

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**ELEKTROIZSMIDZINĀŠANAS JONIZĀCIJAS APSTĀKĻU
IETEKME UZ NEKOVALENTU STRUKTŪRU VEIDOŠANOS
STARP 5-METILCITOZĪNU UN DAŽĀDIEM CVITERJONU
TIPA SAVIENOJUMIEM.**

BAKALaura DARBS

Autori: **Svjatoslavs Kistkins**

Stud. apl.Nr SK11364

Darba vadītājs: doktorants Antons Podjava

RĪGA

2014

KOPSAVILKUMS

Elektroizsmidzināšanas jonizācijas apstākļu ietekme uz nekovalento struktūru veidošanos starp 5-metilcitozīnu un dažādiem cviterjonu tipa savienojumiem. Kistkins S., zinātniskais vadītājs doktorants Podjava A. bakalaura darbs. 41 lappuses, 23 attēli, 3 tabulas, 32 literatūras avoti. Latviešu valodā.

CVITERJONU TIPA SAVIENOJUMI, 5-METILCITIZĪNS,
TANDEMMASSEKTROMETRIJA, SADURSMJU INDUCĒTĀ DISOCIĀCIJA,
NEKOVALENTĀ STRUKTŪRA

Darbā izpētīta cviterjonu tipa savienojumu koncentrācijas, kapilāra, konusa un ekstraktora spriegumu, kā arī sadursmju enerģijas ietekme uz nekovalentās struktūras veidošanos starp 5-metilcitozīnu kā arī pirmējo, otrējo un aromātisko amīnu un 3-(1-alkil-3N-imidazolio)-1-propānsulfonātu (alkil - metil, butil, heksil, oktil), 3-(1-hinolinio)-1-propānsulfonātu, 3-(3N-tiazolio)-1-propānsulfonātu, 3-(1-piridinio)-1-propānsulfonātu, 4-(1,2-dimetil-3N-imidazolio)-1-butānsulfonātu un 3-(1-metil-3N-imidazolio)-butānkarboksilātu. Paralēli tika pārbaudīta šķīdinātāja (acetonitrils, metanols un ūdens) sastāva ietekme uz 5-metilcitozīnu un dažiem cviterjona tipa savienojumiem.

ABSTRACT

Influence of electrospray ionization conditions on the formation of non-covalent structures between 5-methylcytosine and different zwitterionic compounds. Kistkin S., supervisor Ph.D. student Podjava A. Bachelor's thesis research project in physical chemistry 41 pages, 23 pictures, 3 table, 32 references. In Latvian.

ZWITTERIONIC COMPOUNDS, 5-METHYLCYTOSINE, TANDEM MASS SPECTROMETRY, COLLISION INDUCED DISSOCIATION, NON-COVALENT STRUCTURE

In this thesis the influence of the concentration of zwitterionic compound, capillary, cone and extractor voltages and collision energy on the formation of non-covalent structures between 5-methylcytosine and 3-(1-alkyl-3N-imidazolio) -1-propanesulfonate (alkyl - methyl, butyl, hexyl, octyl), 3-(1-quinolinio) -1-propanesulfonate, 3-(3N-thiazolio) -1-propanesulfonate, 3-(1-pyridinio) -1-propanesulfonate, 4-(1,2-dimethyl-3N-imidazolio)-1-butanefulfonate and 3-(1-methyl-3N-imidazolio)-butanecarboxylate has been studied. Also the influence of the solvent (acetonitrile, methanol, water) composition on the non-covalent complex between 5-methylcytosine and some zwitterionic compounds has been tested.

РЕФЕРАТ

Влияние условий электрораспыления на образование нековалентных структур между 5-метилцитозином и различными соединениями цвиттер ионного. С. Кисткин, Научный руководитель докторант. А. Подява. Бакалаврская работа. 41 страниц, 23 изображения, 3 таблицы, 32 источников. На Латышском.

СОЕДИНЕНИЯ ЦВИТТЕР-ИОННОГО ТИПА, 5-МЕТИЛЦИТОЗИН, ТАНДЕМНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ, ДИССОЦИАЦИЯ, ИНДУЦИРОВАННАЯ СТОЛКНОВЕНИЯМИ, НЕКОВАЛЕНТНАЯ СТРУКТУРА

В работе изучено влияние концентрации соединений цвиттер-ионного типа , напряжения капилляра, конуса и экстрактора и энергии соударений на образование нековалентной структуры между 5-метилцитозином и 3-(1-алкил-3N-имидазолио) -1-пропансульфонатом (алкил - метил, бутил, гексил, октил), 3-(1-хинолинио) -1-пропансульфонатом, 3-(3N-тиазолио) -1-пропансульфонатом, 3-(1-пиридилио) -1-пропансульфонатом, 3-(1,2-диметил-3N-имидазолио) -1-бутансульфонатом и 3-(1-метил-3N-имидазолио) -1-бутанкарбоксилатом. Паралельно было проверено влияние состава растворителя (ацетонитрил, метанол, вода) на образование нековалентной структуры между 5-метилцитозином и некоторыми соединениями цвиттер-ионного типа

SATURS

IEVADS.....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	8
1.1. Tandēmmasspektrometra uzbūve.....	8
1.1.1. Elektroizsmidzināšanas jonizācija.....	8
1.1.2. Sadursmju inducētā disociācija.....	9
1.2. Nekovalento struktūru veidošanās elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā.....	10
1.2.1. Konusa sprieguma ietekme uz nekovalento struktūru stabilitāti gāzes fāzē.....	10
1.2.2. Sadursmes enerģijas ietekme uz nekovalento struktūru stabilitāti gāzes fāzē.....	11
1.2.3. Šķīdinātāja izvēle.....	11
1.2.4. Analīta pKa un šķīdinātāja pH loma.....	12
1.2.5. Analīta virsmas aktivitātes efekts EIJ eksperimentos.....	13
1.3. Faktori, kas traucē kompleksu veidošanai elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā.....	13
1.3.1. Matricas efekti.....	13
1.3.2. Signāla piesātināšana lielas analīta koncentrācijas gadījumā.....	13
1.3.3. Aduktu veidošanās.....	14
1.4. Cviterjonu tipa savienojumu fragmentācija sadursmju inducētās disociācijas apstākļos.....	14
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA.....	16
2.1. Izmantotie reaģenti un šķīdinātāji.....	16
2.2. Izmantotā aparatūra.....	16
2.3. Darba gaita.....	17
2.3.1. 4-(1-Metilimidazolijs)-butān-1-karboksilāta sintēze.....	17
2.3.2. Masspektrometriskie eksperimenti.....	18
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS.....	22
3.1. Pievienotā cviterjonu tipa savienojuma koncentrācijas ietekme uz 5-metilcitozīna kompleksa signāla intensitāti.....	22
3.2. Pievienotā cviterjonu tipa savienojuma koncentrācijas ietekme uz pirmējā, otrējā un aromātiskā amīna kompleksa signāla intensitāti.....	25
3.3. Šķīdinātāja ietekme.....	29
3.4. Konusa un ekstraktora spriegumu piemeklēšana.....	31
3.5. Kompleksu fragmentācija pozitīvo jonu skenējumā.....	34
SECINĀJUMI.....	37
LITERATŪRAS SARAKSTS.....	38

SAĪSINĀJUMI

ACN – acetonitrils

EIJ – elektroizsmidzināšanas jonizācija

EIJ+ – pozitīvā elektroizsmidzināšanas jonizācija

EIJ- – negatīvā elektroizsmidzināšanas jonizācija

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

GC-MS – gāzu hromatogrāfija-masspektrometrija

GDP – guanozīna difosfāts

HPLC – augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija

LC-MS – šķidrumu hromatogrāfija-masspektrometrija

MeOH - metanols

MS – masas analizators

5-MetC – 5-metilcitozīns

Cvit – cviterjona tipa savienojums

SID – sadursmju inducētā disociācija

IEVADS

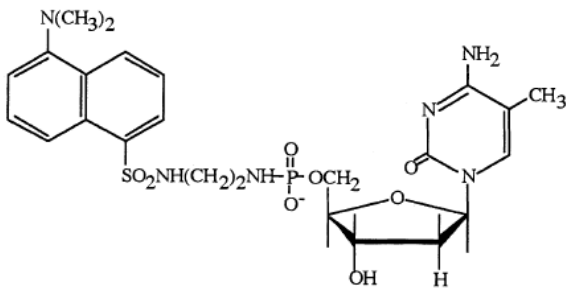
Masspektrometrijā plaši tiek izmantota parauga derivatizācija fizikālo un ķīmisko īpašību uzlabošanai. Mainās ne tikai parauga molmasa, bet arī gaistamība, termāla stabilitāte, virsmas aktivitāte, jonizācija vai arī uzlabojas spēja fragmentēties savienojumiem, kuru fragmentācija ir apgrūtināta [1]. Pārsvārā izmanto ķīmiskos derivatizācijas reaģentus, kuri veido kovalento saiti ar analīta molekulu. Piemēram, gāzu hromatogrāfija, polāras grupas sililē, samazinot vielas polaritāti un paaugstinot vielas gaistamību. LC-MS gadījumā, analīta jonizācijas efektivitātes un fragmentācijas spējas palielināšanai izmanto vairākus derivatizācijas reaģentus. Tie satur grupas, kas spēj stabilizēt pozitīvo, vai negatīvo lādiņu, piemēram, benzofurazāna, alkilamonija un ferocēna, grupas. Tomēr kovalentās derivatizācijas procesā var saskarties ar dažiem trūkumiem: palielināts analīzes laiks, nepilnīgi derivatizācijas reakcijas iznākumi, stingra reakcijas apstākļu kontrole, papildus operācijas pirms analīzes (piemēram, derivatizācijas reaģenta pārākuma izolēšana, šķīdinātāja maiņa utt.).

Nesen Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes hromatogrāfijas un masspektrometrijas laboratorijā veiktajos eksperimentos [2] novēroja, ka dažādi imidazolija un citu heterociklu saturošie cviterjonu tipa savienojumi elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā spēj veidot nekovalenti saistītas struktūras ar 5-metilcitozīnu. Tas nozīmē, ka šādu nekovalento struktūru veidošanos eksperimenta gaitā varētu izmantot analītiskiem mērķiem, piemēram, 5-metilcitozīna noteikšanai dažādos bioloģiskās izcelsmes objektos.

5-metilcitozīns (5-mCyt) ir viena no pirimidīna bāzēm, kas ietilpst DNS molekulas sastāvā, gan prokariotiem, gan eikariotiem un organismā darbojas kā gēnu inaktīvētājs.

Pēc 5-mCyt atklāšanas, pētnieciskajos darbos tika salīdzināti 5-mCyt izkārtojums un daudzums DNS molekulā veselam cilvēkam un vēža slimniekam. Starp tiem izšķir 2 veidus, kā metilēšana un demetilēšana var piedalīties onkoloģisko slimību iniciēšanā: vēža genoma hipometilēšana, gēna-supresora hipermetilēšana un tiešā mutācija. No tā seko, kā 5-mCyt koncentrācijas izmaiņa regulē gēnu ekspresiju, kuri savukārt regulē organisma metabolismu.

Daudzās publikācijās 5-mCyt noteikšanai izmanto apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfiju [2,3] ar UV detektoru, tomēr to trūkums bija salīdzinoši liela parauga masa (0,5-1 µg DNS hidrolizāta), zemas UV-detektora jutības dēļ. Ar fluorimetrisko detektoru parauga masu pazemināja līdz 0,1 µg derivatizējot 5-metil 1,2'-deoksicitidīna monofosfātu ar N-(danzil)-etilēn diamīnu. (skat. 1. att.)



1. att. 5-metil-1,2'-deoksicitidīna monofosfāta derivatizācijas produkts [4]

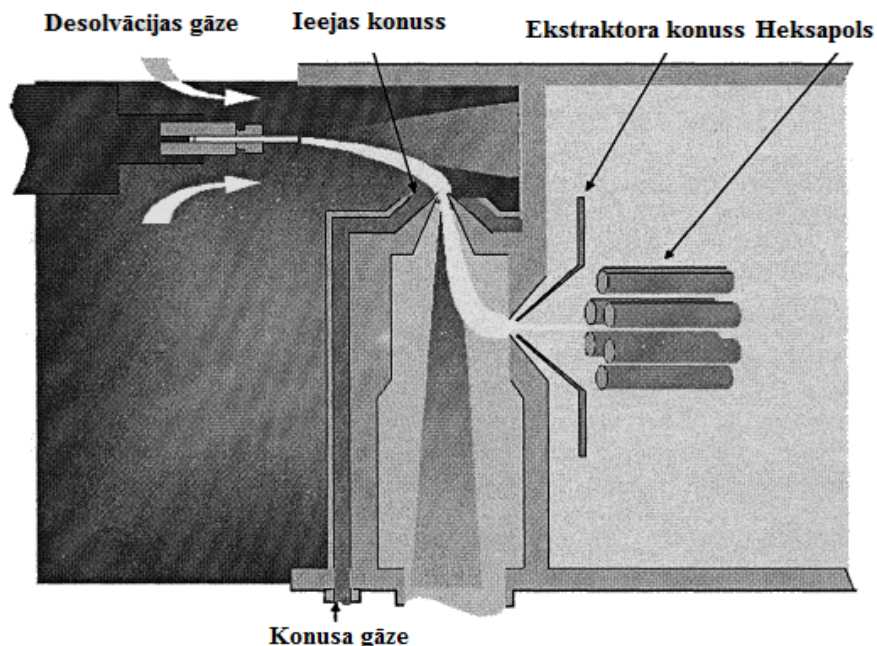
Izmantojot gan HPLC ar UV-detektoru [3] un fluorescences [4], gan GS-MS [5] tika iegūtas 5-metilcitozīna/citozīna attiecība dzīvniekiem un augiem. Izrādās, ka veselā dzīvnieka DNS molekulā 5-metilcitozīna daļa attiecībā pret citozīnu variē no 3-8% [3,5] atkarība no dzīvnieka orgāna. Turpretim augos, piemēram, tabaka BY-2 šūnās, attiecībā palielinājās līdz 35-40%. [4] No augstāk pateiktā izriet, ka 5-metilcitozīns ir svarīgs biomarķieris, un tā daudzuma izmaiņas var norādīt uz dažādām slimībām.

Šī darba mērķis ir izpētīt, kā dažādi elektroizsmidzināšanas parametri, cviterjona tipa savienojumu koncentrācija un šķīdinātāja sastāvs ietekmē amīnu (5-metilcitozīns, heksilamīns, piperidīns, piridīns) un cviterjonu tipa savienojumu nekovalenti saistīto struktūru stabilitāti. Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojošie darba uzdevumi:

1. Sintezēt cviterjonu tipa savienojumus, kuri satur propānsulfonāta, butānsulfonāta vai butānkarboksilāta funkcionālas grupas un dažādus slāpekļa heterociklus.
2. Pārbaudīt cviterjonu tipa savienojuma un 5-metilcitozīna koncentrācijas attiecības ietekmi uz kompleksa veidošanos.
3. Pārbaudīt cviterjonu tipa savienojuma un pirmēja, otrēja un aromātiskā amīna koncentrācijas attiecības ietekmi uz kompleksa veidošanos.
4. Pārbaudīt šķīdinātāja sastāva ietekmi uz cviterjonu tipa savienojuma un 5-metilcitozīna kompleksa veidošanos
5. Piemeklēt un salīdzināt sprieguma vērtības, pie kurām nekovalenti saistītā kompleksa signāla intensitāte ir maksimāla.
6. Izpētīt un salīdzināt iegūtā kompleksa fragmentāciju SID apstākļos.

šķīdinātājus ar zemu viskozitāti, augstu viršanas temperatūru un virsmas spraigumu, piemēram, metanolu, acetonitrilu un to maisījumus ar ūdeni.

Pārsvārā izmanto Z veida izsmidzināšanu, lai novērstu kapilāra un konusa aizsprostošanos (sk. 1.2. att.) .



1.2. att. Z veida elektroizsmidzināšanas shēma [7]

EIJ var efektīvi izmantot lielmolekulāro savienojumu pētīšanai (līdz 150000 Da). Tā kā joniem, kuri tiek iegūti elektroizsmidzināšanas procesā, ir mazāka enerģija nekā tiem, kuri tiek iegūti elektrontrieciena jonizācijas gaitā, to fragmentācija praktiski nenotiek un masspektā redzamas protonētās molekulas (ja strādā pozitīvo jonu skenējumā) $[M+nH]^{n+}$ un molekulu adukti $[M+nNa]^{n+}$, $[M+nK]^{n+}$ un citi. Lai notiktu fragmentācija, izmanto tandemmasspektrometriju.

1.1.2. Sadursmju inducētā disociācija

Kā jau tika minēts, starp diviem masas analizatoriem (kvadrapoliem) atrodas sadursmju šūna, kur notiek jonu fragmentācija. Sadursmju šūnas telpā atrodas inertas gāzes molekulas (slāpeklis, argons, hēlijs). Joniem, kuri nonāk sadursmju šūnā, ir liela kinētiskā enerģija. Gadījumā, kad jons sadurās ar inertās gāzes molekulu, jonu iekšējā enerģija tiek paaugstināta. Iekšējās enerģijas palielināšanas rezultātā, jons spēj fragmentēties. Tiešās un apgrieztās ģeometrijas magnētisko analizatoru lietošana ļauj izpētīt augstās enerģijas

fragmentācijas procesus (6-8 KeV), bet divu kvadrapolu tipa instrumenti tiek izmantoti zemas enerģijas fragmentācijas pētīšanai (0-100 eV) [8].

Fragmentāciju ietekmē arī spiediens un gāzes izvēle. Jo lielāks ir spiediens, jo lielāks ir fragmentētu skaits, jo palielinās jona un gāzes molekulas sadursmes varbūtība. Jo smagāka ir gāze, jo efektīvāk notiek fragmentācija.

1.2. Nekovalento struktūru veidošanās elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā

Ar masspektrometriju plaši pēta nekovalento struktūru veidošanos. Šādas struktūras var veidoties natīvajos apstākļos, piemēram, dzīvajos organismos, vai arī noteikta liganda pievienošanās rezultātā konkrētajam substrātam [9-17]. Pārsvarā literatūrā tiek apskatīta lielmolekulāro kompleksu veidošanas [10-15]. Tie var būt enzīms/substrāts [10], proteīns/ligands [11], proteīns/proteīns [12], antigēns/antiviela [13], kā arī citi. Piemēram, hepatīta C vīruss [14] ir proteīna/metāla/peptīda komplekss un, lai saprastu slimības patogēnēzi, nepieciešams noskaidrot, kāda ir nekovalentā kompleksa struktūra un veidošanās mehānisms.

Literatūra aprakstītas arī mijiedarbības starp nelielām molekulām [16-17]. Tās bieži izmanto, lai kvantitatīvi vai kvalitatīvi noteiktu konkrētu analītu dažādos objektos. Piemēram, nukleotīdu [16], vai perhlorāta [17] mijiedarbība ar katjonu tipa jonu pāru reaģentiem. Nukleotīdu sastāvā ietilpst negatīvi lādētas fosfāta grupas, kuras tāpat kā perhlorāta anjonus ir vieglāk analizēt negatīvo jonu skenējumā.

Viens no EIJ- trūkumiem ir elektronu veicināta gāzes izlāde, kuras sekas – dzirksteļošana. Tā izraisa šķīdinātāja molekulu ķīmisko jonizāciju, nevēlamās gāzes fāzes reakcijas, palielina ķīmiskā un elektriskā fona līmeni un var negatīvi ietekmēt analīzes atkārtojamību. Šī iemesla dēļ, perhlorāta vai oligonukleotīdu analīzes gaitā kustīgai fāzei pievienoja organiskos polikatjonus. Rezultātā polikatjoni veido pozitīvi lādētos kompleksus ar augstāk minētām vielām un analīzi var veikt pozitīvo jonu skenējumā. Visstabilākos kompleksus ar anjoniem veido dikatjoni, trikatjoni un tetrakatjoni, kas satur 1-alkilimidazolijs funkcionālās grupas.

1.2.1. Konusa sprieguma ietekme uz nekovalento struktūru stabilitāti gāzes fāzē

Strādājot ar EIJ, konusa spriegums vienmēr paliek pie zemām vērtībām, jo tas tieši ietekmē kompleksa stabilitāti. Pie lielajām sprieguma vērtībām palielinās arī kompleksa iekšēja enerģija, jo tas spēj sadurties ar desolvācijas gāzes molekulām, kuras vienmēr atrodas elektroizsmidzināšanas jonu avota atmosfēras spiediena reģionā. Konusa sprieguma efekts ir

atkarīgs no tās saites enerģijas, kurā veido kompleksu. Piemēram, ras-GDP komplekss ir relatīvi stabils, jo disociācija nenotiek līdz sprieguma vērtība sasniedz 120 V [10]. Tomēr, pie ļoti zema sprieguma, var veidoties citi kompleksi ar citām molekulām, kuriem saites enerģija ir zemāka. Piemēram, dimēru un oligomēru veidošanas, vai mijiedarbība ar šķīdinātāja molekulām. Tāpēc konkrētajā gadījumā operatoram jāpiemeklē optimālā konusa sprieguma vērtība, lai jutība būtu maksimāla.

1.2.2. Sadursmes enerģijas ietekme uz nekovalento struktūru stabilitāti gāzes fāzē

Gāzes fāzes labilitāte ir otrais parametrs, kuru var izmatot nekovalentās saites stipruma noteikšanā. Tas var būt sasniegts, palielinot sadursmju enerģiju tandemmaspektrometrijas eksperimentos. Pārsvārā, nespecifiskie kompleksi disociē vieglāk nekā specifiskie. Turpretim, nukleīnskābju kompleksi, kuros pastāv daudz nekovalento mijiedarbību ar otru partneri, var eksistēt pat pie tādām sadursmju enerģijas vērtībām, pie kurām sabrūk kovalentas saites. [18] Šo parādību var izmantot analītiskajos mērķos, jo kompleksam sabrūkot, tas fragments satur tikai protonēto molekulu, kura vēl nespēj sabrukt fragmentos.

1.2.3. Šķīdinātāja izvēle

Viens no svarīgākajiem faktoriem ir šķīdinātāja izvēle. No visam īpašībām ir vērts apskatīt šķīdinātāja virsmas spraigumu, gaistamību un dielektrisko konstanti.

Kā jau tika minēts iepriekš, lai notiktu pilienā „sprāgšana”, Kulona atgrūšanas spēkam ir jābūt lielākam par virsmas spraigumu. Šo situāciju var aprakstīt ar Releja vienādojumu:

$$V_{rl} = 8\pi\sqrt{\varepsilon_0\gamma R} \quad (1.1)$$

Kur V_{rl} – pievienotājs spriegums, V

ε_0 – dielektriskā konstante $J^{-1}\cdot m^{-1}\cdot C^2$;

R – piliena rādiuss, m.

γ – virsmas spraigums J/m^2

Acetonitrila, metanola un ūdens virsmas spraigumi [19-20] pie 25°C ir attiecīgi 29,25 mN/m, 22,76 mN/m un 71,96 mN/m, kas savukārt liecina par to, ka, lietojot organiskus šķīdinātājus, ir jāpievieno mazāks kapilāra spriegums, lai sasniegtu Releja robežu. Turpretim, strādājot ar ūdeni, ir jāpievieno lielākais konusa un kapilāra spriegums, kas savukārt var izraisīt nekovalentā kompleksa sabrukšanu. Kad notiek desolvācija, jo lielāka ir šķīdinātāja gaistamība, jo mazāki kļūst pilieni, kas, protams, palielina aparāta jutību.

Runājot par nekovalentām mijiedarbībām, ir vērts apskatīt arī šķīdinātāja dielektrisko konstanti. Ja divas molekulas satur lādiņus, tad mijiedarbības var aprakstīt ar Kulona likumu:

$$E_k = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi \epsilon_0 \epsilon r} \quad (1.2)$$

kur Q_1 un Q_2 – lādiņa lielums, C;

ϵ – vides dielektriskā caurlaidība;

ϵ_0 – dielektriskā konstante $J^{-1} \cdot m^{-1} \cdot C^2$;

r – attālums starp lādiņiem, m.

Tomēr, ja runa ir par divu molekulu dipola momentiem (u_1 un u_2), tad stājas spēkā Van der Valsa mijiedarbības.

$$E_k = \frac{u_1 u_2}{3(4\pi \epsilon_0 \epsilon)^2 k T r^6} \quad (1.3)$$

kur u_1 un u_2 – divu molekulu dipola momenti, C/m;

ϵ – vides dielektriskā caurlaidība;

ϵ_0 – dielektriskā konstante $J^{-1} \cdot m^{-1} \cdot C^2$;

r – attālums starp lādiņiem, m;

T – temperatūra, K;

k – Bolcmaņa konstante, J/K.

Kā var redzēt, jo lielāka videi ir dielektriskā konstante, jo mazāka ir mijiedarbības enerģija. Piemēram, ūdenim un acetonitrilam ir atbilstoši $\epsilon=79$ un $\epsilon=38$. Tas liecina par to, ka, mainot ūdeni uz acetonitrilu, Kulona mijiedarbības enerģija palielinās divas reizes, bet Van der Valsa mijiedarbības enerģija – četras reizes.

1.2.4. Analīta pKa un šķīdinātāja pH loma

Tā ka EIJ jonizācijas process ietver sevī molekulas protonēšanu un deprotonēšanu, var likties, ka analīta funkcionālo grupu pKa vērtībām ir svarīga nozīme. Proti, ka protonēšana notiek vieglāk, ja analīts ir bāzisks, un deprotonēšana notiek, ja analīts ir skābs. Tāpēc bāzisko analītu EIJ analīzēs pH ir zems, bet skābo – augsts. Tomēr, bāziskā analīta protonēto formu var novērot pat ja EIJ analīzēs tiek izmantots bāziskāks šķīdums (šķīduma pH ir lielāks nekā analīta pKa). [21]

To izskaidro ar šķīduma plūsmas ātrumu un konusa spriegumu. Pozitīvo jonu skenējumā protonu šķīdinātājos rodas pārpalikuma lādiņš, kuru veido protoni, kuri savukārt atrodas pilienu virsmā un protonē analīta molekulas, pat ja analīta pKa ir zemāks nekā šķīduma pH.

1.2.5. Analīta virsmas aktivitātes efekts EIJ eksperimentos

Kā jau iepriekš tika minēts, pilieni, samazinoties izmēros, kļūst stipri lādēti, rezultātā tie sadalās uz maziem pilieniem. Jo lielāka ir tieksme analītam aizņemt pilienu virsmu, jo lielāks ir EIJ signāls. Tā ka uz pilienu virsmas veidojas pārpalikuma lādiņš, protonējas tā viela, kura aizņem pilienu virsmu. [22]

Turpretim vielas ar zemu virsmas aktivitāti atrodas pilienu iekšienē, kur lādiņš ir neitrāls, un to signālu intensitāte ir ievērojami zemāka. Tomēr, signālu var uzlabot, izmantojot nanoizsmidzināšanu, kas krietni palielina pilienu virsmas/tilpuma attiecību.

1.3. Faktori, kas traucē kompleksu veidošanai elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā

1.3.1. Matricas efekti.

Par matricas efektu sauc izmaiņas analīta jonizācijas procesā citu šķīdumā esošo savienojumu dēļ. Tas var gan uzlabot, gan arī nomākt jonizāciju un bez šaubām ietekmē analīzes precizitāti un jutību.

EIJ gadījumā, jonizācijas process notiek šķīdrajā fāzē, un matricas efekts izpaužas analīta un matricas komponentu konkurencē par pieeju pilienu virsmai. Turklāt matricas komponenti var mainīt eluenta viršanas temperatūru, virsmas spraigumu un viskozitāti – visus faktorus, kuri spēj ietekmēt jonizācijas procesu.

1.3.2. Signāla piesātināšana lielas analīta koncentrācijas gadījumā.

Signāla piesātināšana ietver sevī 3 gadījumus: lādiņa pārpalikuma ierobežotais daudzums; ierobežotais pilienu virsmas laukums; signāla apspiešana vai kompensācija.

Tā kā pārpalikuma lādiņš ir noteikts lielums, kas ir atkarīgs no konusa sprieguma, plūsmas ātruma un šķīdinātāja elektrovadāmības, analīta koncentrācijai kļūstot lielākai par pārpalikuma lādiņa koncentrāciju, EIJ atbilde samazināsies. Otrajā gadījumā pārāk liela analīta koncentrācija pilnīgi aizņem pilienu virsmu, kas gala rezultātā izraisa ne tikai signāla apspiešanu, bet arī oligomēru veidošanos. Trešajā gadījumā apspiešana notiek divu vielu konkurences dēļ. Konkurence var arī izlabot signālu, atkarībā no analīta virsmas aktivitātes. Pievienojot solvofīlo reaģentu, virsmas aktīva viela „izspiežas” no pilienu iekšienes un ar lielāko varbūtību aizņem pilienu virsmu, kur pastāv lādiņa pārpalikums.

1.3.3. Aduktu veidošanās.

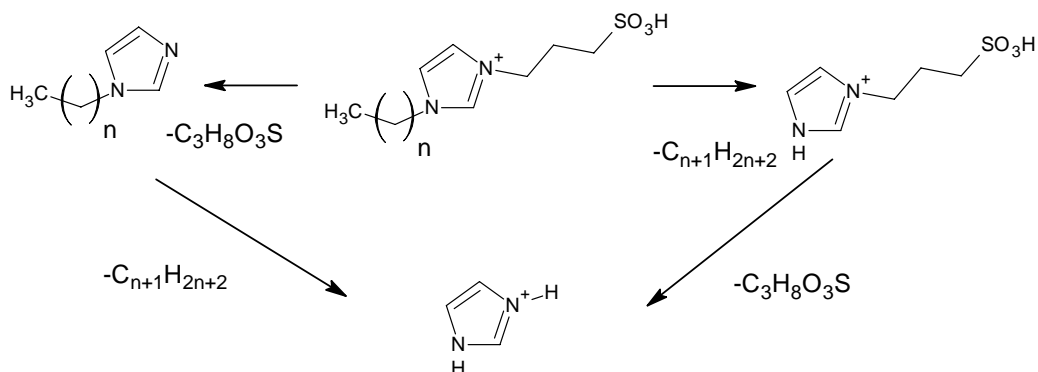
Elektroizsmidzināšanas jonizācijas gaitā joni pārsvarā veidojās šķīdumā, tāpēc šķīdinātāja sastāvs ietekmē analīta dažādu formu sadalījumu šķīdumā. Ideālajā gadījumā, kad analizējamais šķīdums pagatavots no dejonizētā ūdens ($R=18\text{ M}\Omega$) un tam pievienota skābe, šķīdumā pārsvarā būs protonētas analīta molekulas $[M+H]^+$. Rezultātā masspektrā būs redzamas tikai tām atbilstošas līnijas ar $m/z = [M+H]^+$. Reālajā gadījumā, kad paraugs saskaras ar jebkurām stikla virsmām, tajā spēj pāriet nātrija un kālija joni, un analīts veidos ne tikai $[M+H]^+$ formu, bet arī $[M+Na]^+$ un $[M+K]^+$. Pēdējās divas formas dažreiz var dominēt šķīdumā, piemēram, tad, kad analīzei izmanto netīrus reaģentus un ūdeni. Rezultātā, analīta jonu strāva sadalīsies vairākās formās, un analīzes jutība krietni samazināsies.

Tā kā tas traucē kvantitatīvai noteikšanai, izmanto dažas pieejas [23], lai sekmētu tikai viena adukta veidošanos:

- 1) Adukta jona pievienošana (μM daudzumos), lai apspiestu citu formu rašanos. Šāda metode var izraisīt jonu avota un lecu sistēmas piesārņojumu ar pievienotā sāls izgulsnēšanos.
- 2) Krauna ēteru pievienošana, kuri veido stabilus kompleksus ar metālu katjoniem. Tomēr, attīrīt pilnībā no Na^+ un K^+ joniem ir smags darbs, jo tie atrodas stiklā, ka arī analizējama parauga un šķīdinātāja piemaisījumos.
- 3) Skābes pievienošana, lai veicinātu $[M+H]^+$ veidošanos. Tomēr ir jāizmanto gaistošās organiskās skābes (HCOOH , CH_3COOH) ar zemu jonu pāru veidošanas efektu, nevis neorganiskās skābes un organiskās sulfonskābes, kurām ir izteikts jonu pāru veidošanas efekts.
- 4) Palielināt konusa spriegumu. Pie augstām sprieguma vērtībām, ka jau tika minēts, notiek nekovalenta kompleksa destabilizācija un sabrukšana. Stipri palielināt konusa spriegumu var tikai tad, kad tiek izmantots tīrs analīta šķīdums vai analīta kompleksa stabilitāte ir ievērojami augstāka nekā aduktam.

1.4. Cviterjonu tipa savienojumu fragmentācija sadursmju inducētās disociācijas apstākļos.

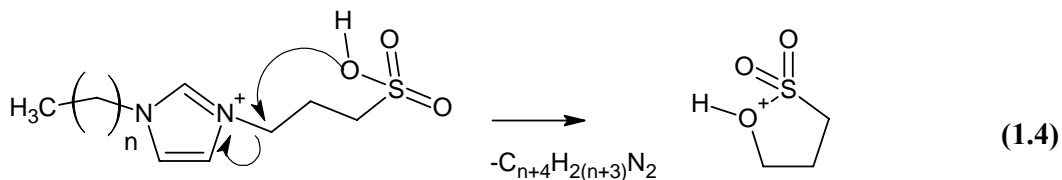
Literatūrā [24] aprakstīta 3-(3-alkil-1-imidazolio)-propān-1-sulfonātu homologu rindu fragmentācija (skat 1.4 att.) .



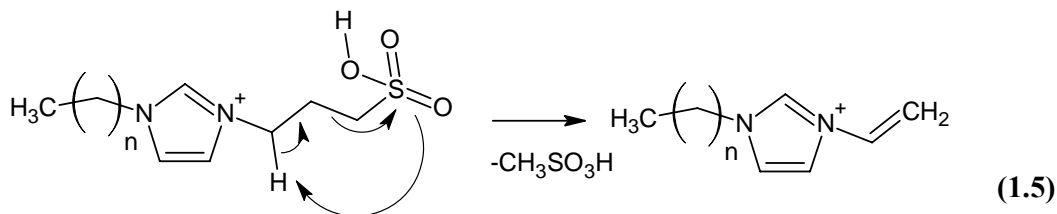
1.3. att. 3-(1-Akil-3N-imidazolio)-1-propānsulfonāta fragmentācija.

Fragmentācijas laikā notiek protona pārnese no sulfonāta grupas, ka arī no alkil grupas uz slāpekļa atomiem [24] un tas tika pierādīts, strādājot ar D₂O [25]. Rezultātā veidojas stabils imidazolijs cikls.

Paralēli veidojas arī otrās paaudzes joni. Piemēram – sultona fragments, atbrīvojoties 1-alkilimidazola fragmentam, jo izotopu klasteri norāda uz sēra atoma klātbūtni, un $m/z=123$, kas atbilst propānsultona protonētai formai (sk. 1.4. vien.).



Turklāt no molekulas var atšķelties metānsulfonskābes fragments (sk. 1.5. vien.)



2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Izmantotie reaģenti un šķīdinātāji

3-(1-Hinolinio)-1-propānsulfonāts¹ - analītiski tīrs 99%

3-(1-Tiazolio)-1-propānsulfonāts¹ - analītiski tīrs 99%

3-(1-Piridīnio)-1-propānsulfonāts¹ - analītiski tīrs 99%

3-(1-Butil-3N-imidazolio)-propānsulfonāts² – analītiski tīrs 99%

3-(1-Heksil-3N-imidazolio)-propānsulfonāts² – analītiski tīrs 99%

3-(1-Oktil-3N-imidazolio)-propānsulfonāts² – analītiski tīrs 99%

3-(1- Metil -3N-imidazolio)-butānsulfonāts² – analītiski tīrs 99%

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

Heksilamīns - 98% tīrība, *Aldrich*

Piperidīns - 98% tīrība, *Aldrich*

1,2-Dimetilimidazols – analītiski tīrs 99%, *Aldrich*

4-hlorbutānskābes etilesteris - 98%, *Aldrich*

Toluols – 99% tīrība, *Penta*

Acetonitrils – $\geq 99,95\%$ tīrība, LC-MS kvalitāte, Carl Roth GmbH

Dejonizēts ūdens – LC-MS kvalitāte, *Fluka*

Etanols (95%) – $\geq 99,8\%$ tīrība, *Carl Roth*

Metanols – $\geq 99,9\%$ tīrība, HPLC kvalitāte, *Aldrich*

HCOOH – 98% tīrība, *Fluka*

IRA-400 anjonīts (Cl⁻ formā) - *Aldrich*

Nātrija hidroksīds, granulēts

AgNO₃ – $\geq 99,9\%$ tīrība, *Aldrich*

Koncentrēta ($\geq 65\%$) HNO₃

Dihrolmetāns - $\geq 99,9\%$ tīrība, *Aldrich*

2.2 Izmantotā aparatūra

Analītiskie svāri *Preciza XB 220A*, precizitāte $\pm 0,0001$ g

¹ Vielu sintēze un attīrīšana aprakstīta darbā [2]

² Viela ir uzsintezēta Ķīmijas fakultātes Organiskās ķīmijas laboratorijā

Waters Micromass Quatro Micro API trīs kvadrupolu tipa masspektrometrs, kas darbojas elektroizsmidzināšanas jonizācijas režīmā.

Waters augsti efektīvās šķidrumu hromatogrāfijas iekārta, kas sastāv no sūkņa ar vadības moduli (*600 E*), *Rheodyne 7725i* rokvadības injektora ar *Rheodyne 100* µl cilpu un *Waters 486 nm UV* detektora.

Sagimed 1 ml šļirce

Waters Alliance 2690 augsti efektīvās šķidrumu hromatogrāfijas iekārta

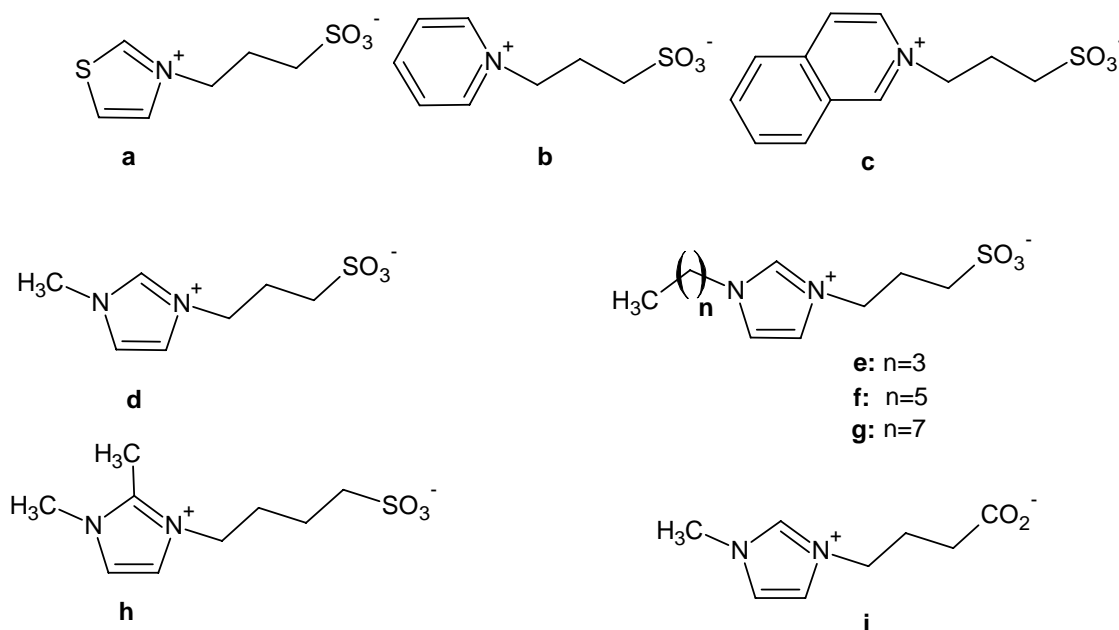
Agela Tech Venusil C18 šķidrumu hromatogrāfijas kolonna (150× 10 mm, 10 µm daļiņu izmērs)

Waters XTerra C18 šķidrumu hromatogrāfijas kolonna (100× 2,1 mm, 5 µm daļiņu izmērs)

Waters Atlantis HILIC Silica šķidrumu hromatogrāfijas kolonna (150 × 2,1 mm, 3 µm daļiņu diametrs)

2.3. Darba gaita

Darbā izmantotus cviterjona tipa jonu šķidrumus var apskatīt att. 2.1.



2.1. att. Cviterjona tipa jonu šķidrumi

2.3.1. 4-(1-Metilimidazolijs)-butān-1-karboksilāta sintēze

4-(1-metilimidazolijs)-butān-1-karboksilāta sintēze. Šajā darbā izmantota modificētā metode piedāvātā darbā [26]. 5 mL apaļkolbā ielej 396 µL 1-metilimidazola un 700 µL 4-hlorobutān-1-skābes etilestera. Reakciju veic 48 stundu laikā 70 °C temperatūrā,

maisot ar magnētisko maisītāju. Reakcijas gaitu novēro, izmantojot tiešo ievadīšanu masspektrometrā. Kad reakcijas ātrums ievērojami samazinās, izslēdz sildīšanu. Rezultātā iegūst dzeltenu viskozo šķidrumu, kas pēc masspektra ($[M+H]^+ = 197$, pamatlīnija) atbilst 4-(1-metilimidazolija)-butān-1-karbonskābes etilestera hlorīdam.

Anjonīta IRA – 400 OH formas sagatavošana. 5 mL apaļkolbā iesver 1240 mg anjonīta IRA – 400 Cl⁻ formā, ielej 2 mL dejonizētā ūdens un atstāj uz 24 stundām. Pēc tām anjonītu pārnes Bihnera piltuvē un skalo ar 50 mL metanola un 400 mL 10 % NaOH šķīdumu. Ik pa laikam pārbauda Cl⁻ jonu klātbūtni efluentā, izmantojot Belšteina testu (AgNO₃ + HNO₃ šķīduma pievienošana efluenta alikvotai). Anjonīts ir pārvērsts OH⁻ formā tad, kad Belšteina testa rezultātā vairs neveidojas AgCl nogulsnes.

4-(1-Metilimidazolija)-butān-1-karboksilāta sintēze. Iegūto anjonītu pievieno 4-(1-metilimidazolija)-butān-1-karbonskābes etilestera hlorīdam un iegūto maisījumu maisa 2 stundu laikā. Anjonītu dekantē, palielina temperatūru līdz 60 °C un maisījumu silda 4 stundas. Reakcijas maisījumam pievieno 300 µL dejonizētā ūdens, un 3 reizes ekstrahē ar 1 mL CH₂Cl₂. Ūdens fāzi ietvaicē ar rotācijas ietvaicētāju un iegūst viskozo higroskopisko šķidrumu, kas pēc masspektrometrijas datiem ($[M+H]^+ = 169$, pamatlīnija) atbilst 4-(1-metilimidazolija)-butān-1-karboksilātam. Iegūto viskozo šķidrumu žāvē eksikatorā virs aktivētā silikagēla. Rezultātā iegūst caurspīdīgas plāksnes.

2.3.2. Masspektrometriskie eksperimenti.

5-metilcitozīna šķīdumu pagatavošana. Šķīdumi tiek pagatavoti ar sekojošām molāro koncentrāciju attiecībām (5-metilcitozīns : cviterjons) - 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20. 5-Metilcitozīna masas koncentrācija gala šķīdumā ir 1,0 µg/ml, kas atbilst 6,2 nmol/ml. Šķīdums satur 0,05% HCOOH.

5-Metilcitozīna sākuma šķīdumu ieguva, izšķīdinot 5,0 mg 5-MetC·HCl 1 ml ūdens un, atšķaidot 100 reizes ar ACN, ieguva masas koncentrāciju 50 µg/ml, kas atbilst 0,31 µmol/ml.

Pirmējā (Heksilamīna), otrējā (piperidīna) un aromatiskā (piridīna) amīnā šķīdumu pagatavošana. Šķīdumi tiek pagatavoti ar sekojošām molāro koncentrāciju attiecībām amīns: cviterjons) - 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20. Heksilamīna, piperidīna un piridīna molārā koncentrācija gala šķīdumā ir 6,2 nmol/ml, kas atbilst masas koncentrācijai atbilstoši 0,63 µg/ml 0,58 µg/ml un 0,49 µg/ml. Šķīdums satur 0,05% HCOOH.

Heksilamīns, piperidīns un piridīns ir šķīdumi, tādēļ ērtāk rēķināt vajadzīgos tilpumus.

$$V = \frac{\gamma \cdot V_{\text{šk}}}{\rho} \frac{V_{\text{šk}}}{V_{\text{pip}}^1} \frac{V_{\text{šk}}}{V_{\text{pip}}^2} \quad (2.1.)$$

$$V = \frac{0,63 \mu\text{g/ml} \cdot 1,00\text{mL}}{0,766 \mu\text{g/nL}} \frac{1,00\text{mL}}{0,020\text{mL}} \frac{1,00\text{mL}}{0,010\text{mL}} = 4112 \text{ nL} \approx 4,1 \mu\text{L}$$

Kur V – amīna tilpums, μL

γ – amīna masas koncentrācija, $\mu\text{g/mL}$

ρ – amīna blīvums, $\mu\text{g/L}$

$V_{\text{šk}}$ – iegūta šķīduma tilpums, mL (1 mL)

V_{pip}^1 un V_{pip}^2 – atšķaidīšanai ņemtais šķīduma tilpums, μL

2.1. tabula

Vielas	molmasa, g/mol	blīvums, g/mL	Pievienotājs tilpums, μL
Heksilamīns	101,19	0,766	4,1
Piperidīns	85,15	0,862	3,1
Piridīns	79,10	0,981	2,5

Tiek pagatavoti amīnu šķīdumi ar molāro koncentrāciju 31 $\mu\text{mol/ml}$ ūdenī, kuri pakāpeniski tiek atšķaidīti 100 reizes ar ACN līdz 0,31 $\mu\text{mol/ml}$.

Cviterjona masas koncentrāciju aprēķina pēc formulas:

$$\gamma_{\text{cvit}} = x C_{5\text{MetC}} M_{\text{cvit}} \quad (2.2.)$$

$$\gamma_{\text{cvit}} = 1 \cdot 6,2 \frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \cdot 207,27 \frac{\text{ng}}{\text{nmol}} = 1310 \text{ ng/mL} \approx 1,3 \mu\text{g/mL}$$

Kur, γ_{cvit} – 5-metilcitozīna masas koncentrācija, nmol/ml

x – koncentrāciju attiecība

M_{cvit} – cviterjona molmasa, ng/nmol

$C_{5\text{MetC}}$ – 5-metilcitozīna koncentrācija, nmol/mL

Nepieciešamo cviterjona masu aprēķina pēc formulas:

$$m_{\text{cvit}} = \gamma_{\text{cvit}} V_{\text{šk}} \frac{V_{\text{šk}}}{V_{\text{pip}}^1} \frac{V_{\text{šk}}}{V_{\text{pip}}^2} \quad (2.3.)$$

$$m_{\text{cvit}} = 1,3 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 1,00\text{mL} \frac{1,00\text{mL}}{0,020\text{mL}} \frac{1,00\text{mL}}{0,010\text{mL}} = 6425 \mu\text{g} \approx 6,4\text{mg}$$

Kur, γ_{cvit} – cviterjona masas koncentrācija, $\mu\text{g/ml}$

$V_{\text{šk}}$ – šķīduma tilpums, mL

V_{pip}^1 un V_{pip}^2 – atšķaidīšanai ņemtais šķīduma tilpums, μL

Cviterjonu nepieciešama masa šķīdumu pagatavošanai

Nr	Vielas	Molmasa g/mol	Masa, mg
1	3-(1-Tiazolio) -propānsulfonāts	207,27	6,4
2	3-(1-Piridīnio)-1-propānsulfonāts.	201,24	7,8
3	3-(1-Hinolinio)-1-propānsulfonāts.	251,30	6,2
4	3-(1- Metil -3N-imidazolio)-1-propānsulfonāts.	204,25	6,3
5	3-(1- Butil -3N-imidazolio)-1-propānsulfonāts.	246,32	7,8
6	3-(1- Heksil -3N-imidazolio)-1-propānsulfonāts.	274,38	8,5
7	3-(1- Oktil -3N-imidazolio)-1-propānsulfonāts.	302,43	9,4
8	4-(1- Metil -3N-imidazolio)-1-butānkarboksilāts.	168,19	5,2
9	4-(1,2-Dimetil -3N-imidazolio)-1-butānsulfonāts.	232,30	7,2

Tiek pagatavoti cviterjonu šķīdumi ar molāro koncentrāciju 31 $\mu\text{mol/ml}$ ūdenī, kuri pakāpeniski tiek atšķaidīti 50 reizes ar ACN līdz 0,62 $\mu\text{mol/ml}$.

1% HCOOH šķīdums acetonitrilā tiek pagatavots izšķīdinot 10 μL HCOOH 990 μL acetonitrilā.

Darba šķīduma pagatavošanai tiek ņemtas sekojošās tilpuma attiecības (5-metilcitozīns vai amīns : cviterjons): 20:10, 20:20, 20:50, 20:100, 20:150, 20:200 (šķīdumu tilpumi ņemti μL). Katram šķīdumam pievieno 50 μL 1% HCOOH un atšķaida līdz 1 mL.

5-Metilcitozīna un cviterjonu šķīdumu pagatavošana, mainot šķīdinātāju sastāvu.

Izvēlas tādu cviterjona koncentrāciju, pie kuras iepriekšējās analīzēs tiek sasniegts signāla maksimums. 5-Metilcitozīna koncentrācija paliek konstanta. Tiek pagatavoti šķīdumi ACN:H₂O ; ACN:MeOH ; MeOH:H₂O attiecībās 100:0 ; 90:10 ; 80:20 ; 70:30 ; 60:40 ; 50:50

Pagatavoto šķīdumu analīze. Pagatavotus šķīdumus, kas satur 5-metilcitozīnu un cviterjonu, ievada masspektrometrā, izmantojot šļirces sūkni. To pašu izdara ar heksilamīna, piperidīna un piridīna šķīdumiem.

Eksperimenta parametri:

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

Spriegumu piemeklēšana. Izmantojot šķīdumu, kur 5-metilcitozīna un cviterjona kompleksa signāla intensitāte ir vislielākā, maina kapilāra, konusa un ekstraktora spriegumu, kad pārējie parametri paliek nemainīti. To pašu izdara ar heksilamīma, piperidīna un piridīna kompleksiem. Ievadīšanas brīdī uzstāda kapilāra spriegumu uz 2 kV un maina to vērtību ar soli 0,5 kV līdz 4,5 kV. Pēc kapilāra sprieguma tiek mainīti konusa spriegums no 10 V līdz 50 V (10, 13-20, 25, 30, 40, 50) un ekstraktora spriegums no 1 V līdz 10 V ar soli 1 V. Sprieguma piemeklēšanai izmanto iepriekšēja parametra optimālas vērtības, pie kurām 5-metilcitozīna un cviterjona kompleksa intensitāte ir vislielākā.

Fragmentācija sadursmju inducētās disociācijas apstākļos. Izmantojot 5-metilcitozīna un cviterjona šķīdumu, kur kompleksa intensitāte ir vislielākā, pie optimālām spriegumu vērtībām, kuras tika piemeklētas iepriekšējā eksperimentā, veic kompleksa fragmentāciju. To pašu izdara ar heksilamīma, piperidīna un piridīna kompleksiem. Fragmentāciju veic sadursmju enerģiju diapazonā no 0 līdz 50 eV ar soli 5eV. Sadursmes inducē, izmantojot argonu ar spiedienu $3,0 \cdot 10^{-3}$ mbar.

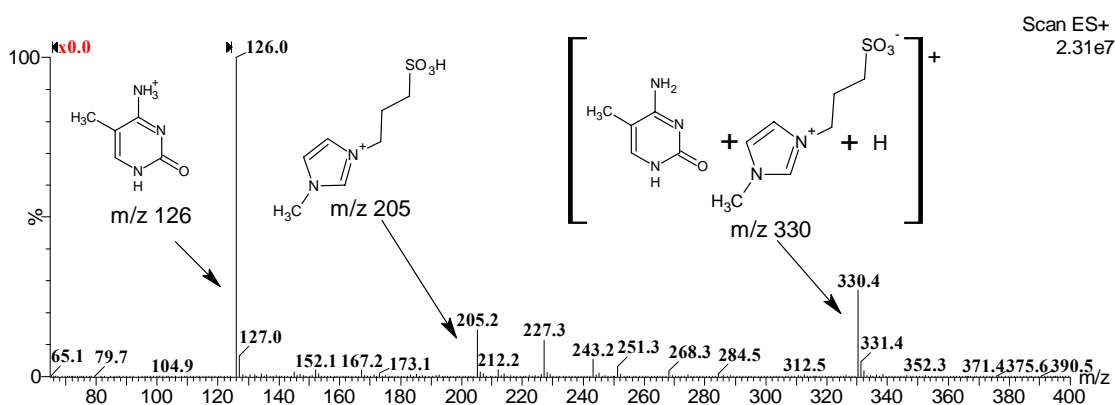
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1. Pievienotā cviterjonu tipa savienojuma koncentrācijas ietekme uz 5-metilcitozīna kompleksa signāla intensitāti.

Darbā [2] tika aprakstīts $[5\text{-MetC+Cvit+Na}]^+$ komplekss, jo to signāls, salīdzinot ar pārējiem aduktiem, bija vislielākais. Na^+ adukta vislielāko intensitāti var izskaidrot ar to, ka iepriekšējos eksperimentos par šķīdinātāju izmantoja HPLC kvalitātes acetonitrilu, kurš satur samērā daudz Na^+ jonu. Pašreizējā darbā, izmantoja LC-MS kvalitātes ACN, kurš satur 0,05% HCOOH. Darbā tiek pārbaudīta protonētā kompleksa veidošanās $[5\text{-MetC+Cvit+H}]^+$. Tika konstatēts, ka minētā kompleksa signāla intensitāte bija ievērojami lielākā nekā $[5\text{-MetC+Cvit+Na}]^+$ un $[5\text{-MetC+Cvit+K}]^+$. 5-Metilcitozīna un vielas **d** kompleksa masspektu var apskatīt att. 3.1.

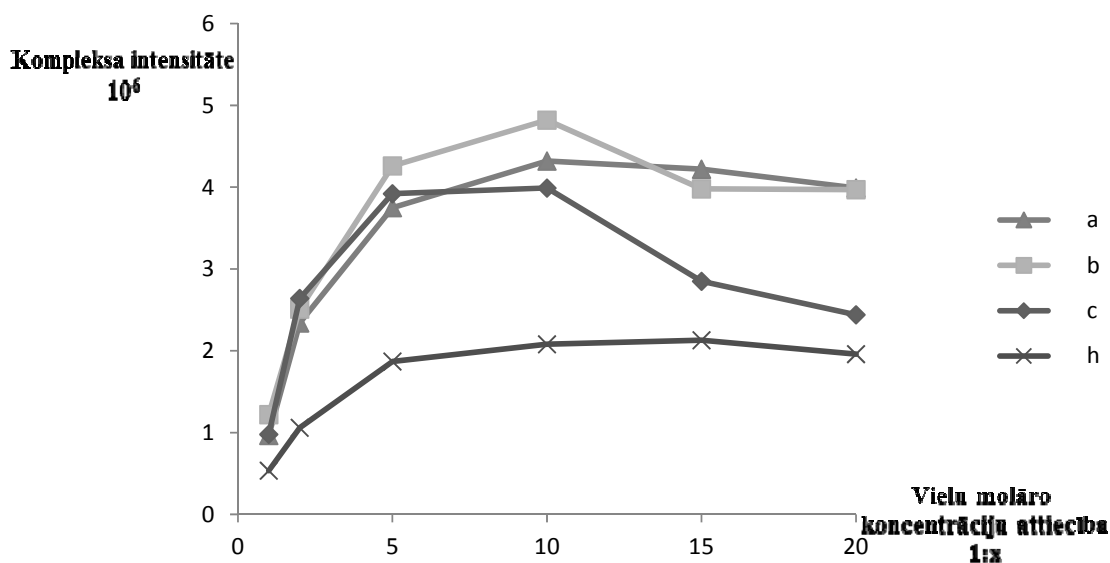
Kompleksa molmasu var izskaitļot pēc formulas (3.1)

$$M_{\text{komplekss}} = M_{\text{cviterjons}} + M_{5\text{-metilcitozīns}} + 1 \quad (3.1)$$



3.1. att. 5-Metilcitozīna un vielas **d** acetonitrila šķīduma masspektrs. Vielu molāro koncentrāciju attiecība 1:10.

5-metilcitozīna un cviterjonu tipa savienojuma koncentrāciju attiecības ietekme uz kompleksa intensitāti ir parādīta 3.2 un 3.3 att.

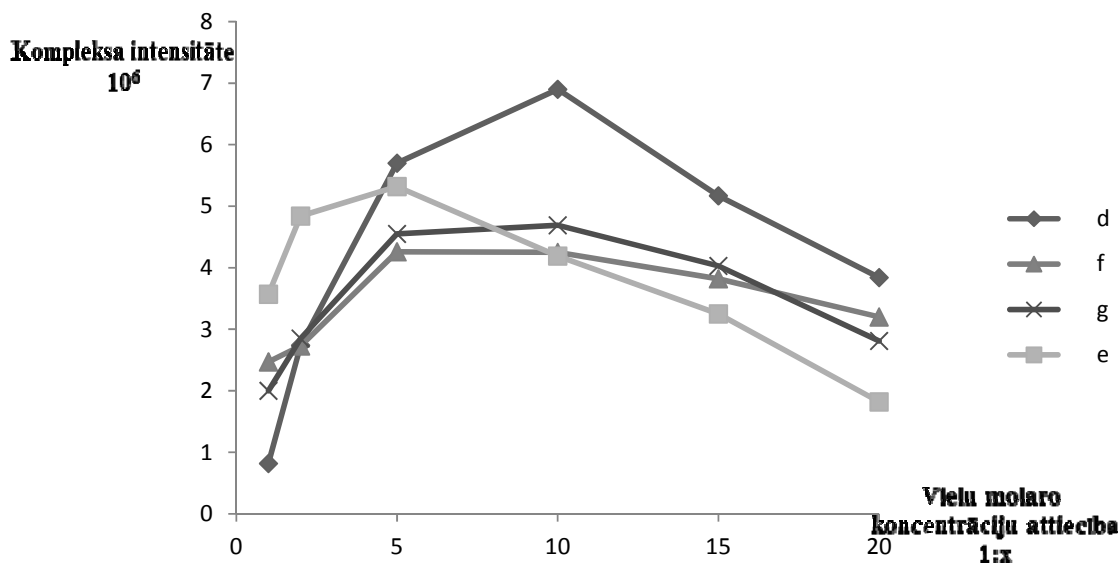


3.2. att. 5-Metilcitozīna un cviterjonu a, b, c un h kompleksu signāla intensitāte atkarībā no 5-MetC : cviterjona molāro koncentrāciju attiecības.

Attēlā 3.2. tiek salīdzināti savienojumi ar dažādiem slāpekļa saturošajiem heterocikliem, ka arī tiek parbaudīta propānsulfonāta un butānsulfonāta grupas ietekme uz kompleksa signālu intensitāti.

Kā var redzēt, visu propānsulfonāta grupas saturošu savienojumu (vielas **a**, **b**, **c**) signāli strauji palielinās jau pie zemām 5-MetC:cviterjona koncentrāciju attiecībām, sasniedzot maksimumus intervālā 4-5·10⁶. Turpretim butānsulfonāta grupu saturošā cviterjona (viela **h**) un 5-MetC kompleksa signāls, palielinās vājāk un sasniedz maksimumu pie ≈ 2·10⁶. Tas liecina par to, ka 5-MetC funkcionālas grupas veido stiprāko saiti ar vielām **a**, **b**, un **c**. Salīdzinot propānsulfonāta grupas saturošo savienojumu grafikus, var redzēt, ka vielas **c** grafika maksimums ir nobīdīts zemo koncentrāciju attiecību virzienā, kas liecina par vielas **c** lielāku virsmas aktivitāti, kuru pastiprina benzolgrupas esamība hinolīna ciklā. Kompleksa [5-MetC+a+H]⁺ signāls sasniedz maksimumu tajā pašā intervālā, kā kompleksa [5-MetC+b+H]⁺ signāls, bet, atšķirībā no vielas **b**, nesamazinās strauji.

Lēnu signāla samazināšanos var saskatīt arī att. 3.3, kur tiek salīdzināta dažādu akilimidazolija propānsulfonātu ietekme uz kompleksu veidošanos ar 5-MetC, it īpaši kompleksu [5-MetC+f+H]⁺ un [5-MetC+g+H]⁺ grafikos.



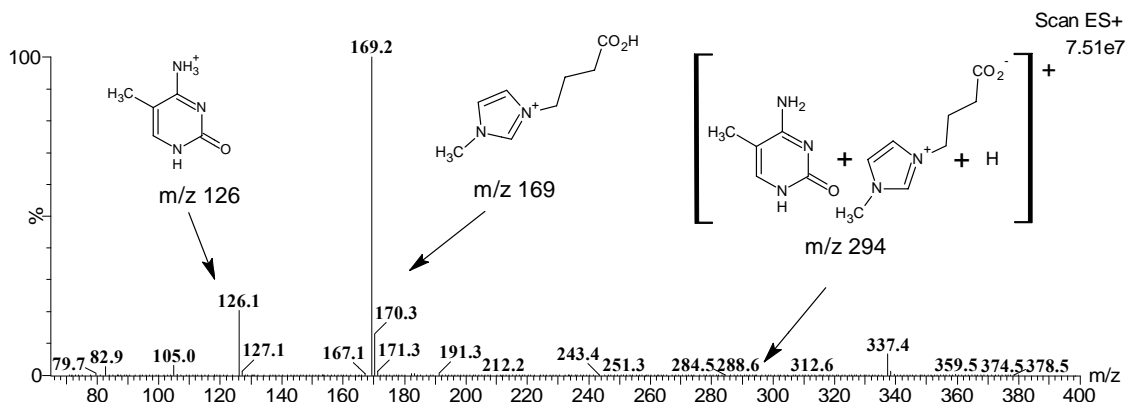
3.3. att. 5-Metilcitozīna un vielu d, e, f un g kompleksu signāla intensitāte atkarībā no 5-MetC : cviterjona molāro koncentrāciju attiecības.

Grafikos var redzēt, ka, palielinoties C-atomu skaitam alkilķēdē, samazinās kompleksa signāla maksimuma intensitāte. To var izskaidrot ar to, ka palielinoties cviterjona virsmas aktivitātei, palielinās arī varbūtība, ka cviterjona molekulas pilnībā aizņems piliena virsmu, un analīta molekulas neveidos kopā ar tiem kompleksu, jo atrodas pilienā iekšienē. Kompleksa $[5\text{-MetC}+e+\text{H}]^+$ grafika maksimums no pārējiem grafikiem atšķiras ar maksimuma sasniegšanu pie zemākām cviterjona koncentrācijām un sāk samazināties straujāk, nekā vielu d, f un g gadījumā. Kaut gan vielas f un g ir virsmas aktīvākas nekā viela d, to maksimumi netiek sasniegti pie zemākām cviterjona koncentrācijām, kā viela e.

Darbā [2] pētāmo $[5\text{-MetC}+\text{Cvit}+\text{Na}]^+$ kompleksu signālu maksimumi bija nobīdīti mazākas cviterjona:5-MeC koncentrāciju attiecības virzienā, salīdzinājumā ar protonu kompleksiem. It īpaši tas bija izteikts vielu f un g gadījumā, kad maksimumi tiek sasniegti pie mazākās cviterjona koncentrācijas, un grafiki ir asāki, nekā strādājot ar protonu kompleksiem. To var izskaidrot ar to, ka cviterjona tipa savienojuma $-\text{SO}_3^-$ grupa veido stabilāku aduktu ar Na^+ , nevis ar protonu. Rezultātā, palielinoties cviterjona koncentrācijai, palielinās arī oligomēru veidošanas varbūtība, kas noved pie kompleksa signāla nomākšanas.

Kad cviterjonu struktūrā $-\text{SO}_3^-$ grupa tiek aizvietota ar $-\text{CO}_2^-$ grupu (viela i), komplekss ar 5-MetC masspektrā nav saskatāms. Tā kā $-\text{SO}_3\text{H}$ ir stiprāka skābe nekā $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3^-$ grupas tieksme pēc protona ir ievērojami zemāka, nekā $-\text{CO}_2^-$ grupai. To var saskatīt, salīdzinot cviterjonu signālus 3.2. att. un 3.4. att. Turpretim cviterjoni ar sulfonātu grupu veido klasterus ar Na^+ u K^+ par ko liecina signāli ar m/z [cviterjons + 23]⁺ vai [cviterjons +

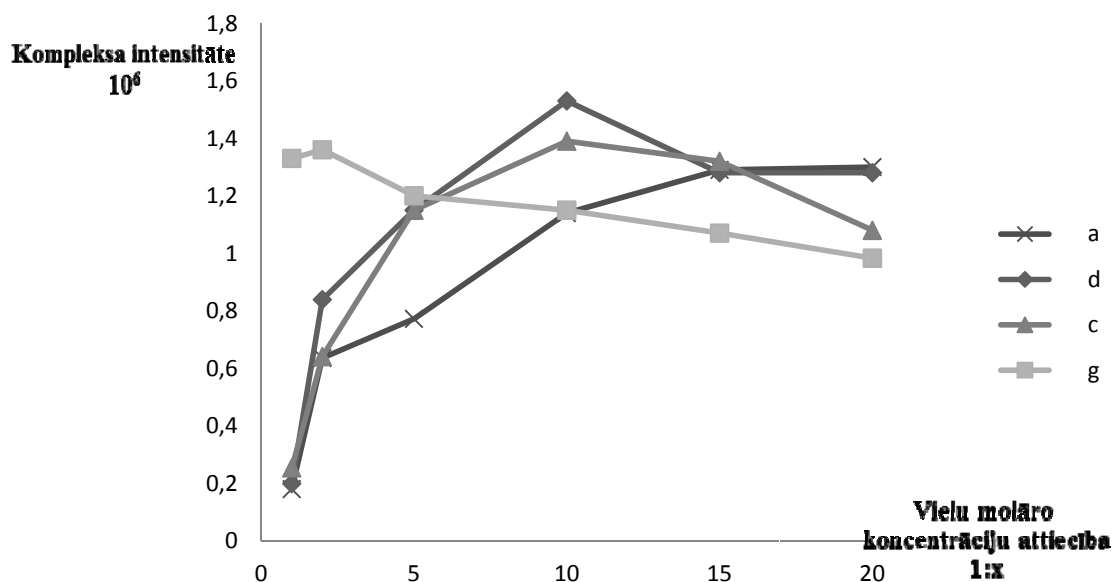
39]⁺, bet cviterjons ar karboksilgrupu klasterus neveido. Karboksilgrupa skābes klātienē pastāv protonētā formā un nevar piedalīties asociātu veidošanas procesā ar 5-MetC, kurš arī labi protonējas.



3.4. att. 5-Metilcitozīna un vielas h šķīduma masspektrs. Vielu molāro koncentrāciju attiecība ir 1:10.

3.2. Pievienotā cviterjonu tipa savienojuma koncentrācijas ietekme uz pirmējā, otrējā un aromātiskā amīna kompleksa signāla intensitāti.

Heksilamīna un piperidīna kompleksu grafikus var apskatīt 3.4 un 3.5 attēlos. Piridīna grafikus konstruēt nav iespējams, jo komplekss spektrā nebija saskatāms.

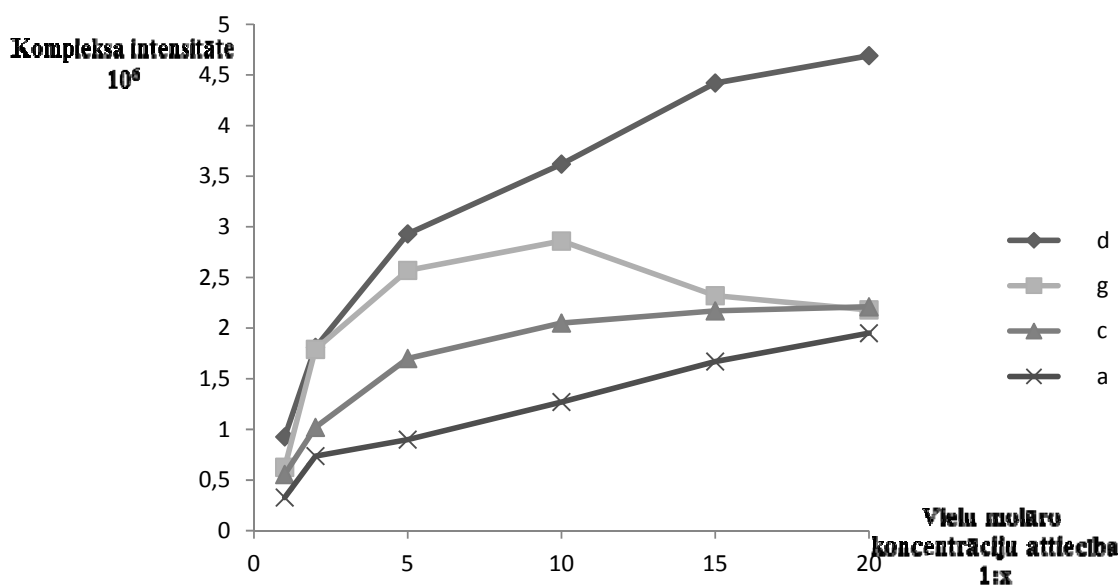


3.5. att. Heksilamīna un vielu a, c, d un g kompleksu signāla intensitāte atkarībā no heksilamīna : cviterjona molāro koncentrāciju attiecības.

Kad 5-MetC tiek aizvietots ar heksilamīnu (3.5. att.), var saskatīt, ka kompleksu intensitāte maksimuma punktos ir ievērojami zemāka, nekā 3.2. att. un 3.3. att. Heksilamīna komplekss ar vielu **g** sasniedz savu maksimumu pie zemākām cviterjona koncentrācijām, bet pārējo kompleksu signālu maksimumi ir līdzīgi 5-MetC kompleksiem, vai arī maksimums tiek nobīdīts lielāko molāro koncentrāciju attiecības virzienā. Tā kā heksilamīns ir virsmas aktīvāks, nekā 5-MetC, jo satur amīnogrupu ar 6-C atomu alkilķēdi, viņš labāk konkurē par vietu pilienā virsmā. Rezultātā grafiki tiek nobīdīti lielu koncentrāciju virzienā (izņemot vielas **g** grafiku), jo heksilamīna koncentrācija ir konstanta, bet cviterjona koncentrācija mainās.

Vielas **g** satur 8 oglekļa atomus aklilvirknē. Rezultātā divas virsmas aktīvas grupas aizņem piliena virsmu un veido kompleksus pie zemākām cviterjona koncentrācijām. Tomēr, palielinoties vielas **g** koncentrācijai notiek savstarpēja konkurence, un kompleksa signāls tiek nomākts.

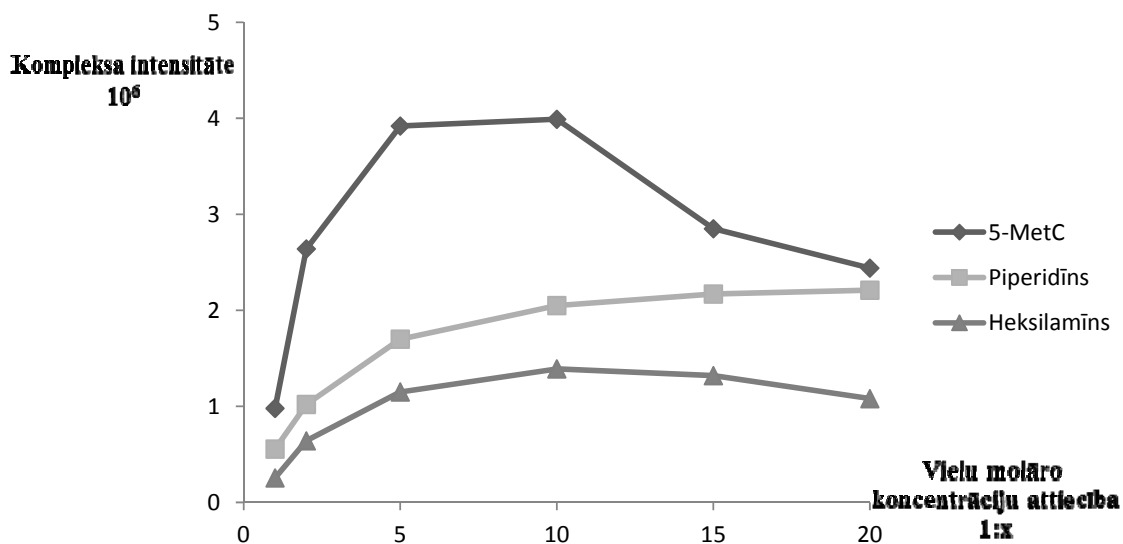
Apskatīsim piperidīna grafikus 3.6. att.



3.6. att. Piperidīna un vielu **a**, **c**, **d** un **g** kompleksu signāla intensitāte atkarībā no piperidīna : cviterjona molāro koncentrāciju attiecības.

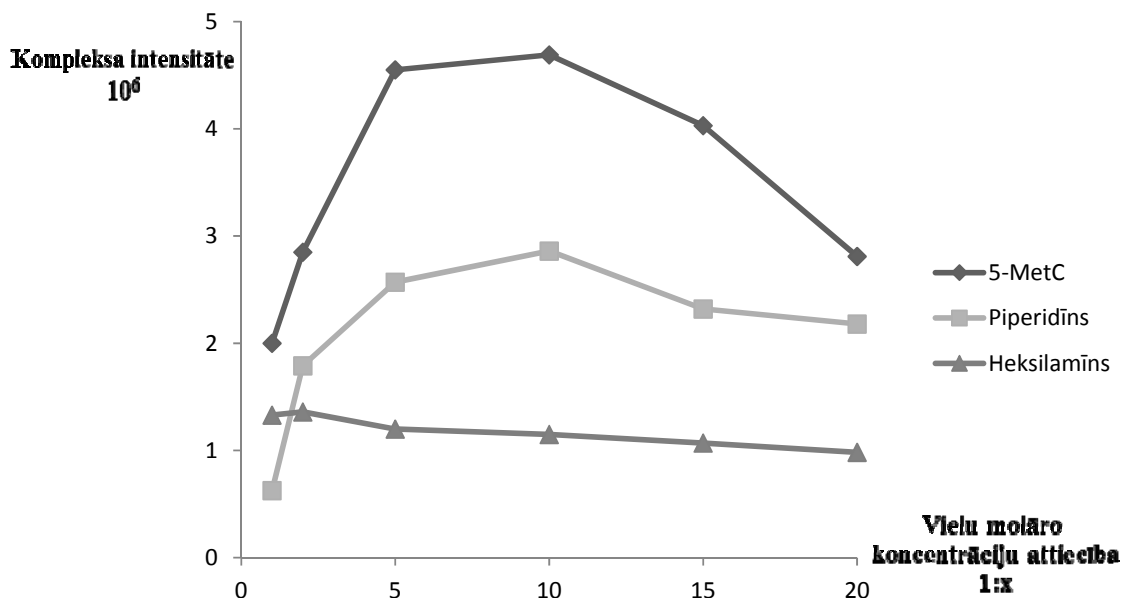
Piperidīna kompleksu intensitāte ir lielāka nekā heksilamīna, bet tomēr zemāka nekā 5-MetC. Piperidīna gadījumā var saskatīt tādu pašu tendenci, ka heksilamīna grafikos. Heksilamīns ir virsmas aktīvāks, nekā piperidīns, tādēļ piperidīna kompleksu signālu maksimumi ir nobīdīti lielu koncentrāciju virzienā. Dažos gadījumos maksimums vispār netiek sasniegts intervālā no 1:1 līdz 1:20.

Attēlos 3.7 un 3.8. var salīdzināt iepriekš minēto amīnu un 5-MeC kompleksu ar vielām c un g signālu grafikus.



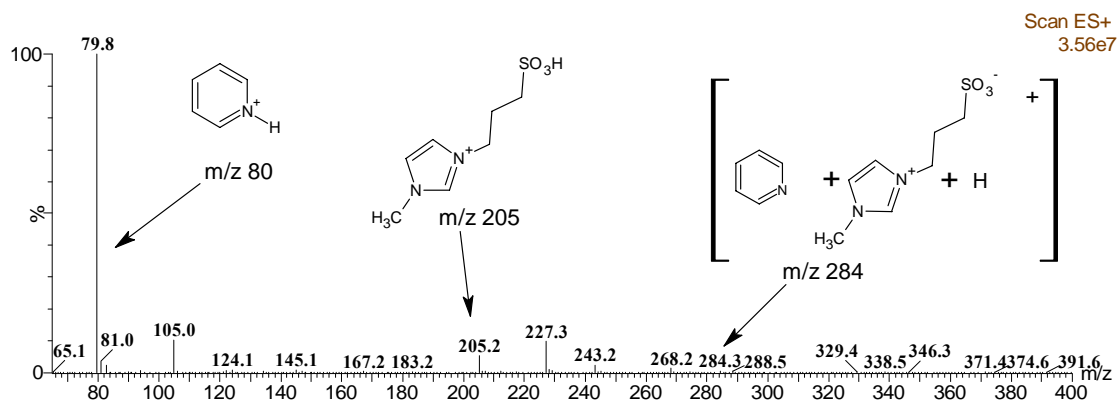
3.7. att. 5-metilcitozīna, piperidīna, heksilamīna un vielas c kompleksa signāla intensitāte atkarībā no analīta : cviterjona molāro koncentrāciju attiecības.

Attēlā 3.7. var redzēt, ka 5-metilcitozīna un vielas c kompleksu intensitāte ir lielāka, nekā piperidīna, heksilamīna un pīridīna kompleksu intensitātes. Tāda pati tendence ir saskatāma attēlā 3.8., kur tiek izmantota viela g.



3.8. att. 5-metilcitozīna, piperidīna, heksilamīna un vielas g kompleksa signāla atkarībā no analīta : cviterjona molāro koncentrāciju attiecības.

Ka jau tika minēts, piridīna kompleksi netika konstatēti masspektros. Iespējams, ka piridīns neveido kompleksu zemākās pKa vērtības dēļ acetonitrīlā (pKa=12,33), salīdzinājumā ar pārējiem amīniem. Piridīna un vielas d masspektru var apskatīt att. 3.9.



3.9. att. Piridīna un vielas c acetonitrīla šķīduma masspektrs. Vielu molāro koncentrāciju attiecība ir 1:10.

Tabulā 3.1. var salīdzināt amīnu un 5-MetC pKa vērtības ūdenī, metanolā un ACN.

3.1.tabula

Viela	pKa (ūdens) [27]	pKa (metanols) [28]	pKa (acetonitrīls) [29,30]
5-Metilcitozīns	12,4	N/p*	N/p*
Heksilamīns	10,56	11,57	18,26
Piperidīns	11,22	11,07	19,29
Piridīns	5,25	5,43	12,33

*dati nav pieejami

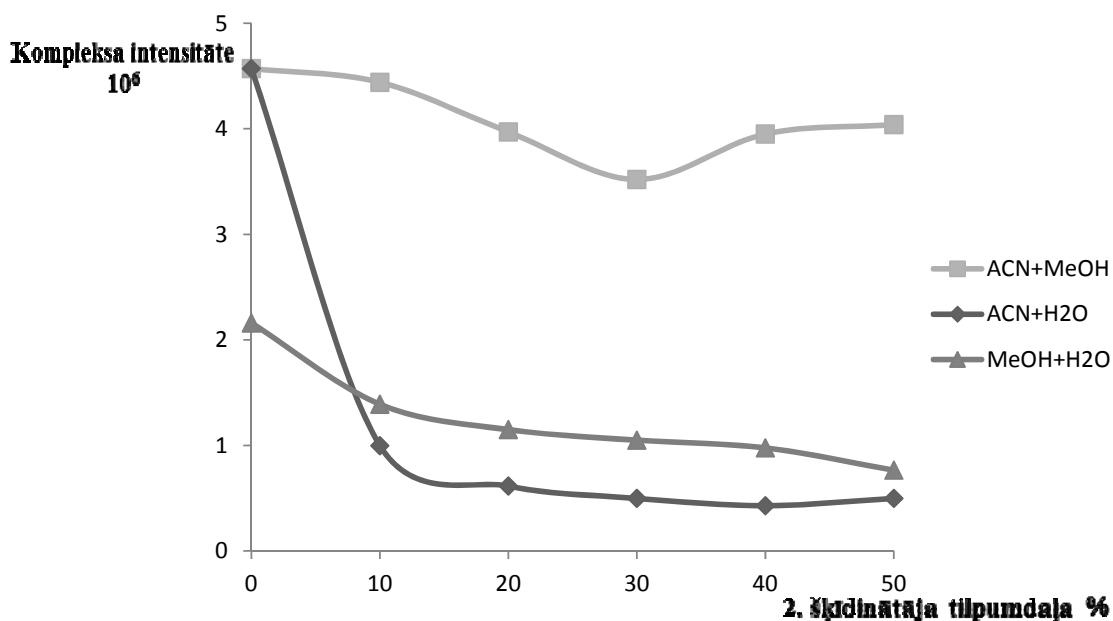
pKa vērtības parāda analīta spēju šķīdumā protonēties. Protonējoties, analīts veido katjonu, kurš, mijiedarbojoties ar anjona grupu (sulfonāta grupu), veido jonu asociātu. Jo labāk notiek protonēšanās, jo lielāks analītu molekulu skaits veido kompleksu ar cviterjoniem. Ar pKa ir iespējams izskaidrot arī piperidīna lielāko intensitāti, salīdzinot ar heksilamīnu un piridīnu intensitātēm. Tā kā literatūrā nav iespējams atrast 5-metilcitozīna pKa vērtības ACN, salīdzināsim ūdens pKa vērtības. Kā var redzēt, gan ACN, gan ūdenī amīnu pKa vērtības ir proporcionālas. 5-metilcitozīna pKa vērtība ūdenī ir lielāka, nekā piperidīnam un heksilamīnam. Pieņemsim, ka 5-MetC pKa vērtība ACN palielinās proporcionāli analītu pKa vērtībām ūdenī. Tad tiek izskaidrots, kāpēc 5-MetC kompleksa signāla intensitāte ir lielāka, nekā pārējo amīnu gadījumā.

Otrs skaidrojums, kāpēc 5-MetC kompleksa signāls ir augstāks par amīnu kompleksiem, ir atšķirīgs funkcionālo grupu skaits. Katrs amīns satur tikai vienu funkcionālu grupu, atšķirībā no 5-MetC. Palielinoties funkcionālo grupu skaitam, palielinās arī varbūtība 5-MetC grupām mijiedarboties ar cviterjona heterocikla atomiem, palielinot kompleksa stabilitāti.

3.3. Šķīdinātāja ietekme.

Šķidrums hromatogrāfijā plaši izmanto acetonitrilu (ACN), metanolu (MeOH) un ūdeni (H₂O) un to maisījumus. Eksperimentos, kur tika pārbaudīta cviterjonu koncentrācijas ietekme uz kompleksa veidošanos, izmantoja ACN, jo kompleksa signāls ACN bija vislielākais.

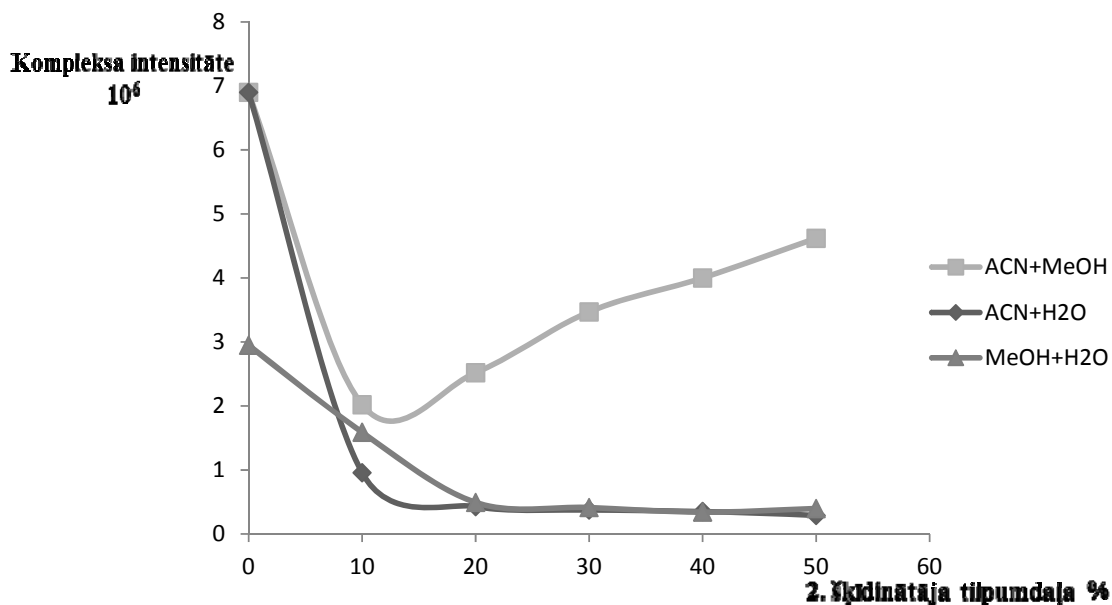
Attēlos 3.10. un 3.11. var redzēt šķīdinātāja sastāva ietekmi uz 5-MetC kompleksa veidošanos ar vielām **g** un **d**.



3.10. att. 5-MetC un vielas **g** kompleksa signāla intensitāte atkarībā no pievienotā šķīdinātāja tilpumdaļas.

Kad organiskajam šķīdinātājam tiek pievienots ūdens, kompleksa signāls tiek nomākts jau pie 20% ūdens. Pirmkārt, ūdens viršanas temperatūra ir lielāka, nekā ACN un līdz ar ūdens pievienošanu palielinās šķīduma maisījuma viršanas temperatūra, kura ietekmē mikropilienu izmērus, jo desolvācija notiek vājāk. Otrkārt, katram šķīdinātājam ir atšķirīgas Releja robežas vērtība, kura ir atkarīga no šķīdinātāja virsmas spraiguma. Piemēram, ka jau

tika minēts iepriekš, Releja robeža ūdenim ir lielāka, nekā ACN un MeOH (skat. nod. 1.2.3.), kas liecina par to, ka optimālais kapilāra spriegums acetonitrila/ūdens vai metanola/ūdens maisījumam nav pietiekošs, lai izraisītu Kulona „sprādzienu”. Treškārt, palielinās dielektriskā konstante, kas samazina kompleksa veidošanas enerģiju.



3.11. att. 5-MetC un vielas d kompleksa signāla intensitātes atkarība no šķīdinātāju attiecības.

Grūtāk izskaidrot ACN/MeOH šķīdumu grafikus. Dielektriskā konstante [31] un virsmas spraigums [19] samazinās palielinoties MeOH daļai šķīdumā. Viskozitāte sākumā samazinās, bet pēc noteiktas MeOH koncentrācijas palielinās [31]. Viršanas temperatūra arī samazinās no 82°C (ACN) līdz 65°C (MeOH). Protams, ka dati iegūti pie 25°C (izņemot viršanas temperatūras), bet elektroizsmidzināšanai izmantotās desolvācijas gāzes un jonu avota temperatūra ir 400°C un 100°C atbilstoši.

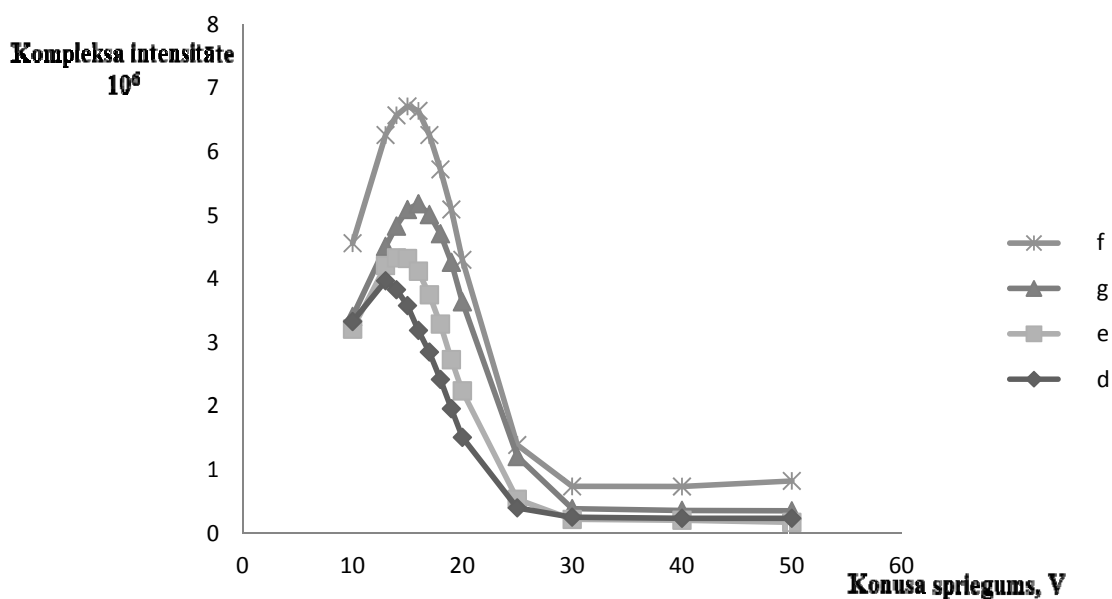
Tomēr, viens no iespējamiem iemesliem, kāpēc notiek signāla samazināšanās, ir atšķirīgas pKa vērtības acetonitrilā un metanolā. Vielu protonēšanas notiek labāk ACN, nevis MeOH. Piemērām, heksilamīna, piperidīna vai piridīna pKa vērtības ūdenī vai metanolā atšķirās par vienu vienību, bet acetonitrilā – par sešām vienībām (skat. tab. 3.1.). Tā ka 5-MetC pKa vērtības metanolā nav pieejamas, pieņemsim, ka 5-MetC pKa vērtības metanolā arī necīgi atšķiras no ūdens pKa vērtībām. Darbā [29] var redzēt, ka benzoscābes pKa vērtība, strādājot ar etanols/ūdens maisījumu, strauji samazinās, pievienojot ūdeni nelielos daudzumos. Tieši ar strauju pKa vērtības samazināšanos, kad tiek pievienots nelielos daudzumos metanols, var izskaidrot kompleksa signāla intensitātes samazināšanos grafika

sākumposmā. Turpretim, kad pKa vērtība mainās niecīgi, kompleksa intensitāte palielinās, jo parādās augstāk minēto šķīdinātāja īpašību ietekme uz signāla intensitāti.

Atšķirībā no šķīduma kas satur ūdeni, kompleksa signāls ir saskatāms pat 50% metanola šķīdumā, kas dod iespēju pētīt kompleksa veidošanos ar hidrofilo mijiedarbību šķīdumu hromatogrāfiju, lietojot nevis ūdeni, kā stipru šķīdinātāju, bet metanolu ar zemu ūdens piedevi ($\geq 2\%$).

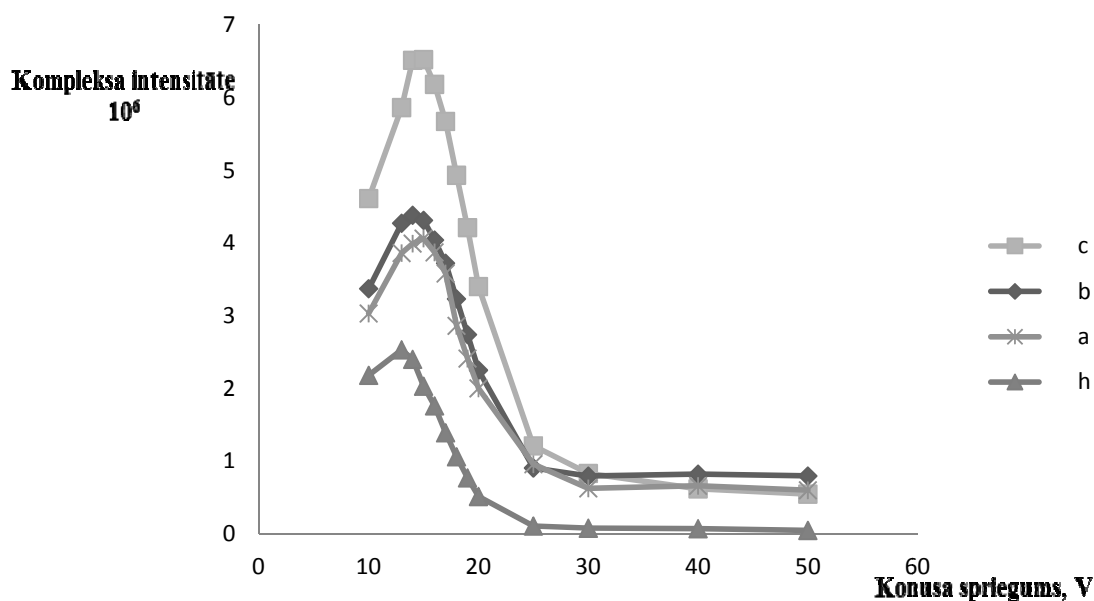
3.4. Konusa un ekstraktora spriegumu piemeklēšana.

Apskatīsim konusa sprieguma ietekmi uz kompleksa stabilitāti. Attēlos 3.12. un 3.13. var redzēt 5-metilcitozīna un cviterjonu kompleksa stabilitāti, atkarībā no konusa sprieguma. Jo tālāk nobīdās grafika (skat. 3.12. att. un 3.13. att.) maksimums x ass virzienā, jo stabilāks ir komplekss.



3.12. att. 5-MetC un vielu d, e, f un g kompleksu signāla intensitāte atkarībā no konusa sprieguma.

5-metilcitozīna un savienojuma d komplekss, salīdzinājumā ar e, f, g, sasniedz signāla maksimumu pie 13-14 V, bet pārējo kompleksu signālu maksimumi nobīdās augstākas konusa sprieguma vērtības virzienā (15-16 V), kas liecina par kompleksa lielāko stabilitāti, palielinoties alkil-grupas masai.



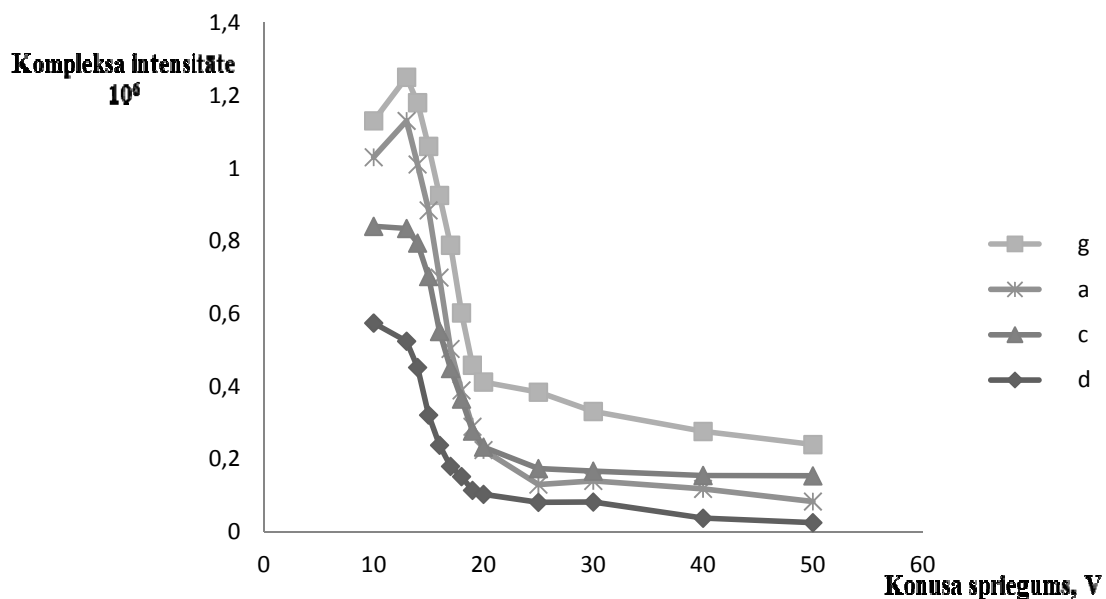
3.13. att. 5-MetC un vielu a, b, c un h kompleksu signāla intensitāte atkarībā no konusa sprieguma

5-MetC un vielu a, b, c un h kompleksu signālu maksimumi atrodas intervālā 14-15 V un to stabilitāte strauji samazinās pēc maksimuma sasniegšanas, kas liecina par kompleksu zemu stabilitāti pie palielinātām sprieguma vērtībām. Mazāk stabils ir komplekss ar vielu h, kura maksimums ir pie 13V, kas liecina par to, ka butānsulfonāta grupas saturošie cviterjona tipa savienojumi ir mazāk stabili nekā propānsulfonāta grupas saturošie.

5-MetC un vielu a-g Na^+ aduktu maksimumi nobīdās palabi uz 1-3 V salīdzinot ar atbilstošiem protonētiem kompleksiem, kas liecina par Na^+ adukta lielāku stabilitāti.

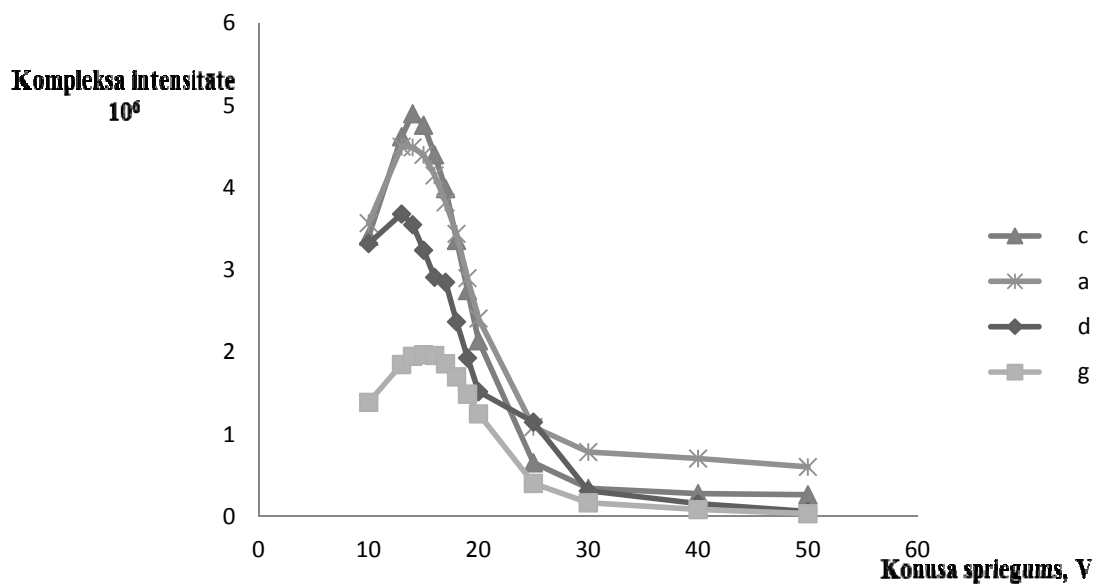
Ekstraktora sprieguma palielināšana ($\geq 1\text{V}$) izraisa nekovalentā kompleksa sabrukšanu, kas liecina par to, ka ekstraktora spriegumam jābūt pēc iespējas mazākam (ap 1 V), lai nodrošinātu stabilu jonu pārnēsī no atmosfēras spiediena reģiona uz vakuuma reģionu. Kapilāra spriegums nodrošina elektroizsmidzināšanu, bet tieši neietekmē kompleksa stabilitāti, kaut gan tas var ietekmēt aerosola pilienu izmēru. Pie lielākiem kapilāra spriegumiem bieži novēro lielāku analīta signālu, bet palielinās arī fona signāla intensitāte. Palielinot kapilāra spriegumu, arvien vairāk palielinās gāzes izlādes varbūtība. Praktiski visu kompleksu signāla intensitātes maksimumi atrodas pie 3.5 kV, ja izmanto acetoni-trila šķīdumu.

Apskatot heksilamīna (3.14. att.) un piperidīna (3.15.att.) kompleksu stabilitāti, var redzēt, ka heksilamīna un piperidīna kompleksi ir vājāki, nekā 5-MetC kompleksi.



3.14. att. Heksilamīna un vielu d, g, a un c kompleksu signāla intensitāte atkarībā no konusa sprieguma.

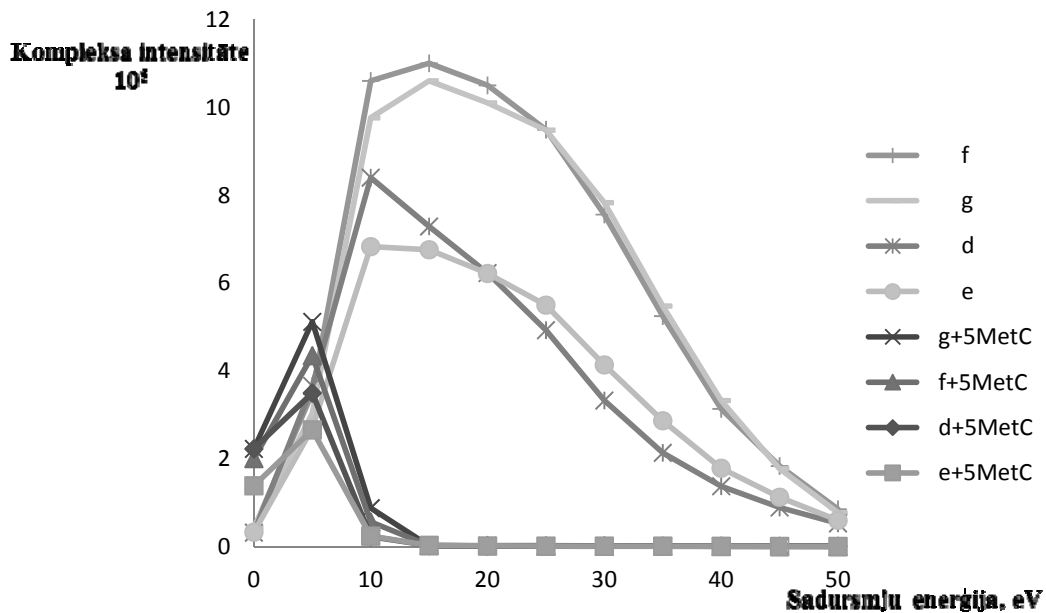
Piemērām, katrs heksilamīna, piperidīna vai 5-MetC kompleksi ar vielām a un c, atšķiras par vienu vienību no 13 V līdz 15 V.



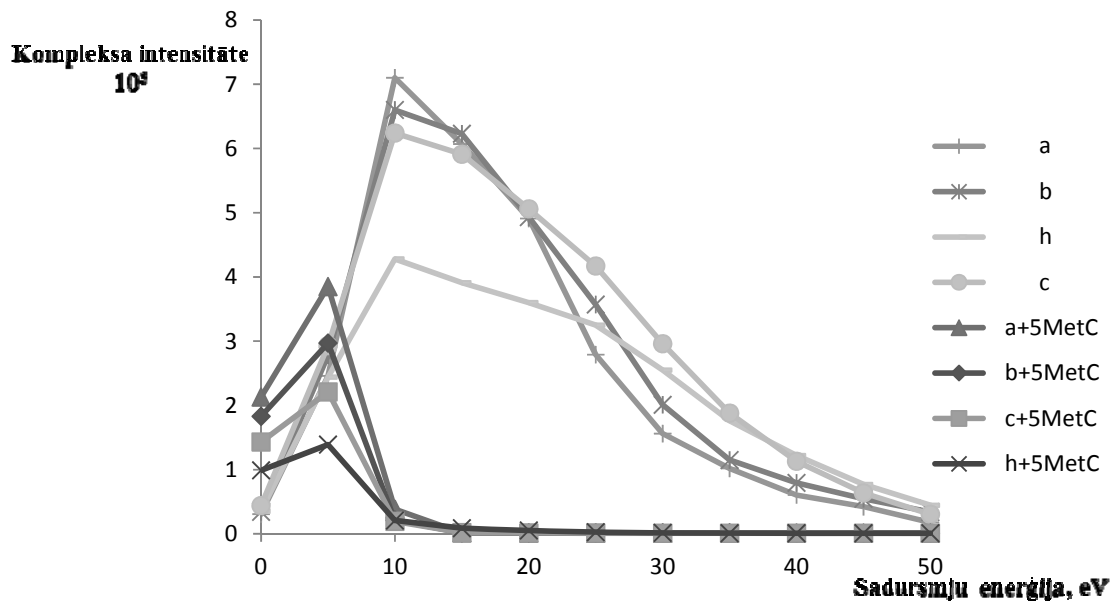
3.15. att. Piperidīna un vielu d, g, a un c kompleksu signāla intensitāte atkarībā no konusa sprieguma.

3.5. Kompleksu fragmentācija pozitīvo jonu skenējumā

Attēlos 3.16. un 3.17. var apskatīt visu 5-metilcitozīna kompleksu un 1. paaudzes fragmentu grafikus.

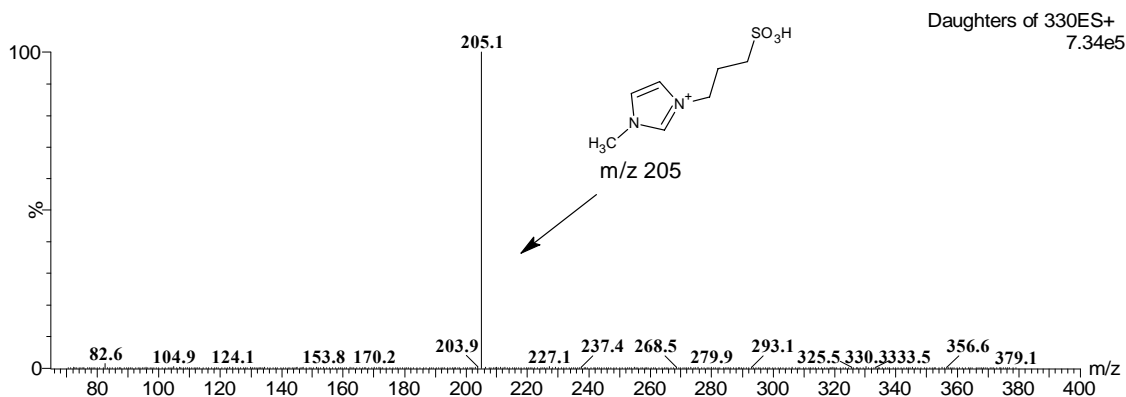


3.16. att. 5-MetC un vielu d, e, f un g kompleksu un 1. paaudzes fragmentu signālu intensitātes atkarībā no sadursmju enerģijas.



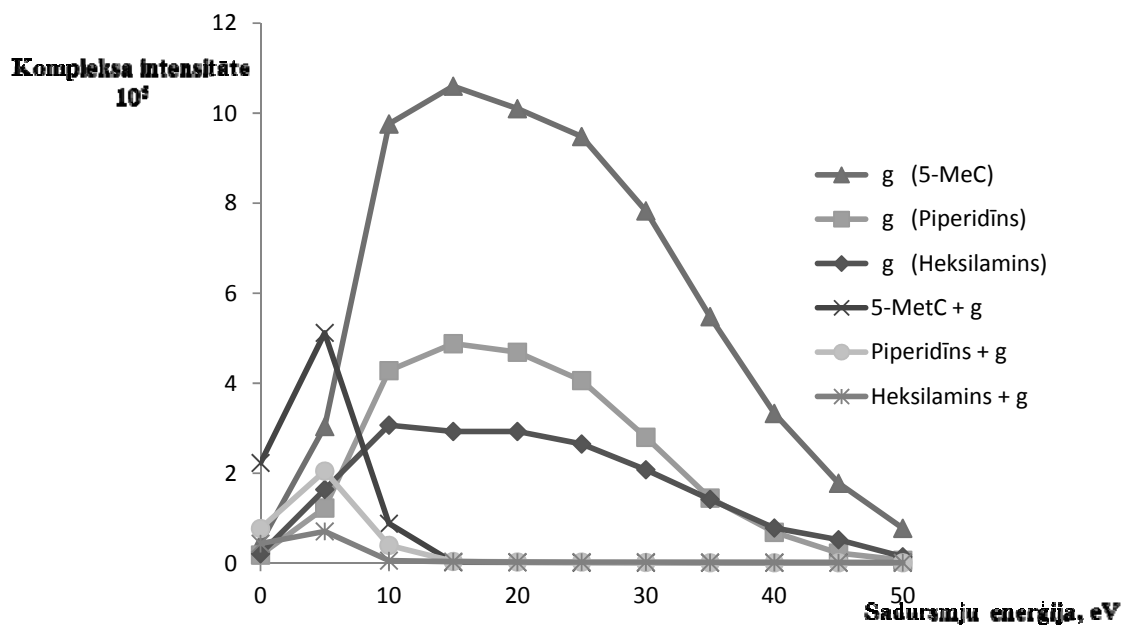
3.17. att. 5-MetC un vielu b, c, a un h kompleksu un 1. paaudzes fragmentu signālu intensitātes atkarībā no sadursmju enerģijas.

Cviterjonu kompleksi ar 5-metilcitozīnu sabrūk jau pie 10 eV un intensitāte samazinās līdz 1% pie 15 eV. Redzams, ka kompleksa 1. paaudzes “meitas” jons [Cvit+H]⁺ sasniedz sava signāla maksimumu pie 10 vai 15 eV. 5-Metilcitozīna un vielas **d** kompleksa fragmenta masspektrs iegūts pie 10 eV sadursmju enerģiju, redzams 3.18 att.



3.18. att. Kompleksa [5-MetC+d+H]⁺ fragments, iegūts ar 10 eV sadursmju enerģiju. Attēls parāda pilno kompleksa sadalīšanu un [d+H]⁺ veidošanos.

Cviterjons neveido fragmentus, kamēr nenodardās pats komplekss. Piemēram, att. 3.18. var redzēt, ka pie 10 eV sadursmes enerģijas, veidojas tikai 1. paaudzes fragments, kas atbilst 3-(3-metil-N-imidazolio)-1-propānsulfonāta jonam. Darbos [25,32] var redzēt, ka otras paaudzes joni veidojas pie sadursmju enerģijas vērtībām ≥ 10 eV un to signāli pie 10 eV nepārsniedz 1%. Tādu pašu tendenci var saskatīt ar [5-MetC+Cvit+Na]⁺ fragmentāciju. Tas nozīmē, ka komplekss gandrīz pilnīgi pārvēršas cviterjona fragmentā, ko varētu izmantot analītiskiem mērķiem, izstrādājot tādas selektīvās skenēšanas metodes kā multireakciju monitorings. Kompleksu [5-MetC+f+H]⁺ un [5-MetC+g+H]⁺ 1. paaudzes fragmenti sāk sadalīties pie 25 eV. Savukārt, kompleksi [5-MetC+a+H]⁺ un [5-MetC+d+H]⁺ sabrūk pie 15 eV.



3.19. Amīnu un 5-MetC kompleksu ar vielu g signāla intensitātes atkarībā no sadursju enerģijas.

Attēlā 3.19 var redzēt, ka cviterjonu kompleksi ar dažādiem amīniem un 5-MetC pēc savas fragmentācijas ir vienādas, izņemot kompleksu masas un signālu intensitātes, kuras jau bija apskatītas nodaļa 3.2.

SECINĀJUMI

1. 4-(1,2-Dimetil -3N-imidazolio)-1-butānsulfonāts ir mazāk stabils nekā propānsulfonāta grupas saturošie cviterjona tipa savienojumi.
2. 4-(1-Metil -3N-imidazolio)-1-butānkarboksilāts, salīdzinot ar propānsulfonāta grupas saturošajiem cviterjona tipa savienojumiem, kompleksus ar 5-metilcitozīnu neveido, jo $-\text{CO}_2^-$ ir stiprākā bāze, nekā, nekā $-\text{SO}_3^-$, bet piridīns neveido kompleksus ar cviterjona tipa savienojumiem zemās pKa vērtībās dēļ.
3. Kompleksa pētīšanai var izmantot gan acetonitrilu, gan acetonitrila/metanola maisījumu. Acetonitrila/ūdens vai metanola/ūdens maisījumos, kompleksu pētīšana ir apgrūtināta.
4. Kompleksa signāla intensitāte pieaug, palielinoties analīta pKa vērtībai.
5. Komplekss pilnīgi sadalās jau pie zemām sadursmes enerģijas vērtībām, pārvēršoties 1. paaudzes meitas jonā.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. 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**, 6, 1143-72
2. S. Kistkin. Elektroizsmidzināšanas jonizācijas apstākļu ietekme uz nekovalento struktūru veidošanos starp 5-metilcitozīnu un dažādiem cviterjonu tipa savienojumiem. Kursa darbs, LU Ķīmijas fakultāte, Rīga 2014, 42 lpp.
3. Citti L., Gervasi P., Turchi G., Mariani L., Durante M. Improved method for determination of 5-methylcytosine by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1983, **261**, 2, 315-319
4. Catania J., Keenan B., Margison G., Fairweather D. Determination of 5-Methylcytosine by Acid Hydrolysis of DNA with Hydrofluoric Acid. *Analytical biochemistry*, 1987, **167**, 347-351
5. Sonoki S., Lin J., Hisamatsu S. Liquid chromatographic determination of 5-methylcytosine in DNA with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 1998, **365**, 213-217
6. Singer J., Schnute W., Shively J., Todd C., Riggs A. Sensitive detection of 5-methylcytosine and quantitation of the 5-methylcytosine/cytosine ratio in DNA by gas chromatography-mass spectrometry using multiple specific ion monitoring. *Analytical biochemistry*, 1979, **94**, 297-301
7. Лебедев А. Масс-спектрометрия в органической химии. Москва. Бинум. Лаборатория знаний, 2003. – 493 с.
8. Holmes J.L., Aubry C., Mayer P. M. Assigning structures to ions in mass spectrometry. New York, CRC, 2006, 472 p.
9. 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
10. Ganguly A.K., Pramanik B.N., Huang E.C., Liberles S., Heimark L., Liu Y.H., Tsarbopoulos A., Doll R.J., Taveras A.G., Remiszewski S., Snow M.E., Wang Y.S., Vibulbhan B., Cesarz D., Brown J.E., del Rosario J., James L., Kirschmeier P., Girijavallabhan V. Detection and structural characterization of ras oncoprotein/inhibitors complexes by electrospray mass spectrometry. *Bioorg Med Chem*, 1997, **5**, 817–820.
11. 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.
12. Huang E. C., Pramanik B.N., Tsarboboulos A., Reichert P., Ganguly A.K., Trotta P.P., Nagabhushan T.L. Application of electrospray mass spectrometry in probing Detection of Noncovalent Complexes protein-protein and protein-ligand non-covalent interactions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1993, **4**, 624–626.
13. 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
14. Mirza U.A., Liu Y.H., Ramanathan L., Heimark L., Pramanik B.N., Malcolm B., Weber P., Ganguly A.K. Characterization of hepatitis C virus by mass spectrometry: detection of protein-Zn complex. 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, USA, Orlando, May 31-June 4, 1998..
15. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, **246**, 64–71.
16. Edra Dodbiba E., Breitbach Z. S., Wanigasekara E., Payagala T., Zhang X., Armstrong D.W. Detection of nucleotides in positive-mode electrospray ionization mass spectrometry using multiply-charged cationic ion-pairing reagents. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, **398**, 367-376
17. Martinelango P. K., Anderson J.L., Dasgupta P.K., Armstrong D. W., Rida S. Al-Horr, and Rosanne W. S. Gas-Phase Ion Association Provides Increased Selectivity and Sensitivity for Measuring Perchlorate by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2005, **77**, 4829-4835
18. Sundqvist G., Benkestock K., Roeraade J. Investigation of multiple binding sites on ribonuclease A using nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005, **19**, 1011-1016
19. 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
20. Никольский Б, Григоров О., Позин М., Справочник химика. Том 1. Москва-Ленинград..Химия. 1966. –1070 с.
21. Cook K.D., Zhou S. Protonation in Electrospray Mass Spectrometry: Wrong-Way-Round or Right-Way-Round? *J Am Soc Mass Spectrom.*, 2000, **11**, 961–966
22. Constantopoulos T.L., Jackson G. S., Enke C. G. Effects of Salt Concentration on Analyte Response Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 1999, **10**, 625– 634
23. Lambert W. Pitfalls in LC-MS(-MS) Analysis, *T + K*, 2004, **71**, 2, 64-68

24. Podjava A. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu analīze šķīdumu hromatogrāfijas-masspektrometrijas apstākļos. Bakalaura darbs. LU Ķīmijas fakultāte, Rīga 2009, 55 lpp.
25. Nakurte I., Mekss P., Klavins K. Zicmanis A., Vavilina G., Dubrovina S. Collision-induced dissociation of sulfurcontaining imidazolium ionic liquids. *J. Mass. Spectrom.*, 2008, **43**, 35-41.
26. Kanagasabapathy S., Kumar S M, Gajanan J S, Kadu M.V., Preeti L., Renuka M., Anasuya S., Parasuraman K. A SOLVENT SYSTEM FOR DISSOLUTION OF PULP AND POLYMER. Patents, wo2013/164845, Mar. 30. 2012. s *Chem. Abstr.* 2013.
27. pKa Data Compiled by R. Williams, http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf (skatīts 25.03.13)
28. Rived F., Canals I., Bosch E., Rosés M. Acidity in methanol–water. *Analytica Chimica Acta*, 2001, **439**, 315–333.
29. Sarmini K., Kenndler E. Ionization constants of weak acids and bases in organic solvents. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1999, **38** 123–137.
30. 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
31. 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
32. Podjava A. Cviterjonu tipa jonu šķidrumu fragmentācija sadursmju inducētas disociācijas apstākļos. Maģista darbs. LU Ķīmijas fakultāte, Rīga 2011, 68 lpp.