

ROZLIŠENÍ IZOMERŮ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ S VYUŽITÍM KINETICKÉ METODY

VÁCLAV RANC*, PETR FRYČÁK, LUKÁŠ MÜLLER, PETR BEDNÁŘ a KAREL LEMR

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc
lemr@prfnw.upol.cz

Došlo 29.8.05, přijato 14.12.05.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, kinetická metoda, rozlišení izomerů

Obsah

1. Úvod
2. Princip kinetické metody
3. Kinetická metoda v analýze izomerů
4. Realizace kinetické metody v průtočných systémech
5. Závěr

1. Úvod

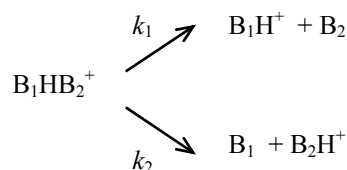
Odlišné vlastnosti izomerů včetně možné rozdílné interakce s biologickými systémy vyžadují syntetické metody vedoucí cíleně k požadovanému izomeru i selektivní analytické metody. Selektivní z hlediska jejich schopnosti „rozpoznat“ jednotlivé izomery. V řadě případů je to úkol relativně snadný. Lze využít rozdílů v rozpustnosti, teplotě tání aj. Jindy je to však úkol značně náročný. Např. optické izomery je nutné vystavit působení chirálního prostředí. Právě odlišná interakce enantiomerů s lidským organismem, který je rovněž chirální (L-aminokyseliny, D-cukry), se projevila smutnými důsledky v aféře thalidomidu, u něhož *S*-enantiomer vykazuje teratogenní účinky. Užívání preparátu (racemátu) proti nevolnosti těhotnými ženami způsobovalo poškození plodu. Vzhledem k rychlé interkonverzi enantiomerů thalidomidu *in vivo* nelze teratogenní efekt eliminovat ani podáváním čistého *R*-enantiomeru. Další výzkum však také prokázal protizánětlivé a imunomodulační účinky *S*-enantiomeru, což vedlo k jeho uvede-

ní na trh a distribuci ovšem za přísně kontrolovaných podmínek^{1,2}. Uvedený příklad ukazuje na nezbytnost studovat vlastnosti a tedy i analyzovat jednotlivé enantiomery ve stadiu vývoje i výroby účinných preparátů, ať již pro humánní či veterinární lékařství, ale i např. při vývoji pesticidů.

K analýze izomerů lze využít celou řadu analytických metod. K velmi účinným přístupům patří aplikace metod separačních, např. plynové nebo kapalinové chromatografie či kapilární elektroforézy. Své uplatnění nachází i hmotnostní spektrometrie. Izomery mají sice stejnou molekulovou hmotnost, ale mohou se lišit svojí fragmentací. Tento rozdíl se však neobjeví u enantiomerů, které, jak již bylo zmíněno, musí být vystaveny působení chirálního prostředí. I zde je však analytický problém řešitelný hmotnostní spektrometrií. Podobně jako u separace enantiomerů jsou postupy hmotnostní spektrometrie založeny na tvorbě diastereoizomerů, např. diastereoizomerních klastrů tak, jak bude popsáno v části věnované aplikaci kinetické metody v analýze izomerů.

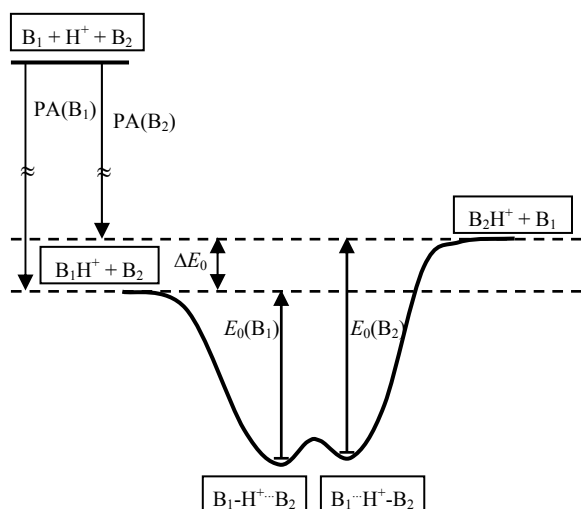
2. Princip kinetické metody

Kinetická metoda, která dnes slouží k měření termochemických veličin (např. protonové afinity), ale z níž vychází i postupy rozlišení a kvantifikace izomerů včetně izomerů optických, byla popsána R. G. Cooksem a T. L. Krugerem v roce 1977 (cit.³). Ve své práci popsali novou metodu určení protonové afinity založenou na fragmentaci metastabilních iontů. Obecně fragmentovaný ion nemusí být metastabilní, štěpení iontů lze docílit např. kolizí indukovanou disociací. Kinetická metoda vychází z izolace vhodného iontového klastru, který následně podléhá dvěma konkurenčním fragmentačním procesům (obr. 1). Při určování protonové afinity je zmíněným klastrem protonovaný adukt dvouází ($[B_1HB_2]^+$), podobně u afinity ke kovovým iontům adukt studovaných látek (M_1 a M_2) s kationtem kovu C^+ ($[M_1CM_2]^+$), při určování elektronové afinity se sleduje záporně nabitý molekulární klaster ($M_1^{\cdots}e^{\cdots}M_2$), pro měření ionizační



Obr. 1. Konkurenční fragmentace protonovaného dimeru bázi B_1 a B_2 , k_1 a k_2 – rychlostní konstanty

* Václav Ranc získal 3. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.



Obr. 2. Schématické znázornění změny energie při konkurenční fragmentaci protonovaného dimeru

energie klastr – kation radikál $M_1M_2^{++}$ atd.⁴

Princip kinetické metody^{3–7} bude objasněn na příkladu určení protonové afinity (PA), přičemž $PA = -\Delta H$, kde ΔH je enthalpie reakce látky s protonem ($B + H^+ \rightarrow BH^+$) v plynné fázi. Určování jiných veličin je analogické. Při experimentu je sledována fragmentace protonovaného aduktu ($[B_1HB_2]^+$). Intenzita vznikajících iontů závisí na rychlostních konstantách (k_1 a k_2) konkurenčních procesů (obr. 1). Průběh dějů je schématicky znázorněn pomocí energetických změn na obr. 2.

Poměr rychlostních konstant k_1 a k_2 konkurenčních monomolekulárních reakcí lze vyjádřit vztahem (1):

$$\ln \left(\frac{k_1}{k_2} \right) = \ln \left(\frac{Q_1^* Q_2}{Q_2^* Q_1} \right) + \frac{\Delta E_0}{RT} \quad (1)$$

kde Q je partiční funkce fragmentovaného iontu, Q^* je partiční funkce aktivovaného komplexu, ΔE_0 je rozdíl aktivací energií (obr. 2), R univerzální plynová konstanta a T je absolutní teplota. Protože obě konkurenční reakce vycházejí z téhož výchozího iontu (protonovaného dimeru), je $Q_1 = Q_2$. Při fragmentaci iontů po jejich izolaci v hmotnostním spektrometru nelze předpokládat, že soubor iontů je v tepelné rovnováze, nelze předpokládat Maxwell-Boltzmannovu distribuci jejich energie charakterizovanou absolutní teplotou, a proto absolutní teplota ve vztahu (1) je nahrazena veličinou T_{eff} tzv. efektivní teplotou (vztah 2).

$$\ln \left(\frac{k_1}{k_2} \right) = \ln \left(\frac{Q_1^*}{Q_2^*} \right) + \frac{\Delta E_0}{RT_{\text{eff}}} \quad (2)$$

Kinetická metoda je přibližná metoda určování termochemických veličin. Pro její uplatnění musí být splněny

následující základní předpoklady^{3–7}:

- I. Poměr naměřených intenzit iontů fragmentů musí být roven poměru koncentrací produktů (např. nesmí docházet k diskriminaci iontů při jejich detekci v hmotnostním spektrometru, popř. tato diskriminace musí být kompenzována).
- II. Rozdíl enthalpie a entropie přechodných stavů. Jinými slovy aktivací bariéra zpětných reakcí (tvorba dimeru) musí být nulová (zanedbatelná) nebo stejná pro obě reakce. Pro tzv. volné přechodné stavy (struktura přechodného stavu se blíží struktuře produktu) je tento požadavek většinou dobře splněn. Pokud by výchozí ionty byly v tepelné rovnováze, poměr koncentrací (intenzit) produktů (odpovídající poměru rychlostních konstant) by byl při splnění uvedeného požadavku v přímém vztahu k termochemickým vlastnostem. Kinetická metoda vychází z předpokladu, že uvedený vztah je přibližně splněn i v případech, kdy systém není v tepelné rovnováze.
- III. Teplotní závislost enthalpie a entropie je zanedbatelná popř. stejná pro obě reakční cesty.
- IV. U aktivovaného iontu (protonovaný dimer apod.) nesmí docházet k izomerii. Představa o jeho struktuře by měla být jasná (např. musí být zřejmé, pro které místo v molekule je měřena protonová afinita).
- V. Jednoduchá původní verze kinetické metody vychází také z předpokladu, že mezi oběma reakčními cestami není rozdíl v entropiích nebo je zanedbatelný. Pak platí $Q_1^* \approx Q_2^*$. Později byly vypracovány varianty, které se s problémem rozdílných entropií do jisté míry vyrovnávají.

Při splnění uvedených pěti podmínek lze využít vztah (3):

$$\ln \left(\frac{k_1}{k_2} \right) = \ln \left(\frac{I(B_1H^+)}{I(B_2H^+)} \right) \approx \frac{\Delta PA}{RT_{\text{eff}}} \quad (3)$$

kde I je intenzita odpovídajícího iontu (B_1H^+ resp. B_2H^+), ΔPA je rozdíl protonových afinit ($\Delta PA = \Delta E_0$, viz. obr. 2).

Postup určení protonové afinity (PA) pomocí nejjednodušší verze kinetické metody (stejná změna entropie pro obě konkurenční reakce)^{3,5} je založen na proměření závislosti (4) odvozené ze vztahu (3) pro sadu standardů B_i se známou protonovou afinitou a studovanou sloučeninu B , jejíž protonová afinita je zjišťována:

$$\ln \left(\frac{I(BH^+)}{I(B_iH^+)} \right) = \frac{PA(B)}{RT_{\text{eff}}} - \frac{PA(B_i)}{RT_{\text{eff}}} \quad (4)$$

Výsledkem měření, jsou-li splněny uvedené předpoklady I. – V., je přímková závislost se směrnici $1/(RT_{\text{eff}})$ a úsekem na ose $PA(B)/(RT_{\text{eff}})$, z níž se určí hodnota měřené protonové afinity. Podmínka V. (shoda partičních funkcí přechodných stavů, $Q_1^* \approx Q_2^*$) může být splněna, jsou-li standardy a studovaná sloučenina strukturně podobné.

V řadě případů však splněna není. Člen $\ln(Q_1^*/Q_2^*)$ ve vztahu (2) je nahrazován rozdílem entropií konkurenčních reakčních cest $\Delta(\Delta S)$, což je oprávněné za předpokladu zanedbatelné nebo stejné aktivační bariéry zpětných reakcí (předpoklad II.). Vztah pro kinetické měření získává tvar:

$$\ln\left(\frac{I(\text{BH}^+)}{I(\text{B}_1\text{H}^+)}\right) = \frac{PA(\text{B})}{RT_{\text{eff}}} - \frac{PA(\text{B}_1)}{RT_{\text{eff}}} - \frac{\Delta(\Delta S)}{R} \quad (5)$$

Práce s uvedeným vztahem se liší v různých verzích kinetické metody. Další informace k nim lze najít v citované literatuře^{3,5,8–13}. Statistický postup zpracování dat při užití kinetické metody byl publikován Armentrou-tem¹⁴.

V literatuře^{8,15,16} stále diskutovanou veličinou je T_{eff} . Při modelování fragmentace protonovaného dimeru byla zjištěna dobrá korelace mezi efektivní teplotou a střední hodnotou vnitřní energie iontů poskytujících detegované fragmenty. Bylo ukázáno, že hodnota T_{eff} závisí na energii dodávané iontu při jeho aktivaci kolizemi, na vazebné energii klastru, na časovém průběhu experimentu (např. doba od aktivace iontů po detekci jejich fragmentů vymezuje z celého souboru aktivovaných iontů pouze ty, u kterých dochází k fragmentaci právě v tomto časovém okně) aj.

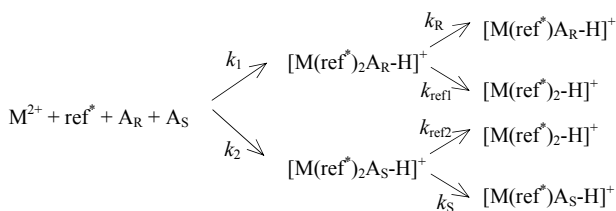
Kinetická metoda vyžaduje měření na tandemových hmotnostních spektrometrech, které jsou však v dnešní době dostupné v řadě laboratorů. Její aplikace je poměrně jednoduchá, je rychlá a je použitelná k měření termochemických vlastností a studiu řady systémů (viz. např. cit.⁴). Kromě hodnot termochemických veličin totiž dovolu- je v určitých případech získat např. představu o struktuře iontů a sterických efektech. Metoda nevyžaduje čistý vzorek (studované ionty jsou izolovány hmotnostním analyzáto- rem), měření relativního poměru intenzit iontů vede do jisté míry ke kompenzaci chyb měření. K výhodám kine- tické metody patří dále její citlivost k malým rozdílům hodnot termochemických veličin a aplikovatelnost i na látky netěkavé. Je to však metoda relativní a správnost výsledku závisí na správnosti referenčních hodnot. Výsled- ky měření lze kontrolovat např. měřením při různých kol- izních energiích, určováním hodnot T_{eff} a jejich porovná- ním s jinými systémy, určováním rozdílů entropií dvou konkurenčních reakcí ($\Delta(\Delta S)$). Výsledky je vhodné také srovnávat s daty získanými jinými experimentálními meto- dami, případně výpočtem. Na závěr je nutné znovu připom- enout, že kinetická metoda je metoda přibližná a relativ- ní a že je založena na určitých předpokladech (I. – V., viz. výše), které nejsou vždy dostatečně naplněny. Její užiteč- nost je zřejmá a byla mnohokrát prokázána, ale její využití vyžaduje opatrnost.

3. Rozlišení izomerů kinetickou metodou

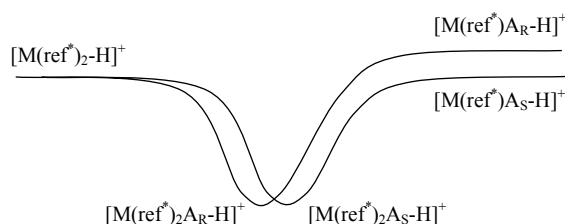
Kinetická metoda umožňuje postihnout velmi malé energetické rozdíly projevující se v rozdílných rychlost-

ních konstantách konkurenčních reakcí. Lze očekávat, že je možné registrovat i rozdíly mezi izomery. Tuto schop- nost kinetické metody demonstroval T. K. Majumdar se spoluautory při rozlišení *cis*- a *trans*-2-methylcyklo- hexanolu a *cis*- a *trans*-4-methylcyklohexanolu¹⁷. Zjistil rozdíl mezi aciditou v plynné fázi pro *cis* a *trans* izomer, přičemž *cis* izomer v obou případech vykazoval vyšší aci- ditu. Rozlišení stereoizomerů demonstrovali další autoři na analýze 2,3-butandiolu¹⁸. Zjistili rozdílnou bazicitu v plynné fázi pro (2*R*,3*R*)- a *meso*-2,3-butandiol (dia- stereoizomery) – 191,5 a 191,2 kcal mol⁻¹. I když hodnoty jsou velmi málo rozdílné, přesnost měření je dostatečná, aby mohl být tento rozdíl postihnout. Optické izomery (2*R*,3*R*)- a (2*S*,3*S*)-butandiol rozlišili na základě tvorby dimeru vždy jednoho optického izomeru s enantiomere- rem referenční sloučeniny. Vznikají dva diastereoizomery, které při fragmenatci dávají různý poměr iontů produktů. Rozlišení optických izomerů bylo uskutečněno s dimery nabitými kladně (protonovanými) i záporně (deprotonova- nými). K. Vékey a G. Czira¹⁹ k odlišení enantiomerů ami- nokyselin využili formování kladně nabitých trimerů obec- ného složení A₂BH⁺, přičemž A i B byly vždy čisté optic- ké izomery některé ze studovaných aminokyselin. Frag- mentace těchto trimerů vede k dvojici dimerů A₂H⁺ resp. ABH⁺. První z nich je vždy homochirální (obsahuje enan- tiomery se stejnou konfigurací), druhý byl homo- nebo heterochirální (obsahuje enantiomery s různou configura- cí) v závislosti na použitých enantiomerech aminokyselin A a B. Měření kinetickou metodou ukázala rozdíly v bazicitě v plynné fázi mezi homo- a heterochirálními dimery, což dovolu- je rozhodnout, jakými enantiomery je dimer ABH⁺ tvořen. Větší rozdíly mezi enantiomery ami- nokyselin byly pozorovány při využití kladně nabitých klastrů, ve kterých jsou aminokyseliny vázány jako ligan- dy na kation Cu²⁺ (cit.²⁰). Komplex [Cu(ref^{*})₂A-H]⁺ po- skytuje fragmenty [Cu(ref^{*})A-H]⁺ resp. [Cu(ref^{*})₂-H]⁺. Ref^{*} značí referenční enantiomer (L-prolin v citované prá- ci), A analyzovanou aminokyselinu. Autoři předpokládají, že v tříligandovém komplexu je jedna z aminokyselin vá- zána na centrální ion dvěma vazbami, druhá dvě jsou vázá- ny každá jednou vazbou a mohou být snáze odštěpeny. Fragmentace ale již poskytuje komplexy, ve kterých jsou obě aminokyseliny koordinovány dvěma vazbami. Jejich dalšímu štěpení dominuje ztráta CO₂, ztráta některého z ligandů pozorována nebyla. Použití měďnatého kationtu dovolu- je odlišit homo- a heterochirální komplexy na zá- kladě různé afinity k tomuto kationtu. Na rozdíl od před- chozích dvou citovaných prací autoři naznačují i možnost kvantifikace enantiomerů ve směsi. Jako referenční slouče- ninu použili nejen čisté enantiomery, ale i jejich směs. Míra chirální diskriminace analyzovaných aminokyselin se měnila se zastoupením enantiomerů referenční látky. Ma- ximální diskriminace bylo dosaženo pro čisté enantiomery referenční látky, žádné pak při použití racemátu.

Stejný systém (tvorba měďnatých komplexů) byl později studován s cílem dosáhnout chirálního rozlišení a kvantifikace enantiomerů aminokyselin²¹. V práci je demonstrována závislost poměru intenzit iontů se dvěma



Obr. 3. Schématické znázornění tvorby komplexů s třemi ligandy a jejich fragmentace



Obr. 4. Schématické znázornění energetických změn při analýze směsi enantiomerů

ligandy na zastoupení enantiomerů v analyzovaném vzorku. Princip stanovení poměru izomerů ve vzorku s využitím kinetické metody bude ukázán na příkladu stanovení poměru enantiomerů^{6,21–24}, ale analogicky je použitelný pro analýzu i jiných izomerních směsí.

Při ionizaci roztoku obsahujícího jednotlivé složky (dvojmocný kation – M^{2+} , referenční enantiomer – ref^* , enantiomery analyzované látky – A_R , A_S) dochází k tvorbě dvou diastereoizomerů. Tyto ionty jsou izolovány v prvním stupni hmotnostně spektrální analýzy a následně podrobeny fragmentaci (kolizi indukované disociaci) za vzniku komplexů s dvěma ligandy, viz. obr. 3. Energetické změny spojené s uvedenými procesy jsou naznačeny na obr. 4.

Je-li systém vhodný k rozlišení enantiomerů, projeví se jejich různý obsah v roztoku v odlišné hodnotě poměru intenzit:

$$R = \frac{[M(ref^*)A - H]^+}{[M(ref^*)_2 - H]^+} \quad (6)$$

kde A představuje oba enantiomery analyzované látky. Obsahuje-li roztok pouze jeden enantiomer, lze vztah (6) psát pro jednotlivé enantiomery:

$$R_R = \frac{[M(ref^*)A_R - H]^+}{[M(ref^*)_2 - H]^+} \quad (7)$$

$$R_S = \frac{[M(ref^*)A_S - H]^+}{[M(ref^*)_2 - H]^+} \quad (8)$$

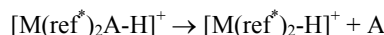
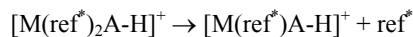
Mírou chirální selektivity je hodnota R_{chiral} :

$$R_{chiral} = R_R / R_S = \frac{[M(ref^*)A_R - H]^+ / [M(ref^*)_2 - H]^+}{[M(ref^*)A_S - H]^+ / [M(ref^*)_2 - H]^+} \quad (9)$$

Je zřejmé, že čím více se R_{chiral} liší od jedné, tím většího chirálního rozlišení je dosaženo. K určení chirální selektivity se proměřují dva roztoky obsahující vždy jeden z optických izomerů analyzované látky. Vzhledem k tomu, že se jedná o dvě měření, nelze hodnoty $[M(ref^*)_2 - H]^+$ ve vztahu (9) vykrátit, obecně jsou různé. Podle kinetické metody (při splnění odpovídajících předpokladů zmíněných výše) lze dospět ke vztahu:

$$\ln R = \frac{\Delta(\Delta G)}{RT_{eff}} \quad (10)$$

kde $\Delta(\Delta G)$ je rozdíl Gibbsových energií mezi následujícími dvěma reakcemi.



Je-li analytem čistý enantiomer R resp. S, označuje se rozdíl Gibbsových energií jako $\Delta(\Delta G)_R$ resp. $\Delta(\Delta G)_S$. Mezi uvedenými veličinami platí vztah:

$$\begin{aligned} \Delta(\Delta G) &= \Delta(\Delta G)_R \alpha + \Delta(\Delta G)_S (1 - \alpha) = \\ &= \Delta(\Delta G)_S + (\Delta(\Delta G)_R - \Delta(\Delta G)_S) \alpha \end{aligned} \quad (11)$$

a tedy

$$\ln R = \frac{\Delta(\Delta G)_S}{RT_{eff}} + \frac{[\Delta(\Delta G)_R - \Delta(\Delta G)_S] \alpha}{RT_{eff}} \quad (12)$$

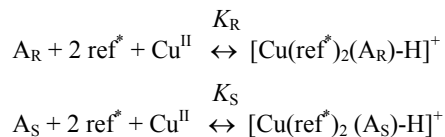
Poslední rovnice ukazuje lineární vztah mezi přirozeným logaritmem poměru intenzit a molárním zlomkem izomeru R ve směsi s izomerem S (α) (např. cit.²¹). Vyplyvá z ní, že by mělo být možné provést kvantifikaci na základě kalibrační závislosti určené ze dvou bodů (dvě různé hodnoty α); např. proměřením dvou roztoků obsahujících vždy jeden enantiomer analytu. Obvyklým postupem je použití kalibrační závislosti získané z většího počtu proměřených bodů. Pro kalibraci je v tomto případě nutné mít dva různé standardy analytu o známém obsahu enantiomerů (nemusí to nutně být dvě čisté optické formy). Po naměření kalibrační závislosti je proměřen vzorek a ze získané hodnoty R je z kalibrační závislosti určen obsah optických izomerů. Chirální analýza je možná i v případě, že dva standardy analyzované látky nejsou k dispozici. Podstata tohoto postupu spočívá v proměření neznámého vzorku postupně s oběma optickými izomery referenční látky²³. Získáme dva poměry intenzit iontů, jejichž podíl je roven veličině RR .

$$RR = \frac{[M(ref_R^*)A - H]^+ / [MA_2 - H]^+}{[M(ref_S^*)A - H]^+ / [MA_2 - H]^+} \quad (13)$$

Podobně jako pro poměr intenzit R lze ukázat, že přirozený logaritmus RR je přímo úměrný molárnímu zlomku α . Navíc pro racemát analyzované látky je RR rovno jedné ($\ln RR = 0$). U tohoto postupu by mohlo stačit proměřit jeden bod kalibrační závislosti (je potřeba jeden standard analytu o známém zastoupení enantiomerů). Druhým bodem je hodnota $\ln RR = 0$ pro racemickou směs.

Zajímavou alternativou popisované metody je zavedení tzv. fixního ligandu²⁵. Podstatou této varianty je tvorba komplexu se třemi ligandy (tedy opět tvorba trimeru – $[\text{ML}_{\text{fix}}(\text{ref}^*)\text{A-H}]^+$). Jeden z ligandů L_{fix} je však výrazně pevněji vázán na centrální kation než další dva ligandy. Důsledkem je, že nedochází k jeho odstěpování a tento fixní ligand zůstává součástí obou iontů vznikajících fragmentací ($[\text{ML}_{\text{fix}}(\text{ref}^*)\text{-H}]^+$ a $[\text{ML}_{\text{fix}}\text{A-H}]^+$). Ty se liší tím, zda obsahují enantiomer referenční látky nebo analyt. Použití fixního ligandu vede ke zjednodušení dějů, na kterých je diskutovaná metoda založena. Fixní ligand je k centrálnímu kationtu (Cu^{2+}) vázán dvěma vazbami, zatímco referenční látka a analyt pouze vazbou jednou, proto jsou snadněji odstěpovány. Při použití $[\text{M}(\text{ref}^*)_2\text{A-H}]^+$ může být jednou vazbou vázán ligand ref^* a A, druhý ligand ref^* je pak vázán dvěma vazbami, ale může nastat situace, kdy jednou vazbou jsou vázány oba ligandy ref^* a ligand A je vázán dvěma vazbami. V populaci iontů se mohou objevit i obě varianty navázání ligandů současně. Uvedená skutečnost může komplikovat stanovení (např. zhoršovat jeho selektivitu), a proto se použití fixního ligandu jeví jako zajímavá alternativa. V citované práci²⁵ byly jako fixní ligandy testovány dipeptidy až pentapeptidy. Nejlepších výsledků pro studovaný systém bylo dosaženo s tetrapeptidem.

Při proměřování kalibrační závislosti pro účely kvantifikace izomerů kinetickou metodou lze někdy pozorovat její odchylky od lineárního průběhu, což může naznačovat diskriminaci jednoho z enantiomerů (izomerů) při tvorbě trimerních iontů v plynné fázi, případně v dalších krocích hmotnostně spektrometrického měření. Popíše-li se proces vzniku trimerních iontů zjednodušeně následujícími rovnicemi, dochází k diskriminaci v případě, že $K_R \neq K_S$ (formální rovnovážné konstanty) a poměr sledovaných izomerů v kapalně fázi se liší od pozorovaného poměru v plynné fázi.



V této souvislosti navrhl M. Y. Zhang se spolupracovníky²⁶ zavést korekci, která by kompenzovala možnou diskriminaci při tvorbě trimerních iontů. Svůj postup autoři demonstrovali na analýze enantiomerů aminokyselin. Korekční faktor zjišťovali z hodnot $\ln R$ změřených pro roztok obsahující čistý L-, čistý D-izomer a pro roztok racemické směsi. Z hodnot pro čisté enantiomery určili rovnici kalibrační přímky, z níž vypočetli pro hodnotu naměřenou pro racemickou směs poměr enantiomerů v plynné

fázi. Tuto hodnotu použili ke korekci při kvantifikaci enantiomerů v analyzovaných vzorcích. Postup sice vedl ke zlepšení korelačního koeficientu, ale použití pouze tří bodů (dvou pro určení kalibrační přímky a následně třetího pro určení korekčního faktoru) může omezovat správnost korigovaných výsledků. Na představě odlišného pozorovaného zastoupení enantiomerů (izomerů) v kapalně a plynné fázi jsme založili i náš přístup ke zpracování dat ovlivněných touto skutečností, ale využito je všech naměřených bodů kalibrační závislosti. Lze odvodit, že mezi molárním zlomkem enantiomerů (obecně izomerů) v kapalně a plynné fázi existuje vztah (14):

$$\alpha_{R,g} = \frac{\frac{K_R}{K_S} \alpha_{R,l}}{1 - \left(1 - \frac{K_R}{K_S}\right) \alpha_{R,l}} \quad (14)$$

kde $\alpha_{R,g}$ je molární zlomek R-enantiomeru v plynné fázi, $\alpha_{R,l}$ v kapalně fázi. Po dosazení do lineární závislosti $\ln R$ na molárním zlomku R-enantiomeru v plynné fázi (15) dostaneme vztah použitelný pro kalibraci (16):

$$\ln R = A \alpha_{R,g} + B \quad (15)$$

$$\ln R = A \frac{\frac{K_R}{K_S} \alpha_{R,l}}{1 - \left(1 - \frac{K_R}{K_S}\right) \alpha_{R,l}} + B \quad (16)$$

Hodnoty konstant A a B i poměr K_R/K_S je nutné určit z bodů kalibrační závislosti. K výpočtu molárního zlomku R-enantiomeru v kapalně fázi lze využít vztahu (17).

$$\alpha_{R,l} = \frac{\ln R - B}{\frac{K_R}{K_S} A + (\ln R - B) \left(1 - \frac{K_R}{K_S}\right)} = \frac{1}{1 + \frac{K_R}{K_S} \left(\frac{A}{\ln R - B} - 1\right)} \quad (17)$$

Nastane-li rovnost $K_R = K_S$, je poměr konstant roven jedné a vztah (16) přechází na rovnici přímky. Aplikací navržené korekce lze dosáhnout zlepšení správnosti stanovení. Možnosti využití vztahu (16) pro hodnocení diskriminace jednoho z enantiomerů jsou v současnosti na našem pracovišti studovány.

Kinetická metoda našla uplatnění při analýze izomerů různých typů látek. Značná pozornost byla věnována chirální analýze aminokyselin. Kromě již zmíněného systému využívajícího kationtu měďnatého²¹ bylo využito kationtu nikelnatého²⁷. K dalším aplikacím diskutované metody v oblasti chirálních látek patří analýza optických izomerů peptidů²², chirálních farmaceutických substancí^{28,29}, látek s antivirálním účinkem³⁰, antibiotik²⁵, α -hydroxykyselin³¹

a cukrů³². Kromě enantiomerů byla metoda použita ke kvantifikaci peptidů lišících se pořadím aminokyselin (dipeptidů^{33,34} a tripeptidů³⁵) i odlišení peptidů obsahujících α - resp. β -aminokyselinu³⁶.

4. Realizace kinetické metody v průtokných systémech

Doposud byla kinetická metoda prováděna v tzv. statickém systému. Byl připraven roztok všech složek (analytu i chirálního selektoru), který byl kontinuálně zaváděn do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Takovéto uspořádání umožňuje sbírat a průměrovat větší počet skenů, ale jeho nevýhodou je menší prostupnost vzorků. Z tohoto důvodu byla v naší laboratoři pozornost zaměřena na dynamické systémy, kdy je vzorek nastříkán do proudu kapaliny, ke kterému je následně přimícháván roztok chirálního selektoru. Takováto modifikace umožňuje provádět průtokovou injekční analýzu i využít kinetické metody jako chirální detekce po předchozí achirální separaci analytů^{37,38}.

Při přechodu od statického k dynamickému systému bylo nutné zhodnotit vliv experimentálních parametrů (obsah jednotlivých složek v roztoku chirálního selektoru, průtok roztoku chirálního selektoru, průtok nosné kapaliny resp. mobilní fáze v případě použití HPLC) na výsledek analýzy. Ukázalo se, že jejich volba může ovlivnit R_{chiral} a že je vhodné tento vliv prověřit před použitím konkrétního systému pro zamýšlenou analýzu. Možnosti dynamických systémů byly testovány na analýze enantiomerů aminokyselin. Obr. 5 ukazuje sekvenci pěti nástríků a odpovídající hmotnostní spektrum demonstrující přítomnost sledovaných fragmentů. Analyzovanou aminokyselinou byl

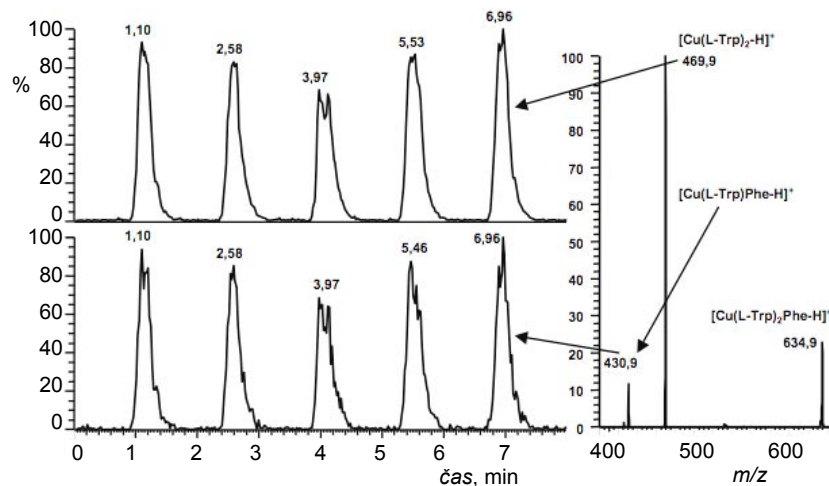
fenylalanin. Použitý systém poskytoval hodnotu $R_{\text{chiral}} = 6,7$. Pro kalibrační závislost bez korekce diskriminace bylo dosaženo hodnoty koeficientu determinace $R^2 = 0,8805$, s korekcí diskriminace dle Zhanga a spol.²⁶ $R^2 = 0,9853$ a s korekcí diskriminace založené na vztahu (17) $R^2 = 0,9926$. Výsledky měření modelových vzorků jsou shrnuty v tabulce I. Koeficienty determinace i výsledky měření ukazují, že u studovaného systému je korekce nezbytná. Neprovedení korekce vede k významným chybám. Ovšem i korekce podle Zhanga a spol. může výrazně zkreslit výsledky. Zatímco u prezentovaného stanovení došlo ke zlepšení jeho správnosti pro nižší obsahy D-fenylalaninu, pro vyšší obsahy je odchylka od daných hodnot dokonce větší než v případě, kdy se korekce neprováděla. Lepších výsledků bylo dosaženo aplikací vztahu (17). Je patrné, že došlo, oproti nekorigovaným hodnotám, ke zlepšení pro nižší i vyšší obsahy D-fenylalaninu (tab. I).

Dosažovaná správnost měření je horší než u statických systémů, ale pro rychlé rozhodnutí, zda je ve vzorku obsažen jeden či druhý enantiomer resp. racemát, je zcela postačující, přičemž rychlost analýzy je větší (pět nástríků bylo realizováno v čase kratším než 8 min, obr. 5).

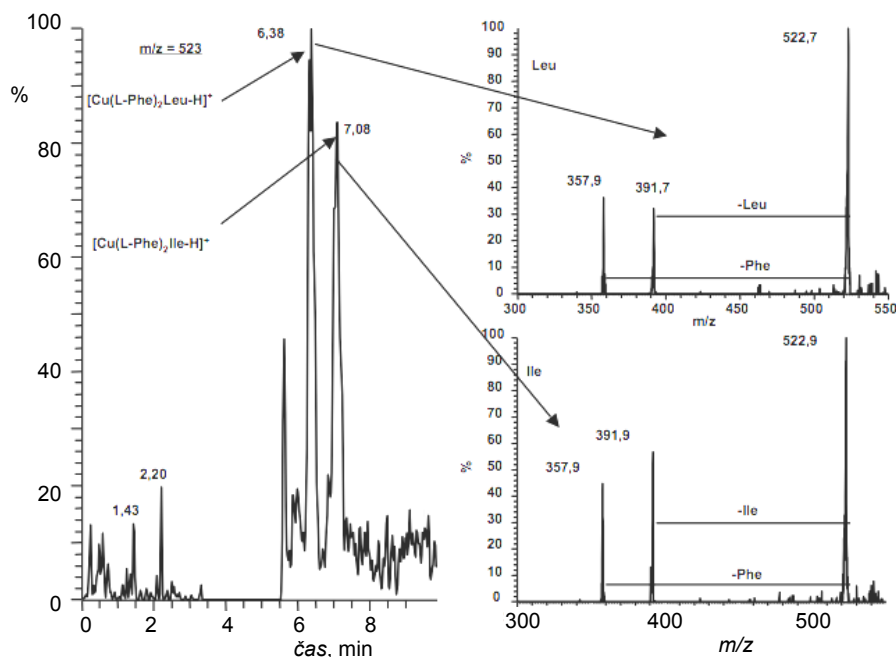
Tabulka I

Analýza směsi enantiomerů fenylalaninu

dáno	Podíl D-fenylalaninu ve směsi enantiomerů [%]		
	nalezeno		
	bez korekce	korekce dle cit. ²⁶	korekce dle (17)
1,0	–24,6	–1,0	–2,0
10,0	–0,4	4,9	5,6
90,0	83,8	99,4	88,8
99,0	87,9	116,5	99,4



Obr. 5. Průtoková analýza poměru enantiomerů fenylalaninu; směs voda : methanol (1 : 1) byla použita jako rozpouštědlo vzorku (fenylalanin, $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, nástrík 10 μl), chirálního selektoru ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ L-tryptofan}$, průtok 5 $\mu\text{l min}^{-1}$) i ako nosná kapalina (průtok 50 $\mu\text{l min}^{-1}$). Přístroj: hmotnostní spektrometr s iontovou pastí a elektrosprejem LCQ (Thermo Finnigan, USA)



Obr. 6. Achirální separace leucinu a isoleucinu s chirální detekcí enantiomerů pomocí kinetické metody; kolona: 150 mm x 4mm, Gemini C18 110A, 5 μm (Phenomenex, USA); mobilní fáze: 5 mmol l^{-1} $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (ve vodě upraveno CH_3COOH na $\text{pH}=3$) ve směsi s acetonitrilem = 95 : 5 (v/v), 0,2 ml min^{-1} ; chirální selektor (přimícháván za kolonou): $4,16 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} Cu^{2+} , $1,25 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} L-fenylalanin, voda : methanol = 1 : 1 (v/v), 30 $\mu\text{l min}^{-1}$; nástřik: 10 μl roztoku leucinu ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) a isoleucinu ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}), voda : methanol = 1 : 1 (v/v); přístroj: vysokotlaké čerpadlo Rheos 2000 (Flux Instruments, Švýcarsko), automatický dávkovač HTS PAL (CTC Analytics, Švýcarsko), hmotnostní spektrometr s iontovou pastí a elektrosprejem LCQ (Thermo Finnigan, USA)

Dynamický systém byl rovněž úspěšně aplikován při průtokové analýze enantiomerů ve směsi aminokyselin i jako nástroj chirální detekce po předchozí achirální separaci analytů kapalinovou chromatografií. I v těchto případech je metoda zcela vyhovující pro rychlý screening³⁸. Chromatografický záznam achirální separace směsi leucinu a isoleucinu včetně odpovídajících fragmentačních spekter ukazuje obr. 6. Izomerní aminokyseliny tvoří trimerní komplexy se stejnou hodnotou m/z , které nelze vzájemně izolovat hmotnostním spektrometrem před kolizí indukovanou disociací. Nezbytné je oddělení těchto aminokyselin vhodnou separační technikou. Po korekci diskriminace pomocí vztahu (17) byla pro vzorky obsahující 10 % D-izomeru nalezena průměrná hodnota 12,9 % pro D-leucin a 11,2 % pro D-isoleucin, pro vyšší obsah D-izomeru (90 %) bylo stanoveno 70,5 % D-leucinu a 85,8 % D-isoleucinu (průměry byly určovány ze tří měření). Důvodem horších výsledků v případě leucinu může být menší chirální selektivita použitého systému pro tuto aminokyselinu ($R_{\text{chiral}}(\text{leucin}) = 1,9$; $R_{\text{chiral}}(\text{isoleucin}) = 3,4$).

Použití dynamických systémů otvírá nové možnosti aplikace kinetické metody. Ve srovnání se statickými systémy jsou chyby určení poměru enantiomerů zatím větší, ale je dosahováno významného urychlení analýzy. Zajímavá je také možnost aplikace studované metody jako „chirálního detektoru“ v HPLC popř. v CE.

5. Závěr

Řada příkladů dokazuje aplikovatelnost kinetické metody při rozlišení izomerů včetně izomerů optických. Prezentovaná modifikace založená na dynamických systémech se ukázala jako vhodná pro rychlé analýzy, kdy je např. nutné rozhodnout, který enantiomer je přítomen či zda se jedná o racemát. Statická i dynamická varianta měření vyžaduje zlepšení přesnosti a správnosti. Doposud v těchto parametrech kinetická metoda nemůže konkurovat separačním metodám. Jednou z možností, jak zlepšit parametry měření, je zmíněné využití fixního ligandu, ale je nutné hledat i další alternativy. Nabízí se několik cest. Je možné testovat jiné chirální systémy. Doposud převažoval systém založený na tvorbě trimerních komplexů, ale vhodným by mohl být obecně i jiný systém, který bude poskytovat dvě fragmentační cesty, jejichž uplatnění během kolizí indukované disociace bude podmíněno poměrným zastoupením analyzovaných izomerů ve vzorku. Další možností je zvýšit intenzitu prekurzorového iontu (v popsaných systémech trimerního komplexu). Předběžné experimenty provedené v naší laboratoři naznačují, že jednou z cest je využití nanoelektrospreje. Ukázalo se, že pro zvolený systém lze dosáhnout pomocí nanoelektrospreje o jeden až dva řády vyšší intenzity prekurzorového iontu

oproti elektrospreji, což ve svém důsledku vede i k vyššímu signálu fragmentů, jejichž intenzita se měří.

Další výzkum ukáže, zda hmotnostně spektrometrická analýza izomerů založená na kinetické metodě bude moci konkurovat separačním metodám nejen rychlostí analýzy, kterou nabízí již dnes, ale i přesností a správností stanovení poměru izomerů.

Výzkum byl podpořen Fondem rozvoje vysokých škol (G6 75/2003) a MŠMT ČR (MSM6198959216).

LITERATURA

- Eriksson T., Björkman S., Höglund P.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 57, 365 (2001).
- Rouhi M.: Chem. Eng. News 83, 122 (2005).
- Cooks R. G., Kruger T. L.: J. Am. Chem. Soc. 99, 1279 (1977).
- Cooks R. G., Wong P. S.: Acc. Chem. Res. 31, 379 (1998).
- McLuckey S. A., Cameron D., Cooks R. G.: J. Am. Chem. Soc. 103, 1313 (1981).
- Zheng X., Cooks R. G., Augusti R., Tao W. A., v knize: *The Encyclopedia of Mass Spectrometry, Theory and Ion Chemistry* (Gross M. L., Caprioli R., Armentrout P. B., ed.), sv. I, kap. The kinetic method: thermochemical determinations and chiral analysis. Elsevier, Amsterdam 2003.
- Drahoš L., Vékey K.: J. Mass Spectrom. 38, 1025 (2003).
- Cooks R. G., Koskinen J. T., Thomas P. D.: J. Mass Spectrom. 34, 85 (1999).
- McLuckey S. A., Cooks R. G., Fulford J. E.: Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics 52, 165 (1983).
- Wu Z. C., Fenselau C.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 3, 863 (1992).
- Cheng X. H., Wu Z. C., Fenselau C.: J. Am. Chem. Soc. 115, 4844 (1993).
- Wenthold P. G., Squires R. R.: J. Am. Chem. Soc. 116, 11890 (1994).
- Zheng X., Cooks R. G.: J. Phys. Chem., A 106, 9939 (2002).
- Armentrout P. B.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11, 371 (2000).
- Drahoš L., Vékey K.: J. Mass Spectrom. 34, 79 (1999).
- Armentrout P. B.: J. Mass Spectrom. 34, 74 (1999).
- Majumdar T. K., Clairet F., Tabet J. C., Cooks R. G.: J. Am. Chem. Soc. 114, 2897 (1992).
- Shen W., Wong P. S. H., Cooks R. G.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 11, 71 (1997).
- Vékey K., Czira G.: Anal. Chem. 69, 1700 (1997).
- Tao W. A., Zhang D., Wang F., Thomas P. D., Cooks R. G.: Anal. Chem. 71, 4427 (1999).
- Tao W. A., Zhang D., Nikolaev E. N., Cooks R. G.: J. Am. Chem. Soc. 122, 10598 (2000).
- Tao W. A., Cooks R. G.: Chem. Int. Ed. 40, 757 (2001).
- Tao W. A., Clark R. L., Cooks R. G.: Anal. Chem. 74, 3783 (2002).
- Tao W. A., Cooks R. G.: Anal. Chem. 75, 25A (2003).
- Wu L., Cooks R. G.: Anal. Chem. 75, 678 (2003).
- Zhang M. Y., Kerns E., McConnell O.: *51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, 8–12 June 2003*, Proceedings (Sjöberg J., Lilly C., Thomas T., Cole R. B., ed.), Poster No. A031172. ASMS, Montreal 2003.
- Zhang D., Tao W. A., Cooks R. G.: Int. J. Mass Spectrom. 204, 159 (2001).
- Tao W. A., Gozzo F. C., Cooks R. G.: Anal. Chem. 73, 1692 (2001).
- Vasconcellos A. D., Rodinei A.: Tetrahedron: Asymmetry 16, 1881 (2005).
- Tao W. A., Wu L., Cooks R. G., Wang F., Begley J. A., Lampert B.: J. Med. Chem. 44, 3541 (2001).
- Tao W. A., Wu L., Cooks R. G.: Chem. Commun. 2000, 2023.
- Augusti D. V., Carazza F., Augusti R., Tao W. A., Cooks R. G.: Anal. Chem. 74, 3458 (2002).
- Tao W. A., Wu L., Cooks R. G.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 12, 490 (2001).
- Schug A. K., Lindner W., Lemr K.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15, 840 (2004).
- Wu L., Lemr K., Aggerholm T., Cooks R. G.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14, 152 (2003).
- Wu L., Meurer C. E., Young B., Yang P., Eberlin M., Cooks R. G.: Int. J. Mass Spectrom. 231, 103 (2004).
- Lemr K., Ranc V., Fryčák P.: *56. sjezd chemických společností, Ostrava, 6. – 9. září 2004*, Sborník – Chem. Listy 98, 605 (2004), str. 605, přednáška 15L-11. ČSCH, Praha 2004.
- Lemr K., Ranc V., Fryčák P., Bednář P.: *53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio, 5–9 June 2005*, Proceedings (Sjöberg J., Lilly C., Watson B., Thomas T., Murray K. K., ed.), Poster No. A051045. ASMS, San Antonio 2005.

V. Ranc, P. Fryčák, L. Müller, P. Bednář, and K. Lemr (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic): **Recognition of Isomers by Mass Spectrometry Using the Kinetic Method**

The principle of the Cooks' kinetic method and its application to analysis of isomeric mixtures are described. The kinetic method based on mass spectrometric measurements is applied to discrimination of isomers of various types of compounds (amino acids, peptides, sugars, pharmaceuticals, etc.). So far this method has been used in static systems (with constant analyte concentrations in the course of analytical run). A modification for dynamic systems (flow injection analysis, HPLC) is presented. The accuracy of determination in both static and dynamic systems can worsen due to different ratios of the isomers in liquid and gas phases. A procedure for correction of this phenomenon is also demonstrated.