

Rafał Frański, Grzegorz Schroeder

**Zastosowanie spektrometrii mas w chemii
supramolekularnej**

SERIA: Chemia Supramolekularna

Poznań 2003

Recenzent : Prof. dr hab. Władysław Boczoń

Prof. dr hab. Grzegorz Schroeder
Dr Rafał Frański
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Chemii
Grunwaldzka 6
60-780 Poznań
tel.: 0-61-8291-486
E-mail: schroede@amu.edu.pl

ISBN

„BETAGRAF” P.U.H. Poznań

Spis treści

Wstęp

1. Spektrometria mas.....	8
2. Wyznaczanie stałych trwałości kompleksów za pomocą widm ESI.....	27
3. Spektrometria mas układów supramolekularnych - faza ciekła czy gazowa?.....	31
4. Kompleksy eterów koronowych z kationami metali.....	36
5. Układy supramolekularne z udziałem eterów koronowych i jonów organicznych.....	45
6. Kompleksy cyklodekstryn.....	48
7. Procesy samoorganizacji.....	54
8. Literatura.....	63

Chemia supramolekularna to chemia ponadcząsteczkowa, która zajmuje się syntezą, badaniami właściwości supermolekuł oraz oddziaływaniami pomiędzy ich fragmentami. Obejmuje zagadnienia zorganizowanych jednostek o różnej złożoności, które są wynikiem asocjacji dwu lub więcej chemicznych indywiduów związanych razem siłami niekowalencyjnymi.

Gwałtowny rozwój **chemii supramolekularnej** doprowadził do pojawienia się bardzo różnych układów chemicznych, które mogą pretendować do grupy supermolekuł. W takich układach wyodrębnia się molekułę kompleksującą – *cząsteczkę gospodarza*, często nazywaną receptorem molekularnym, i molekułę kompleksowaną – *cząsteczkę gościa*. Cząsteczki te są zdolne do wzajemnego dopasowania i utworzenia kompleksu typu *gość-gospodarz*. W układach biologicznych przykładami tego typu kompleksów mogą być układy „ligand-metal”, „enzym-substrat”, „receptor-substrat”, „receptor-lek” lub „antyciało-antygen”. Reakcja pomiędzy cząsteczkami gościa i gospodarza jest najczęściej procesem selektywnym i ma z tego powodu ogromne znaczenie praktyczne.

Dowodem zauważenia ważności tych zagadnień było przyznanie 1987 Nagrody Nobla w dziedzinie chemii za badania naukowe z zakresu chemii supramolekularnej („za rozwinięcie i zastosowanie cząsteczek o szczególnie selektywnych oddziaływaniach

zależnych od struktury”). Laureatami zostali Charles J. Pedersen za syntezę eterów koronowych, Donald J. Cram za kompleksy gość-gospodarz oraz Jean-Marie Lehn za układy przestrzenne - kryptaty.

Jean-Marie Lehn, którego powszechnie uważa się za twórcę chemii supramolekularnej, urodził się w 1939 we Francji w miasteczku Rosheim. W 1963 roku uzyskał stopień naukowy doktora, a w 1970 roku tytuł profesora na uniwersytecie w Strasburgu.

Charles J. Pedersen urodził się w 1904 roku w Fusan w Korei. W 1922 roku wyjechał do Stanów Zjednoczonych gdzie w 1926 roku ukończył studia na Uniwersytecie w Dayton w Ohio, a 1926 w Instytucie Technologii w Massachusetts. Większość życia pracował w firmie DuPont w USA. Zmarł w 1989 roku w Salem w stanie New Jersey.

Donald J. Cram urodził się w 1919 roku w Chester w stanie Vermont w USA. W 1947 roku uzyskał stopień naukowy doktora na Uniwersytecie Harvarda w Cambridge. W 1955 roku uzyskał tytuł profesora na Uniwersytecie Kalifornijskim w Los Angeles.

Istnieje wiele metod stosowanych do badań supermolekuł. Obok magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektroskopii UV-Vis i FTIR, **spektrometria mas** odgrywa wiodącą rolę w badaniach tego typu układów zarówno w fazie gazowej, jak i w fazie ciekłej. Spektrometria mas to technika, której istota leży w jonizacji badanej substancji z utworzeniem jonów dodatnich lub ujemnych, a następnie wyznaczenie masy tych jonów w stosunku do ładunku. W tej technice stosuje się szeroką gamę metod jonizacji oraz wiele różnych pod względem konstrukcyjnym analizatorów jonów. Ta

różnorodność technik czyni dzisiaj spektrometrię mas szczególnie atrakcyjną w badaniach biologicznie czynnych związków naturalnych i syntetycznych o strukturze kompleksów gość-gospodarz.

Początki spektrometrii mas sięgają końca XIX-go wieku. Pierwszą pracę dotyczącą analizy małych cząsteczek opublikował w 1912 roku Joseph J. Thompson. Wiele odkryć naukowych, za które przyznano w ostatnich latach nagrodę Nobla opierało się na wynikach uzyskanych za pomocą technik spektrometrii mas. Przykładem może być odkrycie deuteru przez Harolda Urey'a (Nagroda Nobla w dziedzinie chemii w 1934 roku) oraz odkrycie fulerenów przez Roberta F. Curla Jr, Harolda Kroto i Richarda E. Smalley'a (Nagroda Nobla z chemii w 1996 roku). Nagroda Nobla w dziedzinie chemii w roku 2002 została przyznana trzem naukowcom zajmującym się spektrometrią mas (MS) oraz magnetycznym rezonansem jądrowym (NMR). Laureatami zostali John B. Fenn, Koichi Tanaka (MS) oraz Kurt Wüthrich (NMR). John B. Fenn i Koichi Tanaka znaleźli sposób na przeniesienie do fazy gazowej bardzo dużych cząstek takich jak białka. Pierwszy z laureatów zastosował rozpylenie roztworu w polu elektrycznym, drugi naukowiec wykorzystał desorpcję laserem.

John B. Fenn urodził się w 1917 roku w Nowym Jorku, w 1940 uzyskał stopień naukowy doktora w chemii na uniwersytecie w Yale (Connecticut, USA), gdzie następnie w latach 1967–1987 zajmował stanowisko profesora. Od 1987 jest profesorem emerytowanym uniwersytetu w Yale. W 1994 roku został profesorem na Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA.

Koichi Tanaka urodził się w 1959 w Japonii w mieście Toyama. W 1983 roku uzyskał licencjat inżyniera na Uniwersytecie Tohoku. Obecnie jest inżynierem do spraw badawczo-rozwojowych w japońskiej firmie Shimadzu w mieście Kyoto w zespole nauk biologicznych, w Sekcji Przyrządów Analitycznych i Pomiarowych.

Te pionierskie prace obydwóch naukowców otworzyły nowe perspektywy w badaniach układów supramolekularnych. Monografia ukazuje możliwości zastosowania spektrometrii mas w badaniach kompleksów gość-gospodarz.

Poznań, 10.02. 2003

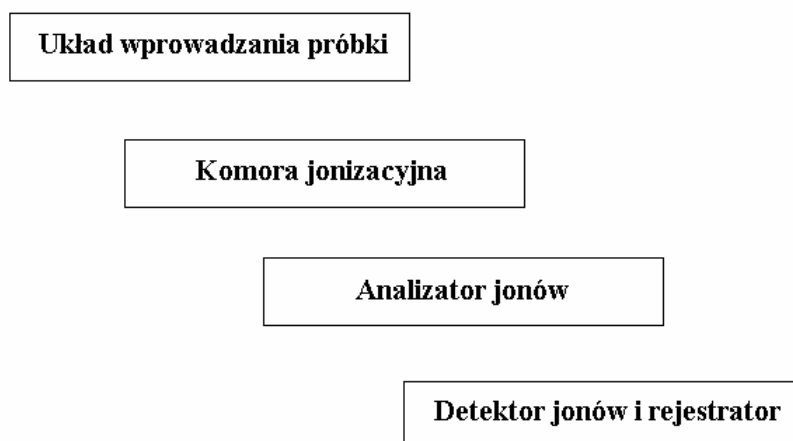
Prof. dr hab. Władysław Boczoń

1. Spektrometria mas

W ostatnich dwóch dekadach lat obserwuje się szybki rozwój technik spektrometrii mas. Dzięki opracowaniu nowych metod jonizacji, zastosowaniu sprawniejszych układów wielofunkcyjnych takich jak spektrometr mas z chromatografem gazowym lub cieczowym oraz rozwiązaniom konstrukcyjnym umożliwiającym badanie związków w szerokim zakresie mas, spektrometria mas jest często jedyną instrumentalną metodą pozwalającą na rozwikłanie wielu problemów badawczych. Możliwości analizowania związków polarnych i termicznie nietrwałych, skomplikowanych mieszanin, w połączeniu z dużą czułością, spowodowały, że spektrometria mas stała się metodą znajdującą zastosowanie w wielu dyscyplinach nauki. W chwili obecnej, poza dziedzinami z zakresu nauk chemicznych, różne techniki spektrometrii mas są szeroko stosowane w biologii i medycynie, a szczególnie w badaniach z zakresu biochemii oraz chemii supramolekularnej. Nowe metody spektrometrii mas wykorzystuje się w badaniach sekwencji kwasów nukleinowych (genomika), struktury i funkcji białek (proteomika) oraz do profilowania zmian w składzie metabolitów wtórnych (metabolomika). Możliwe jest badanie także różnych typów związków kompleksowych, na przykład kompleksów eterów koronowych i ich pochodnych, kompleksów białek, oddziaływań typu gość-gospodarz oraz procesów samoorganizacji. Tak ogromny wzrost znaczenia tej metody instrumentalnej w rozwiązywaniu różnych problemów badawczych jest możliwy dzięki ściślejszej współpracy naukowców z

różnych dziedzin: chemii i biochemii, biologii, medycyny i farmacji oraz oczywiście fizyki i elektroniki.

Każdy spektrometr, niezależnie od rodzaju aparatu czy sposobu jego wykorzystania, składa się z szeregu niezbędnych podzespołów. Konstrukcję spektrometru mas przedstawia schemat blokowy (rysunek 1):



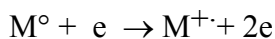
Rysunek 1. Schemat blokowy spektrometru mas

Pierwszym elementem spektrometru jest układ wprowadzania próbki. W zależności od właściwości oraz stopnia czystości badanych substancji, istnieje kilka sposobów ich wprowadzania. Dla ciał stałych i jednorodnych chemicznie stosuje się tzw. wprowadzenie bezpośrednie (ang. *direct inlet*, DI), natomiast do badania próbek niejednorodnych (mieszanin) wykorzystuje się możliwość sprzężenia spektrometru mas z chromatografem gazowym (ang. *gas chromatography/mass spectrometry*, GC/MS) lub cieczowym (ang. *high pressure liquid chromatography/mass spectrometry* lub *high*

performance liquid chromatography/mass spectrometry, HPLC/MS).

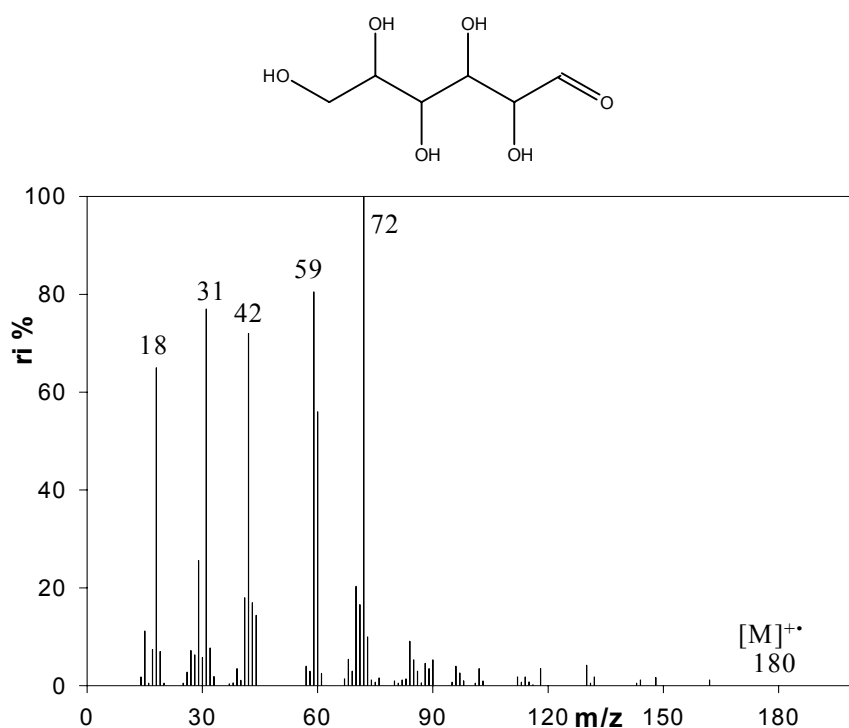
Podczas tego rodzaju analiz widma masowe są rejestrowane w sposób ciągły, a rozdzielone na kolumnie chromatograficznej składniki mogą na ich podstawie być identyfikowane. Połączenie chromatografu gazowego lub cieczowego ze spektrometrem mas jest szczególnie przydatne podczas analiz wykonywanych w badaniach skażeń środowiska, podczas kontroli przebiegu procesów przemysłowych, również w badaniach próbek otrzymanych z materiału biologicznego, zarówno pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego. Sprzężenie chromatografu ze spektrometrem mas połączyło w jedno urządzenie dwa zupełnie niezależne i bardzo wydajne aparaty analityczne. Sposób wprowadzania próbek zależy od konstrukcji źródła jonów (zwanego także komorą jonizacyjną), w którym próbki badanych substancji ulegają procesowi jonizacji.

Najstarszą i nadal powszechnie stosowaną metodą jest jonizacja poprzez bombardowanie strumieniem elektronów (ang. *electron impact* lub *electron ionization*, EI)¹. Strumień elektronów o energii najczęściej 70 eV przechodzi przez pary badanej substancji. W wyniku "bombardowania" elektronami (e) elektrycznie obojętnej cząsteczki substancji badanej (M°) zachodzi reakcja prowadząca do powstania kationu rodnikowego $M^{\cdot+}$ (kationorodnika), która sumarycznie i w dużym uproszczeniu można przedstawić poniższym równaniem:

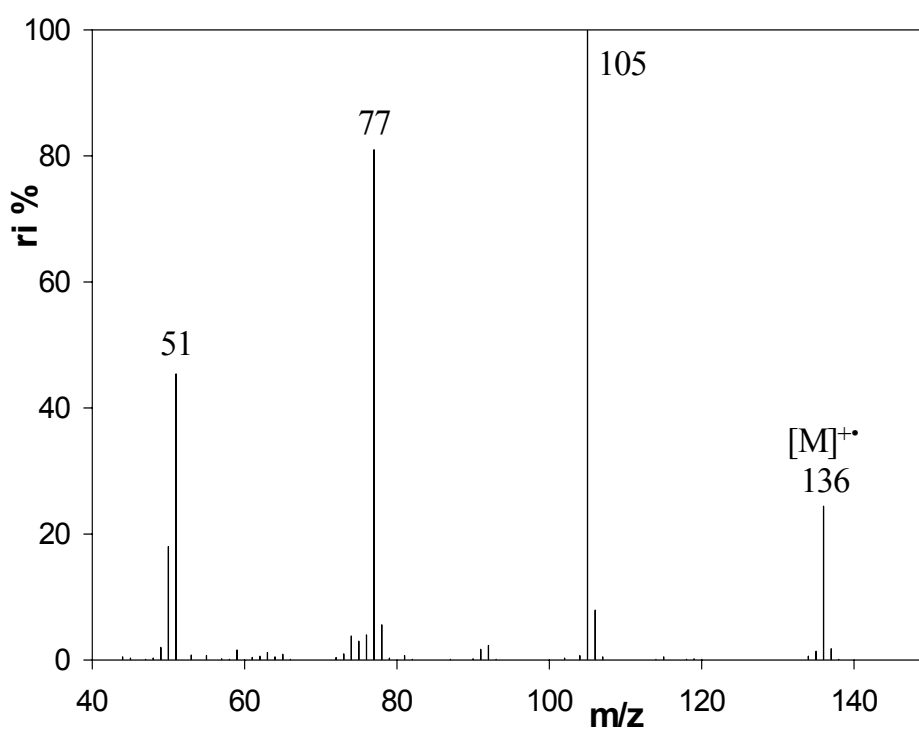
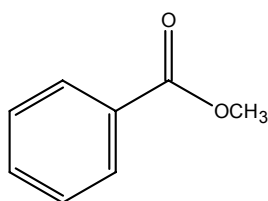


Powstały kation rodnikowy o masie cząsteczkowej praktycznie równej masie badanego związku nosi nazwę *jonu molekularnego*. Ze

względu na przekazywany jonizowanym cząsteczkom duży nadmiar energii wewnętrznej następuje silna fragmentacja powstających w źródle jonów molekularnych. Czasami zdarza się, np. w przypadku analizy cukrów, że jonizacja metodą EI powoduje tak intensywną fragmentację, że identyfikacja jonu molekularnego, a w konsekwencji oznaczenie masy cząsteczkowej, stają się niezmiernie utrudnione. Na rysunkach 2 i 3 przedstawiono przykładowe widma mas glukozy oraz benzoesu metylu zarejestrowane przy użyciu jonizacji EI, w których obserwuje się (lub nie) piki odpowiadające jonom molekularnym.



Rysunek 2. Widmo mas glukozy (m.cz.=180 D) zarejestrowane przy użyciu jonizacji w strumieniu elektronów (EI). Brak sygnału molekularnego

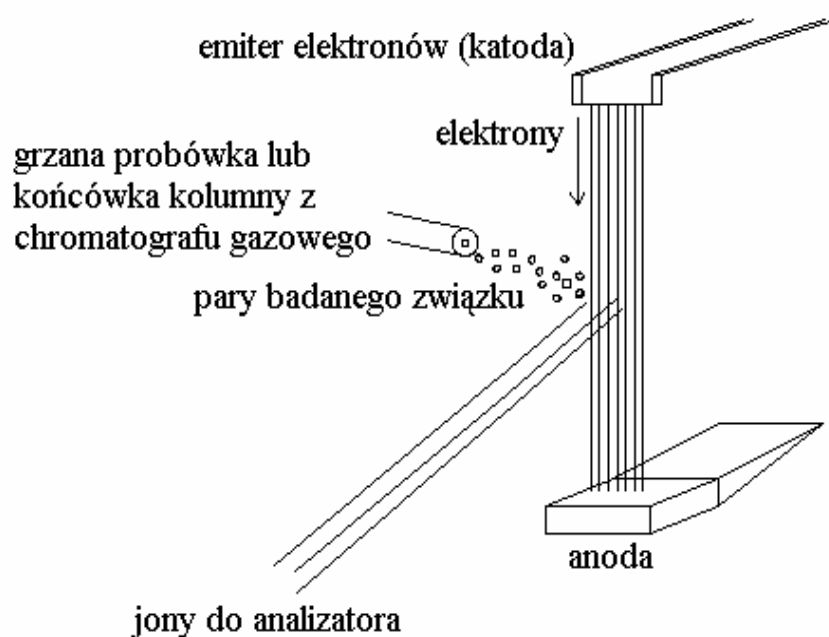


Rysunek 3. Widmo mas benzoesanu metylu (m.c.z. 136) zarejestrowane przy użyciu jonizacji w strumieniu elektronów (EI).

Obserwuje się intensywny sygnał jonu molekularnego

W przypadku źródeł z jonizacją EI badane związki po umieszczeniu w małej szklanej lub metalowej probówce wprowadza się za pomocą sondy, w której następuje ich ogrzewanie w celu przeprowadzenia w stan gazowy. W przypadku jednorodnych próbek

o wysokiej prężności pary, na przykład cieczy niskowrzących lub gazów, stosuje się tzw. *zbiornik podciśnieniowy*, do którego nastrzykuje się lotną próbkę, skąd w formie pary jest ona dozowana - poprzez zawór iglicowy - do komory jonizacyjnej spektrometru mas. Substancje ciekłe mogą być również wprowadzane bezpośrednio za pomocą sondy po umieszczeniu ich w próbówce zamkniętej koreczkiem z otworem o bardzo małej średnicy. Z kolei analiza mieszanin jest możliwa przy zastosowaniu chromatografu gazowego jako układu wprowadzania próbek. W każdym przypadku konieczne jest przeprowadzenie badanych związków w stan pary bez ich termicznego rozkładu. Rysunek 4 przedstawia schemat źródła jonów z jonizacją EI.

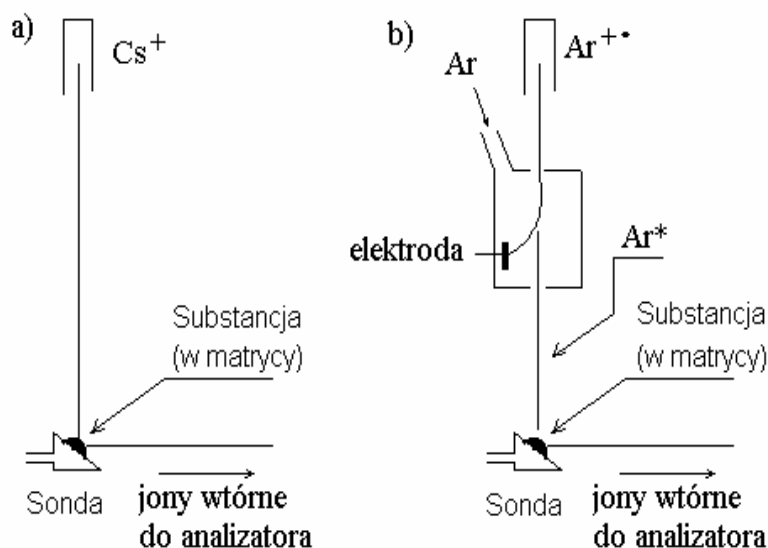


Rysunek 4. Uproszczony schemat źródła jonów z jonizacją EI

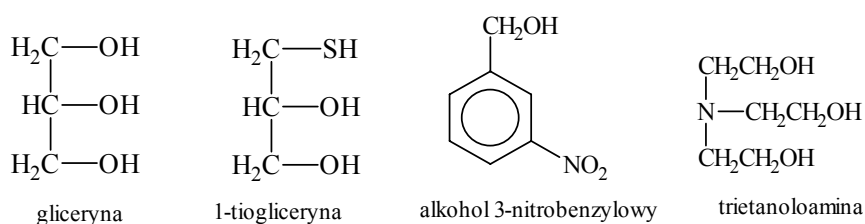
Metoda jonizacji w strumieniu elektronów nie ma praktycznego zastosowania w przypadku układów supramolekularnych, czy związków o dużych masach cząsteczkowych. Do badania tego typu próbek obecnie wykorzystuje się bombardowanie szybkimi jonami lub atomami (ang. *liquid secondary ion mass spectrometry*, LSIMS lub *fast atom bombardment*, FAB)^{2,3,4} oraz, w szczególności, jonizację poprzez elektrorozpraszanie (ang. *electrospray ionization*, ESI)^{5,6,7}

Bombardowanie szybkimi jonami nazywa się często spektrometrią mas jonów wtórnych w matrycy ciekłej. Idea tej metody jonizacji polega na wytworzeniu pierwotnej wiązki jonów (najczęściej Cs^+) i skierowaniu jej na badaną substancję rozpuszczoną w ciekłej matrycy i naniesioną na sondę zakończoną stalową powierzchnią ściętą pod kątem około $45 - 60^\circ$. Pod wpływem bombardowania wiązką pierwotną następuje desorpcja jonów, które ogniskowane są we wtórną wiązkę jonów kierowaną do analizatora spektrometru mas (rysunek 5). Bombardowanie atomami szybkimi – FAB polega na wprowadzeniu w miejsce jonów Cs^+ obojętnych pod względem elektrycznym, lecz energetycznie wzbudzonych atomów gazu szlachetnego najczęściej argonu lub ksenonu. Wzbudzenie gazu obojętnego odbywa się przez kolizje cząsteczek obojętnych z jonami tego gazu. Wiązka wzbudzonych atomów Ar^* lub Xe^* trafia na sondę z naniesioną na nią badaną substancją w matrycy. Pozostałe jony są wychwytywane przez elektrodę (rysunek 5). Metody FAB i LSIMS pozwalają (w odróżnieniu od EI) badać związki polarne i termicznie nietrwale, jednak warunkiem zarejestrowania widma mas jest ich

dostateczna rozpuszczalność w matrycy. Matryce można świadomie dobierać pod względem charakteru badanych substancji np. rozpuszczalności, polarności lub innych cech fizykochemicznych. Gdy pojawia się problem rozpuszczalności badanej substancji w matrycy, stosuje się współrozpuszczalnik dobrze rozpuszczający próbkę i jednocześnie rozpuszczalny w matrycy np. chlorek metylenu, acetonitryl, DMSO. Najczęściej stosowane matryce przedstawione zostały na rysunku 6.



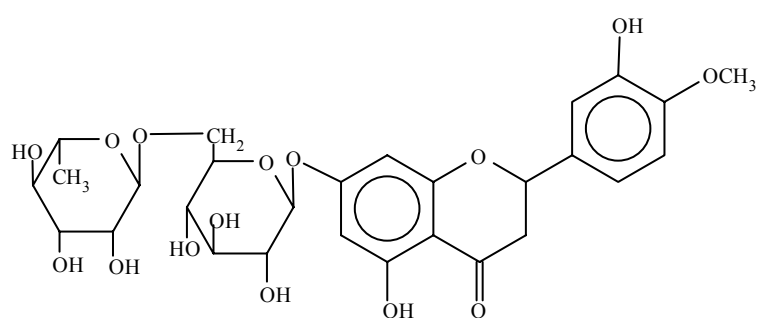
Rysunek 5. Uproszczony schemat źródła jonów z jonizacją LSIMS (rysunek lewy) oraz FAB (rysunek prawy)



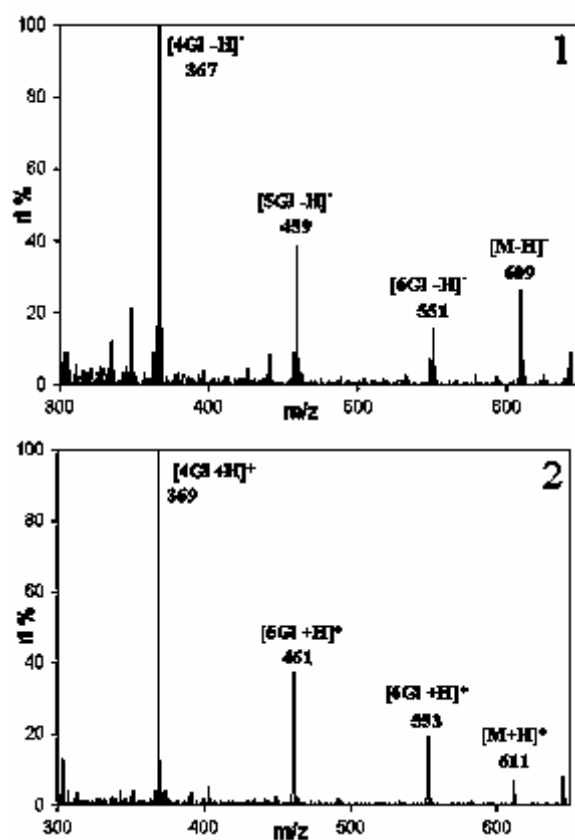
Rysunek 6. Najczęściej stosowane matryce w metodach jonizacji FAB oraz LSIMS

Rola matrycy jest potrójna: ułatwia ona desorpcję jonów substancji badanej, zapewnia równomierne jej stężenie w obrębie oddziaływania wiązki pierwotnej jonów Cs^+ lub Ar^* , jest pośrednikiem w przekazywaniu energii niesionej przez wiązkę Cs^+ lub Ar^* , gdyż ulega ona jonizacji w pierwszej kolejności. Ponieważ widma mas rejestrowane przy zastosowaniu metod FAB i LSIMS są bardzo do siebie podobne, akronim FAB jest często używany w stosunku do obu tych metod jonizacji.

Na rysunku 7 przedstawiono strukturę oraz widma LSIMS 7-O-(6''-O-ramnozylo)glukozydu hesperetyny (hesperydyna) zarejestrowane w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Jak wskazuje przykład hesperedyny - w widmach rejestrowanych metodą FAB lub LSIMS obserwuje się jony odpowiadające protonowanym cząsteczkom badanego związku (jony dodatnie $[\text{M}+\text{H}]^+$) lub cząsteczki pozbawione protonu (jony ujemne $[\text{M}-\text{H}]^-$). Jony te dawniej nazywano pozornymi jonami molekularnymi (*quasimolecular ion*).



7-O-(6''-O-ramnozylo)glukozyd hesperetyny



Rysunek 7. Struktura oraz widma LSIMS jonów (1) ujemnych i (2) dodatnich 7-O-(6''-O-ramnozylo)glukozydu hesperetyny wykonane w glicerynie (Gl) jako matrycy

Występują również jony pochodzące od matrycy, są to klaster typu $[nGI+H]^+$ oraz $[nGI-H]^-$. Wyjątkiem jest alkohol 3-nitrobenzylowy (NBA), który w trybie jonów ujemnych tworzy jony będące anionorodnikami typu $[nNBA]^-$. Badane związki, jak również wszystkie matryce często przylaczają jony nieorganiczne, najczęściej kationy sodu, co prowadzi do powstawania jonów $[M+Na]^+$. W trybie jonów ujemnych możliwe jest powstawanie np. jonów typu $[M+Cl]^-$. Tworzenie klasterów nie jest charakterystyczne tylko dla matryc. Również badane związki mogą tworzyć jony typu $[nM+H]^+$, jak również klaster z matrycą np. $[M+NBA+H]^+$.

Fakt, że w tych metodach jonizacji możliwe jest obserwowanie indywiduów chemicznych mających w swojej budowie słabe oddziaływania niekowalencyjne sprawia, że techniki te nadają się do badań z zakresu chemii supramolekularnej.

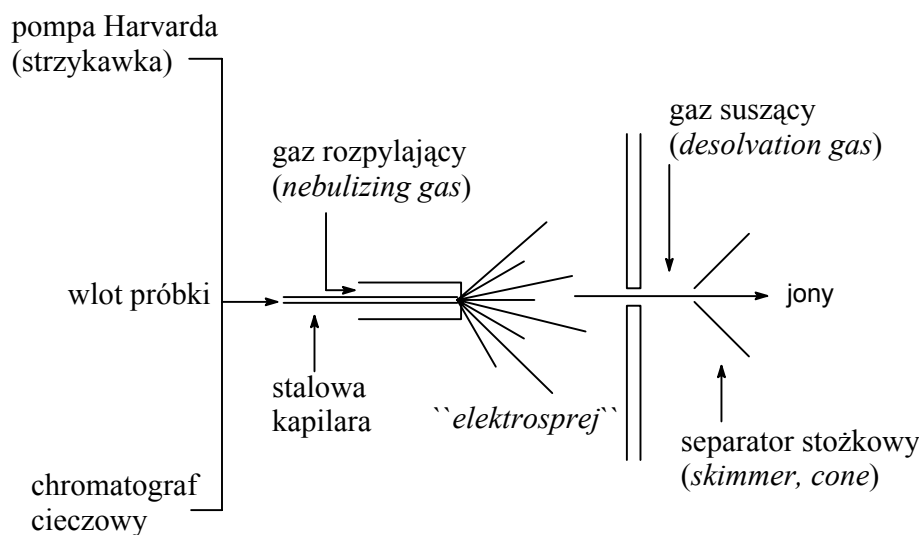
W widmach mas rejestrowanych przy użyciu technik FAB oraz LSIMS rzadko obserwuje się jony wielokrotnie naładowane, przez co utrudnione jest obserwowanie kompleksów z kationami dwu- i trójwartościowymi, kompleksów z więcej niż jednym kationem metalu oraz jonów cząsteczek wielokrotnie protonowanych $[M+nH]^{n+}$ mających ogromne znaczenie w analizie białek.

Wymienionych ograniczeń nie ma metoda jonizacji polegająca na rozpyleniu roztworu z badaną próbką w silnym polu elektrycznym pod ciśnieniem atmosferycznym (ESI, rysunek 8). Roztwór badanej substancji jest wprowadzany do źródła jonów ESI przez stalową kapilarę, do której jest przyłożone napięcie rzędu kilku kV. Pod

wpływem przyłożonego napięcia oraz gazu rozpylającego (prawie zawsze azotu) następuje rozpylenie badanego roztworu. Prowadzi to do wytworzenia małych kropeł obdarzonych na powierzchni ładunkiem elektrycznym. Wytworzone krople ulegają kurczeniu pod wpływem gazu suszącego (następuje odparowywanie rozpuszczalnika) oraz odpychaniu pomiędzy równoimiennymi ładunkami na ich powierzchni. Proces ten w konsekwencji prowadzi do powstania jonów, które są dalej analizowane w spektrometrze mas. Jako rozpuszczalników najczęściej używa się metanolu, acetonitrylu, wody lub ich mieszaniny w odpowiednich proporcjach. Często też dodaje się małych ilości innych substancji, w szczególności kwasu octowego, trifluorooctowego lub mrówkowego. Zakwaszenie roztworu ułatwia protonowanie badanych związków, co wpływa na polepszenie czułości wykonywanych analiz.

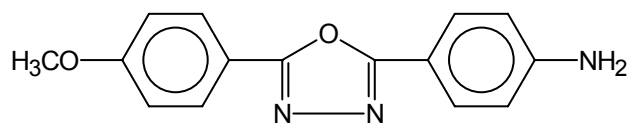
Istnieją dwa sposoby wprowadzania badanego roztworu do źródła jonów typu ESI. W przypadku próbek jednorodnych roztwór badanej substancji o stężeniu ok 10^{-5} M wprowadza się bezpośrednio ze strzykawki. Używając do tego celu pompy Harvarda można precyzyjnie regulować szybkość przepływu badanego roztworu, najczęściej wynosi ona 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. W przypadku analiz mieszanin badany roztwór wprowadzany jest przez chromatograf cieczowy. Na kolumnie chromatograficznej następuje rozdział analizowanej mieszaniny na poszczególne składniki, dla których, w kolejności elucji, rejestrowane są widma mas. Ten sposób analizy ma szczególne znaczenie w przypadku próbek pochodzenia naturalnego. Dodatkowym parametrem pozwalającym na identyfikację

poszczególnych składników jest *czas retencji* (porównanie ze wzorcem). W przypadku analiz HPLC/MS zazwyczaj stosuje się przepływy rzędu 0,5 ml/min.

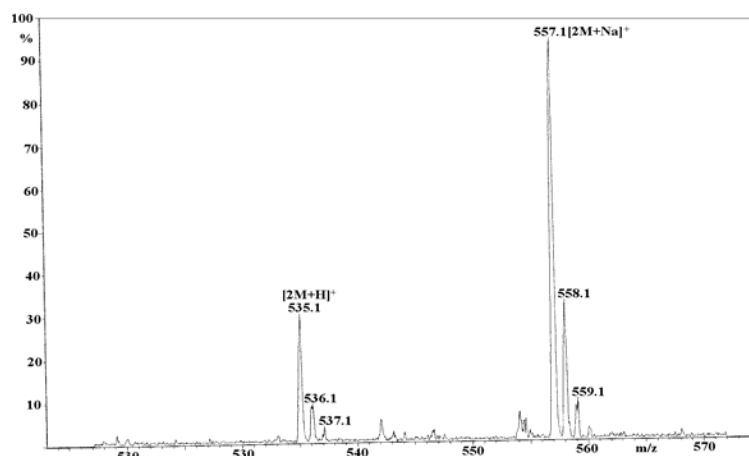


Rysunek 8. Uproszczony schemat źródła jonów ESI

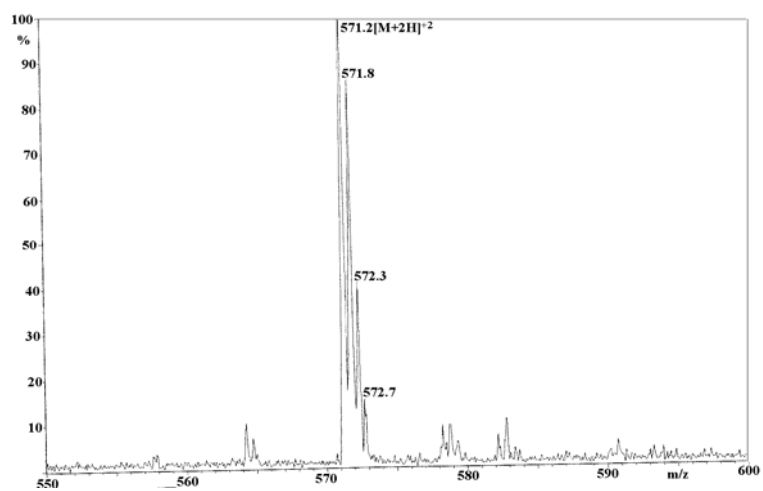
W metodzie ESI, podobnie jak w przypadku FAB, obserwuje się jony typu $[M+H]^+$, $[M+N]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, jak również różnego typu klaster, kompleksy oraz jony wielokrotnie naładowane. Jony powstałe przy użyciu techniki ESI mają bardzo mały nadmiar energii wewnętrznej, dlatego uważa się, że jest to najłagodniejsza metoda jonizacji spośród obecnie znanych. Dlatego technika ta nadaje się do badania indywidualnych związków chemicznych mających w swojej budowie oddziaływania niekowalencyjne.



2,5-dipodstawiony 1,3,4-oksadiazol



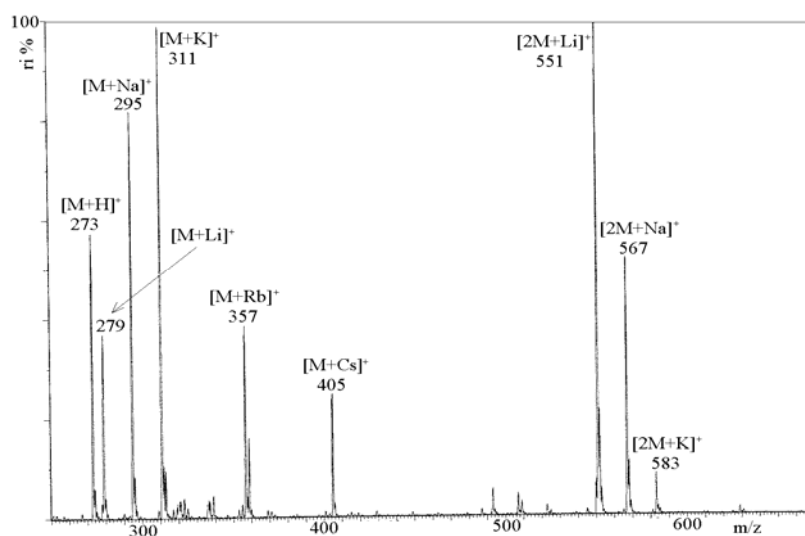
Rysunek 9. Widmo ESI 2,5-dipodstawionego 1,3,4-oksadiazolu



Rysunek 10. Widmo ESI gramicydyny

Jedną z charakterystycznych cech widm mas rejestrowanych w metodzie ESI, zwłaszcza w przypadku białek, są jony wielokrotnie naładowane. W przypadku jonów obdarzonych pojedynczym ładunkiem, pasma izotopowe są oddalone od siebie o jednostkę, dla jonów dwukrotnie naładowanych o pół jednostki, dla trójkrotnie o jedną trzecią jednostki itd. Na rysunkach 9 i 10 przedstawiono widma ESI zarejestrowane w trybie jonów dodatnich 2,5-dipodstawionego oksadiazolu oraz gramicydyny (peptyd o właściwościach antybiotyku). W przypadku gramicydyny obserwujemy jon podwójnie protonowany $[M+2H]^{+2}$, natomiast dla oksadiazolu w przedstawionym zakresie m/z (stosunek masy do ładunku ang. *mass to charge ratio*) występują jony $[2M+H]^+$ oraz $[2M+Na]^+$. Różnica między nimi wynosi 22 jednostki, co prawie zawsze odpowiada – odpowiednio - jonowi protonowanemu i sodowanemu.

Technika ESI doskonale nadaje się do badania układów supramolekularnych. Na rysunku 11 przedstawiono widmo mas oksaalkilofosforanu zarejestrowane po dodaniu mieszaniny litowców do badanego roztworu. Z widma tego można wnioskować o selektywności kompleksowania jonów metali, jak również o trwałości kompleksów typu 1:1 oraz 2:1.



Rysunek 11. Widmo ESI oksaalkilofosforanu $\text{OP}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ zarejestrowane w obecności jonów litowców

W każdym roztworze występują oddziaływania zachodzące pomiędzy substancją rozpuszczoną a rozpuszczalnikiem. Istotny wpływ na wielkość sygnału w widmie ESI posiada energia jaka jest potrzebna, aby obecny w roztworze jon pozbawić "otoczki" rozpuszczalnika (ang. *solvation energy*). Im wyższa jest energia solwatacji tym mniejszy będzie sygnał w widmie ESI. W przypadku rozpuszczalników polarnych (np. wody) energia solwatacji rośnie wraz ze wzrostem gęstości ładunku (oddziaływanie jon-dipol). Energie hydratacji (solwatacja cząsteczkami wody) litowców oraz ich względne sygnały w widmie ESI zarejestrowanym dla roztworu wodnego zawierającego równomolowe ilości kationów przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1.

Energie hydratacji jonów litowców oraz ich względne sygnały w widmie ESI

	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺	Rb ⁺	Cs ⁺
Energia solwatacji (kJ/mol, T=298K)	519	406	322	293	264
Względna intensywność sygnału w widmie ESI (%)	2	7	23	60	100

W chemii supramolekularnej największe zastosowanie mają techniki ESI oraz FAB. Znanych jest jednak wiele innych metod jonizacji. Nadal często wykorzystywana jest jonizacja chemiczna (ang. *chemical ionization*, CI)⁸ oraz bezpośrednia jonizacja chemiczna (zwana także jonizacją chemiczną przez desorpcję, ang. *desorption chemical ionization* lub *direct chemical ionization*, DCI). Dla związków polarnych i/lub o dużych masach cząsteczkowych stosuje się obecnie bardzo popularną jonizację przez desorpcję laserową z matrycy (ang. *matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI)⁹. Podobnie jak ESI, jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI)^{10,11} ma szczególne znaczenie w przypadku sprzęgania chromatografu cieczowego ze spektrometrem masowym. Kolejną metodą jonizacji substancji o wysokich masach cząsteczkowych może być desorpcja polem (ang. *field desorption*, FD)¹². Obecnie tej techniki jonizacji praktycznie się nie stosuje ze względu na trudne i

czasochłonne przygotowanie próbki do analizy. Wszystkie wymienione metody jonizacji są stosowane przy bezpośrednim wprowadzeniu próbek do komory jonizacyjnej. Jonizacja w strumieniu elektronów oraz jonizacja chemiczna są również stosowane podczas wprowadzania próbek przez chromatograf gazowy. W przypadku wykorzystywania sprzężenia chromatografu cieczowego ze spektrometrem masowym najczęściej stosuje się wymienione wyżej metody jonizacji (ESI i APCI) oraz termorozpraszanie (ang. *thermospray*, TSP)¹³. W przypadku układów HPLC/MS stosowane jest również połączenie wykorzystujące do wzbudzenia cząsteczek bombardowanie szybkimi atomami z ciągłym przepływem matrycy (ang. *continuous flow-fast atom bombardment*, CF-FAB).¹⁴

Z komory jonizacyjnej wiązka jonów kierowana jest do analizatora, gdzie następuje ich rozdział w zależności od stosunku masy do ładunku (m/z). Obecnie stosowane są bardzo różne typy analizatorów: analizatory magneto-elektrostatyczne (B/E lub E/B), analizatory jonowego rezonansu cyklotronowego (ang. *ion cyclotron resonance*, ICR), analizatory mierzące czas przelotu (ang. *time-of-flight*, TOF), analizatory kwadrupolowe (ang. *quadrupole*, Q) i różnego typu pułapki jonowe (ang. *ion trap*). Obserwuje się szybki rozwój tandemowej spektrometrii masowej, gdzie spektrometry są łączone szeregowo. Istnieje również możliwość łączenia różnych rodzajów analizatorów (instrumenty hybrydowe). Podstawowe trzy parametry charakteryzujące analizator to: zakres mas, przepuszczalność i zdolność rozdzielcza. Większość spektrometrów

masowych wyposażonych w nowoczesne analizatory umożliwia badanie rozpadów metastabilnych,¹⁵ lub badanie rozpadów jonów aktywowanych przez kolizję (ang. *colission activated dissociation*, CAD lub *colissionally induced dissociation*, CID). W obu przypadkach analizie poddawane są jony powstające podczas rozpadów zachodzących pomiędzy komorą jonizacyjną a detektorem.

Ostatnim, niezbędnym elementem spektrometru, jest detektor jonów i rejestrator widma masowego. W pierwszych spektrometrach do detekcji jonów stosowano płytę fotograficzną, którą szybko zastąpiono powielaczem elektronowym lub fotopowielaczem. Obecnie, sygnały z detektora są rejestrowane przez system komputerowy.

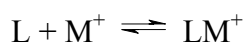
Wewnątrz każdego spektrometru mas panuje bardzo wysoka próżnia. W zależności od typu aparatu są to ciśnienia rzędu 10^{-5} - 10^{-8} milibara ($1 \text{ bar} \cong 1 \text{ atm}$). Do osiągnięcia tak niskiego ciśnienia konieczny jest układ pomp rotacyjnych i turbomolekularnych.

Istnieje szereg opracowań książkowych, zarówno w języku angielskim, jak i polskich, poświęconych spektrometrii mas jako metodzie analitycznej, obejmujących zarówno zagadnienia instrumentalne, procesy fragmentacji, zasady interpretacji widm, jak i omówienie konkretnych przykładów zastosowań^{16,17,18,19}.

Jedną z podstawowych informacji, jakich poszukuje się w badaniach supermolekuł, jest wyznaczenie ich *stałych trwałości* (K). Spektrometria mas oferuje metody pozwalające wyznaczać ten ważny parametr.

2. Wyznaczanie stałych trwałości kompleksów za pomocą widm ESI

Jeżeli w roztworze znajduje się kation metalu M^+ oraz związek L (ligand) zdolny do utworzenia kompleksu z tym kationem LM^+ , wówczas ustala się równowaga opisana równaniem:



Stała trwałości kompleksu K (ang. *binding constant*) opisana jest matematycznie równaniem:

$$K = \frac{f_{LM^+} [LM^+]}{f_L [L] f_{M^+} [M^+]}$$

Gdzie $[LM^+]$, $[L]$ i $[M^+]$ są stężeniami molowymi – odpowiednio - kompleksu, ligandu i kationu metalu, a f_{LM^+} , f_L , f_{M^+} są odpowiednimi współczynnikami aktywności. W przypadku roztworów rozcieńczonych równanie to się upraszcza, ponieważ wartości f są równe 1. Wartość stałej trwałości, czyli ustalona w roztworze równowaga, zależy od rodzaju użytego rozpuszczalnika, przede wszystkim jego polarności. Metoda ESI dużo lepiej nadaje się do wyznaczania stałych trwałości kompleksów niż FAB, ponieważ matryce stosowane w technice FAB rzadko kiedy są stosowane jako rozpuszczalniki. Natomiast ciecze typu metanol, woda, acetonitryl, czyli takie, które standardowo są stosowane w technice ESI, są bardzo często stosowane jako rozpuszczalniki w chemii roztworów, w tym roztworów kompleksów. Stałą trwałości kompleksu można wyznaczyć dwiema metodami: metodą Liu oraz metodą Brodbelta z wykorzystaniem techniki ESI-MS.

W metodzie Liu²⁰ wykorzystuje się równanie

$$\frac{K_1}{K_2} = S \frac{I_1}{I_2}$$

gdzie K_1 i K_2 są stałymi trwałości kompleksu 1 i 2, I_1 i I_2 są wysokościami (intensywnościami) pików odpowiadających odpowiednio kompleksowi 1 i 2, które odczytujemy z widma mas zarejestrowanego dla mieszaniny kompleksów 1 i 2. Parametr S należy wyznaczyć eksperymentalnie i jest to względny współczynnik przeniesienia kompleksów pomiędzy fazami (ciekłą i gazową) zwany także stosunkiem wydajności jonizacji (ang. *cationization efficiency ratio*). Kompleksem 1 jest układ $[L+Li^+]$, a kompleks 2 jest układem $[L+Na^+]$. W celu wyznaczenia wartości S rejestrujemy widma mas roztworów, w których stosunek stężeń kationów metalu zmienia się od 1:1 do 5:1, a stężenie L pozostaje stałe. Następnie wykreślamy wykres, w którym na osi x odnotowany jest stosunek stężeń kationów metalu, a na osi y stosunek intensywności pików odpowiadających kompleksom 1 i 2. Prowadzi to do otrzymania prostej opisanej równaniem typu $y = ax + b$. Współczynnik nachylenia prostej a jest parametrem S . Jeśli znana jest stała trwałości jednego z kompleksów np. 1, wyznaczymy wartość S i z widma mas odczytamy stosunek I_1/I_2 to wówczas z równania można obliczyć stałą trwałość kompleksu 2.

W metodzie Brodbelt'a²¹ wykreśla się krzywą kalibracyjną zależności intensywności sygnału kompleksu (wzorca) w widmie od jego stężenia w roztworze. Stężenie wzorca wyznaczamy znając jego stałą trwałości oraz początkowe stężenia kationu metalu i ligandu.

Założmy, że zrobiliśmy to dla kompleksu ligandu L_1 z kationem sodu $[L_1+Na^+]$. Jeśli do roztworu kompleksu $[L_1+Na^+]$ zostanie dodany ligand L_2 , który z kationem sodu tworzy kompleks o podobnej trwałości, to wówczas utworzy się kompleks $[L_2+Na^+]$ i zmniejszy się stężenie kompleksu $[L_1+Na^+]$, którego wartość po zarejestrowaniu widma mas dla tej mieszaniny kompleksów odczytamy z wykreślonej krzywej kalibracyjnej. Stałe trwałości kompleksu wzorca oraz kompleksu badanego określają równania:

$$K_{wz} = \frac{[L_1 + Na^+]}{[L_1][Na^+]} \quad K_{bad} = \frac{[L_2 + Na^+]}{[L_2][Na^+]}$$

Natomiast wartości stężeń $[L_1]$, $[L_2]$ oraz $[Na^+]$ dane są następującymi równaniami:

$$[L_1] = [L_1]_{total} - [L_1 + Na^+]$$

$$[L_2] = [L_2]_{total} - [L_2 + Na^+]$$

$$[Na^+] = [Na^+]_{total} - [L_1 + Na^+] - [L_2 + Na^+]$$

Gdzie $[L_1]_{total}$, $[L_2]_{total}$ i $[Na^+]_{total}$ są całkowitymi, znanymi, stężeniami ligandów i kationów sodu. Rozwiązując równania na stężenie badanego kompleksu otrzymuje się równanie:

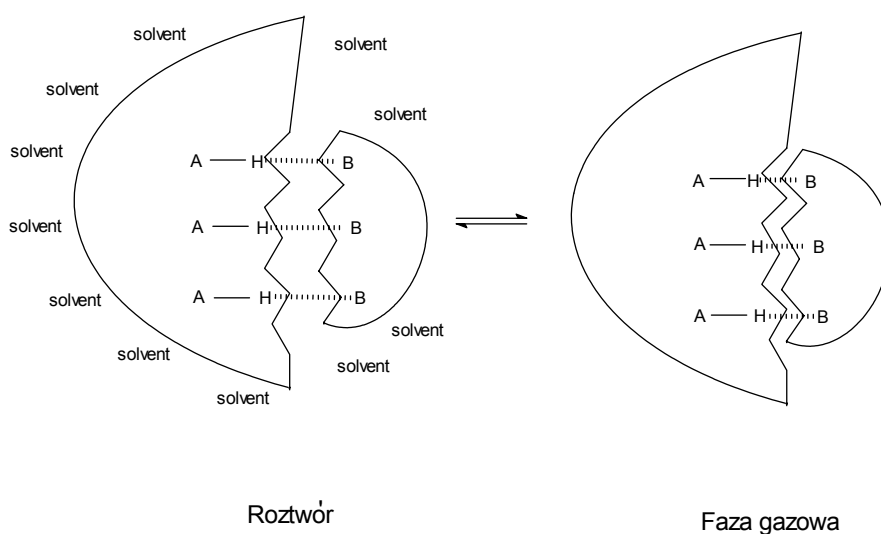
$$[L_2 + Na^+] = [Na^+]_{total} - [L_1 + Na^+] - \frac{[L_1 + Na^+]}{K_1([L_1]_{total} - [L_1 + Na^+])}$$

Wyliczając z równania wartość stężenia badanego kompleksu $[L_2+Na^+]$ oraz z wartości stężenia $[L_2]$ oraz $[Na^+]$ oblicza się stałą trwałości badanego kompleksu. W tej metodzie odczytuje się z widma wyłącznie intensywność sygnału wzorca. Pozwala ona wyznaczyć

stałą trwałości kompleksu niejonowego lub takiego, którego wartość m/z leży poza zakresem możliwości naszego spektrometru mas.

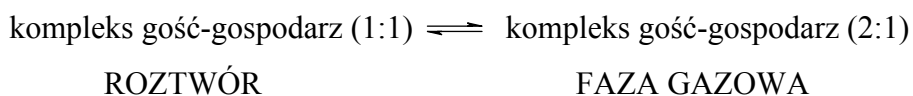
3. Spektrometria mas układów supramolekularnych - faza ciekła czy gazowa?

Technikę ESI/MS (ang. *electrospray ionisation/mass spectrometry*) uważa się za najłagodniejszą metodę uzyskania z fazy ciekłej jonów w fazie gazowej, które mogą być analizowane w spektrometrze mas - w warunkach wysokiej próżni. Jednakże, każdy eksperymentator dokonując analizy wyników musi być świadomy faktu, że podczas przeniesienia indywiduów chemicznych z roztworu do fazy gazowej następuje drastyczna zmiana środowiska. Efekty związane z obecnością rozpuszczalnika oraz w przypadku układów jonowych z obecnością przeciwjonu zanikają w momencie zmiany faz. Podczas procesu odparowania rozpuszczalnika mogą zachodzić zmiany we właściwościach układów supramolekularnych, zmienia się energia oddziaływań, stechiometria, struktury kompleksów gość-gospodarz. Oddziaływania w supermolekułach, które są osłabiane przez rozpuszczalnik stają się mocniejsze w fazie gazowej (rysunek 12). Efekt ten szczególnie silnie obserwowany jest kiedy dokonuje się pomiarów ESI/MS supercząsteczek z wiązaniem wodorowym w rozpuszczalnikach protonowych. W roztworze rozpuszczalnik protonowy tworzy silne międzycząsteczkowe wiązania wodorowe z kompleksem gość-gospodarz, podczas gdy usunięcie rozpuszczalnika w momencie przejścia do fazy gazowej drastycznie zwiększa moc wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego w supermolekule.



Rysunek 12. Zmiana w strukturze supermolekuły spowodowana przeniesieniem z roztworu do fazy gazowej

Podobne zjawisko obserwuje się w przypadku oddziaływań elektrostatycznych w kompleksach gość-gospodarz, oddziaływania te są osłabiane w fazie ciekłej przez dipole cząsteczek polarnego rozpuszczalnika. W momencie przejścia do fazy gazowej drastycznie wzrasta rola tych oddziaływań i w wielu przypadkach stają się one odpowiedzialne za stechiometrię oraz strukturę kompleksów. Dlatego też, w widmach mas często obserwuje się kompleksy o stechiometrii 2:1 lub wyższej, których występowania nie stwierdza się w roztworze.



Odmienna sytuacja panuje w przypadku oddziaływań hydrofobowych w kompleksach gość-gospodarz. Oddziaływania te są zazwyczaj mocniejsze w roztworze, niż w fazie gazowej. W rozpuszczalnikach polarnych takich, jak woda, niepolarne cząsteczki supermolekuł są ściskane przez cząsteczki rozpuszczalnika, co prowadzi do zmniejszenia całkowitej powierzchni hydrofobowej wewnątrz polarnego rozpuszczalnika. Przy przejściu do fazy gazowej nie ma efektu polarnego rozpuszczalnika przez co oddziaływań hydrofobowych zazwyczaj się nie obserwuje. Z kolei, niektóre układy supramolekularne obdarzone ładunkiem elektrycznym są trwałe w roztworze i nietrwałe w fazie gazowej ze względu na stabilizację ładunku przez rozpuszczalnik.

Warunki w fazie gazowej są podobne do roztworu, tylko w tych przypadkach, w którym są niewielkie oddziaływania pomiędzy substancją rozpuszczoną – supermolekułą, a rozpuszczalnikiem.

Istotną rolę w zmianie budowy układów supramolekularnych przy przejściu z fazy ciekłej do fazy gazowej odgrywa efekt entropowy. Załóżmy, że układ supramolekularny typu gość-gospodarz rozpuszczamy w roztworze, rozpad/dysocjacja takiego układu prowadzi do powstania wolnej luki/wnęki wewnątrz cząsteczki gospodarza. W procesie asocjacji luka/wnęka gospodarza może być wypełniona konkurencyjną cząsteczką rozpuszczalnika. Proces taki kontrolowany jest przez entropię, co prowadzi do stabilizacji układu typu gość-gospodarz w rozpuszczalnikach. Jeśli jednak taki kompleks znajdzie się w wysokiej próżni to ze względu na entropię jego dysocjacja jest bardzo korzystna.

W momencie rozpuszczenia kompleksów gość-gospodarz w rozpuszczalniku ustala się równowaga dysocjacyjno-asocjacyjna:



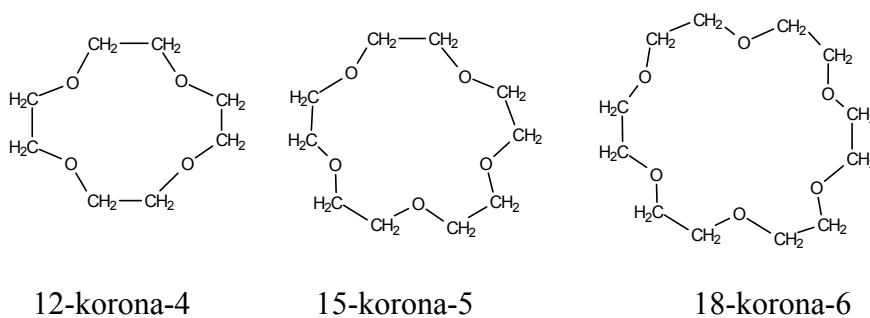
Stałą równowagi tego procesu w fazie ciekłej, można badać klasycznymi metodami, a jej wielkość determinują efekty termodynamiczne. Natomiast równowagę w fazie gazowej można próbować badać mając do dyspozycji spektrometr mas wyposażony w kwadropolową pułapkę jonową (ang. *quadrupole ion trap*, QIT)²² lub analizator cyklotronowego rezonansu jądrowego z transformacją Fouriera (ang. *Fourier transform ion cyclotron resonance*, FTICR)²³. Obydwa typy analizatorów umożliwiają przebywanie w nich jonów przez kilkanaście sekund, co zazwyczaj teoretycznie wystarcza do wytworzenia się równowagi termodynamicznej. Jednak ze względu na fakt, że w spektrometrze mas panuje bardzo wysoka próżnia (10^{-5} - 10^{-8} milibara), jony praktycznie nie oddziałują ze sobą, przez co obserwowanie efektów równowagowych jest szczególnie utrudnione, a uzyskane wyniki nie zawsze są wiarygodne.

W tego typu analizatorach istnieje możliwość badania składu mieszaniny jonów w określonych odstępach czasu, co pozwala na prowadzenie precyzyjnych badań kinetycznych. W analizatorach tego typu panują doskonałe warunki do badania efektów kinetycznych, ponieważ w wysokiej próżni konkretny proces nie jest zakłócany przez środowisko (np. dysocjacja kompleksu typu gość-gospodarz).

Pomimo, że warunki panujące w spektrometrze mas są zupełnie inne niż te w roztworze badanie układów supramolekularnych metodą spektrometrii mas przynosi ogromne korzyści. Można w ten sposób badać właściwości danego układu supramolekularnego nie zakłócone przez jego oddziaływanie z czynnikami zewnętrznymi. Z kolei porównanie wyznaczonych wartości parametrów kinetycznych i termodynamicznych, np. energii wiązania, w fazie gazowej i w roztworze, pozwala określić jaka jest rola rozpuszczalnika. Ponadto, wyniki uzyskane dla układów supramolekularnych w fazie gazowej doskonale nadają się do porównania z wynikami obliczeń teoretycznych, dlatego, że w obu przypadkach nie występują efekty związane ze środowiskiem.

4. Kompleksy eterów koronowych z kationami metali.

Układy supramolekularne eter koronowy – kation metalu uważane są za "klasykę" kompleksów typu gość-gospodarz (ang. *host-guest*) zwanych także kompleksami inkluzyjnymi (ang. *inclusion complexes*). W zależności od wielkości pierścienia eteru koronowego (rysunek 13) preferowane jest tworzenie kompleksów z kationami metali o promieniu odpowiadającym wielkości pierścienia. Można powiedzieć, że występuje tu zjawisko polegające na wzajemnym rozpoznawaniu jednej cząsteczki (lub jonu) przez drugą czyli tzw. rozpoznanie molekularne (ang. *molecular recognition*).



Rysunek 13. Przykładowe struktury eterów koronowych

Promień kationu Li^+ odpowiada wnęce eteru 12-korona-4 (ang. 12-crown-4, 12C4), kationu Na^+ wnęce eteru 15-korona-5, natomiast kationu K^+ wnęce eteru 18-korona-6. Odpowiednie wartości przedstawia Tabela 2.

Tabela 2.

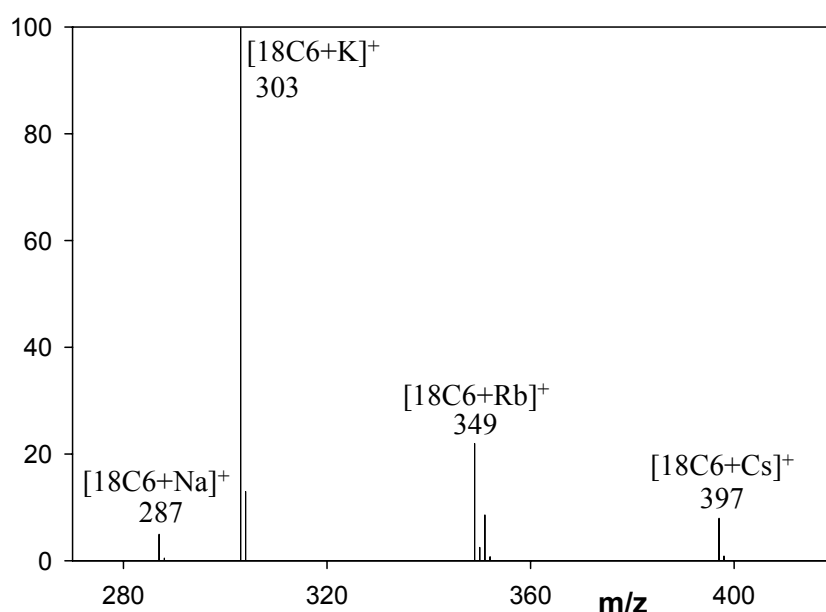
Promienie jonowe kationów oraz wyznaczone wartości promienia wnęki eteru koronowego.

kation metalu	promień kationu (Å)	cząsteczka eteru	promień wnęki (Å)
Li^+	0,7	12-korona-4	0,60-0,75
Na^+	1,0	15-korona-5	0,86-0,92
K^+	1,4	18-korona-6	1,34-1,43

Ze względu na możliwość występowania różnych konformacji nie można jednoznacznie określić wielkości promienia wnęki eterów koronowych, a jedynie ich wartości minimalne i maksymalne (tabela 2).

Tworzenie kompleksów eterów koronowych z kationami metali zachodzi bardzo szybko, dlatego roztwór eteru koronowego z odpowiednimi solami, np. chlorkami litowców (metali alkalicznymi) można wprowadzać do spektrometru mas zaraz po jego sporządzeniu.

W widmie mas ESI zarejestrowanym dla 18-korona-6 w obecności chlorków sodu, potasu, rubidu oraz cezu (ilości równomolowe) obserwowano sygnały odpowiednich kompleksów, przy czym najwyższy pik odpowiadał jonowi $[\text{18-korona-6}+\text{K}]^+$ (rysunek 14).²⁴



Rysunek 14. Widmo MS mieszaniny eteru 18-korona-6 (18C6) z jonami litowców

Zaobserwowano dobrą zgodność pomiędzy intensywnością względną poszczególnych sygnałów, a wartościami odpowiednich stałych trwałości (Tabela 3).

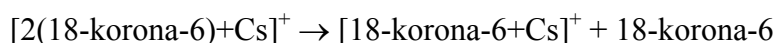
W przypadku, gdy wielkość promienia kationu metalu jest większa niż wielkość promienia wnęki, jak w przypadku 18-korona-6 i jonów Rb^+ lub Cs^+ , możliwe jest powstawanie kompleksów o stechiometrii 2:1 typu "kanapkowego" (ang. *sandwich type complexes*). Przy czym, im większy jest promień kationu metalu, tym wyższy jest sygnał odpowiadający kompleksowi typu 2:1, dla badanych układów stosunek wysokości sygnałów $[2(18\text{-korona-6})+\text{Cs}]^+ : [2(18\text{-korona-6})+\text{Rb}]^+$ wynosił 5:1.

Tabela 3.

Porównanie intensywności pików w widmach ESI oraz stałych trwałości kompleksów 18-korona-6 z kationami litowców.

kompleks	[18- 6+Na] ⁺	[18-korona-6+K] ⁺	[18-korona-6+Rb] ⁺	[18-korona-6+Cs] ⁺
Proporcje stałych trwałości	2,2	83,7	11,3	2,7
Proporcje sygnałów w widmie ESI (%)	2,8	71,4	19,4	6,5

W celu otrzymania widma MS kompleksów typu kanapkowego badany roztwór powinien zawierać nadmiar eteru koronowego, ponieważ jony odpowiadające kompleksom 2:1 mogą ulegać dysocjacji zgodnie z równaniem reakcji:

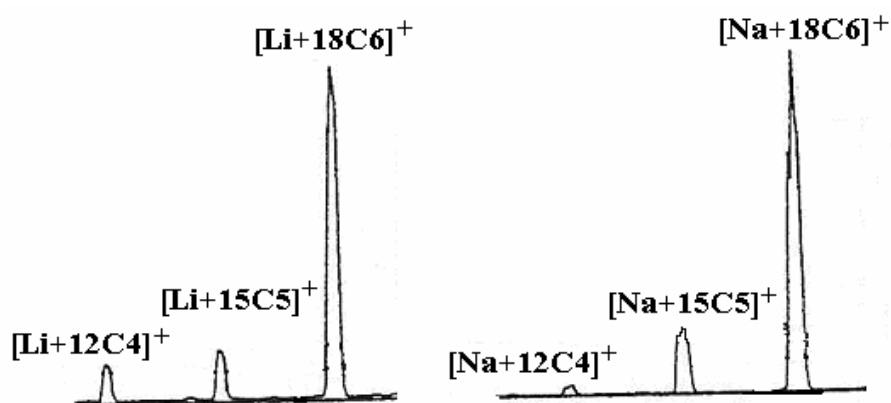


Dlatego, dokonując pomiarów w spektrometrze mas, aby uniknąć zachodzenia procesu dysocjacji lub zmniejszyć jego wpływ na wygląd widma mas należy zwrócić uwagę na parametry źródła jonów, a w szczególności na tzw. potencjał stożka (ang. *cone voltage*). Parametr ten posiada kluczowy wpływ na stopień fragmentacji jonów (tzw. fragmentacja w źródle jonów ang. *fragmentation "in source"*) i powinien być najniższy z możliwych gdy chcemy obserwować jony, które łatwo ulegają rozpadowi.

Koncepcja "najlepszego dopasowania" (ang. *"best-fit" concept*) odgrywa istotną rolę w przypadku tworzenia się kompleksów typu gość-gospodarz o stechiometrii 1:1, co z kolei najczęściej znajduje potwierdzenie w widmie mas – sygnał kompleksu najlepiej

dopasowanego jest największy. Jednakże wyniki niektórych danych eksperymentalnych wydają się podważać efekt korelacji sygnałów z koncepcją "best-fit". Rejestrowano widma ESI dla roztworu zawierającego jeden kation litowca oraz mieszaninę trzech eterów koronowych (12-korona-4, 15-korona-5, 18-korona-6). W każdym przypadku najwyższy sygnał odpowiadał kompleksowi zawierającemu największy eter koronowy czyli 18-korona-6 (rysunek 15).²⁵

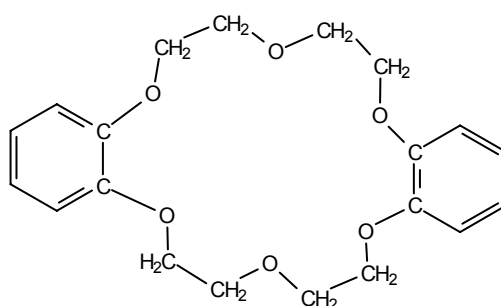
Zgodnie z koncepcją najlepszego dopasowania, dla mieszaniny Li^+ oraz eterów: 12-korona-4, 15-korona-5, 18-korona-6 najwyższy sygnał powinien pochodzić od jonu $[\text{12-korona-4}+\text{Li}]^+$, a dla roztworu zawierającego Na^+ oraz etery: 12-korona-4, 15-korona-5, 18-korona-6, najwyższy sygnał powinien odpowiadać jonowi $[\text{15C-korona-5}+\text{Na}]^+$. Dla większych eterów koronowych możliwe jest oddziaływanie kationów z większą liczbą atomów tlenu (oddziaływania typu jon-dipol). Większe cząsteczki są także bardziej "giętkie" (ang. *flexible*), co umożliwia przyjęcie optymalnej konformacji w utworzonym kompleksie.



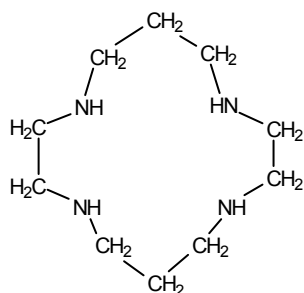
Rysunek 15. Względne intensywności pików w widmie ESI dla roztworu zawierającego jeden kation litowca oraz mieszaninę trzech eterów koronowych

Metodą ESI²⁶ badano kompleksowanie kationów metali poprzez pochodne tlenowe – eter dibenzo-18-korona-6 oraz analog azotowy - cyklam i siarkowy (rysunek 16)

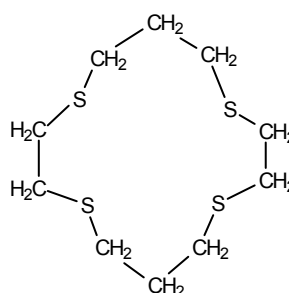
Wielkość wnęki w przypadku eteru dibenzo-18-korona-6 jest podobna do 18-korona-6, jednakże wprowadzenie układu aromatycznego do cząsteczki powoduje jej usztywnienie, dlatego efektywna wielkość wnęki w przypadku dibenzo-18-korona-6 jest mniejsza niż dla 18-korona-6. Efekt ten jest obserwowany podczas kompleksowania kationów metali. Dla dibenzo-18-korona-6 w widmie ESI obserwuje się jony o stechiometrii 2:1 z kationem potasu, $[2(\text{dibenzo-18-korona-6})+\text{K}]^+$, podczas gdy dla 18-korona-6 analogiczne kompleksy nie powstają.



dibenzo-18-korona-6



1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan



1,4,8,11-tetrathiacyklotetradekan

Rysunek 16. Cykliczne analogi tlenowe i azotowe siarkowe

Efekt ten jest także widoczny podczas kompleksowania kationów berylowców. W przypadku kationów dwuwartościowych mogą powstawać jony podwójnie naładowane i/lub pojedynczo naładowane z anionem wbudowanym do wnęki. Dla roztworu azotanu (V) wapnia i eteru 18-korona-6 w widmie ESI obserwowano sygnały odpowiadające $[18\text{-korona-6}+\text{Ca}]^{2+}$ oraz $[18\text{-korona-6}+\text{Ca}+\text{NO}_3]^+$, a dla mieszaniny eteru dibenzo-18C6 sygnały $[\text{dibenzo-18-korona-6}+\text{Ca}]^{2+}$, $[\text{dibenzo-18-korona-6}+\text{Ca}+\text{NO}_3]^+$ oraz $[2(\text{dibenzo-18-korona-6})+\text{Ca}+\text{NO}_3]^+$.

Etery koronowe kompleksują kationy metali bloku s, d oraz p. Natomiast azotowe odpowiedniki eterów koronowych (cyklamy, rysunek 16) kompleksują jedynie kationy pierwiastków bloku d oraz p. Z kolei analogi siarkowe eterów koronowych kompleksują kationy wszystkich bloków ale nie tworzą trwałych kompleksów z kationami berylowców. Fakty te znajdują potwierdzenie w widmach ESI, co z kolei pozwala na wykorzystanie spektrometrii mas w badaniach właściwości koordynujących pierwiastków.

Kompleksy eterów koronowych z kationami metali badano również wykorzystując technikę LSIMS.²⁷

Na wielkość sygnału w widmie LSIMS kluczowy wpływ ma stężenie badanego związku w matrycy (w przypadku kompleksów stężenie to jest proporcjonalne do stałej trwałości) oraz szybkość desorpcji (ang. *desorption rate*). W celu ustalenia wpływu tego zjawiska rejestrowano widma LSIMS zawierające mieszaninę litowców (ilości równomolowe) oraz nadmiar eteru 15-korona-5. W tym eksperymencie wszystkie kationy są skompleksowane przez eter koronowy a stężenia poszczególnych kompleksów są jednakowe. Wielkości sygnałów w widmie LSIMS tak przygotowanej próbki jest proporcjonalna do szybkości desorpcji poszczególnych kompleksów z matrycy. W sytuacji odwrotnej, gdy badany roztwór zawiera nadmiar kationów metali, wszystkie cząsteczki eteru 15-korona-5 występują w formie kompleksów: $[(15\text{-korona-5})+\text{Li}]^+$, $[(15\text{-korona-5})+\text{Na}]^+$ oraz $[(15\text{-korona-5})+\text{K}]^+$, których stężenia jest zależne od powinowactwa (ang. *affinity*) cząsteczki eteru 15-korona-5 do kationów litowców. W konsekwencji widmo LSIMS tak przygotowanej próbki będzie

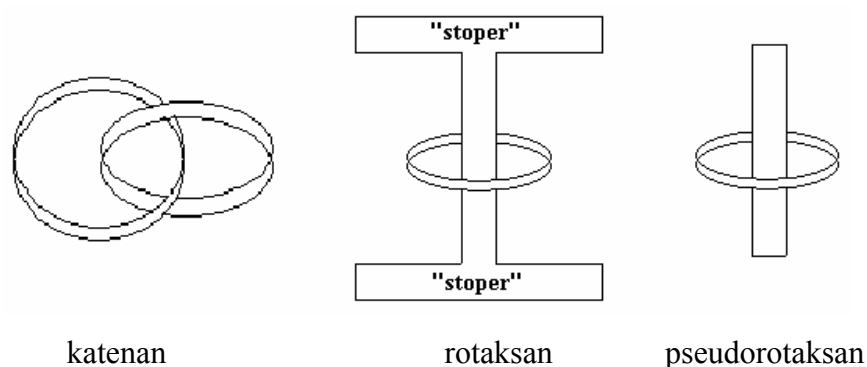
odzwierciedleniem zdolności kompleksowania kationów metali przez cząsteczkę eteru koronowego.

Rodzaj zastosowanej matrycy posiada istotny wpływ na wielkość sygnału w widmie LSIMS (oraz FAB). Matryce polarne, np. gliceryna znacznie obniżają stałe trwałości kompleksów eterów koronowych z kationami o dużej gęstości elektronowej jak Li^+ lub Na^+ . Jon $[\text{15-korona-5+Li}]^+$ jest praktycznie niewidoczny w widmie LSIMS jeśli użyjemy gliceryny jako matrycy. Wynika to z faktu, że gliceryna, której jest nadmiar, sama tworzy kompleksy z kationami litu, a proces charakteryzuje się dużą energią solwatacji. W przypadku zastosowania matrycy mniej polarnej takiej jak alkohol *meta*-nitrobenzylowy (NBA) otrzymane wartości stałych trwałości są zgodne z koncepcją "*best-fit*" i dla eteru 15-korona-5 maleją w szeregu: $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$.

5. Układy supramolekularne z udziałem eterów koronowych i jonów organicznych

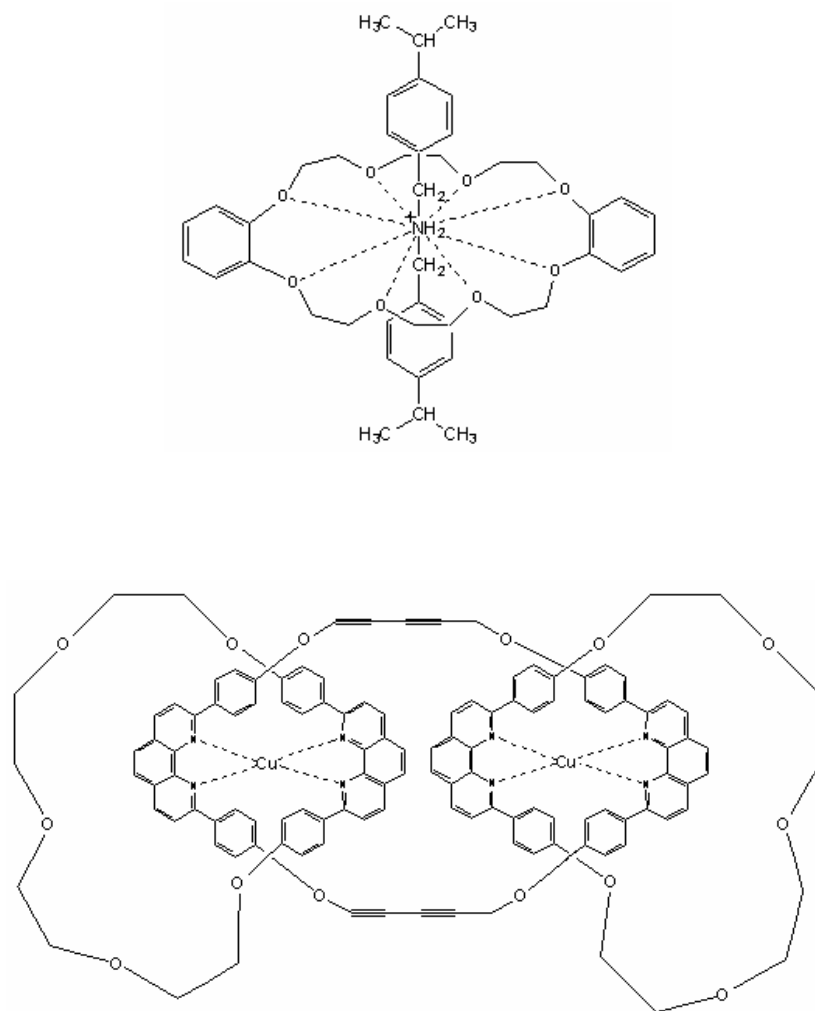
Za pomocą technik spektrometrii mas badano również kompleksy eterów koronowych z kationem amonowym, z różnymi kationami organicznymi (np. pirydyniowym, tropyliowym), z protonowanymi cząsteczkami amin (np. propyloaminą), a nawet z protonowanymi cząsteczkami aminokwasów.²⁸⁻³⁰

Do grupy związków makrocyclicznych można zaliczyć układy połączone mechanicznie, tj. katenany (ang. *catenanes*) oraz rotaksany (ang. *rotaxanes*) przedstawione na rysunku 17. Pseudorotaksany (ang. *pseudorotaxanes*) to układy, które nie posiadają tzw. „stopera” a układ utrzymywany jest wewnątrz makrocyclu za pomocą wiązań wodorowych lub oddziaływań elektrostatycznych



Rysunek 17. Układy supramolekularne utworzone poprzez mechaniczne połączenie molekuł

Za pomocą technik spektrometrii mas badano tego typu układy supramolekularne^{28,31}, a przykładowe struktury zostały przedstawione na rysunku 18.

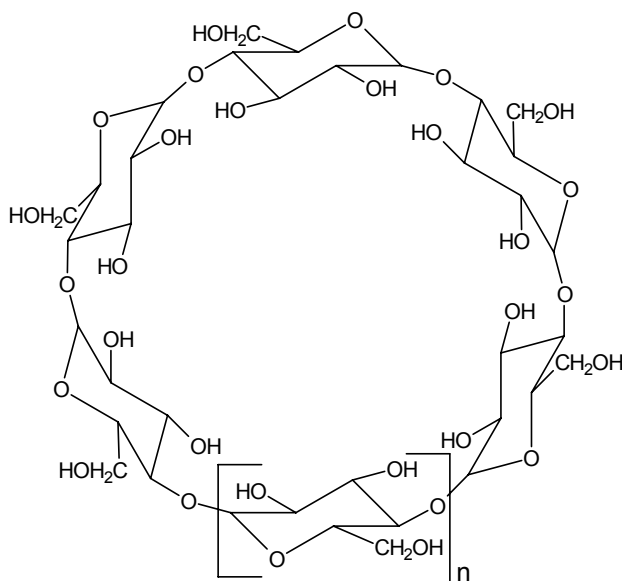


Rysunek 18. Przykładowe struktury katenanu i pseudorotaksanu badane technikami MS

W przypadku pęknięcia pierścienia następuje natychmiastowa fragmentacja katenanów lub rotaksanów na poszczególne cząsteczki. Stosując jednak łagodną metodę jonizacji, taką jak ESI, FAB lub MALDI, pęknięcie łańcucha zachodzi w niewielkim stopniu.

6. Kompleksy cyklodekstryń

Cyklodekstryny (CD) są cyklicznymi oligosacharydami zdolnymi do tworzenia kompleksów inkluzyjnych z różnymi cząsteczkami organicznymi. Struktury cyklodekstryń zbudowanych z podjednostek cząsteczek glukozy połączonych glikozydowymi wiązaniami α -(1-4) zostały przedstawione na rysunku 19.



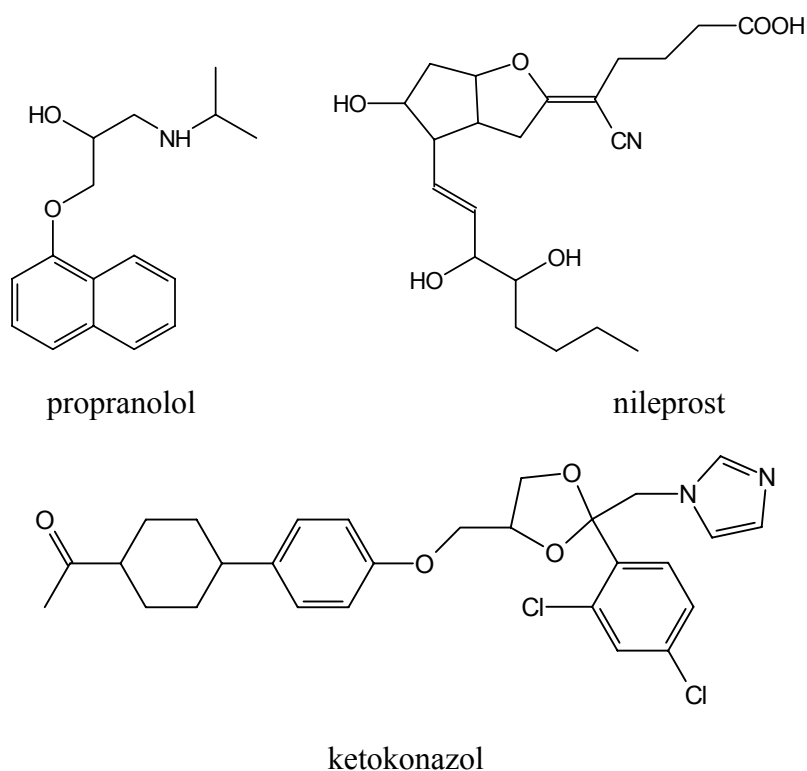
$n = 1$ α -cyklodekstryna; $n = 2$ β -cyklodekstryna;

$n = 3$ γ -cyklodekstryna

Rysunek 19. Struktura cząsteczki cyklodekstryny

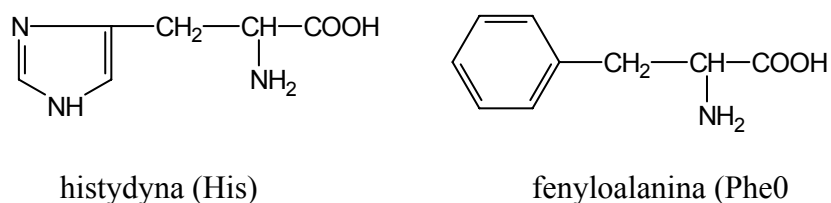
Wnęka w cząsteczce cyklodekstryny posiada właściwości hydrofobowe, dlatego w przypadku roztworów wodnych, cząsteczki cyklodekstryń bardzo chętnie tworzą kompleksy ze związkami o

charakterze hydrofobowym. W tym przypadku siłą napędową (ang. *driving force*) tworzenia kompleksu jest wypychanie związku niepolarnego przez polarny rozpuszczalnik – wodę do wnętrza cząsteczki cyklodekstryny, a powstały kompleks gość-gospodarz utrzymywany jest na zasadzie oddziaływań hydrofobowych i/lub van der Waalsa. Proces ten został wykorzystany do kompleksowania niektórych leków. Obecność cyklodekstryn podwyższa rozpuszczalność leków w wodzie i ułatwia ich przyswajalność w organizmie lub zapobiega zbyt szybkiemu rozkładowi. Przykłady leków, których kompleksy z cyklodekstryną badano technikami spektrometrii mas przedstawia rysunek 20.²⁸

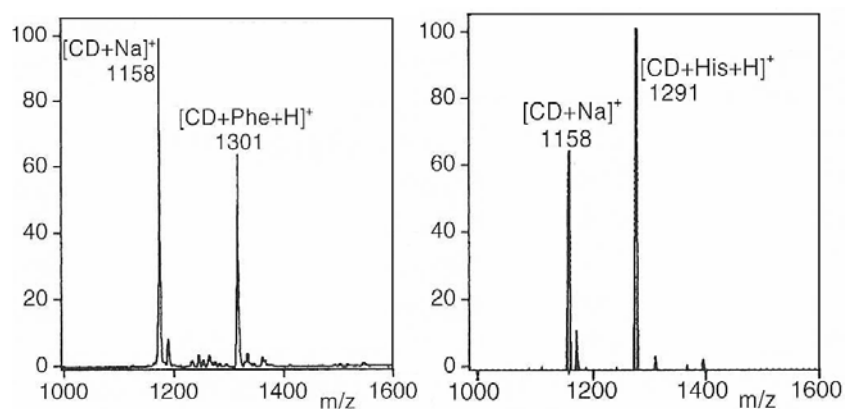


Rysunek 20. Leki stosowane łącznie z cyklodekstrynami

Spektrometria mas to chemia jonów w fazie gazowej, dlatego po przeniesieniu kompleksu z roztworu polarnego rozpuszczalnika do fazy gazowej oddziaływania hydrofobowe ulegają osłabieniu (patrz rozdział 3). Stwierdzono, że cząsteczki cyklodekstryn tworzą w roztworze wodnym kompleksy z fenyloalaniną (Phe). Nie stwierdzono natomiast obecności w roztworze analogicznych kompleksów z bardziej polarnym aminokwasem jakim jest histydyna (His) (rysunek 21).



Rysunek 21. Struktury badanych aminokwasów

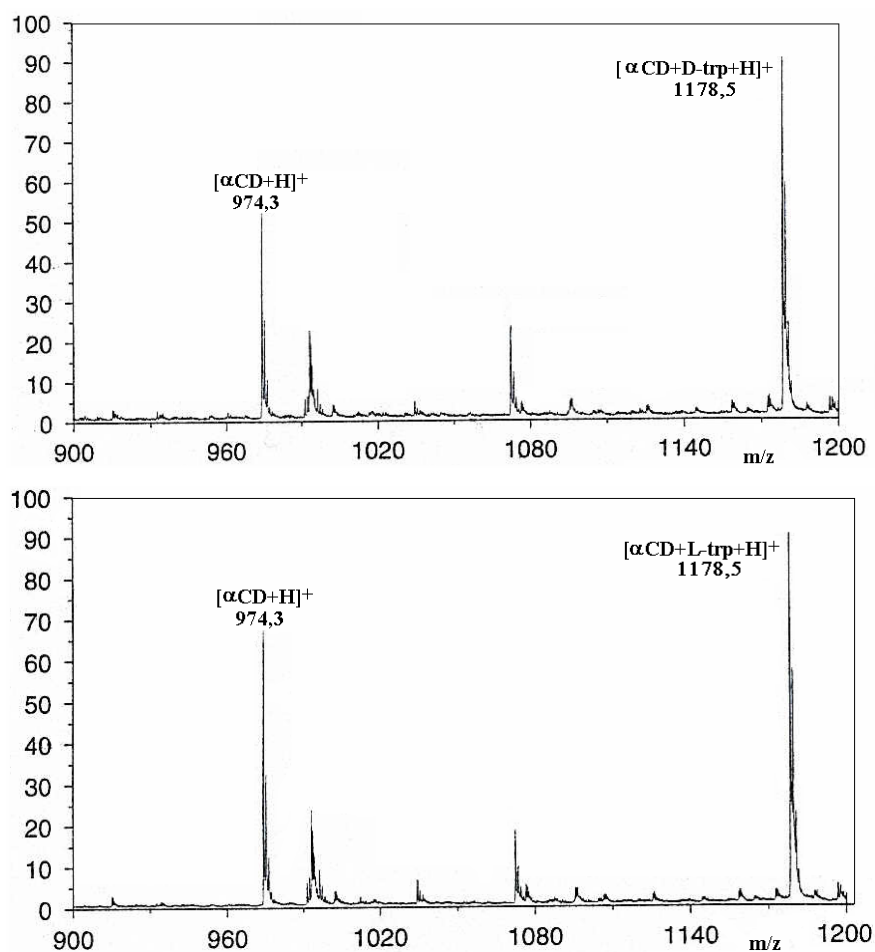


Rysunek 22. Widma ESI cyklodekstryny z aminokwasami

W widmie ESI zaobserwowano, że w stosunku do sygnału jonu $[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$, sygnał pochodzący od kompleksu β -cyklodekstryny z histydyną był intensywniejszy od sygnału kompleksu z fenyloalaniną (rysunek 22).³²

Cząsteczka cyklodekstryny posiada wiele asymetrycznych atomów węgla, dlatego kompleksy ze związkami chiralnymi charakteryzują się różnymi wartościami stałych trwałości, co z kolei znajduje swoje odzwierciedlenie w intensywnościach sygnałów w widmach ESI. Na rysunku 23 przedstawiono widma ESI roztworów zawierających α -cyklodekstrynę oraz L- i D-tryptofan (Trp). Sygnał pochodzący od jonu $[\alpha\text{-CD}+\text{L-Trp}]^+$ jest wyższy od sygnału jonu $[\alpha\text{-CD}+\text{D-Trp}]^+$ co wskazuje na wyższą stałą trwałości kompleksu z izomerem L.³³

Preferencje w kompleksowaniu związków chiralnych przez cyklodekstryny są widoczne w badaniach kinetycznych. Obserwowano proces wymiany cząsteczki gościa w fazie gazowej (ang. *gas-phase guest exchange reaction*) na przykładzie reakcji kompleks cyklodekstryna-aminokwas z n-propyloaminą.³⁴ Kinetykę tego procesu badano za pomocą spektrometru mas wyposażonego w analizator cyklotronowego rezonansu jonowego z transformacją Fouriera. Stwierdzono, że L-alanina ulega wymianie 1,6 razy szybciej od izomeru D.



Rysunek 23. Widma MS Kompleksów cyklodekstryny z izomerami tryptofanu

Interesujące badania kompleksów cyklodekstryn z zasadami nukleinowymi oraz nukleozydami przeprowadzono stosując metodę jonizacji FAB.³⁵ Stwierdzono, że w wyniku fragmentacji jonów $[\text{CD}+\text{G}+\text{H}]^+$ (gdzie G oznacza cząsteczkę gościa) powstają jony fragmentacyjne odpowiadające protonowanym cząsteczkom gościa czyli protonowanym zasadom nukleinowym lub protonowanym

nukleozydom. Natomiast w wyniku fragmentacji jonów $[CD+G-H]^-$ (rejestrowanych w trybie ujemnym) powstają jony odpowiadające deprotonowanym cząsteczkom gospodarza czyli jony $[CD-H]^-$. Oznacza to, że w przypadku jonów $[CD+G+H]^+$ wewnątrz luki cyklodekstryny znajduje się protonowana cząsteczka gościa, natomiast dla jonów $[CD+G-H]^-$, wewnątrz deprotonowanej cząsteczki gospodarza znajduje się obojętna cząsteczka gościa.

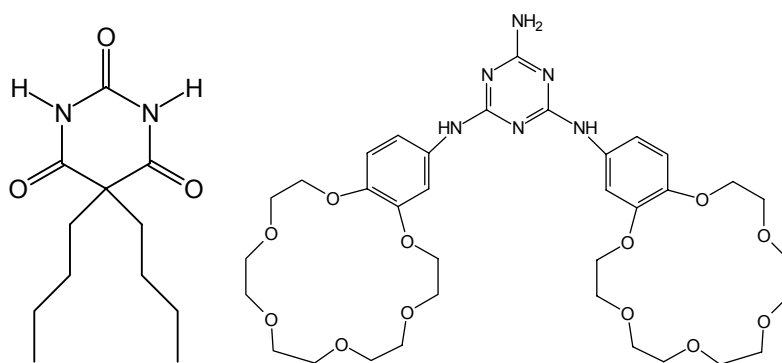
7. Procesy samoorganizacji

Proces samoorganizacji (ang. *self-assembly*) można zdefiniować jako spontaniczne łączenie się cząsteczek za pomocą oddziaływań niekowalencyjnych w termodynamicznie trwałe układy o ściśle określonej strukturze. Powstawanie takich struktur może być wynikiem tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami związku chemicznego (ang. *self-assembly driven by hydrogen bonding*) lub może zachodzić poprzez koordynowanie kationu metalu cząsteczkami związku chemicznego (ang. *metal directed self-assembly*).

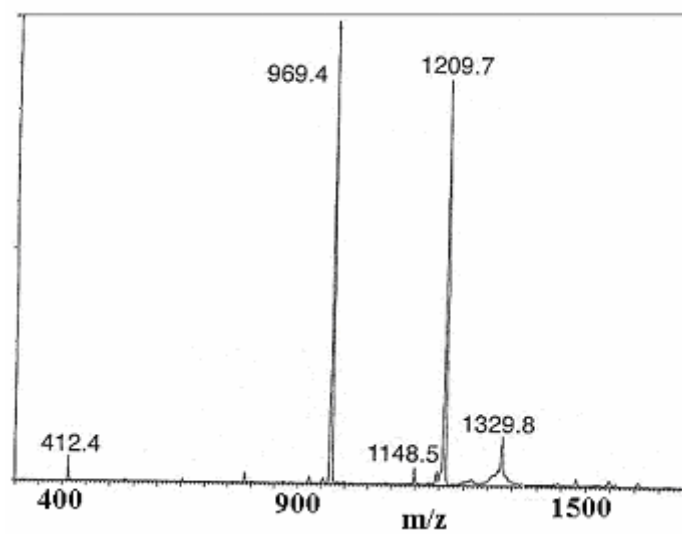
Struktury powstałe w wyniku utworzenia się wiązań wodorowych są zazwyczaj nietrwałe w rozpuszczalnikach polarnych. Powoduje to, że w badaniach ESI/MS gdzie używane są najczęściej rozpuszczalniki polarne takie jak metanol, woda nie obserwuje się sygnałów pochodzących od cząsteczek kompleksów. Drugim problemem jaki może napotkać eksperymentator stosujący techniki MS podczas badania procesów samoorganizacji jest uwidocznienie w widmie mas tylko zjonizowanych indywidualów chemicznych. Przyłączenie protonu do cząsteczki kompleksu utworzonego poprzez wiązania wodorowe (sposób jonizacji charakterystyczny dla ESI lub FAB) może spowodować zanik słabych wiązań wodorowych i rozpad kompleksu.

Rejestrowano widma ESI mieszaniny pochodnej kwasu barbiturowego (kwas 5,5-dibutylobarbiturowy; związek A) oraz pochodnej triaminotriazyny podstawionej eterem koronowym

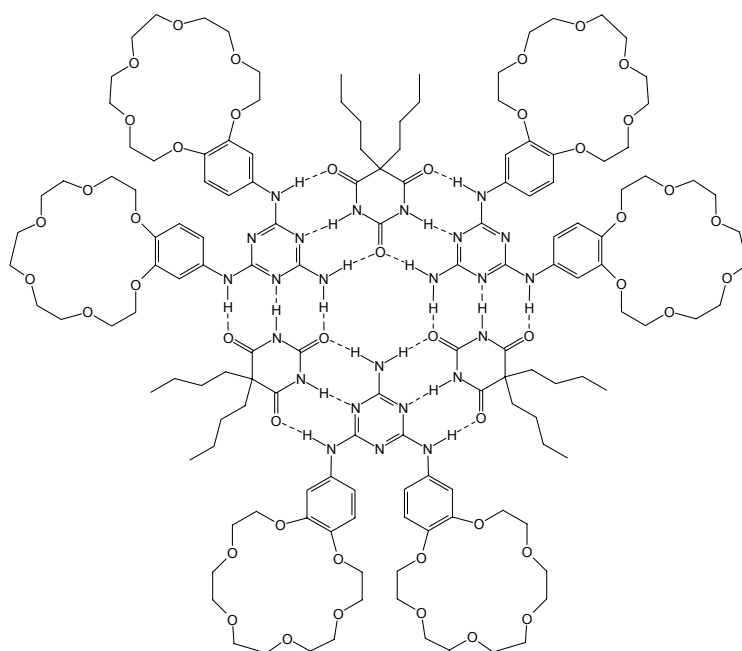
(otrzymanej w wyniku reakcji 4'-amino-benzo-18-korona-6 z 6-amino-2,4-dichloro-1,3,5-triazyną - związek B). Struktury tych związków zostały przedstawione na rysunku 24. Jako rozpuszczalnik użyto chlorek metylenu (CH_2Cl_2), a w celu uzyskania ładunku dodawano heksafluorofosforek potasu (KPF_6) ponieważ kation K^+ jest bardzo dobrze kompleksowany przez podstawnik benzo-18-korona-6.³⁶ Uzyskano intensywny sygnał kompleksu A_3B_3 zawierającego trzy kationy potasu i trzy cząsteczki KPF_6 (lub sześć kationów potasu i trzy aniony PF_6^-), sumaryczny ładunek wynosił +3, a więc stosunek masy do ładunku (m/z) dla takiego jonu wynosił 1209,7. Obserwowano również mniej intensywne sygnały jonów o różnej liczbie kationów potasu i anionów PF_6^- oraz kompleksy typu A_2B_3 i A_3B_2 (rysunek 25). Kompleksy te powstają na skutek tworzenia się wiązań wodorowych, a strukturę kompleksu A_3B_3 przedstawiono na rysunku 26. Należy podkreślić, że dla roztworu zawierającego dodatkowo metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} -10:1$) nie obserwowano w widmie ESI powstawania kompleksów.



Rysunek 24. Struktury związków tworzące układ supramolekularny poprzez wiązania wodorowe



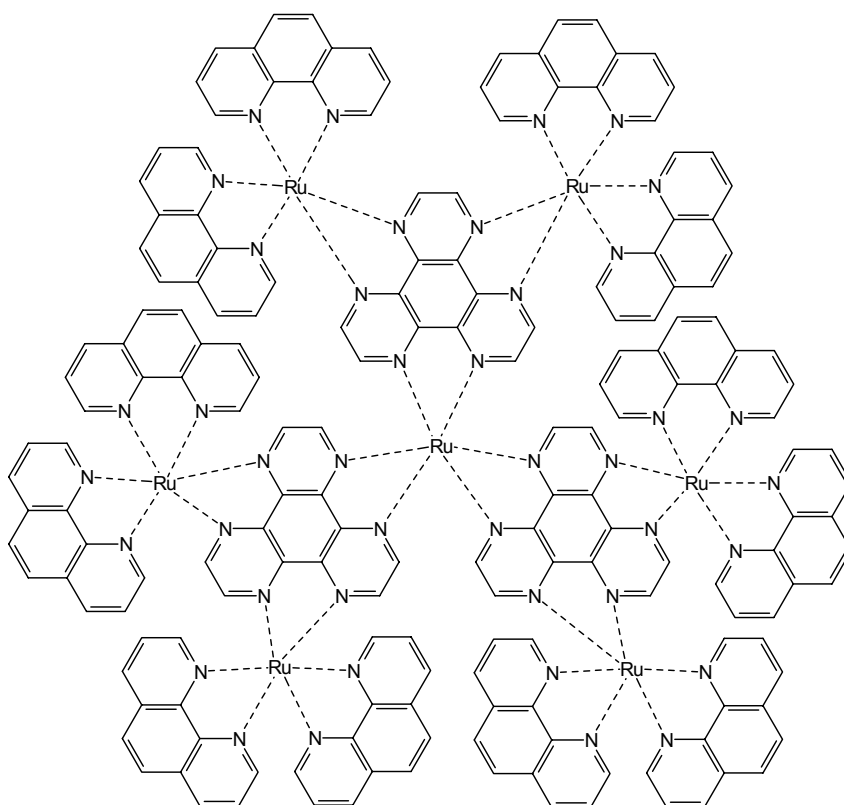
Rysunek 25. Widmo ESI zarejestrowane dla roztworu CH_2Cl_2 mieszaniny związków A i B



Rysunek 26. Kompleks A_3B_3 utworzony poprzez wiązania wodorowe

W przypadku układów supramolekularnych zawierających kationy metali sygnały widoczne w widmie mas powstają z cząsteczek po odłączeniu przeciwjonu (anionu). W zależności od liczby anionów, które uległy oddysocjowaniu obserwujemy sygnały o różnych wartościach m/z , ponieważ w wyniku procesu oderwania przeciwjonu zmienia się zarówno masa, jak i ładunek badanego układu. Widma mas tego typu układów są trudne w interpretacji. Dodatkowym czynnikiem komplikującym pomiary może być występowanie procesów utleniająco-redukujących zarówno w obszarze kationów lub anionów. Na rysunku 27 przedstawiono kompleks rutenu II (o strukturze dendrymeru) w obecności heksafluorofosforeku PF_6^- z cząsteczkami fenantroliny oraz 1,4,5,8,9,12-heksaazatrifenylenu.³⁷ W obecności metalu przejściowego oraz domieszek wody nastąpiła hydroliza anionu PF_6^- prowadząca do powstania fosforanów oraz tlenofluorofosforków. Obserwowane w widmie ESI sygnały przedstawiono w tabeli 4. Otrzymano sygnały pochodzące od jonów trzy-, cztero-, pięcio- oraz sześciokrotnie naładowanych. Zmiana ładunku następowała w wyniku odłączenia kolejnego anionu PF_6^- , dlatego otrzymane sygnały można podzielić na trzy serie **a**, **b** i **c** (Tabela 4).

Wartości m/z podane w Tabeli 4 są wartościami uśrednionymi. W widmach tego typu kompleksów obserwujemy charakterystyczny rozkład izotopowy zależny od składu pierwiastkowego i ładunku jonu. Rozkład izotopowy dla jonu trójrotnie naładowanego serii **a** przedstawiono na rysunku 28.



Rysunek 27.

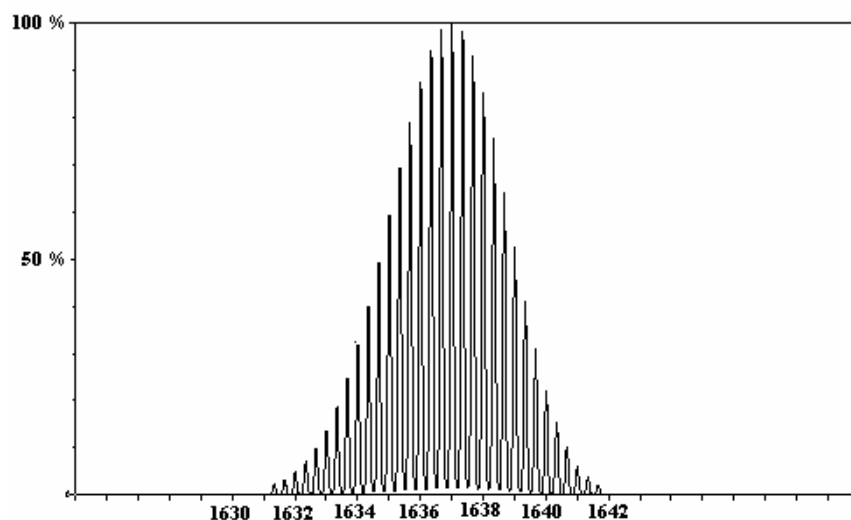
Kompleks rutenu II z cząsteczkami fenantroliny oraz 1,4,5,8,9,12-heksaazatrifenylenu

Tabela 4.

Sygnaly obserwowane w widmie ESI kompleksu rutenu II z cząsteczkami fenantroliny oraz 1,4,5,8,9,12-heksaazatryfenylenu (M) w obecności PF_6^- jako przeciwjonu.

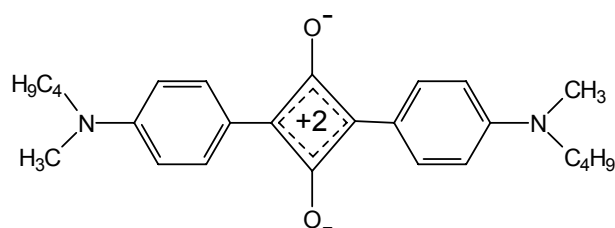
jon	m/z
(a) $[\text{M} + 7\text{PF}_6^- + \text{HPO}_4^{2-} + \text{POF}_4^- + \text{PO}_2\text{F}_2^-]^{3+}$	1635
(b) $[\text{M} + 4\text{PF}_6^- + \text{HPO}_4^{2-} + \text{POF}_4^- + 4\text{PO}_2\text{F}_2^-]^{3+}$	1593
(c) $[\text{M} + 4\text{PF}_6^- + 2\text{HPO}_4^{2-} + 3\text{PO}_2\text{F}_2^-]^{3+}$	1548
(a) $[\text{M} + 6\text{PF}_6^- + \text{HPO}_4^{2-} + \text{POF}_4^- + \text{PO}_2\text{F}_2^-]^{4+}$	1190
(b) $[\text{M} + 3\text{PF}_6^- + \text{HPO}_4^{2-} + \text{POF}_4^- + 4\text{PO}_2\text{F}_2^-]^{4+}$	1158
(c) $[\text{M} + 3\text{PF}_6^- + 2\text{HPO}_4^{2-} + 3\text{PO}_2\text{F}_2^-]^{4+}$	1126
(a) $[\text{M} + 5\text{PF}_6^- + \text{HPO}_4^{2-} + \text{POF}_4^- + \text{PO}_2\text{F}_2^-]^{5+}$	923
(b) $[\text{M} + 2\text{PF}_6^- + \text{HPO}_4^{2-} + \text{POF}_4^- + 4\text{PO}_2\text{F}_2^-]^{5+}$	897
(c) $[\text{M} + 2\text{PF}_6^- + 2\text{HPO}_4^{2-} + 3\text{PO}_2\text{F}_2^-]^{5+}$	871
(a) $[\text{M} + 4\text{PF}_6^- + \text{HPO}_4^{2-} + \text{POF}_4^- + \text{PO}_2\text{F}_2^-]^{6+}$	745
(b) $[\text{M} + \text{PF}_6^- + \text{HPO}_4^{2-} + \text{POF}_4^- + 4\text{PO}_2\text{F}_2^-]^{6+}$	723
(c) $[\text{M} + \text{PF}_6^- + 2\text{HPO}_4^{2-} + 3\text{PO}_2\text{F}_2^-]^{6+}$	702

M – kompleks przedstawiony na rysunku 18; siedem kationów Ru^{2+} , trzy cząsteczki 1,4,5,8,9,12-heksaazatryfenylenu oraz dwanaście cząsteczek fenantroliny.

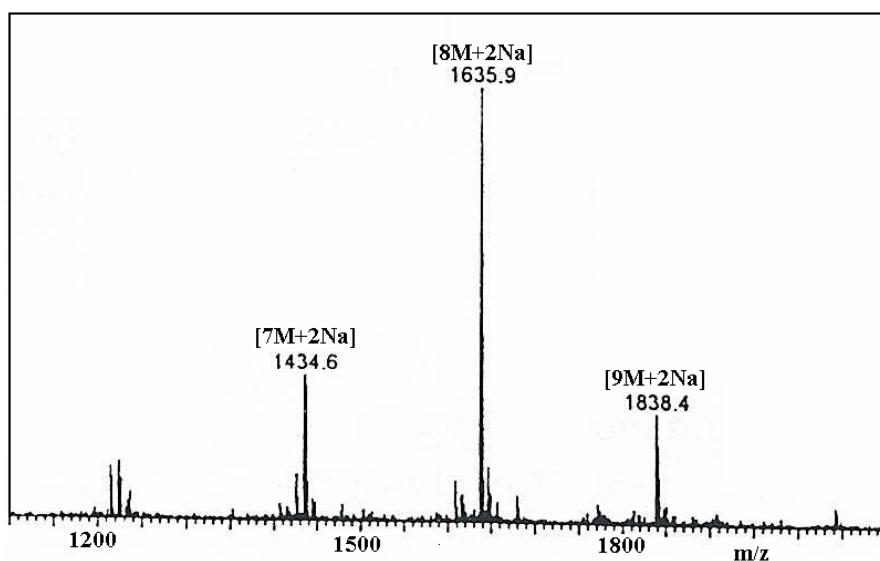


Rysunek 28. Rozkład izotopowy jonu $[M + 7PF_6^- + HPO_4^{2-} + POF_4^- + PO_2F_2^-]^{3+}$

W badaniach ESI wielu roztworów obserwuje się produkty powstałe w wyniku procesu samoorganizacji, których strukturę trudno określić. W przypadku barwnika przedstawionego na rysunku 29 obserwowano intensywne sygnały $[7M+2Na]^+$ (m/z 1434,6), $[8M+2Na]^+$ (m/z 1635,9), $[9M+2Na]^+$ (m/z 1838,4) (rysunek 30, gdzie M odpowiada cząsteczce barwnika) dla których trudno było przypisać strukturę. Obserwowane sygnały świadczą o dużej termodynamicznej trwałości kompleksów tego związku z kationami sodu o stechiometrii 7:2, 8:2 i 9:2. Sygnały tych kompleksów nie były artefaktami pomiarowymi. Po licznych doświadczeniach kompleksy takie zaobserwowano dla roztworów bardzo rozcieńczonych.



Rysunek 29. Struktura barwnika zdolnego do tworzenia z kationami sodu kompleksów o różnej stechiometrii



Rysunek 30. Widmo ESI barwnika z zarejestrowane w obecności kationów sodu

Dodatek nadmiaru innych kationów litowców nie powodował powstania z nimi podobnych kompleksów. Również dodatek eteru 15-korona-5 bardzo dobrze kompleksującego kationy sodu nie powodował zaniku sygnałów badanych kompleksów. Świadczy to dużej selektywności cząsteczek tego związku do kationów sodu.

Sygnalów tych nie obserwowano w widmie MS po obniżeniu pH roztworu za pomocą kwasu trifluorooctowego (TFA). Jednakże po zobojętnieniu roztworu węglanem sodu ponownie zachodził proces samoorganizacji. Zastąpienie podstawników alkilowych na atomach azotu grupami większymi, np. oktadecylowymi ($C_{18}H_{37}$), powodowało, że proces samoorganizacji nie zachodził.³⁸

Badanie te ukazują jak bardzo przydatną metodą jest technika MS w badaniach układów złożonych.

8. Literatura

- ¹ Biemann K., 1962. Mass Spectrometry. Organic Chemical Applications. McGraw-Hill, New York.
- ² Barber M., Bordoli R.S., Elliott J., Sedgwick R.D., Tyler A., 1982. Fast atom bombardment mass spectrometry. Anal. Chem. 54, 645A.
- ³ Aberth, W., Burlingame. A.L., 1984. Comparison of three geometries for a cesium primary beam liquid secondary ion mass spectrometry source. Anal. Chem. 56, 2915.
- ⁴ De Pauw E., 1986. Liquid matrices for secondary ion mass spectrometry. Mass Spectrom. Rev. 5, 191.
- ⁵ Yamashita M., Fenn J.B., 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. J. Phys. Chem. 88, 4451.
- ⁶ Gaskell S.J., 1997. Electrospray: principles and practice. J. Mass Spectrom. 32, 677.
- ⁷ Cole R.B., 1996. Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Wiley, New York.
- ⁸ Munson M.S., Field F.H., 1966. Chemical ionization mass spectrometry. General introduction. J. Am. Chem. Soc. 88, 2621.

-
- ⁹ Karas M., Buchman D., Hillenkamp F.K., 1985. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* 57, 2935.
- ¹⁰ Carroll D.I., Dzidic I., Stillwell R.N., Haegele K.D., Horning E.C., 1975. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry: corona discharge ion source for use in liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system. *Anal. Chem.* 47, 2369.
- ¹¹ Huang E.C., Wachs, T., Conboy J.J., Henion J.D., 1990. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 62, 713.
- ¹² Blakley C.R., Vestal M.L., 1983. Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 55, 750.
- ¹³ Beckey H.D., Schulten H.-R., 1975. Field desorption mass spectrometry. *Angew. Chem., Int. Ed.* 14, 403.
- ¹⁴ Caprioli R.M., Fan, T., Cottrell J.S., 1986. Continuous flow sample probe fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.* 58, 2949.
- ¹⁵ Cooks R.G., Beynon J.H., Caprioli R.M., Lester G.R., 1973. *Metastable Ions*. Elsevier, Amsterdam.
- ¹⁶ Johnstone, R.A.W., Rose, M.E., 1996. *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*. Cambridge University Press.

-
- ¹⁷ Płaziak, A.S., 1997. Spektrometria masowa związków organicznych. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
- ¹⁸ Hoffmann, de E., Charette, J., Stroobant, V., 1998. Spektrometria Mas. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- ¹⁹ McLafferty F.W., Tureček F., 1993. Interpretation of Mass Spectra. Mill Valley, University Science Books.
- ²⁰ Young D.-S., Hung H.-Y., Liu L.K., 1997. Estimation of selectivities and relative cationization efficiency of different [Crown+M]⁺ by electrospray mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 32, 432.
- ²¹ Kempen E.C., Brodbelt J.S., 2000. A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry. Anal. Chem. 72, 5411.
- ²² Visser H.C., Reinhoudt D.N., De Jong F., 1994. Carrier-mediated transport through liquid membranes. Chem. Soc. Rev. 23, 75.
- ²³ Lamb J.D., Christensen J.J., Izatt S.R., Bedke K., Astin M.S., Izatt R.M., 1980. Effects of salt concentration and anion on the rate of carrier-facilitated transport of metal cations through bulk liquid membranes containing crown ethers. J. Am. Chem. Soc. 102, 3399.

-
- ²⁴ Leize E., Jaffrezic A., Van Dorrselaer A., 1996. Correlation between solvation energies and electrospray mass spectrometric response factors. Study by electrospray mass spectrometry of supramolecular complexes in thermodynamic equilibrium in solution. *J. Mass Spectrom.* 31, 537.
- ²⁵ Abdoul-Carime H., 1998. Choral crown ether macrocycle-alkali metal cation 1:1 complexes 'host-guest' effect investigated directly by mass spectrometry. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94, 2407.
- ²⁶ Colton R., Mitchell S., Traeger J.C., 1995. Interactions of some crown ethers, cyclam and its tetrathia analogue with alkali, alkali earth and other metal ions: an electrospray mass spectrometric study. *Inorg. Chim. Acta* 231, 87.
- ²⁷ Giraud D., Laprévotte O., Das B.C., 1994. Matrix influence on stability constants of 15-crown-5-alkali metal complexes measured by liquid secondary ion mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* 29, 169.
- ²⁸ Schalley C.A., 2001. Molecular recognition and supramolecular chemistry in the gas phase. *Mass Spectrom. Rev.* 20, 253.
- ²⁹ Williamson B.L., Creaser C.S., 1999. Noncovalent inclusion complexes of protonated amines with crown ether. *Int. J. Mass Spectrom.* 188, 53.

-
- ³⁰ Julian R.R., Akin M., May J.A., Stoltz B.M., Beauchamp J.L., 2002. Molecular recognition of arginine in small peptides by supramolecular complexation with dibenzo-30-crown-10 ether. *Int. J. Mass Spectrom.* 220, 87.
- ³¹ Schalley C.A., 2000. Supramolecular chemistry goes gas phase: the mass spectrometric examination of noncovalent interactions in host-guest chemistry and molecular recognition. *Int. J. Mass Spectrom.* 194, 11.
- ³² Schneider H.-J., Yatsimirsky A., 2000. Principles and method in supramolecular chemistry. Wiley, New York.
- ³³ Cheng Y., Hercules D.M., 2001. Measurement of chiral complexes of cyclodextrins and amino acids by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36, 834.
- ³⁴ Ramirez J., He F., Lebrilla C.B., 1998. Gas-phase chiral differentiation of amino acids guest in cyclodextrin hosts. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 7387.
- ³⁵ Madhusudanan K.P., Katti S.B., Dwivedi A.K., 1998. Non-covalent complexes of nucleosides and nucleobases with β -cyclodextrin: a study by fast atom bombardment mass spectrometry and collision induced dissociation. *J. Mass Spectrom.* 33, 1017.

-
- ³⁶ Russel K.C., Leize E., Van Dorsselaer A., Lehn J.-M., 1995. Investigation of self-assembled supramolecular species in solution by IL-ESMS, a new mass spectrometric technique. *Angew. Chem. Int. Ed.* 34, 209.
- ³⁷ Moucheron A., Kirsch-De Mesmaeker A., Dupont-Gervais A., Leize E., Van Dorsselaer A., 1996. Synthesis and characterization by electrospray mass spectrometry of a novel dendritic heptanuclear complex of ruthenium (II). *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12834.
- ³⁸ Langley G.J., Hecquet E., Morris I.P., Hamilton D.G., 1997. Direct observation of associative behaviour by electrospray ionization: self-assembly – fact or fiction. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 165.