

Kukurbituriilien rakennekemia ja
toiminta nanoreaktoreina
ioniliikkuvuusmassaspektrometrialla
tutkittuna

Pro gradu-tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

31.05.2023

Mira Peurala

Tiivistelmä

Projektissa tutkittiin ioniliikkuvuusmassaspektrometrialla kukurbit[6]uriilia ja kukurbit[7]uriilia, niiden rakennetta ja toimimista isäntämolekyylinä erilaisissa komplekseissa. Mittauksissa käytettiin Agilent 6560 IM-Q-TOF and Synapt G5-S massaspektrometrejä. Komplekseissa vierasmolekyyleinä käytettiin useita alkalimetalleja, alkyyliamiineja sekä syklisiä amiineja. Amiinikomplekseille määritettiin molemmilla laitteilla törmäyspoikkipinta-alat ja selvitettiin olivatko kompleksit *endo*-vai *eksokomplekseja*. Myös kompleksien pilkkoutumista tutkittiin törmäysaktivoinnilla.

Avainsanat: supramolekyyliekemia, isäntä-vieraskemia, kukurbituriilit, ioniliikkuvuus, massaspektrometria, *eksokompleksi*, *endokompleksi*

Abstract

In the project cucurbit[6]uril and cucurbit[7]uril, their structure and acting as host molecules with ion mobility mass spectrometry was studied. Measurements were performed with two instruments Agilent 6560 IM-Q-TOF and Synapt G5-S. As guest molecules, different alkali metals, alkylamines and cyclic amines were used. Collision cross sections for the complexes were measured. Both instruments were used to identify if complex was *endo*- or *exo* complex. Complexes were also activated and the dissociation of the complexes was studied by both instruments.

Keywords: supramolecular chemistry, host-guest chemistry, cucurbiturils, ion mobility, mass spectrometry, *endo* complex, *exo* complex

Esipuhe

Pro gradu työn mittaukset tehtiin 2018 syksyn ja 2019 alkuvuoden aikana. Mittaukset suoritettiin Jyväskylässä ja Freyen yliopistossa Berliinissä. Tutkimusaiheen sain ohjaajaltani ja se osoittautui erittäin kiinnostavaksi työstää.

Suuret kiitokset ohjaajalleni Elina Kaleniukselle ohjauksesta, kärsivällisyydestä ja tärkeistä neuvoista tutkimusta tehdessä ja perehdyttämisestä massaspektrometrien maailmaan. Olen myös suuresti kiitollinen toiselle Pro gradun tarkastajista professori Kari Rissaselle paikasta tutkimusavustajana syksyllä 2018, sekä Berliinin vierailun mahdollistamisesta. Kiitokset myös professori Christoph Schalleylle ja hänen tutkimusryhmälleen avusta ja mahdollisuudesta tehdä tutkimusta Freyen yliopistossa. Valtavat kiitokset myös muille Jyväskylän yliopiston työntekijöille avusta ja tuestanne, erityisesti Johannalle ja Anninalle. Kiitos myös Jyrki, että autoit minut läpi vaikeuksien ja että olit tukenani saattaakseni tämän projektin loppuun asti. Ilman perheen ja ystävien tukea en olisi tässä pisteessä, joten erityinen kiitos kuuluu myös kaikille teille.

Jyväskylässä 17. toukokuuta 2023

Mira Peurala

Sisältö

Tiivistelmä	i
Abstract	ii
Esipuhe	iii
Lyhenteet	vii
<u>Kirjallinen osa</u>	1
1 Johdanto	1
2 Supramolekyyliekemia	2
2.1 Vuorovaikutukset	2
2.2 Isäntä-vieraskemia	5
2.3 Avain-lukkoperiaate	6
2.4 Sovelluskohteet	8
3 Kukurbituriilit	11
3.1 Synteesi ja eristys	11
3.2 Rakenne ja kompleksoituminen	13
3.3 Käyttötarkoitukset	15
4 Ioniliikkuvuusmassaspektrometria	17
4.1 Massaspektrometria	17
4.1.1 Ionisaatiomenetelmät	18
4.1.2 Massa-analyssaattorit ja detektorit	22
4.2 Ioniliikkuvuusmassaspektrometria	28

4.3	Törmäyspoikkipinta-ala	32
4.4	Sovelluskohteet	35
	<u>Kokeellinen osa</u>	36
5	Johdanto	36
6	Näytteiden valmistus ja laitteistot	38
6.1	Näytteiden valmistus	38
6.2	Agilent 6560 Ion Mobility ESI-QTOF-massaspektrometri	39
6.3	Synapt G2-S-massaspektrometri	41
7	Tulokset	44
7.1	Kukurbituriilien alkalimetallikompleksit	44
7.2	Kukurbituriilien amiinikompleksit	49
7.2.1	Kukurbit[6]uriilin alkyyliamiinikompleksit	49
7.2.2	Kukurbit[6]uriilin alkyyliamiinikompleksien törmäysaktivointi	56
7.2.3	Kukurbit[7]uriilin alkyyliamiinikompleksit	59
7.2.4	Kukurbit[6]uriilin ja syklisten amiinien kompleksit	60
7.2.5	Kukurbit[7]uriilin DBOA-kompleksi	63
8	Johtopäätökset	67
	Viitteet	69
	Liitteet	74

Lyhenteet

NMR	Nuclear magnetic resonance, ydinmagneettinen resonanssi
NOE	Nuclear overhauser effect
CBn	Kukurbit[n]uriili, kun n=5,6,7,..jne
DBOA	2,3-diatsabisyklo[2.2.2]okt-2-eenimetyyliamiini
HPLC	High performance liquid chromatography, korkean erotuskyvyn nestekromatografia
UPLC	Ultra performance liquid chromatography, ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia
EI	Elektroni-ionisaatio
ESI	Electrospray ionization, sähkösumutus-ionisaatio
Q-TOF	Quadrupole-time of flight, kvadrupoli-lentoaikamassaspektrometri
DT	Drift time, Drift-aika
DTIM	Drift tube ion mobility, Driftputki - ioniliikkuvuus
TWIMS	Travelling wave ion mobility spectrometry, travelling wave-ioniliikkuvuus-spektrometria
CCS	Collision cross section, törmäyspoikkipinta-ala
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
GC	Gas chromatography, kaasukromatografia
UV	Ultravioletisäteily
IR	Infrapunasäteily
TOF	Time of flight, lentoaika
MS	Massaspektrometri
QIT	Kvadrupoli-ioniansa
MCP	Microchannel plate, mikrokanavalevyilmaisin
ADC	Analog to digital-muuntaja
PDA	Photodiode array detector, fotodiodijärjestelmädetektori
FAIMS	Field asymmetric waveform ion mobility
TIMS	Trapped ion mobility spectrometry
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance
RF	Radiotaajuussäteily
RSD	Relative standard deviation, suhteellinen standardipoikkeama

CID	Törmäysaktivointi
IM-MS	Ioniliikkuvuusmassaspektrometria

Kirjallinen osa

1 Johdanto

Supramolekyylit koostuvat molekyyleistä, jotka rakentuvat heikkojen vuorovaikutusten varaan, ja joiden rakenne voi muuttua vaatimatta yhdenkään kovalenttisen sidoksen katkeamista. Supramolekyylien rakennetta voidaan tutkia vahingoittamatta molekyylin sisäisiä ja molekyylien välisiä heikkoja vuorovaikutuksia, kun käytetään pehmeää ionisointimenetelmää, esimerkiksi sähkösumutusionisaatiota liitettynä ioniliikkuvuusmassaspektrometriaan. Teoreettisessa osuudessa esitellään supramolekyylikemian perusteita, kukurbituriilia ja sen ominaisuuksia isäntämolekyylinä sekä ioniliikkuvuusmassaspektrometriaa alkaen massaspektrometrian esittelyllä ja edeten ioniliikkuvuuden määrittämisestä törmäyspoikkipinta-alan kautta aina sovelluksiin. Kokeellisessa osassa esitellään tutkimuslaitteistot Agilent 6560 Ion Mobility ESI-QTOF ja Synapt G2-S ja niillä tehdyt ioniliikkuvuus- ja törmäysaktivointimittaukset eri kukurbituriilikomplekseille. Kukurbituriilien lisäksi näytteissä oli vierasmolekyyleinä maa-alkalimetalleja sekä erilaisia amiineja.

2 Supramolekyylikemia

Supramolekyylikemia tutkii kemiaa, jossa molekyylien välillä ei ole kovalenttisia vuorovaikutuksia. Atwoodin ja Steedin kirjassa *Supramolecular Chemistry*¹ kerrotaan hyvin mitä supramolekyylikemia on ja tämä luku pohjautuu hyvin pitkälti tähän lähteeseen. Supramolekyylikemiksi kutsutaan systeemiä, jossa kaksi tai useampi molekyyliä on sitoutuneena toisiinsa heikoilla vuorovaikutuksilla. Luonnosta voidaan löytää monia supramolekulaarisia systeemejä, esimerkiksi entsyymit ja substraatit. Orgaanisessa kemiassa usein iso synteettisesti valmistettu molekyyli on tehty useiden vaiheiden kautta ja vaiheet ovat usein irreversiibeileitä, eli ne eivät palaudu, ellei sidoksia rikota. Supramolekyylikemiassa suuriakin molekyylien yhteenliittymiä rakennetaan vain muutamien vaiheiden kautta ja vaiheet ovat usein reversiibeileitä. Reversiibelit reaktiot voivat palautua ja lopullinen supramolekyyli eli molekyylien yhteenliittymä on usein supramolekyylin pysyvin muoto. Reaktio voi palautua edelliseen vaiheeseen, mikäli supramolekyyli ei ole pysyvä kyseisissä olosuhteissa ja palautumisen jälkeen voi muodostua entistä pysyvämpi molekyylien yhteenliittymä. Perinteisessä orgaanisen kemian synteeseissä irreversiibelit reaktiot eivät josta, jos muodostunut molekyyli ei olekaan pysyvin tai jos haluttua molekyyliä ei saadakaan, vaan usein joudutaan aloittamaan alusta. Vaikka sidokset ovat tässä tapauksessa usein kovalenttisia, molekyyli ei välttämättä ole silti pysyvä, jos se ei ole pysyvin muoto kyseisissä olosuhteissa, vaan se voi hajota nopeastikin eikä enää välttämättä tee uusia sidoksia.

2.1 Vuorovaikutukset

Supramolekyyliit voivat olla sitoutuneena monilla erilaisilla heikoilla vuorovaikutuksilla ja erilaisia vuorovaikutuksia voi esiintyä samanaikaisesti eri molekyylien välillä ja niiden ympäristön välillä.¹ Supramolekyyleissä esiintyviä vuorovaikutuksia ovat mm. kahden ionin-, ionin ja dipolin-, kahden dipolin-, kationin/anionin ja piisidoksen sekä kahden piisidoksen väliset vuorovaikutukset. Muita varsin yleisiä vuorovaikutuksia supramolekyyleissä ovat esimerkiksi vetysidos ja Van der Waalsin vuorovaikutukset.

Taulukossa 1 löytyy vuorovaikutusten voimakkuuksia ja esimerkkejä. Kahden ionin välisiä vuorovaikutuksia on esimerkiksi kiinteissä suoloissa. Ionin ja dipolin väli-

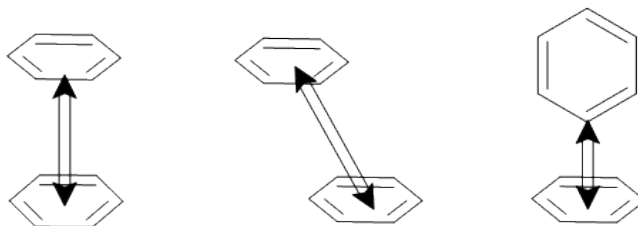
nen vuorovaikutus vallitsee esimerkiksi veden ja ionin välillä tai kationin ja makrosyklin välillä. Kaksi dipolia voi olla vuorovaikutuksessa keskenään, kun dipolin positiivinen osittaisvaraus on vuorovaikutuksessa toisen dipolin negatiivisen osittaisvarauksen kanssa. Tällainen vuorovaikutus voidaan löytää esimerkiksi kahden sopivasti toisiinsa nähden asettuneen karbonyyliryhmän tai vetykloridien väliltä. Vetysidos on eräänlainen versio dipoli-dipolivuorovaikutuksesta ja siinä poolisuus on suuressa roolissa. Vetysidoksessa kovalenttisesti sitoutuneeseen elektronegatiiviseen atomiin tai elektroneja puoleensa vetävään ryhmään sitoutunut vety on vuorovaikutuksessa toiseen elektronegatiiviseen atomiin tai elektroneja puoleensa vetävään ryhmään. Veden lisäksi esimerkiksi DNA:ssa aminohappojen välillä on vetysidoksia, jotka pitävät vastinjuosteet yhdessä. Vaikka yksittäinen vetysidos ei ole kovin vahva verrattuna esimerkiksi kovalenttiseen sidokseen, niin niiden suuri määrä vahvistaa vaikutusta paljon.

Taulukko 1: Vuorovaikutustyyppinä, niiden voimakkuuksia sekä esimerkkejä.¹⁻⁴

Vuorovaikutus	Voimakkuus (kJ/mol)	Esimerkki
Ioni-ioni	100–350	NaCl
Ioni-dipoli	50–200	Alkalimetallikationi ja makrosykli
Dipoli-dipoli	5–50	Kaksi karbonyyliryhmää
Vetysidos	4–120	Emäsparit DNA:ssa
Kationi- π -sidoks	50–150	Alkalimetallikationi ja bentseenirengas
Anioni- π -sidoks	20–70	Fluorianioni ja bentseenirengas
Kaksi π -sidosta	2–30	Kaksi bentseenirengasta

Kationin ja piisidoksen välisiä vuorovaikutuksia löytyy esimerkiksi siirtymämetallien tai alkalimetallikationien ja aromaattisten hiilivetyjen väliltä. Pii-sidoksen elektronitiheys vuorovaikuttaa siirtymämetallien vajaiden d-orbitaalien kanssa.¹ Anionin ja pii-sidoksen välisessä vuorovaikutuksessa anionin ja elektroniköyhän aromaattisen yhdisteen välillä tapahtuu elektronitiheyden siirtoa anionilta aromaattiselle yhdisteelle.¹ Kahden piisysteemin välinen vuorovaikutus perustuu elektrostaattiseen vetovoimaan. Hunter *et al.*⁴ ovat tutkineet kahden piisysteemin välistä vuorovaikutusta kahden bentseenirenkaan välillä. Kahden bentseenimolekyylin välinen vuorovaikutus on hylkivää, mikäli ne ovat täysin kohdakkain niin sanotussa voileipäarakenteessa. Bentseenirenkaiden asettuminen toisiinsa nähden on havainnollistettu kuvassa 1 ja kuvassa vasemmanpuoleinen asetelma kuvaa kohdakkasta

voileipärakennetta. Jos bentseenirenkaat ovat sijoittuneet päällekkäin, mutta toisiinsa nähden hieman limittäin, niin bentseenirenkaan sisäosan positiivinen osittaisvaraus vetää puoleensa sen kanssa kohdikkain olevan toisen bentseenirenkaan ulkoreunan negatiivista elektronipilvettä. Kyseinen esimerkki on lomittainen eli niin sanottu parallel displaced-rakenne ja on kuvassa keskimmäisenä. Kolmas mahdollinen rakenne on edge to face, jossa toinen renkaista on kohtisuorassa toista rengasta vastaan ja renkaan keskiosan positiivisen keskittymän sekä toisen renkaan reunan negatiivisen elektronipilven välillä on piisysteemien välinen vuorovaikutus.⁴ Kyseinen asetelma on kuvassa oikeanpuoleisena.



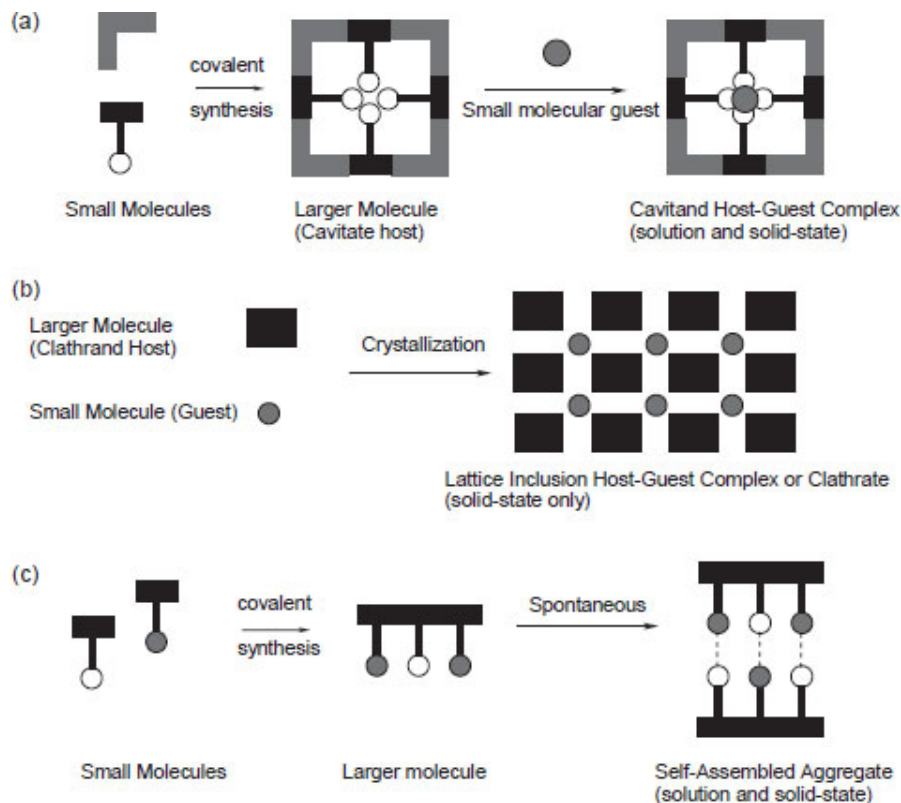
Kuva 1: Bentseenirenkaiden kolme erilaista sijoittumista toisiinsa nähden ja vuorovaikutus toisiinsa nuolilla havainnollistettuna. Vasemmalla kohdakkainen voileipärakenne, keskellä lomittainen eli parallel displaced-rakenne ja oikealla edge to face-rakenne

Van der Waalsin vuorovaikutus on tärkeä supramolekyyleillä etenkin inklusiokomplekseissa. Vuorovaikutus muodostuu, kun kaksi tai useampi neutraali molekyyli tulevat lähelle toisiaan ja niiden varausjakauma polarisoituu toisen molekyylin mukaan, niin että toisiaan lähekkäin ovat erimerkkiset osittaisvaraukset. Inklusiokomplekseissa isäntä- ja vierasmolekyylien lähekkäin toisiaan olevat reunat polarisoituvat toistensa vaikutuksesta vastakkaisvarauksellisiksi. Van der Waalsin vuorovaikutus heikkenee tehokkaasti etäisyyden kasvaessa säteen kuudennen potenssin mukaan.¹ Molekyylit yrittävät maksimoida Van der Waalsin voimat ja pakkautuvat erityisesti kiinteässä olomuodossa mahdollisimman tiiviisti yksinkertaistaen rakennettaan. Tämän takia molekyylit muodostavat usein usean molekyylin rakenteita esimerkiksi dimeerejä ja trimeerejä. Steed ja Atwood¹ havainnollistavat tätä pakkautumista Tetris-pelillä, kun molekyylit pyrkivät menemään toistensa kanssa niin limittäin, ettei tyhjää tilaa jää jäljelle.

2.2 Isäntä-vieraskemia

Supramolekyylikemiasta puhuttaessa törmätään hyvin nopeasti termiin isäntä-vieraskemia. Kompleksissa isäntä on yleensä isompi molekyyli, ioni tai molekyyli-ryhmittymä ja vieras esimerkiksi pienempi orgaaninen molekyyli, ioni, metalli tai ioni-ligandiyhdistelmä.⁵ Isännän ja vieraan kiinnittyminen tapahtuu sidoskeskusten välillä. Isännän sidoskeskuksia kutsutaan kokoaviksi (convergent) ja vieraan sidoskeskuksia laajentuviksi (divergent).¹ Isäntien sidoskeskuksia voivat olla esimerkiksi Lewis-emäksiset atomit ja vetysidoksen luovuttajat, kun taas vastaavasti vieraiden sidoskeskuksia voivat olla esimerkiksi metalliatomi, joka on Lewis-happo tai vetysidoksen vastaanottava halidi-anioni.¹ Isäntä-vieraskemiaa esiintyy kaikissa olomuodoissa kiinteänä, nesteinä ja kaasuna. Kompleksi ei kuitenkaan välttämättä pysy koossa kaikissa kolmessa olomuodossa. Esimerkiksi klatraatit muodostavat komplekseja kiinteässä olomuodossa, mutta kompleksit hajoavat liuetessaan liuottimeen.¹ Esimerkkejä isännistä, jotka muodostavat komplekseja sekä nesteessä että kiinteässä olomuodossa ovat esimerkiksi kruunueetterit, kryptandit, karserandit, sferandit ja kryptofaanit.¹

Isäntä-vieras yhdisteet voidaan jaotella kavitandeihin ja klatrandeihin rakenteen mukaan.¹ Kavitaandeissa on usein ontelo, johon vieras voi sitoutua. Kavitaandikomplekseja kutsutaan kavitaateiksi ja isäntäesimerkkinä mainittakoon syklodekstriinit, joiden vieraana voi olla esimerkiksi p-hydroksibentsoehappo¹ ja toisena esimerkinä kaliksareenit joiden vieraana voi olla esimerkiksi tolueeni¹. Klatrandikomplekseja kutsutaan klatraateiksi ja usein ne muodostuvat useammasta molekyylistä, jotka muodostavat yhdessä vieraalle kiinnittymiskohdan. Klatraateissa vieraan kiinnittymiseen tarkoitettu kohta on isännän ulkopinnalla. Klatraatti voi olla esimerkiksi jääkiteiden väliin jäänyt metaani¹ ja syklotriveratryleenin vieraana voi olla esimerkiksi asetoni¹. Kuvassa 2 on esitelty kavitaatin, klatraatin ja aggregaatin eroja. Kuvassa b-kohdassa esitetään hyvin, miten klatraateissa eli klatrandien ja vieraiden muodostamissa komplekseissa vierasmolekyylit sitoutuvat useamman molekyylin väleihin jääneisiin koloihin. Kavitaateissa taas (kuvan a-kohta) vierasmolekyyli on sitoutunut heikoilla vuorovaikutuksilla isomman isäntämolekyylin sisälle. Kolmas tyyppi (kuvan c-kohta) on itsejärjestäytynyt (self-assembled) kompleksi. Kompleksilla ei ole varsinaista isäntää tai vierasta, vaan kaksi yhdistettä sitoutuu toisiinsa heikoilla vuorovaikutuksilla. Esimerkiksi DNA:n



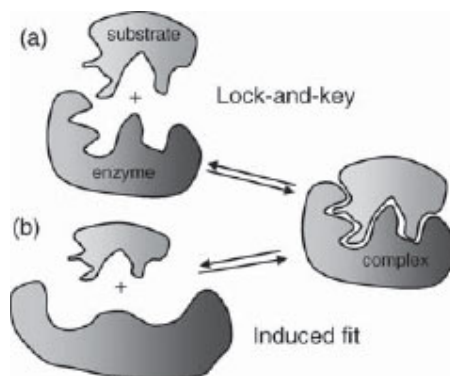
Kuva 2: Kavitaattien ja klatraattien muodostumisen erot. Lisäksi kuvassa näkyy kuinka itsejärjestäytyvän kompleksin muodostuminen eroaa merkittävästi kahdesta muusta. Kuva on otettu lähteestä Steed, J, W.; Jerry L. Atwood, J, L., *Supramolecular Chemistry*, 2. painos, Wiley, Iso-Britannia, 2009 ja kuvan käyttöön on saatu lupa, Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

vastinjuosteet on itsejärjestäytynyt kompleksi, jossa juosteet sitoutuvat toisiinsa pääasiassa vetysidoksilla.

2.3 Avain-lukkoperiaate

Supramolekyylin muodostavat isäntä ja vieras, joita voi olla yksi tai useampia. Isäntä ja vieras sitoutuvat heikoilla vuorovaikutuksilla ja niiden sitoutumista toisiinsa voidaan kuvata avain-lukkoperiaatteella. Emil Fischer esitti avain-lukkosysteemin vuonna 1894, kun hän kuvasi sillä substraatin sitoutumista entsyymiin.⁶ Heikoilla vuorovaikutuksilla sitoutuminen vaatii isännän ja vieraan yhteensopivuutta. Syklodekstriini on ollut suosittu molekyyli avain-lukko-periaatteen tutkimisessa.⁷ Syklodekstriini muodostaa esimerkiksi kompleksin klooribentseenin kanssa, mutta ei bromibentseenin kanssa.⁷ Myös kiraalisuus vaikuttaa yhteensopivu-

teen. Kuvassa 3 avain-lukkoperiaatetta on havainnollistettu entsyymin ja substratin avulla. Kuvassa esitetään, että isännän ja vieraan rakenteet voivat muuttua niiden sitoutuessa toisiinsa. Kyseessä on Daniel Koshlandin indusoitu sopivuusteoria (induced fit theory).¹ Tämä sama ilmiö voi tapahtua myös muilla isäntä-vierasvaihtoehdoilla.



Kuva 3: Avain-lukkoperiaate, jossa isäntä ja vieras muotoutuvat uudestaan sitoutuessaan Daniel Koshlandin (induced fit) teorian mukaan. Kuva on otettu lähteestä Steed, J. W.; Jerry L. Atwood, J. L., *Supramolecular Chemistry*, 2. painos, Wiley, Iso-Britannia, 2009 ja kuvan käyttöön on saatu lupa, Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

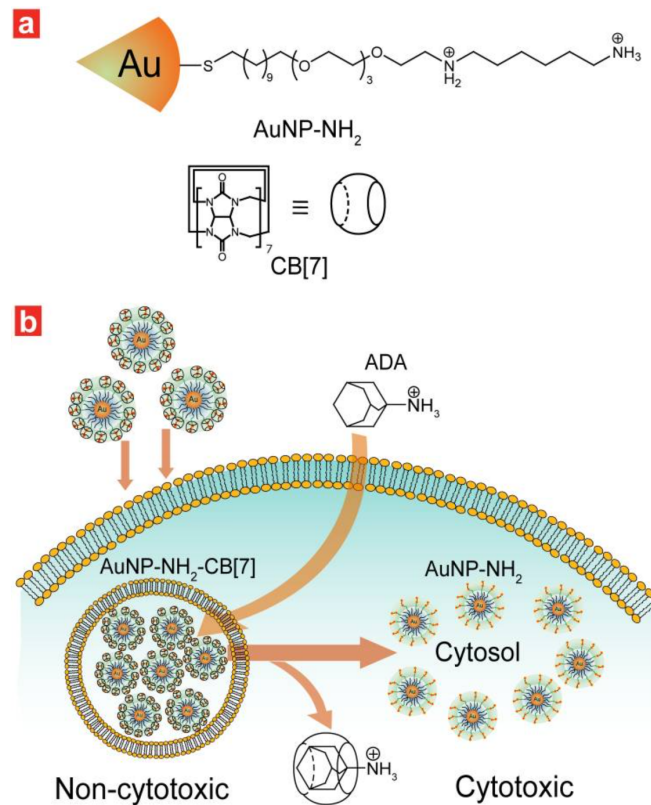
Avain-lukkosysteemissä vuorovaikutustyyppi vaikuttaa siihen, miten hyvin isännän ja vieraan tulee sopia yhteen geometrisesti. Coulombisessa vuorovaikutuksessa vahvuuteen vaikuttaa etäisyys heikentäen sitä kääntäen verrannollisesti r^{-1} , kun taas dispersiivisessä vuorovaikutuksessa etäisyys vaikuttaa jo paljon enemmän ja pienenee jopa r^{-6} mukaan.⁸ Kyseinen tutkimus on tehty liuosfaasissa. Coulombinen vuorovaikutus sallii enemmän epäsuhtaisia kohtia isännän ja vieraan välillä, mahdollistaen silti suhteellisen voimakkaan vuorovaikutuksen, kun taas dispersiivisellä vuorovaikutuksella kiinni pysyvien isännän ja vieraan tulee olla huomattavan paljon paremmin toisilleen yhteensopivat. Vetysidoksessa sidoslujuuteen vaikuttaa paljon myös luovuttajan ja vastaanottajan orientaatio toisiinsa nähden. Sidosenergiaan vaikuttaa myös, mikäli isäntä ja vieras muuttavat muotoaan sitoutuessaan. Esimerkiksi kaliks[6]areenin ontelo supistuu jos ontelossa oleva vieras on pieni ja venyy suuremmaksi jos vieras on suuri.⁸ Kapselimaisten ontelollisten isäntämolekyylien liuostutkimuksissa on havaittu ontelon täyttöasteen vaikuttavan sidosenergiaan. Optimaalinen täyttöaste on määritelty olevan $55 \pm 9 \%$.⁹

2.4 Sovelluskohteet

Supramolekyylidemian lähtökohtana ovat luonnon systeemit ja niitä on pyritty syntetisoimaan laboratorio-olosuhteissa. Luonnon systeemeistä on myös pyritty etenemään uudenslaisiin yhdisteisiin, jotka silti edelleen muistuttavat luonnossa tavattuja muotoja. Nilotpal Barooah *et al.* listaavat review-artikkelissaan¹⁰ useita supramolekyyliden isäntä-vieraskemian sovelluskohteita: optoelektroniset ja elektroniset sovellukset, kemiallisten olosuhteiden muutoksien havaitseminen, supramolekulaariset katalyytit, nanokapselit, lääkeaineiden kuljetus ja supramolekyyliden rakenteiden suunnittelu. Das *et al.* kertovat artikkelissaan¹¹ kukurbituriiliden sovelluksista lääketieteellisessä kemiassa ja biokemiassa. Artikkelin mukaan makrosykliset isäntämolekyylit kuten kukurbituriilit syklodekstriinit ja kaliksareenit ovat käyttökelpoisempia lääkkeiden kuljetukseen kuin jotkut nanokokoluokan vastaavat kuljettajat esimerkiksi liposomit, dendriimerit, misellit, hiilinanoputket ja hydrogeelit. Syiksi luetellaan että makrosyklit ovat esimerkiksi lämpö- ja kemialliselta pysyvyydeltään kestäviä, niitä on useita eri kokoja saatavilla ja ne ovat bioyh-teensopivia ihmisen elimistössä. Toisin sanoen ne eivät ole esimerkiksi myrkyllisiä ihmiselle ja monet ovat myös veteen liukenevia. Makrosyklit ottavat sisään ja vapauttavat lääketieteellisen komponentin ei-kovalenttisesti ja tämä on ollut hyvin paljon kiinnostusta herättävä ominaisuus.¹¹ Das *et al.* artikkelissaan kertovat, että makrosykleistä syklodekstriinit ovat yleisimpiä niiden helpon saatavuuden takia, mutta ne eivät muodosta kovin helposti komplekseja lääkeaineiden kanssa, niiden affiniteetti on matala ja ne pitää kuljettaa elimistöön ruuansulatuskanavassa. Kukurbituriiliden sitoutumisvakiot (binding constant) ovat useiden lähteiden mukaan useita kertaluokkia korkeampia kuin syklodekstriinien vastaavat.¹¹

Kuvassa 4 esimerkki supramolekyyliden toiminnasta lääkkeiden kuljettajana. Isäntänä toimiva kukurbituriili CB7 muodostaa solulle myrkyllisen lääkeaineen AuNP-NH₂ ympärille kuoren. Supramolekyyliden muodostavat isäntämolekyylit ja vieras näkyvät kuvassa a-kohdassa. Muodostunut supramolekyylit on solulle myrkytön ja kuvassa tätä on havainnollistettu kolmella supramolekyylillä a-kohdan vasemmassa yläkulmassa. Supramolekyylit kulkeutuu soluun ja päästää lääkeaineen vapaaksi solun sisällä. Irtoaminen tapahtuu, kun elimistöön vapautetaan lääkeaineeseen verrattuna kukurbituriiliin korkeammalla affiniteetillä sitoutuvaa kilpailevaa vierasmolekyylit 1-adamantyyliamiinia (ADA). Lääkeaine pääsee näin elimistön läpi

vaarattomana kohdesoluun asti, jossa se pääsee toimimaan vapautuessaan myrkyä.



Kuva 4: Esimerkkikuva miten kukurbituriili ottaa vieraaksi lääkeaineen ja päästää sen solun sisällä vapaaksi, kilpailevan vierasmolekyylin tieltä. Kuva otettu lähteestä Kim, Chaekyu et al. "Recognition-mediated activation of therapeutic gold nanoparticles inside living cells." *Nature chemistry* vol. 2,11 (2010): 962-6. doi:10.1038/nchem.858, kuvan käyttöön on saatu lupa Copyright © 2010, Springer Nature Limited.

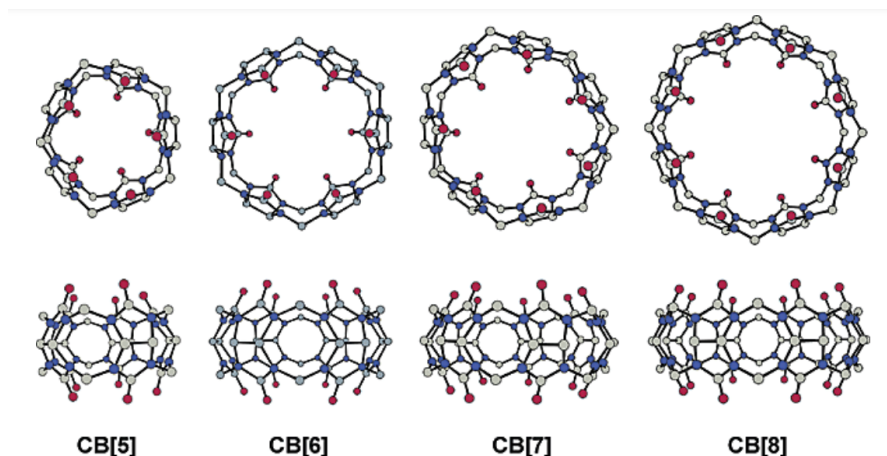
Supramolekyylejä käytetään myös reaktioiden katalysointiin. Deraedtin ja Astrucin¹² artikkelissa esitellään useita eri isäntämolekyylejä ja niiden katalysoimia reaktioita. Isäntämolekyylin rakenne muodostaa vieraalle mikroympäristön, joka saa aikaan vieraan tiheyden kasvun paikallisesti. Mikroympäristö tuo vieraat lähemmäs toisiaan, verrattuna siihen, miten ne normaaliolosuhteissa hakeutuisivat toistensa lähelle. He kuvaavat, että vieraat sijoittuvat eräänlaiseen siirtymävaiheeseen ennen niiden välillä tapahtuvaa reaktiota. Tämän takia reaktiosta voi tulla selektiivinen tietyn konformaation suhteen, joka ei välttämättä olisi mahdollinen ilman kyseistä sijoittumista toisiinsa nähden. Supramolekyylit voivat mahdollistaa stereoselektiiv-

visen reaktion. Esimerkiksi Tan *et al.*¹³ esittävät review artikkelissaan, että eräs häkkirakenteinen supramolekyyli voi ottaa sisäänsä rodiumkompleksikatalyytin, joka aikaan saa styreenijohdannaisen stereoselektiivisen hydroformylaation. Häkkirakenne koostuu kahdesta palladiumkompleksia sisältävästä osasta ja neljästä sinkkikompleksia sisältävästä osasta. Häkkirakenteessa katalysoidusta reaktiosta saatiin ulos kahta tuotetta ja halutun tuotteen enantiomerinen runsaus (enantiomeric excess) oli 79 %, mikä oli huomattavasti suurempi kuin ilman häkkirakennetta saadun tuotteen runsaus, joka oli vain 9 %.

Isännän aikaansaama mikroympäristö voi myös nopeuttaa reaktion kulkua.¹² Reaktiotuotteen saanto voi kuitenkin olla hyvin pieni johtuen isäntämolekyylin ja tuotteen korkeasta sitoutumiskyvystä eli affiniteetista, sillä silloin vierasmolekyyli ei vapaudu kompleksin vuorovaikutuksen piiristä. Esimerkiksi dendriittiset nanoreaktorit ovat tämän haasteen edessä tuoneet ratkaisua ongelmaan.¹²

3 Kukurbituriilit

Kukurbituriilit ovat glykoluriiliyksiköistä muodostuvia makrosyklejä. Kukurbit[6]-uriilin syntetisoi vuonna 1905 Behrend yhteistyökumppaneineen¹⁴, mutta rakennetta ei vielä tällöin esitetty. Kukurbituriilin rakenteen esitti vuonna 1981 W.A.Freeman, W.L.Mock ja N.Y.Shih.¹⁵ He ehdottivat yhdisteen nimeksi kukurbituriilia ja se on vakiintunut sen jälkeen yleiseen käyttöön. Kukurbituriilin rakenne muistuttaa kurpitsaa ja sen nimi tulee kurpitsan kasvitieteellisestä heimosta cucurbitaceae. Kukurbituriilien glykoluriiliyksikköjen lukumäärä kerrotaan kukurbituriilin nimesä hakasulkeiden sisällä. Myös lyhenne CBn on yleisesti käytössä, jossa n on glykoluriiliyksiköiden lukumäärä. Kuvassa 5 nähdään erikokoisia kukurbituriileja ja niiden mittasuhteita.

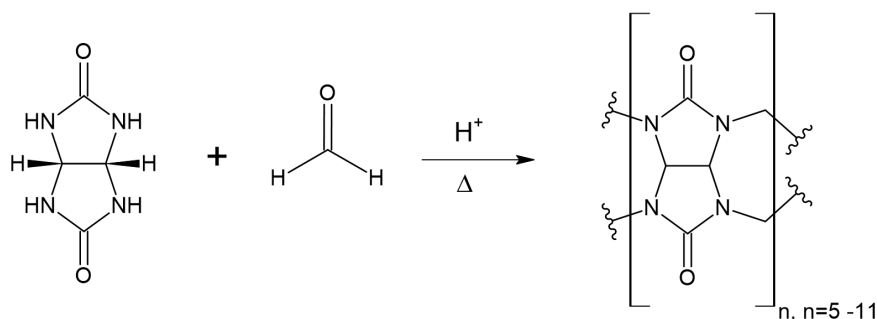


Kuva 5: Kukurbituriilien CB5-CB8 röntgenkristallografiarakenteet¹⁶. Kuva otettu lähteestä Acc. Chem. Res. 2003, 36, 8, 621–630, 2003, <https://doi.org/10.1021/ar020254k> ja kuvan käyttöön on saatu lupa Copyright © 2003, American Chemical Society.

3.1 Synteesi ja eristys

Mock *et al.* esittävät synteesin pääpiirteissään artikkelissaan¹⁵ seuraavasti: Glykoluriilin sekaan lisätään ylimäärin formaldehydiä ja seokseen lisätään vettä ja vetykloridia. Saadaan saostuma, minkä ominaisuuksia on kuvattu amorfiseksi ja liukenemattomaksi kaikkiin yleisiin liuottimiin. Tähän saostumaan lisättäessä 110-asteista rikkihappoa, saadaan seos kuitenkin liukenemaan. Liuokseen lisätään kyl-

mää vettä ja seos suodatetaan. Suodatuksen jälkeen suodos kuumennetaan kiehu-
vaksi ja saadaan kiteisenä sakkana kukurbituriilia. Tästä synteesistä päätuotteena
saadaan CB6: a. 2000-luvulla Kim *et al.*¹⁷ tekivät synteesin lisäämällä glykolurii-
liin ja formaldehydiin 9 M rikkihappoa ja lämmittämällä seosta ensin 75-asteessa
vuorokauden ja sen jälkeen nostamalla lämpötilaa 100-asteeseen 12 tunniksi. Täl-
lä menetelmällä he saivat useita kukurbituriileja CB[n] (n = 5 – 11) ja seoksen
homologiin suhteet olivat yleensä n. 60 % CB6, n. 10 % CB5, n. 20 % CB7 ja n.
10 % oli näitä suurempia homologeja.¹⁷ Kukurbituriilin synteesi on esitetty kuvas-
sa 6. On huomattu että muuttamalla synteesin olosuhteita voidaan muuttaa eri
homologiin suhteita ja esimerkiksi mikroaaltouunia hyödyntäen synteesiä saadaan
nopeutettua ja tehostettua.¹⁸



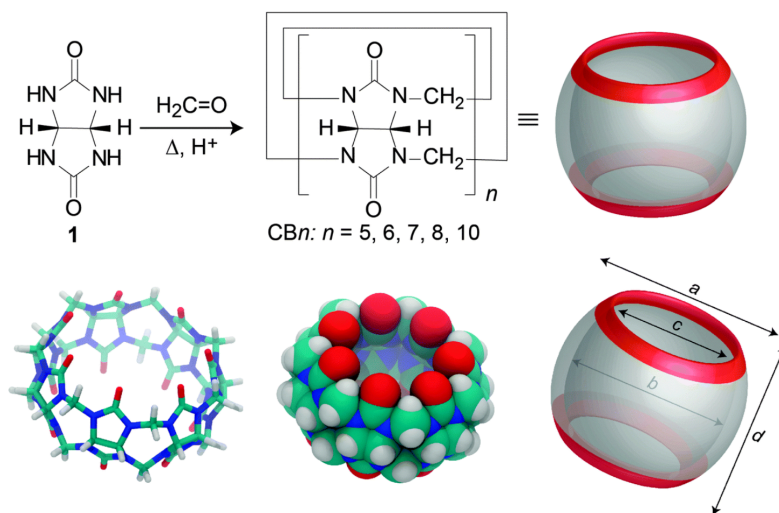
Kuva 6: Kukurbit[n]uriilin synteesi glykouriilista, kun tuotteiksi saadaan useita eri
kukurbituriileja ja päätuotteena kukurbit[6]uriili.

Cong *et al.* esittelevät artikkelissaan¹⁸ menetelmiä eri kukurbituriilihomologiin eli
eri glykoluriiliyksikkömäärän sisältämien kukurbituriilien puhdistamiseen ja erot-
teluun toisistaan. Kukurbituriilin puhdistuksessa on olemassa monia eri tekni-
koita, joissa apuna käytetään esimerkiksi erilaisia vieraita, joiden mukana eri ho-
mologit saadaan eroteltua toisistaan. Toinen mahdollisuus on käyttää hyödyksi
vesiliukoisuutta. Kukurbituriileista parillisen määrän hiiliatomeja sisältävät ho-
mologit CB6, CB8 jne. eivät liukene veteen niin hyvin kuin parittoman määrän
hiiliatomeja sisältävät kukurbituriilit CB5, CB7 jne. jotka liukenevat veteen to-
della hyvin.¹⁸ CB6:n erotukseen muista kukurbituriileista voidaan käyttää me-
netelmää, jossa käytetään hyödyksi affiniteetti-kromatografiaa. Yhtenä esimerk-
kiyhdisteenä affiniteetti-kromatografisessa erottelussa voidaan käyttää aminopen-
tylaminometyloitua polystyreenihartsia, joka substituotuu CB6:iin.¹⁸ Affiniteet-
tikromatografiassa eroteltavaa yhdistettä sisältävä liuosseos laitetaan pylvääseen

liikkuvana faasina ja kiinteässä faasissa on vierasmolekyylejä. Kohdeyhdiste jää vuorovaikuttamaan pylvään vierasmolekyylien kanssa ja muut yhdisteet kulkeutuvat pylvään läpi nopeammin kuin kohdeyhdiste. Näin kohdeyhdisteen suurempi affiniteetti vierasmolekyyliin erottaa sen muista molekyyleistä. CB5:n ja CB7:n erotteluun toisistaan voidaan käyttää hyödyksi kukurbituriilien onteloiden eri kokoa. CB7 tekee endokompleksin ionisen alkyyli-imidatsoliumin kanssa, kun taas CB5:n sisään vieras ei mahdu.¹⁸ Kompleksi on vesiliuoksessa kiinteässä muodossa, kun CB5 on liuenneena veteen. Näin kukurbituriilit saadaan erotettua toisistaan, minkä jälkeen CB7:n kompleksi hajotetaan saaden vieras ehjänä talteen seuraavaa käyttökertaa varten.

3.2 Rakenne ja kompleksoituminen

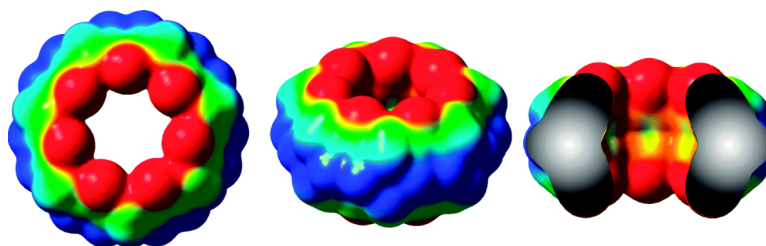
Kukurbituriilit ovat makrosyklejä, joiden kahta aukkoa reunustavat pooliset karbonyyliryhmät. Kuvassa 7 nähdään kukurbituriilien säiliömäinen rakenne hyvin. Alhaalla vasemmalla ja keskellä on väritetyt havainnollistukset kukurbituriilin atomikoostumuksesta. Punainen kuvaa happea, sininen typpeä, vihreä hiiltä ja vaalea vetyä.



Kuva 7: Assafin ja Naun esittämä kukurbituriilin rakenne. Yläosassa kukurbituriilin synteesireaktio yksinkertaistettuna.¹⁹

Kukurbituriilien sisäosa on hydrofobinen ja molekyylin rakenne vaikuttaa vahvasti kompleksien muodostumiseen. Vierasmolekyylit sitoutuvat kukurbituriiliin karbonyyleistä muodostuville poolisille aukoille ja rakenteen sisäpuolelle asettuu

vieraan hydrofobinen osa. Kuvassa 8 näkyvät hyvin kolmesta eri suunnasta kuvattuna punaisella poolisten karbonyyliryhmien aiheuttama elektronegatiivisuus. Kukurbituriileja voidaan kutsua myös kavitandeiksi ja ne voivat muodostaa kavitaatteja. CB:n sisäosan kyky muodostaa dipolivuorovaikutuksia on erittäin pieni.²⁰ Kukurbituriilin sisäpuolen poolittomuus vaikuttaa siihen, että vierasmolekyylin koko ja sen yhteensopivuus kukurbituriilin sisäosaan on suurempi tekijä vuorovaikutuksen voimakkuudessa kuin vieraan poolisuus.²¹ Mitä enemmän glykoluriiliyksiköitä molekyyliin on sitä suuremmat vierasmolekyylit mahtuvat rakenteen sisälle. Molekyylin koko ja samalla sisäosan ontelon koko kasvaa, kun yksiköiden lukumäärä kasvaa. Esimerkkejä vierasmolekyyleistä ovat alkali- ja maa-alkalimetallikationit, aminoalkaanit ja aromaattiset yhdisteet. Isommat kukurbituriilit CB8 lähtien voivat isännöidä myös kahta eri vierasmolekyyliä esimerkiksi 2,6-dihydroksinaftaleenin ja metyyliivilogeenin.²² CB10 voi ottaa vieraakseen myös CB5:n.²² Barooah *et al.* review artikkelissaan kertovat, että suurin raportoitu kukurbituriili CB12 ei muodosta suurta rengasta vaan tekee kahdeksikon muotoisen laskostuneen konformaation.¹⁰



Kuva 8: Kukurbituriilin elektronitiheysjakauma.¹⁹

Marquez *et al.*²¹ ovat koonneet kukurbituriilin muodostamia vuorovaikutuksia seuraavasti: Kun kukurbituriilin sisällä on pooliton vieras ja ulkopuolella vettä, kyseessä on hydrofobinen efekti. Ioni-dipolivuorovaikutus havaitaan, kun metallikationi, tai orgaaninen ammonium-ioni vuorovaikuttaa kukurbituriilin suuaukon poolisten glykouriiliryhmien kanssa. Vuonna 1996 ilmestyneen Jeon *et al.* artikkelista²³ lähtöisin molekyyliin on liitetty ajatus, että kationit toimisivat kompleksissa luukkui-
na, jotka kontrolloisivat sisäpuolella olevan vieraan sitoutumista ja vapautumista. Florea ja Nau toteavat vuonna 2011 ilmestyneessä artikkelissaan²⁴, että alkalimetalliluukut heikentävät poolittoman vieraan sitoutumisvoimakkuutta kompleksissa. He ehdottavat, että ionien lisääminen voisi edistää mahdollisissa sovelluksissa kompleksin hajoamista ja vieraan vapautumista kukurbituriilikapselista. Myös ku-

kurbituriilin suuaukkojen koko vaikuttaa kompleksoitumiseen. Marquez *et al.* tutkimuksessaan²¹ havaitsivat, ettei esimerkiksi syklinen amiini DBOA mahdu CB6 sisään, sillä suuaukko on liian pieni. CB7 puolestaan pystyy muodostamaan erittäin voimakkaita vuorovaikutuksia vieraisiinsa. Review-artikkelissaan Das *et al.* kertovat, että joidenkin CB7:n kompleksien isännän ja vieraan välinen sitoutumissaffiniteetti päihittää vahvimman ei-kovalenttisen luonnossa tavatun kompleksin biotiini-avidiini parin sitoutumisvoimakkuuden.¹¹

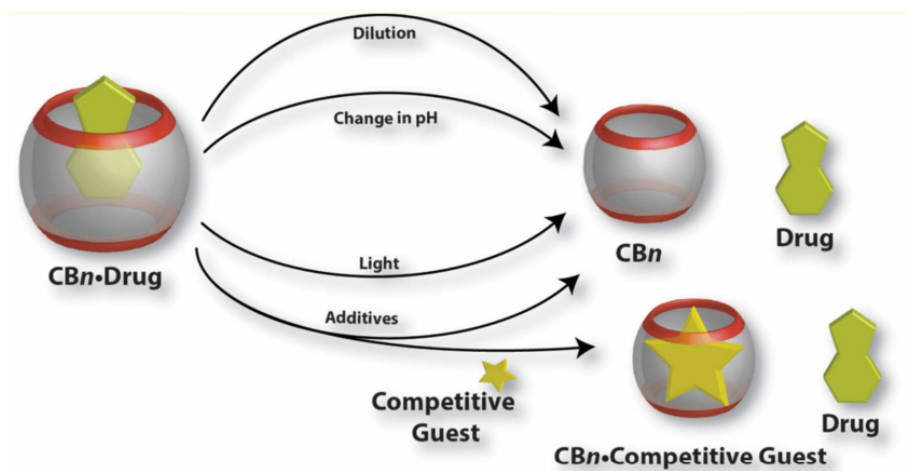
3.3 Käyttötarkoitukset

Kukurbituriilit tekevät komplekseja sekä orgaanisten että epäorgaanisten molekyylien kanssa. Sovelluksia on paljon molemmista ja aiheesta on kirjoitettu useita review-artikkeleita. Kukurbituriileja on tutkittu viime aikoina paljon isäntämolekyyleinä lääkemolekyyleille silmällä pitäen niiden avulla tehtävää lääkkeiden kuljetusta elimistössä. Parittomien kukurbituriilien vesiliukoisuuden myötä kompleksin sisällä olevaa veteen liukenematonta vierasta voidaan kuljettaa elimistössä helpommin. Lääkeaine voisi kulkeutua kukurbituriilin sisällä haluttuun paikkaan, jossa se voitaisiin vapauttaa. Kukurbituriileista parillisen glykouriiliyksikkömäärän sisältävät molekyylit ovat heikommin veteen liukenevia, mutta liukenevuutta voidaan edistää kationeilla tai positiivisesti varatuilla vierailta. Marquez ja Nau ovat saaneet tutkimuksessaan²⁵ selville, että pH vaikuttaa selvästi CB6:n vieraiden kompleksoitumisen ja irtoamisen keston, mikä on hyvä asia liittyen mahdollisuuden kuljettaa lääkkeitä elimistöön.

Kukurbituriiliin kompleksoituessaan vierasmolekyylin kemialliset ominaisuudet voivat muuttua, kun sen pK_a -arvo muuttuu uudessa mikroympäristössä.¹¹ Tällä tavoin kompleksissa oleva vieras voi reagoida eri lailla muihin molekyyliin, kuin ollessaan vapaana kompleksista ja siksi kukurbituriileja voidaan nimittää myös nanoreaktoreiksi. Esimerkiksi Mock on tehnyt tutkimuksia jo 1980-luvulla CB6 toiminnasta nanoreaktorina. Esimerkiksi CB6:n läsnä ollessa ammoniumalkyynin ja ammoniumatsidin välillä tapahtuu 1,3-sykloadditio, kun ilman kukurbituriilin osallisuutta näiden välillä tapahtuisi vapaasti reagoidessaan 1,4- tai 1,5-sykloadditio. Reaktio esitetään Deraedtin ja Astrucin artikkelissa¹². Vierasmolekyylien ammoniumioniryhmät muodostavat vetysidoksia CB6:n karbonyyliryhmien kanssa ja

ovat pakotettuina toistensa lähelle. Vieraiden pakotettu lyhyt etäisyys toisiinsa nähden saa aikaan juuri tietyn konformaation syntymisen.

Review-artikkelissaan Das *et al.*¹¹ kertovat, että 2010-luvun alussa on tutkittu ja havaittu kukurbituriilien kasvattavan lääkeaineiden termistä pysyvyyttä myös kiinteässä muodossa. Lisäksi kerrotaan, että kukurbituriilien endokompleksit lisäävät joidenkin lääkemolekyylien valonkestävyyttä. Samassa artikkelissa on paljon esimerkkejä lääkeaineista, jotka muodostavat endokomplekseja kukurbituriilien kanssa. Kuvassa 9 näytetään tutkittuja vaihtoehtoja, miten lääkeaine vapautetaan kukurbituriilin endokompleksista. Vaihtoehtoja ovat laimentaminen, pH:n muut-



Kuva 9: Lääkeaineen vapautusmenetelmiä kukurbituriilin endokompleksista.¹¹

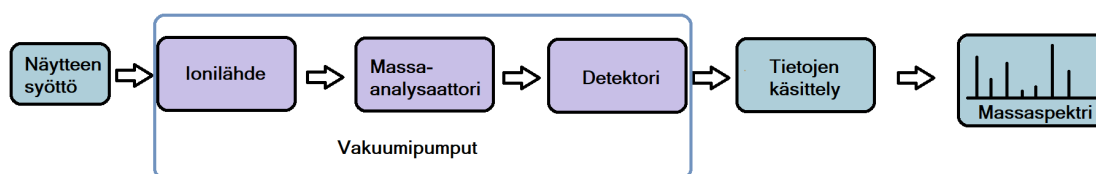
taminen, valo ja erillinen lisättävä yhdiste, joka voi esimerkiksi ottaa lääkeaineen paikan vieraana kompleksissa ja syrjäyttää alkuperäisen vieraan.

CB6:a on käytetty myös katalyyttinä polyrotaksaanien, katenaanien ja fluoresoivien materiaalien valmistuksessa, sekä epäpuhtauksien poistoon vedestä ja räjähdysherkkien orgaanisten molekyylien poistoon ilmasta.²¹ Esimerkiksi Florean ja Naun²⁴ artikkelissa kerrotaan, että kaupallisella neopentaanilla on tuntematonta epäpuhtautta, joka saatiin poistettua kun kiinteää CB6 lisättiin neopentaanin D₂O liuokseen. Tämä tulos havaittiin ¹H NMR-spektristä. Ennen CB6 lisäämistä spektrissä havaittiin neopentaanin lisäksi tuntematon epäpuhtaudesta johtuva piikki. Kiinteään CB6:n lisäyksen jälkeen mitatussa ¹H NMR-spektrissä ei enää havaittu epäpuhtautta. NMR-mittauksien lisäksi supramolekyylien isäntä-vieraskemiaa tutkitaan myös massaspektrometrialla.

4 Ioniliikkuvuusmassaspektrometria

4.1 Massaspektrometria

Massaspektrometriaa käytetään esimerkiksi erilaisten yhdisteiden koostumuksen selvittämisessä, molekyylien tarkan massan määrittämisessä sekä molekyylien tunnistamisessa erilaisista matriiseista. Massaspektrometrisessä mittauksessa saadaan selville näytteen ionikoostumus, kun massaspektrometri ionisoi näytteen molekyylit ionilähteessä ja ionit erotuttuaan massa-varaussuhteensa perusteella massa-analyssaattorissa saapuvat detektorille ja saadaan massaspektri kaikista näytteessä olevista ioneista. Massaspektrometrin perusrakenne on esitetty kuvassa 10. Fysii-



Kuva 10: Yksinkertaistettu kaavakuva massaspektrometrin rakenteesta.

kan nobelisti J.J Thomson (Elektronin löytäminen v.1906) kehitti yhdessä Francis Astonin (1922 Nobelisti) kanssa ensimmäisen massaspektrometrin 1900-luvun alussa mittaamaan varauksellisten atomien massoja.²⁶ Tämän jälkeen varsinkin isotooppiutkimukset toisen maailmansodan yhteydessä siivittivät massaspektrometrien kehitystä. Kevin Downardin²⁷ kirjassa kerrotaan, että Thomsonin selvittämät ominaisuudet massaspektrometriassa pitävät paikkaansa yhä edelleen; massaspektrometrialla voidaan mitata varauksellisten atomien ja molekyylien massat erilaisista näytteistä, näyttemäärä ja konsentraatio voi olla todella pieni ja että yhdisteitä voidaan analysoida näytteestä puhdistamatta sitä matriisistaan. Aluksi kemistit käyttivät massaspektrometriä kvantitatiiviseen konsentraation määrittämiseen, mutta myöhemmin syntyi kiinnostus myös monimutkaisten molekyylien rakenteiden tunnistamiseen laitteen avulla.

Massaspektrometriassa selvitetään mitattavan yhdisteen sisältö, muuttamalla molekyylit ioneiksi ja analysoimalla ionien massa-varaussuhteet. Joka mittauksesta tulostuu massaspektri, jossa x-akselilla on massa-varaussuhteen m/z mukaan havaittujen ionien massapiikit ja y-akselilla on massapiikkien intensiteetit, jotka ku-

vaavat ionien runsautta näytteessä absoluuttisina tai suhteellisina arvoina. X-akseli eli massa-alue määritetään ennen mittausta ja näytteen mittauksesta tulostuvassa profiilispektrissä esiintyvät massapiikit edustavat kaikkia näytteessä olevia massa-alueelle osuvia ioneja. Ioneista havaitaan joko positiiviset tai negatiiviset ionit ennen mittausta valitun polariteetin mukaan. Massapiikit ovat ideaalitapauksessa lähietäisyydeltä tarkasteltaessa Gaussin käyrän muotoisia. Kun x-akselia suurenetaan tietyn massapiikin kohdalta, voidaan nähdä ionin isotooppijakauma. Isotooppijakaumasta saadaan selville ionien varaustila. Jos ioni on kerran varattu, isotooppipatterin massapiikit ovat spektrissä yhden yksikön välein. Kahdesti varatulla ionilla isotooppipiikkien väli on puoli yksikköä, sillä massa-varaussuhde m/z puolittuu varauksen z ollessa kaksi ja niin edelleen isompien varausten tapauksissa. Massaspektrometrejä on erilaisia riippuen esimerkiksi, miten näytteen molekyylit ionisoidaan ja miten ionit erotellaan massa-varaussuhteen perusteella. Massaspektrometreissä on myös useita mahdollisia näytteen sisäänvientimahdollisuuksia riippuen laitetyypistä. Näyte voi tulla laitteeseen esimerkiksi suorasyötöllä ruiskupumpulla, neste- tai kaasukromatografilta tai esimerkiksi kiinteältä näytelevyltä, jolta ionisointi tehdään suoraan.

4.1.1 Ionisaatiomenetelmät

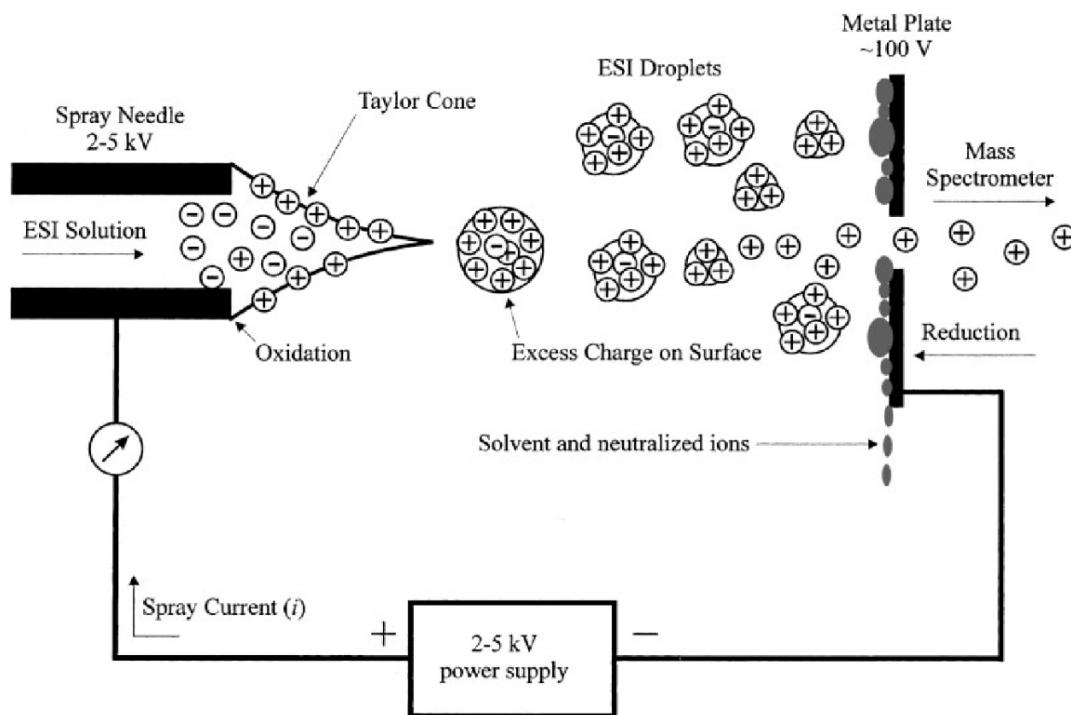
Massaspektrometrillä tunnistetaan ioneja ja ennen analysoimista molekyyleistä pitää tehdä ioneja. Massaspektrometreissä voidaan käyttää useita eri ionisointimenetelmiä, esimerkiksi elektroni-ionisaatiota (EI), sähkösumutus-ionisaatiota (ESI), ja matriisiavusteista laserdesorptio-ionisaatiota (MALDI). Ionisaatiomenetelmistä saadaan erilaisia ioneja riippuen näytteen molekyyleistä ja ionisaatiossa käytetyn energian suuruudesta. Supramolekyylejä tutkittaessa käytetään pehmeitä ionisaatiomenetelmiä, eli käytännössä yleensä ESI:a tai MALDI:a. Pehmeillä ionisaatiomenetelmillä ei-kovalenttiset yhdisteet säilyvät paremmin koossa, kun niiden ionisoimiseen ei käytetä niin suurta energiaa. EI on kova ionisaatiomenetelmä ja sillä aikaan saadut ionit ovat usein molekyyli-ioneja.²⁷ Molekyyli ottaa ionisaatiossa elektronin tai vastaanottaa sen ja muodostuu radikaali-ioni. EI kohdistaa niin suuren energian näytteen molekyyleihin, että usein ne myös hajoavat ja muodostavat pilkeioneja (fragment-ion). ESI on pehmeä ionisaatiomenetelmä ja siitä muodostuu usein protonoituja tai deprotonoituja ioneja, kun molekyyli vastaanot-

taa tai luovuttaa protonin H^+ . Myös addukti-ionit ovat yleisiä ESI:n tapauksessa. Addukti-ionit muodostuvat kun esimerkiksi Na^{2+} , K^+ tai Cl^- , kiinnittyy näytteessä oleviin molekyyliin. Natrium-, kalium- ja kloori-ioneja on aina näytteessä tai laitteen pinnoilla, sillä niitä esiintyy ympäristössämme niin paljon että niiden aiheuttamia kontaminaatioita on erittäin vaikeaa poistaa kokonaan.

EI:ssa kaasuna ionisointikammioon tulevia molekyyliä pommitetaan elektroneilla. Elektronivirta muodostuu, kun katodina olevaan filamenttilankaan johdetaan virtaa. Elektronit kulkeutuvat katodia vastapäätä olevalle anodille, kun anodin ja katodin välille muodostetaan potentiaaliero. Esimerkiksi kaasukromatografilta (GC) tulevat molekyylit kulkeutuvat elektronisuihkuun, jossa ne elektronien törmäysten takia menettävät elektronin. Filamenttilangasta irtoavien elektronien energian suuruudesta riippuen osa pommitetuista molekyyleistä hajoaa fragmenteiksi eli hajoamisessa muodostuneiksi jäännösioneiksi. Jos molekyylien halutaan pysyvän kokonaisina ei EI ole sopiva ionisaatiomenetelmä. EI on kuitenkin hyvin käyttökelpoinen pienille molekyyliin ja se on vanhin massaspektrometreissä käytetty ionisaatiomenetelmä.

Toinen ja paljon pehmeämpi eli vähemmän energiaa molekyyliin siirtävä ionisaatiomenetelmä on sähkösumutus-ionisaatio ESI, josta John B. Fenn sai kemian Nobelin palkinnon vuonna 2002. ESI on ionisaatiomenetelmistä yksi suosituimmista supramolekyylien kohdalla. ESI ei vaikuta molekyylien välisiin tai sisäisiin heikkoihin vuorovaikutuksiin ja näin ne pysyvät koossa ionisaation aikana.²⁸ Menetelmä on kuvitettu kuvassa 11. ESI:ssa nesteeseen liuotettu näyte johdetaan hyvin ohuen kapillaarin läpi. Kapillaarin seinämällä oleva korkea potentiaalijännite saa aikaan liuottimessa hapetus-pelkistysreaktion ja liuotinmolekyylit ionisoituvat. Kapillaarin päähän muodostuu Taylorin kartio (Taylor Cone), kun Coulombin voima yrittää saada varaukset kauemmas toisistaan ja rikkoa pinnan ja toisaalta liuottimen pintajännite pitää pintaa kasassa. Lopulta kartion päästä irtoaa pieniä pisaroita, joiden pinnalla on aikaan saatu varaus. Kuumen kuivauskaasun avulla pisarat pienenevät, kun liuotin haihtuu. Pisarot kulkeutuvat vastakkaisen varauksen anodille tai katodille pisaroiden pinnalla olevien ionien varauksen takia.

Kun haihtuvan liuottimen myötä pisaran halkaisija pienenee, niin Coulombin voiman vaikutus repulsiona vahvistuu. Lopulta pisaroiden saavuttaessa Rayleighin rajan (Rayleigh limit) pisara hajoaa pienemmiksi pisaroiksi eli tapahtuu Coulombin



Kuva 11: Sähkösumutusionisaation periaate, jossa kapillaarista tulevat näyte-liuospiisarat muuttuvat vähitellen yksittäisiksi ioneiksi. Kuva on otettu lähteestä²⁹ Cech NB, Enke CG. Practical implications of some recent studies in electropray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev.* 2001;20(6):362-387. doi:10.1002/mas.10008 ja käyttöön on saatu lupa Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Inc.

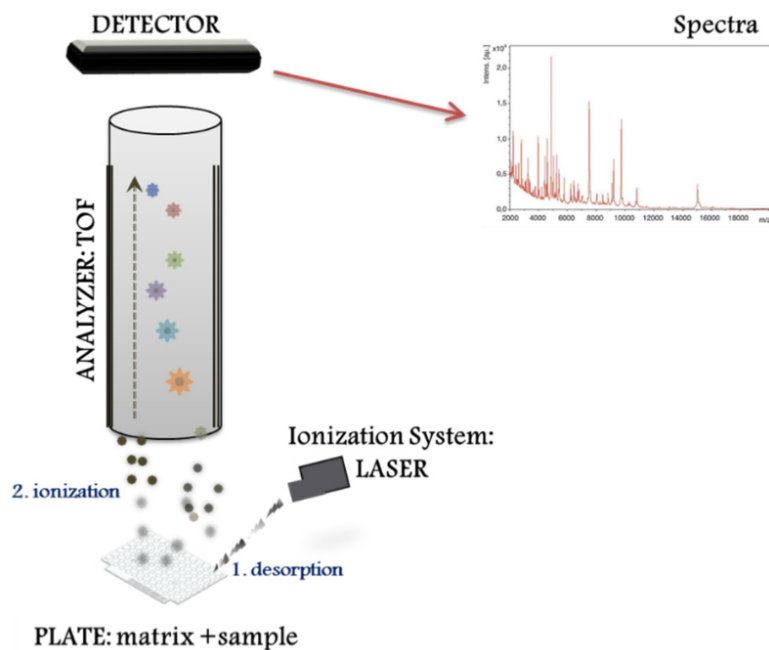
fissio.²⁹ Tämä kierto jatkuu, kunnes lopulta on jäljellä enää näytteen molekyylit ionisoituneina. Rayleighin rajan yhtälössä³⁰

$$q^2 = 8\pi^2\epsilon_0\gamma D^3 \quad (1)$$

q on varaus, ϵ_0 väliaineen eli tässä tapauksessa liuottimen permittiivisyys, γ pintajännitys ja D pisaran halkaisija.

Toinen pehmeä ionisaatiomenetelmä on MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization). Torres-Sangiao *et al.*³¹ kertovat artikkelissaan, että MALDI on yksi eniten käytetyistä ionisointimenetelmistä biologisten ja kliinisten kuvantamisovellusten kehityksessä. MALDI:n sisältävän massaspektrometrin etu on näytteen analysoimiseen kestävä aika, luotettavuus ja edullisuus. Ilman massaspektrometriä perinteisillä sienien viljelymenetelmillä voi esimerkiksi sienisolujen tunnistamisessa kestää päiviä, kun MALDI:n sisältävällä massaspektrometrillä voi sienisolujen

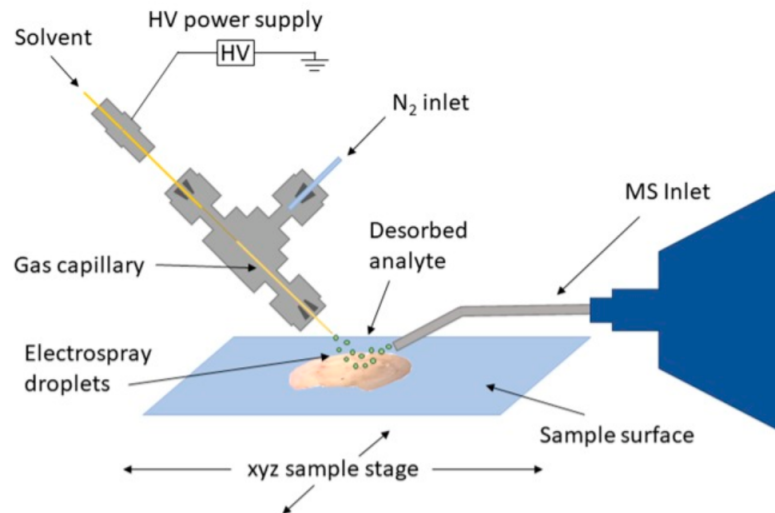
tuottaman proteiinin tunnistaa minuuteissa.³² MALDI-TOF:lla voidaan analysoida isoja molekyyliä, kuten proteiineja ja polymeerejä, jotka pilkkoutuvat erittäin helposti kovemmilla ionisaatiomenetelmillä.³¹ MALDI:ssa UV- tai IR-laserilla pommitetaan näytettä, joka on näytematriisissa. Näytteen valmistuksessa on kaksi yleistä perinteistä menetelmää, kuivaus-(dried-droplet) ja ohutlevymenetelmä (thin-layer).³³ Kuivausmenetelmässä liuotettu näyte sekoitetaan matriisiliuokseen ja hitaasti ilmakeivataan samalla muodostuen analyyttikiteitä. Ohutlevymenetelmässä näyte liuotetaan helposti haihtuvaan liuottimeen ja liuottimen haihtuessa jää jäljelle ohut homogeeninen kiteinen näytekalvo, jonka päälle laitetaan yleensä vielä pieni määrä analyyttiliuosta.³³ Matriisiliuos on orgaanista helposti käytetyn laserin aallonpituudella absorboivaa yhdistettä.³¹ Ionisoiminen on esitetty kuvassa 12. Kun korkeaaenergiset UV tai IR-laserimpulssit absorboituvat näytteeseen, molekyyliä ionisoituu ja irtoaa. Irrotessaan ionien olomuoto vaihtuu kiinteästä kaasuksi ja ne kulkeutuvat edelleen massa-analyysiin.



Kuva 12: MALDI-TOF-MS menetelmän kuvaus.³¹

Desorptiosähkösumutus-ionisaatiomenetelmä (DESI) mahdollistaa näytteen mitaamisen ilmanpaineessa ja sille ei tarvitse tehdä esikäsitteilyä. DESI:lla voidaan tutkia kiinteitä- ja nestenäytteitä, jäätyneitä liuoksia ja absorboivia kaasuja.³⁴ Mikäli halutaan tutkia näytettä, jossa on paljon suoloja, kannattaa käyttää ionisaatiomenetelmänä mieluiten DESI:a. Artikkelissaan Miao ja Chen³⁵ kertovat esimerkiksi tehneensä massaspektrometrimittauksen virtsanäytteessä olevasta me-

tamfetamiinista ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), joka ei näkynyt protonoituneena ESI:lla tehdyssä mitauksessa. DESI:lla taas mittaus onnistui ja metamfetamiini havaittiin spektrissä. DESI:lla voidaan lääkeaineiden lisäksi myös mitata nopeasti räjähteitä, metaboliitteja, kemiallisten aseiden yhdisteitä ja soluja. DESI:n toiminta esitetään kuvassa 13. DESI:n ionisaatiomenetelmässä hyödynnetään sekä ESI:n ja MALDI:n



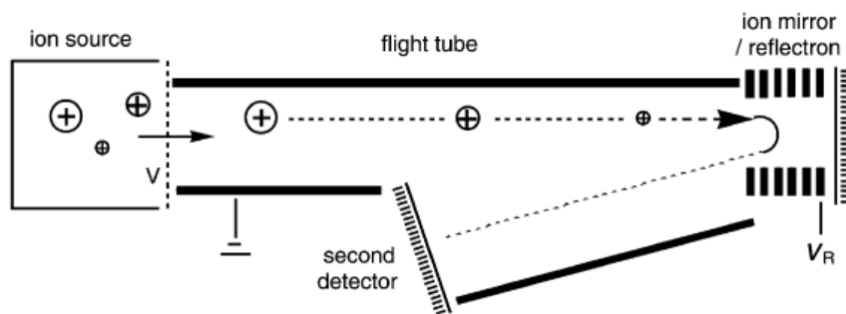
Kuva 13: Kaavakuva desorptioelektronisumutus-ionisaatiosta.³⁶

ominaisuuksia. ESI:n kanssa yhteneväisyyttä on sumutin, joka sumuttaa DESI:n tapauksessa liuotinta näytteeseen. MALDI:n kanssa yhteistä on, että ionisoitu liuotinsuihku ohjataan näytteeseen ja se aiheuttaa näytteen molekyylien ionisoitumisen ja näytemolekyylit ionisoituessaan kulkeutuvat edelleen massaspektrometrin sisään. Liuotinsuihkun kulmaa voidaan tarvittaessa säätää, sekä sen osumakohtaa näytteessä.

4.1.2 Massa-analysaattorit ja detektorit

Ionit kulkeutuvat ionisaation jälkeen edelleen massa-analyysiin, jossa erotellaan eri m/z -arvon omaavat ionit toisistaan. Massa-analyysiin käytetään esimerkiksi lentoaikamassa-analysaattoria TOF (Time of flight), kvadrupoleja Q (quadrupole) tai kvadrupoli-ioniloukkua QIT (quadrupole ion trap). Erottelumenetelmiä voidaan myös yhdistellä, jolloin kyseessä on hybridilaitteisto. Esimerkiksi Agilent 6560 massaspektrometrissä on yhdistetty menetelmistä kvadrupoli ja lentoaikamassa-analysaattori ja sitä nimitetään lyhenteellä Q-TOF. Kevin Downardin²⁷ kirjassa

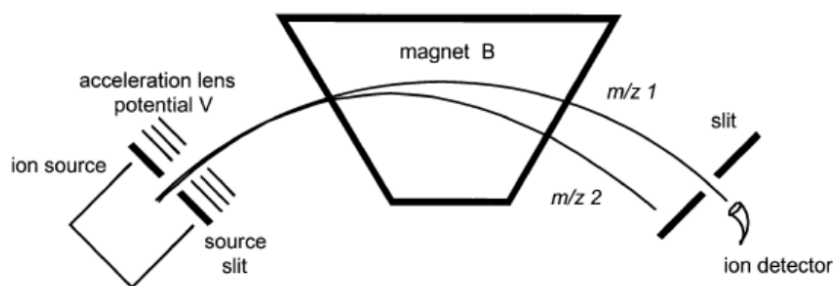
esitellään hyvin massaerotteluun käytettyjä menetelmiä ja kirjasta otetusta kuvassa 14 nähdään TOF-menetelmän kaavakuva. Menetelmässä ionilähteestä tulevat ionit kulkeutuvat putkessa ionien kanssa saman merkkisen potentiaali-jännitteen vaikutuksesta putken toiseen päähän. Suuremman varauksen ionit liikkuvat nopeammin kuin pienemmän varauksen ionit. Suurimassaiset ionit liikkuvat potentiaalijännitteen avulla taas hitaammin kuin niitä kevyemmät ionit massan hitauden vuoksi. Putki on yleensä 1-2 m pitkä ja erottelua kehittääkseen on tehty kuvassa 14 näkyvä konfiguraatio, jossa ionit heijastetaan jännitteen avulla putken toisesta päästä detektorin suuntaan ja näin lentomatkaan saadaan lisättyä pituutta yksisuuntaiseen lentorataan verrattuna. Suuremmat ja pienemmän varauksen ionit ajautuvat lähemmäs reflektoria, joka hidastaa ioneja niiden kanssa saman merkkisen jännitteen avulla. Ionien lähestymisnopeus hidastuu ja lopulta reflektori kääntää ionien suunnan pois päin kohti detektoria.



Kuva 14: Kaavakuva lentoaikaerottelusta, jossa ionireflektori. Kuva on otettu lähteestä Downard, K., *Mass Spectrometry : A Foundation Course*, Iso-Britannia, Royal Society of Chemistry, 2004, ja sen käyttöön on saatu lupa: the Royal Society of Chemistry

Sektorimassa-analysaattori on vanhin massaerottelumenetelmä massaspektrometreissa.²⁷ Siinä ionien lentorata on kaareva, kuten Downardin kirjasta otetussa kuvassa 15. Erottelumenetelmässä ionien lentorataan vaikutetaan magneetilla, joka ohjaa ionit ympyräradalle. Ionit kokevat keskipakoisvoiman (centrifugal force) $zevB$ ja keskihakuisuusvoiman (centripetal force) mv^2/r yhtä suurina ja tällöin pätee seuraava yhtälö

$$zevB = \frac{mv^2}{r}. \quad (2)$$



Kuva 15: Kaavakuva sektorimassa-analysointilaitteesta. Kuva on otettu lähteestä Downard, K., *Mass Spectrometry : A Foundation Course*, Iso-Britannia, Royal Society of Chemistry, 2004, ja sen käyttöön on saatu lupa: the Royal Society of Chemistry

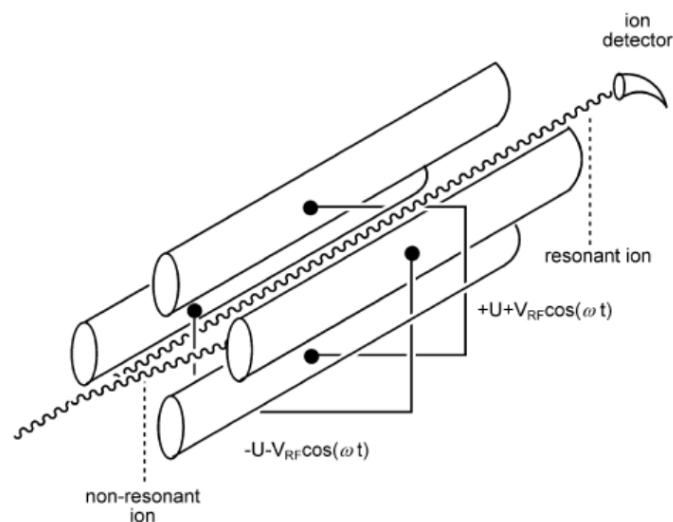
Yhtälöstä 2 saadaan edelleen ratkaistua ionien lentoradan säde

$$r = \frac{mv^2}{zevB}, \quad (3)$$

joka riippuu ionin liikemäärästä mv , kun magneettikenttä on vakio. Näin ionit saadaan eroteltua toisistaan ja detektorille pääsevät vain ionit, joilla on tietty massa-varaussuhde. Magneetin lisäksi ionien liikettä voidaan muuttaa myös sähkökentän avulla asettamalla sektorille sähkökentän muodostava komponentti. Näitä kahta eri sektoria voidaan yhdistellä samassa laitteessa ja massojen erotuskykyä voidaan kasvattaa.

Kvadrupolierottelussa ionit kulkevat neljän samansuuntaisen sauvan muodostaman ns. tunnelin läpi. Sauvoissa on erimerkkiset jännitteet ja sauvoista johdetaan ioneille myös radiotaajuussäteilyä.²⁷ Ionit liikkuvat oskilloiden radiotaajuussäteilyn ja jännitteen aiheuttamien voimien mukaan sauvoja kohti ja niistä pois päin edeten samalla sauvojen suuntaisesti. Mikäli jännitteet ja radiotaajuuspulssit aiheuttavat lentorataa liikaa muutosta, ne poikkeavat sauvojen suuntaiselta radalta ja eivät päädy detektorille asti. Kuvassa 16 havainnollistetaan ionien lentorataa kvadrupolin läpi sinusoidaalisella radalla. Kuvassa toinen ioni ei ole resonanssissa radiotaajuussäteilyn kanssa ja ei pääse detektorille saakka vaan ajautuu pois ennen sitä. Kuvassa olevat kosiniyhtälöt kuvaavat ioneihin vaikuttavia jännitteestä U ja radiotaajuussäteilyä $V_{RF}\cos(\omega)$ aiheuttamia voimia, jotka ovat vastakkaisilla sauvoilla vastakkaismerkkiset johtuen niiden erimerkkisistä jännitteistä. Radiotaajuussäteilyn lausekkeessa oleva symboli ω tarkoittaa radiotaajuuden kulmataajuutta.

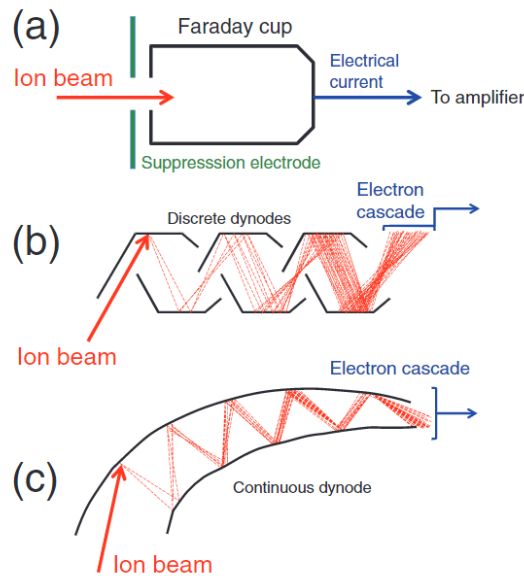
Lisäksi on olemassa erilaisia ioniloukkusysteemeitä, joissa ionit kerätään yhteen ja



Kuva 16: Kaavakuva kvadrupoli-massa-analysaattorista. Kuva on otettu lähteestä Downard, K., *Mass Spectrometry : A Foundation Course*, Iso-Britannia, Royal Society of Chemistry, 2004, ja sen käyttöön on saatu lupa: the Royal Society of Chemistry

vain tietyn massa-varaussuhteen m/z omaavat ionit päästetään detektorille yhtä aikaa. Keräys tehdään muuttamalla ioniloukun ympärillä olevien elektrodien jännitteitä. Ioniloukun sisällä ionit liikkuvat sinusoidaalista rataa, joka johtuu ioneihin vaikuttavasta ympärillä olevasta rengaselektrodista peräisin olevasta radiotaajuussäteilystä. Ionien konsentraation ollessa pieni niiden tunnistamisherkkyys kasvaa, kun vain kyseiset ionit päästetään yhtä aikaa detektorille. Detektori havaitsee näin vähäiset ionit kaikkien näytteen ionien jatkuvaa virtaa herkemmin. Downardin kirjassa²⁷ muistutetaan että ioneja ei voida loukuttaa kuitenkaan loputtomia määriä ajatellen sen kasvattavan pienen konsentraation ionien havaitsemista. Vaikka suurempi määrä ioneita aiheuttaa herkemmän havaitsemisen detektorissa, niin suuri määrä ioneja ioniloukussa häiritsee niiden lentoratoja törmäilemällä toisiinsa ja niiden välisellä repulsiolla. Nämä vääristymät ioniloukun lentoradoissa edelleen väärentävät myös m/z arvoja.

Massaspektrometreihiin on olemassa erilaisia detektoreja, joilla eri massavaraussuhteiset ionit havaitaan. Detektorityyppejä ovat esimerkiksi faradayn kuppi ja erilaiset elektronimionistimet, jotka esitetään kuvassa 17.³⁷ Metalliseen Faradayn kuppiin (kuva 17 a) saapuessaan ionisuihku aiheuttaa elektronien liikkeen johteessa ja tämä muodostunut jännite voimistetaan ja saadaan talteen tietoa saapuneiden

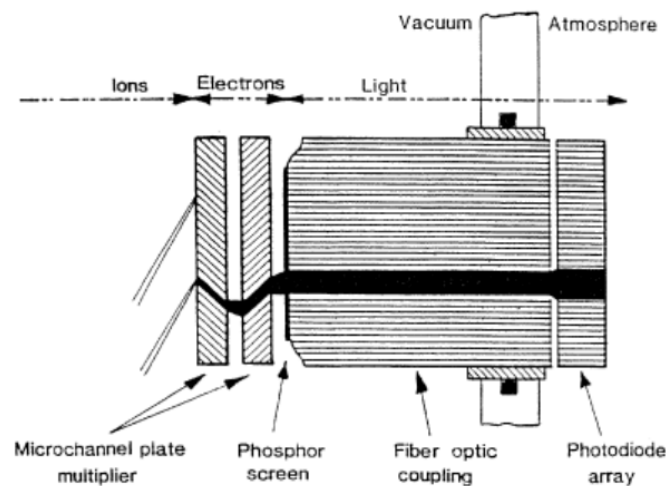


Kuva 17: Kuvat a) faradayn kupista b) diskreetistä ionimonistimesta ja c) jatkuvas-
 ta ionimonistimesta. Kuva on otettu lähteestä Wiedenbeck *et al.*, GGR Biennial
 Critical Review: Analytical developments since 2010., *Geostand. Geoanal. Res.*,
2012, 36, 337-398. Lupa kuvan käyttöön on saatu John Wiley and Sons. © 2012
 The Authors. Geostandards and Geoanalytical Research © 2012 International As-
 sociation of Geoanalysts

ionien lukumäärästä. Elektronimonistimet (electron multipliers) monistavat sekun-
 däärielektronien lukumäärän, jotka irtoavat ilmaisimen pinnasta, kun ionit pom-
 mittavat sitä. Eri elektronimonistimet eroavat toisistaan siinä, miten monistetut
 elektronit liikkuvat monistimen sisällä. Diskreeteissä dynodimonistajissa (kuva 17
 b) monistinlevyn pinnasta emittoituneet sekundäärielektronit kimpoavat toiselle
 levyille, josta edelleen irtoaa lisää elektroneja ja niin edelleen. Jatkuva dynodimo-
 nistaja (kuva 17 c) koostuu jatkuvasta johdeseinämäsuppilosta, jonka reunoista
 emittoituu sekundäärielektroneja ionien törmätessä ensimmäiseen seinämään. En-
 simmäisestä seinämästä elektronit kimpoavat toiseen seinämään ja etenevät näin
 kimpoillen syvemmälle suppilossa. Molemmissa dynodimonistajissa jokaisella ker-
 ralla seinämästä irtoaa edellistä kertaa enemmän elektroneja ja niin monistus ete-
 nee. Monistimista elektronit etenevät muuntajalle, joka muuntaa elektronivirran
 jännitteeksi.

Näiden kolmen lisäksi Downardin kirjassa esitellään mikrokanavalevyilmaisin (mic-
 rochannel plate MCP) sekä järjestelmädetektori, jotka pystyvät ottamaan ioneja

vastaan laajemmalta alueelta. Esimerkiksi TOF-analyysimenetelmässä ionit eivät saavu pienelle alueelle, koska niitä ei valikoida massa-analyysissä, vaan ionien m/z skaala on suurempi. Mikrokanavadetektorin levyssä on useita mikrokanavia, joihin ioni voi ohjautua. Törmätessään kanavaan, se emittoi sekundäärielektronin kuten aiemmin esitellyissä elektronimonistimissa ja elektronit monistuvat jokaisessa törmäyksessä kanavan seinämiin. Kanavat eivät ole saman suuntaisia ionisuihkun kanssa, vaan ne on kohdistettu pienellä kulmalla ionisuihkuun, jotta ionit törmäivät sen seinämiin eivätkä mene siitä läpi törmäämättä. Järjestelmädetektorissa ensimmäisenä ionit kohtaavat mikrokanavalevyn kuten kuvassa 18 vasemmalla on havainnollistettu. Tämän jälkeen elektronit törmäävät fosforoivaan pintaan, joka



Kuva 18: Kuva fotodiodijärjestelmädetektorista PDA (photodiode array detector). Kuva otettu lähteestä Evans, S., *Methods in enzymology*, 193, Academic Press, New York, 1990 ja lupa kuvan käyttöön on saatu Elsevier Science & Technology Journals.³⁸

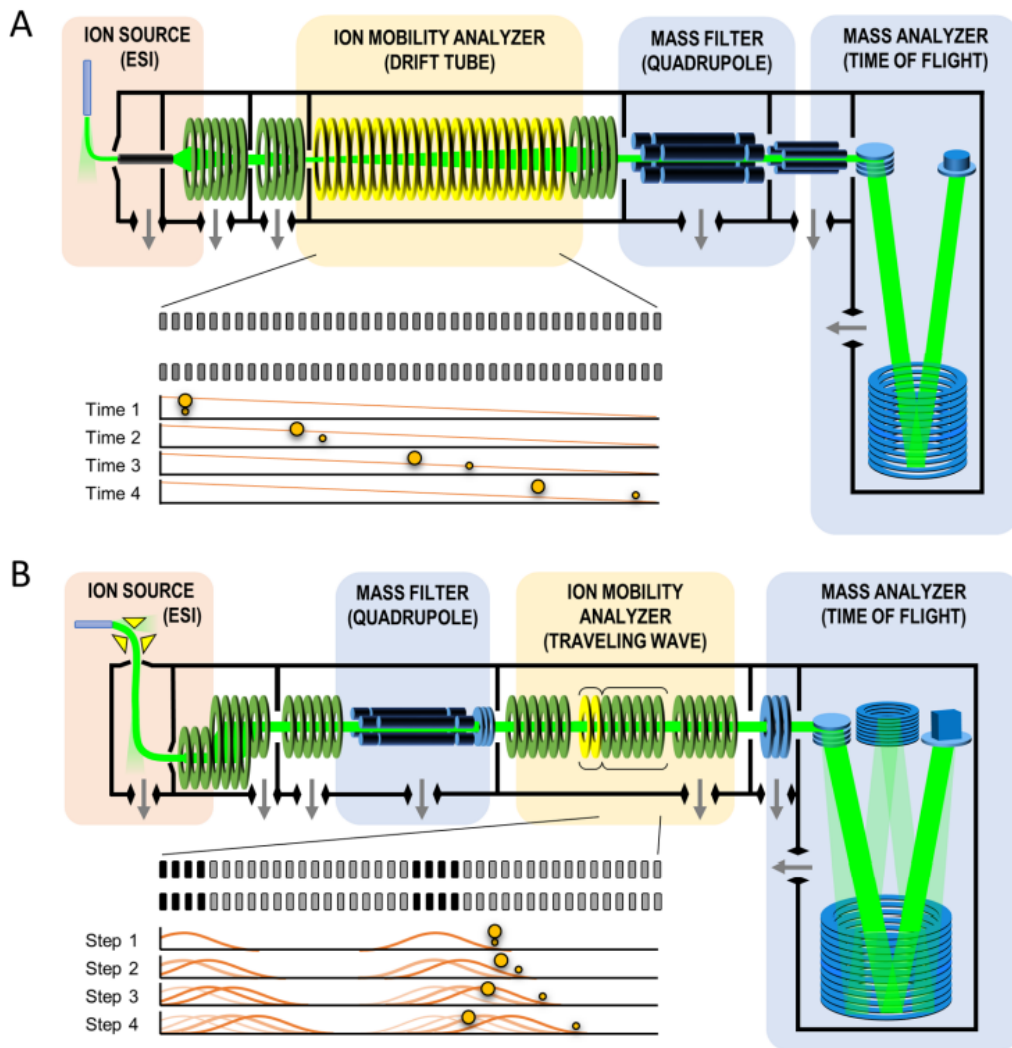
muuttaa elektronivirran edelleen valoksi eli fotoneiksi. Valo etenee valokuidussa ja saapuu fotodiodille, jossa fotonit välittyvät eteenpäin jännitteenä. Fotodiodilla muodostunut jännite pystytään analysoimaan kvantitatiivisesti eli määrällisesti. Massaspektrometrillä saatu analoginen informaatio muutetaan ADC (analog to digital) -muuntajan avulla digitaaliseen muotoon ja käytössä ollut tietokoneohjelma kokoaa eri m/z -arvot omaavien ionien runsaudet massaspektriiksi perustuen laitteelle ennen mittausta tehtyyn kalibrointiin. Kalibroinnissa tunnetaan kalibrointiliuoksessa olevien ionien tarkat m/z -arvot ja niiden avulla laite tunnistaa varsinaisen näytteen ionien m/z -arvot.

4.2 Ioniliikkuvuusmassaspektrometria

Kun massaspektrometrilla erotellaan ionit massa-varaussuhteen perusteella, niin ioniliikkuvuuspektrometrian avulla voidaan erotella samalla massa-varaussuhteella esiintyvät ionit toisistaan avaruudellisen koon ja muodon perusteella. Näin voidaan erotella eri isomeerit toisistaan. Ioniliikkuvuusmassaspektrometria on myös huomattavasti nopeampi menetelmä isomeerien erotteluun kuin esimerkiksi kaasusu tai nestekromatografia.³⁹ Ioniliikkuvuus yksinkertaistaen perustuu avaruudellisesti isojen molekyylien hitauteen liikkua verrattuna pieniin molekyyliin erilaisissa ympäristöissä, sekä useasti varattujen ionien suurempaan nopeuteen niiden kokeman jännitteen vaikutuspiirissä, pienemmän varauksen ioneihin verrattuna. Pelkkää ioniliikkuvuuspektrometriä voidaan käyttää ilman massaspektrometriäkin, mutta tunnistukseen yhdisteet täytyy tuntea standardiyhdisteiden avulla määritettävien yhdisteiden drift-ajat. Erottelu ei ole niin tehokasta ja paljon eri ioneja sisältävä näytteestä ei saada erotettua niin hyvin eri ioneja toisistaan. Kun massaspektrometri lisätään, saadaan ionit erotettua sekä massa-varaussuhteen mukaan, että myös lentoajan mukaan. Pakettiin lisättäessä vielä neste- tai kaasukromatografian, erottuvuus on jo erittäin hyvä. Erottelumenetelmiä ioniliikkuvuusmassaspektrometriassa on useita ja ne oli hyvin jaoteltu D'Atri *et al.* artikkelissa⁴⁰ ja niitä ovat: aikaerottuvuuteen perustuvat menetelmät (Drift tube ion mobility DTIM ja travelling-wave ion mobility spectrometry TWIMS), eri ionien erilaisiin kulkureitteihin perustuvat menetelmät (field asymmetric waveform ion mobility FAIMS) sekä ioneja loukuttavat ja ne liikkuvuuden perusteella valikoiden vapauttavat (trapping) menetelmät (trapped ion mobility spectrometry TIMS). Tämän tutkielman kokeellisessa osassa käytämme ensimmäisiä kahta eli aikaerottuvuuteen perustuvia DTIM ja TWIMS menetelmiä. Niitä käytetään yleisesti isojen rakenteiden esimerkiksi proteiinien määrittämisessä. Lisäksi esitellään uusi menetelmä cyclic ion mobility (cIM), joka perustuu TWIMS-menetelmään.

Kaavakuvat DTIM- ja TWIMS-erottelumenetelmien rakenteesta massaspektrometreissä löytyvät kuvasta 19. Kuvassa ylempänä on drift-tube-menetelmän sisältävän massaspektrometrin rakenne ja alempana travelling-wave-menetelmällä toimivan massaspektrometrin rakenne. Kuvan massaspektrometreissä ionit kulkevat vasemmalta oikealle. DTIM-MS asetelmassa vasemmanpuoleisena on ionilähde, jonka jälkeen ionit kerätään ennalta asetetun aikaikkunan ajan ioniloukkui-

Temporally-Dispersive Ion Mobility Techniques



Kuva 19: Kaavakuvat drift-tube ja travelling-wave massaspektrometrien rakenteista.⁴¹

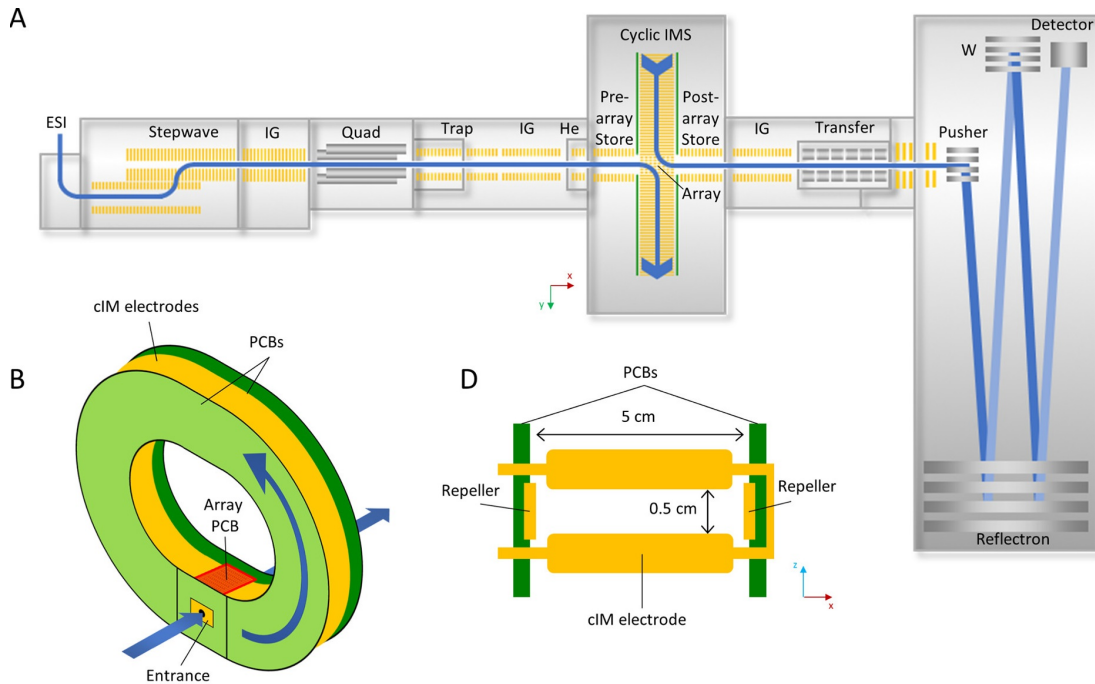
hin (ion trap), josta ne päästetään ioniliikkuvuuden määrittävään drift-putkeen. Putkessa ionit erotellaan koon mukaan, kun tasajännite kuljettaa ionit kaasua sisältävän putken läpi. Kaasu on reagoimatonta (inert), jotta ionit eivät vuorovaikuttaisi kaasuatomien kanssa, muuten kuin törmäilemällä. Kaasuina käytetään esimerkiksi typpeä ja heliumia. Kaasuatomit estävät suurimpien ionien liikettä enemmän, kuin pienempien ionien ja isommilla ioneilla kestää putken läpi menemiseen pidempi aika törmäillessään kaasuatomeihin enemmän. Putken läpi kuljetun ajan terminä käytetään drift-aikaa eli lentoaikaa T_d . Drift-putkesta ionit siirtyvät DTIM-MS-laitteistossa mahdollisesti olevaan kvadrupoli-massa-analyysiin, jossa ne erotellaan edelleen massa-analyysiin. Kvadrupolilta ionit voidaan tarvittaessa myös kuljettaa massa-analyysiä ennen tehtävään törmäysaktivointiin. Tör-

mäysaktivoinnissa valitut ionit aktivoidaan, jotta ne mahdollisesti myös pilkkoutuvat ja ionien hajoamisesta saadaan lisää tietoa niiden kemiallisista ja rakenteellisista ominaisuuksista. Viimeisenä ionit kulkeutuvat massa-analyysiin joka kaavakuvassa on lentoaika-analyysimenetelmä (TOF). Kaleniuksen *et al.* artikkelissa²⁸ kerrotaan, että TOF massa-analyysi sopii hyvin DTIM-menetelmälle, sillä siinä ionien skannausaika on niin nopea. Toisaalta artikkelissa kerrotaan myös, että hitaampi ioniliikkuvuusmenetelmä esimerkiksi TIMS mahdollistaa yhdistämisen FT-ICR-massa-analyysiin. Tällä yhdistelmällä voidaan ioniliikkuvuusmittauksen jälkeen törmäysaktivoida yhtä aikaa kaikki näytteen ionit. TIMS-FT-ICR yhdistelmällä ionien erottelutarkkuus on erinomainen ja kaikkien alkuperäisten ionien pilkkeet voidaan yhdistää lähtöioniinsa saman drift-ajan mukaan.

Kuvassa 19 alempana on travelling-wave menetelmä (TWIMS) ja sen rakenne on vasemmalta lähtien lähes sama kuin aiemmin esitellyssä DTIM-MS-laitteistossa. TWIMS-laitteistossa kvadrupolit ovat ennen ioniliikkuvuuserottelua ja sen jälkeen on viimeisenä TOF-massa-analysointilaitteisto. Ioniliikkuvuuserottelua ennen kvadrupolissa tehty ionien erottelu tuo mahdollisuuden tarkastella pelkkien valittujen ionien törmäysaktivoinnissa hajonneiden ionien hajoamistuotteita eli pilkkeitä. Travelling-wave menetelmässä drift-putkessa erikokoiset molekyylit kulkeutuvat eri tahdissa aaltomaisen liikkuvan jännitepotentiaalin mukana drift-kaasua vastaan. Jännitepotentiaaliaallot muodostetaan rengaselektrodien avulla. Muuttuva jännite (DC) ja radiotaajuussäteily (RF) muodostavat eteenpäin liikkuvan potentiaaliaaltojen sarjan.⁴² Mitä isompi ioni on, sitä suuremman potentiaaliaaltorintaman se tarvitsee kulkeutuakseen drift-putken läpi. Isot ionit nousevat ensimmäisten potentiaaliaaltojen harjalle ja aalto menee niistä ohi eivätkä ne välttämättä pääse heti ensimmäisten aaltojen mukana liikkeelle, vaan tarvitsevat useamman potentiaaliaallon antaman liike-energian liikkuaan drift-putken päästä päähän. Pienemmät ionit liikkuvat aaltojen mukana pienemmällä liike-energialla kuin isommat. Ionien erottuvuuteen vaikutetaan aaltojen nopeudella ja aaltojen korkeudella.⁴² Ionien liikkuvuutta voidaan erilaisten elektronisten konfiguraatioiden lisäksi muuttaa erilaisilla kaasuilla esimerkiksi hiilidioksidilla ja argonkaasulla. Kaasuvaihtoehtojen lisäksi eri lämpötiloilla on vaikutusta ionien liikkuvuuteen.⁴¹

Myös uusi syklinen ioniliikkuvuuserottelumenetelmä (cIM) on tullut käyttöön ja siitä kerrotaan erittäin seikkaperäisesti Giles *et al* artikkelissa A Cyclic Ion Mobility-

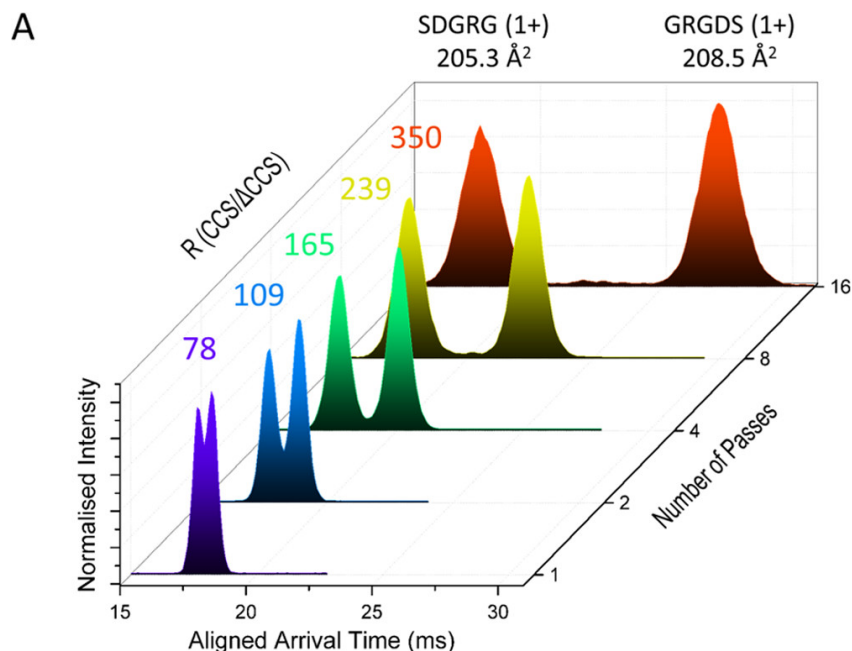
Mass Spectrometry System.³⁹ Kaavakuvia menetelmästä löytyy kuvasta 20. Tä-



Kuva 20: Kaavakuvia cIM-laitteiston rakenteesta: A) massaspektrometrin rakenne, jossa sinisellä viivalla kuvataan ionien kulkua laitteistossa, B) rengasrakenne, jossa ionit erotellaan TW-menetelmällä, C) yksi rengasrakenteen sadoista elektrodikomponenteista ionin kulkusuunnasta katsottuna⁴¹. Kuva on muokattu versio lähteen Giles K, *et al.*, A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System. Anal Chem. 2019;91(13):8564-8573. doi:10.1021/acs.analchem.9b01838 kuvasta 1.

mä TWIMS-menetelmään perustuva ioniliikkuvuuslaitteisto on rakennettu Waters SYNAPT G2-Si IM-MS laitteiston runkoon, mutta ioniliikkuvuusosuuksia on muokattu siten, että siihen on voitu liittää uusi kilparadan muotoinen pyörästetyn suorakulmion muotoinen rakenne, joka näkyy kuvassa 20 B)-kohdassa. Ionit ohjataan tälle rengasreitille, joka on kohtisuorassa niiden aiempaan kulkusuuntaan. Ulos tullessaan, ionien liike jatkuu samansuuntaisena kuin ennen ioniliikkuvuuseroittelua. Ionien reitti näkyy kuvassa 20 A)-kohdassa sinisellä. Rengasreitti on 98 cm pitkä ja se mahdollistaa ioneille pidemmän matkan erottautumiseen verrattuna muihin ioniliikkuvuusmenetelmiin. Ionit kerätään nippuihin ennen rengasreitille päästämistä ja niitä voidaan kierrättää rengasreitillä useampiakin kierroksia, jolloin ionien erottuvuus liikkuvuuden perusteella kasvaa. Mitä useamman kierroksen ionit kiertävät, sitä paremmin aiemmin drift-spektrissä päällekkäin olleet piikit erottuvat. Ionit liikkuvat rengasreitillä 608 elektrodin aiheuttamien potentiaalierojen

vaikutuksesta sekä radiotaajuussäteilyn avulla. Kuvassa 20 C)-kohdassa näytetään ionin näkökulmasta yksi elektrodi, jonka läpi ionit kulkevat. Drift-piikkien erottuvuus havaitaan hyvin kuvassa 21. Kuvassa on esitetty kahden ionin drift-piikit, jotka ovat yhden kierroksen kiertämisellä vielä päällekkäin, mutta mitä enemmän kierroksia ionit kulkevat sitä paremmin ionien drift-piikit erottuvat toisistaan. Me-



Kuva 21: Kahden eri ionin drift-spektrit kerrattuna peräkkäin cIM-menetelmän rengasreitin kierroslukumäärien perusteella. Kuvassa näkyy drift-spektrien piikkien erottuminen toisistaan ionien kulkiessa 1-16 kierrosta. Kuva on otettu lähteestä Giles K, *et al.*, A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System. *Anal Chem.* 2019;91(13):8564-8573. doi:10.1021/acs.analchem.9b01838

netelmällä on useita etuja tavalliseen lineaariseen erotteluun verrattuna ja Giles *et al.* ovat listanneet niitä kattavasti artikkelissaan.³⁹ CCS-arvoja ei voida tälläkään laitteistolla määrittää suoraan, vaan ne tulee edelleen tehdä kalibroimalla, kuten lineaarisen TWIMS-menetelmän tapauksessa.

4.3 Törmäyspoikkipinta-ala

Ioniliikkuvuuden tehokkuutta arvioidaan erotuskyvyllä (Resolving power). Se määritellään jakamalla massapiikin huipun korkeus sen korkeuden puolivälin leveydellä. Eri ioniliikkuvuuden määrittämismenetelmillä on kuitenkin erilaiset määreet, joilla

erotuskyky lasketaan. Määreet voivat liittyä aikaan, törmäyspoikkipinta-alaan tai ionien liikettä hallitsevaan jännitteeseen (compensation field ($E_c/\Delta E_c$)).⁴¹ Siksi on hyödyllistä, että vain yhtä suuretta käytetään hyväksi ja muutetaan ionierottelusta saatu määre samaksi eli törmäyspoikkipinta-alaksi (collision cross section, CCS). DTIM-MS-menetelmällä tehty CCS-arvon määrittäminen voidaan tehdä sekä teoreettisesti että kokeellisesti. Teoreettiseen määrittämiseen käytetään Mason-Schamp:n yhtälöä²⁸

$$\Omega = \frac{3}{16} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_B T} \frac{ezEt_d}{LN}}, \quad (4)$$

jossa Ω on laskettu CCS arvo, μ ionin ja drift-kaasun redusoitu massa (reduced mass), k_B on Boltzmannin vakio, e alkeisvaraus, z on ionin varaus, E sähkökentän suuruus, L drift-putken pituus ja N on kaasun lukumäärätiheys eli hiukkasten määrä tilavuutta kohti. DTIM-MS-menetelmällä CCS-arvo voidaan määrittää suoraan käyttämällä Mason-Schamp yhtälöä 4. On huomioitava, että sähkökentän on oltava vakio ja suhteellisen matala kuten DTIM-MS menetelmän avulla pystytään varmistamaan. Sähkökentän ja kaasunlukumäärätiheyden suhde tulisi olla yhtä suuri tai alle 2 Td (1 Townsend Td = 10^{-17} Vcm²), jotta yhtälö pätee.⁴⁰ DTIM-MS-menetelmällä määrittäessä CCS-arvoa käytetään stepped wave menetelmää, jossa drift-putken jännitettä nostetaan tietyin välein ja tehdään ioniliikkuusmittaus kaikilla valituilla jännitteen arvoilla. Agilent 6560 IMMS-laitteella on tehty rinnakkaistutkimusta useista CCS-arvoista ja arvot on määritetty samoilla parametreilla samoille yhdisteille. Stow *et al.* kertovat tuloksissaan saaneensa erittäin yhteneväiset CCS-arvot kaikkien kolmen tutkimuksessa mukana olleiden laboratorioden välillä. RSD (relative standard deviation) kolmelle eri laboratoriolle oli 0,29 %. Tämä kertoo menetelmän hyvästä toistettavuudesta ja siitä, että laitteiden olosuhteet pystytään määrittämään ja kontrolloimaan erinomaisesti.

TWIMS-menetelmässä sähkökenttä ei ole drift-putkessa vakio muuttuvan potentiaalilin vuoksi ja siksi myöskään tasaiselle potentiaalille määritettyä yhtälöä 4 ei voida hyödyntää. CCS-arvoja ei voi laskea tästä syystä teoreettisesti TWIMS-menetelmälle. Tätä varten on olemassa CCS-kirjastoja useille peptideille, joita voidaan käyttää kalibroimaan CCS-arvot niitä hyvin ominaisuuksiltaan vastaaville ioneille. TWIMS-menetelmää kehitetään jatkuvasti törmäyspoikkipinta-alojen määrittämisen ja CCS-kirjastoja laajennetaan, jotta ionien tunnistaminen ja karak-

terisointi onnistuisi paremmin. Polyalaniinia käyttämällä kalibranttina, on pystytty mittaamaan useille tuhansille peptideille CCS-arvot 3-4 % tarkkuudella.⁴¹ Harrison *et al.*⁴³ esittävät, että proteiinien kalibrointiin käytettyjä kalibrantteja ovat olleet esimerkiksi ubikitiini, sytokromi c ja myoglobiini, koska nämä ovat halpoja, helposti sekä saatavilla että käsiteltäviä, pieniä ja veteen liukenevia. Perustuen useampaan lähteeseen he myös kertovat, että usein kalibranttien CCS-arvot on mitattu juuri DTIM-MS-laitteella. Samassa artikkelissa mainitaan myös, että ongelmaksi kalibroinnissa saattoi muodostua se, ettei TWIMS-laitteelle tarkoitettujen kalibranttien CCS-arvojen määrittämiseen käytetyissä DTIM-MS-laitteissa käytetty samaa kaasua eli tyyppiä vaan heliumia. Agilent 6560 tullessa markkinoille, CCS-arvojen määrittämisessä voidaan käyttää myös tyyppiä ja TWIMS-laitteiston CCS-arvojen kalibrointi voidaan tehdä luotettavammin. TWIMS-menetelmän erotuskyky on sen verran heikko, ettei sillä välttämättä pysty erottamaan niin hyvin ionien eri konformaatioita ja saman ionin eri konformaatioiden drift-piikit voivat mennä osittain tai kokonaan päällekkäin.²⁸

Kalenius *et al.* kertovat että ioniliikkuvuusmassaspektrometrialla määritetty CCS-arvo voi poiketa esimerkiksi röntgenkristallografialla määritetystä geometrisesta pinta-alasta. Tämä johtuu heidän mukaansa siitä, että esimerkiksi suurella varausluvulla esiintyvillä proteiineilla on suurempi molekyylin sisäinen Coulombinen repulsio, joka vaikuttaa molekyylin avaruudelliseen kokoon. Kaasun ja kompleksin välistä vuorovaikutusta ja sen vaikutusta CCS-arvoon ei myöskään saada arvioidua tarpeeksi tarkkaan kun CCS-arvo lasketaan röntgenkristallografisesta rakenteesta.²⁸ Devine *et al.* esittävät proteiinien ja RNA:n CCS-arvoja käsittelevässä artikkelissaan⁴⁴, että ESI-TWIMS menetelmällä määritetyt CCS-arvot ovat pienempiä kaasuolomuodossa kuin mitä CCS-arvot ovat nesteessä tai kiinteänä määritettyinä. Tämä asia kannattaa ottaa huomioon esimerkiksi, jos arvioidaan molekyylin kokoa sovelluksessa, jolloin on hyvä huomioda onko CCS-arvo määritetty samasta olomuodosta kuin mitä se suunnitellussa sovelluksessa on. Harrison *et al.*⁴³ tutkiessaan proteiinien CCS-mittauksia ovat tehneet useiden artikkelien pohjalta huomion, että tärkeää on pyrkiä siihen että kalibrantin CCS-mittauksessa ja näytteen CCS-mittauksessa ovat mahdollisimman samat olosuhteet, vaikka laitteistot ovat erilaiset. He korostavat myös, että mitattavan ionin ja kalibrantin olisi hyvä olla samanlaisia kooltaan, mutta myös kemiallisilta ominaisuuksiltaan, jotta kalibrantin ja näytteen drift-ajat olisivat suunnilleen samat ja näytteen ioneille

saataisiin luotettava CCS-arvo.

4.4 Sovelluskohteet

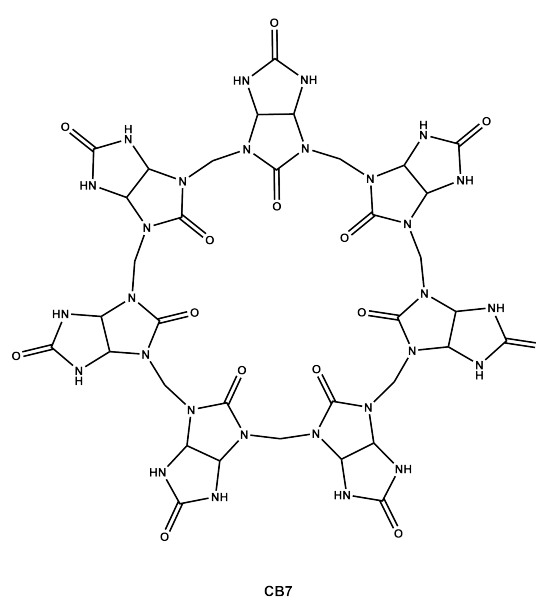
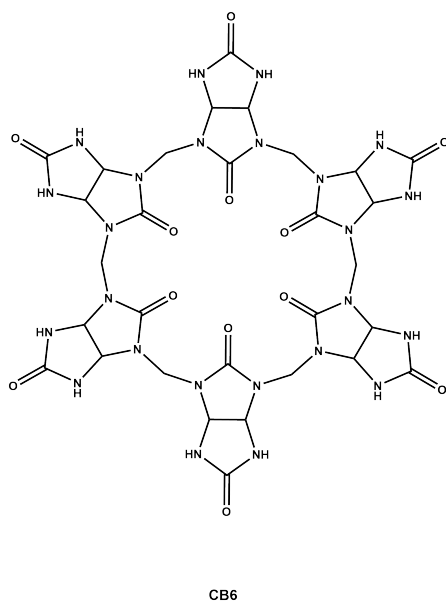
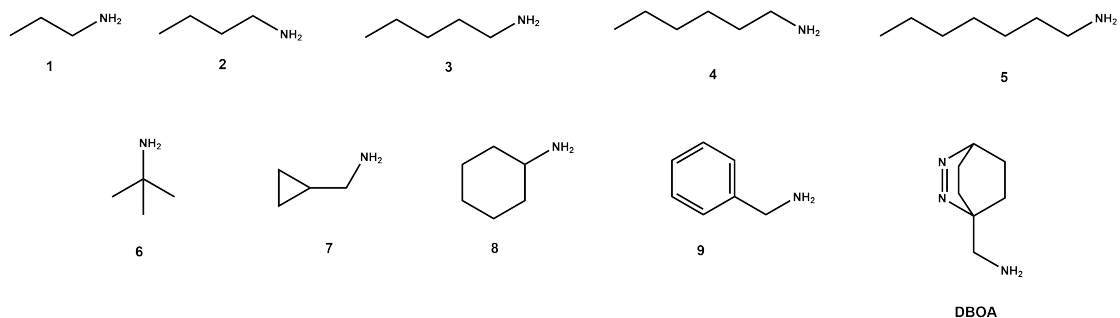
Useissa käyttämissäni lähteissä on kerrottu sama ioniliikkuvuusmassaspektrometrian suosion kasvutarina, eli laitteiden määrä on kasvanut paljon, kun ioniliikkuvuusmassaspektrometreistä aloitettiin valmistaa kaupallisia laitteita. Ioniliikkuvuusmassaspektrometrian sovelluskohteita on paljon esimerkiksi liittyen ionien tunnistamiseen biologisista matriiseista. Esimerkkejä sovelluskohteissa analysoitavista aineista ovat esimerkiksi: hyönteismyrkyt⁴⁵, lääkkeet ja räjähdysaineet. Ioniliikkuvuusmassaspektrometrien hyviä puolia ovat niiden korkea herkkyys tunnistaa eri ioneja näytteestä, pieni näytemäärä ja vaadittu konsentraation pienuus.²⁸ Näytteen puhdistus ei ole niin suuri haaste kuin esimerkiksi joissain muissa kemiallisissa analyysimenetelmissä, kun analysoitavien ionien määrä voidaan rajata haluttuun osajoukkoon. Ioniliikkuvuusmassaspektrometriaa voidaan myös käyttää esimerkiksi tutkiessa miten erilaiset ligandit vaikuttavat proteiinin laskostumisen avautumiseen.²⁸ Proteiinin ja ligandin muodostamaa kompleksia tutkitaan törmäysaktivoinnilla ja saadaan selville, miten paljon energiaa mikäkin kompleksi vaatii hajotukseen. Asioita mitä pitää ottaa huomioon tutkittaessa heikoilla vuoro-vaikutuksilla rakentuneita supramolekyylejä ioniliikkuvuusmassaspektrometrialla ovat esimerkiksi, oikeanlaisen liuottimen valinta, lämpötila, konsentraatio ja ionilähteen jännitteet.²⁸ Jos olosuhteisiin ei kiinnitä tarpeeksi huomiota, kompleksi voi hajota tai muuttaa muotoaan niin ettei mitattavaksi tarkoitettu näyte enää sisällä siitä etsittyä ionia. Siksi on tärkeää, että mittauksen olosuhteet pystytään tekemään oikeanlaisiksi juuri kyseiselle näytteelle.

Kokeellinen osa

5 Johdanto

Kokeellisessa osassa tutkittiin kukurbituriilikomplekseja ja niiden rakennetta massaspektrometriamittausten avulla. Mittauksia tehtiin kukurbituriilien alkalimetalli- ja amiinikomplekseille. Komplekseja tutkittiin ioniliikkuvuusmassaspektrometriamittauksilla (IM-MS), törmäysaktivointimittauksilla (CID, in Source-CID, IMMS-CID) sekä määritettiin komplekseille törmäyspoikkipinta-alat (collision cross section CCS). Massaspektreissä havaitaan kompleksien muodostuminen ja törmäysaktivointimittauksilla voidaan tutkia kompleksien pilkkoutumista ja vuorovaikutusten vahvuutta. Törmäyspoikkipinta-alalla arvioidaan kompleksien rakennetta ja voidaan havainnoida vierasmolekyylin kiinnityskohta isäntämolekyylissä.

Kukurbituriilin alkalimetallikompleksimittauksiin valittiin seuraavat alkalimetallit: litium, natrium, kalium ja rubidium. Lisäksi kokeiltiin muodostaako kukurbituriili hopeaionikompleksia. Mittauksissa käytetyt yhdisteet löytyvät taulukosta 2. Kukurbituriilin amiinikompleksimittauksiin valittiin seuraavat amiinit: propyyliamiini **1**, butyyliamiini **2**, pentyyliamiini **3**, heksyyliamiini **4**, heptyyliamiini **5**, tert-butyliamiini **6**, syklopropyylimetyyliamiini **7**, sykloheksyyliamiini **8**, bentsyyliamiini **9** ja 2,3-diatsabisyklo[2.2.2]okt-2-eenimetyyliamiini **DBOA**. Tutkimuksessa käytetyt amiiniyhdisteet ja kukurbituriilit on esitetty kuvassa 22.



Kuva 22: Tutkimuksessa käytettyjen amiiniyhdisteiden ja kukurbituriilien rakenteet: propyyliamiini **1**, butyyliamiini **2**, amyliamiini **3**, heksyyliamiini **4**, heptyyliamiini **5**, tertbutyyliamiini **6**, syklopropyyliimetyyliamiini **7**, sykloheksyyliamiini **8**, bentsyyliamiini **9**, 2,3-diatsabisyklo[2.2.2]okt-2-eenimetyyliamiini **DBOA**, kukurbit[6]uriili **CB6** ja kukurbit[7]uriili **CB7**.

Taulukko 2: Tutkimuksessa käytetyt reagenssit ja niiden alkuainekoostumukset, moolimassat, valmistajat ja tunnetut puhtausasteet

Aine	Alkuainekoostumus	Moolimassa g/mol	Alkuperä	Puhtausaste (%)
Natriumjodidi	NaI	149,8942	Sigma-Aldrich	99,999
Hopeatetrafluoroboraatti	AgBF ₄	194,6728	Aldrich	98
Natriumasettaatti	C ₂ H ₃ O ₂ Na	82,0339	Fluka	≥ 99
Hopeanitraatti	AgNO ₃	169,8731	VWR	
Natriumkloridi	NaCl	58,4427	Aldrich	99,999
Kaliumkloridi	KCl	74,5512	Fluka	99,9995
Litiumkloridi	LiCl	42,3930	Baker	99,1
Rubidiumkloridi	RbCl	120,9206	Cerac	99,9
Propyyliamiini 1	C ₃ H ₉ N	59,1104	Prof. Naun ryhmä	-
Butyyliamiini 2	C ₄ H ₁₁ N	73,1370	Prof. Naun ryhmä	-
Amyyliamiini 3	C ₅ H ₁₃ N	87,1636	Prof. Naun ryhmä	-
Heksyyliamiini 4	C ₆ H ₁₅ N	101,1902	Prof. Naun ryhmä	-
Heptyyliamiini 5	C ₇ H ₁₇ N	115,2168	Prof. Naun ryhmä	-
Tertbutyyliamiini 6	C ₄ H ₁₁ N	73,1370	Prof. Naun ryhmä	-
Syklopropyyliimetyyliamiini 7	C ₄ H ₉ N	71,1211	Prof. Naun ryhmä	-
Sykloheksyyliamiini 8	C ₆ H ₁₃ N	99,1743	Prof. Naun ryhmä	-
Bentsyyliamiini 9	C ₇ H ₉ N	107,1533	Prof. Naun ryhmä	-
DBOA	C ₇ H ₁₃ N ₃	139,1985	Prof. Naun ryhmä	-
CB6	C ₃₆ H ₃₆ N ₂₄ O ₁₂	996,8261	Prof. Naun ryhmä	-
CB7	C ₄₂ H ₄₂ N ₂₈ O ₁₄	1162,9638	Prof. Naun ryhmä	-

6 Näytteiden valmistus ja laitteistot

6.1 Näytteiden valmistus

Tutkimuksen kohteena olivat kukurbituriilit (**CB6** ja **CB7**), useat alkalimetallit, hopea ja erilaiset amiinit. Metallit olivat näytteissä suoloina. Näytteiden suolat olivat: natriumjodidi (NaI), hopeatetrafluoroboraatti (AgBF₄), natriumasettaatti (C₂H₃O₂Na), hopeanitraatti (AgNO₃), natriumkloridi (NaCl), kaliumkloridi (KCl), litiumkloridi (LiCl) ja rubidiumkloridi (RbCl). Ensimmäiseksi yhdisteistä valmistettiin kantaliuokset punniten yhdisteet ja liuottaen ne HPLC-laatuiseen veteen. Näytteisiin isäntä- ja vierasmolekyylien välille haluttiin tunnetut konsentraatiosuhteet ja näytteiden valmistusta helpottaakseen kantaliuosten konsentraatioiksi valittiin 1 mM tai 5 mM. Kantaliuokset valmistettiin 1,5 ml kromatografia-

pulloihin.

CB6 on niukkaliukoinen veteen, joten sen annettiin liueta 10 % muurahaishapon vesiliuoksessa yön yli. Seuraavana päivänä **CB6**:n vesiliuos erotettiin kiinteästä sakasta. **CB6**:n kantaliuoksen konsentraatiota ei tunneta tarkasti, mutta kantaliuoksen konsentraatio olisi ollut 1 mM jos yhdiste olisi liuennut kokonaan veteen. Näyteliuosten konsentraatiot vaihtelivat 10-300 μM . Näytteet tehtiin 1,5 ml eppendorf-putkiin ja liuottimena käytettiin HPLC-laatuista vettä. Näytteet olivat tuoreita, eli ne valmistettiin kantaliuoksista juuri ennen mittausta. Kukurbiturii-
lien konsentraatio oli mittauksissa 10-30 μM ja vieraita lisättiin ylimäärä (2,5:1, 5:1 tai 10:1).

6.2 Agilent 6560 Ion Mobility ESI-QTOF-massaspektrometri

Mittaukset suoritettiin kahdella massaspektrometrillä, Agilent 6560 Ion Mobility ESI-QTOF-massaspektrometrillä (Jyväskylän yliopisto) ja Synapt G2-S-massaspektrometrillä (Freye Universität Berlin FUB). Massaspektrometrit löytyvät kuvista 23 ja 24.

Näytteen vienti laitteeseen tapahtui suorasyöttönä ruiskupumpulla ja ionisaatiomenetelmänä oli sähkösumutus-ionisaatio (ESI). Agilentin laitteella ionien erottelu tapahtui n. 80 cm pitkässä drift-putkessa⁴¹ ionien liikkuvuuden perusteella ja driftkaasuna käytettiin typpeä. Taulukossa 3 ovat massaspektrometrillä käytetyt parametrit, joita käytettiin eri isäntä-vierasryhmien mittauksissa. Ionien polarisaatio oli mittauksissa positiivinen ja IM-MS-mittauksien yhteydessä käytettiin ohjelmaa Agilent Mass Hunter IM-MS Browser B.08.00. Massaspektrit on muokattu Corel Draw-kuvankäsittelyohjelmalla.

Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition ohjelmassa on oma valmis kalibroitimenetelmä, joka suoritettiin aina mittauspäivän alussa. Massaspektrometriin laitettiin kalibroitinäytteeksi Agilentin omaa kalibroitiliuosta (ES-TOF Tuning Mix), jossa massa-alue positiivisen polarisaation mittauksissa on m/z 118-2721. Kalibroitiohjelma käynnistettiin ja kalibrointi tapahtui automaattisesti tulostaen tuloksista raportin. Kalibroinnin jälkeen aloitettiin varsinaiset mittaukset.



Kuva 23: Agilent 6560 Ion Mobility ESI-QTOF-massaspektrometri.

Taulukko 3: Agilent 6560 massaspektrometrillä suoritettujen ioniliikkuvuus- ja törmäysaktivointimittausten parametrit eriteltyinä eri isäntä-vierasryhmien mukaan

Parametri	CB6, CB7+metallit	CB6+1-5	CID (CB6+3-5)	CB7+1-5	CB6+6-8	CB6+9
Flow Rate ($\mu\text{l}/\text{min}$)	5	5	5	5	5	5
Gas Temp ($^{\circ}\text{C}$)	200	250	280	250	280	280
Drying Gas (l/min)	3	10	7	12	12	10
Nebulizer (psi)	15	40	50	50	50	40
V Cap (V)	4 000	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000
Fragmentor (V)	350	400	400	400	400	300
Oct 1RF V _{pp} (V)	750	750	750	750	750	700
Mass Range m/z	20 - 1 500	200 - 1 300	80 - 1 300	300 - 1 300	300 - 1 300	300 - 1 400
Max Drift Time (ms)	60	60	60	60	60	60
Trap Fill Time (μs)	20 000	10 000	5 000	5 000	5 000	5 000
Trap Release Time (μs)	150	250	250	250	250	250
High Pressure Funnel Delta (V)		150	150	200	200	200
High Pressure Funnel RF (V)	170	100	180	100	100	100
Trap Funnel RF (V)	150	200	180	200	200	200
Trap Entrance Grid Delta (V)	10	10	15	15	11	13
Trap Exit Grid 2 Delta (V)	7	7	7	7	7	7
Drift Tube Entrance Voltage (V)	1 700	1 700	1 700	1 700	1 700	1 700
Drift Tube Exit Voltage (V)	224	224	224	224	224	224
Rear Funnel Entrance (V)	217,5	217,5	217,5	217,5	217,5	217,5
Rear Funnel RF (V)	160	160	160	170	170	170
Rear Funnel Exit (V)	45	45	45	45	45	45
IM Hex Delta (V)	4	-4	-4	-4	-4	-4
Collision Cell Delta Delta (V)	0	0	20 - 200	0	0	0
IBC Delta Delta (V)	0	0	0	0	0	0

Ioniliikkuvuusmittauksen (IM-MS) kesto oli 1 min ja sillä saatiin näytteelle massaspektri ja drift-spektri. Spektrien esimerkkikuvat ovat tulokset-luvussa mittaustulosten yhteydessä. Agilentin massaspektrometrillä CCS-arvo määritettiin seuraavasti: Ensin suoritettiin 3,5 minuutin ioniliikkuvuusmittaus nostamalla drift-kentän jännitettä sadan voltin askelin puolen minuutin välein 1074 voltista 1674 volttiin. Mittausdatasta valittiin yksi puolen minuutin mittausjaksoista ja ohjelma (IM-MS Browser B.08.00) summaa sen aikana saadun ioniliikkuvuusdatan. Kolmiulotteisesta spektristä valitaan ionin isotooppipatterin drift-piikeistä kaksi tai kolme ja ohjelma laskee ionille CCS-arvon ja sille virheen. CCS-arvoa määritettäessä käytettiin jänniteparametrejä, jotka löytyvät Liite 2. CCS-arvoja määritettäessä tehtiin jännitejaksotettu IM-MS-mittaus myös kalibrantille ja sen CCS-arvoja verrattiin kirjallisuusarvoihin. Näin varmistettiin kalibroinnin riittävä tarkkuus ($\pm 1 \text{ \AA}$) CCS-arvojen määrittämiseen.

CB7:n litiumkloridi- ja rubidiumkloridinäytteille tehtiin törmäysaktivointimittauksia (CID), joissa ioni eristetään kvadrupolissa drift-putken jälkeen. Mittauksissa yritettiin saada selville kompleksien koostumusta, irtoavien pilkkeiden kautta. **CB6:n** amiinikompleksien $[\text{CB6} + (\mathbf{3,4,5,8,9}) + \text{H}]^+$ törmäysaktivointimittauksissa aktivointi tehtiin kaikille näytteen ioneille jo ionilähteessä ennen drift-putkea (in Source-CID) ja ionien eristystä ei tehty. Kiinnostuksen kohteena oli, onko esimerkiksi **CB6:n** eri amiinikompleksien välillä eroja tarvittavassa törmäysenergiassa, mikä vaadittaisiin amiinin kompleksista irtoamiseen. Toinen kiinnostuksen kohde oli, onko amiinin irtoamiseen vaadittavassa törmäysenergiassa eroja endo- ja eksokompleksien välillä. Mittaus oli sama kuin in Source-CID-mittaus, mutta tuloksissa vertailtiin endo- ja eksokompleksien pilkkoutumista erikseen. Mittauksiin valittiin **CB6:n** vierasmolekyyleiksi amiineista amyylimiini **3**, heksyylimiini **4** ja heptyylimiini **5**. Nämä amiinit valittiin, koska näiden **CB6:n** kerran protonoituneilla $[\text{CB6} + (\mathbf{3,4,5}) + \text{H}]^+$ amiinikomplekseilla havaittiin endo- ja eksomuodot.

6.3 Synapt G2-S-massaspektrometri

Synapt G2-S massaspektrometrillä näytteen vienti oli suorasyöttönä ruiskupumpulla ja ionisaatiomenetelmänä oli ESI. Laitteisto näkyy kuvassa 24. Ionien polarisaatio oli mittauksissa positiivinen. Ionien erottelu tapahtui travelling wave-



Kuva 24: Synapt G2-S travelling wave massaspektrometri.

menetelmällä, jonka periaate on kuvattu ioniliikkuvuuspektrometriaa käsittelevässä kappaleessa 4.2. Synapt G2-S laitteessa drift-putki on 18 cm pituinen. Mittausohjelma oli Synapt G2-S HDMS ja tulostenkäsittelyohjelma oli Masslynx. Massaspektrit on muokattu Corel Draw-kuvankäsittelyohjelmalla. Molemmissa massaspektrometreissä voidaan tehdä törmäysaktivointi ennen ioniliikkuvuserottelua. Tämän lisäksi Synapt G2-S massaspektrometri pystyy eristämään ionin jo ennen driftputkea. Taulukossa 4 ovat Synapt G2-S massaspektrometrillä suoriteissa mittauksissa käytetyt parametrit jaoteltuina kahteen eri mittausryhmään. Yhdisteet mittauksissa olivat **CB7** ja **DBOA** sekä **CB6** ja alkyliamiinit propyyliamiinista heptyyliamiiniin **1-5**.

Ioniliikkuvuusmittauksissa mittauksen kesto oli 5 minuuttia. Ionien keräysaikaa nostettiin yhdestä sekunnista viiteen, jolloin myös mittauksen kesto viisinkertaisui. Ionit kerätään ennen niiden päästämistä travelling wave-osaan ja keräysajan kesto pidennettiin, koska sekunnin keräysajalla kerran varattuja komplekseja $[\text{CB6}+5+\text{H}]^+$ ei havaittu. Kalibrointia varten mitattiin ensin polyalaniinille ioniliikkuvuusmittaus samoilla laitteen asetuksilla kuin mitattavalle näytteelle. Polyalaniini valittiin kalibrointiin, sillä se oli yhteensopivin mitattavien yhdisteiden kanssa saatavilla olevista kalibranteista. Kalibrantin IM-MS mittauksesta saatiin polyalaniinin protonoituneille ioneille drift-ajat ja polyalaniinin protonoituneiden ionien törmäyspoikkipinta-alojen kirjallisuusarvojen⁴⁶ ollessa tunnettu-

Taulukko 4: Synapt G2-S massaspektrometrillä suoritettujen ioniliikkuvuus- ja törmäysaktivointimittausten parametrit eriteltyinä **CB7:n DBOA-**kompleksimittauksiin ja **CB6:n** alkyyliamiinikompleksimittauksiin

Parametri	CB7+DBOA	CB6+1-5
Flow Rate ($\mu\text{l}/\text{min}$)	5	8
m/z	200 - 2 000	200 - 1 500
Capillary (kV)	2,50	3,70
Sampling Cone (V)	70	100
Source Offset (V)	60	90
Source ($^{\circ}\text{C}$)	90	120
Desolvation ($^{\circ}\text{C}$)	350	300
Desolvation Gas (l/h)	500	500
Nebuliser (bar)	5,2	6,3
IMS Wave Velocity (m/s)	300	350
IMS Wave Height (V)	40,0	37,5
Trap (ml/min)	2,0	0,4
Helium Cell (ml/min)	180	100
IMS (ml/min)	90	80
Entrance (V)	3,0	0,0
Bias (V)	45	31,6
Trap DC (V)	0,0	-4,0
Exit (V)	0,0	3,0

ja, tehtiin suora drift-aikojen funktiona. Suorasta saatiin funktio CCS-arvoille, kun tiedettiin kokeelliset drift-ajat. Kerran ja kahdesti varattujen polyalaniini-ionien CCS-arvoille oli omat arvot, joten molemmille varausasteille johdettiin omat CCS-arvojen funtkiot.

CB7:n DBOA komplekseille ja **CB6:n** propyyliamiini **1**, butyyliamiini **2**, amyylamiini **3**, heksyyliamiini **4** ja heptyyliamiini **5**-komplekseille tehtiin myös törmäysaktivointimittaukset (CID). Kohtena oleva ioni eristettiin muista ioneista massan perusteella ja eristetyille kompleksi-ioneille tehtiin törmäysaktivointi eri energioilla. Energiaa nostettiin tasaisin välein, kunnes kaikki aktivoituneet kompleksi-ionit hajosivat eli ionin massapiikkiä ei enää näkynyt massaspektrissä. **CB7:n DBOA-**kompleksin pilkkoutumisessa oltiin kiinnostuneita, miten amiini pilkkoutuu. Alkyyliamiineja sisältävien näytteen osalta törmäysaktivoinnilla haluttiin nähdä tuoko aktivointi eroja endo- ja eksokompleksien runsauksiin, kun ne hajoavat. Törmäysaktivoinnin kohtena olevat kompleksi-ionit olivat $[\text{CB7+DBOA+H}]^+$,

$[\text{CB7}+\text{DBOA}+2\text{H}]^{2+}$, $[\text{CB6}+1,2,3,4,5+\text{H}]^+$ ja $[\text{CB6}+1,2,3,4,5+2\text{H}]^{2+}$.

7 Tulokset

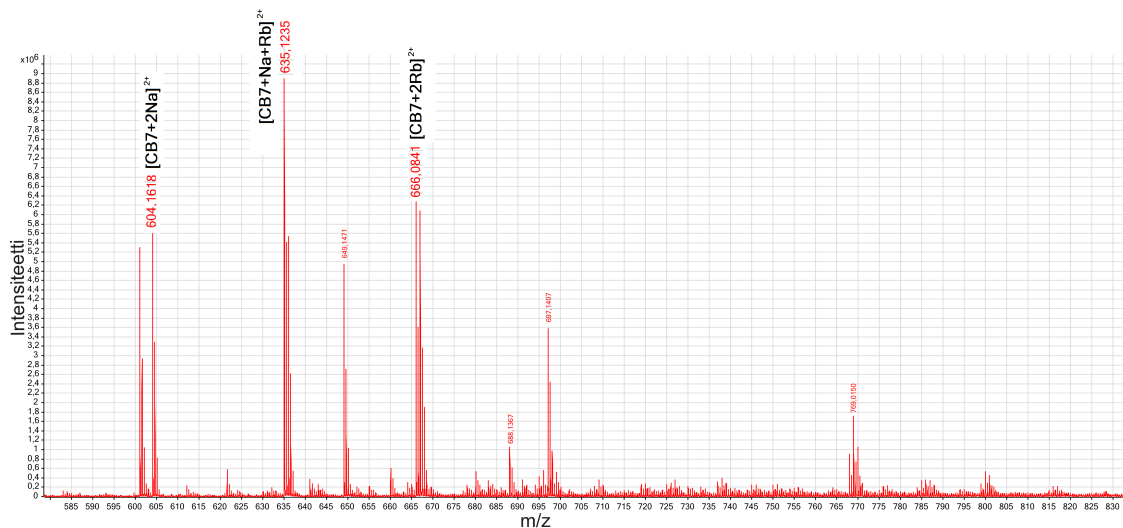
7.1 Kukurbituriilien alkalimetallikompleksit

Kukurbituriilit muodostavat komplekseja alkalimetallien kanssa ja IM-MS mittauksilla haluttiin selvittää kompleksien rakennetta. Metallikationit sitoutuvat kukurbituriilin karbonyyliin reunustamille kahdelle aukolle ionidipolivuorovaikutuksilla. Saman varauksen ioneilla esiintyy repulsiota ja ne eivät voi olla lähellä toisiaan ja siksi on hyvin epätodennäköistä että kaksi kationia olisi kompleksoituneena samaan kukurbituriilin suuaukkoon.²¹ Mielenkiinnon kohteena oli, tekevätkö erilaiset alkalimetalli-ionit kukurbituriilien kanssa ekso- vai endokomplekseja ja nähdäänkö kompleksoitumisessa eroja erikokoisten metallien suhteen. Mittauksissa tutkittiin kukurbituriilin komplekseja alkalimetallien kanssa litiumista rubidiumiin sekä hopean kanssa. Mittaukset suoritettiin Agilent 6560 Ion Mobility ESI-QTOF-massaspektrometrillä.

Kukurbituriilien (**CB6**,**CB7**) ja metallien kompleksoitumista tutkittaessa käytettiin näytteissä seuraavia alkalimetallisuoloja: natriumjodidi (NaI), natriumasetatti (NaCOOH), natriumkloridi (NaCl), litiumkloridi (LiCl), kaliumkloridi (KCl) ja rubidiumkloridi (RbCl). Näytteissä käytettyjen yhdisteiden alkuperä ja puhtausasteet löytyvät taulukosta 2. **CB7**:n kanssa tehtiin mittaukset edellä mainittujen lisäksi myös kahdella hopeasuolalla, hopeatetrafluoroboraatilla (AgBF_4) ja hopeanitraatilla (AgNO_3). Näytteiden konsentraatiot, käytetyt yhdisteet ja liuotin kerrotaan mittaustuloksissa taulukossa 5. Ennen mittausta etsittiin kokeilemalla sopivat parametrit, joilla kompleksit saatiin näkyviin massaspektrissä. Mittauksissa käytetyt parametrit on esitetty taulukossa 3. Mittauksissa käytetyt suolat aiheuttivat suurta kontaminaatiota laitteeseen ja mittausten jälkeen tehtiin paljon puhdistustoimenpiteitä. Suurimmat kontaminaatiot aiheutuivat hopeasuoloista ja siksi niiden komplekseja ei mitattu molemmilla kukurbituriileilla. Kontaminaatioita ei olisi muodostunut niin paljon, jos konsentraatiot olisivat olleet pienempiä.

Kuvassa 25 on massaspektri näytteestä, jossa oli vesiliuoksessa 20 μM vahvuista **CB7** ja rubidiumkloridia 5:1 suhteella. Mittauksen polariteetti oli positiivinen,

joten massaspektrissä näkyvät vain näytteessä olevat positiiviset ionit. Massaspektrissä pystyakselilla on massapiikkien intensiteetti, joka kuvaa ionien runsautta näytteessä ja vaak akselilla on ionien massa-varaussuhde m/z . Massaspektrin kaikkia ioneja ei ole pystytty tunnistamaan, mutta tunnistettuja ioneja ovat **CB7**:n kompleksit, joissa on vieraana natriumia $[\text{CB7}+2\text{Na}]^{2+}$ m/z 604,1618 tai rubidiumia $[\text{CB7}+2\text{Rb}]^{2+}$ m/z 666,0841 tai molempia $[\text{CB7}+\text{Na}+\text{Rb}]^{2+}$ m/z 635,1235. Tunnistetut ionit ovat kahdesti varattuja (varaus $z=2$), eli ionin molekyyliainoa saadaan selville kertomalla piikin massa-varaussuhde kahdella. Nimettömät piikit ovat näytteen tunnistamattomia kompleksi-ioneja tai epäpuhtauksia, jotka ovat muodostaneet ioneja näytteen yhdisteiden kanssa. Kuvan spektri on rajattu meitä kiinnostavalle alueelle, jossa havaitaan näytteen yhdisteiden muodostamia kahdesti varattuja komplekseja. Kerran varattuja komplekseja ei tässä spektrissä havaittu, joten niiden massa-alueita ei ole otettu kuvaankaan mukaan.



Kuva 25: Näytteen: 20 μM , $\text{RbCl}+\text{CB7}$, 5:1, H_2O :ssa massaspektri.

IM-MS-mittauksessa saadaan massaspektrin lisäksi drift-spektri. Drift-spektrissä pystyakselilla on ionien runsaus ja vaak akselilla on drift-aika. Jos näytteessä on kaksi tai useampia ioneja samalla m/z -arvolla, ne saadaan tunnistettua toisistaan tarkastelemalla drift-spektriä ionin massapiikin m/z -arvon kohdalta. Näistä saman massaisista isomeereistä avaruudellisesti suuremmalla rakenteella kestää kauemmin päästä kaasulla täytetystä drift-putkesta läpi ja suuremman ionin drift-aika on siten pidempi. Samalla massapiikillä voi siis olla kaksi eri drift-piikkiä, pienemmän drift-ajan kohdalla pienemmän ionin ja pidemmän drift-ajan kohdalla suuremman

ionin drift-piikki. Kukurbituriilien kohdalla vierasmolekyylit voivat kiinnittyä molekyylin ulko- tai sisäpuolelle muodostaen kompleksin ekso- tai endorakenteen. Saman massaiset ekso- ja endorakenteet saadaan erotettua toisistaan drift-putkessa ja ne havaitaan drift-spektrissä.

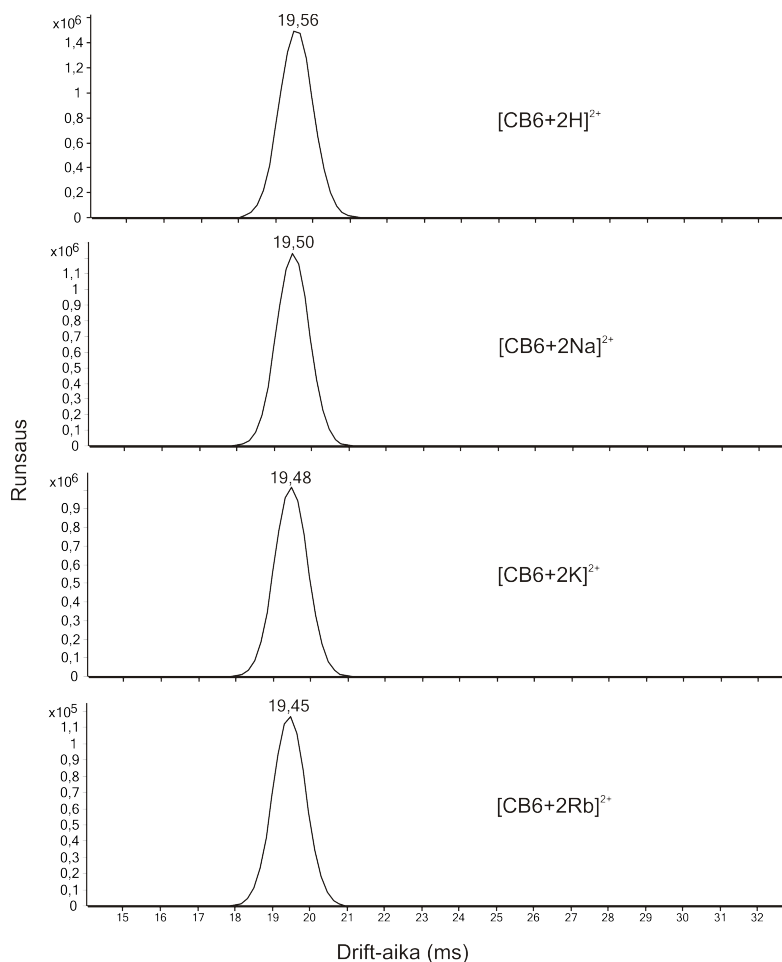
Mittaustulostaulukoista, esimerkiksi taulukosta 5 löytyvät koottuina mitatut ionit, ionien alkuainekoostumus, teoreettinen massa (m/z (teor)), kokeellinen massa (m/z (kok)), massatarkkuus millidaltoneina ($\Delta(\text{mDa})$) ja mittauksesta riippuen ionin drift-aika (DT) millisekunteina tai törmäyspoikkipinta-ala (CCS) yksikössä Å^2 . Mittauksissa ei havaittu kukurbituriilien kerran varattuja metallikomplekseja muilla metalleilla paitsi rubidiumilla $[\text{CB6}+2\text{Rb}+\text{Cl}]^+$ m/z 1201,0917. Kahdesti varattuja kukurbituriilikomplekseja havaittiin kaikkien mitattujen alkalimetallien kanssa. Kahdesti varattujen kompleksien drift-ajoille haluttiin vertailuajat kahdesti protonoituneista vapaista kukurbituriileista. Metallikompleksimittausten massaspektreissä ei havaittu protonoituja kukurbituriileja, joten molemmat kukurbituriilit mitattiin erikseen toisena päivänä samoilla parametreilla kuin metallikompleksit.

Taulukko 5: **CB6**:n ja **CB7**:n alkalimetallikompleksien mittaustulokset, joissa esiintyy vieraina kaksi samaa alkalimetallikationia tai kaksi hopeakationia.

Näyte	Ioni	Alkuainekoostumus	m/z (teor)	m/z (kok)	$\Delta(\text{mDa})$	DT(ms)
n.20 μM , CB6 , 10% muurahaishapon vesiliuos	$[\text{CB6}+2\text{H}]^{2+}$	$\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_{24}\text{O}_{12}$	499,15450	499,1536	0,90	19,56
n.20 μM , $\text{NaI}+\text{CB6}$, 5:1, H_2O	$[\text{CB6}+2\text{Na}]^{2+}$	$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_{24}\text{O}_{12}\text{Na}_2$	521,13645	521,1378	-1,35	19,50
n.20 μM , $\text{KCl}+\text{CB6}$, 5:1, H_2O	$[\text{CB6}+2\text{K}]^{2+}$	$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_{24}\text{O}_{12}\text{K}_2$	537,11038	537,1114	-1,02	19,48
n.20 μM , $\text{RbCl}+\text{CB6}$, 5:1, H_2O	$[\text{CB6}+2\text{Rb}]^{2+}$	$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_{24}\text{O}_{12}\text{Rb}_2$	583,05847	583,0635	-5,03	19,45
20 μM , CB7 , 10% muurahaishapon vesiliuos	$[\text{CB7}+2\text{H}]^{2+}$	$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_{28}\text{O}_{14}$	582,17904	582,1739	4,64	21,45
20 μM , $\text{NaCl}+\text{CB7}$, 5:1, H_2O	$[\text{CB7}+2\text{Na}]^{2+}$	$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_{28}\text{O}_{14}\text{Na}_2$	604,16098	604,1825	-21,52	21,70
20 μM , $\text{KCl}+\text{CB7}$, 5:1, H_2O	$[\text{CB7}+2\text{K}]^{2+}$	$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_{28}\text{O}_{14}\text{K}_2$	620,13492	620,1374	-2,48	21,58
20 μM , $\text{RbCl}+\text{CB7}$, 5:1, H_2O	$[\text{CB7}+2\text{Rb}]^{2+}$	$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_{28}\text{O}_{14}\text{Rb}_2$	666,08301	666,0841	-1,09	21,61
20 μM , $\text{AgBF}_4+\text{CB7}$, 10:1, H_2O	$[\text{CB7}+2\text{Ag}]^{2+}$	$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_{28}\text{O}_{14}\text{Ag}_2$	688,07631	688,0922	-15,89	21,94

Taulukon 5 tuloksista huomataan, että kahdesti protonoituneiden kukurbituriilien $[\text{CB6},\text{CB7}+2\text{H}]^{2+}$ drift-ajat eivät ole vertailukelpoisia metallikompleksien $[\text{CB6},\text{CB7}+2\text{Na}]^{2+}$, $[\text{CB6},\text{CB7}+2\text{K}]^{2+}$ ja $[\text{CB6},\text{CB7}+2\text{Rb}]^{2+}$ drift-ajoille. Drift-ajat protonoituneille komplekseille ovat samat protonoituneeseen **CB6** verrattuna ja **CB7**:n tapauksessa hyvin lähellä kompleksien drift-aikoja tai jopa niitä suurempia. Törmäyspoikkipinta-alan CCS arvo ei ole riippuvainen laitteen parametreista ja se on käyttökelpoisempi määrittämään luotettavammin ekso- ja endomuotojen eroja eri laitteidenkin välillä.

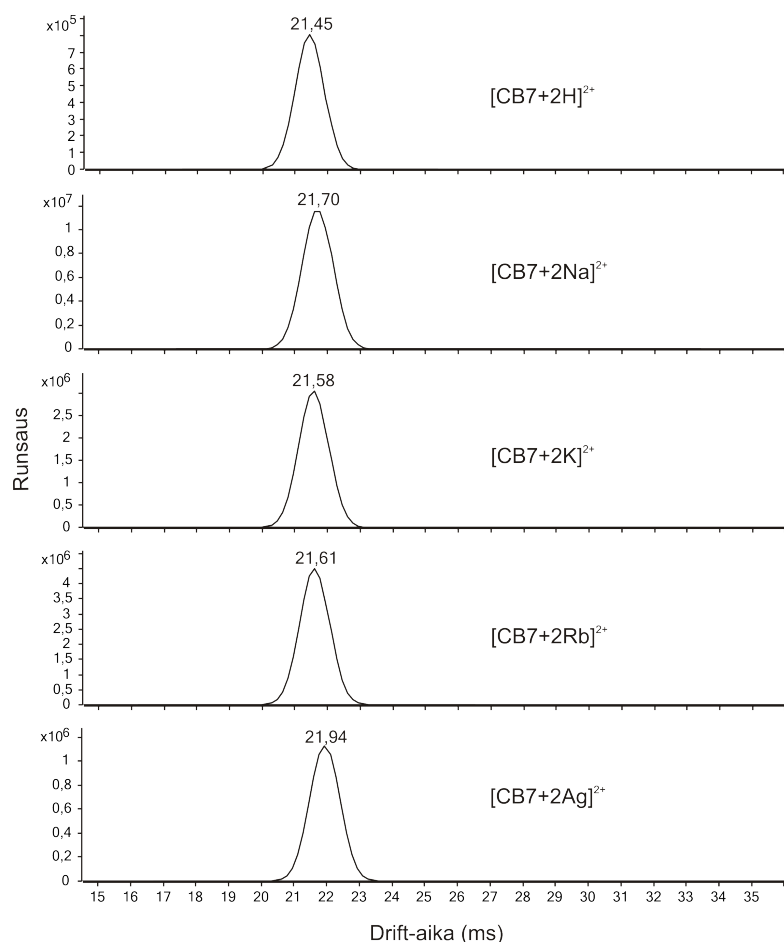
Mittauksista havaittiin, että **CB6** tekee komplekseja alkalimetallikationien kanssa siten, että vieraana on kaksi metallikationia (Taulukko 5). Vaikka kompleksien drift aikoja ei voida vertailla vapaan kahdesti protonoituneen **CB6**:n drift aikaan, voidaan niitä silti vertailla keskenään. Kompleksien drift-kuvaajat ovat koottuina päällekkäin samaan kuvaan kuvassa 26 ja niistä voidaan havaita drift-aikojen olevan lähes identtiset kaikille komplekseille. Kationien välillä on repulsiota, joten



Kuva 26: **CB6**:n alkalimetallikompleksien drift-spektrit, joissa vieraana on kaksi samaa metallia.

ne eivät voi olla molemmat täysin kukurbituriilin sisäpuolella. Drift-kuvaajista ei voida sanoa rakennetta yksiselitteisesti, mutta tiedetään että kompleksit muodostuvat ja ne eivät eroa avaruudelliselta kooltaan toisistaan. Kationit ovat sitoutuneina suuaukkoihin vähintään osittain molekyylin sisäpuolelle. Jos kationit olisivat sijoittuneet täysin kukurbituriilin suuaukkojen ulkopuolelle, kompleksien avaruudellinen koko muuttuisi suuremmaksi kationin koon suurentuessa ja tuloksissa huomattaisiin drift-ajan kasvu. Mittauksissa ei havaittu **CB6**:n ja kahden litiumkationin kompleksia $[\text{CB6}+2\text{Li}]^{2+}$. Tämän perusteella ei voida silti sanoa, ettei

kompleksia voisi muodostua ollenkaan kaasufaasissa, sillä muodostumiseen vaikuttavat mittausolosuhteet ja mittauksessa käytetyt massaspektrometrin asetukset. Marquez et al.²¹ tutkimuksessa litiumia ei saatu liukenemaan **CB6**:n kanssa nestefaasissa ja siitä oletettiin, että litiumioni myös kompleksoituu huonosti **CB6**:n kanssa. Tässä projektissa tehdyissä massaspektrometrimittauksissa litiumin ei havaittu kompleksoituvan kaasufaasissa **CB6**:n tai **CB7**:n kanssa ja tämä olisi yhdenmukainen tulos viitattuun artikkeliin **CB6**:n kohdalla.



Kuva 27: **CB7**:n metallikompleksien drift-spektrit, joissa vieraana kaksi metallikationia: natrium-, kalium-, rubidium- ja hopeakationit.

CB7 tekee **CB6**:n tapaan metallikomplekseja, joissa **CB7**:iin on sitoutunut kaksi samaa metallikationia. Taulukon 5 tuloksista ja kuvan 27 vastaavista drift-spektreistä nähdään, että natriumia sisältävästä kompleksista rubidiumia sisältävään kompleksiin drift-ajat poikkeavat hieman toisistaan mutta erot eivät ole merkittävän isoja. Hopeakompleksi $[\text{CB7}+2\text{Ag}]^{2+}$ sen sijaan poikkeaa muiden **CB7**:n alkalimetallia sisältävien kompleksien drift-ajoista suurempana. Alkalimetallia si-

sältävillä komplekseilla toinen kationeista on kompleksissa todennäköisesti kukurbituriilin sisäpuolella ja toinen ulkopuolella repulsion vuoksi. **CB7**:n hopeaa sisältävän kompleksin tapauksessa vähintään toinen on kokonaan kukurbituriilin ulkopuolella suuaukon karbonyyliryhmiin sitoutuneena ja toinen vähintään suuaukolla, ellei jopa kokonaan ulkopuolella. Perusteluna tälle on kompleksin drift-ajan ero verrattuna **CB7**:n alkalimetallia sisältävien kompleksien välisiin drift-aikojen eroihin. Kaikissa massaspektreissä nähdään myös natriumia sisältäviä komplekseja, vaikkei näytteeseen laitettu natriumia sisältäviä suoloja. Tämä johtuu siitä, että natrium on niin yleinen kationi ympäristössämme, että sitä ei tarvitse lisätä näytteeseen ja silti sitä nähdään massaspektrissä.

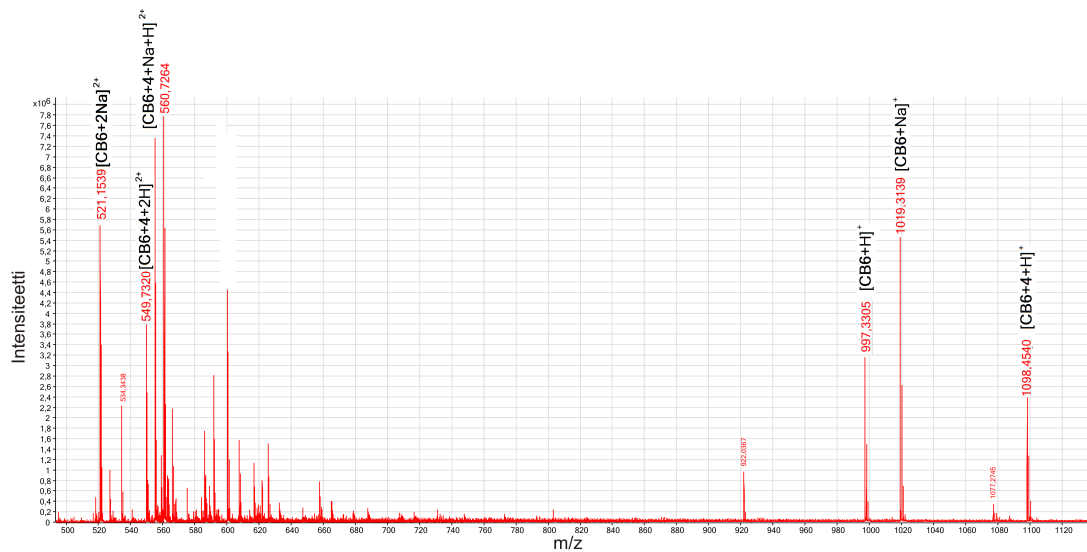
7.2 Kukurbituriilien amiinikompleksit

Kukurbituriilien amiinikompleksimittauksiin valittiin useita alkyyliamiineja sekä syklisiä amiineja, jotka on esitetty kuvassa 22. Vierasamiineiksi valittiin alkyyliamiineja propyyliamiinista heptyyliamiiniin **1-5** ja syklisiä amiineja olivat syklopropyyliimetyyliamiini **7**, sykloheksyyliamiini **8** ja bentsyyliamiini **9**. Lisäksi tutkittiin **CB7**:n **DBOA**-kompleksin rakennetta ja pilkkoutumista. Kompleksien rakennetta ja hajoamista mitattiin Agilent 6560 Ion Mobility ESI-QTOF massaspektrometrillä ja Synapt G2-S massaspektrometrillä. Kaikille näytteille tehtiin ioniliikkuvuusmittaus sekä törmäyspoikkipinta-alan määrittäminen. Lisäksi useille komplekseille tehtiin myös törmäysaktivointimittauksia vertaillaksemme esimerkiksi, miten endo- ja eksokompleksit hajoavat toisiinsa verrattuna. Mittausten parametrit löytyvät erikseen molemmille massaspektrometreille taulukoista 3 ja 4.

7.2.1 Kukurbit[6]uriilin alkyyliamiinikompleksit

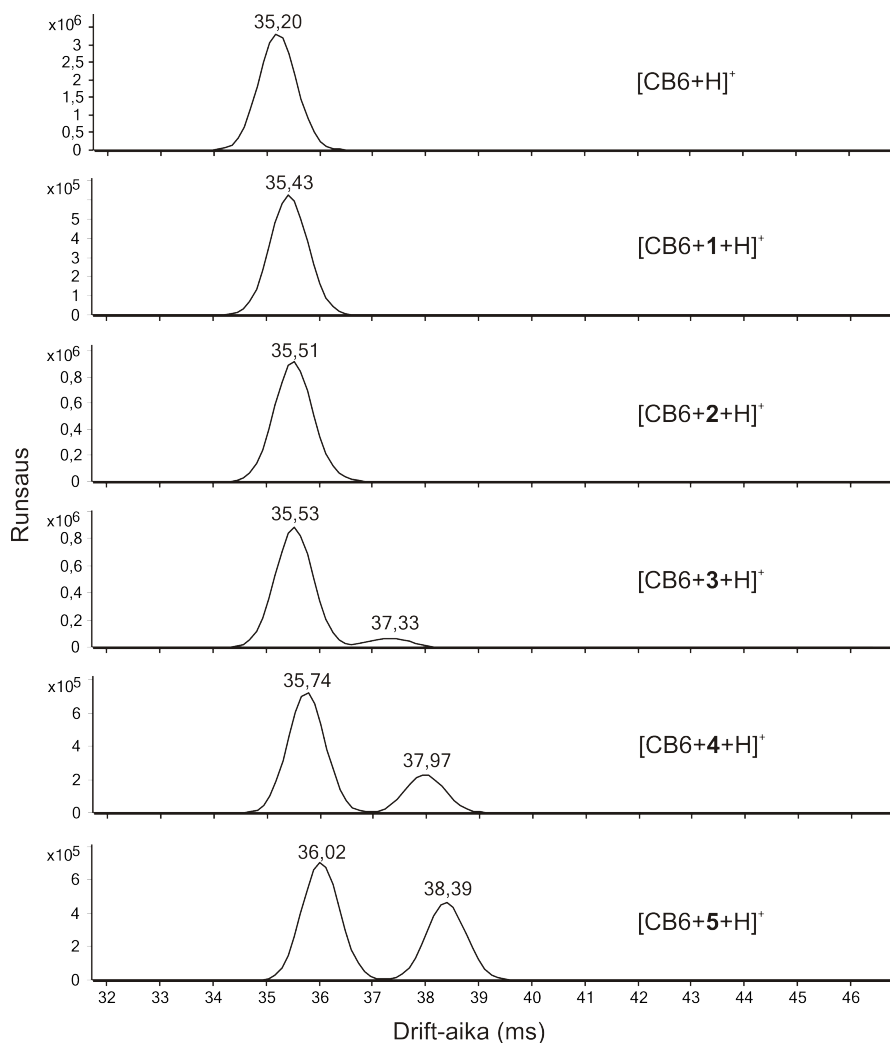
Veteen liuotetuissa näytteissä vierasmolekyyleinä olivat alkyyliamiinit **1-5** 2,5:1 suhteella n. 20 μM isäntäkukurbituriiliin **CB6**. Mittauksen polarisaatio oli positiivinen. Tulokset ovat koottuina taulukoihin liitteissä Liite 1 ja Liite 3. **CB6** ja alkyyliamiineja sisältäville näytteille esimerkki massaspektristä on kuvassa 28, jossa **CB6**:n vieraana on heksyyliamiini **4** ja mittaus on tehty Agilent 6560 massaspektrometrillä. Synaptin laitteella tehty esimerkkispektri **CB6**:n alkyyliamiinikompleksimittauksista on liitteessä Liite 3. Kuvan 28 massaspektrissä nähdään

sekä kerran että kahdesti protonoituneet heksyyliamiinia sisältävät $[\text{CB6}+4+\text{H}]^+$ m/z 1098,4540, $[\text{CB6}+4+2\text{H}]^{2+}$ m/z 549,7320 kompleksit sekä natrium-ionin ja yhden protonin sisältävä $[\text{CB6}+4+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ m/z 560,7264 **CB6**:n heksyyliamiinikompleksi. Nämä kompleksit löytyvät kaikista alkyliamiineja **1-5** sisältävien näytteiden massaspektreistä. Massaspektreissä nähdään myös muita piikkejä, jotka ovat epäpuhtauksia tai komplekseja, joita ei ole tunnistettu. Kaikissa alkyliamiineja sisältävien näytteiden spektreissä on myös protonoituneen **CB6**:n piikki $[\text{CB6}+\text{H}]^+$ m/z 997,3305 ja **CB6**:n natriumadduktit $[\text{CB6}+\text{Na}]^+$ m/z 1019,3139, $[\text{CB6}+2\text{Na}]^{2+}$ m/z 521,1539.



Kuva 28: Näytteen: n.20 μM , **4**+**CB6**, 2,5:1, H_2O :ssa massaspektri.

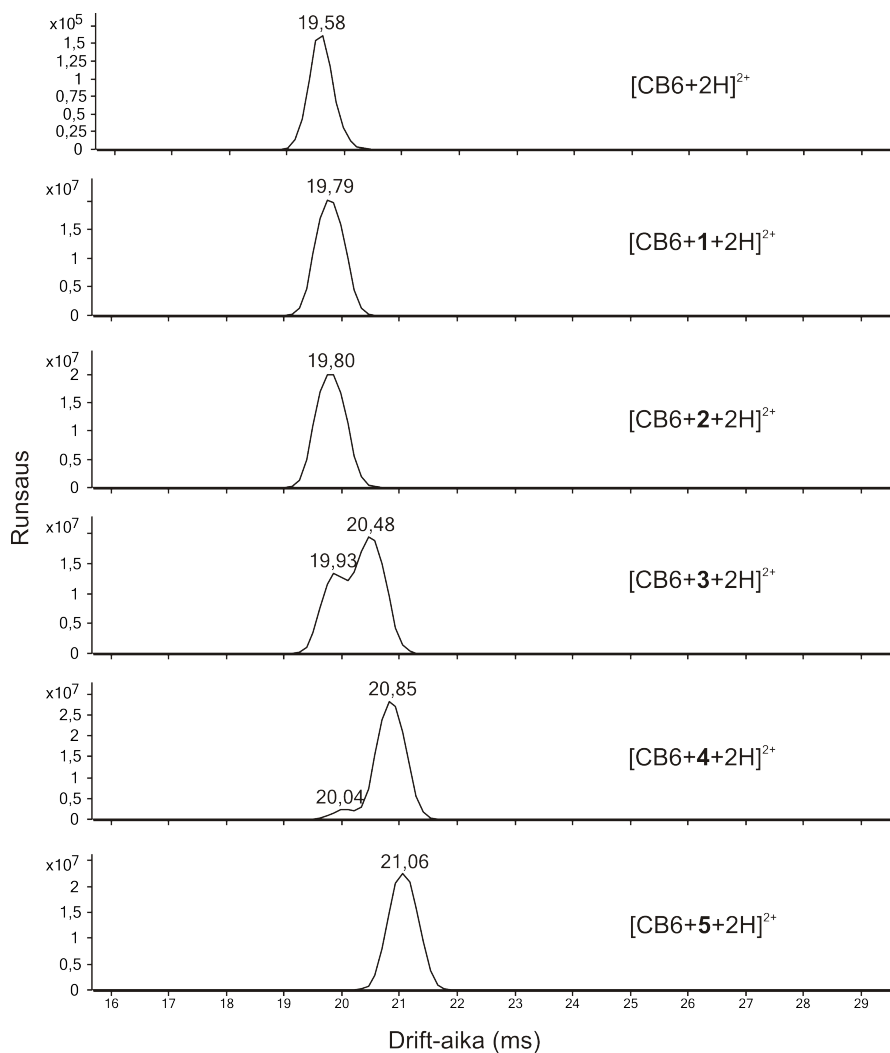
Protonoituneilla komplekseilla $[\text{CB6}+1,2+\text{H}]^+$ nähdään ainoastaan yksi driftpiikki kuvassa 29. Drift-ajat ovat hyvin lähellä protonoidun **CB6**:n drift-piikkiä, joten näitä kahta kompleksia voidaan kutsua siis endokomplekseiksi. Protonoituneiden amyli-, heksyyli- ja heptyyliamiinia sisältävien $[\text{CB6}+3,4,5+\text{H}]^+$ **CB6**-kompleksien drift-kuvaajista voidaan havaita kaksi drift-piikkiä (Kuva 29). Piikit kuvaavat ionin endo- ja eksokomplekseja. Endokompleksilla on lyhyempi drift-aika ja eksokompleksilla pidempi sen suuremman koon takia. Sekä endo- että eksokompleksien drift-ajat kasvavat amiinin koon kasvaessa. Eli alkyliketjun piteneminen aiheuttaa komplekseille avaruudellisen koon kasvun. Kompleksien eri konformaatioiden käyttäytyminen massaspektrometrin drift-putkessa nähdään myös taulukoiduissa CCS-arvoissa (Liite 1). Protonoidun $[\text{CB6}+\text{H}]^+$ ionin drift-aika 35,20 ms ja CCS-arvo $275,2 \pm 0,42 \text{ \AA}^2$ ovat amiineja **3-5** sisältäviä komplekse-



Kuva 29: Protonoituneen **CB6**:n $[\text{CB6}+\text{H}]^+$ ja **CB6**:n protonoituneiden alkyyliamiinikompleksien $[\text{CB6}+3,4,5+\text{H}]^+$ drift-spektrit.

ja $[\text{CB6}+3,4,5+\text{H}]^+$ pienempiä ja CCS-arvot kasvavat, mitä suuremmaksi alkyyliamiiniketju kompleksissa kasvaa. Koska myös endokompleksien drift-ajat kasvavat, kun amiinien suuruus kasvaa, voidaan päätellä että amiinit **1-5** eivät mahdu kokonaan **CB6**:n sisään tai kukurbituriilin rakenne venyy ulospäin suuremmista amiinivieraista. Eksokompleksien drift-piikkien korkeus eli eksokompleksin runsaus kasvaa verrattuna endokompleksiin, kun alkyyliamiinin hiiliketju pitenee. Voidaan sanoa, että eksokompleksi muuttuu suotuisammaksi konformaatioksi, mitä pidempi hiiliketju vierasalkyyliamiinilla on. Seuraavaksi voitaisiin tutkia muuttuisiko eksokompleksi endokompleksiä suotuisammaksi, kun vieraan alkyyliketju kasvaa heptyyliamiinin seitsemästä hiilestä pidemmäksi. Toinen mielenkiintoinen kysymys olisi, että kuinka pitkä hiiliketjun tulisi vierasalkyyliamiinissa olla, jotta endokompleksi konformaatiovaihtoehtona mahdollisesti jäisi pois kokonaan.

Kahdesti protonoituneilla $[\text{CB6}+\mathbf{3,4,5}+2\text{H}]^{2+}$ komplekseilla havaitaan yhteneväisyyksiä ja eroavaisuuksia drift-spektreissä (Kuva 30) ja CCS-arvoissa (Liite 1) vastaaviin kerran protonoituneiden $[\text{CB6}+\mathbf{3,4,5}+\text{H}]^+$ kompleksien drift-spektreihin ja CCS-arvoihin verrattuna. Endo- ja eksokompleksit havaitaan amyli- ja heptyyliamiineja sisältävillä kahdesti protonoituneilla **CB6** komplekseilla $[\text{CB6}+\mathbf{3}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 542,7106 ja $[\text{CB6}+\mathbf{4}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 549,7214 mutta ei enää suuremmalla heptyyliamiinia **5** sisältävällä kompleksilla $[\text{CB6}+\mathbf{5}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 556,7322. Samoin ku-



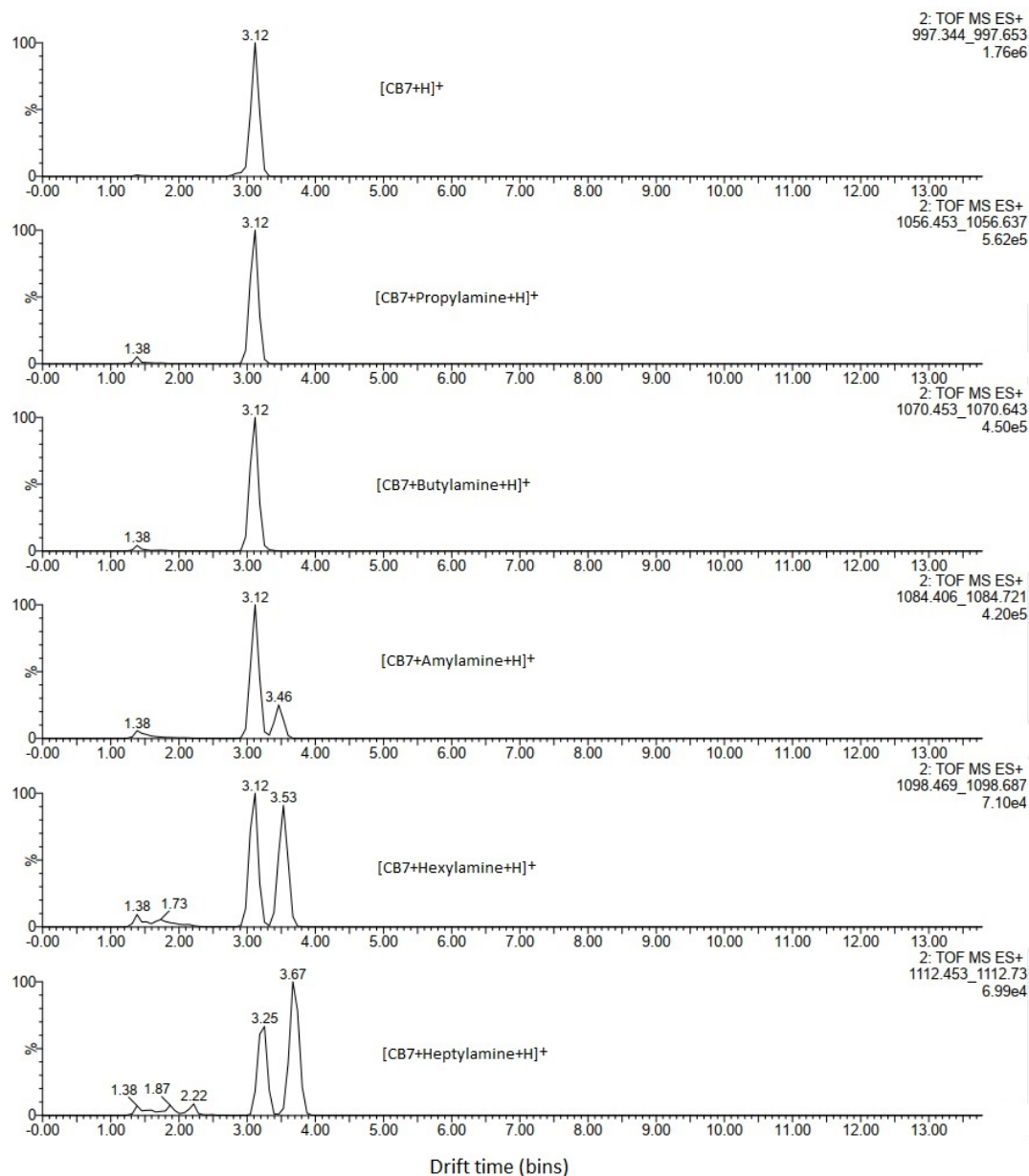
Kuva 30: Kahdesti protonoituneen kukurbit[6]uriilin $[\text{CB6}+2\text{H}]^{2+}$ sekä kahdesti protonoituneiden $[\text{CB6}+\mathbf{3,4,5}+2\text{H}]^{2+}$ kompleksien drift-spektrit.

ten kerran protonoituneilla, niin kahdesti protonoituneilla endo- ja eksokomplekseilla havaitaan drift-aikojen kasvu alkyyliiryhmän pidentyessä. **CB6**:n kahdesti varatulla heptyyliamiinikompleksilla $[\text{CB6}+\mathbf{5}+2\text{H}]^{2+}$ CCS-arvo on $325,8 \pm 0,36 \text{ \AA}^2$, joka on lähempänä muiden eksokompleksien CCS-arvoja $[\text{CB6}+\mathbf{3}+2\text{H (ekso)}]^{2+}$ $318,4 \pm 0,89 \text{ \AA}^2$ ja $[\text{CB6}+\mathbf{4}+2\text{H (ekso)}]^{2+}$ $322,9 \pm 0,37 \text{ \AA}^2$, kuin esimerkiksi en-

dokompleksin $[\text{CB6}+\mathbf{4}+2\text{H (endo)}]^{2+}$ CCS-arvoa $307,7 \pm 0,23 \text{ \AA}^2$. Tällä perusteella voidaan sanoa $[\text{CB6}+\mathbf{5}+2\text{H}]^{2+}$ kompleksin olevan eksokompleksi. Kuvassa 30 nähdään kahdesti protonoituneen $[\text{CB6}+2\text{H (endo)}]^{2+}$ drift-spektri, jonka alla ovat $[\text{CB6}+\mathbf{3,4,5}+2\text{H}]^{2+}$ drift-spektrit. Kuvan drift-spektreistä huomataan endokompleksien drift-aikojen olevan hyvin lähellä $[\text{CB6}+2\text{H}]^{2+}$ drift-aikaa ja amiinin kasvaessa ajat suurenevät hieman. Eksokompleksit noudattavat samaa trendiä. **CB6:n** ja amyylimiamiinia **3** ja erityisesti heksyyliamiinia **4** sisältävillä kahdesti varatuilla $[\text{CB6}+\mathbf{3,4}+2\text{H}]^{2+}$ eksokomplekseilla on suurempi runsaus kuin vastaavien ionien endokomplekseilla. Tämä tarkoittaa että mittaolosuhteissa konformaatioista eksokompleksi on amiineja **3-5** sisältävillä **CB6:n** komplekseilla suotuisampi konformaatio. Drift-spektreistä havaitaan endo- ja eksokompleksien drift-piikkien menevän osittain päällekkäin ja siksi $[\text{CB6}+\mathbf{3}+2\text{H}]^{2+}$ endokompleksille ei voitu määrittää CCS-arvoa. Drift-piikkien mennessä päällekkäin drift-ajat ovat lähes samat ja erottaakseen nämä piikit toisistaan voisi yrittää muuttaa drift-putken parametrejä, jotta ionien lentoaikojen eroa drift-putkessa saataisiin kasvatettua. $[\text{CB6}+\mathbf{3,4,5}+\text{H}]^+$ komplekseista tutkittiin myös, muuttuuko endo- ja eksokompleksien runsauksien suhde ajan kuluessa. Mitatut näytteet jätettiin odotamaan viikoksi ja mitattiin sitten uudestaan samoilla parametreillä. Kompleksien runsauksissa ei havaittu merkittäviä muutoksia ja tällä perusteella ei voitu siis sanoa kumpi konformaatioista on stabiilimpi.

CB6:n komplekseja amiinien **1-5** kanssa mitattiin myös Synapt G2-S massaspektrometrillä. Näytteet olivat n. $10 \mu\text{M}$ **CB6:n** vesiliuoksessa ja vieraan suhde isäntään oli 5:1. Mittauksen polarisaatio oli positiivinen ja laitteessa on travelling-wave ioniliikkuvuusmenetelmä. Esimerkkinä tällä laitteella mitatusta massaspektristä on **CB6:n** heptyyliamiininäytteen massaspektri (Liite 3). Näytteiden profiilispektreissä nähdään paljon piikkejä, vielä enemmän kuin Agilent 6560 suoritetuissa mittauksissa. Spektreissä näkyy paljon epäpuhtauksia ja komplekseja, joita ei pystytty nimeämään. Spektrejä voidaan selkeyttää optimoimalla laitteen asetuksia ja yrittäen tehdä puhtaampia näytteitä. Mittauksissa saatiin kuitenkin esiin kerran ja kahdesti protonoituneet kompleksit $[\text{CB6}+\mathbf{1,2,3,4,5}+\text{H}]^+$, $[\text{CB6}+\mathbf{1,2,3,4,5}+2\text{H}]^{2+}$, jotka olivat mielenkiinnon kohteena. Näistä komplekseista haluttiin drift-spektrit ja verrata niitä Agilent 6560 mitattuihin drift-spektreihin. Mittausten tulokset löytyvät taulukoituina liitteistä (Liite 3). Tuloksista huomataan, että massatarkkuus on huomattavasti heikompi kuin Agilentin massaspekt-

rometrillä mitattaessa. Tarkkuus Synaptin laitteella mitattaessa oli 150 mDa luokkaa, kun taas Agilentin laitteella päästiin alle 10 mDa ja parhaimmillaan 0,03 mDa tarkkuuteen. Tarkkuutta Synaptin massaspektrometrillä olisi voinut lisätä paremman kalibrantin löytäminen ja laitteen toimintaan perehtyminen syvemmin.



Kuva 31: Synapt G2-S massaspektrometrillä mitattujen CB6:n ja alkyyliamiinien protonoituneiden kompleksien $[CB6+1,2,3,4,5+H]^+$ drift-spektrit.

Synapt-massaspektrometrillä suoritetuissa mittauksissa protonoituneiden CB6:n alkyyliamiinikompleksien drift-spektreissä (Kuva 31) havaitaan Agilent 6560 suoritetuista mittauksista tuttu kaava. Kuvassa on protonoidun $[CB6+H]^+$ drift-spektrin alla $[CB6+1,2,3,4,5+H]^+$ kompleksien drift-spektrit. Propyyliamiinia ja

butyyliamiinia sisältävillä komplekseilla $[\mathbf{CB6+1,2+H}]^+$ havaitaan ainoastaan endokompleksit, joiden drift-ajat ovat samat protonoidun $[\mathbf{CB6+H}]^+$ kanssa. Suurempia alkyyliamiineja sisältävillä komplekseilla $[\mathbf{CB6+3,4,5+H}]^+$ havaitaan molemmat konformaatiot. Endokomplekseilla on samat CCS-arvot protonoituneen $[\mathbf{CB6+H}]^+$ kanssa (CCS: $279 \pm 27,9 \text{ \AA}^2$) ja muutosta ei tapahdu alkyyliketjun pidentyessä. Heptyyliamiinia sisältävällä endokompleksilla $[\mathbf{CB6+5+H}]^+$ CCS-arvo $285 \pm 28,5 \text{ \AA}^2$ on selkeästi muita suurempi. $[\mathbf{CB6+5+H}]^+$ -kompleksilla on myös erilainen runsaussuhde endo- ja eksokompleksien välillä muihin alkyyliamiinia sisältäviin komplekseihin verrattuna. Nämä erot Agilentin massaspektrometrillä tehtyihin mittauksiin verrattuna johtuvat todennäköisesti siitä, että kyseessä on erilainen massaspektrometri travelling wave-menetelmiseen. Eksokompleksien drift-ajat kasvavat alkyyliamiinin hiiliketjun kasvaessa kompleksissa, mikä oli odotettua aiempien mittausten perusteella. Drift-spektrien piikkien muodot eivät ole yhtä siistejä kuin Agilentin massaspektrometrillä mitattaessa. Tämäkin todennäköisesti liittyy menetelmän erilaisuuteen ja parametrien muokkaamiseen olisi pitänyt käyttää enemmän aikaa, piikkien siistimiseksi. Piikkien muotoa voidaan yrittää korjata muuttamalla mittauksen parametrejä. Drift-spektreissä näkyvät pienemmät kummut vasemmassa reunassa pienemmällä drift-ajalla johtuvat, siitä että aivan valitun kompleksin massapiikin vieressä ja osin päällekkäin on ollut toisia tuntemattomia ioneja ja niiden drift-piikit ovat tulleet samaan drift-spektriin tutkittujen kompleksien drift-piikkien kanssa.

Kahdesti protonoituneilla $[\mathbf{CB6+1,2,3,4,5+2H}]^{2+}$ komplekseilla havaitaan drift-spektreissä pelkät endokompleksit. Kerran ja kahdesti protonoituneiden kompleksien CCS-arvojen tarkkuudet eri massaspektrometrien välillä eroavat toisistaan mutta ovat silti toistensa virherajoissa (Liite 3, Liite 1). Esimerkiksi $[\mathbf{CB6+H}]^+$ CCS-arvo Agilentin massaspektrometrillä on $275,2 \pm 0,42 \text{ \AA}^2$ ja Synaptin massaspektrometrillä $279 \pm 27,9 \text{ \AA}^2$, joka kuitenkin kattaa virherajallaan myös $275,2 \text{ \AA}^2$. Synaptin massaspektrometrillä tarkkuutta ei saatu niin pieneksi, että CCS-arvoja voitaisiin vertailla. Eroihin vaikuttavat CCS-arvon määrittämisen erot. Synaptin laitteella mitatuille ioneille määritettiin CCS-arvot polyalaniinilla kalibroiden, kun Agilentilla MassHunter-tietokoneohjelma tekee määrittämisen automaattisesti ja arvojen luotettavuus varmistetaan valmistajan kalibrantin kirjallisuusarvoilla. Synaptin laitteessa kalibranttina käytetty polyalaniini ei vastaa ominaisuuksiltaan tarpeeksi hyvin kukurbituriilikomplekseja ja sen takia virhe jouduttiin arvioimaan

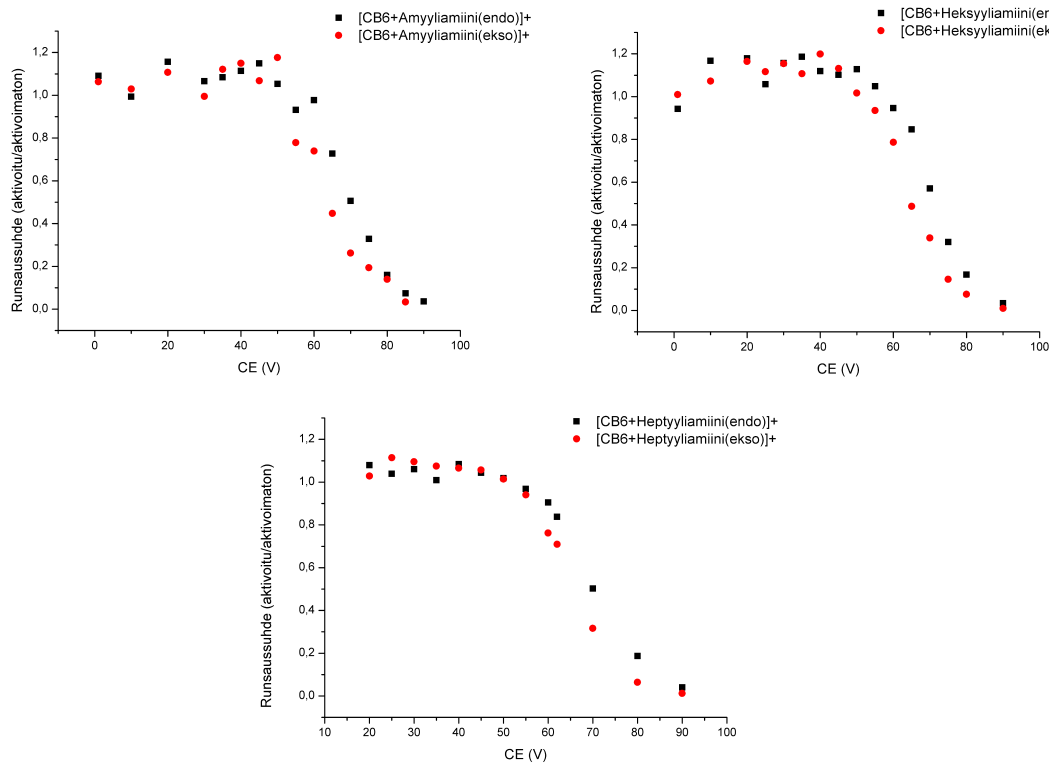
suureksi. Kalibrantti kannattaisi valita vielä huolellisemmin vastaamaan mitattua yhdistettä. Drift-piikkien muoto on myös kulmikkaampi kuin Agilentin laitteella. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että ionien keräysaika on ollut niin lyhyt travelling wave-menetelmälle, ettei tarpeeksi ioneja ole saatu mitattua ja piikistä on tullut epätarkka. Massaspektrissä kompleksien piikit ovat muihin piikkeihin verrattuna Agilentin massaspektrometrillä mitattuna huomattavasti suurempia kuin Synaptilla mitattuina, eli kompleksien runsautta olisi pitänyt edelleen yrittää kasvattaa. Aiemmin mainitsin, että CCS-arvoja pystyy luotettavasti vertailemaan eri laitteidenkin välillä, mutta nyt näemme kuinka siihenkin voivat vaikuttaa useammatkin tekijät kuten kalibrantin valinta sekä laitteeseen ja sen menetelmään perehtymisen tärkeys.

7.2.2 Kukurbit[6]uriilin alkyyliamiinikompleksien törmäysaktivointi

CB6:n alkyyliamiinikomplekseista [**CB6** + **3,4,5**+H]⁺ havaittiin endo- ja eksokompleksit ja niille tehtiin törmäysaktivointimittaus. Törmäysaktivoinnilla yritettiin selvittää kumpi konformaatio on pysyvämpi ja kasvaako toisen konformaation runsaus, kun toinen mahdollisesti hajoaa. Törmäysaktivointi tehtiin Agilent 6560 massaspektrometrillä kaikille näytteen ioneille, eli eristystä ei tehty ja kyseessä oli CID. Näytteet olivat 30 μ M vesiliuos **CB6** suhteen ja vieraan suhde isäntään oli 10:1. Ionien polariteetti oli positiivinen ja muut mittauksen parametrit löytyvät taulukosta 3. Ensimmäiset mittaukset tehtiin isolla CE (collision energy) jännitehaarukalla 20-200V ja tällä jännitevälillä tehtiin muutamia aktivointeja. Ensimmäisissä mittauksissa havaittiin, että kompleksit ovat täysin hajonneet, kun törmäysenergia on yli 100 V. Seuraavaksi lähdettiin tarkastelemaan tarkemmin alle 100 V aktivointienergioilla, miten kompleksien runsaus muuttuu ja törmäysenergian jännitettä CE nostettiin tasaisin välein 20 voltista 90 volttiin. Mittausdataa otettiin ylös [**CB6** + **3,4,5**+H]⁺ ekso- ja endokompleksien runsaudet jokaiselle energialle, jolla ioneja aktivoitiin.

Endo- ja eksokompleksien runsauksista tehtiin kuvaaja energian funktiona. Kuvassa 32 on [**CB6** + **3,4,5**+H]⁺ aktivoitujen ja aktivoimattomien endo- ja eksokompleksien runsaussuhteiden kuvaajat energian funktiona. Aktivoitujen kompleksien runsaudet jaettiin aktivoimattomien kompleksien runsauksilla ja saadun runsaussuhteen avulla päästiin eroon absoluuttisista intensiteeteistä, jotka vaihtelevat

eri mittausten välillä. $[\text{CB6} + \mathbf{3,4,5} + \text{H}]^+$ kompleksien kuvaajista nähdään, että

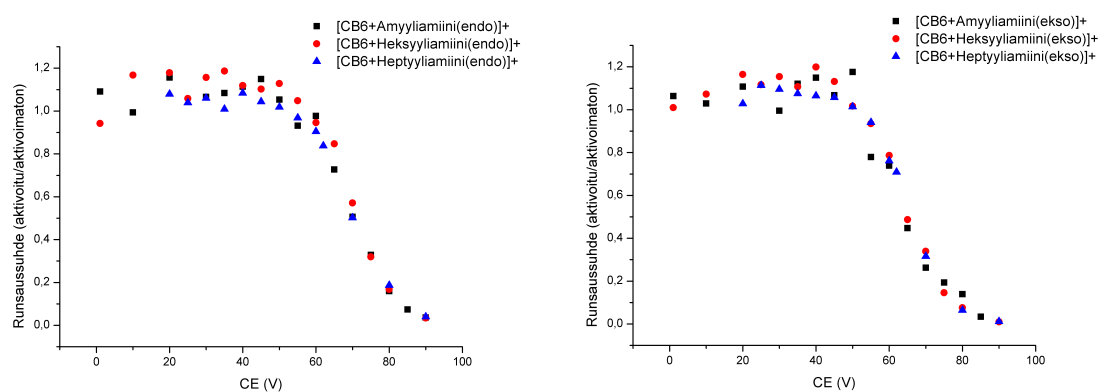


Kuva 32: Kompleksien $[\text{CB6} + \mathbf{3,4,5} + \text{H}]^+$ aktivoitujen ja aktivoimattomien endo- ja eksokompleksien runsaussuhteet energian funktiona.

endokompleksin runsaus alkaa vähenemään hieman suuremmalla energialla kuin eksokompleksin runsaus. Voidaan siis sanoa, että endokompleksissa vuorovaikutus isännän ja vierään välillä on voimakkaampaa.

Kuvassa 33 on koottu sama mittaus siten että samassa kuvaajassa on kaikkien kolmen endokompleksin runsaussuhteet energian funktiona ja toisessa kuvassa eksokomplekseista vastaavat kuvaajat. Kuvaajista nähdään, että eri amiinien välillä ei merkittäviä eroja ole. Kuvan 33 kuvaajiin tehtiin suoransovitukset, jotka mukailevat mahdollisimman tarkasti suoraa. Suoransovitusten avulla selvitettiin, millä jännitteellä kompleksien runsauksista on jäljellä enää puolet. $[\text{CB6} + \mathbf{3} + \text{H}]^+$ kompleksille saatiin 3.-asteen suoran sovituksella endokompleksin runsauden puoliintumisjännitteeksi 70,81 V ja eksokompleksille 64,78 V. Jännitteiden ero kompleksien välillä oli 6,03 V. $[\text{CB6} + \mathbf{4} + \text{H}]^+$ kompleksille saatiin 3.-asteen suoran sovituksella endokompleksin runsauden puoliintumisjännitteeksi 72,30 V ja eksokompleksille 65,70 V. Jännitteiden ero kompleksien välillä oli 6,61 V. $[\text{CB6} + \mathbf{5} + \text{H}]^+$ kompleksille saatiin 4.-asteen suoran sovituksella endokompleksin runsauden puoliintumisjän-

nitteeksi 71,06 V ja eksokompleksille 67,02 V. Jännitteiden ero kompleksien välillä oli 4,03 V. Endokompleksien $[\text{CB6} + \mathbf{3,4,5} + \text{H}]^+$ runsauksien puoliintumisjännitteissä on vaihtelua. Pienin puoliintumiseen vaadittava jännite on amyylimiamiinia sisältävällä kompleksilla, seuraavaksi pienin heptyylimiamiinia sisältävällä kompleksilla ja suurin vaadittu jännite heksyylimiamiinia sisältävällä kompleksilla. Mittauksen mukaan kaikista vahvin vuorovaikutus vierasamiineista **CB6** endokompleksissa on heksyylimiamiinilla ja pienin amyylimiamiinilla. Eksokompleksien kohdalla runsauden puolittumiseen vaadittava energia on suoraan verrannollinen vierasamiinin pituuteen. Pienimmän jännitteen vaati amyylimiamiinia sisältävä kompleksi ja suurimman heptyylimiamiinia sisältävä kompleksi. Heptyylimiamiinilla on siis vahvin vuorovaikutus **CB6** eksokompleksissa. Jännitteiden eroista endo ja eksokompleksien välillä huomataan heptyylimiamiinia sisältävien kompleksien eron olevan hieman pienempi kuin amyylimiamiinia ja heksyylimiamiinia sisältävien kompleksien erot, jotka olivat lähes samat.

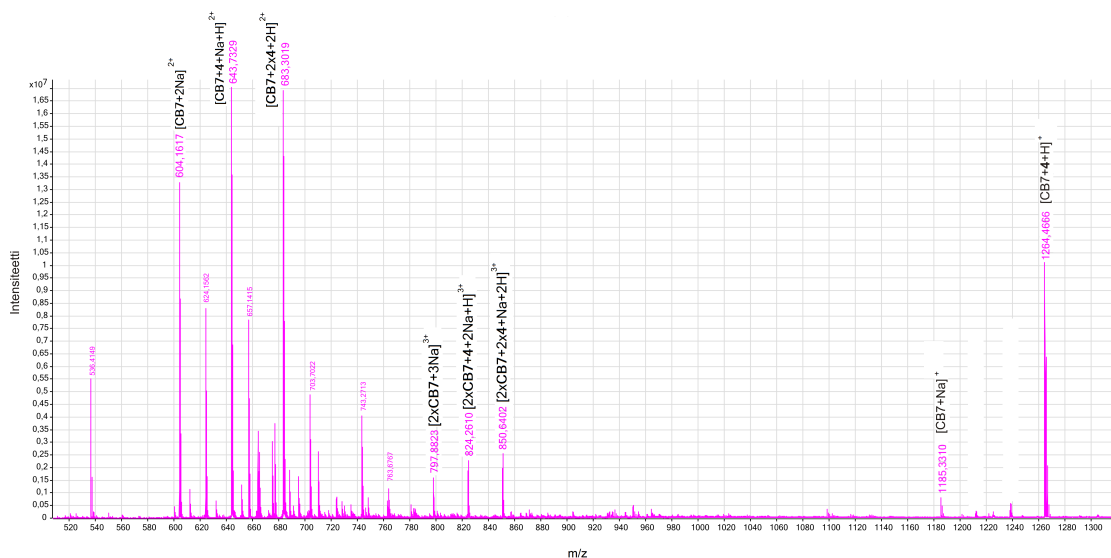


Kuva 33: **CB6**:n ja amiinien **3-5** protonoitujen aktivoitujen ja aktivoimattomien endo- ja eksokompleksien runsaussuhteet energian funktiona.

Törmäysaktivointi tehtiin $[\text{CB6} + \mathbf{3,4,5} + \text{H}]^+$ komplekseille myös Synaptin massaspektrometrillä. Näytteet olivat 10 μM **CB6**:n suhteen ja vieraan suhde isäntään oli 5:1. **CB6**:n amiinkomplekseilla käytetyt törmäysenergiat olivat 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ja 80 V. Synaptin massaspektrometrillä pystyttiin eristämään tietty kompleksi ja tekemään aktivointi vain sille. Mittauksessa tarkasteltiin samojen kerran protonoituneiden endo- ja eksokompleksien runsauksia aktivoitijännitteen funktiona kuin Agilentin laitteellakin. Aktivointi ei vaikuttanut kompleksien runsauksiin tällä massaspektrometrillä.

7.2.3 Kukurbit[7]uriilin alkyyliamiinikompleksit

CB7:n kanssa mitattiin samat alkyyliamiinit **1-5** kuin **CB6**:n kanssa. Näytteet olivat **CB7**:n suhteen 20 μM veteen liuotettuna ja vieraan suhde isäntään oli 10:1. **CB7**:n alkyyliamiinikompleksien tulokset on taulukoituina liitteissä (Liite 4). Esimerkkispektrinä kuvassa 34 isäntänä on **CB7** ja vieraana heksyyliamiini **4**. Esimerkkispektrissä on protonoitunut amiinia sisältävä kompleksi $[\text{CB7}+\mathbf{4}+\text{H}]^+$ m/z 1264,4666, joka löytyy eri vierasamiinilla kaikista massaspektreistä. **CB7** muodostaa myös kahdesti protonoituneen kompleksin, jossa on kaksi vierasamiinia (esimerkkispektrissä: $[\text{CB7}+2\mathbf{x4}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 683,3019). Kaksi vierasamiinia sisältävä kompleksi havaitaan myös, kun vieraana on amylyli- ja heptyyliamiini. Näiden lisäksi havaittiin komplekseja, joissa oli mukana myös natriumaddukteja. Lisäksi massaspektreistä löydettiin kaksi isäntäkukurbituriilia sisältäviä dimeerikomplekseja, joissa vieraina ovat amiinit propyyliamiinista heksyyliamiiniin $[2\mathbf{xCB7}+\mathbf{1,2,3,4}+2\text{Na}+\text{H}]^{3+}$, $[2\mathbf{xCB7}+\mathbf{1,2,3,4}+\text{Na}+2\text{H}]^{3+}$. Valitettavasti näitä dimeerikomplekseja ei havaittu ilman natriumaddukteja ja nämä dimeerikompleksien runsaudet olivat todella pieniä. Dimeerikomplekseja voisi tulevaisuudessa tarkastella myös erikseen toisilla parametreilla, jolloin ne saataisiin mahdollisesti näkyviin suuremmilla runsauksilla.



Kuva 34: Näytteen: 20 μM , **4**+**CB7**, 10:1, H_2O :ssa massaspektri.

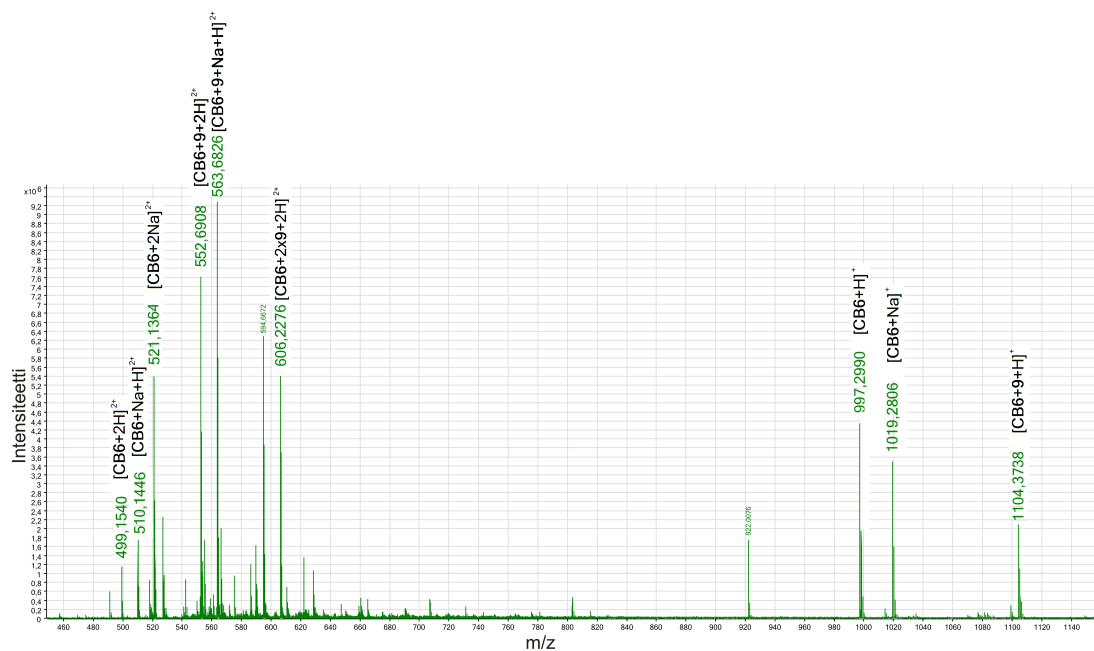
Kerran protonoituneiden $[\text{CB7}+\mathbf{1,2,3,4,5}+\text{H}]^+$ kompleksien drift-ajoista ja CCS-arvoista ilmenee (Liite 4), ettei kompleksien koko juurikaan vaihtelee vierasamiinin

vaihtuessa. Myöskään dimeeristen kompleksien kohdalla ei nähdä johdonmukaisuutta CCS-arvoissa, kun amiinin koko kasvaa. Kahdesti protonoituneiden kaksi samaa amiinia sisältävien $[\mathbf{CB7}+2\mathbf{x}(\mathbf{3,4,5})+2\mathbf{H}]^{2+}$ kompleksien kohdalla taas amiinin koko vaikuttaa suoraan kompleksin CCS-arvojen kasvuun, kun amiinin koko kasvaa. CCS-arvot kasvavat amiinien koon kasvaessa 338,5 Å²:stä 356,1 Å²:iin. Kaksi amiinia sisältävässä kompleksissa kompleksin koko kasvaa selkeästi, eli amiinit eivät täysin mahdu kompleksin sisään. CCS-arvoista voidaan päätellä, että yhden **CB7**:n ja yhden amiinin muodostamissa komplekseissa amiinit mahtuvat hyvin isännän sisään, eivätkä näin vaikuta kompleksin kokoon, kun amiinin koko kompleksissa kasvaa. Sama nähdään myös kahden **CB7**:n ja kahden amiinin muodostamissa dimeerisissä komplekseissa. Näiden kompleksien osalta olisi mielenkiintoista nähdä vaikuttaisiko amiinin koko CCS-arvoihin, jos amiinien kokoa kasvatettaisiin edelleen ja havaittaisiinko tällöin sekä endo-, että eksomuotoja myös **CB7**:n kohdalla.

7.2.4 Kukurbit[6]uriilin ja syklisten amiinien kompleksit

Syklisistä amiineista valittiin mittauksiin **CB6**:n vieraiksi syklopropyyliimetyyliamiini **7**, sykloheksyyliamiini **8** ja bentsyyliamiini **9**. Näytteet olivat **CB6**:n suhteen n. 20 μM vahvuisia ja vieraat 2,5:1 suhteella isäntäkukurbituriiliin. Mittauksissa ionien polariteetti oli positiivinen. Lisäksi tutkittiin muodostaako haaroittunut tertbutyyliamiini **6** kompleksia **CB6**:n kanssa, mutta kompleksia ei havaittu. Esimerkkispektrinä kuvassa 35 on bentsyyliamiinia **9** ja **CB6** sisältävän näytteen massaspektri. Kaikissa syklisiä amiineja sisältävien näytteiden massaspektreissä havaitaan vastaavien kompleksien massapiikit kuin esimerkkispektrissä.

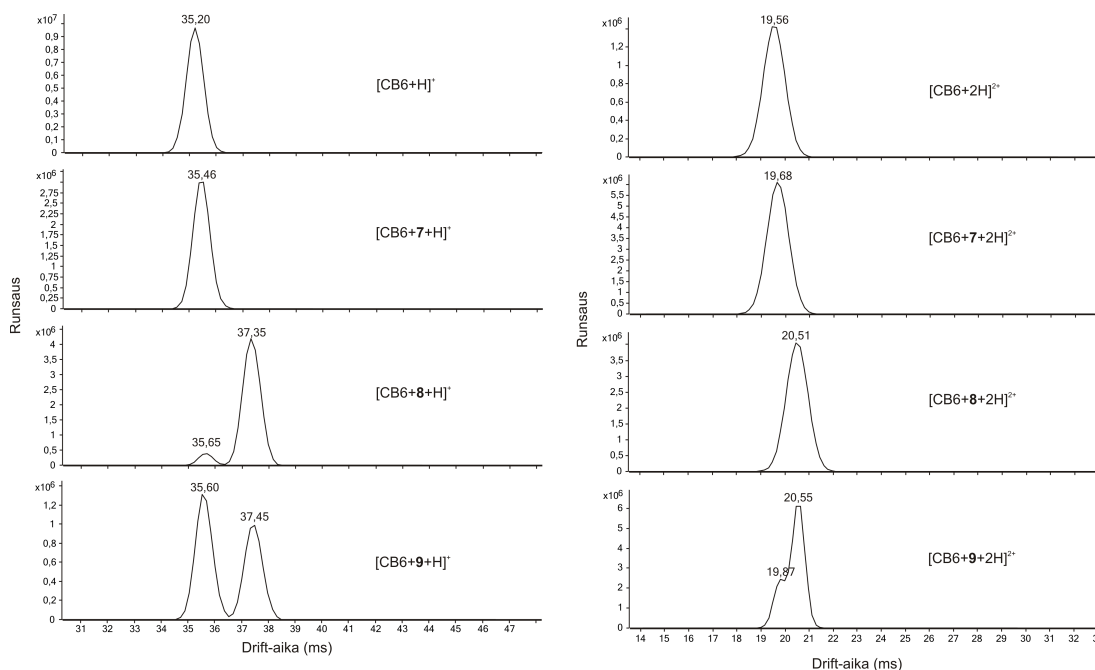
CB6:n ja syklisten amiinien kerran ja kahdesti protonoituneiden kompleksien $[\mathbf{CB6} + \mathbf{7,8,9}+\mathbf{H}]^+$, $[\mathbf{CB6} + \mathbf{7,8,9}+2\mathbf{H}]^{2+}$ tulokset ovat taulukoituina liitteissä (Liite 5). Kuvan 35 massaspektrissä, havaitaan kerran ja kahdesti protonoituneen **CB6**:n piikit $[\mathbf{CB6}+\mathbf{H}]^+$ m/z 997,2990, $[\mathbf{CB6}+2\mathbf{H}]^{2+}$ m/z 499,1540 ja **CB6**:n natriumadduktit $[\mathbf{CB6}+\mathbf{Na}]^+$ m/z 1019,2806, $[\mathbf{CB6}+2\mathbf{Na}]^{2+}$ m/z 521,1364, sekä $[\mathbf{CB6}+\mathbf{Na}+\mathbf{H}]^{2+}$ m/z 510,1446. Bentsyyliamiinin ja **CB6**:n komplekseja havaittiin muodostuvan kerran ja kahdesti protonoituneina $[\mathbf{CB6} + \mathbf{9}+\mathbf{H}]^+$ m/z 1104,3738 ja $[\mathbf{CB6} + \mathbf{9}+2\mathbf{H}]^{2+}$ m/z 552,6908. Lisäksi havaittiin kahdesti protonoitunut **CB6**:n ja bentsyyliamiinin kompleksi, jossa on kaksi amiinia $[\mathbf{CB6}+2\mathbf{x9}+2\mathbf{H}]^{2+}$ m/z 606,



Kuva 35: Näytteen: n.20 μM , **9**+**CB6**, 10:1, H_2O :ssa massaspektri.

2276. Yhden amiinin sisältävä **CB6**:n kompleksi oli myös kaikissa spektreissä ker-
ran protonoituneena natriumadduktin kanssa $[\text{CB6} + \mathbf{9} + \text{Na} + \text{H}]^{2+}$ m/z 563,6826.

Protonoituneiden **CB6**:n ja syklisten amiinien kompleksien drift-kuvaajat ovat
kuvassa 36. Kompleksien CCS-arvoja ja drift-piikkejä vertaillessa protonoituneeseen
[**CB6**+**H**]⁺ kompleksiin, havaitaan komplekseilla [**CB6** + **8,9**+**H**]⁺ sekä endo-
että eksokompleksimuodot. Endokompleksit pienemmällä drift-ajalla ja pienem-
mällä CCS-arvolla ja eksokompleksit vastaavasti suurempina suuremmilla arvoilla.
Kompleksilla [**CB6** + **7**+**H**]⁺ havaitaan vain endokompleksi ja kompleksin CCS-
arvo $276,4 \pm 0,35 \text{ \AA}^2$ on oletetusti pienempi kuin kahden muun suuremmat amiinit
sisältävillä endokomplekseilla. **CB6**:n sykloheksyyliamiinikompleksilla ja bentsyy-
liamiinikompleksilla havaitaan eroja endo- ja eksokompleksien CCS-arvoissa. Bent-
syyliamiinia sisältävän endokompleksin [**CB6** + **9**+**H**]⁺ CCS-arvo $276,9 \pm 0,24 \text{ \AA}^2$
on pienempi kuin sykloheksyyliä sisältävän kompleksin [**CB6** + **8**+**H**]⁺ CCS-arvo
 $278,0 \pm 0,44 \text{ \AA}^2$. Vastaavilla eksokomplekseilla CCS-arvojen suuruudet ovat vir-
herajoissa samat $291,5 \pm 0,43 \text{ \AA}^2$ ja $291,3 \pm 0,41 \text{ \AA}^2$. Bentsyyliamiinilla voidaan
näillä havainnoilla sanoa olevan voimakkaampi vuorovaikutus endokompleksissa
[**CB6** + **9**+**H**]⁺ isäntämolekyylin kanssa kuin sykloheksyyliamiinilla tai että syklo-
heksyyliamiinin kanssa muodostettu kompleksi venyy suuremmaksi kuin bent-
syyliamiinin kanssa muodostettu kompleksi. Vaikka bentsyyliamiini on kooltaan



Kuva 36: CB6:n ja syklisten amiinien **7-9** kerran ja kahdesti protonoituneiden kompleksien drift-kuvaajat.

suurempi kuin sykloheksyyliamiini yhden hiilen erolla, niin sillä voi olla suurempi vuorovaikutus isäntämolekyylillä **CB6**:n kanssa ja sen takia bentsyyliamiini on ehkä osittain eksokompleksissa kukurbituriilin rakenteen sisäpuolella. Vuorovaikutusten vahvuudet voidaan varmistaa törmäysaktivoimalla endo- ja eksokomplekseja. Vasta näillä mittauksilla voidaan todeta varmaksi, kumpi kompleksi vaatii vähemmän ja kumpi enemmän energiaa hajotukseen. Enemmän energiaa hajoamiseen vaativalla kompleksilla on vahvempi vuorovaikutus isännän ja vieraan välillä ja vähemmän energiaa vaativalla heikompi.

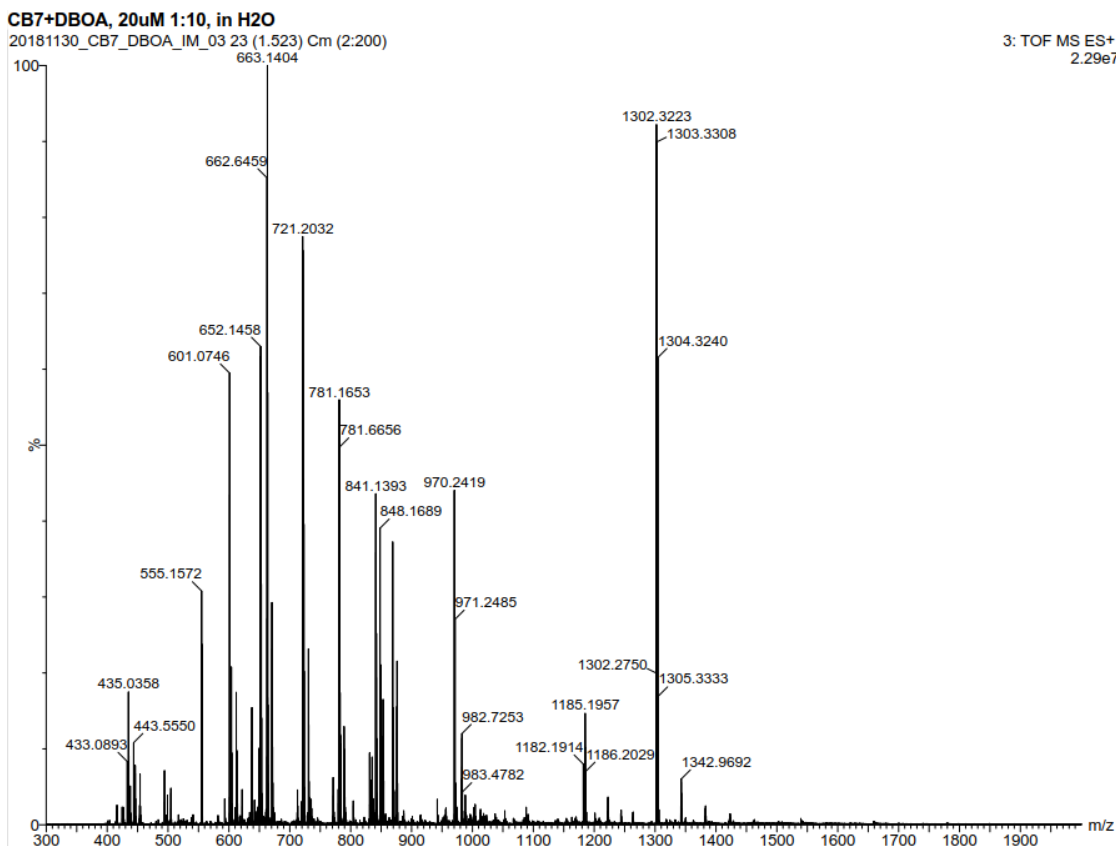
Kahdesti protonoituneiden kompleksien $[\text{CB6} + \mathbf{7,8,9} + 2\text{H}]^{2+}$ drift-kuvaajissa kuvassa 36 havaitaan syklopropyyliimetyyliamiinia **7** sisältävä endokompleksi, sykloheksyyliamiinia **8** sisältävä eksokompleksi ja bentsyyliamiinia sisältävät endo- ja eksokompleksit. Kahdesti protonoituneen $[\text{CB6} + 2\text{H}]^{2+}$ drift-kuvaaja on kuvassa ylimpänä ja kompleksien kuvaajat sen alla. Endokompleksien $[\text{CB6} + \mathbf{7,9} + 2\text{H}]^{2+}$ drift-ajat ovat lähellä kahdesti protonoituneen **CB6**:n $[\text{CB6} + 2\text{H}]^{2+}$ drift-aikaa ja myös endokompleksien CCS-arvot ovat lähes samoja (Liite 5). Eksokompleksien $[\text{CB6} + \mathbf{8,9} + 2\text{H}]^{2+}$ drift-ajat ovat myös lähes samat, kuin myös CCS-arvot. Massaspektreissä havaittiin näiden lisäksi myös kompleksit, joissa on kaksi sykloamiinia $[\text{CB6} + 2\mathbf{x}(\mathbf{7,8,9} + 2\text{H})]^{2+}$ m/z 570,2265; 598,2656 ja 606,22800 (35, Liite 5).

Kompleksien CCS-arvoista huomataan yhtäläisyyksiä kahdesti varattuihin yhden amiinin sisältäviin komplekseihin. Kaksi sykloporpyylimetyyliamiinia **7** sisältävä on endokompleksi $[\text{CB6}+2\text{x7}+2\text{H}]^{2+}$ ja kaksi sykloheksyyliamiinia **8** sisältävä on eksokompleksi $[\text{CB6}+2\text{x8}+2\text{H}]^{2+}$, kuten yhden amiinin sisältävät kompleksit. Bentsyyliamiinia sisältävällä kompleksilla $[\text{CB6}+2\text{x9}+2\text{H}]^{2+}$ on molemmat konformaatiot, kuten yhden bentsyyliamiinin sisältävällä kompleksilla, mutta endokompleksin runsaussuhde eksokompleksiin verrattuna on huomattavasti pienempi. Tämä voi merkitä kahden amiinin vievän jo liian paljon tilaa isäntämolekyylin **CB6** sisältä, ettei tämä konformaatio ole energettisesti niin edullinen kuin yhden amiinin tapauksessa.

7.2.5 Kukurbit[7]uriilin DBOA-kompleksi

CB7 ja DBOA sisältävälle veteen liuotetulle 20 μM näytteelle, jossa vieraan suhde isäntään 10:1 tehtiin ioniliikkuvuusmittaus Synapt G2-S massaspektrometrillä. Mittauksessa ionien polariteetti oli positiivinen ja kalibranttina käytettiin polyalaniinia. Kerran ja kahdesti protonoiduille komplekseille $[\text{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}]^+$, $[\text{CB7}+\text{DBOA}+2\text{H}]^{2+}$ suoritettiin myös törmäysaktivointi. Kuvan 37 massaspektrossä havaitaan kompleksien $[\text{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}]^+$ m/z 1302,3223 ja $[\text{CB7}+\text{DBOA}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 651,6442 piikit. Spektrissä havaitaan useita muitakin piikkejä, mutta niitä ei ole tunnistettu ja olemme tässä tutkimuksessa kiinnostuneita ainoastaan edellä mainituista komplekseista. **CB7**:n DBOA-kompleksin ioniliikkuvuusmittauksen tulokset ovat taulukoituina liitteissä (Liite 6). Kompleksien $[\text{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}]^+$ ja $[\text{CB7}+\text{DBOA}+2\text{H}]^{2+}$ CCS-arvoja $313 \pm 31,3 \text{ \AA}^2$, $360 \pm 36,0 \text{ \AA}^2$ ja drift-spektrejä vertaillen protonoituneen ja kahdesti protonoituneen kukurbituriilin $[\text{CB7}+\text{H}]^+$ ja $[\text{CB7}+2\text{H}]^{2+}$ vastaaviin CCS arvoihin $313 \pm 31,3 \text{ \AA}^2$ ja $354 \pm 35,4 \text{ \AA}^2$ ja drift-spektreihin, huomataan niiden olevan hyvin toisiaan vastaavia. Voidaan sanoa, että kompleksit $[\text{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}]^+$, $[\text{CB7}+\text{DBOA}+2\text{H}]^{2+}$ ovat endokomplekseja.

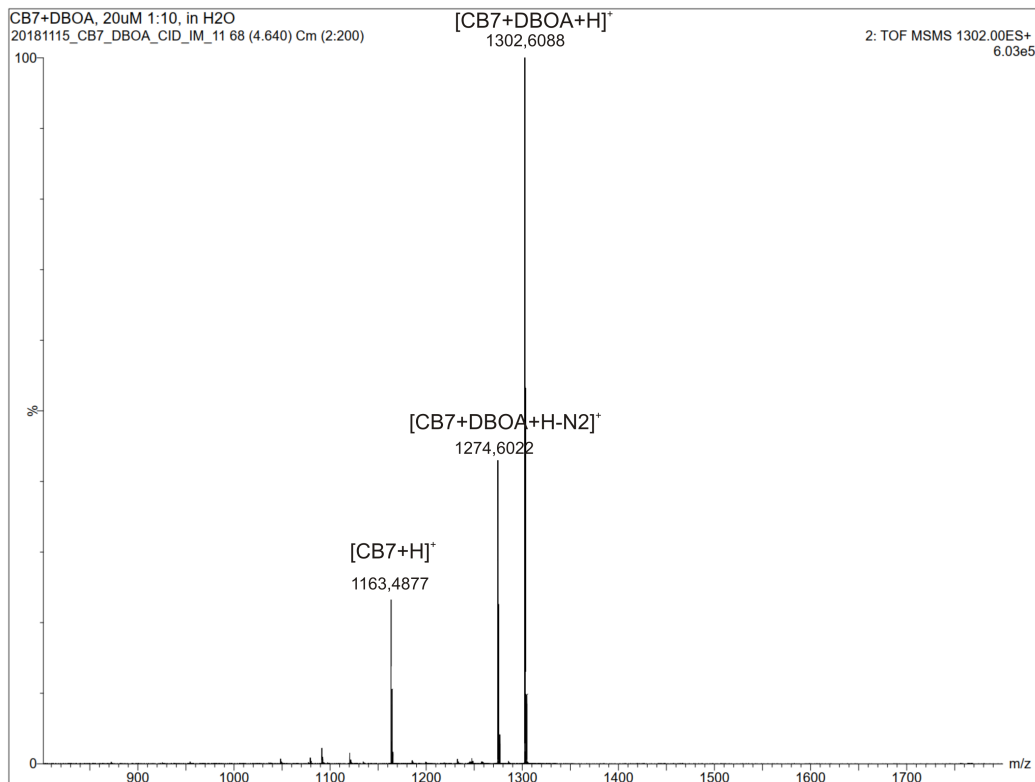
Sekä kerran, että kahdesti protonoituneet $[\text{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}]^+$, $[\text{CB7}+\text{DBOA}+2\text{H}]^{2+}$ kompleksit eristettiin muista näytteen ioneista ja niille tehtiin erikseen törmäysaktivointimittaukset. Aktivointienergiaa lähdettiin nostamaan 4 V lähtien tasisisin jännitevälein niin suureksi, että kompleksi oli hajonnut. $[\text{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}]^+$ kompleksiin käytetyt törmäysenergiat (Trap collision energy) olivat 4, 10, 50, 60, 70



Kuva 37: Näytteen: n.20 μM , DBOA+CB7, 10:1, H₂O:ssa massaspektri.

ja 90 V. Protonoituneen kompleksin törmäysprofilispektriin valittu mittaus tehtiin 60 V törmäysenergialla. Kuvan 38 törmäysaktivoinnista saadusta massaspektristä nähdään kompleksin hajoaminen protonoituneeseen kompleksiin asti. Mittaustulokset jäännösioneille löytyvät liitteistä (Liite 6) taulukosta 10.

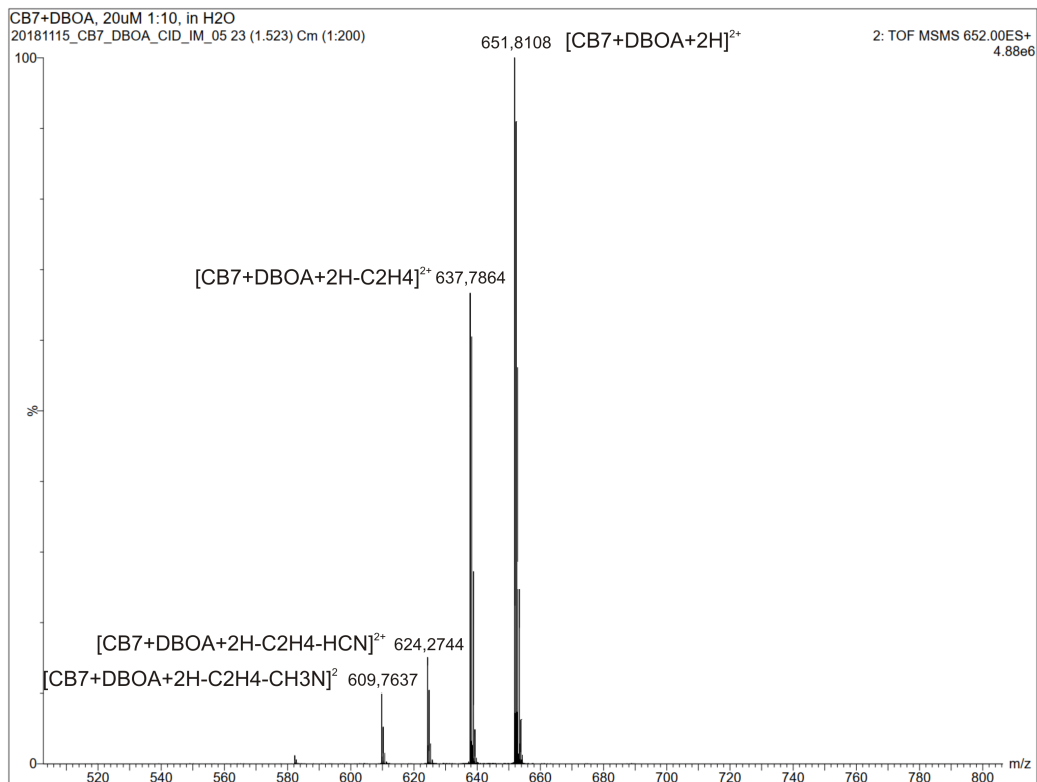
Massaspektrin piikki [CB7+DBOA+H-N₂]⁺ m/z 1274,3188 vastaa pilkeionia, jossa kompleksista [CB7+DBOA+H]⁺ on irronnut typpimolekyyli N₂. Massaspektrissä seuraavien pilkeionien piikit ovat hyvin pieniä verrattuna ensimmäiseen hajoamiseen ja niitä ei juurikaan silmällä kuvan spektristä erota. Spektriä suurentamalla voidaan kuitenkin vielä havaita seuraavien pilkeionien piikit. Tyypin jälkeen kompleksista irtoaa vetysyanidi (-HCN), josta jää jäljelle pilkeioni [CB7+DBOA+H-N₂-HCN]⁺ m/z 1247,2827. Viimeisenä irtoaa metaani-imiini (-CH₃N) ja pilkeionin [CB7+DBOA+H-N₂-HCN-CH₃N]⁺ piikki on m/z 1218,2496. Hajoamistuotteiden joukossa oli myös [CB7+DBOA+H-N₂-HCN-CH₃]⁺ m/z 1232,2789, joka on todennäköisesti vetysyanidin irtoamisen jälkeen olevan vaihtoehdoisen pilkkoutumisreititin tuote, jossa irtoaa metyyliryhmä. Kompleksin [CB7+DBOA+H]⁺ CCS-arvo: $308 \pm 30,8 \text{ \AA}^2$ ja pilkeionien CCS arvot: [CB7+DBOA+H-



Kuva 38: **CB7**:n protonoituneen DBOA-kompleksin [CB7+DBOA+H]⁺ törmäysaktivoinnin profiilispektri

N₂)⁺) 311 ± 31,1 Å², CCS([**CB7**+DBOA+H-N₂-HCN]⁺): 308 ± 30,8 Å², CCS ([**CB7**+DBOA+H-N₂-HCN-CH₃N]⁺): 306 ± 30,6 Å² ja CCS ([**CB7**+DBOA+H-N₂-HCN-CH₃]⁺): 308 ± 30,8 Å². CCS-arvojen havaitaan olevan virherajoissa samat. Voidaan sanoa että protonoidun kompleksin pilkeionit ovat avaruudellisesti saman kokoisia ja täten voidaan todeta DBOA:n hajoavan **CB7**:n sisällä.

[**CB7**+DBOA+2H]²⁺ kompleksille käytetyt törmäysenergiat olivat 4, 6, 10, 12, 20, 30, 40 ja 50 V. Kahdesti protonoituneen kompleksin törmäysaktivointimittauksen profiilispektriä valittiin mittausta 20 V törmäysenergialla kuvassa 39, jossa näkyy kompleksin hajoaminen aina kahdesti protonoituneeseen [**CB7**+2H]²⁺ m/z 582,0989 asti. Spektrissä havaitaan pilkeioneja ja tulokset on koottu taulukoituina liitteisiin (Liite 6). Ensimmäisenä kompleksista irtoaa eteeni (-C₂H₄), josta havaitaan pilkeioni [**CB7**+DBOA+2H-C₂H₄]²⁺ m/z 637,6329. Seuraavaksi irtoaa vetycyanidi (-HCN), josta jäljelle jäävän pilkeionin [**CB7**+DBOA+2H-C₂H₄-HCN]²⁺ piikki m/z 624,1229. Viimeiseksi kompleksista irtoaa metaani-imiini (-CH₃N), josta havaitaan pilkeionina [**CB7**+DBOA+2H-C₂H₄-HCN-CH₃N]²⁺ m/z 609,6144.



Kuva 39: **CB7**:n ja DBOA:n kahdesti protonoituneen kompleksin [CB7+DBOA+2H]²⁺ törmäysaktivoinnin profiilispektri

Pilkeionien CCS-arvoja vertailtaessa havaitaan niiden olevan samat kuin kahdesti varatulla [CB7+DBOA+2H]²⁺ kompleksilla, jonka CCS-arvo on $360 \pm 36,0 \text{ \AA}^2$. Voidaan siis sanoa myös kahdesti protonoituneen kompleksin tapauksessa, että pilkeionit ovat endokomplekseja, eli pilkkoutuminen tapahtuu **CB7**:n sisällä.

8 Johtopäätökset

Mittauksissa havaittiin, että alkalimetalli-ionit ovat kukurbituriilin suuaukoilla eivätkä kokonaan ulkopuolella. Tämä havainto on yhdenmukainen Young et al.²³ artikkelin kanssa ja useat muutkin ovat todenneet, että ionit tekevät kukurbituriilin suuaukolle luukun. Tähän projektiin emme tehneet enempää tarkentavia metallikompleksimittauksia, koska kontaminaatiot olivat niin suuria. Metallikompleksien massaspektreistä voidaan sanoa, että mittauseräparametrejä ja olosuhteita olisi pitänyt parantaa vielä huomattavasti, että halutut kompleksit olisi havaittu suuremmalla intensiteetillä ja ei-toivottujen ionien runsaudet olisivat jääneet pienemmiksi. Metallikompleksien koolle saataisiin yksiselitteisemmät tulokset törmäyspoikkipinta-alojen määrittämisellä. Törmäyspoikkipinta-alojen arvot ovat toistettavampia kuin drift-ajat ja arvon laskemisessa otetaan huomioon muutujia, jotka vaihtelevat päivästä toiseen ja näin muuttavat drift-aikoja.

Laitteistoissa oli tehtyjen mittausten perusteella eroa. Travelling wave-erotteluun perustuvaa laitteistoa käytettäessä, konformaatioiden erottuvuus toisistaan oli huonompaa, kuin DTIM-erotteluun perustuvalla laitteistolla määritettäessä. Tämä oli kirjallisuudesta saadun tiedon mukaista. CCS-arvoille TWIMS-laitteistolla täytyi myös määrittää suuret virherajat, koska CCS-arvojen kalibranttina käytetyn polyalaniinin rakenteellinen ja kemiallinen vastaavuus ei ollut tarpeeksi hyvä verrattuna mitattuihin komplekseihin. Kuten teoriaosassa on sanottu, niin Agilent 6560 on paremmin soveltuva tarkkojen CCS-arvojen määrittämiseen, kun taas Synaptin laitteella arvojen määrittäminen on paljon kiinni kalibrantin ja mitatun yhdisteen samankaltaisuudesta. Mayn ja McLeanin⁴¹ artikkelissa arvioidaan Agilentin laitteen hyvän törmäyspoikkipinta-alan tarkkuuden olevan sen tarkan elektroniikan-, lämpötilan -ja paineiden säädeltävyyden ansiota. CCS-arvoista tehdyillä tulkinnoilla ei laitteistojen välillä ollut suuria poikkeamia, kun niiden perusteella vertailtiin kompleksien rakenteita. CCS-arvot suurentuivat tai pysyivät samoina, kun vierasmolekyylin kokoa kasvatettiin. Eikä tullut ristiriitaisia havaintoja esimerkiksi alkyyliketjujen pidentymisen vaikuttamisesta kompleksin kokoon pienentävästi. Drift-spektrin piikkien muoto oli huonompi TWIMS-laitteistoa käytettäessä

kuin DTIM-MS-laitteistolla. Tosin muotoon saattoi vaikuttaa lyhyempi parametrien muokkaukseen käytetty aika eikä sopivien parametrien löytymiseen ehditty käyttää tarpeeksi aikaa.

Ioniliikkuvuusmassaspektrometria on erittäin hyvä ja tehokas tapa määrittää isäntävieraskompleksien rakenteita ja myös tarkastella kompleksien hajoamista aktivoinnin seurauksena. Näin voidaan selvittää, esimerkiksi kumpi saman kompleksin eri konformaatioista on pysyvämpi muoto. Kompleksien hajoamistuotteiden ioniliikkuvuuden määrittämisestä saadaan selville esimerkiksi, hajoaako lääkeaine kompleksin sisällä vai irtoaako se sitä ennen kompleksista ja hajoaa vasta sitten. Koska CCS-arvoja voidaan määrittää useilla eri menetelmillä, se on oiva tapa pystyä vertailemaan saman yhdisteen eri mittauksia toisiinsa vaikka mittaus tehtäisiin eri menetelmällä. Laitteiston yhdistämistä muihin analyttisiin menetelmiin esimerkiksi liuoskromatografisiin laitteistoihin on myös lisätty. Eri menetelmien yhdistelmillä saadaan kasvatettua esimerkiksi yhdisteiden erottuvuutta isommista näytematriiseista, kuten verinäytteistä. Kukurbituriileilla on erittäin hyviä sovellusmahdollisuuksia isäntämolekyylinä ja on hyvä, että tämän makrosyklin mahdollisuuksia eri sovelluksissa on alettu enenevässä määrin selvittämään. Monissa lähteissäkin mainittiin, että etenkin lääketieteen ja biokemian saralla mahdollisuudet esimerkiksi CB7:n suhteen ovat todella valoisat. Pienten ja keskikokoisten lääkeainesten kuljetus vesiliukoisella CB7:lla on erittäin potentiaalinen suunta tutkimukselle. Myös massaspektrometriaa ja varsinkin ioniliikkuvuusmassaspektrometriaa on alettu käyttää kemian tutkimuksessa yhä enemmän.

Viitteet

- [1] Steed, J, W.; Jerry L. Atwood, J, L., *Supramolecular Chemistry*, 2. painos, Wiley, Iso-Britannia, 2009.
- [2] Dougherty, D, A., The Cation- π Interaction *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 885–893.
- [3] Chifotides, H, T ja Dunbar, K, R., Anion- π Interactions in Supramolecular Architectures, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 894–906.
- [4] Hunter, C, A.; Lawson, K, R.; Perkins, J.; Urch, C, J., Aromatic interactions, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*,, **2001**, 651-669.
- [5] Evan P. Kyba, E, P.; Helgeson R, C.; Madan, K.; Gokel, G, W.; Tarnowski, T, L.; Moore, S, S.; Cram, D, J., Host-guest complexation, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 2564-2571.
- [6] Fischer, E., Ueber die Verbindungen der Zuckerarten mit den Mercaptanen, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1894**, *27*, 673-679.
- [7] Cramer, F., *Lock-and-Key Principle: The State of the Art-100 Years On*. Kirjassa: Behr, J-P.(toim.), John Wiley and Sons Inc., Iso-Britannia, 1994, s. 1-2.
- [8] Schneider, H-J., Limitations and Extensions of the Lock-and-Key Principle: Differences between Gas State, Solution and Solid State Structures, *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 6694-6717.
- [9] Mecozzi, S. ja Rebek, J., Jr. The 55 % solution: a formula for molecular recognition in the liquid state, *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4*, 1016–1022.
- [10] Barooah, N.; Mohanty, J.; Bhasikuttan, J, A., Cucurbituril-based supramolecular assemblies: Prospective on drug delivery, sensing, separation, and catalytic applications, *Langmuir*, **2022**, *38*, 6249-6264.
- [11] Das, D.; Assaf, K, I.; Nau, W, M., Applications of cucurbiturils in medicinal chemistry and chemical biology, *Front. Chem.*, **2019**, *7* (619).
- [12] Deraedt, C ja Astruc, D., Supramolecular nanoreactors for catalysis, *Coordination Chemistry Review*, **2016** *324*, 106-122.

- [13] Tan, C., Chu, D., Tang, X., Liu, Y., Xuan, W., Cui, Y., Supramolecular coordination cages for asymmetric catalysis, *Chem. Eur. J.*, **2019**, *25*, 662-672.
- [14] Behrend, R.; Meyer, E.; Rusche, F., Ueber Condensationsproducte aus Glycoluril und Formaldehyd, *Liebigs Ann. Chem.*, **1905**, *339*, 1-37 .
- [15] Freeman, W, A.; Mock, W, L.; Shih, N, Y., Cucurbituril, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 7367-7368
- [16] Lee, J, W., Samal, S., Selvapalam, N., Kim, H-J., Kim, K., Cucurbituril homologues and derivatives: New opportunities in supramolecular chemistry, *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*, 621-630.
- [17] Kim, J.; Jung, I.; Kim, S.; Lee, E.; Kang, J.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K., New cucurbituril homologues: Syntheses, isolation, characterization, and x-ray crystal structures of cucurbit[n]uril (n= 5, 7, and 8), *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 540-541.
- [18] Cong, H; Ni, X, L.; Xiao, X.; Huang, Y.; Zhu, Q.; Xue, S.; Tao, Z.; Lindoy, L, F.; Wei, G., Synthesis and separation of cucurbit[n]urils and their derivatives, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 4335-4364.
- [19] Assaf, K, I. ja Nau, W, M., Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis, *Chem. Soc. Rev*, **2015**, *44*, 394-418
- [20] Wagner, B, D., *Organic Nanoreactors From Molecular to Supramolecular Organic Compounds*. Kirjassa: Sadjadi, S. (toim.), Academic Press, Iso-Britannia, 2016, s. 43-84 .
- [21] Márquez, C.; Hudgins, R, R.; Nau, W, M., Mechanism of host-guest complexation by cucurbituril, *J. Am. Chem. Soc*, **2004**, *126*, 5806-5816.
- [22] Chernikova, E, Y.; Fedorov, Y, V.; ja Fedorova, O, A., Cucurbituril as a new "host" of organic molecules in inclusion complexes, *Russ Chem Bull*, **2012**, *61*, 1363-1390.
- [23] Jeon, Y, M.; Kim, J.; Whang, D.; Kim, K, J., Molecular container assembly capable of controlling binding and release of its guest molecules: Reversible

- encapsulation of organic molecules in sodium ion complexed cucurbituril, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 9790-9791.
- [24] Florea, M. ja Nau W, M., Strong binding of hydrocarbons to cucurbituril probed by fluorescent dye displacement: A supramolecular gas-sensing ensemble, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 9338-9342.
- [25] Marquez, C. ja Nau, W, M., Two mechanisms of slow host-guest complexation between cucurbit[6]uril and cyclohexylmethylamine: pH-responsive supramolecular kinetics, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 3155-3160
- [26] Griffiths, J., A Brief history of mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 5678–5683.
- [27] Downard, K., *Mass Spectrometry : A Foundation Course*, Iso-Britannia, Royal Society of Chemistry, 2004.
- [28] Kalenius, E.; Groessl, M.; Rissanen, K., Ion mobility–mass spectrometry of supramolecular complexes and assemblies, *Nat Rev Chem*, **2019**, *3*, 4–14.
- [29] Cech, N, B ja Enke, C, G., Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom. Rev.*, **2001**, *20*, 362–387.
- [30] Rayleigh, Lord., XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity, *Philosophical Magazine*, **1882**, *14*, 184-186.
- [31] Torres-Sangiao, E.; Rodriguez, C, L.; García-Riestra, C., Application and perspectives of MALDI–TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories, *Microorganisms*, **2021**, *9*, 1539.
- [32] Harju, I ja Grönroos, J, O., MALDI-TOF-massaspektrometria kliinisessä mikrobiologiassa, *Duodecim*, **2020**, *136*, 1660-1667.
- [33] Dreisewerd, K., The desorption process in MALDI, *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 395-425.
- [34] Takats, Z.; Wiseman, J, M.; Cooks, R, G., Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology, *J. Mass Spectrom.*, **2005**, *40*, 1261–1275.

- [35] Miao, Z ja Chen, H., Direct analysis of liquid samples by desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS), *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **2011**, *20*, 10-19.
- [36] Carson, R, H.; Lewis, C, R.; Erickson, M, N.; Zagieboylo, A, P.; Naylor, B, C.; Li, K, W.; Farnsworth, P, B.; Price, J, C., Imaging regiospecific lipid turnover in mouse brain with desorption electrospray ionization mass spectrometry, *J. Lipid. Res.*, **2017**, *58*, 1884-1892.
- [37] Wiedenbeck, M.; Bugoi, R.; Duke, J, M.; Dunai, T.; Enzweiler, J.; Horan, M.; Jochum, K, P.; Linge, K.; Kossler, J.; Merchel, S.; Morales, L, F, G.; Nasdala, L.; Stalder, R.; Sylvester, P.; Weis, U.; Zoubir, A., GGR Biennial Critical Review: Analytical developments since 2010., *Geostand. Geoanal. Res.*, **2012**, *36*, 337-398.
- [38] Evans, S., *Methods in enzymology*, 193, Academic Press, New York, 1990, 61-86.
- [39] Giles, K., Ujma, J., Wildgoose, J., Pringle, S., Richardson, K., Langridge, D., Green, M., A Cyclic ion mobility-mass spectrometry system, *Anal. Chem.*, **2019**, *91*, 8564–8573
- [40] D’Atri, V.; Causon, T.; Hernandez-Alba, O.; Mutabazi, A.; Veuthey, J-L.; Cianferani, S.; Guillarme, D., Adding a new separationdimension to MS and LC–MS: What is the utility of ion mobility spectrometry?, *J. Sep. Sci.*, **2018**, *41*, 20–67.
- [41] May, J, C. ja Mc Lean, J, A., Ion mobility-mass spectrometry: time-dispersive instrumentation, *Anal. Chem.*, **2015**, *87*, 1422-1436.
- [42] Belova, L.; Celma, A.; Van Haesendonck, G.; Lemièrre, F.; Sancho, J, V.; Covaci, A.; van Nuijs, A, L, N.; Bijlsma, L., Revealing the differences in collision cross section values of small organic molecules acquired by different instrumental designs and prediction models, *Anal. Chim. Acta.*, **2022**, *1229*, 340-361.
- [43] Harrison, J, A.; Kelso, C.; Pukala, T, L.; Beck, J, L., Conditions for analysis of native protein structures using uniform field drift tube ion mobility mass

spectrometry and characterization of stable calibrants for TWIM-MS, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **2019**, *30*, 256-267.

- [44] Devine, P, W, A.; Fisher, H, C.; Calabrese, A, N.; Whelan, F.; Higazi, D, R.; Potts, J, R.; Lowe, D, C.; Radford, S, E.; Ashcroft, A, E., Investigating the structural compaction of biomolecules upon transition to the gas-phase using ESI-TWIMS-MS, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **2017**, *28*, 1855-1862.
- [45] Hernandez-Mesa, M.; Escourrou, A.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Dervilly-Pinel, G., Current applications and perspectives of ion mobility spectrometry to answer chemical food safety issues, *TrAC*, **2017**, *94*, 39-53.
- [46] Bush, M, F.; Campuzano, I, D, G.; Robinson, C, V., Ion mobility mass spectrometry of peptide ions: effects of drift gas and calibration strategies, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 7124-7130.
- [47] Stow, S, M.; Causon, T, J.; Zheng, X.; Kurulugama, R, T.; Mairinger, T.; May, J, C; Rennie, E, E.; Baker, E, S; Smith, R, D.; Mc Lean, J, A.; Hann, S.; Fjeldsted, J, C., An interlaboratory evaluation of drift tube ion mobility-mass spectrometry collision cross section measurements, *Anal. Chem.*, **2017**, *89*, 9048-9055.

Liitteet

Liite 1: Agilent 6560 massaspektrometrillä mitattujen **CB6** ja amiinien **1-5** protonoituneiden ja kahdesti protonoituneiden kompleksien mittaustulokset

Liite 2: Agilent 6560 massaspektrometrin CCS-arvojen määrittämisessä käytetyt mittaustulokset

Liite 3: Synapt G2-S massaspektrometrillä mitattujen **CB6** ja amiinien **1-5** protonoituneiden ja kahdesti protonoituneiden kompleksien mittaustulokset ja esimerkiksi massaspektri **CB6** ja **5** sisältäneestä näytteestä

Liite 4: **CB7:n** ja amiineja **1-5** sisältäneiden kompleksien mittaustulokset

Liite 5: **CB6:n** ja amiinien **7-9** protonoituneiden ja kahdesti protonoituneiden kompleksien mittaustulokset

Liite 6: **CB7:n** protonoidun ja kahdesti protonoidun DBOA-kompleksin ioniliikkuvuusmittauksen ja törmäysaktivointimittausten tulokset

Liite 1

Taulukko 6: Agilent 6560 mitattujen **CB6** ja alkyyliamiinien **1-5** protonoituneiden ja kahdesti protonoituneiden kompleksien mittaustulokset

Näyte	Ioni	Alkuainekoostumus	m/z (teor)	m/z (kok)	Δ (mDa)	CCS(\AA^2)
n.20 μM , 5+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +H] ⁺	C ₃₆ H ₃₈ N ₂₄ O ₁₂	997,30173	997,3016	0,13	275,2 \pm 0,42
n.20 μM , 1+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +1+H (endo)] ⁺	C ₃₉ H ₄₆ N ₂₅ O ₁₂	1056,37523	1056,3765	-1,27	275,9 \pm 0,41
n.20 μM , 2+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +2+H (endo)] ⁺	C ₄₀ H ₄₈ N ₂₅ O ₁₂	1070,39088	1070,3904	-0,48	276,5 \pm 0,36
n.20 μM , 3+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +3+H (endo)] ⁺	C ₄₁ H ₅₀ N ₂₅ O ₁₂	1084,40653	1084,4065	0,03	277,2 \pm 0,41
n.20 μM , 3+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +3+H (exo)] ⁺	C ₄₁ H ₅₀ N ₂₅ O ₁₂	1084,40653	1084,4065	0,03	291,7 \pm 0,36
n.20 μM , 4+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +4+H (endo)] ⁺	C ₄₂ H ₅₂ N ₂₅ O ₁₂	1098,42218	1098,4229	-0,72	279,0 \pm 0,32
n.20 μM , 4+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +4+H (exo)] ⁺	C ₄₂ H ₅₂ N ₂₅ O ₁₂	1098,42218	1098,4229	-0,72	295,5 \pm 0,36
n.20 μM , 5+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +5+H (endo)] ⁺	C ₄₃ H ₅₄ N ₂₅ O ₁₂	1112,43783	1112,4435	-5,67	280,4 \pm 0,44
n.20 μM , 5+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +5+H (exo)] ⁺	C ₄₃ H ₅₄ N ₂₅ O ₁₂	1112,43783	1112,4435	-5,67	298,6 \pm 0,43
n.20 μM , 5+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +2H] ⁺	C ₃₆ H ₃₈ N ₂₄ O ₁₂	499,15450	499,1535	1,00	302,5 \pm 0,39
n.20 μM , 1+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +1+2H (endo)] ²⁺	C ₃₉ H ₄₇ N ₂₅ O ₁₂	528,69125	528,6986	-6,65	305,8 \pm 0,34
n.20 μM , 2+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +2+2H (endo)] ²⁺	C ₄₀ H ₄₉ N ₂₅ O ₁₂	535,69908	535,7070	-7,92	305,4 \pm 0,35
n.20 μM , 3+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +3+2H (endo)] ²⁺	C ₄₁ H ₅₁ N ₂₅ O ₁₂	542,70690	542,7106	-3,70	ei määritetty
n.20 μM , 3+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +3+2H (exo)] ²⁺	C ₄₁ H ₅₁ N ₂₅ O ₁₂	542,70690	542,7106	-3,70	318,4 \pm 0,89
n.20 μM , 4+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +4+2H (endo)] ²⁺	C ₄₂ H ₅₃ N ₂₅ O ₁₂	549,71473	549,7214	-6,67	307,7 \pm 0,23
n.20 μM , 4+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +4+2H (exo)] ²⁺	C ₄₂ H ₅₃ N ₂₅ O ₁₂	549,71473	549,7214	-6,67	322,9 \pm 0,37
n.20 μM , 5+ CB6 , 2,5:1, H ₂ O	[CB6 +5+2H (exo)] ²⁺	C ₄₃ H ₅₅ N ₂₅ O ₁₂	556,72255	556,7322	-9,65	325,8 \pm 0,36

Liite 2

Table S5. Drift Tube Settings for Single Field Experiments

Time Sequence	Time (min)	Drift Tube Entrance (V)	Drift Tube Exit (V)	Rear Funnel Entrance (V)	Rear Funnel Exit (V)
1	0.0 – 0.5	1574	224	217.5	45

Table S3. Drift Tube Settings for Stepped Field Experiments

Time Sequence	Time (min)	Drift Tube Entrance (V)	Drift Tube Exit (V)	Rear Funnel Entrance (V)	Rear Funnel Exit (V)
1	0.0 – 0.5	1074	224	217.5	45
2	0.5 – 1.0	1174	224	217.5	45
3	1.0 – 1.5	1274	224	217.5	45
4	1.5 – 2.0	1374	224	217.5	45
5	2.0 – 2.5	1474	224	217.5	45
6	2.5 – 3.0	1574	224	217.5	45
7	3.0 – 3.5	1674	224	217.5	45

Kuva 40: Agilent 6560 CCS-arvojen määrittämisessä käytetyt mittausparametrit⁴⁷

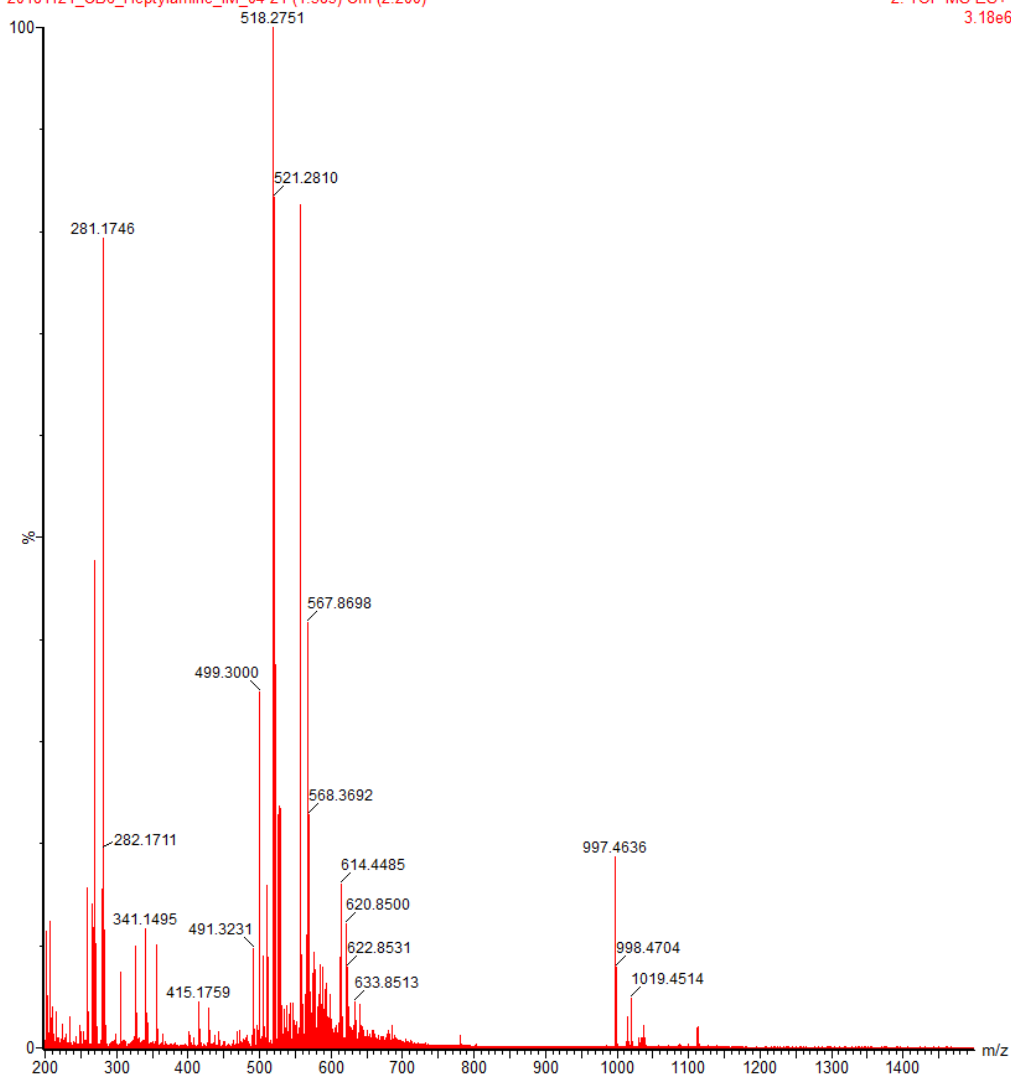
Liite 3

Taulukko 7: Synapt G2-S mitattujen **CB6** ja amiinien **1-5** protonoituneiden ja kahdesti protonoituneiden kompleksien mittaustulokset

Ioni	Alkuainekoostumus	m/z (teor)	m/z (kok)	Δ (mDa)	CCS (\AA^2)
[CB6 +H] ⁺	C ₃₆ H ₃₈ N ₂₄ O ₁₂	997,30173	997,4636	-162	279 ± 27,9
[CB6 + 1 +H (endo)] ⁺	C ₃₉ H ₄₆ N ₂₅ O ₁₂	1056,37523	1056,5404	-165	279 ± 27,9
[CB6 + 2 +H (endo)] ⁺	C ₄₀ H ₄₈ N ₂₅ O ₁₂	1070,39088	1070,5358	-145	279 ± 27,9
[CB6 + 3 +H (endo)] ⁺	C ₄₁ H ₅₀ N ₂₅ O ₁₂	1084,40653	1084,5800	-173	279 ± 27,9
[CB6 + 3 +H (exo)] ⁺	C ₄₁ H ₅₀ N ₂₅ O ₁₂	1084,40653	1084,5800	-173	294 ± 29,4
[CB6 + 4 +H (endo)] ⁺	C ₄₂ H ₅₂ N ₂₅ O ₁₂	1098,42218	1098,5710	-149	279 ± 27,9
[CB6 + 4 +H (exo)] ⁺	C ₄₂ H ₅₂ N ₂₅ O ₁₂	1098,42218	1098,5710	-149	297 ± 29,7
[CB6 + 5 +H (endo)] ⁺	C ₄₃ H ₅₄ N ₂₅ O ₁₂	1112,43783	1112,6082	-170	285 ± 28,5
[CB6 + 5 +H (exo)] ⁺	C ₄₃ H ₅₄ N ₂₅ O ₁₂	1112,43783	1112,6082	-170	303 ± 30,3
[CB6 +2H] ⁺	C ₃₆ H ₃₈ N ₂₄ O ₁₂	499,15450	499,2902	-136	320 ± 32
[CB6 + 1 +2H (endo)] ²⁺	C ₃₉ H ₄₇ N ₂₅ O ₁₂	528,69125	528,8337	-142	320 ± 32
[CB6 + 2 +2H (endo)] ²⁺	C ₄₀ H ₄₉ N ₂₅ O ₁₂	535,69908	535,8342	-135	320 ± 32
[CB6 + 3 +2H (endo)] ²⁺	C ₄₁ H ₅₁ N ₂₅ O ₁₂	542,70690	542,8604	-154	320 ± 32
[CB6 + 4 +2H (endo)] ²⁺	C ₄₂ H ₅₃ N ₂₅ O ₁₂	549,71473	549,8607	-146	320 ± 32
[CB6 + 5 +2H (endo)] ²⁺	C ₄₃ H ₅₅ N ₂₅ O ₁₂	556,72255	556,8749	-152	320 ± 32

CB6+Heptylamine 10 uM 1:5 in H2O
20181121_CB6_Heptylamine_IM_04 21 (1.385) Cm (2:200)

2: TOF MS ES+
3.18e6



Kuva 41:

Liite 4

Taulukko 8: Agilent 6560 mitattujen **CB7** ja amiinien **1-5** protonoituneiden ja kahdesti protonoituneiden kompleksien mittaustulokset, joissa isäntänä **CB7**:n monomeeri tai dimeeri ja vieraana yksi tai kaksi amiinia ja mahdollisia natriumaddukteja

Ioni	Alkuaineostoitus	m/z (teor)	m/z (kok)	Δ (mDa)	CCS (\AA^2)
[CB7 + 1 +H] ⁺	C ₄₅ H ₅₂ N ₂₉ O ₁₄	1222,42430	1222,4217	2,60	307,7 ± 0,71
[CB7 + 2 +H] ⁺	C ₄₆ H ₅₄ N ₂₉ O ₁₄	1236,43995	1236,4342	5,75	308,5 ± 0,74
[CB7 + 3 +H] ⁺	C ₄₇ H ₅₆ N ₂₉ O ₁₄	1250,45560	1250,4504	5,20	308,2 ± 0,70
[CB7 + 4 +H] ⁺	C ₄₈ H ₅₈ N ₂₉ O ₁₄	1264,47125	1264,4666	4,65	307,7 ± 0,67
[CB7 + 5 +H] ⁺	C ₄₉ H ₆₀ N ₂₉ O ₁₄	1278,48690	1278,4834	3,50	309,8 ± 0,57
[CB7 +2x 1 +2H] ²⁺	C ₄₈ H ₆₂ N ₃₀ O ₁₄	641,25254	641,2535	-0,96	338,5 ± 0,42
[CB7 +2x 2 +2H] ²⁺	C ₅₀ H ₆₆ N ₃₀ O ₁₄	655,26819	655,2706	-2,41	340,6 ± 0,43
[CB7 +2x 3 +2H] ²⁺	C ₅₂ H ₇₀ N ₃₀ O ₁₄	669,28384	669,2853	-1,46	345,3 ± 0,37
[CB7 +2x 4 +2H] ²⁺	C ₅₄ H ₇₄ N ₃₀ O ₁₄	683,29949	683,3019	-2,41	350,1 ± 0,34
[CB7 +2x 5 +2H] ²⁺	C ₅₆ H ₇₈ N ₃₀ O ₁₄	697,31514	697,3168	-1,66	356,1 ± 0,23
[2x CB7 +3Na] ³⁺	C ₈₄ H ₈₄ N ₅₆ O ₂₈ Na ₃	797,88491	797,8823	2,61	512,8 ± 0,66
[2x CB7 + 1 +2Na+H] ³⁺	C ₈₇ H ₉₄ N ₅₇ O ₂₈ Na ₂	810,24876	810,2447	4,06	517,1 ± 0,63
[2x CB7 + 2 +2Na+H] ³⁺	C ₈₈ H ₉₆ N ₅₇ O ₂₈ Na ₂	814,92064	814,9173	3,34	515,7 ± 0,67
[2x CB7 + 3 +2Na+H] ³⁺	C ₈₉ H ₉₈ N ₅₇ O ₂₈ Na ₂	819,59252	819,5890	3,52	515,1 ± 0,54
[2x CB7 + 4 +2Na+H] ³⁺	C ₉₀ H ₁₀₀ N ₅₇ O ₂₈ Na ₂	824,26441	824,2610	3,41	514,4 ± 0,51
[2x CB7 +2x 1 +Na+2H] ³⁺	C ₉₀ H ₁₀₄ N ₅₈ O ₂₈ Na	822,61261	822,6084	4,21	521,2 ± 0,65
[2x CB7 +2x 2 +Na+2H] ³⁺	C ₉₂ H ₁₀₈ N ₅₈ O ₂₈ Na	831,95638	831,9528	3,58	519,6 ± 0,64
[2x CB7 +2x 3 +Na+2H] ³⁺	C ₉₄ H ₁₁₂ N ₅₈ O ₂₈ Na	841,30014	841,2962	3,94	519,6 ± 0,51
[2x CB7 +2x 4 +Na+2H] ³⁺	C ₉₆ H ₁₁₆ N ₅₈ O ₂₈ Na	850,64391	850,6402	3,71	519,4 ± 0,48

Liite 5

Taulukko 9: Agilent 6560 mitattujen **CB6**:n ja amiinien **7-9** prtonoituneiden ja kahdesti protonoituneiden kompleksien mittaustulokset, joissa vieraana yksi tai kaksi amiinia.

Ioni	Alkuainekoostumus	m/z (teor)	m/z (kok)	Δ (mDa)	CCS (\AA^2)
[CB6 +H] ⁺	C ₃₆ H ₃₈ N ₂₄ O ₁₂	997,30173	997,3016	0,13	275,2 ± 0,42
[CB6 + 7 +H (endo)] ⁺	C ₄₀ H ₄₆ N ₂₅ O ₁₂	1068,37523	1068,3718	3,43	276,4 ± 0,35
[CB6 + 8 +H (endo)] ⁺	C ₄₂ H ₅₀ N ₂₅ O ₁₂	1096,40653	1096,4040	2,53	278,0 ± 0,44
[CB6 + 8 +H (ekso)] ⁺	C ₄₂ H ₅₀ N ₂₅ O ₁₂	1096,40653	1096,4040	2,53	291,5 ± 0,43
[CB6 + 9 +H (endo)] ⁺	C ₄₃ H ₄₆ N ₂₅ O ₁₂	1104,375230	1104,3738	1,43	276,9 ± 0,24
[CB6 + 9 +H (ekso)] ⁺	C ₄₃ H ₄₆ N ₂₅ O ₁₂	1104,375230	1104,3738	1,43	291,3 ± 0,41
[CB6 +2H] ⁺	C ₃₆ H ₃₈ N ₂₄ O ₁₂	499,15450	499,1535	1,00	302,5 ± 0,39
[CB6 + 7 +2H (endo)] ²⁺	C ₄₀ H ₄₇ N ₂₅ O ₁₂	534,69125	534,6913	-0,05	305,0 ± 0,34
[CB6 + 8 +2H (ekso)] ²⁺	C ₄₂ H ₅₁ N ₂₅ O ₁₂	548,70690	548,7070	-0,10	318,0 ± 0,35
[CB6 + 9 +2H(endo)] ²⁺	C ₄₃ H ₄₇ N ₂₅ O ₁₂	552,69125	552,6908	0,45	306,5 ± 0,36
[CB6 + 9 +2H(ekso)] ²⁺	C ₄₃ H ₄₇ N ₂₅ O ₁₂	552,69125	552,6908	0,45	318,5 ± 0,34
[CB6 +2x 7 +2H(endo)] ²⁺	C ₄₄ H ₅₆ N ₂₆ O ₁₂	570,22800	570,2265	1,50	314,2 ± 0,36
[CB6 +2x 8 +2H(ekso)] ²⁺	C ₄₈ H ₆₄ N ₂₆ O ₁₂	598,25930	598,2656	-6,30	333,6 ± 0,43
[CB6 +2x 9 +2H(endo)] ²⁺	C ₅₀ H ₅₆ N ₂₆ O ₁₂	606,22800	606,2276	0,40	321,6 ± 0,57
[CB6 +2x 9 +2H(ekso)] ²⁺	C ₅₀ H ₅₆ N ₂₆ O ₁₂	606,22800	606,2276	0,40	334,6 ± 0,33

Liite 6

Taulukko 10: **CB7**:n protonoidun ja kahdesti protonoidun DBOA-kompleksin ioniliikkuvuusmittausten $[\mathbf{CB7}+\mathbf{H}]^+$, $[\mathbf{CB7} + 2\mathbf{H}]^{2+}$ tulokset

Ioni	Alkuaineostoitus	m/z (teor)	m/z (kok)	Δ (mDa)	CCS(\AA^2)
$[\mathbf{CB7}+2\mathbf{H}]^{2+}$	$\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{N}_{28}\text{O}_{14}$	582,17904	582,0884	90,64	$354 \pm 35,4$
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+2\mathbf{H}]^{2+}$	$\text{C}_{49}\text{H}_{57}\text{N}_{31}\text{O}_{14}$	651,73451	651,6442	90,31	$360 \pm 36,0$
$[\mathbf{CB7}+\mathbf{H}]^+$	$\text{C}_{42}\text{H}_{43}\text{N}_{28}\text{O}_{14}$	1163,35080	1163,2185	132,30	$313 \pm 31,3$
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+\mathbf{H}]^+$	$\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{N}_{31}\text{O}_{14}$	1302,46175	1302,3223	139,45	$313 \pm 31,3$

Taulukko 11: **CB7**:n protonoituneen DBOA-kompleksin törmäysaktiivisuuden mitaustulokset.

Ioni	Alkuaineostoitus	m/z (teor)	m/z (kok)	Δ (mDa)	CCS(\AA^2)
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+\mathbf{H}]^+$	$\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{N}_{31}\text{O}_{14}$	1302,46175	1302,3223	139,45	$308 \pm 30,8$
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}-\text{N}_2]^+$	$\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{N}_{29}\text{O}_{14}$	1274,45560	1274,3188	136,80	$311 \pm 31,1$
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}-\text{N}_2-\text{HCN}]^+$	$\text{C}_{48}\text{H}_{55}\text{N}_{28}\text{O}_{14}$	1247,44470	1247,2827	162,00	$308 \pm 30,8$
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}-\text{N}_2-\text{HCN}-\text{CH}_3]^+$,	$\text{C}_{47}\text{H}_{52}\text{N}_{28}\text{O}_{14}$	1232,42123	1232,2789	142,33	$308 \pm 30,8$
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+\text{H}-\text{N}_2-\text{HCN}-\text{CH}_3\text{N}]^+$	$\text{C}_{47}\text{H}_{52}\text{N}_{27}\text{O}_{14}$	1218,41816	1218,2496	168,56	$306 \pm 30,6$
$[\mathbf{CB7}+\mathbf{H}]^+$	$\text{C}_{42}\text{H}_{43}\text{N}_{28}\text{O}_{14}$	1163,35080	1163,2185	132,30	$308 \pm 30,8$

Taulukko 12: **CB7**:n kahdesti protonoidun DBOA-kompleksin törmäysaktiivisuuden mitaustulokset

Ioni	Alkuaineostoitus	m/z (teor)	m/z (kok)	Δ (mDa)	CCS(\AA^2)
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+2\mathbf{H}]^{2+}$	$\text{C}_{49}\text{H}_{57}\text{N}_{31}\text{O}_{14}$	651,73451	651,6553	-76,29	$360 \pm 36,0$
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+2\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4]^{2+}$	$\text{C}_{47}\text{H}_{53}\text{N}_{31}\text{O}_{14}$	637,71886	637,6329	-67,54	$360 \pm 36,0$
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+2\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{HCN}]^{2+}$	$\text{C}_{46}\text{H}_{52}\text{N}_{30}\text{O}_{14}$	624,21341	624,1229	-60,99	$360 \pm 36,0$
$[\mathbf{CB7}+\text{DBOA}+2\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{HCN}-\text{CH}_3\text{N}]^{2+}$	$\text{C}_{45}\text{H}_{49}\text{N}_{29}\text{O}_{14}$	609,70014	609,6144	-63,56	$360 \pm 36,0$
$[\mathbf{CB7}+2\mathbf{H}]^{2+}$	$\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{N}_{28}\text{O}_{14}$	582,17904	582,0989	54,70	$354 \pm 35,4$