

# SPEKTROMETRIA MAS W ROZRÓŻNIANIU ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH

## CHIRAL RECOGNITION BY MASS SPECTROMETRY

**Ewelina Drabik**

*Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych  
Polskiej Akademii Nauk,  
Środowiskowe Laboratorium Badań Fizykochemicznych,  
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź  
e-mail: ewdrabik@wp.pl*

---

Abstract

Wstęp

1. Techniki jonizacji i typy analizatorów mas stosowane w analizie związków chiralnych
2. Metody analizy związków chiralnych
  - 2.1. Tworzenie kompleksów typu gość-gospodarz lub układów analit-selektor
  - 2.2. Enancjoselektywne reakcje kompleksów inkluzyjnych jon-cząsteczka w fazie gazowej
  - 2.3. Metoda kinetyczna
  - 2.4. Analiza ilościowa związków chiralnych oparta na metodzie kinetycznej
  - 2.5. Wyznaczenie współczynnika CR w oparciu o widma jonów produktów dla określonych kompleksów
3. „Ruchliwość jonów” w analizie związków chiralnych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**mgr Ewelina Drabik** ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2005 roku. Pracę magisterską wykonała w Katedrze Chemii Fizycznej. W roku 2006 rozpoczęła pracę w Środowiskowym Laboratorium Badań Fizykochemicznych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, gdzie obecnie pracuje jako asystent. Obszarem jej zainteresowań jest zastosowanie spektrometrii mas w badaniach stereochemii związków organicznych.

## ABSTRACT

The phenomenon of *optical activity* was discovered by Louis Pasteur in 1848. Since this time, chirality of organic compounds observed in biological systems has become a central theme in scientific research. Synthesis and quantitation of enantiomerically pure compounds is important for a wide range of applications. Chirally pure compounds are required not only by pharmacology, but they are also of interest in cosmetic and food industry and many other applications.

Similarity of enantiomers in their chemical and physical properties, except for optical rotation, makes their separation and detection very difficult. Until now, many methods have been used for the enantioselective discrimination of organic compounds, including nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), circular dichroism (CD), capillary electrophoresis (CE) and chromatography (GC, HPLC), where an interference of a solvent cannot be excluded.

Recent studies have shown that mass spectrometry (MS) is an alternative approach to traditional method for chiral recognition and determination of enantiomeric composition. Although, mass spectrometry has been considered as insensitive to chirality because enantiomers have the same mass and show identical mass spectra, it is now accepted as important tool for differentiating of enantiomeric compounds through their interactions with chiral reference molecules (Fig. 1). The ability to transfer diastereomeric non-covalent complexes between chiral selectors and analyte enantiomers, which differ in stability, into the gas-phase and measure such differences through mass spectrometric ion abundances, has appeared with development of soft ionization techniques such electrospray ionization (ESI), fast atom bombardment (FAB) and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI). Mass spectrometry-based methods for chiral recognition and quantitative determination of enantiomeric purity are attractive due to their speed, high sensitivity, low sample consumption, tolerance to impurities and ability to probe the analyte in a solvent free environment.

Currently, there are four well-defined approaches for determining a measure of enantiomer discrimination, using either single-stage or tandem mass spectrometry. They can be classified into the following categories: (1) measurement of the relative abundance of diastereomeric complexes between chiral reference compound and the enantiomers (usually one isotopically labeled [10]), (2) enantioselective ion/molecule reaction between diastereomeric complexes and chiral or achiral reactants [11], (3) kinetic method [12] and (4) collision-induced dissociation (CID) of diastereomeric adducts in a tandem mass spectrometry (MS/MS) experiment [61, 62].

Over the past decade, new approaches to chiral separation and analysis of enantiomers have been introduced, where molecules are separated based on their mobility (ion mobility spectrometry) [66].

**Keywords:** mass spectrometry, chiral recognition, *host-guest* (analyte-selector) interaction, kinetic method, ion-molecule reaction, ion mobility spectrometry

**Słowa kluczowe:** spektrometria mas, rozróżnianie związków chiralnych, oddziaływanie typu gość-gospodarz (analit-selektor), metoda kinetyczna, reakcje kompleksów jon-cząsteczka, spektrometria „ruchliwości jonów”

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

CD	– dichroizm kołowy
CID	– dysocjacja indukowana zderzeniami
CE	– elektroforeza kapilarna
CIF	– ułamek intensywności pików kompleksu (ang. <i>complex intensity fraction</i> )
CR	– „rozpoznanie chiralne” (ang. <i>chiral recognition</i> )
CSP	– chiralne fazy stacjonarne
<i>e.e.</i>	– nadmiar enancjomeryczny (czystość enancjomeryczna)
ESI	– elektrosprej
FAB	– bombardowanie szybkimi atomami
FTICR	– cyklotronowy rezonans jonów z transformacją Fouriera
GC	– chromatografia gazowa
HPLC	– wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa
LSIMS	– spektrometria mas jonów wtórnych w ciekłej matrycy (ang. <i>liquid secondary ion mass spectrometry</i> )
MALDI	– desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą
MS	– spektrometria mas
MS/MS	– tandemowa spektrometria mas
NMR	– spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
PA	– powinowactwo względem protonu (ang. <i>proton affinity</i> )
Q	– kwadrupol
QIT	– kwadrupolowa pułapka jonów
QR	– metoda QR (ang. <i>quotient ratio method</i> )
QR <sup>fixed</sup>	– metoda QR <sup>fixed</sup> (ang. <i>fixed-ligand quotient ratio method</i> )
RPI	– względna intensywność pików (ang. <i>relative peak intensity</i> )
SA	– selektand
SO	– selektor
SR	– metoda SR (ang. <i>single ratio method</i> )
TOF	– analizator czasu przelotu

## WSTĘP

Zjawisko czynności optycznej związków organicznych zostało po raz pierwszy zaobserwowane w roku 1848 przez Louisa Pasteura. Różnice w skręcalności płaszczyzny polaryzacji światła, jakie zaobserwował dla roztworów dwóch form krystalicznych kwasu winowego zostały szeroko opisane w pracy zatytułowanej *Researches on the Molecular Asymmetry of Natural Organic Products* [1], a fakt ten powszechnie uznany za początek rozwoju stereochemii.

Zaproponowana przez Kelvina w roku 1893 definicja chiralności, zgodnie z którą „figurę geometryczną lub grupę punktów określamy jako chiralną wtedy, jeśli posiada ona odbicie lustrzane, które nie może być na nią nałożone” [2], funkcjonuje do dziś i przyjęta została również w terminologii chemicznej. Częsteczki względem siebie chiralne występują w formie dwóch stereoisomerów, tzw. enancjomerów. Enancjomery tego samego związku, zwane również izomerami optycznymi wykazują identyczne właściwości fizykochemiczne. Wyjątkiem jest jedynie kierunek skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego, przechodzącego przez substancję lub jej roztwór. Zgodnie z przyjętą konwencją enancjomer, który skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego kołowo w prawo oznaczany jest symbolem (+) i nazywany prawoskrętnym, natomiast skręcający płaszczyznę takiego światła w lewo – lewoskrętnym i ma symbol (–).

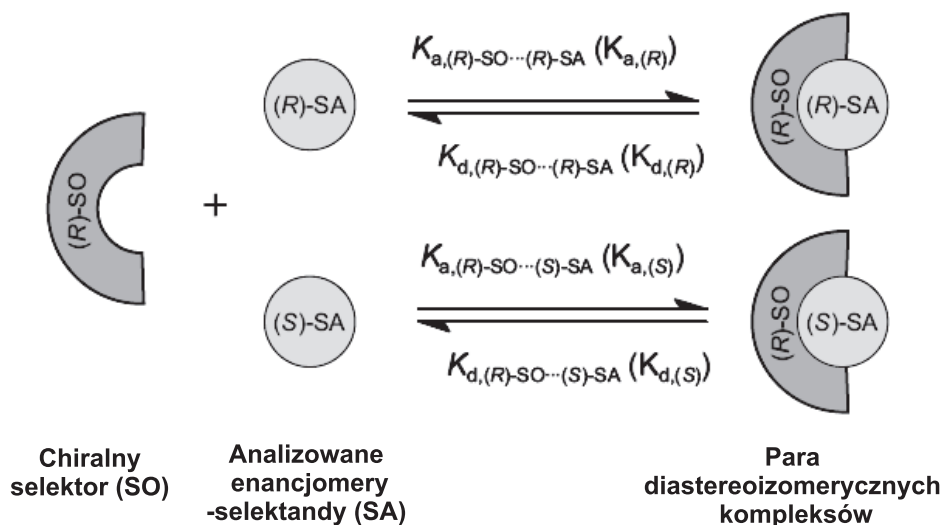
Pełne scharakteryzowanie substancji optycznie czynnej wymaga określenia nadmiaru enancjomerycznego i/lub diastereoizomerycznego oraz oznaczenia absolutnej konfiguracji wokół elementu chiralności odpowiedzialnego za pojawienie się takiego rodzaju aktywności.

Zjawisko występowania izomerii optycznej ma szczególne znaczenie dla organizmów żywych. Ścisłe określone enancjomery są monomerami większości naturalnych białek, węglowodanów, kwasów nukleinowych, terpenów i szeregu innych składników żywej materii. Ponadto w przypadku związków biologicznie czynnych takich jak leki i inne farmaceutyki, często tylko jeden z enancjomerów posiada właściwości terapeutyczne, podczas gdy drugi stanowi zbędny balast lub wywołuje niepożądane skutki. Możliwość otrzymywania i stosowania czystych enancjomerów jest również istotna z punktu widzenia przemysłu spożywczego, kosmetycznego czy chemii polimerów.

Skutkiem coraz większego zapotrzebowania na pojedyncze enancjomery jest nie tylko poszukiwanie nowych sposobów pozyskiwania związków homochiralnych (np. synteza asymetryczna), ale również rozwój metod analitycznych określających ich czystość optyczną lub nadmiar enancjomeryczny *e.e.* (ang. *enantiomeric excess*).

Ze względu na brak istotnych różnic we właściwościach fizykochemicznych enancjomerów określenie ich zawartości przy użyciu klasycznych metod analitycznych jest bardzo trudne. Obecnie wśród metod wykorzystywanych w kontroli czystości optycznej związków chemicznych najczęściej stosowanymi są: spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [3], dichroizm kołowy (CD) [4], elek-

troforeza kapilarna (CE) [5] oraz metody chromatograficzne: wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC) [6] i chromatografia gazowa (GC) [7]. Wszystkie z wymienionych metod, z wyjątkiem dichroizmu kołowego, wymagają obecności chiralnego środowiska, w którym optycznie czynny selektor (SO) oddziałując z danym enancjomerem analitu, zwanym selektandem (SA), tworzy przejściowy diastereoizomeryczny kompleks. Kompleksy utworzone przez poszczególne enancjomery danego związku często różnią się stabilnością. Uzyskany w ten sposób efekt różnicowania właściwości fizycznych badanych enancjomerów umożliwia ich rozróżnienie z zastosowaniem wymienionych technik analitycznych (Rys. 1). W praktyce jednak podczas stosowania opisanej strategii często pojawia się wiele problemów wynikających ze skomplikowanej i czasochłonnej procedury przygotowania analizy czy potrzeby użycia relatywnie dużej ilości próbki. Alternatywne podejście w analizie jakościowej, jak również ilościowej związków chiralnych, pozbawione takich ograniczeń stwarza spektrometria mas (MS), mimo iż enancjomery dają identyczne widma, a sama technika nazywana jest potocznie „chiralnie ślepą”. Wykorzystanie spektrometrii mas jako użytecznego narzędzia w analizie związków chiralnych możliwe jest poprzez tworzenie diastereoizomerycznych kompleksów w obecności związków chiralnych, w których słabe oddziaływania niekowalencyjne są przenoszone do fazy gazowej podczas wykonywanego eksperymentu.



**Jeżeli  $K_{a,(R)} \neq K_{a,(S)}$  i/lub  $K_{d,(R)} \neq K_{d,(S)}$ , selektor (R)-SO jest enancjoselektywny względem enancjomerów SA.**

Rysunek 1. Powstawanie i/lub dysocjacja diastereoizomerycznych kompleksów pomiędzy chiralną cząsteczką selektora ((R)-SO) i enancjomerycznymi cząsteczkami analitu ((R)-SA i (S)-SA) [9]

Figure 1. Generalized description of a formation and/or dissociation of diastereomeric complexes between a chiral selector molecule ((R)-SO) and enantiomeric selectands ((R)-SA and (S)-SA) [9]

Podstawowe cechy, stanowiące o użyteczności spektrometrii mas w analizie związków chiralnych to szybkość analizy (jakościowej i ilościowej), wysoka czułość pomiarów, tolerancja na zanieczyszczenia oraz znacznie mniejsza ilość wymaganego analitu. Pełną optymalizację parametrów pomiaru wraz z rejestracją widma można wykonać już dla kilku mikrogramów substancji. Dodatkowo spektrometria mas eliminuje możliwy wpływ rozpuszczalnika lub fazy stacjonarnej na wynik przeprowadzonej analizy, co ma miejsce np. w przypadku metod chromatograficznych.

Pierwsza praca omawiająca eksperymenty nad rozróżnianiem enancjomerów z wykorzystaniem MS pochodzi z roku 1977 [8]. False i Wright opisali w niej wpływ „chiralności” estrów kwasu winowego na względną intensywność wybranych sygnałów, które odpowiadały powstającym w warunkach jonizacji chemicznej dimerom.

W późniejszym okresie, do znacznego rozwoju w dziedzinie MS, przyczyniło się wprowadzenie tzw. „łagodnych” technik jonizacji, wśród których na szczególną uwagę zasługują: elektrosprej (ang. *Electrospray Ionisation*, ESI), jonizacja za pomocą bombardowania szybkimi atomami (ang. *Fast Atom Bombardment*, FAB) czy desorpcja/jonizacja wspomagana matrycą (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*, MALDI). Istotny postęp nastąpił również wyniku zastosowania nowych, opartych na innych zasadach działania, analizatorów mas.

Możliwości, jakimi dysponuje współczesna spektrometria mas pozwoliły na wprowadzenie szeregu metod, które sklasyfikowano w czterech grupach i opisano w wielu pracach przeglądowych [9]. Wykonanie oznaczeń w poszczególnych grupach metod jest możliwe dzięki:

- tworzeniu przez analizowane enancjomery diastereoizomerycznych kompleksów typu gość-gospodarz (ang. *host-guest method*) w obecności chiralnych związków, które zdolne są inkludować mniejsze cząsteczki, lub układów analit-selektor. Przy rozróżnianiu enancjomerów wykorzystuje się pomiar względnych intensywności pików, odpowiadających poszczególnym dynamicznym diastereoizomerom, które z założenia różnią się stabilnością w warunkach eksperymentu. Zwykle jeden z analizowanych enancjomerów jest znaczony trwałym izotopem, dzięki czemu piki odpowiadające utworzonym diastereoizomerycznym kompleksom są przesunięte względem siebie o określoną wartość  $m/z$  [10],
- monitorowaniu stałych równowagi lub stałych szybkości reakcji wymiany cząsteczki analitu w diastereoizomerycznym kompleksie typu gość-gospodarz (analit-selektor) przez chiralną lub optycznie nieczynną cząsteczkę reagenta wprowadzoną w warunkach analizy [11],
- utworzeniu trimerycznego kompleksu analitu i enancjomerycznie czystego odnośnika w obecności dwuwartościowych jonów metali  $[M^{2+}(\text{ref})_2(\text{A})\text{-H}]^+$  (zwykle metali grup przejściowych) i monitorowaniu szybkości konkurencyjnych procesów dysocjacji indukowanych zderzeniami (ang. *Collision-Induced Dissociation*, CID) [12],
- wyznaczeniu współczynnika CR (ang. *chiral recognition ratio*), jako stosunku względnej intensywności tylko jednego jonu fragmentacyjnego do

jonu podlegającego fragmentacji lub stosunku dwóch jonów fragmentacyjnych powstałych w wyniku dysocjacji indukowanej zderzeniami.

Stosując inne kryteria, wymienione metody podzielić można na te, które wymagają rejestracji jedynie podstawowego widma mas (pierwsza grupa) i takie (grupa druga) gdzie konieczne jest zastosowanie tandemowej spektrometrii mas (ang. *tandem mass spectrometry*, MS/MS). W pierwszej grupie metod rejestruje się widma, w których piki odpowiadające utworzonym diastereoizomerom przesunięte są o określoną wartość  $m/z$  w wyniku zastosowania znaczonego izotopowo jednego z enancjomerów. Znacznie szerzej wykorzystywane są metody grupy drugiej, gdzie jony o wybranej wartości  $m/z$  pod wpływem niskoenergetycznych zderzeń ulegają określonym procesom fragmentacji (widma CID).

W praktyce metoda MS/MS polega na tym, że z wiązki jonów selekcjonuje się wybrany jon, nazywany jonem prekursorem (ang. *precursor ion*), który poddawany jest kolizjom, zwykle z cząsteczkami wprowadzonego gazu obojętnego, na skutek czego rozpada się na jony fragmentacyjne (ang. *product ions*). Dzięki tej metodzie możliwe jest rejestrowanie widm jonów powstałych w wyniku fragmentacji wybranego jonu prekursora (ang. *product ion mass spectra*), widm jonów, które ulegając fragmentacji wytwarzają jon o wybranej masie (ang. *precursor ion mass spectra*) oraz widm jonów, które ulegają fragmentacji tracąc obojętną cząsteczkę o wybranej masie (ang. *neutral loss mass spectra*).

## 1. TECHNIKI JONIZACJI I TYPY ANALIZATORÓW MAS STOSOWANE W ANALIZIE ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH

Rozróżnianie enancjomerów w spektrometrii mas stało się możliwe w momencie wprowadzenia odpowiednich technik jonizacji, podczas których słabe oddziaływania tworzone pomiędzy analitem a chiralną cząsteczką odnośnika lub jonem metalu mogły być zachowane i przeniesione do fazy gazowej w trakcie wykonywania eksperymentu.

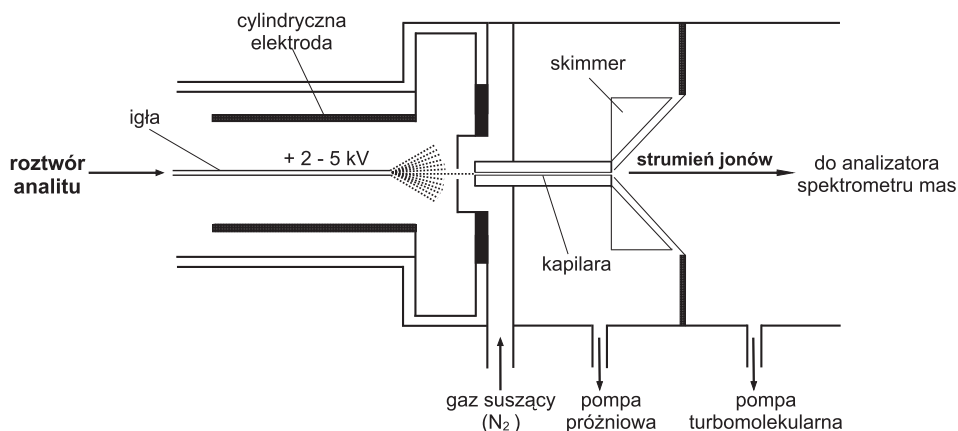
W roku 2001 ukazała się praca przeglądowa na temat niekowalencyjnych oddziaływań w układach typu *gość-gospodarz* w fazie gazowej opisująca możliwości ich obserwacji przy zastosowaniu spektrometrii mas [13].

W ostatniej dekadzie najpowszechniej stosowaną techniką jonizacji w spektrometrii mas jest elektrosprej (ESI). Pionierskie prace dotyczące tej techniki należą do Fenna i pochodzą już z połowy lat osiemdziesiątych [14]. Podstawową zaletą ESI jest szerokie spektrum zastosowań w analizie różnych grup związków, od małych cząsteczek począwszy, przez wielkocząsteczkowe biopolimery, takie jak białka czy oligonukleotydy, po złożone układy kompleksowe.

Jonizując badany związek techniką ESI, analit rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku, zwykle z niewielkim dodatkiem kwasu, ułatwiającym jego protonowanie. Następnie roztwór zostaje wprowadzany do komory, w której utrzymywane jest ciśnienie atmosferyczne. Przepływ cieczy odbywa się przez kapilarę



o stosunkowo małej średnicy, dzięki czemu zachowana jest niewielka szybkości przepływu roztworu (2–100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Przyłożone do kapilary napięcie rzędu 2–5 kV powoduje akumulację ładunku na jej końcu, czego efektem jest utworzenie przez przepływającą ciecz tzw. dynamicznego stożka Taylor'a [15]. Odpowiednio wysokie napięcie powoduje, że gęstość ładunku jest na końcu stożka na tyle wysoka, że napięcie powierzchniowe nie może utrzymać cieczy w całości i ulega ona rozproszeniu tworząc strumień drobnych, równomiernie naładowanych kropli. Wytworzone krople zmniejszają objętość pod wpływem gazu suszącego (następuje odparowywanie rozpuszczalnika) oraz odpychania pomiędzy równoimiennymi ładunkami zgromadzonymi na ich powierzchni. Proces ten w konsekwencji prowadzi do powstania wiązki jonów, która wprowadzana jest do analizatora spektrometru mas (Rys. 2).



Rysunek 2. Schemat źródła jonów do ESI.  
Figure 2. Schematic depiction of an ESI source

Jony powstałe przy użyciu techniki ESI charakteryzują się niewielkim nadmiarem energii wewnętrznej, co sprawia, że elektrosprej jest jedną z najłagodniejszych metod jonizacji spośród obecnie znanych.

Inne metody jonizacji, też zaliczane do tzw. „metod miękkich”, to jonizacja w wyniku bombardowania szybkimi atomami FAB i desorpcja/jonizacja wspomagana matrycą MALDI. Techniki te również pozwalają na obserwację „połączeń niekowalencyjnych” w warunkach wykonywanego eksperymentu. Ich wykorzystanie do badań związków chiralnych nie jest jednak obecnie tak duże jak techniki ESI.

Jonizacja techniką FAB następuje na skutek bombardowania roztworu analitu w odpowiednio dobranej ciekłej matrycy za pomocą strumienia atomów argonu lub ksenonu o energii rzędu 3–8 keV. Stosowana matryca ułatwia desorpcję jonów substancji badanej. Ulegając jonizacji w pierwszej kolejności pośredniczy w przekazywaniu energii niesionej przez wiązkę „rozpędzonych” atomów, wspomagając proces jonizacji analitu. Ponadto zapewnia równomierne stężenie badanej substancji w całym obszarze podlegającym działaniu wiązki energetycznie wzbudzonych atomów.

Jonizacja próbki może również odbywać się przy wykorzystaniu strumienia jonów cezu ( $\text{Cs}^+$ ). Modyfikacja ta znana jest pod nazwą spektrometrii mas jonów wtórnych w ciekłej matrycy (ang. *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*, LSIMS). Z uwagi na to, że w praktyce techniki FAB i LSIMS, jak również widma rejestrowane przy ich zastosowaniu są bardzo do siebie podobne, akronim „FAB” jest często używany w stosunku do obu metod.

MALDI jako technika jonizacji, rozwijana w spektrometrii mas od połowy lat 80., wykorzystuje ideę znaną z technik FAB i LSIMS. Podstawowym założeniem MALDI jest użycie odpowiednio dobranej matrycy pośredniczącej w przekazywaniu energii umożliwiającej jonizację badanej substancji. W tym przypadku źródłem energii jest promieniowanie laserowe. Jonizacja cząsteczek analitu następuje po naświetleniu wiązką lasera o energii, która nie doprowadza do ich fragmentacji. Po zjonizowaniu próbki, strumień jonów kierowany jest do analizatora, gdzie następuje ich rozdział w zależności od wartości  $m/z$ .

Obecnie spektrometry mas wyposażone są w analizatory różnych typów. Na szczególną uwagę, z punktu widzenia badania związków chiralnych, zasługują analizatory kwadrupolowe (ang. *Quadrupole*, Q), różnego rodzaju pułapki jonów (ang. *Ion Trap*, IT), analizatory cyklotronowego rezonansu jonów z transformacją Fouriera (ang. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*, FTICR) oraz analizatory czasu przelotu (ang. *Time-of-Flight*, TOF). Spektrometry, w których analizatory łączone są szeregowo umożliwiają stosowanie tzw. tandemowej spektrometrii mas (MS/MS). W takim systemie, pierwsze urządzenie służy do wyizolowania jonu o określonej wartości  $m/z$ , po czym wybrany jon zostaje poddany dalszej fragmentacji, a powstałe jony fragmentacyjne są analizowane w drugim z analizatorów.

Najpowszechniej używanym analizatorem mas jest analizator kwadrupolowy Q. Zbudowany jest on z czterech równoległych prętów ułożonych symetrycznie, do których przykładana jest napięcie prądu stałego oraz nakładany potencjał zmieniający się z częstością radiową. Dzięki temu działa on jako filtr masy, czyli w danym momencie przepuszcza tylko jony o określonej wartości  $m/z$ . Spektrometry z analizatorem kwadrupolowym są aparatami o relatywnie niskiej zdolności rozdzielczej, zaś ich podstawową zaletą jest proste połączenie z szeregiem układów służących do wprowadzania próbek np. z chromatografem.

Wśród pułapek jonowych najczęściej wykorzystywaną jest kwadrupolowa pułapka jonów (ang. *Quadrupole Ion Trap*, QIT). Jej działanie podobne jest do zwykłego analizatora kwadrupolowego. Pomiaru masy dokonuje się tu przez zatrzymanie w specjalnej komorze (pułapce) jonów o szerokim zakresie wartości  $m/z$ , dzięki zastosowaniu odpowiedniego pola elektrycznego. Następnie, jony te są selektywnie wyrzucane do detektora, na skutek przykładanego, zmieniającego się sinusoidalnie potencjału o częstości radiowej. Analizator taki pozwala stosować tandemową spektrometrię mas bez konieczności sprzęgania go z kolejnym analizatorem. Wyselekcjonowane jony są zatrzymywane w pułapce, a następnie wskutek przyłożonego dodatkowego impulsu o odpowiedniej częstości ulegają procesom fragmentacji.

Jony fragmentacyjne są dalej „wypychane” do detektora w kolejności zgodnej ze zmianą wartości  $m/z$ .

Analizator cyklotronowego rezonansu jonów z transformacją Fouriera (FTICR), podobnie jak pułapka jonów, zatrzymuje jony wewnątrz odpowiednio zbudowanej komory. Jony znajdujące się pod wpływem pola magnetycznego i elektrycznego poruszają się w jej wnętrzu po orbitach kołowych, gdzie dodatkowo przykładane napięcie o częstotliwości radiowej powoduje zmianę ich toru.

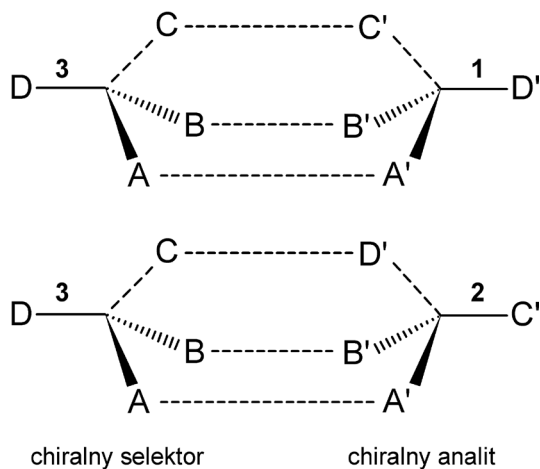
Główną zaletą spektrometru mas wyposażonego w analizator typu FTICR, podobnie jak w pułapkę jonów QIT jest fakt, iż jony mogą przebywać w nich do kilkudziesięciu minut. Tak „długi” okres umożliwia badanie składu mieszaniny powstających jonów w określonych odstępach czasu. Pozwala to na prowadzenie precyzyjnych badań kinetycznych, które z uwagi na wysoką próżnię w komorze analizatora ( $10^{-5}$ – $10^{-8}$  milibara), nie są narażone na błędy wynikające z zakłóceń spowodowanych dodatkowymi oddziaływaniami między jonami.

Zasada działania analizatora czasu przelotu TOF jest zupełnie inna. Jony przyspieszane przy pomocy impulsu elektrycznego dryfują przez komorę analizatora, w której nie poddawane są działaniu żadnego pola. Wskutek tego jony o różnym stosunku masy do ładunku poruszają się z różną prędkością i w różnym czasie docierają do detektora.

## 2. METODY ANALIZY ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH

### 2.1. TWORZENIE KOMPLEKSÓW TYPU GOŚĆ-GOSPODARZ (ANG. *HOST-GUEST METHOD*) LUB UKŁADÓW ANALIT-SELEKTOR

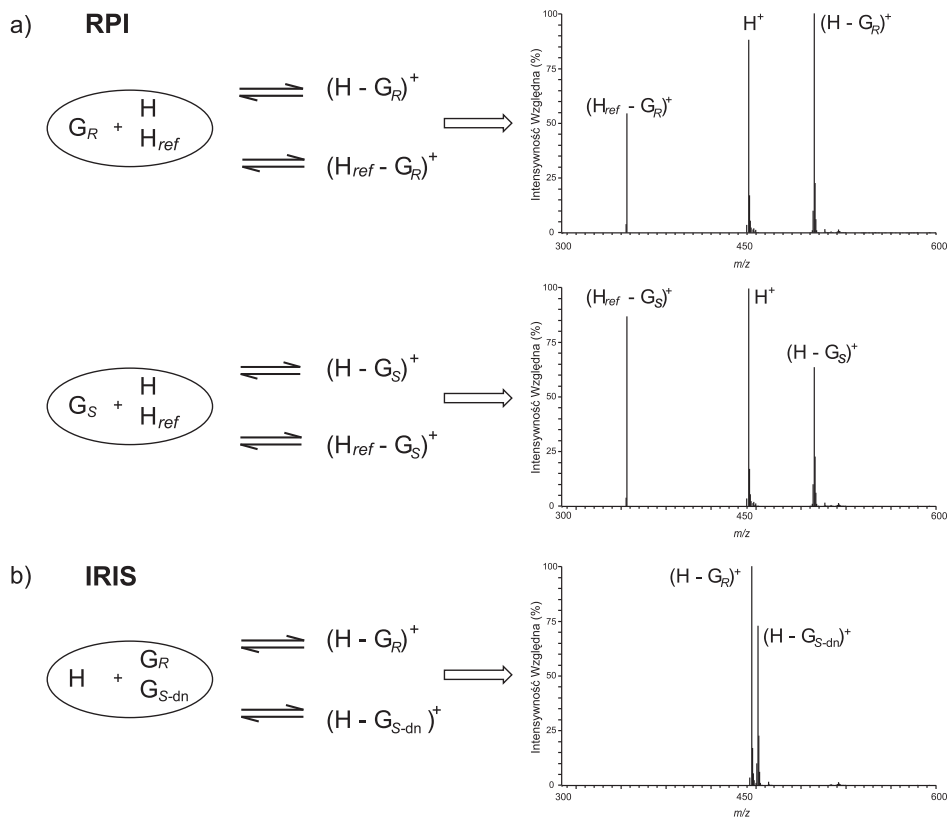
Zgodnie z powszechnie przyjętym poglądem, różnicowanie związków chiralnych przy użyciu metod chromatograficznych wymaga utworzenia przez cząsteczkę analitu stabilnego w warunkach analizy kompleksu z drugą enancjomerycznie czystą cząsteczką. Są to kompleksy typu analit–selektor lub *gość–gospodarz*. Układy te tworzą się dzięki obecności słabych oddziaływań, takich jak oddziaływanie dipol–dipol, hydrofobowe, elektrostatyczne, van der Waals’a czy wiązania wodorowe (Rys. 3) w przynajmniej trzech miejscach. Taki model oddziaływań oparty na trzech punktach zwany regułą trzech punktów lub regułą Pirkle’a, zakłada, że jedno z oddziaływań występujących pomiędzy enancjomerem a chiralnym selektorem powinno być stereochemicznie zależne tzn. zależeć od konfiguracji centrum stereogenicznego danego enancjomeru. W przypadku spektrometrii mas, jako techniki analitycznej, oczywistym wymogiem jest występowanie podobnych oddziaływań pomiędzy wyjściową cząsteczką a powstałym jonem w fazie gazowej, w warunkach wykonywanego eksperymentu.



Rysunek 3. Reguła trzech punktów (reguła Pirkle'a) stosowana w rozróżnianiu enancjomerów (1 i 2) przez chiralny selektor (3)

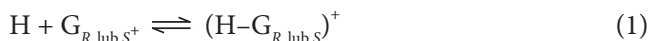
Figure 3. Schematic illustration of the three-point "Pirkle Rule" required for chiral recognition of enantiomers (1 and 2) by chiral selector (3)

Istotny wkład w rozwój badań nad trwałością kompleksów związków chiralnych typu *gość-gospodarz* mają prace Sawady, w których do jonizacji analizowanych cząstek wykorzystywano głównie bombardowanie szybkimi atomami (FAB) [10]. Rozróżnienia enancjomerów dokonywano na podstawie stosunku względnych intensywności pików (ang. *Relative Peak Intensity*, RPI) odpowiadających kompleksom, jakie optycznie czysta cząsteczka analitu ( $G_R$  lub  $G_S$ ) utworzyła z chiralną cząsteczką *gospodarza* (H) wobec kompleksów utworzonych przez dany enancjomer z cząsteczką odnośnika ( $H_{ref}$ ) (równania 1–3) [16]. Użyty odnośnik, oprócz właściwości kompleksujących powinien wykazywać podobieństwo chemiczne i strukturalne z chiralnym *gospodarzem*. Z uwagi na to, iż eksperyment wymaga wykonania dwóch oddzielnych widm, bo osobno dla poszczególnych enancjomerów, zachowanie identycznych warunków pomiaru jest często trudne do osiągnięcia i może prowadzić do dość dużego błędu (Rys. 4a).



Rysunek 4. Rozróżnianie związków chiralnych w oparciu o trwałość kompleksów typu gość–gospodarz: a) RPI, b) IRIS

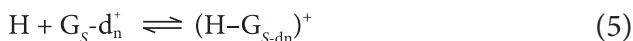
Figure 4. Recognition of chiral compounds based on stability of host–guest complexes: a) RPI, b) IRIS



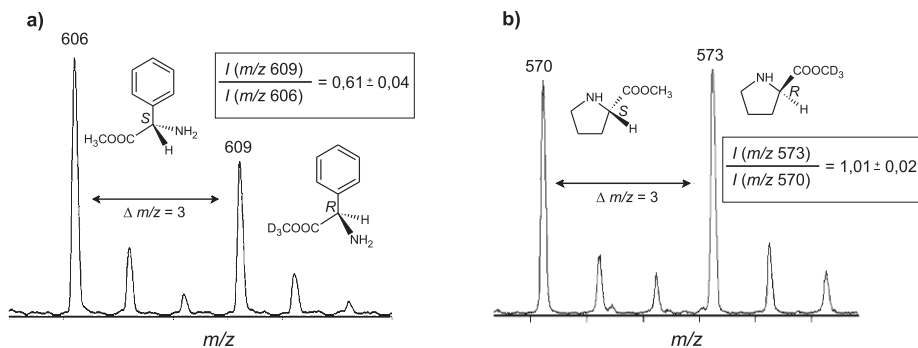
$$\text{RPI} = \frac{\text{RPI}_{(R)}}{\text{RPI}_{(S)}} = \frac{I[(\text{H} - \text{G}_R)^+]/I[(\text{H}_{\text{ref}} - \text{G}_R)^+]}{I[(\text{H} - \text{G}_S)^+]/I[(\text{H}_{\text{ref}} - \text{G}_S)^+]} \quad (3)$$

Zastosowanie znaczonych izotopowo cząsteczek gościa (ang. *enantiomer-labeled guest method*) lub gospodarza (ang. *enantiomer-labeled host method*) umożliwiło nie tylko rozróżnianie związków chiralnych, ale także analizę ilościową poszczególnych enancjomerów, już podczas rejestracji pojedynczego widma mas. Obecnie metoda ta jest dość powszechnie wykorzystywana w eksperymentach, w których jako technikę jonizacji stosuje się elektrosprej (ESI) [17], zaś znacznie rzadziej jonizację przez bombardowanie szybkimi atomami [18].

Metoda znaczonej trwałym izotopem cząsteczki *gościa* wymaga przygotowania równomolowej mieszaniny analizowanych enancjomerów, z których jeden jest znaczony izotopowo ( $G_R$  i  $G_{S-dn}$ ), w obecności znacznie mniejszej ilości związku pełniącego rolę *gospodarza* (H) (równanie 4 i 5, Rys. 4b). Dzięki temu sygnały, które odpowiadają utworzonym kompleksom ( $H-G_R$ ) i ( $H-G_{S-dn}$ ) są przesunięte względem siebie o określoną wartość  $m/z$ . Miarą zróżnicowania enancjomerów jest stosunek względnej intensywności tych pików w widmie mas (zgodnie z przyjętą terminologią IRIS - równanie 6).



$$IRIS = \frac{I_R}{I_{S-dn}} = \frac{I[(H-G_R)^+]}{I[(H-G_{S-dn})^+]} \quad (6)$$

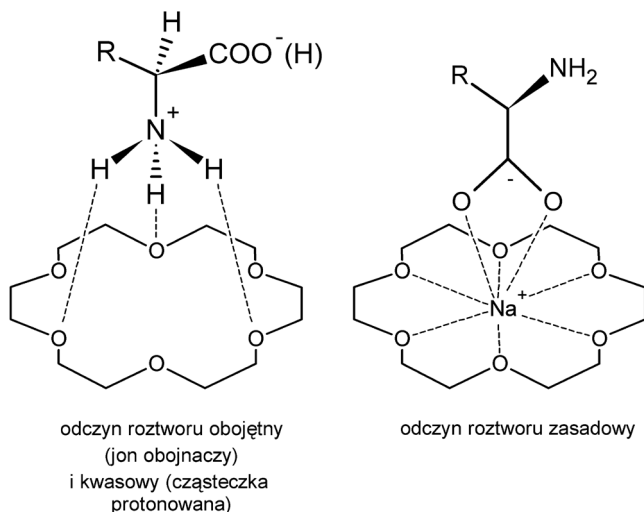


Rysunek 5. Widma ESI-TOF trójskładnikowych roztworów zawierających a) kwas eter 18-korona-6-2,3,11,12-tetrakarboksylowy ((-)-18C6TA) i enancjomery estrów metylowych fenyloglicyny (*L*-PG-CH<sub>3</sub> i *D*-PG-CD<sub>3</sub>), b) (-)-18C6TA i enancjomery estrów metylowych proliny (*L*-Pro-CH<sub>3</sub> i *D*-Pro-CD<sub>3</sub>) w metanolu w stosunku 1:10:10 [19]

Figure 5. ESI-TOF analysis of 1:10:10 ternary solutions in methanol containing a) ([18]crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid ((-)-18C6TA), enantiomers of phenylglycine methyl ester (*L*-PG-CH<sub>3</sub> and *D*-PG-CD<sub>3</sub>) and b) (-)-18C6TA, enantiomers of proline methyl ester (*L*-Pro-CH<sub>3</sub> and *D*-Pro-CD<sub>3</sub>) [19]

Metodę opartą na wprowadzeniu izotopowoznaczonych cząsteczek jednego z enancjomerów analizowanego związku wykorzystali m.in. Gerbaux i współpracownicy w badaniach chiralnych aminokwasów i ich estrów metylowych, używając jako związków różnicujących eterów koronowych podstawionych czterema grupami karboksylowymi [19]. Wybór tej grupy związków nie jest przypadkowy, lecz był efektem ich szerokiego zastosowania w rozdziale optycznie czynnych aminokwasów

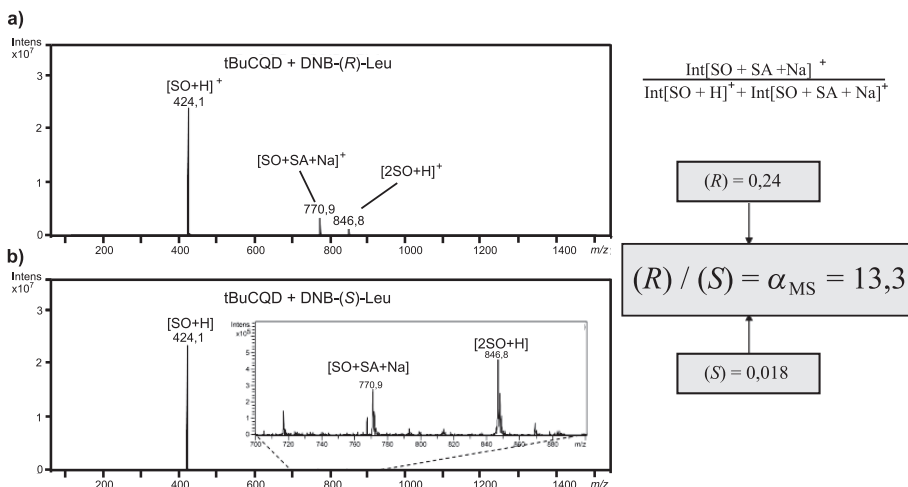
przy użyciu technik chromatograficznych. Funkcjonalizowane resztami karboksylowymi etery koronowe stosuje się w chromatografii jako chiralne fazy stacjonarne (ang. *Chiral Stationary Phases*, CSP). Możliwości rozróżniania aminokwasów przez etery koronowe wynikają bezpośrednio z ich struktury oraz ewentualnych oddziaływań z grupami funkcyjnymi i łańcuchem bocznym aminokwasów, zależnie od stereochemii badanych układów (Rys. 6). Z wybranej grupy aminokwasów, jedynie dla estrów metylowych proliny metoda ta nie dała satysfakcjonujących wyników (Rys. 5b) (IRIS = 1,01). Może to wskazywać na brak specyficznych oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy proliną a cząsteczkami eterów koronowych.



Rysunek 6. Podstawowe oddziaływania pomiędzy cząsteczką aminokwasu a eterem koronowym w zależności od odczynu roztworu [19]

Figure 6. Fundamental binding interactions between an amino acid and a crown ether in relation to pH [19]

Inną grupą związków powszechnie stosowaną jako chiralne fazy stacjonarne w chromatograficznym i elektroforetycznym rozdziale enancjomerów są pochodne chininy i chinidyny, do których zalicza się alkaloidy chinowcowe. Stosując spektrometrię mas, obiekty te zostały użyte jako związki różnicujące – selektory (SO) m.in. w analizie chiralnych *N*-(3,5-dinitrobenzoilo)aminokwasów [20] i dipeptydów [21] (selektandy, SA). Wykonano dwa oddzielne widma mas rejestrowane dla mieszanin selektora i czystych enancjomerów. Liczbowo miarą rozróżnienia enancjomerów był współczynnik enancjoselektywności ( $\alpha_{MS}$ ). Jego wartość, wyznaczona jako stosunek względnej intensywności sygnału odpowiadającego kompleksowi analit–selektor dla enancjomeru *S* i *R* lub na podstawie stosunków intensywności sygnału kompleksu analit–selektor do sumy intensywności wszystkich pików (wolny selektor + kompleks) (Rys. 7), bardzo dobrze korelował z danymi uzyskanymi w oparciu o metody chromatograficzne ( $\alpha_{HPLC}$ ).



Rysunek 7. Widma mas dla równomolowych mieszanin a) *tert*-butylokarbamoilochininy, *t*BuCQD (SO) i (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, DNB-(*R*)-Leu (SA) oraz b) *t*BuCQD i DNB-(*S*)-Leu w układzie woda/metanol w stosunku 50:50 z dodatkiem 10 μM octanu sodu [20]

Figure 7. Mass spectra generated from equimolar mixtures of a) *tert*-butylcarbamoylquinine, *t*BuCQD (SO) and (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine, DNB-(*R*)-Leu (SA) and b) *t*BuCQD and DNB-(*S*)-Leu in 50:50 water/methanol with 10 μM sodium acetate [20]

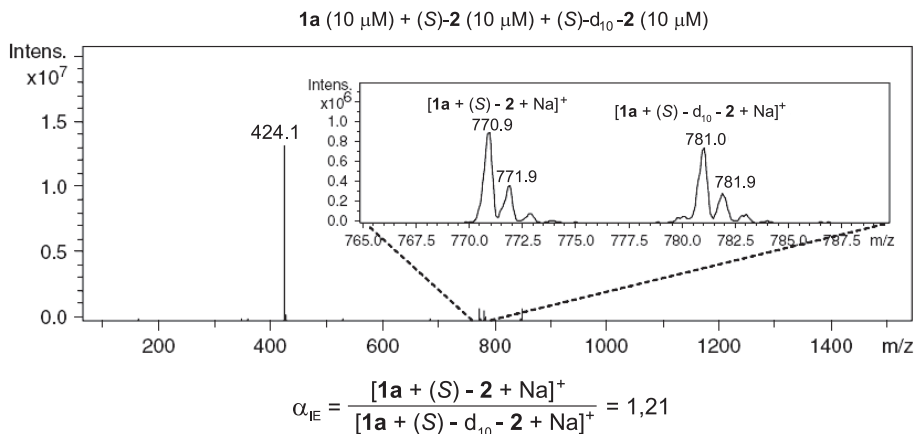
Pochodnych chinowcowych użyto również jako związków różnicujących w analizie enancjomerów *N*-podstawionych aminokwasów wykorzystując opisaną wcześniej metodologię, w której jeden z analizowanych enancjomerów był znaczonej trwałym izotopem [22]. Z przeprowadzonych badań wynikało, iż w przypadku tej klasy związków metoda obarczona była błędem wynikającym z kinetycznego efektu izotopowego. Analizując równomolową mieszaninę (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny i jej deuterowanego analogu o tej samej konfiguracji, w obecności pochodnej chininowej zaobserwowano różnice w intensywności pików, odpowiadającym poszczególnym kompleksom analit–selektor (Rys. 8) [23].

Z uwagi na taką samą konfigurację absolutną analizowanych związków, prawdopodobnym powodem zaobserwowanych różnic jest modyfikacja właściwości fizykochemicznych związku deuterowanego względem nieznaczzonego. Przypuszczenia odnośnie osłabienia oddziaływań typu van der Waals'a pomiędzy grupą *tert*-butylową selektora i deuterowanego aminokwasu, nie znalazły potwierdzenia. Wydeuterowanie grupy *tert*-butylowej w cząsteczce selektora nie spowodowało istotnych zmian w intensywności pików, odpowiadającym diastereoizomerycznym kompleksom w stosunku do eksperymentów, w których jako selektora użyto związku z niedeuterowaną grupą *tert*-butylową.

Wpływ kinetycznego efektu izotopowego w rozróżnianiu związków chiralnych został wyeliminowany w metodzie zaproponowanej przez Koschoë, w której jako związków różnicujących (selektorów) zastosowano pary „pseudoenancjomerów”. Pseudoenancjomerami nazywamy pary związków, które oprócz przeciwnej konfi-



guracji różnią się masą cząsteczkową. Różnicę tę powoduje zwykle podstawnik alkilowy o różnej długości łańcucha w odpowiadających sobie enancjomerach. Grupy te nie oddziałują w istotny sposób z cząsteczkami analitu, przez co nie mają wpływu na stopień zróżnicowania związków chiralnych.

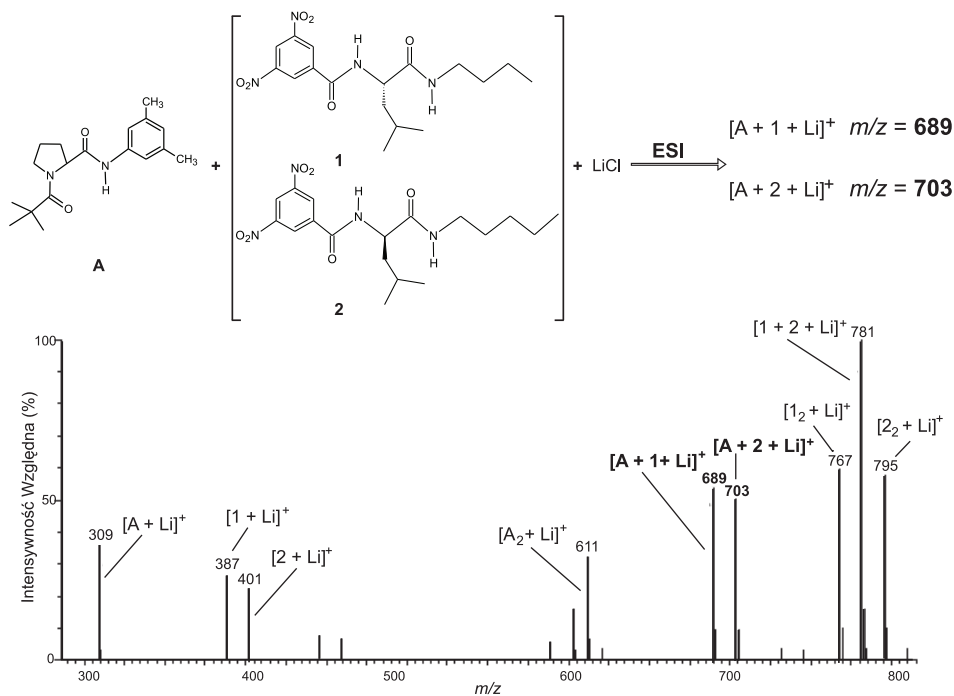


Rysunek 8. Widmo mas kompleksów *tert*-butylokarbamoilochininy **1a** z (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)-leucyną (*S*)-**2** i jej deuterowanym analogiem o tej samej konfiguracji (*S*)-d<sub>10</sub>-**2**. Wyższa intensywność pików odpowiadającego diastereoizomerycznemu kompleksowi z cząsteczką niedeuterowaną świadczy o kinetycznym efekcie izotopowym. Potwierdzeniem jest wartość  $\alpha_{IE}$  różna od jedności [23]

Figure 8. Mass spectrum of **1a** (*tert*-butylcarbamoylquinine) binding enantiomeric isotopologues of **2** ((*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine) with the same configuration. A deuterium isotopic effect is apparent from the higher ion abundance of the diastereomeric complex incorporating the non-deuterated SA. The difference is manifested in a non unity  $\alpha_{IE}$  value [23]

W pierwszych doniesieniach wykorzystujących opisane podejście, jako selektorów, użyto rozpuszczalne analogi chiralnych faz stacjonarnych typu Pirkle'a. Były to odpowiednie amidy *N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny stosowane w analizie pochodnych proliny (Rys. 9), których rozdział metodami chromatograficznymi przy użyciu tychże faz był już znany [24, 25].

W widmach wykonanych techniką ESI dla równomolowej mieszaniny związków będących parą „pseudoenancjomerów”, tj. amidu butylowego (*S*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny i amidu pentylowego (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, pełniących rolę selektorów wobec chiralnej pochodnej proliny, zaobserwowano piki, które odpowiadały obu kompleksom analit–selektor. Względna intensywność tych sygnałów zależała od składu enancjomerycznego badanego analitu. Z różnicy intensywności wynikało, że enancjomer *R* proliny tworzył kompleks o większej trwałości z amidem pentylowym (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, podczas gdy enancjomer *S* bardziej trwale łączył się z jego „pseudoenancjomerem” (Rys. 10a).

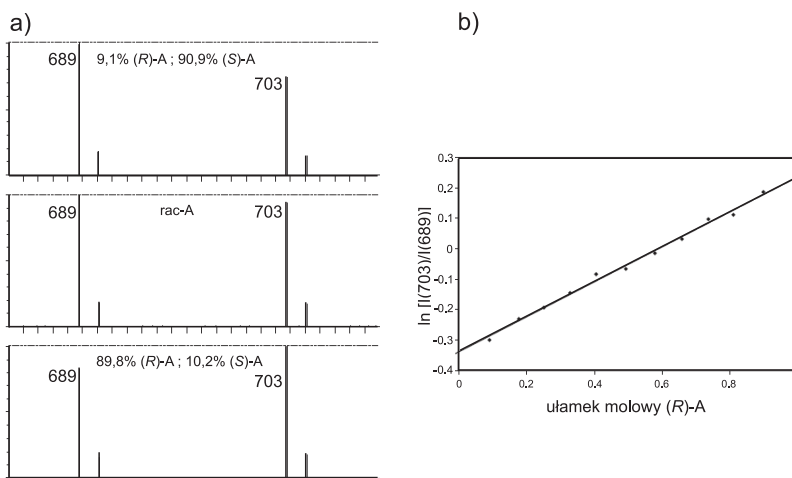


Rysunek 9. Widmo mas mieszaniny par „pseudoenancjomerycznych” selektorów **1** (amid butylowy (S)-N-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny), **2** (amid pentylowy (R)-N-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny) (2,5 mM) i analitu **A** (0,25 mM) z dodatkiem chlorku litu (25 mM) w układzie metanol/woda/aceton (1:1:2) [24]

Figure 9. Mass spectrum of a solution of pseudo-enantiomeric selectors **1** (butyl amide of (S)-DNB-leucine) and **2** (pentyl amide of (R)-DNB-leucine) (2.5 mM) and analyte **A** (0.25 mM) with added lithium chloride (25 mM) in methanol/water/acetone (1:1:2) [24]

Podjęto również próbę, gdzie rolę selektora pełniły pochodne proliny [26] oraz *trans*-4-hydroksyproliny [27]. Związków tych użyto z powodzeniem w analizie *N*-(3,5-dinitrobenzoilo)aminokwasów. W zależności od charakteru użytego selektora, widma ESI (dla tych układów) rejestrowane były zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych.

We wszystkich przypadkach zależność logarytmu naturalnego ilorazu względnych intensywności pików odpowiadających kompleksom analit–selektor, gdzie pary selektorów są „pseudoenancjomerami”, względem ułamka molowego jednego z enancjomerów jest funkcją liniową (Rys. 10b). Powinowactwo poszczególnych enancjomerów badanego analitu wobec selektorów określa współczynnik enancjoselektywności  $\alpha_{MS}$ . Wyznaczyć go można w prosty sposób na podstawie nachylenia prostej, które równe jest podwojonej wartości logarytmu naturalnego współczynnika enancjoselektywności ( $2\ln\alpha_{MS}$ ).



Rysunek 10. a) Widma mas pary „pseudoenancjomerycznych” selektorów: amid butylowy (S)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, (S)-1 i amid pentyłowy (R)-*N*-(3,5-dinitrobenzoilo)leucyny, (R)-2 (2,5 mM) z analitem A (0,25 mM) z dodatkiem chlorku litu (25 mM) w układzie metanol/woda/aceton (1:1:2) dla roztworów o różnym składzie enancjomerycznym analitu A, b) zależność logarytmu naturalnego stosunku intensywności pików o  $m/z$  703 i 689 w widmach mas ESI względem ułamka molowego (R)-A ( $r^2 = 0,997$ ) [24]

Figure 10. a) Partial mass spectra of pseudo-enantiomeric selectors (S)-1 and (R)-2 (2.5 mM) and analyte A (0.25 mM) with added lithium chloride (25 mM) in methanol/water/acetone (1:1:2), b) Plot of the natural log of the ratio of peaks at  $m/z$  703 and 689 in the ESI-MS versus the mole fraction of (R)-A in the solution ( $r^2 = 0.997$ ) [24]

Istotnym zabiegiem prowadzącym do poprawienia dokładności wyznaczonej na podstawie powyższej zależności wartości współczynnika  $\alpha_{MS}$  okazało się wprowadzenie w cząsteczkach selektorów dodatkowej grupy, która łatwo ulegała protonowaniu (grupa aminowa). Umożliwiło to odseparowanie miejsca lokalizacji ładunku od miejsc oddziałujących z analitem i jednocześnie odpowiedzialnych za zróżnicowanie enancjomerów [28].

W oparciu o podstawowe widma ESI, dzięki tej metodzie, wyznaczyć można również tzw. ułamek intensywności pików kompleksu (ang. *Complex Intensity Fraction*, CIF). Liczbowo jest on określany jako stosunek intensywności sygnału pochodzącego od jednego z kompleksów analit-selektor do sumy intensywności pików pochodzących od obu kompleksów jakie dany analit tworzy z parą „pseudoenancjomerów”. Jego wartość zmienia się liniowo względem enancjomerycznego składu badanego analitu ( $r^2=0,999$ ). Liniowy charakter tej zależności umożliwia z dużą dokładnością określenie udziału poszczególnych enancjomerów w próbkach o nieznanym składzie (analiza ilościowa). Pozwala również wyznaczyć współczynnik enancjoselektywności  $\alpha_{MS}$  chiralnej pary „pseudoenancjomerycznej” względem analizowanych układów na podstawie równania łączącego CIF z ułamkiem molowym jednego z enancjomerów  $X_{R \text{ lub } S}$  analitu:

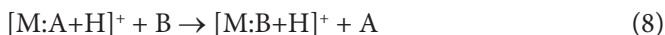
$$\text{CIF} = \left( \frac{\alpha_{\text{MS}} - 1}{\alpha_{\text{MS}} + 1} \right) X_{R \text{ lub } S} + \left( \frac{1}{\alpha_{\text{MS}} + 1} \right) \quad (7)$$

## 2.2. ENANCJOSELEKTYWNE REAKCJE KOMPLEKSÓW INKLUZYJNYCH JON-CZĄSTECZKA W FAZIE GAZOWEJ

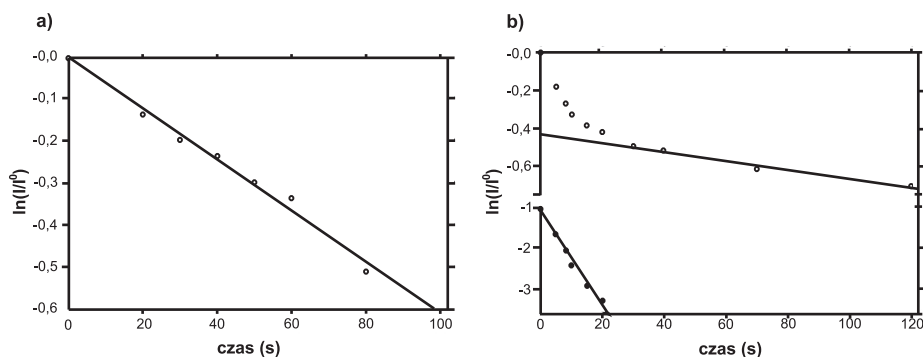
Znanym i powszechnie używanym terminem w chemii supramolekularnej jest tzw. „rozpoznanie molekularne” (ang. *molecular recognition*). Pod pojęciem tym rozumie się proces specyficznego wiązania ligandu przez większą cząsteczkę, w wyniku którego dochodzi do powstania kompleksu typu *gość-gospodarz*. Związkami, które najczęściej pełnią rolę molekuly kompleksującej są układy makrocykliczne, takie jak: cyklodekstryny, etery koronowe, kaliksareny, wśród których szeroką grupę stanowią rezorcynoareny, czy cykliczne poliamidy. Skuteczność wymienionych związków w otrzymywaniu połączeń inkluzyjnych, które często tworzą się w sposób stereoselektywny, wynika z ich specyficznej budowy. Natomiast taka zdolność rozpoznawania związków chiralnych (ang. *Chiral Recognition*, CR) stwarza możliwość ich wykorzystania w spektrometrii mas, do określania czystości optycznej związków optycznie czynnych.

Metoda rozróżniania związków chiralnych, z wykorzystaniem enancjoselektywnych reakcji kompleksów jon-cząsteczka w fazie gazowej (ang. *ion/molecule reaction*) polega na utworzeniu kompleksu opartego na słabych oddziaływaniach niekowalencyjnych, takich jak: siły van der Waalsa, słabe wiązania wodorowe, oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  (nazywane także  $\pi$ - $\pi$  *stackingiem*) oraz oddziaływania elektrostatyczne, w którym związek optycznie czynny jest zainkludowany przez molekułę kompleksującą. Powstały w ten sposób kompleks typu *gość-gospodarz* ulega następnie reakcji wymiany ligandu przez obojętną cząsteczkę innego związku. Związkami, które najczęściej pełnią funkcję reagenta zastępującego badany analit w kompleksie inkluzyjnym są chiralne bądź nieczynne optycznie aminy lub aminokwasy. Sama metoda dostarcza oprócz cennych informacji na temat trwałości diastereoizomerycznego kompleksu jon-cząsteczka również dane opisujące szybkość reakcji wymiany cząsteczki gościa w tymże kompleksie.

Ogólnie, pomiar taki wykonuje się generując z roztworu zawierającego makrocykl M oraz analizowany enancjomer A odpowiedni diastereoizomeryczny kompleks  $[M:A+H]^+$ , stosując jako technikę jonizacji elektrosprej ESI. Po wprowadzeniu utworzonego jonu do analizatora cyklotronowego rezonansu jonów z transformacją Fourier'a FTICR w obecności wprowadzonego z zewnątrz chiralnego bądź achiralnego reagenta B monitoruje się szybkość reakcji wymiany, opisanej równaniem (8).



W oparciu o względne intensywności pików, które odpowiadają kompleksom: wyjściowemu  $[M:A+H]^+$  oraz powstałemu w reakcji wymiany  $[M:B+H]^+$ , mierzo- nym w zależności od czasu, wyznaczyć można stałą szybkości przebiegającej reak- cji wymiany. Jeżeli  $I$  opowiada względnej intensywności kompleksu wyjściowego  $[M:A+H]^+$  w czasie  $t$ , podczas gdy  $I_0$  jest sumą intensywności kompleksu pierwot- nego oraz uzyskanego w reakcji wymiany, zależność logarytmu naturalnego ( $I/I_0$ ) od czasu  $t$  jest zwykle zależnością liniową, a nachylenie prostej odpowiada stałej szybkości reakcji wymiany pseudo-pierwszego rzędu ( $k'$ ) (Rys. 11a). Odpowied- nio stałą szybkości drugiego rzędu opisuje stosunek nachylenia prostej pierwszego rzędu względem stężenia reagenta B ( $k=k'/[B]$ ).



Rysunek 11. Zależność opisująca kinetykę reakcji kompleksów jon–cząsteczka w fazie gazowej pomiędzy a) S-(+)-2-butyloaminą a kompleksem  $[M:L-DOPA^{OEt} + H]^+$ , b) S-(+)-2-butyloaminą a kompleksem  $[M:L-DOPA^{OMe} + H]^+$  [31].

Figure 11. Kinetic plot for the gas-phase reaction between a) S-(+)-2-butylamine and  $[M:L-DOPA^{OEt} + H]^+$ , b) between S-(+)-2-butylamine and  $[M:L-DOPA^{OMe} + H]^+$  [31]

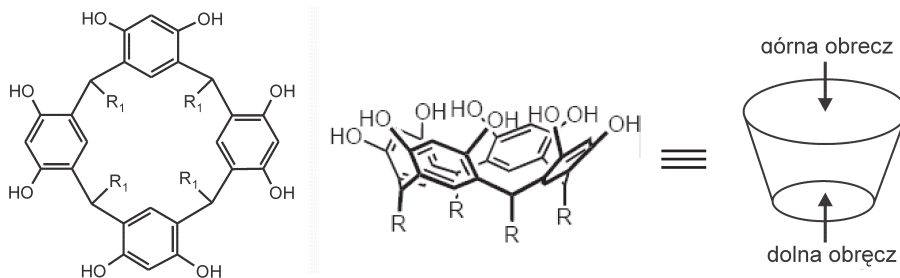
Istnieją przypadki, w których  $\ln(I/I_0)$  w funkcji czasu nie jest zależnością liniową i obserwujemy się swego rodzaju załamanie prostej (Rys. 11b). Jest to wynikiem współistnienia co najmniej dwóch trwałych izomerycznych struktur kompleksu wyjściowego  $[M:A+H]^+$ , które różnią się reaktywnością względem wprowadzonego związku B. Mniej reaktywny określany jest jako  $[M:A+H]_{slow}^+$  oraz podlegający reakcji wymiany szybciej, jako  $[M:A+H]_{fast}^+$ . Zależność  $\ln(I/I_0)$  względem czasu  $t$  dla kompleksu bardziej reaktywnego  $[M:A+H]_{fast}^+$  (zapełnione kółka na Rys. 11b) można wykreślić odejmując od zależności opisującej cały proces wymiany (puste kółka na Rysunku 11b), punkty odpowiadające szybkości reakcji pierwszego rzędu rozpadu kompleksu, dla którego reakcja wymiany zachodzi wolniej  $[M:A+H]_{slow}^+$  (górną prostą na Rysunku 11b). Punkty przecięcia prostych opisujących kinetykę reakcji z osią rzędnych dla kompleksów  $[M:A+H]_{slow}^+$  i  $[M:A+H]_{fast}^+$  pozwala oszacować ich względny rozkład.

Kinetyczną enancjoselektywność reakcji wymiany ligandu wyznaczyć można porównując stałe szybkości reakcji drugiego rzędu dla dwóch identycznych reakcji

wymiany w diastereoizomerycznych kompleksach  $[M:A_R+H]^+$  i  $[M:A_S+H]^+$  przeprowadzonych w tych samych warunkach. Zatem,  $k_{\text{homo}}$  odnosi się do kompleksu, w którym związki A i M posiadają tę samą konfigurację, zaś  $k_{\text{hetero}}$  do pary o konfiguracji przeciwnej. W zależności od konfiguracji związku B stała szybkości reakcji opisywana jest jako  $k_{(R)}$  lub  $k_{(S)}$ .

Wartość enancjoselektywności określana jest dwoma parametrami  $\rho$  i  $\xi$ . Współczynnik  $\rho$  zdefiniowany jako  $k_{\text{homo}}/k_{\text{hetero}}$  dotyczy konfiguracji pary M/A natomiast  $\xi = k_{(R)}/k_{(S)}$ , odnosi się do konfiguracji substancji B (obojętnej aminy lub aminokwasu). Jeżeli  $\rho > 1$ , reakcja wymiany ligandu A przez B zachodzi szybciej dla kompleksu homochiralnego i odwrotnie, dla kompleksu heterochiralnego gdy  $\rho < 1$ . Wartość  $\rho = 1$  wskazuje na jednakową szybkość wymiany dla obu reakcji. Analogicznie,  $\xi > 1$  wskazuje na szybszą reakcję wymiany cząsteczki gościa A w danym kompleksie przez związek B o konfiguracji R, podczas gdy związek o konfiguracji S zastępuje cząsteczkę A szybciej, jeżeli spełniona jest zależność  $\xi < 1$ . Identyczną szybkość reakcji wymiany niezależnie od konfiguracji reagenta B obserwujemy w przypadku, gdy współczynnik enancjoselektywności  $\xi = 1$ .

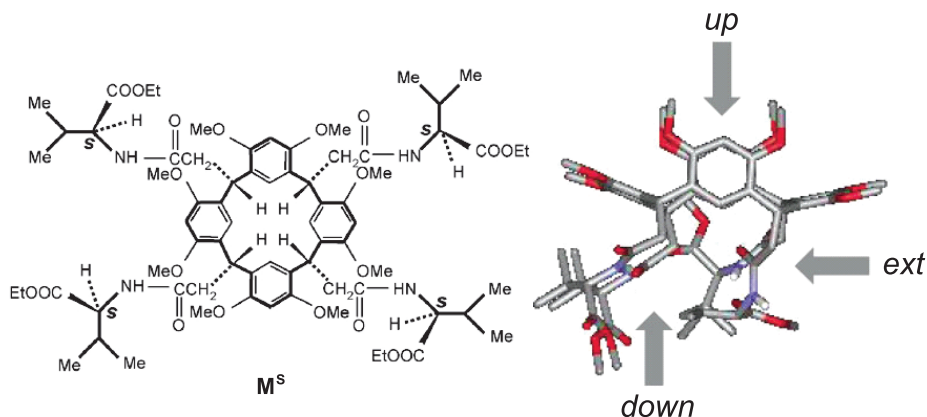
Śród makrocyklicznych związków, które łatwo tworzą kompleksy inkluzyjne, grupą obecnie najczęściej wykorzystywaną są kaliksareny i ich pochodne zwane rezorcynoarenami. Z uwagi na ich wnątkową (stożkową) budowę (Rys. 12) mają one zdolność do kompleksowania szerokiej gamy analitów. Dodatkowo istotną cechą tej grupy połączeń jest możliwość ich łatwej modyfikacji poprzez funkcjonalizację grup hydroksylowych. Wprowadzenie optycznie czynnych podstawników powoduje, że stają się chiralne i wykazują stereoselektywny charakter w oddziaływaniach typu gość-gospodarz wobec związków optycznie czynnych.



Rysunek 12. Struktura rezorcynoarenów  
Figure 12. Structure of resorcinarenes

W przeprowadzonych dotychczas badaniach za pomocą spektrometrii mas, wykazano użyteczność metody polegającej na reakcji wymiany jon-cząsteczka w rozróżnianiu szeregu chiralnych aminokwasów i ich pochodnych [29–33], a także dipeptydów [34]. Jako molekuł kompleksujących użyto tu chiralnych pochodnych rezorcyno[4]arenów, których asymetryczną budowę uzyskano dzięki wprowadzeniu czterech aksjalnie położonych grup L-waliny (Rys. 13). Związkami uczestniczącymi

w reakcji wymiany zainkludowanego aminokwasu były enancjomery [(*S*)- lub (*R*)]-2-butyloaminy.



Rysunek 13. Wzór pochodnej 2,8,14,20-tetrakis(*L*-walinamido)rezorcyno[4]arenu ( $M^S$ ) oraz możliwe miejsca lokalizacji cząsteczki aminokwasu (cząsteczki gościa) [33]

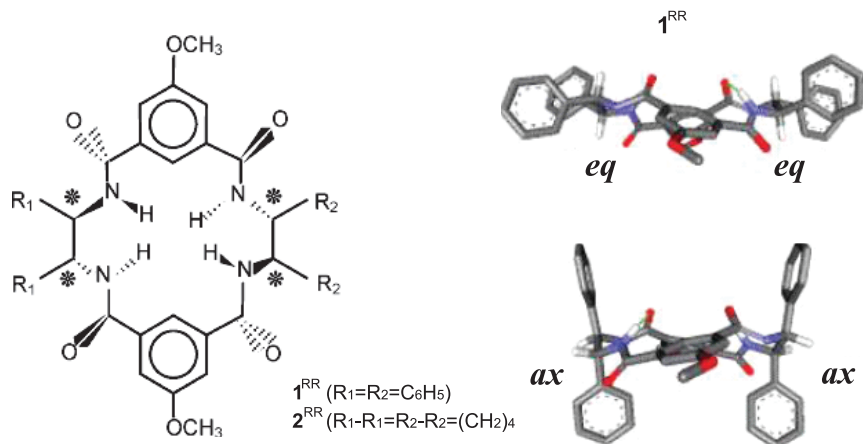
Figure 13. Formula of the flattened-cone 2,8,14,20-tetrakis(*L*-valinamido)resorcin[4]arene ( $M^S$ ) and regions of attachment of amino acidic guest on flattened-cone 2,8,14,20-tetrakis(*L*-valinamido)resorcin[4]arene [33]

Szybkość reakcji wymiany we wszystkich analizowanych układach zależała zarówno od konfiguracji badanych aminokwasów ( $\rho \neq 1$ ) jak i od konfiguracji użytej aminy ( $\xi \neq 1$ ). W wielu przypadkach zaobserwowano również obecność więcej niż jednej trwałej struktury kompleksu  $[M:A+H]^+$ .

Użytecznym narzędziem, które pomaga zrozumieć zaistniałe różnice są metody obliczeniowe oparte na założeniach mechaniki i dynamiki molekularnej. Zgodnie z nimi w badanych pochodnych rezorcyno[4]arenów istnieją trzy pozycje, gdzie cząsteczka gościa może zostać zainkludowana. Cząsteczka kompleksowana może znajdować się wewnątrz achiralnej górnej obręczy (pozycja *up*), pomiędzy chiralnymi podstawnikami (pozycja *down*) oraz na zewnątrz cząsteczki w otoczeniu dwóch sąsiednich chiralnych podstawników (pozycja *ext*) (Rys. 13). Dodatkowo istotnym elementem jest konformacja cząsteczki gospodarza. Żadna z tych pozycji nie jest uprzywilejowana dla całej grupy badanych analitów i zależy od charakteru łańcucha bocznego i konfiguracji aminokwasów.

Grupą związków równie często wykorzystywaną w opisaney metodzie badań związków chiralnych są cykliczne poliamidy [35]. Na szczególną uwagę zasługuje amfifilowy charakter grup amidowych w oddziaływaniach dipolowych oraz wiązaniach wodorowych. Grupa karbonylowa może spełniać funkcję donorową w oddziaływaniu dipolowym i być akceptorem wodoru w wiązaniu wodorowym, zaś grupa N–H działać jako akceptor dipolowy, a zarazem donorem wodoru w wiązaniu wodorowym.

Kompleksy cyklicznych poliamidów z pochodnymi aminokwasów  $[M:A+H]^+$  mogą przyjmować w fazie gazowej trzy różne konformacje, zależne od położenia podstawników alkilowych lub fenylowych przy dwóch sąsiednich stereogenicznych atomach węgla (Rys. 14).



Rysunek 14. Wzór cyklicznych tetramidów i odpowiadające mu struktury o najniższej energii [36]  
 Figure 14. Formula and relevant minimum energy structures of tetra-amide macrocycles [36]

Wśród nich położenia *eq-eq* i *ax-ax* wykazują największą trwałość, dając zwykle mieszaninę dwóch konformerów dla danego diastereoizomerycznego kompleksu  $[M:A:H]^+$ , których stosunek zależy od konfiguracji cząsteczek A i M i charakteryzujących się różną reaktywnością względem stosowanej aminy. W odróżnieniu od rezorcynoarenów szybkość reakcji wymiany zainkludowanej cząsteczki przez reagent B nie zależy w znacznym stopniu od jego konfiguracji ( $\xi \approx 1$ ) [36].

Szeroką analizę osiągnięć w badaniach związków chiralnych, z wykorzystaniem enancjoselektywnych reakcji w fazie gazowej kompleksów jon–cząsteczka przedstawił w pracy przeglądowej Speranza [37].

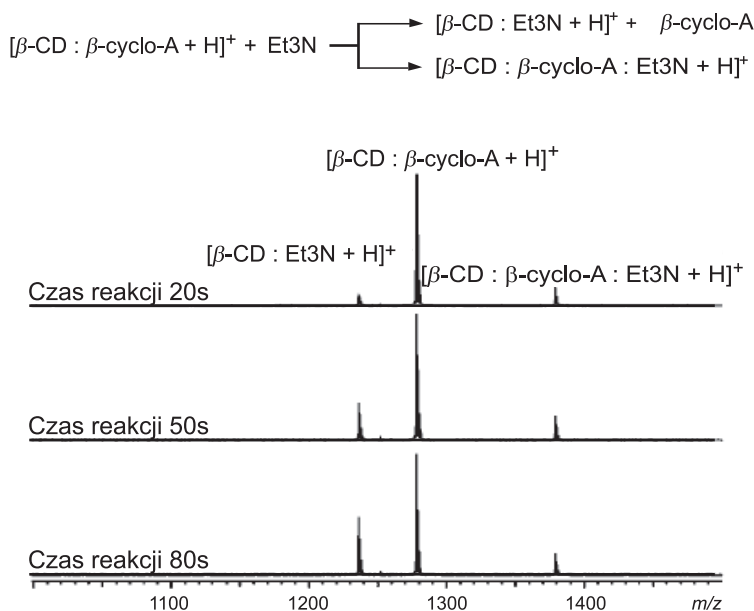
Kolejną szeroko stosowaną grupą makrocykli wykorzystywaną w analizie związków chiralnych, również metodami chromatograficznymi są cyklodekstryny. Są to cykliczne układy zbudowane z jednostek cukrowych  $\alpha$ -1,4-glukozy, z których najbardziej rozpowszechnione formy to  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  składające się odpowiednio z 6, 7 lub 8 merów. Z uwagi na toroidalny kształt cząsteczki z chiralną wnęką oraz grupami hydroksylowymi obecnymi na krawędzi toroidalnej struktury, cyklodekstryny posiadają zdolność stereoselektywnego inkludowania mniejszych cząsteczek. We wcześniejszych latach fakt ten wykorzystywany był w rozróżnianiu związków chiralnych opisaną w poprzednim rozdziale metodą opartą na tworzeniu kompleksów typu *gość–gospodarz* [38], a obecnie dodatkowo wykorzystującą reakcję wymiany zainkludowanego w cząsteczce cyklodekstryny gościa. Stosowany w eksperymencie reagent B, w przypadku użycia cyklodekstryn jako związków kompleksujących musi charakteryzować się odpowiednio wysokim powinowactwem względem



protonu (ang. *Proton Affinity*, PA), aby reakcja wymiany ligandu mogła nastąpić. W przypadku analizy chiralnych cyklicznych  $\beta$ -aminokwasów w kompleksie z  $\beta$ -cyklodekstryną konieczne było zastosowanie trietyloaminy (PA = 982 kJ mol<sup>-1</sup>), podczas gdy w obecności eterów koronowych wystarczyła *n*-propyloamina, której powinowactwo względem protonu wynosi 918 kJ mol<sup>-1</sup> [39].

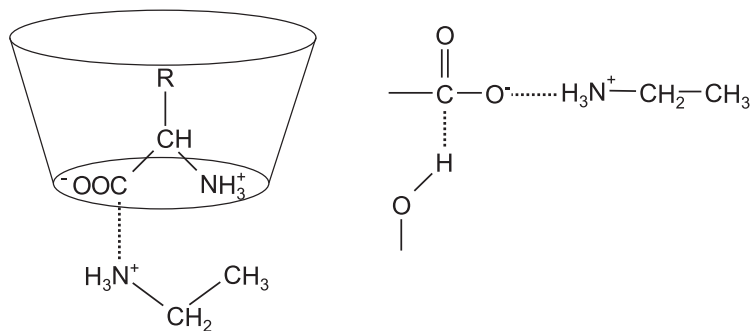
Interesującą obserwacją w przypadku stosowania cyklodekstryn jako cząsteczek kompleksujących względem chiralnych aminokwasów, oprócz typowej reakcji wymiany ligandu przez wprowadzony reagent, jest obecność trimerycznych kompleksów [M:A:B+H]<sup>+</sup>, które nie występują w przypadku opisanych poprzednio klas związków kompleksujących (Rys. 15).

Aby uniknąć tworzenia kompleksów trimerycznych w analizie chiralnych aminokwasów w obecności  $\beta$ -cyklodekstryn, które mogą zakłócać ich rozróżnianie, w wielu przypadkach stosuje się modyfikację cyklodekstryn poprzez częściowe metylowanie grup hydroksylowych [40]. Za przyczynę powstawania kompleksów trimerycznych uznaje się występowanie aminokwasów w postaci jonów obojnaczych (*zwitterion*), które oddziałują jednocześnie z cząsteczką  $\beta$ -cyklodekstryny i protonowaną cząsteczką aminy.



Rysunek 15. Widma mas ESI kompleksu  $\beta$ -cyklodekstryny ( $\beta$ -CD) z  $\beta$ -aminokwasem 1R,2S-cykloheksanowym ( $\beta$ -cyclo-A) w obecności trietyloaminy (Et<sub>3</sub>N) w różnych odstępach czasu opisujące reakcję wymiany ligandu w kompleksie [39]

Figure 15. a) ESI mass spectra of ion/molecule reaction of *host-guest* complex of  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and 1R,2S-cyclohexane  $\beta$ -amino acid ( $\beta$ -cyclo-A) with triethylamine (Et<sub>3</sub>N) [39]



Rysunek 16. Proponowana struktura aminokwasu w postaci jonu obojnaczego zainkludowanego we wnęce cyklodekstryny [41]

Figure 16. Proposed structure of gas-phase zwitterionic amino acid in the cavity of cyclodextrin (represented as a toroidal cavity) [41]

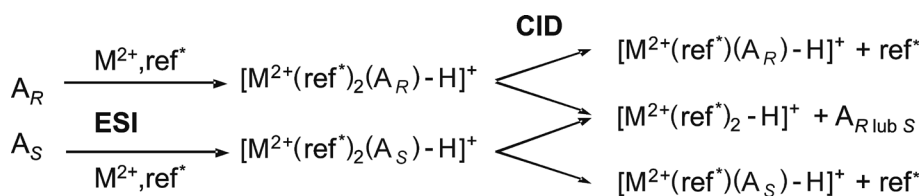
Szczegółowa analiza kompleksowania chiralnych aminokwasów przez  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyklodekstryny oraz reakcje wymiany ligandów przez obojętne aminy wskazała, że aminokwasy, które preferencyjnie występują w postaci jonu obojnaczego w fazie gazowej charakteryzują się wysoką zasadowością. Zgodnie z proponowaną strukturą kompleksu inkluzyjnego, aminokwas w postaci jonu obojnaczego jest stabilizowany przez wiązania wodorowe, jakie tworzy z grupami hydroksylowymi w obszarze wąskiej obręczy cyklodekstryny. Ponadto ładunek dodatni protonowanej cząsteczki aminy, będącej reagentem biorącym udział w reakcji wymiany jest skoordynowany z grupą karboksylową aminokwasu (Rys. 16). Kluczowymi w tworzeniu kompleksów cyklodekstryn z aminokwasami jest geometria i wielkość wnęki, jakimi charakteryzuje się dana molekula kompleksująca oraz rodzaj grupy w łańcuchu bocznym zainkludowanego ligandu. Im wnęka ta jest większa, a co za tym idzie cząsteczka posiada więcej grup hydroksylowych w obszarze wąskiej obręczy (ang. *narrow rim*), tym łatwiej stabilizuje ona aminokwas w formie jonu obojnaczego [41]. Rozróżnienie związków chiralnych w oparciu o reakcję wymiany ligandu w kompleksie typu *gość-gosodarz* zastosowano również w analizie ilościowej. Krzywą kalibracyjną wyznacza się w oparciu o intensywność pików, które odpowiadają kompleksom wyjściowemu  $[M:A+H]^+$  i powstałemu w reakcji wymiany  $[M:B+H]^+$  w ściśle określonym czasie  $t$  dla mieszanin o znanej zawartości poszczególnych enancjomerów [42]. Zależność  $I/I_0$  względem ułamka molowego jednego z enancjomerów ma charakter liniowy, co pozwala z dość dużą dokładnością wyznaczyć stosunek poszczególnych enancjomerów dla mieszanin o nieznannej ich zawartości.

### 2.3. METODA KINETYCZNA (ANG. KINETIC METHOD)

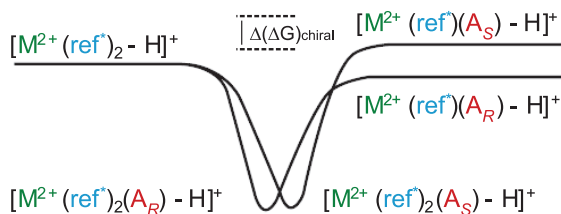
Metoda kinetyczna (ang. *kinetic method*) została po raz pierwszy wprowadzona przez Cooks'a i początkowo szeroko stosowana w wyznaczaniu wielkości termodynamicznych [43, 44]. Z czasem znalazła również zastosowanie w oznaczaniu i kontroli

czystości enancjomerycznej związków chiralnych. W ciągu ostatnich dziesięciu lat metodę tę zastosowano w oznaczaniu wielu grup związków chiralnych jak aminokwasy [45],  $\alpha$ -hydroksykwasy [46], dipeptydy [47],  $\beta$ -blokery [48], cukry [49] czy nukleozydy stosowane jako leki antywirusowe [50]. Prowadzone do chwili obecnej badania mają na celu jej udoskonalenie i określenie wpływu różnych czynników na jej użyteczność.

Stosując metodę kinetyczną w analizie enancjomerów w pierwszym etapie pomiaru wymagane jest wygenerowanie odpowiedniego trimerycznego kompleksu  $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(A_R \text{ lub } A_S)-H]^+$ . Kompleks taki można otrzymać z mieszaniny wodnych roztworów metanolu zawierających odpowiednio: interesujący izomer optyczny  $A_R$  lub  $A_S$ , chiralny odnośnik  $\text{ref}^*$  i sól dwuwartościowego metalu  $M^{2+}$ , stosując jako technikę jonizacji elektrosprej. Następnie wyizolowany jon poddaje się dysocjacji indukowanej zderzeniami (CID), w wyniku której ulega on dwóm konkurencyjnym procesom eliminacji ligandów. W efekcie odejścia cząsteczki będącej odnośnikiem lub cząsteczki analizowanego enancjomeru powstają odpowiednio dimeryczne jony:  $[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_R \text{ lub } A_S)-H]^+$  i  $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2-H]^+$ .



Z uwagi na różnice energii wewnętrznej jonów  $[M^{2+}(\text{ref}^*)(A)-H]^+$  dla poszczególnych enancjomerów  $A_R$  i  $A_S$ , stałe szybkości reakcji eliminacji prowadzące do ich powstawania są odpowiednio różne. Rysunek 17 przedstawia diagram zmian energetycznych dla dwóch konkurencyjnych procesów fragmentacji trimerycznych kompleksów  $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(A_R)-H]^+$  i  $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(A_S)-H]^+$  prowadzących do odpowiednich jonów fragmentacyjnych.



Rysunek 17. Diagram zmian energii wewnętrznej jonów powstałych w konkurencyjnych procesach fragmentacji dwóch trimerycznych kompleksów różniących się chiralnością jednego z ligandów.

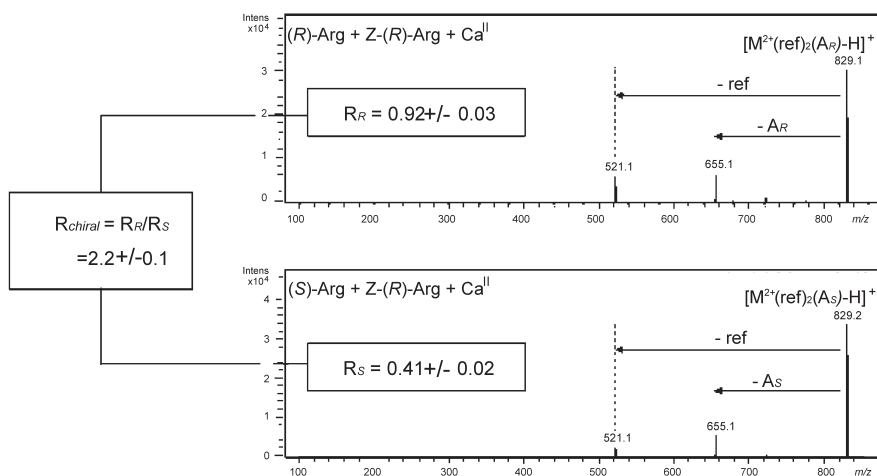
Figure 17. Energy diagram for competitive dissociations of metal-ion bound cluster ions of two deprotonated trimeric cluster ions that differ in the chirality of one ligand

Efektem różnicy w energii wewnętrznej oraz szybkości reakcji eliminacji, prowadzących do powstawania dimerycznych kompleksów  $[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_R)-H]^+$

i  $[M^{2+}(\text{ref})(A_S)-H]^+$  jest różnica względnych intensywności odpowiadających im pików w rejestrowanych widmach jonów produktów dla odpowiedniego diastereoizomerycznego kompleksu  $[M^{2+}(\text{ref})_2(A_R \text{ lub } A_S)-H]^+$  (Rys. 17), oraz wielkości  $R_R$  i  $R_S$  opisane odpowiednio równaniami (9) i (10):

$$R_R = \frac{[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_R) - H]^+}{[M^{2+}(\text{ref}^*)_2 - H]^+} \quad (9)$$

$$R_S = \frac{[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_S) - H]^+}{[M^{2+}(\text{ref}^*)_2 - H]^+} \quad (10)$$



Rysunek 18. Rozróżnienie enancjomerów argininy ( $A_R$  i  $A_S$ ) metodą kinetyczną przy użyciu  $N$ -benzyloksykarbonylo- $(R)$ -argininy ( $Z$ - $(R)$ -Arg) jako odnośnika i  $\text{Ca}^{\text{II}}$  jako jonu metalu; (a) i (b) widma jonów produktów dla trimerycznych jonów ( $m/z$  829) [55]

Figure 18. Example of chiral discrimination of Arg by  $Z$ - $(R)$ -Arg using the kinetic method: (a) and (b) show the dissociation of the trimer ion ( $m/z$  829) formed from  $(R)$ -Arg and  $(S)$ -Arg, respectively, with  $Z$ - $(R)$ -Arg and  $\text{Ca}^{\text{II}}$  metal mediation [55]

Stosunek  $R_R$  do  $R_S$  określony jako  $R_{\text{chiral}}$  (równanie 11) liczbowo opisuje stopień zróżnicowania dwóch enancjomerów w określonym eksperymencie i zależy od rodzaju jonu centralnego oraz użytego odnośnika.

$$R_{\text{chiral}} = \frac{R_R}{R_S} = \frac{[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_R) - H]^+ / [M^{2+}(\text{ref}^*)_2 - H]^+}{[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_S) - H]^+ / [M^{2+}(\text{ref}^*)_2 - H]^+} \quad (11)$$

Aby uznać, że przeprowadzony pomiar umożliwił rozróżnienie enancjomerów  $R_{\text{chiral}}$  powinna mieć wartość jak najbardziej różną od 1. W przypadku, gdy  $R_{\text{chiral}} = 1$  wybór określonego kationu  $M^{2+}$  oraz odnośnika jest błędny i wskazuje na brak

w diastereoizomerycznych kompleksach oddziaływań zależnych od konfiguracji analizowanych enancjomerów  $A_R$  i  $A_S$ .

Istotą doboru odpowiedniego związku jako odnośnika jest jego powinowactwo wobec użytego w eksperymencie jonu metalu, które powinno być porównywalne z powinowactwem substancji analizowanej. Znaczna różnica w powinowactwie powoduje eliminację tylko jednego z ligandów (analitu lub odnośnika) lub znaczną przewagą jednego z dwóch konkurencyjnych procesów fragmentacji. Cechą równie pożądaną jest podobieństwo w strukturze analitu i odnośnika, co ułatwia tworzenie się układów kompleksowych wokół jonu centralnego.

Większość obecnie prowadzonych prac ma na celu optymalizację metody kinetycznej w rozróżnianiu związków chiralnych, głównie aminokwasów i ich pochodnych, poprzez stosowanie różnego rodzaju odnośników oraz jonów metali. Bazując na szeregu wcześniejszych doniesień najlepsze wyniki rozróżniania chiralnych aminokwasów uzyskano w przypadku stosowania jako odnośników aminokwasów zawierających pierścień aromatyczny w łańcuchu bocznym (np. *L*-fenyloalanina). Zgodnie z hipotezą Cooksa jest to wynikiem oddziaływań  $\pi$ - $\pi$  typu *stacking*, czyli nakładaniem się orbitali  $\pi$  pierścienia aromatycznego w łańcuchu bocznym tej części i grupy karboksylowej analizowanego aminokwasu [51].

Vairamani wraz ze współpracownikami opublikowali szereg danych dotyczących halogenowych pochodnych aromatycznych aminokwasów, użytych jako cząsteczek odnośnika w metodzie kinetycznej i wpływu obecnego podstawnika na wartość enancjoselektywności. Pochodne tyrozyny, posiadające różną liczbę podstawionych atomów jodu w pierścieniu aromatycznym użyto w analizie wszystkich naturalnie występujących aminokwasów [52]. Wraz ze wzrostem liczby atomów jodu zaobserwowano wzrost enancjoselektywności dla wszystkich alifatycznych i aromatycznych aminokwasów. Jest to prawdopodobnie wynikiem oddziaływań sterycznych wynikających z bliskiego położenia atomów jodu i łańcucha bocznego analizowanych *L*-aminokwasów, które obniżają trwałość powstałych kompleksów w stosunku do powstałych z enancjomerami *D*. Stosując szereg halogenowych *para*-podstawionych pochodnych *L*-fenyloalaniny jako odnośników, zaobserwowano dla analizowanych układów wzrost enancjoselektywności w szeregu  $I > Br > Cl > F$  [53]. Wysoka elektroujemność atomu fluoru, która powoduje zmniejszenie gęstości elektronowej w pierścieniu aromatycznym fenyloalaniny może mieć ujemny wpływ na siłę oddziaływań  $\pi$ - $\pi$  typu *stacking* i obniżenie efektywności w rozróżnieniu związków chiralnych. Wzrost enancjoselektywności w przypadku pozostałych pochodnych jest wynikiem oddziaływań sterycznych w kompleksach powstałych z *L*-aminokwasami i jest zależne od wielkości atomu podstawionego w pierścieniu fenyloalaniny.

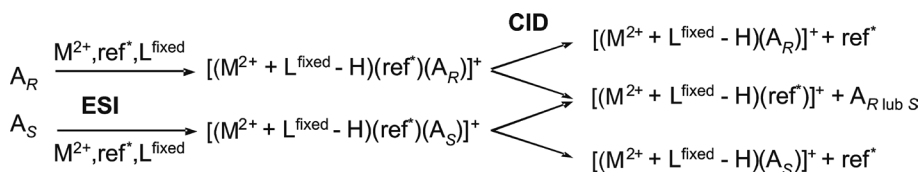
Szczegółową optymalizację doboru odpowiedniego jonu metalu i odnośnika przeprowadził wraz ze współpracownikami Ramagiri, wykorzystując metodę kinetyczną w analizie enancjomerów *L* i *D* kwasu *N*-ftaliloglutaminowego [54]. Dzięki acetylowaniu grupy aminowej *L*-fenyloalaniny, użytej jako odnośnik, uzyskano bardziej satysfakcjonujące wyniki od prezentowanych wcześniej. Jest to prawdopodob-

nie wynikiem obecności dodatkowej grupy karbonylowej uczestniczącej w oddziaływaniach ligand–ligand lub ligand–metal.

Najczęściej stosowanymi jonami metali do rozróżniania enancjomerów metodą kinetyczną są jony metali grup przejściowych, które posiadają zdolność tworzenia kompleksów z większością związków organicznych, wykorzystując elektronowe orbitale *d*. Znane są również prace gdzie w analizie związków chiralnych metodą kinetyczną jako jonu centralnego użyto jonów wapnia [55].

Udoskonaleniem klasycznej metody kinetycznej w analizie związków chiralnych jest wprowadzona przez Cooksa w roku 2003 tzw. metoda kinetyczna z „nieruchomym” ligandem (ang. *kinetic method with fixed ligand*).

Ogólną procedurą tej metody jest zastąpienie w wygenerowanym w warunkach jonizacji trimerycznym kompleksie, jednej z dwóch cząsteczek chiralnego odnośnika ligandem, który nie ulega odejściu w wyniku fragmentacji indukowanej zderzeniami (ang. *fixed ligand*) [56]. Istotną cechą, którą musi posiadać związek użyty jako dodatkowy ligand jest wysokie powinowactwo względem stosowanego jonu metalu, zaś fragmentacja diastereoizomerycznego kompleksu powinna przebiegać zgodnie z obserwowaną w metodzie klasycznej. W przypadku przedstawionej przez Cooksa analizy aminokwasów jako ligandy stosowane były krótkie peptydy (od 2 do 5 aminokwasów), których powinowactwo do jonu metalu jest wyższe niż pojedynczych aminokwasów. Dwie konkurencyjne ścieżki fragmentacji, w których eliminacji ulegają cząsteczka chiralnego odnośnika lub analizowanego związku, prowadzą do posiadających różną energię odpowiednich jonów  $[(M^{2+} + L^{\text{fixed}} - H)(A)]^+$  i  $[(M^{2+} + L^{\text{fixed}} - H)(\text{ref})]^+$  zgodnie z przedstawionymi równaniami:



W przeciwieństwie do klasycznej metody, gdzie trudno dokładnie wskazać miejsce oderwania protonu i strukturę powstałych kompleksów, wprowadzenie ligandu, który nie ulega eliminacji jednoznacznie wskazuje cząsteczkę tego ligandu jako miejsce deprotonacji. Dzięki temu struktura wygenerowanych kompleksów może być ściśle określona. Dodatkowo, porównując fragmentację kompleksów z dwoma identycznymi ligandami odnośnika, oddziaływania ligand–metal oraz ligand–ligand są łatwiejsze do zoptymalizowania w przypadku zastosowania odnośnika, który nie podlega eliminacji, co usprawnia i poprawia efektywność rozróżnienia związków optycznie czynnych.

Metodę kinetyczną z zastosowaniem „nieruchomego” ligandu wykorzystano w ostatnim czasie w analizie pochodnych fenyloalaniny [57], z których tylko jeden z enancjomerów, *L*-3,4-dihydroksyfenyloalanina (*L*-DOPA) wykazuje właściwości terapeutyczne. Pochodne pirydyli, które posiadają dwa aromatyczne atomy azotu

o hybrydyzacji  $sp^2$  położone w jednej płaszczyźnie, użyto jako ligandów nie ulegających eliminacji. Wolne pary elektronowe atomów azotu uczestniczą w wiązaniach koordynacyjnych z centralnym jonem metalu, prowadząc do stabilnych połączeń w diastereoizomerycznych kompleksach. Vainioto i współpracownicy wykorzystali natomiast opisaną metodę w analizie chiralnych cyklicznych  $\beta$ -aminokwasów posiadających dwa asymetryczne atomy węgla, wykorzystując jako „nieruchome” ligandy dipeptydy [58]. Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami dipeptyd, w którym jeden z aminokwasów posiada w łańcuchu bocznym układ aromatyczny, powoduje znaczny wzrost enancjoselektywności, wskutek oddziaływań z grupą karboksylową analizowanych aminokwasów.

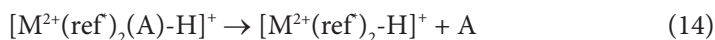
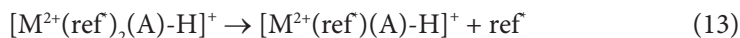
#### 2.4. ANALIZA ILOŚCIOWA ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH OPARTA NA METODZIE KINETYCZNEJ

Różnice w energii wewnętrznej dimerycznych kompleksów  $[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_R)-H]^+$  i  $[M^{2+}(\text{ref}^*)(A_S)-H]^+$  i co się z tym wiąże różnice w szybkości ich tworzenia, skutkują różną względną intensywnością odpowiadających im pikom w widmach jonów produktów dla wybranych diastereoizomerycznych kompleksów  $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(A_R \text{ lub } A_S)-H]^+$ . W analizie ilościowej związków optycznie czynnych opierającej się na metodzie kinetycznej wykorzystuje się logarytmiczną zależność pomiędzy  $R_{\text{chiral}}$  a nadmiarem enancjomerycznym (*e.e.*) jednego z enancjomerów.

Logarytm naturalny stosunku stałych szybkości reakcji (*R*) jest proporcjonalny do różnicy pomiędzy zmianami entalpii swobodnej dla dwóch konkurencyjnych dróg fragmentacji prowadzących do utworzenia dwóch dimerycznych produktów:

$$\ln R = \frac{\Delta(\Delta G)}{RT_{\text{eff}}} \quad (12)$$

gdzie *R* w mianowniku jest stałą gazową,  $T_{\text{eff}}$  temperatura efektywna kompleksu aktywnego układu trimerycznego (średnia temperatura kompleksów aktywnych dla dwóch konkurencyjnych procesów fragmentacji),  $\Delta(\Delta G)$  różnice energii swobodnej reakcji opisanych równaniami (13) i (14)



W przypadku analizy czystych enancjomerów  $A_R$  i  $A_S$ ,  $\Delta(\Delta G)$  w równaniu (12) opisane jest odpowiednio przez  $\Delta(\Delta G)_R$  i  $\Delta(\Delta G)_S$ . Dla mieszaniny enancjomerów z nadmiarem enancjomeru *R* o określonej wartości *e.e.*  $\Delta(\Delta G)$  wyraża się jako:

$$\Delta(\Delta G) = \Delta(\Delta G)_R \frac{1+ee}{2} + \Delta(\Delta G)_S \frac{1-ee}{2} = \frac{[\Delta(\Delta G)_R + \Delta(\Delta G)_S]}{2} + \frac{[\Delta(\Delta G)_R - \Delta(\Delta G)_S]}{2} ee \quad (15)$$

Zależność łączącą  $R$  z nadmiarem enancjomerycznym  $e.e.$  opisuje więc równanie (16):

$$\ln R = \left[ \frac{\ln(R_R) + \ln(R_S)}{2} \right] + \left[ \frac{\ln(R_{\text{chiral}})}{2} \right] ee \quad (16)$$

Przeprowadzenie pomiaru ilościowego wymaga wyznaczenia w pierwszym etapie krzywej kalibracyjnej. Stosując klasyczne podejście krzywą tą w metodzie kinetycznej wykonuje się wykorzystując liniową zależność pomiędzy  $\ln R$  a nadmiarem enancjomerycznym  $e.e.$  jednego z analizowanych enancjomerów. W metodzie SR (ang. *Single Ratio method*, SR) wyznaczenie takiej krzywej wymaga przynajmniej dwóch punktów kalibracyjnych (racemat i próbka o znanej czystości enancjomerycznej, dwóch czystych enancjomerów  $R$  i  $S$  lub dwóch próbek o znanej czystości enancjomerycznej).

Rejestrując jedno widmo jonów produktów dla diastereoizomerycznego kompleksu  $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(\text{A})-\text{H}]^+$  dla mieszaniny o nieznannej zawartości poszczególnych enancjomerów i określając  $R$  jako stosunek względnych intensywności dimerycznych jonów fragmentacyjnych, możliwe jest określenie na podstawie krzywej kalibracyjnej jej składu enancjomerycznego.

Metoda ta posiada pewne ograniczenia i nie może być stosowana w przypadku, gdy dostępna jest tylko jedna próbka optycznie czystej substancji lub o znanej czystości enancjomerycznej (potrzebne dwa punkty kalibracyjne). Problem ten jest szczególnie często spotykany w przypadku chiralnych leków otrzymywanych z naturalnych chiralnych produktów, gdzie tylko jeden z enancjomerów występuje w postaci czystej, a uzyskanie nawet mieszaniny racemicznej jest skomplikowane.

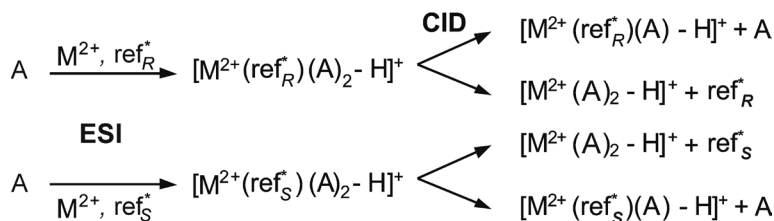
Problem ten został wyeliminowany przez wprowadzenie bardziej rozbudowanej metody QR (ang. *Quotient Ratio method*, QR) [59]. Metoda ta wymaga tylko jednej próbki o znanej czystości enancjomerycznej w celu uzyskania krzywej kalibracyjnej.

W odróżnieniu od metody *single ratio* widma jonów produktów wykonuje się dla trimerycznego kompleksu  $[M^{2+}(\text{ref}^*)(\text{A})_2-\text{H}]^+$  (zamiast  $[M^{2+}(\text{ref}^*)_2(\text{A})-\text{H}]^+$ ), dla którego monitoruje się dwa konkurencyjne procesy eliminacji ligandów: cząsteczki chiralnego odnośnika  $\text{ref}^*$  i analitu  $\text{A}$ , prowadzące do powstania odpowiednio dimerycznych jonów  $[M^{2+}(\text{A})_2-\text{H}]^+$  i  $[M^{2+}(\text{ref}^*)(\text{A})-\text{H}]^+$ . Tworzenie krzywej kalibracyjnej, jak również analiza próbki o nieznannej zawartości poszczególnych enancjomerów, wymaga zarejestrowania dwóch oddzielnych widm jonów produktów dla kompleksu  $[M^{2+}(\text{ref}^*)(\text{A})_2-\text{H}]^+$ , stosując optycznie czyste lub o znanej czystości enancjomerycznej cząsteczki odnośnika  $\text{ref}_R^*$  i  $\text{ref}_S^*$ .

Wynikiem różnicy w energii potrzebnej do powstania dimerycznych jonów fragmentacyjnych  $[M^{2+}(\text{ref}_R^*)(\text{A})-\text{H}]^+$  i  $[M^{2+}(\text{ref}_S^*)(\text{A})-\text{H}]^+$  jest różna intensywność względna odpowiadających im pików w widmach jonów produktów oraz stosunek



względem  $[M^{2+}(A)_2-H]^+$ . Ogólny schemat metody QR oraz zależności matematyczne opisujące stopień rozróżnienia enancjomerów  $RR_{\text{chiral}}$  w tej metodzie przedstawiono poniżej:



$$RR = \frac{[M^{2+}(\text{ref}_R^*)(A)-H]^+ / [M^{2+}(A)_2-H]^+}{[M^{2+}(\text{ref}_S^*)(A)-H]^+ / [M^{2+}(A)_2-H]^+} \quad (17)$$

W przypadku gdy analit jest enancjomerycznie czysty tzn.  $A = A_R$ , to  $RR = RR_R$ , lub gdy  $A = A_S$ , to  $RR = RR_S$ , zaś stopień ich rozróżnienia określa  $RR_{\text{chiral}}$  zdefiniowany jako:

$$RR_{\text{chiral}} = RR_R / RR_S \quad (18)$$

Podobnie jak w metodzie *single ratio*  $\ln RR$  wykazuje zależność liniową względem czystości enancjomerycznej *e.e.* jednego z enancjomerów. Zgodnie z zależnościami opisanymi w cytowanej pracy  $\ln RR$  dla mieszaniny racemicznej wynosi zero, co umożliwia uzyskanie krzywej kalibracyjnej w oparciu o dane eksperymentalne dla jednej próbki o znanej czystości enancjomerycznej. Porównując dane eksperymentalne z rzeczywistymi dla szeregu próbek *L*-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (*L*-DOPA), średni błąd pomiaru nadmiaru enancjomerycznego (różnica pomiędzy wartościami zmierzonymi a rzeczywistymi) wyniósł 2,4%.

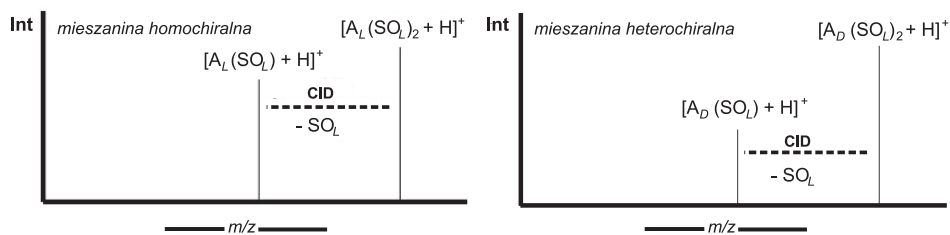
Połączenie metody kinetycznej opartej na wprowadzeniu „nieruchomego” ligandu z opisaną wyżej metodą QR pozwoliło na wprowadzenie kolejnej modyfikacji w analizie ilościowej związków chiralnych. Jest to tzw. *fixed-ligand quotient ratio method*  $QR^{\text{fixed}}$ . Jej główną zaletą jest szybka konstrukcja krzywej kalibracyjnej przez zmianę chiralności „nieruchomego” ligandu i cząsteczki odnośnika oraz jeszcze większa dokładność pomiaru [60]. Średni błąd pomiaru nadmiaru enancjomerycznego dla szeregu próbek wspomnianej wcześniej pochodnej alaniny (*L*-DOPA) wyznaczony tą metodą wynosi mniej niż 1,2%.

Praktycznie we wszystkich podjętych próbach analizy ilościowej związków chiralnych metodą kinetyczną stosowaną techniką jonizacji jest elektrosprej. Dotychczas opublikowano tylko jedną pracę, gdzie w analizie ilościowej kwasu *N*-ftaliloglutaminowego metodą kinetyczną wykorzystano desorpcję/jonizację laserową wspomaganą matrycą MALDI [54]. Uzyskane wyniki m.in. wysoki współczynnik korelacji dla linowej zależności  $R_{\text{chiral}}$  w funkcji czystości enancjomerycznej enancjomeru *L* ( $r^2 = 0,9843$ ) sugeruje, iż MALDI może być uznawana jako technika

komplementarna do ESI w określaniu zawartości poszczególnych enancjomerów w próbkach o nieznanym składzie.

### 2.5. WYZNACZENIE WSPÓŁCZYNNIKA CR (ANG. *CHIRAL RECOGNITION RATIO*) W OPARCIU O WIDMA JONÓW PRODUKTÓW DLA OKREŚLONYCH KOMPLEKSÓW

Drugą opartą na tandemowej spektrometrii mas jest metoda, w której rozróżnienie enancjomerów polega na wyznaczeniu współczynnika nazywanego *chiral recognition ratio* CR. Kinetyczna metoda opisana powyżej wymaga doboru odpowiedniego metalu i odnośnika, aby jony powstałe w dwóch konkurencyjnych procesach fragmentacji miały odpowiednio wysoką intensywność. W wielu przypadkach dobór tych reagentów jest dość problematyczny. Alternatywną metodą okazała się metoda oparta na wyznaczeniu współczynnika CR. Metoda ta wymaga wygenerowania odpowiedniego trimerycznego układu analit-selektor lub diastereoizomerycznego kompleksu, zawierającego analogicznie jak w metodzie kinetycznej cząsteczkę analitu i enancjomerycznie czystego odnośnika w obecności jonu metalu. Wartość CR określa się na podstawie stosunku względnej intensywności tylko jednego jonu fragmentacyjnego do intensywności jonu prekursora lub stosunku intensywności dwóch jonów fragmentacyjnych (Rys. 19, równanie 19). Logarytm naturalny tego stosunku względem nadmiaru enancjomerycznego jednego z enancjomerów jest zależnością liniową, co pozwala na zastosowanie tej metody w analizie ilościowej.



Rysunek 19. Fragmentacja trimerycznych diastereoizomerycznych kompleksów homochiralnych (wszystkie cząsteczki o konfiguracji *L*) i heterochiralnych (układy o konfiguracji *D, D, L* i *L, L, D*) wskazujące na enancjoselektywne wiązanie jednego ze składników w kompleksie wyjściowym [9]

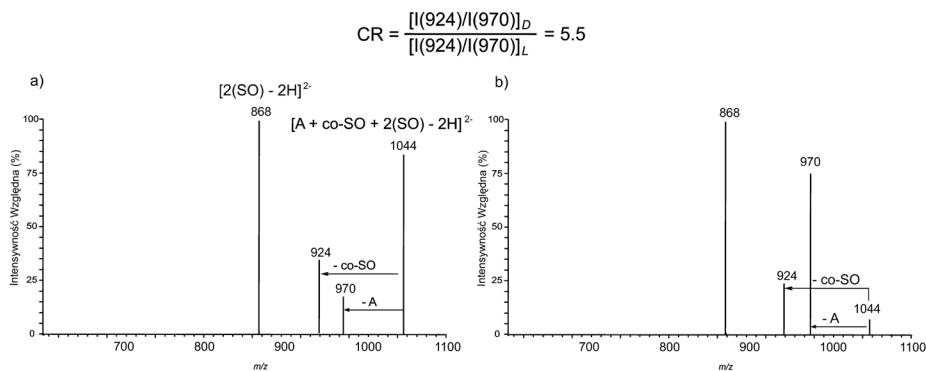
Figure 19. Dissociation of homochiral (all *L*) and heterochiral (*D, D, L*; *L, L, D*) trimeric diastereomeric complexes for the purpose of measuring a branching ratio indicative of enantioselective binding in one component of the parent trimeric complex [9]

$$\text{CR} = \frac{[A_L(\text{SO}_L) + \text{H}]^+ / [A_L(\text{SO}_L)_2 + \text{H}]^+}{[A_D(\text{SO}_L) + \text{H}]^+ / [A_D(\text{SO}_L)_2 + \text{H}]^+} \quad (19)$$

Pionierskie prace oparte na tej metodzie badań związków optycznie czynnych należą do Yao, który wykorzystał ją zarówno w analizie jakościowej jak i ilościowej dziewiętnastu aminokwasów (A), stosując jako selektory chiralne *N-tert*-butoxycarbonyłowe pochodne seryny, fenyloalaniny i proliny (SO) [61, 62].

Dotychczasowe badania różnych klas związków chiralnych wykorzystywały możliwość ich stereoselektywnego kompleksowania przez związki powszechnie używane w metodach chromatograficznych (cyklodekstryny, etery koronowe) oraz modyfikowane aminokwasy czy peptydy. W ostatnich latach do potencjalnych selektorów wykorzystywanych w analizie związków optycznie czynnych, głównie aminokwasów w oparciu o tandemową spektrometrię mas, dołączyły krótkie oligonukleotydy [63]. Analiza szeregu połączeń nukleotydowych, zbudowanych z trzech deoksyrybonukleotydów, wskazała trimer GCA jako najkorzystniejsze połączenie w analizie chiralnych  $\alpha$ -aminokwasów, wykazujące stereoselektywność kompleksowania wobec enancjomerów *D*. Interesujący jest fakt, iż kompleksy chiralnych aminokwasów z trinukleotydem ACG, który posiada identyczny skład, ale odwrotną sekwencję w ogóle nie wykazują charakteru stereoselektywnego. Istotnym elementem w prawidłowym określeniu współczynnika CR okazał się wybór odpowiedniego jonu, który poddawany jest reakcji fragmentacji. W przypadku użycia trinukleotydów jako selektorów zaobserwowano nakładanie pików, które odpowiadały różnym jonom, co w istotny sposób zakłóca wyznaczoną wartość enancjoselektywności.

Problem ten wyeliminowano wprowadzając dodatkową cząsteczkę aminokwasu jako ko-selektora (co-SO), który charakteryzuje się podobnym powinowactwem względem oligonukleotydu. Wartość CR wyznaczono w tym przypadku na podstawie widma CID dla jonu  $[A+co-SO+2(SO)-2H]^{2-}$ , jako stosunek intensywności dwóch pików fragmentacyjnych  $[A+2(SO)-2H]^{2-}$  i  $[co-SO+2(SO)-2H]^{2-}$  (Rys. 20) [64].



Rysunek 20. Widma jonów produktów dla jonu  $[A+co-SO+2(SO)-2H]^{2-}$ , gdzie  $A = D$ -Glu (a) i  $L$ -Glu (b),  $co-SO = D$ -Trp i  $SO = GCA$  [64]

Figure 20. CID spectra of  $[A+co-SO+2(SO)-2H]^{2-}$  ion,  $A = D$ -Glu (a) and  $L$ -Glu (b),  $co-SO = D$ -Trp and  $SO = GCA$  [64]

W przeprowadzonych badaniach jako cząsteczek ko-selektorów użyto szeregu *L*- i *D*-aminokwasów. Nie dla wszystkich badanych układów możliwe było wyznaczenie współczynnika CR, jednak w większości z nich jego wartość okazała się wyższa niż w badaniach przeprowadzonych wcześniej.

Użycie tetranukleotydów jako związków kompleksujących w rozróżnieniu chiralnych aminokwasów nie wymaga wprowadzenia cząsteczki ko-selektora, z uwagi na wybór innego rodzaju jonu, który podlega procesom fragmentacji [65]. Spośród analizowanych połączeń nukleotydowych GCAA i GGCA wykazały najwyższą stereoselektywność względem  $\alpha$ -aminokwasów; odpowiednio GCAA względem enancjomerów *D*, zaś GGCA enancjomerów *L*.

Jednym z nielicznych chiralnych aminokwasów, dla którego rozróżnienie enancjomerów metodą kinetyczną okazało się trudne jest arginina i jej *N*-blokowane pochodne. Wynika to z jej wysokiego powinowactwa względem większości metali. Problem ten próbowano rozwiązać stosując jako chiralne odnośniki pochodne argininy o podobnym powinowactwie względem użytego kationu. W wielu przypadkach nie uzyskano jednak pożądanego efektu i wartość enancjoselektywności określono opierając się na wyznaczeniu współczynnika *chiral recognition ratio* [55]. Porównywalna wartość współczynnika korelacji dla krzywych kalibracyjnych uzyskanych obiema metodami (KM i CR) dla układów, kiedy względne intensywności odpowiednich pików umożliwiły zastosowanie obu z nich, pozwalają twierdzić, że metody te mogą być stosowane zamiennie w oznaczeniu zawartości czystości enancjomerycznej *e.e.* z odpowiednio dużą dokładnością.

### 3. „RUCHLIWOŚĆ JONÓW” W ANALIZIE ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH

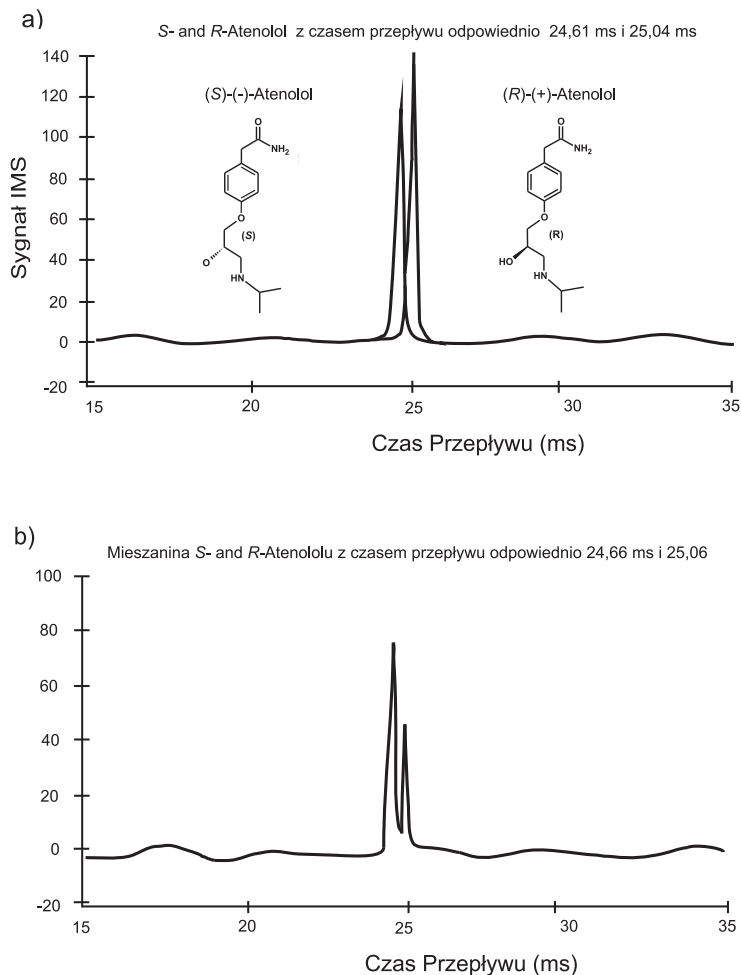
W ciągu ostatniej dekady zjawisko ruchliwości jonów, zwane również mobilnością w połączeniu ze spektrometrią mas znalazło swoje zastosowanie również w odróżnianiu związków optycznie czynnych [66]. Typowy spektrometr wykorzystywany w tej metodzie, oprócz tradycyjnych elementów, wyposażony jest w odpowiednio skonstruowaną komorę, w której następuje separacja analizowanych związków. Proces ten jest analogiczny do rozdziału elektroforetycznego w fazie gazowej, który odbywa się w oparciu o wielkość cząsteczek analitu i wzajemne oddziaływanie podczas ich zderzeń z cząsteczkami gazu obojętnego. Z uwagi na różne konstrukcje stosowanych komór, rozdział molekuł może odbywać się zarówno w czasie, jaki i przestrzeni. Generalnie, powstałe w wyniku jonizacji jony zostają wprowadzone do komory separacyjnej wraz z cząsteczkami gazu obojętnego i poddawane działaniu pola elektrycznego. Szybkość przepływu ( $v_d$ ) jonów przez komorę jest proporcjonalna do napięcia elektrostatycznego ( $E$ ),  $v_d = KE$ , gdzie współczynnik proporcjonalności  $K$  określa ruchliwość jonów w danym gazie nośnym.

Podobnie jak tradycyjna spektrometria mas, *ion mobility spectrometry* jest metodą, która nie posiada możliwości rozdziału związków chiralnych bez wprowadzenia dodatkowych reagentów, które wpływają na zmianę ich ruchliwości.

Jednym z zaproponowanych podejść jest wygenerowanie diastereoizomerycznych kompleksów, analogicznych do wykorzystywanych w metodzie kinetycznej, gdzie jon dwuwartościowego metalu ( $M^{2+}$ ) połączony jest z cząsteczką analitu ( $A_X$ ) i dwiema cząsteczkami odnośnika ( $ref^+$ )  $[M^{2+}(ref^+)_2(A_X)-H]^+$ . Następnie kompleksy

rozdzielane są w komorze separacyjnej pod wpływem zmiennego pola elektrycznego, które przyłożone jest do dwóch równoległe ułożonych elektrod. Uzyskuje się to na skutek cyklicznie powtarzających się impulsów wysokiego pola elektrycznego o danej polarności w krótkim okresie czasu i niskiego pola o polarności przeciwnej w okresie dłuższym. Rozdział jonów następuje więc w przestrzeni, w oparciu o stosunek ruchliwości jonów w obszarze wysokiego i niskiego pola. Dzięki dodatkowo użytemu napięciu stałemu, którego wartość można regulować, określanemu jako napięcie kompensujące, tylko interesujące jony mogą przechodzić przez komorę. Pozostała część podlega zderzeniom z elektrodami i zostaje utracona. Opisaną metodę określa się jako *high-field asymmetric waveform ion mobility*. Dotychczas zastosowano ją w rozróżnianiu wielu związków chiralnych m.in. aminokwasów [67], enancjomerów terbutaliny [68], enancjomerów kwasu mlekowego [69] oraz diastereoizomerów efedryny i pseudoefedryny [70]. W wielu przypadkach określenie warunków eksperymentu, a szczególnie wartości napięcia kompensującego jest dość problematyczne i wymaga optymalizacji na enancjomerycznie czystym odnośniku.

Druga z użytych metod nazywana *drift tube ion mobility*, której ogólnym założeniem jest wprowadzenie do komory separacyjnej strumienia gazu obojętnego, którego cząsteczki w efekcie zderzeń z analitem powodują zmianę ich ruchliwości. W ten sposób mniejsze cząsteczki, które ulegają mniejszej liczbie zderzeń, ze względu na niższą masę lub ściślejsze upakowanie, w krótszym czasie docierają do detektora, niż cząsteczki większe lub posiadające bardziej rozbudowaną strukturę. Rozdział związków optycznie czynnych w oparciu o tę metodę wymaga wprowadzenia niewielkiej ilości chiralnego modyfikatora, którego oddziaływanie z cząsteczkami analitu może mieć charakter selektywny. Jeden z enancjomerów analizowanego związku mieszaniny racemicznej oddziałuje z enancjomerycznie czystą formą modyfikatora dłużej lub oddziaływanie to jest bardziej korzystne, przez co dłużej pozostaje w komorze separacyjnej [71]. W eksperymencie przeprowadzonym przez Dwivediego metodą tą uzyskano rozdział wielu chiralnych związków, wśród których znalazły się min. aminokwasy, węglowodany i grupa związków zaliczanych do leków. Jako chiralnego modyfikatora dodanego do gazu nośnego użyto (S)-(+)-2-butanolu (Rys. 21). Jest to obecnie jedyna praca dotycząca analizy związków optycznie czynnych z wykorzystaniem tej metody i odnosi się do cząsteczek o niewielkich rozmiarach. Czynnikiem, który czyni ją dość obiecującą w analizie bardziej skomplikowanych związków chiralnych jest fakt, że nie wymaga wprowadzania dodatkowych cząsteczek określonego odnośnika czy związku kompleksującego.



Rysunek 21. Rozdział enancjomerów atenololu, a) nałożone widma (*S*- i (*R*)-atenololu uzyskane po wprowadzeniu 10 ppm (*S*)-(+)-2-butanolu jako chiralnego modyfikatora do strumienia gazu nośnego (azotu), b) rozdział enancjomerów w mieszaninie racemicznej [71]

Figure 21. Gas-phase separation of atenolol enantiomers, a) superimposed spectrum of (*S*- and (*R*)-atenolol obtained after introduction of (*S*)-(+)-2-butanol (10 ppm) as the chiral modifier in the inert nitrogen drift gas, b) separation of the enantiomers from their racemic mixture [71]

## PODSUMOWANIE

W ciągu ostatniego dziesięciolecia nastąpił bardzo istotny postęp w zastosowaniu spektrometrii mas do analizy związków chiralnych. Czynnikiemami decydującymi o rozszerzeniu możliwości tej metody analitycznej były przede wszystkim

rozwój i udoskonalenie technik jonizacji oraz rozwój technik analizy jonów. Coraz powszechniejsze stosowanie elektrospreju pozwoliło na wykorzystanie niekowalencyjnych oddziaływań pomiędzy chiralnymi cząsteczkami (jonami) w fazie gazowej do rozróżniania enancjomerów, co uprzednio było możliwe jedynie w fazie skondensowanej i stanowiło podstawę ich rozdziałów chromatograficznych.

Omówione w niniejszej pracy doniesienia literaturowe świadczą o tym, że spektrometria mas jest użyteczną, a zarazem mającą ogromne perspektywy rozwoju metodą analityczną do analizy związków chiralnych. Dotychczas znalazła zastosowanie w rozróżnianiu enancjomerów oraz określaniu ich zawartości dla szerokiej gamy związków, wśród których najczęściej spotykane to: aminokwasy i ich pochodne, dipeptydy, cukry czy  $\alpha$ -hydroksykwasy.

Wiele z cytowanych prac oryginalnych zawiera dane uzyskane przy jednoczesnym zastosowaniu przynajmniej dwóch z opisanych metod oznaczania nadmiaru enancjomerycznego. Otrzymane wartości enancjoselektywności, jak również przeprowadzone przy użyciu tych metod pomiary ilościowe wyrażone nadmiarem enancjomerycznym jednego z izomerów optycznych, mają zwykle zbliżone do siebie wartości. Dodatkowo w wielu przypadkach są one zgodne z danymi uzyskanymi innymi technikami analitycznymi, którymi zwykle są techniki chromatograficzne. Zgodność wyników uzyskanych różnymi metodami, jak również fakt, iż spektrometria mas jest metodą szybką i coraz bardziej dostępną, pozwala postrzegać ją jako narzędzie do poszukiwania nowych związków o wysokiej zdolności rozróżniania związków chiralnych, które w przyszłości mogą być zastosowane w chromatografii jako chiralne selektory.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Pasteur, *Researches on the Molecular Asymmetry of Natural Organic Products*, Alembic Club Reprints, Edinburgh, 1897.
- [2] L. Kelvin, *Baltimore Lectures on Molecular Dynamics and the Wave Theory of Light*, C.J. Clay and Sons, London, 1904.
- [3] G. Uccello-Barretta, L. Vanni, F. Balzano, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 928.
- [4] N. Berova, L. Di Bari, G. Pescitelli, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 914.
- [5] G. Gübitz, M.G. Schmid, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1204**, 140.
- [6] Y. Okamoto, T. Ikai, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 2593.
- [7] G. Sicoli, F. Pertici, Z. Jiang, L. Jicsinkszy, V. Schurig, *Chirality*, 2007, **19**, 391.
- [8] H.M. Fales, G.J. Wright, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 2339.
- [9] K.A. Shug, W. Lindner, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 1932.
- [10] M. Sawada, *Mass Spectrom. Rev.*, 1997, **16**, 73.
- [11] M. Speranza, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2004, **232**, 277.
- [12] W.A. Tao, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2003, **75** (1), 5A.
- [13] C.A. Schalley, *Mass Spectrom. Rev.*, 2001, **20**, 253.
- [14] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 4451.
- [15] M.S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 1994, **136**, 167.

- [16] M. Sawada, M. Shizuma, Y. Takai, H. Yamada, T. Kaneda, T. Hanafusa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 4405.
- [17] Y. Takai, K. Iguchi, H. Yamada, M. Shizuma, R. Arakowa, M. Sawada, *J. Mass Spectrom.*, 2006, **41**, 266.
- [18] M. Shizuma, H. Adachi, D. Ono, H. Sato, M. Nakamura, *Chirality*, 2009, **21**, 324.
- [19] P. Gerbaux, J. De Winter, D. Cornil, K. Ravicini, G. Pesesse, J. Cornil, R. Flammang, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 11039.
- [20] K.A. Schug, P. Frycak, N.M. Maier, W. Lindner, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 3660.
- [21] C. Czerwenka, N.M. Maier, W. Lindner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **379**, 1039.
- [22] K.A. Schug, N.M. Maier, W. Lindner, *Chem. Commun.*, 2006, 414.
- [23] K.A. Schug, N.M. Maier, W. Lindner, *J. Mass Spectrom.*, 2006, **41**, 157.
- [24] M.E. Koscho, C. Zu, B.N. Brewer, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 801.
- [25] B.N. Brewer, C. Zu, M.E. Koscho, *Chirality*, 2005, **17**, 456.
- [26] C. Zu, J.A. Woolfolk, M.E. Koscho, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2009, **288**, 44.
- [27] C. Zu, J.A. Woolfolk, M.E. Koscho, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **661**, 60.
- [28] C. Zu, B.N. Brewer, B. Wang, M.E. Koscho, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5019.
- [29] B. Botta, F. Caporuscio, D. Subissati, A. Tafi, M. Botta, A. Filippi, M. Speranza, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 2717.
- [30] B. Botta, F. Caporuscio, I. D'Acquarica, G. D. Monache, D. Subissati, A. Tafi, M. Botta, A. Filippi, M. Speranza, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 8096.
- [31] B. Botta, G. D. Monache, C. Frasschetti, L. Nevola, D. Subissati, M. Speranza, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2007, **267**, 24.
- [32] B. Botta, A. Tafi, F. Caporuscio, M. Botta, L. Nevola, I. D'Acquarica, C. Frasschetti, M. Speranza, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 3585.
- [33] M. Speranza, I. D'Acquarica, C. Frasschetti, B. Botta, A. Tafi, L. Bellucci, G. Zappia, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2010, **291**, 84.
- [34] B. Botta, C. Frasschetti, I. D'Acquarica, M. Speranza, F.R. Novara, J. Mattay, M.C. Letzel, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 14625.
- [35] A. Filippi, F. Gasparrini, M. Pierini, M. Speranza, C. Villani, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 11913.
- [36] F. Gasparrini, M. Pierini, C. Villani, A. Filippi, M. Speranza, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 522.
- [37] M. Speranza, F. Gasparrini, B. Botta, C. Villani, D. Subissati, C. Frasschetti, F. Subrizi, *Chirality*, 2009, **21**, 69.
- [38] Y. Cheng, D. M. Hercules, *J. Mass Spectrom.*, 2001, **36**, 834.
- [39] A.R.M. Hyyryläinen, J. M. H. Pakarinen, E. Forró, F. Fülöp, P. Vainitalo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1235.
- [40] S.C.X. Ahn, C.B. Lebrilla, S. Gronert, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, **16**, 166.
- [41] X. Cong, G. Czerwieńiec, E. McJimpsey, S. Ahn, F.A. Troy, C.B. Lebrilla, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2006, **17**, 442.
- [42] G. Grigorean, C.B. Lebrilla, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1684.
- [43] J.S. Patrik, T. Kotiaho, S.A. McLuckey, R.G. Cooks, *Mass Spectrom. Rev.*, 1994, **13**, 287.
- [44] P.H. Wong, R.G. Cooks, *Acc. Chem. Res.*, 1998, **31**, 379.
- [45] D. Zhang, W.A. Tao, R.G. Cooks, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2001, **204**, 159.
- [46] L. Wu, W.A. Tao, R.G. Cooks, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 618.
- [47] W.A. Tao, L. Wu, R.G. Cooks, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2001, **12**, 490.
- [48] W.A. Tao, F.C. Gozzo, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1692.
- [49] D.V. Augusti, F. Carazza, R. Augusti, W.A. Tao, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 3458.
- [50] W.A. Tao, L. Wu, R.G. Cooks, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 3541.
- [51] W.A. Tao, D. Zhang, E.N. Nikolaev, R.G. Cooks, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 10598.



- [52] S. Kumari, S. Prabhakar, M. Vairamani, C.L. Devi, G.K. Chaitanya, K. Bhanuprakash, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2007, **18**, 1516.
- [53] S. Kumari, S. Prabhakar, M. Vairamani, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 1393.
- [54] S. Ramagiri, R. Gupete, I. Racov, C.R. Yates, D.D. Miller, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 639.
- [55] K.A. Schug, W. Linder, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, **16**, 825.
- [56] L. Wu, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 678.
- [57] M.K. Lee, A.P. Kumar, D. Jin, Y. Lee, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 909.
- [58] A.R.M. Hyyryläinen, J.M.H. Pakarinen, E. Forró, F. Fülöp, P. Vainiotalo, *J. Mass. Spectrom.*, 2010, **54**, 198.
- [59] W.A. Tao, R.L. Clarc, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 3783.
- [60] L. Wu, E.C. Meurer, R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 663.
- [61] Z.P. Yao, T.S.M. Wan, K.-P. Kwong, C.-T. Che, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5383.
- [62] Z.P. Yao, T.S.M. Wan, K.-P. Kwong, C.-T. Che, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5394.
- [63] M. Ravikumar, S. Prabhakar, M. Vairamani, *Chem. Comm.*, 2007, 392.
- [64] M.R. Kumar, S. Prabhakar, T. Sivaleela, M. Vairamani, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 1218.
- [65] T. Sivaleea, M.R. Kumar, S. Prabhakar, G. Bhaskar, M. Vairamani, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 204.
- [66] J.R. Enders, J.A. Mclean, *Chirality*, 2009, **21**, E253.
- [67] A. Mie, M. Jornten-Karlsson, B.-O. Axelsson, A. Ray, C.T. Reimann; *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 2850.
- [68] A. Mie, A. Ray, B.-O. Axelsson, M. Jornten-Karlsson, C.T. Reimann, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 4133.
- [69] J. Sultan, W. Gabryelski, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2905.
- [70] M. McCooye, L. Ding, G.J. Gardner, C.A. Fraser, J. Lam, R.E. Sturgeon, Z. Mester, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 2538.
- [71] P. Dwivedi, C. Wu, L.M. Matz, B.H. Clowers, W.F. Siems, H.H. Hill, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 8200.

Praca wpłynęła do Redakcji 28 lipca 2011

