

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
Keemia instituut

Piia Burk

**ELEKTROPIHUSTUSE IONISATSIOONIEFEKTIIVSUSE
SKAALA LAIENDAMINE POSITIIVSES JA NEGATIIVSES
REŽIIMIS**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Anneli Kruve, PhD
Karl Kaupmees, PhD

Kaitmisele lubatud

Juhendaja

allkiri, kuupäev

Tartu 2015

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	3
Sissejuhatus	4
1 Kirjanduse ülevaade	5
1.1 Ioniseerumise mehhanism ESI allikas	5
1.2 Mitmelaenguliste ionide teke ESI allikas	7
1.3 Ionisatsiooniefektiivsus	9
1.4 Ionisatsiooniefektiivsuse rakendused	13
2 Eksperimentaalne osa	14
2.1 Aparatuur	14
2.2 Kasutatud ained	16
2.3 Arvutused.....	17
2.4 Mudelite koostamine	18
3 Tulemused	20
3.1 Mitmelaengulisi ioone andvate ühendite ionisatsiooniefektiivsuste uurimine	20
3.2 Aminohapete ja oligopeptiidide ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmine.....	23
4 Arutelu.....	27
4.1 Mitmelaengulisi ioone andvate ühendite ionisatsiooniefektiivsuste uurimine	27
4.2 Aminohapete ja oligopeptiidide ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmine.....	29
Kokkuvõte	34
Summary	35
Kasutatud kirjanduse loetelu	36
Lisad	41

Kasutatud lühendid

α	ioniseerumise määr (positiivses ESI režiimis protoneerumise määr, negatiivses ESI režiimis deprotoneerumise määr)
BP	Becke-Perdew (tihedus)funktsionaal
COSMO-RS	ingl <i>Conductor-like Screening Model for Real Solvation</i>
DFT	tihedusfunktsionaali teooria (ingl <i>density-functional theory</i>)
ESI	elektropihustusionisatsioon (ingl <i>electrospray ionization</i>)
IE	ionisatsiooniefektiivsus
LC	vedelikkromatograafia (ingl <i>liquid chromatography</i>)
LDA	lineaarne diskriminantanalüüs
$\log P_{ow}$	oktanool-vesi jaotuskoefitsient
MS	massispektromeetria; massispektromeeter
RI lähendus	ingl <i>resolution-of-identity</i>
TM	sihtmäss (ingl <i>target mass</i>)
TZVP	kolmekordse zeeta täpsusega ja polarisatsioonifunktsioone sisaldav baas (ingl <i>triple zeta valence + polarization</i>)
WAPS/WANS	kaalutud keskmine positiivne/negatiivne sigma (ingl <i>weighted average positive/negative sigma</i>)

Sissejuhatus

Vedelikkromatograafia (LC) ja massispektromeetria (MS) on üks enimkasutatavaid analüütilisi meetodeid nii rutiinanalüüsis, rakendusuuringutes kui ka fundamentaalteadustes. Lahusest gaasifaasiliste ionide tekitamiseks kasutatakse elektropihustusionisatsiooni (ESI), mis sobib erinevalt teistest ionisatsioonitehnikatest nii väikeste ja hüdrofiilsete ühendite, kuid ka suurte peptiidide ioniseerimiseks.

On teada, et erinevatel ühenditel on LC/ESI/MS analüüsil väga erinev tundlikkus, seetõttu on tänaseni vajalik ESI/MS analüüsi puhul kasutada kvantiseerimiseks standardaineid. Samas ei ole kõigi ühendite jaoks standardaineid olemas ning mõningatel juhtudel pole standardainete valmistamine isegi teoreetiliselt võimalik (mittekovalentsed kompleksid, ebastabiilsed ühendid jne). Seetõttu on üritatud ESI ionisatsiooniprotsessi erinevate ühendite jaoks kirjeldada. TÜ analüütilise keemia õppetoolis on alguse saanud ESI ionisatsiooniefektiivsuse skaalade väljatöötamine. Selle kaugemaks eesmärgiks on mõõdetud numbriliste ionisatsiooniefektiivsuste kaudu koostada mudel, mis võimaldaks ennustada analüütide ionisatsiooniefektiivsusi.

Senini on nii positiivses kui ka negatiivses ESI režiimis ionisatsiooniefektiivsuste skaalasse kaasatud vaid väikeseid ühelaengulisi ioone moodustavaid keskmise või kõrge hüdrofoobsusega ühendeid. Samas pakuvad massispektromeetria kasutajatele sageli huvi ka mitmelaengulisi ioone andvad ja/või hüdrofiilsed ühendid.

Seetõttu püstitati käesolevale tööle järgmised eesmärgid:

1. Selgitada välja, millest sõltub mitmelaenguliste ionide moodustumine elektropihustusionisatsioonil ning täiendada ionisatsiooniefektiivsuste skaalat mitmelaengulisi ioone andvate ühenditega;
2. täiendada ionisatsiooniefektiivsuste skaalat nii positiivses kui ka negatiivses ESI režiimis väikeste hüdrofiilsete ühenditega;
3. täiendada ionisatsiooniefektiivsuste skaalasisid suuremate hüdrofiilsemate ühenditega;
4. kontrollida, kas töö käigus ionisatsiooniefektiivsuste skaalasse lisatud ühendite jaoks kehtivad varasemalt leitud seosed ühendite füüsikalise-keemiliste omadustega.

Nende eesmärkide täitmiseks uuriti 8 mitmealuselist hapet negatiivses ESI režiimis, 21 aminohapet ja 7 peptiidi nii positiivses kui ka negatiivses režiimis ning töötati välja mudelid mõlemas režiimis mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste ennustamiseks.

1 Kirjanduse ülevaade

Massispektromeetria (MS) leiab üha enam kasutust bioloogiliselt huvipakkuvate ühendite uurimisel [1, 2]. Elektropihustusionisatsioon (ESI) [3] on pehme ionisatsioonimeetod ja seetõttu väga sobiv bioloogiliste ühendite analüüsiks, kuna gaasifaasiliste ionide tekitamisel toimub vähe või ei toimu üldse fragmenteerumist [1]. Täiendavaks eeliseks on asjaolu, et ionisatsioon toimub lahusest, mis sobib hästi kokku vedelikkromatograafiliste (LC) meetoditega. Tihti annavad bioloogiliselt huvipakkuvad ühendid ESI ionisatsiooniallikas mitmelaengulisi ioone, mistõttu saab kasutada madalama massi-laengu suhte (m/z) vahemikuga massianalüsaatoreid.

Hoolimata sellest, et LC/ESI/MS süsteeme kasutatakse väga laialdaselt, on ESI siiski kui must kast – selle toimise mehhanismid pole lõpuni selged. Välja on pakutud erinevaid ioniseerumise mehhanismi teooriaid. Analüüt võib saada laengu mitmel erineval viisil: laadumisel lahuses, laenguga osakeste seostumisel ehk aduktide moodustumisel, gaasifaasilistes reaktsioonides, elektrokeemilisel oksüdeerumisel või redutseerumisel [1, 4].

Levinuim ESI ionisatsiooni režiim on positiivne. See tähendab, et ioniseerumise käigus tekivad positiivselt laetud ioonid. Üldiselt on positiivses režiimis kõrgem tundlikkus kui negatiivses režiimis [1]. Kaarlahendust pihustinõela ja massispektromeetri sisendi vahel, mis võib vähendada tulemuste korduvust, esineb positiivses režiimis vähem [1]. Samas on näidatud, et maatriksefektid mõjutavad negatiivset ionisatsiooni vähem [5], seega võib negatiivne režiim olla selektiivsem. Negatiivne režiim on vähem levinud ja sobib eelkõige just happeliste analüütide korral.

1.1 Ioniseerumise mehhanism ESI allikas

Elektropihustusionisatsiooniallikat kasutatakse väga laialdaselt LC ja MSi ühendamiseks. Kuigi ESI allikas toimuvaid protsesse on väga palju uuritud [4,6-11], on siiski mõningaid vasturääkivusi ja ebaselgust ESI-s toimuva ioniseerumisprotsessi osas. On selgeks tehtud, et erinevate analüütide signaalid sama kontsentratsiooni juures ei ole samad [6]. See on osalt tingitud analüüdi enda omadustest, samuti mängivad rolli maatriksefektid, mis võivad signaali võimendada või maha suruda [7]. Et paremini mõista, mis on analüüdi signaali mõjutavad faktorid on oluline uurida, millise mehhanismiga toimub ioniseerumine ESI allikas. Siiani on välja pakutud kaks peamist mudelit: ionaurustumise teooria [12] ja jääklaengute teooria [13]. Esimene kehtib pigem väiksemate, teine suuremate analüütide jaoks. Lisaks on ebakorrapäraste polümeeride jaoks välja pakutud ahela väljaheitmise mudel [14-16]. Nende kolme erineva mehhanismi on piirid analüüdi suuruse, struktuuri ja polaarsuse järgi ebaselged. On

aineperekondi, mille puhul selgelt domineerib üks või teine mudel. Samas leidub hulgaliselt aineid, mille puhul toimivad mitmed mehhanismid korraga, omades enamasti erinevaid osakaale [17].

Ioonaurustumise mudel [12] kehtib madalate molekulaarmassidega ühendite ja anorgaaniliste väikeste ionide puhul [7, 18]. Tilgas ioniseerunud ühendile mõjuvad nii seda tilgas hoidvad kui ka tilgast väljatõukavad jõud. Solvendi polarisatsioon tekitab laengu, mis hoiabiooni tilga sees. Laenguliist tingitud ionide vaheline tõukumine lükkabiooni tilga välispinnale ja sealt välja. Nende kahe protsessi mõjul moodustub enam-vähem sfääriline tilk. Uuemad molekulaardünaamilised arvutused näitavad, et ioonaurustumisel ei teki kohe gaasifaasilineioon vaid esmalt tekib solvendi molekulidest sild eralduvaiooni ja tilga vahele, mille püsivus sõltub solvendi pindpinevusest [15]. Mida veerikkam on lahusti, seda väiksem on tendents silla moodustumiseks. Iooni jätkuval kaugenemisel tilgast sild katkeb. Esmane ioonaurustumise protsessi produkt on väike gaasifaasiline solvateeritud analüüdiioon. Allesjäänud solvaatkate kaotatakse kokkupõrgetel gaasi molekulidega, kuiioon liigub MS sisendi poole. On täheldatud, et kõrgema tundlikkusega on sellised ühendid, mis paiknevad eelistatult tilga pinnal – pindaktiivsed ained – sest tekkiv gaasifaasiline analüüdiioon eraldub tilga pinnalt [16].

Üldiselt on levinud arvamus, et suuremate globulaarsete valkude jaoks ei kehti ioonaurustumise teooria. Selle tõestuseks on kaks olulist fakti. Esiteks on valkude massispektris üldiselt suurema laengute arvuga ionide piigid, kui oleks oodatav ioonaurustumise mudeli järgi. Teiseks on valkude ESI massispektrites mõnikord agregate, mille teke on seletatav jääklaengute mudeli abil [2].

Jääklaengute mudeli [13] korral toimub tilga „kuivaks“ aurumine, kus kogu solvendi aurustumise jooksul säilib enam-vähem tilga algne laeng. Solvendi aurustumisel alles jäävad laengukandjad seostuvad analüüdiga. Molekulaardünaamilised arvutused [14] näitavad, et valgu ulatuslik hüdratatsioon peidab valgu tilga sisemusse. ESI ioniseerumise määr jääklaengute mudeli korral ei sõltu analüüdi laengust lahuses. Ioniseerumise määra saame arvutada Rayleigh piiri järgi [19]. Rayleigh piiril on kohesiivsed vastasmõjud tasakaalus elektrostaatilisega ning seda kirjeldab valem 1.

$$z_R = \frac{8\pi}{e} \sqrt{\epsilon_0 \gamma R^3} \quad (1)$$

Valemis 1 on z_R Rayleigh laeng ehk elementaarlaengute e arv tilgas raadiusega R , ϵ_0 on vaakumi dielektriline läbitavus ja γ on pindpinevus. Valemit 1 saab kasutada olenemata valgu

laengute hulgast lahuses ja aminohappelisest koostisest valkude maksimaalse laengute arvu ennustamiseks ESI/MS spektris juhul, kui laadumisel kantakse üle kõik tilgas olevad laengud.

Valgu käitumine ESI allikas sõltub tema konformatsioonist. Neutraalsetes vesilahustes on valkudel enamasti globulaarne konformatsioon, kus enamik laetud ja polaarseid osi on suunatud väljapoole, mis suurendab valgu pinna ja vee vahelisi interaktsioone. Mittepolaarsed osad on enamasti valgu sisemuses ja ei ole solvendile ligipääsetavad.

Väiksemate mudelvalkude uurimisel on näidatud, et denatureeritud ebakorrapäraseid valgud ioniseeruvad ahela väljaheitmise mudeli järgi [14, 15]. Valgu denatureerimist soodustavad mitmed faktorid, näiteks happelise LC mobiilfaasi kasutamine. Tekkinud konformatsioonidel on ebakorrapärane struktuur ja varem valgu struktuuri sisemuses asetsenud mittepolaarsed alad on nüüd interaktsioonis tilga solvendiga. Seega muudab denatureerimine valgu omadusi kompaktselt ja hüdrofiilsest väljavenitatuks ja hüdrofoobsemaks. Denatureerunud valkude omadused muudavad tilga sisemuses paiknemise vähem tõenäoliseks. Pigem soodustavad mittepolaarsed osad valgu liikumist tilga pinnale [15]. Selle tulemusel heidetakse üks valgu ahela ots tilgast välja. Sellele järgneb ülejäänud valgu samm-sammuline lahkumine tilgast. Toodud mudelil on palju sarnasusi ioonaurustumise mudeliga. Ahela väljaheitmise mudel kehtib selliste valkude puhul, mis on ebakorrapäraseid, osaliselt hüdrofoobsed ja võimelised siduma laenguliia kandjaid [15, 16].

Denatureerunud valgud annavad massispektris üldiselt kõrgemaid signaale kui globulaarsed valgud. Globulaarse valguga toimuv jääklaengu protsess on suhteliselt aeglane (μs) ja väheefektiivne, samal ajal denatureerunud valguga toimuv ahela väljaheitmine on kiire (ns) ja efektiivne, suurendades tekkivate ionide arvu. Ahela väljaheitmine on kooskõlas ka ülelaadumise teooriaga, kus lahusefaasis nähtust kõrgem laetud olek on tingitud ülelaaduva reagenti denatureerivast mõjust [20].

1.2 Mitmelaenguliste ionide teke ESI allikas

Elektropihustusionisatsioonil võivad tekkida ka mitmelaengulised ioonid [13, 16, 21-23]. Tihti võib mitmelaengulisus esineda koos solvendi klastrite tekkimisega ionisatsiooniallikas. Erinevates kirjandusallikates [17, 21, 24] ollakse eriarvamusel, kas sellised mitmelaengulised klastrid on tekkinud ioonaurustumise mehhanismi või jääklaengute mudeli kohaselt. Esimesena täheldas mitmelaenguliste ionide teket ESI allikas Dole *et al.* [13], kes uurisid polüstüreeni makroioone. Pakuti välja, et polüstüreeni mitmelaenguliste ionide teke toimub jääklaengute mudeli kohaselt. Hiljem väljatöötatud ioonaurustumise mehhanismiga ei osatud esialgu sellega seletada mitmelaengulisust. Ioonaurustumise teooriat täiendasid Fenn *et al.* [24], kes väitsid, et

polüetüleenglükoolide ja valkude laengujaotus sõltub iooni desorptsiooni kiirusest, mis omakorda sõltub tilga laengutihedusest. Wong *et al.* [21] töötasid välja mudeli ennustamiseks, kui suur on maksimaalne võimalik laengute arv sõltuvalt ühendi suuruselt ja afiinsusest temale liituva iooni suhtes. Gamero-Castaño ja de la Mora [17] välistasid jääklaengute mudeli toimimise kasutades kõrge juhtivusega lahuseid. Seeläbi oli võimalik uurida, milliseid protsesse mõjutab ionaurustumine ja millised jääklaengute teke. Tehti kindlaks, et ühelaengulised ioonid tekivad ionaurustumisel ning mitmelaengulised ioonid jääklaengu mudeli kohaselt.

Schnier *et al.* [25] ning Smith *et al.* [26] uurisid valkude ning peptiididega seonduvate prootonite arvu gaasifaasis ning leidsid, et prootonite arv on väga lähedane aluseliste rühmade arvule (globulaarsete valkude puhul ligipäätavate aluseliste rühmade arvule). Uuringutest selgus, et lähedal asetsevad protoneeritud rühmad mõjutavad järgmiste laengute liitumist. Selle seletamiseks kasutati näiva aluseliseuse mõistet, mis võttis arvesse lähedal asetsevaid laenguid. Selgus, et lähedal asetsevate laengute mõjul on kõrvalrühma näiline aluselisisus palju väiksem kui lähedal paiknevate laenguteta. Samuti leiti, et laengut mõjutab ka lahusti ning lisandite aluselisisus. Sama leidsid ka Felitsyn *et al.* [27], kes tõid välja, et aluseliste rühmade protoneerumist vähendavad lähedal asetsevad positiivsed laengud. Lisaks uuriti teooriat, et suurimat laengute arvu saab ennustada tugevalt aluseliste kõrvalrühmade arvu ning Rayleigh piirist [19] arvutatava teoreetilise laengu järgi. Nimelt, kui aluselisi kõrvalrühmi on vähe ning nad paiknevad üksteisest piisavalt kaugel, on piiravaks aluseliste kõrvalrühmade arv, kui aga aluselisi kõrvalrühmi on palju, siis on piiravaks tilga aurustumisel ülekantavate laengute arv.

Palju on mitmelaengulisusega seoses uuritud valke ja peptiide ning juba üsna varakult avastati, et positiivses ESI režiimis on suurema laenguga aluselistest rühmadest koosnevad valgud ja mitmeid tugevaid aluseliseuse tsentreid sisaldavad ühendid ning negatiivses ESI režiimis sellised analüüdid, mis koosnevad mitmetest happelistest (prootoneid loovutavatest) kõrvalrühmadest. Loo *et al.* [28] näitasid, et aluseliste aminohapete arv on otseselt seotud valgu maksimaalse võimaliku laenguga. Samuti toodi välja, et valkudel, mis sisaldasid disulfiidsidemeid, oli maksimaalne võimalik laeng madalam, kui aluseliste aminohapete arvu järgi võinuks eeldada [29]. Eelneva põhjenduseks toodi selliste valkude aluseliste piirkondade halvem ligipäätavus. Cole *et al.* [23] uurisid laetud olekuid ja selle mõjureid negatiivses režiimis ning leidsid, et mitmelaenguliste ionide teke on soodustatud suure dielektrilise konstandiga lahustes ning see mõju on seda suurem, mida lähemal asuvad potentsiaalselt laaduvad kohad üksteisele. Gandori [30] tõi välja alternatiivse teooria – konformatsioonist sõltuva neutralisatsiooni teooria, mis ütleb, et pakitud (ingl *folded*) konformatsioonid stabiliseerivad kõrgemalt laetud olekuid suurendades laengute vahelisi kaugusi. Ta tõi välja,

sisemolekulaarsed interaktsioonid mõjutavad pakitud ja denatureerunud valkude erinevaid laetud olekuid rohkem kui solvendi ligipääsetavus. Seega vastupidise laenguga kõrvalrühmad stabiliseerivad pakitud valgu laetud olekut. Hogan *et al.* [31] pakkusid välja teooria, kus peptiidide laetud olek ei tulene ainult peptiidi mõõtmetest, vaid ka tilgas olevatest teistest laengukandjatest. Kõigepealt lahkuvad tilgast ionaurustumise teel väikesed laengukandjad, mille jaoks kriitiline väljatugevus on madalaim.

Kui mitmelaengulisuse vähenemine (ennustatust väiksema maksimaalse laenguga laetud olek) on laialt tunnustatud, siis ülelaadumist (ingl *supercharging*; analüüdi laengujaotuse nihkumine suuremate laengute poole) on keerulisem seletada. Iavarone pani aluse ülelaadumise uurimisele [32] ning leidis, et kui lahustile lisatakse veest vähemlenduvaid lisandeid esineb laetud olekute nihkumine kõrgemalt laetud olekute poole [32-34].

Välja on pakitud kaks mehhanismi, mis põhjustavad ülelaadumist. Esimene väidab, et ülelaadumist põhjustab lisand, mis suurendab lahusti pindpinevust, mille tulemusena saab pinnal olla rohkem laengukandjaid [34]. Teise mehhanismi kohaselt on ülelaadumine tingitud lisandi denatureerivast mõjust analüüdile ning on juba varem teada, et denatureerimine suurendab laengute ligipääsu valgule ning laaduvate rühmade omavahelist kaugust, vähendades elektrostaatilist tõukumist [20]. Šamalikova *et al.* [35] näitasid, et kui ei toimu konformatsioonilisi muutusi, siis on mitmekordne laadumine sõltumatu pindpinevusest. Douglass *et al.* [36] nägid, et ülelaadumine esineb vaid positiivses režiimis ning järeldasid sellest, et ülelaadumine ei ole tingitud polaarsusest sõltumatutest omadustest nagu konformatsiooni muutus ja pindpinevuse muutus. Näidati, et ülelaaduva reagendi, sulfolaani, lisamine suurendas kõrgeimalt laetud ionide moodustumist. Pakuti välja, et sulfolaan interakteerub aluseliste kõrvalrühmadega ning vähendab lähedal olevate laengute tõukumist ning seeläbi on suurem tõenäosus, et ka lähestikku asetsevad aluselised tsentrid ioniseeruvad.

Kui valkudest mitmelaenguliste ionide moodustumist on uuritud küllaltki palju siis väiksemate mitmeid aluselisi või happelisi rühm sisaldavate ühendite jaoks analoogseid uuringuid on kirjandusest vähe leida [34].

1.3 Ionisatsiooniefektiivsus

Ionisatsiooniefektiivsus on lahuses olevatest analüüdi molekulidest gaasifaasiliste ionide genereerimise efektiivsus [37, 38]. Väike hulk allikasse sattuvatest analüüdi molekulidest ioniseerub ja veel väiksem hulk jõuab massianalüsaatoris detekteerimiseni.

Välja on pakutud kaks mudelit, mis seavad vastavusse iooni signaali massispektromeetris ja tema kontsentratsiooni pihuses. Ioonaurustumise mudeli põhjal pakkusid Tang ja Kebarle [6, 9] välja mudeli:

$$I(A^+, ms) = Pf \frac{k_A [A^+]}{k_A [A^+] + k_E [E^+]} I, \quad (2)$$

kus $I(A^+, ms)$ on iooni signaal massispektromeetris, P iseloomustab ionitranspordi efektiivsust, f on laenguliia osa, mis muudetakse gaasifaasilisteks ionideks, k_A ja k_E on analüüdi ja teiste ionide tilgast gaasifaasi liikumise määrad, $[A^+]$ ja $[E^+]$ on vastavalt analüüdi ja teiste elektrolüütide tasakaalulised kontsentratsioonid pihuses ning I on elektropihustusel tekkivioonvool.

Suurused k , f ja P on sõltuvad ionide iseloomust ja lahustist, mida pihustatakse. Nende parameetrite teadmine annaks ionisatsiooniprotsessist peaaegu täieliku pildi. Siiski on nende, eriti nende absoluutväärtuste, mõõtmine keerukas.

Enke [7] jõudis üsna sarnasele järeldusele kasutades teistsugust lähenemist. Mudeli väljatöötamisel tegi ta neli eeldust. Esiteks eeldati, et kogu lisalaeng on kontsentreerunud tilga pinnale ning tilga sisemus on elektriliselt neutraalne. Teiseks eeldati, et tilga sisemus ja pind on kaks erinevat faasi, ionide jaotuvad nende faaside vahel ja see jaotumine on nii kiire protsess, et igal ajahetkel võime eeldada, et süsteem on tasakaalus. Kolmandaks eeldati, et iooni kontsentratsioon pinnal on madal võrreldes tilga sisemusega ning neljandaks, et iooni signaal massispektromeetris on proportsionaalne iooni kontsentratsiooniga tilga pinnal. Eelneva tulemusel saadi järgmine võrrandi:

$$R_A = Pf \frac{K_A C_A}{K_A C_A + K_E C_E} [Q], \quad (3)$$

kus R_A on iooni A^+ signaal massispektris, K_A ja K_E on iooni A^+ ja kõikide teiste lahuses olevate elektrolüütide jaotuskoefitsiendid, C_A ja C_E on vastavad analüütilised kontsentratsioonid, $[Q]$ on lisalaengu tasakaaluline kontsentratsioon ning P ja f omavad sama tähendust, mis võrrandis 2.

Mõlemad võrrandid näitavad, et kui elektrolüüte on palju rohkem kui analüüte, on kontsentratsiooni ja signaali vahel lineaarne sõltuvus.

Parameetreid P , f , K_A ja K_E , on eksperimentaalselt keeruline määrata ning samuti sõltuvad suurused P ja f kasutatavast instrumendist ja meetodist. Seetõttu pole absoluutsete ionisatsiooniefektiivsuste määramine osutunud võimalikuks. Sel põhjusel on TÜ analüütilise keemia õppetooli poolt varem välja töötatud [37] meetod suhteliste ionisatsiooniefektiivsuste (*RIE*) leidmiseks ühelaenguliste analüütide jaoks lähtudes Enke mudelist:

$$RIE(B_1, B_2) = \frac{R_1 C_2}{R_2 C_1}, \quad (4)$$

kus R_1 ja R_2 on ainetele B_1 ja B_2 vastavad signaalid massispektris ja C_1 ja C_2 on ainete B_1 ja B_2 analüütilised kontsentratsioonid. Suhtelist ionisatsiooniefektiivsust on erinevalt absoluutsest ionisatsiooniefektiivsusest lihtne mõõta ning samuti on võimalik teadaolevatest suhtelistest ionisatsiooniefektiivsustest määrata absoluutsed ionisatsiooniefektiivsused, kui vähemalt ühe aine absoluutne ionisatsiooniefektiivsus on teada.

Varasematest uuringutest on teada, et erinevatel analüütidel on erinev ionisatsiooniefektiivsus nii positiivses [38] kui ka negatiivses režiimis [46].

Ionisatsiooniefektiivsust on üsna hoolikalt uuritud nii Tartu Ülikoolis kui ka mujal. Peamiste ionisatsiooniefektiivsust mõjutavate faktoritena tuuakse välja molekuli mittepolaarne pindala, molekuli aluseliskus/happeliskus nii vedelikus kui ka gaasifaasis. Keskkonnamõjudest rõhutatakse orgaanilise solvendi sisalduse, orgaanilise solvendi mõju (MeCN vs MeOH), happeliste/aluseliste jm lisandite jne olulisust. Üldiselt sobib aluseliste analüütide uurimiseks happeline keskkond ning happeliste analüütide jaoks aluseline keskkond [1], kuigi esineb ka vastupidist efekti (nn valet pidi ionisatsioon, ingl *wrong-way ionization* [39]).

Järgnevalt kirjeldatud uuringutes on kasutatud erinevatesse aineklassidesse kuuluvaid ühendeid ning erinevat aparatuuri ja lahusteid. Seega on keeruline teha väga üldiseid järeldusi, mis rakenduksid kõikides situatsioonides. Tang ja Kebarle [6] uurisid metallide katioone ja protoneeritud alkaloide ning tõid välja, et analüüdi ning solvendi pindaktiivsus ning iooni aurustumise kiiruskonstant mõjutavad vastava analüüdi signaali. Cech *et al.* [40] uurisid tripeptiidide signaali sõltuvust mittepolaarsusest (mittepolaarsest pindalast) ning tasakaalulise jaotusmudeli efektiivsust [7]. Nende teooria väitis, et mittepolaarsemate kõrvalrühmadega peptiidid paiknevad tilga pinnal, kus nende kõrvalrühmad saavad desolvateeruda samal ajal kui polaarsemad peptiidid paiknevad tilga sisemuses, kus nad on vastasioonide poolt neutraliseeritud. Pakuti välja, et hea tundlikkusega (tuleneb kõrgest ionisatsiooniefektiivsusest) ained sisaldavad nii polaarseid kui ka mittepolaarseid regioone. Polaarsed rühmad on vajalikud, et oleks võimalik iooni moodustumine (happeline või aluseline tsenter) ning mittepolaarsed osad aitavad kaasa sellele, et analüüt liiguks tilga pinnale. Sama järeldust toetavad ka Leito *et al.* [37] kümne estri ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmisel saadud tulemused, mille kohaselt oli ionisatsiooniefektiivsus seda parem, mida suurem oli estri hüdrofoobsus.

Ehrmann *et al.* [41] leidsid, et parim ESI/MS signaali ennustaja on analüüdi aluseliskus lahuses (pK_b). Samuti uuriti gaasifaasilise aluselise mõju ning jõuti järeldusele, et kõrgete gaasifaasiliste aluselisustega ained andsid kõrget signaali vaid siis, kui neil olid ka madalad pK_b

väärtused. Eelneva põhjal järeldasid nad, et uuritud ainete jaoks on gaasifaasilisel prootoni ülekandel väiksem roll, kui kirjanduses varem välja pakutud [42]. Samuti leiti, et ei ole selget korrelatsiooni $\log P_{ow}$ (oktanool-vesi jaotuskoefitsent) ja leitud ESI signaali vahel ning järeldati, et nende uuritud analüütide jaoks on olulisem aluselisisus. Oss *et al.* [38] (Leito *et al.* [37] töö edasiarendus) uurisid erinevatesse aineklassidesse kuuluvate ainete ionisatsiooniefektiivsusi ning nende korrelatsiooni erinevate arvutatud füüsikalise-keemiliste omadustega (gaasifaasiline aluselisisus, molekuli pindala ja ruumala, polaarne pindala, dipoolmoment, $\log P$ (lahusti-heksaan), pK_a). Ionisatsiooniefektiivsuse mudeli väljatöötamisel ilmnis, et statistiliselt olulist seost ionisatsiooniefektiivsusega omavad analüüdi pK_a ja katiooni molekulaarruumala. Chalcraft *et al.* [18] näitasid hulga polaarsete metaboliitide (seal hulgas 17 aminohapet) uurimisel kapillaarelektroforees-ESI/MS-iga, et ESI signaali on võimalik ennustada molekulaarruumala, oktanool-vesi jaotuskoefitsiendi ning iooni absoluutse mobiilsuse abil. Nguyen *et al.* [43] leidsid positiivse korrelatsiooni ESI signaali ja iooni parandatud massi (molekulaarmassi ning vesinike ja süsinike arvu suhte korrutis) vahel.

Põhjalikult on uuritud ka negatiivset ionisatsioonirežiimi, kus esialgu uuriti enamasti vaid väikeseid ja struktuurilt sarnaseid, tihti samasse aineklassi kuuluvaid ühendeid. Henriksen *et al.* [44] uurisid happeliste analüütide signaali puhtas atsetonitriilis, puhtas metanoolis ja kummagi segus veega (50/50). Uuringutest selgus, et ühendid ioniseerusid paremini metanoolis kui atsetonitriilis ning et analüüdi polaarsust hindav $\log P_{ow}$ oli paremas korrelatsioonis ioonide signaaliga kui happelisust näitav pK_a . Toodi välja, et $\log P_{ow}$ ei ole parimas seoses pindaktiivsusega, kuna ainult täielikult desolvateerunud analüüt saab üle minna oktanooli, samas kui tilga pinnale liikumiseks peab see olema ainult osaliselt desolvateerunud. Huffmann *et al.* [45] uurisid 49 erinevatest aineklassidest ja erinevate funktsionaalrühmadega ühendit. Leiti, et kõrgema ionisatsiooniefektiivsusega on happelisemad ja hüdrofoobsemad ühendid. Ta leidis, et 32 analüüdi jaoks 48st oli signaal parem, kui solvendina kasutati metanooli. Krueve *et al.* [46] leidsid, et ionisatsiooniefektiivsust negatiivse režiimis ennustab kõige paremini analüüdi ioniseerumise määr (α) ning WAPS parameeter (iseloomustab laengu delokaliseeritust anioonis).

Kuigi mõlemas ESI ionisatsioonirežiimis on teostatud mitmeid uuringuid ja on leitud erinevaid parameetreid, millest ESI signaal sõltub, on need uuringud enamasti teostatud piiratud analüütide hulgaga (millel on tihti suur struktuuriline sarnasus) ning ei võimalda seetõttu teha suuri üldistusi. Samuti on üsna vähe uuritud mitmelaenguliste ionide tekke mehhanismi ning selle mõjureid ning MS signaalide suhtelise intensiivsuse sõltuvust erinevatest parameetritest, kuigi on tihti viidatud selle töö vajalikkusele [40]. Varem on TÜ analüütilise keemia töögruppis

avaldatud väikesemate orgaaniliste keskmise ja kõrge hüdrofoobsusega ühendite ionisatsiooniefektiivsuste ulatuslik skaala nii positiivses [37, 38] kui ka negatiivses režiimis [46]. Samuti on mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste skaala naatrium-adektide [47] jaoks. Ka teistes töögruppides on ionisatsiooniefektiivsuse või üldiselt analüüdi signaali uurimisel tegeletud pigem väiksemate ühelaenguliste ionidega [7, 38, 41, 44, 48].

1.4 Ionisatsiooniefektiivsuse rakendused

Ionisatsiooniefektiivsusi on kasulik rakendada valdkondades, kus standardained on kallid või neid ei ole võimalik valmistada. Selline vajadus tekib näiteks täiesti uute ainete uurimisel, mille jaoks standardaineid veel ei ole [49]. Üha enam kasutatakse massispektromeetria ka mittekovalentsete komplekside tasakaalude uurimiseks (valkude interaktsioonid inhibiitoritega, kofaktorite, metalli ionide, süsivesikute, teiste valkude ja peptiididega, ensüüm-substraat seondumised, nukleiinhapete kompleksid) [50-52]. Kuna väga palju ei ole uuritud selliste suurte analüütide ionisatsiooniefektiivsusi mõjutavaid tegureid, siis tehakse tihti lihtsustus, et signaal ja kontsentratsioon lahuses on omavahel võrdelised. Samas on paljudest uuringutest teada, et analüüdi signaal lahuses oleneb mitmetest erinevatest mõjuritest ning eeltoodud lihtsustus ei pruugi kehtida [18, 38]. Just sellises rakenduses oleks väga mugav kasutada füüsikalisi-keemilisi parameetreid aine ionisatsiooniefektiivsuse ennustamiseks.

2 Eksperimentaalne osa

2.1 Aparatuur

Kõik ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmised teostati Agilent XCTioonlõks massispektromeetril. Ionisatsiooniallikas kasutati eluendi voolukiirusele vastavaid soovituslikke seadeid: pihustusgaasi rõhk 15 psi, kuivatusgaasi voolukiirus 7 l/min, kuivatusgaasi temperatuur 300 °C. Kapillaaripinge MS ja pihusti vahel ±3500 V (sõltuvalt ESI režiimist). Kõik ülejäänud iontranspordi parameetrid määrati sihtmassi (TM) parameetri kaudu, mis on varasemalt optimeeritud [53]. Negatiivses režiimis aminohapete ning oligopeptiidide mõõtmiseks saadi optimaalne sihtmass analüüdile vastava m/z suhte ümardamisel lähima viiekümneni. Mitmelaengulisuse uuringutel viidi läbi katseid erinevate sihtmassist juures ning leiti optimaalsemad (vt lisas tabel L5). Positiivses režiimis võeti sihtmassist 15 kui m/z oli väiksem kui 180. Vastasel juhul kasutatakse valemit 5 [53]:

$$TM = 497 \cdot \ln(m/z) - 2317 \quad (5)$$

ning saadud väärtus ümardatakse lähima viiekümneni (50, 100, 150 jne).

Ioonlõksu parameetrid olid: *Smart Target* (parameeter, mis iseloomustabioonlõksu poolt kogutavate laengute arvu ühes tsüklis) 100 000, maksimaalne kogumise aeg 300 ms. Iga spekter skaneeriti m/z väärtuste vahemikus 40 kuni 2200.

Iga analüüdi jaoks kasutati optimaalseimat sihtmassi nii ühelaengulistele kui ka kahelaenguliseleioonidele. Olenevalt ühendist olid massispektris olemas, kas ainult $[M-H]^-$ või nii $[M-H]^-$ kui ka $[M-2H]^{2-}$ ioonid negatiivses režiimis ning $[M+H]^+$ ioonid positiivses režiimis. Käsitletudioonidel ei esinenud fragmente ning aduktide moodustumist käesolevas töös ei uuritud.

Ionisatsiooniefektiivsuse voolukiirusest sõltuvuse uuringu mõõtmised teostati Agilent 3Q massispektromeetril, kus kasutati tehase seadeid: kuivatusgaasi temperatuur 200 °C, voolukiirus 14 l/min, pihustusgaasi rõhk 15 psi, kapillaaripinge 4000 V. Muudeti vaid eluendi voolukiirusi: 0,05 ml/min; 0,2 ml/min ja 0,8 ml/min.

2.1.1 Suhteline meetod

Suhtelisel meetodil teostati happeliste indikaatorühendite ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmised. Kahe analüüdi lahuseid infuseeriti ESI allikasse erinevatel voolukiirustel suhtel. Summaarne voolukiirus hoiti seejuures konstantsena. Tulemusena saadi ühe aine ionisatsiooniefektiivsus teise suhtes (valem 4).

Kahe aine omavaheline ionisatsiooniefektiivsus saadi kõigil voolukiiruste suhetel saadud tulemuste keskmistamisel. Suhtelistest ionisatsiooniefektiivsustest saadakse absoluutsed minimeerides omistatud $\log IE$ väärtuste ja mõõdetud $\log RIE$ vahede ruutude summa (SS):

$$SS = \sum_{k=1}^{n_m} \left\{ \log RIE_k(A_i, A_j) - [\log IE(A_i) - \log IE(A_j)] \right\}^2, \quad (6)$$

kus n_m on suhteliste ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmiste arv ja $\log RIE_k(A_i, A_j)$ on ainepaari A_i ja A_j mõõtmisel saadud suhteline ionisatsiooniefektiivsus ning $\log IE(A_i)$ ja $\log IE(A_j)$ on vastavalt ühenditele A_i ja A_j omistatud ionisatsiooniefektiivsuste.

Skaala kooskõlalisust väljendatakse kui kooskõlalisuse standardhälvet:

$$s = \sqrt{\frac{SS}{n_m - n_c}}, \quad (7)$$

kus n_m on summaarne mõõtmiste arv ja n_c on omistatud $\log IE$ väärtuste arv. Suhtelisel meetodil mõõdetud ainete kontsentratsioonid olid väärtused olid vahemikus 1 ja 10 μM .

2.1.2 Absoluutne meetod

Absoluutsel ehk süstimismeetodil sisestatakse konstantsesse vedelikuvoogu korraga ühte ainet. Iga uuritava aine jaoks mõõdetakse signaalid vähemalt kuuel kontsentratsioonil ning ionisatsiooniefektiivsused arvutatakse saadud kalibreerimisgraafikute tõusude suhetest. $\log IE$ väärtused saadakse uuritava aine ja nn ankurühendile – ühend, mille suhtes kõik ülejäänud tulemused väljendatakse – vastavate tõusude suhte logaritmilisel:

$$\log IE(A_i) = \log \frac{tõus(A_i)}{tõus(A_j)}, \quad (8)$$

kus $tõus(A_i)$ on aine A_i kalibreerimisgraafiku tõus ning $tõus(A_j)$ aine A_j (ankurühendi) kalibreerimisgraafiku tõus. Absoluutsel meetodil mõõdetud ainete kontsentratsioonid olid vahemikus 0,5 μM kuni 0,6 mM

2.1.3 Ankurdamine

Positiivses režiimis mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused ankurdati kasutades kõiki varasemas töös suhtelisel meetodil [38] ning selles töös absoluutsel meetodil mõõdetud ühiseid aineid. Selleks minimeeriti mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste vahede ruutude summa (SS_2):

$$SS_2 = \sum_{i=1}^n [\log IE_1(B_i) - \log IE_2(B_i)]^2, \quad (9)$$

kus $\log IE_1(B_i)$ on aine B_i ionisatsiooniefektiivsus absoluutsel meetodil ning $\log IE_2(B_i)$ on aine B_i ionisatsiooniefektiivsuse väärtus, mis on saadud suhtelisel meetodil [38].

Kõik negatiivses režiimis mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste väärtused ankurdati bensoehappe külge. Samuti võeti arvesse, et bensoehappel on erinev ionisatsiooniefektiivsus happelises ja aluselises lahuses. Bensoehappe ionisatsiooniefektiivsused mõõdeti mõlemas lahustis. Saadud väärtuste erinevust kasutati bensoehappe ionisatsiooniefektiivsuse väärtuse määramiseks happelises lahustis:

$$\log IE(S_h) = \log \left(IE(S_a) \cdot \frac{\text{signaal}(S_h) \cdot C(S_a)}{\text{signaal}(S_a) \cdot C(S_h)} \right), \quad (10)$$

kus S_a on aluseline keskkond ning S_h happeline keskkond ning *signaal* on bensoehappe signaal vastavas keskkonnas ning *C* on bensoehappe sisaldus vastavas keskkonnas.

Seega on negatiivses režiimis kahes solvendis mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste väärtused omavahel võrreldavad. Positiivses režiimis viidi mõõtmised läbi ühes solvendis.

2.2 Kasutatud ained

Ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmiseks kasutati happelist ja aluselist keskkonda. Happeline lahusti oli 80/20 atsetonitriil/0,1% sipelghappe lahuse segu (v/v) ja aluseline 80/20 atsetonitriil/0,1% ammoniaagilahuse segu (v/v). Lahustid valmistati kasutades atsetonitriilist (HPLC puhtusega, J. T. Baker, Deventer, Holland), ülipuhast vett (eritakistusega 18,2 MΩ·cm, TOC 1-2 ppb, mis valmistati kasutades Millipore Milli-Q Advantage A10 veepuhastusseadet), sipelghapet (≥98%, Sigma, Steinheim, Saksamaa) ja ammoniaagilahust (25% lahus, Lach:Ner, Tšehhi).

Mitmelaenguliste ionide moodustumist uuriti järgnevatel ainetel: 3-nitroftaalhape (Reakhim, Venemaa), adipiinhape (Reakhim, Venemaa), sinine eosiin (Reakhim, Venemaa), batokuproiindisulfoonhape (Chemapol, Tšehhi), broomfenoolsinine (Reakhim, Venemaa), broomkresoolpurpur (Schering AG Berlin, Saksamaa), broomkresoolroheline (Sigma-Aldrich, Ameerika Ühendriigid), broomtümoolsinine (Reakhim, Venemaa), fenool-2,4-disulfoonhape (Reakhim, Venemaa), fenoolftaleiin (Reakhim, Venemaa), ftaalhape (Rohuteaduste instituut, Eesti), fumaarhape (Rohuteaduste instituut, Eesti), glutaarhape (Aldrich, Ameerika Ühendriigid), isoftaalhape (Rohuteaduste instituut, Eesti), itakoonhape (Rohuteaduste instituut, Eesti), kollane eosiin (Sigma-Aldrich, Ameerika Ühendriigid), kresoolpunane (Reakhim, Venemaa), maleiinhape (E. Merck Darmstadt, Saksamaa), merivaikhape (Rohuteaduste instituut), mesakoonhape (Rohuteaduste instituut, Eesti), *m*-kresoolpurpur (Reakhim, Venemaa), pimeelhape (Aldrich, Ameerika Ühendriigid), SPADNS (Chemapol, Tšehhi),

suberiinhape (Aldrich, Ameerika Ühendriigid), sulfosalitsüülhape (Lach-ner, Tšehhi), tereftaalhape (Rohuteaduste instituut, Eesti), tiroon (Reakhim, Venemaa), tümoolsinine (E. Merck Darmstadt, Saksamaa), tümoolftaleiin (Reakhim, Venemaa). Kasutatud ainete struktuurid on toodud lisas (tabelid L1 ja L2). Ankuraineks kasutati bensoehapet (Reakhim, Venemaa).

Järgnevad mõõdetud aminohapped pärinesid L-aminohapete komplektist (Sigma, Saksamaa): α -alaniin, glütsiin, lüsiin, fenüülalaniin, proliin, asparagiinhape, treoniin, asparagiin, metioniin, glutamiinhape, glutamiin, türosiin, leutsiin, trüptofaan, tsüsteiin, histidiin, valiin, isoleutsiin, arginiin, seriin. Lisaks mõõdeti ionisatsiooniefektiivsused β -alaniinile (Fluka, Šveits) ja 7 oligopeptiidile: Ac-Gly-Lys-OMe (Bachem, Saksamaa), Gly- β -Ala- β -Ala (Bachem, Saksamaa), Gly-Asp-Ala (Bachem, Saksamaa), Phe-Phe-Phe-Phe (Bachem, Saksamaa), Gly-Pro-Gly-Gly (Bachem, Saksamaa), Gly-Gly-Gly-NH₂ (sünteesis A. Laaniste), Gly-Gly-Gly-Phe-Phe (sünteesis A. Laaniste). Struktuurid on toodud lisas (tabel L3).

Positiivses režiimis mõõdeti absoluutsel meetodil võrdluseks järgnevate varem mõõdetud [38] (tabel L6) ainete ionisatsiooniefektiivsused: difenüülguanidiin, püridiin, tetraetüülammooniumperkloraat, tetrapropüülammooniumkloriid, tetrabutüülammooniumperkloraat, tetraheksüülammooniumbensoaat, pürrolidiin, 3-nitroaniliin, trietüülamiin, 1-etüül-3-metüülimidiasooliumtrifluorometüülsulfonaat, *N,N*-dimetüülaniliin, DBU (1,8-diasabitsüklo[5.4.0]undek-7-een), 1-naftüülamiin, difenüülamiin, akriidiin, 1-heksüül-3-metüülimidiasoolium-bis(trifluorosulfonüül)imiid, tripropüülamiin, tributüülamiin, fenüülbensoaat, dietüülamiin, bensamiid, dimetüülglutaraat, 2-metüülpüridiin, aniliin, piperidiin, bensofenoon, sulfanüülamiid, 2,6-dimetüülpüridiin, bensüülamiin, fenüültetrametüülguanidiin, tetrametüülguanidiin, tetrametüülammooniumkloriid (kõigil päritolu sama mis [38]). Lisaks mõõdeti reserpiini (Sigma, Hiina) ja verapamiili (Sigma, Ameerika Ühendriigid) ionisatsiooniefektiivsused (struktuurid tabelis L4).

2.3 Arvutused

Statistiliste mudelite jaoks vajalike parameetrite – veefaasi pK_a , $\log P_{ow}$, laengu delokalisatsiooni parameeter *WAPS*, Klanti deskriptorid – arvutamiseks kasutati COSMO-RS meetodit.

COSMO-RS meetod [54] eeldab kaheetapilist lähenemist, milles esimeses teostati geomeetria optimeerimine DFT BP [55, 56] TZVP tasemel RI [57] lähendusega rakendades COSMO kontiinumi solvatatsiooni mudelit ($\epsilon = \infty$) [54]. Arvutused teostati kasutades programmipaketti Turbomole, versioon 6.4 [58]. Enamuse ainete jaoks kasutati mitut

konformeeri, mis vastasid erinevatele lokaalse energia miinimumidele. Kasutati Turbomole'i vaikimisi määratud konvergeerumise kriteeriumit 10^{-6} Hartree, geomeetria konvergeerumise maksimaalne gradient $|dE/dxyz|$ 10^{-3} Hartree/Bohr. Selle esimese arvutusetapi tulemusena saadakse: iga konformeeri jaoks konformeeri optimeeritud geomeetria; detailsed andmed molekulaarse augu kohta, polarisatsiooni laengutihedused, mis on kaardistatud augu pinnale; virtuaalsesse juhti ($\epsilon = \infty$) sukeldatud molekuli kogu elektroonneenergia ja molekulaarse pinna pindala ja ruumala.

Teises etapis teostati statistilise termodünaamika arvutus kõikide ühendite jaoks programmis COSMO $therm$, versioon C3.0, 13.01 [59]. COSMO-RS arvutus võtab arvesse interaktsioone analüüdi ja solvendi/keskkonna molekulide vahel, samuti interaktsioone analüüdi molekulide vahel [54]. Sisendina võetakse arvesse ka solvendi koostis sellisena, nagu see oli eksperimendis (kaasa arvatud vee kontsentratsioon solvendis). Uuritud analüütide jaoks kasutati null-kontsentratsioone (lõpmata lahja lahus). Nii võetakse arvesse interaktsioone uuritud analüütide ja solvendi vahel, aga mitte analüüdi molekulide endi vahel. Selliselt simuleeritakse eksperimendi tingimusi, kus kasutakse samuti väga lahjasid lahuseid. Siin võetakse arvesse kõikide interakteeruvate molekulide konformeere vastavalt nende suhtelisele stabiilsusele etteantud keskkonnas.

COSMO-RS programmiga leiti pK_{a1} ja pK_{a2} vees, mis kirjeldavad analüüdi happelisi omadusi, $\log P_{ow}$, mis iseloomustab analüüdi hüdrofoobsust, $WAPS$, mis näitab analüüdi laengu delokalisatsiooni anioonis (mida väiksem number, seda delokaliseeritum on laeng) ning nn Klanti parameetrid, mis iseloomustavad solvateeritud molekuli pindala, polaarsust ja polariseeritavust (σ_2 ja σ_3) ning vesiniksideme aktseptoorset ja doonorset võimet. Arvutatud parameetrite väärtused on toodud tabelis 1 (pK_{a1} , pK_{a2} , α_2 , $\log P_{ow}$, $WAPS$) ning lisas (tabelid L7.1 ja L7.2).

2.4 Mudelite koostamine

Kõik statistilised testid viidi läbi 95%-sel usaldusnivool. Lineaarne diskriminantanalüüs viidi läbi programmiga R paketi Mass abil. Et selgitada, miks osad ühendid annavad mitmelaengulisi ioone ESI allikas, aga teised ühendid ei anna, on vajalik teada uuritud ühendite füüsikalisi-keemilisi omadusi, aga samuti ESI pihustuses kasutatud keskkonna, lahusti, omadusi. Teame kirjandusest, et osa analüüdi ionisatsioonini viivaid protsesse toimub lahuses ning osa gaasifaasis. Kuna pihuses toimuvat lahustikoostise muutust on keeruline arvesse võtta, siis üldjuhul tehakse lihtustus ja kasutatakse analüüdi omadusi veefaasis. Ka käesolevas töös kasutati sarnast lähendust.

Ioniseerumise määra arvutamiseks positiivses ESI režiimis kasutati valemit 11.

$$\alpha = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}} \quad (11)$$

kus K_a on analüüdi konjugeeritud happetele vastav dissotsiatsioonikonstant ning $[H^+]$ vesinikioonide kontsentratsioon lahuses.

Negatiivses režiimis toimuvate protsesside iseloomustamiseks kasutati valemite 12 ja 13 alusel arvutatud ioniseerumismäärasid. Valemities 12 ja 13 on K_{a1} analüüdi dissotsiatsioonikonstant esimeses astmes ning K_{a2} on analüüdi dissotsiatsioonikonstant teises astmes.

$$\alpha_1 = \frac{\frac{K_{a1}}{[H^+]}}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2}} \quad (12)$$

$$\alpha_2 = \frac{\frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]}}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2}} \quad (13)$$

3 Tulemused

3.1 Mitmelaengulisi ioone andvate ühendite ionisatsiooniefektiivsuste uurimine

Ionisatsiooniefektiivsuste skaala koostati aluselises ja happelises solvendis negatiivses režiimis kahelaengulisi ioone moodustavate ainete jaoks. Seejuures koostati eraldi skaalad ühe- ja kahelaenguliste ionide signaalide alusel. Kokku analüüsiti 30 erinevat ühendit, millest kahelaengulisele ioonile vastavat kvantiseeritava intensiivsusega signaali andis 9 ainet. Ühendid, mis andsid kahelaengulisi ioone on toodud tabelis 1 koos vastavate mõõdetud $\log IE$ väärtustega (va fenool-2,4-disulfoonhape, mille jaoks ei olnud võimalik ionisatsiooniefektiivsuseid mõõta tingituna lähedase m/z väärtusega segajast spektris). Kõik ionisatsiooniefektiivsused mõõdeti suhtelisel meetodil. Ankuraineks oli bensoehape, mille ionisatsiooniefektiivsus aluselises solvendis võeti nulliks [46].

Skaalade jaoks teostati aluselises keskkonnas kokku 23 ja happelises 17 suhteliste ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmist. Iga mõõtmine viidi läbi viiel erineval analüütide kontsentratsioonide suhtel ning leiti $\log RIE$ väärtused vastavalt valemile 4. Aluselises solvendis on ionisatsiooniefektiivsuste skaala ulatus kahelaenguliste ionide jaoks ligikaudu 3 logaritmilist ühikut ja ühelaenguliste jaoks ligikaudu 4 logaritmilist ühikut. Happelises keskkonnas on skaala ulatused vastavalt 4 ja 3 logaritmilist ühikut. Ühelaenguliste ionidele vastavad ionisatsiooniefektiivsused kahes keskkonnas t -testi alusel statistiliselt ei erinenud. Kahelaengulisele ionidele vastavate ionisatsiooniefektiivsuste korral erinesid tulemused statistiliselt, välja arvatud SPADNSi ja tirooni jaoks. Mõõdetud $\log IE$ väärtused on toodud tabelis 1 ning neid omavahel võrdlev graafik lisas (joonis L1).

COSMO-RS programmiga arvatud parameetreid korreleeriti üksikhaaval mõõdetud $\log IE$ väärtustega. Korrelatsioon oli halb ($R^2 < 0,55$) Klamti parameetritega (polaarsust ja polariseeritavust iseloomustavad $\text{sig}2$ ja $\text{sig}3$ ning vesiniksideme donoorsust ja aktseptoorusust iseloomustavad $\text{Hacc}3$ ja $\text{Hdon}3$). Samuti ei olnud võimalik korreleerida α_2 aluselises keskkonnas leitud ionisatsiooniefektiivsustega, kuna kõik ühendid on selles keskkonnas täielikult deprotoneerunud ning ioniseerumise määr on sellisel juhul kõikide ühendite jaoks võrdne ühega. Ülejäänud parameetritega saadi kas ühe- ja/või kahelaengulisele ioonile vastava $\log IE$ väärtusega hea korrelatsioon.

Parimas korrelatsioonis oli ühelaengulise iooni ionisatsiooniefektiivsusega aluselises keskkonnas ühelaengulise iooni $\log P_{\text{ow}}$ ($R^2 = 0,84$ ning positiivne). Samuti andis hea korrelatsiooni ühelaengulisele ioonile vastava $\log IE$ väärtusega ühendi $\text{p}K_{\text{a}1}$, *WAPS* ja neutraali vesiniksidemete donoorne võime. Nendest on omavahel tugevas korrelatsioonis $\text{p}K_{\text{a}1}$ ja

neutraali vesiniksidemete donoorsus. Kahelaenguliste ionide jaoks oli hea korrelatsioon ionisatsiooniefektiivsusega *WAPS* parameetril, molekulaarruumalal ja neutraali vesiniksidemete donoorsusel.

Happelises keskkonnas olid korrelatsioonid samaväärsed, vaid kahelaengulise iooni ionisatsiooniefektiivsuse ja vastava *WAPS* parameetri vahel ei täheldatud korrelatsiooni. Huvitava tõsiasi tähtsana täheldati head korrelatsiooni happelises keskkonnas ka ühelaengulisele ioonile vastava ionisatsiooniefektiivsuse ja kahelaengulisele ioonile vastava ioniseerumise määra vahel. Samas korrelatsioon ühelaengulise iooni osakaalu lahuses kirjeldava ioniseerumise määraga oli kehv.

Teostati lineaarne diskriminantanalüüs (LDA), et leida omadused, mille abil saaks ennustada, kas analüüt annab kahelaengulisi ioone. LDA mudel töötati välja kasutades treeningandmestikku, mis koosnes 18 juhuslikult valitud ühendist. Nende hulgas oli 5 ühendit, mis eksperimentaalselt andsid kahelaengulisi ioone ja 13 ühendit, mis kahelaengulisi ioone ei andnud. Kasutati erinevaid kombinatsioone *COSMOtherm*-i abil arvatud parameetritest ($\log P_{ow}$ neutraali, aniooni, dianiooni jaoks, *WAPS*, pindala, pK_a väärtused). Valiti selline kombinatsioon, mis andis kõrgeima ennustustäpsuse. Selleks oli mudel, mis põhineb pK_{a2} ja neutraali $\log P_{ow}$ väärtustel (vt valem 14):

$$F = -0,48 \cdot pK_{a2}(A) + 0,60 \cdot \log P_{ow}(A) \quad (14)$$

kui $F > 0$ siis analüüt $A \in$ annab kahelaengulisi ioone,

kui $F < 0$ siis analüüt $A \in$ ei anna kahelaengulisi ioone.

Nende parameetritega saadi treeningandmestiku jaoks ennustustäpsus 94%. Vaid pisut halvema ennustustäpsusega (89%) oli mudel, mis sisaldas $\log P_{ow}$ asemel molekuli pindala või *WAPS*-i või aniooni või dianiooni $\log P_{ow}$ väärtust. Sinise eosiooni jaoks ennustas mudel kahelaenguliste ionide andmise võimet valesti. Mudel ennustas, et kahelaengulineioon moodustub, kuid spektris vastavat iooni ei täheldatud. Välja töötatud LDA mudelit rakendati testandmestikule, mis sisaldas 11 ühendit, neist 4 andsid kahelaengulisi ioone. Testandmestiku jaoks saadi ennustustäpsus 82%. Mudel ennustas valesti ionisatsioonikäitumise batokuproiindisulfoonhappele ja broomkresoolpurpurile.

Head kvantitatiivset ühelaengulistele ioonidele vastavat ionisatsiooniefektiivsuse ennustamise mudelit (nii aluselises kui happelises keskkonnas) oli võimalik tuletada, kasutades ühelaengulise iooni *WAPS* väärtusi. Saadud mudeli ennustustäpsust kirjeldab ruutkeskmise viga (s) 0,71 ja korrelatsioonikoefitsiendi ruut (R^2) 0,64.

$$\log IE = (-1,14 \pm 0,23) \cdot WAPS + (3,36 \pm 0,51) \quad (15)$$

Tabel 1. Negatiivses režiimis uuritud ained. Ainetele, mis kahelaengulisi ioone massispektris ei andnud, ionisatsiooniefektiivsusi ei mõõdetud (-). Toodud on aluselises (pH = 10,74) ja happelises keskkonnas (pH = 2,68) kahelaengulisi ioone andvate ainete ionisatsiooniefektiivsused ($\log IE_1$ – ühelaengulisele ioonile vastav ionisatsiooniefektiivsus; $\log IE_2$ – kahelaengulisele ioonile vastav ionisatsiooniefektiivsus), pK_a väärtused, ioniseerumise määrad (α_2), neutraali $\log P_{ow}$ väärtused ja WAPS parameetrid ühe- ja kahelaengulise analüüdi iooni jaoks. Ankuraineks on bensoehape aluselises keskkonnas.

			pH = 10,74			pH = 2,68			$\log P_{ow}$	WAPS·10 ⁵	
	pK_{a1}	pK_{a2}	α_2	$\log IE_2$	$\log IE_1$	α_2	$\log IE_2$	$\log IE_1$		anioon	di-anioon
Broomfenoolsinine	0,99	2,96	1,00	2,63	2,34	0,34	0,28	1,93	6,86	1,54	1,86
Batokuproiindisulfoonhape	-1,70	5,05	1,00	1,95	0,45	0,00	1,06	0,42	-0,06	2,02	1,92
Broomkresoolroheline	0,55	3,49	1,00	1,71	1,45	0,13	-0,15	2,01	6,63	1,62	1,83
Broomtümoolsinine	1,15	5,76	1,00	1,23	2,95	0,00	-0,25	2,16	7,47	1,44	1,70
Kollane eosiin	3,30	4,54	1,00	1,15	1,50	0,00	0,27	1,47	5,03	1,60	1,90
SPADNS	-2,32	-2,19	1,00	0,66	-0,20	1,00	0,16	-0,58	1,41	2,34	2,57
Sulfosalitsüülhape	-1,53	2,31	1,00	-0,38	0,22	0,70	-2,54	0,22	2,68	2,38	2,60
Tiroon	-2,66	-2,15	1,00	-0,62	-0,68	1,00	-0,29	-0,34	3,07	3,98	5,01
Broomkresoolpurpur	1,26	4,31	1,00	-	-	0,02	-	-	4,75	2,01	2,34
Sinine eosiin	2,80	3,14	1,00	-	-	0,13	-	-	4,17	1,58	1,90
Tümoolltaleiin	10,04	10,98	0,32	-	-	0,00	-	-	5,79	1,66	1,98
Tümooolsinine	-0,89	7,54	1,00	-	-	0,00	-	-	4,51	1,70	2,01
Kresoolpunane	1,08	6,31	1,00	-	-	0,00	-	-	4,10	2,19	2,59
<i>m</i> -kresoolpurpur	-1,29	6,71	1,00	-	-	0,00	-	-	1,85	2,34	2,89
Fenoolftaleiin	9,28	9,04	0,98	-	-	0,00	-	-	2,66	2,60	3,31
Fenool-2,4-disulfoonhape*	-2,99	-1,91	1,00	-	-	1,00	-	-	2,10	4,28	5,25
Tereftaalhape	2,26	3,44	1,00	-	-	0,11	-	-	1,01	5,23	6,96
Oktaandihape	4,91	4,88	1,00	-	-	0,00	-	-	1,12	5,24	6,05
Isoftaalhape	2,87	4,16	1,00	-	-	0,01	-	-	1,02	5,54	7,36
Heptaandihape	4,61	4,76	1,00	-	-	0,00	-	-	0,78	6,09	6,92
Ftaalhape	2,92	4,56	1,00	-	-	0,00	-	-	0,36	6,12	8,23
3-nitroftaalhape	2,11	3,60	1,00	-	-	0,09	-	-	2,19	6,25	5,11
Heksaandihape	4,98	4,98	1,00	-	-	0,00	-	-	0,18	7,04	8,10
(2 <i>E</i>)-2-metüülbut-2-eeendihape	3,31	5,65	1,00	-	-	0,00	-	-	0,88	7,74	9,73
2-metüleenbutaandihape	4,05	4,48	1,00	-	-	0,00	-	-	0,50	8,05	10,05
Pentaandihape	4,59	4,92	1,00	-	-	0,00	-	-	-0,35	8,22	9,65
(2 <i>E</i>)-but-2-eeendihape	3,41	4,00	1,00	-	-	0,01	-	-	0,55	8,66	11,30
Butaandihape	4,27	4,89	1,00	-	-	0,00	-	-	-0,33	9,60	11,64
(2 <i>Z</i>)-but-2-eeendihape	2,92	4,66	1,00	-	-	0,00	-	-	-0,26	9,64	12,69

*Andis kahelaengulisele ioonile vastavat signaali ESI/MS spektris, kuid $\log IE$ väärtust polnud võimalik mõõta tingituna lähedase m/z väärtusega segajast massispektris.

Ainukesena hälbis mudelist tiroon. Kui tirooni mudeli koostamisel mitte arvestada saadi ennustatud ja mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuse vahel hea korrelatsioon ($R^2 = 0,88$), ka kooskõlalatus on hea ($s = 0,39$).

$$\log IE = (-2,65 \pm 0,28) \cdot WAPS + (6,06 \pm 0,53) \quad (16)$$

Kahelaengulistele ioonidele analoogset mudelit välja töötada ei õnnestunud.

3.2 Aminohapete ja oligopeptiidide ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmine

Kokku mõõdeti 21 aminohappe ja 7 oligopeptiidi ionisatsiooniefektiivsused ESI positiivses režiimis ning 14 aminohappe ja 6 oligopeptiidi ionisatsiooniefektiivsused ESI negatiivses režiimis absoluutsel meetodil. Positiivses režiimis kasutati solvendina 80/20 MeCN/0,1% HCOOH lahust ning negatiivses 80/20 MeCN/0,1% NH₃ lahust.

Iga aine jaoks teostati vähemalt kolm kordusmõõtmist. Positiivses režiimis mõõdetud skaala ulatus on aminohapete jaoks umbes 2 logaritmilist ühikut ning kogutud standardhälve $s = 0,24$ ning peptiidide jaoks 3 logaritmilist ühikut ($s = 0,31$) ja negatiivses aminohapete jaoks 1 logaritmiline ühik ($s = 0,14$) ning peptiidide jaoks 2,5 logaritmilist ühikut ($s = 0,08$). Positiivne skaala on ankurdatud kõigi käesolevas töös ja varasemas uurimuses [38] mõõdetud ühiste ainete kaudu varasemalt mõõdetud skaala külge, kus skaala nullpunkt oli metüülbensoadi $\log IE$ väärtus. Ankurdamine teostati kasutades varasemas töös ning käesolevas töös mõõdetud väärtuste vahe minimeerimist vastavalt valemile 9.

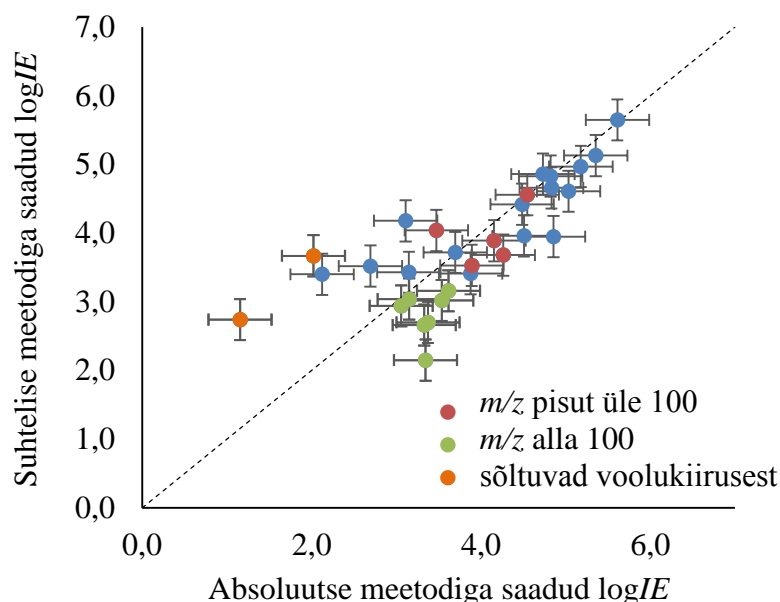
Negatiivses režiimis mõõdetud skaala on ankurdatud bensoehappe külge, mida on kasutatud ankruna ka varasemates töödes [46]. Seetõttu ei ole omavahel võrreldavad ionisatsiooniefektiivsuste numbrilised väärtused kahes eri režiimis, kuid võrreldav on konkreetsete ainete paiknemine skaalades.

Koos aminohapetega mõõdeti üle (tulemused tabelis L6) ka 34 varem mõõdetud ainet [38] (joonis 1) ning 2 uut ühendit (verapamiil ja reserpiin). Erinevus käesoleva töö raames mõõdetud tulemuste ja varem mõõdetute vahel on see, et varasemad tulemused on saadud kasutades infuseerimist ning suhtelist meetodit, praegused tulemused on saadud absoluutsel meetodil. Lisaks on praegu kasutatud iga aine jaoks optimaalset sihtmassi [53]. Varasemalt [38] kasutati kolme sihtmassi – kummagi analüüdi m/z väärtuseid ja sihtmassi 500 – ning saadud ionisatsiooniefektiivsused keskmistati. Samuti olid erinevad voolukiirused (praegu 2 ml/min, varasemas töös kasutati 0,0083 ml/min). Saadud tulemuste võrdlus on toodud joonisel 1.

Tabel 2. Positiivses ja negatiivses režiimis mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused. Positiivses režiimis on tulemused ankurdatud Oss *et al.* [38] tulemuste külge ning negatiivses režiimis Kruve *et al.* [46] tulemuste külge.

Analüüt		$\log IE_{\text{positiivne}}$	$\log IE_{\text{negatiivne}}$
Aminohapped			
Leutsiin	Leu	3,15	-0,12
Fenüülalaniin	Phe	3,07	0,69
Histidiin	His	3,04	-0,69
Arginiin	Arg	2,88	-
Isoleutsiin	Ile	2,75	-0,09
Metioniin	Met	2,70	-0,62
Valiin	Val	2,70	-0,16
Proliin	Pro	2,63	-
Trüptofaan	Trp	2,62	-0,05
Lüsiin	Lys	2,58	-
Türosiin	Tyr	2,51	0,30
Glutamiinhape	Glu	2,39	-0,31
Treoniin	Thr	2,35	-0,52
Glutamiin	Gln	2,31	-0,58
Asparagiinhape	Asp	2,21	-0,49
α -Alaniin	Ala	2,17	-
β -Alaniin	β -Ala	2,15	-
Seriin	Ser	2,14	-0,49
Asparagiin	Asn	2,12	-0,49
Glütsiin	Gly	1,30	-
Tsüsteiin	Cys	1,24	-
<i>Kogutud standardhälve</i>		<i>0,24</i>	<i>0,14</i>
Oligopeptiidid			
Phe-Phe-Phe-Phe		4,69	1,62
Gly-Gly-Gly-Phe-Phe-NH ₂		3,85	0,62
Ac-Gly-Lys-OMe		3,79	-
Gly-Pro-Gly-Gly		3,79	-0,07
Gly-Gly-Asp-Ala		2,78	0,03
Gly- β -Ala- β -Ala		2,57	-0,36
Gly-Gly-Gly-NH ₂		1,91	-0,90
<i>Kogutud standardhälve</i>		<i>0,59</i>	<i>0,08</i>

- madala tundlikkuse tõttu polnud võimalik mõõta

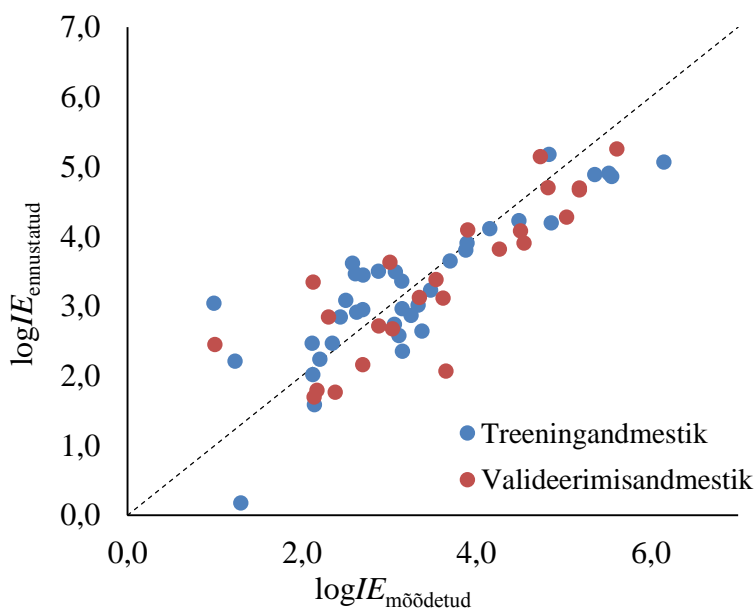


Joonis 1. Varem mõõdetud tulemuste (suhteline meetod [38]) ja käesolevas töös mõõdetud tulemuste (absoluutne meetod) korrelatsioon.

Ionisatsiooniefektiivsuse ennustamise mudeli koostamiseks kasutati varem mõõdetud [38] tulemusi, käesolevas töös üle mõõdetud tulemusi ning lisaks juurde mõõdetud aminohapete tulemusi. Treeningandmestiku moodustasid 37 juhuslikult valitud ühendit, millest 6 olid varem mõõdetud tulemused, 16 ülemõõdetud tulemused ning 15 aminohapete tulemused. Mudel koostati sarnaselt varem negatiivses ESI režiimis kasutatud ioniseerumise määra α ning laengu delokalisatsiooniparameetri WANS abil ning saadi valem 13.

$$\log IE = (1,38 \pm 0,38) \cdot \alpha + (-0,36 \pm 0,04) \cdot WANS + (3,96 \pm 0,38) \quad (13)$$

Kooskõllalisust iseloomustav ruutkeskmine ennustusviga $s = 0,67$ ning ennustatud ja mõõdetud väärtuste vaheline korrelatsioon treeningandmestiku puhul oli hea ($R^2 = 0,71$).



Joonis 2. Mudeli väljatötamine aminohapete ja varem mõõdetud ainete [38] jaoks.

Valideerimisandmestiku kuulusid treeningandmestikku mittekuulunud 24 ühendit, millest 6 olid varem mõõdetud ning 12 üle mõõdetud ühendit, lisaks 6 aminohapet. Valideerimisandmestiku mõõdetud ja ennustatud väärtuste korrelatsioon on hea, ruutkeskmine ennustusviga $s = 0,66$.

4 Arutelu

4.1 Mitmelaengulisi ioone andvate ühendite ionisatsiooniefektiivsuste uurimine

Saadud tulemuste põhjal näeme, et teatud funktsionaalsete rühmadega analüüdid annavad kahelaengulisi ioone. Kõik kahelaengulisi ioone moodustavad ühendid omasid vähemalt ühte sulfoonhapperühma, samuti enamikel juhtudel (va batokuproiindisulfoonhape) ühte või mitut elektronegatiivset rühma (hüdrosü või bromiid) ning olid aromaatsed. Dikarboksüülhapped ei andnud massispektris kahelaengulistele ionidele vastavat signaali.

LDA mudelist, mis töötati välja ennustamiseks, millised ühendid annavad kahelaengulisi ioone, näeme, et peamised omadused, mis mitmelaenguliste ionide andmist määravad, on happelisus ja hüdrofoobsus. Seejuures on oluline just teise happerühma dissotsiatsiooni kirjeldav pK_{a2} . Mitmed ühendid, mis ühendi pK_a ja lahuse pH järgi oleksid lahufaasis kahelaenguliste anioonidena massispektris kahelaengulisi ioone ei andnud. Vaid ühendid, mille pK_{a2} oli oluliselt madalam lahuse pH-st andsid kahelaengulisi ioone. Sarnase tulemuseni on peptiidide mitmelaengulisust uurides jõudnud ka Felitsyn *et al.* [27], näidates, et teise laengu tekkimine analüüsitava ühendi molekulile ESI protsessis on raskendatud tingituna laengute tõukumisest. Teiseks on oluline ühendi hüdrofoobsus. Dissotseerumine muudab happeid hüdrofiilsemaks, ning sunnib neid seetõttu jääma ESI tilkade sisemusse. Seetõttu suudavad ESI tilga pinnale, kust ionide liikumine gaasifaasi toimub, liikuda vaid väga hüdrofoobsetele ühenditele vastavad dianioonid. Seega suudavad kahelaengulisi ioone anda vaid väga happelisi rühmi sisaldavad ja väga hüdrofoobsed ühendid.

Siiski ennustas LDA mudel kolme aine (sinine eosiin, batokuproiindisulfoonhape ja broomkresoolpurpur) jaoks kahelaenguliste ionide andmise võimet valesti. Sinise eosiini puhul võib olla põhjuseks lisandite esinemine aines, mis võivad alla suruda analüüdi signaali ning teha massispektri müraseks. Seetõttu võis sinine eosiin küll kahelaengulisi ioone anda, kuid nende intensiivsus jäi allapoole meie määramispiiri. Sarnastel põhjustel võis ka broomkresoolpurpuri kahelaengulineioon selles töö massispektrist tuvastamata jääda. Samas on võimalik, et kahelaenguliste ionide moodustumist mõjutab veel mõni faktor, mis pole meie mudelis arvesse võetud.

Batokuproiindisulfoonhappe $\log P_{ow}$ on väga sarnane nendele ühenditele, mis ei andnud kahelaengulisi ioone ning ilmselt sellest ongi tingitud valesti ennustamine. Batokuproiindisulfoonhappe puhul kasutati füüsikalise-keemiliste parameetrite arvutamisel ka tsvitterioone, samas Teesch *et al.* on näidanud, et gaasifaasi jõudvate ionide struktuur ei sarnane lahusefaasis eksisteerivate tsvitterioonidele [60]. Seega võib oletada,

batokuproiindisulfoonhappe jaoks on tilga pinnale jaotumise kirjeldamiseks $\log P_{ow}$ ebasobiv parameeter.

Ionisatsiooniefektiivsuste skaala (tabel 1 ja joonis L1) ulatus ja ühendite järjekord skaalas sõltub keskkonna happelisusest. Happelises keskkonnas on skaala ulatus kahelaenguliste ionide jaoks umbes ühe ühiku võrra suurem kui aluselises keskkonnas. Seega on pH väga hea vahend mõjutamaks MSi tundlikkust kahelaengulisele ühendile vastava signaali detekteerimiseks.

Ühendite järjekord on erinev sõltuvalt lahusti pH-st. Üldiselt on kahelaenguliste ionidele vastavad ionisatsiooniefektiivsuste väärtused võrreldes nende väärtustega aluselises keskkonnas umbes ühe logaritmilise ühiku võrra madalamad kui happelises keskkonnas. Ühelaenguliste ionidele vastavad $\log IE$ väärtused on lahuse pH-st oluliselt vähem mõjutatud.

Aluselises keskkonnas moodustub lahusefaasis rohkem kahelaengulisi ioone, sest analüütide näol on tegemist happeliste ühenditega, mis aluselises keskkonnas loovutavad ühe prootoni asemel kaks (pK_{a2} on oluliselt väiksem kui aluselise keskkonna pH) ning seega on kahelaenguliste ionidele vastav signaal suurem ning ionisatsiooniefektiivsused üldiselt suuremad. Happelises keskkonnas ei ole kahelaengulise iooni moodustumine nii soodne ja seega moodustub pigem rohkem ühelaengulisi ioone. Selle tulemusena on kahelaenguliste ionidele vastavad ionisatsiooniefektiivsused happelises keskkonnas madalamad kui aluselises. Vaid SPANDSi ja tirooni jaoks ei muutu ionisatsiooniefektiivsused aluselises ja happelises keskkonnas, mis on loogiline, kuna nende ühendite jaoks on pK_{a2} väga madal ja ioniseerumise määr (α_2) 1 ning seetõttu esineb nende ühendite jaoks mõlemas lahuses sama palju kahelaengulisi ioone.

Aluselises keskkonnas annavad kõrgema ionisatsiooniefektiivsuse ühelaengulisele ionile vaid broomtümoolsinine ja kollane eosiin. Broomkresoolroheline ja broomfenoolsinine jaoks muutub happelises keskkonnas ühelaengulise iooni $\log IE$ kõrgemaks kui kahelaengulise iooni $\log IE$. Ionisatsiooniefektiivsuste erinevused on sel juhul umbes 0,1 kuni 0,5 logaritmilist ühikut.

Vaadeldes happelises keskkonnas ühelaenguliste ionidele vastavaid ionisatsiooniefektiivsusi, näeme, et kõrgeima ionisatsiooniefektiivsustega on suure molekulaarruumalaga ühendid, mis ei anna nii kõrge ionisatsiooniefektiivsusega kahelaengulisi ioone (vastavalt broomtümoolsinine, broomkresoolroheline ja broomfenoolsinine). Nende seas kõrgeima $\log IE$ väärtusega broomtümoolsinine, millel on rohkem hüdrofoobseid kõrvalrühmi. Väiksema ionisatsiooniefektiivsusega on need ained, mis annavad kõrge

ionisatsiooniefektiivsusega kahelaengulisi ioone ning sulfosalitsüülhape ja tiroon, mis on suhteliselt hüdrofiilsed ühendid. Keskmise ionisatsiooniefektiivsusega on kollane eosiin, mis on suhteliselt suur molekul ning eristub selle poolest, et ei sisalda sulfoonhapperühma.

Broomtümoosinine on mõlemas keskkonnas ühelaenguliste ionide jaoks suurima ionisatsiooniefektiivsusega. Ilmselt seetõttu, et tema hüdrofoobsus on võrreldes teiste uuritud ühenditega suurem ning seetõttu liigub ühelaengulineioon suurel määral ESI tilga pinnale, isegi kui seda tekib vaid vähesel määral. Kõige kehvema ionisatsiooniefektiivsusega on tiroon, tegemist on võrreldes teiste analüüsitud ühenditega kõrge hüdrofiilsusega väikese molekuliga (tabel 1). Madala ionisatsiooniefektiivsusega on ka teine väikene hüdrofiilne ühend sulfosalitsüülhape.

Seega on näha, et vastavad $\log IE$ väärtused on aluselises ja happelises keskkonnas erinevad ning see näitab, et $\log IE$ väärtused sõltuvad lahusti pH väärtusest. Lahusti pH on seega oluline parameeter, mida võtta arvesse $\log IE$ -d ennustava mudeli väljatöötamisel ning samuti parema selektiivsuse saavutamisel. Samuti on ülaltoodust näha, et ühelaengulise ja kahelaengulise iooni moodustumine on mitmealuseliste hapete puhul tugevalt omavahel seotud protsessid.

4.2 Aminohapete ja oligopeptiidide ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmine

Oluliselt täiendati ESI positiivses režiimis mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste skaalat. Mõõdetud aminohapete ja peptiidide ionisatsiooniefektiivsused varasemat skaalat küll ei laiendanud, kuid muutsid skaalasse mõõdetud ainete valimi mitmekesisemaks. Aminohapped paiknesid skaalas pigem skaala alumises osas – $\log IE$ väärtused alla 3 $\log IE$ ühiku (nullpunktiks on metüülbesoadi ionisatsiooniefektiivsus). Peptiididele vastavad $\log IE$ väärtused varieerusid vahemikus 4,69 kuni 1,91.

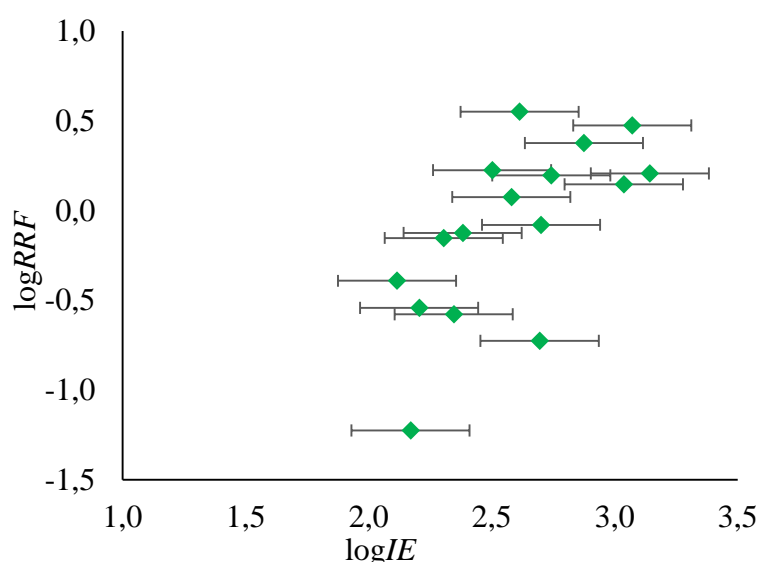
Negatiivses režiimis olid aminohapete ja peptiidide ionisatsiooniefektiivsuste väärtused samuti pigem skaala alumises osas: $\log IE$ väärtused enamasti alla 0, kusjuures nullpunktiks on bensoehappe ionisatsiooniefektiivsus.

4.2.1 Positiivses režiimis teostatud aminohapete ja oligopeptiidide mõõtmised

Positiivses režiimis olid parema ionisatsiooniefektiivsusega pigem hüdrofoobsemad ja suuremad ühendid. See on tingitud sellest, et sellised ühendid on pihuses olevates tilkades rohkem tilga pinna lähedal ja seetõttu on nende üleminek gaasifaasi lihtsam ja ionisatsiooniefektiivsus kõrgem. Samuti olid eelistatud aluselised (His, Arg, Lys) aminohapped. Nendel ühenditel on kaks aluselist rühma, mis võib ioniseerumist lihtsustada. Madalamate ionisatsiooniefektiivsustega olid happelised aminohapped (Asp, Glu). Samuti olid

madala ionisatsiooniefektiivsusega väiksemad ja hüdrofiilsemad aminohapped (Gly, Cys jne), mis on paremini solvateeritud ning seetõttu paiknevad suure tõenäosusega tilga sisemuses, seega on nende üleminek gaasifaasi keerulisem.

Käesolevas töös uuritud oligopeptiidid olid üldiselt suurema ionisatsiooniefektiivsusega, kui aminohapped. Ka oligopeptiidide korral kehtivad samad tendentsid: suurima ionisatsiooniefektiivsusega on suurte ja pigem hüdrofoobsete kõrvalrühmadega oligopeptiidid, mis ka ise olid suured (Phe-Phe-Phe-Phe ning Gly-Gly-Gly-Phe-Phe-NH₂) ning väiksema ionisatsiooniefektiivsusega olid väiksemad ja hüdrofiilsematest aminohapetest koosnevad peptiidid (madalaim Gly-Gly-Gly-NH₂). Seega teades peptiidid aminohappelist koostist on võimalik ennustada ühendi ioniseerumise headust.



Joonis 3. Chalcraffi mõõdetud [18] suhteliste signaalide (RRF – ingl *Relative Response Factor*) logaritmide ja käesoleva töö raames mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste korrelatsioon.

Chalcraft *et al.* [18] on varasemalt samuti mõõtnud aminohapete ionisatsiooniefektiivsuseid. Kuigi mõõtmised on läbi viidud erinevates lahustites (Chalcraft *et al.* kasutasid mõõtmistes kardinalahusena (ingl *sheath liquid*) MeOH/0,1% sipelghappe 50/50 lahust), on tulemused omavahel heas sõltuvuses (Joonis 3). Korrelatsioonisirge tõus on väga lähedane ühele (0,98), see tähendab, et ei esine olulisel määral väärtuste ulatuse kokku surumist ega väljavenitamist. Vabaliige tuleneb erinevast ankurainest, mille suhtes on signaal mõõdetud (Chalcraft *et al.* [18] mõõtsid Ala-Ala suhtes, siin metüülbensoadi suhtes). Üldiselt võime öelda, et tulemused on siiski omavahel võrreldavad ja ühendite järjekord on suhtelisel sarnane, eriti kui võtame arvesse mõõtmiste standardhälvet. Kahjuks pole teada Chalcraft *et al.* mõõtmiste standardhälvet. Korrelatsioonisirgest erinevad oluliselt valiin jaalaniin, mis on mõlemas uuringus vaadeldud ainetest ühed hüdrofiilsemad.

Ionisatsiooniefektiivsuste ennustamiseks on välja töötatud mudel [38], mis põhineb ainete pK_a väärtustel ja molekulaarruumalal. Hiljem on leitud [46], et veelgi paremaid tulemusi annab laengu delokalisatsiooni määra (*WAPS/WANS*) ning ioniseerumise määra α kasutamine ionisatsiooniefektiivsuste ennustamisel. Mudeli headust ja universaalsust saame kontrollida lisatud ainetega. Kui mudel on universaalne, siis suudab mudel lisanduvate aminohapete jaoks ennustada korrektselt ionisatsiooniefektiivsusi.

Varem mõõdetud [38] ainetest oli võimalik uuesti mõõta pigem kõrgema ionisatsiooniefektiivsusega ained. See on osaliselt tingitud varem kasutatud infuseerimismeetodi ja selles töös kasutatud süstimismeetodi erinevustest. Infuseerimisel viiakse analüüdilahust pidevalt ioonallikasse, mistõttu saab selle meetodi puhul ka madala kontsentratsiooniga lahustest väga hea signaali. Samuti on teada, et ESI/MS üldine efektiivsus on kõrgem madalamatel voolukiirustel. Üldiselt lähevad varem teostatud suhtelise meetodiga ja praegu absoluutse meetodiga mõõdetud tulemused omavahel kokku (joonis 1 ja tabel L6). Seega võime suhtelisel meetodil ja absoluutsel meetodil saadud tulemusi omavahel võrrelda, kasutades vastavat korrelatsioonivõrrandit. Esinevad ka mõned kõrvalekalded.

Suuri erinevusi varem mõõdetud ja selles töös mõõdetud skaalade vahel täheldati trifenüülamiini, bensamiidi, tetrametüülammoniumiooni, dietüülamiini ja pürrolidiini jaoks ($\log IE$ muutus 0,7 kuni 1,7 logaritmilist ühikut).

Tetrametüülammoniumiooni, dietüülamiini ja pürrolidiini jaoks on m/z alla 100. Varasemas töös kasutatud sihtmäss on selliste väikse m/z suhtega ühendite jaoks optimaalsest erinevam kui suurema m/z suhtega ainete jaoks. Sihtmassi täpsema uuringu põhjal [47] on põhjust arvata, et praegu kasutatud meetodika on parem ning annab eriti madala m/z suhtega ainete jaoks korrektsemaid tulemusi.

Trifenüülamiini ja bensamiidi $\log IE$ muutuse selgitamiseks viid läbi $\log IE$ määramine kolmel erineval voolukiirusel: 0,8; 0,2 ja 0,05 ml/min. Seejuures määrati $\log IE$ muutus voolukiirusega 43-le käesolevas töös uuritud ainele. Tehnilistel põhjustel jäid uuringust välja ühendid, mille m/z oli alla 100. Uuringu tulemusena leiti, et trifenüülamiini, bensamiidi ionisatsiooniefektiivsus sõltus oluliselt mõõtmisteks kasutatavast voolukiirusest ($\log IE$ muutus kuni 0,7 logaritmilist ühikut). Nende ühendite näol on tegemist väga madala aluselisusega ainetega, mis lahuses ei protoneeru ning ilmselt mõjutavad nende ionisatsiooni väga tugevasti gaasifaasilised protsessid. Voolukiirusest sõltuvus seletab suuri erinevusi mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste väärtuste vahel, kuna varasemas töös ja siin kasutatud voolukiirused on üle 20 korra erinevad.

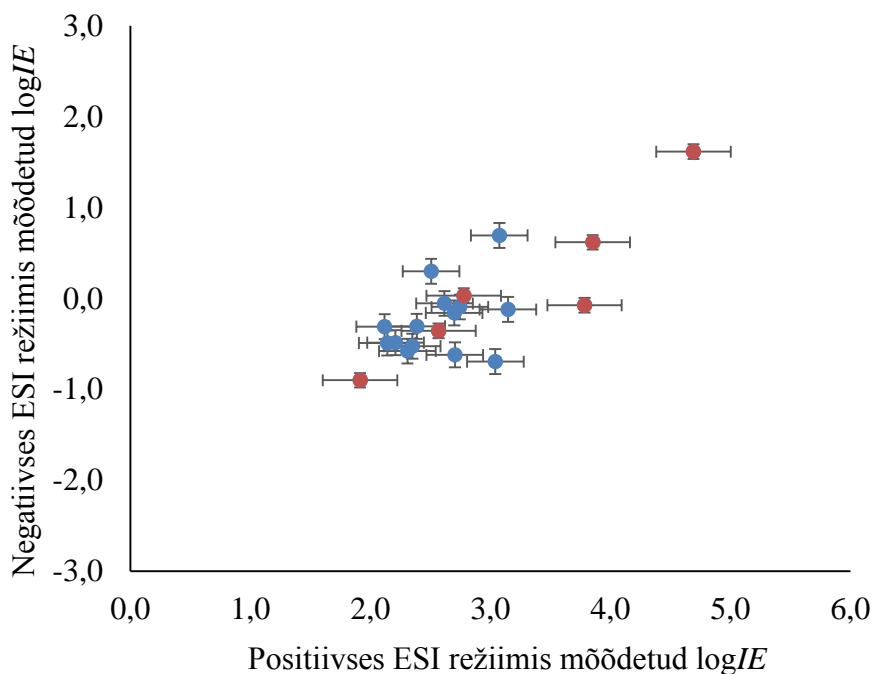
Positiivses režiimis juurde mõõdetud ning parendatud väärtustega skaala jaoks koostati ionisatsiooniefektiivsusi ennustav mudel. Mudeli väljatöötamisse ei kaasatud ühendeid, mille puhul oli täheldatud $\log IE$ sõltumist voolukiirusest, kuna samaaegselt gaasifaasis ning lahusefaasis toimuvaid protsesse on väga raske või isegi võimatu ühe mudeliga arvesse võtta. Madala m/z väärtusega ühenditel kasutati parendatud, st siin töös mõõdetud, $\log IE$ väärtuseid. Need madala m/z suhtega ained, mida ei õnnestunud optimaalsema sihtmassi üle mõõta (madal tundlikkus), jäeti mudelist välja.

Jooniselt 2 on näha, et madalamate ionisatsiooniefektiivsuste väärtuste juures on mõned punktid korrelatsioonisirgest üpris eemal. Mõõdetust madalamaks on ennustatud glütsiini väärtus. Glütsiinil on nii treening- kui ka valideerimisvalimis olevatest ainetest absoluutväärtuselt kõige suurem *WANS*. Ilmselt töötaks mudel paremini ka glütsiini korral, kui lisaksime valimisse veelgi sarnaseid väga väikse laengu ioniseerumise määraga ühendeid. Praegu kasutatavatest ühenditest on glütsiin sellepoolest teistest väga erinev. Mõõdetud väärtusest kõrgema $\log IE$ ennustab mudel 2-metoksüpüridiinile, mille $\log IE$ võeti varasemast tööst. Kuna tema m/z on üsna lähedal kriitilisele väärtusele 100, siis võib põhjus peituda selles, et tegemist on ühendiga, mille puhul ei ole kasutatud optimaalset sihtmassi.

4.2.2 Negatiivses režiimis teostatud aminohapete ja oligopeptiidide mõõtmised

Negatiivses režiimis oli võimalik mõõta väiksem hulk aminohappeid ja peptiide, sest tundlikkus on negatiivses režiimis madalam. Lisaks ei ioniseerunud Ac-Gly-Lys-OMe üldse, mis ühelt poolt ei ole üllatav, arvestades, et nimetatud oligopeptiidis puuduvad selgelt happelised vesinikud. Teisalt tõstatab see küsimuse Gly-Gly-Gly-Phe-Phe-NH₂ ja Gly-Gly-Gly-NH₂ suhtes, millel puudub samuti karboksüülhappe fragment koos selgelt happelise vesinikuga. Nende puhul on deprotonisatsiooni tsentriks ilmselt atsetamiidi fragment, mis on oluliselt vähem happeline kui karboksüülhappe jääk, kuid siiski happelisem kui Ac-Gly-Lys-OMe peptiidis leiduvad amiidsideme lämmastikud, mis tingib ka vastavate anioonide esinemise massispektris. Lisaks eelnimetatud peptiidile ei saanud mõõta järgnevaid aminohappeid: α -alaniin, β -alaniin, arginiin, glütsiin, lüsiin, proliin, tsüsteiin. Need aminohapped on negatiivses režiimis ennustatavalt madalaimate ionisatsiooniefektiivsustega, kuna nad on kas väikesed, hüdrofiilsemad või on tegemist aluseliste aminohapetega. Aluselist kõrvalrühma omavate aminohapete anioonse vormi esinemiseks lahuses peab pH olema suhteliselt kõrge võrreldes happelist kõrvalrühma omavate aminohapetega. Lisaks muudavad aluselised kõrvalrühmad aminohappe suhteliselt hüdrofiilseks. Aminohapetest on suurima ionisatsiooniefektiivsusega trüptofaan ning kõige madalama ionisatsiooniefektiivsusega asparagiin. Üldiselt kehtivad

negatiivses režiimis sarnased seaduspärasused positiivsega. Nimelt on suurema ionisatsiooniefektiivsusega sellised aminohapped, mis on suuremad ja hüdrofoobsemad, samas kui madalama ionisatsiooniefektiivsusega on väikesed ja hüdrofiilsemad aminohapped. Kuigi nii aminohapete kui peptiidide puhul on $\log IE$ väärtustes ja järjekorras mõningaid erinevusi, võib välja tuua, et kahe režiimi jaoks mõõdetud $\log IE$ väärtuste vahel on korrelatsioon ($R^2 = 0,6$; joonis 4).



Joonis 4. Positiivses ja negatiivses režiimis teostatud aminohapete ja peptiidide ionisatsiooniefektiivsuste väärtuste mõõtmiste korrelatsioon.

Graafikult ning ka saadud skaalade ulatusest on näha, et negatiivses režiimis on skaalade ulatus väiksem. Seda näitab ka tõus ($0,68 \pm 0,13$), mis on statistiliselt ühest väiksem. Eelneva põhjal näeme, et negatiivne režiim surub ionisatsiooniefektiivsuste skaalat kokku võrreldes positiivse režiimiga.

Kokkuvõte

Magistritöö eesmärgiks oli mõõta mitmelaengulisi ioone andvate ainete, aminohapete ja peptiidide ionisatsiooniefektiivsused ning seejärel välja töötada mudel ionisatsiooniefektiivsuste ennustamiseks. Täiendav eesmärk oli uurida varem ionisatsiooniefektiivsuse ennustamiseks kasutatud ioniseerumise ja delokalisatsioonimäära rakendatavust ka hüdrofiilsemate ühendite $\log IE$ ennustamiseks.

Lineaarset diskriminantanalüüsi kasutades koostati mudel, mis võimaldab pK_{a2} ja $\log P_{ow}$ abil ennustada, kas analüüt annab ESI/MS korral kahelaengulisele ioonile vastavat signaali või mitte. See lihtsustab tulevikus oluliselt ainete lisamist mitmelaengulisi ioone andvate ainete ionisatsiooniefektiivsuste skaalasse. Samuti töötati välja laengu delokalisatsioonimääral põhinev mudel mitmelaengulisi iooni andvate ainete ühelaengulisteleioonidele vastava ionisatsiooniefektiivsuse ennustamiseks. Tehti kindlaks, et kahelaengulisteleioonidele vastav ionisatsiooniefektiivsus on enim seotud aine happelisuse, hüdrofoobsuse (oktanool-vesi jaotuskoefitsient) ning laengu delokalisatsioonimääraga. Samuti tehti kindlaks, et aine ionisatsiooniefektiivsust mõjutab ka keskkonna pH, mille optimaalne valik on hea moodus selektiivsuse suurendamiseks.

Aminohapete ja oligopeptiidide ionisatsiooniefektiivsused mõõdeti nii positiivses kui ka negatiivses režiimis ning selgus, et negatiivses režiimis on ionisatsiooniefektiivsuste skaala ulatus väiksem. Samuti oli tundlikkus väiksem ning ei õnnestunud mõõta mõnede positiivses režiimis madalamate ionisatsiooniefektiivsusega aminohapete ionisatsiooniefektiivsusi.

Selgus, et varasem ioniseerumise ning delokalisatsioonimäära põhine mudel on edukalt rakendatav ka aminohapetele. Aminohapete ja oligopeptiidide korral täheldati ühine seaduspärasus, et mida suurema ja hüdrofoobsema ühendiga on tegemist, seda paremini ta ioniseerub. Muuhulgas kinnitas tehtud töö absoluutse meetodi rakendatavust erinevate ainete ionisatsiooniefektiivsuse mõõtmiseks.

Käesoleva töö tulemusena mõõdeti ionisatsiooniefektiivsused ja töötati välja ennustusmudelid mitmelaengulistele ühenditele ning aminohapetele. Järgmisena on plaanis laiendada analüütide valikut suuremate mitmelaenguliste oligopeptiididega ning uurida väljatöötatud mudelite rakendatavust ka selliste analüütide puhul.

Summary

Expanding the electrospray ionization efficiency scale in positive and negative mode ESI

Piia Burk

Mass spectrometry with electrospray ionization source is more and more widely used analytical technique. It has become a popular tool for investigation of biologically active substances such as metabolites, peptides and proteins. Not all substances ionize with the same efficiency therefore conclusions about concentration of analytes in the sample cannot be made based only on the peak intensities in MS. In order to effectively estimate concentrations even without standard substances it is essential to know which factors affect signal in ESI source and why.

The aim of this work was to study hydrophilic compounds as well as compounds giving multiply charged ions in MS. Therefore we measured ionization efficiencies for 8 polyprotic acids yielding multiply charged ions, 21 amino acids and 7 peptides.

Based on linear discriminant analysis a model for predicting whether a polyprotic acid gives or does not give doubly charged species was developed. It was observed that only compounds with low pK_{a2} and high hydrophobicity are able to form doubly charged ions. Also, for polyprotic acids, an ionization efficiency prediction model was developed that enables to predict the ionization efficiencies that correspond to singly charged moiety. The model was based on charge delocalization parameter. Also good correlation was seen between ionization efficiencies corresponding to doubly charged moieties and acidity, octanol-water distribution coefficient and also with charge delocalization parameter.

In the case of amino acids and oligopeptides it was seen that compounds with higher hydrophobicity ionized better. Ionization efficiency measurements were carried out both in positive and negative mode ESI. Results demonstrated that negative mode compresses the ionization efficiency scale.

It was also shown that parameters (ionization degree α and charge delocalization degree) used to develop a model for prediction ionization efficiencies for hydrophobic analytes also suited well for developing a model for predicting ionisation efficiencies for both hydrophobic and hydrophilic analytes.

In conclusion, all the main aims set were reached. The outlook of this work is to expand research with multiple charging hydrophilic analytes as well as to expand our research on bigger oligopeptides which would also have multiple charges and to see whether our assumptions also work with those molecules.

Kasutatud kirjanduse loetelu

1. Cole, R.B. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*, Wiley: Hoboken, 2010.
2. Liuni, P.; Wilson, D.J. Understanding and optimizing electrospray ionization techniques for proteomic analysis. *Expert Rev. Proteomics* **2011**, *8*, 197-209.
3. Yamashita, M.; Fenn, J.B. Electrospray Ion Source. Another variation on the Free-Jet Theme. *J Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451-4459.
4. Cech, N.B.; Enke, C.G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20*, 362-387.
5. Thurman, E.M.; Ferrer, I.; Barceló, D. Choosing between Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Interfaces for the HPLC/MS Analysis of Pesticides. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5441-5449.
6. Tang, L.; Kebarle, P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3654-3668.
7. Enke, C.G. A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4885-4893.
8. Kebarle, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 804-817.
9. Tang, L.; Kebarle, P. Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current. Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2709-2715.
10. Tang, X.; Bruce, J.E.; Hill Jr., H.H. Characterizing Electrospray Ionization Using Atmospheric Pressure Ion Mobility Spectrometry *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7751-7760.
11. Constantopoulos, T.L.; Jackson, G.S.; Enke, C.G. Challenges in achieving a fundamental model for ESI. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *406*, 37-52.
12. Iribarne, J.V.; Thomson, B.A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287-2294.
13. Dole, M.; Mack, M.M.; Hines, R.L.; Mobley, R.C.; Ferguson, L.D.; Alice, M.B. Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240-2249.
14. Ahadi, E.; Konermann, L. Modeling the Behavior of Coarse-Grained Polymer Chains in Charged Water Droplets: Implications for the Mechanism of Electrospray Ionization. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 104-112.

15. Konermann, L.; Rodriguez, A.D.; Liu, J. On the Formation of Highly Charged Gaseous Ions from Unfolded Proteins by Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6798–6804.
16. Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A.D.; Vahidi, S. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2-9.
17. Gamero-Castaño, M.; de la Mora, F.J. Mechanisms of electrospray ionization of singly and multiply charged salt clusters. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *406*, 67-91.
18. Chalcraft, K.R.; Lee, R.; Mills, C. Britz-McKibbin, P. Virtual quantification of metabolites by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: predicting ionization efficiency without chemical standards. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2506-2515.
19. Taflin, D.C.; Ward, T.L.; Davis, E.J. Electrified droplet fission and the Rayleigh limit. *Langmuir* **1989**, *5*, 376-384.
20. Sterling, H.J.; Daly, M.P.; Feld, G.K.; Thoren, K.L.; Kintzer, A.F.; Krantz, B.A. Williams, E.R. Effects of Supercharging Reagents on Noncovalent Complex Structure in Electrospray Ionization from Aqueous Solutions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 1762-1774.
21. Wong, S.F.; Meng, C.K.; Fenn, J.B. Multiple Charging in Electrospray Ionization of Poly(ethylene glycols). *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 546-550.
22. Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* **1989**, *246*, 64-71.
23. Cole, R.B.; Harrata, K.A. Solvent Effect on Analyte Charge State, Signal intensity, and Stability in negative ion electrospray mass spectrometry; implications for the mechanism of negative ion formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 546-556.
24. Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization - principles and practice. *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, *9*, 37-70.
25. Schnier, P.D.; Gross, D.S.; Williams, E.R. On the maximum charge state and proton transfer reactivity of peptide and protein ions formed by electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 1086-1097.
26. Smith, R.D.; Loo, J.A.; Ogorzalek Loo, R.R.; Busman, M.; Udseth, H.R. Principles and practice of electrospray ionization—mass spectrometry for large polypeptides and proteins. *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 359-452.
27. Felitsyn, N.; Peschke, M.; Kebarle, P. Origin and number of charges observed on multiply-protonated native proteins produced by ESI. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *219*, 39-62.
28. Loo, J.A.; Udseth, H.R.; Smith, R.D. Solvent effects on the charge distribution observed with electrospray ionization-mass spectrometry of large molecules. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *17*, 411-414.

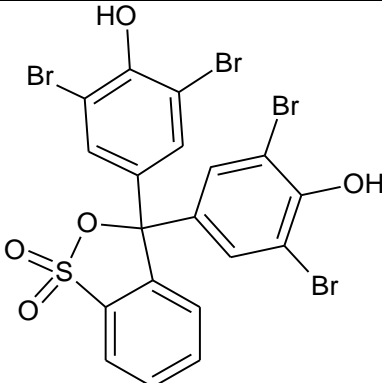
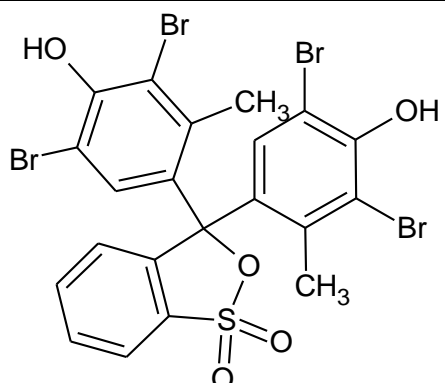
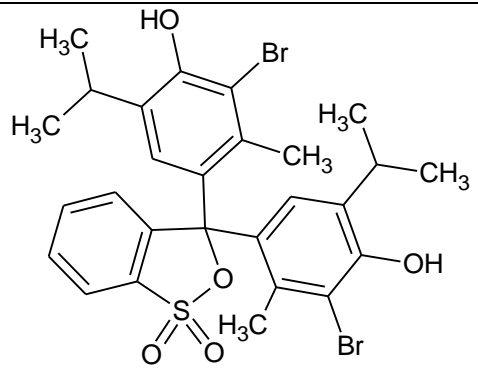
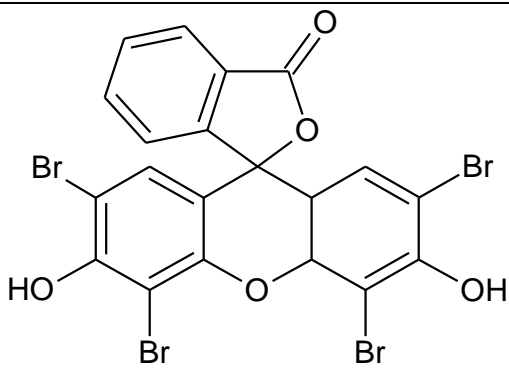
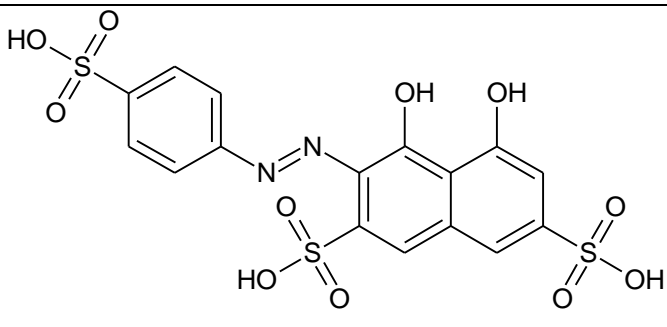
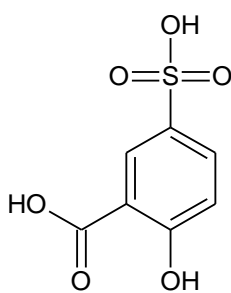
29. Loo, J.A.; Edmonds, C.G.; Udseth, H.R.; Smith, R.D. Effect of Reducing Disulfide-Containing Proteins on Electrospray Ionization Mass Spectra. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 693-698.
30. Grandori, R. Origin of the conformation dependence of protein charge-state distributions in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 11-15.
31. Hogan, C.J.J.; Carol, J.A.; Rohrs, H.W.; Biswas, P. Gross, M.L. Charge Carrier Field Emission Determines the Number of Charges on Native State Proteins in Electrospray Ionization. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6926-6927.
32. Iavarone, A.T.; Jurchen, J. C.; Williams, E. R. Effects of Solvent on the Maximum Charge State and Charge State Distribution of Protein Ions Produced by Electrospray Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 976-985.
33. Iavarone, A.T.; Jurchen, J. C.; Williams, E. R. Supercharged Protein and Peptide Ions Formed by Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1455-1460.
34. Iavarone, A.T.; Williams, E. R. Mechanism of Charging and Supercharging Molecules in Electrospray Ionization. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2319-2327.
35. Šamalikova, M.; Grandori, R. Testing the role of solvent surface tension in protein ionization by electrospray. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 503-510.
36. Douglass, K.A.; Venter, A.R. Investigating the Role of Adducts in Protein Supercharging with Sulfolane. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 489-497.
37. Leito, I.; Herodes, K.; Huopolainen, M.; Virro, K.; Künnapas, A.; Kruve, A.; Tanner, R. Towards the electrospray ionization mass spectrometry ionization efficiency scale of organic compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 379-384.
38. Oss, M.; Kruve, A.; Herodes, K.; Leito, I. Electrospray ionization efficiency scale of organic compounds. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2865-2872.
39. Zhou, S.; Cook, K.D. Protonation in Electrospray Mass Spectrometry: Wrong-Way-Round or Right-Way-Round? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 961-966.
40. Cech, N.B.; Enke, C.G. Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2717-2723.
41. Ehrmann, B.M.; Henriksen, T.; Cech, N.B. Relative importance of basicity in the gas phase and in solution for determining selectivity in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 719-728.
42. Amad, M.H.; Cech, N.B.; Jackson, G.S.; Enke, C.G. Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 784-789.

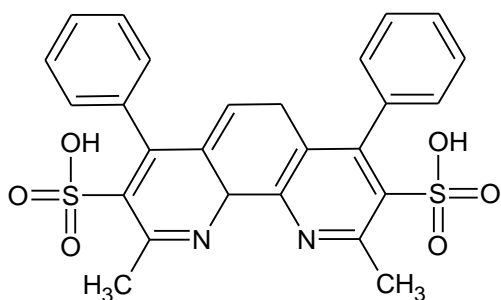
43. Nguyen, T.B.; Nizkorodov, S.; Laskin, A.; Laskin, J. An approach toward quantification of organic compounds in complex environmental samples using high-resolution electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 72-80.
44. Henriksen, T.; Juhler, R.; Svensmark, B.; Cech, N.B. The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 446-455.
45. Huffman, M.L.; Poltash, B.A.; Hughey, C.A. Effect of polar protic and polar aprotic solvents on negative-ion electrospray ionization and chromatographic separation of small acidic molecules. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9942-9950.
46. Kruve, A.; Kaupmees, K.; Liigand, J.; Leito, I. Negative electrospray ionization via deprotonation: predicting the ionization efficiency. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4822-4830.
47. Kruve, A.; Kaupmees, K.; Liigand, J.; Oss, M.; Leito, I. Sodium adduct formation efficiency in ESI source. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 695-702.
48. Bökman, C.F.; Bylund, D.; Markides, K.E.; Sjöberg, P.J.R. Relating chromatographic retention and electrophoretic mobility to the ion distribution within electrosprayed droplets. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *17*, 318-324.
49. Hug, C.; Ulrich, N.; Schulze, T.; Brack, W.; Krauss, W. Identification of novel micropollutants in wastewater by combination of suspects and nontarget screening. *Environ. Poll.* **2014**, *184*, 25-32.
50. Liu, J.; Konermann, L. Protein-Protein Binding Affinities in Solution Determined by Electrospray Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 408-417.
51. Loo, J. A. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 175-186.
52. Peschke, M.; Verkerk, U.H.; Kebarle, P. Features of the ESI mechanism that Affect the Observation of Multiply Charged Noncovalent Protein Complexes and the Determination of the Association Constant by Titration Method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1424-1434.
53. Liigand, J.; Kruve, A.; Leito, I.; Girod, M.; Antoine, R. Effect of Mobile Phase on Electrospray Ionization Efficiency. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *11*, 1853-1861.
54. Klamt, A. *COSMO-RS From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Design*. Elsevier Science Ltd: Amsterdam, 2005.
55. Perdew, J.P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8822-8824.

56. Becke, A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098-3100.
57. Eichkorn, K.; Treitler, O.; Öhm, H.; Häser, M. Ahlrichs, R. Auxiliary basis-sets to approximate Coulomb potentials. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *240*, 283-289.
58. TURBOMOLE V6.4, 2012, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989-2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007; available from <http://www.turbomole.com>.
59. Eckert, F.; Klamt, A. COSMOtherm, Version C3.0, Release 13.01; COSMOlogic GmbH&CoKG, Leverkusen, Germany, 2013; available from <http://www.cosmologic.de/>.
60. Teesch, L.M.; Orlando, R.C.; Adams, J. Location of the Alkali Metal Ion in Gas-Phase Peptide Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3668-3675.

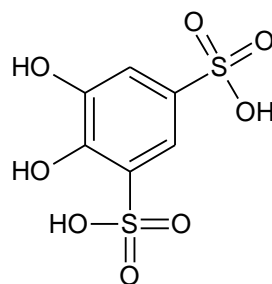
Lisad

Tabel L1. Kahelaengulistele ionidele vastavat MS signaali andvate ühendite (kõik happevormina) struktuurid.

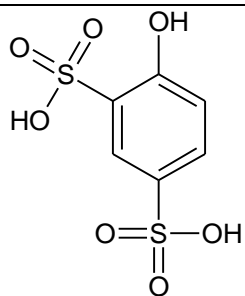
 <p style="text-align: center;">Broomfenoolsinine 4,4'-(1,1-dioksido-3<i>H</i>-2,1-bensoksatiool-3,3-diiül)bis(2,6-dibromofenool)</p>	 <p style="text-align: center;">Broomkresoolroheline 4,4'-(1,1-dioksido-3<i>H</i>-2,1-bensoksatiool-3,3-diiül)bis(2,6-dibromo-3-metüülfenool)</p>
 <p style="text-align: center;">Broomtümoolsinine 4,4'-(1,1-dioksido-3<i>H</i>-2,1-bensoksatiool-3,3-diiül)bis(2-bromo-6-isopropüül-3-metüülfenool)</p>	 <p style="text-align: center;">Kollane eosiin 2-(2,4,5,7-tetrabromo-6-hüdroksü-3-okso-3<i>H</i>-ksanteen-9-üül)bensoehape</p>
 <p style="text-align: center;">SPADNS 4,5-dihüdroksü-3-[(<i>E</i>)-(4-sulfofenüül)diasenüül]naftaleen-2,7-disulfoonhape</p>	 <p style="text-align: center;">Sulfosalitsüülhape 2-hüdroksü-5-sulfobensoehape</p>



Batokuproiindisulfoonhape
(2,9-dimetüül-4,7-difenüül-3,8-
fenantroliindisulfoonhape)



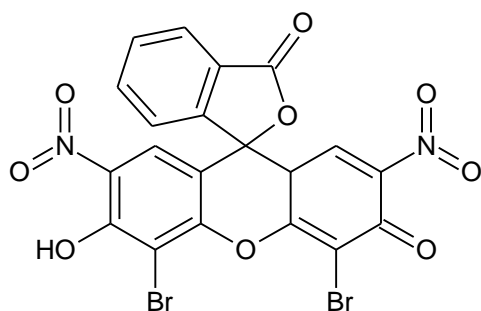
Tiroon
(4,5-dihüdroksü-1,3-benseendisulfohape)



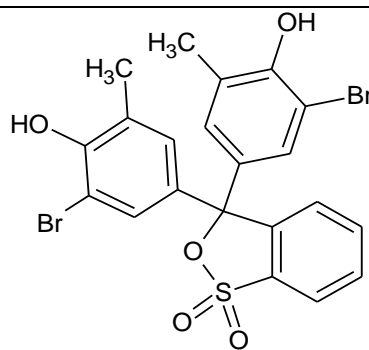
Fenool-2,4-disulfoonhape*

* ei olnud võimalik ionisatsiooniefektiivsuseid mõõta tingituna lähedase m/z väärtusega segajast spektris

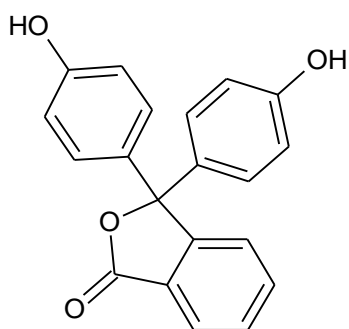
Tabel L2. Kahelaengulistele ionidele vastavat signaali mitteandvate ühendite (kõik happevormina) struktuurid.



Sinine eosiin
2-(4,5-dibromo-6-hüdroksü-2,7-dinitro-3-okso-3H-
ksanteen-9-üül)bensoehape

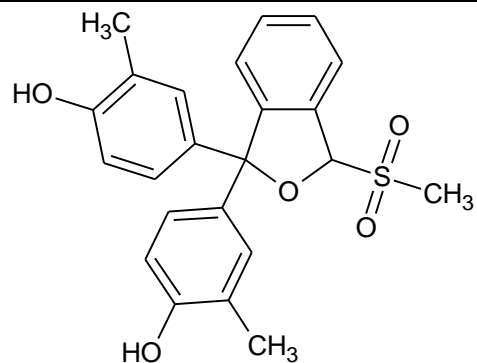


Broomkresoolpurpur
4,4'-(1,1-dioksido-3H-2,1-bensoksatiool-3,3-
diüül)bis(2-bromo-6-metüülfenool)



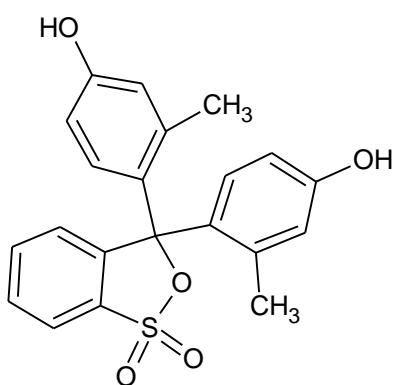
Fenoolftaleiin

3,3-bis(4-hüdroksüfenüül)-2-bensofuraan-
1(3*H*)-oon



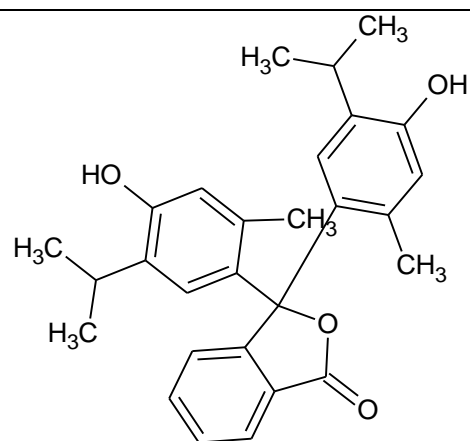
Kresoolpunane

4-[3-(4-hüdroksü-3-metüülfenüül)-1,1-
dioksobenso[c]oksatiol-3-üül]-2-metüülfenool



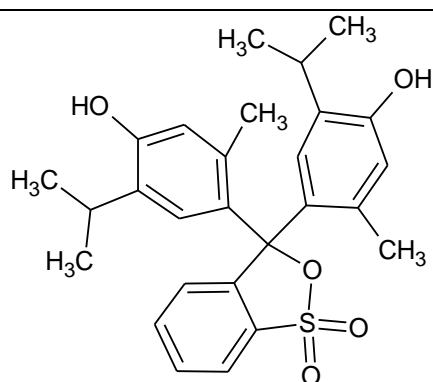
m-kresoolpurpur

4,4'-(1,1-dioksido-3*H*-2,1-bensoksatiol-3,3-
diüül)bis(3-metüülfenool)



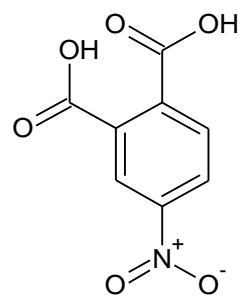
Tümoollftaleiin

3,3-bis(4-hüdroksü-2-metüül-5-propaan-2-
üülfenüül)-2-bensofuraan-1-oon



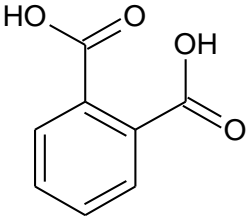
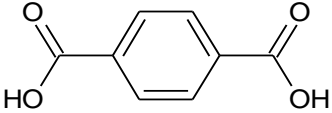
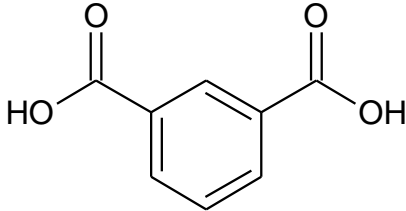
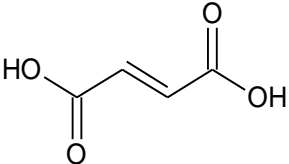
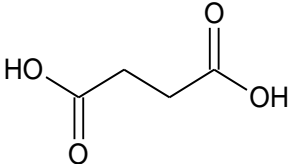
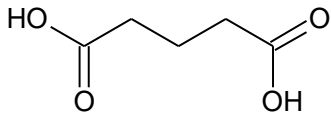
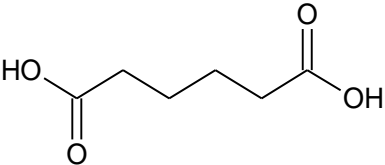
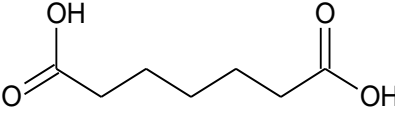
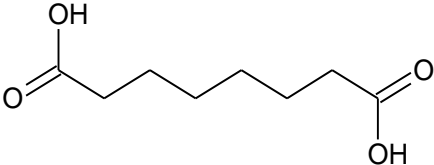
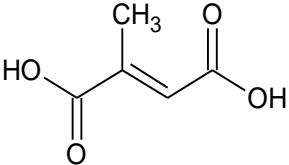
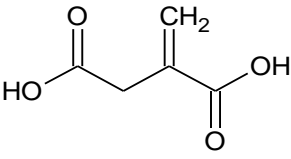
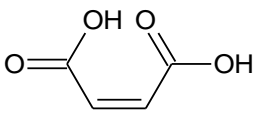
Tümoolsinine

4,4'-(1,1-dioksiido-3*H*-2,1-bensoksatiol-3-
ülideen)bis[5-metüül-2-(1-metüületüül)fenool

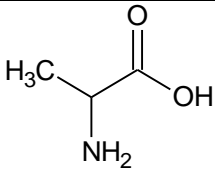
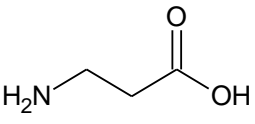
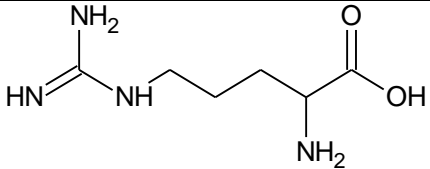
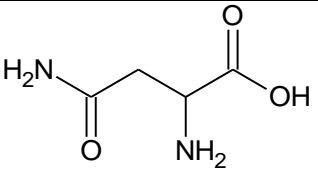
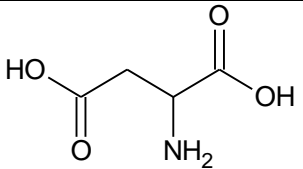
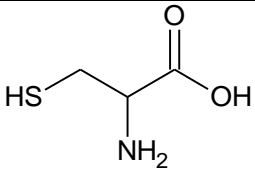
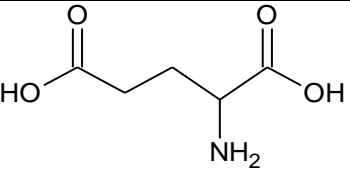
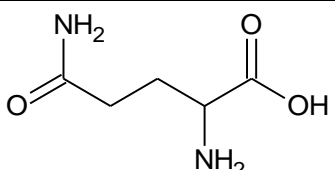
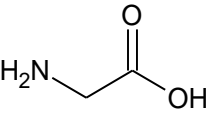
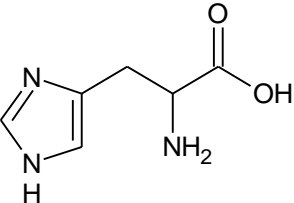
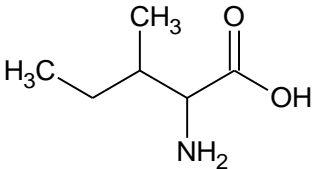
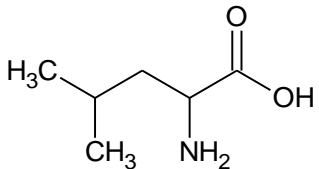
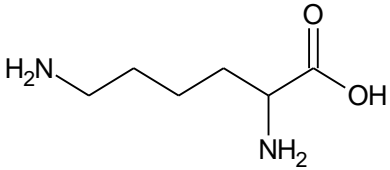
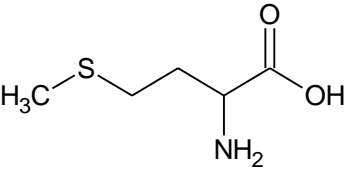
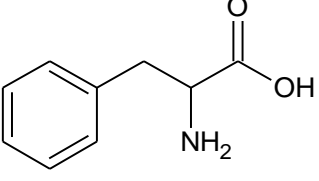
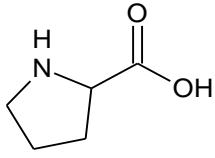
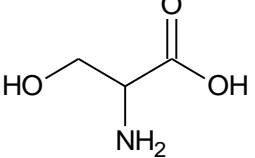
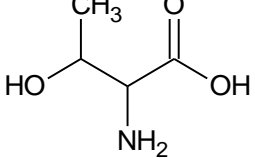
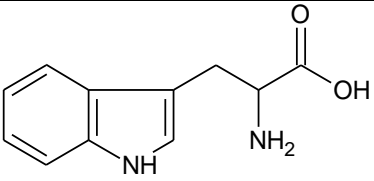
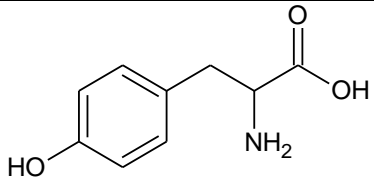
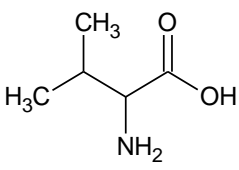


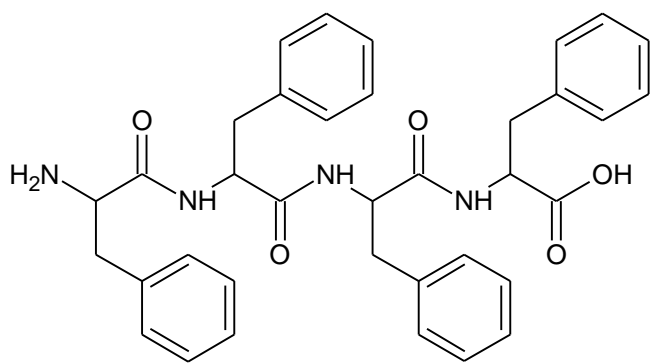
3-nitroftaalhape

4-nitrobenseen-1,2-dikarboksüülhape

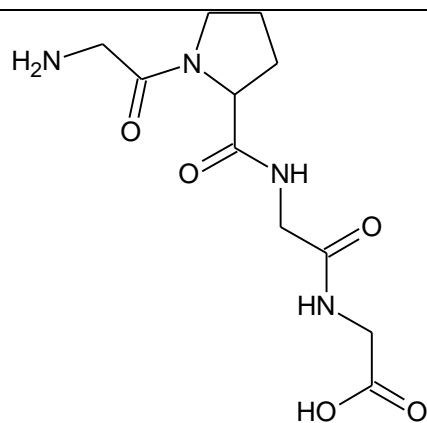
 <p>Ftaalhape benseen-1,2-dikarboksüülhape</p>	 <p>Tereftaalhape benseen-1,4-dikarboksüülhape</p>	 <p>Isoftaalhape benseen-1,3-dikarboksüülhape</p>
 <p>Fumaarhape (2<i>E</i>)-but-2-eendihape</p>	 <p>Merivaikhape Butaandihape</p>	 <p>Glutraarhape Pentaandihape</p>
 <p>Abipiinhape Heksaan-1,6-dihape</p>	 <p>Pimeelhape Heptaandihape</p>	 <p>Suberiinhape Oktaandihape</p>
 <p>Mesakoonhape (2<i>E</i>)-2-metüülbut-2-eendihape</p>	 <p>Itakoonhape 2-metüleenbutaandihape</p>	 <p>Maleiinhape (2<i>Z</i>)-but-2-eendihape</p>

Tabel L3. Mõõdetud aminohapete ja peptiidide struktuurid.

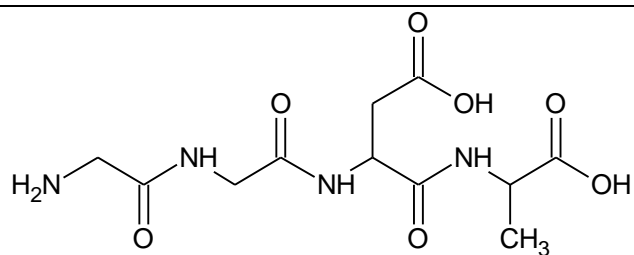
 <p>α-Alaniin, Ala</p>	 <p>β-Alaniin, β-Ala</p>	 <p>Arginiin, Arg</p>
 <p>Asparagiin, Asn</p>	 <p>Asparagiinhape, Asp</p>	 <p>Tsüsteiin, Cys</p>
 <p>Glutamiinhape, Glu</p>	 <p>Glutamiin, Gln</p>	 <p>Glütsiin, Gly</p>
 <p>Histidiin, His</p>	 <p>Isoleutsiin, Ile</p>	 <p>Leutsiin, Leu</p>
 <p>Lüsiin, Lys</p>	 <p>Metioniin, Met</p>	 <p>Fenüülalaniin, Phe</p>
 <p>Proliin, Pro</p>	 <p>Seriin, Ser</p>	 <p>Treoniin, Thr</p>
 <p>Trüptofaan, Trp</p>	 <p>Türosiin, Tyr</p>	 <p>Valiin, Val</p>



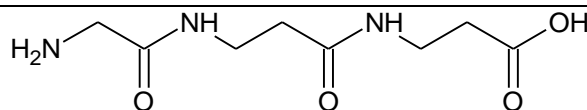
Phe-Phe-Phe-Phe



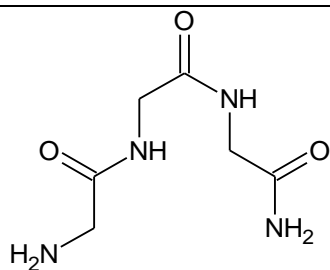
Gly-Pro-Gly-Gly



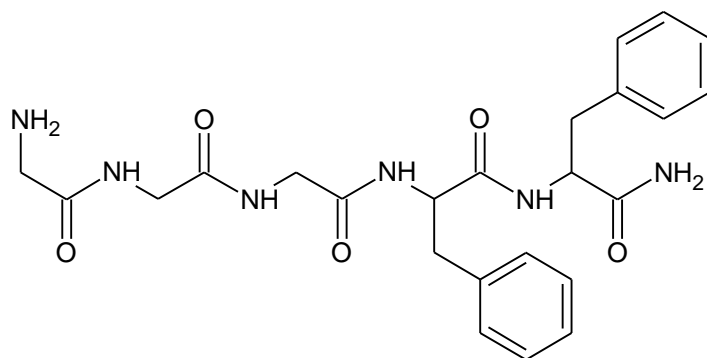
Gly-Gly-Asp-Ala



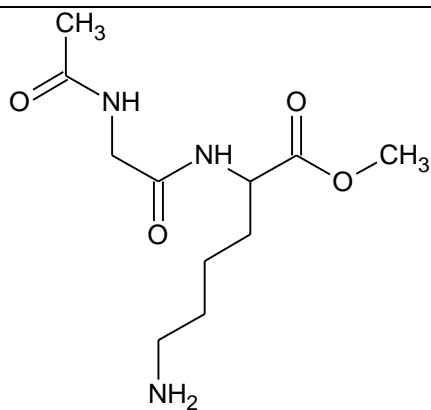
Gly-β-Ala-β-Ala



Gly-Gly-Gly-NH₂

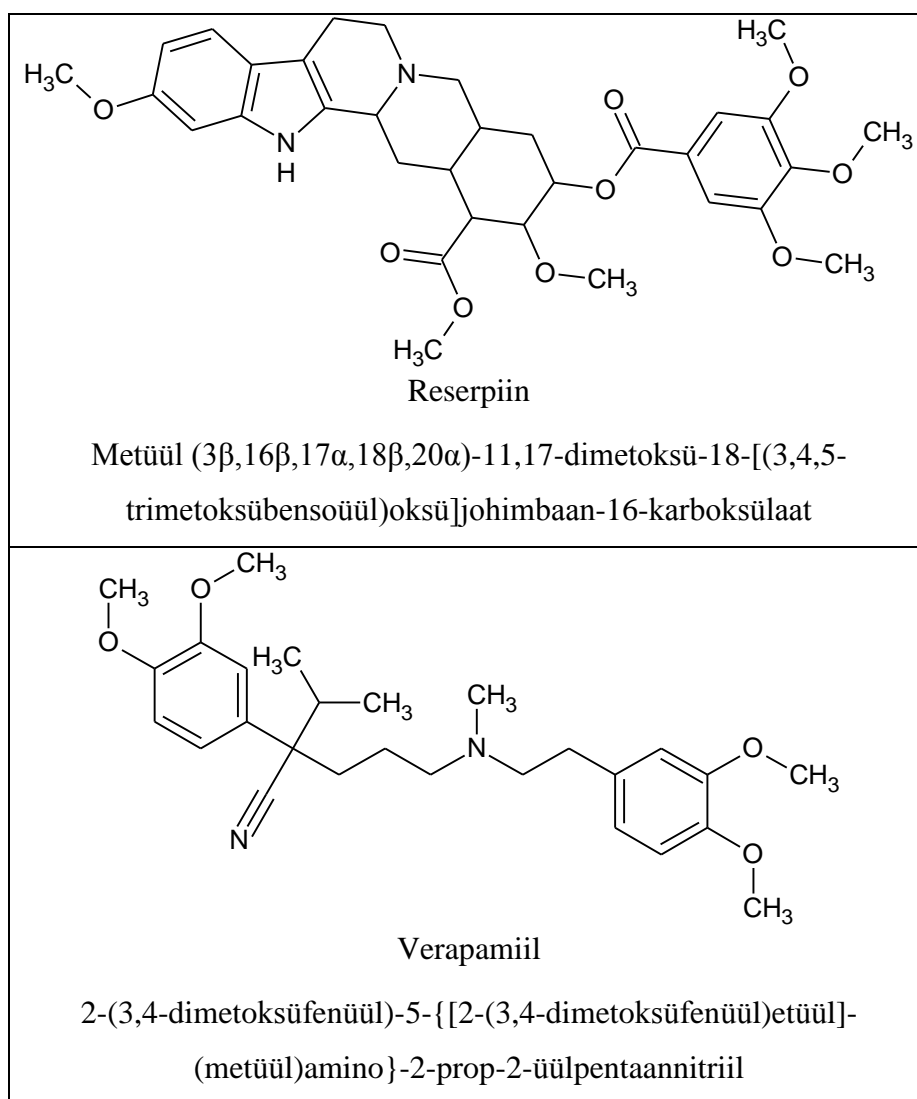


Gly-Gly-Gly-Phe-Phe-NH₂



Ac-Gly-Lys-OMe

Tabel L4. Reserpiini ja verapamiili struktuurid.



Tabel L 5. Mõõdetud ainete m/z ja sihtmassi väärtused.

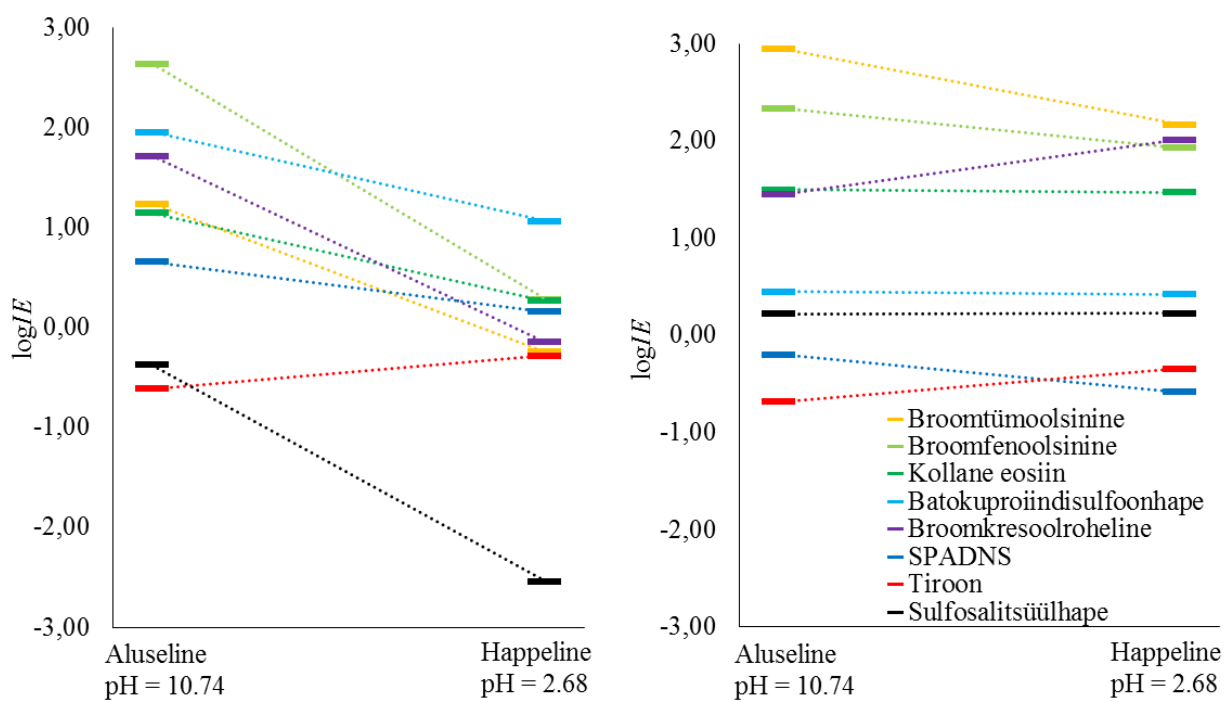
	Kahelaenguline		Ühelaenguline	
	m/z	Sihtmäss	m/z	Sihtmäss
Batokuproiindisulfoonhape	259	150	519	500
Broomfenoolsinine	334	300	669	600
Broomkresoolroheline	348	300	697	700
Broomtümoosinine	311	300	623	600
Kollane eosiin	323	300	647	650
SPADNS	251	250	503	450
Sulfosalitsüülhape	108	15	217	125
Tiroon	134	15	269	125

	Positiivne ESI		Negatiivne ESI	
	m/z	Sihtmäss	m/z	Sihtmäss
Ac-Gly-Lys-OMe	260	450	258	250

Gly-β-Ala-β-Ala	218	350	216	200
Gly-Gly-Asp-Ala	319	550	317	300
Gly-Gly-Gly-NH ₂	189	300	187	200
Gly-Gly-Gly-Phe-Phe-NH ₂	483	750	481	500
Gly-Pro-Gly-Gly	287	500	285	300
Phe-Phe-Phe-Phe	607	850	605	600
α-alaniin	90	15	88	100
Arginiin	175	15	173	150
Asparagiin	133	15	131	150
Asparagiinhape	134	15	132	150
β-alaniin	90	15	88	100
Fenüülalaniin	166	15	164	150
Glutamiin	147	15	145	150
Glutamiinhape	148	15	146	150
Glütsiin	76	15	74	50
Histidiin	156	15	154	150
Isoleutsiin	132	15	130	150
Leutsiin	132	15	130	150
Lüsiin	147	15	145	150
Metioniin	150	15	148	150
Proliin	116	15	114	100
Seriin	106	15	104	100
Treoniin	120	15	118	100
Trüptofaan	205	350	203	200
Tsüsteiin	122	15	120	100
Türosiin	182	250	180	200
Valiin	118	15	116	100

Tabel L 6. Varem suhtelisel meetodil mõõdetud [38] ja käesoleva töö jooksul absoluutsel meetodil mõõdetud tulemused

	Absoluutsel meetodil mõõdetud	Suhtelisel meetodil mõõdetud [38]
<i>s</i>	0,32	0,30
Tetraheksüülammoonium	5,61	5,65
Tetrabutüülammoonium	5,36	5,13
Tetrapropüülammoonium	5,18	4,97
Fenüültetrametüülguanidiin	4,73	4,86
Tribütüülamiin	4,82	4,83
1-heksüül-3-methüülimidiasooliumbis(trifluorosulfonyl)imiid	4,83	4,66
Difenüülguanidiin	5,03	4,61
Tripropüülamiin	4,55	4,56
Akridiin	4,49	4,42
Difenüülamiin	3,11	4,18
1-naftüülamiin	3,47	4,04
DBU (1,8-Diasabitsüklo[5.4.0]undek-7-een)	4,51	3,96
Tetraetüülammoonium	4,86	3,95
Tetrametüülguanidiin	4,15	3,89
N,N-dimetüülalaniin	3,70	3,72
1-etüül-3-methüülimidiasooliumtrifluorometüülsulfonaat	4,26	3,68
Trifenüülamiin	2,02	3,67
Trietüülamiin	3,89	3,53
3-nitroaniliin	2,70	3,52
Bensüülamiin	3,15	3,43
2,6-dimetüülpüridiin	3,88	3,41
Sulfanüülamiid	2,12	3,4
Bensofenoon	1,68	3,25
Piperidiin	3,61	3,16
Aniliin	3,15	3,04
2-metüülpüridiin	3,53	3,02
Püridiin	3,05	2,94
Dimetüülglutaraat	1,45	2,88
Bensamiid	1,15	2,74
Pürrolidiin	3,37	2,7
Dietüülamiin	3,33	2,66
Fenüülbensoaat	1,13	2,44
2-nitroaniliin	1,13	2,44
Tetrametüülammoonium	3,34	2,15
Dimetüülsuktsinaat	-	2,14
Verapimiil	5,00	-
Reserpiin	4,66	-



Joonis L1. Kahelaengulistele ionidele vastavat signaali andvate ainete ionisatsiooniefektiivsuste sõltuvus lahuse pH väärtusest.

Tabel L 7.1. COSMO-RS programmiga arvatatud füüsikalise-keemilised parameetrid ning mõõdetud $\log IE$ väärtused. Siin $\log P_{ow}$ – neutraalile vastav oktanool-vesi jaotuskoefitsient; $\log P_{ow_a}$ – anioonile vastav oktanool-vesi jaotuskoefitsient ning $\log P_{ow_da}$ – dianioonile vastav oktanool-vesi jaotuskoefitsient.

			pH = 10,74			pH = 2,68			WAPS·10 ⁵				
	pK _{a1}	pK _{a2}	α_2	logIE _{kahe-} laenguline	logIE _{ühe-} laenguline	α_2	logIE _{kahe-} laenguline	logIE _{ühe-} laenguline	logP _{ow}	logP _{ow_a}	logP _{ow_da}	anioon	dianioon
Broomfenoolsinine	0,99	2,96	1,00	2,63	2,34	0,34	0,28	1,93	6,86	-3,00	-9,25	1,54	1,86
Batokuproiindisulfoonhape	-1,70	5,05	1,00	1,95	0,45	0,00	1,06	0,42	-0,06	-8,50	-12,68	2,02	1,92
Broomkresoolroheline	0,55	3,49	1,00	1,71	1,45	0,13	-0,15	2,01	6,63	-2,51	-8,95	1,62	1,83
Broomtümoolsinine	1,15	5,76	1,00	1,23	2,95	0,00	-0,25	2,16	7,47	-1,46	-8,05	1,44	1,70
Kollane eosiin	3,30	4,54	1,00	1,15	1,50	0,00	0,27	1,47	5,03	-0,17	-7,64	1,60	1,90
SPADNS	-2,32	-2,19	1,00	0,66	-0,20	1,00	0,16	-0,58	1,41	-5,39	-14,57	2,34	2,57
Sulfosalitsüülhape	-1,53	2,31	1,00	-0,38	0,22	0,70	-2,54	0,22	2,68	-7,36	-16,07	2,38	2,60
Tiroon	-2,66	-2,15	1,00	-0,62	-0,68	1,00	-0,29	-0,34	3,07	-4,89	-15,89	3,98	5,01
Broomkresoolpurpur	1,26	4,31	1,00			0,02			4,75	-5,17	-11,47	2,01	2,34
Sinine eosiin	2,80	3,14	1,00			0,13			4,17	-1,27	-7,66	1,58	1,90
Tümooltaleiin	10,04	10,98	0,32			0,00			5,79	-0,46	-6,83	1,66	1,98
Tümooolsinine	-0,89	7,54	1,00			0,00			4,51	-3,80	-9,49	1,70	2,01
Kresoolpunane	1,08	6,31	1,00			0,00			4,10	-6,04	-12,08	2,19	2,59
m-kresoolpurpur	-1,29	6,71	1,00			0,00			1,85	-6,48	-12,92	2,34	2,89
Fenoolftaleiin	9,28	9,04	0,98			0,00			2,66	-3,66	-10,48	2,60	3,31
Fenool-2,4-disulfoonhape	-2,99	-1,91	1,00			1,00			2,10	-5,87	-16,72	4,28	5,25
Tereftaalhape	2,26	3,44	1,00			0,11			1,01	-6,59	-15,05	5,23	6,96
Oktaandihape	4,91	4,88	1,00			0,00			1,12	-6,55	-14,23	5,24	6,05
Isoftaalhape	2,87	4,16	1,00			0,01			1,02	-7,05	-15,56	5,54	7,36
Heptaandihape	4,61	4,76	1,00			0,00			0,78	-6,96	-14,82	6,09	6,92
Ftaalhape	2,92	4,56	1,00			0,00			0,36	-7,65	-16,02	6,12	8,23
3-nitroftaalhape	2,11	3,60	1,00			0,09			2,19	-6,55	-15,17	6,25	5,11
Heksaandihape	4,98	4,98	1,00			0,00			0,18	-7,56	-15,38	7,04	8,10
(2E)-2-metüülbut-2-eendihape	3,31	5,65	1,00			0,00			0,88	-7,92	-15,64	7,74	9,73
2-metüleenbutaandihape	4,05	4,48	1,00			0,00			0,50	-7,72	-16,08	8,05	10,05
Pentaandihape	4,59	4,92	1,00			0,00			-0,35	-8,05	-15,96	8,22	9,65
(2E)-but-2-eendihape	3,41	4,00	1,00			0,01			0,55	-7,98	-16,61	8,66	11,30
Butaandihape	4,27	4,89	1,00			0,00			-0,33	-8,31	-16,44	9,60	11,64
(2Z)-but-2-eendihape	2,92	4,66	1,00			0,00			-0,26	-9,34	-16,99	9,64	12,69

Tabel L 7.2. COSMO-RS programmiga arvutatud füüsikalise-keemilised parameetrid ning mõõdetud log*IE* väärtused.

	KLAMT: neutraal					KLAMT: anioon					KLAMT: dianioon				
	pindala	sig2	sig3	Hacc3	Hdon3	pindala	sig2	sig3	Hacc3	Hdon3	pindala	sig2	sig3	Hacc3	Hdon3
Broomfenoolsinine	413,82	59,76	-14,01	1,97	1,21	410,24	89,30	66,52	0,95	0,58	412,11	123,81	153,43	0,00	0,00
Batokuproiindisulfoonhape	454,92	271,06	58,77	12,87	7,82	451,42	326,84	316,64	31,07	1,62	452,58	372,82	517,99	47,83	0,00
Broomkresoolroheline	412,07	134,63	-20,45	0,35	3,92	422,23	228,70	213,77	20,67	2,09	421,63	301,06	401,41	35,90	0,00
Broomtümoosinine	441,15	278,47	-11,13	7,19	4,14	440,70	670,25	642,39	5,08	2,88	453,80	642,86	911,14	0,00	0,00
Kollane eosiin	397,83	27,66	-3,45	0,95	0,59	397,34	41,93	35,34	0,45	0,27	398,37	64,11	95,61	0,00	0,00
SPADNS	418,45	329,71	-96,73	5,43	19,66	416,26	381,30	184,66	23,28	11,29	415,38	463,27	445,94	44,97	7,47
Sulfosalitsüülhape	206,73	355,44	-184,82	28,36	19,70	204,79	280,44	232,24	7,69	5,13	202,51	450,45	700,83	2,82	1,75
Tiroon	232,19	209,69	-152,21	0,28	19,87	229,07	222,22	114,73	11,56	7,62	227,08	321,48	427,90	38,51	1,64
Broomkresoolpurpur	371,52	172,97	-63,80	0,73	8,73	371,32	264,37	216,29	24,74	4,73	368,82	325,34	452,86	42,24	0,00
Sinine eosiin	400,82	106,99	-3,86	3,81	2,57	398,14	273,04	253,38	2,81	1,81	398,48	192,26	286,70	0,00	0,00
Tümoosifaleiin	419,42	363,62	-10,60	13,04	7,79	415,90	395,03	460,73	3,83	2,23	420,38	141,66	236,78	0,00	0,00
Tümoosinine	421,14	186,89	0,97	8,32	5,68	416,38	309,31	308,12	4,55	3,06	420,95	140,68	218,53	0,00	0,00
Kresoolpunane	361,99	208,49	-28,73	7,83	4,79	362,56	283,80	292,18	3,09	1,95	362,83	294,46	447,27	0,00	0,00
<i>m</i> -kresoolpurpur	346,67	319,84	9,07	13,55	9,28	343,29	601,01	605,96	8,45	5,66	339,32	445,89	691,84	0,00	0,00
Fenoosifaleiin	319,33	69,28	-13,37	3,26	2,04	317,05	108,94	119,71	1,58	0,98	314,30	153,54	261,65	0,00	0,00
Fenool-2,4-disulfoonhape	223,78	195,95	-128,31	16,29	11,74	221,27	405,62	252,07	13,42	9,43	218,96	505,70	698,92	3,78	2,54
Tereftaalhape	182,00	143,72	-62,20	10,66	7,34	180,90	188,87	224,34	3,83	2,56	178,59	221,53	417,77	0,00	0,00
Oktaandihape	223,81	92,43	6,74	4,34	2,75	222,11	116,28	177,68	1,70	1,10	219,87	85,40	179,36	0,00	0,00
Isoftaalhape	182,90	167,07	-42,95	10,23	6,74	182,35	192,88	244,32	3,01	1,93	180,01	231,61	431,51	0,00	0,00
Heptaandihape	205,48	92,62	1,33	4,81	3,11	203,50	113,96	177,31	1,45	0,91	200,95	84,96	177,61	0,00	0,00
Ftaalhape	180,99	85,18	-28,11	5,72	3,89	179,80	202,84	272,10	3,06	1,95	178,23	251,42	495,16	0,00	0,00
3-nitroftaalhape	209,17	271,61	-115,91	17,89	12,52	207,47	499,12	538,85	4,41	5,89	205,82	391,39	701,01	0,00	0,00
Heksaandihape	184,09	94,17	-5,22	5,20	3,37	182,38	114,52	174,49	1,69	1,08	180,87	85,06	178,56	0,00	0,00
(2 <i>E</i>)-2-metüülbut-2-eendihape	155,39	108,81	-30,33	7,25	4,91	153,94	186,00	260,14	2,22	1,37	150,51	80,01	164,44	0,00	0,00
2-metüleenbutaandihape	155,51	203,46	-55,89	13,06	8,74	153,10	407,01	584,34	5,89	3,78	151,37	248,76	514,30	0,00	0,00
Pentaandihape	164,88	94,27	-9,88	5,33	3,47	162,50	113,06	171,91	1,69	1,09	160,37	85,78	181,97	0,00	0,00
(2 <i>E</i>)-but-2-eendihape	141,30	87,82	-38,57	6,87	4,73	276,17	176,55	293,24	1,65	1,07	137,00	80,44	163,16	0,00	0,00
Butaandihape	145,04	92,07	-19,33	5,60	3,70	142,85	108,42	162,90	1,64	1,05	140,63	86,18	184,19	0,00	0,00
(2 <i>Z</i>)-but-2-eendihape	137,29	83,95	-31,57	5,74	3,95	136,09	100,26	130,90	1,65	1,06	134,38	85,77	177,84	0,00	0,00

Lihthitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, _____ Piia Burk, _____

(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihthitsentsi) enda loodud teose

Elektropihustuse ionisatsiooniefektiivsuse skaala laiendamine positiivses ja negatiivses režiimis

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on _____ Anneli Kruve ja Karl Kaupmees _____ ,

(*juhendaja nimi*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihthitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **22.05.2015**