

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

ANTONS PODJAVA

**CVITERJONU TIPA JONU ŠĶIDRUMU ĶĪMISKĀS
ĪPAŠĪBAS GĀZES FĀZĒ UN PIELIETOJUMI
ELEKTROIZSMIDZINĀŠANAS JONIZĀCIJAS
MASSPEKTROMETRIJĀ**

PROMOCIJAS DARBS

Darba vadītājs: Dr. Ķīm.,
asoc. prof. Pēteris Mekšs

RĪGA, 2015

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātē Ķīmijas fakultātē laika posmā no 2011. gada līdz 2015. gadam. Darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē” Nr.2009/0138/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/004 finansiālu atbalstu.



Darba zinātniskais vadītājs: Dr. ķīm., asoc. prof. Pēteris Mekšs

Darba recenzenti:

- 1) *Dr. ķīm., prof., Andris Actiņš, Latvijas Universitāte;*
- 2) *Dr. ķīm., Osvalds Pugovičs, Latvijas Organiskās Sintēzes Institūts;*
- 3) *Dr. ķīm., asoc. prof., Vadims Bartkevičs, BIOR.*

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2015. gada 22. oktobrī Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē plkst. 16.00 Latvijas Universitātes Dabaszinātņu akadēmiskajā centrā, Jelgavas ielā 1.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Jelgavas ielā 1.

SATURA RĀDĪTĀJS

SATURA RĀDĪTĀJS.....	3
APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS.....	8
1. LITERATŪRAS APSKATS	13
1.1. Elektroizsmidzināšanas jonizācijas pamatprincipi	13
1.2. Analīta uzlādēšanās EIJ procesā	14
1.2.1. Parauga jonizācija lādiņu atdalīšanas procesā	15
1.2.2. Aduktu veidošanās	16
1.2.3. Jonizācija gāzes fāzē	16
1.2.4. Oksidēšanās – reducēšanās procesi EIJ gaitā.....	17
1.2.5. Analīta virsmas aktivitātes ietekme uz signāla intensitāti	18
1.2.6. Analīta pK _a un šķīduma pH ietekme uz jonizācijas efektivitāti EIJ gaitā	18
1.2.7. Šķīdinātāja izvēle EIJ apstākļos.....	19
1.3. Tandēmmasspektrometrija.....	20
1.3.1. Sadursmju inducētā disociācija.....	21
1.4. Imidazolija atvasinājumu gāzes fāzes ķīmijas pētījumi SID apstākļos	23
1.4.1. Imidazoliņu saturošo spirtu fragmentācija.....	23
1.4.2. Imidazoliņu saturošo karbonskābju fragmentācija	24
1.4.3. Imidazoliņu saturošo esteru fragmentācija	25
1.4.4. Imidazoliņu saturošo sulfīdu, sulfoksīdu un sulfonu fragmentācija	26
1.4.5. Sulfonskābes grupu saturošo jonu šķīdumu fragmentācija	29
1.5. Elektroizsmidzināšanas jonizācijas izmantošana nekovalento struktūru pētīšanai šķīdumos un gāzes fāzē.....	31
1.5.1. Nekovalento struktūru stabilitāte EIJ apstākļos.....	31
1.5.2. EIJ instrumentālo parametru ietekme uz nekovalento struktūru stabilitāti.....	33
1.5.3. Kompleksu asociācijas konstanšu noteikšana ar EIJ	34
1.6. Nekovalento struktūru loma analītisko EIJ – MS metožu selektivitātes uzlabošanā....	37
1.6.1. Alkilamīnu kompleksu izmantošana EIJ – MS.....	39
1.6.2. Acetāta kompleksu izmantošana EIJ – MS.....	39
1.6.3. Organisko polikatjonu izmantošana EIJ – MS.....	40
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA.....	44
2.1. Reāģenti	44
2.1.1. Analizētie cviterjonu tipa jonu šķīdumi.....	45
2.2. Izmantotā aparatūra.....	46

2.3. Darba gaita	47
2.3.1. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu sintēze un attīrīšana	47
2.3.2. Deiterēto cviterjonu tipa jonu šķidrumu sintēze	50
2.4. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu tandēmmasspektrometrija	50
2.4.1. Optimālā sprieguma vērtību piemeklēšana	50
2.4.2. Sadursmju inducētās disociācijas eksperimenti	51
2.4.3. Savienojuma “a” deprotonēto formu gāzes fāzes bāziskuma kvantu ķīmiskie aprēķini	52
2.5. Kompleksu veidošanās starp cviterjonu tipa jonu šķidrumiem un dažādiem amīniem EIJ apstākļos	53
2.5.1. Cviterjona funkcionālās grupas un amīna struktūras ietekme uz kompleksu veidošanos	53
2.5.2. Cviterjona koncentrācijas ietekme uz kompleksa absolūto intensitāti	54
2.5.3. Šķīdinātāja ietekme uz kompleksa absolūto intensitāti	54
2.5.4. Kapilāra, konusa un ekstraktora sprieguma piemeklēšana	54
2.5.5. Kompleksu stabilitātes pētījumi šķīdumā un gāzes fāzē	54
2.5.6. Kompleksu kvantu ķīmiskie aprēķini	56
2.6. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu izmantošana DNS metilēšanas līmeņa noteikšanai	56
2.6.1. Cviterjonu tipa savienojuma izvēle	56
2.6.2. Metodes validācija	57
2.6.3. DNS parauga hidrolīze	58
2.6.4. 5-Metilcitozīna PIA – EIJ – MS analīze	58
2.6.5. DNS metilēšanas līmeņa aprēķināšana	59
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	61
3.1. Sulfonāta grupu saturošo cviterjonu tipa jonu šķidrumu sintēze	61
3.2. Karboksilāta grupu saturošo cviterjonu tipa jonu šķidrumu sintēze	62
3.3. Iezīmēto sulfonāta grupu saturošo cviterjonu tipa jonu šķidrumu sintēze	63
3.4. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu gāzes fāzes pētījumi sadursmju inducētās disociācijas apstākļos	64
3.4.1. Sulfonāta grupu saturošo CJŠ protonēto molekulu fragmentācija	64
3.4.2. Sulfonāta grupu saturošo CJŠ deprotonēto molekulu fragmentācija	71
3.4.3. Karboksilāta grupu saturošo CJŠ ķīmiskās īpašības elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā	78
3.5. Kompleksu veidošanās starp cviterjonu tipa jonu savienojumiem un dažādiem amīniem elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā	83
3.5.1. Šķīdinātāja tīrības ietekme uz kompleksu veidošanos	83
3.5.2. Cviterjona funkcionālās grupas ietekme uz kompleksu veidošanos	84
3.5.3. Amīna struktūras ietekme uz kompleksu veidošanos	85

3.5.4. Šķīdinātāja ietekme	87
3.5.5. Konusa, ekstraktora un kapilāra sprieguma piemeklēšana	88
3.5.6. 5-Metilcitozīna kompleksu ar cviterjonu tipa jonu šķīdriem asociācijas konstanšu noteikšana	90
3.5.7. 5-Metilcitozīna kompleksu ar cviterjonu tipa jonu šķīdriem stabilitāte gāzes fāzē.....	95
3.5.8. 5-Metilcitozīna kompleksa ar MeImPS kvantu ķīmiskie aprēķini	99
3.6. Cviterjonu tipa jonu šķīdriem izmantošana DNS metilēšanas līmeņa noteikšanai ...	101
3.6.1. Reaģenta un citu apstākļu izvēle.....	102
3.6.2. Metodes validācija	104
3.6.3. Teļa vairogdziedzera DNS analīze.....	106
SECINĀJUMI.....	108
IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	110
PIELIKUMI	122

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- A – anjons;
- ACN – acetonitrils;
- AEŠH – augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija;
- AF – apgrieztā fāze;
- BIRD – disociācija, izraisīta ar absolūti melnā ķermeņa radiāciju, *blackbody infrared radiative dissociation*;
- BuImPS – 3-(1-butil-N-imidazolio)-propān-1-sulfonāts;
- CJŠ – cviterjonu tipa jonu šķidrums;
- DMF – N,N-dimetilformamīds;
- DSC – diferenciālā skenējošā kalorimetrija, *differential scanning calorimetry*;
- EIJ+ – elektroizsmidzināšanas jonizācija, pozitīvo jonu skenējums;
- EIJ- – elektroizsmidzināšanas jonizācija, negatīvo jonu skenējums;
- GH – MS – gāzu hromatogrāfija – masspektrometrija;
- HILIC – hidrofilo mijiedarbību šķidrumu hromatogrāfija;
- HImPS – 3-(1-heksil-N-imidazolio)-propān-1-sulfonāts;
- HinPS – 3-(N-hinolīnio)-propān-1-sulfonāts;
- IRMPD – disociācija, izraisīta ar infrasarkano starojumu, *infrared multiphoton dissociation*;
- IS – infrasarkanā spektroskopija;
- ITC – izotermiskā titrēšanas kalorimetrija, *isothermal titration calorimetry*;
- Kat – katjons;
- KMR – kodolu magnētiskā rezonanse;
- LOQ – kvantificēšanas robežvērtība;
- 5-MC – 5-metilcitozīns;
- [M+H]⁺ – protonēta molekula;
- [M-H]⁻ – deprotonēta molekula;
- MeImBC – 4-(1-metil-N-imidazolio)-butān-1-karboksilāts;
- MeImEC – 2-(1-metil-N-imidazolio)-etān-1-karboksilāts;
- MeImPC – 3-(1-metil-N-imidazolio)-propān-1-karboksilāts;
- MeImPS – 3-(1-metil-N-imidazolio)-propān-1-sulfonāts;
- MeOH – metanols;
- MRM – multireakciju monitorings, *multiple reaction monitoring*;
- MS – masspektrometrija;
- MS² – tandēmmasspektrometrija;
- MS³ – trīs stadiju masspektrometrija;
- OImPS – 3-(1-oktil-N-imidazolio)-propān-1-sulfonāts;
- PIA – plūsmas injekciju analīze, *flow injection analysis*;
- PyPS – 3-(N-piridīnio)-propān-1-sulfonāts;
- RSN – relatīvā standartnovirze;
- SE – sadursmju enerģija;
- SID – sadursmju inducētā disociācija;

SIR – selektīvais jonu skenējums, *selected ion recording*;

TFA – trifluoretiķskābe;

THF – tetrahidrofurāns;

TiaPS – 3-(N-tiazolio)-propān-1-sulfonāts;

VID – virsmas inducētā disociācija;

IEVADS

Cviterjonu tipa jonu šķidrums (CJŠ) ir organiskie savienojumi, kuri satur gan pozitīvu, gan negatīvu lādiņu vienā molekulā. Parasti to struktūrā ietilpst kvaternizētā slāpekļa heterocikla fragments, piemēram, imidazolijs, piridīnijs u.c., kā arī sulfonāta, vai karboksilāta grupa, kas atdalīta no heterocikla ar oglekļa atomu virkni. Mūsdienās CJŠ galvenais pielietojuma virziens saistīts ar elektroniku, kur tos izmanto kā matricas (Li jonu baterijas piedevas), kurās var migrēt tikai pievienotie joni [1, 2]. Pateicoties iepriekš minētām īpašībām, CJŠ var aizvietot tradicionālos elektrolītus. Līdzšinējie pētījumi parādīja, ka CJŠ var ķīmiski piesaistīt sorbenta virsmai un iegūto modifikāciju izmantot par nekustīgo fāzi šķidrums hromatogrāfijā [3]. Zināms arī CJŠ pielietojums tehniskās celulozes un dažādu polimēru šķīdināšanai [4].

Neskatoties uz to, ka CJŠ ir negaistoši savienojumi ar augstām kušanās temperatūrām un zemu tvaika spiedienu, mūsdienu masspektrometrijas metodes ļauj raksturot šo savienojumu īpašības gan šķīdumos, gan arī gāzes fāzē, kas nebija iespējams agrāk [5]. EIJ šajā kontekstā ir īpaša nozīme, jo šī metode spēj pārnest jonus no nepārtraukti plūstošā šķīduma uz gāzes fāzi „maigos” apstākļos. Turklāt EIJ kombinācija ar SID [6] ļauj pētīt virkni CJŠ gāzes fāzes ķīmisko īpašību, kā lādiņa virzītā šķelšanās, pārgrupēšanās un ar lādiņu nesaistītie procesi.

Literatūrā sniegtā informācija rāda, ka alkilimidazolijs funkcionālie atvasinājumi, kuros funkcionālā grupa atrodas alkilķēdē (esteri, sulfīdi, sulfoksīdi un sulfoni) veido virkni metastabilu jonu MS^2 un MS^3 apstākļos [7, 8]. Šo jonu veidošanās, galvenokārt, ir saistīta ar imidazolijs cikla paplašināšanās procesiem, radikāļu virzīto šķelšanos un mazu molekulu atšķelšanos. Turklāt, novēroti neparasti H/D apmaiņas procesi, kuru mehānismi pašlaik ir neskaidri [8]. Līdz ar to, ir nepieciešams izpētīt cik lielā mērā CJŠ funkcionālās grupas (sulfonāta, karboksilāta) ietekmē protonēto un deprotonēto CJŠ molekulu fragmentāciju. Aktuāls ir jautājums arī par heterocikla un oglekļa atomu skaita starp heterociklu un funkcionālo grupu ietekmi uz fragmentācijas procesiem. Šādu sakarību noskaidrošana dos iespēju vispārināt fragmentu veidošanas mehānismus arī citos savienojumos, kas satur līdzīgus struktūras elementus. Īpaši svarīgi tas ir ķيميķiem, kuri strādā ar jaunu savienojumu sintēzi vai izdalīšanu no dabas objektiem. Kā piemēru šajā darbā pētīto objektu un dabas vielu struktūras līdzībai var minēt nesen izdalītus bioloģiski aktīvos bromopirolo – imidazola alkaloīdus, daži no kuriem satur imidazolijs un sulfonāta grupas [9].

Kā jau minēts iepriekš, EIJ metode dod iespēju pētīt procesus, kuri notiek šķīdumā. Neskatoties uz to, ka mikropilienu desolvācijas gaitā var veidoties nekovalenti saistītie nespecifiskie agregāti, ir zināms, ka kompleksi, kas veidojas šķīdumā, arī tiek pārnesti uz gāzes fāzi [10]. Literatūrā aprakstīto kompleksu piemēri ietver sevī bioloģisko makromolekulu kompleksus ar vairākiem ligandiem [11], kā arī mazmolekulāro vielu kompleksus [12, 13, 14].

Nesen Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes hromatogrāfijas un masspektrometrijas laboratorijā novērots, ka dažādi imidazolija un citu heterociklu saturošie CJŠ EIJ gaitā spēj veidot nekovalenti saistītas struktūras ar dažādiem aminogrupu saturošiem savienojumiem, piemēram, 5-metilcitozīnu, kas ir DNS metilēšanās produkts [15, 16]. Šādu kompleksu veidošanai var būt praktiska nozīme 5-metilcitozīna un citu mazmolekulāro savienojumu noteikšanā. Tas ir saistīts ar to, ka, veicot mazmolekulārā analīta noteikšanu sarežģītos bioloģiskas izcelsmes paraugos, noteikšanas robežu var krietni samazināt, palielinot analīzes selektivitāti. To var izdarīt dažādi, bet visbiežāk lietotā pieeja ir analīta derivatizācija ar mērķi novērst traucējošo vielu signālus. Derivatizācijas rezultātā mainās ne tikai analīta molmasa, bet arī gaistamība, termiskā stabilitāte, virsmas aktivitāte, jonizācijas īpašības, kā arī uzlabojas fragmentu rašanās spēja [17]. Tomēr kovalentai derivatizācijai piemīt arī daži trūkumi: palielināts analīzes laiks, zemi derivatizācijas reakcijas iznākumi, kā arī nepieciešama stingra reakcijas apstākļu kontrole un papildus operācijas pirms analīzes (piemēram, derivatizācijas reaģenta pārākuma izolēšana, šķīdinātāja maiņa utt.). Nekovalenti saistīto struktūru veidošanās starp dažādiem CJŠ un 5-metilcitozīnu var novērst šos trūkumus, jo komplekss veidojas uzreiz pēc CJŠ sajaukšanas ar šķīdumu, kas satur 5-metilcitozīnu, un nekādas papildus operācijas nav vajadzīgas. Tādu metodi varētu lietot AEŠH – MS variantā, pievienojot CJŠ efluentam. Pastāv arī perspektīva izstrādāt ātru ekspresmetodi, kurai hromatogrāfiskā kolonna nav vajadzīga.

Galvenais jautājums, kas ir saistīts ar šādu kompleksu lietošanu ķīmiskajā analīzē, ir to stabilitāte EIJ apstākļos. Tāpēc šajā darbā ir izpētīta dažādu faktoru ietekme uz minēto kompleksu stabilitāti gan šķīdumā, gan gāzes fāzē.

Darba mērķi:

1. Noskaidrot CJŠ struktūras ietekmi uz monomolekulāriem procesiem, kuri notiek sadursmju inducētās disociācijas gaitā.
2. Izpētīt CJŠ kompleksu veidošanas spēju ar mazmolekulāriem savienojumiem, kuri satur aminogrupu, un izvērtēt iespējas šādu kompleksu izmantošanai bioloģiskās izcelsmes paraugu AEŠH – MS analīzē.

Darba uzdevumi:

1. Izstrādāt preparatīvas metodes CJŠ ar mainīgu oglekļa atomu skaitu starp heterocikla slāpekli un funkcionālo grupu (sulfonāta vai karboksilāta) iegūšanai un attīrīšanai;
2. Sintezēt 3-(1,2-dimetil-3N-imidazolio)-propān-1-sulfonāta atvasinājumus, kuri satur deiterija atomus propān-1-sulfonāta ķēdes 1. un 3. stāvoklī;
3. Atrast optimālus masspektrometra darbības parametrus (kapilāra, konusa un ekstraktora spriegums, jonu avota un desolvācijas temperatūra, desolvācijas un konusa gāzes plūsma) iegūto savienojumu fragmentācijas pētīšanai EIJ – SID apstākļos;
4. Izpētīt minēto savienojumu fragmentāciju SID apstākļos (pozitīvo un negatīvo jonu skenējumā) un izdarīt secinājumus par CJŠ struktūras ietekmi uz fragmentācijas procesiem;
5. Mainot vairākus faktorus (CJŠ struktūru un funkcionālās grupas, amīna struktūru, šķīdinātāja sastāvu, CJŠ koncentrāciju) novērtēt CJŠ un 5-metilcitozīna kompleksu stabilitāti;
6. Noteikt asociācijas konstantes 5-metilcitozīna kompleksiem ar 3-(1-alkil-3N-imidazolio)-propān-1-sulfonātiem acetnitrilā un metanolā, izmantojot EIJ – MS. Pārbaudīt alkilķēdes ietekmi uz asociācijas konstanti abos šķīdinātājos;
7. Noteikt pussabrukšanas enerģijas vērtības 3-(1-alkil-3N-imidazolio)-propān-1-sulfonāta kompleksiem ar 5-metilcitozīnu gāzes fāzē. Salīdzināt alkilķēdes ietekmi uz kompleksa stabilitāti šķīdumā un gāzes fāzē;
8. Izmantojot kvantu mehānikas aprēķinus, atrast varbūtīgāko CJŠ un 5-metilcitozīna kompleksa struktūru gāzes fāzē un noskaidrot parametrus, kas nosaka kompleksa stabilitāti. Izmantojot atrastos datus, novērtēt šādu kompleksu izmantošanas perspektīvas 5-metilcitozīna noteikšanai ar plūsmas injekciju metodi un masspektrometrisko detektēšanu.

Darba zinātniskā novitāte

Izpētītas cviterjonu tipa jonu šķīdrumu (CJŠ) ķīmiskās īpašības gāzes fāzē, kas iekļauj protonēto un deprotonēto molekulu pārvērtības sadursmju inducētās disociācijas gaitā. Izstrādātas metodes 3-(1,2-dimetil-3N-imidazolio)-propān-1-sulfonāta iezīmēšanai ar deiterija

atomiem un lielāka daļa fragmentācijas maršrutu pamatota, izmantojot deuterēto analogu fragmentāciju. Izpētīta metilēngrupu skaita un funkcionālās grupas ietekme uz fragmentāciju.

Parādīts, ka CJŠ šķidrā fāzē spēj veidot kompleksus ar amino – un amidīngrupas saturošiem savienojumiem. CJŠ kompleksiem ar 5-metilcitozīnu eksperimentāli noteiktas asociācijas konstanšu un pussabrukšanas enerģijas vērtības, kā arī izvērtēti faktori, kas nosaka doto kompleksu stabilitāti šķīdumā un gāzes fāzē. Izmantojot kvantu aprēķinus, novērtēta varbūtīgākā kompleksa struktūras veidošanās gāzes fāzē.

Darba praktiskā nozīme

Parādīts, ka kompleksu veidošanās starp CJŠ un 5-metilcitozīnu iespējams izmantot DNS metilēšanas līmeņa noteikšanai zīdītāju organismos. Šim nolūkam izstrādāta ātra plūsmas injekciju metode, kuras gaitā 5-metilcitozīns tiek saistīts kompleksā ar CJŠ, kuru nosaka, izmantojot EIJ. Šādā veidā ir iespējams viegli mainīt noteikšanas selektivitāti, atkarībā no pievienotā CJŠ un parauga tīrības pakāpes. Dotās metodes priekšrocības, salīdzinājumā ar zināmām 5-metilcitozīna noteikšanas metodēm ir īss analīzes laiks (≥ 50 analīžu stundā) un ar literatūras datiem salīdzināma vai labāka jutība. Izstrādātā metode dod iespēju, neizmantojot augsti efektīvo šķidrumu hromatogrāfiju un tandēmmasspektrometriju. Ir pamats prognozēt, ka aprakstīto metodi var paplašināt arī uz citiem bioloģiski aktīviem amidīniem un guanidīniem.

Promocijas darba aprobācija

Zinātniskās publikācijas

1. Podjava, A.; Mekšs, P.; Zicmanis A. Liquid chromatography – mass spectrometry of zwitterionic liquids. *Latv. J. Chem.* **2010**, *1*, 102-113.
2. Podjava, A.; Mekss, P.; Zicmanis, A. Positive and negative electrospray ionization – collision induced dissociation of sulfur containing zwitterionic liquids. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2011**, *17*, 377-383.
3. Podjava, A.; Mekss, P.; Zicmanis, A; Krasnov, S. Gas-phase chemical properties of zwitterionic imidazolium alkanecarboxylates studied by electrospray ionization – collision-induced dissociation. *Latv. J. Chem.* **2012**, *3*, 249-256.
4. Podjava, A; Kistkin, S., Ausekle, E., Priede, E.; Mekss, P.; Zicmanis, A. Electrospray ionization mass spectrometry of non-covalent complexes formed between N-

alkylimidazolium-containing zwitterionic sulfonates and protonated bases. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2014**, 20, 467-475.

5. Podjava, A.; Kistkin, S.; Ausekle, E.; Mekss, P.; Zicmanis, A. Zwitterionic sulfonates as m/z shift reagents for 5-methylcytosine detection in deoxyribonucleic acids (DNA) using flow injection analysis and electrospray ionisation mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2015**, 21, 659–667.

Dalība konferencēs

Lokālās konferences

1. Podjava, A.; Mekšs, P. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu analīze šķidrumu hromatogrāfijas – masspektrometrijas apstākļos, LU 68. konference, Latvijas Universitāte, Ķīmijas Fakultāte, 2010. g.
2. Kistkins, S.; Podjava, A. Elektroizsmidzināšanas jonizācijas apstākļu ietekme uz nekovalento struktūru veidošanos starp 5-metilcitozīnu un dažādiem cviterjonu tipa savienojumiem, LU 73. konference, Latvijas Universitāte, Ķīmijas Fakultāte, 2014. g.

Starptautiskā konference

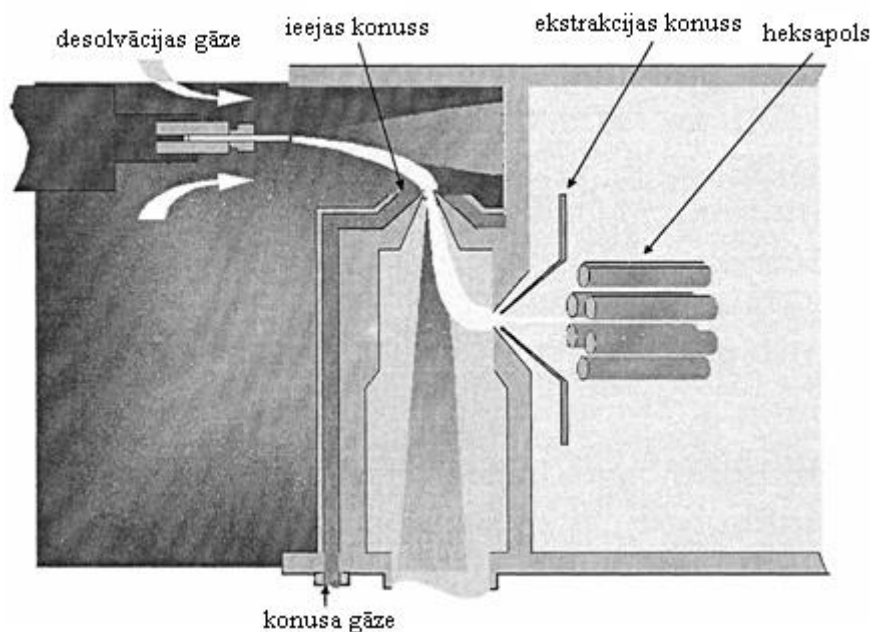
1. Podjava, A.; Mekšs, P.; Zicmanis, A. Liquid chromatography – mass spectrometry of zwitterionic liquids. The 9th International Symposium on Systems with Fast Ionic Transport. Rīga, Latvia, 2010. g.
Tēzes: Cietvielu Fizikas Institūts, 2010. g., Rīga, 150 lpp

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Elektroizsmidzināšanas jonizācijas pamatprincipi

Kopš EIJ atklāšanas [18] un tās tālākās attīstības [19], metode ir ieguvusi plašu popularitāti tādās zinātnes sfērās, kā proteomika un bioķīmija [20], zāļu ražošana [21], katalīze [22], polimēru ķīmija [23] un daudzās citās. Šādas plašas izmantošanas iemesli ir „maigais” desolvācijas process, daudzlādiņu struktūru veidošanās makromolekulu gadījumā, iespējas izmantot polārus organiskos šķīdinātājus un natīvus apstākļus, saderība ar paraugu atdalīšanas metodēm un augsta jutība pareizi izvēlētajos apstākļos.

EIJ metodes būtība parādīta attēlā 1.1.



1.1. att. Elektroizsmidzināšanas jonizācijas avots [24]

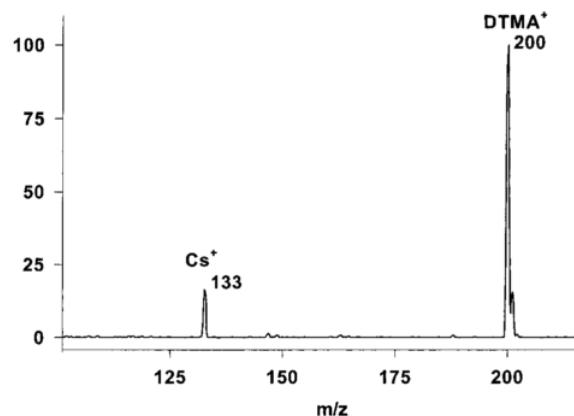
Šķīduma plūsma no hromatogrāfijas iekārtas, vai no masspektrometra ievadīšanas sistēmas, virzās caur tievu kapilāru ($\varnothing 0,1$ mm), kuram pieslēgts apmēram 4 kV spriegums. Pēc parauga šķīduma izplūdes no kapilāra, tas pārvēršas par aerosolu, kas sastāv no lādētiem pilieniem ar augstu lādiņa blīvumu. Tuvojoties ieejas konusam, šie pilieni pakāpeniski samazinās, jo visu laiku notiek šķīdinātāja iztvaikošana. Pie kritiskā pilienu izmēra pienāk brīdis, kad spraiguma spēks ir mazāks par Kulona atgrūšanās spēku – tas izraisa pilienu sabrukšanu par vairākiem mazākiem pilieniem [24]. Šķīdinātāji ar lielu spraiguma spēku un/vai

augstu viskozitāti stipri traucē mazu pilienu veidošanai, tāpēc, ūdens nav piemērots šķīdinātājs AEŠH – MS eksperimentiem [25]. Pilienu samazināšanās atkārtojas, līdz veidojas mikropilieni, kuri satur tikai vienu lādētu parauga daļiņu, kas zaudē palikušās šķīdinātāja molekulas un pati pāriet gāzes fāzē (ir zināmi arī citi jonizācijas modeļi). Pēc tam ekstrakcijas konuss savāc jonus un novirza tos uz masu analizatoru. Fragmentācija šajā gadījumā ir niecīga, jo jonu iekšējā enerģija ir maza.

Savienojumu klāsts, kurus var analizēt EIJ apstākļos, ir diezgan liels [26]. Tie var būt organiski savienojumi, kuri jau ir jonizēti šķīdumā, neitrāli vai polārie savienojumi, kuri var būt protonēti/deprotonēti noteiktā pH, kā arī nepolārie savienojumi, kurus var oksidēt vai reducēt. EIJ process ir diezgan jutīgs pret jonu konkurences un apspiešanas efektiem [27]. Minētie efekti ievērojami samazina instrumenta jutību, tāpēc sarežģītu maisījumu analīzēm nepieciešama papildus attīrīšana. To panāk ar šķīdumu ekstrakciju, cietfāzes ekstrakciju, centrifugēšanu, eksklūzijas hromatogrāfiju u. c.

1.2. Analīta uzlādēšanās EIJ procesā

Viens no nozīmīgākajiem jautājumiem, kas saistīts ar EIJ, ir sakarība starp analīta uzbūvi un jonizācijas spēju. Jau sen ir zināms, ka dažādu analītu signāla intensitāte ir atšķirīga, pat ja to koncentrācijas šķīdumā ir vienādas [28]. Piemēram, 1.2. att. redzamais cēzija bromīda un dodeciltrimetilamonija bromīda ekvimolāra šķīduma masspektrs, rāda ievērojamu signālu starpību, neskatoties uz abu analītu koncentrāciju vienādību.

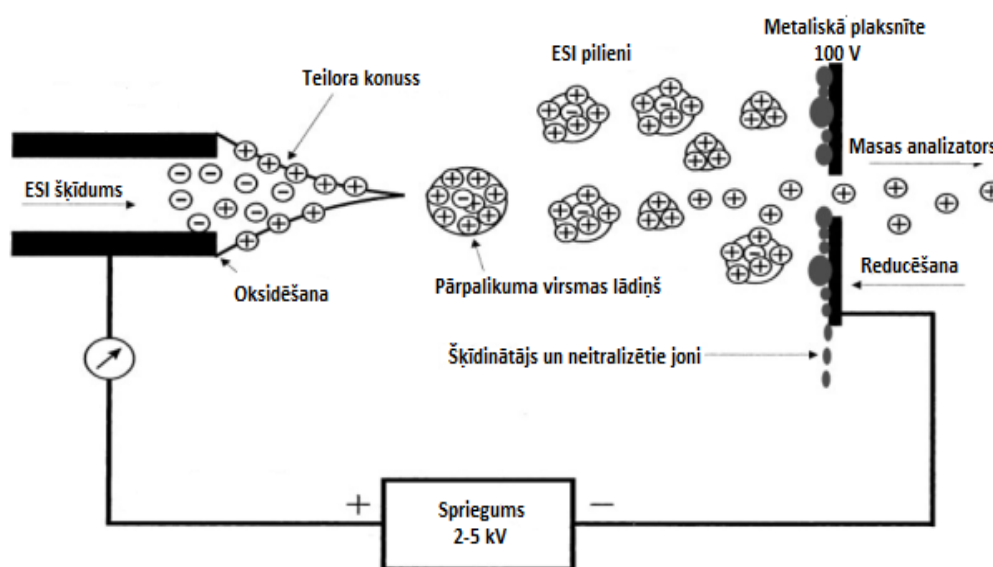


1.2. att. Cēzija bromīda un dodeciltrimetilamonija bromīda ekvimolāra šķīduma masspektrs, iegūts EIJ režīmā [29]

Iespējams, ka to nosaka stipri atšķirīgā analītu virsmas aktivitāte, kas liecina par analīta struktūras tiešu ietekmi uz tā noteikšanas jutību. Zemāk apskatīti vairāki faktori, kas var ietekmēt analīta jonizācijas efektivitāti EIJ apstākļos.

1.2.1. Parauga jonizācija lādiņu atdalīšanas procesā

EIJ process sastāv no trim galvenām stadijām, kuras redzamas 1.3. att.



1.3 att. Elektroizsmidzināšanas procesa shēma

Pirmajā stadijā veidojas pilieni ar pozitīvā vai negatīvā lādiņa pārpalikumu. Otrajā – notiek šo pilieņu desolvācija un mazāka diametra pilieņu veidošanās. Beidzot, trešajā stadijā, saskaņā ar jonu iztvaikošanas modeli [30], kas ir piemērots mazmolekulāriem analītiem, joni no šķīduma tiek pārnesti gāzes fāzē. Analīti, kas pastāv šķīdumā jonu formā, var nokļūt uz mikropiliena virsmas un veidot lādiņa pārpalikumu. Lādiņu atdalīšanās process, kas notiek Teilora konusa veidošanās gaitā, ir galvenais mehānisms, kas nosaka neorganisko jonu nokļūšanu uz piliena virsmas. Organisko vielu, kuru sastāvā ir bāziskas, skābas vai lādētas amonija, fosfonija un oksonija grupas, jonizācija un pārnese uz piliena virsmu notiek atbilstoši aprakstītajam mehānismam. Neorganiskos katjonus un pozitīvi lādētus organiskos savienojumus analizē pozitīvo jonu skenējumā, bet neorganiskos un organiskos anjonus - negatīvo jonu skenējumā.

1.2.2. Aduktu veidošanās

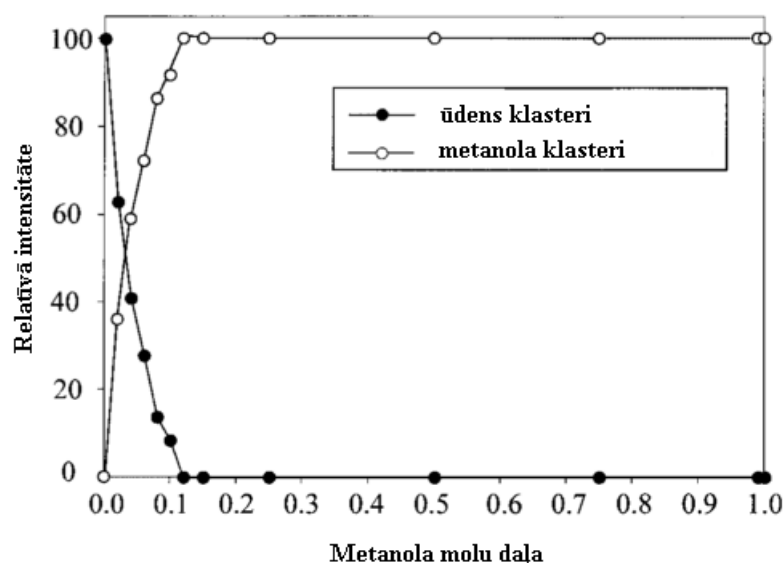
Savienojumi, kuru struktūrā ietilpst polārās funkcionālās grupas, var veidot aduktus ar dažādiem joniem. Aduktu veidošanās ir jonizācijas ar lādiņu atdalīšanas mehānisma palīdzību speciāls gadījums. Process notiek šķīdumā pirms lādiņu atdalīšanās. Aduktos saglabājas lādiņš, kā rezultātā analīta signāls kļūst novērojams masspektā gan pozitīvo, gan negatīvo jonu skenējumā (atkarībā no adukta zīmes). Piemēram, pievienojot hloroformu analizējamam šķīdumam, var panākt aduktu veidošanos starp dažiem analītiem un hlorīda joniem [31]. Tas ļauj noteikt tādus neitrāli lādētus analītus negatīvo jonu skenējumā, kuri nespēj paši veidot anjonus deprotonēšanas rezultātā.

Pievienojot šķīdumam sārmu metālu sāļus, var panākt aduktu veidošanos starp analītu un nātrija, amonija, litija vai kālija katjoniem [32]. Uzmanība ir jāpievērš pievienotā sāls koncentrācijai, jo, atšķirībā no mazām sāls piedevām, lielas piedevas var stipri samazināt vai pat pilnīgi izslēgt analīta signāla veidošanos. Tas ir saistīts ar mikropilienu virsmas pārsātināšanos ar sāls joniem, kas izraisa analīta izspiešanu no virsmas. Jāievēro, ka sārmu metālu katjoni praktiski vienmēr atrodas šķīdinātājā, kas saskārušies ar stikla traukiem, piemēram, zema kvalitātes stikla pudelēm. Parasti analītiskas kvalitātes šķīdinātāji satur nātrija jonus ar koncentrācijas kārtu 10^{-6} M. Rezultātā aduktu veidošanās notiek arī tad, kad tā nav vēlama.

1.2.3. Jonizācija gāzes fāzē

EIJ process notiek atmosfēras spiedienā. Līdz ar to jonu avotā atrodas gan neitrālā šķīdinātāja tvaiki, gan arī tā joni, kuri var veidoties EIJ gaitā. Rezultātā analīta joni kopā ar lādētām šķīdinātāja molekulām var piedalīties dažādās gāzes fāzes reakcijās. Visbiežāk protonētas analīta molekulas iesaistās protonu pārnese procesos ar šķīdinātāja molekulām [33]. Pēc iztvaikošanas no piliena virsmas protonētas analīta molekulas var atdot protonus molekulām ar augstāku gāzes fāzes bāziskumu, piemēram, šķīdinātājam vai citam analītam. Rezultātā analīts var iegūt lādiņu jonu – molekulu reakcijā, vai arī to zaudēt. Šādi procesi notiek apstākļos, kad jonu pārnese rezultātā no šķīduma uz gāzes fāzi mainās analītu bāziskuma pieauguma secība. Tas ir skaidrojams tādējādi, ka bāziskums šķīdumā nav saistīts ar bāziskuma vērtību gāzes fāzē. Darbā [33] parādīts, ka metanola un ūdens maisījuma EIJ analīzes gaitā

metanola klasteri dominē masspektros arī tad, ja metanola mola daļa šķīdumā ir maza (sk. 1.4. att.).



1.4. att. Šķīdinātāju klasteru relatīvā intensitāte atkarībā no metanola mola daļas [33]

Attēlā 1.4. redzams, ka EIJ gaitā notiek protona pārnese no šķīdinātāja ar zemāku protonu afinitāti uz šķīdinātāju, kam tā ir augstāka, kas norāda uz protonu afinitātes ietekmi uz analīta jonizāciju. Veicot EIJ analīzes, jāpievērš uzmanība šķīdinātāja izvēlei – šķīdinātāji ar augstu protonu afinitāti nav piemēroti vāji bāzisku analītu noteikšanai.

1.2.4. Oksidēšanās – reducēšanās procesi EIJ gaitā

EIJ procesu var aplūkot kā sava veida elektroķīmisku šūnu [34]. Lādiņa bilances saglabāšanai nepieciešams, lai oksidēto vai reducēto daļiņu koncentrācija būtu vienāda ar pārpalikuma lādiņa koncentrāciju. Oksidēšanās – reducēšanās procesi var pārvērst analītu jonu formā, kas ir svarīgi EIJ, bet dažreiz to klātbūtne stipri traucē analīzei. Piemēram, oksidēšanās – reducēšanās produkti spēj veidot aduktus ar analītu vai konkurēt ar to par vietu piliena virsmā. Bieži var novērot tādus nevēlamus efektus, kā kapilāra materiāla oksidēšanās. Rezultātā šķīdumā pāriet Fe(II) joni, kas var veidot kompleksus ar analītiem. Gadījumos, kad elektroķīmiskie procesi traucē analīzei, vislabākais risinājums ir nomainīt kapilāra materiālu, kas var krietni izmainīt elektroķīmiskos procesus [35].

1.2.5. Analīta virsmas aktivitātes ietekme uz signāla intensitāti

Analīta struktūra var stipri ietekmēt ne tikai jonizācijas mehānismu, bet arī signāla intensitāti masspektūrā. Visbiežāk to nosaka savienojuma virsmas aktivitāte. Jau sen zinātnieki pamanīja, ka analītiem ar lielām nepolārām grupām signāls ir krietni intensīvāks nekā mazmolekulārām polārām vielām [36]. Lielas nepolārās grupas novietojas gaisa – šķīduma robežvirsmā, nevis mikropiliena iekšpusē. Rezultātā joni ar nepolārajām grupām pāriet gāzes fāzē daudz vieglāk. Līdzsvara – sadalījuma modelis [37] paredz, ka tikai noteikts daudzums lādiņu var veidoties uz piliena virsmas, bet piliena iekšpuse ir elektroneitrāla. Katjoni un anjoni, kuri atrodas piliena iekšienē neitralizē viens otru un gala rezultātā izveido sāļus.

Daži mainīgie, kas apraksta analīta polaritāti, var korelēt ar signāla intensitāti. Piemēram, parādīts, ka signāla intensitāte var būt lineāri atkarīga no molekulas nepolārās daļas virsmas laukuma [38]. Vēl viens lielums, kas korelē ar signāla intensitāti, ir Gibsa enerģijas izmaiņas, saistītas ar jona pārnesei no nepolārā šķīduma un polāro. Analītiem ar lielāku pārnesei enerģiju ir augstāka intensitāte masspektūrā [38]. Interesanta korelācija ir atrasta starp vienkāršo analītu izdalīšanās laiku šķīdumu hromatogrāfijā un signāla intensitāti [39]. Analītam ar lielāku izdalīšanās faktora vērtību arī detektora atsauce ir augstāka.

1.2.6. Analīta pK_a un šķīduma pH ietekme uz jonizācijas efektivitāti EIJ gaitā

Gadījumos, kad veic analītu analīzi, kuriem ir skābes vai bāzes īpašības, pK_a un pH vērtības var ietekmēt jonizācijas efektivitāti. Kopumā, bāzisko analītu noteikšana ir efektīvāka šķīdumos ar pazeminātu pH. Analītus ar skābju īpašībām parasti analizē šķīdumos ar paaugstinātu pH. Neskatoties uz šo vispārīgumu, ir zināmi vairāki izņēmumi, kas norāda uz EIJ mehānismu sarežģītību. Piemēram, protonētu jonu veidošanās novērota gadījumos, kad analīze veikta bāziskā šķīdumā ar pH, kas lielāks nekā vielas pK_a [40]. Deprotonēto jonu veidošanās novērota analizējot skābus šķīdumus [40]. Šos „izņēmumus” var izskaidrot šādi: EIJ gaitā mikropilienu virsmā vienmēr veidojas lādiņa pārpalikums, citādi EIJ nav iespējama [37]. Pozitīvo jonu skenējumā un protonu šķīdinātāja vidē lādiņa pārpalikums ir protonu formā, kurus var piesaistīt pats šķīdinātājs vai analīta molekula. Šādu protonu daudzums ir atkarīgs tikai no šķīduma plūsmas ātruma un sprieguma, bet nav atkarīgs no šķīduma pH. Ja analīta molekula ir nonākusi mikropilienu virsmā, tā ir protonēta, neatkarīgi no šķīduma pH, ja analīta

pK_a vērtība ir augstāka, nekā šķīdinātājam. Pretējā gadījumā tiks novēroti tikai šķīdinātāja un protona klasteru signāli.

Protonu pārnesei gāzes fāzē pēc analīta iztvaikošanas var izraisīt efektus, līdzīgus aprakstītiem iepriekš, neatkarīgi no šķīduma pH. Piemēram, ja analīzi veic pozitīvo jonu skenējumā bāziskā šķīdumā, kas satur amonjaku, daudzi amonija joni tiek pārnesti uz gāzes fāzi. Amonija jons gāzes fāzē ir stipra skābe, kas var atdot protonu analīta molekulai.

Pastāv vēl viens iemesls, kas nedod iespēju kontrolēt analīta jonizācijas efektivitāti, izmantojot šķīduma pH. Dažos gadījumos pozitīvo jonu skenējumā pie kapilāra virsmas notiek ūdens molekulu oksidēšana, kas var pazemināt mikropilienu pH līdz 4 vienībām, salīdzinājumā ar pārējo šķīdumu [41].

1.2.7. Šķīdinātāja izvēle EIJ apstākļos

Šķīdinātāja izvēle pārsvarā ir atkarīga no tā, kādu jonizācijas režīmu izmanto analīzei. Šķīdinātājs analīzei EIJ+ režīmā var atšķirties no šķīdinātāja, kuru izmanto EIJ- režīmā. Neskatoties uz to, ka pārsvarā EIJ apstākļos izmanto šauru šķīdinātāju loku, dažiem specifiskiem mērķiem, kā kompleksu pētīšana un proteīnu konformāciju saglabāšana, var lietot arī visai netipiskus EIJ šķīdinātājus vai piedevas tiem.

Viens no galvenajiem šķīdinātāja raksturlielumiem ir virsmas spraigums. Šķīdinātāji ar augstu virsmas spraigumu samazina izsmidzināšanās stabilitāti, kas izraisa signāla pulsācijas un sliktu atkārtotamību. Izsmidzināšanas stabilitāti var viegli panākt sistēmās, kur ir ap 50 % polāra organiskā šķīdinātāja (metanols vai acetonitrils) un 50 % ūdens. Ūdens daudzuma palielināšana izraisa virsmas spraiguma palielināšanos un iegūt stabilu izsmidzināšanu kļūst arvien grūtāk. No citas puses, iegūt stabilu izsmidzināšanu, lietojot nepolārus un vidēji polārus šķīdinātājus (heksāns, hloroforms) ir tikpat grūti, jo tiem ir ļoti mazs virsmas spraigums, mazas dielektriskās konstantes un augsta gaistamība.

Šķīdinātāja sastāva ietekme uz EIJ masspektrā redzamām līnijām ir būtiska. Pirmkārt, šķīdinātāja klāsts veido ķīmisko fonu, kas nav vēlams vielu zīmju analīzēs. Tikai ideālā gadījumā šķīdinātājs neveido klasterus ar elektrolīta un citu piedevu joniem. Otrkārt, analīta signāla intensitāte ir atkarīga no izmantotā šķīdinātāja. Daudzos gadījumos detektora atsauce ir augstākā, ja organiskā šķīdinātāja saturs šķīdumā ir palielināts, kas nosaka efektīvāku mikropilienu desolvāciju un stabilāku izsmidzināšanu [42]. Treškārt, EIJ ir svarīga šķīdinātāja elektrovadītspēja. Lai to nodrošinātu, šķīdumā vienmēr jāatrodas lādētām daļiņām. To izcelsme

var būt lādēts analīts, pievienotas elektrolīta piedevas (etiķskābe, amonija acetāts) un/vai elektroķīmisko pārvērtību produkti. Lādiņa nesēju trūkuma dēļ, izsmidzināšanās dinamika nav sasniedzama un detektora atsauce var stipri fluktuēt.

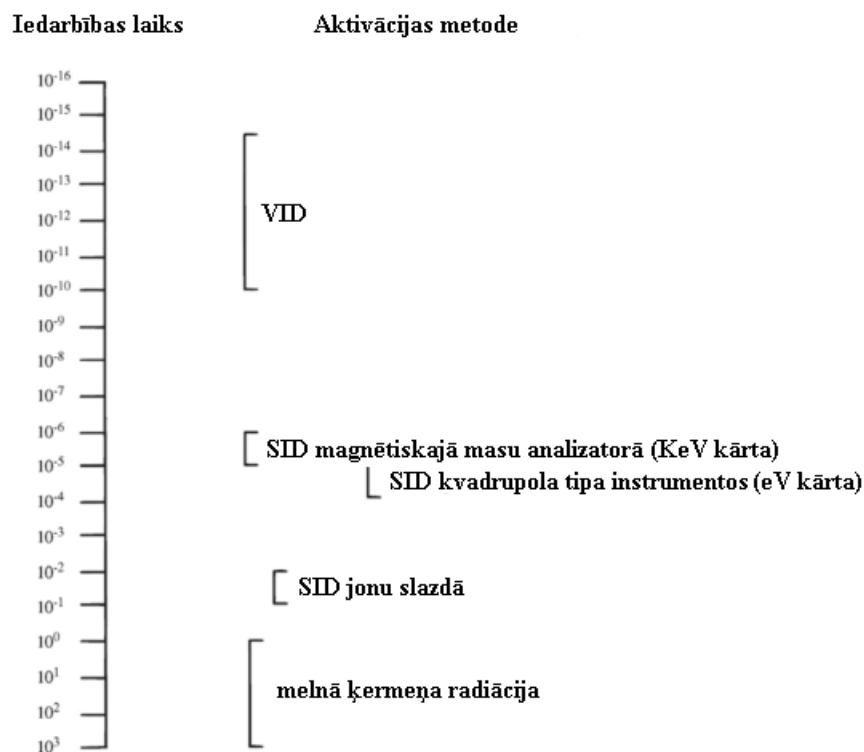
No tā izriet, ka EIJ+ režīmā var lietot polāra organiskā šķīdinātāja maisījumus ar ūdeni, organiskām skābēm (skudrskābi, etiķskābi) vai gaistošiem amonija sāļiem (amonija formiāta, amonija acetāta) piedevām. Šādā gadījumā lādiņa pārpalikuma nesēji ir šķīdinātāja klasteri ar protoniem.

Šķīdinātāja izvēle darbam EIJ- režīmā ir atkarīga no vairākiem apsvērumiem. Bāzes klātbūtnē nav iespējams sasniegt stabilu izsmidzināšanu, jo neveidojas pietiekoši stabila negatīvi lādētās daļiņas, kas varētu pārnest lādiņa pārpalikumu uz analītu. Šī iemesla dēļ, jutība EIJ- režīmā ir zemāka nekā EIJ+. Lai iegūtu stabilāku izsmidzināšanu EIJ- režīmā, jālieto šķīdinātājs, kas veido stabilus anjonus. Piemēram, ir pazīstama heksafluoroizopropanola un metanola maisījuma izmantošana oligonukleotīdu noteikšanai [43]. Piedāvāta arī cita šķīdinātāju sistēma, kura sastāv no 10 % 2,2,2-trifluoroetanolā un 90 % metanolā [26]. 2,2,2-Trifluoroetanol piedalās elektroķīmiskajā reducēšanas procesā, kurš notiek pie kapilāra virsmas, veidojot 2,2,2-trifluoroetoksīda anjonus un ūdeņradi. Aprakstītā šķīdinātāju sistēma nerada augstu fona līmeni un dod iespēju pazemināt noteikšanas robežu līdz 10^{-8} M taukskābju un 10^{-7} M peptīdu gadījumā.

1.3. Tandēmmasspektrometrija

Tandēmmasspektrometrija ir metožu kopums, kas ietver vismaz divas masu analīzes stadijas [44]. Pirmajā stadijā tiek selektīvi izolēts „mātes”jons (prekursors). Posmā starp divām stadijām bieži notiek prekursora aktivācija, palielinot tā iekšējo enerģiju. Iekšējās enerģijas palielināšana izraisa virkni fragmentācijas procesu, kuru gaitā notiek homolītiskā vai heterolītiskā (vai abas kopā) šķelšanās. Rezultātā veidojas noteikts daudzums fragmentu, jeb „meitas”jonu, kuri satur informāciju par prekursora uzbūvi. „Meitas”joni tiek analizēti otrajā masu analīzes stadijā. MS² lietošana vienas stadijas masspektrometrijas (MS) vietā sniedz informāciju ne tikai par jonu gāzes fāzes ķīmiskajām īpašībām, bet daudzos gadījumos palīdz pareizi un precīzi noteikt vielu sarežģītā bioloģiskā matricā, jo prekursoriem ar vienādām masām bieži atšķiras fragmentācija.

Zināmas vairākas jonu aktivācijas metodes, ieskaitot zemas un augstas enerģijas SID [45], VID [46], *IRMPD* [47], *BIRD* [48], elektronu satveres [49] un elektronu pārnese izraisīto disociāciju [50]. Metožu salīdzinājums ir redzams 1.5. att.



1.5. att. Jonu aktivācijas metožu salīdzinājums [51]

Katrā no šīm metodēm jonu aktivācijai izmanto dažādus fizikālus principus, kuri atšķiras ar iedarbības laiku, iegūto iekšējās enerģijas daudzumu un ierosināšanās veidu (elektronu pāreju vai svārstību ierosināšana). Dažādu aktivācijas metožu izmantošana sniedz komplementāru informāciju par jonu struktūru, bet tā ir atkarīga no konkrētās iekārtas. Šajā darbā jonu aktivācijas eksperimenti veikti, izmantojot triju kvadrupolu tandēmmaspektrometru ar sadursmju inducētās disociācijas šūnu, kam veltīta tālākā diskusija.

1.3.1. Sadursmju inducētā disociācija

SID metode pašlaik ir viena no izplatītākajām jonu aktivācijas metodēm. Kā jau norāda metodes nosaukums, jonu aktivāciju panāk jona un neitrālās daļiņas sadursmes rezultātā. Sadursmju inducēšanai bieži izmanto inertas gāzes – hēliju, argonu un slāpekli. Stiprākai aktivācijai var izmantot arī ksenonu. Tradicionāli SID iedala zemas vai augstas enerģijas

variantos un starpība starp abiem ir ap 100 eV. Zemas enerģijas SID var realizēt gan kvadrupola tipa instrumentos, kas izmanto jonu atdalīšanu telpā, gan arī slazda tipa iekārtās, kur joni mazā telpas iecirknī var atrasties neierobežotu laiku pirms analīzes. Parasti SID kvadrupola instrumentos notiek pilnīgāk, un enerģijas daudzums, ko iegūst jons, ir lielāks, nekā slazda tipa analizatorā.

Neatkarīgi no instrumenta veida, kur notiek SID eksperimenti, jona iekšējās enerģijas pieaugumu sadursmju rezultātā var izteikt ar 1.1. vienādojumu [6, 45].

$$E = \frac{M_g}{M_j + M_g} E_k \quad (1.1)$$

Šajā vienādojumā E ir iekšējā enerģija, M_g ir gāzes molmasa, M_j ir jona molmasa un E_k ir jona kinētiskā enerģija. Zemas enerģijas SID režīmā (<100 eV) jona iekšējās enerģijas pieaugums ir pietiekoši liels, lai sasniegtu svārstību ierosināšanu, bet nesasniedz elektronu ierosināšanai nepieciešamo līmeni. Tādēļ jona iekšējā enerģija tiek sadalīta starp visām jona svārstību brīvības pakāpēm, kas izraisa vājāko saišu šķelšanos. Jona iekšējās enerģijas pieaugums, kuru apraksta izteiksme 1.1, nav diskrēta vērtība, bet gan enerģijas sadalījums, kas kļūst platāks ar jona kinētiskās enerģijas palielināšanos [45]. Šīs, SID procesam raksturīgas īpatnības dēļ, masspektrā novēro vairākus „meitas” jonus, kuri rodas pārvērtībās, saistītās ar vairākām aktivācijas barjerām. Masspektri bieži vien kļūst komplicētāki, pieaugot jona kinētiskai enerģijai.

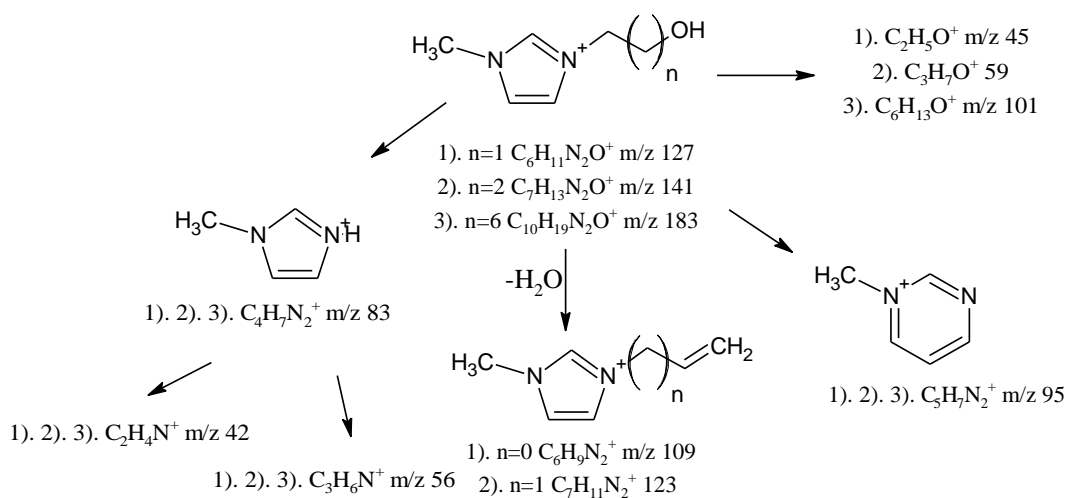
Viens no SID metodes trūkumiem ir MS^2 spektru vājā atkārtojamība, veicot mērījumus ar dažādām iekārtām, jo enerģijas pārnesei sadalījums ir ļoti jutīgs pat pret mazām izmaiņām eksperimenta apstākļos. Šis iemesls neļauj apvienot ar dažādām iekārtām iegūtos masspektus datubāzēs. Otrs SID trūkums ir saistīts ar to, ka pārsvarā notiek tikai vājāko saišu šķelšanās, kas daudzos gadījumos nav informatīvi. Piemēram, fosfopeptīdu identifikācijai ir jāpierāda ne tikai fosfāta grupas klātbūtne, bet arī tās precīzs novietojums polipeptīdā. Fosfāta grupa ir ļoti labila, tāpēc fosfopeptīdu masspektros pat pie zemām enerģijām dominē H_3PO_4 un HPO_3 masu zudumu signāli. Abu šo signālu klātbūtne pierāda, ka pētāmā viela ir fosfopeptīds [52], bet informāciju par fosfāta grupas atrašanās vietu nevar iegūt. Neskatoties uz šiem trūkumiem, SID metode mūsdienās ir vislabāk pielāgota EIJ un citām atmosfēras spiediena jonizācijas metodēm un ir plaši lietojama dažādu analītiskās un fizikālās ķīmijas problēmu risināšanai. Metodes izmantošana CJŠ līdzīgo savienojumu fragmentācijas procesu pētīšanai aplūkota nākamajā apakšnodaļā.

1.4. Imidazolijs atvasinājumu gāzes fāzes ķīmijas pētījumi SID apstākļos

N-Alkilimidazolijs dažādu pārstāvju MS² spektros var ieraudzīt interesantas sakarības starp struktūru un fragmentāciju. Kvaternizētā heterocikla klātbūtne daudzos gadījumos izraisa dažādus lādiņa virzītās šķelšanās procesus. Bet tas nav vienīgais fragmentācijas mehānisms, jo izplatīti arī dažādi pārgrupēšanās un homolītiskās šķelšanās procesi. Pārsvarā novērota fragmentācijas procesu stipra atkarība no oglekļa atomu skaita starp heterociklu un funkcionālo grupu.

1.4.1. Imidazolijs saturošo spirtu fragmentācija

Literatūrā var atrast dažu imidazolijs funkcionālo atvasinājumu gāzes fāzes ķīmisko pārvērtību pētījumus. SID apstākļos izpētīto imidazolijs gredzenu saturošo alkanolu fragmentācijas shēma parādīta 1.6. att.



1.6. att. N-metilimidazolijs saturošo spirtu SID shēma [7]

Shēmā redzams, ka alkilķēdes ietekme uz fragmentācijas procesu ir minimāla, jo līdzīgi fragmenti ir novērojami neatkarīgi no metilēngrupu skaita. Fragmentācijas gaitā notiek tādi procesi, ka lādiņa virzītā šķelšanās, sānu virknes sadalīšanās un imidazolijs cikla paplašināšanās. Atšķirības homolōgu fragmentācijā novērotas ūdens molekulas eliminēšanās procesā, kas ir raksturīgs vienīgi zemākiem homolōgiem ar n=1, 2.

Veicot SID pētījumus ar dažādām sadursmju enerģijām, autori pamanīja, ka do savienojumu $[\text{M}+\text{H}]^+$ relatīvā intensitāte paliek nemainīga, sākot ar 25 eV un augstāk. Ņemot

vērā šo novērojumu, tika izvirzīta hipotēze par iespējamo $[M+H]^+$ pārgrupēšanos stabilākajā formā. Kā parādīts 1.6. att., N-metilimidazolijs joni fragmentācijas gaitā pārvēršas par N-metilpirimidīnija joniem. Darbā [7] parādīta apgriezti proporcionāla sakarība starp N-metilpirimidīnija jonu relatīvo intensitāti un oglekļa atomu skaitu starp imidazolijs gredzenu un hidroksilgrupu.

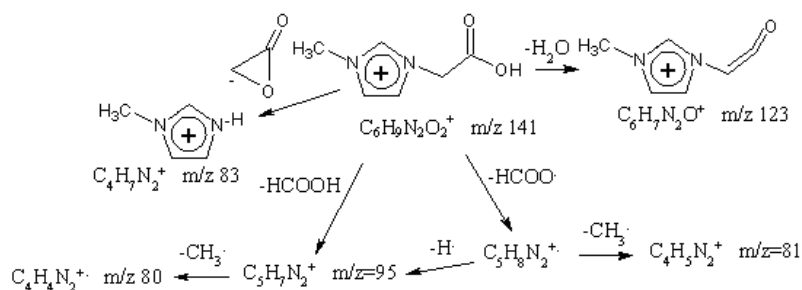
Apskatāmo savienojumu masspektros pamatlīnija atbilst jonam ar m/z 83, kas veidojas lādiņa virzītās šķelšanās rezultātā. Ūdeņraža atoms var migrēt gan no metilēngrupas gan no skābekļa atoma. Veicot ar D iezīmēto savienojumu analīzes, autori pierādīja, ka šajā procesā ūdeņraža pārnese varbūtība no metilēngrupas uz imidazolijs gredzenu pieaug līdz ar metilēngrupu skaitu.

Aprakstītais process konkurē ar N-metilimidazolijs eliminēšanu, kura gaitā veidojas alkanola virknei atbilstošie fragmenti (sk. 1.6. att.). Konstatēts, ka fragmentu signālu intensitāte samazinās, pieaugot metilēngrupu skaitam.

Pie lielākām sadursmju enerģijas vērtībām novērota katjonradikāļa veidošanās ar m/z 96, kuram atbilst molekulārā formula $C_5H_8N_2^{+\cdot}$. Process raksturīgs tikai mazākajam homologam ar $n=1$. Pēc autoru domām, dotā daļiņa veidojas 'CH₂OH' radikāļa β-šķelšanās rezultātā. Dotais katjonradikālis spēj piedalīties tālākajā fragmentācijā, zaudējot H[·] vai CH₃[·] [7].

1.4.2. Imidazolijs saturošo karbonskābju fragmentācija

Karboksilgrupu saturošā N-metilimidazolijs atvasinājuma SID procesa shēma parādīta 1.7. att.



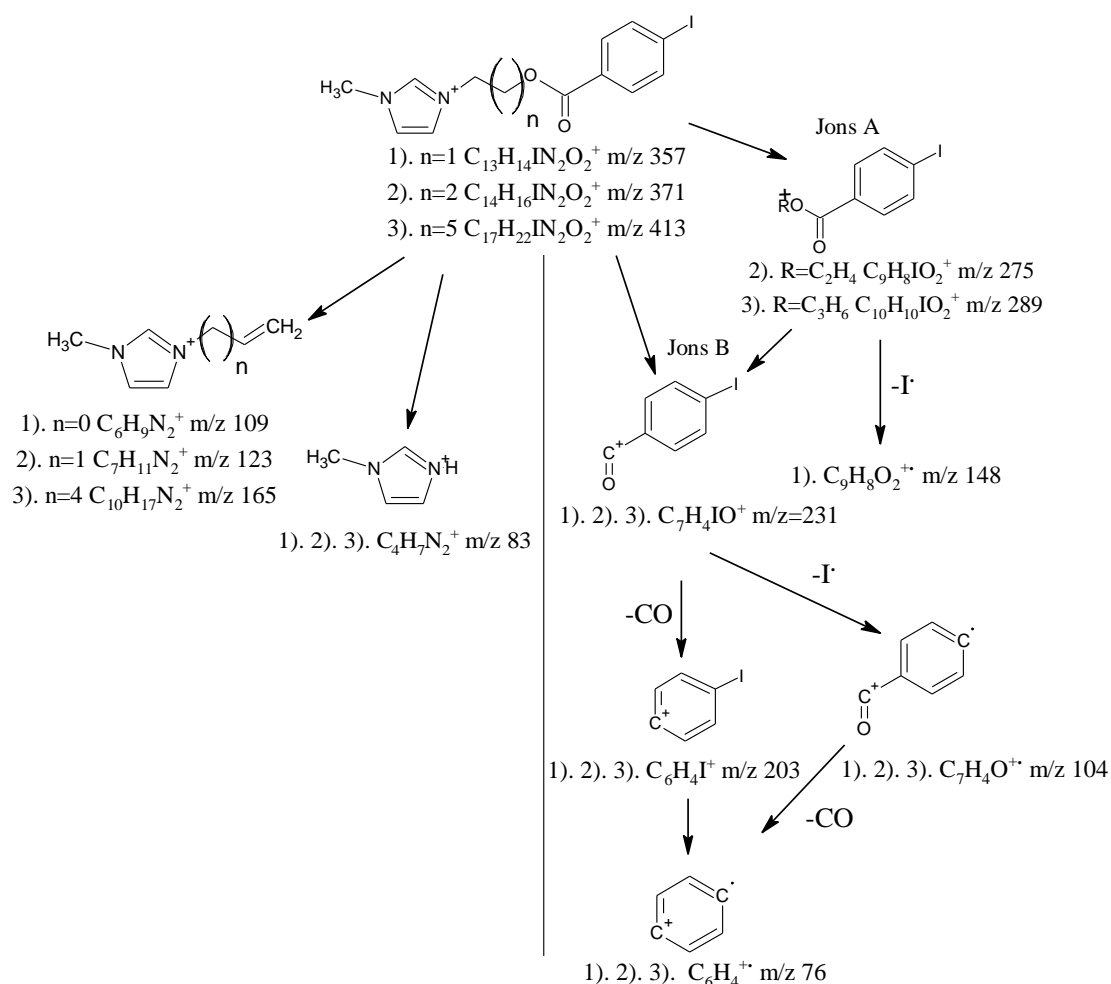
1.7. att. N-metilimidazolijs saturošas karbonskābes SID shēma [7]

Shēmā redzams, ka karboksilgrupas klātbūtne izraisa dažas būtiskas izmaiņas fragmentācijas procesā salīdzinājumā ar līdzīgo spirtu fragmentāciju (sk. 1.4.1. apakšnodaļu). Galvenais fragmentācijas virziens dotajam savienojumam saistīts ar HCOOH un HCOO[•] atšķelšanās no [M+H]⁺. Rezultātā veidojas C₅H₇N₂⁺ ar m/z=95 un C₅H₈N₂⁺ m/z=96.

Vēl viens fragmentācijas maršruts saistīts ar ūdens molekulas eliminēšanu, kas izraisa jona ar m/z=123 veidošanos. Apskatītie fragmentācijas procesi konkurē ar citiem maršrutiem, piemēram, α-laktona eliminēšanu vai CH₃[•] atšķelšanu [7].

1.4.3. Imidazoliju saturošo esteru fragmentācija

N-Metilimidazoliu saturošiem esteriem raksturīgi SID procesi apkopoti 1.8. att.



1.8. att. N-Metilimidazoliu saturošu esteru SID shēma [7]

Šāda tipa esteru fragmentācija ir īpaša ar to, ka fragmentu veidošanās notiek divos virzienos. Pirmais virziens saistīts ar N-metilimidazolijs, bet otrs – ar estera grupas veicināto fragmentāciju.

Fragmentācija, saistīta ar N-metilimidazolijs noteikto virzienu, ir p-jodobenzoskābes eliminēšanās, kas raksturīga visiem pētījumā lietotiem esteriem (sk. 1.8. att.). Autori parādīja, ka dotās fragmentācijas gaitā veidoto jonu relatīvās intensitātes palielinās līdz ar oglekļa atomu skaitu starp N-metilimidazolijs un estera fragmentiem.

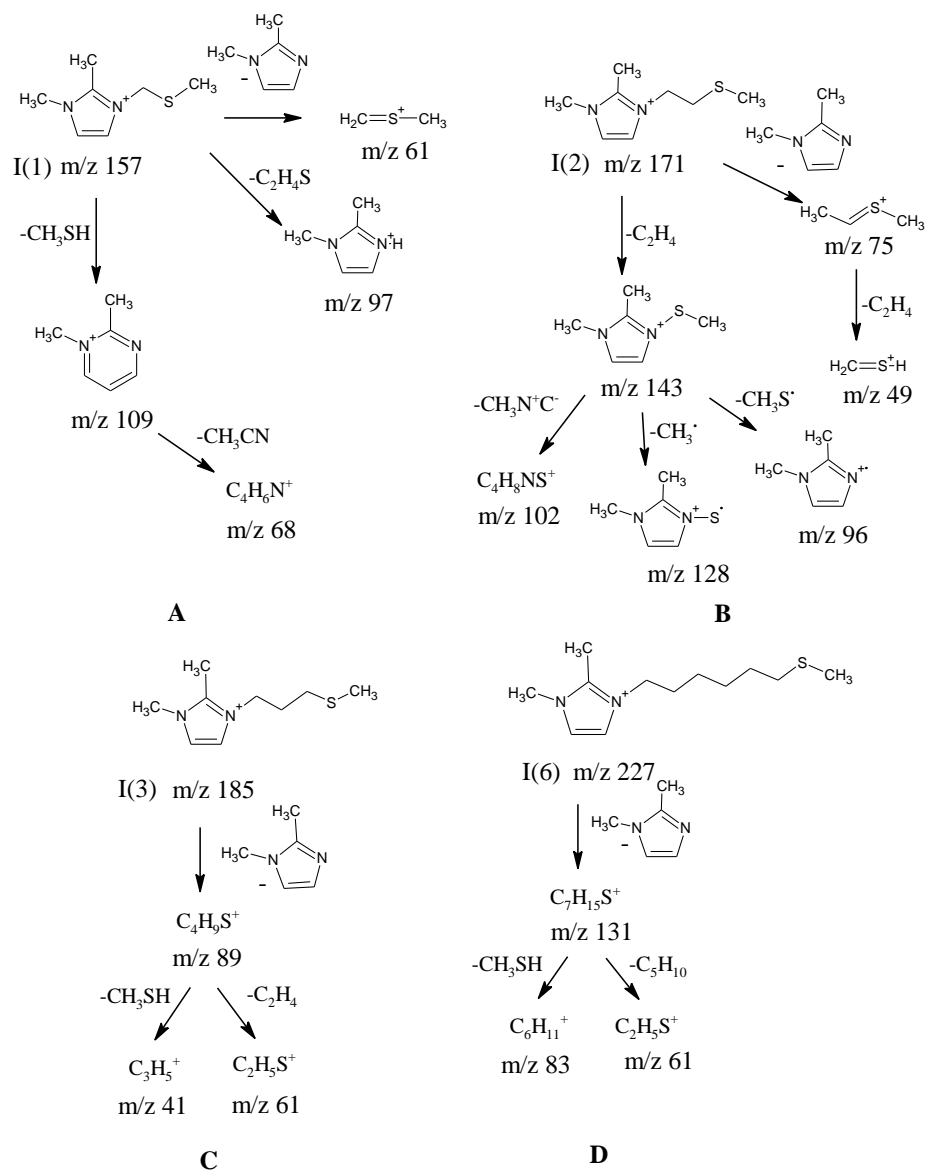
Otrs process, saistīts ar N-metilimidazolijs ietekmi, ir alkilķēdes eliminēšana ar sekojošu ūdeņraža atoma pārnesi uz N-metilimidazolijs fragmentu, kuras gaitā veidojas jons ar m/z 83. Šis fragmentācijas virziens vairāk raksturīgs homologam ar $n=5$, bet nav novērots savienojumam ar $n=1$ (sk. 1.8. att.).

Esteru grupas izraisa N-metilimidazolijs eliminēšanas procesu, kura gaitā veidojas jons A savukārt jona B rašanās saistīta ar spirta molekulas eliminēšanos (sk. 1.8. att.). Šajos procesos novērojama izteikta oglekļa atomu skaita ietekme – jo lielāks ir n , jo lielāka ir jona A relatīvā intensitāte masspektā. Ja n ir mazs, palielinās jona B relatīvā intensitāte.

Palielinot sadursmju enerģiju, novēro jonu A un B tālāku sadalīšanos [7].

1.4.4. Imidazolijs saturošo sulfīdu, sulfoksīdu un sulfonu fragmentācija

Zināma arī dažu sēra saturošo imidazolijs atvasinājumu fragmentācija. Sulfīdu SID procesu shēma parādīta 1.9. att.



1.9. att. Imidazoliu saturošu sulfīdu SID shēma [8]

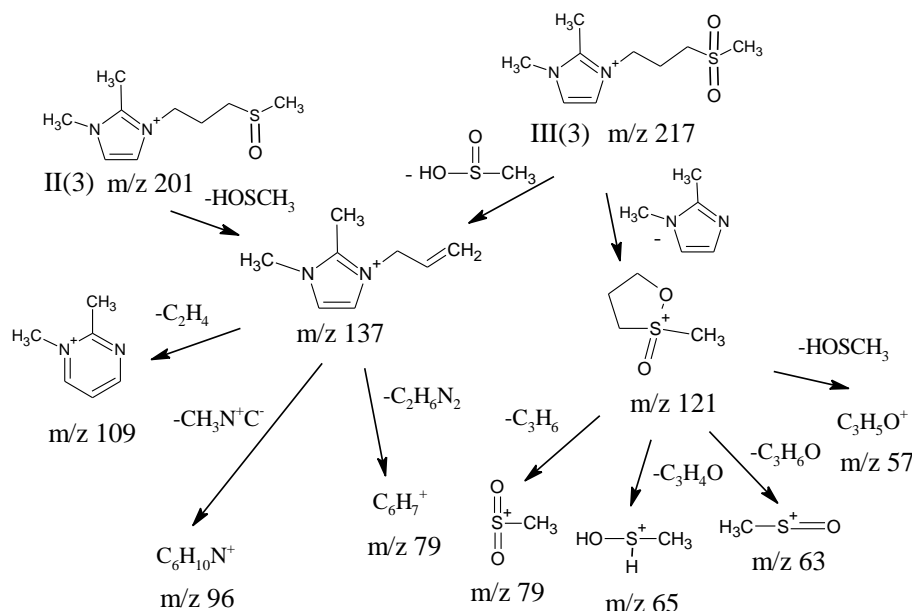
Shēmā atspoguļotie procesi parāda, ka sulfīdu fragmentācija ir stipri atkarīga no metilēngrupu skaita starp imidazoliu un sulfīda grupām. Dotajiem homoloģiem raksturīgs tikai viens kopīgs fragmentācijas virziens, kas ir saistīts ar 1,2-dimetilimidazola eliminēšanos. Procesā veidojas sulfēnija un augstāko sulfīdu katjoni ar $m/z=61$, $m/z=75$, $m/z=89$ un $m/z=131$. Minēto jonu relatīvās intensitātes palielinās līdz ar metilēngrupu skaita pieaugumu. Smagākie šo jonu pārstāvji spēj piedalīties tālākajā fragmentācijas procesā, zaudējot alkēna molekulas un veidojot ar sēra atomu stabilizētus katjonus (sk. 1.9. att., B, C un D).

Autori pierādīja, ka savienojums I(1) aktivācijas rezultātā zaudē metāntiola molekulu. Šajā procesā novēro jonu ar $m/z=109$ (sk. 1.9. att., A), kuram atbilst 1,2-dimetilpirimidīnija

struktūra, līdzīga tai, kas veidojas imidazoliņu saturošo spirtu un karbonskābju fragmentācijā (sk. 1.4.1. un 1.4.2. apakšnodaļas).

Sulfīdiem I(1) un I(2), atšķirībā no augstākiem homoloģiem I(3) un I(6), raksturīga mazmolekulāru fragmentu atšķelšanās. Pirmais no tiem zaudē dimetilsulfīda molekulu, veidojot jonu ar m/z 97. Otrais atšķēl etilēna molekulu, veidojot jonu ar $m/z=143$ (1.9. att., B). Tālākā jona ar m/z 143 fragmentācija saistīta ar konkurējošiem $\text{CH}_3\cdot$, $\text{CH}_3\text{S}\cdot$ un CH_3NC zudumiem.

Tālāk apskatīta sēra atoma oksidēšanās pakāpes ietekme uz imidazoliņu saturošu savienojumu fragmentāciju. Attēlā 1.10. parādīta imidazoliņu saturošā sulfona un sulfoksīda SID shēma.

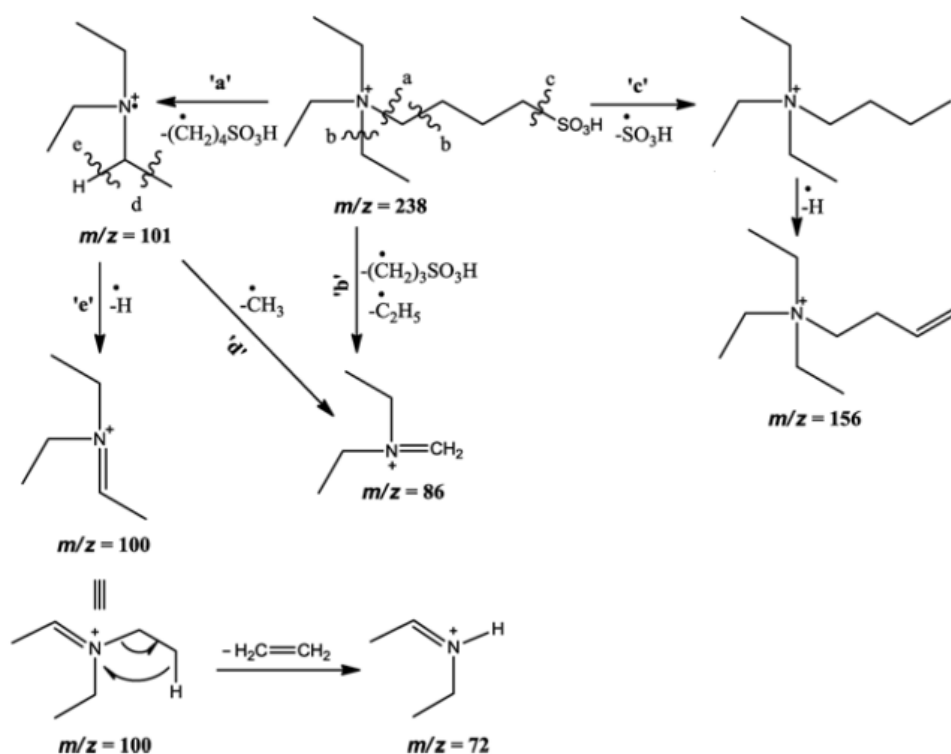


1.10. att. Sulfoksīda un sulfona grupas saturošu jonu šķīdrumu fragmentācijas shēma [8]

Abu savienojumu fragmentācijas gaitā novēro mazmolekulāru S-saturošo skābju eliminēšanos, kas izraisa jona ar m/z 137 veidošanos. Sulfonam II(3) raksturīga sulfēnskābes atšķelšanās, bet sulfoksīds III(3) zaudē sulfīnskābes molekulu. Šajos procesos veidojas jons (m/z 137), kas piedalās tālākajā fragmentācijā, zaudējot C_2H_4 , CH_3NC un $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_2$. Atšķirībā no sulfona II(3), sulfoksīda III(3) gadījumā iespējama arī 1,2-dimetilimidazola molekulas eliminēšanās. Šī procesa rezultātā parādās jons ar m/z 121, kas kļūst par vairāku mazmolekulāro fragmentu ($m/z=57, 62, 65$ un 78) priekšteci [8].

1.4.5. Sulfonskābes grupu saturošo jonu šķidrumu fragmentācija

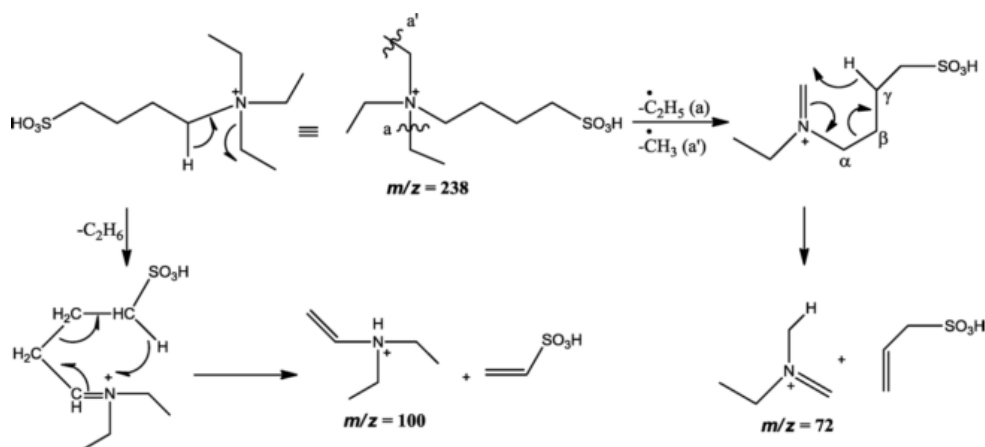
Zināmi savienojumi, kuru struktūrā ietilpst sulfonāta un kvaternizētā slāpekļa grupas, savienotas savā starpā ar alkilķēdi. Šādi savienojumi var reaģēt ar stiprām skābēm, veidojot jonu šķidrumus ar Brensteda skābju īpašībām, kas dod iespēju tos izmantot organiskajā sintēzē, piemēram, kā šķīdinātājus vai dažu reakciju katalizatorus [53]. Šādu savienojumu īpašības ir pētītas SID apstākļos. 4-(Trietilamonio)-butān-1-sulfonskābes fragmentāciju raksturo piemērs [54].



1.11. att. 4-(Trietilamonio)-butān-1-sulfonskābes fragmentācijas shēma [54]

Sākuma fragmentācijas stadijas raksturo homolītiskā šķelšanās, kas ir saistīta ar butānsulfonskābes (sk. 1.11. att., a), propānsulfonskābes (sk. 1.11. att., b) un hidrogensulfīta radikāļu (sk. 1.11. att., c) zudumiem. Šo procesu rezultātā veidojas virkne slāpekli saturošo katjonradikāļu, kas tālāk šķeļas atbilstoši α -šķelšanās mehānismam, veidojot imīnija jonus ar m/z 86 un 100. Tālākajos fragmentācijas posmos joni veido amīniem raksturīgus mazmolekulārus fragmentus (nav parādīti) pēc alkēnu vai alkānu molekulu atšķelšanās. Piemēram, jons ar m/z 86 pakāpeniski pārvēršas par joniem ar m/z 54 un 30 pēc divu etilēna molekulas zudumiem. Darbā [54] ir izvirzīta hipotēze, ka joni ar m/z 100 un 72 var veidoties

ne vien atbilstoši augstāk aprakstītiem maršrutiem, bet arī MakLafertī pārgrupēšanās rezultātā (sk. 1.12. att.).



1.12. att. Imīnija jonu ar m/z 100 un 72 veidošanās, saskaņā ar alternatīvo MakLafertī mehānismu [54]

Šis mehānisms ir iespējams, jo dotie joni satur γ -ūdeņraža atomus un imīnija grupu, bet nekādi papildus eksperimenti netika veikti, lai to apstiprinātu. Spriežot pēc literatūras datiem, MakLafertī pārgrupēšanās ir reti sastopams process pārskaita elektronu jonu SID pētījumos [55]. Dažreiz tas notiek tālu no lādiņa centra specifisku struktūras elementu dēļ [56].

Minētā savienojuma SID fragmentācija EIJ- režīmā nebija informatīva [54]. Autori demonstrēja, ka negatīvi lādētā daļiņa atbilst 4-(trietilamonio)-butān-1-sulfonskābes asociātam ar sulfāta anjonu. Dotais asociāts tālāk disociē, veidojot HSO_4^- daļiņu, kas, savukārt, veido dominējošu fragmentu ar m/z 80, kas atbilst sēra trioksīda anjonam vai anjonradikālim. Šāda daļiņa parasti veidojas daudziem sulfonskābes grupu saturošiem savienojumiem SID apstākļos [57, 58]. Autori novēroja arī alkilķēdes sabrukšanas fragmentus, bet to interpretāciju apgrūtināja zemā relatīvā intensitāte.

Kopumā, izvērtējot informāciju par jonu šķidrumu atvasinājumu gāzes fāzes īpašībām, var pamanīt, ka fragmentāciju mehānismi ir atkarīgi gan no funkcionālās grupas, gan no alkilķēdes garuma, kas atdala funkcionālu grupu no aizvietotā imidazola gredzena. Jaunu grupu ievadīšana molekulā var izraisīt arī neparastus fragmentācijas un pārgrupēšanās procesus. Protams, pastāv arī līdzīgi procesi, kuri nav atkarīgi no funkcionālās grupas. Starp tiem ir terminālās dubultsaites veidošanās alkilimidazoliņa jonu šķidrumu atvasinājumiem, kuri satur hidroksil-, estera, sulfoksīda un sulfona grupas alkilķēdē, vai pārgrupēšanās ar alkilpirimidīnija jonu veidošanos zemākajiem hidroksil-, karboksil-, sulfīda, sulfoksi – un sulfona grupu

saturošiem alkilimidazolija jonu šķīdumiem. Doto procesu pētījumi var palīdzēt tālākai šāda veida savienojumu identifikācijai un kvantitatīvai MS un MS² noteikšanai, savukārt jaunu daļiņu un pārvērtību atklāšana palīdz analīta uzbūves pamatošanā.

1.5. Elektroizsmidzināšanas jonizācijas izmantošana nekovalento struktūru pētīšanai šķīdumos un gāzes fāzē

EIJ procesa īpatnība ir analīta uzlādēšanās šķīdumā un tālākā pārnese uz gāzes fāzi. Tas liek uzskatīt, ka metode varētu būt piemērota dažādu šķīdumā esošo līdzsvaru pētīšanai. Īpaša nozīme metodei ir dažādu kompleksu veidošanās pētīšanai šķīdumos, jo šie procesi praktiski vienmēr ietver arī lādētās daļiņas. Līdz ar to, pētot šķīdumu, kas satur kompleksu un ligandus ar EIJ – MS, var iegūt informāciju par kompleksa stabilitāti. Savukārt, ja papildus izmanto arī tandēmmasspektrometriju, var izpētīt kompleksa uzbūvi.

Lielākā daļa pētāmo kompleksu piedalās dažādos šūnu procesos. Tādas bioloģiski svarīgas molekulas, kā proteīni vai DNS, organismā var saistīties ar dažādiem ligandiem, piemēram, slimības gaitā. Zinot, kā šīs mijiedarbības notiek un cik tās ir stipras, var izpētīt atbilstošos bioloģiskos procesus [59]. Šajā sakarā literatūrā plaši tiek apskatīta lielmolekulāro kompleksu veidošanās. Tie var veidoties starp enzīmu un substrātu [59], proteīnu un ligandu [60], diviem proteīniem [61], antigēnu un antivielu [62], kā arī citām vielām. Kompleksu veidošanās starp mazmolekulārajām vielām arī tiek plaši pētīta. Literatūrā ir atrodama informācija par dažādu makrociklu un metāla vai amonija jonu [12], ciklodekstrīnu un dažādu ligandu [13, 63], kaliks[n]arēnu un ligandu [14, 64], aminoskābju un dažādu katjonu [65, 66] un anjonu [67] kompleksiem. Tālāk tiks apskatītas EIJ lietošanas perspektīvas kompleksu līdzsvara aprakstam un stabilitātes konstanšu noteikšanai.

1.5.1. Nekovalento struktūru stabilitāte EIJ apstākļos

Nekovalento struktūru veidošanās ir atkarīga no mijiedarbību veida, kas tur kompleksa komponentus kopā. Dažādus mijiedarbību veidus var apskatīt 1.13. att.

Mijiedarbību veids	Formula	Nosaukums
lādiņš - lādiņš	$\frac{Q_1 Q_2}{\pi \epsilon \epsilon_0 r}$	Kulona enerģija
lādiņš - dipols (fiksēts dipols)	$\frac{Qu \cos \theta}{4\pi \epsilon \epsilon_0 r^2}$	
lādiņš - brīvi rotējošs dipols	$\frac{Q^2 u^2}{6(4\pi \epsilon \epsilon_0)^2 k T r^4}$	
dipols - dipols (fiksēts dipols)	$-\frac{u_1 u_2}{4\pi \epsilon \epsilon_0 r^3} (2 \cos \theta_1 \cos \theta_2 - \sin \theta_1 \cos \phi \sin \theta_2)$	
dipols - dipols (brīvi rotējošs)	$-\frac{u_1^2 u_2^2}{3(4\pi \epsilon \epsilon_0)^2 k T r^6}$	Kīsona enerģija
lādiņš - nepolārās mijiedarbības	$-\frac{Q^2 \alpha}{2(4\pi \epsilon \epsilon_0)^2 r^4}$	
dipols - nepolārās mijiedarbības (fiksēts dipols)	$-\frac{u^2 \alpha (1 + 3 \cos^2 \theta)}{2(4\pi \epsilon \epsilon_0)^2 r^6}$	
dipols - nepolārās mijiedarbības (brīvi rotējošs)	$-\frac{u^2 \alpha}{(4\pi \epsilon \epsilon_0)^2 r^6}$	Debaja enerģija
nepolārās mijiedarbības-nepolārās mijiedarbības	$-\frac{3}{2} \frac{\alpha_{01} \alpha_{02}}{(4\pi \epsilon \epsilon_0)^2 r^6} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}$	Londona dispersijas enerģija
ūdeņraža saite	speciāls mijiedarbību veids	
hidrofilās mijiedarbības	speciāls mijiedarbību veids	
hidrofobās mijiedarbības	speciāls mijiedarbību veids	

1.13. att. Nekovalento mijiedarbību veidi. Apzīmējumi: Q – lādiņš, u – dipols, r – attālums, α – polarizējamība, ϵ – dielektriskā konstante, I – pirmais jonizācijas potenciāls, θ – leņķis starp dipolu un vektoru, kas savieno daļiņas, ϕ – otrā dipola leņķis polārajās koordinātēs [68]

Vienādojumi 1.13. att. apraksta dažāda veida mijiedarbību enerģijas starp divām daļiņām. Kulona mijiedarbības ir spēcīgas un molekulu mērogā darbojas lielā attālumā, kaut gan mijiedarbības enerģija ir atkarīga no reaģējošo daļiņu lādiņiem. Dipolu mijiedarbības atkarīgas no lādiņa zīmēm un attāluma, kā arī no dipolu savstarpējas leņķiskās orientācijas. Visām pārējām mijiedarbībām piemīt tikai pievilksanas raksturs. Daļiņas, kurām nav lādiņa, piedalās pievilksnās mijiedarbībās, pateicoties polarizējamībai. Visas apskatītās iedarbības var klasificēt pēc rakstura, kādā tās mainās atkarībā no attāluma. Redzams, ka Kulona mijiedarbības ir atkarīgas no $1/r$ savukārt van der Vālsa mijiedarbības – no $1/r^6$. Visas nekovalentās mijiedarbības ir atkarīgas no vides dielektriskās konstantes $1/\epsilon$. Tas ir ļoti svarīgs apstāklis kompleksu pētīšanai ar EIJ – MS metodēm. Šķīdinātāja iztvaikošanas rezultātā notiek vides dielektrisko īpašību maiņa, kas var palielināt vienu mijiedarbību īpatsvaru, vienlaikus samazinot citu. Informācija, sniegtā 1.13. att., rāda, ka visas mijiedarbības, kas balstās ar lādiņiem, dipoliem un polarizējamību, kļūst stiprākas šķīdinātāja iztvaikošanas rezultātā. Izņēmums ir hidrofobās mijiedarbības, kas ir izplatītas bioloģiskos objektos. Piemēram, natīvajā šķīdumā proteīnu hidrofobās daļas veido nekovalentas struktūras [69]. EIJ gaitā

šķīdinātāja iztvaikošanas rezultātā hidrofobais efekts pazūd un kompleksa subvienības atdalās viena no otras.

Ūdeņraža saites un hidrofīlās mijiedarbības ir vēl viena svarīga kompleksu stabilizējošo spēku klase. H-saišu enerģija bieži ir 10 – 40 kJ/mol intervālā. Šāda tipa mijiedarbības ir specifiskas, atkarīgas no vielu struktūras, tāpēc tās nevar aprakstīt ar vienkāršu matemātisku formulu. Pierādīts, ka elektrostatiskā potenciāla vērtības uz ūdeņraža atoma var izmantot ūdeņraža saišu stipruma aprakstam. Autori [70] atraduši, ka elektrostatiskā potenciāla vērtības un kompleksu mijiedarbības enerģijas ir lineāri saistīti lielumi.

No augstāk teiktā izriet, ka veicot kompleksu stabilitātes pētījumus ar EIJ – MS metodēm, jāņem vērā, ka dažos gadījumos stabilitāte šķīdumā var nekorelēt ar stabilitāti gāzes fāzē. Tāpēc, ir vērtīgi salīdzināt iegūtās stabilitātes konstanšu vērtības ar literatūras datiem vai arī izmantot vienu no tradicionālajām „šķīduma” metodēm kā kontroles metodi. Tālāk tiks apskatīta dažu eksperimentālo parametru ietekme uz nekovalento struktūru stabilitāti.

1.5.2. EIJ instrumentālo parametru ietekme uz nekovalento struktūru stabilitāti

Instrumentālie parametri, kurus izmanto nekovalento struktūru pētīšanai ar EIJ, bieži stipri atšķiras no tiem, kurus izmanto vielu ķīmiskai analīzei. Vairākos gadījumos ir jāatrod kompromiss starp instrumenta jutību un kompleksa stabilitāti. Viens no galvenajiem faktoriem, kas ietekmē kompleksa stabilitāti gāzes fāzē, ir iekšējā enerģija. Masspektrometros ar Z-tipa smidzinātāju jonu trajektorija un iekšējā enerģija tiek kontrolēta ar diviem konusveida elektrodiem – ieejas konusu un ekstraktoru (sk. 1.1. att.). Ieejas konuss atrodas starp atmosfēras spiediena reģionu (1 atm) un pirmās sūkņēšanās stadijas reģionu (1 Torr). Ekstraktors atrodas starp pirmās un otrās pakāpes sūkņēšanās stadijas reģioniem (10^{-3} Torr). Katrā no šiem reģioniem vēl paliek desolvācijas gāzes molekulas, ar kurām pārneses laikā var sadurties labīlie kompleksa joni. Sadursmju rezultātā var palielināties jonu iekšējā enerģija, kas izraisa kompleksa disociāciju [10, 11]. Tāpēc, strādājot ar EIJ, konusa un ekstraktora spriegums vienmēr paliek pie zemām vērtībām. No otras puses, konusa un ekstraktora spriegums nevar būt ļoti zems. Dzesēšanās efekta dēļ [71], kas notiek pirmās sūkņēšanās stadijas reģionā, neitrālās šķīdinātāja molekulas un paraugā esošie komponenti veido veselu virkni lādēto agregātu. Rezultātā masspektra interpretācija kļūst neiespējama.

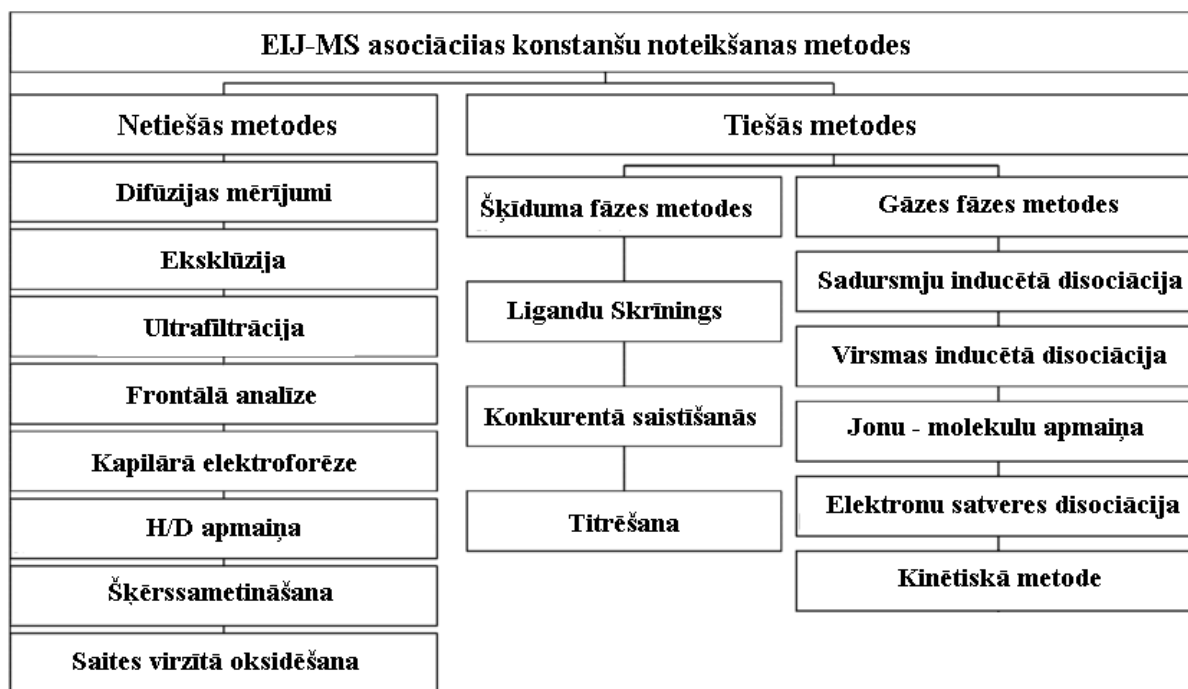
Ne mazāk svarīgs parametrs ir jonu avota un desolvācijas gāzes temperatūra, kas ir zināms kompleksu sabrukšanās aktivators. Tāpat kā konusa sprieguma gadījumā, temperatūrai

jābūt tādai, lai notiktu efektīva šķīdinātāja iztvaikošana. Gadījumos, kad novēro ievērojamu kompleksa stabilitātes atkarību no temperatūras, šķīdinātāja desolvācijai var palīdzēt konusa gāzes plūsmas palielināšana temperatūras palielināšanas vietā [10]. Proteīnu kompleksu pētīšanas gaitā ir demonstrēts asprātīgais ceļš jonu avota temperatūras ietekmes samazināšanai. Šķīdumam, kas saturēja pētamo kompleksu, pievienoja imidazolu 1 mM koncentrācijā. Rezultātā tika sasniegta palielināta proteīnu kompleksa stabilitāte [72]. Līdzīgs stabilizācijas efekts ir panākts, ievadot jonu avotā sēra heksafluorīdu [73]. Abos gadījumos stabilizāciju autori saista ar atdzesēšanās efektu imidazola iztvaikošanas rezultātā. Dažos gadījumos aprakstīto efektu panākt nebija iespējams, bet tas attiecas uz ļoti nestabiliem kompleksiem [74].

Kā izriet no iepriekšējiem apsvērumiem, pirms kompleksu analīzes ir jānodrošina to stabilitāte posmā no smidzinātāja līdz masu analizatoram. Tālākā diskusija veltīta dažādām kompleksu pētīšanās pieejām un ar tām saistītām problēmām.

1.5.3. Kompleksu asociācijas konstanšu noteikšana ar EIJ

Mijiedarbības stiprumu starp divām kompleksa sastāvdaļām var raksturot, izmantojot asociācijas (vai disociācijas) konstantes vērtību K , kas apraksta līdzsvaru starp kompleksu un ligandiem analīzes apstākļos. Pastāv vairākas tradicionālās metodes K noteikšanai šķīdumā – optiskā spektroskopija (UV/redzamās gaismas un fluorimetrija), *ITC*, *DSC* un *KMR* [11, 68, 75]. Katrai no šīm metodēm ir savas priekšrocības un trūkumi, savukārt masspektrometrijai ir vismaz divas priekšrocības, salīdzinot ar iepriekš minētām metodēm. Pirmkārt, masspektrometriskajā eksperimentā var tieši noskaidrot kompleksa stehiometriju, izmantojot m/z informāciju. Otrkārt, masspektrometrijā var sasniegt augstu jutību un izmantot mazāku parauga daudzumu, kas ir svarīgi, ja paraugs ir dārgs. Šie faktori kopā ar to, ka EIJ gaitā var analizēt vielas ar atšķirīgām īpašībām, noteica vairāku metodoloģiju attīstību, kuru kopums atspoguļots 1.14. att.



1.14. att. EIJ asociācijas konstanšu noteikšanas metožu klasifikācija [75]

Kā redzams no 1.14. att., izmantotās metodes var iedalīt tiešās un netiešās [76]. Tiešo metožu izmantošanas gaitā, komplekss tiek saglabāts šķīdumā un tālāk pārnest uz gāzes fāzi, izmantojot „maigo” jonizācijas metodi. Interesējošo kompleksu signālu intensitātes masspektrā var izmantot līdzsvara koncentrāciju aprēķināšanai šķīdumā.

Vienkāršākajā gadījumā tiek pagatavots šķīdums, kas satur vielas, no kurām veidojas komplekss. Šo šķīdumu ievada EIJ – MS sistēmā un, izvērtējot iegūto masspektru, nosaka, cik lielā mērā ligandi veido kompleksu. Šāda viena punkta analīze ir ļoti ātrs veids, lai iegūtu kvalitatīvu informāciju par kompleksa veidošanos, bet rodas sarežģītjumi, ja šo pašu eksperimentu grib izmantot kvantitatīvās informācijas iegūšanai par kompleksa stabilitāti. Problēmas rada atšķirīga jonu pārnese efektivitāte no šķīduma uz gāzes fāzi. Rezultātā jonu intensitātes masspektrā neatspoguļo reālās jonu koncentrācijas pētāmajā šķīdumā. Tāpēc ir jānosaka katram jonam atbilstošais detektora atsaucē faktors, kas saista koncentrācijas šķīdumā ar jonu intensitāti [77, 78].

Otrs aspekts, kas jāņem vērā, ir nespecifisko agregātu veidošanās iespēja EIJ – MS apstākļos. Tāpēc papildus veic ligandu skrīninga procedūru, kas palīdz atšķirt specifiskās mijiedarbības no nespecifiskajām. Ligandu skrīninga eksperimentos ķīmiski izmaina struktūru blakus reakciju centram, lai specifisko mijiedarbību gadījumā kompleksam atbilstošais signāls pazustu. Piemēram, ja pētāmā kompleksa veidošanā piedalās aminoskābe lizīns, tad to ir

iespējams pārveidot par homo-arginīnu [68]. Bieži izmanto arī metilēšanas un acilēšanas reakcijas [79].

Lai samazinātu atkārtojamības kļūdas, pētot vienas vielas mijiedarbības ar vairākiem ligandiem, iespējams realizēt konkurentās saistīšanās eksperimentus [80]. Metodes priekšrocība ir apstākļi, ka vairāki ligandi piedalās saistīšanās procesā ar interesējošo vielu viena šķīduma ietvaros, kas samazina variācijas kļūdas un ietaupa laiku. Savukārt, veicot šādus eksperimentus, jāņem vērā signāla apspiešanas efektu palielināta varbūtība, kas kļūst izteiktāka, palielinoties šķīdumā esošo komponentu daudzumam [27].

Kā jau minēts iepriekš, kompleksam un ligandiem atbilstošo masspektra intensitāšu ievietošana līdzsvara konstantes izteiksmē nav izmantojama precīzu asociācijas konstanšu aprēķināšanai. Vienīgais izņēmums pieļaujams gadījumam, kad viens no ligandiem ir daudz lielāks nekā otrs, piemēram, proteīna – medikamenta kompleksu gadījumā. Tad var pieņemt, ka paša proteīna un tā kompleksa ar mazmolekulāro savienojumu detektora atsauces faktori ir vienādi (jo fizikāli – ķīmiskās īpašības praktiski neatšķiras), un asociācijas konstanti var viegli aprēķināt no vienas analīzes datiem. Visos pārējos gadījumos, piemēram, pētot kompleksu veidošanos starp mazmolekulārajām vielām, jāveic speciāli eksperimenti. Īpaši svarīga problēma šajos eksperimentos saistīta ar to, ka atšķirībā no ligandu līdzsvara koncentrācijām, kompleksa līdzsvara koncentrāciju praktiski nav iespējams atrast eksperimentāli (asociācijas konstante arī nav zināma). Tāpēc šajā jomā ir izstrādātas vairākas kalibrācijas metodes asociācijas konstantes noteikšanai, kur kompleksa līdzsvara koncentrācija netiek izmantota. Piemēram, zināma metode, kur K iegūst, veicot kalibrāciju pret kompleksu ar zināmu K vērtību [81]. Cita metode [82], kura izmantota arī šajā darbā, balstās uz teorētiski izveidotā vienādojuma (sk. 2.2. vien.) pielāgošanu eksperimentāli iegūtiem datiem, lai ar statistikas programmas palīdzību atrastu detektora atsauces faktoru un asociācijas konstantes vērtību vajadzīgajam kompleksam. Vēlāk šo pašu autoru grupa izstrādāja vēl vienu metodi kompleksa asociācijas konstanšu noteikšanai [83]. Metodē tiek izmantots iekšējais standarts un masas bilances vienādojumu sistēma, kuru var atrisināt, izmantojot vienkāršu matricu algebru, rezultātā iegūstot kompleksa detektora atsauces faktoru.

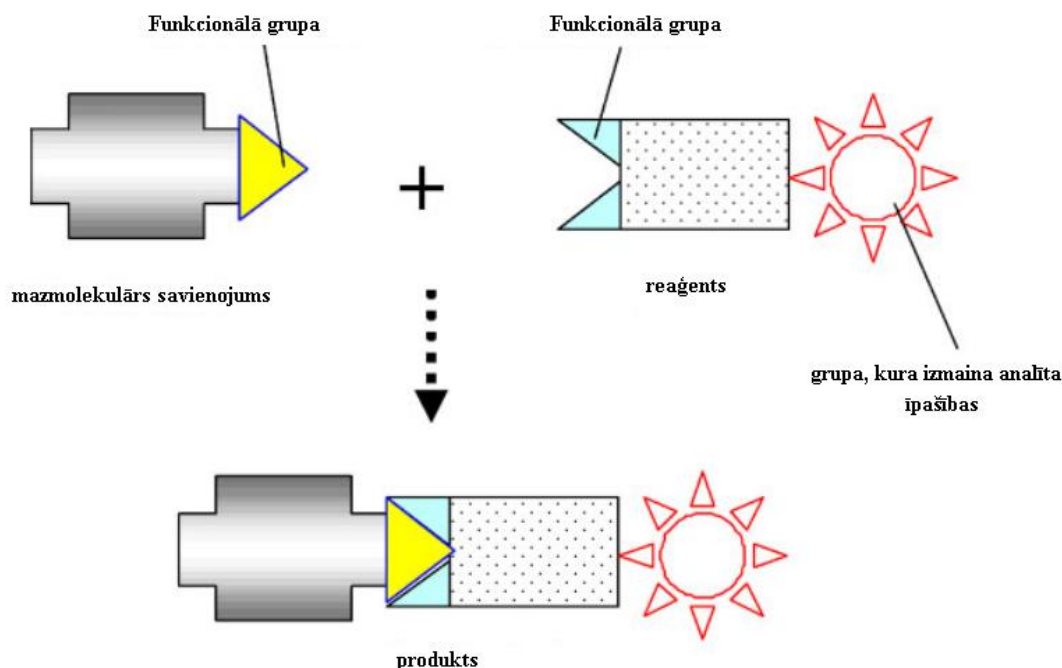
Kā izriet no 1.14. att., masspektrometrija dod iespēju izvērtēt kompleksu stabilitāti ne tikai šķīdumā, bet arī gāzes fāzē. Šajā gadījumā stabilitāte tiek raksturota bez šķīdinātāja, tāpēc tās tieša salīdzināšana ar stabilitāti šķīdumā ir sarežģīta. Neskatoties uz šo faktu, pastāv daži parametri kompleksu stabilitātes raksturošanai gāzes fāzē. Viens no tiem ir konusa sprieguma vērtība (CV_{50}), pie kuras jonu avotā sadalās 50 % no sākotnējā kompleksa [84]. Šo vērtību parasti atrod, mainot konusa sprieguma vērtību kādā intervālā līdz kompleksa signāla pilnīgai

izzušanai. Grafisks kompleksa signāla attēlojums atkarībā no konusa sprieguma dod iespēju noteikt CV_{50} vērtību. Līdzīga metode aprakstīta, izmantojot tandēmmaspektrometru. Pētāmo kompleksu izolē no pārējiem joniem un, pakāpeniski palielinot kompleksa aktivāciju, ļauj tam sadalīties par fragmentiem. Attēlojot grafiski kompleksa intensitāti atkarībā no sadursmju enerģijas (divu kvadropolu tipa masspektrometru gadījumā), atrod enerģijas robežvērtību ($E_{1/2}$), kurā sadalās 50 % no sākotnējā kompleksa [67]. Abas aplūkotās metodes ir ātrākas par šķīdumu metodēm, tāpēc tās var izmantot kā papildinājumu asociācijas konstantes mērījumiem, lai novērtētu mijiedarbību veidu šķīdumā un gāzes fāzē.

Nobeigumā apskatīsim netiešo metožu grupu, kas paliek arvien populārāka lielmolekulāro kompleksu pētījumos, piemēram, zāļu izstrādes stadijā. Šajās metodēs vairāki ligandi – kombinatoriālo bibliotēku locekļi – veido kompleksus ar lielmolekulāru savienojumu (piem., receptora proteīnu). Kompleksus atdala ar vienu no 1.14. att. redzamām netiešām metodēm un analizē, izmantojot masspektrometriju, lai identificētu tos ligandus, kuriem ir afinitāte pret proteīnu un noteiktu liganda saistīšanas vietu [85, 86]. Tas nozīmē, ka netiešās metodes dod iespēju izolēt kompleksus un pētīt tos atsevišķi. Liels metožu trūkums ir to lietošanas ierobežojumi lielmolekulāro struktūru pētīšanai. Tāpēc mazmolekulāro kompleksu raksturošanai jāizmanto viena vai vairākas tiešās metodes.

1.6. Nekovalento struktūru loma analītisko EIJ – MS metožu selektivitātes uzlabošanā

EIJ – MS metodes arvien plašāk izmanto mazmolekulāru polāro analītu kvalitatīvajā un kvantitatīvajā analizē [87]. Neskatoties uz to, ka modernai masspektrometrijas aparatūrai ir iespējas krietni paaugstināt analīzes jutību un specifiskumu (nano – un desorbcijas EIJ, tandēmmaspektrometrija, augstas izšķiršanas MS), komplicētos gadījumos, kad analizējamā paraugā atrodas vairāki komponenti, labus rezultātus sasniegt ir grūti. Mazmolekulāro savienojumu analīzes gaitā var rasties vairākas problēmas: zema signāla un fona attiecība, zema jonizācijas efektivitāte, signāla apspiešanas efekti, šķīdības problēmas pie lielākām organiskā šķīdinātāja koncentrācijām, adsorbcija uz stikla un metāla virsmām u.c. Lai novērstu lielāko daļu no minētām problēmām, jāizmaina analīta struktūra, izmantojot atvasinājumu pagatavošanu jeb derivatizāciju (sk. 1.15. att.).



1.15. att. Derivatizācijas reakcijas shēma [88]

Kā redzams 1.15. att., derivatizācijas rezultātā mainās analīta struktūra un fizikāli – ķīmiskās īpašības. Tas savukārt stipri ietekmē vielas uzvedību hromatogrāfiskās un masspektrometriskās analīzes gaitā, t.i., izmaina selektivitāti. No vienas puses, derivatizācijas reakciju klāsts ir diezgan plašs, kas dod iespēju uzlabot jutību un selektivitāti vielām, kuras pieder vairākām savienojumu klasēm [88, 89], no otras – modernajās metodēs būtiska loma ir analīzei nepieciešamā laika patēriņam. Ņemot vērā to, ka derivatizācijas gaitā jākontrolē vairāki parametri (reakcijas temperatūra un laiks, produkta iznākums, reakcijas vide) un jāatbrīvojas no reaģentu pārākuma, var secināt, ka dažos gadījumos ķīmiskai derivatizācijai var būt zema efektivitāte. Arī tad, ja derivatizāciju veic „online” režīmā, lielu laika ieguldījumu prasa reaktora konstruēšana un pielāgošana sistēmai.

Ievērojot derivatizācijas augsto potenciālu ķīmiskajā analīzē, ķīmiķi ir centušies atrast optimumu starp patērēto laiku un derivatizācijas iznākumu. Dažreiz to izdodas panākt, derivatizācijas nolūkiem izmantojot nevis kovalento saišu rašanos starp analītu un reaģentu, bet nekovalento struktūru veidošanos, kas ir raksturīga EIJ procesam. Zināms, ka stabili kompleksi var rasties gan šķīdumā pirms EIJ – MS analīzes, gan tieši EIJ gaitā šķīdinātāja iztvaikošanas rezultātā [10]. Nekovalento struktūru stabilitāte ir daudz mazāka, nekā kovalenti saistītām struktūrām, bet pareiza apstākļu kontrole dažreiz dod iespēju saistīt analītu kompleksā ar labu iznākumu. Turklāt, lai kompleksu veidošanās būtu pilnīgāka, jāpanāk vienīgi analīta un reaģenta efektīva sajaukšanās, jo kompleksi veidojas ātri. Lietojot šādu pieeju, ir iespējams

efektīvi uzlādēt analītu, izmainīt analīta polaritāti un nobīdīt tā signālu lielāku masu diapazonā, izmainot analīzes selektivitāti. Nepieciešams atzīmēt, ka gadījumos, kad kompleksi veidojas ar augstu selektivitāti, analīzi var veikt pat bez parauga sagatavošanas un atdalīšanas metodēm, ievadot to tieši kustīgajā fāzē. Šādu metodi sauc par plūsmas injekciju analīzi (PIA, *flow injection analysis*) [90]. Savienojot PIA ar EIJ – MS, var krietni samazināt analīzes laiku.

Tālāk tiks apskatīti konkrēti nekovalento struktūru izmantošanas piemēri EIJ – MS analīzēs.

1.6.1. Alkilamīnu kompleksu izmantošana EIJ – MS

Kā jau minēts iepriekš, EIJ+ procesā var veidoties dažāda tipa lādētās daļiņas, kā $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$. Rezultātā signāls tiek sadalīts starp šīm daļiņām, kas samazina metodes jutību, atkārtojamību un dinamisko diapazonu. Darbā [91] parādīts, ka pievienojot dažādu alkilamīnu piedevas analizējamam šķīdumam, var pilnībā novērst aduktu veidošanos un panākt $[M+alkilamīns+H]^+$ kompleksu rašanos. Autori izpētīja arī struktūras ietekmi uz kompleksu veidošanos. Rezultāti parādīja, ka kompleksu veidošanās spēja korelē ar brīvo ūdeņraža atomu skaitu pie N atoma. Rezultātā secināts, ka labāk šajā reakcijā stājās pirmējie amīni, jo tiem ir vairāk iespēju veidot H–saites. Otrs faktors, kas ietekmē saistīšanās efektivitāti, ir amīna hidrofobitāte. Izmantojot šo metodi 10 dažādu vielu gadījumā, bija iespējams palielināt jutību līdz 7 reizēm, salīdzinot ar gadījumu, kad alkilamīnu nepievienoja. Turklāt autoriem izdevās būtiski paplašināt linearitātes diapazonu.

Cita autoru grupa [92] izstrādāja metodi paklitaksela un docetaksela noteikšanai plazmā, izmantojot kompleksu veidošanās ar 1-oktilamīnu AEŠH – MS apstākļos. Izmantojot šo metodi, tika sasniegtas zemas detektēšanas un kvantificēšanas robežas (0,5 un 0,9 ng/ml). Vairāku eksperimentu rezultātā autori secināja, ka jutības paaugstinājums saistīts ar kompleksa virsmas aktivitātes palielināšanos salīdzinājumā ar $[M+Na]^+$ adukta virsmas aktivitāti.

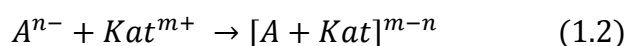
1.6.2. Acetāta kompleksu izmantošana EIJ – MS

Nekovalento struktūru veidošanos iespējams sasniegt arī EIJ- režīmā. Pievienojot kustīgai fāzei 1% etiķskābi un strādājot pie maziem konusa spriegumiem, darbā [93] autori novēroja kvantitatīvo kortikosteroīdu molekulu asociāciju ar acetāta jonu, veidojot $[M+CH_3COO^-]$ kompleksu. Darbā tika demonstrēta skābes pK_a vērtības ietekme uz kompleksa

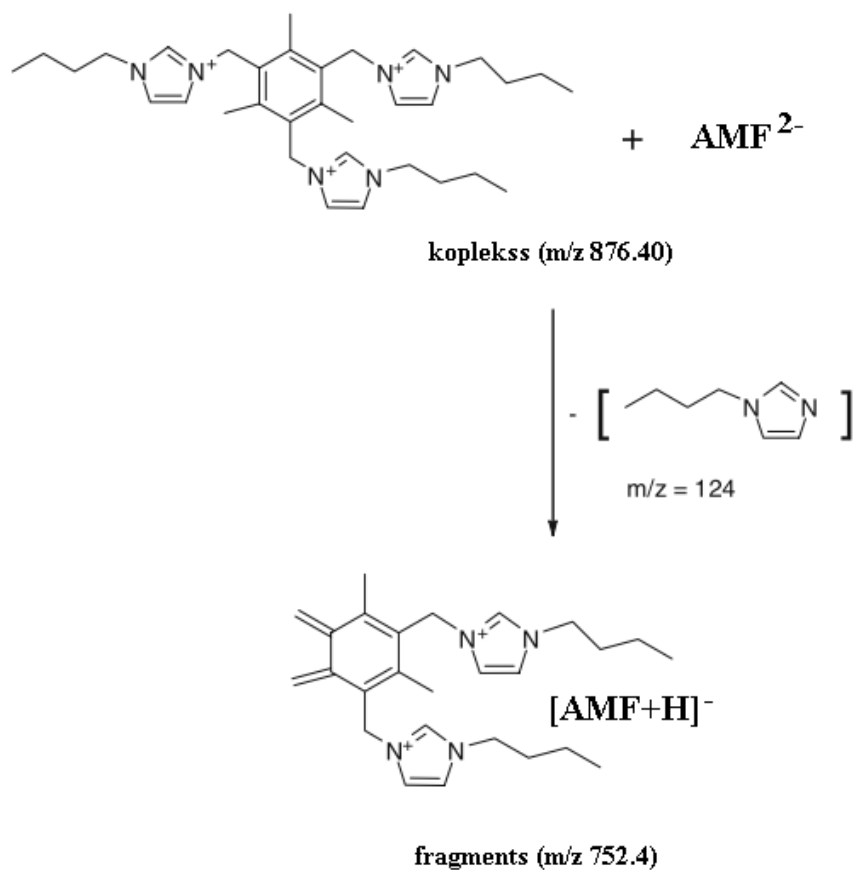
intensitāti. Eksperimentu rezultātā autori secināja, ka vislielāka kompleksa intensitāte ir sasniegta gadījumos, kad pievienotās skābes pK_a ir lielāka. Turklāt autori parādīja, ka kortikosteroīdu kompleksi var veidot specifiskus fragmentus SID apstākļos. Šo īpašību izmantoja, lai izstrādātu metodi kortikosteroīdu noteikšanai cilvēka urīnā ar augstu jutību un selektivitāti. Darbā [93] parādīts, ka līdzīgo efektu rāda ne tikai paši kortikosteroīdi, bet arī iespējamie metabolīti.

1.6.3. Organisko polikatjonu izmantošana EIJ – MS

Zināms, ka organiskie polikatjoni spēj piedalīties asociācijā ar dažāda tipa anjoniem (sk. 1.2. vien.).



Šajā gadījumā $n < m$, un kompleksa kopējais lādiņš ir pozitīvs. Darbā [94] šo īpašību izmantoja, lai izstrādātu metodi 28 dažādu mononukleotīdu noteikšanai pozitīvo jonu skenējumā. Šim nolūkam autori ieguva 11 imidazolija un fosfonija grupu saturošus di –, tri – un tetrakatjonus. Katru no šīm vielām pievienoja kustīgai fāzei, kura saturēja mononukleotīda savienojumus. Rezultātā veidojās pozitīvi lādētie kompleksi ar lielām molmasām, kurus nosaka, izmantojot *SIR* un *MRM* metodes. Salīdzināšanas mērķim veiktā mononukleotīdu noteikšana arī bez jonu pāru reaģenta pievienošanas negatīvo jonu skenējumā (klasiskie apstākļi) *SIR* un *MRM* režīmā. Kā arī bija sagaidāms, klasiskajos apstākļos iegūtas detektēšanas robežas savienojumu lielākai daļai, bija krietni lielākas, nekā pēc jonu pāru reaģentu pievienošanas. Piemēram, adenozinmonofosfāta (AMF) gadījumā detektēšanas robežas, noteiktās pirms un pēc reaģenta pievienošanas *SIR* režīmā, ir attiecīgi 1,5 un 0,075 ng. Izmantojot *MRM* režīmu pozitīvo jonu skenējumā, detektēšanas robežu varēja samazināt līdz 0,0075 ng. Papildus selektivitātes un jutības pieaugumu autoriem izdevās sasniegt, pateicoties unikālai kompleksu fragmentācijai *MRM* režīmā. Autori demonstrēja, ka mononukleotīdu kompleksi ar organiskiem polikatjoniem piemīt augsta stabilitāte, tāpēc sadursmju šūnā nenotiek kompleksu lielākai daļai raksturīga disociācija uz sākuma komponentiem. Savukārt, pēc kompleksa aktivācijas novērota reaģenta molekulas sānu ķēdes atdalīšanās (sk. 1.16. att.).

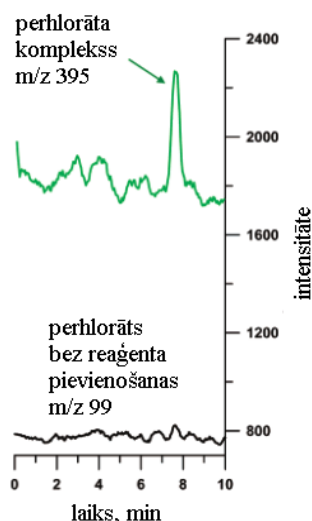


1.16. att. Organiskā trikatjona un AMF kompleksa fragmentācijas shēma [94]

Kā redzams no 1.16. att., SID apstākļos veidojas kompleksa fragments, kas satur par vienu 1-butylimidazola vienību mazāk nekā sākotnējā kompleksā. Neskatoties uz to, ka autori neizraisa hipotēzes par šāda tipa īpatnējo kompleksu stabilitāti un fragmentācijas virzienu, viņi atzīst, ka aromātiskā polikatjonu daba ir nepieciešama, lai uzlabotu kompleksu stabilitāti. Vislabākus rezultātus izdevās sasniegt ar reaģentiem, kas sastāv no tri – vai tetrakatjoniem ar mezitilēna pamatstruktūru un vairākiem imidazolija cikliem. Pēc autoru vārdiem, šai metodei ir liels potenciāls organisko fosfātu noteikšanai, jo metodi var kombinēt ar vielu atdalīšanās metodēm, piemēram, AEŠH vai kapilāro elektroforēzi. Nesen šādu pieeju autori nodemonstrēja sfingolipīdu noteikšanai ar EIJ – MS [95]. Izmantojot optimāli piemeklētus dikatjonus kopā ar AEŠH, autori sasniedza femtomola kārtas detektēšanas robežas 14 sfingolipīdiem.

Vēl spilgtāk organisko polikatjonu lomā demonstrē to izmantošana neorganisko anjonu noteikšanā. Mazu neorganisko anjonu analīzes var veikt, izmantojot jonu vai jonu pāru hromatogrāfiju ar elektrovadītspējas vai UV detektoru, bet sarežģītu paraugu gadījumos šīm metodēm trūkst selektivitātes. Šajos gadījumos pastāv iespēja kombinēt dotās metodes ar EIJ – MS, bet, lai sasniegtu labus rezultātus, nepieciešams atrisināt vairākas problēmas, kas

saistītas ar EIJ dabu. Mazie neorganiskie anjoni uzlādēšanās procesā vienmēr paliek mikropilienu iekšējā daļā un netiek uz virsmas. Tāpēc nākas palielināt spriegumu, lai samazinātu mikropilienu izmēru un palielinātu anjonu atrašanās varbūtību uz pilienu virsmas. Sprieguma palielināšanas rezultātā var notikt gāzes izlādes process, kas palielina fona līmeni, samazina izsmidzināšanas stabilitāti, metodes jutību un atkārtojamību. Šo iemeslu dēļ neorganisko anjonu analīze ar EIJ – MS negatīvo jonu skenējumā kļūst apgrūtināta. No otras puses, var izmantot anjonu tieksmi veidot kompleksus ar organiskiem polikatjoniem (sk. 1.2. vien.) un veikt analīzi pozitīvo jonu skenējumā, kā tas ir izdarīts darbā [96] perhlorāta jona noteikšanai pienā, ūdenī un urīnā. Darba gaitā autori izmēģināja tetraalkilamonija, alkilimidazolija un pirolidīnija dikatjonus un secināja, ka pēdējiem ir lielāka tieksme veidot kompleksus ar perhlorātu. Reāģentus pievienoja efluentam no jonu hromatogrāfiskās kolonnas, kas saturēja perhlorātu. Izmantojot minēto pieeju, autori novēroja, ka perhlorāta kompleksam ar organisko dikatjonu atbilstoša signāla intensitāte ir daudz lielāka, nekā perhlorāta signāla intensitāte, iegūta negatīvo jonu skenējumā bez dikatjona pievienošanas (sk. 1.17. att.).



1.17. att. Hromatogrammas, iegūtas perhlorāta (100 ng/L) analīzes gaitā ar EIJ – MS metodi ar un bez organiskā dikatjona pievienošanas kustīgai fāzei [96]

No 1.17. att. izriet, ka, pievienojot organisko dikatjonu kustīgai fāzei, var sasniegt ievērojami augstāku jutību perhlorāta analīzei. Otrs svarīgs novērojums saistīts ar to, ka sulfāta joni, kas praktiski vienmēr sastopami lielā pārkāpumā, netraucē perhlorāta analīzei, pat tad, ja to saturs 30 reizes pārsniedz perhlorāta koncentrāciju. Metodes detektēšanas robeža, atbilstoši autoru veiktajiem eksperimentiem, ir 25 ng/L, kas ir ļoti labs rezultāts.

No visa iepriekš minētā izriet, ka kompleksu izmantošana EIJ – MS kvantitatīvajā analīzē nav guvusi plašu pielietojumu (izņemot daudzos piemērus metālu jonu noteikšanai,

izmantojot dažādus organiskus ligandus). Taču aprakstītie piemēri parāda lielu izmantošanas potenciālu citādi problemātiskos gadījumos. Nekovalento struktūru lietošana EIJ – MS dažreiz dod ļoti labus rezultātus ievērojami īsākā laikā, nekā kovalento atvasinājumu izmantošana. Kopumā, jāsecina, ka galvenais ierobežojošais faktors metodes izmantošanai ir kompleksu stabilitāte. Tāpēc ir jāizpēta pēc iespējas dziļāk kompleksu veidošanas mehānismi un to stabilitāti noteicošie faktori EIJ – MS apstākļos.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Reāģenti

Acetonitrils – $\geq 99,95\%$ tīrība, AEŠH – MS kvalitāte, *Carl Roth GmbH*;

Bora trifluorīda un dietilētera komplekss – tīrs, destilēts, *Aldrich*;

2-Bromoetānsulfonskābes nātrija sāls – 97% tīrība, *Peaxum*;

Bromūdeņražskābe (40%) – analītiski tīra, *Peaxum*;

1,4-Butānsultons - $\geq 99\%$ tīrība, *Aldrich*;

Deiterētā etiķskābe – 99% izotopu tīrība, *Aldrich*;

Deiterēts ūdens – $99,9\%$ izotopu tīrība, *Aldrich*;

Dejonizēts ūdens – AEŠH – MS kvalitāte, *Fluka*;

Dihlormetāns – $\geq 99,9\%$ tīrība, *TCI Chemicals*;

Dietilēteris – sauss, 99% tīrība, *LabScan*;

1,2-Dimetilimidazols – 98% tīrība, *Alfa Aesar*;

Etanols (96%) – *Carl Roth GmbH*;

Heksāns – GH kvalitāte, $99,9\%$ tīrība, *Fluka*;

Heksilamīns – 98% tīrība, *Aldrich*;

Hinolīns – 99% tīrība, *Aldrich*;

4-Hlorobutānskābes etilesteris – 99% , *Aldrich*;

2-Hloroetānskābes etilesteris – 99% , *Aldrich*;

Hloroforms – 99% tīrība, *LabScan*;

3-Hloropropānskābes etilesteris – 98% tīrība, *Aldrich*;

Hlorūdeņražskābe (36%) – analītiski tīra, *Aldrich*;

IRA-400 anjonīts (Cl^- formā) – *Aldrich*;

Izopropanols – 99% tīrība, AEŠH kvalitāte, *Aldrich*;

Jods – ķīmiski tīrs, *Peaxum*;

Metanols – $\geq 99,9\%$ tīrība, AEŠH – MS kvalitāte, *Aldrich*;

1-Metilimidazols – $>99,0\%$ tīrība, *Fluka*;

5-Metilcitozīna hidrohlorīds – 99% tīrība, *Aldrich*;

Nātrija borodeiterīds, NaBD_4 – izotopu tīrība 98% , *Aldrich*;

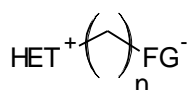
Nātrija hidroksīds – ķīmiskas analīzes kvalitāte, *Stanlab*;

Nātrija tiosulfāts – analītiski tīrs, *Peaxum*;

Nātrija sulfāts – bezūdens, analītiski tīrs, *Stanlab*;
 Nātrija sulfīts – bezūdens, $\geq 98\%$, *Aldrich*;
 N,N-Dimetilformamīds – destilēts, sauss;
 Piperidīns – 98% tīrība, *Aldrich*;
 Piridīns – 99% tīrība, *Aldrich*;
 Pirolidīns – 99% tīrība, *Aldrich*;
 Sērskābe (95 %) – *P.P.H „Standard”*;
 Skudrskābe – AEŠH – MS kvalitāte, *Fisher Scientific*;
 Slāpekļis – 99,9 % tīrs, *AGA*;
 Slāpekļskābe ($\geq 65\%$) – metālu noteikšanas kvalitāte, *Aldrich*;
 Sarkanais fosfors – attīrīts pēc karsēšanas ar ūdeni, filtrēšanas un žāvēšanas pie 110 °C, *Peaxum*;
 Sudraba nitrāts – analītiski tīrs, *Aldrich*;
 Tetrahidrofurāns – 99,8 % tīrība, *Penta*;
 Tiazols – 99% tīrība, *Aldrich*;
 Toluols – 99 % tīrība, *Penta*;
 Trietilamīns – 99% tīrība, *Aldrich*;

2.1.1. Analizētie cviterjonu tipa jonu šķidrums

Analizējamo vielu kopējā formula ir parādīta 2.1. att., bet apzīmējumu paskaidrojumi doti 2.1. tabulā.



2.1. att. Darbā izmantoto savienojumu kopējā struktūrformula, apzīmējumi doti 2.1. tab.

Shēmā (2.1) lietoto apzīmējumu atšifrējumi

Nr.	Het ⁺	n	FG ⁻	Apzīmējums tekstā
1.	1,2-Dimetilimidazolijs	2	SO ₃ ⁻	c
2.	1,2-Dimetilimidazolijs	3	SO ₃ ⁻	a
3.	1,2-Dimetilimidazolijs	4	SO ₃ ⁻	b
4.	1-Metilimidazolijs	1	CO ₂ ⁻	MeImEC
5.	1-Metilimidazolijs	2	CO ₂ ⁻	MeImPC
6.	1-Metilimidazolijs	3	CO ₂ ⁻	MeImBC
7.	1-Metilimidazolijs ¹	3	SO ₃ ⁻	MeImPS
8.	1-Butilimidazolijs ¹	3	SO ₃ ⁻	BuImPS
9.	1-Heksilimidazolijs ¹	3	SO ₃ ⁻	HImPS
10.	1-Oktilimidazolijs ¹	3	SO ₃ ⁻	OImPS
11.	1-Hinolīnijs	3	SO ₃ ⁻	HinPS
12.	1-Piridīnijs	3	SO ₃ ⁻	PyPS
13.	1-Tiazolijs	3	SO ₃ ⁻	TiaPS

Izmantoto deiterēto savienojumu **A1** un **A2** struktūrformulas var redzēt 3.3. att. (63. lpp.).

2.2. Izmantotā aparatūra

1. Analītiskie svāri *Precisa XB 220A*, precizitāte ± 0,0001 g;
2. *Shimadzu GC-2010* gāzu hromatogrāfiskā iekārta ar *Shimadzu AOC-20i* automātisko ievadīšanas sistēmu;
3. *Shimadzu GCMS-QP2010* kvadrupola tipa masspektrometrs ar elektronu triecienu jonizācijas avotu;
4. *Waters Micromass Quattro API* trīs kvadrupolu tipa masspektrometrs, ar elektroizsmidzināšanas jonizācijas jonu avotu;
5. *Waters Alliance 2690* augsti efektīvās šķīdumu hromatogrāfijas iekārta;

¹ Viela ir sintezēta LU Ķīmijas fakultātes Organiskās ķīmijas laboratorijā, attīrīšana veikta, izmantojot autora izstrādātas metodes

6. *Waters 600* augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas iekārta, kas sastāv no sūkņa ar vadības moduli (*600 E*), *Rheodyne 7725i* rokvadības injektora ar 100 µl cilpu un *Waters 486 UV* detektora;
7. *Restek Rtx-1 Ms* kapilārā hromatogrāfiskā kolonna, garums 30 m, sorbenta slāņa biezums 0,25 µm, iekšējais diametrs 0,25 mm;
8. *Waters Atlantis HILIC Silica* šķidrums hromatogrāfijas kolonna (150×2,1 mm, 3 µm daļiņu diametrs);
9. *Waters X-Terra MS* šķidrums hromatogrāfijas kolonna (150×2,1 mm, 3 µm daļiņu diametrs);
10. *Agela Tech Venusil C18* šķidrums hromatogrāfijas kolonna (150×10 mm, 10 µm daļiņu izmērs);
11. *SGE* 1 ml šļirce ar Luera uzgali;
12. *SGE* 10 µl šļirce gāzu hromatogrāfijas injekcijām;
13. *Hamilton* 100 µl šļirce AEŠH injekcijām;
14. *Biohit Proline* automātiskā pipete, 100 µl – 1 ml; kļūda ± 2 µl;
15. *Brand Transferpette S* automātiskā pipete, 10 – 100 µl, kļūda ± 0,1 µl.

2.3. Darba gaita

2.3.1. Cviterjonu tipa jonu šķidrums sintēze un attīršana

Izmantoto savienojumu sintēzes ir līdzīgas, tāpēc šeit apskatīti tikai reprezentatīvi piemēri. Savienojumu **a**, **b** un **c** sintēzes aprakstītas darbā [97].

3-(1-Hinolīnio)-propān-1-sulfonāts (HinPS, 2.1. Tab.). Apaļkolbā (5 ml) ielej 5 mmol hinolīna un izšķīdina to 1 ml toluola. Apaļkolbā ievieto magnētu un pievieno 5 mmol 1,3-propānsultona. Kolbu savieno ar atteces dzesinātāju un reakcijas maisījumu silda 70 °C 4 dienas. Rezultātā izkrīt baltas nogulsnes, kuras atdala no reakcijas maisījuma, mazgā ar aukstu etanolu un žāvē gaisā. Iegūto vielu pārkristalizē no etanola un neliela ūdens daudzuma. Ņem dažus kristālus un izšķīdina tos ACN/H₂O 95:5 maisījumā. Iegūto šķīdumu (1 µl) ievada AEŠH – MS iekārtā ar kolonnu nr. 8 (sk. 2.2. apakšnodaļu.) Analīzei izmanto šādu kustīgās fāzes gradientu: 95 % ACN – 50 % ACN (10 min), 50 % ACN (15 min). Analīzes gaitā plūsmas ātrums ir 0,2 ml/min, kapilāra spriegums 3,5 kV, konusa spriegums 30 V, jonu avota

temperatūra 100 °C, desolvācijas temperatūra 400 °C. Vēlamā savienojuma raksturīgākie signāli ir: m/z 252 [M+H]⁺, m/z 130. Pārējie sulfonāta rindas savienojumi sintezēti un analizēti līdzīgi. Tālāk aprakstītas reprezentatīvas attīrīšanas metodes.

3-(1-Metil-3N-imidazolio)-propān-1-sulfonāta attīrīšana (MeImPS, sk. 2.1. Tab.). Apaļkolbā (5 ml) iesver 100 mg iepriekš sintezētā **MeImPS** un pārkristalizē no acetonitrila un etanola maisījuma (90:10 tilp. daļas). Ļoti lēni atdzesē šķīdumu, atstājot apaļkolbu karstajā vannā. Pēc atdzesēšanas izkrīt caurspīdīgas nogulsnes. Ja šķīdumu atdzesē ātri, iegūst eļļu, un attīrīšana nesasnāc. Produkta tīrību pārbauda, izmantojot iepriekš aprakstītos apstākļus.

3-(1-Heksil-3N-imidazolio)-propān-1-sulfonāta attīrīšana (HImPS, sk. 2.1. Tab.). Pudelītē (4 ml) iesver 500 mg iepriekš sintezētā **HImPS** un izšķīdina 2 ml dejonizēta ūdens, kuram pievieno dažus pilienus amonjaka ūdens šķīduma līdz pH≈8. Pudelītes saturu pārnes 15 ml centrifugēšanas mēģenē un pielej 3 ml hloroforma un izopropanola maisījuma (7:3 tilp. daļas). Sakrata maisījumu un centrifugē 5 min ar 4000 apg/min. Organisko slāni atdala, bet ūdens slāni ekstrahē vēl divas reizes. Produkta tīrību pārbauda, izmantojot iepriekš aprakstītos apstākļus. Ūdens slāni ietvaicē ar rotācijas ietvaicētāju. Rezultātā iegūst bāli dzeltenu eļļu, kuru žāvē eksikatorā virs kālija hidroksīda.

3-(1-Oktil-3N-imidazolio)-propān-1-sulfonāta attīrīšana (OImPS, sk. 2.1. Tab.). Pudelītē (2 ml) iesver 100 mg neattīrīta **OImPS** un izšķīdina 1 ml metanola. Attīrīšanu veic, izmantojot puspreparatīvo AF – AEŠH ar UV detektoru. Piemaisījumu atdalīšanai izmanto kolonnu nr. 10 (sk. 2.2. apakšnodaļu). Sistēmā nr. 6 (sk. 2.2. apakšnodaļu) atkārtoti ievada 100 µl parauga. Paraugu eluē ar ACN/H₂O, kas satur 0,1 % HCOOH gradienta apstākļos: 30% ACN – 50 % ACN (20 min), 50% ACN (25 min). Analīzei lieto 3 ml/min plūsmas ātrumu un detektēšanu veic 212 nm. Katras injekcijas laikā savāc frakciju, kas izdalās no kolonnas 5,7 – 7 min intervālā. Apvieno 10 savāktās frakcijas un ietvaicē ar rotācijas ietvaicētāju. Iegūst dzeltenu eļļu, kuru žāvē eksikatorā. Iegūtās vielas tīrību pārbauda, kā aprakstīts iepriekš.

Tālāk aprakstītas metodes karboksilāta rindas savienojumu sintēzei, izmantojot **MeImBC** kā reprezentatīvu piemēru.

4-(1-Metil-3N-imidazolio)-butān-1-karbonskābes etilestera hlorīds. Šis savienojums ir izejviela **MeImBC** sintēzē. Apaļkolbā (5 ml) ielej 90 µl (1,15 mmol) N-metilimidazola. Kolbā ievieto magnētu un pievieno 241 µl (1,72 mmol) 4-hlorobutānskābes etilestera. Kolbas saturu

maisā ar magnētisko maisītāju 60 stundas 90 °C temperatūrā. Iegūst viskozu šķidrumu. Dotā šķidruma 1 µl izšķīdina 1ml ūdens, ievada AEŠH – MS iekārtā un analizē, izmantojot sekojošus apstākļus: kolonna nr. 9 (sk. 2.2. apakšnodaļu.), kustīgā fāze ir 0,1 % HCOOH (H₂O/MeOH 95:5), plūsmas ātrums 0,2 ml/min, kapilāra spriegums 3,5 kV, konusa spriegums 30 V, jonu avota temperatūra 120 °C, desolvācijas temperatūra 350 °C. Vēlamā savienojuma raksturīgākie signāli: m/z 197 [M+H]⁺, 115, 87, 83.

4-(1-Metil-3N-imidazolio)-butān-1-karboksilāts, I metode (MeImBC, sk. 2.1. Tab.). Pie 237 mg (1,02 mmol) 4-(1-metil-3N-imidazolio)-butān-1-skābes etilestera hlorīda pakāpeniski pievieno 118 mg (0,51 mmol) Ag₂O (pagatavots no KNO₃ un NaOH šķīdumiem, žāvēts) un maisā ar magnētisko maisītāju 2 stundas istabas temperatūrā. Iegūto maisījumu centrifugē un nogulsnes dekantē. Iegūto šķidrumu ekstrahē ar hloroformu (2 ×1 ml). Iegūst viskozu šķidrumu, kura 1 µl izšķīdina 1ml ūdens un ievada AEŠH – MS iekārtā un analizē, kā parādīts iepriekš. Vēlamā savienojuma raksturīgākie signāli: m/z 169 [M+H]⁺, m/z 83.

4-(1-Metil-3N-imidazolio)-butān-1-karboksilāts, II metode (MeImBC, sk. 2.1. Tab.). Sintēzi veic pēc metodes [4]. Sagatavo anjonīta IRA – 400 OH⁻ formu. Apaļkolbā (5 mL) iesver 1240 mg anjonīta IRA – 400 Cl⁻ formā, ielej 2 mL dejonizēta ūdens un atstāj uz 24 stundām. Pēc tām anjonītu pārnes Bihnera piltuvē un skalo ar 50 mL metanola un 400 mL 10 % NaOH. Ik pa laikam pārbauda Cl⁻ jonu klātbūtni efluentā, izmantojot Belšteina testu (AgNO₃ + HNO₃ šķīduma pievienošana efluenta alikvotai). Anjonīts uzskatāms par pārvērstu OH⁻ formā tad, kad Belšteina testa rezultātā vairs neveidojas AgCl nogulsnes.

Iegūto anjonītu pievieno 4-(1-metilimidazolija)-butān-1-karbonskābes etilestera hlorīdam un kolbas saturu maisā 2 stundas. Anjonītu dekantē, palielina temperatūru līdz 60 °C un maisījumu silda 4 stundas. Pēc tam pievieno 300 µL dejonizēta ūdens, un 3 reizes ekstrahē ar 1 mL CH₂Cl₂. Ūdens fāzi ietvaicē ar rotācijas ietvaicētāju un iegūst viskozu, higroskopisku šķidrumu, kas pēc masspektrometrijas datiem (m/z 169, [M+H]⁺, pamatlīnija) atbilst **MeImBC**. Iegūto viskozo šķidrumu žāvē eksikatorā virs izkarsēta silikagela. Rezultātā iegūst caurspīdīgas plēksnes.

2.3.2. Deiterēto cviterjonu tipa jonu šķidrumu sintēze

Savienojuma **a** deiterēto analogu **A1** un **A2** (sk. 3.3. att., 63. lpp.) sintēzes metodes izstrādātas darbā [97], kur atrodamas katrai stadijai atbilstošo starpproduktu sintēzes procedūru un analīžu apstākļi. Saīsinātā sintēzes shēma ar atbilstošiem apstākļiem atrodama 3.3. nodaļā.

2.4. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu tandēmmasspektrometrija

2.4.1. Optimālā sprieguma vērtību piemeklēšana

Attīrītus CJŠ atšķaida ar ACN/H₂O 70:30 maisījumu, kuram pievienota 0,1 % HCOOH un ievada masspektrometrā, izmantojot šļirces sūkni. Eksperimentus veic gan pozitīvo, gan negatīvo jonu skenējumā. Ievadišanas brīdī uzstāda kapilāra spriegumu (3 kV) un pakāpeniski maina konusa spriegumu no 20 līdz 50 V ar soli 5 V. Šajā laikā mainās [M+H]⁺ (vai [M-H]⁻) jona intensitāte, kuru attēlo grafiski atkarībā no konusa sprieguma. No grafika izvēlas konusa sprieguma vērtību, kur [M+H]⁺ (vai [M-H]⁻) jona intensitāte ir maksimāla. Uzstāda šo vērtību un mainā kapilāra spriegumu no 2 līdz 4,5 kV ar 0,5 kV soli un atliek uz grafika [M+H]⁺ (vai [M-H]⁻) jona intensitātes maiņu atkarībā no kapilāra sprieguma pie konstanta konusa sprieguma. Tālāk izvēlas kapilāra spriegumu, pie kura [M+H]⁺ (vai [M-H]⁻) jona intensitāte ir maksimāla. Abu eksperimentu rezultātā katram CJŠ iegūst kapilāra un konusa sprieguma vērtības, kuras izmanto fragmentācijas pētījumiem. Iegūtās konusa un kapilāra sprieguma vērtības apkopotas 2.2. tab.

2.2. Tabula

Kapilāra un konusa sprieguma vērtības CJŠ ar dažādu C-atomu skaitu, kurās [M+H]⁺ un [M-H]⁻ jonu intensitātes ir maksimālas

Apzīmējums	[M+H] ⁺		[M-H] ⁻	
	Kapilāra spriegums (kV)	Konusa spriegums (V)	Kapilāra spriegums (kV)	Konusa spriegums (V)
c	4,0	20	2,5	45
a	3,5	30	3,0	35

Apzīmējums	[M+H] ⁺		[M-H] ⁻	
	Kapilāra spriegums (kV)	Konusa spriegums (V)	Kapilāra spriegums (kV)	Konusa spriegums (V)
b	4,0	35	2,5	45
MeImEC	3,0	30	- ²	-
MeImPC	3,0	30	-	-
MeImBC	3,0	30	-	-
A1	3,5	30	3,0	35
A2	3,5	30	3,0	35

2.4.2. Sadursmju inducētās disociācijas eksperimenti

Attīrītus CJŠ analizē, izmantojot tiešo ievadīšanu ar šļirci. [M+H]⁺ un [M-H]⁻ jonu ģenerēšanai izmanto kapilāra un konusa spriegumus, kas ir parādīti 2.2. tabulā. Visas analīzes veic elektroizsmidzināšanas jonizācijas režīmā ar sekojošiem parametriem: šķīdumu ievadīšanas ātrums ir 10 µl/min, desolvācijas temperatūra 250 °C, jonu avota temperatūra 120 °C, desolvācijas gāzes plūsmas ātrums ir 250 L/st., konusa gāzes plūsmas ātrums 0 L/st., ekstraktora spriegums 3 V, viena skenējuma laiks 0,2 s. Fragmentāciju veic sadursmju enerģiju diapazonā no 0 līdz 50 eV. Sadursmes veicina, ievadot šūnā argonu 3,3 – 3,8×10⁻³ mbar spiedienā.

Karboksilāta tipa CJŠ sadursmju inducētās disociācijas eksperimenti veikti arī D₂O/MeOH (30:70) šķīdumā, kas paskābināts ar 0,1 % CH₃COOD.

Iezīmētos CJŠ analogus analizē AEŠH – MS² režīmā. Paraugu izšķīdina ACN/H₂O 70:30 maisījumā un 1 µl analizējamā šķīduma ievada AEŠH – MS iekārtā. Par kustīgo fāzi izmanto ACN/H₂O 70:30 maisījumu izokrātiskajos apstākļos. Hromatogrāfisko analīzi veic, izmantojot HILIC tipa sorbentu (kolonna nr. 8, sk. 2.2. apakšnodaļu). Kustīgās fāzes plūsmas ātrums ir 0,2 ml/min. Kapilāra un konusa spriegumu vērtības atrodamas 2.2. tab., desolvācijas temperatūra ir 350 °C, jonu avota temperatūra 120 °C, desolvācijas gāzes plūsmas ātrums 400 L/st., konusa gāzes plūsmas ātrums 50 L/st., ekstraktora spriegums 3 V un viena skenējuma

² Šie savienojumi neveido stabilus [M-H]⁻ jonus, tāpēc šajā režīmā netika pētīti

laiks ir 0,2 s. Fragmentāciju panāk analogiskos apstākļos, kā neiezīmētiem savienojumiem. Iegūtos masspektrus apstrādā, izmantojot *MassLynx 4.1* programmu.

2.4.3. Savienojuma "a" deprotonēto formu gāzes fāzes bāziskuma kvantu ķīmiskie aprēķini

Lai aprēķinātu dažādu savienojuma **a** deprotonēto formu gāzes fāzes bāziskuma vērtības, nepieciešama tā ģeometrijas optimizācija. Šajā darbā savienojuma **a** un pozīcijās 4., 5., 6. un 7. deprotonēto [a-H]⁻ formu ģeometrijas optimizācija veikta, izmantojot blīvuma funkcionāli *B3LYP* ar *6-31++g(d,p)* bāzu komplektu. Aprēķiniem lietota *Gaussian 09* programmas *DOI* versija [98]. Pēc ģeometrijas optimizācijas veikta katras daļiņas saišu deformāciju analīze, kuras rezultātā iegūtas aprēķiniem nepieciešamās termodinamisku parametru skaitliskās vērtības. Ievietojot atrastās vērtības vienādojumā 2.1 [99], atrod gāzes fāzes bāziskumu:

$$\Delta G_{g,298} = E_{a-H} + E_{a-H,NPE} - TS_{a-H} - E_a - E_{a,NPE} + TS_a - 6,28 \quad (2.1)$$

Kur:

$\Delta G_{g,298}$ ir gāzes fāzes bāziskums 298 K, Kcal/mol;

E_{a-H} – noteiktajā pozīcijā deprotonētās daļiņas elektronu enerģija, Ha;

$E_{a-H,NPE}$ – deprotonētās daļiņas nulles punkta enerģija, Ha;

T – temperatūra, vienāda ar 298 K;

S_a un S_{a-H} – attiecīgās daļiņas kopējā entropija, cal/K·mol;

E_a – savienojuma **a** elektronu enerģija, Ha;

$E_{a,NPE}$ – savienojuma **a** nulles punkta enerģija, Ha;

6,28 – konstante, kas apvieno H⁺ translācijas entalpiju, translācijas entropiju un $\Delta(PV)=RT$, Kcal/mol.

Aprēķina piemērs [a-H]⁻ daļiņai, kura veidojas pēc protona atraušanas no 7. pozīcijas 1,2-dimetilimidazolija gredzenā:

$$\begin{aligned} \Delta G_{g,298} &= \left((E_{a-H} + E_{a-H,NPE}) - (E_a + E_{a,NPE}) \right) \cdot 627,51 - \frac{TS_{a-H}}{1000} + \frac{TS_a}{1000} - 6,28 = \\ &= (-1045,86 \text{ Ha} + 1046,40 \text{ Ha}) \cdot 627,51 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}} - \frac{298 \text{ K} \cdot \frac{128,6 \text{ cal}}{\text{K} \cdot \text{mol}}}{1000} + \frac{298 \text{ K} \cdot \frac{122,0 \text{ cal}}{\text{K} \cdot \text{mol}}}{1000} \end{aligned}$$

$$-\frac{6,28 \text{ Kcal}}{\text{mol}} = 339 \text{ Kcal/mol}$$

2.5. Kompleksu veidošanās starp cviterjonu tipa jonu šķīdumiem un dažādiem amīniem EIJ apstākļos

2.5.1. Cviterjona funkcionālās grupas un amīna struktūras ietekme uz kompleksu veidošanos

Darba šķīdumu pagatavošana. 5-Metilcitozīna sākuma šķīdumu ar koncentrāciju 31 mM ieguva, izšķīdinot 5,0 mg 5-metilcitozīna hidrohlorīda 1,00 ml AEŠH – MS kvalitātes ūdenī. Heksilamīna, piperidīna un piridīna sākuma šķīdumus (31 mM) sagatavoja, izšķīdinot attiecīgi 4,1, 3,1 un 2,5 μL šo savienojumu 1,00 ml ūdens. Katrā amīna darba šķīdumu sērija saturēja nemainīgo amīna koncentrāciju (6,2 μM) un mainīgo **HinPS** koncentrāciju, lai molārās attiecības būtu 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15 un 1:20. Darba šķīdumu sagatavošanai izmantoja acetonitrilu (1,00 mL), kas saturēja 0,05 % (tilp.) skudrskābes.

Cviterjona funkcionālās grupas pētījumiem sagatavoja divus šķīdumus, kas saturēja 5-metilcitozīnu (6,2 μM) ar **MeImPS** vai **MeImBC** molārā attiecībā 1:1. Kā šķīdinātāju lietoja augšējā rindkopā aprakstīto maisījumu.

Instrumenta parametri. Pagatavotos šķīdumus analizē, izmantojot šādus apstākļus:

Kapilāra spriegums: +2,8 kV;

Konusa spriegums: 15 V;

Ekstraktora spriegums: 1 V;

Parauga šķīduma plūsmas ātrums: 50 $\mu\text{L}/\text{min}$;

Desolvācijas gāzes (N_2) plūsmas ātrums: 250 L/st;

Konusa gāzes (N_2) plūsmas ātrums: 30 L/st;

Desolvācijas temperatūra: 400 °C;

Jonu avota temperatūra: 100°C;

Skenēšanas ātrums: 0,5 s;

Skenēšanas režīms: pilnais skenējums.

2.5.2. Cviterjona koncentrācijas ietekme uz kompleksa absolūto intensitāti

Darba šķīdumu sagatavošana. Eksperimentiem izmantoja cviterjonus nr. 3, 7 – 13. (sk. 2.1. tab.). Sākuma šķīdumus ar koncentrāciju 31 mM pagatavoja, izšķīdinot noteiktu cviterjona masu 1,00 mL ūdens. Darba šķīdumu sērijas saturēja 6,2 μ M 5-metilcitozīna un tādu mainīgu cviterjona koncentrāciju, lai iegūtu abu komponentu molāro koncentrāciju attiecību 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15 un 1:20. Par šķīdinātāju izmantots maisījums, kas aprakstīts 2.5.1. apakšnodaļā. Iegūtos šķīdumus ievada, izmantojot šļirces sūkni 2.5.1. apakšnodaļā aprakstītajos apstākļos.

2.5.3. Šķīdinātāja ietekme uz kompleksa absolūto intensitāti

Darba šķīdumu pagatavošana. Eksperimentiem izmanto vielu **MeImPS** (sk. 2.1. tab.). Pēc 2.5.2. apakšnodaļā aprakstīto eksperimentu rezultātiem izvēlas tādu 5-metilcitozīna/**MeImPS** koncentrāciju attiecību, kurā tiek sasniegts [**MeImPS**+5-MC+H]⁺ kompleksa signāla maksimums. Doto attiecību izmanto darba šķīdumu pagatavošanai. Kā šķīdinātājus izmanto trīs dažādas sistēmas, kas sastāv no ACN/H₂O, ACN/MeOH un MeOH/H₂O maisījumiem. Katrā maisījumā izmaina otrā komponenta saturu robežās no 0 līdz 50 % (tilp.). Katrā sērijā iegūst šķīdumus ar 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 un 50:50 sastāvu. Šķīdumu analīzei izmanto 2.5.1. apakšnodaļā minētos eksperimenta parametrus.

2.5.4. Kapilāra, konusa un ekstraktora sprieguma piemeklēšana

Eksperimentiem izmanto cviterjonus nr. 3, 7 – 13. (sk. 2.1. tab.) un 5-metilcitozīna šķīdumus, kuriem atrasta vislielākā kompleksa signāla intensitāte 2.5.2. apakšnodaļā aprakstītajos apstākļos. Sākumā uzstāda kapilāra spriegumu 2 kV un maina šo vērtību ar soli 0,5 kV līdz 4,5 kV, nemainot pārējos parametrus. Atrod optimālo kapilāra spriegumu. Tālāk maina konusa spriegumu no 10 līdz 50 V (10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50) un, visbeidzot, ekstraktora spriegumu no 1 līdz 10 V ar soli 1 V.

2.5.5. Kompleksu stabilitātes pētījumi šķīdumā un gāzes fāzē

Kompleksu asociācijas konstanšu noteikšana acetonitrilā un metanolā. Asociācijas konstantes nosaka **MeImPS**, **BuImPS**, **HImPS** un **OImPS** kompleksiem ar 5-metilcitozīnu.

Nosaukto CJŠ un 5-metilcitozīna sākuma šķīdumi ar koncentrāciju 100 mM sagatavoti atsevišķi, izmantojot ūdeni vai metanolu kā šķīdinātājus.

Katrā CJŠ un 5-metilcitozīna sākuma šķīdumu alikvotas sajauktas kopā un atšķaidītas ar AEŠH – MS kvalitātes acetonitrilu (vai AEŠH – MS kvalitātes metanolu), lai iegūtu ekvimolāru (CJŠ/5-MC) darba šķīdumu sēriju koncentrāciju diapazonā 1 – 15 μM. Darba šķīdumiem pievienota HCOOH 0,025 % (tilp.) daudzumā. Katrs no šķīdumiem tika pagatavots un analizēts trīs reizes. Darba šķīdumi tika ievadīti masspektrometrā, lietojot mērījuma apstākļus, kuri aprakstīti 2.5.1. apakšnodaļā.

Iegūtie dati apstrādāti, izmantojot metodi, kurā protonētā 5-metilcitozīna un kompleksa intensitāšu attiecības atkarību no koncentrācijas apraksta ar 2.2. vienādojumu [82]:

$$\frac{I_{5-MC}}{I_{Comp}} = \frac{(1 + \sqrt{1 + 4KC})}{2KRC} \quad (2.2)$$

Kur:

I_{5-MC} – protonētā 5-metilcitozīna, 5-metilcitozīna dimēra un 5-metilcitozīna adukta ar Na^+ intensitāšu summa;

I_{Comp} – kompleksa intensitāte masspektūrā;

C ir 5-metilcitozīna (vai CJŠ, jo šķīdumi ir ekvimolāri) koncentrācija;

K – kompleksa asociācijas konstante;

R ir 5-metilcitozīna un atbilstošā kompleksa detektora atsauces faktoru attiecība.

Konstruējot I_{5-MC}/I_{Comp} atkarību no koncentrācijas un pielāgojot dotiem punktiem 2.2. vienādojumu, var noteikt kompleksa asociācijas konstanti. Šo procedūru visiem kompleksiem izpildīja, izmantojot *IBM SPSS Statistics* programmu (21. versija).

MeImPS kompleksu ar heksilamīnu, pirolidīnu un trietilamīnu asociācijas konstanšu noteikšana veikta analogiski.

CJŠ kompleksu ar 5-metilcitozīnu pussabrukšanas enerģijas noteikšana gāzes fāzē. Šiem eksperimentiem izmantoti **MeImPS**, **BuImPS**, **HImPS**, **OImPS** kompleksi ar 5-metilcitozīnu. Pētāmajā šķīdumā CJŠ un 5-metilcitozīna koncentrācija ir 20 μM. Šķīdums ievadīts masspektrometrā, analīzei izmantojot EIJ avota apstākļus, kas aprakstīti 2.5.1. apakšnodaļā (sk. *Instrumenta parametri*). Kompleksa aktivācijai izmantota sadursmju inducētā disociācija, kuru panāk ar argonu (3×10^{-3} mbar spiedienā) sadursmju enerģijas diapazonā no 0

līdz 16 eV ar soli 1 eV. Datu apstrādes gaitā konstruēta kompleksa relatīvās intensitātes atkarība no sadursmju enerģijas. Dotā sakarība izmantota kompleksa pussabrukšanas enerģijas ($E_{1/2}$) aprēķināšanai.

2.5.6. Kompleksu kvantu ķīmiskie aprēķini

Aprēķini veikti, izmantojot *Gaussian 09* programmu (*D01* versija) [98]. Protonētā 5-metilcitozīna [5-MC+H]⁺ zemākās enerģijas tautomēra ģeometrija atrasta, veicot 4 iespējamo tautomēru struktūru optimizāciju ar blīvuma funkcionāli *B3LYP* [100, 101] ar *6-31g(d,p)* bāzu komplektu.

MeImPS un [MeImPS+H]⁺ zemākās enerģijas konformēru piemeklēšana veikta ar *MMFF94* [102] molekulārās mehānikas algoritmu, kas ir iekļauts bezmaksas *Avogadro 1.0.0* programmā. Pēc minētā algoritma lietošanas, izvēlēti 6 **MeImPS** un 4 [MeImPS+H]⁺ konformēri.

Katrs no sešiem **MeImPS** konformēriem apvienots ar [5-MC+H]⁺, lai izveidotu dažādas kompleksa struktūras ar mainīgu [5-MC+H]⁺ orientāciju. Šādi iegūto kompleksu ģeometrijas pakāpeniski optimizētas ar *MMFF94* spēka lauku, pusempīrisko *PM3* metodi [103] un *ab initio HF/6-31g(d)* metodi. Pēdējā posmā izvēlēts viens kompleksa konformērs ar viszemāko enerģiju un tā struktūra optimizēta, lietojot *M06-2X* funkcionāli [104] ar *6-311++g(d,p)* bāzu komplektu. Lai pārlicinātos, ka iegūtā struktūra atbilst lokālajam minimumam, veikta saišu deformāciju frekvenču analīze. Mijiedarbību enerģijas vērtība dotajam kompleksam aprēķināta, izmantojot bāzu superpozīcijas kļūdu korekcijas metodi un *M06-2X/6-311++g(d,p)* funkcionāli.

Visas iepriekšējā rindkopā minētās procedūras atkārtotas četriem [MeImPS+H]⁺ kompleksiem ar 5-MC.

2.6. Cviterjonu tipa jonu šķidrums izmantošana DNS metilēšanas līmeņa noteikšanai

2.6.1. Cviterjonu tipa savienojuma izvēle

Piemērotākais CJŠ tika izvēlēts, balstoties uz eksperimentiem, aprakstītiem 2.5.2. apakšnodaļā, kuru gaitā CJŠ un 5-metilcitozīna kompleksa signāla intensitāti masspektā nosaka, mainot abu komponentu molāro koncentrāciju attiecību. CJŠ, kas veido kompleksu ar

vislielāko absolūto intensitāti masspektrā, tika izvēlēts kā reaģents DNS metilēšanas līmeņa noteikšanai teļa vairogdziedzera DNS paraugā.

2.6.2. Metodes validācija

Lai pārbaudītu iegūto datu ticamību, veiktā daļēja PIA – EIJ – MS metodes validācija³, kas iekļauj tādus parametrus kā linearitātes apgabals, *LOQ*, precizitāte, pareizība, reproducējamība, matricas efekts un analīta starpinjekciju pārnese (*carryover*).

Lai modelētu reālā parauga matricu, visiem 5-metilcitozīna šķīdumiem validācijas gaitā tika pievienotas nukleobāzes, kas raksturīgas DNS paraugam. Matricas sākuma šķīdumu sagatavoja 100,0 ml polipropilēna mērkolbā (lai izslēgtu sārma metālu jonu klātbūtni), izšķīdinot 2,0 mg adenīna, timīna, citozīna, guanīna un uracila AEŠH – MS kvalitātes ūdenī ar 2,5 % HCOOH piedevu. 5-Metilcitozīna sākuma šķīdumu ar koncentrāciju 1,0 mM sagatavoja analogiski. Validācijai nepieciešami kvalitātes kontroles un kalibrācijas šķīdumi iegūti, pakāpeniski atšķaidot un kombinējot abus sākuma šķīdumus. Matricas komponentu (citozīna, guanīna, adenīna, timīna un uracila) koncentrācijas kvalitātes kontroles un kalibrācijas šķīdumos ir attiecīgi 180, 132, 148, 159 un 180 nM. Katrs šķīdums tika pagatavots AEŠH – MS kvalitātes acetonitrilā ar 0,0001% trifluoretiķskābes piedevu un ievadīts PIA – EIJ – MS sistēmā, izmantojot iekārtas darbības apstākļus, kas aprakstīti 2.6.4. apakšnodaļā.

Linearitātes apgabalu nosaka, izmantojot septiņus 5-metilcitozīna šķīdumus 0 – 1000 nM koncentrāciju diapazonā. Metodes *LOQ* vērtību izrēķina pēc 2.3. vien.:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (2.3)$$

kur, σ ir 6 paralēli sagatavoto un analizēto tukšo paraugu (satur tikai matricas komponentus) signāla laukuma standartklūda un S ir kalibrācijas taisnes koeficients. Precizitāti, pareizību, reproducējamību un matricas efektu nosaka, izmantojot divus 5-metilcitozīna koncentrācijas līmeņus (10 un 100 nM). Analīta starpinjekciju pārnese izsaka kā kompleksam atbilstoša signāla laukuma attiecību tukšajā paraugā pret standartu ar 5-metilcitozīna koncentrāciju 200 nM, kas atbilst augšējai metodes noteikšanas robežai.

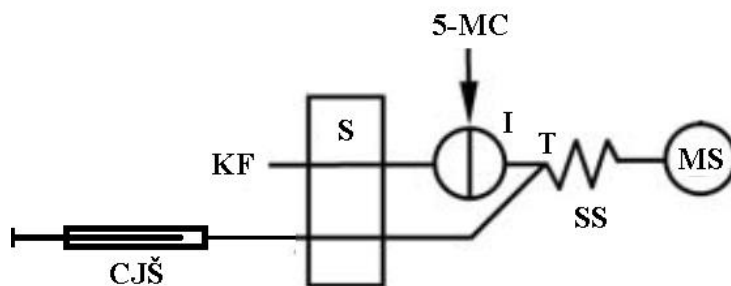
³ Metodes validācijas procedūra ir detalizēti aprakstīta publikācijā nr. 5 (sk. Ievads, Promocijas darba aprobācija), kuras tekstu var apskatīt Pielikumos, 158. lpp.

2.6.3. DNS parauga hidrolīze

Par modeli izmantota teļa vairogdziedzera DNS, kas ir komerciāli pieejama. Pirms hidrolīzes DNS izšķīdināja AEŠH – MS kvalitātes ūdenī, un noteica reālo DNS daudzumu paraugā, mērot UV absorbciju 260 nm ar UV spektrofotometru. Tad paraugs tika atšķaidīts ar ūdeni un 100 µl iegūtā šķīduma, kas atbilst 2,5 µg DNS, ielēja 2 ml hromatogrāfiskajā parauga trauciņā (virsmā iepriekš deaktivēta ar HMDS). Pudelītes saturu ietvaicēja slāpekļa plūsmā istabas temperatūrā. Sausajam atlikumam pievienoja 200 µl 88 % HCOOH, novietoja pudelīti uz elektriskās plītiņas un veica hidrolīzi 1,5 st. laikā 140 °C temperatūrā, kā tas aprakstīts darbā [105]. Pēc hidrolīzes skudrskābe tika ietvaicēta slāpekļa plūsmā un pudelītes saturam pievienots 1 ml ACN ar 0,001% TFA piedevu. Pirms ievadīšanas, paraugs atšķaidīts 10 reizes ar ACN.

2.6.4. 5-Metilcitozīna PIA – EIJ – MS analīze

Zemās dispersijas PIA – EIJ – MS sistēmas shēma ir parādīta 2.2. att.



2.2. att. PIA-EIJ-MS sistēmas shēma, izmantota 5-metilcitozīna noteikšanai DNS paraugā. Apzīmējumi: CJŠ – cviterjonu tipa jonu šķidrums, 5-MC – 5-metilcitozīns, KF – kustīgā fāze, S – AEŠH sūkņi, I – sešceļu rokvadības injektors, T – T-veida savienotājs, SS – sajaukšanas spirāle, MS – masspektrometrs

Kā redzams no 2.2. att., PIA – EIJ – MS sistēma sastāv no AEŠH iekārtas, kas padod kustīgo fāzi ar nemainīgu plūsmas ātrumu (80 µl/min), *Rheodyne* elektriski vadāma rokvadības injektora ar paštaisīto *PEEK* cilpu (1 µl), šļirces sūkņa, kas nodrošina CJŠ plūsmas ātrumu 20 µl/min, T-veida savienotāja, *PEEK* sajaukšanas spirāles (1 m × 0,125 mm i.d.) un *Upchurch* poraina tērauda mikrofiltra, kas ir pievienots masspektrometram. Paraugu ievada ar stikla šļirci

manuālajā injektorā, izmantojot cilpas pārpildīšanas metodi, ņemot vienai injekcijai 30 μl šķīduma. Rezultātā precīzi 1 μl tiek ievadīts sistēmā un pārējie 29 μl paliek atkritumu pudelē. Kopumā paraugu ievada 6 reizes ar 20 s intervālu starp injekcijām. Analīzes gaitā veic signāla m/z 126.1 (atbilst 5-metilcitozīnam) un m/z 330.4 (atbilst 5-metilcitozīna kompleksam ar **MeImPS**) monitoringu, datu savākšanai lietojot 0,1 s laika vērtību (*dwel time*). Pārējie EIJ analīzes apstākļi ir šādi:

Kapilāra spriegums: 2,8 kV;

Konusa spriegums: 15 V;

Ekstraktora spriegums: 1 V;

Desolvācijas gāzes (N₂) plūsmas ātrums: 250 L/st;

Konusa gāzes (N₂) plūsmas ātrums: 30 L/st;

Desolvācijas temperatūra: 400 °C;

Jonu avota temperatūra: 100°C.

2.6.5. DNS metilēšanas līmeņa aprēķināšana

DNS metilēšanas līmeni izsaka vienādojums 2.5.

$$5 - MC_{\%} = \frac{n_{5-MC}}{n_{Cyt}} 100\% = \frac{n_{5-MC}}{0.2095n_{NB}} \quad (2.4)$$

Kur:

n_{5-MC} ir 5-metilcitozīna daudzums 2,5 μg DNS (nmol), aprēķināts pēc kalibrācijas taisnes vienādojuma, ievietojot vidējo (n=6) signāla laukuma vērtību;

n_{Cyt} – kopējais citozīna daudzums (nmol);

n_{NB} – kopējais nukleobāzu daudzums 2,5 μg DNS (nmol);

0,2095 ir koeficients, norādīts teļa vairogdziedzera DNS specifiskācijas lapā, kas parāda citozīna molu % DNS paraugā;

Aprēķina piemērs DNS paraugam ir šāds:

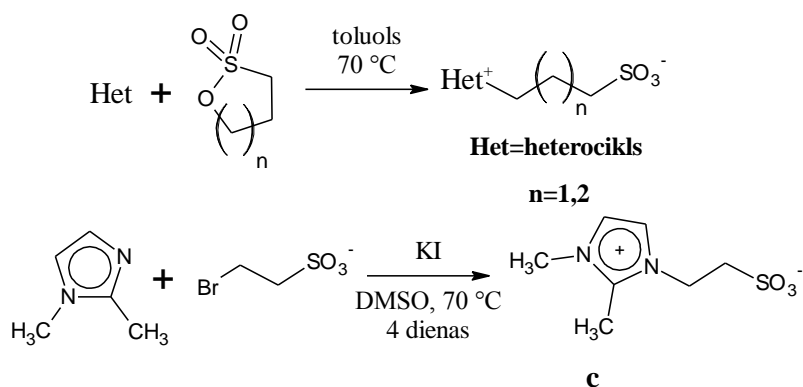
$$5 - MC_{\%} = \frac{C_{5-MC} \cdot 10}{0,2095 \cdot \frac{m_{DNS}}{M_{NB}} \cdot 1000} \cdot 100\% = \frac{10,6 \frac{nmol}{l} \cdot 10}{0,2095 \cdot \frac{2,5\mu g}{330\mu g} \cdot 1000} \cdot 100\% = 6,7\%$$

Šajā piemērā M_{NB} ir mononukleotīdu vidējā molmasa, raksturīga DNS nātrija sāls formai.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1. Sulfonāta grupu saturošo cviterjonu tipa jonu šķidrumu sintēze

Lielākā daļa šajā darbā pētīto savienojumu ir dažādi slāpekļa heterociklus saturoši sulfonāti. To iegūšanai tika izmantotas nukleofilās aizvietošanas reakcijas, kuras ir parādītas 3.1. att.



3.1. att. Sulfonātu iegūšanas reakcijas

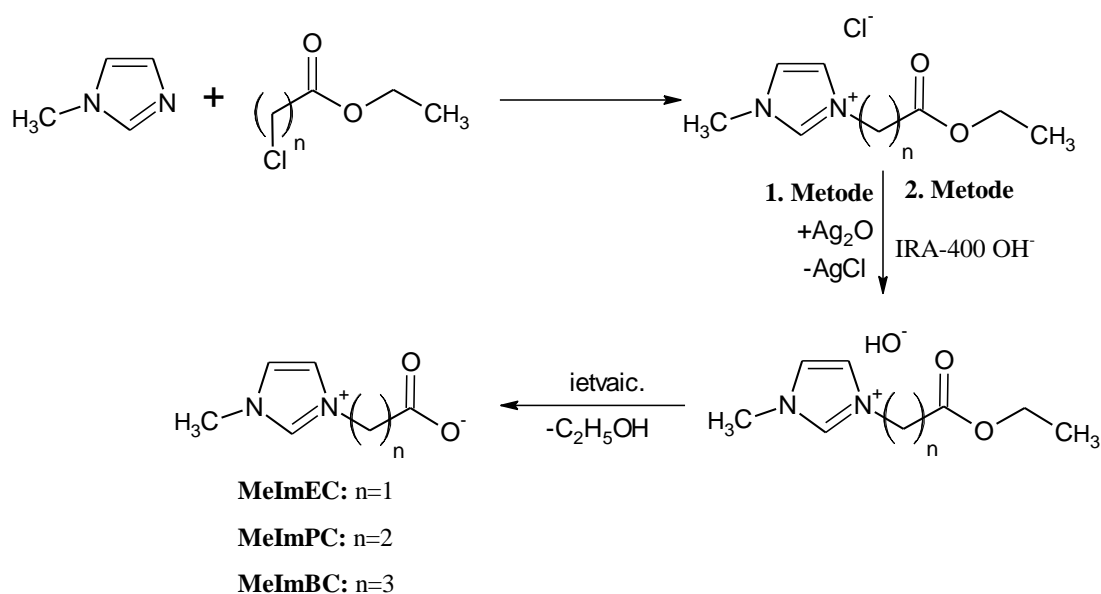
Lai izslēgtu kļūdas, saistītas ar parauga nepietiekamu tīrību, darbā izmantotas vairākas attīrīšanas metodes. Kristāliskos savienojumus (visus, izņemot **HImPS** un **OImPS**) attīrīja, izmantojot pārkristalizāciju no etanola/ūdens un acetonitrila/etanola maisījumiem. Savukārt savienojumu **HImPS** un **OImPS** attīrīšana ar pārkristalizācijas metodi nav iespējama, jo šie savienojumi istabas temperatūrā ir viskozi šķidrumi. Tāpēc **HImPS** attīrīšanai izmantota šķidrumu ekstrakcija ar sistēmu, kas sastāv no ūdens ar $\text{pH} \approx 8$ (pēc koncentrēta NH_3 pievienošanas) un hloroforma/izopropanola maisījuma attiecībā 7:3. AEŠH – MS analīzes parādīja, ka, lietojot šo metodi, iespējams iegūt **HImPS** ar 99 % tīrību. **OImPS** attīrīšanai lietota preparatīvā AF – AEŠH, jo šis savienojums un tajā esošie piemaisījumi veido ar ūdeni heterogēnu sistēmu, kas nedod iespēju izmantot iepriekš aprakstīto ekstrakcijas metodi. AF – AEŠH izmantotajos apstākļos bija iespējams ievadīt vienā mēģinājumā 10 mg neattīrīta maisījuma. Metode pēc visu savākto frakciju ietvaicēšanas un produkta žāvēšanas ļauj iegūt 35 mg attīrīta (99 %) **OImPS**.

Iegūto savienojumu tīrības kontrolei un blakusproduktu identifikācijai izmantota speciāli izstrādāta **HILIC** – AEŠH – MS metode. Tai, salīdzinājumā ar AF – AEŠH ir liela

priekšrocība – metode ir praktiski universāla jebkuram darbā izmantotam CJŠ. AF – AEŠH apstākļos no izejvielām labi atdalās tikai hidrofobākie analogi **OImPS**, **HImPS**, **BuImPS** un **HinPS**. Visi pārējie CJŠ augstās polaritātes dēļ izdalās no kolonnas ar zemiem sorbcijas faktoriem kopā ar izejvielām. Savukārt, piedāvātā *HILIC* – AEŠH – MS metode gradienta apstākļos ļauj labi atdalīt gala produktus un piemaisījumus. Galvenais šīs metodes trūkums ir lēns līdzsvarošanās process silikagela tipa sorbentam, kuru izmanto *HILIC* metodē.

3.2. Karboksilāta grupu saturošo cviterjonu tipa jonu šķīdrumu sintēze

Karboksilāta saturošo CJŠ sintēzei nepieciešamas trīs stadijas, kuras redzamas 3.2. att.



3.2. att. Imidazoliņa alkānkarboksilātu iegūšanas metode

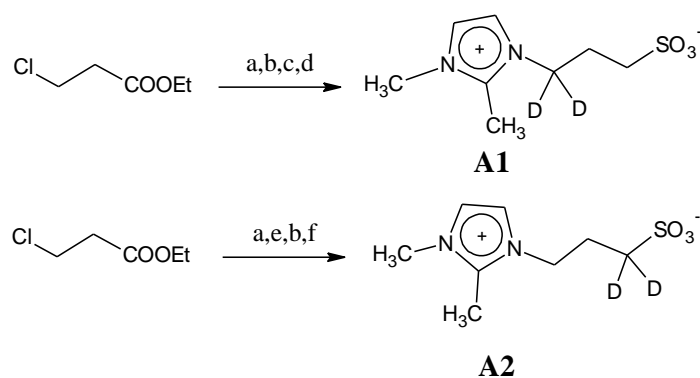
Līdzīgu savienojumu sintēzes metodes ir aprakstītas avotos [2, 4, 106, 107], tomēr to lietošanai bija nepieciešams piemeklēt un precizēt iegūšanas apstākļus. Sintēžu pamatā ir nukleofīlās aizvietošanas un jonu apmaiņas reakcijas. Produktu tīrība šajās reakcijās ir stipri atkarīga no konversijas pakāpes pirmajā stadijā, kura notiek lēni. Veicot alkilēšanu, var paaugstināt temperatūru, bet, kā rāda analīzes, temperatūrā, augstākā par 80 °C, veidojas krāsaini blakusprodukti.

Kā redzams no 3.2. att., otrā stadija ir tipveida jonu apmaiņas reakcija, kur hlorīda anjonu apmaina pret hidroksīda anjonu. Šajā posmā iespējams izmantot IRA-400 anjonītu OH⁻ formā vai Ag₂O. Abu metožu lietošana dod labus rezultātus, bet priekšrocība ir IRA-400

lietošanai, jo anjonītam ir spēja adsorbēt 1-metilimidazola piemaisījumu uz polimēra matricas. Eksperimentu gaitā tika konstatēts reakcijas ierobežojums, kas saistīts ar to, ka reakciju nevar veikt metanolā, jo tajā praktiski kvantitatīvi notiek estera grupas pāresterifikācija. Pēdējā stadijā pēc ietvaicēšanas var iegūt bezkrāsainus viskozus šķidrumus, kuri ir higroskopiski. Iespējams iegūt arī kristālisko formu (vismaz **MeImBC** gadījumā), žāvējot šos savienojumus eksikatorā virs silikagela vai kālija hidroksīda.

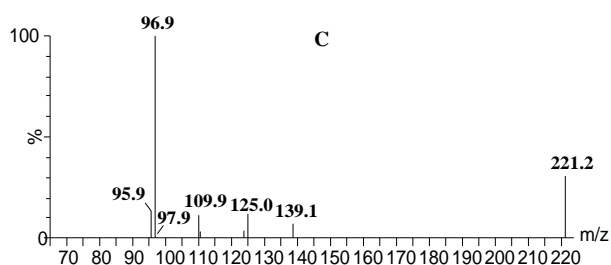
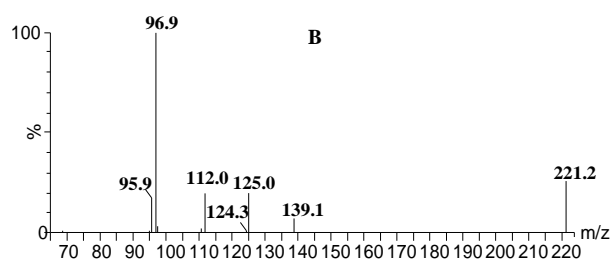
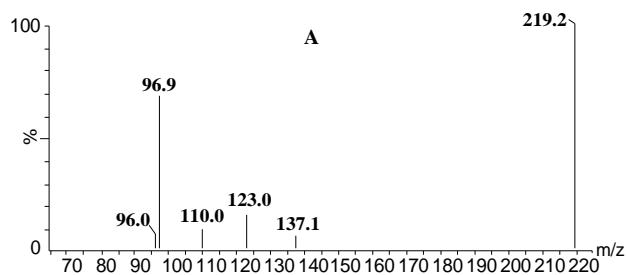
3.3. Iezīmēto sulfonāta grupu saturošo cviterjonu tipa jonu šķidrumu sintēze

Lai atvieglotu CJŠ masspektu interpretāciju un pamatotu šo savienojumu fragmentācijas mehānismus, tika ieplānots iegūt divus CJŠ analogus, kas dažādos stāvokļos satur deiterija atomus. Šie savienojumi ir 3-(1,2-dimetil-3N-imidazolio)-propān-1-sulfonāta atvasinājumi **A1** un **A2**. Šo savienojumu izvēle pamatojas ar to, ka: 1) līdzīgu savienojumu masspektometrija ir vairāk izpētīta [108]; 2) minēto savienojumu masspektri satur dažāda tipa signālus, kas dod iespēju izmantot savienojumus **A1** un **A2** kā modeļus, lai pētītu homologu fragmentāciju. Abu savienojumu iegūšanai izmantotās reakcijas ilustrē 3.3. att.



3.3. att. Iezīmēto savienojumu **A1** un **A2** sintēzes shēmas, kur **a**: $\text{NaBD}_4/\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{THF}/\Delta$, **b**: $\text{Na}_2\text{SO}_3/\Delta$, **c**: $\text{HBr}/\text{H}_2\text{SO}_4/100\text{ }^\circ\text{C}/2\text{st}$, **d**: 1,2-dimetilimidazols/toluols/ $70\text{ }^\circ\text{C}/4$ dienas, **e**: P/I_2 , **f**: 1,2-dimetilimidazols/DMF/ $70\text{ }^\circ\text{C}/4$ dienas

Kā redzams, savienojumu **A1** un **A2** iegūšanai nepieciešamas 4 stadijas, ja par izejvielu izvēlas 3-hloropropānskābes etilesteri. Doto metožu izstrāde kopā ar vairākām detaļām aprakstīta darbā [97]. Produkta atbilstību vēlamam savienojumam pārbauda ar AEŠH – MS^2 metodi, kas parādīja, ka deiterija atomi ievadīti propānsulfonāta ķēdē 1. vai 3. stāvoklī, atbilstoši izstrādātai shēmai (sk. 3.4. att.).



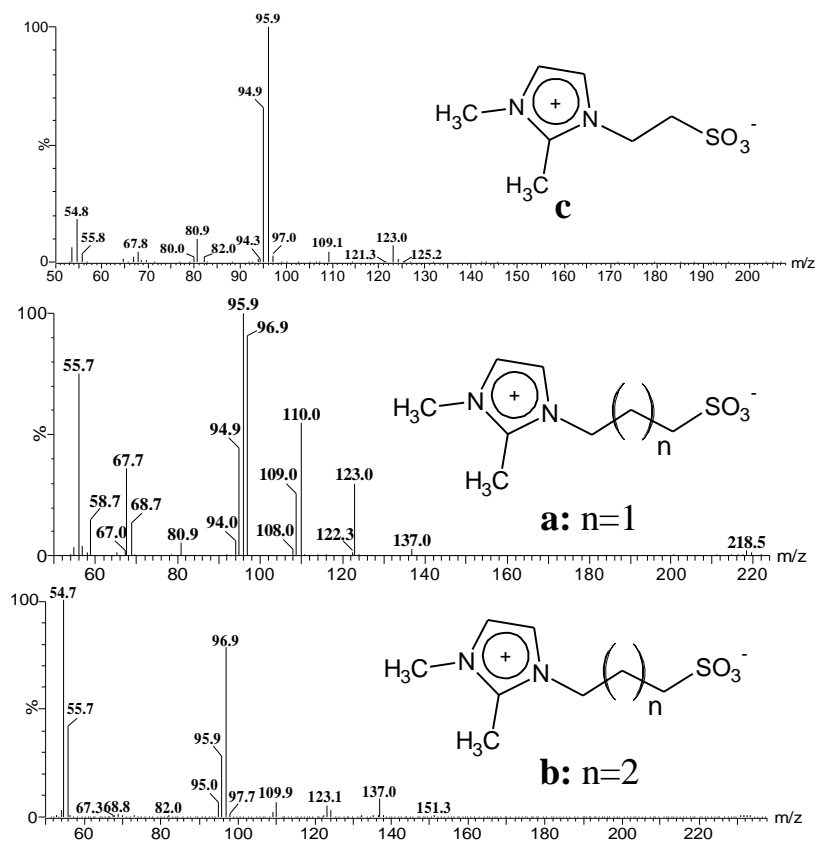
3.4. att. Nedeiterētā (A), 3. pozīcijā (A1, B) un 1. pozīcijā (A2, C) iezīmēto CJŠ masspektri, iegūti ar 20 eV sadursmju enerģiju

Kā redzams, deiterija atomu klātbūtnes dēļ **A1** un **A2** protonēto molekulu signāli atšķiras par 2 m/z vienībām (m/z 221) no nedeiterētā savienojuma **a** signāliem (m/z 219). Specifisko fragmentu rašanās ar m/z 110 (**A2**) un m/z 112 (**A1**), pierāda, ka deiterija atomi šajos savienojumos atrodas tieši 1. un 3. pozīcijā. Tāpēc iegūtos savienojumus var izmantot cviterjonu tipa savienojumu fragmentācijas pētīšanai SID apstākļos, kuru aplūkosim tālākajās nodaļās.

3.4. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu gāzes fāzes pētījumi sadursmju inducētās disociācijas apstākļos

3.4.1. Sulfonāta grupu saturošo CJŠ protonēto molekulu fragmentācija

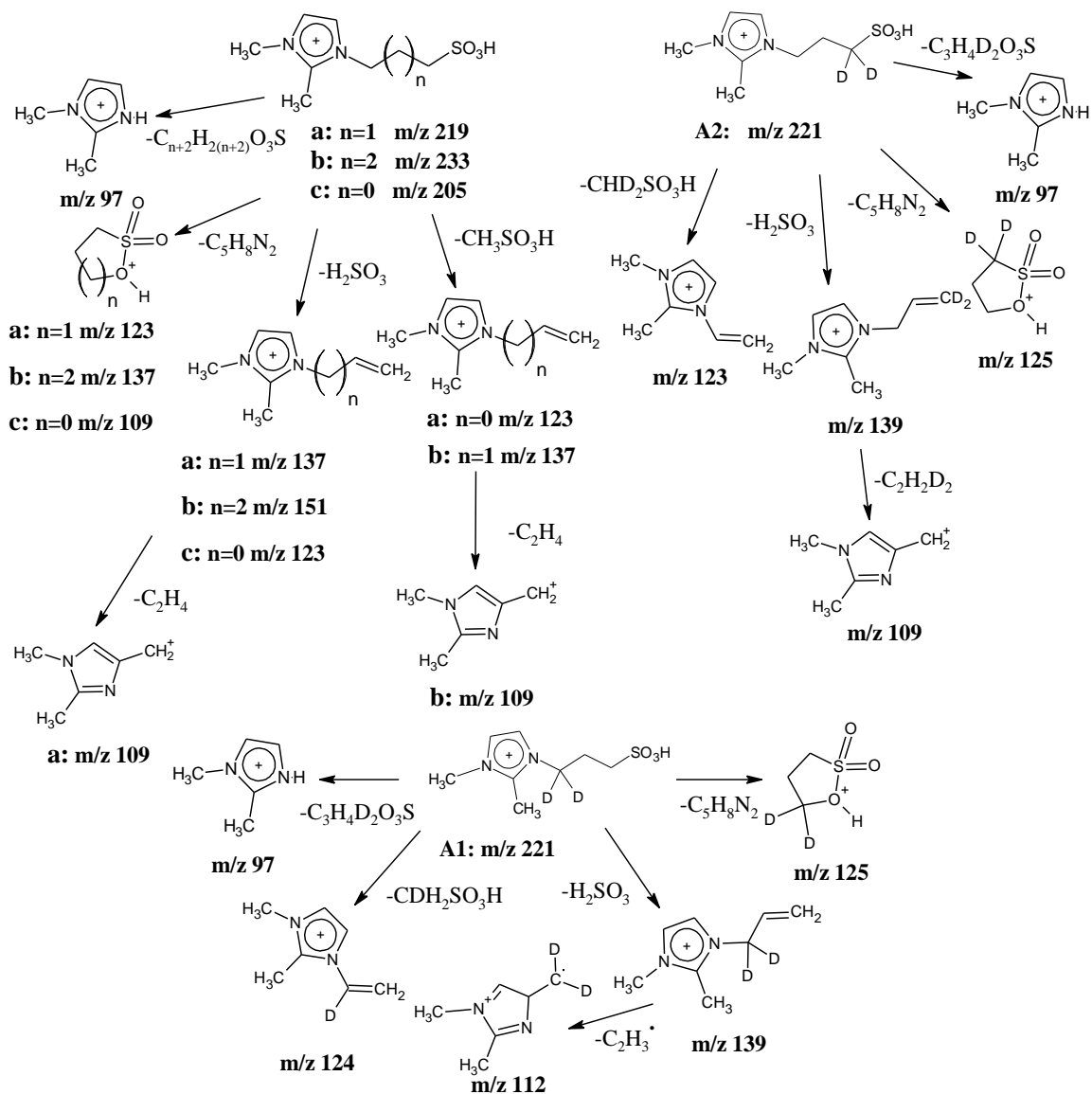
Neiezīmēto savienojumu **a**, **b** un **c** $[M+H]^+$ jonu MS² spektri parādīti 3.5. att.



3.5. att. Neiezīmēto savienojumu a, b un c SID masspektri, iegūti ar 40 eV sadursmju enerģiju

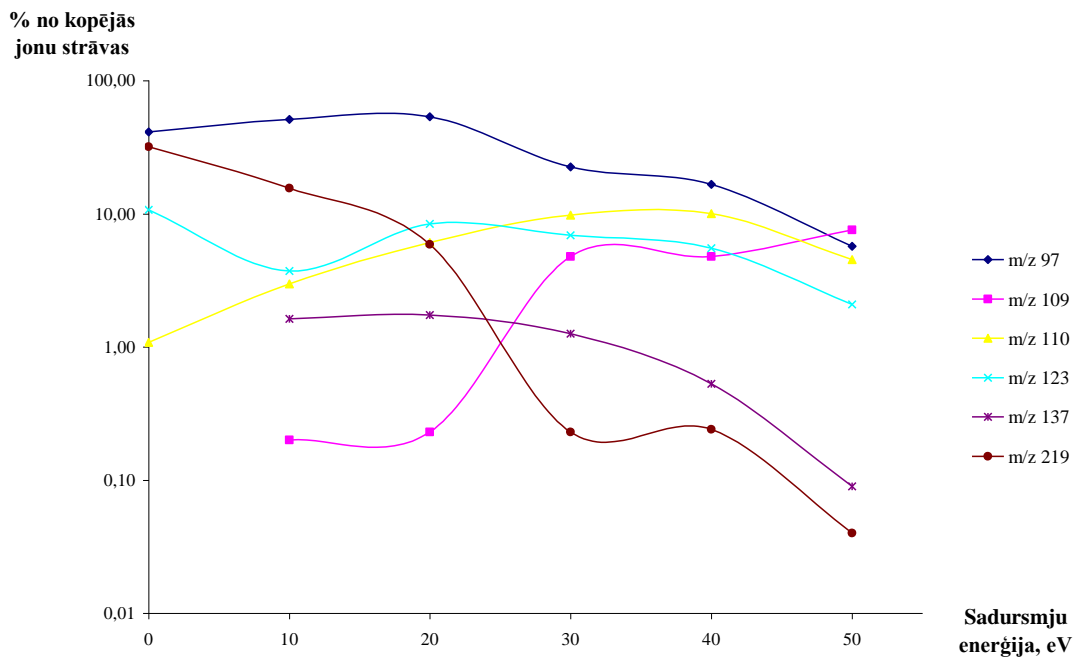
No 3.5. att. izriet, ka neatkarīgi no metilēngrupu skaita starp 1,2-dimetilimidazola gredzenu un SO_3^- grupu, masspektros dominē fragmenti ar vienādām m/z vērtībām. Savukārt atbilstošo fragmentu relatīvās intensitātes stipri atšķiras, kas liecina par struktūras ietekmi uz disociācijas procesiem. Iespējams, tas ir skaidrojams ar iekšējās enerģijas pieauguma atšķirīgu sadalījumu SID gaitā starp $[\text{M}+\text{H}]^+$ jonu translācijas kustību un saišu svārstību līmeņiem [109].

Iegūto masspektu interpretācija dod iespēju sastādīt disociācijas maršrutu shēmu, kas ir atrodama 3.6. att.



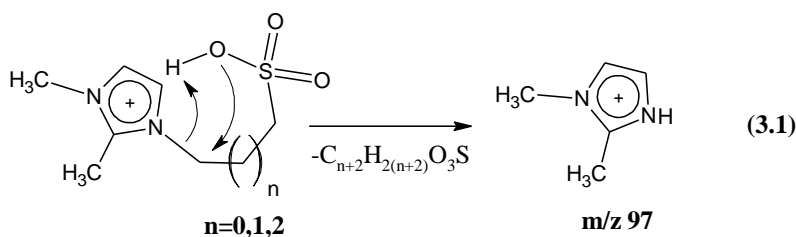
3.6. att. Savienojumu a, b, c un deiterēto analogu A1 un A2 SID procesu shēma pozitīvo jonu skenējumā

Shēmā redzami procesi ir līdzīgi visiem savienojumiem, tāpēc ar savienojuma **a** piemēru sīkāk apskatīsim intensīvāko fragmentu rašanos SID apstākļos. Šo fragmentu relatīvās intensitātes atkarībā no sadursmju enerģijas var apkopot sabrukšanas diagrammā, kas ir parādīta 3.7. att.



3.7. att. $[a+H]^+$ jona sabrukšanas diagramma, kas parāda nozīmīgāko fragmentu strāvas daļu atkarībā no sadursmju enerģijas

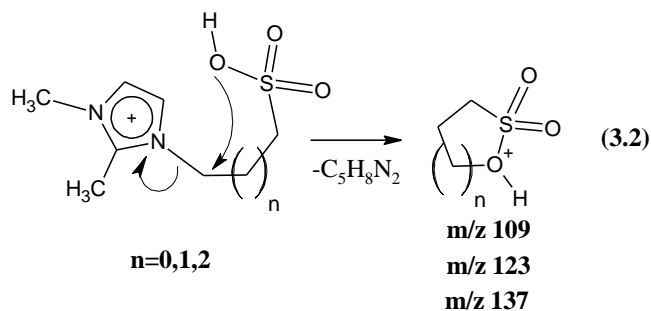
Attēlā 3.7. redzams, ka $[a+H]^+$ fragmentācija sākās jau pie 0 eV (bez paātrinātā potenciāla), kas liecina par zemu disociācijas reakcijas aktivācijas enerģijas barjeru. Vislielākā relatīvā intensitāte visā sadursmju enerģijas diapazonā atbilst jonam ar m/z 97. Šāda stabilitāte bieži saistīta ar vielas aromātisko raksturu. Līdz ar to ir pamats uzskatīt, ka dotais jons ir 1,2-dimetilimidazolijs katjons ar elementu sastāvu $C_5H_9N_2^+$ (sk. 3.1. vien.).



Dotais jons dominē arī savienojuma **b** masspektros. Turpretim, savienojuma **c** gadījumā novēro arī jona ar m/z 96 veidošanos, kas tāpat satur 1,2-dimetilimidazolijs fragmentu, bet veidojas saskaņā ar homolītiskās šķelšanas mehānismu. Šādas atšķirības var izskaidrot ar to, ka savienojums **c** mazākas molmasas dēļ ātrāk sasniedz radikāļu šķelšanai nepieciešamo iekšējās enerģijas pieaugumu. Rezultātā **c** gadījumā, novērojama vienlaicīga jonu ar m/z 96 un

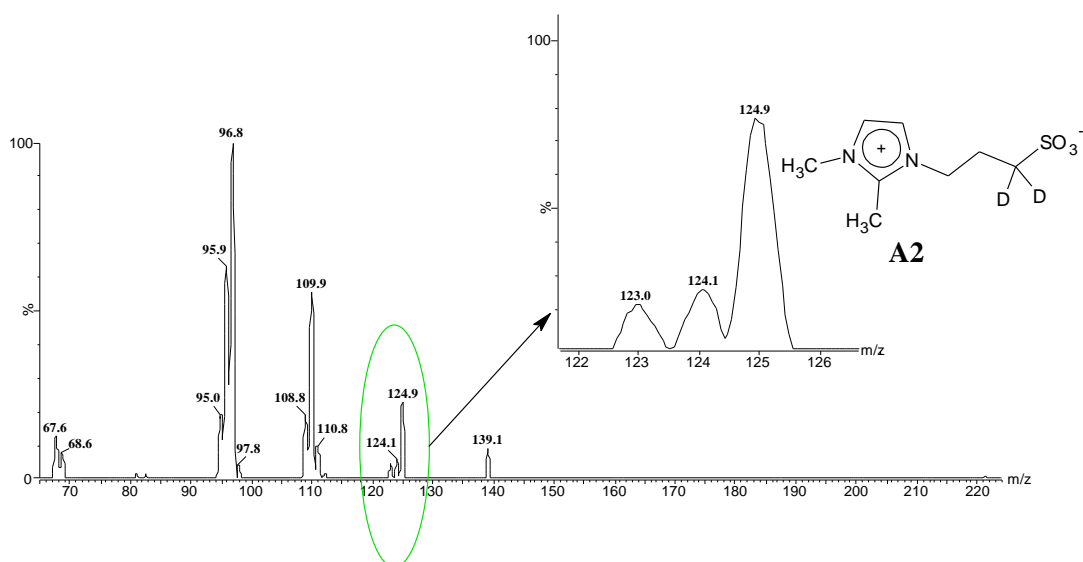
97 rašanās. Jāpiebilst, ka 1,2-dimetilimidazolijs jons, saņemot enerģiju, kas pārsniedz 30 eV, spēj disociēt tālāk, veidojot otras paaudzes jonus ar m/z 82, 55 un dažus citus.

Otrs process, kurš sākas jau pie 0 eV savienojumu **a**, **b** un **c** gadījumā, ir jonu ar m/z 109, 123 un 137 veidošanās (sk. 3.2. vien.).



Šis process ir lādiņa virzītā šķelšanās, kas ir raksturīgs visiem CJŠ, kuri satur alkānsulfonāta virkni.

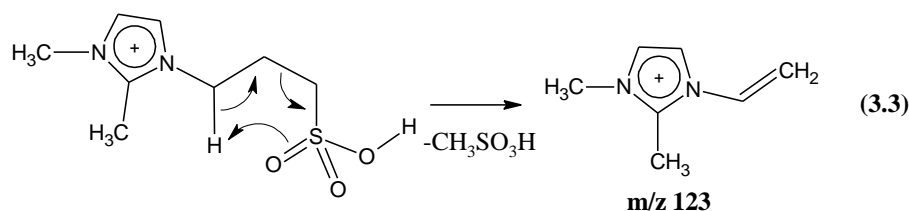
Apskatot savienojuma **a** fragmentācijas diagrammu (sk. 3.7. att.), var pamanīt, ka jonam ar m/z 123 atbilstošā līknē pie 10 eV atrodas minimuma punkts. Tas var liecināt par atšķirīgu jona formu pastāvēšanu gāzes fāzē. Deiterētā analoga **A2** masspektrs pierāda šo hipotēzi, jo tajā redzami signāli ar m/z 123, 124 un 125 (sk. 3.8. att.)



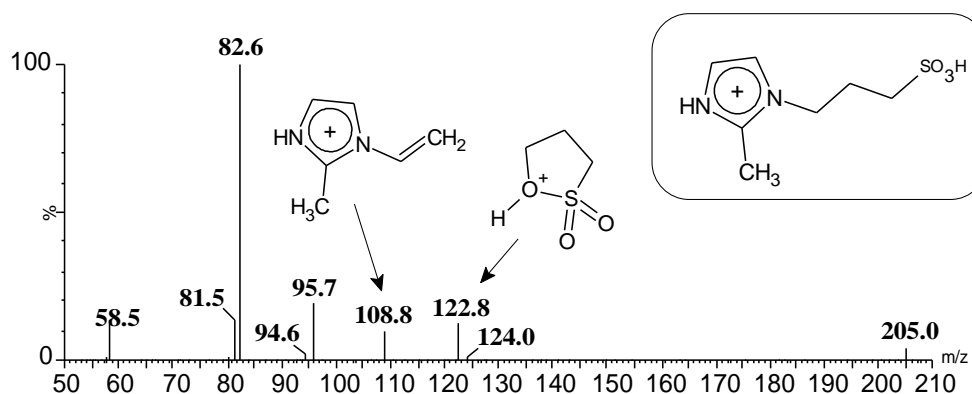
3.8. att. Stāvoklī 1 deiterija atomus saturošā savienojuma **A2** masspektrs, iegūts ar 30 eV sadursmju enerģiju

No šī masspektra izriet, ka savienojuma **a** fragmentācijā veidojas divi dažādi izobāri joni ar m/z 123, kurus iespējams diferencēt pateicoties deiterija atomu ievadīšanai. No

savienojuma **A2** masspektra izriet, ka jona ar m/z 125 sastāvā ietilpst divi deiterija atomi, kas pierāda protonētā propānsultona veidošanos. Savukārt, jons ar m/z 123 deiterija atomus nesatur. Tāpēc ir pamats uzskatīt, ka CD_2 grupa neietilpst tā sastāvā, un piedāvāt molekulāro formulu $C_7H_{11}N_2^+$. Doto formulu varētu saistīt ar dažādām struktūrām, no kurām ticamākā būtu 1,2-dimetil-3N-vinilimidazolijs struktūra, kas veidojas pēc metānsulfonskābes molekulas eliminēšanās (sk. 3.3. vien.).



Dotā fragmenta rašanos var netieši pierādīt, salīdzinot iezīmēto savienojumu **A1** un **A2** masspektus. Savienojuma **A2** gadījumā jonam ar m/z 123 ir neliela intensitāte (ap 1 – 1,3 %). Savienojuma **A1** gadījumā dotajam jonam ir jāparādās ar m/z 124, jo vienam D atomam būtu jāmigrē uz metānsulfonskābes molekulu. Šī jona rašanās **A1** masspektros novēro ar ļoti zemu intensitāti (ap 0,3 %). Iespējams, ka jona veidošanos samazina kinētiskais izotopu efekts, saistīts ar deiterija atoma piedalīšanos pārejas stāvoklī. Lai pārbaudītu šo hipotēzi, tika uzņemts tāda CJŠ masspektrs, kura fragmentācijas gaitā veidoto protonētā propānsultona un vinilimidazolijs jonu m/z vērtības nozīmīgi atšķirtos (sk. 3.9. att.).

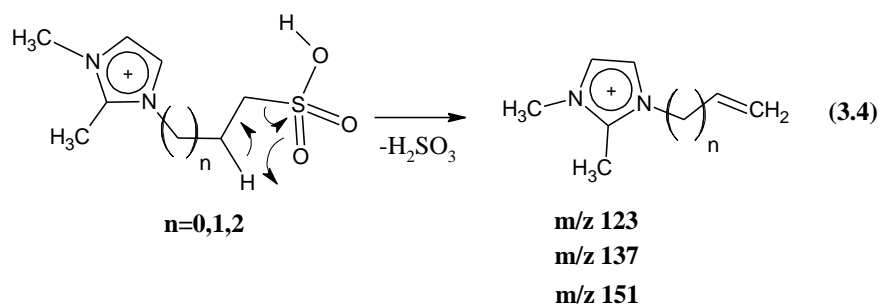


3.9. att. 3-(2-Metil-N-imidazolio)-propān-1-sulfonāta masspektrs, kas parāda vienlaicīgu vinilimidazolijs un protonētā propānsultona veidošanos SID gaitā

Šajā gadījumā protonētajam propānsultonam atbilst signāls ar m/z 123, bet 2-metil-N-vinilimidazolijam – ar m/z 109. Līdz ar to, var secināt, ka metānsulfonskābes eliminēšanas process notiek vienlaicīgi ar protonētā propānsultona veidošanās SID apstākļos.

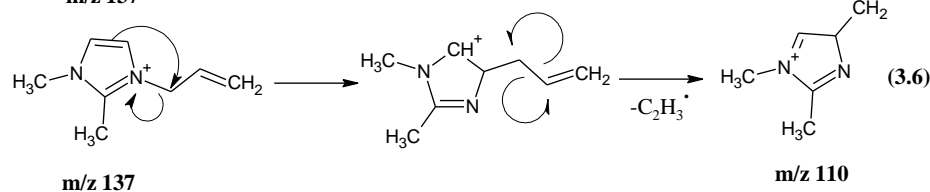
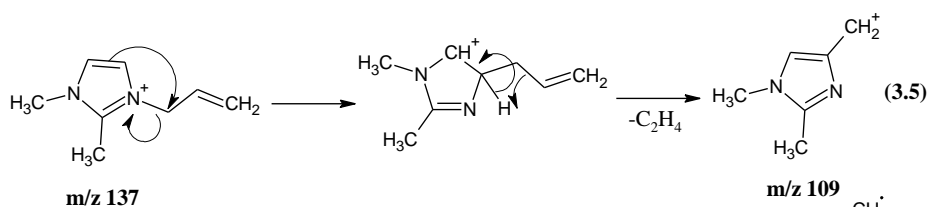
Ir pamats uzskatīt, ka līdzīga reakcija notiek arī savienojuma **b** gadījumā, kas izraisa jona ar m/z 137 rašanos, bet savienojuma **c** gadījumā tā nav iespējama metilēngrupu skaita trūkuma dēļ.

Palielinot sadursmju enerģiju līdz 10 eV, var novērot dažus citus $[a+H]^+$ jona fragmentus. Jona ar m/z 137 (m/z 139 savienojumu **A1** un **A2** gadījumā) rašanās saistīta ar sērpaskābes eliminēšanos (sk. 3.4. vien.).



Līdzīgu procesu novēro arī savienojuma **b** (m/z 151) un **c** (m/z 123) fragmentācijas gaitā. Savienojuma **b** gadījumā dotajam jonam ir zemāka intensitāte, ko var izskaidrot ar citiem kinētiski un termodinamiski izdevīgākiem procesiem. Kā alternatīvu sērpaskābes atšķelšanās mehānismam var piedāvāt pakāpenisku HSO_3^{\cdot} un H^{\cdot} radikāļu atbrīvošanās [110].

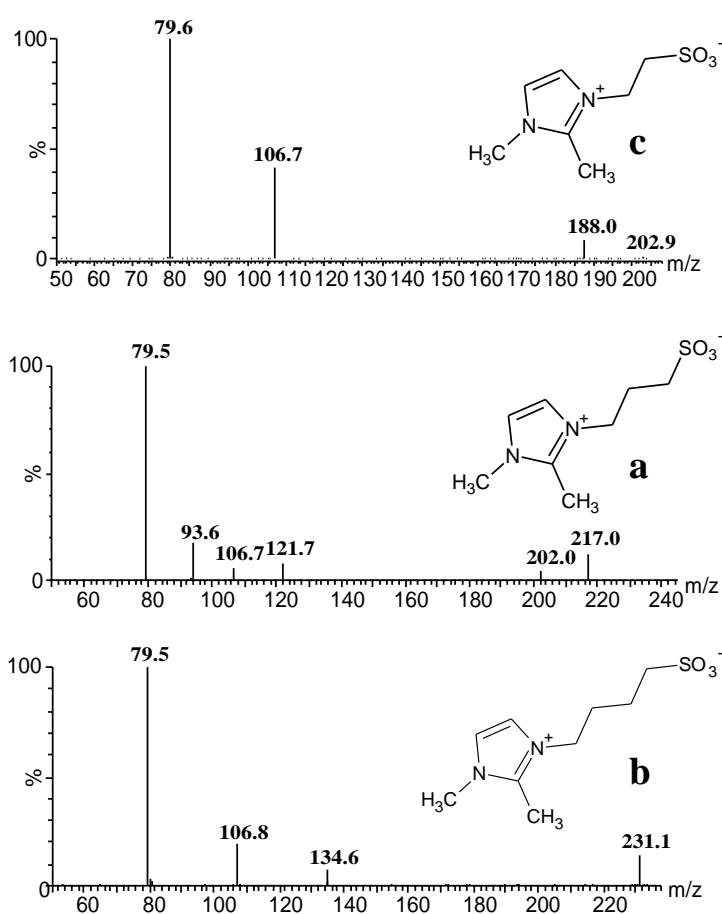
Līdz ar sērpaskābes eliminēšanos savienojuma **a** masspektros parādās joni ar m/z 109 un 110. To rašanās savienojumu **a** un **b** gadījumā novērojama 10 – 50 eV diapazonā, kas norāda uz īpašu stabilitāti. Savienojuma **A1** masspektros var saskatīt doto jonu signāla nobīdi par 2 m/z vienībām. Tas liecina, ka tajos ietilpst CD_2 grupa, kas atrodas blakus slāpekļa atomam. Jona ar m/z 109 veidošanās raksturīga visiem trim homologiem, bet jons ar m/z 110 nav raksturīgs vienīgi savienojumam **c**. Darbā [97] veiktie eksperimenti deva pamatu savienojumu **a** un **b** gadījumā jonu ar m/z 109 un 110 struktūru attēlot ar 3.5. un 3.6. shēmām.



Iespējams, ka lādiņa vai nesapārota elektrona klātbūtne izraisa šo jonu tālāku cikla paplašināšanos līdzīgi benzilkatjona pārgrupēšanai par tropīlija jonu [8]. Jāpiebilst, ka atšķirībā no **a** un **b**, savienojums **c** veido jonu ar m/z 109, kura iespējamā struktūra parādīta ar 3.2. vien. Tas savukārt liecina par izobāro jonu ar m/z 109 rašanos savienojuma **c** SID gaitā.

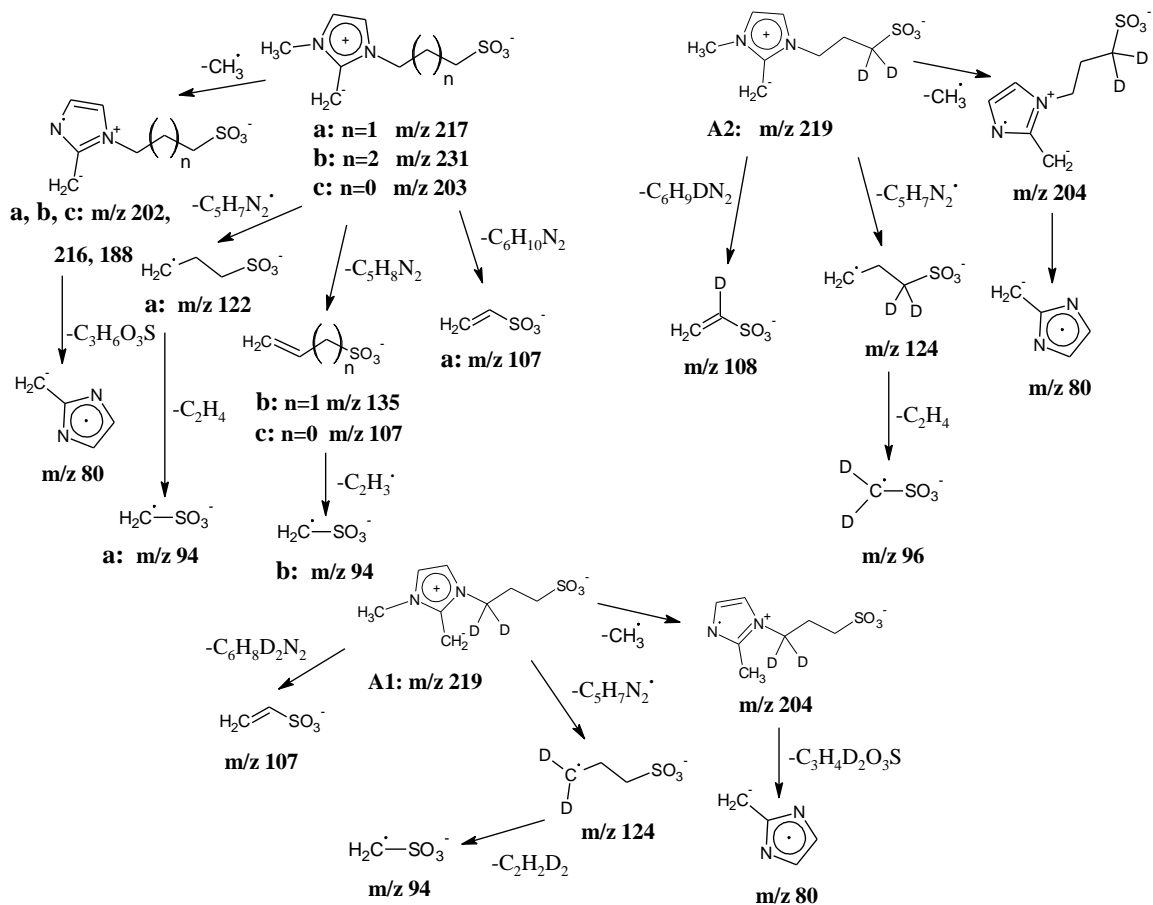
3.4.2. Sulfonāta grupu saturošo CJS⁺ deprotonēto molekulu fragmentācija

EIJ apstākļos iespējams izpētīt savienojumu **a**, **b** un **c** deprotonēto daļiņu ķīmiskās īpašības gāzes fāzē. Šo savienojumu $[M-H]^-$ jonu MS² spektri redzami 3.10. att.



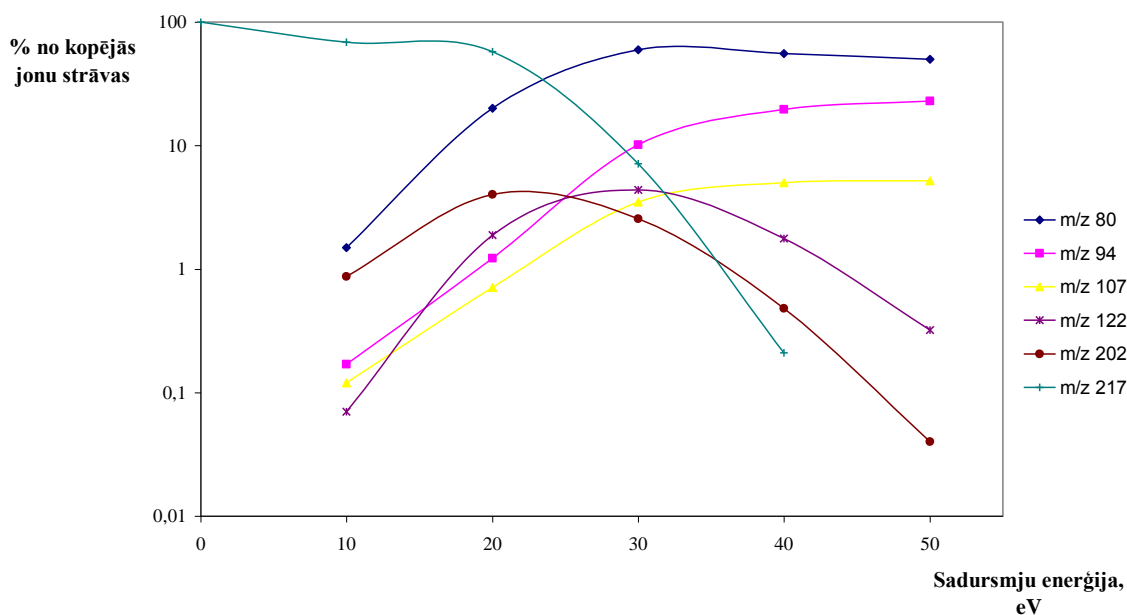
3.10. att. Savienojumu **a**, **b** un **c** MS² spektri, iegūti ar 20 eV sadursmju enerģiju

Masspektri rāda, ka SID apstākļos veidotie fragmenti ir līdzīgi. Homologu **a**, **b**, **c**, kā arī ar deiteriju iezīmēto savienojumu **A1** un **A2** fragmentu veidošanās redzamā 3.11. attēlā.



3.11. att. Savienojumu a, b, c un deiterēto analogu A1 un A2 deprotonēto molekulu SID procesu shēma

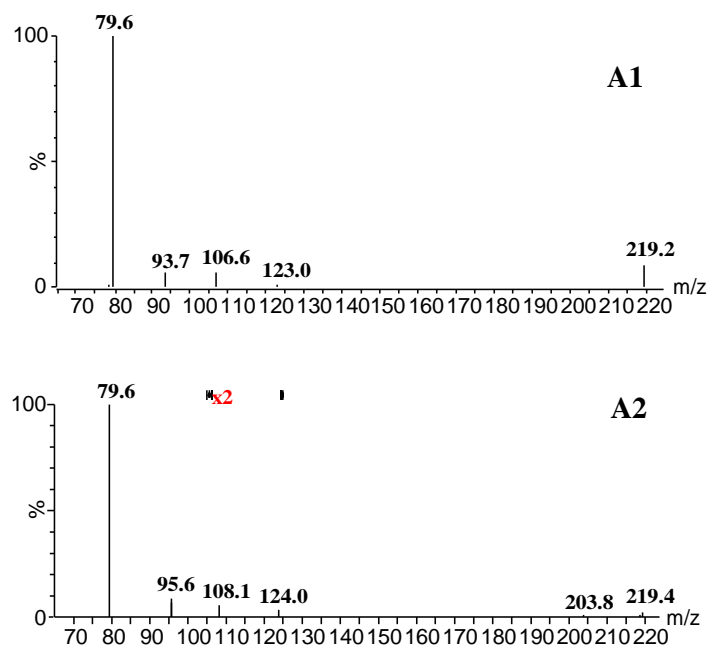
Fragmentāciju var izvērtēt ar savienojuma **a** piemēru, nozīmīgāko $[\mathbf{a}\text{-H}]^-$ jona fragmentu radītās strāvas daļu grafiski attēlojot sabrukšanas diagrammā (sk. 3.12. att.).



3.12. att. [a-H]⁻ jona sabrukšanas diagramma, kas parāda nozīmīgāko fragmentu strāvas daļu atkarībā no sadursmju enerģijas

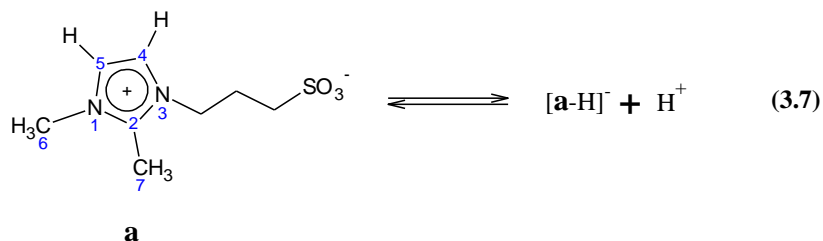
Lielākai daļai jonu ir pārskaita m/z vērtības, kas norāda uz jona [a-H]⁻ fragmentācijas procesā pārsvarā veidotām nepārskaita elektronu daļiņām (anjonradikāļiem vai distoniskiem joniem). Tāda pati tendence novērojama arī [b-H]⁻ un [c-H]⁻ fragmentācijas procesā. Šī īpašība būtiski atšķir deprotonēto CJŠ šķelšanos no atbilstošo [M+H]⁺ jonu fragmentācijas, kas apskatīta iepriekšējā apakšnodaļā.

Minēto savienojumu masspektu interpretācijas gaitā radās jautājums par protona atrašanās vietu no CJŠ molekulas. CJŠ uzbūve norāda uz vairākām vietām, kurās var notikt deprotonēšanās. Eksperimenti ar iezīmētiem savienojumiem **A1** un **A2**, parādīja, ka propānsulfonāta ķēdē deprotonēšanās nenotiek, jo abos gadījumos novēro [A1-H]⁻ un [A2-H]⁻ jonus ar m/z 219 (sk. 3.13. att.).



3.13. att. Iezīmēto CJŠ [A1-H]⁻ un [A2-H]⁻ MS² spektri, iegūti ar 20 eV sadursmju enerģiju

Tas liecina, ka H-atoma atraušana notiek no 1,2-dimetilimidazolija cikla. Lai to pamatotu, tika veikti aprēķini ar kvantu ķīmijas metodēm protona atraušanas vietas noteikšanai atbilstoši vienādojumam 3.7.



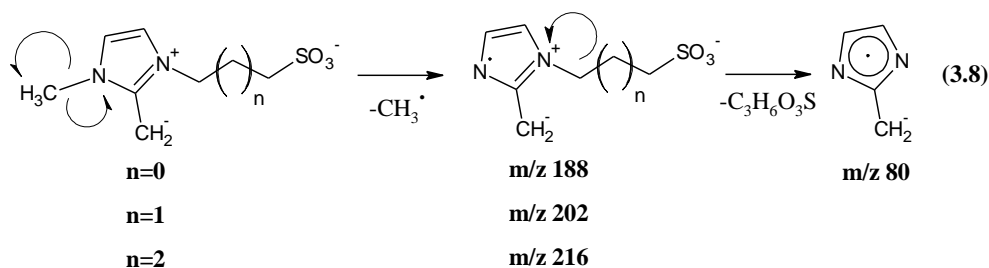
Šajā vienādojumā parādīta savienojuma **a** gāzes fāzes deprotonēšanas reakcija, kuras gaitā protons tiek atrauts no pozīcijām 4, 5, 6 vai 7. Rezultātā veidojas [a-H]⁻ daļiņas ar atšķirīgu negatīvā lādiņa izvietojumu. Katrai no šīm daļiņām tika izrēķinātas gāzes fāzes bāziskuma vērtības ($\Delta G_{g,298}$) saskaņā ar 2.1. vienādojumu, lai noskaidrotu termodinamiski izdevīgāko protona atraušanas vietu. Iegūtās vērtības apkopotas 3.1. tabulā.

Gāzes fāzes bāziskuma ($\Delta G_{g,298}$) vērtības, aprēķinātas dažādām $[\mathbf{a-H}]^-$ daļiņām, lietojot funkcionāli *B3LYP* ar *6-31++g(d,p)* bāzu komplektu

Daļiņa/protona atrašanās vieta	$E+E_{NPE}$, Ha	S, cal/mol·K	TS, Kcal/mol	$\Delta G_{g,298}$, Kcal/mol
a (neitrāla forma)	-1046,40	122,0	36,35	
a/4	-1045,84	123,4	36,78	352,8
a/5	-1045,84	126,8	37,78	353,6
a/6	-1045,83	125,8	37,50	360,7
a/7	-1045,86	128,6	38,34	339,0

Tabulas 3.1. dati liecina par stāvoklī 7 esošā protona vieglāku atrašanos no 1,2-dimetilimidazolijs cikla, jo atbilstošā $\Delta G_{g,298}$ vērtība ir viszemākā. Tas var būt saistīts ar īpašu stabilizāciju rezonanses dēļ starp deprotonēto metilgrupu un imidazola imīnija fragmentu. Līdzīga stabilizācija citu deprotonēto daļiņu gadījumā nenotiek.

Sabrukšanas diagrammā (sk. 3.12. att.) redzams, ka $[\mathbf{a-H}]^-$ (m/z 217) dominē masspektros līdz 20 eV. Dažus fragmentus var novērot jau pie 10 eV, bet to intensitāte ir zema. Viens no procesiem, kas līdzīgs visiem trim homologiem, ir homolītiskā H_3C-N saites šķelšanās. Tās rezultātā veidojas joni ar m/z 202, 216 un 188 (sk. 3.8 vien.).

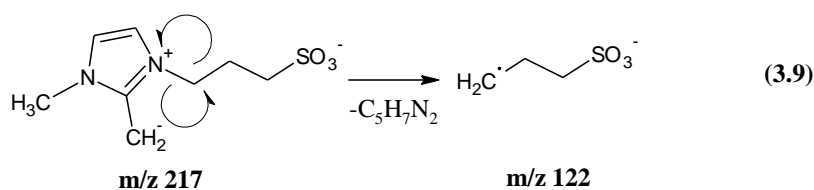


Savienojuma **a** gadījumā dotais process notiek līdz 20 eV, bet augstākā enerģijā notiek tālāka sadalīšanās ar sīkāku fragmentu veidošanos.

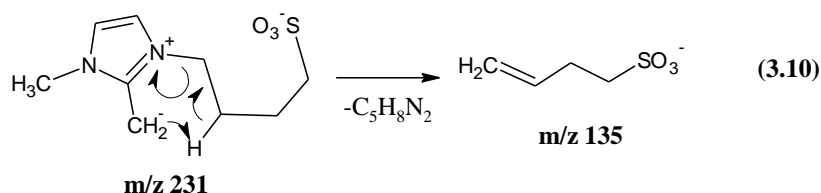
Visus trīs homologu sadalīšanās notiek veidojoties jonam ar m/z 80. Spriežot pēc savienojuma **a** sabrukšanas diagrammas, šim jonam saglabājas īpaša stabilitāte arī augstā enerģijā. Deiterēto analogu **A1** un **A2** masspektros jona m/z vērtība saglabājas, kas liecina, ka tajā neietilpst 1. un 3. stāvoklī esošās CD_2 grupas. Pastāv iespēja, ka tas veidojas atbilstoši 3.8.

izteiksmei alkānsulfonāta grupu saturošās ķēdes heterolītiskās atšķelšanas rezultātā. Kaut gan, nevar izslēgt varbūtību, ka dotais jons atbilst arī sēra trioksīda anjonradikālim, kas veidojas pēc C–SO₃⁻ saites homolītiskās šķelšanās. Līdzīgi procesi raksturīgi daudziem sulfonāta grupu saturošiem savienojumiem [57, 58]. Iespējams, ka notiek konkurence starp abu jonu veidošanos un to signāli ir pārklājušies. Šo problēmu varētu atrisināt, izmantojot augstas izšķiršanas masspektrometrijas datus, vai ar ¹⁸O/¹⁵N/¹³C iezīmēto CJŠ analīzi.

Savienojuma **a** gadījumā novēro vēl vienu procesu, kas notiek saskaņā ar homolītiskās šķelšanās mehānismu. Process saistīts ar jona m/z 122 veidošanos sadursmju enerģiju intervālā no 10 līdz 50 eV. Deiterēto analogu **A1** un **A2** masspektros jona m/z vērtība abos gadījumos nobīdās par 2 m/z vienībām. Tas liecina par propānsulfonāta grupu saturošas ķēdes esamību jona ar m/z 122 sastāvā. Dotā jona rašanos var aprakstīt ar 3.9. vienādojumu.



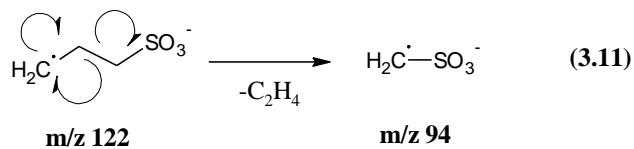
Kā izriet no vielu **b** un **c** masspektriem, aprakstītais process šiem savienojumiem nav raksturīgs. Savukārt to masspektros parādās joni ar m/z 135 un m/z 107. Šāda tipa fragmentācijas pamatošanai var izmantot saskaņotu protona pārneses mehānismu, kurā piedalās 1,2-dimetilimidazolijs gredzens. Dotais mehānisms savienojumam **b** atspoguļots 3.10. vienādojumā.



Saprotams, ka jons ar m/z 107 savienojuma **c** fragmentācijas gaitā veidojas līdzīgā veidā.

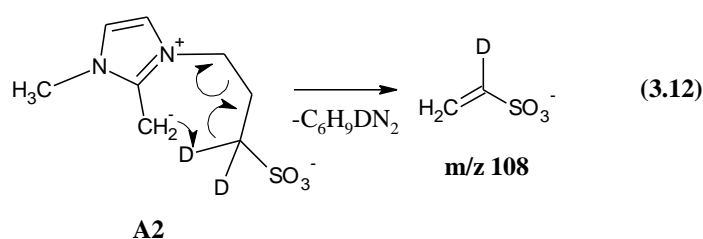
Vēl vienu homolītiskās šķelšanās procesu ilustrē jona ar m/z 94 veidošanās, kas atrodams [**a**-H]⁻ un [**b**-H]⁻ SID spektros. Salīdzinot iezīmēto **A1** un **A2** analogu SID

masspektros, var secināt, ka dotais anjonradikālis satur CD₂ fragmentu blakus sulfonāta grupai. Pastāv varbūtība, ka pētāmā daļiņa atbilst metānsulfonskābes anjonradikālim, kas veidojas jona ar m/z 122 sabrukšanas rezultātā. Doto procesu var izteikt ar 3.11. vienādojumu.



Savienojuma **b** gadījumā dotā jona rašanās varētu būt saistīta ar m/z 135 sadalīšanos pēc līdzīga mehānisma. Savukārt vielas **c** gadījumā par šādu pārvērtību nekas neliecina. Acīmredzot nepastāv prekursors, kuram būtu iespējams šāds fragmentācijas maršruts.

Pārskaita elektronu daļiņas ir retāk sastopamas [M-H]⁻ jonu fragmentācijas gaitā. Viena šāda tipa fragmenta rašanās ar m/z 107 ir novērota savienojuma **a** SID masspektros. Dotais jons ir stabils sadursmju enerģiju intervālā 10 – 50 eV. Savienojuma **A1** SID masspektrā (sk. 3.13. att.) redzams, ka dotais jons nesatur D atomus. Tas norāda, ka 1,2-dimetilimidazolija gredzenam blakus esošā metilēngrupa neietilpst šī jona sastāvā. Savukārt **A2** masspektrā novērota interesanta īpašība, kas saistīta ar minētā jona signāla nobīdi par 1 m/z vienību. Tas, iespējams, pierāda viena CH₂SO₃⁻ grupas protona zudumu m/z 107 veidošanas gaitā. Tas pamato vinilsulfonāta jona veidošanos saskaņā ar iekšmolekulāro mehānismu, kas parādīts savienojuma **A2** piemērā 3.12. vienādojumā.



Shēma parāda tikai procesa būtību, bet pastāv iespēja, ka pārvērtība notiek vairākos posmos, kuru pierādīšanai nepieciešami papildus eksperimenti.

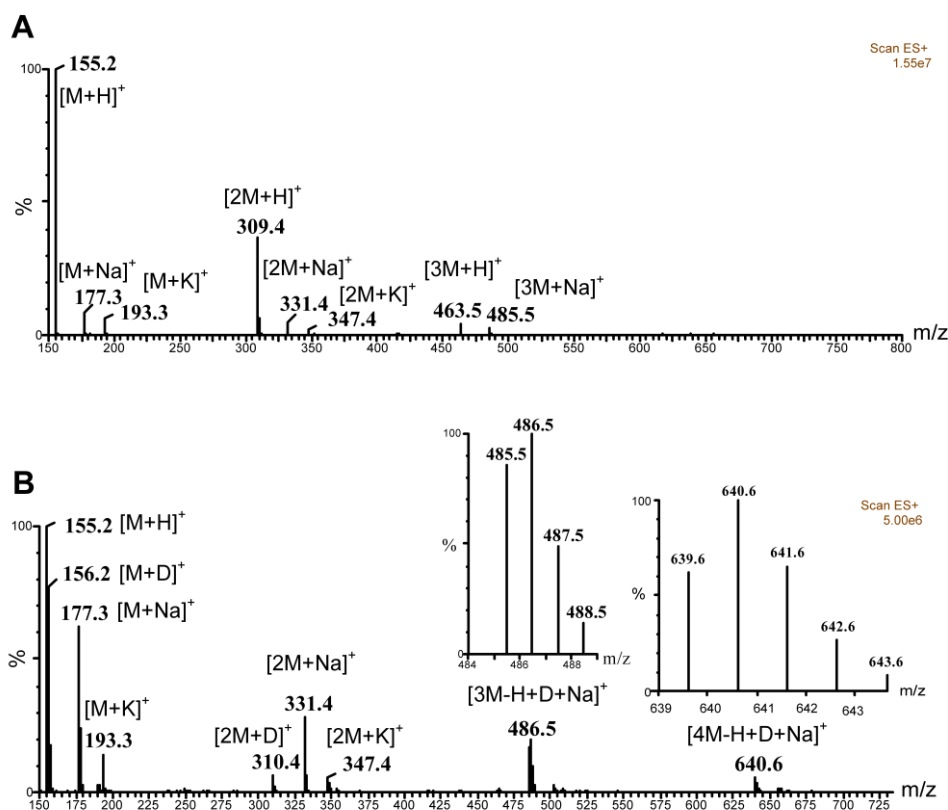
No iepriekšējās analīzes izriet, ka fragmentu rašanās no CJŠ [M+H]⁺ un [M-H]⁻ ar nedaudziem izņēmumiem, notiek pēc līdzīgiem mehānismiem. Oglekļa atomu skaits starp 1,2-dimetilimidazolija gredzenu un sulfonāta grupu būtiski ietekmē fragmentu signālu intensitātes pie noteiktām sadursmju enerģijām. [M+H]⁺ jonu fragmentācija pārsvarā virzīta uz 1,2-

dimetilimidazolija veidošanos, kas efektīvi stabilizē pozitīvo lādiņu. Lielākā daļa fragmentu ir pārskaita elektronu daļiņas. Savukārt, $[M-H]^-$ jonu fragmentācijas gaitā novēro virkni sulfonāta grupu saturošo anjonradikāļu, kas stabilizē negatīvo lādiņu.

3.4.3. Karboksilāta grupu saturošo CJŠ ķīmiskās īpašības elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā

Karboksilāta grupu saturošie savienojumi **MeImEC**, **MeImPC** un **MeImBC** (sk. 3.2. att.) veido stabilas protonētas molekulas EIJ pozitīvo jonu skenējuma apstākļos. Savukārt negatīvo jonu skenējumā stabilas daļiņas neveidojas, tāpēc tālākā diskusija veltīta šo savienojumu ķīmiskajām īpašībām pozitīvo jonu skenējumā.

Aduktu veidošanās pozitīvo jonu skenējumā. Pētāmo savienojumu struktūrā ietilpst negatīvi lādētā karboksilāta grupa, tāpēc ir iespējama aduktu veidošanās ar sārnu metālu joniem. Šī iemesla dēļ, iespējamā arī lādētu oligomēru veidošanās. Raksturīgs karboksilāta grupas saturoša savienojuma **MeImPC** EIJ masspektrs ir redzams 3.14. (A) att.

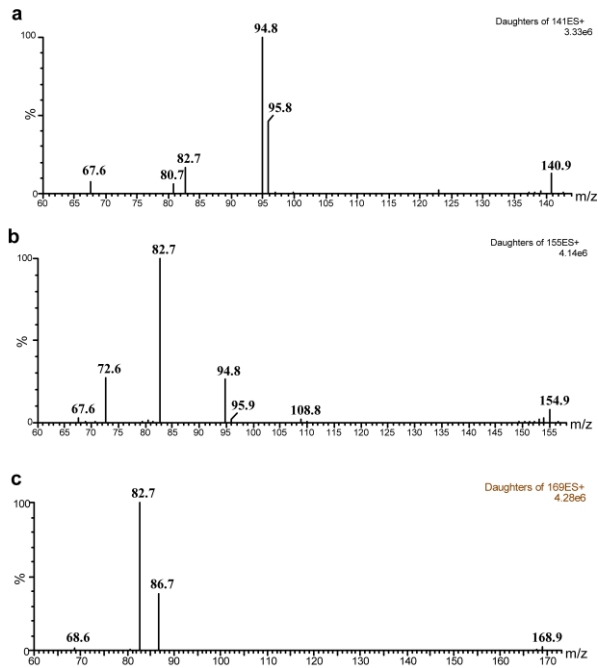


3.14. att. Savienojuma **MeImPC** EIJ masspektri, iegūti MeOH/H₂O/CH₃COOH (A) un MeOH/D₂O/CH₃COOD (B) šķīdumos. Palielinājumos parādīta Na⁺ saturošo trimēru un tetramēru izotopu kompozīcija (B)

Kā redzams, savienojums **MeImPC** pārsvarā veido dimēra daļiņas $[2M+H]^+$ un nelielu daudzumu adukta $[2M+Na]^+$, ja EIJ spektra iegūšanai izmanto paskābinātu MeOH/H₂O šķīdumu. Dimēra rašanās saistīta ar ūdeņraža saišu veidošanos šķīdinātāja iztvaikošanas rezultātā, bet adukts veidojas lādētu daļiņu mijiedarbības rezultātā šķīdumā. Attēls 3.14. (A) ļauj pārlicināties arī par K⁺ saturošu aduktu veidošanos – $[2M+K]^+$, $[3M+K]^+$ un augstāku. Kā jau minēts (sk. 1.2.2. apakšnodaļu), sārmu metālu katjoni nonāk šķīdumā no stikla traukiem, kurus izmanto AEŠH kvalitātes šķīdinātāju uzglabāšanai. Mazos daudzumos tie ir nepieciešami pārpalikuma lādiņa veidošanai uz mikropilienu virsmas. Līdzīgu aduktu veidošanās novērota sulfonāta grupu saturošo CJŠ gadījumā [108]. Konusa sprieguma palielināšana, kas būtiski ietekmē jonu iekšējo enerģiju zema spiediena reģionā, maz ietekmē nekovalenti saistītos aduktus. Tas norāda uz to īpašu stabilitāti gāzes fāzē. Eksperimentos ar konusa un ekstraktora spriegumiem konstatēts, ka adukti var būt stabili konusa sprieguma vērtību diapazonā 30 – 150 V un ekstraktora spriegumu reģionā 2 – 50 V. Šāda stabilitāte ir augstāka nekā vairumam kovalentu savienojumu gāzes fāzē. Rezultāti parādīja, ka adukts $[M+Na]^+$ (sk. 3.14. (A) att.) nesadalās pat 150 V, bet $[3M+Na]^+$ un $[2M+Na]^+$ uzrāda zemāku stabilitāti. Kopumā aduktu stabilitāte samazinās līdz ar m/z vērtības palielināšanos.

Aduktu pētīšanas gaitā deiterēta šķīdinātāja (MeOH/D₂O/CH₃COOD) vidē (sk. 3.14. (B) att.) tika novērotas dažas izmaiņas. Pirmkārt, masspektrā dominē smagākie adukti $[nM+Na]^+$, kur n=1, 2, 3, 4. Iespējams, ka šis fakts ir saistīts ar dažādu Na⁺ jonu saturu H₂O un D₂O, kā arī CH₃COOH un CH₃COOD reaģentos. Otrkārt, masspektri norāda uz H/D apmaiņas reakcijām starp savienojumiem **MeImEC**, **MeImPC**, **MeImBC** un šķīdinātāju. Šādu procesu klātbūtni pierāda gan aduktu izotopu sastāvs, gan protonēto molekulu izotopu sastāvs. Abos gadījumos masspektros veidojas virkne izotopu signālu, piemēram, M+1 un M+2 signāli ar anomāli augstām relatīvajām intensitātēm, kas neatbilst normālam izotopu sadalījumam šāda sastāva molekulās (pierādīts ar izotopu kalkulatora *AMDIS* palīdzību). Tas nozīmē, ka H/D apmaiņas reakcijās var piedalīties CJŠ sastāvā esošie ūdeņraža atomi, piemēram, imidazola gredzena protoni. Kā redzams, aduktu sastāvu var ietekmēt šķīdinātāja un piedevu izvēle.

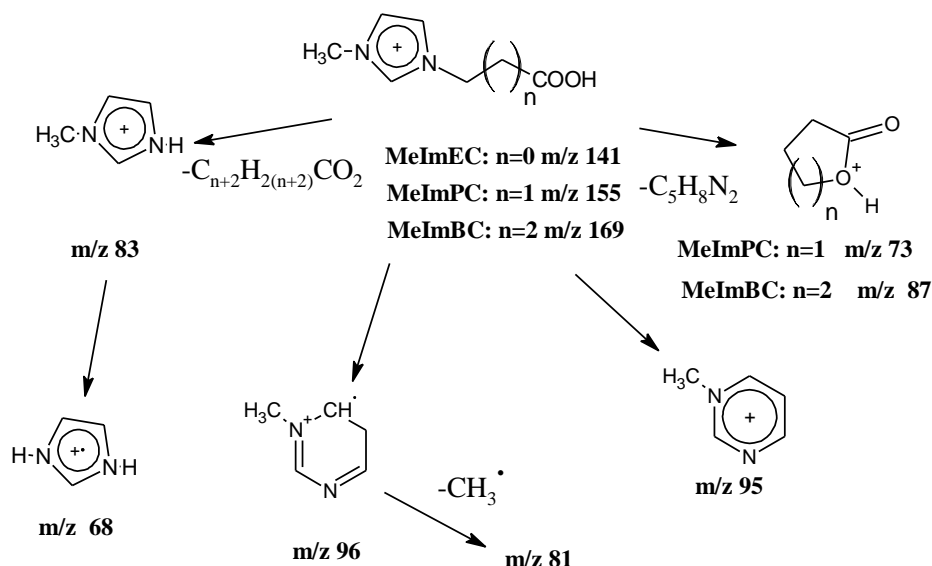
Karboksilāta grupu saturošo CJŠ fragmentācija pozitīvo jonu skenējumā. Raksturīgi karboksilāta grupu saturošo CJŠ SID masspektri ir redzami 3.15. att.



3.15. att. **MeImEC (a), MeImPC (b) un MeImBC (c) masspektri, iegūti ar 30 eV SE**

Savienojuma **MeImEC** masspektā pamatsignāls atbilst jonam ar m/z 95. Darbos [7, 8 un 111] parādīts, ka šāda tipa jonu veidošanās saistīta ar imidazoliņa cikla paplašināšanos un alkilķēdes atdalīšanos, kas veicina aromātiskā pirimidīniņa cikla veidošanos, kuram piemīt īpaša stabilitāte. Līdzīgs process var veicināt jona m/z 96 rašanos. Šajā gadījumā iespējams radikāļu noteikts process, jo jonam ar m/z 96 ir nepāra elektronu skaits. Abu jonu rašanās ir raksturīga arī augstākiem homoloģiem **MeImPC** un **MeImBC**, bet ar augstākām sadursmju enerģijām 40 – 50 eV intervālā. Atšķirībā no **MeImEC** augstāko homoloģu **MeImPC** un **MeImBC** masspektros pamatsignāls atbilst 1-metilimidzoliņa jonam ar m/z 83. Šo savienojumu masspektros novērojama arī jonu ar m/z 73 un 87 veidošanās. Pastāv varbūtība, ka dotie joni veidojas lādiņa virzītās heterolītiskās N – C saites šķelšanās rezultātā ar 1-metilimidzola molekulas atbrīvošanos un protonētā laktona cikla veidošanos.

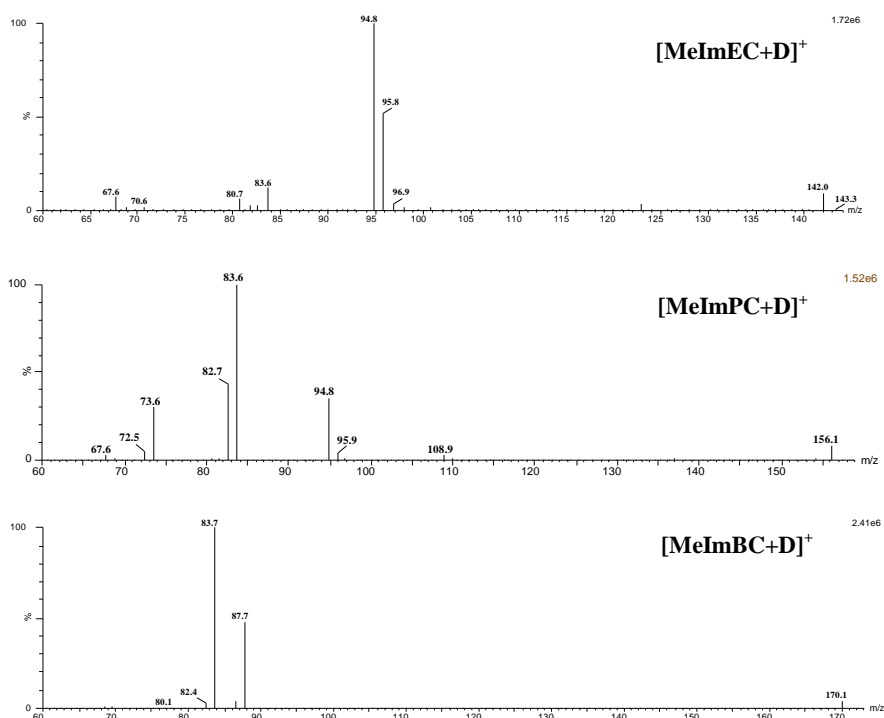
Visiem trim karboksilāta tipa CJŠ raksturīga mazāku fragmentu veidošanās. Piemēram, joni ar m/z 68 un m/z 81 rodas sadursmju šūnā, palielinot enerģiju līdz 30 – 50 eV. Šo jonu veidošanās saistīta ar metilgrupas atraušanos pēc radikāļu mehānisma. Apkopojot iepriekš minēto, izstrādāta kopējā karboksilātu fragmentācijas shēma (sk. 3.16. att.).



3.16. att. Karboksilāta grupu saturošo CJŠ galveno fragmentācijas maršrutu shēma, iegūta EIJ – SID eksperimentos

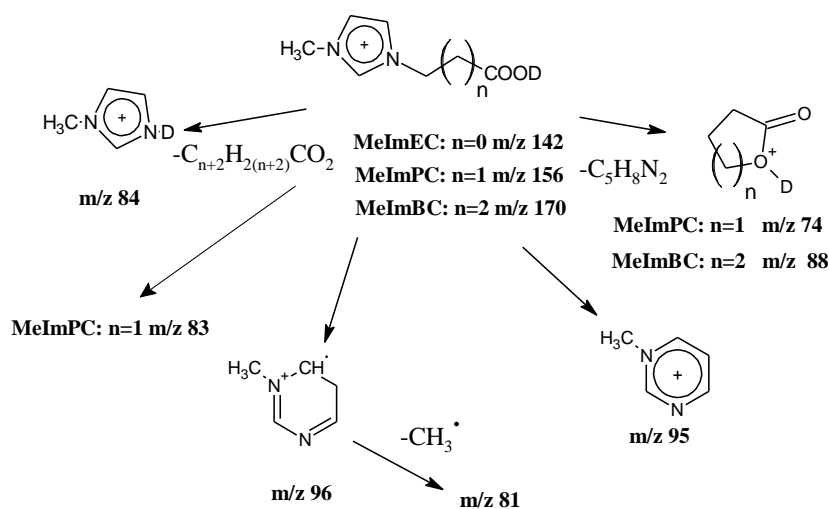
Salīdzinot 3.16. att. fragmentācijas maršrutus ar augstāk parādītiem sulfonāta grupu saturošo CJŠ fragmentācijas maršrutiem (sk. 3.6. att.), redzams, ka funkcionālā grupa praktiski nemaina fragmentācijas virzienu un iegūto jonu veidu. Viens izņēmums ir sulfonātiem raksturīgā metānsulfonskābes molekulas atbrīvošanās (sk. 3.6. att. un 3.3. vien., veidojoties m/z 123). Analogs etiķskābes atšķelšanās process nav novērojams karboksilātu gadījumā. Savienojuma **MeImEC** gadījumā šāda tipa process nav iespējams, jo trūkst nepieciešamais atomu daudzums. Savienojuma **MeImPC** gadījumā šī procesa gaitā būtu jāveidojas jonam ar m/z 95, kas pārklātos ar metilpirimidīnija jonam atbilstošo signālu, kas ir minēts iepriekš (sk. 3.16. att.). Savukārt, **MeImBC** gadījumā, būtu jāveidojas jonam ar m/z 109, kas ir novērojams tikai fona līmenī un tā atbilstību pamatot ir problemātiski. Līdz ar to, var secināt, ka etiķskābes eliminēšanās process nav raksturīgs karboksilāta grupu saturošiem CJŠ. Šādas atšķirības starp sulfonātiem un karboksilātiem varētu izskaidrot ar karboksilāta un sulfonāta grupu bāziskuma atšķirībām gāzes fāzē. Ja pieņemtu, ka abi procesi notiek pēc shēmas, kas ir parādīta 3.3. vien., tad protona pārnese no C – H saites uz S – O saiti būtu svarīga. Zināms, ka CH_3COO^- ir mazāks bāziskums gāzes fāzē, nekā CH_3SO_3^- [112], kā rezultātā protona atrašanās ir grūtāka karboksilātu nekā sulfonātu gadījumā.

Lai apstiprinātu karboksilāta tipa CJŠ fragmentācijas maršrutus, SID eksperimenti veikti ar deiterētiem analogiem, iegūtiem *in situ*, izmantojot H/D apmaiņas procesus $\text{MeOH}/\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOD}$ šķīdumā. Tipiskākie **MeImEC**, **MeImPC** un **MeImBC** masspektri redzami 3.17. att.



3.17. att. Deiterēto karboksilāta CJŠ masspektri, iegūti ar 30 eV SE

Kā redzams no 3.17. att., jonu signāli, kas ir saistīti ar skābā protona piedalīšanos fragmentācijas procesā, ir nobīdīti par 1 m/z vienību augstāko vērtību virzienā. Deiterēto un nedeiterēto karboksilāta CJŠ masspektu salīdzinājums (sk. 3.17. un 3.15. att.) apstiprina 3.16. att. redzamos fragmentācijas maršrūtus. Deiterēto karboksilāta CJŠ fragmentācijas maršruti apkopoti 3.18. att.



3.18. att. Deiterēto karboksilāta grupu saturošo CJŠ galveno fragmentācijas maršrutu shēma, iegūta EIJ – SID eksperimentos

Apkopojot iepriekš izklāstīto, var secināt, ka karboksilāta tipa CJŠ fragmentācija ir atkarīga no oglekļa atomu skaita starp karboksilāta grupu un imidazolija gredzenu. Salīdzinot karboksilāta un sulfonāta tipa CJŠ, jāsecina, ka funkcionālā grupa visai maz ietekmē veidoto jonu tipu. Atšķirības ir novērotas tikai alkānskābju (metānsulfonskābes un etiķskābes) atšķelšanās procesos. Savukārt krasas funkcionālās grupas noteiktas atšķirības novērotas negatīvo jonu skenējumā, jo karboksilātus, atšķirībā no sulfonātiem, praktiski nav iespējams deprotonēt EIJ gaitā.

3.5. Kompleksu veidošanās starp cviterjonu tipa jonu savienojumiem un dažādiem amīniem elektroizmidzināšanas jonizācijas gaitā

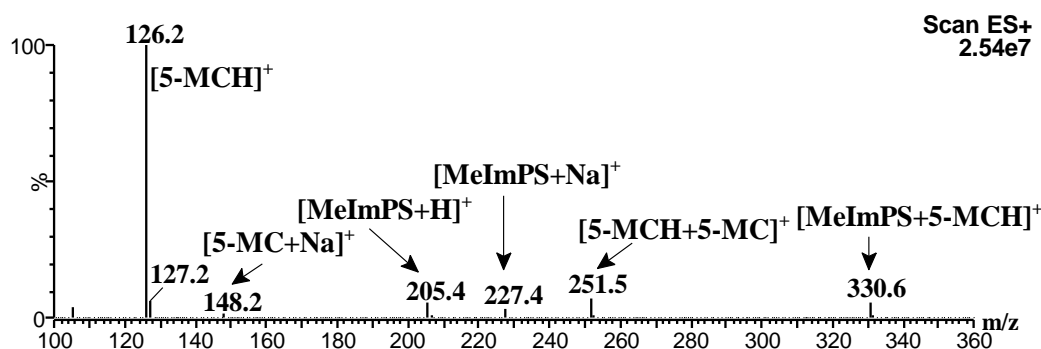
EIJ eksperimenti ar šķīdumiem, kas satur CJŠ un vielas ar dažādām funkcionālām grupām, parādīja, ka CJŠ ir tieksme veidot kompleksus ar dažādiem amīniem. Īpaši stabili kompleksu veidošanās novērota, pētot CJŠ un 5-metilcitozīna mijiedarbības šķīdumos. Šādiem kompleksiem iespējams atrast praktisku pielietojumu, piemēram, ķīmiskajā analizē. Šajā apakšnodaļā tiks apskatītas šo kompleksu īpašības gāzes fāzē un faktori, kas varētu ietekmēt to stabilitāti. Sākumā aplūkosim dažus parametrus, kas ietekmē šāda tipa kompleksu veidošanos šķīdumā.

3.5.1. Šķīdinātāja tīrības ietekme uz kompleksu veidošanos

Kompleksu veidošanās starp CJŠ un 5-metilcitozīnu (5-MC) ir stipri atkarīga no izmantoto šķīdinātāju kvalitātes. Pirmajos eksperimentos tika izmantoti AEŠH līmeņa tīrības šķīdinātāji ar pārāk augstu (AEŠH – MS mērķiem) Na⁺ un K⁺ jonu koncentrāciju. Tāpēc, masspektros novēroti adukti ar sastāvu [CJŠ+5-MC+Na]⁺ [113]. Protams, arī šādu kompleksu veidošanos varētu izmantot analītiskiem mērķiem, bet kontrolēt Na⁺ un K⁺ koncentrācijas šķīdumos, īpaši bioloģiskas izcelsmes paraugos, praktiski nav iespējams. Turklāt augstas sārmu metālu jonu koncentrācijas piesārņo aparatūru. Pilnīgi citas īpašības ir [CJŠ+5-MC+H]⁺ kompleksi, kuru rašanās ir vairāk atkarīga no pašu reaģējošo vielu koncentrācijas, nekā no ārējiem faktoriem. Minēto apsvērumu dēļ, tālākā darba daļa veltīta tikai protonu kompleksu veidošanai.

Visos eksperimentos, lai samazinātu Na⁺ un K⁺ traucējošo efektu, izmantoti tikai AEŠH – MS kvalitātes šķīdinātāji ar pazeminātu ($\leq 0,05-0,1$ mg/kg) sārmu metālu jonu koncentrāciju,

ieskaitot ūdeni, acetonitrilu, metanolu un skudrskābi. 5-Metilcitozīna un **MeImPS** kompleksa masspektrs, kas iegūts AEŠH – MS kvalitātes acetonitrilā ir apskatāms 3.19. att.



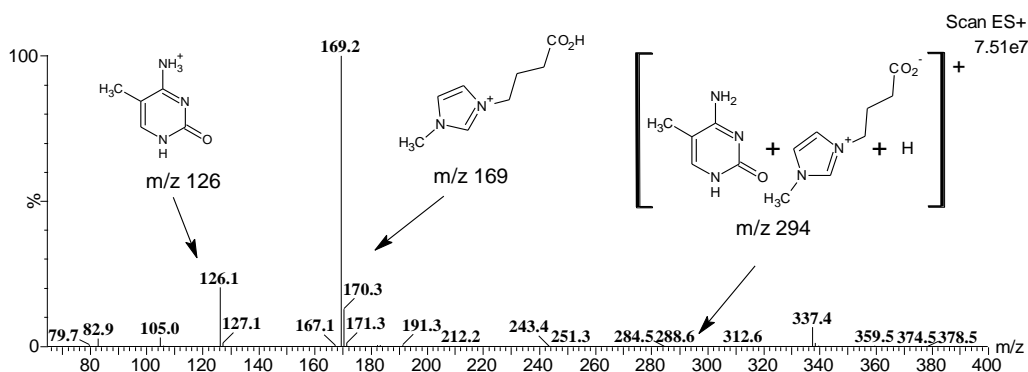
3.19. att. 5-Metilcitozīna un MeImPS masspektrs, iegūts acetonitrila šķīdumā. Vielu molāro koncentrāciju attiecība 1:1.

Kā redzams no masspektra, Na⁺ saturošā kompleksa [MeImPS+5-MC+Na]⁺ signāls nav novērojams, ja eksperimentiem lieto AEŠH – MS kvalitātes šķīdinātāju. Savukārt masspektrā novēro signālu ar m/z 330, kas liecina par [MeImPS+5-MC+H]⁺ kompleksa pastāvēšanu. Lai pārbaudītu kompleksa veidošanās selektivitāti, tika izpētīta funkcionālu grupu ietekme uz kompleksa stabilitāti.

3.5.2. Cviterjona funkcionālās grupas ietekme uz kompleksu veidošanos

Negatīvi lādētās funkcionālās grupas, kuras var ievadīt cviterjona struktūrā, ir sulfonāta, karboksilāta un fosfāta grupas. Ņemot vērā to, ka zināmas tikai pirmo divu atvasinājumu iegūšanas metodes, šajā darbā fosfāta atvasinājumi netika izmantoti.

Aizvietojot sulfonāta grupu saturošo MeImPS ar MeImBC, kas satur CO₂⁻ grupu, novēro, ka kompleksa signāls masspektrā pazūd (sk. 3.20. att.).

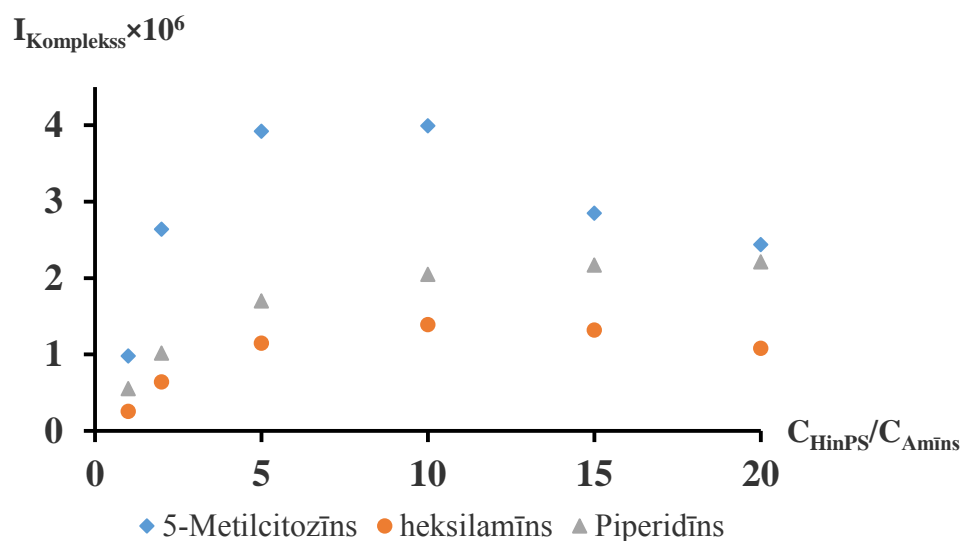


3.20. att. 5-Metilcitozīna un MeImBC šķīduma masspektrs. Vielu molāro koncentrāciju attiecība ir 1:10.

Šo novērojumu var izskaidrot, ja pieņem, ka kompleksu veidošanās notiek šķīdumā pirms EIJ analīzes. Šī hipotēze tika apstiprināta, izmantojot infrasarkanā spektroskopiju (sk. 3.5.6. apakšnodaļu). Ir pamats uzskatīt, ka kompleksi veidojas šķīdumā, pateicoties skābes – bāzes mijiedarbībām. **MeImPS** struktūrā ietilpst sulfonāta grupa, kuras pK_a vērtībai acetonitrilā jābūt ievērojami mazākai, nekā **MeImBC**, kas satur karboksilāta grupu. Abu funkcionālo grupu pK_a vērtības var aptuveni novērtēt ar metānsulfonskābes un etiķskābes eksperimentāli noteiktām pK_a vērtībām, kas acetonitrilā ir attiecīgi 9,97 un 23,51 [114]. Rezultātā, **MeImBC** paliek šķīdumā protonētā formā, kas nedod iespēju veidot kompleksu ar protonēto 5-metilcitozīnu, un kompleksam atbilstošais signāls spektrā neparādās. Tas nozīmē, ka sulfonāta rindas cviterjoni ir piemērotāki kompleksu veidošanai ar 5-MC, nekā atbilstošie karboksilāti.

3.5.3. Amīna struktūras ietekme uz kompleksu veidošanos

Lai izpētītu dažādu amīnu spēju veidot kompleksus ar CJŠ, tika izvēlēti savienojumi, kas satur amidīna, pirmējā, otrējā un aromātiskā heterocikliskā amīna struktūras. Kā CJŠ šajos eksperimentos tika izvēlēts **HinPS** (sk. 2.1. tab.). Eksperimentu gaitā tika mainītas **HinPS** un amīna molārās koncentrācijas attiecība acetonitrilā (sk. 3.21. att.).



3.21. att. 5-Metilcitozīna, piperidīna, heksilamīna kompleksu ar HinPS signāla intensitāte atkarībā no molāro koncentrāciju attiecības.

Attēlā redzams, ka $[\text{HinPS}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ kompleksa signāla intensitāte pētītajā koncentrāciju diapazonā ir augstāka, nekā pārējo amīnu kompleksu intensitātes, t.i., amīnu spēja veidot kompleksus ar CJŠ ir atkarīga no aminosavienojuma veida. Šī īpašība amīniem palielinās sekojošajā rindā: piperidīns \ll heksilamīns $<$ piperidīns $<$ 5-metilcitozīns. Jāpiebilst, ka piperidīns dotajos apstākļos kompleksus neveidoja, tāpēc 3.21. att. tam atbilstošais grafiks nav parādīts. Iegūtie rezultāti ļauj izteikt domu, ka amīnu gadījumā pK_a vērtības nodrošina šo savienojumu veidoto kompleksu stabilitāti ar CJŠ. Šo hipotēzi apstiprina arī literatūrā atrastās doto savienojumu pK_a vērtības dažādos šķīdinātājos, kuras apkopotas 3.2. tab.

3.2. Tabula

Aminogrupu saturošo savienojumu pK_a vērtības dažādos šķīdinātājos

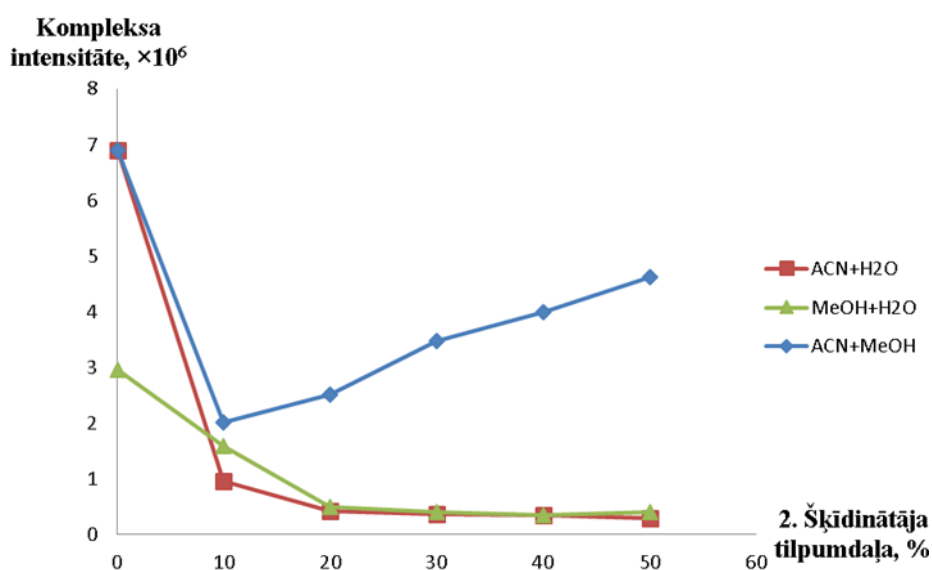
Vielā	pK_a (ūdens) [115]	pK_a (metanols) [116]	pK_a (acetoniitrils) [117,118]
5-Metilcitozīns	12,4	-*	-*
Heksilamīns	10,56	11,57	18,26
Piperidīns	11,22	11,07	19,29
Piridīns	5,25	5,43	12,33

*dati nav pieejami

Šajā tabulā redzams, ka pK_a acetonitrilā palielinās rindā no piridīna uz piperidīnu. 5-Metilcitozīna pK_a acetonitrilā netika atrasta, bet, pamatojoties uz pK_a vērtībām ūdenī, var uzskatīt, ka atbilstoša tendence saglabāsies arī acetonitrilā. Tādā veidā ir skaidrojama 5-MC kompleksa signāla augstā intensitāte, salīdzinājumā ar citu amīnu kompleksiem. Iespējams, ka 5-MC esošo citu funkcionālo grupu klātbūtne rada papildus mijiedarbības ar CJŠ. Šis jautājums aplūkots vēlāk, veicot 5-MC kompleksu kvantu aprēķinus.

3.5.4. Šķīdinātāja ietekme

AEŠH plaši izmanto tādus šķīdinātājus, kā acetonitrils, metanols, ūdens un to maisījumi. Kā jau minēts 1.2.7. apakšnodaļā, šķīdinātājs var stipri ietekmēt analīta signālu EIJ gaitā, tāpēc likās interesanti novērtēt tā ietekmi uz kompleksu veidošanos starp 5-MC un CJŠ. Darbā veikti eksperimenti ar trim šķīdinātāju sistēmām, kas ir acetonitrila vai metanola maisījumi ar ūdeni, kā arī acetonitrila un metanola maisījums. Iegūtie rezultāti apkopoti 3.22. att.



3.22. att. 5-MC un MeImPS kompleksa signāla intensitātes atkarība no šķīdinātāja sastāva.

Kā redzams, augstākā $[\text{MeImPS}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ kompleksa signāla intensitāte sasniedzama, izmantojot acetonitrila šķīdumu. Šo novērojumu var saistīt ar acetonitrila salīdzinoši zemo virsmas spraigumu, kā rezultātā, samazinās mikropilienu izmēri, kas izraisa

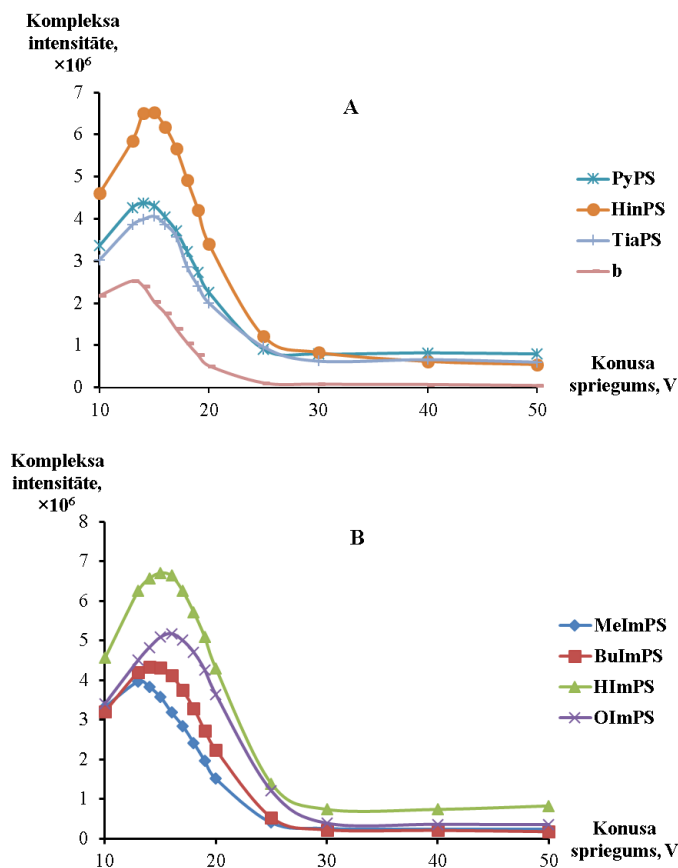
efektīvāku jonu iztvaikošanas spēju. Otrkārt, acetonitrils praktiski neveido ūdeņraža saites, salīdzinot ar abiem citiem šķīdinātājiem. Līdz ar to, tas mazāk ekranē abu kompleksa komponentu mijiedarbības šķīdumā. Šo apsvērumu demonstrē kompleksa signāla intensitāšu salīdzinājums acetonitrilā un metanolā.

Ja vienam no organiskajiem šķīdinātājiem pievieno ūdeni, novēro strauju kompleksa signāla intensitātes samazināšanos. Iespējams, ka šajā gadījumā palielinās tādas šķīduma īpašības, kā blīvums, virsmas spraigums, viskozitāte un dielektriskā konstante. Rezultātā gan desolvācijas spēja, gan kompleksu stabilitāte krietni samazinās. Tāpēc, kompleksu veidošanās pētījumos starp 5-metilcitozīnu un CJŠ, ūdens klātbūtne nav vēlama.

Diezgan interesantas ir $[\text{MeImPS}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ kompleksa intensitātes izmaiņas ACN/MeOH maisījumos. Palielinot metanola tilpuma daļu, kompleksa signāls samazinās, bet pēc 10 % metanola sāk atkal palielināties. Iespējams, ka posmā no 0 līdz 10 % metanola, dominējošais faktors ir abu vielu pK_a straujās izmaiņas. Savukārt, posmā no 10 līdz 50 % metanola, izteiktāka ir citu īpašību ietekme. Zināms, ka dielektriskā konstante [119] un virsmas spraigums [120] samazinās, palielinoties metanola daļai šķīdumā. Tāpēc arī jonu pārnese no šķīduma uz gāzes fāzi palielinās. Iegūtie rezultāti parāda, ka metanols būtu laba alternatīva ūdenim *HILIC* – EIJ – MS metodē, ja šāda tipa kompleksus lietotu selektivitātes uzlabošanai 5-metilcitozīna noteikšanas gaitā.

3.5.5. Konusa, ekstraktora un kapilāra sprieguma piemeklēšana

Kā jau minēts 1.5.2. apakšnodaļā, nekovalento struktūru stabilitāti gāzes fāzē var kontrolēt, izmantojot konusa un ekstraktora sprieguma vērtības. Tāpēc katram kompleksam ir jāatrod optimālais spriegums, kurā signāla intensitāte ir maksimāla. Šādu eksperimentu rezultāti $[\text{CJŠ}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ kompleksiem ir apkopoti 3.23. att.



3.23. att. Kompleksu starp 5-MC un dažādu heterociklisku (A) un N-alkilimidazolijs (B) CJŠ signālu intensitātes atkarība no konusa sprieguma

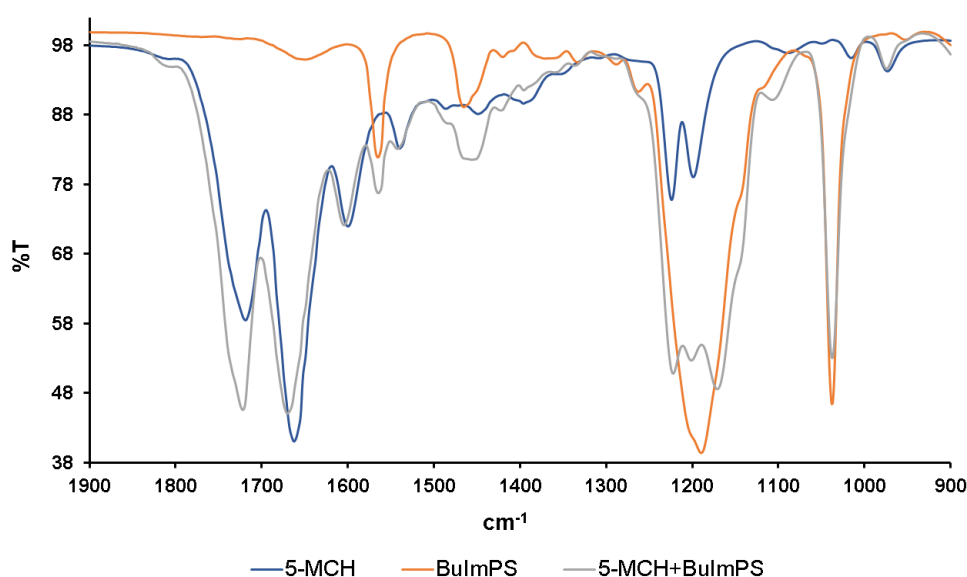
Kā redzams, optimālās konusa sprieguma vērtības visiem šāda tipa kompleksiem atrodas 13 – 16 V intervālā. Maksimumi nav asi, tāpēc 5-metilcitozīna noteikšanai var izvēlēties jebkuru vērtību šajā diapazonā, nezaudējot jutību. Jāpiezīmē, ka strādājot ar tik zemām konusa sprieguma vērtībām (darbā izmantotam instrumentam kovalento savienojumu maksimumi parasti atrodas 20 – 50 V intervālā), var sagaidīt šķīdinātāja molekulu agregātu veidošanās, kas traucētu kvantitatīvai analīzei. No otras puses, šo efektu kompensē ievērojama m/z nobīde, kuru sasniedz, saistot 5-MC kompleksā ar daudz lielākas masas CJŠ, nekā šķīdinātāja agregātiem (parasti < 300 Da).

Pārāk liels ekstraktora spriegums var izraisīt nekovalentā kompleksa signāla intensitātes samazināšanos. Šajā darbā pētīto struktūru gadījumā optimāls ekstraktora spriegums ir 1 V. Lielāka ekstraktora sprieguma izvēle ātri samazina kompleksu veidoto signālu intensitāti. Kapilāra spriegums nevar tieši ietekmēt kompleksa stabilitāti, bet var atstāt iespaidu uz aerosola pilienu izmēru. Pie lielākām kapilāra sprieguma vērtībām bieži novēro stiprāku signālu, bet vienlaikus palielinās arī fona intensitāte. Tāpēc signāla un fona attiecība

praktiski nemainās. Kapilāra sprieguma piemeklēšanas eksperimentos tika konstatēts, ka pētāmo kompleksu signāla intensitātes maksimumi atrodas pie 3,5 kV, ja izmanto acetonnitrila šķīdumu. Šo vērtību tālākajos pētījumos samazināja līdz 2,8 kV, lai novērstu gāzes izlādes procesu varbūtību un palielinātu atkārtojamību.

3.5.6. 5-Metilcitozīna kompleksu ar cviterjonu tipa jonu šķīdriem asociācijas konstanšu noteikšana

Iepriekšējās apakšnodaļās parādīts, ka CJŠ noteiktajos apstākļos spēj veidot kompleksus ar 5-metilcitozīnu un dažiem alifātiskiem amīniem. Lai parādītu, ka doto kompleksu veidošanās notiek šķīdumā, 5-MC un **BuImPS** maisījums (1:1) metanolā tika analizēts ar infrasarkano spektroskopiju (IS). Salīdzinot maisījuma un atsevišķo komponentu IS spektrus, novērotas dažas raksturīgas viļņu skaitļu un caurlaidības intensitātes izmaiņas (sk. 3.24. att.).



3.24. att. 5-Metilcitozīna, BuImPS un abu savienojumu maisījuma IS spektri, kas iegūti metanola šķīdumā

5-MC un **BuImPS** maisījuma IS spektra interpretācija liecina par sulfonāta grupai raksturīgās asimetriskās valences deformācijas viļņu skaitļa vērtības nobīdi par -19 cm^{-1} , salīdzinājumā ar tīra **BuImPS** IS spektru. Amidīna grupas C=N fragmenta valences

deformācijas viļņu skaitlis nobīdās par $+8\text{ cm}^{-1}$. Turklāt notika arī sulfonāta, C=N un C=O caurlaidības intensitāšu izmaiņas (sk. 3.3. tab.), kas var liecināt par dipola momenta izmaiņām.

3.3. Tabula

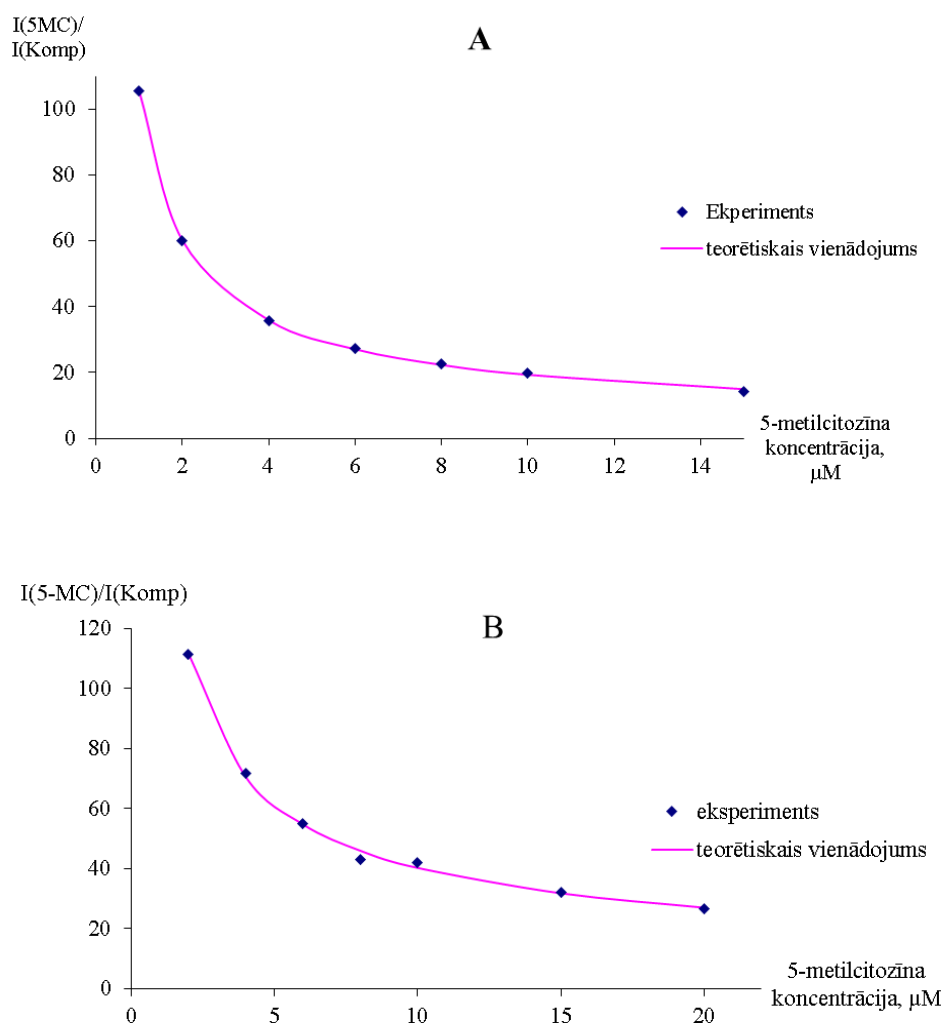
Galveno 5-MC, BuImPS un to maisījuma funkcionālo grupu valences deformāciju un caurlaidību vērtības, iegūtas metanola šķīdumā

Deformācijas veids	5-MC		BuImPS		5-MC+BuImPS	
	cm ⁻¹	%T	cm ⁻¹	%T	cm ⁻¹	%T
C=O	1719	59	-	-	1722	46
C=N	1662	41	-	-	1670	45
SO ₃ (sim.)	-	-	1038	46	1037	53
SO ₃ (asim.)	-	-	1190	39	1171	49

Dotās izmaiņas norāda uz šķīdumā pastāvošām cviterjona un protonētās bāzes mijiedarbībām, ietverot arī kompleksa veidošanos. Tādā veidā tika pamatota kompleksu veidošanās norise pirms elektroizsmidzināšanas procesa.

Kā jau minēts, masspektrometrijas metodes var izmantot kompleksu līdzsvaru pētīšanai (sk. 1.5. apakšodaļu). Neskatoties uz masspektrometrijas metožu vienkāršību, lādētu daļiņu intensitātes nevar salīdzināt savā starpā, jo EIJ gaitā vielas konkurē par lādēto pilienu virsmu, kas izraisa stipru diskrimināciju. Tāpēc, lai salīdzinātu dažādu daļiņu koncentrācijas šķīdumā, izmantojot intensitātes vērtības no masspektra, jānosaka detektora atsaucē faktori katrai daļiņai. Lai demonstrētu šo apsvērumu svarīgumu, 3.19. att. (sk. 84. lpp.) parādīts ekvimolārā 5-MC un **MeImPS** acetoneitrila šķīduma masspektrs. Tajā redzams, ka protonētā 5-metilcitozīna $[5\text{-MCH}]^+$, $[\text{MeImPS}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ kompleksa, kā arī protonētā CJŠ $[\text{MeImPS}+\text{H}]^+$ intensitātes atšķiras apmēram 10 reizes. Skaidrs, ka šajā gadījumā intensitātes neatspoguļo šo pašu daļiņu koncentrāciju šķīdumā, un šādu masspektru nevar izmantot kompleksu stabilitātes konstanšu aprēķināšanai. Šī iemesla dēļ, darbā izmantota metode, kas matemātiski ievēro detektora atsaucē faktoros [82]. Metodes galvenā prasība ir izmantoto šķīdumu stingra ekvimolaritāte. Pat mazas atkāpes no ekvimolaritātes spēj izraisīt kļūdas asociācijas konstanšu vērtībās. Otrs pieņēmums šajā metodē ir detektora atsaucē faktoru neatkarība no vielas koncentrācijas šķīdumā. Neskatoties uz šiem ierobežojumiem, metode spēj sniegt kvantitatīvu informāciju par kompleksa stabilitāti. Eksperimentiem tika izmantoti 5-metilcitozīna kompleksi ar **MeImPS**, **BuImPS**, **HImPS** un **OImPS**, kā arī **MeImPS** kompleksi ar heksilamīnu, pirolidīnu un trietilamīnu. Vielu izvēle pamatota ar alkilķēdes efekta un amīna grupas veida ietekmi uz kompleksa stabilitāti šķīdumā. Eksperimentālie punkti, kas

iegūti izomolāro šķīdumu sēriju analīzes gaitā un tiem matemātiski pielāgotais vienādojums 2.2. (sk. 2.5.5 apakšnodaļu), parādīti 3.25. att.



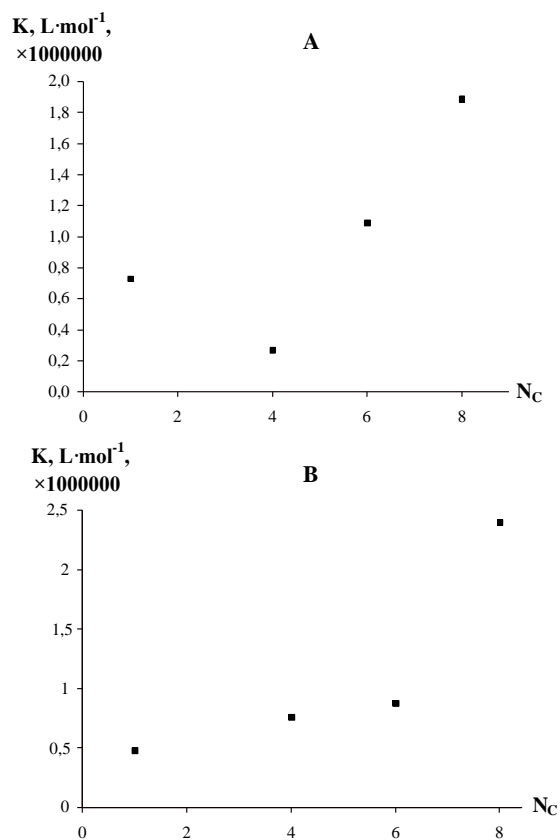
3.25. att. 5-Metilcitozīna un BuImPS izomolāro šķīdumu sērijas analīzes dati, iegūti acetnitrilā (A) un metanolā (B). Eksperimentālajiem punktiem ir pielāgots vienādojums 2.2. (skat. 2.5.5. apakšnodaļu)

Uz ordinātu ass atliktā $I_{5\text{-MC}}$ atbilst protonētā 5-metilcitozīna $[5\text{-MCH}]^+$, tā dimēra $[5\text{-MCH}+5\text{-MC}]^+$ un $[5\text{-MC}+\text{Na}]^+$ adukta masspektra intensitāšu summai. Šis pieņēmums ir izdarīts ar mērķi palielināt konstanšu noteikšanas pareizību, jo reālajā šķīdumā atbilstoši masas bilancei 5-metilcitozīna sākuma koncentrācija tiek patērēta minēto daļiņu veidošanai. I_{Komp} ir vienāda ar kompleksam atbilstošā signāla intensitāti masspektā. Iegūto konstanšu vērtības un relatīvās detektora atsauces faktoru vērtības 5-metilcitozīna kompleksiem ar N-alkilimidazolija CJŠ ir atrodamas 3.4. tabulā.

Dažādos šķīdinātājos iegūto asociācijas konstanšu un vērtību kopsavilkums

CJŠ	Metanols			Acetonitrils		
	$(K_a \pm \Delta K_a) \times 10^6$ L·mol ⁻¹	$(R \pm \Delta R)$ $\times 10^{-2}$	R ²	$(K_a \pm \Delta K_a) \times 10^6$ L·mol ⁻¹	$(R \pm \Delta R)$ $\times 10^{-2}$	R ²
MeImPS	0,5±0,4	1,4±0,8	0,997	0,7±0,3	2,6±0,7	0,999
BuImPS	0,8±0,6	1,1±0,6	0,998	0,30±0,04	4,1±0,4	1
HImPS	0,9±0,6	0,8±0,4	0,998	1,1±0,8	1,5±0,8	0,996
OImPS	2,4±2,7	0,5±0,3	0,997	1,9±1,1	1,0±0,4	0,998

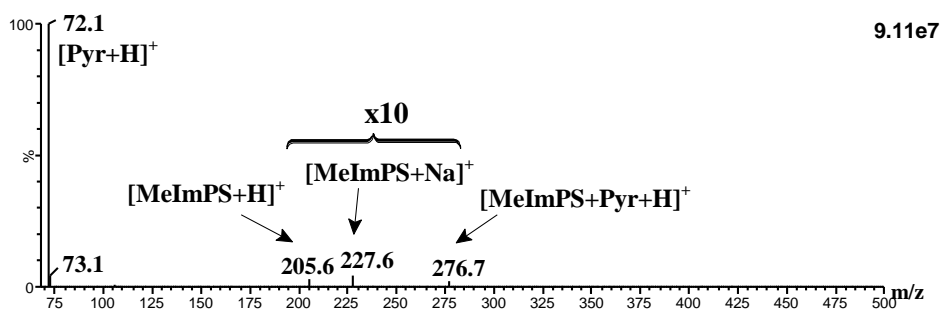
Kā redzams no tabulas, 2.2. vien. pielāgošana ir diezgan laba visos gadījumos, jo nelineārās mazāko kvadrātu metodes R² vērtības ir diezgan augstas un nav mazākas par 0,996. Tabulā 3.4. sniegtā informācija rāda, ka abos šķīdinātājos pastāv 5-metilcitozīna un CJŠ kompleksu asociācijas konstanšu vērtību atkarība no alkilķēdes garuma. Šī sakarība ir grafiski attēlota 3.26. att.



3.26. att. Kompleksu asociācijas konstanšu atkarība no CJŠ alkilķēdes garuma, iegūtā acetonitrilā (A) un metanolā (B)

Kā redzams 3.26. (A) att., [**MeImPS**+5-MC+H]⁺ kompleksa stabilitāte ir augstāka, nekā [**BuImPS**+5-MC+H]⁺, bet, sākot ar **BuImPS**, stabilitāte lineāri pieaug līdz **OImPS**. Ja par šķīdinātāju izmanto metanolu, (sk. 3.26. (B) att.), pētāmo kompleksu K vērtības pieaug no **MeImPS** līdz **HImPS**, bet **OImPS** kompleksam novērojama atkāpe no kopējās tendences. Iespējams, ka stabilitātes konstanšu izmaiņas abos šķīdinātājos ir izskaidrojama ar atšķirīgiem solvatācijas mehānismiem acetonitrilā un metanolā. Abiem šķīdinātājiem ir līdzīgas dielektriskās konstantes, bet acetonitrils, atšķirībā no metanola, nespēj veidot pietiekoši stipras ūdeņraža saites ar analīta molekulām. Lai izskaidrotu **MeImPS** un **OImPS** kompleksu ar 5-MC stabilitātes konstanšu atkāpes no kopējās tendences attiecīgajos šķīdinātājos, varētu pieņemt, ka šīs izmaiņas nosaka summāri alkilķēdes un sulfonāta grupas solvatācijas efekti. Arī literatūrā ir atrodamas norādes, ka molekulāro klasteru veidošanās starp alifātiskām organiskajām skābēm un aromātiskām bāzēm šķīdumā ir atkarīga no skābes molekulu agregātu veidošanās un elektrostātiskām skābes – bāzes mijiedarbībām [121]. Turklāt tika parādīts, ka bilance starp šiem mijiedarbību veidiem mainījās atkarībā no šķīdinātāja dabas, skābes alkilķēdes garuma un amīna pK_a vērtībām. Iespējams, ka minētie faktori vairāk vai mazāk ietekmē arī šajā darbā aprakstīto kompleksu stabilitāti. Zināms, ka šķīdumā ir iespējama kontakta tipa un ar šķīdinātāja molekulām atdalītu jonu pāru veidošanās [122, 123]. Kontakta tipa jonu pāru veidošanos pārsvarā nosaka jonu desolvācijas spēja dotajā šķīdinātājā [123]. Savukārt, ar šķīdinātāja molekulām atdalīto jonu pāru veidošanos nosaka difūzija un starpjonu attālumi šāda tipa pāri [123]. Reālajā paraugā abi minētie mehānismi ir līdzsvarā un to izpausme ir atkarīga no šķīdinātāja un jonu uzbūves [123]. Apkopojot iepriekš aprakstīto, var secināt, ka stabilitātes konstanšu vērtību atkarību no alkilķēdes garuma abos šķīdinātājos varētu izskaidrot, ja būtu zināmas solvatācijas enerģijas katram kompleksam.

Neskatoties uz to, ka 5-metilcitozīna un N-alkilimidazolijs kompleksu asociācijas konstantes tika noteiktas gan metanolā, gan acetonitrilā, alkilamīnu un **MeImPS** kompleksu konstanšu nenoteiktība ir visai augsta. Galvenais iemesls tam ir zemā kompleksiem atbilstošo signālu intensitāte pie mazām koncentrācijām. Pat relatīvi augstās koncentrācijās šo kompleksu signāls ir samērā vājš (sk. 3.27. att.).

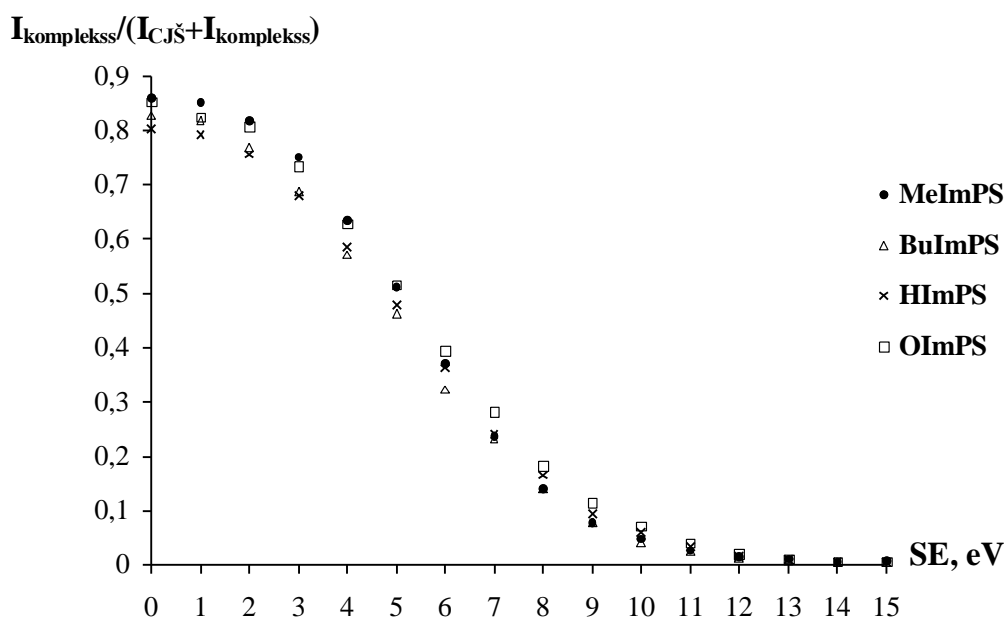


3.27. att. MeImPS un pirolidīna acetoniātrila šķīduma masspektrs. Abu vielu koncentrācija ir 20 μM

Izomolāro sēriju analīzes gaitā tika novērots, ka, samazinoties MeImPS un amīna koncentrācijai, sākas stipra fona signālu ietekme uz kompleksa signāla intensitāti. Rezultātā teorētiskā 2.2. vienādojuma pielāgošana eksperimentālajiem punktiem kļūst neiespējama. Situācija nedaudz uzlabojas, ja izmanto fona korekcijas. Piemēram, analizējot tukšo paraugu, kas satur tikai acetoniātrilu un skābes piedevu, var iegūt fona līmeņa vērtību kompleksam atbilstoši m/z vērtībai. Šo korekcijas vērtību atskaita no reālajā paraugā iegūtās kompleksa intensitātes. Tomēr arī šāda procedūra maz palīdz, jo konstanšu vērtībām saglabājas augsta standartnovirze. Veicot minēto korekciju, tika pieņemts, ka fons dotajā m/z vērtībā ir statistisks, bet reālajā situācijā fons dinamiski mainās pat vienādos apstākļos.

3.5.7. 5-Metilcitozīna kompleksu ar cviterjonu tipa jonu šķīdumiem stabilitāte gāzes fāzē

Sadursmju inducētā disociācija ir metode, kuru plaši lieto nekovalento struktūru stabilitātes pētīšanai gāzes fāzē, lai izslēgtu šķīdinātāja solvatācijas efektu ietekmi uz stabilitāti. Šādos eksperimentos var precīzāk noskaidrot uzbūves faktorus, kas nosaka kompleksu stabilitāti. Pētījuma gaitā bija jāsalīdzina $[\text{CJ}\check{\text{S}}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ kompleksu stabilitātes izmaiņas šķīdumā un gāzes fāzē atkarībā no alkilķēdes garuma. Par kompleksa stabilitātes rādītāju tika izvēlēta pussabrukšanas enerģijas vērtība $E_{1/2}$ (enerģija, kurā sabrūk puse no kompleksa kopskaita). Lai atrastu $E_{1/2}$ vērtības 5-metilcitozīna kompleksiem ar N-alkilimidazolijs CJŠ, kompleksu aktivēja ar SID metodi un pēc tām konstruēja kompleksa relatīvās intensitātes atkarību no sadursmju enerģijas. Dotā sakarība visiem kompleksiem ir parādīta 3.28. att.



3.28. att. 5-Metilcitozīna kompleksu ar CJŠ sadursmju inducētās disociācijas līknes, no kurām var noteikt pussabrukšanas enerģiju

Kā redzams no 3.28. att., kompleksu stabilitāte gāzes fāzē ir līdzīga, bet nav vienāda. Lai atrastu $E_{1/2}$ vērtības katram kompleksam, var izmantot grafisko metodi, bet var arī aproksimēt katras līknes apgabalā no 4 līdz 7 eV ar taisnes vienādojumu un ar tā palīdzību aprēķināt $E_{1/2}$ vērtības. Šajā darbā izmantots pēdējais variants. Ar šo metodi izrēķinātas $E_{1/2}$ vērtības apkopotas 3.5. tabulā.

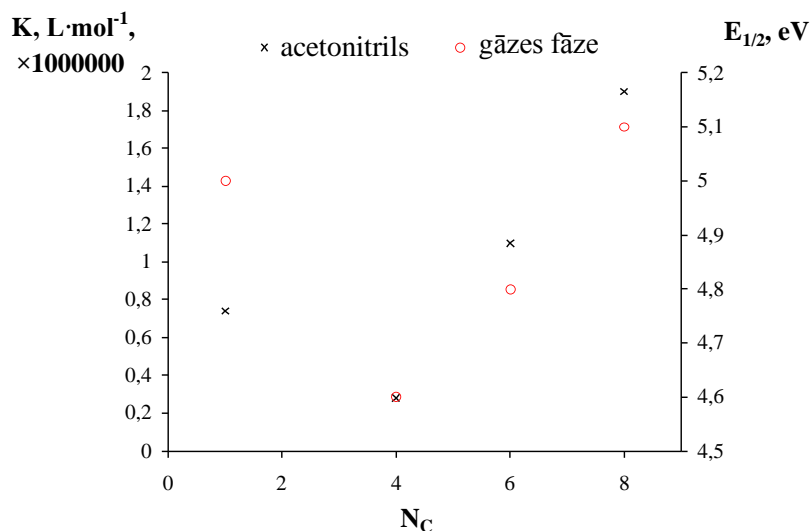
3.5. Tabula

5-Metilcitozīna kompleksu ar N-alkilimidazolija CJŠ pussabrukšanas enerģijas

5-MC komplekss ar vielu:	$E_{1/2}$, eV	Taisnes R^2 vērtība apgabalā 4 – 7 eV
MeImPS	5,0	0,999
BuImPS	4,6	0,993
HImPS	4,8	0,999
OImPS	5,1	1

No aprēķinātām $E_{1/2}$ vērtībām izriet, ka kompleksu stabilitāte ir visai maz atkarīga no alkilķēdes garuma CJŠ molekulā. Svarīgs ir novērojums, ka gāzes fāzē aprēķinātās $E_{1/2}$ vērtības mainās līdz ar cviterjona alkilķēdes garumu tāpat kā asociācijas konstantes acetonitrilā. Abu

minēto vērtību izmaiņas atkarībā no CJŠ alkilķēdes garuma acetonitrilā un gāzes fāzē ir attēlotas grafiski (sk. 3.29. att.).

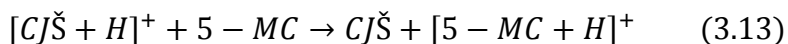


3.29. att. 5-Metilcitozīna kompleksu ar CJŠ asociācijas konstanšu un pussabrukšanas enerģijas vērtības, iegūtas attiecīgi acetonitrilā un gāzes fāzē

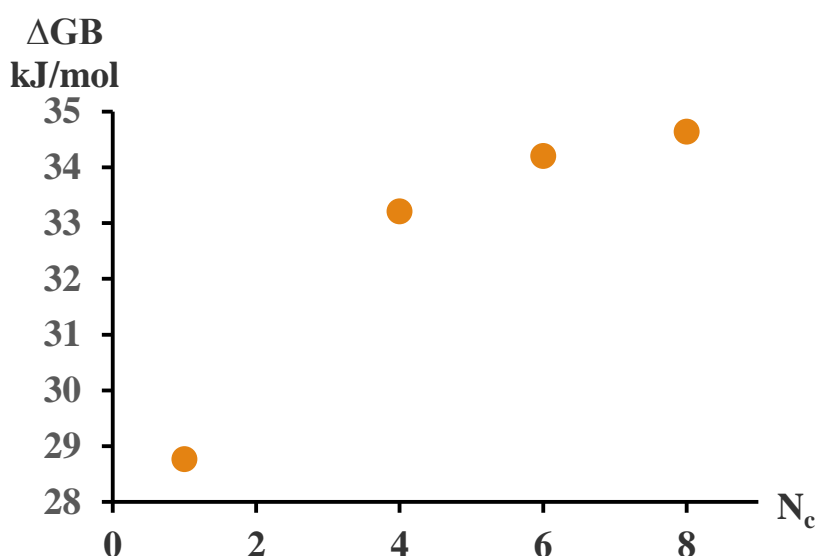
Savukārt, salīdzinot doto raksturlielumu izmaiņas metanolā un gāzes fāzē, līdzīgo tendenci nenovēro. Tas liek domāt, ka acetonitrils atšķirībā no metanola nespēj ietekmēt ūdeņraža saišu stiprumu, kas tur kompleksa komponentus kopā. Rezultātā, komplekss tiek pārnesti no šķīduma uz gāzes fāzi, saglabājot sākotnējās mijiedarbības starp 5-metilcitozīnu un CJŠ. Tāpēc asociācijas konstantes acetonitrilā mainās ar CJŠ alkilķēdes garumu līdzīgi kā $E_{1/2}$ vērtības gāzes fāzē. Savukārt metanols spēj labi solvatēt abus kompleksa komponentus, veicinot ar šķīdinātāja molekulām atdalīto jonu pāru veidošanos. Rezultātā kompleksu stabilitāte šķīdumā atšķiras no stabilitātes gāzes fāzē, jo noteicoša loma ir kompleksa komponentu solvatācijas enerģijai.

Anomāli augsto $[MeImPS+5-MC+H]^+$ kompleksa $E_{1/2}$ vērtību var izskaidrot ar sekojošiem apsvērumiem. No vienas puses, atbilstoši 1.1. vien., palielinoties vielas molmasai, palielinās arī tās stabilitāte SID apstākļos. Tas ir parādīts dažādu kompleksu piemēros [124, 125]. Ja pieņemtu, ka tikai šis faktors nosaka kompleksa stabilitāti, tad eksperimentā būtu jānovēro lineāra sakarība starp $E_{1/2}$ un kompleksa molmasu. Tāpēc var iedomāties, ka pastāv arī otrs faktors, kas ietekmē kompleksu stabilitāti gāzes fāzē. Piemēram, no literatūras ir zināms, ka anjonu – neitrālo molekulu kompleksu stabilitāte palielinās, ja anjona un neitrālās molekulas konjugētās bāzes gāzes fāzes bāziskumi ir līdzīgi [126]. To pašu principu varētu pielietot 5-metilcitozīna kompleksiem ar CJŠ. Jo lielāka būtu 5-metilcitozīna un CJŠ gāzes fāzes bāziskuma atšķirība, jo mazāk stabils būtu komplekss. Lai pārbaudītu šo hipotēzi, tika

veiktā sērija kvantu ķīmisko aprēķinu *ab initio HF/6-31+g(d)* līmenī, lai noteiktu CJŠ relatīvās gāzes fāzes bāziskuma vērtības attiecībā pret 5-metilcitozīnu. Gāzes fāzes bāziskuma vērtības definē, kā Gibbsa enerģijas izmaiņas hipotētiskai reakcijai (sk. 3.13. vienādojumu).



Aprēķina rezultāti atrodami 3.30. att.



3.30. att. N-alkilimidazolijs CJŠ gāzes fāzes bāziskuma vērtības attiecībā pret 5-metilcitozīnu, aprēķinātas ar *ab initio HF/6-31+g(d)* metodi

Aprēķini rāda, ka viszemākā gāzes fāzes bāziskuma vērtība attiecībā pret 5-metilcitozīnu ir **MeImPS**. Tālāk ΔG_b vērtības sāk palielināties ar alkilķēdes palielināšanos CJŠ struktūrā. Ja pieņemtu, ka tas būtu vienīgais faktors, kas ietekmē kompleksu stabilitāti, tad $E_{1/2}$ vērtībām būtu jāsamazinās no $[MeImPS+5-MC+H]^+$ līdz $[OImPS+5-MC+H]^+$. Tāpēc var secināt, ka iepriekš apskatītais molārās masas pieauguma efekts un relatīvais gāzes fāzes bāziskums pretēji ietekmē 5-metilcitozīna un CJŠ kompleksu stabilitāti. Rezultātā, $[BuImPS+5-MC+H]^+$ kompleksa stabilitāte ir mazākā no visiem apskatītajiem kompleksiem, jo gan **BuImPS** relatīvais gāzes fāzes bāziskums, gan molārā masa atrodas starp **MeImPS** un **OImPS**.

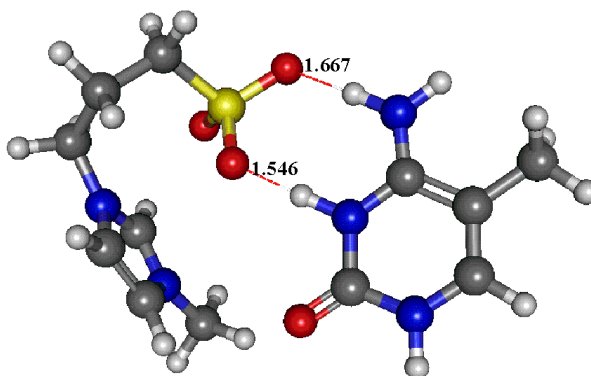
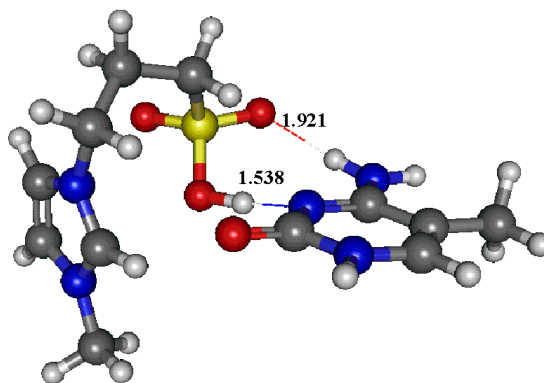
Zinot, ka iepriekš minētie faktori ietekmē 5-metilcitozīna un CJŠ kompleksu stabilitāti, var paredzēt tādas CJŠ, kuru mijiedarbības ar 5-metilcitozīnu būtu pietiekami stipras, lai tos varētu lietot kvantitatīvai 5-metilcitozīna saistīšanai kompleksā. Tas savukārt paver iespēju

nākotnē izstrādāt efektīvu derivatizācijas metodi ne tikai 5-metilcitozīnam, bet arī citiem līdzīgiem savienojumiem.

3.5.8. 5-Metilcitozīna kompleksa ar MeImPS kvantu ķīmiskie aprēķini

Lai atrisinātu jautājumu par iespējamās struktūras rašanos gāzes fāzē, tika veikti mijiedarbību enerģijas aprēķini situācijām, kad protons atrodas uz 5-metilcitozīna (komplekss 1) vai **MeImPS** (komplekss 2). Sākumā, izmantojot molekulārās mehānikas spēka lauku *MMFF94*, veikta protonētā un neitrālā **MeImPS** konformāciju analīze, abos gadījumos izvēloties konformācijas ar zemāko enerģiju. Katrai **MeImPS** formai var atrast vairākas 5-metilcitozīna orientācijas apkārt sulfonāta grupai. Tāpēc, pārvietojot protonētā 5-metilcitozīna molekulu apkārt neprotonētajam **MeImPS** (un otrādi, pārvietojot neprotonētā 5-metilcitozīna molekulu apkārt protonētajam **MeImPS**), var atrast virkni orientāciju ar zemāku enerģiju. Šo orientāciju ģeometrijas tiek pakāpeniski optimizētas, izmantojot *MMFF94* spēka lauku, pusempīrisko *PM3* metodi un pēc tām *ab initio HF/6-31g(d)* metodi. Tādējādi pakāpeniski samazina 5-metilcitozīna orientāciju skaitu kompleksam 1 un kompleksam 2. Pēc *ab initio HF/6-31g(d)* metodes lietošanas katram kompleksam izvēlās vienu stabilāko struktūru, kuru optimizē ar *ab initio HF/6-31+g(d)* un visbeidzot ar funkcionāli *M06-2X/6-311++g(d,p)*. Pēdējā metode izvēlētā tāpēc, ka tajā iekļauta dispersijas mijiedarbību korekcija. Pēdējā optimizācijas stadijā krietni palielinās bāzu skaits, rezultātā palielinās arī laiks, kas ir nepieciešams aprēķiniem. Tāpēc aprēķini veikti tikai 5-metilcitozīna kompleksi ar **MeImPS**, jo šajā gadījumā aprēķinu laiki ir vismazākie, salīdzinot ar citu homologu kompleksiem.

Lai aprēķinātu mijiedarbību enerģijas kompleksam 1 un kompleksam 2, izmantoti aprēķini ar *M06-2X/6-311++g(d,p)* funkcionāli un bāzu superpozīcijas kļūdu korekciju. Rezultātā iegūtas divas iespējamās kompleksa 1 un kompleksa 2 ģeometrijas, kas parādītas 3.31. att.

A**B**

3.31. att. Kompleksa 1 (A) un kompleksa 2 (B) ģeometrijas, iegūtās pēc optimizācijas ar *M06-2X/6-311++g(d,p)* funkcionāli

Kā redzams no 3.31. att., kompleksa stabilitāti nodrošina ūdeņraža saišu veidošanās starp cviterjona SO_3^- grupu un 5-MC amidīna grupu. Rezultātā veidojas redzamais astoņlocekļu cikls.

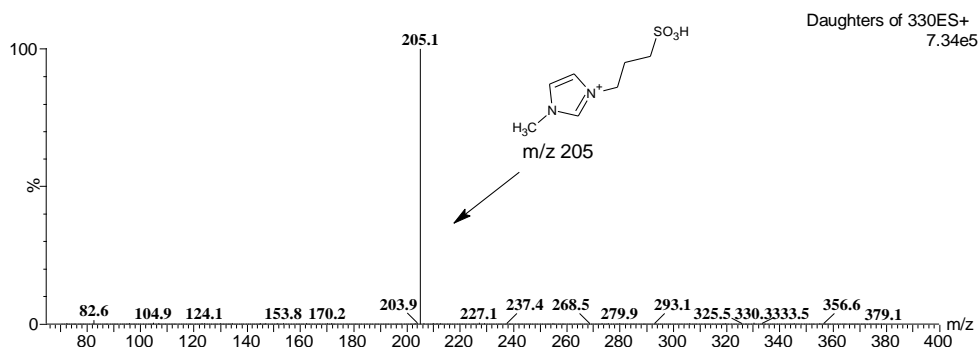
Mijiedarbību enerģiju kompleksos 1 un 2 var definēt kā starpību starp kompleksa un ligandu enerģijas vērtībām gāzes fāzē (sk. 3.14. un 3.15. vienādojumu).

$$\Delta E_1 = E_{Komp,1} - (E_{5-MCH} + E_{MeImPS}) \quad (3.14)$$

$$\Delta E_2 = E_{Komp,2} - (E_{5-MC} + E_{MeImPS+H}) \quad (3.15)$$

Aprēķinu rezultātā iegūst, ka kompleksa 1 mijiedarbību enerģija ir lielāka (-58 kcal/mol), nekā kompleksam 2 (-54 kcal/mol). Tomēr, ņemot vērā, ka SID apstākļos komplekss iegūst iekšējās enerģijas pieaugumu, kompleksa 2 veidošanās varbūtība pieaug, jo enerģijas starpība starp abiem kompleksiem ir maza (4 kcal/mol). Turklāt eksperiments rāda, ka SID

apstākļos drīzāk veidojas tieši komplekss 2, jo kompleksa fragments ir $[\text{MeImPS}+\text{H}]^+$, nevis $[\text{5-MC}+\text{H}]^+$ (sk. 3.32. att.).



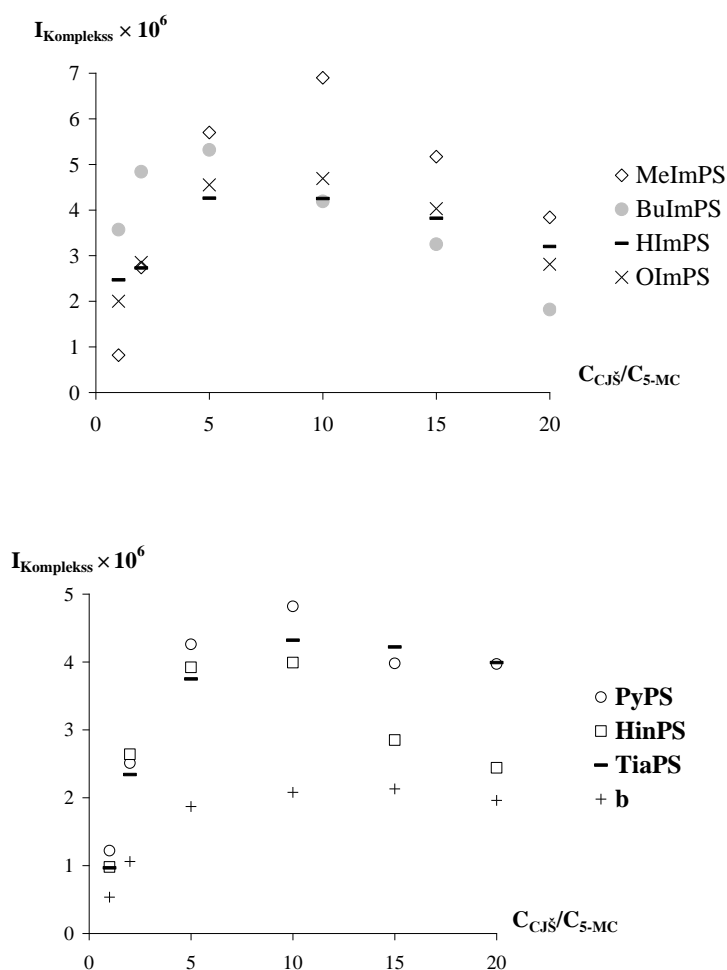
3.32. att. Kompleksa $[\text{MeImPS}+\text{5-MC}+\text{H}]^+$ fragments, iegūts ar 10 eV sadursmju enerģiju. Attēls parāda pilnīgu kompleksa sadalīšanos un $[\text{MeImPS}+\text{H}]^+$ veidošanos.

3.6. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu izmantošana DNS metilēšanas līmeņa noteikšanai

Nemot vērā iepriekšējos rezultātus, var nodemonstrēt, ka kompleksu veidošanos starp 5-metilcitozīnu un cviterjoniem EIJ – MS gaitā iespējams izmantot kvantitatīvajā analīzē. Zināms, ka 5-meticitozīns zīdītāju organismā veidojas DNS metilēšanas rezultātā [15, 16], tāpēc šī savienojuma noteikšana ir svarīgs uzdevums. Literatūrā aprakstītas dažādas metodes 5-metilcitozīna noteikšanai, bet to pamatā pārsvarā ir hromatogrāfiskās metodes ar masspektrometrisko, UV vai fluorimetrisko detektēšanu [105, 127 – 131]. Nukleobāzu atdalīšana plaši izmantotās apgrieztās fāzes hromatogrāfijas apstākļos ir sarežģīts darbs. Bieži vien nukleobāzu sorbcijas palielināšanai nepieciešams izmantot buferšķīdumus, kas var samazināt metodes jutību un efektivitāti. Beidzot, hromatogrāfisko analīžu laiks ir liels. Tāpēc šajā darbā izmēģināta pieeja 5-metilcitozīna noteikšanai bez hromatogrāfijas, izmantojot kompleksu veidošanos starp 5-metilcitozīnu un kustīgai fāzei pievienoto cviterjonu. Rezultātā, 5-metilcitozīna m/z vērtība tiek nobīdīta lielāku masu virzienā atbilstoši kompleksa molmasai, kas izmaina analīta īpašības un metodes selektivitāti. Parauga analīzi veic, izmantojot plūsmas injekciju metodi (sk. 2.2. att.) kopā ar EIJ – MS detektēšanu SIR režīmā. Tālāk sīkāk aprakstīti šīs pieejas izmantošanas rezultāti DNS parauga analīzei.

3.6.1. Reaģenta un citu apstākļu izvēle

Lai sasniegtu viszemāko detektēšanas robežu, ir jāpiemeklē apstākļi, kuros 5-MC un cviterjona kompleksa absolūtā intensitāte ir visaugstākā. Šim mērķim pārbaudīta dažādu cviterjonu tieksme veidot kompleksus ar 5-MC. Katrs no 7 cviterjoniem tika sajaukts dažādās molāro koncentrāciju attiecībās ar 5-MC un iegūtie šķīdumi analizēti ar EIJ – MS. Šādu eksperimentu rezultāti apkopoti 3.33. att.



3.33. att. Kompleksu intensitātes atkarība no reaģenta un 5-MC koncentrāciju attiecības

Salīdzinot dažādu kompleksu absolūto signālu masspektrā, var redzēt, ka vislielākā intensitāte atbilst $[\text{MeImPS}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ kompleksam ar molāro koncentrāciju attiecību 10:1. Tālāka **MeImPS** koncentrācijas palielināšana izraisa kompleksa intensitātes samazināšanos. Līdzīgi var raksturot arī pārējo cviterjonu kompleksus – katram reaģentam novēro maksimuma veidošanos ar sekojošu kritumu. Iespējams, ka pie lielākām koncentrācijām cviterjona virsmas

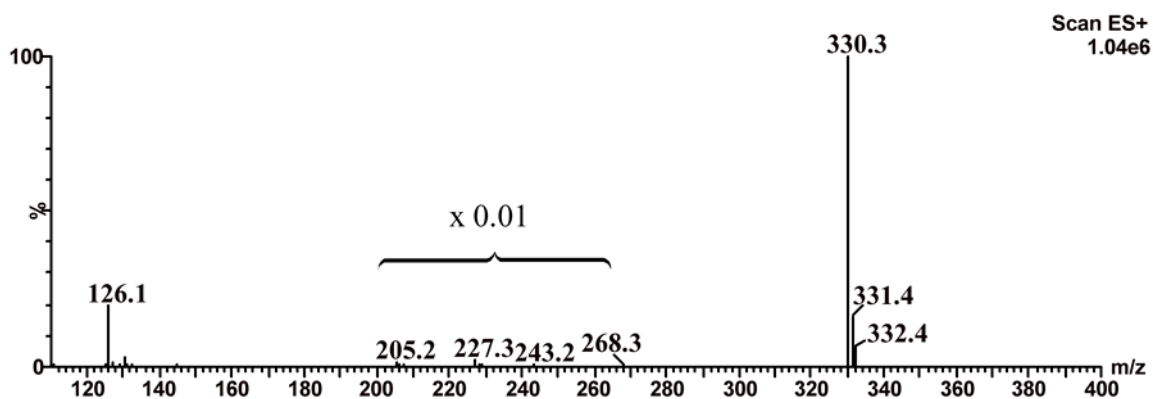
aktivitātes dēļ, sākās konkurence par mikropilienu virsmu starp visām šķīdumā esošām daļiņām. Šo hipotēzi apstiprina arī fakts, ka cviterjoni ar mazāku virsmas aktivitāti sasniedz maksimuma punktus pie lielākām koncentrācijām. Šajā kontekstā var savstarpēji salīdzināt **MeImPS** un **BuImPS** vai **HImPS** kompleksus ar 5-MC. Pirmais no tiem sasniedz maksimumu pie attiecības 10:1, bet pēdējie - 5:1. Turklāt cviterjoni lielā koncentrācijā spēj veidot dimērus un citus oligomērus [108], kas nobīda 5-MC kompleksa ar CJŠ veidošanas līdzsvaru.

Neskatoties uz atšķirīgajām kompleksa signāla intensitātēm, starpības starp tām nav lielas. Tāpēc var izvēlēties praktiski jebkuru cviterjonu tipa savienojumu, izņemot **b**, 5-MC kvantitatīvai analīzei bez metodes jutības zuduma. Tas savukārt dod iespēju viegli mainīt selektivitāti. Tālākajam darba posmam par reaģentu tika izvēlēts **MeImPS**, jo šī savienojuma kompleksam atbilst vislielākā signāla intensitāte.

Eksperimentu gaitā tika konstatēts, ka kompleksus ar **MeImPS** veido ne tikai 5-MC, bet arī citas nukleobāzes ar amidīna vai guanīna grupu – citozīns, adenīns un guanīns. Tāpēc, tika nolemts palielināt reaģenta koncentrāciju līdz 100 μM, ņemot vērā šo savienojumu lielākas koncentrācijas paraugā un reaģenta atšķaidījumu ar kopējo plūsmu (reaģenta un parauga plūsmas ātrumu attiecība bija 1:4).

Visi pārējie apstākļi, kā šķīdinātājs, konusa un ekstraktora spriegums, izvēlēti atbilstoši apsvērumiem, kas aprakstīti 3.5. apakšnodaļā. Vienīgais parametrs, kas tika nomainīts, bija skābes piedeva kustīgai fāzei. 5-Metilcitozīna noteikšanai DNS paraugā kā piedevu acetnitrilam izmantota 0,001% trifluoretiķskābe, nevis 0,025 % skudrskābe. Izvēle pamatota ar lielāku TFA stiprumu, kas veicina augstāku lādiņa nesēju blīvuma rašanos uz mikropilienu virsmas. Tas savukārt uzlabo izsmidzināšanas stabilitāti un samazina augstās frekvences signāla fluktuācijas. Turklāt TFA samazina 5-MC adsorbcijas spēju uz injektora un citu sistēmas komponentu virsmām.

Kā jau bija minēts, par reaģentu šajā darbā izvēlēts **MeImPS**, kas veido kompleksu ar visaugstāko signāla intensitāti. Dotā kompleksa veidošanās analīzei izvēlētajos apstākļos ir atspoguļota 3.34. att.



3.34. att. 5-Metilcitozīna un MeImPS masspektrs, iegūts acetnitrila šķīdumā ar 0,001% TFA piedevu. Signāli pie m/z 126 un 330 atbilst 5-metilcitozīnam un $[\text{MeImPS}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ kompleksam. MeImPS signālu (m/z 205, 227, 243 un 268) intensitātes ir samazinātas 100 reizes

Lai izmantotu doto reaģentu DNS parauga analīzei, bija jāpārlicinās, ka paraugā nav komponentu ar m/z 330, kas atbilst $[\text{MeImPS}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ kompleksam. Pretējā gadījumā SIR režīmā var iegūt kļūdainu rezultātu, kas saistīts ar atšķirīgas izcelsmes signālu pārklāšanos. Tāpēc, pirms kvantitatīvās analīzes hidrolizēto DNS paraugu ievadīja PIA – EIJ – MS sistēmā bez MeImPS pievienošanas. Šīs procedūras rezultātā m/z 330 atbilstošais signāls netika novērots. Tādējādi bija pierādīts, ka komponentu ar m/z 330 paraugā nav, un var lietot MeImPS kvantitatīvai analīzei. Pretējā gadījumā būtu jāmaina reaģents, lai iegūtu kompleksu ar atšķirīgu m/z vērtību.

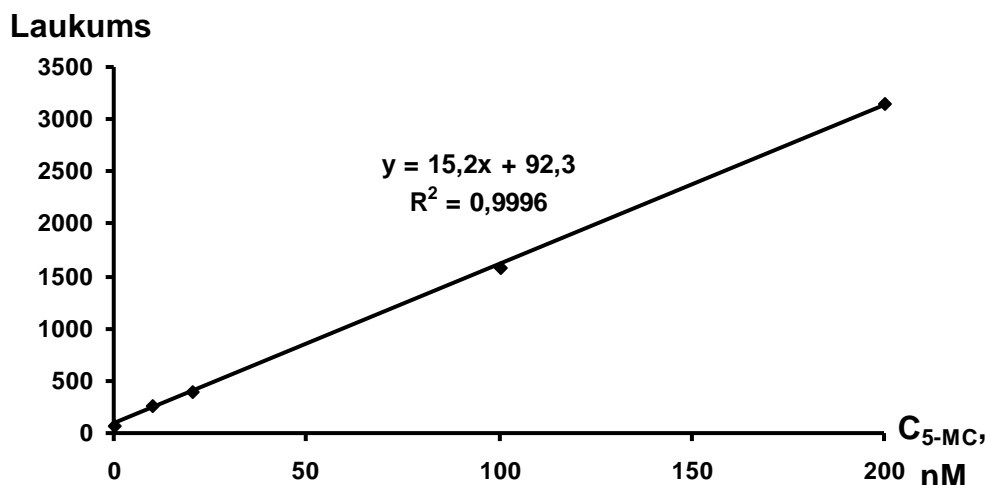
Lai rezultāti būtu mazāk atkarīgi no matricas ietekmes, kalibrācijas taisnes konstruēšanai izvēlas tādus 5-MC šķīdumus, kuri jau satur DNS raksturīgo nukleobāzu (adenīns, timīns, citozīns, guanīns un uracils) nemainīgas koncentrācijas katrā punktā. Uracils, kas neietilpst DNS sastāvā, var nonākt paraugā piesārņojuma rezultātā no sveša RNS. Tāpēc arī uracilu pievienoja kalibrācijas šķīdumiem.

3.6.2. Metodes validācija

Lai izvērtētu dotās metodes rezultātus, tika veikta daļēja validācija⁴, kas ietver sevī tādus parametrus kā linearitātes apgabals, LOQ, precizitāte, pareizība, reproducējamība, matricas efekts un analīta starpinjekciju pārnese (*carryover*).

⁴ Validācijas parametru noteikšanas rezultāti detalizēti aprakstīti publikācijā nr.5 (sk. Ievads, Promocijas darba aprobācija), kuras teksts ir pieejams Pielikumos, 158. lpp.

Linearitātes diapazona noteikšana veikta 5-MC koncentrāciju intervālā no 0 līdz 1000 nM. Iegūto punktu regresijas analīze parādīja, ka kompleksam atbilstošais signāla laukums ir lineāri atkarīgs no 5-metilcitozīna koncentrācijas līdz 200 nM (sk. 3.35. att.).



3.35. att. 5-Metilcitozīna kompleksa ar MeImPS signāla laukuma atkarība no 5-metilcitozīna koncentrācijas šķīdumā

Pie lielākām koncentrācijām var novērot atkāpi no linearitātes, kas var būt aprakstīta ar kvadrātisku funkciju (sk. Pielikumos atrodamo publikāciju, 158. lpp.).

Ar 2.3. vienādojuma veiktajiem aprēķiniem metodes *LOQ* vērtībai atbilst 8 nM (1 pg ievadīts sistēmā). Šī vērtība ir salīdzināma vai mazāka, nekā pēdējā laikā literatūrā publicētās AEŠH – MS² un GH – MS metožu attiecīgās vērtības [127-131]. Nepieciešams uzsvērt, ka dotā pieeja ir daudz vienkāršāka, jo analīzi veic bez hromatogrāfijas un tandēm-masspektrometrijas, kas ievērojami samazina analīzes laiku un līdzekļu patēriņu vienai analīzei.

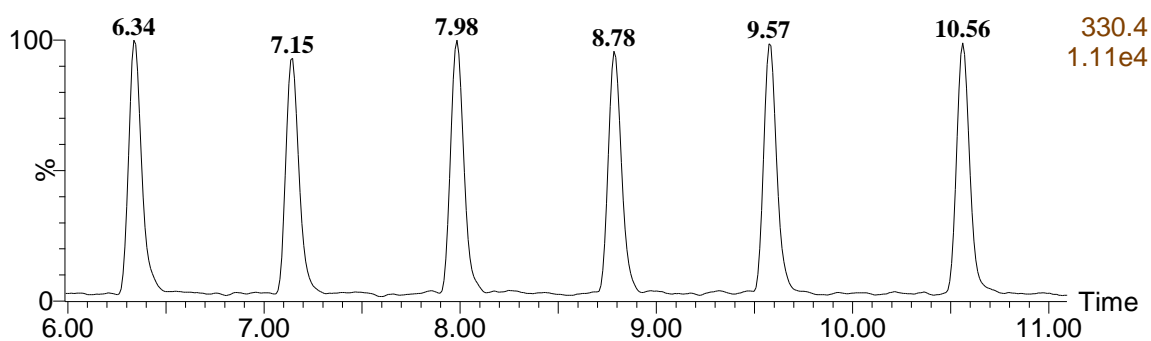
Validācijas procedūra parādīja, ka metode ir precīza, pareiza un reproducējama pie abām kvalitātes kontroles šķīdumu koncentrācijām (10 un 100 nM). Nosaukto parametru vērtības un citas detaļas ir atrodamās pēdējā publikācijā, kuru var apskatīt Pielikumos (158. lpp). Metodei piemīt neliels matricas efekts ($\leq 1,2$) un zema analīta starpinjekciju pārnese (0,3 %), kas atbilst 9,6 % no *LOQ* parauga laukuma. Rezultātā var secināt, ka iegūto validācijas parametru vērtības atbilst EMA prasībām bioanalītisko metožu validācijai⁵.

⁵ European Medicines Agency guideline on bioanalytical method validation, revision 1, corr. 2, 2011.

3.6.3. Teļa vairogdziedzera DNS analīze

Lai demonstrētu metodes pielietojšanas iespēju 5-metilcitozīna noteikšanai reālajā paraugā, kā piemēru izvēlējamies komerciāli pieejamo teļa vairogdziedzera DNS. Sākotnēji hidrolīzei ņemtais daudzums bija 2,5 µg, atbilstoši metodei [105], bet rezultāts parādīja, ka daudz lielāks atšķaidījums vajadzīgs (vismaz 100 reizes), lai nepārslogotu zemās dispersijas PIA sistēmu. Tāpēc tālākajās analīzēs paraugu sagatavoja atbilstoši 2.6.3. apakšnodaļā aprakstītajam. Kā alternatīvu var izmantot analīzei ņemtā DNS parauga daudzuma samazinājumu. Tas būtu izdevīgi gadījumos, ja DNS parauga lielums ir ierobežots, piemēram, mikrobioloģiskos pētījumos.

Kompleksam $[\text{MeImPS}+5\text{-MC}+\text{H}]^+$ atbilstošais signāla pieraksts, iegūts DNS hidrolizāta PIA – EIJ – MS analīzes gaitā, redzams 3.36. att.



3.36. att. Kompleksam (m/z 330) atbilstošā signāla *SIR* pieraksts, iegūts pēc 6 atkārtoti veiktām teļa vairogdziedzera DNS hidrolizāta injekcijām PIA – EIJ – MS apstākļos

Kā redzams, injekcijas veiktas ar vidēju ātrumu, ļaujot iepriekšējam paraugam pilnīgi izdalīties no sistēmas. Pat šī samērā lēnā parauga ievadīšanas metode dod iespēju veikt ap 60 analīžu stundā. Injekciju ātrumu var ievērojami palielināt, tās veicot vienu pēc otras. Procesu varētu paātrināt, pieslēdzot programmējamu automātisko paraugu ievadīšanas ierīci, ar kādām ir aprīkotas mūsdienu AEŠH sistēmas ar maziem iekšējiem tilpumiem.

Divu dažādās dienās veikto DNS paraugu analīžu rezultāti parādīja, ka 2,5 µg DNS satur atbilstoši $13,2 \pm 0,4$ un $13,5 \pm 0,8$ ng 5-metilcitozīna. Veicot nelielu aprēķinu, ievietojot iegūtās vērtības 2.4. vien., var iegūt teļa vairogdziedzera DNS metilēšanas līmeņa vērtību, kas ir vienāda ar 6,7 un 6,8 molu % no kopējā citozīna daudzuma. Dotās vērtības labi sakrīt ar literatūrā atrastiem teļa vairogdziedzera DNS metilēšanas līmeņiem, piemēram, 6,5 [128] un 6,9 [132] molu %.

Iegūtie rezultāti parāda, ka kompleksu veidošanās starp 5-metilcitozīnu un cviterjonu tipa savienojumiem ir pielietojama reālu DNS paraugu kvantitatīvajā analīzē. Metodes selektivitāti var mainīt, izvēloties lielāko daļu no darbā izmantotajiem cviterjoniem, kuri nobīda 5-metilcitozīna signālu lielāko m/z vērtību diapazonā. Cviterjonu tipa savienojumi ir viegli sintezējami, tāpēc jebkurai gadījumam var viegli piemeklēt efektīvu reaģentu.

Pēdējā laikā mūsu laboratorijā veiktie pētījumi parādīja, ka dotie cviterjoni veido līdzīgus kompleksus arī ar citiem bioloģiski aktīviem mazmolekulāriem savienojumiem, kuri satur amidīna un guanidīna grupas, kā kreatinīns un metformīns. Tāpēc aprakstītā metode ir lietojama arī citu savienojumu noteikšanai, kuri atrodas sarežģītā bioloģiskā matricā. Darbs šajā virzienā tiek turpināts.

SECINĀJUMI

1. Sadursmju inducētās disociācijas pētījumi parādīja, ka protonēto sulfonāta un karboksilāta rindas CJŠ molekulu fragmentācija ir vērsta uz imidazolija ciklu saturošo katjonu veidošanos. Šo jonu stabilitāte saistīta ar pozitīvā lādiņa delokalizāciju imidazolija gredzenā.
2. Sulfonāta rindas CJŠ EIJ gaitā spēj veidot deprotonētas molekulas, kuru fragmentācijas virziens saistīts ar sulfonāta grupu saturošo anjonu un anjonradikāļu veidošanos. Savukārt karboksilāta rindas CJŠ līdzīgos apstākļos stabilas deprotonētas daļiņas neveido.
3. CJŠ šķīdumā spēj veidot kompleksus ar dažādiem amīniem. Doto kompleksu rašanās spēja atkarīga no CJŠ funkcionālās grupas un amīna pK_a vērtībām. Turklāt kompleksu stabilitāte ir stipri atkarīga no vairākiem apstākļiem: ūdens daudzuma kustīgajā fāzē, sārna metālu jonu satura un konusa sprieguma.
4. Kvantu aprēķini parādīja, ka kompleksu veidošanās starp sulfonāta rindas CJŠ un 5-metilcitozīnu notiek sulfonāta un amidīna fragmentu mijiedarbību rezultātā. Starp abiem fragmentiem pastāv ūdeņraža saites, kas veicina cikliskas struktūras rašanos.
5. Asociācijas konstanšu vērtības 5-metilcitozīna kompleksi ar N-alkilimidazolija CJŠ nelineāri mainās līdz ar alkilķēdes garumu gan acetonitrilā, gan metanolā. Dotie novērojumi saistīti ar atšķirīgiem solvatācijas mehānismiem šajos šķīdinātājos.
6. Sadursmju inducētās disociācijas eksperimenti parādīja, ka kompleksu stabilitātes secība atkarībā no alkilķēdes garuma gan gāzes fāzē, gan acetonitrilā ir līdzīga. Savukārt metanola gadījumā šāda līdzība nepastāv.
7. Kompleksu stabilitāti gāzes fāzē var izskaidrot ar divu faktoru kombināciju, kuri darbojas pretējā virzienā. No vienas puses, komplekss kļūst stabilāks, ja 5-metilcitozīna un atbilstošā CJŠ gāzes fāzes bāziskuma vērtības ir tuvas. No otras puses, iekšējās enerģijas pieaugums kompleksa sadursmju rezultātā, ir apgriezti proporcionāls kompleksa molmasai. Abu faktoru kombinācija nosaka butil – aizvietota CJŠ kompleksa ar 5-metilcitozīnu zemāku stabilitāti nekā pārējo homologu gadījumā. Nosaukto faktoru pārzināšana, rada priekšnoteikumus tādu cviterjonu tipa jonu šķīdumu iegūšanai, kas varētu veidot vēl stabilākus kompleksus ar 5-metilcitozīnu.
8. Darbā izstrādāto metodi var izmantot 5-metilcitozīna noteikšanai DNS paraugos. Kustīgai fāzei pievienotais CJŠ spēj izmainīt 5-metilcitozīna noteikšanas selektivitāti,

nobīdot signālu lielāku m/z vērtību virzienā. Uzlabotā selektivitāte dod iespēju veikt plūsmas injekciju analīzi (*flow injection analysis*) ar sekojošu EIJ – MS detektēšanu. Sasniegtā jutība ir augstāka vai vienāda ar AEŠH/MS un AEŠH/MS² metožu jutību, kas zināma no literatūras. Izstrādātās pieejas priekšrocība ir liels analīžu ātrums (≥ 50 analīzes stundā) un iespēja to izmantot citu amidīna un guanidīna grupu saturošu savienojumu noteikšanai.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Yoshizawa, M.; Hirao, M.; Ito-Akita, K.; Ohno, H. Ion conduction in zwitterionic-type molten salts and their polymers. *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 1057-1062.
2. Yoshizawa, M.; Narita, A.; Ohno, H. Design of ionic liquids for electrochemical applications. *Austr. J. Chem.* **2004**, *57*, 139-144.
3. Qiu, H.; Jiang, Q.; Wei, Z.; Wang, X.; Liu, X.; Jiang, S. Preparation and evaluation of a silica-based 1-alkyl-3-(propyl-3-sulfonate) imidazolium zwitterionic stationary phase for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1163*, 63-69.
4. Kanagasabapathy, S.; Kumar, S.; Gajanan, J.; Kadu, M.; Preeti, L.; Renuka, M.; Anasuya, S.; Parasuraman, K. A solvent system for dissolution of pulp and polymer. WO2013/164845, Nov 7, 2013.
5. Jackson, G.P.; Duckworth, C.D. Electrospray mass spectrometry of undiluted ionic liquids. *Chem. Commun.* **2004**, 522-523.
6. Shukla, A. K.; Futrell, J. H. Tandem mass spectrometry: Dissociation of ions by collisional activation. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1069-1090.
7. Lesimple, A.; Mamer, O.; Miao, W.; Chan, T.H. Electrospray mass spectral fragmentation study of N,N'-disubstituted imidazolium ionic liquids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 85-95.
8. Lesimple, A.; He, X.; Chan, T.H.; Mamer, O. Collision-induced dissociation of sulfur-containing imidazolium ionic liquids. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 35-41.
9. Jin, Z.. Muscarine, imidazole, oxazole and thiazole alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 382-445.
10. Smith, R. D.; Light-Wahl, K. J. The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: Promise, pitfalls and prognosis. *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, *22*, 493-501.
11. Mathur, S.; Nazabal, A.; Zenobi, R. Probing noncovalent interactions by electrospray ionization and matrix-assisted laser Desorption/Ionization. In *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications: Second Edition*, Cole, R., Ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, 2012; pp. 535-570
12. Brodbelt, J. S. Probing molecular recognition by mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 57-69.

13. 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*, 171-180.
14. Torvinen, M.; Kalenius, E.; Sansone, F.; Casnati, A.; Jänis, J. Noncovalent complexation of monoamine neurotransmitters and related ammonium ions by tetramethoxy tetraglucosylcalix[4]arene. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 359-365.
15. Momparler, R. L.; Bovenzi, V.. DNA methylation and cancer. *J. Cell. Physiol.* **2000**, *183*, 145-154.
16. Jones, P. A. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Gen.* **2012**, *13*, 484-492.
17. Xu, F.; Zou, L.; Liu, Y.; Zhang, Z.; Ong C.N. Enhancement of the capabilities of liquid Chromatography–mass spectrometry with derivatization: general principles and applications. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 1143-72
18. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Chemistry, D. O.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240-2249.
19. Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451-4459.
20. Domon, B.; Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **2006**, *312*, 212-217.
21. Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A. Applications of ESI-MS in drug discovery: Interrogation of noncovalent complexes. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 585-595.
22. Vikse, K. L.; Ahmadi, Z.; Scott McIndoe, J. The application of electrospray ionization mass spectrometry to homogeneous catalysis. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *279*, 96-114.
23. Rizzarelli, P.; Carroccio, S.. Modern mass spectrometry in the characterization and degradation of biodegradable polymers. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *808*, 18-43.
24. Лебедев, А. Т. *Масс-спектрометрия в органической химии*, Бином: Москва, 2003; 475 p.
25. Ardrey, R. E. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*, John Wiley & Sons: London, **2003**; 263 p.
26. Cech, N.; Enke, C. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20*, 362-387.
27. Kebarle, P.; Verkerc, U. H. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 898-917.

28. Cheng, Z.L.; Siu, K.; Guevremont, R; Berman, SS. Electrospray mass spectrometry: A study on some aqueous solutions of metal salts. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 281-288.
29. Zhou, S.; Cook, K.D. A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: Charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 206-214.
30. Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287-2294.
31. Cole, R. B.; Zhu J. H. Chloride ion attachment in negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 607-611.
32. Ackloo, S. Z.; Smith, R. W.; Terlouw, J. K.; McCarry, B. E. Characterization of ginseng saponins using electrospray mass spectrometry and collision-induced dissociation experiments of metal-attachment ions. *Analyst* **2000**, *125*, 591-597.
33. Amad, M. H.; Cech, N. B.; Jackson, G. S.; Enke, C. G. Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 784-789.
34. Fernandez De La Mora, J.; Van Berkel, G. J.; Enke, C. G.; Cole, R. B.; Martinez-Sanchez M., Fenn, J. B. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 939-952.
35. Kertesz, V.; Van Berkel, G. J. Minimizing analyte electrolysis in an electrospray emitter. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 204-210.
36. Iribarne, J. V.; Dziedzic, P. J.; Thomson, B. A. Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Phys.* **1983**, *50*, 331-347.
37. Enke, C. G. A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4885-4893.
38. Cech, N. B.; Enke, C.G. Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2717-2723.
39. Cech, N. B.; Krone, J. R.; Enke, C. G. Predicting electrospray response from chromatographic retention time. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 208-213.
40. Zhou, S.; Cook, K. D. Protonation in electrospray mass spectrometry: Wrong-way-round or right-way-round? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, *11*, 961-966.
41. Van Berkel, G. J.; Zhou, F; Aronson, J. T. Changes in bulk solution pH caused by the inherent controlled-current electrolytic process of an electrospray ion source. *International J. Mass Spectrom. and Ion Proc.* **1997**, *162*, 55-67.

42. Temesi, D.; Law, B. The effect of LC eluent composition on MS responses using electrospray ionization. *LC-GC Europe* **1999**, *12*, 175-180.
43. Huber, C. G.; Krajete A. Sheath liquid effects in capillary high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of oligonucleotides. *J. Chromatogr. A* **2000**, *870*, 413-424.
44. McLafferty, J. *Tandem mass spectrometry*, John Wiley & Sons: New York, 1983; 526 p.
45. McLuckey, S. A. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 599-614.
46. Chorush, R. A.; Little, D. P.; Beu, S. C.; Wood, T. D.; McLafferty, F. W. Surface-induced dissociation of multiply-protonated proteins. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1042-1046.
47. Little, D. P.; Speir, J. P.; Senko, M. W.; O'Connor, P.B.; McLafferty, F.W. Infrared multiphoton dissociation of large multiply charged ions for biomolecule sequencing. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2809-2815.
48. Dunbar, R. C.; McMahon, T. B. Activation of unimolecular reactions by ambient blackbody radiation. *Science* **1998**, *279*, 194-197.
49. Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3265-3266.
50. Syka, J. E.; Coon, J. J.; Schroeder, M. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9528-9533.
51. McLuckey, S. A., Goeringer, D. E. Slow heating methods in tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 461-474.
52. Schlosser, A.; Pipkom, R.; Bossemeyer, D.; Lehmann, W. D. Analysis of protein phosphorylation by a combination of elastase digestion and neutral loss tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 170-176.
53. Cole, A.; Jensen, J.; Ntai, I.; Tran, K.; Weaver, K.; Forbes, D.; Davis, J. Novel brønsted acidic ionic liquids and their use as dual solvent-catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5962-5963.
54. Garg, B.; Lei, S.; Liu, S.; Bisht, T.; Liu, J.; Ling, Y. Rapid identification of trimethyl and triethyl amines using sulphonic acidic ionic liquids: A time-of-flight secondary ion mass spectrometry study of fragmentation reactions. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *757*, 48-55.
55. Zollinger, M.; Seibl, J. McLafferty reactions in even-electron ions? *Org. Mass Spectrom.* **1985**, *20*, 649-661.

56. Paulose, J.; Achuthan, R.; Mathai, G.; Chander, P.; Srinivas, R. McLafferty-type rearrangement of protonated N-[nicotinoyl] phenylethyl amines and consequent elimination of styrene. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 343–348.
57. Smith, J.; O'Hair, R.; Williams, T. Gas phase chemistry of sulfonate anions: Basicities and fragmentation reactions. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and Related Elements* **1996**, *119*, 49-59.
58. Jariwala, F.; Wood, R.; Nishshanka, U.; Attygalle, A. Formation of the bisulfite anion (HSO_3^- , m/z 81) upon collision-induced dissociation of anions derived from organic sulfonic acids. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 529-538.
59. Ganguly, A. K.; Pramanik, B. N.; Chen, G.; Tsarbopoulos, A. Detection of Noncovalent Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. In *Applied Electrospray Mass Spectrometry*; Ganguly, A. K.; Pramanik, B. N.; Gross, M., Eds.; Practical Spectroscopy Series 32; Marcel Dekker: New York, **2002**; pp. 361-389.
60. Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D. Detection of non-covalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6294–6296.
61. Huang, E. C.; Pramanik, B. N.; Tsarbopoulos, A.; Reichert, P.; Ganguly, A. K.; Trotta, P.P.; Nagabhushan, T. L.; Covey, T. R. Application of electrospray mass spectrometry in probing protein-protein and protein-ligand non-covalent interactions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 624–626.
62. Sannes-Lowery, K.A.; Mei, H. Y.; Loo, J. A. Studying aminoglycoside antibiotic binding to HIV-1 TAR RNA by electrospray ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *193*, 115–122
63. Fernandes, A. M.; Schröder, B.; Barata, T.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P. Inclusion complexes of ionic liquids and cyclodextrins: Are they formed in the gas phase? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25*, 852-860.
64. Da Silva, E.; Valmalle, C.; Becchi, M.; Cuilleron, C.; Coleman, A. W. The use of electrospray mass spectrometry (ES/MS) for the differential detection of some steroids as calix-[n]-arene sulphonate complexes. *J. Inclusion Phenomena* **2003**, *46*, 65-69.
65. Jang, S.; Ju Song, M.; Kim, H.; Choi, S. Formation of metal complex ions from amino acid in the presence of Li^+ , Na^+ and K^+ by electrospray ionization: Metal replacement of hydrogen in the ligands. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46*, 496-501.
66. Jover, J.; Bosque, R.; Sales, J. A comparison of the binding affinity of the common amino acids with different metal cations. *Dalton Trans.* **2008**, *45*, 6441-6451.

67. Schug, K. A.; Lindner, W. Noncovalent binding between guanidinium and anionic groups: Focus on biological- and synthetic-based arginine/guanidinium interactions with phosph[on]ate and sulf[on]ate residues. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 67-113.
68. Daniel, J. M.; Friess, S. D.; Rajagopalan, S.; Wendt, S.; Zenobi, R. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *216*, 1-27.
69. Bich, C.; Baer, S.; Jecklin, M. C.; Zenobi, R. Probing the hydrophobic effect of noncovalent complexes by mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 286-289.
70. Galabov, B.; Bobadova-Parvanova, P.; Ilieva, S.; Dimitrova, V. The electrostatic potential at atomic sites as a reactivity index in the hydrogen bond formation. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2003**, *630*, 101-112.
71. Bruins, A. P. Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure. *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 53-77.
72. Sun, J.; Kitova, E. N.; Klassen, J. S. Method for stabilizing protein-ligand complexes in nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 416-425.
73. Bagal, D.; Kitova, E. N.; Liu, L.; El-Hawiet, A.; Schnier, P. D.; Klassen, J. S. Gas phase stabilization of noncovalent protein complexes formed by electrospray ionization. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7801-7806.
74. Clark, S. M.; Konermann, L. Screening for noncovalent ligand-receptor interactions by electrospray ionization mass spectrometry-based diffusion measurements. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1257-1263.
75. Schug, K. A.; Serrano, C.; Fryčák, P. Controlled band dispersion for quantitative binding determination and analysis with electrospray ionization-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 806-829.
76. Annis, D. A.; Nazef, N.; Chuang, C.; Scott, M. P.; Nash, H. M. A general technique to rank protein-ligand binding affinities and determine allosteric versus direct binding site competition in compound mixtures. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15495-15503.
77. Page, J. S.; Kelly, R. T.; Tang, K.; Smith, R. D. Ionization and transmission efficiency in an electrospray ionization-mass spectrometry interface. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1582-1590.
78. Zook, D. R.; Bruins, A. P. On cluster ions, ion transmission, and linear dynamic range limitations in electrospray (ionspray) mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1997**, *162*, 129-147.

79. Galvani, M.; Hamdan, M.; Righetti, P. G. Probing protein unfolding through monitoring cysteine alkylation by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 1925-1931.
80. Schug, K. A.; Maier, N. M.; Lindner, W. Chiral recognition mass spectrometry: Remarkable effects observed from the relative ion abundances of ternary diastereomeric complexes using electrospray ionization. *Chem. Commun.* **2006**, *4*, 414-416.
81. Kempen, E.; Brodbelt, J. A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5411-5416.
82. Gabelica, V.; Galic, N.; Rosu, F.; Houssier, C.; De Pauw, E. Influence of response factors on determining equilibrium association constants of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 491-501.
83. Gabelica, V.; Rosu, F.; De Pauw, E. A simple method to determine electrospray response factors of noncovalent complexes. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6708-6715.
84. Rogniaux, H.; Van Dorsselaer, A.; Barth, P.; Biellmann, J.; Barbanton, J.; van Zandt, M.; Podjarny, A. Binding of aldose reductase inhibitors: Correlation of crystallographic and mass spectrometric studies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 635-647.
85. Annis, D.; Athanasopoulos, J.; Curran, P.; Felsch, J.; Kalghatgi, K.; Lee, W.; Nash, H.; Orminati, J.-P.; Rosner, K.; Shipps, Jr.; Thaddupathy, G.; Tyler, A.; Vilenchik, L.; Wagner, C. R.; Wintner, E. A. An affinity selection-mass spectrometry method for the identification of small molecule ligands from self-encoded combinatorial libraries: Discovery of a novel antagonist of E. coli dihydrofolate reductase. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *238*, 77-83.
86. Comess, K.; Trumbull, J.; Park, C.; Chen, Z.; Judge, R.; Voorbach, M.; Coen, M.; Gao, L.; Tang, H.; Kovar, P.; Cheng, X.; Schurdak, M.; Zhang, H.; Sowin, T.; Burns, D. Kinase drug discovery by affinity selection/mass spectrometry (ASMS): Application to DNA damage checkpoint kinase Chk1. *J. Biomol. Screening* **2006**, *11*, 755-764.
87. Holčapek, M.; Jirásko, R.; Lísa, M.. Recent Developments in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and Related Techniques. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 3-15.
88. Xu, F.; Li, Z.; Liu, Y.; Zhang, Z.; Ong, C. Enhancement of the Capabilities of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry with Derivatization: General Principles and Applications. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 1143-1172.
89. Santa, T. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25*, 1-10.
90. Ruzicka, J.; Hansen, E. *Flow injection analysis*. Wiley: New York, 1988; p. 498.

91. Stefansson, M.; Sjöberg, P.; Markides, K. Regulation of multimer formation in electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1792-1797.
92. Gao, S.; Zhang, Z.; Edinboro, L.; Ngoka, L.; Karnes, H. The effect of alkylamine additives on the sensitivity of detection for paclitaxel and docetaxel and analysis in plasma of paclitaxel by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, *20*, 683-95.
93. Antignac, J.; Le Bizec, B.; Monteau, F.; Poulain, F.; André, F. Collision-induced dissociation of corticosteroids in electrospray tandem mass spectrometry and development of a screening method by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 33-39.
94. Dodbiba, E.; Breitbach, S.; Wanigasekara, E.; Payagala, T.; Zhang, X.; Armstrong, D. Detection of Nucleotides in Positive-Mode Electrospray Ionization Mass Spectrometry using Multiply-Charged Cationic Ion-Pairing Reagents. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 367-376.
95. Xu, C.; Pinto, E.; Armstrong, D. Separation and Sensitive Determination of Sphingolipids at Low Femtomole Level by using HPLC-PIESI-MS/MS. *Analyst* **2014**, *139*, 4169-4175.
96. Martinelango, P.; Anderson, J.; Dasgupta, P.; Armstrong, D.; Al-Horr, R.; Slingsby, R. Gas-Phase Ion Association Provides Increased Selectivity and Sensitivity for Measuring Perchlorate by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4829-4835.
97. Podjava A. Cviterjonu tipa jonu šķidrums fragmentācija sadursmju inducētās disociācijas apstākļos. Maģistra darbs, LU Ķīmijas fakultāte, Rīga, 2011, 68 lpp.
98. 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.; et al., Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
99. Topol, I.; Tawa, G.; Burt, S.; Rashin, A. Calculation of absolute and relative acidities of substituted imidazoles in aqueous solvent. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 10075-10081.
100. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. the role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648-5652.
101. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
102. Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 490-519.
103. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications, *J. Comp. Chem.* **1989**, *10*, 221-264.
104. Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and

transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215-241.

105. Rossella, F.; Polledri, E.; Bollati, V.; Baccarell, A.; Fustinoni, S. Development and Validation of a Gas Chromatography/ Mass Spectrometry Method for the Assessment of Genomic DNA Methylation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2637-2646.

106. Dega-Szafran, Z.; Przybylak, R. Synthesis, IR and NMR studies of zwitterionic ω -(1-pyrrolidine)alkanocarboxylic acids and their N-methyl derivatives. *J. Mol. Struct.* **1997**, 436-437, 107-121.

107. Nockemann, P.; Thijs, B.; Parac-Vogt, T.; Hecke, K.; Meervelt, L.; Tinant, B.; Hartenbach, I.; Schield, T.; Ngan, V.; Nguyen, M.; Binnemans K. Carboxyl-functionalized task-specific ionic liquids for solubilizing metal oxides. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 9987-9999.

108. Nakurte, I.; Mekss, P.; Klavins, K.; Zicmanis, A.; Vavilina, G.; Dubrovina, S. Collision-induced dissociation of imidazolium-based zwitterionic liquids. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2009**, *15*, 471-478.

109. Sleno, L.; Volmer, D. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1091-1112.

110. Levsen, K.; Schiebel, H.; Terlouw, J.; Jobst, K.; Elend, M.; Preiß, A.; Thiele, H.; Ingendoh, A. Even-electron ions: a systematic study of the neutral species lost in the dissociation of quasi-molecular ions. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 1024-1044.

111. Thuijl, J.; Klebe, K.; Houte, J. Fragmentation behavior and ring expansion of 1-methylimidazole and 1-methylpyrazole upon electron-impact. *Org. Mass Spectrom.* **1973**, *7*, 1165-1172.

112. Hunter, E. P.; Lias, S.G. In: W.G. Mallard, P.J. Linstrom (Eds.), NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 2000 (<http://webbook.nist.gov>).

113. Kistkins, S. Elektroizsmidzināšanas jonizācijas apstākļu ietekme uz nekovalento struktūru veidošanos starp 5-metilcitozīnu un dažādiem cviterjonu tipa savienojumiem. Kurša darbs, LU Ķīmijas fakultāte, Rīga 2014, 42 lpp.

114. Muckerman, J.; Skone, J.; Ning, M.; Wasada-Tsutsui, Y. Toward the accurate calculation of pKa values in water and acetonitrile. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1827*, 882-891.

115. http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf (skatīts 25.03.13)

116. Rived, F.; Canals, I.; Bosch, E.; Rosés, M. Acidity in methanol-water. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *439*, 315-333.

117. Sarmini, K.; Kenndler, E. Ionization constants of weak acids and bases in organic solvents. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, *38*, 123–137.
118. Rõõm, E.; Kütt, A.; Kaljurand, I.; Koppel, I.; Koppel, I.; Leito, I.; Mishima, M.; Goto, K.; Miyahara, Y. Brønsted Basicities of Diamines in the Gas Phase, Acetonitrile, and Tetrahydrofuran. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7631-7643
119. Cunningham, G.; Gidulich, G.; Kay, R. Several Properties of Acetonitrile-Water, Acetonitrile-Methanol and Ethylene Carbonate-Water Systems. *J. Chem. Eng. Data* **1967**, *12*, 336–337.
120. Mirfakhar, S. H.; Bagloo, D. Density and Surface Tension of Binary Mixtures of Acetonitrile 2-Alkanol at 298,15 K. *J. of Science and today's world*, **2013**, *2*, 344-357.
121. Mochizuki, S.; Usui, Y.; Wakisaka, A. Acid-base interaction from the viewpoint of molecular clustering: Effects of solvent, pKa and size of alkyl group. *J. Chem. Soc. - Faraday Trans.* **1998**, *94*, 547-552.
122. Evans, D. F.; Gardam, P. Transport processes in hydrogen-bonding solvents. II. conductance of tetraalkylammonium salts in 1-butanol and 1-pentanol at 25°. *J. Phys. Chem.* **1969**, *73*, 158-163.
123. D'Aprano, A.; Goffredi, M.; Triolo, R. Ion pairing in protic and aprotic solvents of intermediate dielectric constant at 25°C. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1: Phys. Chem. in Condensed Phases* **1975**, *71*, 1188-1191.
124. Luxford, T. F.; Milner, E. M.; Yoshikawa, N.; Bullivant, C.; Dessent, C. E. Complexation of carboxylate anions with the arginine gas-phase amino acid: Effects of chain length on the geometry of extended ion binding. *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *577*, 1.
125. Nesatyy, V. J. Mass spectrometry evaluation of the solution and gas-phase binding properties of noncovalent protein complexes. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *221*, 147.
126. Cai, Y.; Cole, R. B. Stabilization of anionic adducts in negative ion electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 985.
127. Hu, C.-W.; Liu, H.-H.; Li, Y.-J.; Chao, M.-R. Direct Analysis of 5-Methylcytosine and 5-Methyl-2'-Deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC-MS/MS: Correlations with N-Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 462-470.
128. Kok, R.; Smith, D.; Barto, R.; Spijkerman, A.; Teerlink, T.; Gellekink, H.; Jakobs, C.; Smulders, Y. Global DNA Methylation Measured by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Analytical Technique, Reference Values and Determinants in Healthy Subjects. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2007**, *45*, 903-911.

129. Zhang, J.-J.; Zhang, L.; Zhou, K.; Ye, X.; Liu, C.; Zhang, L.; Kang, J.; Cai, C. Analysis of Global DNA Methylation by Hydrophilic Interaction Ultra High-Pressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **2011**, *413*, 164-170.
130. Wrobel, K.; Lopez Torres, A.; Yanez Barrientos, E.; Wrobel, K. Selective Derivatization of Cytosine and Methylcytosine Moieties with 2-Bromoacetophenone for Submicrogram DNA Methylation Analysis by Reversed Phase HPLC with Spectrofluorimetric Detection. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7999-8005.
131. Romerio, A.; Fiorillo, G.; Terruzzi, I.; Senesi, P.; Testolin, G.; Battezzati, A. Measurement of DNA Methylation using Stable Isotope Dilution and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **2005**, *336*, 158-163.
132. Falck, E.; Groenhagen, A.; Mühlisch, J.; Hempel, G.; Wünsch, B. Genome-Wide DNA Methylation Level Analysis by Micellar Electrokinetic Chromatography and Laser-Induced Fluorescence Detection After Treatment of Cell Lines with Azacytidine and Antifolates. *Anal. Biochem.* **2012**, *421*, 439-445.

Promocijas darbs „Cviterjonu tipa jonu šķidrumu ķīmiskās īpašības gāzes fāzē un pielietojumi elektroizsmidzināšanas jonizācijas masspektrometrijā” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____ Antons Podjava
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)
(datums) _____

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai
Vadītājs asoc. prof., Dr. Ķīm. Pēteris Mekšs: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts
LU Ķīmijas nozares Promocijas padomē: _____ (datums)
Padomes sekretārs/e: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Darbs aizstāvēts Promocijas padomes sēdē:
_____ protokols Nr. _____
(datums) (protokola Nr.)

Padomes sekretārs/e: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

LIQUID CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY OF ZWITTERIONIC LIQUIDS

A. Podjava, P. Mekšs, A. Zicmanis

Department of Chemistry, University of Latvia, Kr. Valdemāra Str. 48, Riga, Latvia;
e-mail: Peteris Mekss [trusens@latnet.lv]

We have implemented full mass spectrometric assay of several 3-(1-alkyl-2-methylimidazolio)propanesulfonates, which are known as zwitterionic liquids (ZILs). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) column and different mobile phases in both isocratic and gradient elution conditions were used for separation of the compounds present in these samples. The structures of the impurities have been confirmed by LC-MS/MS experiments. In addition, fragmentation pathways of ZILs were studied for different collision energies (0–50 eV) in positive electrospray ionization (ESI) mode under collision-induced dissociation conditions. Several new routes of fragmentation are briefly discussed. These include possible rearrangements and imidazolium ring expansions, which hypothetically proceed through carbocationic intermediates in the gas phase. Currently these processes are studied in a more detailed fashion.

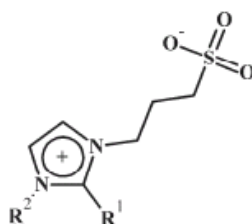
Key words: *zwitterionic liquids, hydrophilic interaction liquid chromatography, collision induced dissociation, electrospray ionization*

INTRODUCTION

Zwitterionic liquids (ZILs) are organic compounds, which contain cationic and anionic parts within one molecule. The unique characteristic of these compounds is the inability of migration of cation and anion under the influence of electric field. This structural property together with thermal stability and high conductivity explains possible use of ZILs as the electrolytes in rechargeable lithium batteries [1, 2].

There are two interesting problems associated with ZILs. The first of them is related to the presence of the impurities and synthetic by-products, which can significantly influence characteristics of ZILs in any area of technologies. The second problem is more theoretical, and is connected with the determination of mass spectrometric fragmentation pathways and gas phase chemistry of ZILs.

Inspired by these two problems, we have implemented full mass spectrometric assay of several imidazolium-based ZIL samples of a type **1**, where $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = n\text{-Bu}$ (**1a**), $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{Octyl}$ (**1b**) and $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{Dodecyl}$ (**1c**).



We have found that there is a lack of information on both chromatography and mass spectrometry of ZILs in the literature. Recently collision-induced dissociation (CID) of several imidazolium ZILs associated with the direct injection experiments have been carried out in our laboratory [3]. In addition, the fragmentation pathways of some S- and O-containing imidazolium ionic liquids were studied by positive Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometry (ESI-FTMS) with Sustained Off-Resonance Irradiation (SORI) [4, 5]. The known capabilities of these techniques are accurate mass measurement and high precision. However, there are possibilities for suppression effects and ion – molecule reactions, which are typical for ESI-MS of crude samples, if separation is not done before the analysis. Therefore we decided to use high performance liquid chromatography (HPLC) in combination with MS in these studies. Some chromatographic data obtained in reverse-phase (RP) mode are published [6]. Although RP columns are more popular and show good reproducible retention of ZILs, there is one drawback of this type of stationary phases when HPLC-ESI-MS is performed. The mobile phases for RPCLC usually contain water as a major component, which has lower volatility as well as higher viscosity than organic solvents and causes low signals of analytes. Thus we preferred to perform separations via Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC), which is believed to be partition of the analyte between stationary aqueous layer and organic mobile phase [7]. This separation technique gives the opportunity of using mobile phases with high organic modifier (such as acetonitrile or methanol) content.

Here we represent our primary results obtained in HILIC-ESI-MS/MS of ZILs. The studies of the problems discussed in this report are ongoing in our laboratory.

EXPERIMENTAL

Materials

All the compounds **1a**, **1b** and **1c** were synthesized in the Department of Organic Chemistry of University of Latvia by the procedures described in the literature [8]. Acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade) and formic acid were obtained from *Aldrich*. Deionized water for mobile phases was obtained by *Milli-Q* technology. All the solvents were filtered through 0.45 μm filter, then degassed prior to analyses. The samples were also filtered through *Millipore* 0.45 or 0.2 μm filters.

HPLC-MS/MS apparatus and analyses

Separation and mass spectrometric analyses were performed using *Waters Alliance 2690* Separation Module and *Waters Micromass Quattro API* triple quadrupole mass spectrometer.

Samples were dissolved in methanol or acetonitrile (with addition of small amount of water for acetonitrile-based mobile phases to increase the solubility) to obtain approximate concentration of 1 mg/ml. For the investigation of better separation conditions in isocratic mode the mobile phases chosen were methanol/water (70–95% of methanol v/v), acetonitrile/water (70–95% of acetonitrile v/v) and acetonitrile/water+formic acid (70–95% of acetonitrile v/v, pH 2.3–6) at flow rate of 0.2 ml/min. The compounds of interest were separated using *Waters Atlantis HILIC Silica* column (150×2.5 mm); particle size 3 μm .

We have performed also gradient elution analyses using acetonitrile/water 90:10 v/v as initial mobile phase composition for all samples. For compound **1a**, the initial content of acetonitrile in the mobile phase was decreased linearly to 0% during 25 min, but for the compounds **1b** and **1c** the initial mobile phase composition was changed to 61:39 during 8 min and then flow rate and mobile phase composition were nonlinearly changed from 0.2 to 0.3 ml/min and 0% of acetonitrile during next 12 minutes.

The analytes were detected in positive electrospray ionization mode. The capillary and cone voltages were set at 3 kV and 30 V respectively. The data were acquired in the range from 50 to 400 m/z units, scan time was 300 ms and interscan delay was 50 ms. The MS/MS experiments were performed in CID mode using argon as collision gas. For the compounds studied mass spectra were collected in the collision energy range of 0–50 eV and for the impurities at 40 eV. The data collected were averaged for every chromatographic peak, the signals were smoothed and background was subtracted using *MassLynx 4.1* software.

RESULTS

Chromatographic conditions

Initial chromatographic experiments are performed using isocratic elution conditions. Neither of methanol/water mobile phases show acceptable chromatography due to very weak resolution of impurities and compounds of interest, poor retention and overloading effects, which are not decreased even when samples are diluted up to 100 times. Very similar observations are made in case of the analysis of non-zwitterionic type ionic liquids on RP stationary phases [9]. Such effects are not observed when acetonitrile mobile phases are used for the separation. These mobile phases are found to be good for the separation, but still have a drawback of asymmetric peak shapes showing very strong retention in HILIC mode. This strong retention can be attributed to ion-exchange between acidic silanol groups on the surface of naked silica and the analytes, which (as will be show later) are basic and can exist in various forms in solution according to their pK_a values. The interactions with silanol groups are especially dominant when mobile phases with high acetonitrile content are used. Because the higher organic modifier content induces better separation in HILIC, we have decided to suppress these unwanted interactions by lowering the pH values of the mobile phases. This procedure is known to prevent the dissociation of the silanol groups by protonation [10]. The other method of minimizing these effects based on adding a competitor base like TEA to the mobile phase [11] seems poor to us, due to obvious ion suppression in the ion source of mass spectrometer, caused by this substance.

Lowering the pH of acetonitrile/water mobile phases improves the resolution of peaks a little and greatly reduces the retention times of basic impurities. However, the problem of peak tailing still exists.

Therefore we have decided to run the samples in a gradient mode. Almost scouting gradient conditions allow to perform not only efficient separation of compounds in all the samples **1a**, **1b**, **1c**, but also to improve the peak shapes and decrease the analysis time. In addition, we are able to identify one more impurity in the sample **1a**, which is not detectable in isocratic conditions possibly due to very strong retention (Fig. 1). As can be seen from Fig. 1, the

order of retention of the analytes reflects that characteristic of the HILIC mode, i.e. the more polar and basic analytes are eluted from the column slower than less polar and basic substances. It should be noted, that the increase of the flow rate of the mobile phase in cases of samples **1b** and **1c** to 0.3 ml/min during the gradient run (see Experimental) is due to the stronger retention of basic impurities OMIM (**1b**) and DMIM (**1c**), when the flow rate value is kept to be 0.2 ml/min. Because of acceptable chromatographic performance of the gradient conditions we have chosen this mode for further investigations.

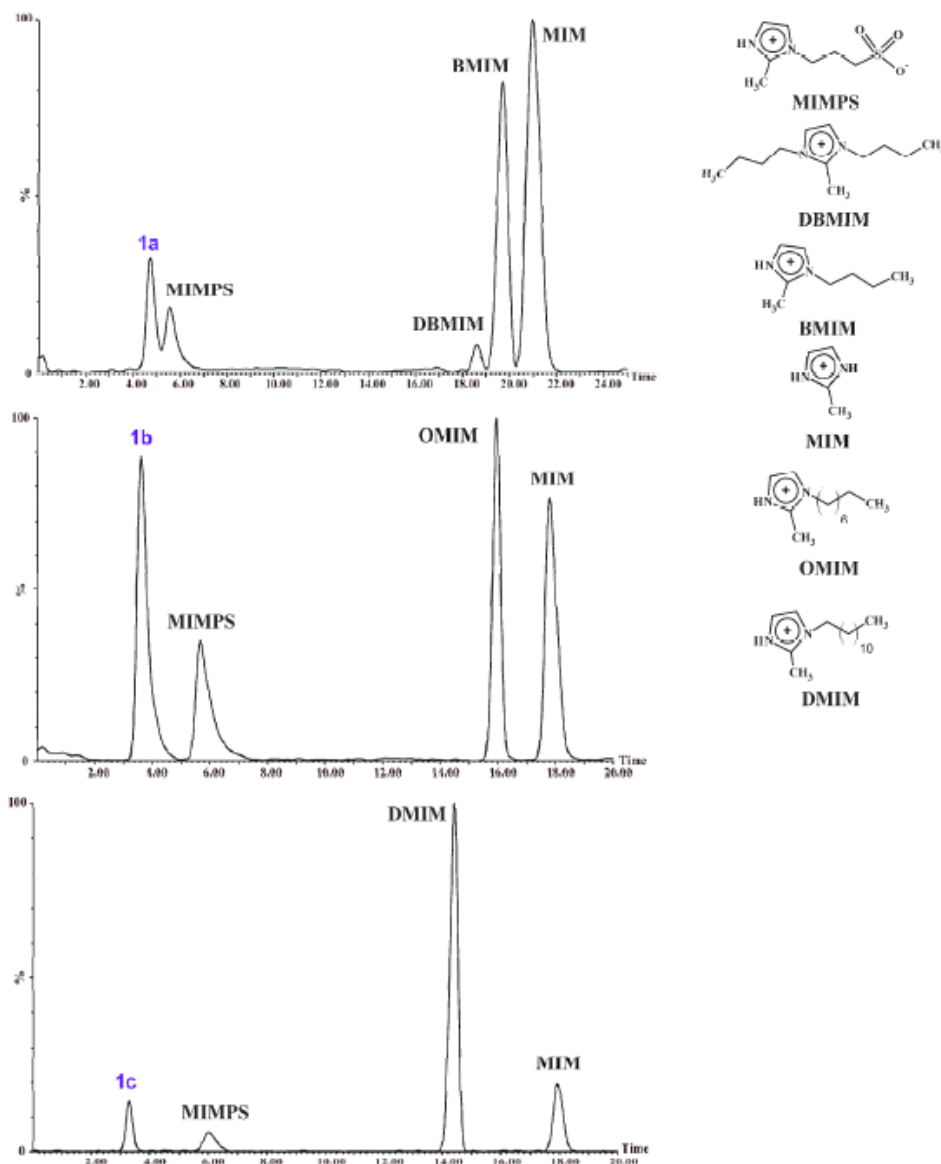
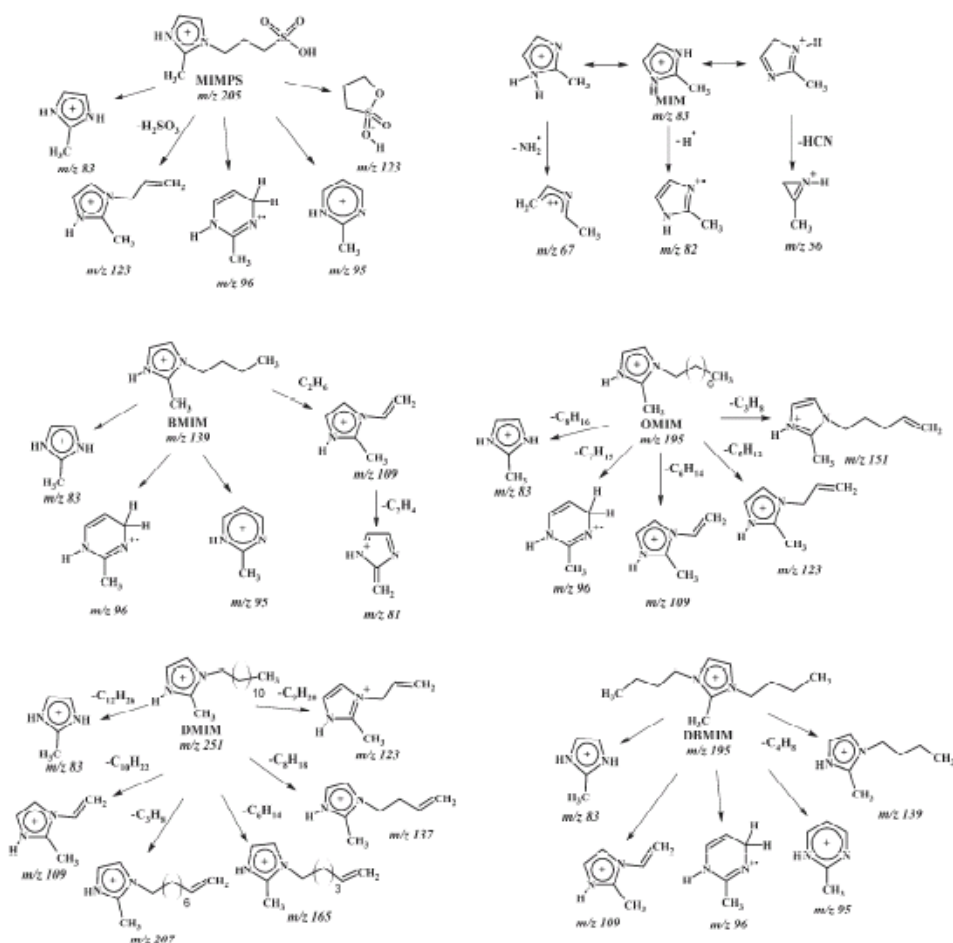


Fig. 1. TIC (total ion current) chromatograms of ZIL samples **1a**, **1b** and **1c** obtained in gradient mode using $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ as a mobile phase.

Determination of impurities in ZIL samples

LC-MS/MS is a powerful technique for the both separation and structural studies of the analytes, which allows us to elucidate the structures of all the

impurities present in samples **1a**, **1b** and **1c**. According to these studies, all the impurities have the same nature (Fig. 1) and the differences in mass spectra are minimal. These compounds are basic (MIM, BMIM, OMIM, DMIM), zwitterionic (MIMPS) and non-basic (DBMIM) derivatives of imidazole which may form in the course of the synthesis of the target zwitterionic liquid (**1a**, **1b** or **1c**) when the reaction conditions are poorly controlled. The minimal differences in the mass spectra of these compounds somewhat complicate the structural elucidation, but it still can be done taking into account the molecular ions obtained in full scan acquisition and small alkyl chain fragments appeared during 40 eV CID experiments with Ar gas. The preferred 40 eV collision energy seems to be optimal for these studies due to the presence of alkyl chain fragments in structures of substances being obtained, the characteristic 2-methylimidazolium ion with m/z 83 and some of its fragments in the spectra, giving wider information for the interpretation. The schemes of fragmentation of impurities which correspond to the mass spectra given in Fig. 1 are shown in Scheme 1.



Scheme 1. Interpretation of the main mass spectral signals of the impurities in ZIL samples.

The isotopic composition of MIMPS molecular ion with m/z 205 and mass spectra obtained at 40 eV suggest that this compound contains sulfur atom. The base peak at this voltage appears at m/z 83, which corresponds to 2-methyl-

imidazolium ion. The difference between m/z 205 and m/z 83 is 122 Da. This indicates for possible neutral loss of sulfur-containing fragment $C_3H_6SO_3$. Similarly, other direction of fragmentation occurs, when MIMPS molecular ion loses fragment 82 Da, which corresponds to 2-methylimidazole molecule and the formation of m/z 123 ion, this time having composition of $C_3H_7SO_3$. These two processes can occur only, when alkyl chain containing sulfur atom is connected to the imidazole ring through nitrogen atom. The neutral loss of H_2SO_3 molecule (82 Da, isobaric with 2-methylimidazole molecule) by the hydrogen transfer from alkyl chain to sulfonate group can also occur leading to the alkenyl cation with m/z 123, but direct evidence of this process does not exist until labelling experiments are carried out. The difference between m/z 83 and 95 is 12 Da. This suggests that these fragments differ by one carbon atom. Therefore fragment with m/z 95 might be the product of ring expansion which leads to additional stabilization at high collision energy. This kind of ring expansion has been described already in literature in the case of functionalized imidazolium ionic liquids [5]. According to the "N-rule" the ion with m/z 96 is a radical-cation, which possibly originates from homolytic cleavage of the alkyl chain.

The main three fragments in MIM spectrum are at m/z 56, 67 and 82, however there are many fragments with very small intensities, which are hardly interpreted because of overlapping with background noise. These three main fragments can originate from different possible resonance forms of the imidazole ring. The fragment with m/z 82 is a radical-cation, which forms as a result of H^\bullet loss from 2-methylimidazolium ion (m/z 83). The ion with m/z 67 possibly forms from fragment with m/z 83 by the loss of NH_2^\bullet . Finally, m/z 56 fragment corresponds to the loss of HCN molecule from one of resonance forms of fragment with m/z 83. This type of fragmentation is quite similar to that for 1-protonated imidazole described for ESI-CID conditions in [12].

As indicated above, the mass spectra of alkylimidazoles (BMIM, OMIM, DMIM and DBMIM) are similar and differ only in alkyl chain fragments, which all have small intensities, but can be recognized. In addition, these compounds have similar characteristic ions at m/z 83, 95 and 109. We suppose that the formation of alkyl chain fragments is a two stage process. The first stage is random homolytic cleavage of one of C–C bonds leading to the formation of a distonic ion. The second stage is the restoring of positive charge by the loss of H^\bullet or subsequent loss of ethylene molecule, to form a new distonic ion and so on until stable ion is formed (m/z 83, 95 or 109). The formation of the last ion (m/z 109) will be discussed in detail in the next section.

Fragmentation of ZILs in CID conditions

The results obtained in the fragmentation studies of ZIL compounds **1a**, **1b** and **1c** can be represented by the breakdown graphs (Fig. 2) and also by common fragmentation scheme (Scheme 2). It is clearly seen from Fig. 2 that the tendency for the fragmentation decreases with increase of the alkyl chain length. Thus, the first fragments for compound **1a** bearing the N-butyl substituent appear even at 0 eV collision energy (CE), that means that the fragmentation starts in the ion source. The compounds **1b** and **1c** are less susceptible for the fragmentation. This observation could be the result of reduction of the internal energy of ion by the rapid change of possible conformations during the collisions with argon molecules. It is clear that the longer the alkyl

chain the more conformations it can have, therefore the observed order of the fragmentation becomes meaningful.

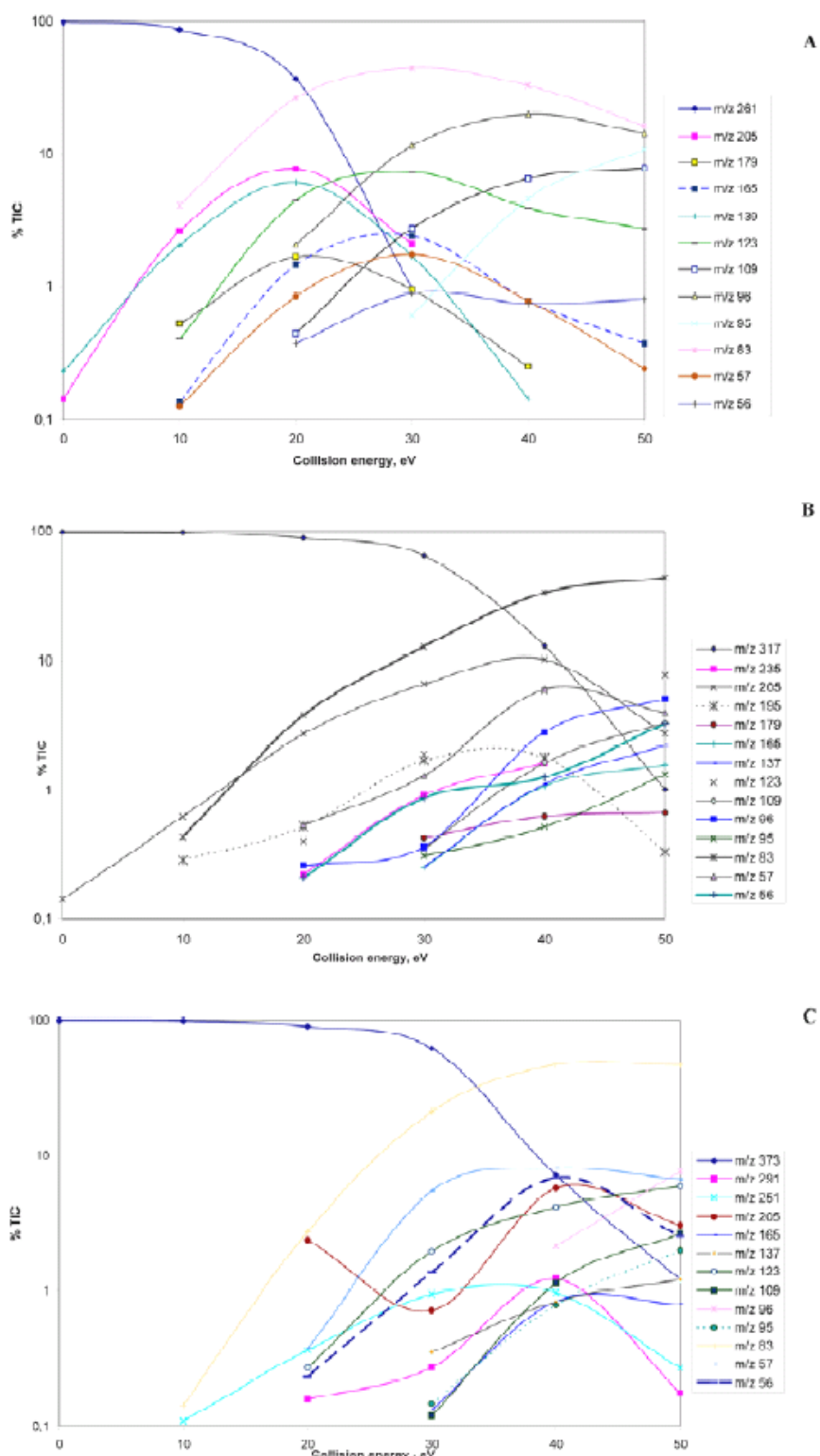
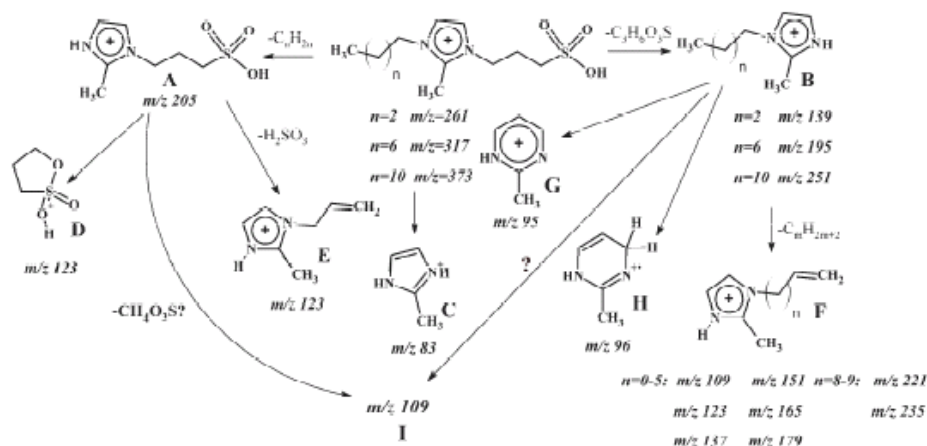


Fig. 2. Breakdown graphs of compounds 1a (A), 1b (B) and 1c (C) showing % TIC of fragments at different collision energies.



Scheme 2. Fragmentation pathways proposed for the $[M+H]^+$ ions of the compounds **1a**, **1b** and **1c** (m/z 261, 317 and 373).

The other observation from the breakdown graph (Fig. 2) is the type of fragments obtained in a low CE region (0–10 eV). For all the compounds **1a**, **1b** and **1c** these are the first generation daughter ions **A** (m/z 205), **B** (m/z 139, 195 or 251) and **C** (m/z 83). This suggests that there are two directions in the fragmentation processes occurring in the low CE region. The first direction is the formation of the ion **A** by the hydrogen transfer from the alkyl chain to the nitrogen atom of the imidazole ring, which results in the alkene neutral loss. The second path is the formation of the ion **B** by the hydrogen transfer from the alkylsulfonate group to the nitrogen atom of the imidazole ring. Previous results obtained in deuterium exchange conditions show that the hydrogen transfer occurs from the protonated sulfonate group instead of migration of hydrogen atom from the alkyl chain [3]. The formation of the ion **C** is theoretically possible either from the ion **A** or the ion **B** by the same two paths described above.

Along with increasing of CE the mass spectra of ZILs become more complicated. During this CE change, the second generation daughter ions appear. One of the most stable ions at moderate CEs (10–30 eV) is the ion with m/z 123, for which two structures could exist (ion **D** or ion **E**). There is no clear evidence which of these structures dominates, but the formation of ions with m/z 179, 235 and 291 via the very similar loss of sulfurous acid from the molecular ions of the compounds **1a**, **1b** and **1c** proves the possibility of the formation of the ion **E** in case of the ion **A** at moderate CE. On the other hand, the formation of the ion **D** seems also quite possible, because of the fragmentation at the positively charged center (α -scission).

More complicated is the formation of ion with m/z 57. At the first sight it could be represented as butyl cation, which originates from direct heterolytic cleavage of C–N bond (at least for compound **1a**, which already has butyl substituent), but there is no clear explanation on the formation of butyl substituent or other precursor that could cleave to give butyl cation in cases of compounds **1b** and **1c**, simply because these substances have only octyl and dodecyl substituents. However, breakdown graphs (Fig. 2) indicate the increasing of TIC % of this ion with increasing the length of the alkyl chain. For

compound **1a**, it reaches only $\approx 1\%$ of TIC, but for compounds **1b** and **1c** it constitutes approximately 10% of TIC.

The ions *G* and *H* also may form from several precursor ions like *A* and *B*. The formation of ions of such type is quite common for the imidazolium systems and have been already described in references [5, 6]. It includes the transfer of alkyl chain from nitrogen atom of imidazolium ring to the carbon atom of the same ring and subsequent ring expansion to pyrimidinium type. In addition, this ring expansion can be either homolytic or heterolytic leading to ions *H* or *G* respectively. These ions are stable and exist in high CE region (30–60 eV) for all compounds. Besides the high CE spectra of these two ions also contain small intensive peak of ion *C* daughter ion with m/z 56 and the products of the homolytic cleavage of the alkyl chain, which are both discussed in the previous section. The number of such cleavage products increases with the increasing the length of the alkyl chain and CE.

The most interesting fragmentation pathway of ZILs without doubts is the formation of the ion *I* with m/z 109. The study of the breakdown graphs indicates that this ion is very stable at high CEs, moreover its stability can be compared to that of aromatic ions *C* and *G*. Its structure remains unclear, but if ion *A* (m/z 205) is considered to be a precursor, there should occur hypothetical methanesulfonic acid loss to obtain the ion *I*. One possible way of this process should be a direct homolytic β -cleavage of the C–C bond and subsequent loss of H^\cdot , but this structure could not be stable under high CEs, because of the loss of either ethynyl radical or ethylene molecule and ion with m/z 82 or m/z 81 would form. Another possibility for the formation of the ion *I* could be a rearrangement of the propanesulfonate skeleton, which leads to overall formation of sulfonate ester, which again could cleave homolytically, but for the same reasons as above, it wouldn't be stable. The same treatment can be done for the ion *B* as a precursor. However, the lack of functional groups in this structure makes this ion a poor precursor, because in this case only homolytic cleavage of the alkyl chain is possible, which leads to the same intermediate as in the above example.

For these reasons we have decided to make additional experiments with the ions *A*, *B* and molecular ion of compound **1a**. Our experiments have been directed to the isolation and subsequent fragmentation of the ion *I*, obtained from real compounds, which form the same molecular ions as the ions *A* and *B*, and deduce whether the structure of the ion *I* is the same for these compounds. The compounds chosen are MIMPS and BMIM – the impurities isolated from the sample **1a** (Fig. 3). A very important point for this experiment is to obtain a good intensity signal of the ion *I* from MIMPS and BMIM directly in the ion source, in other words, to obtain cone voltage fragmentation of these compounds. This can be achieved only if a) suitable conditions are chosen (especially voltages), b) either of the compounds can produce the ion *I*. For the optimization of these suitable conditions, initially the cone voltage is held constant while capillary voltage is constantly changed and the signal of the ion *I* is recorded for MIMPS, BMIM and compound **1a**. After optimizing the capillary voltage at which the signal of the ion *I* is maximal for every individual compound, this voltage is held constant and cone voltage is changed until suitable conditions are found. For our surprise, the both compounds MIMPS and BMIM form the ion *I* under these optimized conditions. At the next stage of

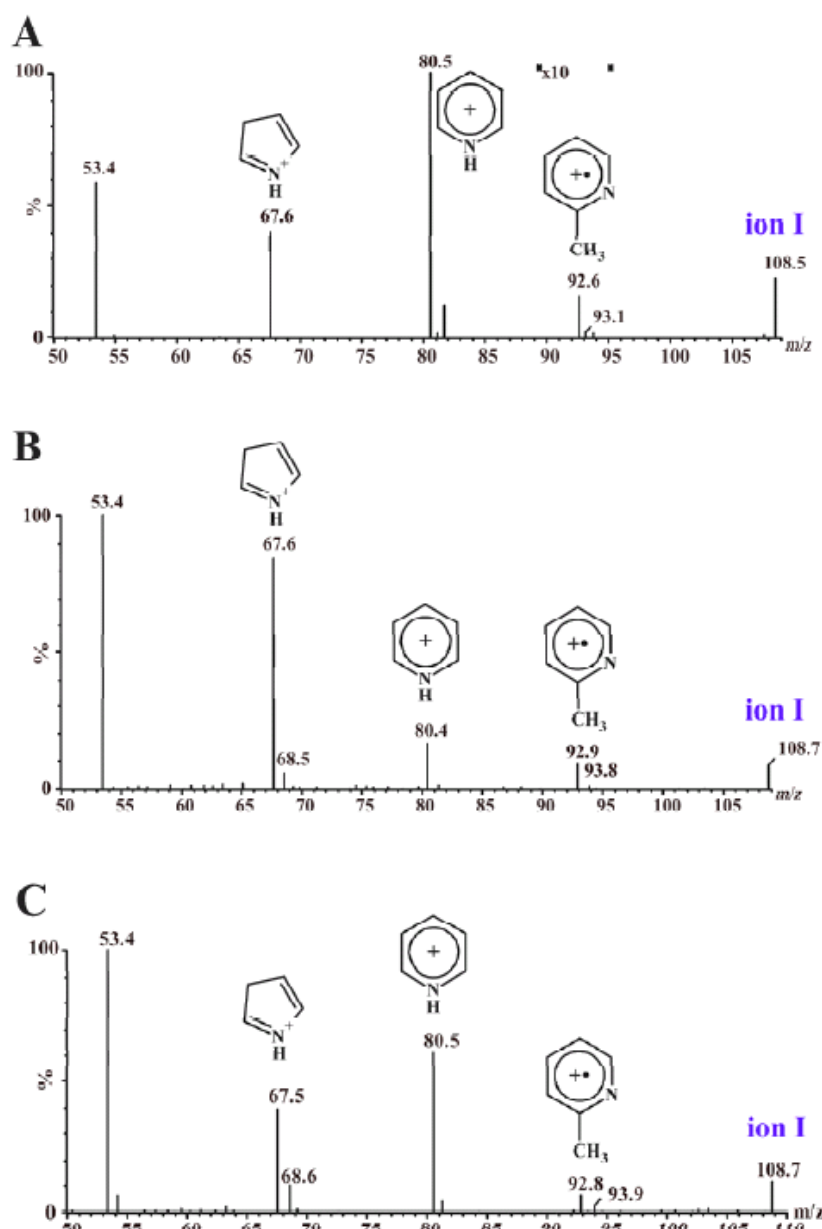
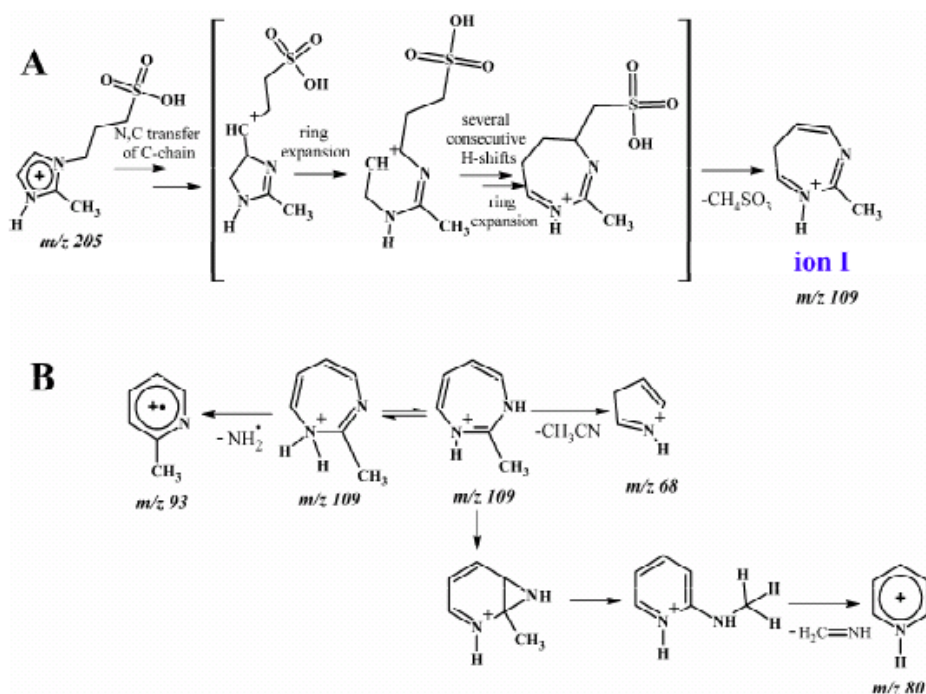


Fig. 3. CID (collision-induced dissociation) spectra of m/z 109 species generated from MIMPS (A), BMIM (B), and BMIMPS (C) $[M+H]^+$ ions at 35 eV collision energies. Possible structures corresponding to the fragments are given above the main peaks.

this experiment after obtaining the ion *I* in the ion source it is directed to the collision cell and fragmented at different CEs. The resulting mass spectra are compared with that obtained for compound **1a** (Fig. 3). This comparison indicates that there are no dramatic differences in all mass spectra – these consist of the same signals, which differ only in relative intensities. Thus, the structure of the ion *I*, obtained from precursor ions *A* and *B*, is the same. Therefore, it is possible that metastable intermediates for the formation of the ion *I* either from ion *A* or ion *B* are very similar in structure. It is rather complicated to postulate the structure of these intermediates until careful isotopic labelling experiments are not carried out. Interpretation of the mass spectra obtained in these expe-

periments gives three possible structures for three main peaks corresponding to the fragments of the ion *I* (Fig. 3). Two of these peaks according to R+dB rule (rings plus double bonds) may belong to pyridinium type compounds and one is pyrrole type compound. This suggests that very unusual cleavage occurs, which results in a loss of fragment containing nitrogen atom from the ion *I*.

Summarizing these observations we propose a general scheme for the formation of the ion *I* and its sequential fragmentation (Scheme 3). It can be seen from Scheme 3 that carbocations are involved in these transformations and whole process ends with mesylic acid loss (MsOH, CH₃SO₃H). It should be noted, that these hypothetical steps occur only if every of them is sufficiently fast, because the fragmentation is controlled kinetically rather than thermodynamically. Of course, at this stage the proposed scheme is only a hypothesis and the deuterium labelling experiments seem to be the next step for the investigation of gas phase chemistry of ZILs in our laboratory.



Scheme 3. Hypothetical scheme of the formation of the ion *I* (m/z 109) from the precursor ion A (the same as MIMPS, m/z 205) (A) and CID fragmentation of the ion *I*, leading to the fragments, shown in Fig. 3 (B).

Note: The formation of the ion *I* from the ion B (the same as BMIM, m/z 139) can be drawn in the same manner, except that the molecule of ethane is lost in the final step instead of MsOH.

CONCLUSIONS

The chromatographic results obtained in these studies show that acetonitrile-based mobile phases are superior in comparison with methanol mobile phases for the separation of basic impurities and ZILs. When operated in a gradient mode, these solvents allow shorter analysis time and improve peak shapes. HPLC in combination with tandem MS is capable to characterize all the impurities as well as to establish the fragmentation pattern of ZILs, which is quite similar. The main routes of fragmentation involve charge-induced dis-

sociation at low CEs and homolytic cleavage of the alkyl chain at high CEs, respectively. Some unusual processes may proceed at high CEs, which possibly are based on gas phase carbocation chemistry and include several consecutive ring expansions promoted by the hydrogen transfer. However, the full fragmentation pathways can be proposed only after accurate mass measuring or isotopic labelling experiments.

REFERENCES

1. Yoshizawa, M., Hirao, M., Ito-Akita, K., Ohno, H. (2001). Ion conduction in zwitterionic-type molten salts and their polymers. *J. Mater. Chem.*, *11*, 1057–1063.
2. Olivier-Bourbigou, H., Magna, L. (2002). Ionic liquids: perspectives for organic and catalytic reactions. *J. Mol. Cat. A: Chemical*, *182–183*, 419–437.
3. Nakurte, I., Mekss, P., Klavins, K., Zicmanis, A., Vavilina, G., Dubrovina, S. (2009). Collision-induced dissociation of imidazolium-based zwitterionic liquids. *Eur. J. Mass Spectrom.*, *15*(4), 471–478.
4. Lesimple, A., Mamer, O., Miao, W., Chan, T.H. (2006). Electrospray mass spectral fragmentation study of N,N'-disubstituted imidazolium ionic liquids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, *17*(1), 85–95.
5. Lesimple, A., He, X., Chan, T.H., Mamer, O. (2008). Collision-induced dissociation of sulfur-containing imidazolium ionic liquids. *J. Mass Spectrom.*, *43*(1), 35–41.
6. Nakurte, I., Mekss, P., Zicmanis, A., Vavilina, G., Zhavoronkova, Z. (2008). Sorption of zwitterionic liquids 3-(3-alkyl-1-imidazolio)-propane sulfonates in reverse-phase high performance liquid chromatography. *Latv. J. Chem.*, *3*, 233–243.
7. Hemström, P., Irgum, K. (2006). Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, *29*(12), 1784–1821.
8. Bonhote, P., Dias, A., Papageorgiou, N., Kalyanasundaram, K., Grätzel, M. (1996). Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorg. Chem.*, *35*(5), 1168–1178.
9. Ruiz-Angel, J.M., Berthod, A. (2006). Reversed phase liquid chromatography of alkyl-imidazolium ionic liquids. *J. Chromat. A*, *1113*(1), 101–108.
10. Nawrocky, J. (1997). The silanol group and its role in liquid chromatography. *J. Chromat. A*, *779*(1–2), 29–71.
11. Kiel, S.J., Morgan, L.S. (1985). Effects of amine modifiers on retention and peak shapes in reversed phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromat. A*, *320*(2), 313–323.
12. Mamer, O., Lesimple, A. (2005). Protonated 1-methylimidazole decomposition by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, *19*(12), 1771–1774.

CVITERJONU ŠĶĪDRUMU HROMATOGRĀFIJA–MASSPEKTROMETRIJA

A. Podjava, P. Mekšs, A. Zicmanis

KOPSAVILKUMS

Veiktie hromatogrāfiskie pētījumi parāda, ka cviterjonu šķidrums (CJŠ) un tajos esošo galveno piemaisījumu atdalīšanai acetonitrilu saturošās kustīgās fāzes ir piemērotākas par eluentiem, kuros ir metanols. Lietojot eluenta gradientu, ir iespējams analīzi veikt ātrāk, kā arī uzlabojas hromatogrāfisko joslu forma. AEŠH apvienojumā ar masspektrometriju ļauj noteikt piemaisījumus CJŠ, kā arī noskaidrot to fragmentēšanās maršrūtus pat, ja šo piemaisījumu struktūra ir visai līdzīga. Galvenie jonu veidošanās ceļi ietver lādiņa inducēto disociāciju, ja sadursmju enerģija ir maza, un homolītisko alkilķēdes šķelšanos, ja sadursmju enerģija ir augsta. Augstas sadursmju enerģijas gadījumā novēro parādības, ko nosaka karbkatjonu īpašības gāzes fāzē; tās ietver secīgas cikla paplašināšanās stadijas, ko veicina ūdeņraža pārnese. Tomēr pilnīgai fragmentēšanās mehānismu noskaidrošanai nepieciešami jonu masu mērījumi ar augstu precizitāti vai eksperimenti ar izotopus saturošiem savienojumiem.



Positive and negative electrospray ionization-collision-induced dissociation of sulfur-containing zwitterionic liquids

Anton Podjava,* Peteris Mekss and Andris Zicmanis

Department of Chemistry, University of Latvia, Riga, Latvia. E-mail: antonpodjava@gmail.com

The mass spectrometric properties of several [1,2-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]-alkane-1-sulfonates (alkane=ethyl, propyl and butyl) are investigated in this study. These substances, named zwitterionic liquids (ZILs), were synthesized using classical transformations and analyzed in positive and negative electrospray ionization mode using collision-induced dissociation (0–50 eV). We have also performed regioselective deuterium labeling of the alkyl chain of 3-[1,2-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]-propane-1-sulfonates. Thus, the mass spectra of isotopically-labeled compounds were used for the confirmation of fragmentation pathways of ZILs. Briefly, the data obtained in this study show that the fragmentation of ZILs is dependent on the alkyl chain length between the imidazolium ring and the sulfonate group. In positive electrospray mode, the main fragments are the imidazolium ring containing even electron ions. On the other hand, in negative electrospray mode, sulfur-containing radical-anions are dominant.

Keywords: zwitterionic liquids, electrospray ionization, collision-induced dissociation, deuterium labeling

Introduction

Zwitterionic liquids (ZILs) are organic compounds which contain positively and negatively charged groups within one molecule. This type of compound is known to act as an excellent ion conductive matrix^{1,2} and finds applications as sorbents for high-performance liquid chromatography (HPLC).³ Some papers^{4–6} were devoted to the studies of gas-phase chemistry and fragmentation of ZILs in positive electrospray ionization (ESI+) mode. In addition, the fragmentation of some imidazolium-based ionic liquids containing different functional groups were investigated by sustained off-resonance irradiation-collision induced dissociation (SORI-CID) and accurate mass measuring.^{7,8}

In a previous paper,⁹ we described possible fragmentation pathways of 3-[1-alkyl-2-methyl-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]-propane-1-sulfonates in ESI+–CID. In this study, it was interesting to know the influence of the alkyl chain length

between the imidazolium ring and the sulfonate group on the fragmentation pathways of ZILs. Thus, we have prepared homologs **A**, **B** and **C** (Figure 1), which contain two, three and four carbon atoms between the imidazolium ring and the sulfonate group. These compounds were investigated under positive and negative ESI-CID conditions. Furthermore, deuterium-labeled analogs of 3-[1,2-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]-propane-1-sulfonate, which contain D atoms in positions 1 and 3 of the propane-1-sulfonate chain (compounds **B1** and **B2**, Figure 1.) were prepared to simplify the interpretation.

The results presented in this study complement mass spectrometric properties of sulfonates in ESI, since there are only a few examples⁹ describing the fragmentation of this type of compound.

Experimental

Materials

Acetonitrile (gradient grade for HPLC), 1,3-propanesultone, 1,4-butanedisultone, ethyl-3-chloropropionate, sodium borodeuteride, sodium sulfite and 1,2-dimethylimidazole were obtained from SIA Labochema Latvija (local distributor of Sigma-Aldrich products in Latvia, Riga, Latvia). Boron trifluoride diethyl etherate, 2-bromoethanesulfonic acid sodium salt, hydrobromic acid solution, sulfuric acid, iodine, red phosphorus, potassium iodide, toluene (analytical grade) and tetrahydrofuran (analytical grade) were obtained from reliable local distributors. Deionized water was prepared using Milli-Q technology. All the reagents were used as received, without further purification.

Syntheses

As can be seen from Figure 1, homologs **A** and **B** were prepared using known procedures.¹⁰ Compound **C** was prepared by the reaction of 1,2-dimethylimidazole with 2-bromoethanesulfonic acid sodium salt catalyzed by potassium iodide. Isotopically-labeled compounds **B1** and **B2** were synthesized by classical transformations using *in situ* generated diborane- d_3 as a source of D atoms. The purity of products was controlled by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and HPLC-MS. The complete description of every procedure, as well as GC-MS and HPLC-MS data, are available from the authors upon request.

Tandem mass spectrometric analyses

Mass spectrometric analyses were performed using a Waters Alliance 2690 Separation Module and a Waters Micromass Quattro API triple quadrupole mass spectrometer equipped with a Z-spray source.

Unlabeled compounds **A**, **B** and **C** were dissolved in acetonitrile/ H_2O 70:30 (v/v) and analyzed using direct syringe pump infusion at a flow rate of $10 \mu L \text{ min}^{-1}$. During the analyses in ESI+ and ESI- modes, capillary and cone voltages were set as shown in Table 1.

The source parameters were as follows: desolvation temperature was 250°C , source temperature was 120°C , desolvation gas flow was 250 L h^{-1} , extractor voltage was 3V and scan time was 0.2s. The fragmentation studies were performed under CID conditions with argon as the collision gas under the pressure of $3.3\text{--}3.8 \times 10^{-3} \text{ mbar}$ in a range of collision energies of 0–50 eV.

The purification of products obtained in the intermediate steps during the syntheses of compounds **B1** and **B2** have not been carried out, therefore labeled compounds were analyzed in HPLC-tandem mass spectrometry (MS/MS) mode. Both compounds were dissolved in acetonitrile/ H_2O 70:30 (v/v) and $1 \mu\text{L}$ of the solution was injected into an HPLC-MS system. HPLC separations were performed on an Atlantis HILIC Silica column ($2.1 \times 150 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$ particles) using the following conditions: mobile phase was acetonitrile/ H_2O 70:30 (v/v), flow rate was 0.2 mL min^{-1} and the analysis time was 6 min. The

capillary and cone voltages used for the analysis are given in Table 1. The desolvation temperature was 350°C , the desolvation gas flow was 250 L h^{-1} , cone gas flow was 50 L h^{-1} with the other parameters being the same as described for the unlabeled compounds. All mass spectrometric data was treated using MassLynx 4.1 software.

Results

Fragmentation of ZILs in ESI+ mode

As depicted in Figure 2, both the number of fragments obtained in ESI+ CID experiments as well as their relative abundances in the mass spectra were dependent on the alkyl chain length. The fragmentation schemes of compounds **A**, **B**, **C** and deuterated analogs **B1** and **B2** are shown in Figure 3.

The main fragment formed in the CID of compounds **B** and **C** in the range of energies studied remains the 1,2-dimethylimidazolium ion at m/z 97. In previous work,⁴ it has been shown that the formation of an ion at m/z 97 is consistent with the migration of a H^+ ion from the sulfonate group to the imidazolium ring. In the case of compound **A**, the main route of fragmentation is the formation of an ion at m/z 96, which is a radical-cation. It is believed that it forms via homolytic cleavage of the N–C bond. The difference in the CID behavior of compound **A** from the other analogs could possibly be explained by smaller degrees of freedom and vibrational

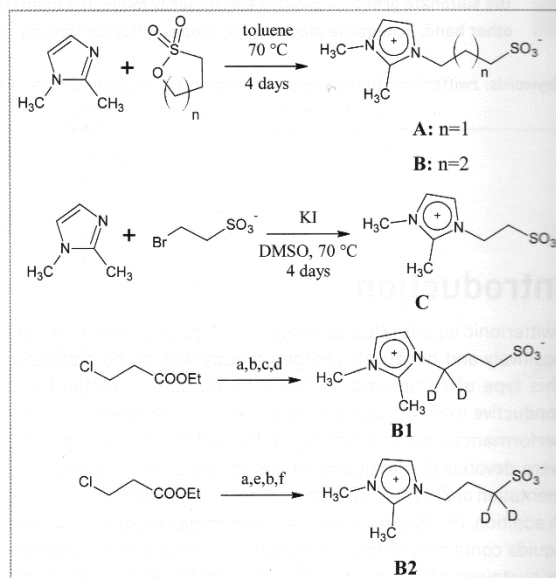


Figure 1. Synthetic schemes for compounds **A**, **B**, **C** and labeled analogs **B1** and **B2**, (a) $\text{NaBD}_4/\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{THF}/\Delta$, (b) $\text{Na}_2\text{SO}_3/\Delta$, (c) $\text{HBr}/\text{H}_2\text{SO}_4/100^\circ\text{C}/2\text{h}$, (d) 1,2-dimethylimidazole/toluene/ $70^\circ\text{C}/\text{four days}$, (e) P/I_2 and (f) 1,2-dimethylimidazole/DMF/ $70^\circ\text{C}/\text{four days}$.

Table 1. Capillary and cone voltages used for the analyses of compounds A, B and C in ESI+ and ESI- modes.

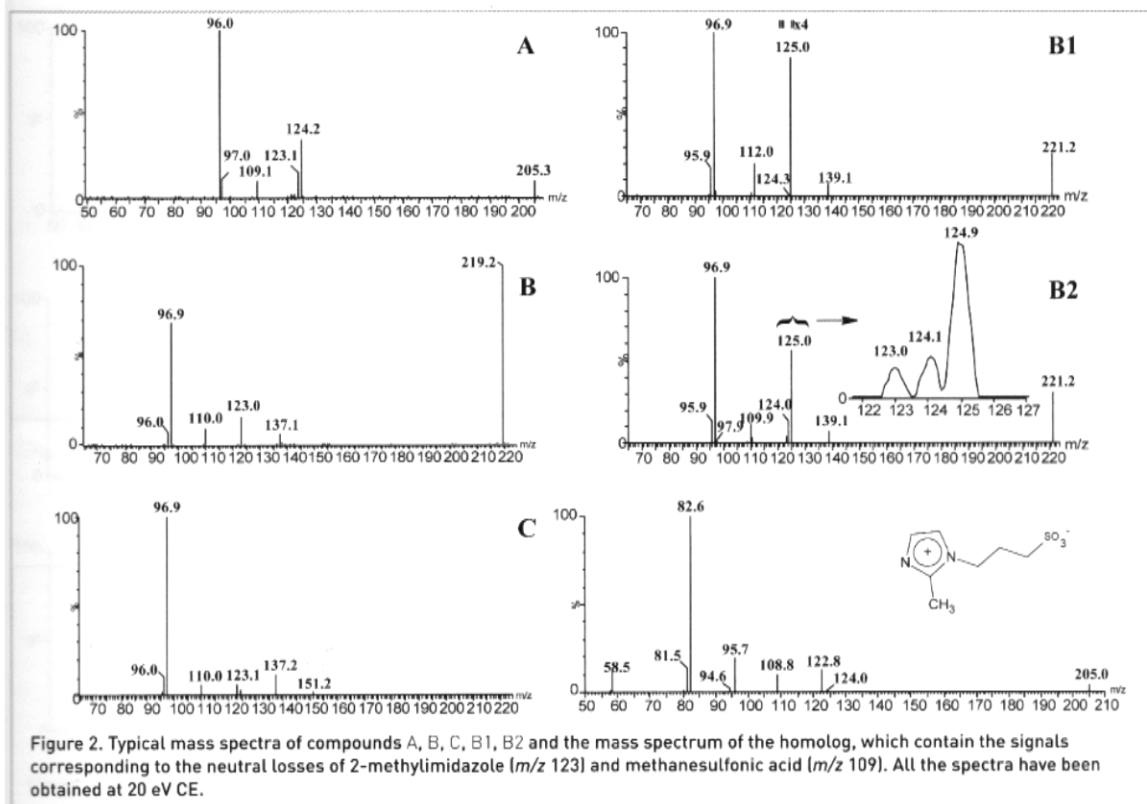
Compound	[M+H] ⁺		[M-H] ⁻	
	Capillary voltage (kV)	Cone voltage (V)	Capillary voltage (kV)	Cone voltage (V)
A	4.0	20	2.5	45
B, B1, B2	3.5	30	3.0	35
C	4.0	35	2.5	45

states, which lead to the lower energy threshold required for homolytic cleavages to occur.

The loss of 1,2-dimethylimidazole, which leads to the formation of ions at m/z 109, m/z 123 and m/z 137 is common for all analogs, **A**, **B** and **C**. However, possibilities exist for other competing processes, as have been proved by CID experiments with deuterated compounds **B2** and **B1**. Figure 2 shows, that the mass spectrum of compound **B2** contains signals at m/z 123, m/z 124 and m/z 125. In this case, the first signal is attributed to a possible loss of methanesulfonic acid, which could proceed either via a concerted mechanism or via stepwise homolytic cleavages of $\bullet\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ and $\text{H}\bullet$. The ion at m/z 124 is probably the product of the homolytic cleavage of the C–C bond and the ion at m/z 125 corresponds to the

neutral loss of 1,2-dimethylimidazole. It should be noted, that the mass spectrum of compound **B1** also contains a low intensity signal corresponding to the loss of methanesulfonic acid (m/z 124). The authors attribute this to the kinetic isotopic effect introduced by a D atom, which is believed to participate in the transition state required for the elimination of methanesulfonic acid via a concerted mechanism (Scheme 1).

It is important that the signal corresponding to the loss of methanesulfonic acid (see Figure 2) has been observed during the CID studies of the unlabeled homolog (chosen to eliminate the possibility of the formation of isobaric ions), which does not contain a methyl group at position 1 of the imidazolium ring. In this case, the signal at m/z 109 has a



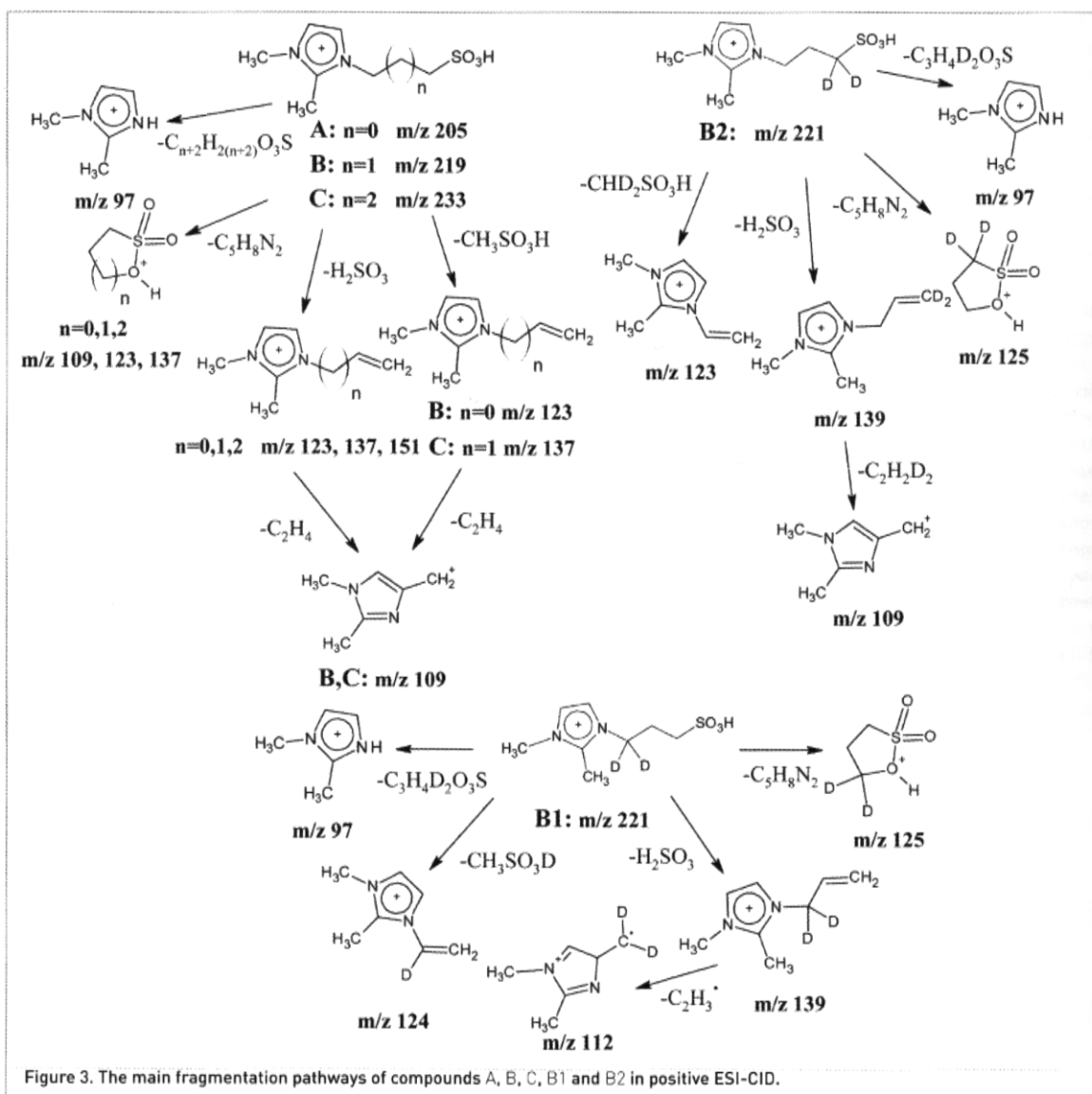
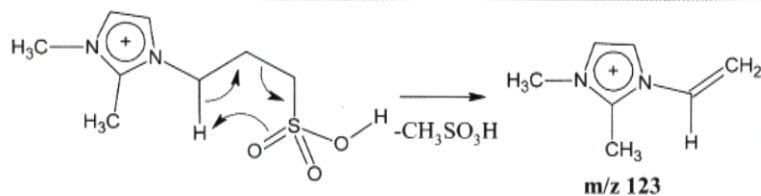


Figure 3. The main fragmentation pathways of compounds A, B, C, B1 and B2 in positive ESI-CID.



Scheme 1. Methanesulfonic acid loss proposed to occur during CID experiments of compounds B, B1, B2 and C (m/z 137 in this case).

much higher abundance than for the labelled homologs **B1** and **B2**. This supports the hypothesis that was mentioned above.

According to the experiments with labeled compounds **B1** and **B2**, the authors suppose that an identical process could occur in the case of compound **C** leading to the formation of an ion at m/z 137. Clearly, this process competes with a 1,2-dimethylimidazole loss, which leads to an ion with the same m/z ratio. Finally, there are no competitive processes observed for the formation of the ion at m/z 109 during the CID studies of compound **A**. Therefore, this ion corresponds to the loss of a 1,2-dimethylimidazole moiety.

Another fragmentation pathway in ESI⁺-CID, which is common for all compounds studied, is the loss of sulfurous acid. This leads to the formation of ions at m/z 123, m/z 137 and m/z 151 for compounds **A**, **B** and **C**, respectively. However, it was observed that the CID of compound **A** leads to the formation of ions at m/z 123 and m/z 124, with the latter being predominant. This latter ion is formed by the expulsion of an HSO_3^- species rather than an H_2SO_3 molecule. No such process was observed during the fragmentation of compounds **B** and **C**. The studies of the CID processes of labeled compounds **B1** and **B2** clearly show that the H atom in position 2 of the alkylsulfonate chain is removed during the loss of the H_2SO_3 molecule.

The mass spectra of investigated compounds containing the m/z values clearly indicate possible rearrangements. Such processes are involved in the formation of the ions at m/z 109 and m/z 110. Comparison of mass spectra of compounds **B** and **B1** shows that the ions at m/z 109, m/z 110 (**B**) and m/z 111 and m/z 112 (**B1**) contain a 1,2-dimethylimidazolium ring and the closest C atom of the alkyl chain. It was shown during in-source CID generation and subsequent fragmentation of the ion at m/z 137 from compound **B** and m/z 139 from compounds **B1** and **B2**, that the latter ions are the precursors of the ions at m/z 109, m/z 110 and m/z 111 and m/z 112. Moreover, the MS/MS spectrum of the ions at m/z 109, generated via in-source CID, show that these species contain 1,2-dimethylpyrimidinium moiety, rather than 1,2-dimethylimidazolium as was already mentioned in the literature.^{7,8}

Fragmentation of ZILs in ESI⁻ mode

Typical mass spectra of homologs **A**, **B**, **C** and labeled compounds **B1** and **B2**, as well as the fragmentation schemes obtained under negative ESI-CID conditions, are shown in Figure 4 and Figure 5. All the compounds studied form $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions but it is difficult to locate the H^+ , which is lost during the formation of negatively charged species. In this work, it is assumed that the H^+ ion has been removed from the

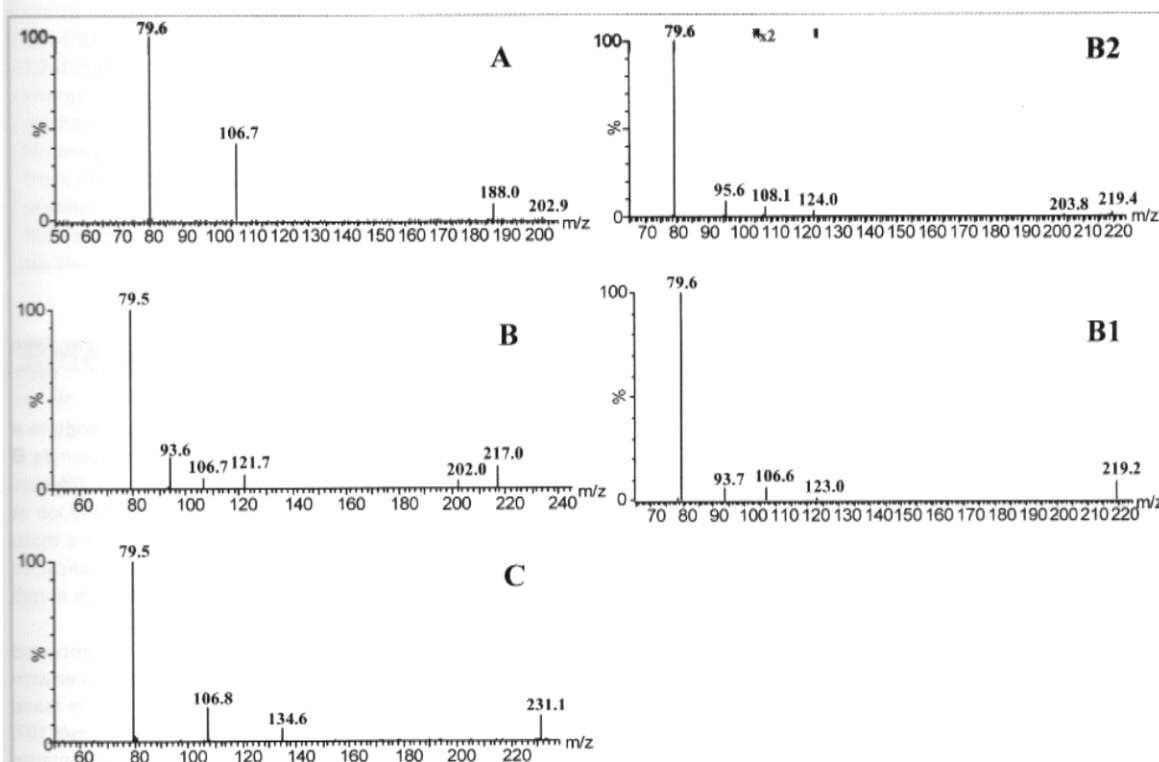


Figure 4. Typical mass spectra of compounds **A**, **B**, **C**, **B1** and **B2** obtained at 20 eV CE.

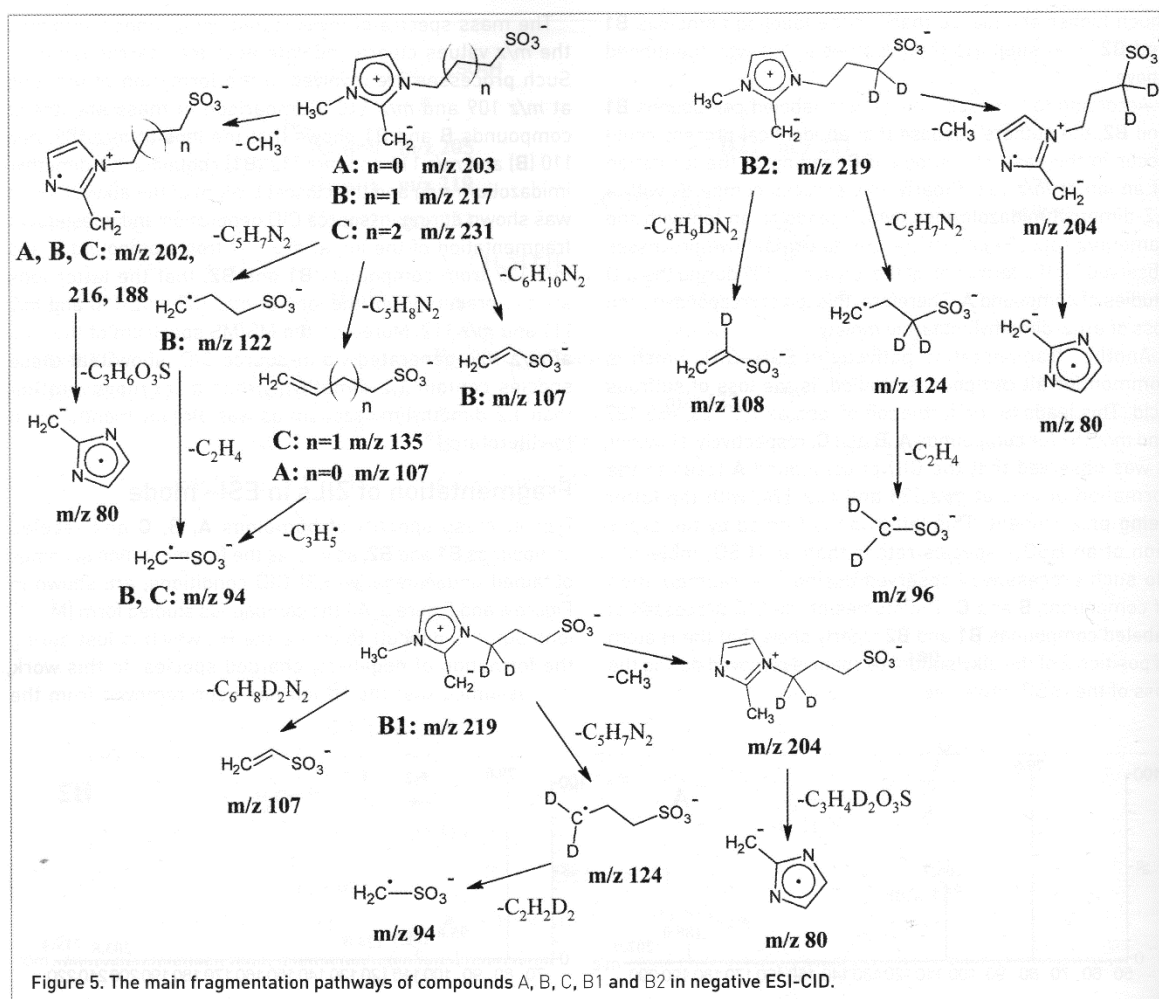


Figure 5. The main fragmentation pathways of compounds A, B, C, B1 and B2 in negative ESI-CID.

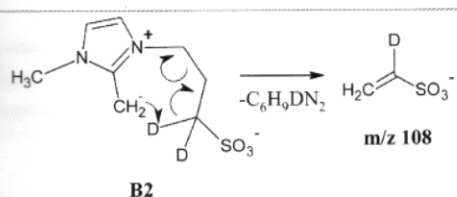
methyl group located at position 2 of the imidazolium ring due to the possibility of negative charge delocalization into the imidazolium ring. In contrast to the fragmentation of ZILs in ESI+ mode, there is an increased amount of odd-electron species in ESI- mode. The fragments at m/z 188, m/z 202 and m/z 216 appear after the homolytic cleavage of CH_3^\bullet from $[\text{M}-\text{H}]^-$ of compounds A, B, C, B1 and B2 [see Figure 5]. These fragments dissociate further leading to an ion at m/z 80, which is characteristic for all described ZILs.

The homolytic cleavage of the alkylsulfonate substituent is apparent only for compound B and its deuterated analogs B1 and B2. As a result, the ion at m/z 122 forms during this process. In addition, the mass spectra of compounds B, B1 and B2 show that homolytic cleavage of the propanesulfonate chain competes with the formation of even-electron ions at m/z 121 and m/z 123 (B1 and B2). On the other hand, the homolytic cleavage of the alkanesulfonate chain does not occur in the case of compounds A and C, showing some dependence on

the alkyl chain length between the imidazolium ring and the sulfonate group. Instead, compounds A and C form even-electron ions at m/z 107 and m/z 135.

The formation of an ion at m/z 94, which corresponds to a methanesulfonyl anion-radical is common for compounds B and C; however, the pathways leading to this ion are different. Thus, in the case of compound B, the precursor of the ion at m/z 94 is probably the ion at m/z 122, which can lose a molecule of ethylene and form a methanesulfonyl anion-radical. In contrast, the ion at m/z 135 is the precursor for the ion at m/z 94 in the case of compound C.

The formation of an ion at m/z 107, in the case of compound B, suggests that the loss of the imidazolium ring together with one of the C-atoms of the alkyl chain should occur. The mass spectrum of labeled compound B1 has a signal at m/z 107, while the mass spectrum of labeled compound B2 contains a signal at m/z 108. This indicates that one of the deuterium atoms is lost from CD_2 during the fragmentation process.



Scheme 2. Intramolecular elimination process leading to the formation of the ion at m/z 108 from $[B2-H]^-$

Therefore, the ion at m/z 107 forms during the charge-induced intramolecular elimination process initiated by the transfer of H (D) to the methyl substituent of the 1,2-dimethylimidazolium ring, as depicted in Scheme 2. Further investigation of the transition states of the processes shown in this scheme are necessary; therefore the computational studies are ongoing in our laboratory.

Conclusions

This study showed that [1,2-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]-alkane-1-sulfonates, with variable numbers of C-atoms between the 1,2-dimethylimidazolium ring and the sulfonate group, could be fragmented in both positive and negative ESI-CID. The majority of ions formed in positive ESI-CID are 1,2-dimethylimidazolium-based even electron ions. Generally, charge remote fragmentations such as loss of sulfurous or methanesulfonic acid occur under positive ESI-CID conditions. In contrast, the ions produced in negative ESI-CID are derived from the alkyl chain containing the sulfonate group, which stabilize the negative charge. In addition, anion-radical formation is common for the [1,2-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]-alkanesulfonates under negative ESI-CID conditions.

References

1. M. Yoshizawa, M. Hirao, K. Ito-Akita and H. Ohno, "Ion conduction in zwitterionic-type molten salts and their polymers", *J. Mater. Chem.* **11**, 1057 (2001). doi: 10.1039/B1010790
2. H. Olivier-Bourbigou and L. Magna, "Ionic liquids: perspectives for organic and catalytic reactions", *J. Mol. Cat. A: Chem.* **182/183**, 419 (2002). doi: 10.1016/S1381-1169(01)00465-4
3. H. Qiu, Q. Jiang, Z. Wei, X. Wang, X. Liu and S. Jiang, "Preparation and evaluation of a silica-based 1-alkyl-3-(propyl-3-sulfonate) imidazolium zwitterionic stationary phase for high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A.* **1163**, 63 (2007). doi: 10.1016/j.chroma.2007.06.001
4. I. Nakurte, P. Mekss, K. Klavins, A. Zicmanis, G. Vavilina and S. Dubrovina, "Collision-induced dissociation of imidazolium-based zwitterionic liquids", *Eur. J. Mass Spectrom.* **15**, 471 (2009). doi: 10.1255/ejms.997
5. A. Podjava, P. Mekšs and A. Zicmanis, "Liquid chromatography – mass spectrometry of zwitterionic liquids", *Latv. J. Chem.* **1**, 102 (2010). doi: 10.2478/v10161-010-0003-y
6. A. Lesimple, O. Mamer, W. Miao and T. Chan, "Electrospray mass spectral fragmentation study of N,N' -disubstituted imidazolium ionic liquids", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 85 (2006). doi: 10.1016/j.jasms.2005.09.002
7. A. Lesimple, X. He, T. Chan and O. Mamer, "Collision-induced dissociation of sulfur-containing imidazolium ionic liquids", *J. Mass Spectrom.* **43**, 35 (2008). doi: 10.1002/jms.1264
8. X. Cao, Y. Yu and W. Mo, "Solvation in gas-phase reactions of sulfonic group containing ionic liquids in electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry", *Eur. J. Mass Spectrom.* **15**, 409, (2009). doi: 10.1255/ejms.985
9. K. Levsen, H. Schiebel, J. Terlouw, K. Jobst, M. Elend, A. Preiß, H. Thiele and A. Ingendoh, "Even-electron ions: a systematic study of the neutral species lost in the dissociation of quasi-molecular ions", *J. Mass Spectrom.* **42**, 1024 (2007). doi: 10.1002/jms.1234
10. P. Bonhote and A. Dias, "Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts", *Inorg. Chem.* **35**, 1168 (1996). doi: 10.1021/ic951325x

CHEMICAL PROPERTIES OF ZWITTERIONIC IMIDAZOLIUM ALKANECARBOXYLATES STUDIED IN GAS-PHASE BY ELECTROSPRAY IONIZATION – COLLISION-INDUCED DISSOCIATION

A. Podjava, P. Mekss, A. Zicmanis, S. Krasnov

Department of Chemistry, University of Latvia, Krišjāņa Valdemāra 48, Riga, Latvia
e-mail: antonpodjava@gmail.com

Gas-phase chemical properties of several (1-methylimidazol-3-yl)-alkane-1-carboxylates (alkane = ethane, propane and butane) have been investigated in this study. These substances are synthesized using classical transformations and analyzed in positive ionization mode using collision-induced dissociation (0–50 eV). The experiments were carried out in both deuterated and undeuterated solvent media. The data obtained in this study show, that carboxylate group weakly influences fragmentation of zwitterionic imidazolium carboxylates in positive electrospray mode. On the other hand, the studied compounds exert a tendency to form various adducts with sodium and potassium ions and to participate in hydrogen/deuterium exchange in the gas phase.

Key words: *zwitterionic imidazolium alkanecarboxylates, adduct formation, collision-induced dissociation, hydrogen/deuterium exchange, gas phase chemistry.*

INTRODUCTION

Electrospray ionization in tandem with the collision-induced dissociation (ESI-CID) has become powerful and efficient mass spectrometry technique for qualitative and quantitative analysis of various classes of compound. The structural elucidation of unknown species in mass spectrometry is commonly based mainly on understanding of gas-phase chemistry of a given molecule. Thus, it is vital to study the fragmentation processes of new compound classes emphasizing the main routes and features.

Since the development of imidazolium sulfonates of the zwitterionic type [1] and their application in different areas [2–4], some papers have appeared which describe gas-phase chemistry of such compounds under ESI-CID conditions. For example, fragmentation pathways of several N-substituted imidazolium alkanesulfonates and cluster formation in the gas phase are described [5]. In our previous paper, we have investigated chromatographic behavior of some N-substituted imidazolium alkanesulfonates containing longer aliphatic chain in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) mode as well as their fragmentation pathways under ESI-CID conditions [6]. Other researchers have shown that the fragments of similar compounds containing a counter ion tend to form adducts with solvent molecules in ESI-CID conditions, when analyzed by ion trap mass spectrometer [7]. Finally, cluster formation during electrospray

mass spectrometric analysis of novel Brønsted acidic ionic liquids composed of imidazolium alkanesulfonate cation and alkanedisulfonate anion was recently described [8].

In the recent paper, we have demonstrated some deuterium-labeled analogues and we have performed CID experiments in both positive and negative ESI mode in order to study the influence of the length of alkyl chain between imidazolium ring and sulfonate group on the fragmentation [9]. We have concluded that the length of the spacer has influenced fragmentation strongly in positive as well as in negative ESI. In contrast, during this study we have decided to prepare some zwitterionic compounds (see Fig. 1) containing carboxylate functional group in order to describe the influence of the negative charge carrier group on the fragmentation process. The synthesis, electrochemical and some other applications of different carboxylates of zwitterionic type have been described elsewhere [10–12 and references cited therein]. However, we were unable to find papers describing gas-phase chemistry of this type of compounds. Therefore, we present here the fragmentation pathways and cluster formation studies of zwitterionic imidazolium alkanecarboxylates, which have been carried out in both deuterated and undeuterated media under ESI-CID conditions.

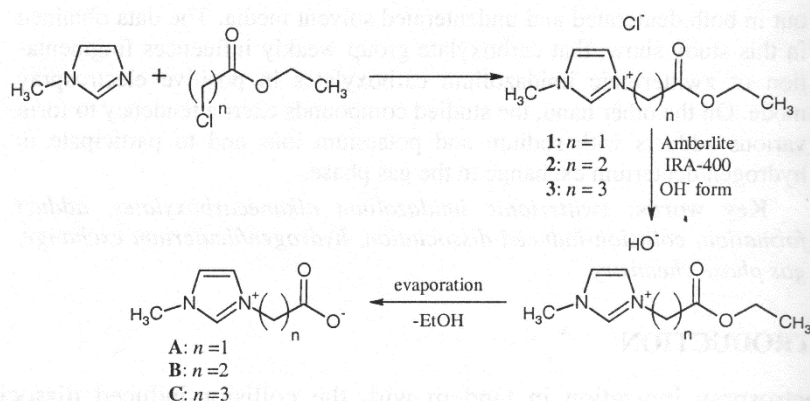


Fig. 1. Synthetic route to compounds A, B and C.

RESULTS AND DISCUSSION

Adduct formation in positive ESI mode

Compounds A, B and C have negatively charged carboxylate group within their structure, therefore the formation of adducts with alkali metal ions and charged oligomers is possible. As depicted in Fig. 2a, dimeric species with a composition of $[2\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 309) are predominantly formed from the acidified methanol/water solution of compound B with a minor amount of adduct $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ions (m/z 331). The former species presumably are formed by hydrogen bonding after evaporation of solvent during droplet fission process, but the latter species could form by a charge attraction and complexation in solution and then transferred into gas phase. Some other adducts can also be observed, which contain Na^+ and K^+ ions incorporated in their structures (Fig. 2a). These ions are common contaminants of HPLC grade solvents and glassware used in mass spectrometry. The same spectra were obtained during analysis of compounds A and C. Similar adducts were also found in case of zwitterionic imidazolium alkanesulfonates [5]. We have found that despite the

noncovalent nature, adducts containing Na^+ are rather stable in the gas phase. This can be concluded from the experiments with cone and extractor voltages, varied in a range of 30–150 V and 2–50 V, respectively, to promote an in-source CID. The results show that the $[\text{M}+\text{Na}]^+$ adduct is the most stable for the all compounds studied. The adduct is hardly decomposed even at 150 V cone voltage and 50 V extractor voltage. Heavier species (sodiated and protonated dimers and trimers) had minor stability, which decreased with increasing m/z value of an ion.

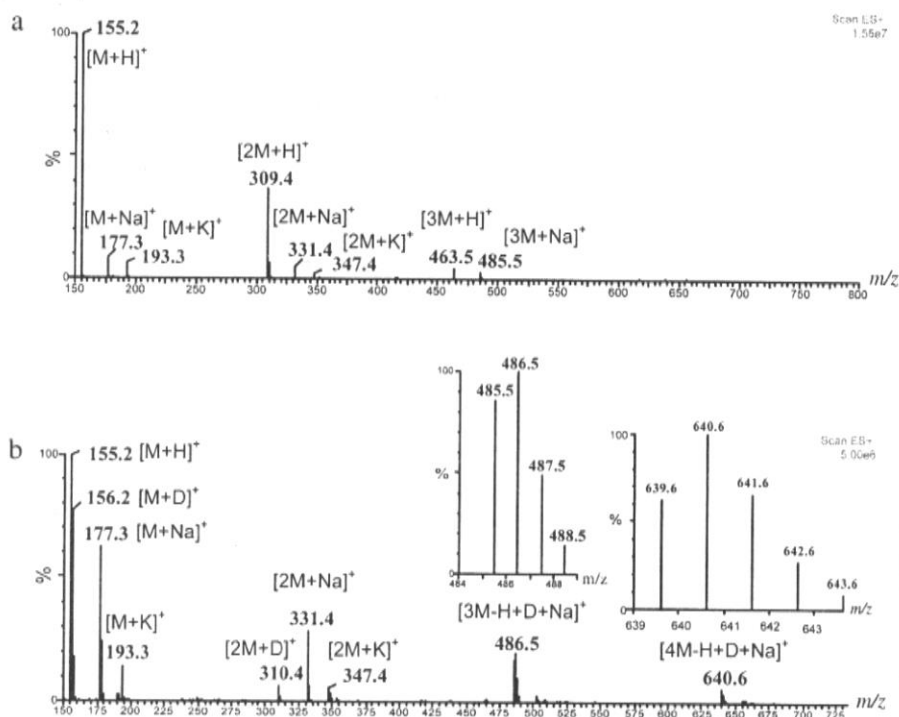


Fig. 2. Mass spectra obtained for compound **B** in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (a) and $\text{MeOH}/\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOD}$ (b) solutions at 40 V (cone voltage) and 10 V (extractor voltage) during direct infusion at 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ flow rate (see experimental for other conditions). Isotopic compositions for trimeric and tetrameric adducts with Na^+ ions are shown in the inserts.

Cluster formation studies in deuterated media (methanol/ $\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOD}$) revealed some interesting features. As can be seen from Fig. 2b, the gas-phase chemistry of compound **B** differs completely in deuterated media. Firstly, the series of heavier adducts with sodium with a composition of $[\text{nM}+\text{Na}]^+$ ($n = 1, 2, 3, 4$) appear in the spectra under these conditions (m/z 331, 485, 639). Similar spectra were observed for compounds **A** and **C**. Secondly, experiments with different cone and extractor voltages (the same range as for non-deuterated media) have shown that hydrogen/deuterium exchange could occur between one of the compounds **A**, **B** or **C** and the solvent system. This is evident from an isotopic composition of either of clusters, where relative intensities of $\text{M}+1$ and $\text{M}+2$ spectral lines are abnormally high for these m/z values and even dominate in heavier adducts (Fig. 2b, insert). This could mean that one of the hydrogen atoms in the zwitterionic carboxylate compound could be exchanged by the deuterium atom from the solvent, so that one, two or three D atoms are incorporated in the structure of a cluster. The location of the H/D exchange could be an imidazolium ring, however this phenomenon has not been studied

yet. At the moment, it is clear that gas phase transformations of zwitterionic imidazolium carboxylates can be driven by choosing solvent composition and focusing voltages.

Fragmentation of zwitterionic imidazolium carboxylates in positive ESI mode

Typical mass spectra of compounds **A**, **B** and **C** obtained under CID conditions are shown in Fig. 3, and the corresponding fragmentation schemes are shown in Fig. 4. The base peak in the CID spectrum of the compound **A** appears at m/z 95. Our previous work [9] and other studies on several imidazolium derivatives [13, 14, 15], have shown that the formation of this type of ions follows the pathway of imidazolium ring expansion to pyrimidinium ring.

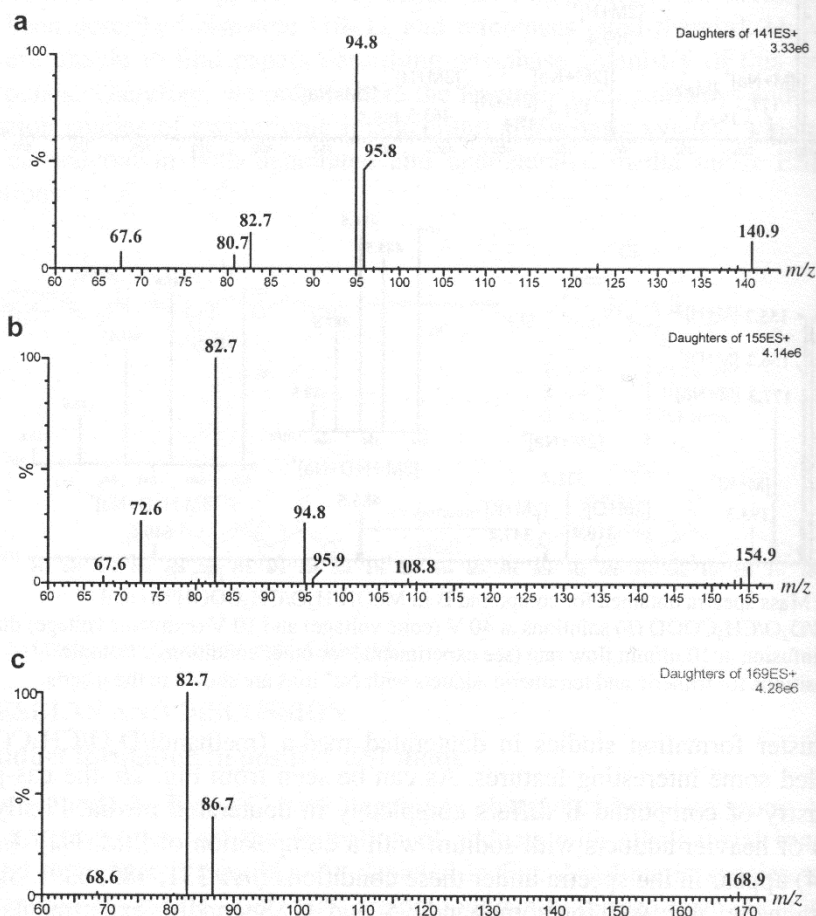


Fig. 3. Typical mass spectra of compounds **A**, **B** and **C** obtained at 30 eV collision energy.

In addition, the similar process could lead to the formation of an ion at m/z 96 except that in this case the imidazolium ring expansion occurs via the radical pathway. Both these processes take place in case of compounds **B** and **C**, but only at higher collision energies (40–50 eV). In contrast to compound **A**, the main fragment ion of **B** and **C** appears at m/z 83, which is also common for the majority of zwitterionic imidazolium sulfonates studied [5, 6, 9]. This ion has the structure of protonated 1-methylimidazole formed by charge-induced fragmentation. The higher length of the carbon chain in compounds **B** and **C** also

permits another route leading to the formation of ions at m/z 73 and 87. These ions are believed to be formed by the heterolytic N–C bond cleavage, loss of 1-methylimidazole molecule and the formation of the protonated lactone ring. This is another process common for zwitterionic imidazolium sulfonates and carboxylates. As shown in the previous paper [9], methanesulfonic acid loss is specific for imidazolium zwitterionic sulfonates. In case of compound **B**, ion, formed by such pathway, should interfere with the ion at m/z 95 (which forms by another route), additionally similar ion at m/z 109 is absent in the mass spectrum of **C**. Thus, we can conclude that the loss of acetic acid is not characteristic of zwitterionic imidazolium carboxylates and other processes are more advantageous in terms of energy. The difference between imidazolium carboxylates and imidazolium sulfonates in terms of losses of methanesulfonic and acetic acids could be explained by the geometry of the corresponding transition states. Since we believe that the loss occurs in an intramolecular fashion, the lengths and angles of the all involved bonds are critical in the transition state. The single carbon–sulfur bond is known to be longer than the single carbon–carbon bond. As a result, the imidazolium sulfonate can obtain more favorite conformation to complete the loss. However, this factor could be studied by the quantum mechanical methods.

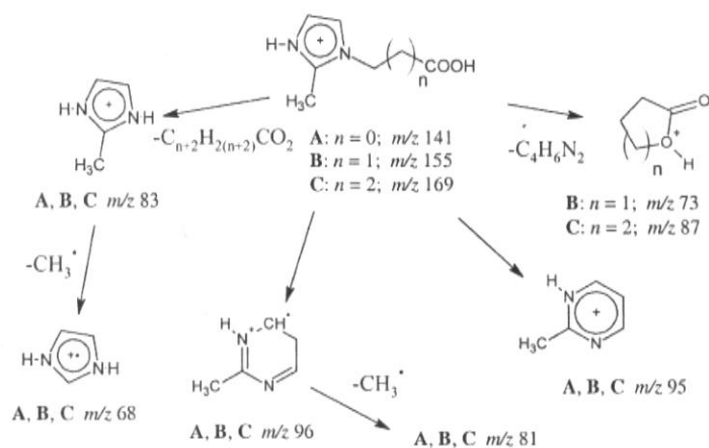


Fig. 4. The main fragmentation pathways of compounds **A**, **B** and **C**, in positive ESI-CID.

Some minor ions (m/z 68 and m/z 81) are common for all three homologs and they are generated in the collision cell as second generation daughter ions of m/z 83 and m/z 96 by the homolytic cleavage of methyl radical at 30–50 eV collision energies. In general, fragmentation of zwitterionic imidazolium carboxylates in positive ESI mode is dependent on the length of carbon chain between imidazolium ring and carboxylate group. The fragments generated by CID in the most cases are similar to the fragments obtained from zwitterionic imidazolium sulfonates, which means that the functional group has only a weak influence on the fragmentation.

EXPERIMENTAL

Materials

Acetonitrile and methanol (both HPLC grade) were obtained from Merck, ethyl-2-chloroethanoate (99% purity), ethyl-3-chloropropionate (98% purity), ethyl-4-chlorobutanoate (98% purity), 1-methylimidazole (>99% purity),

deuterium oxide (99,9 atom % D), (O-²H)-acetic (99 atom % D) acid and Amberlite IRA-400 anion-exchange resin (chloride form) were obtained from *Sigma-Aldrich* and utilized without further purification. Deionized water was prepared using *Milli-Q* technology.

Syntheses

1-Methylimidazolium alkanecarboxylates **A**, **B** and **C** (see Fig. 1) were prepared in a small scale using described procedures [11] with slight modifications. The purity of products was controlled by means of high-performance liquid chromatography – mass spectrometry (HPLC-MS) and HPLC with ultraviolet (UV) detection. The representative synthetic procedure for 2-(1-methylimidazolio)-ethane-1-carboxylate is as follows (procedures for compounds **B** and **C** are similar in all aspects except that the reaction temperature is 80 °C). The 4 ml vial was charged with 1-methylimidazole (180 µl) followed by 1,1 eq (180 µl) of ethyl-2-chloroethanoate. A small magnet was placed into the vial, then the vial was closed and stirring was performed at ambient temperature. After 48 hours, 2-(1-methylimidazolio)-ethane-1-carboxylic acid ethyl ester chloride (see Fig. 1, **1**) precipitated as a colorless glassy mass. A small aliquot of this material was analyzed by HPLC-UV/MS, which showed 98% purity of compound **1**. The conversion of an intermediate **1** to the corresponding zwitterionic imidazolium carboxylate **A** was then performed as follows. The intermediate **1** was dissolved in methanol and the solution was percolated through Amberlite IRA-400 anion-exchange resin (2 g) previously converted to hydroxide form. The eluate was evaporated to dryness using a rotary evaporator resulting to a pure solid substance **A** (m/z 141, $[M+H]^+$ and m/z 163, $[M+Na]^+$). Substances **B** and **C** obtained as viscous liquids by similar procedure contained color impurities, which were removed by passing methanol/water solution of **B** or **C** through a Pasteur pipette filled with an activated carbon. The HPLC-UV/MS analyses of both compounds **B** (m/z 155, $[M+H]^+$ and m/z 177, $[M+Na]^+$) and **C** (m/z 169, $[M+H]^+$ and m/z 191 $[M+Na]^+$) have shown >95% purity.

Purity estimation and tandem mass spectrometric analyses

Mass spectrometric and HPLC-UV analyses were performed using *Waters Alliance 2690* Separation Module with *Waters 991* photodiode array detector and *Waters Micromass Quattro API* triple quadrupole mass spectrometer equipped with Z-spray source.

For purity assessment, intermediates **1–3** were dissolved in water and analyzed under HPLC-UV/MS conditions using the reversed-phase chromatographic column (*Waters X-Terra MS*, 2.1×150 mm, 3.5 µm) at flow rate of 0.2 ml/min in the positive electrospray mode and UV detection at 210–400 nm. The mobile phase was composed by 5% methanol in 0.1% solution of acetic acid in water. The purity of compounds **A**, **B** and **C** was monitored in a similar manner using weak cation-exchange/reverse phase column (*Grace Alltima C18u*, 4.6×250 mm, 5 µm) at a flow rate of 1 ml/min and post-column split ratio 1:5 (0.2 ml/min flow rate was allowed to enter the ion source).

For fragmentation studies, compounds **A**, **B** and **C** were dissolved in methanol/0.1% acetic acid in water 80:20 (v/v) and analyzed using direct

syringe pump infusion at flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. During fragmentation studies in ESI+ mode, capillary and cone voltages were set as shown in Table 1.

Table 1. Capillary and cone voltages used for the fragmentation studies of compounds A, B and C in positive ESI mode

Compound	Capillary voltage, kV	Cone voltage, V	Capillary voltage, kV	Cone voltage, V
A	4,0	20	2,5	45
B	3,5	30	3,0	35
C	4,0	35	2,5	45

For cluster formation studies, compounds A, B and C were dissolved in methanol/0.1% ($\text{O}-^2\text{H}$)-acetic acid solution in deuterium oxide 80:20 (v/v). Such parameters as cone voltage and extractor voltage were optimized during the analyses.

The source parameters were as follows: desolvation temperature 250 $^{\circ}\text{C}$, source temperature 120 $^{\circ}\text{C}$, desolvation gas flow 250 l/h and scan time 0.5 s. The fragmentation studies were performed under CID conditions with argon as collision gas under the pressure of $3.3\text{--}3.8\times 10^{-3}$ mbar in a range of collision energies of 0–50 eV. All mass spectrometric data were treated using *MassLynx 4.1* software.

CONCLUSIONS

CID experiments have shown that the fragmentation of zwitterionic imidazolium carboxylates in the positive ion mode is very similar to the fragmentation of the corresponding sulfonates studied earlier. This means that the influence of functional group on the fragmentation of zwitterionic imidazolium compounds in the positive ion mode is insignificant. This study has also shown that zwitterionic imidazolium carboxylates form adducts of different composition with the sodium and potassium ions and can participate in the hydrogen/deuterium exchange in the gas phase with solvent molecules. These processes can be controlled by the selection of appropriate focusing voltages.

REFERENCES

1. Bonhote, P., Dias, A. (1996). Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorg. Chem.*, 35, 1168–1178.
2. Yoshizawa, M., Hirao, M., Ito-Akita, K., Ohno, H. (2001). Ion conduction in zwitterionic-type molten salts and their polymers. *J. Mater. Chem.*, 11, 1057–1062.
3. Qiu, H., Jiang, Q., Wei, Z., Wang, X., Liu, X., Jiang, S. (2007). Preparation and evaluation of a silica-based 1-alkyl-3-(propyl-3-sulfonate) imidazolium zwitterionic stationary phase for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1163, 63–69.
4. Kundu, D., Bagdi, A., Majee, A., Haira, A. (2011). Zwitterionic-type molten salt: a mild and efficient organocatalyst for the synthesis of 3-aminoalkylated indoles via three-component coupling reaction. *Synlett*, 8, 1165–1167.
5. Nakurte, I., Mekss, P., Klavins, K., Zicmanis, A., Vavilina, G., Dubrovina, S. (2009). Collision-induced dissociation of imidazolium-based zwitterionic liquids. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 15, 471–478.

6. Podjava, A., Mekšs, P., Zicmanis, A. (2010). Liquid chromatography – mass spectrometry of zwitterionic liquids. *Latv. J. Chem.*, 1, 102–113.
7. Cao, X., Yu, Y., Mo, W. (2009). Solvation in gas-phase reactions of sulfonic group containing ionic liquids in electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 15, 409–413.
8. Li, J., Wei, W., Nye, L., Schulz, P., Wasserscheid, P., Ivanović-Burmazović, I., Drewello, T. (2012). Zwitterionic clusters with dianion core produced by electrospray ionisation of Brønsted acidic ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14, 5115–5121.
9. Podjava, A., Mekss, P., Zicmanis, A. (2011). Positive and negative electrospray ionization – collision-induced dissociation of sulphur-containing zwitterionic liquids. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 17, 377–383.
10. Yoshizawa, M., Narita, A., Ohno, H. (2004). Design of ionic liquids for electrochemical applications. *Austral. J. Chem.*, 57, 139–144.
11. Dega-Szafran, Z., Przybylak, R. (1997). Synthesis, IR and NMR studies of zwitterionic ω -(1-pyrrolidine)alkanocarboxylic acids and their N-methyl derivatives. *J. Mol. Struct.*, 436–437, 107–121.
12. Nockemann, P., Thijs, B., Parac-Vogt, T., Hecke, K., Meervelt, L., Tinant, B., Hartenbach, I., Schield, T., Ngan, V., Nguyen, M., Binnemans, K. (2008). Carboxyl-functionalized task-specific ionic liquids for solubilizing metal oxides. *Inorg. Chem.*, 47, 9987–9999.
13. Lesimple, A., He, X., Chan, T., Mamer, O. (2008). Collision-induced dissociation of sulfur-containing imidazolium ionic liquids. *J. Mass Spectrom.*, 43, 35–41.
14. Lesimple, A., Mamer, O., Miao, W., Chan, T. (2006). Electrospray mass spectral fragmentation study of N,N'-disubstituted imidazolium ionic liquids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 17, 85–95.
15. Thuijl, J., Klebe, K., Houde, J. (1973). Fragmentation behavior and ring expansion of 1-methylimidazole and 1-methylpyrazole upon electron-impact. *Org. Mass Spectrom.*, 7, 1165–1172.

**CVITERJONU TIPĀ IMIDAZOLIJA ALKĀNKARBOKSILĀTU
ĶĪMISKĀS ĪPAŠĪBAS GĀZES FĀZĒ,
KĀS PĒTĪTAS AR ELEKTROIZSMIDZINĀŠANAS JONIZĀCIJU –
SADURSMJU INDUCĒTO DISOCIĀCIJU**

A. Podjava, P. Mekšs, A. Zicmanis, S. Krasnovs

K O P S A V I L K U M S

Izpētītas dažu (1-metil-3-N-imidazolija)-alkān-1-karboksilātu (alkān = etān, propān, butān-) ķīmiskās īpašības gāzes fāzē. Šīs vielas sintezētas, izmantojot klasiskās metodes, un analizētas pozitīvās elektroizsmidzināšanas jonizācijas – sadursmju inducētās disociācijas apstākļos (0–50 eV). Eksperimenti veikti gan deiterētā, gan nedeiterētā šķīdinātāja vidē. Iegūtie dati rāda, ka karboksilgrupa maz ietekmē cviterjonu tipa imidazolija karboksilātu fragmentāciju pozitīvo jonu skenējumā. No otras puses, šiem savienojumiem ir tendence veidot vairākus aduktus ar nātrija un kālija joniem un piedalīties ūdeņraža/deitērija apmaiņas procesos gāzes fāzē.

Iesniegts 28.08.2012



Electrospray ionization mass spectrometry of non-covalent complexes formed between *N*-alkylimidazolium-containing zwitterionic sulfonates and protonated bases

Anton Podjava,^a Svjatoslav Kistkin,^b Elina Ausekle,^a Elina Priede,^a Peteris Mekss^a and Andris Zicmanis^a

^aDepartment of Chemistry, University of Latvia, Riga, Latvia. antonpodjava@gmail.com

^bDepartment of Medicine, University of Latvia, Riga, Latvia

This paper describes non-covalent complexes between zwitterionic 3-[1-alkyl-3*N*-imidazolio]-propane-1-sulfonates and different amines. Electrospray ionization (ESI) mass spectrometry and collision-induced dissociation were used to measure the stability of such complexes in solution and in the gas phase. Generally, zwitterionic sulfonates formed more abundant complexes with protonated 5-methylcytosine (5-MCH) than with aliphatic amines. The results show that the association constants and half-dissociation threshold energies of these complexes nonlinearly depend on the alkyl chain length of the zwitterion. It is shown that the complexes with the lowest stability exist in acetonitrile solution or in the gas phase. The factors responsible for this complicated behavior are discussed. The structure of the complexes was investigated by quantum chemical calculations using molecular mechanics and density functional theory. Hydrogen bonding is proposed as the main type of interaction responsible for the stability of ion-zwitterion complexes. In summary, the information obtained in this study could be used for the development of the new derivatization reagents for some compounds containing amidinium groups, like 5-MCH, to increase selectivity of ESI-based methods.

Keywords: ion-zwitterion interactions, association constants, collision-induced dissociation, electrospray ionization, quantum chemical calculations, 5-methylcytosine

Introduction

The process of electrospray ionization (ESI) was first realized by the Dole group in 1968¹ and further developed by the Fenn group in 1980s² to demonstrate the ability of ESI to act as an effective ion-production method for mass spectrometry (MS). ESI-MS has gained an enormous popularity in different areas, i.e. proteomics and biochemistry,³ in the past few decades. The non-destructive nature of the ESI process ensures that a variety of non-covalent complexes originating from solution can be transferred into a gas phase and subsequently studied by MS.⁴ Most common examples of such non-covalent complexes include the specific association of biological

macromolecules to different ligand,⁵ studied by ESI-MS due to their biochemical significance.⁶ Attention has also been paid to small-molecule association in solution. Numerous papers have described the formation of complexes of different macrocycles (crown ethers, cryptands, glymes),⁷ cyclodextrins,⁸ calixarene,⁹ aminoacids¹⁰ and guanidinium ions¹¹ with various guests.

To our knowledge the association of zwitterions with cations derived from organic bases has been rarely studied. Two examples can be mentioned in this respect. The first one is a theoretical study of the association between betaine and

ammonium ion in the gas phase,¹² while the second is an experimental study of the dissociation kinetics of betaine-organic base complexes.¹³ These examples suggest that other zwitterions containing different structural features should interact with protonated bases (at least in the gas phase). We show in this paper that solutions containing previously known^{14,15} zwitterionic sulfonates and some organic bases, like the DNA methylation product 5-methylcytosine^{16,17} or aliphatic amines, form non-covalently bonded complexes under ESI-MS conditions. The formation of these complexes is an interesting point because it could be used for the development of a new simple derivatization procedure for several low molecular weight amines or amidines to improve the selectivity of ESI-MS analyses. However, neither derivatization protocol could be developed if the reaction product (the complex) was unstable under the selected conditions. Thus, the stability of such complexes should be evaluated. The present paper describes the initial part of our group's research on the development of a fast ESI-MS screening method of DNA methylation. The aim is to understand the influence of the alkyl chain and functional group of the zwitterion on the stability of the complexes of 5-methylcytosine and the zwitterions in solution and in the gas phase.

In order to describe the stability in solution, the association constant K_a has to be determined. MS and other methods^{5,18} can be used for this purpose. Several ESI-based approaches are of special interest, because they account for the different ability of the complex and its parts to be transferred from solution to the gas phase¹⁹⁻²¹ leading to the more precise K_a values. The role of the solvent itself cannot be ignored because sometimes it completely masks some interactions preventing the formation of the complex. Comparing the K_a values obtained in different solvents could give important information for the right choice of a medium for the derivatization procedure. Therefore, the K_a values determined in methanol and acetonitrile will be given in this paper.

In contrast to solution, gas-phase stability is not influenced by the solvent type. It has often been described by collision-

induced dissociation (CID) and subsequent determination of half-dissociation threshold energies^{22,23} ($E_{1/2}$). The plots of these energies vs. alkyl chain length could be compared to the plots of K_a vs. alkyl chain length. As a result, an important question concerning the change of stability upon transfer from solution to gas phase²⁴ could be answered. Finally, quantum chemical calculations provide insights into the gas-phase structure of the complexes, i.e. the location of the proton with respect to the amino and sulfonate group in the ground state of the complex.

Experimental

Materials

Acetonitrile (HPLC/MS grade), methanol (HPLC/MS grade), water (HPLC/MS grade), formic acid (HPLC/MS grade), 5-methylcytosine hydrochloride (>99% purity), hexylamine (99% purity), pyrrolidine (>99% purity) and triethylamine (>99% purity) were purchased from SIA Labochema Latvia (local distributor of Sigma-Aldrich products in Latvia, Riga, Latvia).

The structures of the following compounds are given in Figure 1. 3-[1-Methyl-3*N*-imidazolio]-propane-1-sulfonate (MelmPS), 3-[1-butyl-3*N*-imidazolio]-propane-1-sulfonate (BulmPS), 3-[1-hexyl-3*N*-imidazolio]-propane-1-sulfonate (HlmPS), 3-[1-octyl-3*N*-imidazolio]-propane-1-sulfonate (OlmPS) were synthesized following the procedure described in Yoshizawa *et al.*¹⁴ 4-[1-Methyl-3*N*-imidazolio]-butane-1-carboxylate (MelmBC) was prepared by a two-step protocol described in Kanagasabapathy *et al.*²⁵ The purity of synthesized compounds was controlled by HPLC/MS.

Instrumentation

The experiments were carried out using a Waters Micromass Quattro Micro API triple quadrupole mass spectrometer equipped with a Z-spray source. The instrumental conditions

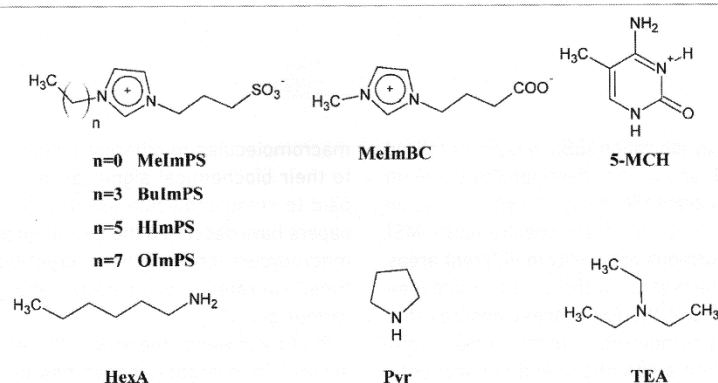


Figure 1. Structural formulas and abbreviations for the substances used in the study.

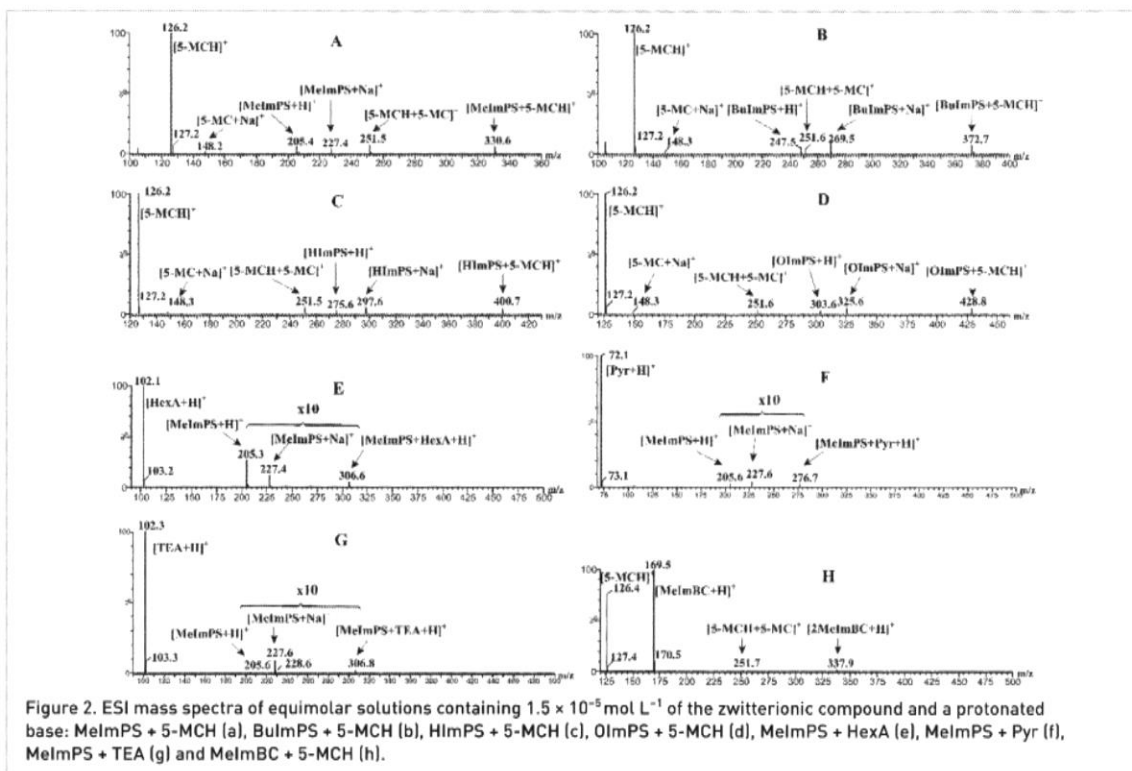


Figure 2. ESI mass spectra of equimolar solutions containing $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ of the zwitterionic compound and a protonated base: MelmPS + 5-MCH (a), BulmPS + 5-MCH (b), HlmPS + 5-MCH (c), OImPS + 5-MCH (d), MelmPS + HexA (e), MelmPS + Pyr (f), MelmPS + TEA (g) and MelmBC + 5-MCH (h).

were optimized during the preliminary studies. All the analyses were carried out in positive-ion mode. Capillary, cone and extractor were held at 2.8 kV, 15 V and 1 V, respectively. Source and desolvation temperatures were set at 100 °C and 400 °C, respectively. Desolvation and cone gas flow rate were set at 250 L h⁻¹ and 30 L h⁻¹, respectively. Solutions were delivered using an infusion pump at a flow rate of 50 $\mu\text{L min}^{-1}$. Data collection was carried out for at least three minutes to obtain a sufficient number of scans. Masslynx 4.1 software was used for the data processing. CID was performed using argon under a pressure of 1.3×10^{-3} mbar in a range of collision energies from 0 eV to 16 eV with 1 eV steps.

Determination of association constants

MelmPS, BulmPS and 5-MCH were dissolved in water at a 100 mM concentration. Stock solutions of HlmPS (100 mM) and OImPS (50 mM) were prepared in methanol. Aliphatic amines were dissolved in methanol or acetonitrile to the 100 mM level. 5-Methylcytosine hydrochloride (or aliphatic amine) and a zwitterionic compound were mixed together and diluted sequentially to give final equimolar working solutions in the range of concentrations 1–15 μM containing 0.025% formic acid. Each working solution was prepared three times and analyzed under conditions described in the Instrumentation section. The data obtained were processed as described in Gabelica et al.²⁰ Briefly, the ratio of intensities of 5-MCH and

a non-covalent complex at each concentration is described by equation (1)²⁰:

$$\frac{I_{5\text{-MCH}}}{I_{\text{Complex}}} = \frac{(1 + \sqrt{1 + 4K_a C_{5\text{-MCH}}})}{2K_a R C_{5\text{-MCH}}} \quad (1)$$

where $I_{5\text{-MCH}}$ represents the sum of the intensities of 5-MCH, its dimer and the sodium adduct also found in the spectra [see Figure 2(a) to (d)], I_{Complex} denotes the intensity of the non-covalent complex, $C_{5\text{-MCH}}$ is the molar concentration of 5-MCH, K_a designates association constant and R is the ratio of the response factors of 5-MCH and the complex. The non-linear least-squares fit of equation (1) to the experimentally obtained plots of $I_{5\text{-MCH}}/I_{\text{Complex}}$ vs. $C_{5\text{-MCH}}$ was performed using the IBM SPSS Statistics program version 22.

Computational methods

The gas-phase structures of the lowest energy tautomers of 5-MCH and the non-protonated form of 5-methylcytosine were obtained after geometry optimizations at the density functional theory (DFT) B3LYP/6-31g(d,p)^{26,27} level using Gaussian 09.²⁸ Initial conformational searches of MelmPS and [MelmPS + H]⁺ were performed using the MMFF94²⁹ algorithm implemented in the Avogadro 1.0.0 program. The six lowest energy conformers of MelmPS and four lowest energy conformers of [MelmPS + H]⁺ were chosen. Then the

Table 1. Values of the association constants (K_a), relative response factors (R) and half-dissociation threshold energies ($E_{1/2}$) for the complexes of 5-methylcytosine and different zwitterions.

Zwitterion	Methanol			Acetonitrile			Gas phase
	$(K_a \pm \Delta K_a)^a$ ($\times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$)	$(R \pm \Delta R)^a \times 10^{-2}$	R^2	$(K_a \pm \Delta K_a)$ ($\times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$)	$(R \pm \Delta R) \times 10^{-2}$	R^2	$E_{1/2}$ (eV)
MelmPS	0.5 ± 0.4	1.4 ± 0.8	0.997	0.7 ± 0.3	2.6 ± 0.7	0.999	5.0
BulmPS	0.8 ± 0.6	1.1 ± 0.6	0.998	0.30 ± 0.04	4.1 ± 0.4	1	4.6
HlmPS	0.9 ± 0.6	0.8 ± 0.4	0.998	1.1 ± 0.8	1.5 ± 0.8	0.996	4.8
OlmPS	2.4 ± 2.7	0.5 ± 0.3	0.997	1.9 ± 1.1	1.0 ± 0.4	0.998	5.1

^a95% confidence interval

5-MCH structure was added to each of the six lowest energy conformers of MelmPS at different orientations relative to the sulfonate group to form conformers of the first isomeric [MelmPS + 5-MCH]⁺ complex. The same algorithm was used in the case of [MelmPS + H]⁺ with the exception that 5-MC was added forming the group of conformers of the second isomeric complex. All these conformers of the two isomeric complexes were optimized using the MMFF94 algorithm and then reoptimized sequentially with a semiempirical PM3³⁰ and *ab initio* HF/6-31g(d) method. Finally, the lowest energy structure was chosen from each group and reoptimized using the M06-2X functional³¹ at a 6-311 + + g(d,p) basis set followed by the analysis of vibrational frequencies to verify that the structures obtained represent true minima. The dissociation energies were calculated using the same level of theory accounting for the basis-set superposition error (BSSE) and zero point energies, as described by equation (2):

$$E_{D, \text{Complex}} = -E_{B, \text{Complex}} - ZPE_{\text{Complex}} + ZPE_{\text{Ligand 1}} + ZPE_{\text{Ligand 2}} \quad (2)$$

where the $E_{D, \text{Complex}}$ is the BSSE-corrected dissociation energy of a complex, the $E_{B, \text{Complex}}$ is the BSSE-corrected binding energy of the complex, and ZPE_{Complex} , $ZPE_{\text{Ligand 1}}$ and $ZPE_{\text{Ligand 2}}$ are the zero point vibrational energies of the complex and the species forming the complex, respectively.

Results

Determination of the association constants of the ion-zwitterion complexes in solution

Equimolar solutions of the amines and one of the zwitterions in acidic acetonitrile were studied using ESI-MS. As can be seen from Figure 2, representative mass spectra of such solutions clearly indicate the formation of the complexes of the type [zwitterion + 5-MCH]⁺ and [MelmPS + amine + H]⁺. To demonstrate that the formation of these complexes takes place in solution, the representative mixture of 5-MCH and BulmPS (1:1) in methanol was investigated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Comparison of the spectra of pure compounds and the mixture shows differences in characteristic frequencies and intensities [see the Supplementary material]. The interpretation of FTIR spectra showed that

the frequency of sulfonate stretch shifted by 19 cm^{-1} and the amidine C = N stretch shifted by 8 cm^{-1} . In addition, the intensities of the sulfonate, C = N and C = O vibrations also changed. This may mean that the zwitterion and the protonated base interact in solution. Thus, ESI can be used to determine the stabilities of these complexes. However, the peak intensities of such complexes in the mass spectra cannot be used directly to calculate the association constants. The reason for this is the different ionization efficiencies of the bases, complexes and zwitterions. In other words, the peak intensities do not represent the solution composition precisely, because each ion has its own response factor. For this reason we performed a series of titration experiments according to method developed by Gabelica *et al.*²⁰ Equation (1) [see the Experimental section] was fitted to the experimentally obtained plots of $I_{5\text{-MCH}/\text{Complex}}$ vs. $C_{5\text{-MCH}}$. This procedure gives the K_a and relative response factor (R) for each complex. Table 1 summarizes these data. It is clearly seen that the R values for each complex are larger for acetonitrile compared to methanol, indicating the influence of the solvent type. In addition, R decreases gradually in methanol for larger zwitterions, while having a maximum value for the BulmPS complex in acetonitrile. Despite these differences in the behavior of individual complexes, a common trend can be observed: the R values of the complexes decrease for zwitterions having larger molecular weight. This is possibly due to discrimination of sampling efficiencies for ions with larger m/z values. A similar trend was demonstrated by Zook and Bruins³² for m/z values greater than 300 m/z .

The results also indicate that there is a dependence of the K_a of the complexes on the alkyl chain length of the zwitterion in both acetonitrile and methanol [see Table 1.]. As can be seen from Figure 3(a), when acetonitrile was used the series of complexes had a minimum corresponding to [BulmPS + 5-MCH]⁺. On the other hand, when methanol was utilized [see Figure 3(b)], the K_a values increased from [MelmPS + 5-MCH]⁺ to [OlmPS + 5-MCH]⁺, having an inflection at [HlmPS + 5-MCH]⁺. The difference in the behavior of K_a for the two solvents can be attributed to the different solvation mechanisms. Both solvents have close dielectric constants, but the acetonitrile, in contrast to methanol, cannot form hydrogen bonds with analytes in solution. As has been shown by Wakisaka and co-workers,³³ molecular clustering between short-chain organic acids and aromatic bases in solution was

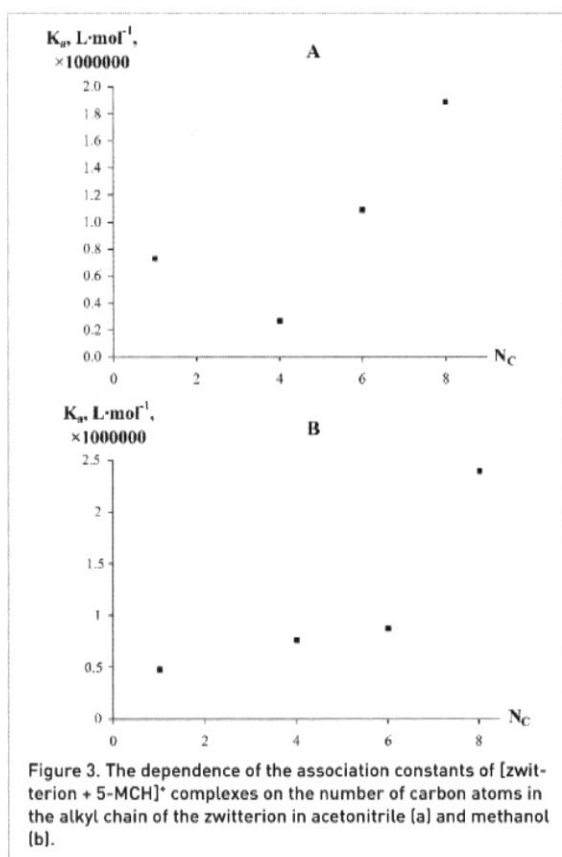


Figure 3. The dependence of the association constants of [zwitterion + 5-MCH]⁺ complexes on the number of carbon atoms in the alkyl chain of the zwitterion in acetonitrile (a) and methanol (b).

controlled by the balance between self-aggregation of the acid and the electrostatic acid–base interactions. Moreover, the change of this balance was influenced by the solvent, the alkyl chain length and the pK_a . The same factors could change the solvation mechanism of the zwitterion or the complex, which, in turn, influences the stability. For example, it is known that the formation of contact and solvent-separated ion pairs is possible in solution.^{34,35} Both mechanisms are in equilibrium and its position depends on the structure of the solvent and the ions.³⁴

The influence of the functionality on the formation of the ion-zwitterion interactions

The functional groups in both interacting species are crucial for the formation of the complex. The ESI-MS spectra of the solutions containing MeImPS and aliphatic amines show low-intensity peaks corresponding to complexes of a type [MeImPS + amine + H]⁺ [see Figure 2(e) to (g)]. The K_a values for these complexes have also been obtained using equation (1). However, the results of these experiments were unsatisfactory because of the high contribution of background noise to the intensity of the complexes at low concentration. Thus, the uncertainties in the K_a were very high and the results cannot be discussed.

The influence of the SO_3^- group on the formation of the complex was studied by exchanging it with a COO^- group. The mass spectrum of an equimolar solution containing MeImBC and 5-MCH is depicted in Figure 2(h). It is seen that the peak of the complex at m/z 294 is absent. This suggests that either the complex is not formed in solution or this is unstable in the gas phase. If the complex is formed in solution, the acidity of the SO_3^- and COO^- functional groups determines the extent of binding to 5-MCH. The less acidic group should form protonated species, which will be preferentially transferred into the gas phase without any binding to 5-MCH. A rough comparison of the acidity of the sulfonate and carboxylate groups can be made on the basis of the experimental pK_a values of methanesulfonic and acetic acids in acetonitrile (9.97 and 23.51, respectively³⁶). Taking into account this difference, it is expected that the unprotonated SO_3^- group of the zwitterion preferentially forms ion pairs with 5-MCH in acetonitrile.

Collision-induced dissociation of the ion-zwitterion complexes

CID experiments, like any gas phase methods, often give the opportunity to study the formation of non-covalently bound complexes without the effects of solvation. During these experiments we were interested in how the stability of [zwitterion + 5-MCH]⁺ complexes depends on the alkyl chain in the gas phase. Figure 4 shows a typical CID mass spectrum of the [MeImPS + 5-MCH]⁺ complex. The same fragmentation channels were observed for all the complexes, showing that the [zwitterion + H]⁺ ion is formed after the loss of 5-methylcytosine. This suggests that, after activation of the complex, a

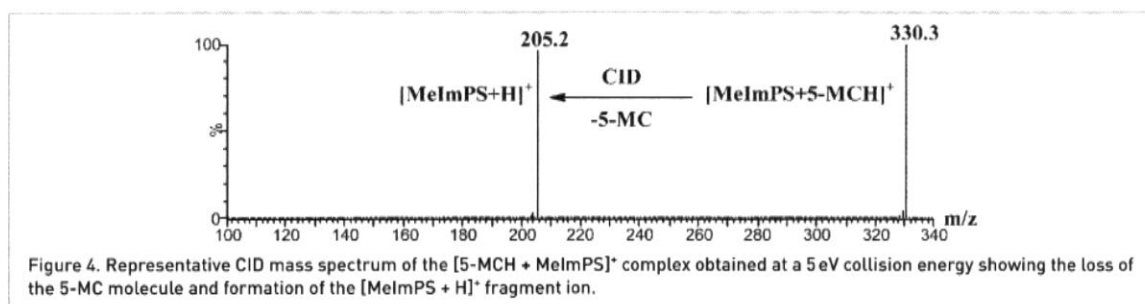


Figure 4. Representative CID mass spectrum of the [5-MCH + MeImPS]⁺ complex obtained at a 5 eV collision energy showing the loss of the 5-MC molecule and formation of the [MeImPS + H]⁺ fragment ion.

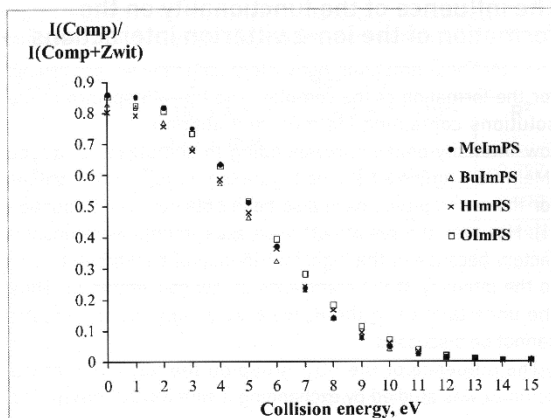


Figure 5. Fragmentation decay curves of [zwitterion + 5-MCH]⁺ complexes used to obtain $E_{1/2}$ values for each complex.

proton transfer from 5-MCH to the zwitterion takes place. To monitor the stability of each [zwitterion + 5-MCH]⁺ complex in the gas phase we chose the so-called half-dissociation threshold ($E_{1/2}$) values. These values were obtained using the plots of the experimental normalized relative intensities of the complexes vs. collision energy [see Figure 5]. The $E_{1/2}$ values for each complex are summarized in Table 1. The plot of $E_{1/2}$ vs. the alkyl chain is represented graphically in Figure 6.

The order of the $E_{1/2}$ values obtained for complexes during the CID experiments can be explained taking into account two different factors. On the one hand, the internal energy distribution of an ion acquired during collisions is inversely proportional to its molecular weight.³⁷ Thus, a heavier complex should have an increased stability. Some studies have shown that the species with larger alkyl chains have larger $E_{1/2}$ values under CID conditions.^{23,38} On the other hand, it has been proposed that the stability of the heterodimeric non-covalent complexes increases when the gas-phase basicity values of

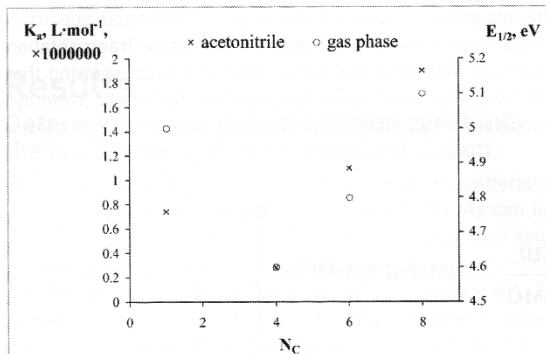


Figure 6. Graph showing the dependence of the association constants and the $E_{1/2}$ values of the [zwitterion + 5-MCH]⁺ complexes on the number of carbon atoms in the alkyl chain of the zwitterion. Similar stability trends can be observed in solution and in the gas phase.

the two species that form a complex are similar.^{39,40} Thus, the larger is the basicity difference between the zwitterion and 5-methylcytosine the least stable is the complex. The basicity of the zwitterions increases for larger alkyl chain homologues (proved by CID experiments of the heterodimers composed of these zwitterions, unpublished results). Thus, the stability order caused by gas-basicity differences is opposite to the order of stability caused by increasing the molar mass of the complex. Therefore, it is possible that a combination of these two factors results in the appearance of a minimum stability complex corresponding to [BulmPS + 5-MCH]⁺.

Comparison of gas phase and solution phase stabilities of the ion-zwitterion complexes

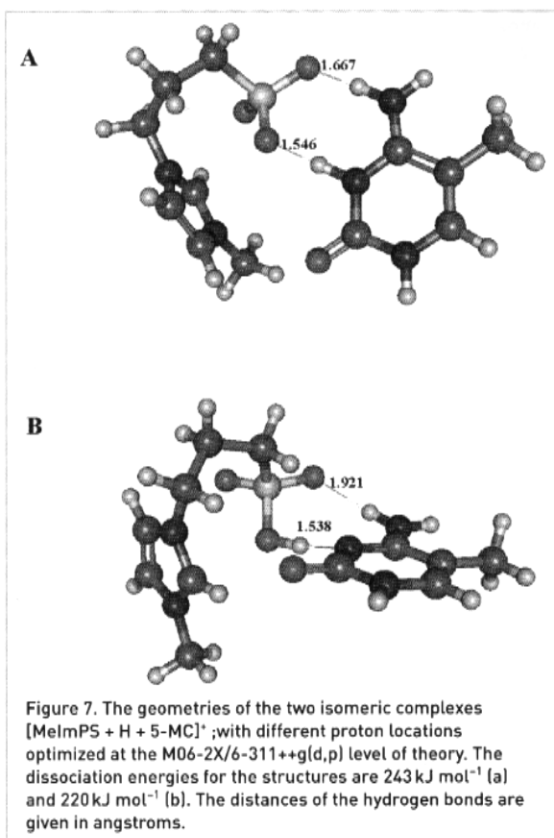
As can be observed from Figure 6, the plots of $E_{1/2}$ and K_a vs. the alkyl chain length have a similar form. Both plots have stability minima for the [BulmPS + 5-MCH]⁺ complex. These observations lead to a hypothesis that factors influencing the stability of the complexes in the gas phase are preserved in acetonitrile solution. In other words, acetonitrile does not disturb the stability order of the complexes. In contrast, when methanol is used as a solvent [Figure 3(b)], the K_a is influenced by various complex-solvent and ion-solvent interactions, resulting in different stability trends in solution and in the gas phase.

The structure of the ion-zwitterion complexes

In order to obtain information about the structure of the complexes, quantum chemical calculations were performed. The smallest computational costs occur for [MeImPS + 5-MCH]⁺ complex. Taking this into account, all the modelling procedures were performed only with this complex. We were interested whether the proton is located at 5-methylcytosine or the SO_3^- group of the zwitterion. Conformational analysis and geometry optimizations of the two isomeric complexes with respect to the proton residence were carried out using molecular mechanics and DFT. Optimized structures for both isomers are depicted in Figure 7. It is clear that both complexes are stabilized by the two hydrogen bonds between the amidinium moiety and the SO_3^- oxygen atoms, resulting in cyclic structures in both cases. The dissociation energies of both isomeric complexes were calculated using equation (2) [see the Experimental section]. When the proton resides on 5-MC, the dissociation energy of the complex is 23 kJ mol⁻¹ higher than that for the isomer of the complex with a protonated SO_3^- group, and hence the higher stability of the former structure. However, the difference is not large, and both complexes can interconvert in the ion source or the CID experiments.

Conclusions

This paper shows that a series of 3-[1-alkyl-3*N*-imidazolio]propane-1-sulfonates interact with 5-methylcytosine and



aliphatic amines to form non-covalently bonded complexes in solution, which are stable in the gas phase. Quantum chemical calculations show that the sulfonate group of the zwitterion forms two hydrogen bonds with the amidinium fragment of protonated 5-methylcytosine. The stability of such complexes depends on the alkyl chain length, functionality of the zwitterion and the solvent. CID experiments show that a minimum stability complex (alkyl = butyl) appears when the alkyl chain is varied in the zwitterion. This is attributed to the combination of two factors influencing the stability. The first factor is the difference of gas basicities of the zwitterion and 5-methylcytosine, while the second factor is the molar mass-dependent internal energy of the complex. The order of stability of the complexes observed in the gas phase was preserved in acetonitrile solution. In contrast, when methanol was used as a solvent, the stability of the complexes changed with the increase of the alkyl chain length of the zwitterion. This reflects different solvation mechanisms of the complexes in methanol and acetonitrile. The formation of the complexes can be used for the derivatization of 5-methylcytosine with subsequent determination by ESI-MS. The development of methods for the determination of DNA methylation is ongoing.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1255/ejms.1303>.

References

1. M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, D.O. Chemistry, R.C. Mobley, L.D. Ferguson and M.B. Alice, "Molecular beams of macroions", *J. Chem. Phys.* **49**, 2240 (1968). doi: <http://dx.doi.org/10.1063/1.1670391>
2. M. Yamashita and J.B. Fenn, "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme", *J. Phys. Chem.* **88**, 4451 (1984). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/j150664a002>
3. B. Dorn and R. Aebersold, "Mass spectrometry and protein analysis", *Science* **312**, 212 (2006). doi: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1124619>
4. R.D. Smith and K.J. Light-Wahl, "The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: promise, pitfalls and prognosis", *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 493 (1993). doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bms.1200220902>
5. S. Mathur, A. Nazabal and R. Zenobi, in *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, 2nd edn, Ed. by R. Cole. John Wiley & Sons, Hoboken, p. 535 (2012).
6. A. Ganguly, B. Pramanik, G. Chen and A. Tsarbopoulos, in *Applied Electrospray Mass Spectrometry: Practical Spectroscopy Series*, Vol. 32. Ed. by A. Ganguly, B. Pramanik and M. Gross. Marcel Dekker, New York, p. 361 (2002).
7. J.S. Brodbelt, "Probing molecular recognition by mass spectrometry", *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, 57 (2000). doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1387-3806\(00\)00302-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1387-3806(00)00302-X)
8. A.M. Fernandes, B. Schröder, T. Barata, M.G. Freire and J.A. Coutinho, "Inclusion complexes of ionic liquids and cyclodextrins: are they formed in the gas phase?" *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **25**, 852 (2014). doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-013-0820-9>
9. M. Torvinen, E. Kalenius, F. Sansone, A. Casnati and J. Jänis, "Noncovalent complexation of monoamine neurotransmitters and related ammonium ions by tetramethoxy tetraglucoylcalix[4]arene", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 359 (2012). doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-011-0289-3>
10. S. Jang, M. Ju Song, H. Kim and S. Choi, "Formation of metal complex ions from amino acid in the presence of Li⁺, Na⁺ and K⁺ by electrospray ionization: metal replacement of hydrogen in the ligands", *J. Mass Spectrom.* **46**, 496 (2011). doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1916>
11. K.A. Schug and W. Lindner, "Noncovalent binding between guanidinium and anionic groups: focus on biological- and synthetic-based arginine/guanidinium interactions with phosph[on]ate and sulf[on]ate

- residues", *Chem. Rev.* **105**, 67 (2005). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/cr040603j>
12. C. Zhu and C. Lifshitz, "The protonated betaine/ammonia complex: how stable is the gas-phase zwitterion structure?" *Chem. Phys. Lett.* **320**, 513 (2000). doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614\(00\)00285-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614(00)00285-2)
 13. W.D. Price, R.A. Jockusch and E.R. Williams, "Binding energies of protonated betaine complexes: a probe of zwitterion structure in the gas phase", *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3474 (1998). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/ja972527q>
 14. M. Yoshizawa, M. Hirao, K. Ito-Akita and H. Ohno, "Ion conduction in zwitterionic-type molten salts and their polymers", *J. Mater. Chem.* **11**, 1057 (2001). doi: <http://dx.doi.org/10.1039/b101079o>
 15. M. Yoshizawa, A. Narita and H. Ohno, "Design of ionic liquids for electrochemical applications", *Aust. J. Chem.* **57**, 139 (2004). doi: <http://dx.doi.org/10.1071/CH03240>
 16. R.L. Momparler and V. Bovenzi, "DNA methylation and cancer", *J. Cell. Physiol.* **183**, 145 (2000). doi: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200005\)183:2<145::AID-JCP1>3.0.CO;2-V](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200005)183:2<145::AID-JCP1>3.0.CO;2-V)
 17. P.A. Jones, "Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond", *Nat. Rev. Gen.* **13**, 484 (2012). doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3230>
 18. J.M. Daniel, S.D. Friess, S. Rajagopalan, S. Wendt and R. Zenobi, "Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry", *Int. J. Mass Spectrom.* **216**, 1 (2002). doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1387-3806\(02\)00585-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1387-3806(02)00585-7)
 19. E.C. Kempen and J.S. Brodbelt, "A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry", *Anal. Chem.* **72**, 5411 (2000). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/ac000540e>
 20. V. Gabelica, N. Galic, F. Rosu, C. Houssier and E. De Pauw, "Influence of response factors on determining equilibrium association constants of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry", *J. Mass Spectrom.* **38**, 491 (2003). doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jms.459>
 21. V. Gabelica, F. Rosu and E. De Pauw, "A simple method to determine electrospray response factors of non-covalent complexes", *Anal. Chem.* **81**, 6708 (2009). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/ac900785m>
 22. K. Schug and W. Lindner, "Using electrospray ionization-mass spectrometry/tandem mass spectrometry and small molecules to study guanidinium-anion interactions", *Int. J. Mass Spectrom.* **241**, 11 (2005). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2004.10.019>
 23. T.F. Luxford, E.M. Milner, N. Yoshikawa, C. Bullivant and C.E. Dessent, "Complexation of carboxylate anions with the arginine gas-phase amino acid: effects of chain length on the geometry of extended ion binding", *Chem. Phys. Lett.* **577**, 1 (2013). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2013.05.040>
 24. V.J. Nesatyy, "Mass spectrometry evaluation of the solution and gas-phase binding properties of non-covalent protein complexes", *Int. J. Mass Spectrom.* **221**, 147 (2002). doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1387-3806\(02\)00956-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1387-3806(02)00956-9)
 25. S. Kanagasabapathy, S. Kumar, J. Gajanan, M. Kadu, L. Preeti, M. Renuka, S. Anasuya and K. Parasuraman, "A solvent system for dissolution of pulp and polymer", Patent WO2013/164845 (2013).
 26. A. D. Becke, "Density-functional thermochemistry. III. the role of exact exchange", *J. Chem. Phys.* **98**, 5648 (1993). doi: <http://dx.doi.org/10.1063/1.464913>
 27. C. Lee, W. Yang and R.G. Parr, "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density", *Phys. Rev. B* **37**, 785 (1988). doi: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>
 28. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, and D.J. Fox., Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
 29. T.A. Halgren, "Merck molecular force field. I. basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94", *J. Comput. Chem.* **17**, 490 (1996). doi: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P)
 30. J.J. Stewart, "Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications", *J. Computational Chem.* **10**, 221 (1989). doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540100209>
 31. Y. Zhao and D.G. Truhlar, "The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals", *Theor. Chem. Acc.* **120**, 215 (2008). doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x>
 32. D.R. Zook and A.P. Bruins, "On cluster ions, ion transmission and linear dynamic range limitations in electrospray (ionspray) mass spectrometry", *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **162**, 129 (1997). doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1176\(96\)04511-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1176(96)04511-9)
 33. S. Mochizuki, Y. Usui and A. Wakisaka, "Acid-base interaction from the viewpoint of molecular clustering:

- effects of solvent, pK_a and size of alkyl group", *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **94**, 547 (1998). doi: <http://dx.doi.org/10.1039/A707189B>
- 34.** D.F. Evans and P. Gardam, "Transport processes in hydrogen-bonding solvents. II. Conductance of tetraalkylammonium salts in 1-butanol and 1-pentanol at 25°C", *J. Phys. Chem.* **73**, 158 (1969). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/j100721a025>
- 35.** A. D'Aprano, M. Goffredi and R. Triolo, "Ion pairing in protic and aprotic solvents of intermediate dielectric constant at 25°C". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **71**, 1188 (1975). doi: <http://dx.doi.org/10.1039/F19757101188>
- 36.** J.T. Muckerman, J.H. Skone, M. Ning and Y. Wasada-Tsutsui, "Toward the accurate calculation of pK_a values in water and acetonitrile", *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 882 (2013). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bba-bio.2013.03.011>
- 37.** A.K. Shukla and J.H. Futrell, "Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation", *J. Mass Spectrom.* **35**, 1069 (2000). doi: [http://dx.doi.org/10.1002/1096-9888\(200009\)35:9<1069::AID-JMS54>3.0.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/1096-9888(200009)35:9<1069::AID-JMS54>3.0.CO;2-C)
- 38.** D. Cubrilovic, A. Biela, F. Sielaff, T. Steinmetzer, G. Klebe and R. Zenobi, "Quantifying protein–ligand binding constants using electrospray ionization mass spectrometry: a systematic binding affinity study of a series of hydrophobically modified trypsin inhibitors." *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 1768 (2012). doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-012-0451-6>
- 39.** Y. Cai and R.B Cole, "Stabilization of anionic adducts in negative ion electrospray mass spectrometry." *Anal. Chem.* **74**, 985 (2002). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/ac0108818>
- 40.** M. Meot-Ner, "Strong ionic hydrogen bonds", *Chem. Rev.* **105**, 22 (2012). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/cr200430n>



Zwitterionic sulfonates as m/z shift reagents for 5-methylcytosine detection in deoxyribonucleic acids (DNA) using flow injection analysis and electrospray ionisation mass spectrometry

Anton Podjava,^a Svjatoslav Kistkin,^b Elina Ausekle,^a Peteris Mekss^a and Andris Zicmanis^a

^aDepartment of Chemistry, University of Latvia, Riga, Latvia. E-mail: antonpodjava@gmail.com

^bDepartment of Medicine, University of Latvia, Riga, Latvia

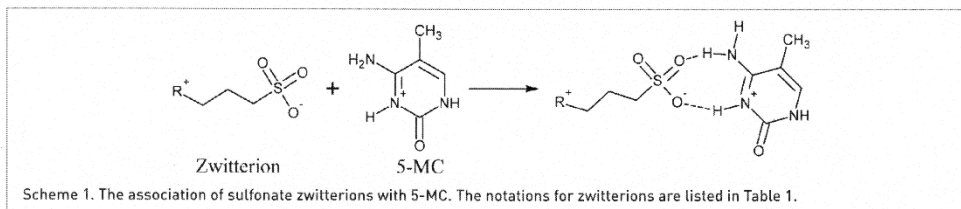
5-Methylcytosine (5-MC) is an important epigenetic modification of DNA. Abnormally high concentrations of this substance appear because of the hypermethylation of cytosine. Therefore, the measurement of the quantity of this compound in mammals is of great importance. Recently, we reported that several imidazolium-based zwitterionic sulfonates form complexes with 5-MC in solution, which can be studied by electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). It is shown in this paper that such an association can be utilised for the detection of 5-MC in a DNA sample using high-throughput a flow injection analysis ESI-MS method. A variety of the sulfonate zwitterions have been tested as m/z shift reagents to increase the selectivity of the analysis. It is shown that either of the zwitterions can be used without the loss of sensitivity. The performance of the method was tested in terms of linearity range, sensitivity, intra- and between-day precision and accuracy, matrix effect and carryover. The method described is characterised by simplicity, a good limit of quantitation (1 pg injected) and low run times (at least 50 injections per hour). In addition, high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry are not required. The possibility exists to widen the scope of the method to other amidine-containing compounds present in more complicated matrices.

Keywords: 5-methylcytosine, zwitterions, non-covalent complexes, selectivity, flow injection analysis, electrospray ionisation mass spectrometry, DNA methylation, calf thymus DNA

Introduction

Electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) is a widely used technique in qualitative and quantitative analysis.¹ Although it is possible to develop precise and accurate procedures for the determination of various analytes in a variety of matrices, this is often achieved by dealing with time-consuming sample preparation and chromatography. In a majority of cases these steps are necessary because of the lack of method selectivity, especially for low molecular weight compounds. As a result, chem-

ical derivatisation is usually performed to change the properties of the analyte and improve the selectivity at different stages of the analysis.^{2–4} Moreover, if the product forms rapidly and its formation is highly selective, the analysis can be performed with minimal sample treatment or even without separation from the matrix. In this respect, flow injection analysis (FIA),⁵ which perfectly combines with ESI-MS,⁶ becomes very attractive as a high-throughput and low-cost method.



It is known that formation of non-covalent structures, i.e. ion-molecule association, is characteristic for the ESI process⁷ and can proceed rapidly and selectively under well-controlled conditions. Several studies have shown that these complexes can be used efficiently in quantitative analysis⁸⁻¹¹ by shifting the *m/z* values of target analytes and/or switching from negative to positive ESI mode. Thus, good selectivity and low detection limits have been achieved.

Recently, we reported that several zwitterions containing a sulfonate group and an *N*-alkylimidazolium ring associate in methanol or acetonitrile with 5-methylcytosine (5-MC).¹² Quantum chemical calculations have shown that the SO₃⁻ group forms hydrogen bonds with the protonated amidine group of 5-MC (see Scheme 1 and Table 1). Taking into account that the determination of 5-MC is often performed to assess the global DNA methylation,^{13,14} we were interested in exploring the effect of complex formation between 5-MC and zwitterionic sulfonates for the analysis of DNA samples. As a result, 5-MC can be converted to a complex, which shifts the *m/z* value of 5-MC, changing the selectivity. Although several methods exist for the detection of 5-MC,¹⁵⁻²⁰ these procedures incorporate gas or liquid chromatography to separate the nucleobases. The objective of this report was to demonstrate that the formation of complexes is applicable for the quantitative analysis of DNA samples without chromatography by employing FIA and ESI-MS in a selected ion-recording mode. It is shown in this report that our approach increases the efficiency, allowing at least 50 injections per hour using optimised low-dispersion FIA. The most recent results obtained in our laboratory have shown that under similar conditions zwitterionic sulfonates also form complexes with other amidines and guanidines like creatinine and metformin (unpublished

results). Thus, we assume that the same approach could also be utilised for other amidine-containing compounds of biological significance to change the selectivity of their detection by ESI-MS.

Experimental

Materials

Acetonitrile (high-performance liquid chromatography [HPLC]/MS grade), water (HPLC/MS grade), formic acid (HPLC/MS grade), 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (HPLC/MS grade), cytosine (>99% purity) and 5-MC hydrochloride (>99% purity) were purchased from Sigma-Aldrich. Thymine (99% purity), adenine (>98% purity) and guanine (>98% purity) were obtained from Acros Organics and TCI Chemicals. Activated DNA from calf thymus was from Sigma-Aldrich.

The structures of the zwitterions are given in Scheme 1 and Table 1. Each zwitterion was prepared according to the procedure described in Yoshizawa *et al.*²¹ and the purity and identity of the compounds were confirmed by HPLC/MS.

Instrumentation

The experiments were carried out using a Waters Micromass Quattro Micro API triple quadrupole mass spectrometer equipped with a Z-spray source. The instrumental conditions were optimised during preliminary studies. All the analyses were carried out in positive ion mode. The capillary, cone and extractor were held at 2.8 kV, 15 V and 1 V, respectively. Source and desolvation temperatures were set at 100°C and 400°C, respectively. Desolvation and cone gas flow rate were set at 250 L h⁻¹ and 30 L h⁻¹. Masslynx 4.1 software was used for data processing.

The choice of the zwitterion

The optimisation of the reagent in terms of the absolute signal of the complex was carried out using infusion of the solutions containing 5-MC and the zwitterion with varying molar concentration ratios. Each solution contained a constant concentration of 5-MC (6 μM) and the level of the zwitterion was increased from 6 μM to 120 μM, corresponding to the molar ratios of 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15 and 1:20. The solvent used for these experiments was 0.05% formic acid in HPLC/MS grade acetonitrile. Each solution was introduced into the MS at a flow rate of 50 μL min⁻¹ and analysed under conditions described in the previous section.

Table 1. The notations of the zwitterions derived from various nitrogen-containing heterocycles.

R	Zwitterion notation
1-Methylimidazolium	1
1-Butylimidazolium	2
1-Hexylimidazolium	3
1-Octylimidazolium	4
Pyridinium	5
Thiazolium	6
Quinolinium	7

DNA hydrolysis

Before the hydrolysis the calf thymus, DNA was dissolved in HPLC/MS grade water and the real quantity of DNA was determined by measuring the ultraviolet (UV) absorbance at 260 nm using a UV spectrophotometer. Then an aliquot was diluted with water to obtain a 25 µg mL⁻¹ solution of DNA. Then 100 µL of this solution (2.5 µg DNA) was placed in a 2 mL vial (deactivated previously by hexamethyldisilazane) and evaporated to dryness using a gentle nitrogen stream. The residue was dissolved in 200 µL of 88% formic acid and hydrolysed for 1.5 h at 140°C according to Rossella *et al.*²⁰ After the hydrolysis the sample was evaporated again and dissolved in 1 mL of 0.001% TFA solution in HPLC/MS-grade acetonitrile. Then, the sample was diluted 10 times by HPLC/MS-grade acetonitrile and used for injection.

Flow injection analysis

The low dispersion FIA set-up consisted of a Waters 2695 pump constantly delivering the mobile phase at 80 µL min⁻¹, the electrically driven Rheodyne manual injector with a 1 µL homemade PEEK loop, an infusion pump delivering the zwitterion at a flow rate of 20 µL min⁻¹, the mixing tee, PEEK coil (1 m × 0.125 mm inner diameter) and microfilter (Upchurch Scientific) connected to the mass spectrometer. The sample was injected manually with a glass syringe by a loop overflow method using 30 µL of the solution. Overall, six injections were made for the sample with a delay of approximately 20 s between injections. The signals at *m/z* 126.1 [0.4 *m/z* span] and *m/z* 330.4 [0.4 *m/z* span] corresponding to 5-MC and the complex of 5-MC with zwitterion 1 (see Scheme 1) were monitored using the selected ion recording (SIR) mode. The inter-scan delay and the dwell time for each ion was 0.1 s. Other instrument settings are listed in Instrumentation.

Method validation

Preparation of the stock solutions

The stock solution containing adenine, cytosine, guanine, thymine and uracil was prepared by dissolving 2.0 mg of each nucleobase in 100 mL of a 2.5% solution of formic acid in HPLC/MS-grade water and stored in a refrigerator. The stock solution of 5-MC was obtained by dissolving 5-MC hydrochloride in the same solvent as for nucleobases at a concentration of 1.0 mM.

Matrix matched calibration

The blank matrix was prepared after a 100× dilution of the stock solution of nucleobases with 0.001% TFA in HPLC/MS grade acetonitrile. To prepare the matrix matched calibration solutions, 100 µL of the blank matrix were spiked with the appropriate volume of 1.0 µM or 10 µM solution of 5-MC in HPLC/MS grade acetonitrile and diluted to 1.0 mL with HPLC/MS-grade acetonitrile. Thus, seven calibration levels containing 0, 10, 20, 100, 200, 500 and 1000 nM of 5-MC with a constant amount of each nucleobase (180, 132, 148, 159 and 180 nM of cytosine, guanine, adenine, thymine and uracil, respectively) were obtained to investigate the range of linear

response of the [zwitterion 1 + 5-MC + H]⁺ complex. The working solutions were injected in triplicate under conditions described in Instrumentation and FIA.

Quantitation

The calibration curves were obtained by plotting the areas under [zwitterion 1 + 5-MC + H]⁺ complex peak versus concentration of 5-MC. Weighted [x^2 , $n = -2$ to $+2$] and non-weighted least-squares regression models were evaluated using the IBM SPSS Statistics program (version 22) in order to obtain the best fit.

Sensitivity

The sensitivity of the method was defined in terms of the limit of quantitation (LOQ) measured using the standard deviation of the response in six blank matrix samples injected in triplicate under conditions described in Instrumentation and FIA. The LOQ value was calculated using the following expression:

$$LOQ = \frac{10s}{S} \quad (1)$$

where s is the standard deviation of the response in the blank matrix and S is the slope of the regression line.

Accuracy and precision

The quality control (QC) samples used for the determination of intra- and between-day accuracy and precision were prepared by combining 50 µL of 5× diluted stock solution of nucleobases (see Matrix matched calibration) with 50 µL of a 2 µM (level 1) or 20 µM (level 2) solution of 5-MC in HPLC/MS water. Each combined solution was processed as described for a real DNA sample (see DNA hydrolysis) to obtain QC1 and QC2 at 10 nM and 100 nM of 5-MC. The intraday precision and accuracy were determined by preparing QC1 and QC2 three times each day and making triplicate injections of each level. To calculate the between-day accuracy and precision, the analyses were repeated three times in a period of two weeks. The intra- and between-day precisions were expressed as the coefficient of variation (CV). The mean % error of back-calculated concentrations for QC1 and QC2 in comparison to the true values was chosen as a measure of the intra- and between-day accuracy.

Matrix effect

The influence of the matrix on the performance of the method was studied using 5-MC solutions prepared at 10 nM and 100 nM. One set of each concentration contained only 5-MC dissolved in 0.0001% TFA in HPLC/MS-grade acetonitrile, whereas the other was spiked by the blank matrix solution and diluted by the same solvent. Each concentration level (matrix free and matrix spiked) was prepared three times and analysed under identical conditions in triplicate as described in Instrumentation and FIA. The matrix effect (ME) was expressed as the ratio of the areas of the [zwitterion 1 + 5-MC + H]⁺ complex obtained in matrix-spiked and matrix-free solutions.

Carryover

The carryover associated with the injection procedure was determined as the ratio of the complex peak area obtained for the blank matrix to the standard of 5-MC at 200 nM injected before the blank.

Results

The choice of the zwitterionic reagent

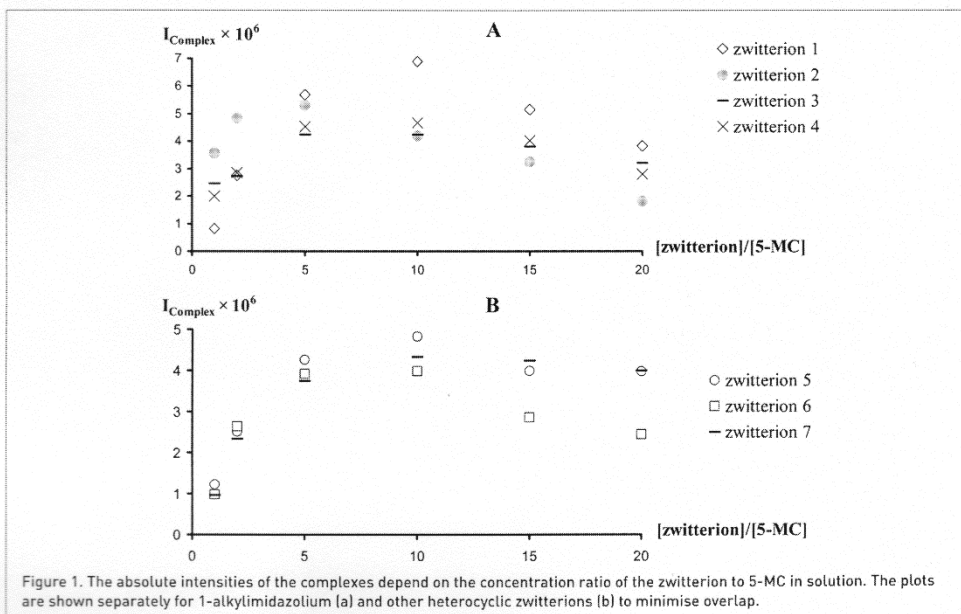
To achieve the highest sensitivity for 5-MC, the absolute signal intensity of the complex should be optimised. For this purpose we have synthesised a series of the zwitterions containing different heterocyclic moieties and the sulfonate group [see Scheme 1 and Table 1]. The absolute signal of the [zwitterion + 5-MC + H]⁺ complex was monitored by infusion of solutions with increasing concentration ratio of the zwitterion to 5-MC. The results of this procedure are represented by Figure 1 for imidazolium [A] and the zwitterions containing other heterocycles [B].

It can be seen that the highest absolute signal of the complex corresponds to zwitterion 1, which is achieved at the concentration ratio of 10. Increasing the concentration of zwitterion 1 further did not lead to an increase of the signal of its complex. Inversely, the decrease of the signal was observed. The reason for this can be attributed to competition between complex formation and the participation of the reagent in other processes like the formation of various oligomeric species

caused by the zwitterion at higher concentrations.²² The same behaviour was observed in case of other zwitterions all having a maxima for the complex signal intensity.

Comparison of the absolute signal values of the complexes leads to the conclusion that the differences among the zwitterions are not large. Thus, almost any zwitterion can be chosen as the *m/z* shift reagent for 5-MC without a dramatic loss of the sensitivity if the suppression limit is not exceeded. All the following work was carried out using zwitterion 1 as a reagent because of the slightly higher absolute signal of the corresponding complex. However, the choice of the reagent in a specific application will be dictated by the presence of the interferences in the sample matrix at a particular *m/z* value. If interference is observed, the zwitterion can be easily changed to form the complex at a different *m/z* value.

The mass spectrum of the complex formed between 5-MC and zwitterion 1 under conditions optimised for the analysis of real sample is presented in Figure 2. It is seen that the relative signal intensity of the complex at *m/z* 330 is higher than the original signal of 5-MC (*m/z* 126) demonstrating acceptable conversion. It should be mentioned that other nucleobases (adenine, guanine and cytosine) containing amidine moiety also formed the complexes with zwitterion 1. Thus, it was decided to maintain the concentration of the reagent equal to 100 μM as optimal [also taking into account the fivefold dilution of the reagent stream by the sample carrier stream after mixing].



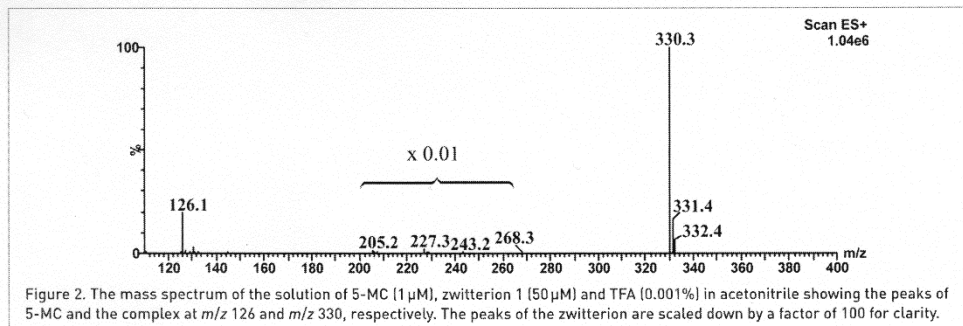


Figure 2. The mass spectrum of the solution of 5-MC (1 μM), zwitterion 1 (50 μM) and TFA (0.001%) in acetonitrile showing the peaks of 5-MC and the complex at m/z 126 and m/z 330, respectively. The peaks of the zwitterion are scaled down by a factor of 100 for clarity.

Method validation

Linearity range

Full validation of the present method has not been performed yet; however, some important parameters were determined. To evaluate the range of the linear response of the [zwitterion 1 + 5-MC + H]⁺ complex, the calibration curve was constructed in the range 0–1000 nM. The regression analysis of the obtained curve showed that the relationship between the area under the peak of the complex and the corresponding concentrations of 5-MC deviates from linearity at 200 nM, and can be expressed as a quadratic function [see Figure 3(a)]. This is possibly attributed to the change of the efficiency of

complex formation at levels larger than 200 nM because of the increased relative amount of 5-MC to other nucleobases.

In our opinion, if the DNA sample is processed as described in the DNA hydrolysis section, such high concentrations of 5-MC cannot be found even at very high methylation levels. Thus, it was decided to evaluate the linearity in a narrower range of concentrations corresponding to 0–200 nM. The fitting of different regression models has shown that this range can be described by a linear function with a very good coefficient of determination [see Figure 3(b)]. In addition, the analysis of the residuals for three repeated calibration curves in this range did not show any pattern, and thus excluded the non-linearity. To study the heteroscedasticity, the non-weighted and different-weighted [x^0 , $n = -2$ to $+2$] linear models were compared. As a result, non-weighted least-squares linear regression was chosen to adequately describe the experimental points.

It can be seen from Figure 3(b) that the calibration curve has a non-zero intercept. The injection of the blank matrix confirmed the presence of a small peak corresponding to m/z 330 (see Figure 4). The same peak also appeared at m/z 126 when the reagent was not added, confirming the presence of 5-MC. Taking into account the very basic nature of 5-MC this observation is not very surprising. Attempts to eliminate this peak by various washing procedures and other investigations were unsuccessful. As a result, the presence of this peak was accepted based on the following considerations: (a) the peak area for the blank matrix checked before and after the runs was constant during the whole validation process; (b) this peak is smaller than the peak corresponding to the LOQ sample; and (c) the intra- and between-day accuracy and precision of the LOQ sample are not influenced by the presence of this peak [see Accuracy and precision].

Sensitivity

The sensitivity of the method was studied in terms of the LOQ. For this purpose six blank matrix samples were injected in triplicate, and the standard deviation was determined. As a result, the LOQ for the current method obtained using equation (1) corresponds to 8 nM (1 pg) of 5-MC. The LOQ determined by this procedure has been confirmed by injection of

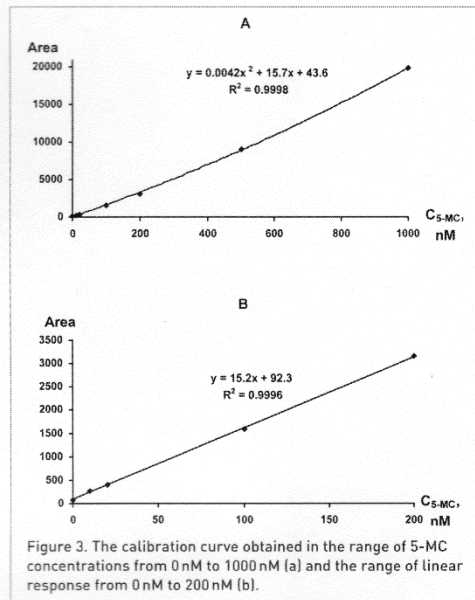


Figure 3. The calibration curve obtained in the range of 5-MC concentrations from 0 nM to 1000 nM (a) and the range of linear response from 0 nM to 200 nM (b).

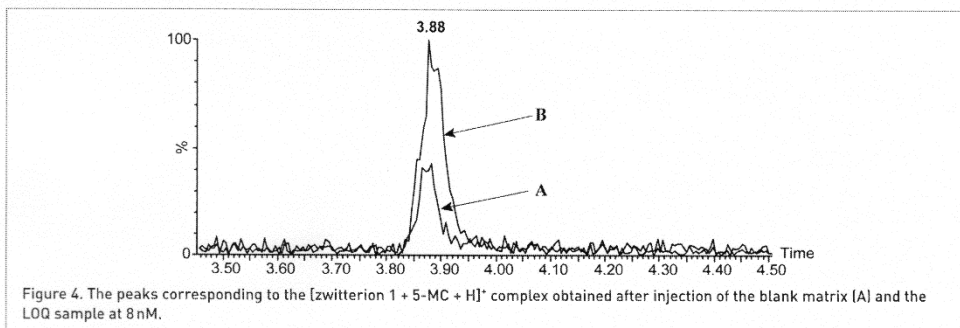


Figure 4. The peaks corresponding to the $[\text{zwitterion 1} + 5\text{-MC} + \text{H}]^+$ complex obtained after injection of the blank matrix (A) and the LOQ sample at 8 nM.

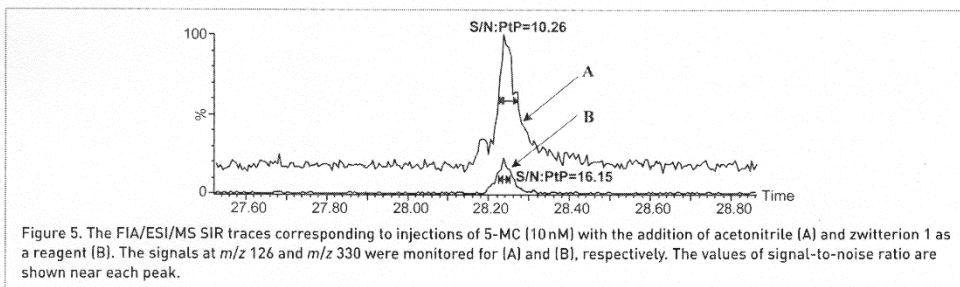


Figure 5. The FIA/ESI/MS SIR traces corresponding to injections of 5-MC (10 nM) with the addition of acetoneitrile (A) and zwitterion 1 as a reagent (B). The signals at m/z 126 and m/z 330 were monitored for (A) and (B), respectively. The values of signal-to-noise ratio are shown near each peak.

the standard containing 5-MC at this level (see Figure 4). Thus, it can be concluded that the value obtained by the method presented in this paper is comparable or lower than those for other HPLC/MS-, HPLC/MS/MS-, or gas chromatography/MS-based methods published for the assessment of DNA methylation.¹⁵⁻²⁰

An interesting question is whether the complexation changes the sensitivity in addition to selectivity of 5-MC detection. Two additional experiments were accomplished to answer this question. The first experiment was carried out when only acetoneitrile was added through the syringe instead of the zwitterion. In the second experiment a solution of the zwitterion 1 in acetoneitrile was added by the syringe pump. All the other conditions were the same including the concentration of 5-MC, which was 10 nM. The results of both experiments are represented in Figure 5. It can be seen that the absolute signal for 5-MC and the background level are both higher in the cases when the zwitterion was not added. On the other hand, the signal-to-background ratio increased by 1.6 times when the zwitterion was added. This leads to a slightly better sensitivity and also improves the quality of the integration process.

Accuracy and precision

The intra- and between-day accuracy and precision, as well as other statistical data obtained for the QC samples at the 10 nM and 100 nM levels are summarised in Table 2. As can be seen,

Table 2. The values of intra- and between-day accuracy (expressed as % error) and precision (expressed as CV).

Run	Statistical descriptor	Concentration of the QCs	
		10 nM	100 nM
Day 1	Mean ($n = 3$), nM	9.5	95
	SD, nM	0.80	2.9
	CV, %	8.4	3.1
	Accuracy, %	95	95
Day 2	Mean ($n = 3$), nM	11.1	101
	SD, nM	0.96	4.7
	CV, %	8.6	4.6
	Accuracy, %	111	101
Day 3	Mean ($n = 3$), nM	10.9	94
	SD, nM	0.64	3.7
	CV, %	5.9	4.0
	Accuracy, %	109	94
Between day	Mean ($n = 3$), nM	10.5	97
	SD, nM	0.88	3.7
	CV, %	8.3	3.9
	Accuracy, %	105	97

Table 3. The values of ME measured at two levels of 5-MC (10 and 100 nM)

	10 nM			100 nM		
	Mean (<i>n</i> = 3) peak area for clean solution	Mean (<i>n</i> = 3) peak area for matrix-containing solution	Matrix effect	Mean (<i>n</i> = 3) peak area for clean solution	Mean (<i>n</i> = 3) peak area for matrix-containing solution	Matrix effect
	176	187	1.1	1287	1575	1.2
SD	11	15		74	29	
CV, %	6.6	8.3		5.8	1.8	

the intraday precision was in the range 5.9–8.6% and 3.0–4.6% for the 10 nM and 100 nM levels, respectively. The between-day precision was 8.3% and 3.9% for the former and the latter levels, respectively. The intraday accuracies determined for the 10 nM level were in the range 95–111%. The values of the same descriptor obtained for the 100 nM level were in the range 94–101%. Finally, the between-day accuracy was 105% and 97% for the 10 nM and 100 nM levels, respectively. As a result, the accuracy and precision of the present method for both levels is in the limits of 85–115% and <15%, respectively, proposed by the European Medicines Agency (EMA) guidelines for bioanalytical methods of validation.²³

Matrix effect

The values of the absolute ME [see Table 3] obtained at 10 nM and 100 nM are 1.1 and 1.2, respectively. Thus, when other nucleobases are present in the sample, a slight comparable enhancement of the signal of the complex is observed ($ME > 1$) for both concentrations of 5-MC.

Carryover

The carryover has been evaluated by injection of the high-level standard at 200 nM followed by an immediate injection of the blank matrix sample. The resulting ratio of the area found for the blank matrix (corrected by the area of the blank injected before the standard) to that of the standard was 0.3%. Alternatively, this corresponds to 9.6% of the LOQ sample peak area. Thus, between-injection carryover is within the acceptable limit (<20% of the LOQ sample area) according to EMA guidelines.²³

The analysis of calf thymus DNA

To demonstrate the applicability of the method, we chose commercially available calf thymus DNA as a representative

sample. Initially, 2.5 µg of DNA was hydrolysed according to the method of Rossella *et al.*,²⁰ but the analysis of this sample revealed that a larger dilution (at least 100 times) is necessary to prevent overloading of the low-dispersion FIA system. As a result, the sample obtained after hydrolysis and evaporation was dissolved and diluted as described in the DNA hydrolysis section. Alternatively, the amount of DNA taken for hydrolysis can be decreased. This can be of great importance when the quantity of the sample is limited, e.g. in the field of microbiology.

The FIA/ESI/MS SIR trace of the sample corresponding to the signal of the complex of zwitterion 1 with 5-MC is depicted in Figure 6. The analysis was performed with a moderate speed of the injections, giving the opportunity for the analyte to completely leave the system. However, the speed of the analysis can be much increased if the injections follow immediately one after another. The amount of 5-MC determined after the two independent analyses of the DNA sample carried out over the two days corresponded to 13.2 ± 0.4 and 13.5 ± 0.8 ng in 2.5 µg DNA, respectively. The experimentally found quantities correspond to 6.7 mol% and 6.8 mol% of 5-MC to total cytosine and are close to the literature data for calf thymus DNA methylation levels detected by other methods, i.e. 6.5 mol%¹⁶ and 6.9 mol%.²⁴ Therefore, the method is applicable for the analysis of real DNA samples.

Conclusion

It has been shown that the association of sulfonate zwitterions with 5-MC can be utilised for the quantitative determination of 5-MC in a hydrolysed DNA sample. The sulfonate zwitterion can shift the *m/z* value of the low molecular weight

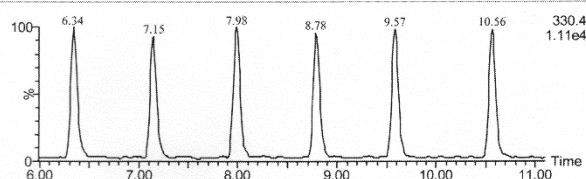


Figure 6. The FIA/ESI/MS trace showing the signal of the complex of 5-MC with zwitterion 1 [*m/z* 330] obtained for six sequential injections of calf thymus DNA sample.

analyte containing the amidine moiety to higher m/z values with the purpose to enhance the selectivity of the assay. A variety of zwitterionic structures can be easily prepared and tested in each particular case to achieve a high selectivity. The method developed, which is based on a combination of FIA and ESI-MS, is highly efficient, allowing the analysis of at least 50 samples per hour. In addition, it lessens the use of time and uses cost-effective procedures and instrumentation. The results demonstrate that 5-MC can be determined at low levels (LOQ = 1 pg), which allows a substantial decrease in the amount of the DNA sample needed for the analysis. The sensitivity of this approach is comparable to that of other methods utilising HPLC and tandem mass spectrometry. We hypothesise that this method could also be expanded for other amidine- (and guanidine-) containing compounds present in more complicated matrices than for 5-MC case. Investigations are currently ongoing.

Acknowledgements

This work was supported by the European Social Foundation (ESF), project Nr.1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/011. We also thank Elina Priede for checking the purity of DNA by UV spectroscopy.

References

1. M. Holčápek, R. Jirásko and M. Lísa, "Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques," *J. Chromatogr. A* **1259**, 3 (2012). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.072>
2. S. Gao, Z.-P. Zhang and H.T. Karnes, "sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives," *J. Chromatogr. B* **825**, 98 (2005). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.04.021>
3. F. Xu, Z. Li, Y. Liu, Z. Zhang and C. N. Ong, "Enhancement of the capabilities of liquid chromatography-mass spectrometry with derivatization: general principles and applications," *Mass Spectrom. Rev.* **30**, 1143 (2011). doi: <http://dx.doi.org/10.1002/mas.20316>
4. B.-L. Qi, P. Liu, Q.-Y. Wang, W.-J. Cai, B.-F. Yuan and Y.-Q. Feng, "Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry," *Trends Anal. Chem.* **59**, 121 (2014). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.013>
5. J. Ruzicka and E. Hansen, *Flow Injection Analysis*. Wiley, New York (1998).
6. H.J.W. Henderickx, P.C. Raemakers-Franken, S. van der Wal, C.G. de Koster, A.L.L. Duchateau and T. Sonke, "Flow injection analysis electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput screening of a gene library for amidase activity," *Anal. Biochem.* **394**, 159 (2009). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2009.07.018>
7. R.D. Smith and K.J. Light-Wahl, "The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: promise, pitfalls and prognosis," *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 493 (1993). doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bms.1200220902>
8. P.K. Martinelango, J.L. Anderson, P.K. Dasgupta, D.W. Armstrong, R.S. Al-Horr and R.W. Slingsby, "Gas-phase ion association provides increased selectivity and sensitivity for measuring perchlorate by mass spectrometry," *Anal. Chem.* **77**, 4829 (2005). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/ac050479j>
9. E.Z. Doddiba, S. Breitbach, E. Wanigasekara, T. Payagala, X. Zhang and D.W. Armstrong, "Detection of nucleotides in positive-mode electrospray ionization mass spectrometry using multiply-charged cationic ion-pairing reagents," *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 367 (2010). doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3949-4>
10. M. Stefansson, P.J.R. Sjöberg and K.E. Markides, "Regulation of multimer formation in electrospray mass spectrometry," *Anal. Chem.* **68**, 1792 (1996). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/ac950980j>
11. C. Xu, E.C. Pinto and D.W. Armstrong, "Separation and sensitive determination of sphingolipids at low femtomole level by using HPLC-PIESI-MS/MS," *Analyst* **139**, 4169 (2014). doi: <http://dx.doi.org/10.1039/c4an00775a>
12. A. Podjava, S. Kistkin, E. Ausekle, E. Priede, P. Mekss and A. Zicmanis, "Electrospray ionization mass spectrometry of non-covalent complexes formed between *N*-alkylimidazolium-containing zwitterionic sulfonates and protonated bases," *Eur. J. Mass Spectrom.* **20**, 467 (2014). doi: <http://dx.doi.org/10.1255/ejms.1303>
13. R.L. Momparler and V. Bovenzi, "DNA methylation and cancer," *J. Cell. Physiol.* **183**, 145 (2000). doi: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200005\)183:2<145::AID-JCP1>3.0.CO;2-V](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200005)183:2<145::AID-JCP1>3.0.CO;2-V)
14. M.F. Fraga and M. Esteller, "DNA methylation: a profile of methods and applications," *BioTechniques* **33**, 632 (2002).
15. C.-W. Hu, H.-H. Liu, Y.-J. Li and M.-R. Chao, "Direct analysis of 5-methylcytosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in human urine by isotope dilution LC-MS/MS: correlations with *N*-methylated purines and oxidized DNA lesions," *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 462 (2012). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/tx2004954>
16. R.M. Kok, D.E.C. Smith, R. Barto, A.M.W. Spijkerman, T. Teerlink, H.J. Gellekink, C. Jakobs and Y.M. Smuiders, "Global DNA methylation measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analytical technique, reference values and determinants in healthy subjects," *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 903 (2007). doi: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2007.137>
17. J.-J. Zhang, L. Zhang, K. Zhou, X. Ye, C. Liu, L. Zhang, J. Kang and C. Cai, "Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Anal.*

- Biochem.* **413**, 164 (2011). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.029>
18. K. Wrobel, A. Lopez Torres, E. Yanez Barrientos and K. Wrobel, "Selective derivatization of cytosine and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for sub-microgram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection," *Anal. Chem.* **83**, 7999 (2011). doi: <http://dx.doi.org/10.1021/ac2020799>
 19. A.S. Romero, G. Fiorillo, I. Terruzzi, P. Senesi, G. Testolin and A. Battezzati, "Measurement of DNA methylation using stable isotope dilution and gas chromatography–mass spectrometry," *Anal. Biochem.* **336**, 158 (2005). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.034>
 20. F. Rossella, E. Polledri, V. Bollati, A. Baccarelli and S. Fustinoni, "Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the assessment of genomic DNA methylation," *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 2637 (2009). doi: <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.4166>
 21. M. Yoshizawa, M. Hirao, K. Ito-Akita and H. Ohno, "Ion conduction in zwitterionic-type molten salts and their polymers", *J. Mater. Chem.* **11**, 1057 (2001). doi: <http://dx.doi.org/10.1039/b101079o>
 22. I. Nakurte, P. Mekss, K. Klavins, A. Zicmanis, G. Vavilina and S. Dubrovina, "Collision-induced dissociation of imidazolium-based zwitterionic liquids," *Eur. J. Mass Spectrom.* **15**, 471 (2009). doi: <http://dx.doi.org/10.1255/ejms.997>
 23. European Medicines Agency. *Guideline on Bioanalytical Method Validation*, revision 1, corr. 2, 2011. Available online: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
 24. E. Falck, A. Groenhagen, J. Mühlisch, G. Hempel and B. Wünsch, "Genome-wide DNA methylation level analysis by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection after treatment of cell lines with azacytidine and antifolates," *Anal. Biochem.* **421**, 439 (2012). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.09.027>