M-H]^-$ i $[2M-H]^-$. Widma ruchliwości obserwowanych jonów przedstawiłam na Rysunkach 2.1 – 2.4, w zależności od rodzaju jonu. Czasy dryfu (t_d) oraz wartości rozdzielczości (R_{p-p}) dla każdego jonu zestawiałam w Tabeli 2.1. Dla bajkaleiny w widmie masowym nie obserwowałam sygnału pochodzącego od jonu $[2M-H]^-$.



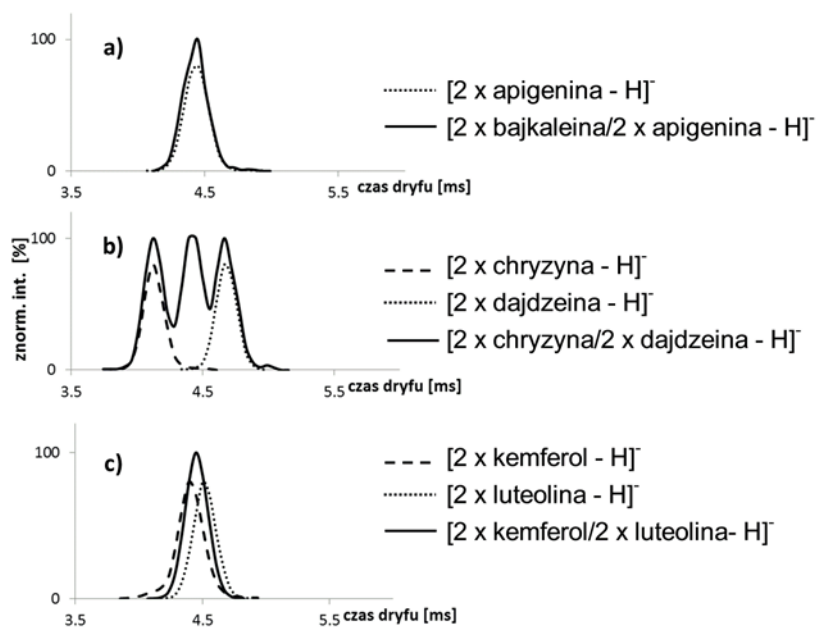
Rysunek 2.1. Mobilogramy jonów $[M+Na]^+$ zarejestrowane dla roztworów poszczególnych izomerów oraz ich równomolowej mieszaniny (linia ciągła) dla: **a)** bajkaleiny oraz apigeniny, **b)** chryzyny oraz dajdzeiny i **c)** kemferolu oraz luteoliny.



Rysunek 2.2. Mobilogramy jonów $[M+H]^+$ (**A**) oraz $[M-H]^-$ (**B**) zarejestrowane dla roztworów równomolowej mieszaniny (linia ciągła) i poszczególnych flawonoidów: **a**) bajkaleiny oraz apigeniny, **b**) chryzyny oraz dajdzeiny i **c**) kemferolu oraz luteoliny.



Rysunek 2.3. Mobilogramy jonu $[2M+Na]^+$ zarejestrowane dla roztworów równomolowej mieszaniny (linia ciągła) oraz poszczególnych flawonoidów: **a**) bajkaleiny oraz apigeniny, **b**) chryzyny oraz dajdzeiny i **c**) kemferolu oraz luteoliny.



Rysunek 2.4. Mobilogramy jonu $[2M-H]^-$ zarejestrowane dla roztworów równomolowej mieszanki (linia ciągła) oraz poszczególnych izomerów: **a)** bajkaleiny oraz apigeniny, **b)** chryzyny oraz dajdzeiny i **c)** kemferolu oraz luteoliny.

Tabela 2.1. Czasy dryfu (t_d) [ms] i wartości rozdzielczości R_{p-p} dla obserwowanych jonów.

| jon | m/z | czas dryfu, t_d [ms] | | R_{p-p} |
|-------------|--------|------------------------|-----------------------|-----------|
| | | t_{d1} | t_{d2} | |
| $[M+H]^+$ | 271,09 | M = bajkalein 3,94 | M = apigenina 4,06 | 0,38 |
| | 255,07 | M = dajdzeina 3,98 | M = chryzyna 3,94 | 0,12 |
| | 287,09 | M = kaempferol 3,65 | M = luteolina 3,72 | 0,22 |
| | | | | |
| $[M+Na]^+$ | 293,07 | M = bajkaleina 4,80 | M = apigenina 4,99 | 0,47 |
| | 277,05 | M = dajdzeina 4,63 | M = chryzyna 4,92 | 0,74 |
| | 309,06 | M = kemferol 4,49 | M = luteolina 4,55 | 0,16 |
| | | | | |
| $[2M+Na]^+$ | 563,13 | M = bajkaleina 9,44 | M = apigenina 8,99 | 0,67 |
| | 531,14 | M = dajdzeina 8,71 | M = chryzyna 9,40 | 0,75 |
| | 595,15 | M = kemferol 8,91 | M = luteolina 7,88 | 1,70 |
| | | | | |
| $[M-H]^-$ | 269,05 | M = bajkaleina 1,78 | M = apigenina 1,75 | 0,11 |
| | | | | |

| | | | | |
|---------------------|--------|-----------------------|----------------------|------|
| | 253,02 | M = dajdzeina | M = chryzyna | |
| | | 1,73 | 1,69 | 0,10 |
| | 285,05 | M = kaempferol | M = luteolina | |
| | | 1,87 | 1,85 | 0,07 |
| | | | | |
| [2M-H] ⁻ | 539,90 | M = bajkaleina | M = apigenina | |
| | | - | 4,42 | - |
| | 507,04 | M = dajdzeina | M = chryzyna | |
| | | 4,66 | 4,11 | 1,68 |
| | 571,01 | M = kemferol | M = luteolina | |
| | | 4,36 | 4,38 | 0,06 |

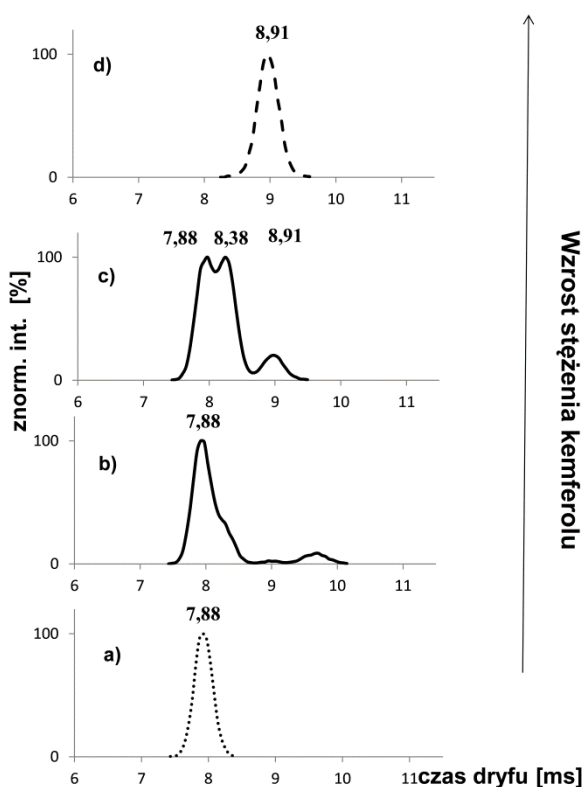
W widmach ruchliwości jonów zaobserwowałam wyraźny rozdział sygnałów odpowiadających jonom $[M+Na]^+$ chryzyny oraz dajdzeiny (Rysunek 2.1.b). Związki te różnią się między sobą umiejscowieniem pierścienia B oraz grupy -OH. W przypadku apigeniny oraz bajkaleiny, w których jedna z trzech grup -OH występujących w cząsteczce znajduje się w pierścieniu A (bajkaleina) lub w pierścieniu B (apigenina) wartość rozdzielczości ($R_{p-p} = 0,47$) (Rysunek 2.1.a) jest znacznie mniejsza w porównaniu z R_{p-p} dla chryzyny oraz dajdzeiny, która wyniosła 0,74. Natomiast dla kemferolu oraz luteoliny, flawonoidów zawierających 4 grupy OH w cząsteczce, z których dwie znajdują się w pierścieniu A, zaś dwie pozostałe umiejscowione są albo na pierścieniu B (luteolina), albo jedna z nich na pierścieniu B, zaś druga zlokalizowana jest przy atomie węgla C3 (kemferol), rozdział sygnałów odpowiadających jonom $[M+Na]^+$ nie został zaobserwowany (Rysunek 2.1.c).

Sygnały w widmach ruchliwości jonów odpowiadające jonom $[M+H]^+$ (Rysunek 2.2.A) i $[M-H]^-$ (Rysunek 2.2.B) związków flawonoidowych, w ramach analizowanych par, miały bardzo zbliżone czasy dryfu, w związku z tym nie obserwowałam ich rozdziału.

Brak rozdziału wyżej wspomnianych sygnałów, podobnie jak to miało miejsce dla katechin, może świadczyć o podobieństwach w strukturze przestrzennej odpowiadających im jonów i związanej z tym małej różnicy w ich przekrojach czynnych. Szczegółowa analiza strukturalna jonów $[M+Na]^+$, $[M+H]^+$ oraz $[M-H]^-$ została przeprowadzona i omówiona w dalszej części pracy.

W przypadku dimerycznych asocjacji badanych flawonoidów z kationem sodu $[2M+Na]^+$ oraz jonów $[2M-H]^-$, w zależności od badanej pary izomerów, zaobserwowałam dwa przypadki. Pomimo znaczącej różnicy w czasach dryfu jonów $[2M+Na]^+$ pochodzących od apigeniny oraz bajkaleiny, jak również od chryzyny oraz dajdzeiny, podczas analizy ich mieszaniny, zaobserwowałam sygnały pochodzące tylko od dimerów mieszanych. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku jonów $[2M-H]^-$ dla kemferolu oraz luteoliny. Dla jonów

[2M-H]⁻, podczas analizy mieszaniny chryzyny oraz dajdzeiny, oprócz pików pochodzących od poszczególnych izomerów, obserwowałam dodatkowy sygnał pochodzący od dimeru mieszanego. W przypadku kemferolu oraz luteoliny, podczas analizy ich mieszaniny, nie obserwowałam pików pochodzących od jonu [2M+Na]⁺ dla kemferolu. Widoczny był natomiast niewielki pik znajdujący się dokładnie pomiędzy sygnałami pochodzącymi od poszczególnych flawonoidów. Prawdopodobnie był to pik pochodzący od mieszanego dimeru. Aby potwierdzić moje przypuszczenia, przeprowadziłam szereg badań dla roztworów izomerycznych flawonoidów o różnym stosunku molowym, w których stężenie luteoliny utrzymywałam na stałym poziomie, a stężenie kemferolu sukcesywnie zwiększałam. Otrzymane wyniki, przedstawiłam na Rysunku 2.5. Wzrost stężenia jednego z izomerów spowodował wzrost sygnału o czasie dryfu 8,41 ms oraz sygnału pochodzącego od kemferolu ($t_d = 8,91$ ms). Na tej podstawie mogę stwierdzić, że obserwowany sygnał pochodzi od dimeru mieszanego.



Rysunek 2.5. Mobilogram jonu [2M+Na]⁺ zarejestrowany dla roztworów o różnym stosunku molowym luteoliny i kemferolu **a)** 1:0, **b)** 1:1, **c)** 1:3 i **d)** 0:1.

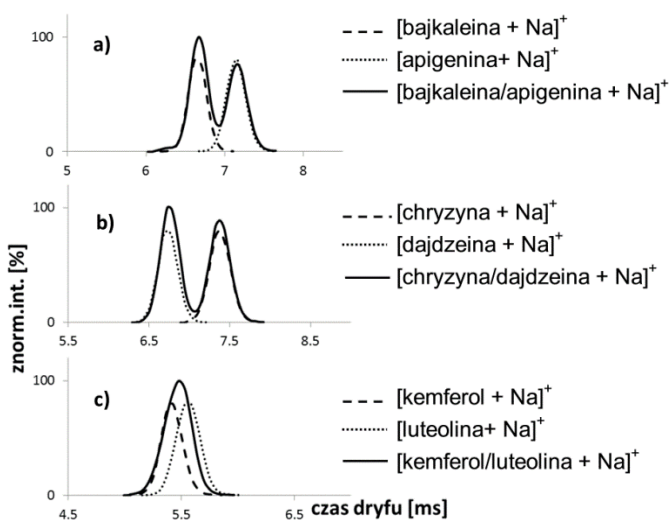
W kolejnych etapach, zbadalam wpływ różnych czynników, takich jak gazu obojętnego oraz obecności kationów Li^+ , Na^+ , K^+ oraz Rb^+ na rozdział wybranych związków flawonoidowych.

III.2.2 Wpływ gazu obojętnego na rozdział izomerów konstytucyjnych flawonoidów

Jak wykazały eksperymenty przeprowadzone dla epimerycznych katechin, należących również do związków flawonoidowych, zmiana gazu buforowego nie ma wpływu na rozdział badanych jonów. Jednakże, jak przedstawiałam w części literaturowej (rozdział II.2) wpływ gazu buforowego w dużej mierze zależy od charakteru badanych jonów.

W przypadku analizowanych związków flawonoidowych, zmiana gazu obojętnego z N_2 na CO_2 , spowodowała poprawę rozdzielności sygnałów odpowiadających jonom $[\text{M}+\text{Na}]^+$ chryzyny oraz dajdzeiny, jak również apigeniny oraz bajkaleiny (Rysunek 2.6.a i c, Tabela 2.2). Wyjątkiem okazały się kemferol oraz luteolina (Rysunek 2.6.c). W tym przypadku różnica między czasami dryfu jonów $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pochodzących od poszczególnych flawonoidów wzrosła nieznacznie z 0,06 ms (N_2 , $R_{p-p} = 0,16$) do 0,15 ms (CO_2 , $R_{p-p} = 0,35$) i nie pozwoliła ostatecznie na ich rozróżnienie. Zastosowanie CO_2 jako gazu buforowego nie miało również wpływu na rozdział jonów $[\text{M}+\text{H}]^+$, jak obrazuje Rysunek 2.7. W eksperymentach prowadzonych z wykorzystaniem CO_2 jako gazu buforowego nie obserwowałam sygnałów pochodzących od sodowanego dimeru $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

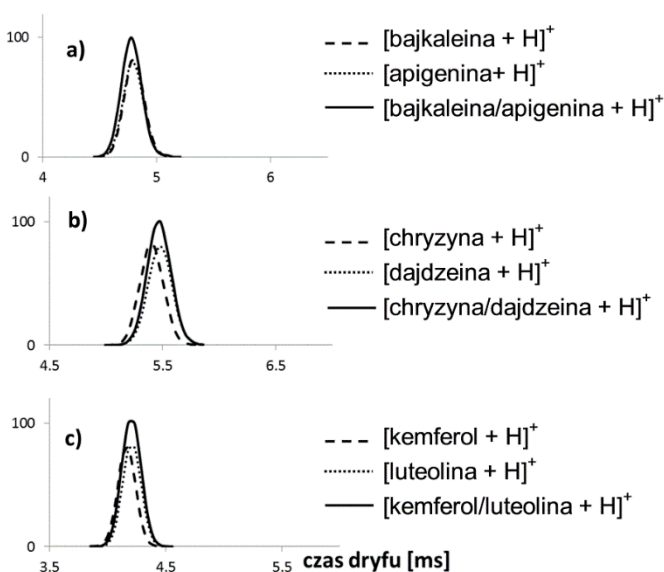
Przeprowadzone eksperymenty wskazują, że zmiana gazu buforowego odgrywa istotną rolę w rozdziale związków flawonoidowych, jednakże zakres jego wpływu silnie zależy od badanych flawonoidów.



Rysunek 2.6. Mobilogram jonu $[M+Na]^+$ zarejestrowany dla roztworów poszczególnych flawonoidów oraz równomolowej mieszaniny (linia ciągła): **a)** bajkaleiny oraz apigeniny, **b)** chryzyny oraz dajdzeiny i **c)** kemferol oraz luteolina. CO_2 - gaz buforowy.

Tabela 2.2. Czasy dryfu t_d [ms] i wartości rozdzielczości R_{p-p} dla jonu $[M+Na]^+$. CO_2 - gaz buforowy. t_{d1} i t_{d2} są czasami dryfu dla poszczególnych jonów.

| jon | m/z | czas dryfu, t_d [ms] | | R_{p-p} |
|------------|--------|------------------------|----------------------|-----------|
| | | t_{d1} | t_{d2} | |
| $[M+Na]^+$ | 293,07 | M = bajkaleina | M = apigenina | 0,98 |
| | | 6,62 | 7,11 | |
| | 277,05 | M = dajdzeina | M = chryzyna | 1,23 |
| | | 6,70 | 7,34 | |
| | 309,06 | M = kemferol | M = luteolina | 0,35 |
| | | 5,41 | 5,56 | |



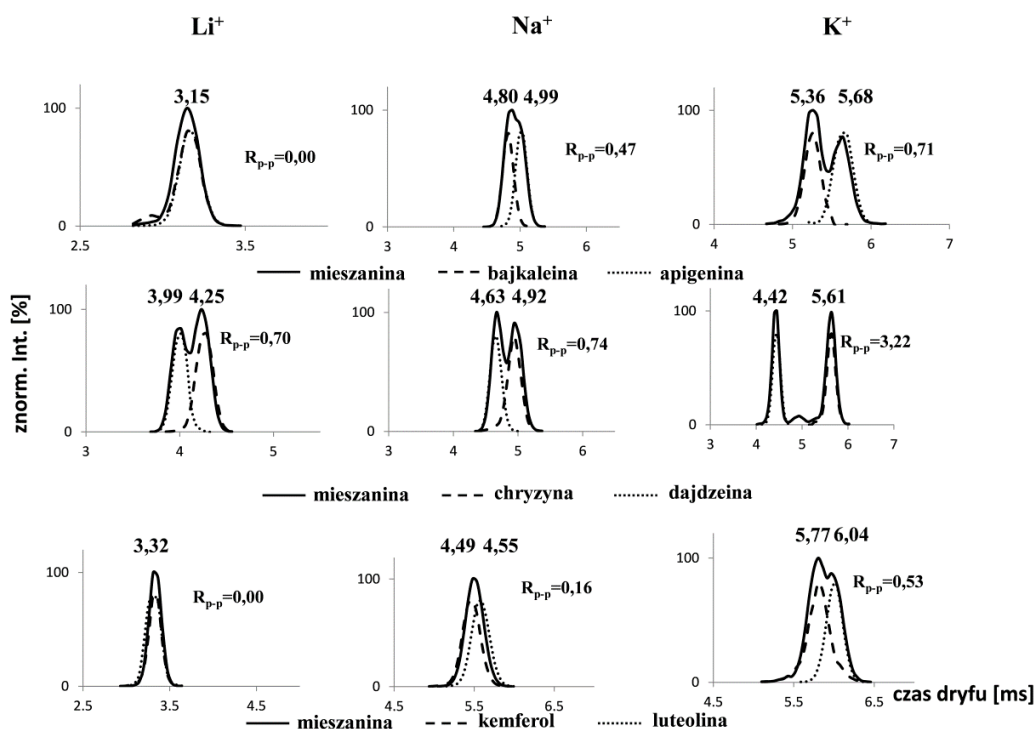
Rysunek 2.7. Mobilogram jonu $[M+H]^+$ zarejestrowany dla roztworów poszczególnych flawonoidów oraz równomolowej mieszaniny (linia ciągła): **a)** bajkaleiny oraz apigeniny, **b)** chryzyny oraz dajdzeiny i **c)** kemferolu oraz luteoliny. CO_2 - gaz buforowy.

III.2.3 Wpływ kationu metalu na rozdział izomerów konstytucyjnych flawonoidów

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, przedstawionymi w rozdziale II.2, obecność jonu metalu może powodować zmiany konformacyjne cząsteczki, umożliwiając rozdział strukturalnie podobnych związków za pomocą IM-MS. Wpływ obecności kationu metalu na rozróżnienie strukturalne jest silnie powiązany z naturą analizowanych cząsteczek, dlatego też, pomimo braku bezpośredniego wpływu obecności kationów metali na rozróżnienie diastereoizomerycznych katechin (rozdział III.1), postanowiłam zbadać wpływ metali alkalicznych (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+) na proces rozdziału analizowanych związków flawonoidowych.

W pierwszej kolejności zarejestrowałam widma masowe za pomocą techniki elektrosprej w celu scharakteryzowania tworzących się asocjatów kationu metalu ze związkami flawonoidowymi. Na widmach ESI-MS obserwowałam jony $[\text{M}+\text{X}]^+$, gdzie X oznacza kationy Li^+ , Na^+ , K^+ , dla których przeprowadziłam dokładną analizę za pomocą IM-MS. W przypadku kationów Rb^+ nie obserwowałam sygnałów pochodzących od jonów $[\text{M}+\text{Rb}]^+$. Dodatkowo, intensywność sygnałów pochodzących od jonów $[\text{M}+\text{K}]^+$, w porównaniu z jonami $[\text{M}+\text{Li}]^+$ oraz $[\text{M}+\text{Na}]^+$ była znacznie mniejsza. Na Rysunku 2.8 przedstawiłam widma ruchliwości obserwowanych jonów zarejestrowane dla mieszaniny (linia ciągła) oraz indywidualnych flawonoidów. Dodatkowo na poniższym rysunku przedstawiłam czasy dryfu (t_d) oraz wartości R_{p-p} dla każdego z obserwowanych jonów.

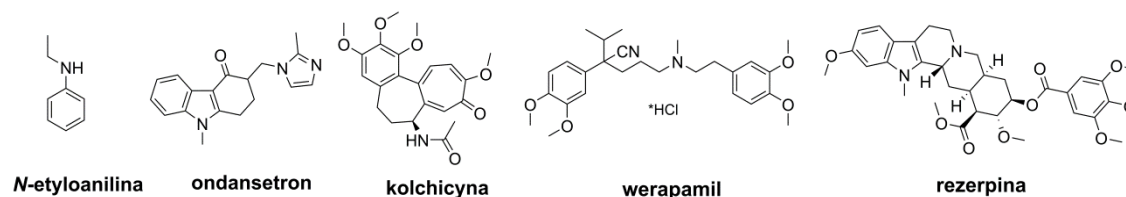
Na podstawie poniższych wyników stwierdziłam, że w przypadku badanych związków flawonoidowych efektywność rozdziału wzrasta wraz ze wzrostem rozmiaru kationu w następującej kolejności $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że w przypadku pary składającej się z kemferolu oraz luteoliny, dla której we wcześniejszych przypadkach nie otrzymałam rozdziału, zmiana kationu metalu z Na^+ na K^+ przyczyniła się do ich rozróżnienia w mieszaninie. Szczegółowa analiza strukturalna jonów $[\text{M}+\text{X}]^+$ została omówiona przeze mnie w dalszej części tego podrozdziału.



Rysunek 2.8. Mobilogramy jonów $[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[M+K]^+$ zarejestrowane dla roztworów izomerycznych flawonoidów i ich równomolowych mieszanin. (linia ciągła). Czasy dryfu (t_d) [ms] oraz wartości R_{p-p} zostały pokazane na rysunku.

III.2.4 Wyznaczanie eksperymentalnych i teoretycznych przekrojów czynnych jonów typu $[M+X]^+$, gdzie $X = H^+, Li^+, Na^+ i K^+$ oraz jonów $[M-H]^-$

Wartości Ω_{eksp} dla jonów $[M+X]^+$, gdzie $X = H^+, Li^+, Na^+ \text{ oraz } K^+$, wyznaczyłam na podstawie krzywych kalibracyjnych, otrzymanych dla wybranych związków odniesienia takich jak *N*-etyloanilina, ondansetron, kolchicyna, werapamil, rezerpina, przedstawionych na Schemacie 2.2,⁴⁶ według ogólnej procedury opisanej w części eksperymentalnej. Przykładowe krzywe kalibracyjne otrzymane dla jonów $[M+H]^+$ związków odniesienia dla czterech różnych zestawów parametrów przedstawiłam na Rysunku E5.2. Dodatkowo, w Tabeli E5.11 zostały przedstawione czasy dryfu jonów odniesienia na podstawie których wyznaczono krzywe kalibracyjne. Wyznaczone Ω_{eksp} , zestawione w Tabeli 2.3, są średnimi wartościami z pomiarów ruchliwości jonów dla czterech różnych zestawów parametrów. Wartość odchylenia standardowego obliczona na podstawie tych pomiarów wyniosła ok. 1%. Ponadto, każdy eksperyment powtórzyłam cztery razy, a odchylenie standardowe wyniosło poniżej 0,1%.

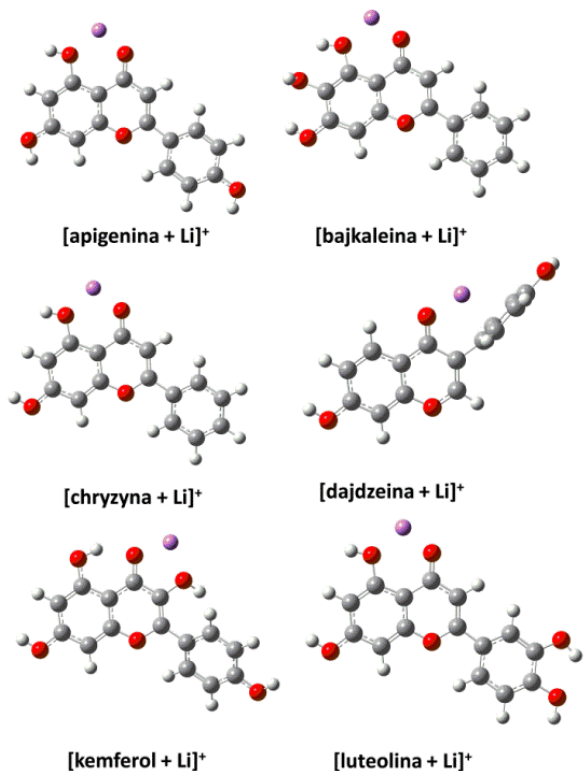


Schemat 2.2. Struktury wybranych związków odniesienia.

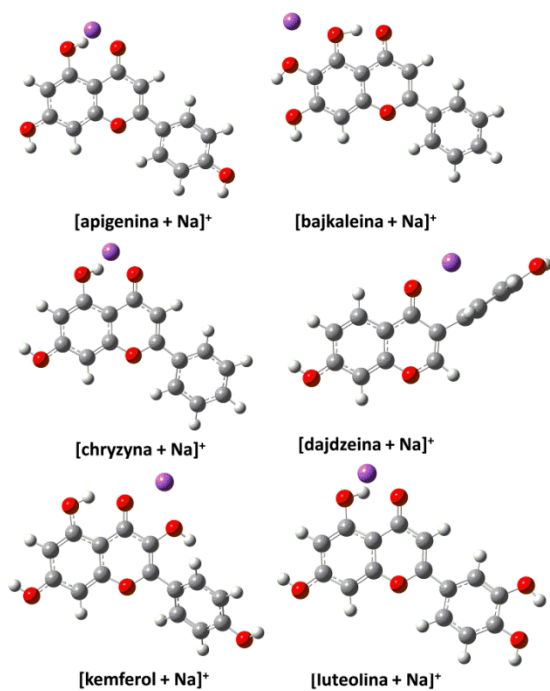
W kolejnym etapie obliczyłam teoretyczne przekroje czynne jonów $[M+X]^+$ ($X = Na^+$, Li^+ oraz K^+) dla ich najniższych energetycznie struktur. Dokładny opis przeprowadzonej optymalizacji przedstawiłam w części eksperymentalnej. Rozważania nad strukturą apigeniny, bajkaleiny, chryzyny, dajdzeiny, kemferolu oraz luteoliny wykazały, że nie są to płaskie cząsteczki lecz charakteryzują się kątem dwuściennym rzędu $15-30^\circ$.⁷⁶ Najniższe energetycznie struktury wyżej wymienionych jonów przedstawiłam na Rysunkach 2.9 – 2.11, które są wynikiem oddziaływania kationów Li^+ , Na^+ oraz K^+ z grupą karbonylową oraz jedną grupą hydroksylową flawonoidu lub grupą karbonylową i aromatycznym pierścieniem B, w przypadku dajdzeiny.

W Tabeli 2.3 umieściłam teoretyczne przekroje czynne wyznaczone dla poniższych struktur. Wartości te zostały obliczone za pomocą metody PA zaimplementowanej w ogólnie dostępnym programie Mobcal.¹⁶ Wykazują one dobrą zgodność z wartościami eksperymentalnymi.

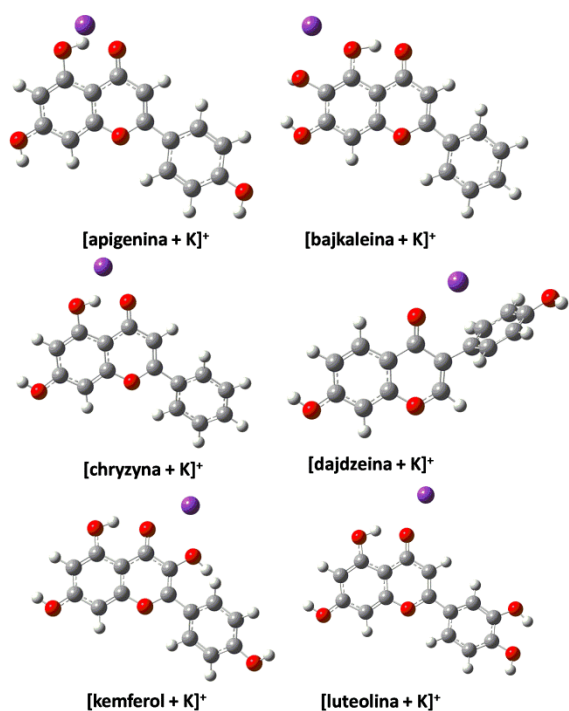
W Tabeli 2.4 zostały przedstawione różnice między teoretycznymi przekrojami czynnymi analizowanych jonów dla każdej pary związków flawonoidowych. Największą różnicę ($\Delta\Omega_t$) zaobserwowałam dla jonów $[M+K]^+$ chryzyny oraz dajdzeiny ($\Delta\Omega_t = 4,2 \text{ \AA}^2$). Jest to zgodne z wynikami eksperymentalnymi, przedstawionymi na Rysunku 2.8. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzałam, że w przypadku izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych różnica między przekrojami czynnymi jonów poszczególnych flawonoidów wynosząca $1,3 \text{ \AA}^2$ jest wystarczająca do ich rozróżnienia.



Rysunek 2.9. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+Li]^+$ otrzymane za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).



Rysunek 2.10. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+Na]^+$ otrzymane za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).



Rysunek 2.11. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+K]^+$ otrzymane za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).

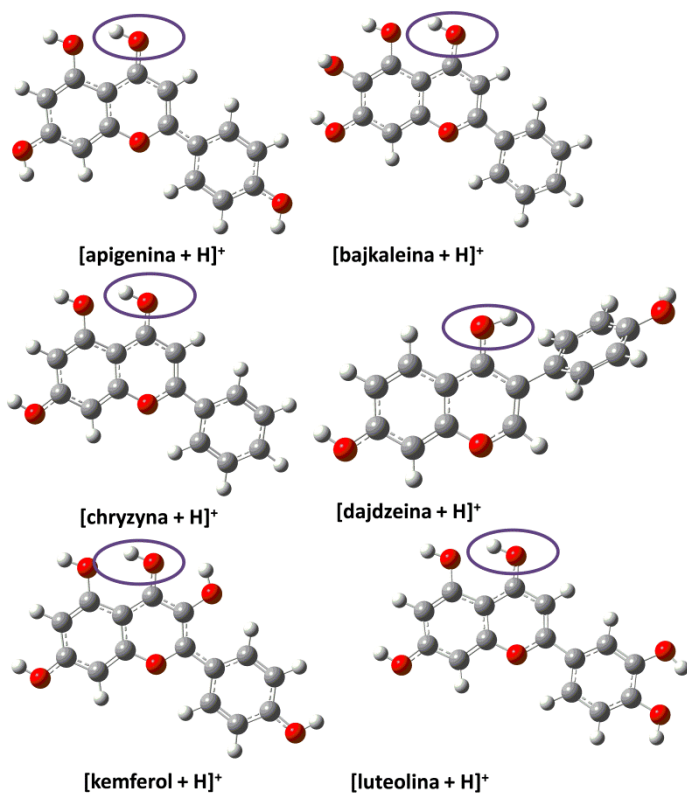
Tabela 2.3. Eksperymentalne i teoretyczne wartości przekrojów czynnych (Ω_{eksp} i Ω_t) (w \AA^2) jonów $[M+X]^+$, gdzie $X = \text{Li}^+, \text{Na}^+$ oraz K^+ . Wartości Ω_t zostały obliczone dla najniższych energetycznie struktur (m05-2x/6-31g(d,p)) za pomocą metody PA.

| cząsteczki | jon | $\Omega_{\text{exp}}(\text{\AA}^2)$ | $\Omega_t(\text{\AA}^2)$ | $\Delta[\%]$ | |
|------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------|------|
| apigenina | $[M+\text{Li}]^+$ | 105,6 | 103,5 | -2,0 | |
| bajkaleina | | 103,4 | 102,8 | -0,6 | |
| chryzyna | | 102,1 | 99,8 | -2,5 | |
| dajdzeina | | 98,5 | 98,0 | -0,5 | |
| kemferol | | 108,9 | 105,9 | -3,0 | |
| luteolina | | 108,2 | 106,7 | -1,4 | |
| apigenina | | $[M+\text{Na}]^+$ | 109,6 | 105,1 | -4,2 |
| bajkaleina | | | 106,9 | 103,8 | -3,0 |
| chryzyna | 103,6 | | 101,4 | -1,9 | |
| dajdzeina | 99,8 | | 99,4 | -0,4 | |
| kemferol | 110,5 | | 107,2 | -3,0 | |
| luteolina | 111,7 | | 108,2 | -3,3 | |
| apigenina | $[M+\text{K}]^+$ | 112,9 | 107,4 | -5,1 | |
| bajkaleina | | 105,1 | 105,7 | 0,6 | |
| chryzyna | | 110,1 | 105,6 | -4,2 | |
| dajdzeina | | 100,5 | 101,4 | 0,9 | |
| kemferol | | 111,0 | 109,3 | -1,5 | |
| luteolina | | 113,3 | 111,7 | -1,4 | |

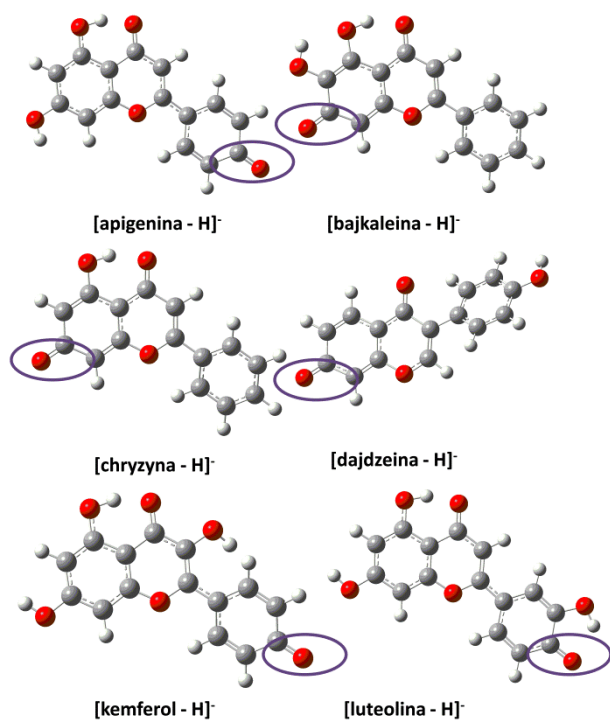
Tabela 2.4. Różnica między teoretycznymi wartościami przekrojów czynnych (Ω_t) (w Å^2) jonów $[M+X]^+$, gdzie $X = \text{Li}^+$, Na^+ oraz K^+ dla każdej pary związków flawonoidowych.

| | $[M+\text{Li}]^+$ | $[M+\text{Na}]^+$ | $[M+\text{K}]^+$ |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | $\Delta\Omega_t (\text{Å}^2)$ | $\Delta\Omega_t (\text{Å}^2)$ | $\Delta\Omega_t (\text{Å}^2)$ |
| apigenina | 0,7 | 1,3 | 1,7 |
| bajkaleina | | | |
| chryzyna | 1,8 | 2,0 | 4,2 |
| dajdzeina | | | |
| kemferol | 0,8 | 1,0 | 2,4 |
| luteolina | | | |

Analogiczne badania przeprowadziłam dla jonów $[M+H]^+$ oraz $[M-H]^-$, dla których w Tabeli 2.5 zestawiałam eksperymentalne i teoretyczne przekroje czynne. Do wyznaczania Ω_{eksp} jonów $[M-H]^-$ badanych flawonoidów jako kalibrant zastosowałam polialaninę. Niewielkie różnice w wartościach Ω , które wynoszą ok. 1 Å^2 , są przyczyną braku rozdziału tych jonów za pomocą IM-MS. Najniższe energetycznie struktury otrzymane na podstawie obliczeń teoretycznych przedstawiłam na Rysunkach 2.12. oraz 2.13. Fioletowymi elipsami zaznaczyłam miejsca protonowania i deprotonowania w cząsteczkach badanych flawonoidów. W przypadku jonów $[M+H]^+$, kation H^+ przyłącza się do grupy karbonylowej, podczas gdy dla jonów $[M-H]^-$ miejsce deprotonowania zlokalizowane jest na grupie hydroksylowej w pierścieniu A (bajkaleina, chryzyna oraz dajdzeina) lub na grupie hydroksylowej w pierścieniu B (apigenina, kemferol oraz luteolina). Wartości powinowactwa do protonu wszystkich miejsc protonowania oraz deprotonowania zostały przedstawione w Tabelach E5.14, E5.15 oraz E5.16 w części eksperymentalnej.



Rysunek 2.12. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+H]^+$ otrzymane za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).



Rysunek 2.13. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M-H]^-$ otrzymane za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).

Tabela 2.5. Eksperymentalne i teoretyczne wartości przekrojów czynnych (Ω_t i Ω_{exp}) (w \AA^2) jonów $[M+H]^+$ oraz $[M-H]^-$. Wartości Ω_t zostały obliczone dla najstabilniejszych geometrii (m05-2x/6-31g(d,p)) za pomocą metody PA.

| cząsteczka | jon | $\Omega_{exp}(\text{\AA}^2)$ | $\Omega_t(\text{\AA}^2)$ | $\Delta[\%]$ | |
|------------|--------------------|------------------------------|--------------------------|--------------|-----|
| apigenina | [M+H] ⁺ | 98,1 | 99,6 | 1,5 | |
| bajkaleina | | 96,6 | 98,7 | 2,1 | |
| chryzyna | | 91,1 | 95,7 | 4,8 | |
| dajdzeina | | 91,7 | 96,7 | 5,1 | |
| kemferol | | 97,3 | 101,3 | 3,9 | |
| luteolina | | 98,4 | 101,7 | 3,2 | |
| apigenina | | [M-H] ⁻ | 96,2 | 98,8 | 2,6 |
| bajkaleina | | | 97,1 | 98,2 | 1,1 |
| chryzyna | 94,7 | | 95,5 | 4,1 | |
| dajdzeina | 95,8 | | 96,0 | 0,2 | |
| kemferol | 101,6 | | 100,5 | -1,1 | |
| luteolina | 101,1 | | 101,5 | 0,4 | |

III.2.5 Podsumowanie

Spektrometria ruchliwości jonów (IM-MS) okazała się skuteczną metodą do rozdziału izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych takich jak apigenina, genisteina, chryzyna, bajkaleina, kemferol oraz luteolina.

Rozdział pomiędzy poszczególnymi izomerami podczas analizy ich równomolowej mieszaniny zaobserwowałam w przypadku jonów $[M+Na]^+$ chryzyny oraz dajdzeiny ($R_{p-p} = 0,74$) jak również apigeniny oraz bajkaleiny ($R_{p-p} = 0,47$). Dobra efektywność rozdziału wynikała z różnic w teoretycznych przekrojach czynnych, które wynosiły odpowiednio $1,9 \text{\AA}^2$ oraz $1,3 \text{\AA}^2$. Były one wystarczające do rozdziału izomerów konstytucyjnych wybranych flawonoidów w warunkach panujących w komorze ruchliwości T-Wave. W przypadku kemferolu oraz luteoliny brak rozdziału jonów $[M+Na]^+$ związany jest z małą różnicą ich przekrojów czynnych wynoszącą 1\AA^2 . Dla jonów protonowanych oraz deprotonowanych rozdział nie był obserwowany, co również związane było z małymi różnicami między przekrojami czynnymi.

Poprawę efektywności rozdziału jonów $[M+Na]^+$ chryzyny i dajdzeiny oraz apigeniny i bajkaleiny osiągnęłam dla dwutlenku węgla jako gazu buforowego. Wartości R_{p-p} wzrosły odpowiednio z 0,74 oraz 0,47 dla N_2 do 1,23 oraz 0,98 dla CO_2 . W przypadku kemferolu

i luteoliny nie obserwowałam rozdziału jonów $[M+Na]^+$ w wyniku zmiany gazu buforowego z N_2 na CO_2 .

Znaczące zróżnicowanie czasów dryfu dla wszystkich izomerycznych związków flawonoidowych a tym samym ich rozdział zaobserwowałam w wyniku ich kompleksowania z kationami potasu, K^+ . Wartości R_{p-p} dla chryzyny i dajdzeiny, apigeniny i bajkaleiny oraz kemferolu i luteoliny wzrosły odpowiednio z 0,74, 0,47 oraz 0,16 dla jonów $[M+Na]^+$ do 3,22, 0,71 oraz 0,53 dla jonów $[M+K]^+$.

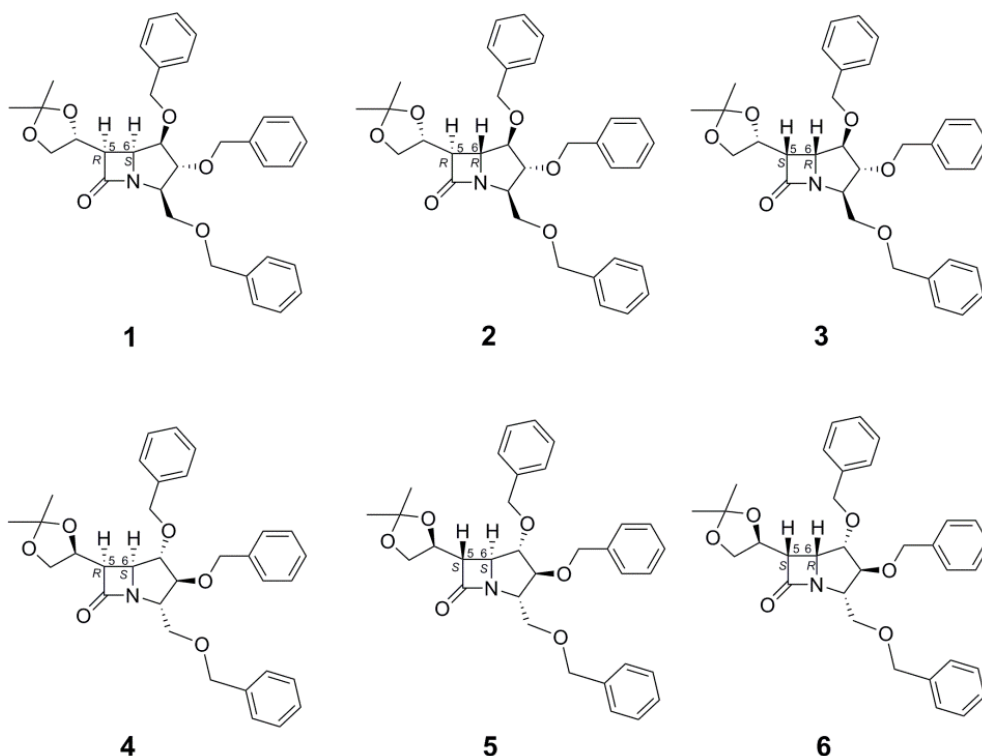
Wzrost rozdziału izomerycznych flawonoidów wraz ze wzrostem rozmiaru kationu ($Li^+ < Na^+ < K^+$) odpowiada zwiększeniu różnicy między przekrojami czynnymi jonów w następującej kolejności $[M+Li]^+ < [M+Na]^+ < [M+K]^+$ dla każdej pary związków flawonoidowych.

Publikacja, dotycząca tej części badań jest w trakcie przygotowywania.

III.3 Analiza diastereoizomerycznych β -laktamów za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi

Ta część pracy poświęcona jest badaniom nad wykorzystaniem spektrometrii ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi do rozdziału oraz analizy strukturalnej diastereoizomerycznych związków β -laktamowych, przedstawionych na Schemacie 3.1. Związki do badań otrzymałam z zespołu naukowego prof. Bartłomieja Furmana z Instytutu Chemii Organicznej PAN. Związki te posiadają sześć centrów stereogenicznych, przy czym konfiguracja na atomach węgla C5 oraz C6 jest odpowiedzialna za aktywność biologiczną związków β -laktamowych. Związki **1-3** różnią się między sobą tylko konfiguracją na atomach węgla C5 albo C6, podobnie jak związki **4 i 6**. Związki **1 i 4** oraz **3 i 6** posiadają tę samą konfigurację na atomach węgla C5 oraz C6, różnią się natomiast konfiguracją na pozostałych centrach stereogenicznych. W przypadku związków **3 i 5** oraz **2 i 4** konfiguracja na atomach węgla C5 pozostaje stała, w przeciwieństwie do pozostałych centrów stereogenicznych. Analogiczna sytuacja ma miejsce w przypadku związków **1 i 5** oraz **2 i 6**, dla których zostaje zachowana tylko konfiguracja na atomach węgla C6. Pozostałe związki, czyli **1 i 6**, **2 i 5** oraz **3 i 4** wykazują odmienną konfigurację na wszystkich centrach stereogenicznych. Konfiguracja na poszczególnych centrach stereogenicznych została określona za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego, rentgenowskiej analizy strukturalnej oraz dichroizmu kołowego.⁷⁷

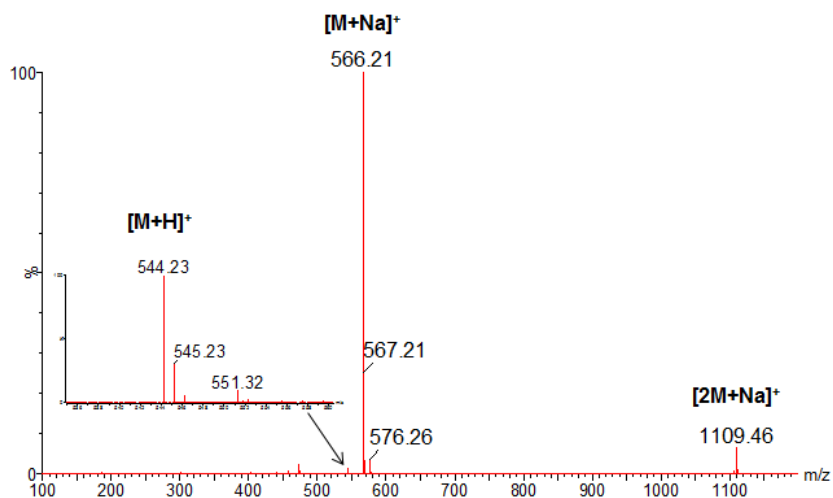
Ze względu na różnorodność stereochemiczną poniższych związków β -laktamowych oraz w celu łatwiejszej analizy widm ruchliwości jonów związki te analizowałam parami.



Schemat 21. Struktury diastereoizomerycznych związków β -laktamowych.

III.3.1 Wstępne pomiary ruchliwości jonów związków β -laktamowych

Badania nad wykorzystaniem IM-MS do rozróżnienia związków β -laktamowych rozpoczęłam od zarejestrowania widm masowych za pomocą techniki elektrosprej. W widmach ESI-MS zarejestrowanych dla związków β -laktamowych zaobserwowałam piki odpowiadające jonom protonowanym $[M+H]^+$, sodowanym $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$. Przykładowe widmo ESI-MS dla związku **1** przedstawiłam na Rysunku 3.1.

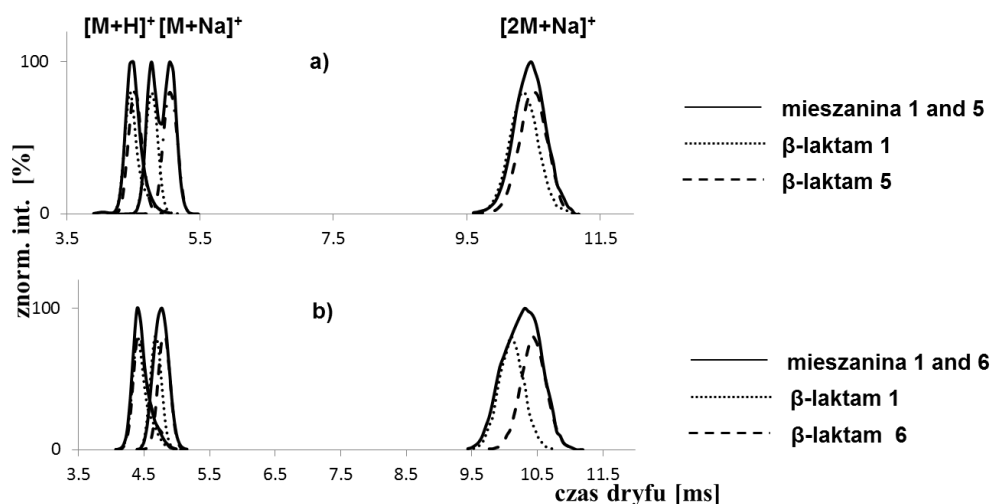


Rysunek 3.1. Widmo ESI-MS zarejestrowane dla związku **1**.

Przykładowe widma ruchliwości poszczególnych rodzajów jonów, zarejestrowane dla roztworów związków **1** i **5**, **1** i **6** oraz ich równomolowych mieszanin zostały przedstawione na Rysunku 3.2. Wartości czasów dryfu (t_d) i rozdzielczości (R_{p-p}), uzyskane na podstawie zarejestrowanych mobilogramów, zostały zebrane w Tabeli 3.1. Na podstawie uzyskanych wyników wyróżniłam grupę zawierającą pary β -laktamów, dla których obserwowałam znaczące różnice pomiędzy wartościami czasów dryfu jonów $[M+Na]^+$ dla poszczególnych izomerów w parze. Dla wszystkich pozostałych par β -laktamów, niewymienionych w Tabeli 3.1, nie obserwowałam rozdziału jonów. Wyniki dla tej grupy związków są przedstawione w Tabeli E5.15 w części eksperymentalnej. W przypadku jonów $[2M+Na]^+$, nieznaczące różnice pomiędzy wartościami t_d dla poszczególnych izomerów w parach nie są wystarczające do ich rozdziału. Najprawdopodobniej jest to związane z powstawaniem mieszanego dimeru.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że konfiguracja na atomach C5 oraz C6, która jest odpowiedzialna za aktywność biologiczną β -laktamów, odgrywa istotną rolę w procesie rozdziału związków β -laktamowych za pomocą IM-MS. Rozdział obserwowałam tylko dla par złożonych z dwóch β -laktamów o konfiguracji *R* na atomie węgla C5 oraz o konfiguracji *S* lub *R* na atomie węgla C6, a także dla par zawierających dwa związki β -laktamowe o konfiguracji *S* na atomie węgla C6 i konfiguracji *S* lub *R* na atomie węgla C5.

W kolejnym etapie zbadalam wpływ amplitudy fali (WH) oraz jej prędkości (WV), temperatury źródła jonów oraz temperatury desolvatacji, rodzaju gazu buforowego, jak również obecności kationu metalu na rozdział związków β -laktamowych w komorze ruchliwości jonów. Badania zostały przeprowadzone dla pary składającej się z β -laktamów **1** i **5**, które wybrałam jako związki modelowe.



Rysunek 3.2. Mobilogramy jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$ zarejestrowane dla roztworów diastereoizomerycznych β -laktamów i ich równomolowej mieszaniny (linia ciągła): a) β -laktamów 1 i 5, b) β -laktamów 1 i 6.

Tabela 3.1. Czasy dryfu (t_d) [ms] oraz wartości R_{p-p} jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$ dla związków β -laktamowych : 1 i 5, 2 i 4, 4 i 5 oraz 1 i 2.

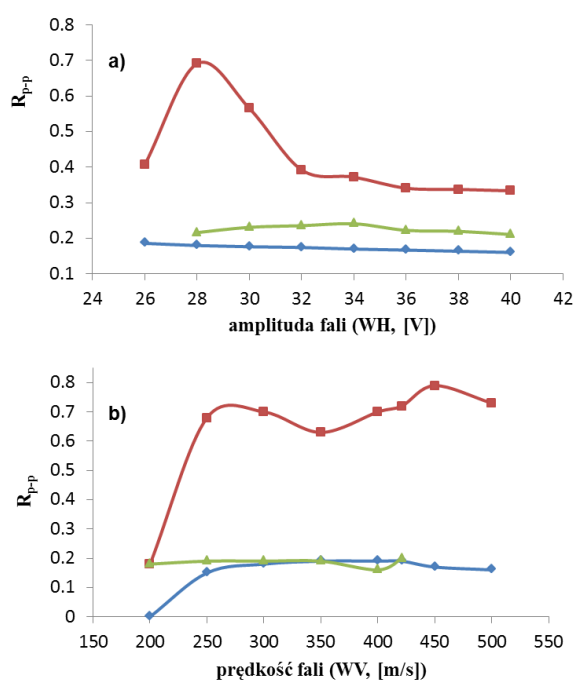
| struktura | jony | czas dryfu, t_d [ms] | | R_{p-p} |
|-----------|-------------|------------------------|----------|-----------|
| | | 1 | 5 | |
| 1. | $[M+H]^+$ | 4,43 | 4,50 | 0,19 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,75 | 5,03 | 0,72 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,31 | 10,50 | 0,20 |
| 2. | | 2 | 4 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,47 | 4,38 | 0,22 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,93 | 4,65 | 0,72 |
| 3. | | 4 | 5 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,06 | 4,13 | 0,21 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,28 | 4,54 | 0,72 |
| 4. | | 1 | 2 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,07 | 4,13 | 0,19 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,29 | 4,53 | 0,78 |
| | $[2M+Na]^+$ | 9,34 | 9,45 | 0,08 |

III.3.2 Wpływ amplitudy (WH) oraz prędkości fali (WV) na rozdział diastereoizomerycznych związków β -laktamowych

Amplituda i prędkość fali pola elektrycznego są parametrami, które wpływają na energię wewnętrzną jonów, a tym samym na ich ruchliwość w komorze ruchliwości jonów T-Wave (rozdział II.1). Wzrost amplitudy fali powoduje wzrost energii wewnętrznej jonu, natomiast wzrost jej prędkości powoduje zmniejszenie energii wewnętrznej jonu. Te dwa

parametry, a dokładnie ich stosunek $[WH]/[WV]$ wpływają również na zdolność rozdzielczą spektrometru (rozdział II.1, Równanie 8).

Wartości WH oraz WV były zmieniane odpowiednio w zakresach 26 – 40 V (przy stałej wartości $WV = 421$ m/s) oraz 200 – 450 m/s (przy stałej wartości $WH = 28,2$ V). Wartości stałe zostały wybrane z początkowych pomiarów, dla których uzyskano najlepszy rozdział jonów $[M+Na]^+$ dla pary związków **1** i **5**. Na Rysunku 3.3 przedstawiłam wykresy opisujące zależność rozdzielczości (R_{p-p}) od amplitudy fali (WH) oraz jej prędkości (WV) dla jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$. Zgodnie z przedstawionymi wykresami, znaczące zmiany R_{p-p} występują jedynie dla jonów $[M+Na]^+$. W przypadku pozostałych jonów badane parametry nie wpływają na efektywność rozdziału związków **1** i **5**.



Rysunek 3.3. Wykresy zależności R_{p-p} od **a)** amplitudy fali (WH, przy stałej wartości $WV = 421$ m/s) oraz **b)** prędkości fali (WV, przy stałej wartości $WH = 28,2$ V) dla następujących jonów: $[M+H]^+$ (niebieski), $[M+Na]^+$ (czerwony) oraz $[2M+Na]^+$ (zielony).

Wzrost amplitudy fali (WH) z 26 V do 28 V, przy stałej wartości $WV = 421$ m/s, spowodował wzrost wartości R_{p-p} z 0,41 do 0,72 dla jonów $[M+Na]^+$. Dalsze zwiększenie amplitudy fali spowodowało zmniejszenie wartości R_{p-p} . W przypadku wzrostu WV przy stałej wartości $WH = 28$ V, zaobserwowałam początkowy wzrost R_{p-p} jonów $[M+Na]^+$ z 0,17 ($WV = 200$ m/s) do 0,70 ($WV = 300$ m/s), następnie spadek rozdzielczości do $R_{p-p} = 0,62$ ($WV = 350$ m/s) i ponowny wzrost R_{p-p} do 0,72 przy $WV = 421$ m/s i 0,75 przy $WV = 450$ m/s. Obserwowane zmiany rozdzielczości (R_{p-p}) są prawdopodobnie związane ze zmianami

energii wewnętrznej jonów $[M+Na]^+$ β -laktamu **1** i **5**. W wyniku wzrostu energii wewnętrznej jony $[M+Na]^+$ β -laktamu **1** i **5** przyjmują konformacje o zbliżonych przekrojach czynnych, niwelując tym samym różnice między czasami dryfu dla tych związków.

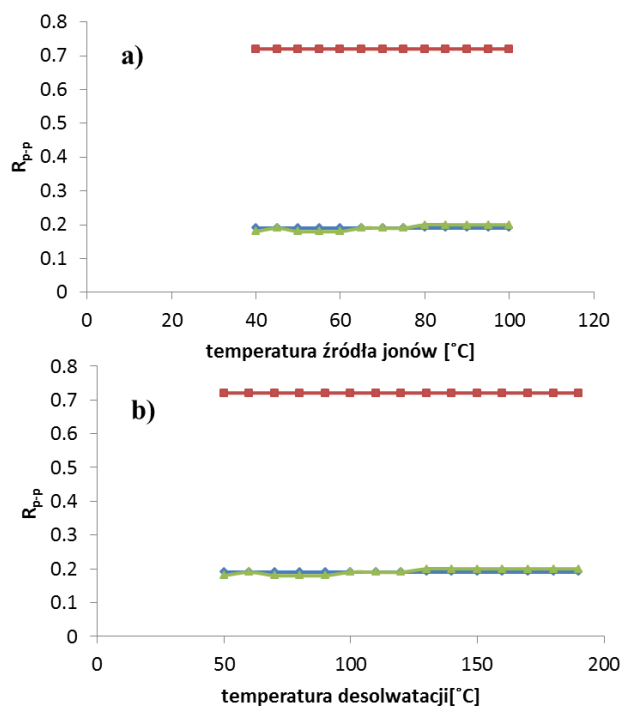
Największe zróżnicowanie czasów dryfu dla dwóch diastereoizomerów następuje przy prędkościach fali wynoszących $WV = 421$ m/s i $WV = 450$ m/s dla stałej amplitudy fali $WH = 28,2$ V. Odpowiada to następującym stosunkom $[WH]/[WV]$: 0,067 oraz 0,062. Dalsze eksperymenty prowadzone były przy wyżej wymienionych wartościach $WV = 421$ m/s oraz $WH = 28,2$ V.

III.3.3 Wpływ temperatury źródła jonów (ST) oraz temperatury desolvatacji jonów (DT) na rozdział diastereoizomerycznych związków β -laktamowych

Ważnym etapem w analizie jonów w fazie gazowej jest proces jonizacji. W moich badaniach był to elektrosprej, polegający na przeniesieniu jonów z roztworu do fazy gazowej. Podczas tego przejścia fazowego, w wyniku różnych mechanizmów jonizacji, o których tutaj nie będę pisała,⁷⁸ jony mogą zmieniać swoją konformację w wyniku wzrostu ich energii wewnętrznej. Temat zmian konformacyjnych jonów w trakcie jonizacji elektrosprej jest szeroko dyskutowany w literaturze.⁷⁹ Zakres tych zmian może być częściowo kontrolowany za pomocą temperatury źródła jonów oraz temperatury desolvatacji. Wzrost energii wewnętrznej jonów na etapie jonizacji elektrosprej powinien być znacznie mniejszy w porównaniu ze wzrostem tej energii w momencie przejścia jonów do komory ruchliwości T-Wave.¹⁹ Pomimo tego, postanowiłam dokładnie zbadać, czy zmiany temperatury źródła jonów oraz temperatury desolvatacji wpływają na efektywność rozdziału związków β -laktamowych.

Pomiary przeprowadzałam dla pary β -laktamów **1** i **5**. W pierwszej kolejności zmieniałam temperaturę źródła jonów w zakresie 40 – 100 °C, utrzymując stałą wartość temperatury desolvatacji wynoszącą 150 °C. W kolejnym etapie temperatura źródła jonów utrzymywana była na stałym poziomie (80 °C) zaś zmianie ulegała temperatura desolvatacji. Była ona zmieniana w zakresie 50 - 150 °C. Na Rysunku 3.4 przedstawiłam wykresy zależności rozdzielczości R_{p-p} od temperatury źródła jonów (Rysunek 3.4.a) oraz od temperatury desolvatacji (Rysunek 3.4.b).

Przedstawione zależności wskazują, że zarówno wzrost temperatury źródła jonów oraz temperatury desolwatacji nie ma wpływu na rozdział jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$ pochodzących od diastereoizomerycznych związków β -laktamowych. Wartości R_{p-p} wynoszą odpowiednio 0,19, 0,72 oraz 0,20, bez względu na wartość temperatury.



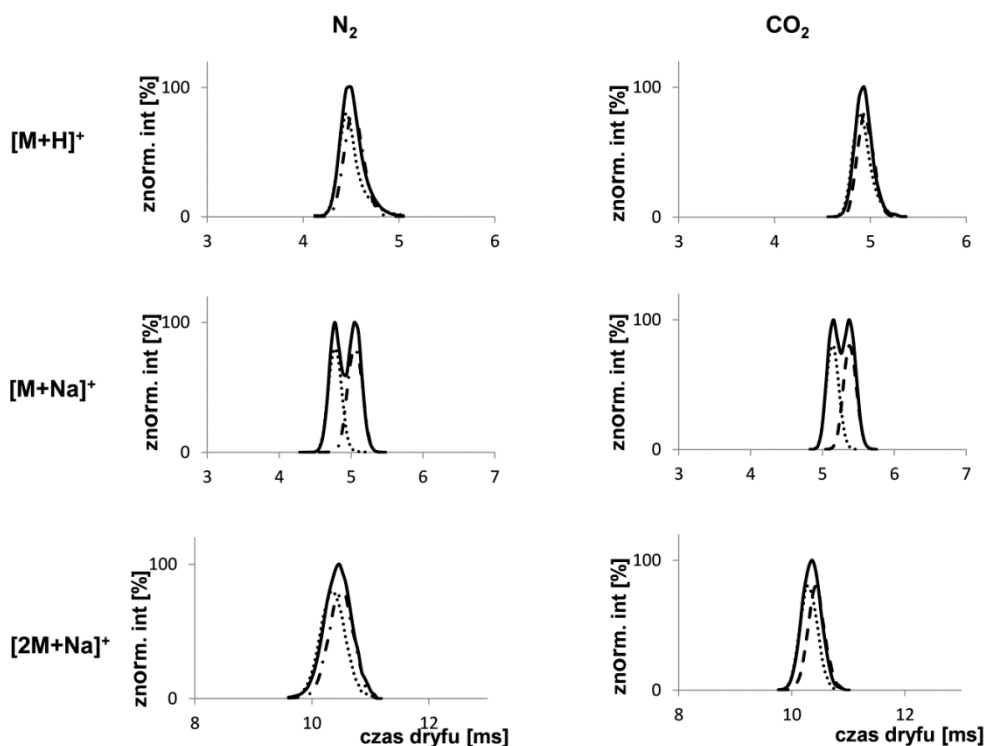
Rysunek 3.4. Wykresy zależności R_{p-p} od **a)** temperatury źródła jonów (przy stałej wartości temperatury desolwatacji $T = 150$ °C) oraz **b)** temperatury desolwatacji (przy stałej wartości temperatury źródła jonów, $T = 80$ °C) dla następujących jonów: $[M+H]^+$ (niebieski), $[M+Na]^+$ (czerwony) oraz $[2M+Na]^+$ (zielony).

III.3.4 Wpływ gazu buforowego na rozdział diastereoizomerycznych związków β -laktamowych

Z przedstawionych w części literaturowej oraz w rozdziale III.2 rozważań wynika, że zmiana gazu buforowego odgrywa bardzo ważną rolę w rozdziale związków organicznych. We wcześniejszych eksperymentach opisanych w rozdziałach III.2, zastosowanie dwutlenku węgla, gazu o większej masie i polaryzowalności (Tabela 2, część literaturowa), w analizie sztywnych cząsteczek związków flawonoidowych, spowodowało poprawę rozdziału jonów $[M+Na]^+$ w porównaniu z azotem. Wpływ gazu buforowego na rozdział jonów zależy również od charakteru badanych związków, jak wykazałam w rozdziale II.2 w części literaturowej oraz III.1 – badania własne.

Aby zbadać zakres tego wpływu na rozdział wybranych związków β -laktamowych, posiadających w swej strukturze trzy labilne grupy benzyloksylowe, przeprowadziłam eksperymenty z zastosowaniem azotu oraz dwutlenku węgla jako gazu buforowego. Badania zostały przeprowadzone dla wybranej pary modelowej zawierającej związku **1** oraz **5**. Rysunek 3.8 przedstawia widma ruchliwości jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$ dla poszczególnych diastereoizomerów **1** i **5**, jak również ich równomolowej mieszaniny zarejestrowane w N_2 oraz CO_2 . W Tabeli 3.2 zostały zebrane czasy dryfu (t_d) oraz wartości R_{p-p} dla wszystkich obserwowanych jonów w azocie oraz dwutlenku węgla.

Zastosowanie CO_2 spowodowało zmniejszenie efektywności rozdziału jonów $[M+Na]^+$ ($R_{p-p} = 0,61$) w porównaniu z azotem. ($R_{p-p} = 0,72$). Dodatkowo zaobserwowałam nieznaczny wzrost rozdziału jonów $[2M+Na]^+$ dla poszczególnych diastereoizomerów w parze **1** i **5**, jednakże nie był on wystarczający do uzyskania rozdziału w ich równomolowej mieszaninie.



Rysunek 3.8. Mobilogramy jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$ zarejestrowane dla poszczególnych diastereoizomerów (**1** – linia kropkowana; **5** - linia przerywana) oraz ich równomolowej mieszaniny (linia ciągła) w zależności od gazu buforowego.

Tabela 3.2. Czasy dryfu (t_d) i wartości R_{p-p} jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$ dla związków **1** oraz **5** w N_2 oraz CO_2 .

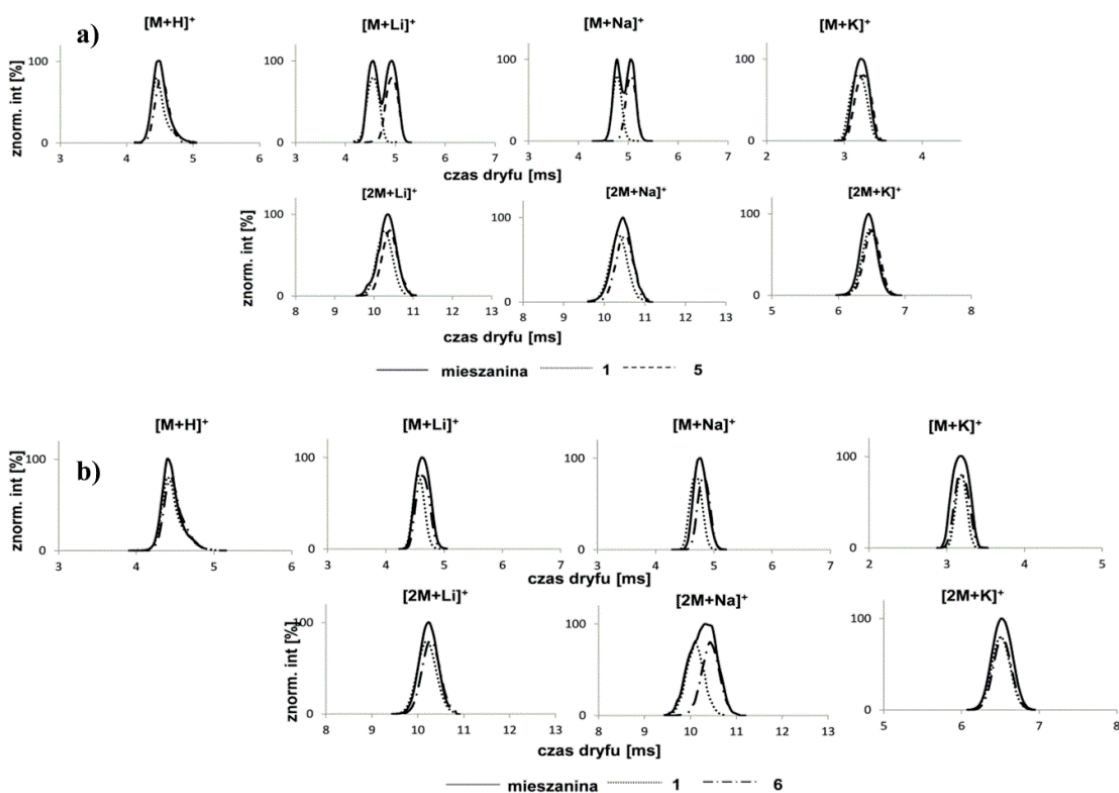
| gaz | masa | polaryzowalność (10^{-24} cm^3) | jony | czas dryfu, t_d [ms] | | R_{p-p} |
|--------|-------|--|-------------|------------------------|-------|-----------|
| | | | | 1 | 5 | |
| N_2 | 28,01 | 1,74 | $[M+H]^+$ | 4,43 | 4,50 | 0,19 |
| | | | $[M+Na]^+$ | 4,76 | 5,03 | 0,72 |
| | | | $[2M+Na]^+$ | 10,31 | 10,50 | 0,20 |
| CO_2 | 44,01 | 2,91 | $[M+H]^+$ | 4,87 | 4,92 | 0,14 |
| | | | $[M+Na]^+$ | 5,12 | 5,35 | 0,61 |
| | | | $[2M+Na]^+$ | 10,25 | 10,39 | 0,22 |

III.3.5 Wpływ kationu metalu na rozdział diastereoizomerycznych związków β -laktamowych

Jak wynika z doniesień literaturowych oraz eksperymentów przedstawionych w rozdziale III.2, kation metalu może powodować zmiany konformacyjne cząsteczki, umożliwiając rozdział strukturalnie podobnych związków, przy czym zmiana ta zależy od rozmiaru kationu oraz rodzaju badanych jonów.

Do badań nad wpływem obecności kationu metalu na rozdział diastereoizomerycznych związków β -laktamowych wybrałam kationy Li^+ , Na^+ oraz K^+ . Eksperymenty rozpoczęłam od zarejestrowania widm ESI-MS dla asocjatów wybranych β -laktamów z powyższymi litowcami. W widmach masowych obserwowałam sygnały pochodzące od jonów $[M+X]^+$ oraz $[2M+X]^+$ (gdzie $X = Li^+, Na^+, K^+$). Badania za pomocą IM-MS przeprowadziłam zarówno dla pary modelowej **1** i **5** jak i dla pary **1** i **6**, którą wybrałam jako parę reprezentującą grupę związków β -laktamowych, dla których nie obserwowałam rozdziału.

Widma ruchliwości jonów $[M+X]^+$ oraz $[2M+X]^+$ zarejestrowane dla poszczególnych izomerów **1** i **5** oraz **1** i **6** jak również dla ich równomolowych mieszanin zostały przedstawione na Rysunku 3.9. Szczegółowe dane uzyskane z tych widm (t_d oraz R_{p-p}) zostały zebrane Tabeli 3.3.



Rysunek 3.9. Mobilogramy jonów $[M+H]^+$, $[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Li]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[2M+K]^+$ zarejestrowane dla poszczególnych diastereoizomerów **a)** 1-linia kropkowana, 5-linia przerywana oraz **b)** 1-linia kropkowana, 6-linia przerywana oraz ich równomolowych mieszanin (linia ciągła).

Obecność kationu litu spowodowała nieznaczne zwiększenie rozdziału jonów $[M+Li]^+$ ($\Delta t_d = 0,36$ ms, $R_{p-p} = 0,74$) w porównaniu z jonami $[M+Na]^+$ ($\Delta t_d = 0,27$ ms, $R_{p-p} = 0,72$). Zależność ta była obserwowana tylko dla pary składającej się ze związków **1** i **5**. W przypadku drugiej pary β -laktamów (**1** i **6**) zmiana kationu metalu nie miała wpływu na efektywność rozdziału jonów $[M+X]^+$ oraz $[2M+X]^+$.

Wzrost rozdziału diastereoizomerów obserwowany dla jonów $[M+X]^+$ wraz ze zmniejszeniem rozmiaru kationu metalu, w przypadku pary β -laktamów **1** i **5**, prawdopodobnie może być związany z siłą wiązania kationów metali alkalicznych przez trzy pierścienie aromatyczne pochodzące od grup benzyloksylowych. Jak wynika z doniesień literaturowych, małe jony o dużej gęstości ładunku wykazują wzrost powinowactwa do układów wiązań π w fazie gazowej. Energie oddziaływań kationów metali alkalicznych z benzenem zmniejszają się w następującej kolejności $Li^+ > Na^+ > K^+$.⁸⁰ W związku z tym oddziaływania występujące między kationem a układem wiązań π odgrywają znaczącą rolę w różnicowaniu uprzywilejowanych konformacji β -laktamów **1** i **5**. Zmiana kationu metalu z Na^+ na Li^+ powoduje zwiększenie wartości rozdzielczości, odpowiednio, z 0,72 do 0,74.

Tabela 3.3. Czasy dryfu (t_d) [ms] oraz wartości R_{p-p} dla wybranych par związków β -laktamowych.

| jony | m/z | czasy dryfu [ms] | | | czasy dryfu [ms] | | |
|----------------------|--------|-----------------------|-------|-----------|-----------------------|-------|-----------|
| | | WV=421 m/s; WH=28,2 V | | | WV=421 m/s; WH=28,2 V | | |
| | | 1 | 5 | R_{p-p} | 1 | 6 | R_{p-p} |
| [M+H] ⁺ | | 4,43 | 4,50 | 0,19 | 4,36 | 4,38 | 0,02 |
| [M+Li] ⁺ | 550,2 | 4,55 | 4,91 | 0,74 | 4,54 | 4,61 | 0,16 |
| [M+Na] ⁺ | 566,2 | 4,76 | 5,03 | 0,72 | 4,68 | 4,80 | 0,27 |
| [M+K] ⁺ | 582,1 | 4,91 | 5,04 | 0,21 | 4,91 | 4,97 | 0,10 |
| [2M+Li] ⁺ | 1093,4 | 10,2 | 10,46 | 0,30 | 10,17 | 10,29 | 0,14 |
| [2M+Na] ⁺ | 1109,5 | 10,31 | 10,50 | 0,20 | 10,22 | 10,48 | 0,33 |
| [2M+K] ⁺ | 1125,3 | | | | | | |
| | | WV=500 m/s; WH=30 V | | | WV=500 m/s; WH=30 V | | |
| [M+K] ⁺ | 582,11 | 3,16 | 3,23 | 0,16 | 3,16 | 3,18 | 0,06 |
| [2M+K] ⁺ | 1125,3 | 6,45 | 6,48 | 0,06 | 6,48 | 6,49 | 0,02 |

III.3.6 Wyznaczanie eksperymentalnych i teoretycznych przekrojów czynnych związków β -laktamowych

Wartości eksperymentalnych przekrojów czynnych (Tabela 3.4) wyznaczyłam na podstawie krzywych kalibracji, otrzymanych dla dwóch zestawów związków referencyjnych: polialaniny oraz wybranych związków: ondansetronu, kolchicyny, verapamilu i rezerpiny,⁴⁶ które wykazują podobieństwo strukturalne do analizowanych związków β -laktamowych (Schemat 2.2, str. 75) Przykładowe krzywe kalibracyjne oraz czasy dryfu, po uwzględnieniu czasu jaki jony spędzają poza komorą ruchliwości T-Wave zanim dotrą do detektora, dla związków odniesienia oraz β -laktamów **1** i **5** zostały przedstawione na Rysunku E5.3 oraz Tabeli E5.14 w części eksperymentalnej. Wyznaczone wartości Ω_{eksp} są średnimi z pomiarów ruchliwości jonów dla pięciu różnych zestawów parametrów, dla których odchylenie standardowe z pomiarów przekrojów czynnych wyniosło poniżej 1,5% (dla polialaniny i drugiej grupy związków odniesienia: ondansetronu, kolchicyny, verapamilu i rezerpiny). Ponadto każdy eksperyment powtórzyłam cztery razy, a odchylenie standardowe dla tych poczwórnych pomiarów wyniosło poniżej 1%.

Tabela 3.4. Wartości eksperymentalnych przekrojów czynnych Ω_{eksp} (\AA^2) jonów $[\text{M}+\text{Na}]^+$ oraz $[\text{M}+\text{H}]^+$ dla analizowanych związków β -laktamowych.

| jony | $[\text{M}+\text{Na}]^+$ | | $[\text{M}+\text{H}]^+$ | |
|----------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|---|
| | Ω_{eksp} polialanina | Ω_{eksp} związki lekoopodobne | Ω_{eksp} polialanina | Ω_{eksp} związki lekoopodobne |
| 1 | 157,1 | 157,0 | 151,6 | 150,2 |
| 2 | 161,8 | 162,7 | 153,6 | 150,3 |
| 3 | 159,6 | 159,1 | 152,3 | 150,7 |
| 4 | 157,3 | 157,0 | 151,8 | 149,9 |
| 5 | 161,2 | 161,9 | 153,0 | 151,8 |
| 6 | 158,5 | 158,8 | 152,0 | 150,4 |

W kolejnym etapie obliczyłam teoretyczne przekroje czynne (Ω_t) jonów $[\text{M}+\text{H}]^+$ i $[\text{M}+\text{Na}]^+$ dla najniższych energetycznie struktur otrzymanych za pomocą odpowiednich metod obliczeniowych chemii kwantowej. Dokładny opis optymalizacji związków β -laktamowych został przedstawiony w części eksperymentalnej w podrozdziale V.3.3 Najniższe energetycznie struktury jonów $[\text{M}+\text{Na}]^+$ oraz $[\text{M}+\text{H}]^+$ przedstawiłam na Rysunkach 3.9 oraz 3.10. Na Rysunku 3.10 za pomocą zielonych elips zaznaczyłam miejsca protonowania związków β -laktamowych.

W Tabeli 3.5 zostały przedstawione wartości teoretycznych przekrojów czynnych oraz różnice pomiędzy Ω_t a Ω_{eksp} (otrzymanymi dla polialaniny (P^a) oraz związków lekoopodobnych (D^b)) dla jonów $[\text{M}+\text{H}]^+$ oraz $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Nieznacznie lepszą zgodność między doświadczalnie wyznaczonymi wartościami przekrojów czynnych a ich wartościami teoretycznymi, obliczonymi dla modeli strukturalnych, zaobserwowałam dla związków lekoopodobnych jako jonów odniesienia. Prawdopodobnie może to wynikać z ich podobieństwa strukturalnego (obecność pierścieni aromatycznych i grup funkcyjnych, tj. grupy karbonylowe, amidowe, eterowe) do badanych β -laktamów.

Konfiguracja wszystkich centrów stereogenicznych ma znaczenie w rozdziale związków β -laktamowych, a w szczególności konfiguracja na atomach węgla C5 oraz C6. Największe zróżnicowanie strukturalne spowodowane jest obecnością grup benzyloksylowych, które skutecznie solwują kation sodu. W przypadku diastereoizomerów **1** oraz **4** kation sodu oddziałuje z trzema pierścieniami aromatycznymi oraz jednym atomem tlenu pochodzącym od grupy benzyloksylowej. W strukturach **2** i **6** oraz **3** i **5** kation Na^+ solwotowany jest odpowiednio przez dwa pierścienie aromatyczne oraz jeden atom tlenu lub dwa atomy tlenu (Rysunek 3.9). Wyniki te potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia o kluczowych oddziaływaniach kationów metali z aromatycznymi łańcuchami benzyloksyloowymi, które determinują konformacje jonów związków β -laktamowych.

W przypadku jonów $[M+H]^+$ (Rysunek 3.10) karbonylowy atom tlenu w pierścieniu β -laktamowym wykazywał najwyższe powinowactwo do protonu (980,3 kJ/mol), które było wyższe o 40,6 - 60,7 kJ/mol od innych możliwych miejsc protonowania. Wartości powinowactwa do protonu dla wszystkich możliwych miejsc protonowania zostały przedstawione w Tabeli E5.27 w części eksperymentalnej. Najniższe energetycznie struktury protonowanych związków β -laktamowych są dodatkowo stabilizowane przez oddziaływania protonu z atomem tlenu pochodzącym od grupy 1,3-dioksolanu (Rysunek 3.10).

Tabela 3.5. Wartości teoretycznych przekrojów czynnych Ω_t (\AA^2) dla jonów $[M+Na]^+$ oraz $[M+H]^+$ dla analizowanych związków β -laktamowych.

| struktury | $[M+Na]^+$ | | | $[M+H]^+$ | | |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| | Ω_t (TJ) | Δ [%] | | Ω_t (TJ) | Δ [%] | |
| | | P ^a | D ^b | | P ^a | D ^b |
| 1 | 155,0 | -1,4 | -1,3 | 150,1 | -1,0 | -0,1 |
| 2 | 162,7 | 0,6 | 0,0 | 149,3 | -2,9 | -0,7 |
| 3 | 158,3 | -0,8 | -0,5 | 150,3 | -1,3 | -0,3 |
| 4 | 155,1 | -1,4 | -1,2 | 149,0 | -1,9 | -0,6 |
| 5 | 162,6 | 0,9 | 0,4 | 150,3 | -1,8 | -1,0 |
| 6 | 158,7 | 0,1 | -0,01 | 150,2 | -2,0 | -1,0 |

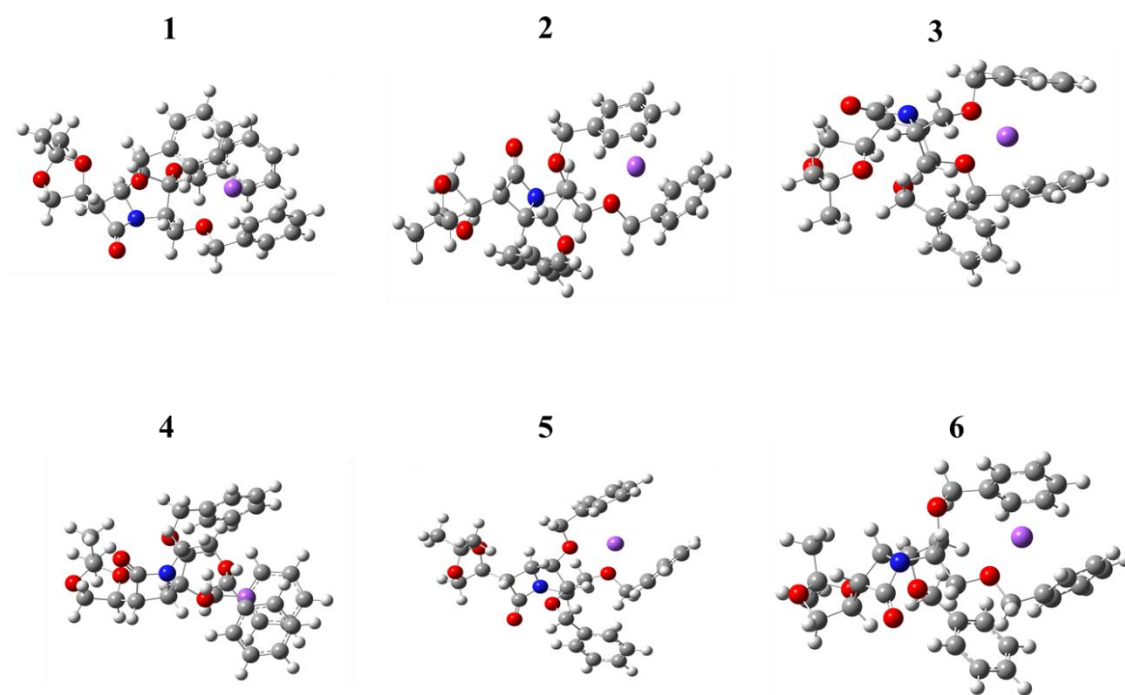
^a różnica pomiędzy eksperymentalnymi przekrojami czynnymi (dla polialaniny jako wzorca) oraz ich wartościami teoretycznymi;

^b różnica pomiędzy eksperymentalnymi przekrojami czynnymi (dla związków lekopodobnych jako związków odniesienia) oraz ich wartościami teoretycznymi.

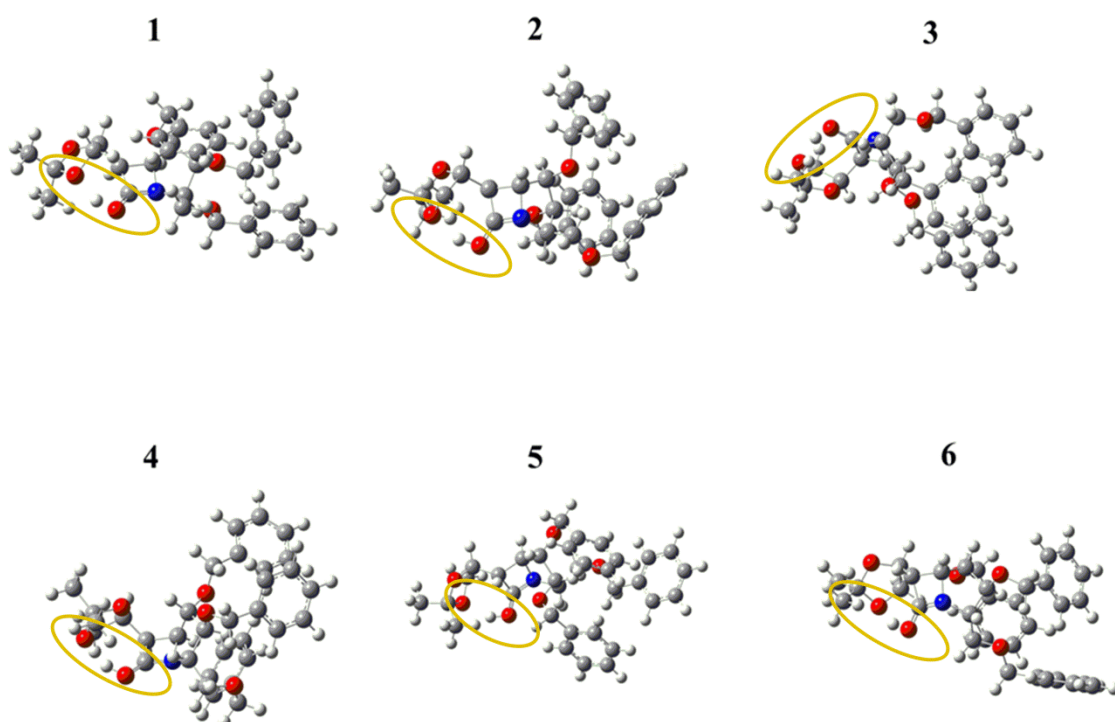
Dodatkowo, w celu potwierdzenia danych eksperymentalnych dotyczących badań nad wpływem kationu litu na rozdział związków β -laktamowych, wyznaczyłam eksperymentalne przekroje czynne oraz obliczyłam teoretyczne przekroje czynne jonów $[M+Li]^+$ dla najniższych energetycznie struktur związków **1**, **5** i **6** (Rysunek 3.11). W Tabeli 3.6 zostały przedstawione wartości Ω_{eksp} oraz Ω_t jonów $[M+Li]^+$.

Kation litu w strukturze **1** solwatowany jest przez dwa pierścienie aromatyczne oraz jeden atom tlenu, w przeciwieństwie do kationu sodu, gdzie trzy pierścienie aromatyczne oraz jeden atom tlenu zaangażowane były w tworzenie odpowiednich asocjatów. Natomiast w strukturze związku **5** kation Li^+ solwatowany jest przez dwa pierścienie aromatyczne oraz dwa atomy tlenu, podobnie jak w przypadku kationu sodu. W przypadku struktury otrzymanej dla związku **6** atom litu, podobnie jak kation sodu, solwatowany jest przez dwa pierścienie aromatyczne i jeden atom tlenu.

Wzrost różnicy Ω_t jonów $[M+Li]^+$ ($\Delta\Omega_t = 9,0 \text{ \AA}^2$), w porównaniu z $\Delta\Omega_t$ jonów $[M+Na]^+$ która wynosi $7,6 \text{ \AA}^2$, dla związków **1** i **5** przyczynił się do poprawy rozdziału jonów $[M+Li]^+$.



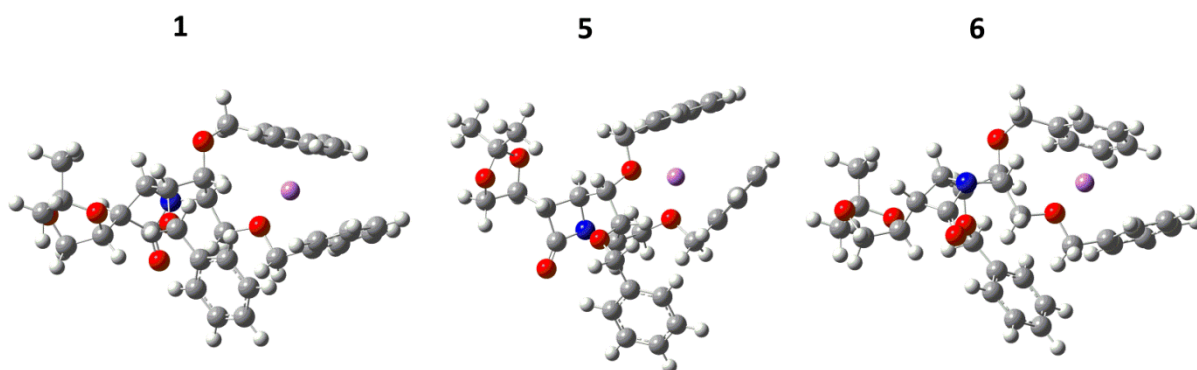
Rysunek 3.9. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+Na]^+$ otrzymane za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).



Rysunek 3.10. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+H]^+$ otrzymane za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).

Tabela 3.6. Wartości teoretycznych przekrojów czynnych Ω_t (\AA^2) dla jonów $[M+\text{Na}]^+$ oraz $[M+\text{H}]^+$ dla analizowanych związków β -laktamowych.

| jony struktury | $[M+\text{Li}]^+$ | | | | |
|-------------------|------------------------|-------------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | Ω_{eksp} | Ω_{eksp} | Ω_t (TJ) | Δ [%] | |
| | polialanina | związki lekoopodobne | | P ^a | D ^b |
| 1 | 154,3 | 153,2 | 151,9 | -1,6 | -0,9 |
| 5 | 161,2 | 161,7 | 160,9 | -0,2 | -0,5 |
| 6 | 155,4 | 154,7 | 151,2 | -2,8 | -2,0 |



Rysunek 3.11. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+\text{Li}]^+$ otrzymane za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).

III.3.7 Podsumowanie

W przypadku diastereoizomerycznych związków β -laktamowych obserwowałam rozdział jonów $[M+\text{Na}]^+$ tylko dla par składających się ze związków **1** i **5**, **2** i **4**, **4** i **5** oraz **1** i **2**. Wzrost temperatury źródła jonów oraz temperatury desolvatacji nie miał wpływu na efektywność rozdziału związków β -laktamowych. Najlepszą rozdzielczość obserwowałam przy prędkości fali wynoszącej 421 m/s oraz przy amplitudzie fali równej 28,2 V. Zmiana kationu metalu z sodu na lit spowodowała nieznaczną poprawę efektywności rozdziału jonów $[M+\text{X}]^+$. Wartość R_{p-p} wzrosła odpowiednio z 0,72 do 0,74. Zastosowanie dwutlenku węgla jako gazu buforowego spowodowało zmniejszenie rozdziału jonów $[M+\text{Na}]^+$ ($R_{p-p} = 0,61$), w porównaniu z azotem ($R_{p-p} = 0,72$). Szczegółowa analiza konformacyjna jonów $[M+\text{Na}]^+$ wykazała, że kation sodu jest solwatowany przez grupy benzyloksylowe. Zaobserwowałam trzy możliwe sposoby oddziaływania kationów Na^+ z β -laktamami: solwatacja jonu Na^+ przez trzy pierścienie aromatyczne i jeden atom tlenu (**1** i **4**), oddziaływanie kationu Na z dwoma

pierścieniami aromatycznymi i jednym atomem tlenu (**2 i 6**) albo z dwoma atomami tlenu (**3 i 5**).

Teoretyczne przekroje czynne obliczone dla najniższych energetycznie struktur związków β -laktamowych wykazywały dobrą zgodność z wartościami eksperymentalnymi. Zgodność ta była lepsza dla Ω_{eksp} wyznaczonych na podstawie krzywej kalibracji stosując związki odniesienia, takie jak ondansetron, kolchicynę, werapamil oraz rezerpinę. Prawdopodobnie jest to wynikiem ich podobieństwa strukturalnego (obecność pierścieni aromatycznych i grup funkcyjnych, tj. grupy karbonyłowe, amidowe, eterowe) do związków β -laktamowych.

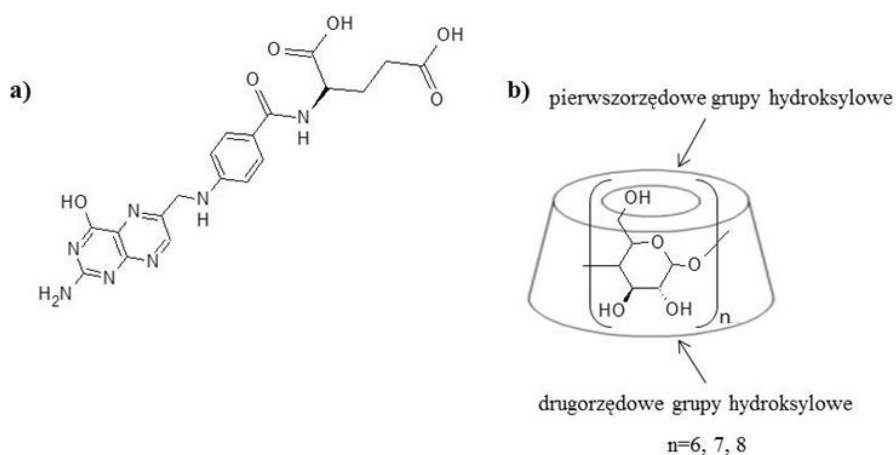
Wstępne wyniki badań nad wykorzystaniem spektrometrii ruchliwości jonów do analizy związków β -laktamowych wydają się być bardzo przydatne w identyfikacji oraz do opisu trójwymiarowych struktur związków β -laktamowych w fazie gazowej.

Publikacja z tej części pracy jest na etapie recenzji w *Journal of Mass Spectrometry*.

III.4 Analiza kompleksów niekowalencyjnych kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstryną (CD)

W tej części pracy zostaną zaprezentowane wyniki dotyczące analizy strukturalnej niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego (KF, Schemat 4.1.a) z α -, β - i γ -cyklodekstryną (α -, β - i γ -CD) za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów. Schematyczna struktura cyklodekstryn została przedstawiona na Schemacie 4.1.b. Kwas foliowy pełni w organizmie wiele funkcji m.in.: bierze on udział w syntezie kwasów nukleinowych a także w tworzeniu czerwonych krwinek.⁸¹ Kwas foliowy wykazuje duże powinowactwo do receptora kwasu foliowego (FR) znajdującego się na powierzchni komórek nowotworowych m.in. piersi oraz jajników.⁸² Ze względu na podobieństwo strukturalne do innych związków biologicznie czynnych, kwas foliowy posłużył jako wzorzec do badań nad zwiększeniem biodostępności związków wykazujących aktywność biologiczną, zwłaszcza tych toksycznych. Jednym z możliwych sposobów wzrostu biodostępności leków jest kompleksowanie z cyklodekstrynami (CD).

Początkowe badania nad różnorodnością strukturalną niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstrynami za pomocą spektrometrii mas, magnetycznego rezonansu jądrowego oraz analizy termogravimetrycznej (TG), prowadzone przez dr Magdalenę Ceborską z Instytutu Chemii Fizycznej PAN we współpracy z naszą grupą badawczą wykazały, że α -CD tworzy z kwasem foliowym kompleks ekсклюzyjny, podczas gdy β -CD oraz γ -CD tworzą z kwasem foliowym stabilne kompleksy inkluzyjne.⁸³ Dodatkowo, określiliśmy stabilność tych kompleksów, która wzrastała w następującej kolejności KF/ α -CD < KF/ β -CD < KF/ γ -CD. Szczegółowa analiza strukturalna za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej okazała się niemożliwa, ponieważ kompleksy te nie wykazywały zdolności do tworzenia kryształów. Dlatego też spektrometria ruchliwości jonów została wykorzystana do określenia trójwymiarowych struktur niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z cyklodekstrynami.

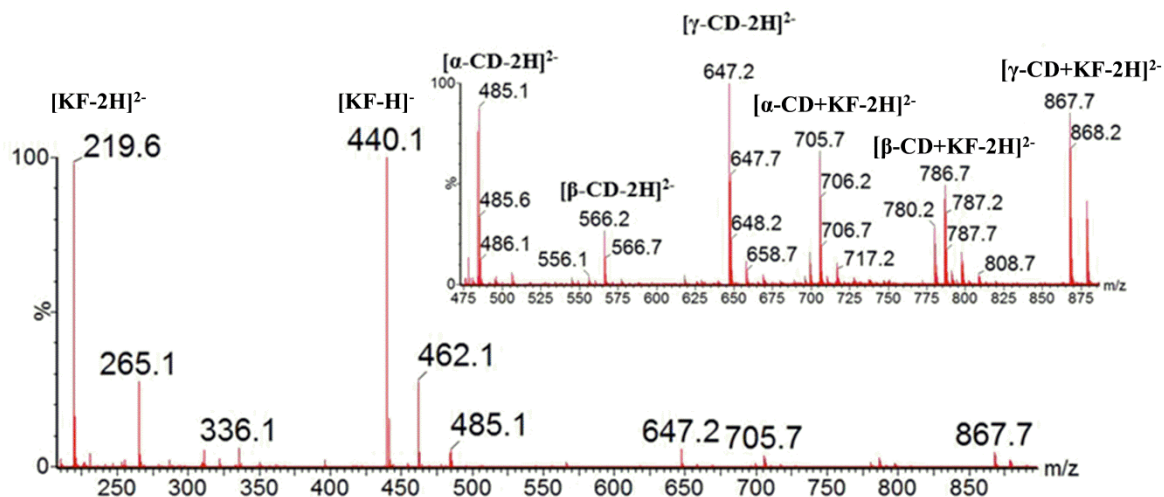


Schemat 4.1. a) Struktura kwasu foliowego. b) Schematyczna struktura cyklodekstryn.

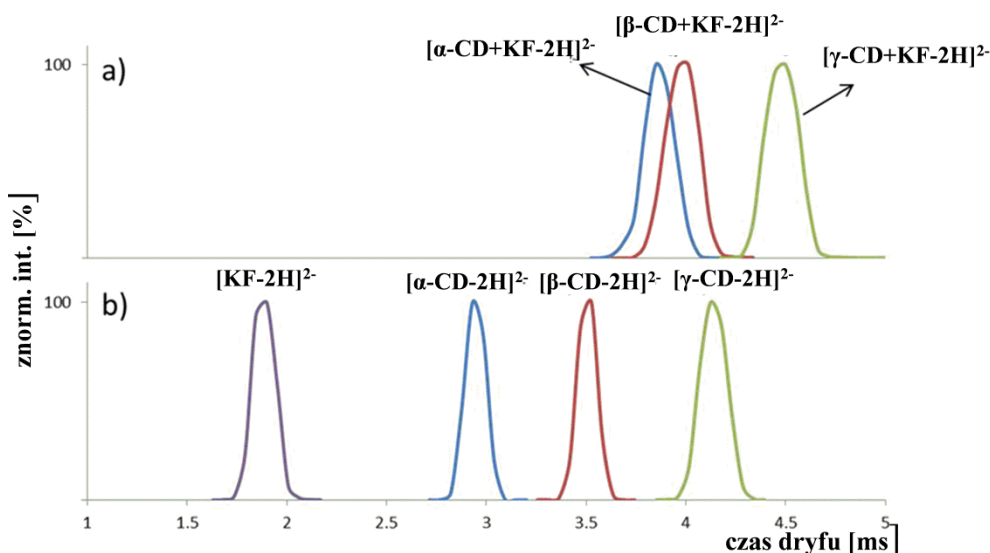
III.4.1 Wstępne pomiary za pomocą IM-MS

Początkowe eksperymenty rozpoczęłam od zarejestrowania widm masowych za pomocą techniki elektrosprej. W widmie masowym ESI-MS zarejestrowanym dla mieszaniny α -, β - i γ -CD z kwasem foliowym, w trybie jonów ujemnych obserwowałam sygnały odpowiadające pojedynczo i podwójnie deprotonowanym jonom kwasu foliowego oraz poszczególnych cyklodekstryn, jak również sygnały odpowiadające ich niekwalencyjnym kompleksom (KF/ α -CD, KF/ β -CD, KF/ γ -CD, Rysunek 4.1).

Widma ruchliwości jonów $[\text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\alpha\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\gamma\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz $[\alpha\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\gamma\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ zostały przedstawione na Rysunku 4.2.



Rysunek 4.1. Widma masowe ESI-MS wykonane w trybie jonów ujemnych dla mieszaniny kwasu foliowego z α -CD, β -CD oraz γ -CD.



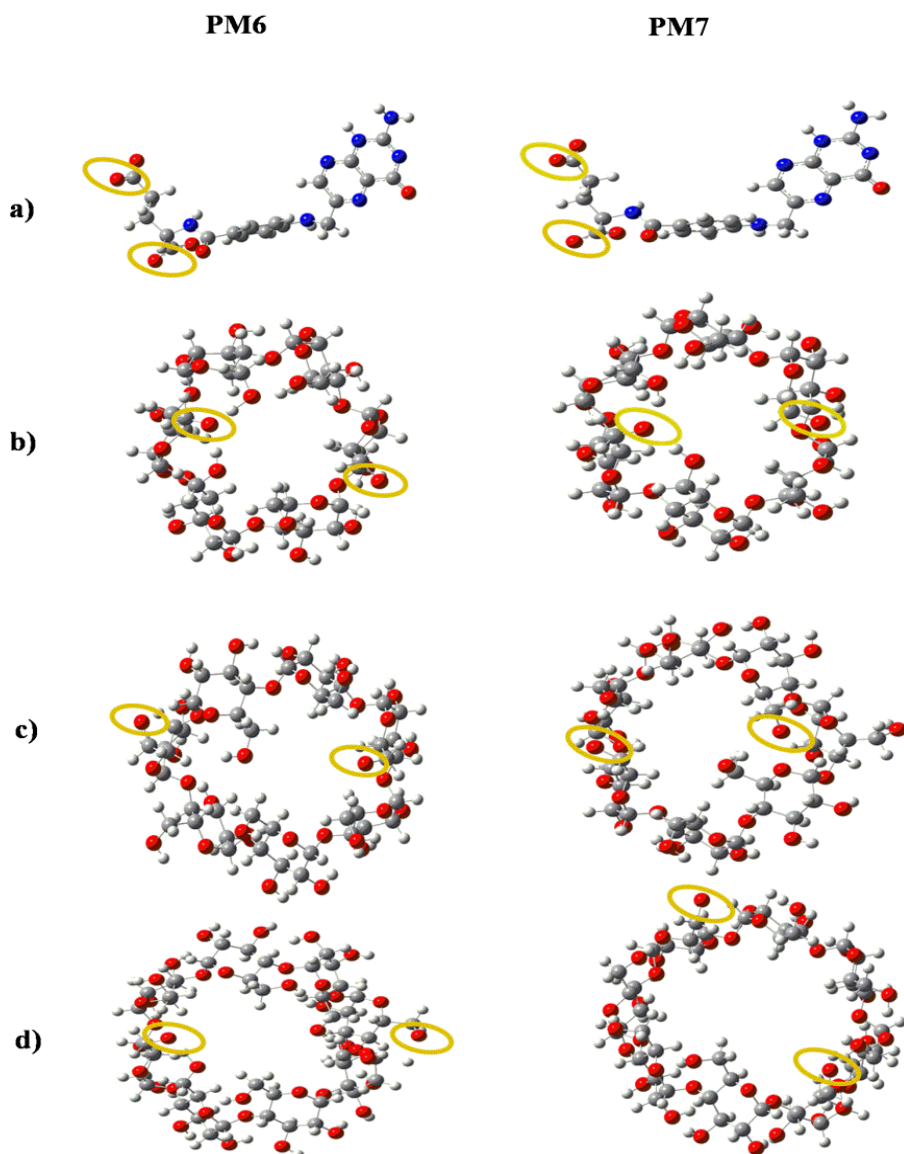
Rysunek 4.2. Mobilogramy jonów a) $[\alpha\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\gamma\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz b) $[\alpha\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\gamma\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz $[\text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$.

III.4.2 Wyznaczanie teoretycznych przekrojów czynnych jonów odniesienia

Jak przedstawiłam w części literaturowej oraz w rozdziale III.3, zastosowanie odpowiednich związków odniesienia zmniejsza różnicę między eksperymentalnymi oraz teoretycznymi przekrojami czynnymi, umożliwiając tym samym dokładniejsze określenie budowy przestrzennej jonów. Związki odniesienia powinny wykazywać podobieństwo

strukturalne do badanych związków, jak również powinny posiadać taki sam ładunek jak analizowane jony. W przypadku niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -, β - i γ -CD jony odniesienia powinny charakteryzować się dość sztywną strukturą, a przede wszystkim posiadać ładunek -2. Ze względu na brak ogólnie dostępnych związków wzorcowych o znanych przekrojach czynnych, które spełniałyby wszystkie powyższe wymagania do wyznaczenia Ω_{eksp} jonów $[\alpha\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz $[\gamma\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, posłużyłam się obliczonymi w ramach tej pracy przekrojami teoretycznymi jonów $[\text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\alpha\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz $[\gamma\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$. W pierwszej kolejności przeprowadziłam analizę konformacyjną jonów $[\text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\alpha\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz $[\gamma\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$ za pomocą metod półempirycznych PM6 oraz PM7. Metody te zostały wykorzystane również do analizy konformacyjnej niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z cyklodekstrynami.

Najniższe energetycznie struktury jonów $[\text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\alpha\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz $[\gamma\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$ otrzymane za pomocą metod PM6 oraz PM7, zostały zaprezentowane na Rysunku 4.3. Zlokalizowanie ładunków ujemnych zaznaczyłam za pomocą żółtych elips. W Tabeli 4.1 przedstawiłam wartości teoretycznych przekrojów czynnych (Ω_{ref}) jonów $[\alpha\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\gamma\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz $[\text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ (Rysunek 4.3), w zależności od zastosowanej metody półempirycznej. Wartości Ω_{ref} obliczone dla struktur otrzymanych za pomocą metody PM7 są niższe w porównaniu z PM6. Związane jest to z tym, że metoda PM7 zawiera dodatkowo poprawkę na energię oddziaływania dyspersyjnego i wiązania wodorowego, która zwiększyła dokładność obliczeń. Uwzględnienie tych poprawek jest szczególnie istotne w przypadku analizy strukturalnej kompleksów niekowalencyjnych, w których oddziaływania te pełnią kluczową rolę w stabilizowaniu kompleksów. Opis przeprowadzonej optymalizacji został przedstawiony w części eksperymentalnej.



Rysunek 4.3. Najniższe energetycznie struktury jonów **a)** $[\text{KF-2H}]^{2-}$, **b)** $[\alpha\text{-CD-2H}]^{2-}$, **c)** $[\beta\text{-CD-2H}]^{2-}$, **d)** $[\gamma\text{-CD-2H}]^{2-}$ otrzymane za pomocą metod PM6 oraz PM7. Żółte elipsy określają położenie ładunków ujemnych.

Tabela 4.1. Teoretyczne przekroje czynne (\AA^2) jonów odniesienia obliczonych za pomocą metody TJ.

| jon | m/z | Ω_{ref} (PM6) | Ω_{ref} (PM7) |
|------------------------------|-------|-----------------------------|-----------------------------|
| $[\text{KF-2H}]^{2-}$ | 219,6 | 142,0 | 140,8 |
| $[\alpha\text{-CD-2H}]^{2-}$ | 485,1 | 193,0 | 190,5 |
| $[\beta\text{-CD-2H}]^{2-}$ | 566,2 | 231,7 | 224,8 |
| $[\gamma\text{-CD-2H}]^{2-}$ | 647,2 | 250,9 | 245,8 |

III.4.3 Wyznaczanie eksperymentalnych i teoretycznych przekrojów czynnych niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z cyklodekstrynami

Teoretyczne przekroje czynne (Tabela 4.1) jonów odniesienia oraz ich czasy dryfu (Tabela E5.18) zostały wykorzystane w kolejnym etapie do wykreślenia krzywych wzorcowych, przedstawionych na Rysunku E5.4 w części eksperymentalnej. Na podstawie krzywych wzorcowych wyznaczyłam eksperymentalne przekroje czynne (Ω_{eksp}) jonów $[\alpha\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ i $[\gamma\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, które zostały przedstawione w Tabeli 4.2. Wartości te są średnią z pomiarów ruchliwości jonów dla czterech różnych zestawów parametrów. Odchylenie standardowe z tych pomiarów mieściło się w granicy 0,1-1%. Ponadto, każdy eksperyment powtórzyłam cztery razy, a odchylenie standardowe z tych poczwórnych pomiarów wyniosło 0,5%.

Tabela 4.2. Wartości eksperymentalnych przekrojów czynnych (Ω_{eksp} , Å²) dla kompleksów kwasu foliowego z α -, β - i γ -CD.

| jon | m/z | Ω_{eksp} (PM6) | Ω_{eksp} (PM7) |
|---|-------|------------------------------|------------------------------|
| $[\alpha\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ | 705,7 | 240,7 | 235,1 |
| $[\beta\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ | 786,7 | 244,4 | 238,7 |
| $[\gamma\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ | 867,7 | 272,0 | 264,9 |

Różnica między przekrojami czynnymi jonu $[\alpha\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz jonu $[\alpha\text{-CD} - 2\text{H}]^{2-}$ (Tabela 4.1. oraz 4.2.) wynosi 44,6 Å². Dla pozostałych kompleksów różnice te są znacznie mniejsze i wynoszą: $[\beta\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ - 13,9 Å², $[\gamma\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ - 19,1 Å². Oznacza to, że kwas foliowy tworzy z α -CD inny rodzaj kompleksu, niż z β -CD oraz γ -CD.

Analiza konformacyjna jonów $[\alpha\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ oraz $[\gamma\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ została przeprowadzona za pomocą dokowania molekularnego oraz metod półempirycznych PM6 oraz PM7. Dokładny opis optymalizacji geometrii powyższych jonów został przedstawiony w części eksperymentalnej.

Najniższe energetycznie struktury jonów $[\alpha\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\gamma\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ otrzymane za pomocą metod PM6 oraz PM7 przedstawiłam na Rysunku 4.4. Teoretyczne przekroje czynne (Ω_t) dla tych struktur przedstawiłam w Tabeli 4.3. Dodatkowo, w Tabeli 4.3 zostały zamieszczone różnice między Ω_{eksp} , a wartościami obliczonymi Ω_t dla kompleksów kwasu foliowego z α -, β - i γ -CD wyrażone w %. Różnice te dla struktur otrzymanych za pomocą metody PM7 były mniejsze w porównaniu z metodą PM6, co związane było z lepszą dokładnością metody PM7 do opisu oddziaływań

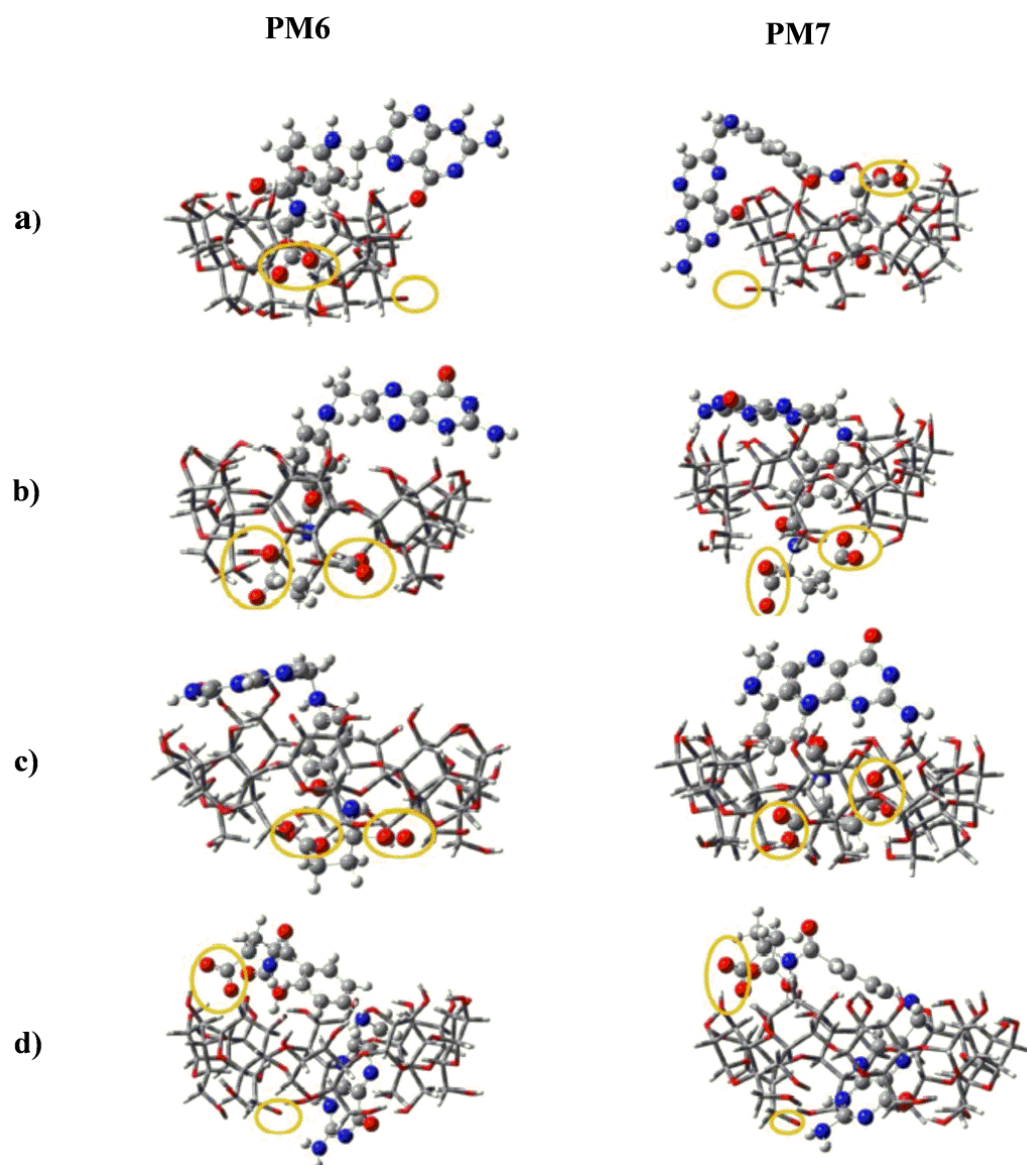
niekowalencyjnych. Nieco większa różnica między tymi wielkościami, jaką zaobserwowałam w przypadku kompleksu kwasu foliowego z γ -CD, może wynikać z faktu, że czas dryfu dla tego kompleksu znajduje się nieznacznie poza zakresem krzywej kalibracyjnej.

W przypadku kompleksu kwasu foliowego z α -CD, reszta kwasu glutaminowego, będąca częścią kwasu foliowego, wnika częściowo do wnęki α -CD, natomiast aromatyczna część pterydyny oraz kwasu *p*-aminobenzoowego pozostają na zewnątrz, tworząc kompleks eksklusyjny (Rysunek 4.4.a). Najniższe energetycznie struktury kompleksu kwasu foliowego z α -CD, otrzymane za pomocą metod półempirycznych PM6 oraz PM7, różnią się między sobą ułożeniem części aromatycznej kwasu foliowego (Rysunek 4.4.a). Dodatkowo, stabilność otrzymanych kompleksów jest zwiększona przez utworzenie wiązań wodorowych pomiędzy pierwszo- i drugorzędowymi grupami hydroksylowymi cyklodekstryny oraz grupą karbonylową i karboksylową kwasu foliowego.

β -Cyklodekstryna, w przeciwieństwie do α -CD, tworzy z kwasem foliowym kompleks inkluzyjny, w którym część pochodząca od kwasu *p*-aminobenzoowego wnika do wnęki β -CD, podczas gdy reszta kwasu glutaminowego i aromatyczny pierścień pterydyny są skierowane odpowiednio w kierunku pierwszo- i drugorzędowych grup hydroksylowych β -CD (Rysunek 4.4.b). Porównanie struktur uzyskanych za pomocą metod PM6 i PM7 wskazuje na niewielkie różnice strukturalne między nimi. W przypadku geometrii otrzymanej za pomocą metody PM6 część aminobenzoowa przemieszcza się nieznacznie w kierunku pierwszorzędowych grup hydroksylowych β -CD.

W przypadku γ -CD, ze względu na dość dużą średnicę wnęki CD, możliwe są dwa sposoby wiązania się kwasu foliowego z γ -CD. Struktury dla tych kompleksów przedstawiłam na rysunku 4.4.c oraz 4.4.d. Pierwsza z nich (Rysunek 4.4.c) jest podobna do kompleksu β -CD z KF, w której część pochodząca od kwasu *p*-aminobenzoowego umiejscowiona jest we wnęce γ -CD, natomiast reszta kwasu glutaminowego i aromatyczny pierścień pterydyny solwatowane są przez pierwszo- i drugorzędowe grupy –OH. W drugim przypadku, przedstawionym na Rysunku 4.4.d, pierścień pterydyny pochodzący od kwasu foliowego przenika do wnęki CD, podczas gdy reszta kwasu glutaminowego oraz kwasu *p*-aminobenzoowego jest umiejscowiona na zewnątrz γ -CD. Kompleksy te wykazywały bardzo małą różnicę w przekrojach czynnych wynoszącą $0,6 \text{ \AA}^2$ (Tabela 4.3). Mała różnica Ω między tymi strukturami oraz niedostateczna zdolność rozdzielcza spektrometru uniemożliwiły ich jednoznaczne rozróżnienie. Dlatego też, w celu dokładnego określenia która z tych struktur jest energetycznie faworyzowana zostały przeprowadzone obliczenia

termodynamiczne (w warunkach standardowych: 1 atm, 298 K) za pomocą metod PM6 oraz PM7.



Rysunek 4.4. Zoptymalizowane struktury kompleksów kwasu foliowego z a) α -CD, b) β -CD, c) i d) γ -CD. Żółte elipsy określają położenie ładunków ujemnych.

Tabela 4.3. Teoretyczne przekroje czynne (Ω_t w \AA^2) dla kompleksów KF/CD przedstawionych na Rysunku 4.4. W nawiasach podane są różnice między eksperymentalnymi i teoretycznymi przekrojami czynnymi.

| Jon | Struktura | Ω_t (PM6) | Ω_t (PM7) |
|---|-----------|------------------|------------------|
| $[\alpha\text{-CD}+\text{KF}-2\text{H}]^{2-}$ | a) | 246,7 (2,5%) | 236,7 (0,7%) |
| $[\beta\text{-CD}+\text{KF}-2\text{H}]^{2-}$ | b) | 257,9 (5,5%) | 235,4 (-1,4%) |
| $[\gamma\text{-CD}+\text{KF}-2\text{H}]^{2-}$ | c) | 277,7 (2,1%) | 272,3 (2,8%) |
| $[\gamma\text{-CD}+\text{KF}-2\text{H}]^{2-}$ | d) | 286,7 (5,4%) | 273,7 (3,3%) |

Wartość stałej trwałości kompleksów określa entalpia swobodna (ΔG), która jest funkcją zmian entalpii (ΔH) i entropii (ΔS) towarzyszących procesom wiązania jednej cząsteczki przez drugą ($\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$).

Termodynamiczne parametry tworzenia kompleksów kwasu foliowego z cyklodekstrynami tj. ΔH , ΔS oraz ΔG zostały zamieszczone w Tabeli 4.4. Duże, ujemne wartości zmiany entalpii (ΔH) sugerują, że tworzenie niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z cyklodekstrynami jest procesem wysoce egzotermicznym. Tak duże wartości ΔH mogą być wynikiem tworzenia wiązań wodorowych i silnych oddziaływań van der Waalsa między kwasem foliowym a cyklodekstrynami. Wysokie, ujemne zmiany entropii (ΔS) związane są ze spadkiem, w wyniku kompleksowania, rotacyjnych oraz translacyjnych stopni swobody. Biorąc pod uwagę wartości zmiany entalpii swobodnej (ΔG) stwierdziłam, że γ -CD tworzy z kwasem foliowym kompleks o strukturze przedstawionej na Rysunku 4.4.d oraz, że stabilność kompleksów wzrasta w następującej kolejności $\text{KF}/\alpha\text{-CD} < \text{KF}/\beta\text{-CD} < \text{KF}/\gamma\text{-CD}$ (izomer **d**). Kolejność ta jest zgodna z wcześniej ustaloną względną stabilnością tych kompleksów w fazie gazowej, wyznaczoną na podstawie krzywych dysocjacji.⁸³

Tabela 4.4. Termodynamiczne parametry reakcji kompleksowania (ΔH , ΔS oraz ΔG) kwasu foliowego z α -, β - i γ -CD obliczone za pomocą metod półempirycznych PM6 oraz PM7.

| jon | struk-tura | PM6 | | | PM7 | | |
|---|------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| | | ΔH [kJ mol ⁻¹] | ΔS [J mol ⁻¹ K ⁻¹] | ΔG [kJ mol ⁻¹] | ΔH [kJ mol ⁻¹] | ΔS [J mol ⁻¹ K ⁻¹] | ΔG [kJ mol ⁻¹] |
| $[\alpha\text{-CD}+\text{KF}-2\text{H}]^{2-}$ | a) | -182,8 | -377,7 | -70,2 | -404,7 | -418,7 | -279,9 |
| $[\beta\text{-CD}+\text{KF}-2\text{H}]^{2-}$ | b) | -208,5 | -454,2 | -73,2 | -479,6 | -551,6 | -315,2 |
| $[\gamma\text{-CD}+\text{KF}-2\text{H}]^{2-}$ | c) | -204,7 | -447,1 | -71,4 | -429,3 | -622,0 | -243,9 |
| $[\gamma\text{-CD}+\text{KF}-2\text{H}]^{2-}$ | d) | -226,4 | -395,6 | -108,5 | -448,4 | -425,3 | -321,6 |

III.4.4 Podsumowanie

Spektrometria ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi została wykorzystana do opisu niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -CD, β -CD i γ -CD. Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowałam dwa różne typy kompleksów, w zależności od rozmiaru wnęki cyklodekstryny.

Jednym z nich był kompleks ekluzyjny kwasu foliowego z α -CD, w którym reszta kwasu *p*-aminobenzoowego oraz aromatyczny pierścień pterydyny, występujące w cząsteczce kwasu foliowego, pozostają na zewnątrz wnęki cyklodekstryny, natomiast reszta kwasu glutaminowego wnika do środka α -cyklodekstryny.

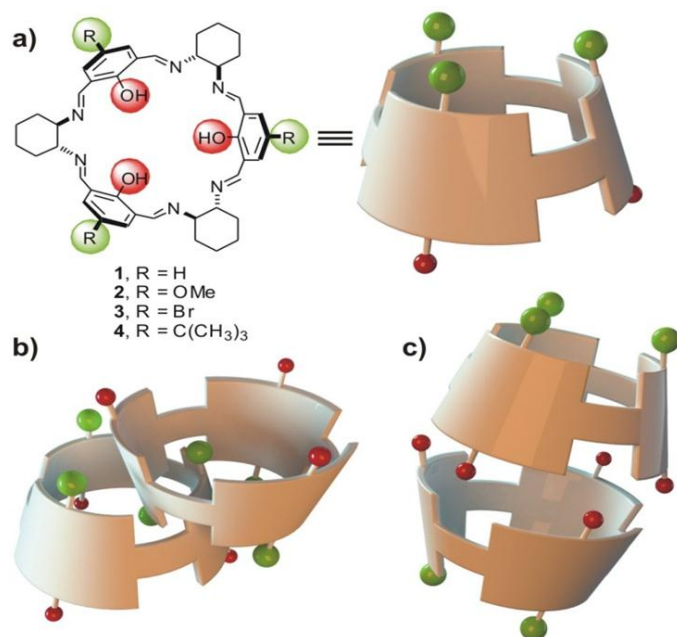
Drugi rodzaj kompleksu tzw. kompleks inkluzyjny był charakterystyczny dla niekowalencyjnych asocjatów kwasu foliowego z β -CD oraz γ -CD. W przypadku β -CD, reszta kwasu *p*-aminobenzoowego pochodząca od kwasu foliowego znajduje się we wnęce β -CD, natomiast reszta kwasu glutaminowego oraz aromatyczny pierścień pterydyny znajdują się na zewnątrz cyklodekstryny. Oddziałują one z pierwszo- oraz drugorzędowymi grupami hydroksylowymi β -cyklodekstryny, zwiększając tym samym stabilność kompleksu.

W przypadku kompleksu kwasu foliowego z γ -CD zaproponowałam dwie możliwe struktury. Pierwsza z nich była analogiczna do kompleksu kwasu foliowego z β -CD. W drugiej strukturze, pierścień aromatyczny pterydyny wnika do wnęki CD, a reszty kwasu glutaminowego oraz *p*-aminobenzoowego znajdują się na zewnątrz cyklodekstryny. Kompleks ten okazał się bardziej stabilnym w porównaniu z pierwszą strukturą.

Przedstawione wyniki zostały opublikowane w *Analytical Chemistry*.⁵²

III.5 Analiza strukturalna kaliksalenów oraz ich dimerycznych asocjatów za pomocą IM-MS

Spektrometria ruchliwości jonów została również wykorzystana do analizy strukturalnej kaliksalenów oraz ich dimerycznych asocjatów, przedstawionych na Schemacie 5.1.a, powstałych w wyniku samoorganizacji. Kaliksaleny, związki wykazujące symetrię C_3 , są bardzo atrakcyjne ze względu na fakt, że wykazują właściwości katalityczne oraz fluorescencyjne.⁸⁴ Dodatkowo, posiadają one zdolność do samoorganizacji w stanie stałym, która jest kontrolowana obecnością i charakterem podstawników R związanych z atomami węgla C5.⁸⁵ Rentgenowska analiza strukturalna wykazała, że badane kaliksaleny, w zależności od rodzaju podstawnika R, mogą tworzyć dimeryczne asocjaty typu „gość-gospodarz” (R = H, OMe, Br, *t*-Bu, Schemat 5.1.b) lub mogą występować w postaci kapsuły z cząsteczką rozpuszczalnika wewnątrz luki (R = *t*-Bu, Schemat 5.1.c). Zdolność kaliksalenów do tworzenia dimerycznych asocjatów została również zbadana w fazie gazowej za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów oraz w roztworze za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego. Wyniki zostały opublikowane w *Chemistry - A European Journal*.⁸⁶ W niniejszej pracy zostaną przedstawione wyniki, które uzyskałam za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi. Ta część pracy została wykonana we współpracy z dr. hab. Marcinem Kwitem z IChO PAN/UAM w Poznaniu.

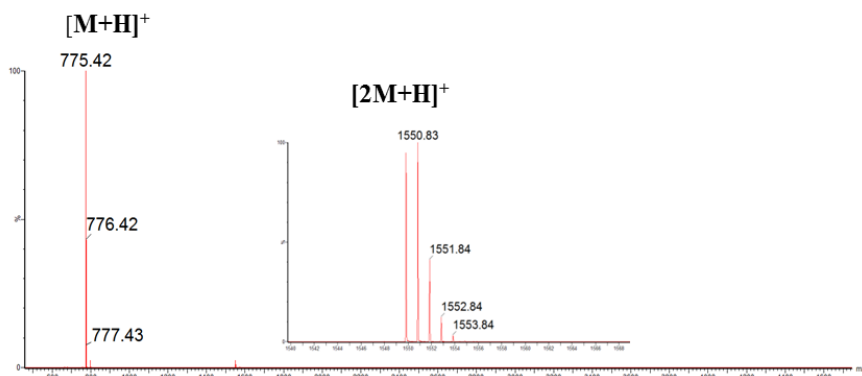


Schemat 5.22. a) Struktury badanych kaliksalenów. Możliwe typy dimerycznych asocjatów otrzymane za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej: b) kompleks typu „gość-gospodarz” i c) kapsuła.

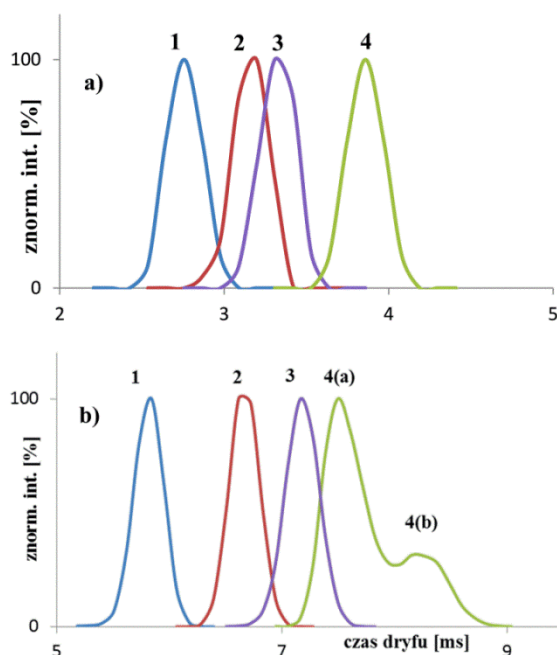
III.5.1 Wstępne pomiary za pomocą IM-MS

Początkowe eksperymenty rozpoczęłam od zarejestrowania widm masowych za pomocą techniki elektrosprej dla kaliksalenów przedstawionych na Schemacie 5.1.a. W widmach ESI-MS zaobserwowałam sygnały pochodzące od jonu $[M+H]^+$ oraz $[2M+H]^+$. Przykładowe widmo masowe dla kaliksalenu **2** (R = OMe) zostało przedstawione na Rysunku 5.1.

Widma ruchliwości jonów $[M+H]^+$ oraz $[2M+H]^+$ dla wszystkich kaliksalenów zostały przedstawione na Rysunku 5.2. W przypadku kaliksalenów, w których podstawnikiem R były H, OMe oraz Br, otrzymane mobilogramy jonów $[2M+H]^+$ wskazywały na obecność tylko jednej formy tworzącego się asocjatu (Rysunek 5.2.b). Odmienną sytuację zaobserwowałam dla *t*-Bu-kaliksalenu, dla którego w widmach ruchliwości jonów $[2M+H]^+$ widoczne były dwa piki pochodzące prawdopodobnie od dwóch możliwych struktur dimerycznych asocjatów w fazie gazowej. W dalszej części pracy przeprowadziłam analizę strukturalną zarówno dla jonów $[M+H]^+$ oraz $[2M+H]^+$.



Rysunek 5.1. Widmo ESI-MS zarejestrowane dla kaliksalenu **2**.



Rysunek 5.2. Widma ruchliwości jonów **a)** $[M+H]^+$ oraz **b)** $[2M+H]^+$ dla kaliksalenów **1 - 4**.

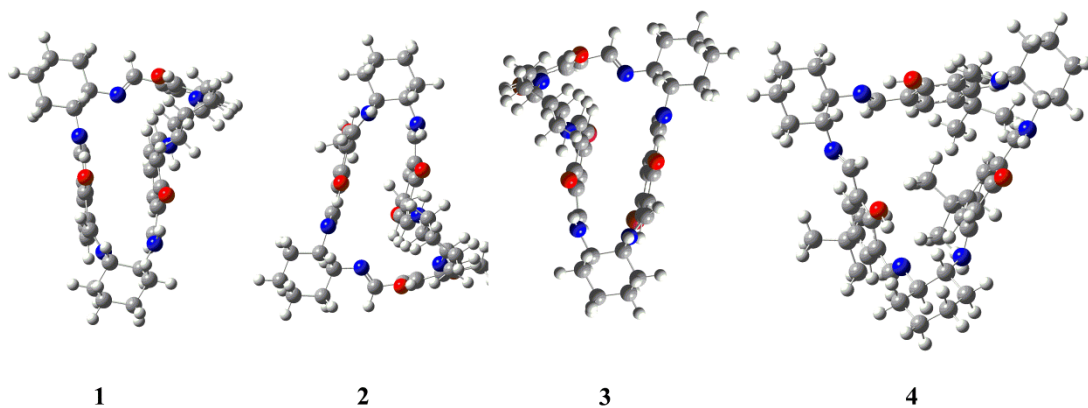
III.5.2 Wyznaczanie eksperymentalnych oraz teoretycznych przekrojów czynnych kaliksalenów

Eksperymentalne przekroje czynne jonów $[M+H]^+$ zostały wyznaczone na podstawie krzywych kalibracji. Związkiem odniesienia o znanych przekrojach czynnych była enolaza.⁸⁷ Przykładowe krzywe kalibracyjne oraz czasy dryfu dla związku odniesienia zostały przedstawione odpowiednio na Rysunku E5.5 oraz w Tabeli E5.21 w części eksperymentalnej. Wartości Ω_{eksp} przedstawione w Tabeli 5.1 są średnimi z pomiarów ruchliwości jonów dla czterech różnych zestawów parametrów. Odchylenie standardowe

z pomiarów Ω_{eksp} wyniosło poniżej 1,8%. Każdy eksperyment powtórzyłam cztery razy, a odchylenie standardowe dla tych poczwórnych pomiarów wyniosło poniżej 1,0%.

Teoretyczne przekroje czynne jonów $[M+H]^+$ zostały obliczone dla najniższych energetycznie struktur, otrzymanych za pomocą metody półempirycznej PM7. Wartości Ω_t zostały przedstawione w Tabeli 5.1. Struktury jonów $[M+H]^+$, dla których wyznaczyłam przekroje czynne zostały przedstawione na Rysunku 5.3.

Kaliksaleny **1** – **3**, gdzie R = H, OMe oraz Br, stabilizowane są przez oddziaływania π - π między pierścieniami aromatycznymi występującymi w cząsteczce. W przypadku kaliksalenu **4**, gdzie podstawnikiem jest duża grupa *t*-butylowa, siłami stabilizującymi cząsteczkę są raczej oddziaływania CH- π pomiędzy protonami alifatycznymi i aromatycznym pierścieniem. Należy się spodziewać, że oddziaływania π - π oraz CH- π mogą odgrywać kluczową rolę w tworzeniu dimericznych asocjatów kaliksalenów.



Rysunek 5.3. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+H]^+$ kaliksalenów **1** - **4**.

Tabela 5.1. Eksperymentalne oraz teoretyczne przekroje czynne (\AA^2) jonów $[M+H]^+$ kaliksalenów **1** - **4**. Ω_t obliczono dla najniższych energetycznie struktur za pomocą metody TJ. W nawiasach podane są różnice między eksperymentalnymi i teoretycznymi przekrojami czynnymi

| $[M+H]^+$ | m/z | Ω_{eksp} | Ω_t |
|-----------|-------|------------------------|---------------|
| 1 | 685,4 | 190,6 | 193,8 (1,7%) |
| 2 | 775,5 | 212,5 | 211,6 (-0,4%) |
| 3 | 921,8 | 219,5 | 229,7 (4,4%) |
| 4 | 853,6 | 241,9 | 234,0 (-3,4%) |

III.5.3 Wyznaczanie eksperymentalnych oraz teoretycznych przekrojów czynnych jonów pochodzących od dimerycznych asocjatów kaliksalenów

Wartości eksperymentalnych przekrojów czynnych jonów $[2M+H]^+$ (Tabela 5.2) wyznaczyłam na podstawie krzywych kalibracji otrzymanych dla enolazy jako związku odniesienia (patrz Rysunek E5.5 w części eksperymentalnej). Wyznaczone wartości Ω_{exp} są średnimi z pomiarów ruchliwości jonów dla czterech różnych zestawów parametrów. Odchylenie standardowe z tych pomiarów wyniosło poniżej 1,8%. Każdy eksperyment powtórzyłam cztery razy, a odchylenie standardowe dla tych poczwórnych pomiarów wyniosło poniżej 0,8%.

Tabela 5.2. Eksperymentalne oraz teoretyczne przekroje czynne (\AA^2) jonów $[2M+H]^+$ kaliksalenów **1-4**. Ω_t obliczono dla najniższych energetycznie struktur za pomocą metody TJ. W nawiasach podane są różnice między eksperymentalnymi jak i teoretycznymi przekrojami czynnymi

| $[2M+H]^+$ | m/z | Ω_{exp} | Ω_t |
|-------------|--------|-----------------------|---------------|
| 1 | 1369,6 | 310,7 | 317,7 (2,2%) |
| 2 | 1550,0 | 332,6 | 324,7 (-2,4%) |
| 3 | 1842,7 | 334,7 | 336,1 (0,4%) |
| 4(a) | 1706,3 | 348,5 | 338,4 (-3,0%) |
| 4(b) | 1706,3 | 366,4 | 365,8 (-0,2%) |

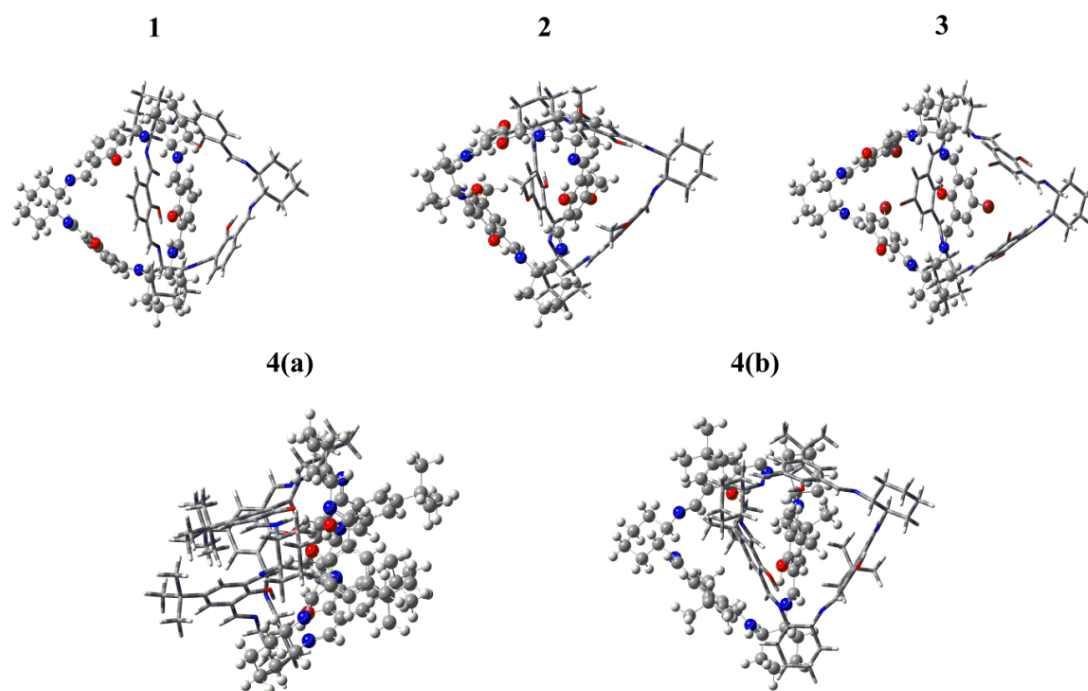
Najniższe energetycznie struktury jonów $[2M+H]^+$, dla których zostały wyznaczone eksperymentalne przekroje czynne, otrzymałam za pomocą metody PM7. Dokładny opis optymalizacji dimerycznych asocjatów został przedstawiony w części eksperymentalnej w podrozdziale V.5.3. Wartości teoretycznych przekrojów czynnych zostały zebrane w Tabeli 5.2. Dodatkowo, w nawiasach zostały przedstawione różnice między eksperymentalnymi i teoretycznymi przekrojami czynnymi wyrażone w %, które wykazywały dobrą zgodności między nimi. Najniższe energetycznie struktury jonu $[2M+H]^+$ dla wszystkich kaliksalenów zostały przedstawione na Rysunku 5.4.

Struktury dimerycznych asocjatów kaliksalenów **1 – 3** są zbliżone do tych otrzymanych za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej.^{84b, 85a} Są one stabilizowane przez oddziaływania π - π między monomerami, w których każdy pełni rolę zarówno gościa, jak i gospodarza. Wyjątkiem okazał się *t*-Bu-kaliksalen, który w zależności od występujących oddziaływań między monomerami może występować w postaci kapsuły (Rysunek 5.4.4(a))

albo tworzyć kompleks typu „gość-gospodarz” (Rysunek 5.4.4(b)) Kompleksy te wykazują duże różnice w wartościach teoretycznych przekrojów czynnych. (Tabela 5.2).

Termodynamiczne parametry tworzenia dimerów tj. ΔH , ΔS oraz ΔG zostały zamieszczone w Tabeli 5.4. Powstawanie dimerycznych asocjatów jest procesem wysoce egzoenergetycznym, o czym świadczą wysokie, ujemne wartości ΔH . Podobnie jak to miało miejsce wcześniej, duże, ujemne wartości ΔH mogą być wynikiem tworzenia wiązań wodorowych i silnych oddziaływań van der Waalsa między monomerami kaliksalenów. Wysokie, ujemne zmiany entropii (ΔS) związane są ze spadkiem, w wyniku kompleksowania, rotacyjnych oraz translacyjnych stopni swobody. Porównanie entalpii swobodnej, obliczonej za pomocą metody PM7 dla dimerów **4(a)** oraz **4(b)** wykazało, że forma kapsuły dla której $\Delta G = -207$ kJ/mol jest energetycznie faworyzowana w porównaniu z kompleksem typu „gość-gospodarz” ($\Delta G = -56,8$ kJ/mol). Jest to wynikiem wzrostu siły oddziaływań między monomerami w przypadku tworzenia kapsuły.

Energetycznie preferowana struktura **4(a)** jest stabilizowana przede wszystkim przez międzycząsteczkowe wiązania wodorowe $N^+H \cdots N$. Występowanie tego typu oddziaływań podczas tworzenia kapsuły jest w niezgodzie z danymi otrzymanymi za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej, gdzie oddziaływaniami dominującymi podczas powstawania kapsuły są oddziaływania $O-H \cdots N$ i $C-H \cdots O$ (Schemat 1c). W przypadku struktury **4(b)**, kompleksy typu „gość-gospodarz” są stabilizowane przez oddziaływania $CH-\pi$ pomiędzy protonami alifatycznymi i aromatycznym pierścieniem, w przeciwieństwie do wcześniej omawianych dimerycznych asocjatów kaliksalenów **1 - 3**.



Rysunek 5.3. Najniższe energetyczne struktury jonów $[2M+H]^+$ kaliksalenów **1 - 4**

Tabela 5.4. Termodynamiczne parametry reakcji tworzenia dimerycznych asocjatów kaliksalenów **1 - 4** (ΔH , ΔS oraz ΔG) obliczone za pomocą metody półempirycznej PM7.

| $[2M+H]^+$ | PM7 | | |
|-------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| | ΔH [kJ mol ⁻¹] | ΔS [J mol ⁻¹ K ⁻¹] | ΔG [kJ mol ⁻¹] |
| 1 | -190,2 | -196,9 | -131,5 |
| 2 | -242,0 | -236,5 | -171,5 |
| 3 | -222,6 | -134,0 | -182,6 |
| 4(a) | -286,9 | -268,1 | -207,0 |
| 4(b) | -208,5 | -509,1 | -56,8 |

III.5.4 Podsumowanie

Spektrometria IM-MS razem z obliczeniami teoretycznymi została wykorzystana do analizy strukturalnej kaliksalenów. Związki te wykazują tendencję do tworzenia dimerycznych asocjatów w wyniku niespecyficznych oddziaływań π - π , CH- π oraz międzycząsteczkowych oddziaływań wodorowych $N^+H \cdots N$ między monomerami, w zależności od podstawnika R występującego w cząsteczce. W przypadku gdy R = H (**1**), OMe (**2**) oraz Br (**3**), siłami stabilizującymi układy dimeryczne są oddziaływania π - π , w przeciwieństwie do kaliksalenu, w którym R jest grupą *t*-butylową (**4**). W tym przypadku możliwe są dwa typy kompleksów. W pierwszym, energetycznie faworyzowanym, siłami

determinującymi tworzenie asocjacji są międzycząsteczkowe wiązania wodorowe $N^+H \cdots N$ między monomerami, podczas gdy w drugim kompleksie są to oddziaływania $CH-\pi$.

Przedstawione wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Chemistry - A European Journal*.⁸⁶

IV. Wnioski

Celem przeprowadzonych i opisanych w pracy badań było pogłębienie wiedzy w zakresie wykorzystania techniki ruchliwości jonów sprzężonej ze spektrometrią mas (IM-MS) do rozróżniania izomerycznych związków flawonoidowych oraz β -laktamów, jak również do analizy strukturalnej niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstryną oraz dimerycznych asocjatów kaliksalenów.

Badania dotyczące rozróżniania izomerów za pomocą IM-MS przeprowadziłam dla stereoizomerów katechin i β -laktamów oraz związków flawonoidowych wykazujących izomerię konstytucyjną. W dyskusji na temat efektywności rozdzielczych analizowanych związków za pomocą IM-MS brałam pod uwagę różnice w przekrojach czynnych jonów ($\Delta\Omega$), zarówno wartości teoretycznych jak też doświadczalnych, uzyskaną w trakcie pomiarów ruchliwości jonów rozdzielczość charakterystyczną dla danej grupy analizowanych związków oraz zdolność rozdzielczą spektrometru. Na efektywność rozdzielczą badanych związków miały wpływ rodzaj gazu buforowego, obecność kationu metalu lub/i chiralnego związku różnicującego, jak również rodzaj związków odniesienia stosowanych do wyznaczenia eksperymentalnych Ω .

Stereoizomery związków flawonoidowych wykazywały niewielkie różnice w przekrojach czynnych rzędu 1 \AA^2 . Niska zdolność rozdzielcza (R_p) spektrometru wynosząca 25 uniemożliwiła mi ich bezpośrednie rozróżnienie. Aby uzyskać rozdział epimerów katechin konieczne było wprowadzenie chiralnego związku różnicującego. Kluczową rolę odegrały hydrofobowe *D*-aminokwasy takie jak *D*-alanina, *D*-leucyna oraz *D*-prolina. Wartość rozdzielczości dla kompleksów typu $[2M + D\text{-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ (R_{p-p}) była większa bądź równa 0,60. Rozróżnienie enancjomerów było możliwe w wyniku ich kompleksowania z *D*-leucyną oraz *L*-proliną. Wartość rozdzielczości wyniosła $R_{p-p} \geq 0,40$.

W przypadku izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych różnice w przekrojach czynnych jonów sodowanych wynosiły od 1,0 do $1,9 \text{ \AA}^2$, w zależności od rodzaju analizowanych związków. Dla $\Delta\Omega$ większej bądź równej $1,3 \text{ \AA}^2$ rozróżnienie izomerów konstytucyjnych było możliwe w standardowych warunkach pomiaru, z rozdzielczością $R_{p-p} \geq 0,47$, przy zdolności rozdzielczej spektrometru wynoszącej 25. Dalsze eksperymenty wykazały, że zastosowanie CO_2 zwiększa efektywność rozdzielczą jonów $[\text{M}+\text{Na}]^+$ w porównaniu z azotem. Do rozróżnienia izomerów konstytucyjnych, dla których różnica w przekrojach czynnych jonów $[\text{M}+\text{Na}]^+$ była równa 1 \AA^2 konieczne było

wprowadzenie kationów potasu. Obecność kationu potasu przyczyniła się do znacznego zwiększenia różnic w przekrojach czynnych analizowanych flawonoidów, umożliwiając tym samym ich rozróżnienie z rozdzielczością 0,53. W tym miejscu chciałabym nadmienić, że zmiana gazu buforowego oraz obecność kationów metalu nie zawsze przyczynia się do poprawy rozdziału związków organicznych, ponieważ wpływ tych czynników w dużej mierze zależy od natury analizowanych związków.

Warunkiem koniecznym do rozróżnienia diastereoizomerycznych związków β -laktamowych ($R_{p-p} = 0,74$) była duża różnica w przekrojach czynnych jonów $[M+Na]^+$ wynosząca $7,6 \text{ \AA}^2$. W przypadku, gdy ta różnica wynosiła $3,6 \text{ \AA}^2$, rozróżnienie β -laktamów nie było możliwe. Kation metalu był solwatowany w różny sposób, w zależności od diastereoizomeru, co umożliwiło rozdział niektórych związków β -laktamowych. Eksperymentalne przekroje czynne wykazywały dobrą zgodność z wartościami teoretycznymi. Zgodność ta była zależna od rodzaju związków odniesienia na podstawie których wyznaczone zostały eksperymentalne przekroje czynne.

W swojej pracy zajęłam się również analizą strukturalną niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -, β - oraz γ -cyklodekstryną oraz dimerycznych asocjatów kaliksalenów za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów. Kluczową rolę w określaniu trójwymiarowych struktur niekowalencyjnych kompleksów odgrywa ich przekrój czynny oraz jego zgodność z wartością eksperymentalną. Zastosowanie odpowiedniego związku odniesienia pozwala na dokładne określenie budowy przestrzennej asocjatów. Wyniki otrzymane w trakcie badań wykazały, że metoda IM-MS pozwala na określenie trójwymiarowych struktur kompleksów kwasu foliowego z α -cyklodekstryną (kompleks ekсклюzyjny) oraz β -cyklodekstryną (kompleks inkluzyjny). W przypadku γ -cyklodekstryny, gdzie możliwe były dwa sposoby wiązania się kwasu foliowego z γ -CD określenie dokładnej struktury kompleksu okazało się niemożliwe za pomocą IM-MS, ze względu na podobne przekroje czynne. Dopiero wyznaczenie entalpii swobodnej (ΔG) pozwoliło na określenie struktury preferowanej energetycznie. Niemniej jednak metoda IM-MS w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi może być niekiedy jedyną metodą do uzyskania szczegółowych informacji na temat trójwymiarowych struktur badanych jonów, które nie mogą być dokładnie scharakteryzowane za pomocą tradycyjnych metod tj. magnetycznego rezonansu jądrowego czy krystalografii rentgenowskiej.

Badania nad zachowaniem się kaliksalenów w fazie gazowej wykazały, że spektrometria ruchliwości jonów może być skuteczną metodą do opisu oddziaływań jakie występują w ich dimerycznych asocjatach. Wyniki otrzymane w trakcie badań były w dobrej

zgodności z danymi otrzymanymi na podstawie rentgenowskiej analizy strukturalnej. Ponadto spektrometria jonów okazała się również skuteczną metodą do rozróżnienia dwóch typów kompleksów tworzących się w przypadku dimeru *t*-Bu-kaliksalenu występującego w postaci kompleksu typu „gość – gospodarz” oraz w postaci tzw. kapsuły.

Na podstawie przeprowadzonych badań mogę stwierdzić, że metoda IM-MS może być jedną z metod umożliwiających rozdział związków flawonoidowych oraz β -laktamów. Jednakże należy wziąć pod uwagę ograniczenia metody IM-MS wynikające z niskiej zdolności rozdzielczej spektrometru, jak również z warunków panujących w komorze ruchliwości T-Wave. Rozdział można w wielu przypadkach znacząco poprawić, stosując kompleksowanie badanych związków chiralnym związkiem pomocniczym i odpowiednim kationem metalu. Ta metoda wydaje się być bardzo obiecująca dla rozróżniania małych cząsteczek o niewielkiej różnicy przekrojów czynnych.

Moje badania potwierdziły, że przypadku większych cząsteczek i ich agregatów spektrometria ruchliwości jonów jest bardzo cennym narzędziem pozwalającym – w połączeniu z obliczeniami teoretycznych przekrojów czynnych – na pełny opis przestrzennej budowy jonu. Należy podkreślić, że dopiero łączne wykorzystanie pomiarów IM-MS i obliczeń kwantowo-chemicznych ujawnia pełne możliwości tej metody analitycznej.

V. Część eksperymentalna

V.1 Uwagi ogólne

Wszystkie widma ruchliwości jonów (mobilogramy) zostały zarejestrowane za pomocą spektrometru SYNAPT G2-S HDMS firmy Waters. Jest to hybrydowy spektrometr typu QqTOF o rozbudowanej, trzyczęściowej komorze zderzeń, w którym została zaimplementowana technika „wędrującej fali” (*Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry*, T-Wave IMS). Dane uzyskane z pomiarów mobilności jonów przetwarzano za pomocą oprogramowania DriftScope 2.0.

Związki flawonoidowe, związki odniesienia, sole metali, aminokwasy, rozpuszczalniki oraz pozostałe odczynniki wykorzystane w ramach niniejszej pracy były dostępne komercyjnie i stosowane bez dodatkowego oczyszczania.

Związki β -laktamowe zostały przekazane do badań przez zespół naukowy prof. Bartłomieja Furmana z Instytutu Chemii Organicznej PAN.

Kompleksy kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstryną zostały przekazane do badań przez dr Magdalenę Ceborską z Instytutu Chemii Fizycznej PAN.

Kaliksaleny zostały przekazane do badań przez dr. Marcina Kwita z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu/Instytutu Chemii Organicznej PAN.

Roztwory analizowanych jonów były przygotowane w metanolu lub w mieszaninie rozpuszczalników woda:metanol oraz wprowadzane do spektrometru przez standardowe źródło jonów elektrosprej (ESI) przy przepływie 5-10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

W Tabeli 5.1 przedstawiłam szczegółowe dane (rodzaj jonu, m/z oraz Ω_{ref}) dla wszystkich związków odniesienia stosowanych w przedstawionej rozprawie doktorskiej.

Tabela E5.1. Rodzaj jonu, stosunek masy do ładunku oraz przekroje czynne związków odniesienia dla jonów $[\text{poliala}_n\text{+H}]^+$ oraz $[\text{poliala}_n\text{-H}]^-$, gdzie $n = 3\text{-}9$ (polialanina), dla jonów $[\text{M+H}]^+$ *N*-etyloaniliny, ondansetronu, kolchicyny, werapamilu oraz rezerpiny oraz jonów $[\text{M+H}]^+$ enolazy.

| n | jon | jony dodatnie | | | jony ujemne | | |
|----|---------------------------------|------------------|----------------------------|-------|---------------------------------|----------------------------|-------|
| | | <i>m/z</i> | Ω_{ref} (He) | | <i>m/z</i> | Ω_{ref} (He) | |
| 3 | $[\text{poliala}_n\text{+H}]^+$ | | 232,1 | 89,0 | $[\text{poliala}_n\text{-H}]^-$ | 230,1 | 93,0 |
| 4 | | | 303,1 | 100,0 | | 301,2 | 106,0 |
| 5 | | | 374,2 | 114,0 | | 372,2 | 120,0 |
| 6 | | | 445,2 | 128,0 | | 443,2 | 132,0 |
| 7 | | | 516,2 | 141,0 | | 514,3 | 147,0 |
| 8 | | | 587,3 | 157,0 | | 585,3 | 159,0 |
| 9 | | | 658,3 | 170,0 | | | |
| 10 | | | 729,3 | 179,3 | | | |
| 11 | | | 800,3 | 192,2 | | | |
| 12 | | | 871,4 | 202,4 | | | |
| 13 | | | 942,4 | 214,9 | | | |
| 14 | | | 1013,4 | 224,9 | | | |
| 15 | | | 1084,5 | 235,2 | | | |
| 16 | | | 1155,5 | 247,4 | | | |
| | | $[\text{M+H}]^+$ | <i>N</i> -etyloanilina | 122,1 | 63,0 | | |
| | | | ondansetron | 294,2 | 105,9 | | |
| | kolchicyna | | 400,2 | 130,8 | | | |
| | werapamil | | 455,3 | 142,6 | | | |
| | rezerpina | | 609,3 | 178,8 | | | |
| | $[\text{M+H}]^+$ | enolaza | 560,3 | 160,3 | | | |
| | | | 572,3 | 162,6 | | | |
| | | | 659,4 | 176,8 | | | |
| | | | 733,4 | 195,3 | | | |
| | | | 745,6 | 202,9 | | | |
| | | | 756,5 | 205,0 | | | |
| | | | 800,4 | 201,0 | | | |
| | | | 807,5 | 210,0 | | | |
| | | | 814,6 | 223,9 | | | |
| | | | 1288,8 | 278,8 | | | |
| | | | 1416,8 | 303,0 | | | |
| | | | 1578,9 | 316,9 | | | |
| | | | 1412,8 | 339,0 | | | |
| | | | 1873,2 | 373,0 | | | |

Ogólna procedura kalibracyjna

Widma ruchliwości (mobilogramy) jonów odniesienia o określonym stężeniu rejestrowano w tych samych warunkach co mobilogramy jonów badanych związków. Zmierzone czasy dryfu (t_d) jonów odniesienia zostały skorygowane o czas jaki jony spędzają poza komorą ruchliwości T-Wave zanim dotrą do detektora (t'_d) w celu wyznaczenia skorygowanego czasu dryfu (t_{dcorr}) według równania.

$$t_{dcorr} = t'_d - \sqrt{\frac{m/z}{1000} \cdot 0,085 \text{ msec}}$$

Skorygowany przekrój czynny (Ω_{corr}) wyznaczono, uwzględniając wpływ masy zredukowanej oraz ładunku na przekrój czynny jonu odniesienia (Ω_{ref}), zgodnie z poniższym równaniem:

$$\Omega_{corr} = \frac{\Omega_{ref}}{z \cdot \left(\frac{1}{m_{gaz}} + \frac{1}{m_{jon}} \right)^{\frac{1}{2}}}$$

Krzywe kalibracji zostały wykreślone jako zależność $\Omega_{corr} = f(t_{dcorr})$. Otrzymane krzywe kalibracyjne odpowiadały równaniu liniowemu $y = ax + b$. Na podstawie wyznaczonych parametrów a i b został wyznaczony przekrój czynny jonów pochodzących od analizowanych związków, zgodnie z Równaniem 11 lub 12 - część literaturowa.

$$\Omega = ((a \cdot t_{dcorr}) + b) \cdot z \cdot \left(\frac{1}{m_{gaz}} + \frac{1}{m_{jon}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (11)$$

$$\Omega = t_{dcorr}^b \cdot a \cdot z \cdot \left(\frac{1}{m_{gaz}} + \frac{1}{m_{jon}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

Przykładowe krzywe kalibracyjne zostały przedstawione na Rysunkach od E5.1 do E5.5.

V.2 Dane eksperymentalne z pomiarów IM-MS

V.2.1 Rozdział izomerycznych katechin za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów

Przygotowanie roztworów

Początkowe roztwory katechin o stężeniu 2.2 mM zostały przygotowane w metanolu. Początkowe roztwory aminokwasów przygotowano w mieszaninie rozpuszczalników woda/metanol (1:1) o stężeniu 2.2 mM. Początkowe roztwory soli metali przygotowano w wodzie o stężeniu 2.2 mM.

Roztwory kompleksów zostały otrzymane przez zmieszanie odpowiednich soli metali [MX₂ i/lub MX, gdzie M = Cu(II), Cu(I), Co(II), Pd(II) oraz X = CH₃COO, Cl], *D*- lub *L*-aminokwasów z roztworem katechin. Stężenia katechin, *D*-, *L*-aminokwasów oraz soli metali w roztworze końcowym wynosiły odpowiednio: 0,055 mM, 0,083 mM oraz 0,014 mM. Roztwory końcowe przygotowano w metanolu.

Eksperymenty T-Wave IM

a) Warunki pomiarów ESI-IM-MS dla katechin

Tabela E5.2. Warunki jonizacji za pomocą techniki elektrosprej (ESI) w trybie jonów dodatnich oraz w trybie jonów ujemnych.

| gaz buforowy | napięcie kapilary [kV] | napięcie stożka [V] | przepływ gazu desolwacyjnego [L/Hr] | gaz nebulizatora [bar] | T źródła [°C] | T desolwacji [°C] |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------|-------------------|
| tryb jonów dodatnich | | | | | | |
| N ₂ | 2,00 | 21 | 162 | 2,5 | 80 | 150 |
| CO ₂ | 1,00 | 21 | 400 | 2,5 | | |
| tryb jonów dodatnich | | | | | | |
| N ₂ | 1,00 | 21 | 327 | 2,5 | 80 | 150 |
| CO ₂ | 1,00 | 11 | 400 | 2,5 | | |

Tabela E5.3. Wartości amplitudy fali (WH) oraz prędkości fali (WV) stosowane do rozdziału jonów [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [2M+Na]⁺, [M-H]⁻, [2M-Na]⁻ dla N₂ oraz CO₂ jako gazów buforowych.

| gaz buforowy | | [M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [2M+Na] ⁺ | | | | [M-H] ⁻ , [2M-Na] ⁻ | | | |
|-----------------|----------|---|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|
| N ₂ | WV [m/s] | 500 | 450 | 500 | 550 | 700 | 300 | 500 | 350 |
| | WH [V] | 25 | 40 | 30 | 40 | 40 | 30 | 40 | 25 |
| CO ₂ | WV [m/s] | 350 | 333 | 450 | 400 | 260 | 300 | 200 | 220 |
| | WH [V] | 40 | 30 | 30 | 40 | 33 | 35 | 20 | 35 |

- Ciśnienie helu w komorze helowej: 1,39 mbar.
- Ciśnienie gazu buforowego w komorze mobilności T-Wave: 3,85 mbar (N₂, tryb jonów dodatnich oraz ujemnych); 1,83 mbar (CO₂, tryb jonów dodatnich); 1,45 mbar (CO₂, tryb jonów ujemnych).

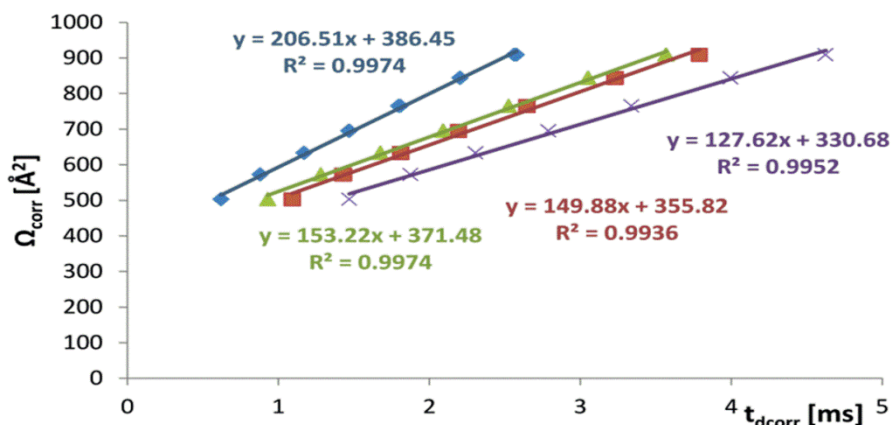
b) Warunki pomiarów IM-MS dla kompleksów

Tabela E5.4. Warunki jonizacji dla kompleksów $[2M + Cu^{2+} + D-, L\text{-aminokwas} - 3H]^-$ za pomocą techniki elektrosprej (ESI) w trybie jonów ujemnych.

| gaz buforowy | napięcie kapilary [kV] | napięcie stożka [V] | przepływ gazu desolwacyjnego [L/Hr] | gaz nebulizatora [bar] | T źródła [°C] | T desolwatacji [°C] |
|----------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------|---------------------|
| tryb jonów ujemnych | | | | | | |
| N ₂ | 2,97 | 11 | 183 | 2,5 | 80 | 150 |

Tabela E5.5. Wartości amplitudy fali (WH), prędkości fali (WV), ciśnienia helu w komorze helowej (P_{He}) oraz ciśnienia azotu w komorze ruchliwości T-Wave (P_{N_2}) stosowane do rozdzielania jonów kompleksu $[2M + Cu^{2+} + D-, L\text{-aminokwas} - 3H]^-$.

| gaz buforowy | | $[2M + Cu^{2+} + D-, L\text{-aminokwas} - 3H]^-$ | | | |
|----------------|------------------|--|-----|------|------|
| N ₂ | WV [m/s] | 428 | 246 | 521 | 862 |
| | WH [V] | 39,6 | 33 | 26 | 29,4 |
| | P_{N_2} [mbar] | 3,8 | | 2,02 | |
| | P_{He} [bar] | 1,4 | | 0,85 | |



Rysunek E5.1. Krzywe kalibracyjne otrzymane dla czterech różnych zestawów wartości prędkości fali (WV) oraz amplitudy fali (WH) dla jonów związku odniesienia (polialaniny) w trybie jonów dodatnich: WV = 500 m/s, HV = 25 V (czerwony); WV = 450 m/s, HV = 40 V (zielony); WV = 500 m/s, HV = 30 V (niebieski); WV = 550 m/s, HV = 40 V (fioletowy).

Tabela E5.6. Czasy dryfu (po uwzględnieniu czasu, jaki jony spędzają poza komorą ruchliwości T-Wave zanim dotrą do detektora) jonów odniesienia: $[\text{poliala}_n\text{H}]^+$ oraz jonów $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ dla epimerycznych katechin otrzymane dla czterech różnych wartości WV oraz WH. Względne odchylenie standardowe (RSD) [%] obliczono na podstawie czterokrotnych powtórzeń pomiaru.

| $[\text{poliala}_n\text{H}]^+$ | WV 500; WH 25 | | WV 450; WH 40 | | WV 500; WH 30 | | WV 550; WH 40 | |
|--------------------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|
| n | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] |
| 3 | 1,09 | 0,23 | 0,93 | 0,10 | 0,62 | 0,20 | 1,47 | 0,01 |
| 4 | 1,43 | 0,31 | 1,28 | 0,12 | 0,88 | 0,14 | 1,88 | 0,05 |
| 5 | 1,81 | 0,15 | 1,68 | 0,13 | 1,17 | 0,19 | 2,31 | 0,04 |
| 6 | 2,19 | 0,03 | 2,09 | 0,07 | 1,47 | 0,21 | 2,79 | 0,02 |
| 7 | 2,65 | 0,12 | 2,53 | 0,02 | 1,80 | 0,36 | 3,34 | 0,01 |
| 8 | 3,23 | 0,10 | 3,05 | 0,05 | 2,20 | 0,10 | 3,99 | 0,02 |
| 9 | 3,79 | 0,02 | 3,57 | 0,08 | 2,57 | 0,34 | 4,62 | 0,04 |
| $[\text{M}+\text{H}]^+$ | | | | | | | | |
| (-)-epikatechina | 1,37 | 0,10 | 1,24 | 0,19 | 0,81 | 0,14 | 1,83 | 0,03 |
| (+)-katechina | 1,37 | 0,30 | 1,24 | 0,10 | 0,81 | 0,14 | 1,84 | 0,18 |
| $[\text{M}+\text{Na}]^+$ | | | | | | | | |
| (-)-epikatechina | 1,66 | 0,04 | 1,53 | 0,15 | 1,01 | 0,19 | 2,10 | 0,04 |
| (+)-katechina | 1,74 | 0,05 | 1,61 | 0,11 | 1,06 | 0,06 | 2,18 | 0,06 |

V.2.2 Rozdział izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów

Przygotowanie roztworów

Początkowe roztwory flawonoidów o stężeniu 2 mM przygotowane zostały w metanolu. Początkowe roztwory soli metali przygotowałam w wodzie o stężeniu 2 mM.

Roztwory końcowe zostały otrzymane przez zmieszanie roztworów flawonoidów (0,050 mM) z 0,5 równoważnikiem molowym jonów metali.

Eksperymenty T-Wave IM-MS

Tabela E5.7. Warunki jonizacji za pomocą techniki elektrosprej (ESI) w trybie jonów dodatnich oraz w trybie jonów ujemnych.

| gaz buforowy | napięcie kapilary [kV] | napięcie stożka [V] | przepływ gazu desolwacyjnego [L/Hr] | gaz nebulizatora [bar] | T źródła [°C] | T desolwacji [°C] |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------|-------------------|
| tryb jonów dodatnich | | | | | | |
| N ₂ | 1,8 | 21 | 298 | 2,5 | 80 | 150 |
| CO ₂ | 1,0 | 21 | 327 | 2,5 | | |
| tryb jonów ujemnych | | | | | | |
| N ₂ | 1,0 | 60 | 150 | 2,5 | 80 | 150 |
| CO ₂ | 1,0 | 30 | 100 | 2,5 | | |

Tabela E5.8. Wartości amplitudy fali (WH) oraz prędkości fali (WV) stosowane do rozdzielania jonów [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [2M+Na]⁺, [M-H]⁻, [2M-Na]⁻, [M+Li]⁺, [M+K]⁺ dla apigeniny oraz bajkaleiny stosując N₂ oraz CO₂ jako gazy buforowe.

| gaz buforowy | | apigenina / bajkaleina | | | | | | | |
|---------------------------|----------|---|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|
| | | [M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [2M+Na] ⁺ | | | | [M-H] ⁻ , [2M-Na] ⁻ | | | |
| N ₂ | WV [m/s] | 300 | 450 | 350 | 700 | 300 | 550 | 500 | 400 |
| | WH [V] | 25 | 35 | 30 | 40 | 30 | 40 | 30 | 25 |
| CO ₂ | WV [m/s] | 370 | 300 | 590 | 450 | 200 | 150 | 300 | 300 |
| | WH [V] | 40 | 35 | 40 | 40 | 40 | 30 | 30 | 35 |
| [M+Li]⁺ | | | | | | | | | |
| N ₂ | WV [m/s] | 500 | 450 | 350 | 650 | | | | |
| | WH [V] | 40 | 30 | 35 | 40 | | | | |
| [M+K]⁺ | | | | | | | | | |
| N ₂ | WV [m/s] | 550 | 450 | 700 | 650 | | | | |
| | WH [V] | 40 | 30 | 40 | 40 | | | | |

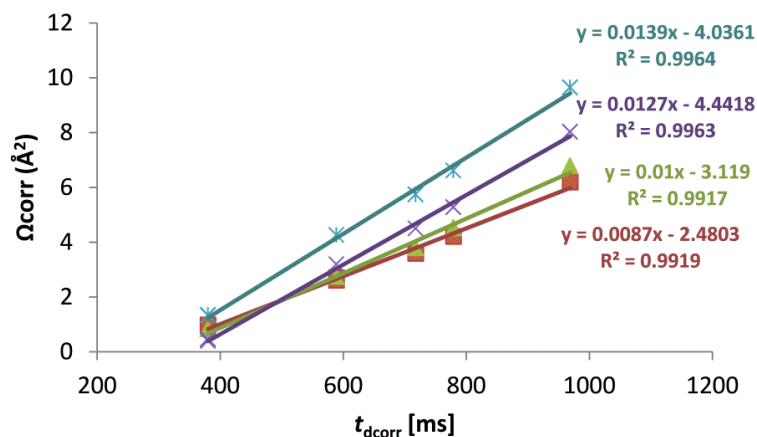
Tabela E5.9. Wartości amplitudy fali (WH) oraz prędkości fali (WV) stosowane do rozdzielania jonów [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [2M+Na]⁺, [M-H]⁻, [2M-Na]⁻, [M+Li]⁺, [M+K]⁺ dla chryzyny oraz dajdzeiny stosując N₂ oraz CO₂ jako gazy buforowe.

| gaz buforowy | | chryzyna / dajdzeina | | | | | | | |
|---------------------------|----------|---|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|
| | | [M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [2M+Na] ⁺ | | | | [M-H] ⁻ , [2M-Na] ⁻ | | | |
| N ₂ | WV [m/s] | 300 | 400 | 400 | 700 | 220 | 500 | 300 | 300 |
| | WH [V] | 25 | 35 | 30 | 40 | 25 | 25 | 20 | 30 |
| CO ₂ | WV [m/s] | 300 | 275 | 350 | 575 | 200 | 150 | 260 | 300 |
| | WH [V] | 33 | 36 | 40 | 40 | 40 | 30 | 30 | 35 |
| [M+Li]⁺ | | | | | | | | | |
| N ₂ | WV [m/s] | 450 | 500 | 300 | 610 | | | | |
| | WH [V] | 35 | 35 | 25 | 40 | | | | |
| [M+K]⁺ | | | | | | | | | |
| N ₂ | WV [m/s] | 400 | 300 | 350 | 700 | | | | |
| | WH [V] | 35 | 30 | 40 | 40 | | | | |

Tabela E5.10. Wartości amplitudy fali (WH) oraz prędkości fali (WV) stosowane do rozdziału jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M-H]^-$, $[2M-Na]^-$, $[M+Li]^+$, $[M+K]^+$ dla kemferolu oraz luteoliny stosując N_2 oraz CO_2 jako gazy buforowe.

| gaz buforowy | | kemferol / luteolina | | | | | | | |
|------------------------------|----------|--------------------------------------|-----|-----|-----|-------------------------|-----|-----|-----|
| | | $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$ | | | | $[M-H]^-$, $[2M-Na]^-$ | | | |
| N_2 | WV [m/s] | 300 | 350 | 550 | 700 | 220 | 550 | 300 | 300 |
| | WH [V] | 25 | 30 | 35 | 40 | 25 | 40 | 20 | 30 |
| CO_2 | WV [m/s] | 240 | 250 | 280 | 350 | 200 | 200 | 260 | 300 |
| | WH [V] | 40 | 30 | 40 | 30 | 40 | 30 | 30 | 35 |
| $[M+Li]^+$ | | | | | | | | | |
| N_2 | WV [m/s] | 300 | 500 | 450 | 350 | | | | |
| | WH [V] | 30 | 40 | 35 | 35 | | | | |
| $[M+K]^+$ | | | | | | | | | |
| N_2 | WV [m/s] | 400 | 600 | 700 | 750 | | | | |
| | WH [V] | 30 | 35 | 40 | 40 | | | | |

- Ciśnienie helu w komorze helowej: 1,39 mbar.
- Ciśnienie gazu buforowego w komorze ruchliwości T-Wave: 3,88 mbar (N_2); 1,55 mbar (CO_2).



Rysunek E5.2. Krzywe kalibracyjne dla czterech różnych zestawów wartości prędkości fali (WV) oraz wysokości fali (WH) dla jonów $[M+H]^+$ pochodzących od związków referencyjnych (*N*-etyloanilina, ondansetron, kolchicyna, werapamil, rezerpina). WV = 300 m/s, HV = 25 V (czerwony); WV = 400 m/s, HV = 35 V (zielony); WV = 700 m/s, HV = 40 V (niebieski); WV = 350 m/s, HV = 30 V (fioletowy).

Tabela E5.11. Czasy dryfu (po uwzględnieniu czasu jaki jony spędzają poza komorą ruchliwości T-Wave zanim dotrą do detektora) jonów $[M+H]^+$ związków referencyjnych (*N*-etyloanilina, ondansetron, kolchicyna, werapamil oraz rezerpina) oraz jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ związków flawonoidowych (apigenina, bajkaleina oraz genisteina) dla czterech różnych wartości WV oraz WH. Względne odchylenie standardowe (RSD) [%] obliczyłam na podstawie czterokrotnych powtórzeń pomiaru.

| $[M+H]^+$ | WV 300; WH 25 | | WV 450; WH 40 | | WV 350; WH 30 | | WV 700; WH 40 | |
|------------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|
| M | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] |
| <i>N</i> -etyloanilina | 1,20 | 0,52 | 0,66 | 1,58 | 0,42 | 2,02 | 1,34 | 0,92 |
| ondansetron | 3,95 | 0,09 | 3,21 | 0,03 | 3,20 | 0,02 | 4,26 | 0,07 |
| kolchicyna | 5,59 | 0,07 | 4,45 | 0,05 | 4,50 | 0,03 | 5,74 | 0,13 |
| werapamil | 6,60 | 0,43 | 5,19 | 0,13 | 5,28 | 0,10 | 6,62 | 0,03 |
| rezerpina | 8,75 | 0,23 | 7,75 | 0,05 | 8,03 | 0,01 | 9,64 | 0,08 |
| | | | | | | | | |
| $[M+H]^+$ | | | | | | | | |
| apigenina | 3,18 | 0,08 | 2,60 | 0,01 | 2,57 | 0,05 | 3,53 | 0,03 |
| bajkaleina | 3,03 | 0,19 | 2,51 | 0,01 | 2,45 | 0,02 | 3,42 | 0,01 |
| | | | | | | | | |
| $[M+Na]^+$ | | | | | | | | |
| apigenina | 4,19 | 0,04 | 3,38 | 0,03 | 3,38 | 0,04 | 4,47 | 0,01 |
| bajkaleina | 3,96 | 0,05 | 3,21 | 0,03 | 3,21 | 0,05 | 4,21 | 0,02 |

V.2.3 Analiza diastereoizomerycznych β -laktamów za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi

Przygotowanie roztworów

Początkowe roztwory β -laktamów o stężeniu 2 mM przygotowane zostały w metanolu. Początkowe roztwory soli metali przygotowałam w wodzie o stężeniu 2 mM.

Roztwory końcowe przygotowałam w metanolu przez zmieszanie izomerycznych β -laktamów (o stężeniu 0,030 mM) z 0,5 równoważnikiem molowym jonów metali.

Eksperymenty T-Wave IM

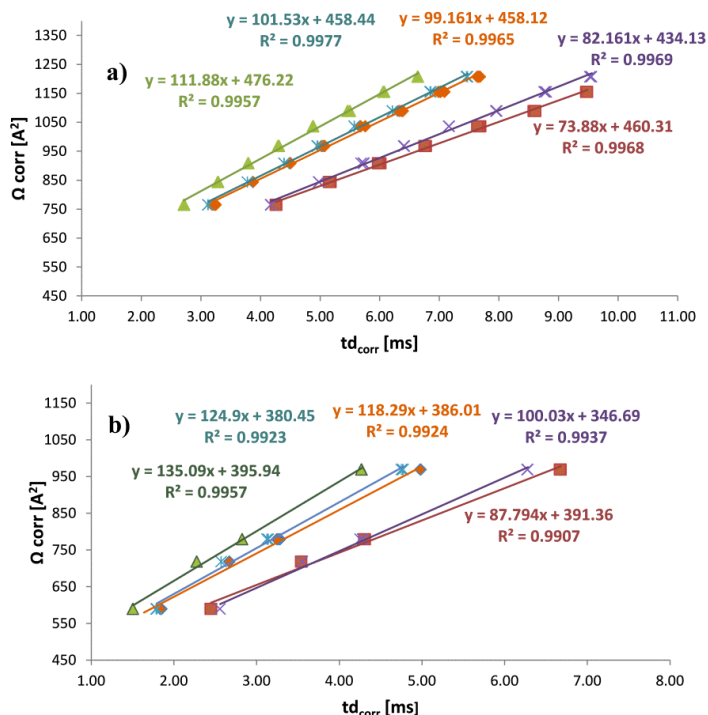
Tabela E5.12. Warunki jonizacji za pomocą techniki elektrosprej (ESI) w trybie jonów dodatnich.

| gaz buforowy | napięcie kapilary [kV] | napięcie stożka [V] | przepływ gazu desolwacyjnego [L/Hr] | gaz nebulizatora [bar] | T źródła [°C] | T desolwacji [°C] |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------|-------------------|
| tryb jonów dodatnich | | | | | | |
| N ₂ | 1,00 | 40 | 295 | 2,9 | 80 | 150 |
| CO ₂ | 1,80 | 18 | 295 | 3,5 | | |

Tabela E5.13. Wartości amplitudy fali (WH) oraz prędkości fali (WV) stosowane do rozdzielania jonów [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [2M+Na]⁺, [M-H]⁻, [2M-Na]⁻, [M+Li]⁺, [M+K]⁺ dla związków β-laktamowych stosując N₂ oraz CO₂ jako gazy buforowe.

| gaz buforowy | | [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [2M+Na]⁺ | | | | |
|---------------------------|----------|---|------|------|------|-----|
| N ₂ | WV [m/s] | 300 | 350 | 419 | 421 | 480 |
| | WH [V] | 30 | 40 | 20 | 28,2 | 40 |
| CO ₂ | WV [m/s] | 350 | 400 | 450 | 265 | 155 |
| | WH [V] | 33 | 40 | 40 | 30 | 25 |
| [M+Li]⁺ | | | | | | |
| N ₂ | WV [m/s] | 550 | 421 | 920 | 400 | 300 |
| | WH [V] | 40 | 28,2 | 30,8 | 30 | 35 |
| [M+K]⁺ | | | | | | |
| N ₂ | WV [m/s] | 450 | 421 | 920 | 500 | 850 |
| | WH [V] | 30 | 28,2 | 30,8 | 30 | 40 |

- Ciśnienie helu w komorze helowej: 1,39 mbar.
- Ciśnienie gazu buforowego w komorze ruchliwości T-Wave: N₂: 3,84 mbar (dla WV = 350 m/s, WH = 40 V), 5,32 mbar (dla WV = 500 m/s, WH = 300 V), dla wszystkich pozostałych wartości WV oraz WH $P_{N_2} = 2,53$ mbar; CO₂: 2,17 mbar.



Rysunek 5.3. Krzywe kalibracyjne dla pięciu różnych zestawów wartości prędkości fali (WV) oraz amplitudy fali (WH) dla związków odniesienia **a)** polialaniny oraz **b)** związków lekopodobnych. WV = 300 m/s, WH = 30 V (czerwony); WV = 350 m/s, WH = 40 V (zielony); WV = 419 m/s, WH = 20 V (pomarańczowy); WV = 421 m/s, WH = 28,2 V (niebieski); WV = 480 m/s, WH = 40 V (fioletowy).

Tabela E5.14. Czasy dryfu (po uwzględnieniu czasu jaki jony spędzają poza komorą ruchliwości T-Wave zanim dotrą do detektora) jonów $[M+H]^+$ związków referencyjnych (ondansetron, kolchicyna, werapamil oraz rezerpina) oraz jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ związków β -laktamowych **1** i **5** dla pięciu różnych wartości WV oraz WH. Względne odchylenie standardowe (RSD) [%] obliczyłam na podstawie czterokrotnych powtórzeń pomiaru.

| $[M+H]^+$ | WV 300; WH 30 | | WV 350; WH 40 | | WV 419; WH 20 | | WV 421; WH 28,2 | | WV 480; WH 40 | |
|--------------------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|--------------------|---------|------------------|---------|
| | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] |
| M | | | | | | | | | | |
| ondansetron | 1,90 | 0,16 | 2,48 | 0,02 | 1,85 | 0,35 | 1,80 | 0,20 | 2,56 | 0,05 |
| kolchicyna | 2,73 | 0,10 | 3,49 | 0,21 | 2,67 | 0,04 | 2,58 | 0,02 | 3,56 | 0,02 |
| werapamil | 3,23 | 0,28 | 4,09 | 0,34 | 3,27 | 0,47 | 3,14 | 0,28 | 4,28 | 0,35 |
| rezerpina | 4,97 | 0,09 | 6,24 | 0,07 | 4,99 | 0,04 | 4,77 | 0,20 | 6,28 | 0,04 |
| $[\text{poliala}_n+H]^+$ | | | | | | | | | | |
| n | | | | | | | | | | |
| 7 | 3,24 | 0,39 | 4,13 | 0,30 | 3,23 | 0,83 | 3,09 | 0,50 | 4,19 | 0,29 |
| 8 | 3,89 | 0,48 | 4,91 | 0,23 | 3,88 | 0,05 | 3,73 | 0,50 | 4,99 | 0,39 |
| 9 | 4,51 | 0,45 | 5,65 | 0,54 | 4,50 | 0,14 | 4,31 | 0,18 | 5,74 | 0,41 |
| 10 | 5,07 | 0,39 | 6,34 | 1,53 | 5,05 | 0,49 | 4,84 | 0,44 | 6,46 | 0,02 |
| 11 | 5,73 | 0,42 | 7,14 | 0,61 | 5,70 | 0,77 | 5,46 | 0,89 | 7,14 | 0,36 |
| 12 | 6,38 | 0,54 | 7,91 | 0,20 | 6,37 | 0,44 | 6,06 | 0,30 | 8,00 | 0,62 |
| 13 | 7,05 | 0,47 | 8,71 | 0,09 | 7,03 | 0,60 | 6,76 | 0,92 | 8,81 | 0,39 |

| | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 14 | 7,69 | 0,37 | 9,48 | 0,68 | 7,64 | 0,60 | 7,33 | 0,62 | 9,35 | 0,07 |
| | | | | | | | | | | |
| [M+H]⁺ | | | | | | | | | | |
| 1 | 3,66 | 0,10 | 4,63 | 0,05 | 3,65 | 0,06 | 3,49 | 0,08 | 4,70 | 0,07 |
| 5 | 3,79 | 0,07 | 4,77 | 0,12 | 3,76 | 0,10 | 3,58 | 0,07 | 4,81 | 0,11 |
| [M+Na]⁺ | | | | | | | | | | |
| 1 | 3,94 | 0,02 | 4,97 | 0,09 | 3,92 | 0,12 | 3,77 | 0,04 | 5,04 | 0,06 |
| 5 | 4,23 | 0,05 | 5,33 | 0,34 | 4,20 | 0,10 | 4,03 | 0,05 | 5,38 | 0,08 |

Tabela E5.15. Czasy dryfu (t_d) [ms] oraz wartości R_{p-p} jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oraz $[2M+Na]^+$ dla związków β -laktamowych dla których nie obserwowałam rozdziału wyżej wymienionych jonów

| | jony | czas dryfu, t_d [ms] | | R_{p-p} |
|-----|-------------|------------------------|----------|-----------|
| | | 1 | 4 | |
| 1. | | | | |
| | $[M+H]^+$ | 4,36 | 4,37 | 0,02 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,68 | 4,67 | 0,01 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,21 | 10,20 | 0,01 |
| 2. | | 1 | 6 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,36 | 4,38 | 0,02 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,68 | 4,80 | 0,27 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,22 | 10,48 | 0,33 |
| 3. | | 2 | 6 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,44 | 4,38 | 0,13 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,89 | 4,77 | 0,20 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,24 | 10,40 | 0,17 |
| 4. | | 3 | 1 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,35 | 4,38 | 0,06 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,74 | 4,67 | 0,13 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,29 | 10,14 | 0,16 |
| 5. | | 3 | 2 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,39 | 4,45 | 0,12 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,77 | 4,94 | 0,29 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,39 | 10,29 | 0,12 |
| 6. | | 3 | 6 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,39 | 4,40 | 0,02 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,77 | 4,78 | 0,02 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,38 | 10,39 | 0,01 |
| 7. | | 1 | 3 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,34 | 4,38 | 0,07 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,67 | 4,77 | 0,16 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,20 | 10,51 | 0,29 |
| 8. | | 2 | 5 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,47 | 4,50 | 0,07 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,92 | 4,94 | 0,09 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,27 | 10,28 | 0,01 |
| 9. | | 4 | 6 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,37 | 4,38 | 0,02 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,65 | 4,76 | 0,15 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,16 | 10,34 | 0,20 |
| 11. | | 5 | 6 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,41 | 4,38 | 0,05 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,94 | 4,76 | 0,25 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,27 | 10,34 | 0,08 |
| 12. | | 3 | 5 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,39 | 4,45 | 0,12 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,77 | 4,94 | 0,29 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,39 | 10,29 | 0,12 |
| 13. | | 3 | 4 | |
| | $[M+H]^+$ | 4,35 | 4,38 | 0,06 |
| | $[M+Na]^+$ | 4,77 | 4,67 | 0,13 |
| | $[2M+Na]^+$ | 10,29 | 10,14 | 0,16 |

V.2.4 Analiza kompleksów niekowalencyjnych kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstryną (CD)

Przygotowanie roztworów

Początkowe roztwory kwasu foliowego oraz α -, β - i γ -cyklodekstryn o stężeniu 2 mM przygotowane zostały w wodzie.

Roztwory końcowe przygotowano przez zmieszanie kwasu foliowego oraz α -, β - i γ -cyklodekstrynami w mieszaninie rozpuszczalników woda/metanol (1:1). Stężenie końcowe roztworu wyniosło 0,70 mM.

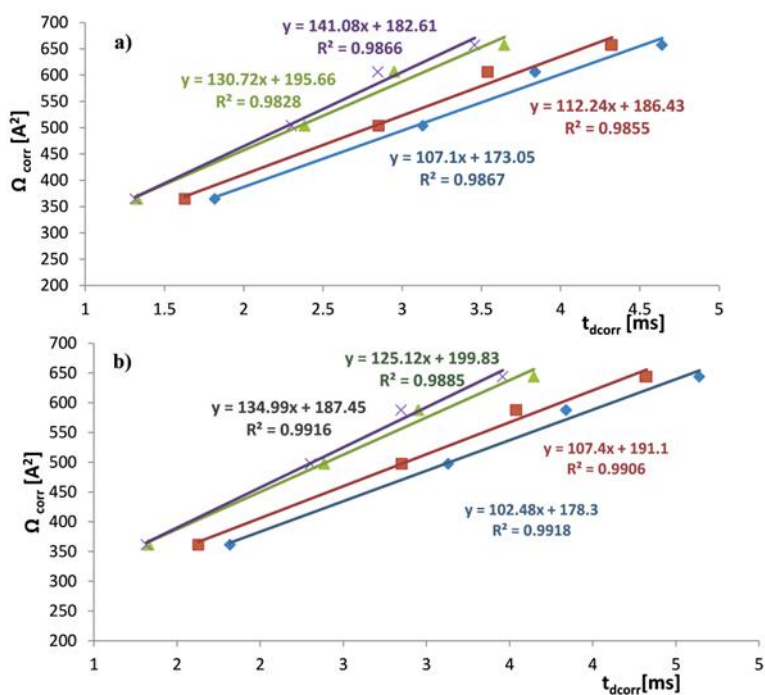
Eksperymenty T-Wave IM

Tabela E5.16. Warunki jonizacji za pomocą techniki elektrosprej (ESI) w trybie jonów ujemnych.

| gaz buforowy | napięcie kapilary [kV] | napięcie stożka [V] | przepływ gazu desolwacyjnego [L/Hr] | gaz nebulizatora [bar] | T źródła [°C] | T desolwatacji [°C] |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------|---------------------|
| tryb jonów dodatnich | | | | | | |
| N ₂ | 2,77 | 40 | 494 | 2,5 | 80 | 150 |

Tabela E5.17. Wartości amplitudy fali (WH) oraz prędkości fali (WV) stosowane do analizy niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -, β - i γ -cyklodekstryną.

| gaz buforowy | | | | | |
|----------------|------------------------|------|-----|-----|-----|
| N ₂ | WV [m/s] | 700 | 600 | 600 | 650 |
| | WH [V] | 36 | 34 | 37 | 40 |
| | P _{N2} [mbar] | 3,40 | | | |
| | P _{He} [mbar] | 1,40 | | | |



Rysunek 5.4. Krzywe kalibracyjne dla czterech różnych zestawów wartości prędkości fali (WV) oraz amplitudy fali (WH) dla związków odniesienia tj.: kwas foliowy (KF), α -CD, β -CD, γ -CD, dla których przekroje czynne zostały wyznaczone za pomocą metody **a)** PM6 oraz **b)** PM7. WV = 600 m/s, WH = 34 V (czerwony); WV = 600 m/s, WH = 37 V (zielony); WV = 700 m/s, WH = 36 V (niebieski); WV = 650 m/s, WH = 40 V (fioletowy).

Tabela E5.18. Czasy dryfu (po uwzględnieniu czasu jaki jony spędzają poza komorą ruchliwości T-Wave zanim dotrą do detektora) jonów $[M-2H]^{2-}$ związków odniesienia (kwas foliowy (KF), α -CD, β -CD, γ -CD) oraz jonów $[\alpha-CD + KF - 2H]^{2-}$, $[\beta-CD + KF - 2H]^{2-}$, $[\gamma-CD + KF - 2H]^{2-}$ dla czterech różnych wartości WV oraz WH. Względne odchylenie standardowe (RSD) [%] obliczyłam na podstawie czterokrotnych powtórzeń pomiaru.

| | WV 700; HV 36 | | WV 600; HV 34 | | WV 600; HV 37 | | WV 650; HV 40 | |
|----------------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|
| | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] |
| $[KF-2H]^{2-}$ | 1,82 | 0,05 | 1,63 | 0,00 | 1,33 | 0,00 | 1,32 | 0,04 |
| $[\alpha-CD-2H]^{2-}$ | 3,13 | 0,10 | 2,85 | 0,14 | 2,39 | 0,11 | 2,30 | 0,05 |
| $[\beta-CD-2H]^{2-}$ | 3,84 | 0,16 | 3,54 | 0,11 | 2,95 | 0,18 | 2,85 | 0,03 |
| $[\gamma-CD-2H]^{2-}$ | 4,64 | 0,05 | 4,32 | 0,26 | 3,65 | 0,09 | 3,46 | 0,03 |
| $[\alpha-CD + KF-2H]^{2-}$ | 4,27 | 0,07 | 3,95 | 0,13 | 3,32 | 0,05 | 3,18 | 0,06 |
| $[\beta-CD+KF-2H]^{2-}$ | 4,35 | 0,46 | 4,01 | 0,48 | 3,42 | 0,18 | 3,29 | 0,17 |
| $[\gamma-CD+KF-2H]^{2-}$ | 5,04 | 0,25 | 4,69 | 0,13 | 3,96 | 0,11 | 3,77 | 0,09 |

V.2.5 Analiza strukturalna kaliksalenów oraz ich dimerycznych asocjatów za pomocą IM-MS

Przygotowanie roztworów

Początkowe roztwory kaliksalenów o stężeniu 2 mM przygotowane zostały w mieszaninie rozpuszczalników chlorek metylenu/metanol.

Stężenie końcowe roztworów wynosiło 0,03 mM.

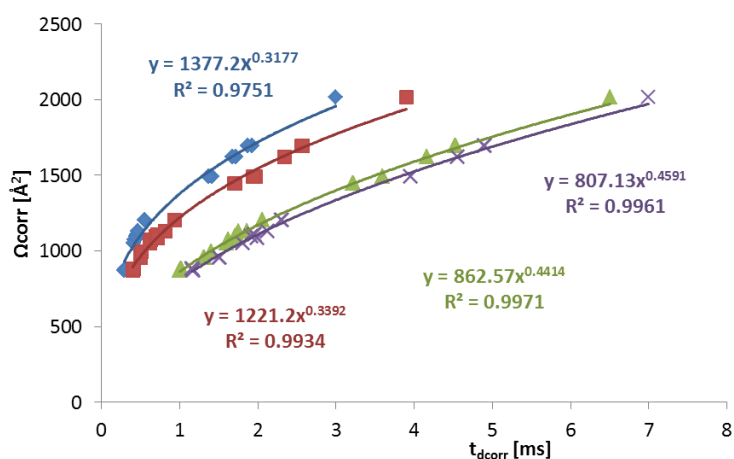
Eksperymenty T-Wave IM

Tabela E5.19. Warunki jonizacji za pomocą techniki elektrosprej (ESI) w trybie jonów ujemnych.

| gaz buforowy | napięcie kapilary [kV] | napięcie stożka [V] | przepływ gazu desolwacyjnego [L/Hr] | gaz nebulizatora [bar] | T źródła [°C] | T desolwatacji [°C] |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------|---------------------|
| tryb jonów dodatnich | | | | | | |
| N ₂ | 2,5 | 70 | 900 | 2,5 | 80 | 150 |

Tabela E5.20. Wartości amplitudy fali (WH) oraz prędkości fali (WV) stosowane do analizy kaliksalenów 1 - 4.

| gaz buforowy | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|------|-----|-----|-----|
| N ₂ | WV [m/s] | 300 | 350 | 500 | 400 |
| | WH [V] | 20 | 20 | 20 | 27 |
| | P _{N₂} [mbar] | 2,41 | | | |
| | P _{He} [mbar] | 1,39 | | | |



Rysunek 5.5. Krzywe kalibracyjne dla czterech różnych zestawów wartości prędkości fali (WV) oraz amplitudy fali (WH) dla enolazy jako związku odniesienia. WV = 350 m/s, WH = 20 V (czerwony); WV = 500 m/s, WH = 20 V (zielony); WV = 300 m/s, WH = 20 V (niebieski); WV = 400 m/s, WH = 27 V (fioletowy).

Tabela E5.21. Czasy dryfu (po uwzględnieniu czasu jaki jony spędzają poza komorą ruchliwości T-Wave zanim dotrą do detektora) jonów $[M+H]^+$ dla enolazy jako związku odniesienia oraz jonów $[M+H]^+$ dla kaliksalenów **1** – **4** dla czterech różnych wartości WV oraz WH. Względne odchylenie standardowe (RSD) [%] obliczyłam na podstawie czterokrotnych powtórzeń pomiaru.

| $[M+H]^+$ | WV 300; WH 20 | | WV 350; WH 20 | | WV 500; WH 20 | | WV 400; WH 27 | |
|-----------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|
| | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] | czas dryfu [ms] | RSD [%] |
| $[enolaza+H]^+$ | 0,32 | 0,17 | 0,40 | 0,14 | 1,02 | 0,05 | 1,17 | 0,58 |
| | 0,33 | 1,52 | 0,41 | 0,15 | 1,31 | 0,42 | 1,16 | 0,23 |
| | 0,38 | 0,14 | 0,50 | 0,13 | 1,62 | 0,03 | 1,51 | 0,35 |
| | 0,39 | 0,14 | 0,63 | 0,01 | 1,41 | 0,05 | 0,01 | 0,01 |
| | 0,37 | 0,01 | 0,51 | 0,12 | 1,60 | 0,03 | 1,81 | 0,14 |
| | 0,39 | 0,14 | 0,62 | 0,09 | 1,71 | 0,08 | 1,92 | 0,02 |
| | 0,40 | 0,34 | 0,70 | 0,02 | 1,73 | 0,04 | 1,96 | 0,19 |
| | 0,42 | 0,13 | 0,72 | 0,08 | 1,71 | 0,02 | 1,99 | 0,14 |
| | 0,45 | 0,13 | 0,75 | 0,39 | 1,74 | 0,03 | 2,12 | 0,05 |
| | 0,50 | 0,33 | 0,93 | 0,01 | 1,84 | 3,00 | 2,30 | 0,09 |
| | 1,14 | 0,14 | 1,71 | 0,22 | 2,05 | 0,02 | 3,96 | 0,04 |
| | 1,36 | 0,11 | 1,95 | 0,39 | 3,22 | 0,11 | 4,55 | 0,02 |
| | 1,67 | 0,23 | 2,34 | 0,01 | 4,16 | 0,12 | 4,90 | 0,09 |
| 1,80 | 0,05 | 2,57 | 0,05 | 4,52 | 0,25 | 5,25 | 0,09 | |
| 3,00 | 0,12 | 3,90 | 0,25 | 6,50 | 0,14 | 7,00 | 0,05 | |
| | | | | | | | | |
| $[M+H]^+$ | | | | | | | | |
| 1 | 0,31 | 1,14 | 0,66 | 0,95 | 1,76 | 2,04 | 1,84 | 0,06 |
| 2 | 0,45 | 0,12 | 0,87 | 0,02 | 2,03 | 0,05 | 2,22 | 0,05 |
| 3 | 0,57 | 0,99 | 0,88 | 1,08 | 1,96 | 0,27 | 2,35 | 0,10 |
| 4 | 0,76 | 0,01 | 1,26 | 0,04 | 2,56 | 0,02 | 2,85 | 0,07 |
| | | | | | | | | |
| $[2M+H]^+$ | | | | | | | | |
| 1 | 1,90 | 0,11 | 2,59 | 0,15 | 4,50 | 0,15 | 4,78 | 0,15 |
| 2 | 2,38 | 0,25 | 3,09 | 0,21 | 5,30 | 0,69 | 5,60 | 0,45 |
| 3 | 2,39 | 0,09 | 3,11 | 0,54 | 5,39 | 0,74 | 6,10 | 0,25 |
| 4(a) | 2,83 | 0,14 | 3,67 | 0,12 | 6,12 | 0,15 | 6,43 | 0,74 |
| 4(b) | 3,21 | 1,00 | 4,18 | 0,68 | 6,80 | 0,25 | 7,19 | 0,85 |

V.3 Część obliczeniowa

Powinowactwa do protonu anionów oraz cząsteczek obojętnych w 298,15 K obliczono na podstawie entalpii reakcji: $AH = A^- + H^+$ oraz $BH^+ = B + H^+$ za pomocą następujących równań:

$$PA_{anionów} = \Delta H_r^{298} = (H_{A^-}^{298} + H_{H^+}^{298}) - H_{AH}^{298}$$

$$PA_{cząsteczek\ obojętnych} = \Delta H_r^{298} = (H_B^{298} + H_{H^+}^{298}) - H_{BH^+}^{298}$$

Entalpię protonu ($H_{H^+}^{298}$) przyjąłem jako wartość równą 6,20 kJ/mol ($5/2 RT$). Końcowe wartości entalpii zostały obliczone za pomocą wzoru:

$$H = E_0 + H_{therm}^{298} - ZPE + SF * ZPE,$$

gdzie ZPE oraz H_{therm}^{298} są wartościami obliczonymi, zaś SF przyjęto jako 0,9610.⁸⁸

V.3.1 Rozdział izomerycznych katechin za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów

Początkowe struktury utworzone za pomocą programu GaussView (wersja 5.0.8)⁸⁹ zoptymalizowałam, stosując metodę półempiryczną PM6, a następnie poddałam dalszej optymalizacji wykorzystując funkcjonal m05-2x oraz bazę funkcyjną 6-31+g(d,p). Obliczenia kwantowo-chemiczne przeprowadziłam za pomocą pakietu Gaussian 09.⁹⁰ Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ otrzymałam w wyniku szeroko zakrojonych poszukiwań przez zmianę miejsc protonowania oraz umiejscowienia atomu sodu. Dla najniższych energetycznie struktur obliczyłam teoretyczne przekroje czynne (Ω_i) za pomocą ogólnie dostępnego programu Mobcal¹⁶ wykorzystując metodę PA.

W Tabeli E5.22 zostały przedstawione wartości powinowactwa do protonu dla wszystkich możliwych miejsc protonowania.

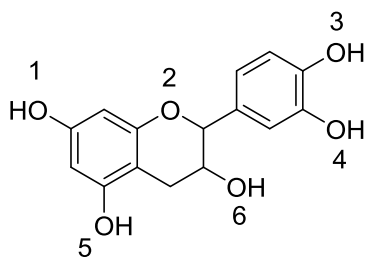


Tabela E6.22. Wartości powinowactwa do protonu [kJ/mol] cząsteczek obojętnych katechin obliczone za pomocą metody m05-2x/6-31+g(d,p).

| atom tlenu | powinowactwo do protonu cząsteczek obojętnych [kJ/mol] | |
|------------|--|------------------|
| | (+)-katechina | (-)-epikatechina |
| O1 | 624,7 | 619,6 |
| O2 | 660,7 | 645,2 |
| O3 | 635,5 | 637,2 |
| O4 | 633,9 | 636,4 |
| O5 | 626,3 | 620,1 |
| O6 | 710,9 | 746,4 |

V.3.2 Rozdział izomerów konstytucyjnych związków flawonoidowych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów

Początkowe struktury zaczerpnęłam z bazy struktur krystalograficznych RCSB PDB (*RCSB Protein Data Bank*), a następnie poddałam dalszej optymalizacji wykorzystując funkcjonał m05-2x oraz bazę funkcyjną 6-31g(d,p). Obliczenia kwantowo-chemiczne przeprowadziłam za pomocą pakietu Gaussian 09. Najniższe energetycznie struktury jonów $[M+X]^+$ ($X = H^+, Na^+, Li^+$ oraz K^+) oraz $[M-H]^-$ otrzymałam w wyniku szeroko zakrojonych poszukiwań przez zmianę miejsc protonowania, deprotonowania oraz przez zmianę umiejscowienia kationu Li^+ , Na^+ oraz K^+ . Dla najniższych energetycznie struktur obliczyłam teoretyczne przekroje czynne (Ω_i) za pomocą ogólnie dostępnego programu Mobcal¹⁶ wykorzystując metodę PA.

Powinowactwo do protonu cząsteczek obojętnych oraz anionów obliczyłam zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale V.3.1. W Tabelach E5.23 – E5.25 zostały przedstawione wartości powinowactwa do protonu dla wszystkich możliwych miejsc protonowania oraz deprotonowania izomerycznych związków flawonoidowych.

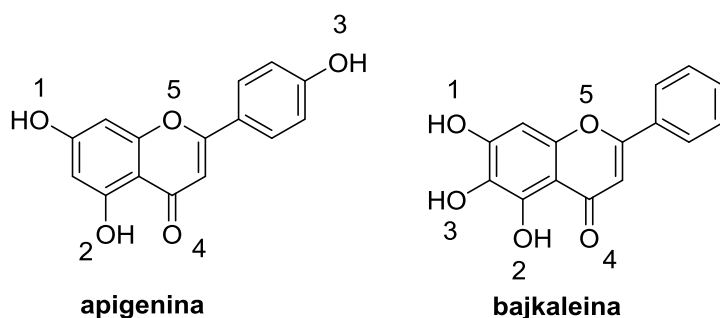


Tabela E5.23. Wartości powinowactwa do protonu [kJ/mol] cząsteczek obojętnych oraz anionów apigeniny oraz bajkaleiny obliczone za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).

| atom tlenu | powinowactwo do protonu cząsteczek obojętnych [kJ/mol] | | powinowactwo do protonu anionów [kJ/mol] | |
|------------|--|--------------|--|---------------|
| | apigenina | bajkaleina | apigenina | bajkaleina |
| O1 | 754,3 | 761,6 | 1420,4 | 1437,6 |
| O2 | 937,6 | 940,1 | 1505,4 | 1463,1 |
| O3 | 731,7 | 917,1 | 1390,9 | 1440,9 |
| O4 | 966,4 | 944,3 | | |
| O5 | 722,3 | 725,3 | | |

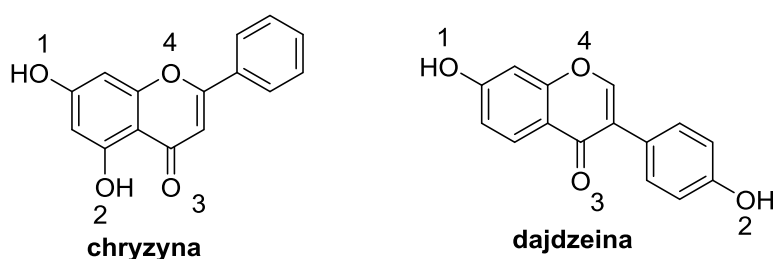


Tabela E5.24. Wartości powinowactwa do protonu [kJ/mol] cząsteczek obojętnych oraz anionów chryzyny oraz dajdzeiny obliczone za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).

| atom tlenu | powinowactwo do protonu cząsteczek obojętnych [kJ/mol] | | powinowactwo do protonu anionów [kJ/mol] | |
|------------|--|--------------|--|---------------|
| | chryzyna | dajdzeina | chryzyna | dajdzeina |
| O1 | 746,4 | 736,4 | 1420,6 | 1415,0 |
| O2 | 884,5 | 777,4 | 1498,1 | 1471,8 |
| O3 | 953,1 | 970,7 | | |
| O4 | 728,8 | 721,8 | | |

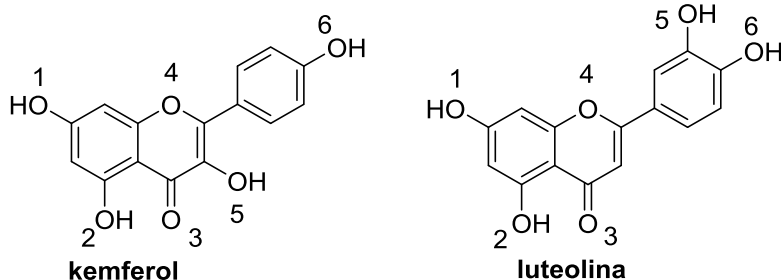


Tabela E5.25. Wartości powinowactwa do protonu [kJ/mol] cząsteczek obojętnych oraz anionów kemferolu oraz luteoliny obliczone za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).

| atom tlenu | powinowactwo do protonu cząsteczek obojętnych [kJ/mol] | | powinowactwo do protonu anionów [kJ/mol] | |
|------------|--|--------------|--|---------------|
| | kemferol | luteolina | kemferol | luteolina |
| O1 | 777,6 | 751,5 | 1423,2 | 1456,9 |
| O2 | 963,4 | 934,7 | 1498,8 | 1504,0 |
| O3 | 972,4 | 961,0 | | |
| O4 | 740,7 | 733,5 | | |
| O5 | 963,6 | 753,6 | 1405,9 | 1456,2 |
| O6 | 796,6 | 753,4 | 1398,4 | 1361,0 |

V.3.3 Analiza diastereoizomerycznych β -laktamów za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi

Początkowe obojętne struktury związków β -laktamowych otrzymałam za pomocą programu GaussView 5.0.8, które w kolejnym etapie zostały poddane szczegółowej analizie z wykorzystaniem symulacji mechaniki (MM) i dynamiki molekularnej (MD). Obliczenia MD zostały przeprowadzone przez dr. Michała Kolińskiego z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN.

Trójwymiarowe struktury sześciu diastereoizomerów zostały stworzone od podstaw z wykorzystaniem serwera PRODRG.⁹¹ Parametry opisujące topologię liganda (wiązania i kąty między atomami oraz kąty dwuścienne) zostały przypisane ręcznie zgodnie z polem siłowym GROMOS96 43A1.⁹² Ładunki punktowe na atomach zostały obliczone z wykorzystaniem funkcjonału B3LYP oraz bazy funkcyjnej 6-311++g (2d, p).

Dla każdego diastereoizomeru przeprowadzono 10000 symulacji komputerowych w celu identyfikacji nisko energetycznych konformerów. Symulacje komputerowe polegały kolejno na symulowanym wyżarzaniu (*Simulated Annealing*, SA) wraz z malejącą temperaturą od 500 K do 100 K w czasie 2500 kroków symulacji a następnie optymalizacji

geometrii (minimalizacji energii) za pomocą algorytmu najszybszego spadku. Algorytm ten polega na zmianie konformacji liganda zgodnie z kierunkiem najszybciej malejącego gradientu obserwowanego na hiperpowierzchni funkcji energii potencjalnej układu. Opisana powyżej procedura złożona z dwóch kolejnych etapów miała na celu jak najdokładniejsze próbkowanie przestrzeni konformacyjnej badanych cząsteczek. Symulacje w wysokiej temperaturze pozwoliły na ominiecie lokalnych maksimów, natomiast algorytm najszybszego spadku umożliwił identyfikację konformacji odpowiednich dla lokalnych minimów funkcji energii potencjalnej układu. Podczas symulacji SA standardowy krok całkowania (czasowy) został ustalony na 2 fs. Do badania oddziaływań elektrostatycznych dalekiego zasięgu zastosowano metodę PME (metoda sumowania Ewalda).⁹³ Wszystkie obliczenia i analizę danych przeprowadzono za pomocą programu GROMACS v3.3.⁹⁴ Wybrane struktury z obliczeń MD zostały zoptymalizowane za pomocą metody półempirycznej PM7 a następnie za pomocą funkcjonału m05-2x oraz bazy funkcyjnej 6-31g(d,p). Wszystkie obliczenia kwantowochemiczne przeprowadzono za pomocą pakietu Gaussian 09. Najbardziej stabilne struktury dla jonów $[M+H]^+$ oraz $[M+Na]^+$ otrzymano w wyniku szeroko zakrojonych poszukiwań miejsc protonowania oraz miejsc oddziaływania z jonami sodu. Teoretyczne przekroje czynne dla najniższych energetycznie struktur zostały obliczone za pomocą ogólnie dostępnego programu Mobcal wykorzystując metodę TJ.

Wartości powinowactwa do protonu wszystkich miejsc protonowania związków β -laktamowych umieszczono w Tabeli E 5.26.

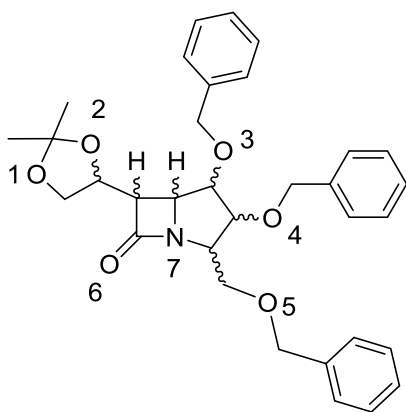


Tabela E5.26. Wartości powinowactwa do protonu [kJ/mol] cząsteczek obojętnych związków β -laktamowych obliczone za pomocą metody m05-2x/6-31g(d,p).

| atom tlenu | powinowactwo do protonu cząsteczek obojętnych [kJ/mol] |
|------------|---|
| O1 | 928,4 |
| O2 | 923,0 |
| O3 | 933,9 |
| O4 | 928,8 |
| O5 | 919,6 |
| O6 | 980,3 |
| atom azotu | |
| N7 | 939,7 |

V.3.4 Analiza kompleksów niekowalencyjnych kwasu foliowego z α -, β -, γ -cyklodekstryną (CD)

Początkowe struktury kwasu foliowego oraz α -, β -, γ -cyklodekstryn zaczerpnęłam z bazy struktur krystalograficznych (*the Cambridge Crystallographic Data Centre*, CCDC). Struktury podwójnie deprotonowanych jonów odniesienia otrzymałam w wyniku intensywnych poszukiwań najniższych energetycznie konformacji przez zmianę położenia ładunków ujemnych.

Początkowe struktury obojętnych kompleksów KF/CD zostały otrzymane w wyniku dokowania molekularnego za pomocą programu AutoDock Vina (wersja 1.1.2.28).⁹⁵

Dokowanie molekularne zostało przeprowadzone przez dr. Michała Kolińskiego z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. Parametry zastosowane w trakcie procedury dokowania utrzymane zostały przy zalecanych wartościach domyślnych programu. Rozmiar siatki wykorzystanej do obliczeń został dobrany tak aby możliwe było utworzenie zarówno inkluzyjnych jak i ekskluzyjnych kompleksów KF/CD i wyniósł 32.55 Å x 32.55 Å x 32.55 Å. W wyniku dokowania molekularnego zostało

otrzymanych dwadzieścia różnych konformacyjnie kompleksów uszeregowanych zgodnie z miarą stabilności programu AutoDock Vina. Otrzymane struktury dodatkowo zoptymalizowałam przy pomocy metod PM6 oraz PM7. Najniższe energetycznie struktury jonów $[\alpha\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\beta\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$, $[\gamma\text{-CD} + \text{KF} - 2\text{H}]^{2-}$ otrzymałam przez zmianę położenia ładunków ujemnych. Teoretyczne przekroje czynne dla najniższych energetycznie struktur zostały obliczone za pomocą metody TJ zaimplementowanej do ogólnie dostępnego programu Mobcal.

V.3.4 Analiza strukturalna kaliksalenów oraz ich dimerycznych asocjatów za pomocą IM-MS

Struktury krystalograficzne kaliksalenów oraz ich dimerów otrzymane za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej posłużyły jako wyjściowe struktury do dalszej optymalizacji za pomocą PM7. Protonowane jony kaliksalenów oraz ich dimerycznych asocjatów otrzymałam w wyniku zmiany miejsc protonowania.

VI. Literatura

1. (a) Tuovinen, K.; Paakkanen, H.; Hänninen, O., Detection of pesticides from liquid matrices by ion mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *404* (1), 7-17; (b) Harvey, S. R.; MacPhee, C. E.; Barran, P. E., Ion mobility mass spectrometry for peptide analysis. *Methods* **2011**, *54* (4), 454-461; (c) Lee, D.-S.; Wu, C.; Hill Jr, H. H., Detection of carbohydrates by electrospray ionization-ion mobility spectrometry following microbore high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1998**, *822* (1), 1-9; (d) Dwivedi, P.; Bendiak, B.; Clowers, B. H.; Hill Jr, H. H., Rapid Resolution of Carbohydrate Isomers by Electrospray Ionization Ambient Pressure Ion Mobility Spectrometry-Time-of-Flight Mass Spectrometry (ESI-APIMS-TOFMS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (7), 1163-1175; (e) Trimpin, S.; Tan, B.; Bohrer, B. C.; O'Dell, D. K.; Merenbloom, S. I.; Pazos, M. X.; Clemmer, D. E.; Walker, J. M., Profiling of phospholipids and related lipid structures using multidimensional ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, *287* (1-3), 58-69.
2. (a) Bagal, D.; Valliere-Douglass, J. F.; Balland, A.; Schnier, P. D., Resolving Disulfide Structural Isoforms of IgG2 Monoclonal Antibodies by Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (16), 6751-6755; (b) Berkowitz, S. A.; Engen, J. R.; Mazzeo, J. R.; Jones, G. B., Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (7), 527-540; (c) Hilton, G. R.; Thalassinou, K.; Grabenauer, M.; Sanghera, N.; Slade, S. E.; Wyttenbach, T.; Robinson, P. J.; Pinheiro, T. J. T.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H., Structural Analysis of Prion Proteins by Means of Drift Cell and Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21* (5), 845-854; (d) Sitkiewicz, E.; Kłoniecki, M.; Poznański, J.; Bal, W.; Dadlez, M., Factors Influencing Compact-Extended Structure Equilibrium in Oligomers of A β 1-40 Peptide—An Ion Mobility Mass Spectrometry Study. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426* (15), 2871-2885; (e) Kłoniecki, M.; Jabłonowska, A.; Poznański, J.; Langridge, J.; Hughes, C.; Campuzano, I.; Giles, K.; Dadlez, M., Ion Mobility Separation Coupled with MS Detects Two Structural States of Alzheimer's Disease A β 1-40 Peptide Oligomers. *J. Mol. Biol.* **2011**, *407* (1), 110-124.
3. Chen, W.; Chakraborty, A., Applications of Ion Mobility Mass Spectrometry for Characterization of Protein Therapeutics. In *Characterization of Protein Therapeutics using Mass Spectrometry*, Chen, G., Ed. Springer US: 2013; pp 371-401.
4. Loo, J.; Berhane, B.; Kaddis, C.; Wooding, K.; Xie, Y.; Kaufman, S.; Chernushevich, I., Electrospray ionization mass spectrometry and ion mobility analysis of the 20S proteasome complex. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (7), 998-1008.
5. (a) Chattock, A. P., XLIV. On the velocity and mass of the ions in the electric wind in air. *Philosophical Magazine Series 5* **1899**, *48* (294), 401-420; (b) Röntgen, W. C., On a new kind of rays. *Nature* **1896**, *53*, 274-276; (c) Munson, R. J.; Tyndall, A. M., The Mobility of Positive Ions in Their Own Gas. *Proc. R. Soc. A* **1941**, *177* (969), 187-191.
6. Langevin, P., L'ionisation des gaz. *Ann. Chim. Phys.* **1903**, *28*, 289-384.
7. Lovelock, J. E., Chapter 1 The electron-capture detector — A personal odyssey. In *J. Chromatogr. Libr.*, Zlatkis, A.; Poole, C. F., Eds. Elsevier: 1981; Vol. Volume 20, pp 1-11.
8. McDaniel, E. W.; Martin, D. W.; Barnes, W. S., Drift Tube-Mass Spectrometer for Studies of Low-Energy Ion-Molecule Reactions. *Rev. Sci. Instrum.* **1962**, *33* (1), 2-7.
9. https://en.wikipedia.org/wiki/Ion-mobility_spectrometry.
10. Wyttenbach, T.; von Helden, G.; Batka, J.; Carlat, D.; Bowers, M., Effect of the long-range potential on ion mobility measurements. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8* (3), 275-282.
11. Mason, E. A.; Schamp Jr, H. W., Mobility of gaseous ions in weak electric fields. *Ann. Phys.* **1958**, *4* (3), 233-270.
12. Mahmoud, T.; Fereshteh, R., Comparing the effect of pressure and temperature on ion mobilities. *J. Phys. D: App. Phys.* **2005**, *38* (6), 857.
13. Larriba, C.; Hogan Jr, C. J., Free molecular collision cross section calculation methods for nanoparticles and complex ions with energy accommodation. *J. Comput. Phys.* **2013**, *251*, 344-363.

14. Steiner, W. E.; English, W. A.; Hill, H. H., Ion-Neutral Potential Models in Atmospheric Pressure Ion Mobility Time-of-Flight Mass Spectrometry IM(tof)MS. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (5), 1836-1844.
15. Shvartsburg, A. A.; Jarrold, M. F., An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *261* (1), 86-91.
16. Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F., Structural Information from Ion Mobility Measurements: Effects of the Long-Range Potential. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (40), 16082-16086.
17. (a) Cumeras, R.; Figueras, E.; Davis, C. E.; Baumbach, J. I.; Gracia, I., Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: current instrumentation. *Analyst* **2015**, *140* (5), 1376-1390; (b) Lanucara, F.; Holman, S. W.; Gray, C. J.; Evers, C. E., The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nat. Chem.* **2014**, *6* (4), 281-294.
18. <http://www.slideshare.net/WatersChemical/advanced-polymer-characterisation-using-hdms-presentation>.
19. (a) Merenbloom, S.; Flick, T.; Williams, E., How Hot are Your Ions in TWAVE Ion Mobility Spectrometry? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (3), 553-562; (b) Morsa, D.; Gabelica, V.; De Pauw, E., Effective Temperature of Ions in Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (14), 5775-5782.
20. (a) Siems, W. F.; Wu, C.; Tarver, E. E.; Hill, H. H., Jr.; Larsen, P. R.; McMinn, D. G., Measuring the Resolving Power of Ion Mobility Spectrometers. *Anal. Chem.* **1994**, *66* (23), 4195-4201; (b) Rokushika, S.; Hatano, H.; Baim, M. A.; Hill, H. H., Resolution measurement for ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (9), 1902-1907.
21. (a) Tabrizchi, M.; Rouholahnejad, F., Pressure effects on resolution in ion mobility spectrometry. *Talanta* **2006**, *69* (1), 87-90; (b) Shvartsburg, A. A.; Smith, R. D., Fundamentals of Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (24), 9689-9699; (c) Zhong, Y.; Hyung, S.-J.; Ruotolo, B. T., Characterizing the resolution and accuracy of a second-generation traveling-wave ion mobility separator for biomolecular ions. *Analyst* **2011**, *136* (17), 3534-3541.
22. (a) Fernández-Maestre, R.; Wu, C.; Hill, H. H., Using a Buffer Gas Modifier to Change Separation Selectivity in Ion Mobility Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2010**, *298* (1-3), 2-9; (b) Matz, L. M.; Hill Jr, H. H.; Beegle, L. W.; Kanik, I., Investigation of drift gas selectivity in high resolution ion mobility spectrometry with mass spectrometry detection. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13* (4), 300-307.
23. (a) Forsythe, J. G.; Petrov, A. S.; Walker, C. A.; Allen, S. J.; Pellissier, J. S.; Bush, M. F.; Hud, N. V.; Fernandez, F. M., Collision cross section calibrants for negative ion mode traveling wave ion mobility-mass spectrometry. *Analyst* **2015**; (b) Bush, M. F.; Campuzano, I. D. G.; Robinson, C. V., Ion Mobility Mass Spectrometry of Peptide Ions: Effects of Drift Gas and Calibration Strategies. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (16), 7124-7130.
24. Budimir, N.; Weston, D. J.; Creaser, C. S., Analysis of pharmaceutical formulations using atmospheric pressure ion mobility spectrometry combined with liquid chromatography and nano-electrospray ionisation. *Analyst* **2007**, *132* (1), 34-40.
25. (a) Cuyckens, F.; Wassvik, C.; Mortishire-Smith, R. J.; Tresadern, G.; Campuzano, I.; Claereboudt, J., Product ion mobility as a promising tool for assignment of positional isomers of drug metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (23), 3497-3503; (b) Porta, T.; Varesio, E.; Hopfgartner, G., Gas-Phase Separation of Drugs and Metabolites Using Modifier-Assisted Differential Ion Mobility Spectrometry Hyphenated to Liquid Extraction Surface Analysis and Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (24), 11771-11779; (c) Bylda, C.; Thiele, R.; Kobold, U.; Bujotzek, A.; Volmer, D. A., Rapid Quantification of Digitoxin and Its Metabolites Using Differential Ion Mobility Spectrometry-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (4), 2121-2128.
26. (a) Jafari, M. T.; Azimi, M., Analysis of Sevin, Amitraz, and Metalaxyl Pesticides Using Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Lett.* **2006**, *39* (9), 2061-2071; (b) Weickhardt, C.; Kaiser, N.; Borsdorf, H., Ion mobility spectrometry of laser desorbed pesticides from fruit surfaces. *Int. J. Ion Mobil. Spec.* **2012**, *15* (2), 55-62.

27. (a) Wu, C.; Siems, W. F.; Klasmeier, J.; Hill, H. H., Separation of Isomeric Peptides Using Electrospray Ionization/High-Resolution Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (2), 391-395; (b) Valentine, S. J.; Kulchania, M.; Barnes, C. A. S.; Clemmer, D. E., Multidimensional separations of complex peptide mixtures: a combined high-performance liquid chromatography/ion mobility/time-of-flight mass spectrometry approach. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *212* (1-3), 97-109; (c) Santos, L. F. A.; Iglesias, A. H.; Pilau, E. J.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C., Traveling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry Analysis of Isomeric Modified Peptides Arising from Chemical Cross-Linking. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21* (12), 2062-2069.
28. (a) Li, H.; Giles, K.; Bendiak, B.; Kaplan, K.; Siems, W. F.; Hill, H. H., Resolving Structural Isomers of Monosaccharide Methyl Glycosides Using Drift Tube and Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (7), 3231-3239; (b) Li, H.; Bendiak, B.; Siems, W. F.; Gang, D. R.; Hill, H. H., Carbohydrate Structure Characterization by Tandem Ion Mobility Mass Spectrometry (IMMS)2. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (5), 2760-2769; (c) Pagel, K.; Harvey, D. J., Ion Mobility-Mass Spectrometry of Complex Carbohydrates: Collision Cross Sections of Sodiated N-linked Glycans. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (10), 5138-5145.
29. (a) Kliman, M.; May, J. C.; McLean, J. A., Lipid analysis and lipidomics by structurally selective ion mobility-mass spectrometry. *BBA - Mol. Cell Biol. L.* **2011**, *1811* (11), 935-945; (b) Shvartsburg, A. A.; Isaac, G.; Leveque, N.; Smith, R. D.; Metz, T. O., Separation and Classification of Lipids Using Differential Ion Mobility Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22* (7), 1146-1155; (c) Jackson, S. N.; Barbacci, D.; Egan, T.; Lewis, E. K.; Schultz, J. A.; Woods, A. S., MALDI-ion mobility mass spectrometry of lipids in negative ion mode. *Anal. Met.* **2014**, *6* (14), 5001-5007.
30. (a) Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T., Collision Cross Sections of Proteins and Their Complexes: A Calibration Framework and Database for Gas-Phase Structural Biology. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (22), 9557-9565; (b) Jenner, M.; Ellis, J.; Huang, W.-C.; Lloyd Raven, E.; Roberts, G. C. K.; Oldham, N. J., Detection of a Protein Conformational Equilibrium by Electrospray Ionisation-Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (36), 8291-8294; (c) Vahidi, S.; Stocks, B. B.; Konermann, L., Partially Disordered Proteins Studied by Ion Mobility-Mass Spectrometry: Implications for the Preservation of Solution Phase Structure in the Gas Phase. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (21), 10471-10478.
31. Laphorn, C.; Pullen, F.; Chowdhry, B. Z., Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: Separating and assigning structures to ions. *Mass Spectrom. Rev.* **2013**, *32* (1), 43-71.
32. Tabrizchi, M., Temperature effects on resolution in ion mobility spectrometry. *Talanta* **2004**, *62* (1), 65-70.
33. Borsdorf, H.; Mayer, T., Temperature dependence of ion mobility signals of halogenated compounds. *Talanta* **2012**, *101*, 17-23.
34. Davis, E. J.; Grows, K. F.; Siems, W. F.; Hill, H. H., Improved Ion Mobility Resolving Power with Increased Buffer Gas Pressure. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (11), 4858-4865.
35. Asbury, G. R.; Hill, H. H., Using Different Drift Gases To Change Separation Factors (α) in Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (3), 580-584.
36. Lalli, P. M.; Corilo, Y. E.; Fasciotti, M.; Riccio, M. F.; de Sa, G. F.; Daroda, R. J.; Souza, G. H. M. F.; McCullagh, M.; Bartberger, M. D.; Eberlin, M. N.; Campuzano, I. D. G., Baseline resolution of isomers by traveling wave ion mobility mass spectrometry: investigating the effects of polarizable drift gases and ionic charge distribution. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48* (9), 989-997.
37. Ahonen, L.; Fasciotti, M.; Gennäs, G. B. a.; Kotiaho, T.; Daroda, R. J.; Eberlin, M.; Kostianen, R., Separation of steroid isomers by ion mobility mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1310*, 133-137.
38. Huang, Y.; Dodds, E. D., Ion Mobility Studies of Carbohydrates as Group I Adducts: Isomer Specific Collisional Cross Section Dependence on Metal Ion Radius. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (20), 9728-9735.

39. Domalain, V.; Tognetti, V.; Hubert-Roux, M.; Lange, C.; Joubert, L.; Baudoux, J.; Rouden, J.; Afonso, C., Role of Cationization and Multimers Formation for Diastereomers Differentiation by Ion Mobility-Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, *24* (9), 1437-1445.
40. Flick, T. G.; Campuzano, I. D. G.; Bartberger, M. D., Structural Resolution of 4-Substituted Proline Diastereomers with Ion Mobility Spectrometry via Alkali Metal Ion Cationization. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (6), 3300-3307.
41. Mie, A.; Jörntén-Karlsson, M.; Axelsson, B.-O.; Ray, A.; Reimann, C. T., Enantiomer Separation of Amino Acids by Complexation with Chiral Reference Compounds and High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry: Preliminary Results and Possible Limitations. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (7), 2850-2858.
42. Mie, A.; Ray, A.; Axelsson, B.-O.; Jörntén-Karlsson, M.; Reimann, C. T., Terbutaline Enantiomer Separation and Quantification by Complexation and Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (11), 4133-4140.
43. Domalain, V.; Hubert-Roux, M.; Tognetti, V.; Joubert, L.; Lange, C. M.; Rouden, J.; Afonso, C., Enantiomeric differentiation of aromatic amino acids using traveling wave ion mobility-mass spectrometry. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (8), 3234-3239.
44. Troć, A.; Zimnicka, M.; Danikiewicz, W., Separation of catechin epimers by complexation using ion mobility mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2015**, *50* (3), 542-548.
45. Baker, E. S.; Bushnell, J. E.; Wecksler, S. R.; Lim, M. D.; Manard, M. J.; Dupuis, N. F.; Ford, P. C.; Bowers, M. T., Probing Shapes of Bichromophoric Metal-Organic Complexes Using Ion Mobility Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (51), 18222-18228.
46. Campuzano, I.; Bush, M. F.; Robinson, C. V.; Beaumont, C.; Richardson, K.; Kim, H.; Kim, H. I., Structural Characterization of Drug-like Compounds by Ion Mobility Mass Spectrometry: Comparison of Theoretical and Experimentally Derived Nitrogen Collision Cross Sections. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (2), 1026-1033.
47. Forsythe, J. G.; Stow, S. M.; Nefzger, H.; Kwiecien, N. W.; May, J. C.; McLean, J. A.; Hercules, D. M., Structural Characterization of Methylenedianiline Regioisomers by Ion Mobility-Mass Spectrometry, Tandem Mass Spectrometry, and Computational Strategies: I. Electrospray Spectra of 2-Ring Isomers. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (9), 4362-4370.
48. Morsa, D.; Defize, T.; Dehareng, D.; Jérôme, C.; De Pauw, E., Polymer Topology Revealed by Ion Mobility Coupled with Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (19), 9693-9700.
49. Kralj, B.; Šmidovnik, A.; Kobe, J., Mass spectrometric investigations of α - and β -cyclodextrin complexes with ortho-, meta- and para-coumaric acids by negative mode electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23* (1), 171-180.
50. Duijn, E. v.; Barendregt, A.; Synowsky, S.; Versluis, C.; Heck, A. J. R., Chaperonin Complexes Monitored by Ion Mobility Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (4), 1452-1459.
51. Ko, J. Y.; Heo, S. W.; Lee, J. H.; Oh, H. B.; Kim, H.; Kim, H. I., Host-Guest Chemistry in the Gas Phase: Complex Formation with 18-Crown-6 Enhances Helicity of Alanine-Based Peptides. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (49), 14215-14220.
52. Zimnicka, M.; Troć, A.; Ceborska, M.; Jakubczak, M.; Koliński, M.; Danikiewicz, W., Structural Elucidation of Specific Noncovalent Association of Folic Acid with Native Cyclodextrins Using an Ion Mobility Mass Spectrometry and Theoretical Approach. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (9), 4249-4255.
53. (a) Ding, F.; Peng, W., Biological activity of natural flavonoids as impacted by protein flexibility: an example of flavanones. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11* (4), 1119-1133; (b) Tripoli, E.; Guardia, M. L.; Giammanco, S.; Majo, D. D.; Giammanco, M., Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* **2007**, *104* (2), 466-479.
54. (a) Cao, J.; Yin, C.; Qin, Y.; Cheng, Z.; Chen, D., Approach to the study of flavone di-C-glycosides by high performance liquid chromatography-tandem ion trap mass spectrometry and its application to characterization of flavonoid composition in *Viola yedoensis*. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49* (10), 1010-1024; (b) Avula, B.; Wang, Y.-H.; Smillie, T. J.; Mabusela, W.; Vincent, L.; Weitz, F.; Khan, I. A., Quantitative Determination of Flavonoids by Column High-Performance Liquid Chromatography

with Mass Spectrometry and Ultraviolet Absorption Detection in *Artemisia afra* and Comparative Studies with Various Species of *Artemisia* Plants. *J. AOAC Int.* **2009**, *92* (2), 633-644.

55. Füzfai, Z.; Molnár-Perl, I., Gas chromatographic–mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: Analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1149* (1), 88-101.

56. (a) Waiss, A. C.; Lundin, R. E.; Stern, D. J., NMR study of trimethylsilyl ethers of flavonoid compounds. *Tetrahedron Lett.* **1964**, *5* (10), 513-518; (b) Daykin, C. A.; Duynhoven, J. P. M. V.; Groenewegen, A.; Dachtler, M.; Amelsvoort, J. M. M. V.; Mulder, T. P. J., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Based Studies of the Metabolism of Black Tea Polyphenols in Humans. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (5), 1428-1434.

57. Zsila, F.; Bikádi, Z.; Simonyi, M., Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65* (3), 447-456.

58. Cai, R.; Wang, S.; Meng, Y.; Meng, Q.; Zhao, W., Rapid quantification of flavonoids in propolis and previous study for classification of propolis from different origins by using near infrared spectroscopy. *Anal. Met.* **2012**, *4* (8), 2388-2395.

59. (a) Pfaendler, H. R.; Gosteli, J.; Woodward, R. B.; Rihs, G., Structure, reactivity, and biological activity of strained bicyclic .beta.-lactams. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (15), 4526-4531; (b) Garrod, L. P., The Relative Antibacterial Activity of Four Penicillins. *B.M. J.* **1960**, *2* (5214), 1695-1696; (c) Morin, R. B.; Jackson, B. G.; Mueller, R. A.; Lavagnino, E. R.; Scanlon, W. B.; Andrews, S. L., Chemistry of cephalosporin antibiotics. XV. Transformations of penicillin sulfoxide. Synthesis of cephalosporin compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (6), 1401-1407; (d) Birnbaum, J.; Kahan, F. M.; Kropp, H.; Macdonald, J. S., Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am. J. Med.* **1985**, *78*, 3-21.

60. Alcaide, B., Beta-lactams as versatile synthetic intermediates for the preparation of heterocycles of biological interest. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *14*, 1921-1949.

61. Tattevin, P.; Tribut, O.; Arvieux, C.; Dupont, M.; Flicoteaux, R.; Desbordes, L.; Le Tulzo, Y.; Michelet, C., Use of high-performance liquid chromatography (HPLC) to monitor β -lactam plasma concentrations during the treatment of endocarditis. *Clin. Microbiol. Inf.* **2005**, *11* (1), 76-79.

62. Verdier, M.-C.; Tribut, O.; Tattevin, P.; Le Tulzo, Y.; Michelet, C.; Bentué-Ferrer, D., Simultaneous Determination of 12 β -Lactam Antibiotics in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (10), 4873-4879.

63. Takeba, K.; Fujinuma, K.; Miyazaki, T.; Nakazawa, H., Simultaneous determination of β -lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1998**, *812* (1-2), 205-211.

64. Asnani, G.; Jadhav, K.; Dhamecha, D.; Sankh, A.; Patil, M., Development and validation of spectrophotometric method of cefpodoxime proxetil using hydrotropic solubilizing agents. *Pharm. Methods* **2012**, *3* (2), 117-120.

65. Lawung, R.; Danielsson, B.; Prachayasittikul, V.; Bülow, L., Calorimetric Analysis of Cephalosporins Using an Immobilized TEM-1 β -Lactamase on Ni²⁺ Chelating Sepharose Fast Flow. *Anal. Biochem.* **2001**, *296* (1), 57-62.

66. Frelek, J.; Kowalska, P.; Masnyk, M.; Kazimierski, A.; Korda, A.; Woźnica, M.; Chmielewski, M.; Furche, F., Circular Dichroism and Conformational Dynamics of Cephams and Their Carba and Oxa Analogues. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (23), 6732-6744.

67. (a) Mobashery, S.; Lerner, S. A.; Johnston, M., Monitoring beta-lactamase activity in vivo by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32* (8), 1196-1203; (b) Milagre, C. n. D. F.; Cabeãsa, L. s. F.; Almeida, W. P.; Marsaioli, A. J., β -lactam antibiotics epitope mapping with STD NMR spectroscopy: a study of drug-human serum albumin interaction. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 403-408.

68. Giles, K.; Williams, J. P.; Campuzano, I., Enhancements in travelling wave ion mobility resolution. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (11), 1559-1566.

69. Belcastro, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M., Interaction of cysteine with Cu²⁺ and group IIb (Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺) metal cations: a theoretical study. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40* (3), 300-306.
70. (a) Tao, W. A.; Zhang, D.; Wang, F.; Thomas, P. D.; Cooks, R. G., Kinetic Resolution of d,l-Amino Acids Based on Gas-Phase Dissociation of Copper(II) Complexes. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (19), 4427-4429; (b) Tao, W. A.; Zhang, D.; Nikolaev, E. N.; Cooks, R. G., Copper(II)-Assisted Enantiomeric Analysis of d,l-Amino Acids Using the Kinetic Method: Chiral Recognition and Quantification in the Gas Phase. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (43), 10598-10609.
71. (a) Schäfer, M., Supramolecular Crown Ether Adducts in the Gas Phase: From Molecular Recognition of Amines to the Covalent Coupling of Host/Guest Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (17), 1896-1899; (b) Rimmel, G.; Bäuerle, P., Molecular recognition properties of crown ether-functionalized oligothiophenes. *Synt. Met.* **1999**, *102* (1-3), 1323-1324; (c) Liu, Y.; You, C.-C., Molecular Recognition Studies on Modified Cyclodextrins. *Chin. J. Chem.* **2001**, *19* (6), 533-544; (d) Szente, L.; Szemán, J., Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host-Guest Type Molecular Recognition. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (17), 8024-8030.
72. Kriz, Z.; Koca, J.; Imberty, A.; Charlot, A.; Auzely-Velty, R., Investigation of the complexation of (+)-catechin by [small beta]-cyclodextrin by a combination of NMR, microcalorimetry and molecular modeling techniques. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (14), 2590-2595.
73. (a) Bentz, E.; Pomilio, A.; Lobayan, R., Exploratory conformational study of (+)-catechin. Modeling of the polarizability and electric dipole moment. *J. Mol. Model.* **2014**, *20* (12), 1-10; (b) Bentz, E.; Pomilio, A.; Lobayan, R., Structure and electronic properties of (+)-catechin: aqueous solvent effects. *J. Mol. Model.* **2014**, *20* (2), 1-13; (c) Hemingway, R. W.; Tobiasson, F. L.; Wayne McGraw, G.; Steynberg, J. P., Conformation and Complexation of Tannins: NMR Spectra and Molecular Search Modeling of Flavan-3-ols. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34* (6), 424-433.
74. (a) Zakharova, N.; Crawford, C.; Hauck, B.; Quinton, J.; Seims, W.; Hill, H., Jr.; Clark, A., An Assessment of Computational Methods for Obtaining Structural Information of Moderately Flexible Biomolecules from Ion Mobility Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (5), 792-805; (b) Brocker, E. R.; Anderson, S. E.; Northrop, B. H.; Stang, P. J.; Bowers, M. T., Structures of Metallosupramolecular Coordination Assemblies Can Be Obtained by Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (38), 13486-13494.
75. D'Atri, V.; Porrini, M.; Rosu, F.; Gabelica, V., Linking molecular models with ion mobility experiments. Illustration with a rigid nucleic acid structure. *J. Mass Spectrom.* **2015**, *50* (5), 711-726.
76. (a) Zhang, J.; Du, F.; Peng, B.; Lu, R.; Gao, H.; Zhou, Z., Structure, electronic properties, and radical scavenging mechanisms of daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A: A density functional study. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2010**, *955* (1-3), 1-6; (b) Amat, A.; Sgamellotti, A.; Fantacci, S., Theoretical Study of the Structural and Electronic Properties of Luteolin and Apigenin Dyes. In *Computational Science and Its Applications – ICCSA 2008*, Gervasi, O.; Murgante, B.; Laganà, A.; Taniar, D.; Mun, Y.; Gavrilova, M., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2008; Vol. 5072, pp 1141-1155.
77. (a) Furman, M. C. n. A. M. M. n. A. S. S. n. A. O. S.-K. n. A. M. J. n. A. B., An Entry to the Carbapenem Antibiotic Scaffold via the Asymmetric Kinugasa Reaction. *Synthesis* **2012**; (b) Woźnica, M.; Masnyk, M.; Stecko, S.; Mames, A.; Furman, B.; Chmielewski, M.; Frelek, J., Structure-Chiroptical Properties Relationship of Carbapenams by Experiment and Theory. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (21), 7219-7226.
78. Banerjee, S.; Mazumdar, S., Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *2012*, 40.
79. Li, J.; Taraszka, J. A.; Counterman, A. E.; Clemmer, D. E., Influence of solvent composition and capillary temperature on the conformations of electrosprayed ions: unfolding of compact ubiquitin conformers from pseudonative and denatured solutions. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *185-187*, 37-47.
80. (a) Peifeng, H.; Sorensen, C.; Gross, M. L., Influences of peptide side chains on the metal ion binding site in metal ion-cationized peptides: Participation of aromatic rings in metal chelation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6* (11), 1079-1085; (b) Ryzhov, V.; Dunbar, R. C.; Cerda, B.; Wesdemiotis,

- C., Cation- π effects in the complexation of Na⁺ and K⁺ with Phe, Tyr, and Trp in the gas phase. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11* (12), 1037-1046; (c) Amicangelo, J. C.; Armentrout, P. B., Absolute Binding Energies of Alkali-Metal Cation Complexes with Benzene Determined by Threshold Collision-Induced Dissociation Experiments and ab Initio Theory. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (48), 11420-11432; (d) Ma, J. C.; Dougherty, D. A., The Cation- π Interaction. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1303-1324.
81. Kidder, G. W., The Biological Activity of Folic Acid and Certain Substituted Pteridines for Tetrahymena. In *Ciba Foundation Symposium - Chemistry and Biology of Pteridines*, John Wiley & Sons, Ltd.: 2008; pp 304-313.
82. Chen, C.; Ke, J.; Zhou, X. E.; Yi, W.; Brunzelle, J. S.; Li, J.; Yong, E.-L.; Xu, H. E.; Melcher, K., Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature* **2013**, *500* (7463), 486-489.
83. Ceborska, M.; Zimnicka, M.; Pietrzak, M.; Troc, A.; Kozbial, M.; Lipkowski, J., Structural diversity in native cyclodextrins/folic acid complexes - from [2]-rotaxane to exclusion compound. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (27), 5186-5188.
84. (a) Li, Z.; Jablonski, C., Synthesis, Characterization, and Structure of Macrocyclic Mono- and C₂-Symmetric, Binuclear Nickel Calixsalen Complexes. *Inorg. Chem.* **2000**, *39* (12), 2456-2461; (b) Tanaka, K.; Shimoura, R.; Caira, M. R., Synthesis, crystal structures and photochromic properties of novel chiral Schiff base macrocycles. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (2), 449-452.
85. (a) Chu, Z.; Huang, W.; Wang, L.; Gou, S., Chiral 27-membered [3 + 3] Schiff-base macrocycles and their reactivity with first-row transition metal ions. *Polyhedron* **2008**, *27* (3), 1079-1092; (b) M.; Petryk, A. J., L. J. Barbour, M. Kwit, unpublished results.
86. Petryk, M.; Troć, A.; Gierczyk, B.; Danikiewicz, W.; Kwit, M., Dynamic Formation of Noncovalent Calixsalen Aggregates. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (29), 10318-10321.
87. Valentine, S.; Counterman, A.; Clemmer, D., A database of 660 peptide ion cross sections: Use of intrinsic size parameters for bona fide predictions of cross sections. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10* (11), 1188-1211.
88. Alecu, I. M.; Zheng, J.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G., Computational Thermochemistry: Scale Factor Databases and Scale Factors for Vibrational Frequencies Obtained from Electronic Model Chemistries. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (9), 2872-2887.
89. GaussView, V., Roy Dennington, Todd Keith and John Millam, Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2009.
90. 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.
91. Schuttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F., PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. Section D* **2004**, *60* (8), 1355-1363.
92. Braun, A. R.; Sachs, J. N.; Nagle, J. F., Comparing Simulations of Lipid Bilayers to Scattering Data: The GROMOS 43A1-S3 Force Field. *J. Phy. Chem. B* **2013**, *117* (17), 5065-5072.
93. Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K., Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. comput. chem.* **2005**, *26* (16), 1781-1802.
94. Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D., GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model.* **2001**, *7* (8), 306-317.

95. Trott, O.; Olson, A. J., AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455-461.

Badanie struktury wybranych grup związków organicznych i ich kompleksów z wykorzystaniem techniki pomiaru mobilności jonów sprzężonej ze spektrometrią mas

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej Anny Troć

Celem mojej pracy było pogłębienie wiedzy w zakresie wykorzystania spektrometrii ruchliwości jonów (IM-MS) do rozdziału oraz analizy strukturalnej wybranych grup związków organicznych takich jak flawonoidy oraz związki β -laktamowe. Związki te zostały wybrane jako związki modelowe ze względu na występującą w nich stereoizomerię oraz izomerię konstytucyjną. Spektrometria ruchliwości jonów była również wykorzystana do określenia trójwymiarowych struktur niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z cyklodekstrynami (α -CD, β -CD i γ -CD), jak również do analizy strukturalnej kaliksalenów i ich dimerycznych asocjatów.

Rozdział izomerycznych katechin został osiągnięty w wyniku ich kompleksowania z wybranymi *D*- i *L*-aminokwasami oraz jonami miedzi (II), tworząc kompleksy typu $[2M + D\text{-lub } L\text{-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^+$. Spośród różnych badanych *D*- i *L*-aminokwasów tylko aminokwasy hydrofobowe, takie jak *D*-alanina, *D*-leucyna oraz *D*-prolina powodowały poprawę rozdziału epimerycznych katechin. Wartość rozdzielczości (R_{p-p}) była większa bądź równa 0,60. W przypadku enancjomerycznych katechin kompleksowanie z Cu^{2+} oraz z *D*-leucyną ($R_{p-p} = 0,44$) i *L*-proliną ($R_{p-p} = 0,40$) przyczyniło się do ich rozdziału.

Spektrometria ruchliwości jonów została również wykorzystana do badania izomerów konstytucyjnych flawonoidów takich jak apigenina, bajkaleina, chryzyna, dajdzeina, kemferol oraz luteolina. Rozdział pomiędzy poszczególnymi izomerami był obserwowany dla jonów $[\text{M}+\text{Na}]^+$ chryzyny oraz dajdzeiny ($R_{p-p} = 0,74$), jak również apigeniny oraz bajkaleiny ($R_{p-p} = 0,47$). Poprawę efektywności rozdziału jonów $[\text{M}+\text{Na}]^+$ chryzyny i dajdzeiny oraz apigeniny i bajkaleiny osiągnięto dla dwutlenku węgla jako gazu buforowego. Wartości R_{p-p} wyniosły odpowiednio 1,23 i 0,98. Znaczący wzrost rozdzielczości dla wszystkich izomerycznych związków flawonoidowych zaobserwowano w wyniku ich kompleksowania z kationami potasu, K^+ . Najlepszą rozdzielczość zaobserwowano dla jonów $[\text{M}+\text{K}]^+$ chryzyny i dajdzeiny ($R_{p-p} = 3,22$).

Spektrometria ruchliwości jonów w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi została wykorzystana do rozdziału i strukturalnego opisu diastereoizomerycznych związków β -laktamowych. Najlepszy rozdział osiągnięto dla jonów $[\text{M}+\text{Na}]^+$ oraz $[\text{M}+\text{Li}]^+$. Inne czynniki takie jak prędkość fali (WV), jej amplituda (WH), temperatura źródła, temperatura

desolwatacji oraz zmiana gazu buforowego miały niewielki lub nie miały w ogóle wpływu na efektywność rozdziału. Teoretyczne przekroje czynne obliczone dla najniższych energetycznie struktur związków β -laktamowych wykazywały dobrą zgodność z wartościami eksperymentalnymi.

Połączenie IM-MS oraz obliczeń teoretycznych zostało wykorzystane do opisu niekowalencyjnych kompleksów kwasu foliowego z α -CD, β -CD i γ -CD. W zależności od rozmiaru wnęki cyklodekstryny zaproponowano dwa różne typy kompleksów. Kwas foliowy tworzył z α -CD kompleks ekсклюzyjny, podczas gdy kompleks inkluzyjny charakterystyczny był dla asocjatów kwasu foliowego z β -CD i γ -CD.

Spektrometria ruchliwości jonów razem z obliczeniami teoretycznymi została również wykorzystana do analizy strukturalnej kaliksalenów i ich dimerycznych asocjatów. W zależności od występujących oddziaływań między monomerami kaliksalenów, mogą tworzyć się dimeryczne asocjaty typu „gość-gospodarz” lub mogą one występować w postaci kapsuły. Wyniki otrzymane w trakcie badań były w dobrej zgodności z danymi otrzymanymi na podstawie rentgenowskiej analizy strukturalnej.

The structural studies of the selected organic compounds with the use of ion mobility technique coupled to mass spectrometry

A Synopsis of the Ph.D. Thesis by Anna Troć

The aim of this Ph.D. dissertation is to explore the application of the ion mobility technique coupled to mass spectrometry (IM-MS) to the separation and structural studies of the selected groups of organic compounds. The flavonoids (catechins as stereoisomers and constitutional isomers of flavonoids) and β -lactams were chosen as model compounds due to their rich stereo- and regiochemistry. Additionally, the IM-MS was used to study the three-dimensional structures of noncovalent complexes of folic acid with α -, β - and γ -cyclodextrins and noncovalent aggregates of calixalenes.

The catechin isomers were successfully separated by complexation with selected *D*- and *L*-amino acids and copper ions. The clusters having the form of $[2M + D\text{-amino acid} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ (*M* stands for (-)-epicatechin or (+)-catechin) showed improvement in stereodifferentiation between two epimeric catechins. Among various examined *D*- and *L*-amino acids only *D*-alanine, *D*-leucine and *D*-proline led to the improvement of the separation of epimeric catechins. The peak-to-peak resolution (R_{p-p}) was greater or equal to 0.60. The catechin enantiomers were separated as complexes with copper ions and *D*-leucine ($R_{p-p} = 0.44$) and *L*-proline ($R_{p-p} = 0.40$).

The IM-MS was also used to study the constitutional isomers of flavonoids, such as apigenin, baicalein, chrysin, daidzein, kaempferol, and luteolin. The separation was observed for $[M+\text{Na}]^+$ ions of chrysin and daidzein ($R_{p-p} = 0.74$) and apigenin and baicalein ($R_{p-p} = 0.47$) using N_2 as ion mobility drift gas. The improvement of separation efficiency of chrysin and daidzein as well as apigenin and baicalein was obtained by using carbon dioxide as a drift gas. In this case the peak-to-peak resolutions were 1.23 and 0.98, respectively. The application of potassium cation induced significant increase of the peak-to-peak resolution (R_{p-p}) values for all examined flavonoids. The best R_{p-p} was determined to be 3.22 for $[M+\text{K}]^+$ clusters of the mixture of chrysin and daidzein.

The ion mobility spectrometry and theoretical calculations were used to separate and structural description of diastereoisomeric β -lactams. The best separation of isomers of β -lactams was observed for $[M+\text{Na}]^+$ and $[M+\text{Li}]^+$ ions. Other factors such as travelling wave height (WH), wave velocity (WV), source and desolvation temperatures, the use of drift gases with varying masses and polarizabilities had little or no impact on separation efficacy. The

theoretical cross section values obtained from extensive molecular dynamics (MD) and DFT calculations for obtained structures were in good agreement with those established experimentally. The interactions of metal ions with the aromatic rings of benzyloxy groups played a crucial role in differentiation of β -lactams.

The combination of ion mobility mass spectrometry studies and theoretical calculations was applied to detailed structural description of noncovalent complexes of folic acid (FA) and native cyclodextrins (α -CD, β -CD and γ -CD). Two different types of complexes were suggested, depending on the size of the cavity of cyclodextrin. The structure of FA/ α -CD represented the exclusion complex. The inclusion complex was characteristic for the noncovalent associates folic acid with β -CD and γ -CD.

In the last part of this Ph.D thesis, the use of IM-MS in combination with theoretical calculations for studying structural behaviour of calixsalens and their dimeric associates has been described. Depending on the modes of interaction, dimers of calixalenes can be formed as capsule or “host-guest” complexes. The results were in good agreement with data obtained by X-ray structural analysis.



B. Org. 381/16

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.381/16



90000000192906