

Autoreferat



**Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk**

**OD NIEPEŁNEGO DO WYCZERPUJĄCEGO OPISU
STRUKTURALNEGO ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH ZA
POMOCA SPEKTROMETRII RUCHLIWOŚCI JONÓW
SPRZEŻONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS**

dr Magdalena Maja Zimnicka

Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
Warszawa

Załącznik 4 do wniosku o wszczęcie postępowania o nadanie stopnia doktora
habilitowanego

Warszawa, dn. 10 czerwca 2022

1. DANE OSOBOWE

Imię i Nazwisko	Magdalena Maja Zimmicka
Afiliacja	Instytut Chemii Organicznej PAN Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa, Polska Tel. +48 22 343 21 23 Fax +48 632 66 81 e-mail: magdalena.zimmicka@icho.edu.pl

2. EDUKACJA

Okres (data nadania i rodzaj uzyskanego stopnia naukowego)	Informacja
12/2004 – 2/2009 (2/2009 – Doktor Nauk Chemicznych)	Studia doktoranckie, Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska Tytuł rozprawy: <i>Badanie właściwości i reakcji anionowych σ-adduktów nitrozwiązków aromatycznych w fazie gazowej</i> Promotor: Prof. dr hab. Witold Danikiewicz
10/1999 – 11/2004 (11/2004 Magister Chemii)	Studia magisterskie, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, Polska Tytuł pracy magisterskiej: <i>Badania anionowych σ-adduktów amin do 1,3,5-trinitrobenzenu metodą spektrometrii mas</i>

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Instytucja naukowa i okres zatrudnienia	Stanowisko
Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska 01/2013 -	Adiunkt
Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska 02/2009 – 10/2009 and 03/2011 – 12/2012	Asystentka
Uniwersytet Waszyngtoński, Wydział Chemii, Seattle, USA 11/2009 – 12/2010	Badaczka w ramach stażu po uzyskaniu stopnia doktora
Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska 12/2004 – 02/2009	Doktorantka

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART.219 UST.1 PKT.2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ.478 Z PÓŹN. ZM.)

4.1. Tytuł osiągnięcia

„Od niepełnego do wyczerpującego opisu strukturalnego związków bioaktywnych za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów sprzężonej ze spektrometrią mas”

4.2. Lista publikacji potwierdzająca osiągnięcie

(* - autor korespondencyjny)

IF (rok publikacji) – Na podstawie: mostwiedzy.pl – 02.06.2022

IF_{5-letni} – Na podstawie: Web of Science – 02.06.2022

Punkty Ministerialne – według zał. do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 9.02.2021

Lp.	Artykuł	IF (rok publikacji)	IF _{5-letni}	Punkty Ministerialne
A1	<p>A. Troć, <u>M. Zimnicka*</u>, W. Danikiewicz</p> <p>“Separation of Catechin Epimers by Complexation Using Ion Mobility Mass Spectrometry”</p> <p><i>Journal of Mass Spectrometry</i> 2015, 50, 542-548</p> <p>Mój wkład w powstanie publikacji:</p> <p>(moja szczegółowa deklaracja i deklaracje pozostałych współautorów dostępne są w załączniku 6)</p> <ul style="list-style-type: none"> - konceptualizacja, - analiza formalna, - badania (obliczenia teoretyczne), - nadzór (pomiar TWIMS), - pisanie – pierwotny projekt, i pisanie – recenzja & redakcja. <p>Mój udział procentowy szacuję na 70%.</p>	2,541	2,03	70
A2	<p>A. Troć, <u>M. Zimnicka*</u>, M. Koliński, W. Danikiewicz</p> <p>“Structural Elucidation of β-Lactam Diastereoisomers through Ion Mobility Mass Spectrometry Studies and Theoretical Calculations”</p> <p><i>Journal of Mass Spectrometry</i> 2016, 51, 282-290</p> <p>Mój wkład w powstanie publikacji:</p> <p>(moja szczegółowa deklaracja i deklaracje pozostałych współautorów dostępne są w załączniku 6)</p> <ul style="list-style-type: none"> - konceptualizacja, - analiza formalna, - badania (obliczenia teoretyczne), - nadzór (pomiar TWIMS), 	2,381	2,03	70

	- pisanie – pierwotny projekt, i pisanie – recenzja & redakcja. Mój udział procentowy szacuję na 60%.			
A3	<u>M. Zimmicka*</u> , A. Troć “Acid-Based Approach for Separation of Peptide Epimers using IM-MS” <i>Journal of Mass Spectrometry</i> 2019, 54, 620-628 Mój wkład w powstanie publikacji: (moja szczegółowa deklaracja i deklaracje pozostałych współautorów dostępne są w załączniku 6) - konceptualizacja, - analiza formalna, - badania (pomiar TWIMS & obliczenia teoretyczne), - pisanie – pierwotny projekt, i pisanie – recenzja & redakcja. Mój udział procentowy szacuję na 90%.	1,671	2,03	70
A4	<u>M. Zimmicka*</u> “Crown Ethers as Shift Reagents in Peptide Epimer Differentiation - Conclusions from Examination of <i>ac</i> -(H)FRW-NH ₂ Peptide Sequences” <i>International Journal for Ion Mobility Spectrometry</i> 2020, 23, 177-188 Mój wkład w powstanie publikacji: (moja szczegółowa deklaracja dostępna jest w załączniku 6) - konceptualizacja, - analiza formalna, - badania (pomiar TWIMS), - pisanie – pierwotny projekt, i pisanie – recenzja & redakcja. Mój udział procentowy szacuję na 100%.	2,8[†]	2,94[†]	70
A5	<u>M. Zimmicka*</u> , A. Troć, M. Ceborska, M. Jakubczak, M. Koliński, W. Danikiewicz “Structural Elucidation of Specific Noncovalent Association of Folic Acid with Native Cyclodextrins Using an Ion Mobility Mass Spectrometry and Theoretical Approach” <i>Analytical Chemistry</i> 2014, 86, 9, 4249–4255 Mój wkład w powstanie publikacji: (moja szczegółowa deklaracja i deklaracje pozostałych współautorów dostępne są w załączniku 6) - konceptualizacja,	5,636	6,755	140

	<ul style="list-style-type: none"> - analiza formalna, - badania (pomiar TWIMS & obliczenia teoretyczne), - pisanie – pierwotny projekt, i pisanie – recenzja & redakcja. <p>Mój udział procentowy szacuję na 70%.</p>			
A6	<p><u>M. Zimmicka*</u>, E. Kalenius, J. Jurczak, W. Danikiewicz</p> <p>“Ion Mobility Mass Spectrometry - an Efficient Tool for the Analysis of Conformational Switch of Macrocyclic Receptors upon Anion Binding”</p> <p><i>Analyst</i>, 2021, 146, 5337-5346</p> <p>Mój wkład w powstanie publikacji:</p> <p>(moja szczegółowa deklaracja i deklaracje pozostałych współautorów dostępne są w załączniku 6)</p> <ul style="list-style-type: none"> - konceptualizacja, - analiza formalna, - badania (pomiar TWIMS & obliczenia teoretyczne), - pisanie – pierwotny projekt, i pisanie – recenzja & redakcja. <p>Mój udział procentowy szacuję na 70%.</p>	4,77	4,232	100

† - Cite Score jest podany (mostwiedzy.pl). IF nie jest dostępny.

4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego

Streszczenie: *Struktury bioaktywnych związków chemicznych i układów pokrewnych są ściśle związane z ich właściwościami fizycznymi i chemicznymi oraz funkcjami, co podkreśla znaczenie ich kompleksowego opisu strukturalnego. W serii publikacji [A1-A6] wykazałam, że zastosowanie spektrometrii mas sprzężonej ze spektrometrią ruchliwości jonów (z ang. Ion Mobility - Mass Spectrometry - IM-MS) wspartej obliczeniami teoretycznymi oraz rozwój metod opartych na ruchliwości jonów w celu zwiększenia zdolności rozdzielczych IM-MS mogą prowadzić do wyczerpującego opisu strukturalnego bioaktywnych związków, których analiza strukturalna była trudna i często niepełna.*

Epimery katechiny [A1], diastereoizomery β -laktamu [A2] i epimery peptydów [A3-A4] należą do ważnych związków bioaktywnych, których aktywność biologiczna jest ściśle związana z typem diastereoizomeru. Ich rozdział umożliwiający ich kompleksowy opis strukturalny jest często niekompletny, co stanowi wyzwanie dla powszechnie stosowanych metod analitycznych, jak również dla IM-MS. Wykazałam, że niewystarczający rozdział IM-MS tych związków, w konsekwencji uniemożliwiający ich pełny opis strukturalny, można przezwyciężyć, stosując odpowiednie podejście metodologiczne IM-MS z wykorzystaniem odczynników przesunięcia.

Kompleksy kwas foliowy-cyklodekstryna (FA-CD) [A5] i kompleksy anion-makrocykl [A6] są istotnymi układami bioaktywnymi, które przyciągnęły uwagę badaczy. Rozróżnienie

pomiędzy kompleksami inkluzyjnymi a ekskluzywnymi FA-CD oraz ich pełny opis jest niezbędny do oceny wpływu wbudowania FA i pokrewnych bioaktywnych ligandów w kompleks z CD na ich biodostępność, rozpuszczalność i aktywność. Kompleksowy opis strukturalny kompleksów anion-makrocycl umożliwia dyskusję na temat rozpoznawania anionów przez syntetyczne receptory. Badania oddziaływań anionów i ich rozpoznawania stanowią istotę współczesnej nauki ze względu na ich znaczenie w procesach przemysłowych oraz w naturalnie występujących zjawiskach obserwowanych w naukach biologicznych i środowiskowych. W badaniach kompleksów kwas foliowy-cyklodekstryna (FA-CD) oraz wybranych kompleksów anion-makrocycl podkreśliłam znaczenie badań IM-MS dla uzyskania kompleksowego opisu strukturalnego, szczególnie w sytuacji, gdy opis dostarczany przez inne metody analityczne jest niepełny lub stanowi podejście uzupełniające.

Ostatecznie wykazałam, że przejście od niepełnego do wyczerpującego opisu struktur kilku ważnych związków bioaktywnych jest możliwe, gdy w procesie ich analizy uwzględnia się IM-MS.

Obecnie dostępnych jest wiele podejść analitycznych do określania struktury związków chemicznych i układów molekularnych. Ze względu na specyfikę każdej metody analitycznej, która definiuje odrębne obszary jej zastosowania, jedynie mając do dyspozycji szereg metod analitycznych, można uzyskać wiarygodny opis strukturalny poszczególnych związków chemicznych. Duże zróżnicowanie stereochemiczne związków chemicznych i wynikające z tego nieidentyczne właściwości chemiczne, fizyczne i biologiczne związków izomerycznych stwarzają dodatkowe wymagania stawiane metodom analitycznych dla ich identyfikacji i różnicowania.

Do niedawna spektrometria mas nie była jeszcze metodą pierwszego wyboru w badaniach strukturalnych. Wprawdzie metoda ta oprócz zastosowania głównie jako narzędzia analitycznego pozwalającego na wyznaczenie masy cząsteczkowej analizowanych związków i ich asocjacji, umożliwia w pewnym stopniu charakteryzację strukturalną. W tym celu przypisanie strukturalne jest realizowane przez porównanie widm fragmentacyjnych nieznanego związku i związków odniesienia, wykorzystując dostępne biblioteki widm masowych.

Pierwsze sprzężenie spektrometrii ruchliwości jonów (IM) ze spektrometrią mas (MS) datowane na rok 1962¹ otworzyło nowe możliwości analizy strukturalnej i konformacyjnej. W tym analitycznym podejściu, określanym również jako spektrometria mas ruchliwości jonów (IM-MS), duża czułość, specyficzność i szybkość spektrometrii mas, co trafnie podkreślił McLafferty,² została dodatkowo wzbogacona o możliwość badania struktury molekuł – ich trójwymiarowego (3D) kształtu, wykorzystując pomiary ruchliwości jonów w fazie gazowej.

Choć na komercjalizację spektrometrów mas sprzężonych z techniką ruchliwości jonów trzeba było długo czekać, wraz z pojawieniem się nowych instrumentów, nastąpił szybki wzrost znaczenia i powszechnego zastosowania IM-MS w badaniach strukturalnych, zarówno w naukach chemicznych, jak i biologicznych. Obecnie dwa główne obszary

zastosowań IM-MS dynamicznie się rozwijają: rozróżnianie związków izomerycznych oraz szczegółowe badania strukturalne prowadzące do kompleksowego opisu kształtu 3D badanego układu.

Podobnie jak elektroforeza, spektrometria mas ruchliwości jonów umożliwia rozdział związków w formie zjonizowanej pod wpływem pola elektrycznego wykorzystując ich różne ruchliwości, ale w gazie buforowym, a nie w cieczy, co jest charakterystyczne dla metod elektroforetycznych. Możliwości IM-MS jako narzędzia separacyjnego są ściśle związane z różnicą ruchliwości rozdzielanych jonów w gazie buforowym oraz zdolnością rozdzielczą komory ruchliwości jonów. W ciągu ostatnich 16 lat pojawiły się na rynku nowe urządzenia do pomiarów ruchliwości jonów, różniące się rozdzielczością i zasadami działania, ale wciąż wykorzystujące w swoich podstawach połączenie pola elektrycznego i gazu buforowego (Tabela 1). Niektóre z wymienionych technik badania ruchliwości jonów są integralnymi częściami spektrometrów mas, a niektóre z nich są dostępne jako samodzielne lub dodatkowe urządzenia do spektrometrów mas.

Tabela 1. Przegląd dostępnych technik badania ruchliwości jonów.

Rodzaj techniki ruchliwości jonów (IM)	Rok	Firma	Rozdzielczość
Technika wędrującej fali (TWIM)	2006	Waters	30-45
Rura dryfowa Drift Tube (DT)	2014 2019	Agilent Technologies TofWerk Excellims	50-60 200 >70
Technika pułapkowa Trapped Ion Mobility (TIM)	2016	Bruker Daltonics	400-600 (w zależności od szybkości zmiany pola elektrycznego)
Komora Cykliczna Cyclic IM	2019	Waters	750 (przy 100 cyklach)
Technika bezstratnej manipulacji jonami Structures for lossless ion manipulations (SLIM)	2021	MOBILion Systems	200-300 dla drogi swobodnej jonów - 13 m i ponad 2000 dla urządzeń wielościeżkowych)
Techniki pól asymetrycznych Field Asymmetric Techniques (FAIMS, DMS)	2007 2010 2011	Thermo Scientific Owlstone AB Sciex	>100
Różnicowy analizator ruchliwości Differential Mobility Analyzers (DMA)	2012	SEADM	100

Kompleksowa analiza strukturalna należy do drugiego intensywnie rozwijającego się obszaru badań IM-MS. Wymaga ona eksperymentalnego wyznaczenia wartości zderzeniowego przekroju czynnego jonu analitu z gazem buforowym (CCS), na podstawie zmierzonego czasu dryfu jonu przez komorę ruchliwości jonów, uzupełnionego intensywnymi badaniami teoretycznymi. Wnioskowanie o trójwymiarowej strukturze związku opiera się na porównaniu otrzymanych eksperymentalnie wartości CCS i obliczonych teoretycznie dla struktur modelowych. Zatem wiarygodność przypisania struktury zależy od dokładności wyznaczonych eksperymentalnie i obliczonych teoretycznie wartości CCS.

Seria publikacji [A1-A6] mieści się w tych dwóch dominujących obszarach tematycznych badań IM-MS. Ta seria porusza zagadnienia związane z tematyką badań strukturalnych za pomocą IM-MS i obliczeń teoretycznych zarówno w zakresie separacji, jak i wyczerpującej analizy strukturalnej bioaktywnych związków chemicznych, takich jak:

- rozróżnianie związków izomerycznych metodą IM-MS – wybrane związki bioaktywne: epimery katechin [A1], diastereoizomery β -laktamów [A2], epimery peptydów [A3-A4] były przedmiotem badań, w których określałam możliwość IM-MS do rozdziału badanych związków w świetle zdolności rozdzielczej IM-MS;
- metody zwiększania zdolności separacyjnych IM-MS – modyfikacja warunków eksperymentalnych i rola dodatków w modulacji zdolności separacyjnych IM-MS [A1-A4];
- trójwymiarowy opis struktury z wykorzystaniem IM-MS – wyznaczenie eksperymentalnego CCS na podstawie pomiarów czasu dryfu oraz rola kalibrantów w pośrednich pomiarach ruchliwości jonów w dokładności wyznaczania CCS [A1-A6].
- rola obliczeń teoretycznych w badaniach strukturalnych za pomocą IM-MS [A1-A6].

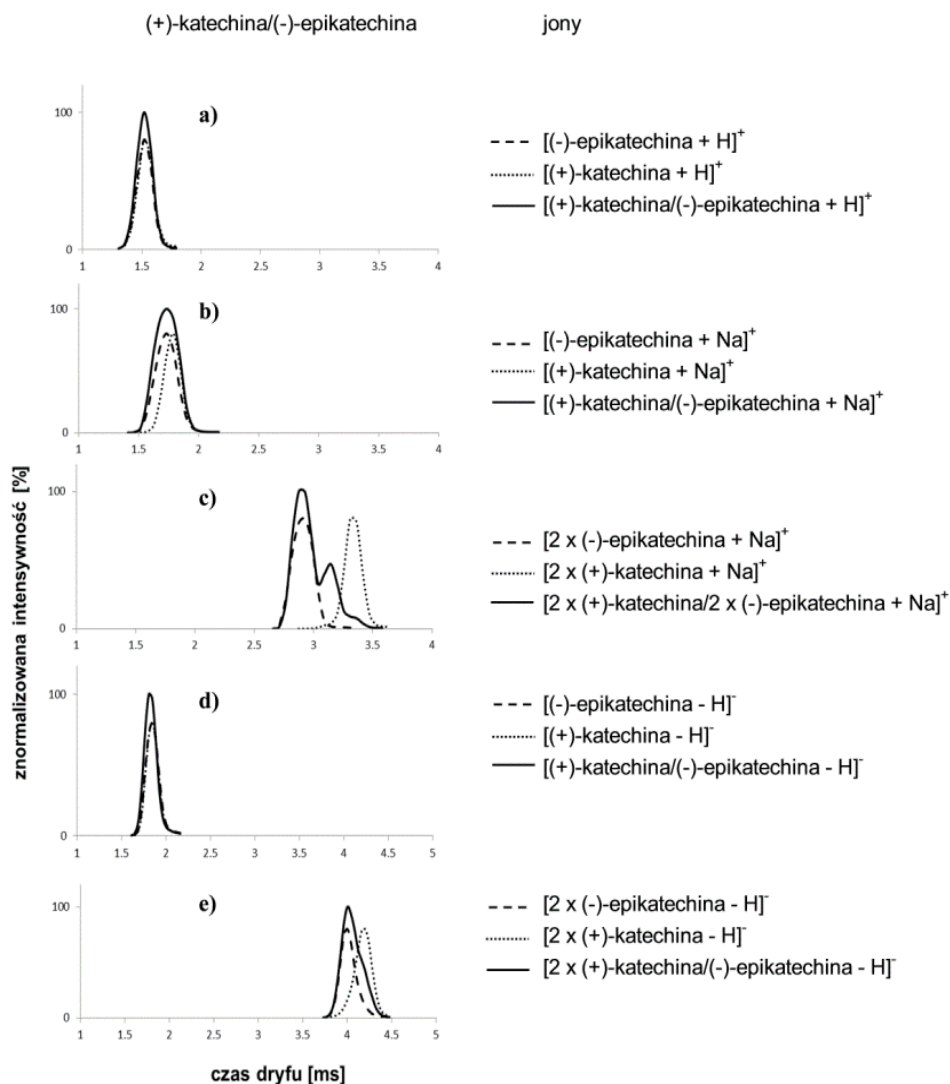
Pomyślnie zastosowanie techniki IM jako dodatkowego wymiaru separacji w MS jest ściśle związane z siłą rozdzielczą komory ruchliwości jonów wbudowanej w spektrometr mas i jej selektywnością. W momencie, gdy zaczęłam interesować się IM-MS (2012), rozdzielczość komór ruchliwości jonów IM była niska, ale nadal imponująca w porównaniu np. do zdolności rozdzielczej systemów HPLC (typowa liczba pól teoretycznych HPLC waha się między 8000-12000, a dla IM przy niskiej rozdzielczości 45 jest równa 11000), a zatem oferuje alternatywę dla tej techniki separacji. Niestety selektywność IM-MS jest dość niska i podobnie jak w przypadku innych technik rozdzielania, takich jak chromatografia cieczowa lub gazowa, technika ta również wymaga pewnego wysiłku, aby umożliwić separację blisko spokrewnionych strukturalnie związków, takich jak różne typy izomerów, asocjaty lub supramolekularne kompleksy, szczególnie dla przyrządów IM o niskiej do średniej zdolności rozdzielczej.

Stosowano różne podejścia do podwyższenia selektywności IM. W zależności od rodzaju zastosowanej techniki ruchliwości jonów zaimplementowanej w spektrometrze mas różne modyfikacje warunków eksperymentalnych są możliwe i dostępne. Do najważniejszych z nich należą: parametry pola elektrycznego,³ ciśnienie,^{4, 5} temperatura,⁶ rodzaj i skład gazu buforowego^{7, 8} Inne podejścia do zwiększania selektywności IM obejmują derywatyzację kowalencyjną^{9, 10} lub niekowalencyjną¹¹⁻¹³ odczynnikami

przesunięcia IM. Efekt zastosowania modyfikatorów selektywności jest zależny od klasy związku i może się zmieniać czasami w nieprzewidywalny sposób ze względu na skomplikowany mechanizm separacji IM, w którym nie tylko masa, ładunek lub kształt jonu, ale także oddziaływania dipolowe między jonami i cząsteczkami gazu buforowego mają istotny wpływ obserwowaną ruchliwość jonów.^{14, 15} W pierwszych czterech artykułach [A1-A4] zmierzyłam się z często spotykanym problemem ograniczonej selektywności IM-MS w analizie związków izomerycznych. Ograniczona selektywność IM-MS prowadzi do uzyskania niepełnych informacji strukturalnych, stąd poprawa rozdziału jest konieczna do zapewnienia kompleksowego opisu strukturalnego.

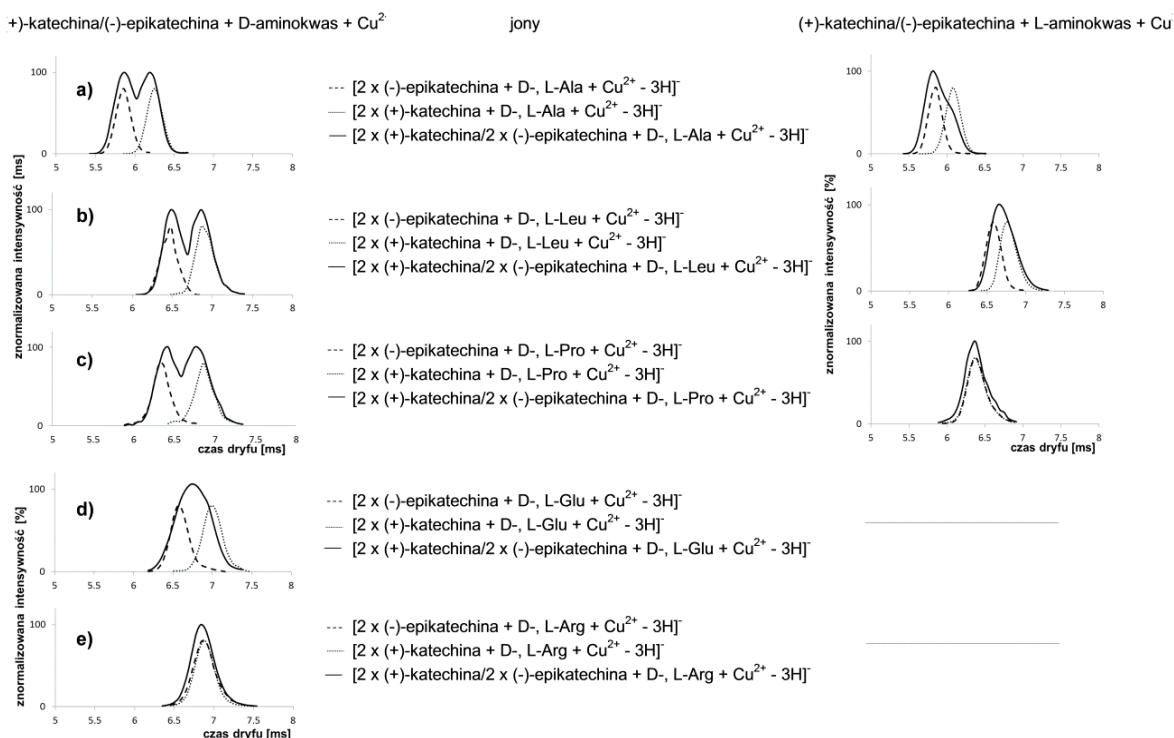
Pierwsza praca [A1] poświęcona była próbie rozdzielenia dwóch wybranych epimerycznych flawonoidów: (+)-katechiny i (-)-epikatechiny za pomocą IM-MS. Związki te należą do grupy flawan-3-oli. Flawonoidy są szeroko rozpowszechnione w roślinach spożywczych (np. guarana, kakao) i napojach (np. czerwone wino, zielona herbata). Flawan-3-ole stanowią interesującą grupę związków ze względu na ich kilka unikalnych właściwości farmakologicznych, w tym działanie antyrakowe,¹⁶ antybiotyczne,¹⁷ przeciwzapalne¹⁸ i antyoksydacyjne.¹⁹ Najczęściej stosowanymi metodami analitycznymi do analizy flawonoidów są wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS) i chromatografia gazowa (GC).^{20, 21} Szereg badań mających na celu identyfikację flawonoidów przeprowadzono z wykorzystaniem desorpcji polem (FD)²² i bombardowania szybkimi atomami (FAB).²³ Chociaż techniki te zapewniają wysoką specyficzną i czułość analizy flawonoidów, nie są wystarczające do osiągnięcia wysokiej selektywności rozdziału związków diastereoizomerycznych, stąd potrzeba rozwoju nowych narzędzi analitycznych umożliwiających ich szybkie i łatwe rozdzielenie prowadzące do ich identyfikacji.

Prace eksperymentalne poparte obliczeniami teoretycznymi dostarczyły dowodów na to, że bezpośrednia analiza IM-MS epimerycznych katechin nie pozwala na ich rozdzielenie (Rysunek 1). Różnice w przekrojach czynnych jonów (ΔCCS) pomiędzy tymi dwoma epimerami, wynoszące od 0,2 do 0,9 Å², w zależności od rodzaju jonu ($[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ lub $[\text{M} - \text{H}]^-$), są zbyt małe, w związku z tym obserwujemy ich nieefektywny rozdział. Mimo że w przypadku jonów dimerycznych zaobserwowano pewien stopień rozdziału (-)-epikatechiny i (+)-katechiny, obecność dodatkowego piku odpowiadającego tworzeniu mieszanego dimeru może skomplikować widmo i prowadzić do błędnej interpretacji wyników, zwłaszcza w przypadku analizy składu złożonej mieszaniny.



Rysunek 1. Rozkłady czasów dryfów (t_d)wybranych typów jonów zarejestrowane dla katechiny, epikatechiny i ich równomolowej mieszaniny.

W celu przeciwdziałania tej ograniczonej selektywności IM-MS z powodzeniem zastosowałam stereoselektywne oddziaływania z chiralnymi modyfikatorami i metalami przejściowymi (Rysunek 2). Spośród różnych badanych kombinacji z chiralnymi ligandami, takimi jak: *D*- i *L*-aminokwasy (*D*- i *L*-AA) i/lub dodatkowe kationy metali, chiralne etery koronowe, kwas winowy i heptakis(2,6-di-O-metylo)- β -cyklodekstryna, tylko klastry mające postać $[2M + D-AA + Cu^{2+} - 3H]^-$ wykazywały poprawę separacji. Uzyskałam eksperymentalne dowody na to, że nie tylko wybór enancjomeru, ale również hydrofobowość aminokwasu wpływa na proces rozdzielania. Pozytywne wyniki otrzymałam dla hydrofobowych *D*-aminokwasów, takich jak *D*-alanina, *D*-leucyna, *D*-prolina. Najlepszą rozdzielczość (R_{p-p}) równą 0,71 uzyskałam dla klastrów $[2M + D-leucyna + Cu^{2+} - 3H]^-$, a granicę wykrywalności (LOD) dla opracowanej metody oszacowałam na poziomie 12,9 $\mu\text{g/ml}$.



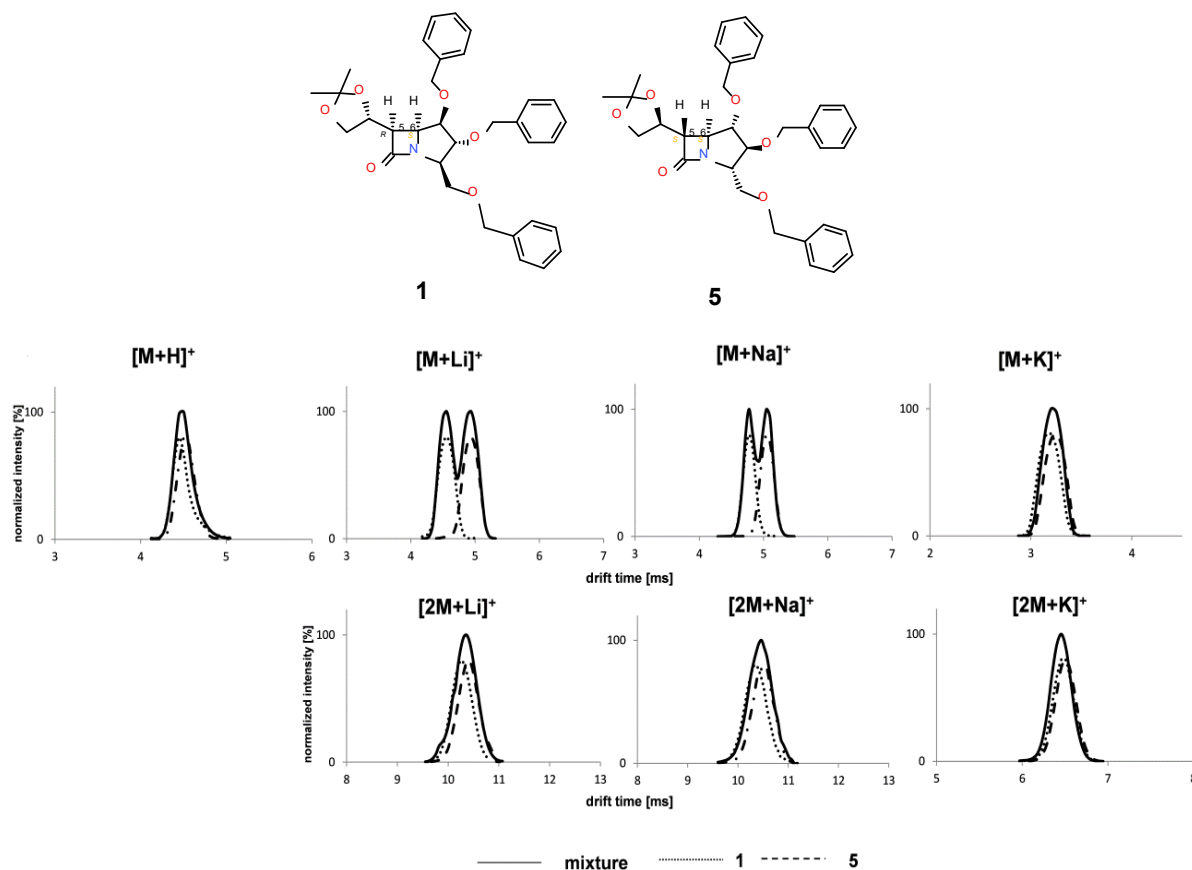
Rysunek 2. Rozkłady czasów dryfów jonów $[2M + D/L\text{-aminokwas} + \text{Cu}^{2+} - 3\text{H}]^-$ zarejestrowane dla roztworów zawierających: katechinę lub epikatechinę lub epimeryczne katechiny (1:1), Cu^{2+} i **a)** *D*-, *L*-alaninę, **b)** *D*-, *L*-leucynę, **c)** *D*-, *L*-prolinę, **d)** kwas *D*-glutaminowy oraz **e)** *D*-argininę.

Zachęcona sukcesem w opracowaniu dodatkowej metodologii rozdzielania epimerycznych katechin, zwróciłam uwagę na rozdzielanie izomerycznych β -laktamów. β -Laktamy są jednymi z najlepiej poznanych i szeroko badanych niearomatycznych związków heterocyklicznych ze względu na ich aktywność biologiczną jako antybiotyków²⁴ oraz ich rolę jako cennych półproduktów w syntezach.²⁵ Pierścień β -laktamowy jest wspólną częścią kilku rodzin antybiotyków, takich jak penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy i monobaktamy, które z tego powodu nazywane są również antybiotykami β -laktamowymi.

Podczas gdy wiele metod analitycznych i spektroskopowych umożliwia wysoce specyficzne i czułe wykrywanie β -laktamów w celu ich analizy ilościowej, rozróżnianie ich izomerów nadal pozostaje trudnym zadaniem. Dlatego postanowiłam zbadać zastosowanie IM-MS do efektywnego rozdziału umożliwiającego dalszą analizę strukturalną wybranych izomerycznych β -laktamów [A2]. Moim szczególnym celem było zbadanie procesu rozdziału w zależności od konfiguracji atomów węgla badanych diastereomerów β -laktamowych oraz zmiennych eksperymentalnych.

Badania te wykazały, że konfiguracja podstawników na atomach C5 i C6 (Rysunek 3) odgrywa kluczową rolę w skuteczności rozdziału diastereoizomerów β -laktamowych. Co ciekawe, są to te same atomy, których konfiguracja odpowiada za aktywność biologiczną β -laktamów. Zbadałam wpływ czynnika kationowego na różnicowanie diastereoizomerów β -laktamowych, ponieważ obecność jonu metalu może wyzwać zmiany konformacyjne cząsteczki,²⁶ przyczyniając się w ten sposób do separacji blisko powiązanych strukturalnie indywiduów.²⁷ Odkryłam, że natura metalu ma znaczący wpływ na czasy dryfu jonów. Efekt ten zależy od wielkości kationu metalu oraz charakteru analizowanych jonów. Dla

przykładowej pary diastereoizomerów **1** i **5** obecność kationu litu nieznacznie zwiększa separację β -laktamów ($\Delta t_d = 0,36$ ms, $R_{p-p} = 0,74$) w porównaniu z jonami sodowanymi ($\Delta t_d = 0,28$ ms, $R_{p-p} = 0,72$), natomiast nie stwierdziłam zwiększenie separacji w przypadku jonów protonowanych lub dimerycznych typu $[2M + \text{Metal}]^+$ przy zmianie typu metalu (Rysunek 3). Wpływ metalu na skuteczność rozdziału IM-MS przypisałam znaczeniu oddziaływań kation- π w stabilizacji konformacji β -laktamowych.



Rysunek 3. Rola czynnika kationowego w rozróżnianiu diastereoizomerycznych β -laktamów pokazana na przykładzie rozdzielania diastereoizomerów **1** i **5**.

Zastosowanie gazu buforowego o różnych masach, momentach dipolowych i polaryzowalności ma znaczący wpływ na czas dryfu i proces rozdzielania w IM-MS.^{7, 28} Ogólnie rzecz biorąc, zastosowanie bardziej polarnych i cięższych gazów buforowych powinno zapewnić zwiększenie separacji w IM-MS. Z drugiej strony, gęstość ładunku jonu i jego rozmiar również muszą być brane pod uwagę przy omawianiu wpływu gazu buforowego na rozdzielczość. Niestety, nie zaobserwowałam poprawy rozdzielania badanych diastereoizomerów przy zmianie gazu buforowego z azotu na bardziej polaryzowalny dwutlenek węgla, co można wytłumaczyć niewielkimi różnicami momentów dipolowych pomiędzy badanymi jonami β -laktamów (poniżej 10%). Zaobserwowałam natomiast przede wszystkim zmniejszenie ruchliwości jonów dla CO_2 jako masywniejszego gazu buforowego.

Dodatkowe czynniki wpływające na proces separacji odnoszą się do warunków eksperymentalnych, takich jak parametry opisujące pole elektryczne. W stosowanej przeze mnie w badaniach ruchliwości jonów techniki wędrującej fali (TWIM) prędkość fali i jej

amplituda są parametrami opisującymi pole elektryczne komory ruchliwości jonów. W badaniach podkreśliłam, że ich wartości mają kluczowe znaczenie dla rozdziału diastereoizomerów β -laktamów, a odpowiednie dostrojenie tych parametrów jest niezbędne do uzyskania rozdziału.

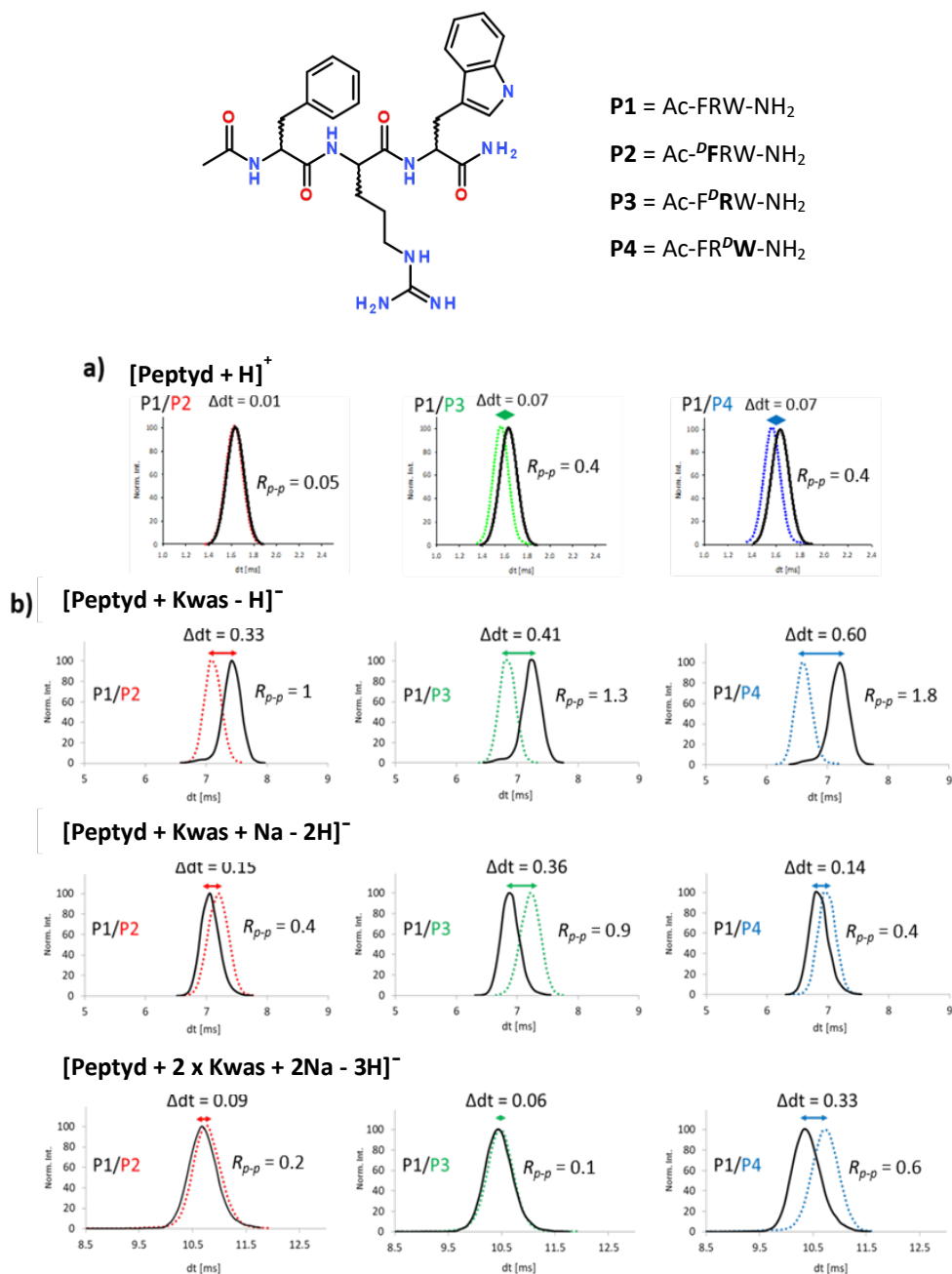
Nie ulega wątpliwości, że zastosowanie odczynników przesunięcia IM stanowi skuteczny sposób na wywołanie lub poprawę selektywności rozdziału w analizie IM-MS. Dlatego też metodologia ta była badana również w kierunku rozdziału izomerów należących do jednej z najważniejszych klas związków biologicznie czynnych: aminokwasów i peptydów. Na przykład, zastosowano ją do rozróżnienia enancjomerów tryptofanu i fenyloalaniny w różnicowej spektrometrii ruchliwości jonów, stosując *N-tert-butoksykarbonylo-O-benzylo-L-serynę* jako odczynnik różnicującego czas dryfu.²⁹ Dodatkowe odkrycia obejmują częściowe rozróżnienie enancjomerów aminokwasów aromatycznych w oparciu o tworzenie trimerycznych kompleksów związanych z Cu(II) typu $[(^D\text{Pro})_2+^{D/L}\text{AA}+\text{Cu}^{\text{II}}-\text{H}]^+$.¹³ Ostatnio wykazano, że dimeryzacja, oligomeryzacja i obecność jonów K^+ poprawiają rozdział wybranych epimerycznych peptydów dermorfiny i achatyny-I.³⁰ Te wstępnie przedstawione przykłady wyraźnie świadczą o tym, że rozdział izomerycznych aminokwasów nie jest trywialnym zadaniem dla IM-MS. Dlatego podjęłam ten szczególnie istotny temat, skupiając się na rozróżnieniu epimerów peptydów [A3 i A4]. Skupiłam się przede wszystkim na sekwencjach peptydowych zawierających zasadowe łańcuchy boczne. Chociaż od dawna przyjmuje się, że u zwierząt wyższych białka i peptydy zbudowane są wyłącznie z *L*-aminokwasów, analiza peptydów zawierających *D*-aminokwasy jako źródła naturalnie i nienaturalnie występujących modyfikacji w organizmach żywych staje się coraz ważniejszym zagadnieniem.^{31,32}

Powszechnie wiadomo, że jedna z najbardziej uniwersalnych i najczęściej stosowanych technik analitycznych – chromatografia ciekłowa, a w szczególności chromatografia w odwróconych fazach, nawet przy uwzględnieniu kolumn nowej generacji, wykazuje pewne słabości w rozdziale peptydów zawierających miejsca zasadowe i ogólnie związków zasadowych.³³ Dlatego też podeszłam do tego zagadnienia, badając selektywność rozdzielania wybranych peptydów przy użyciu IM-MS i opracowując dodatkowe metodologie do jej poprawy.

Wykorzystałam metodologię addycji odczynnika przesunięcia IM i oceniłam wpływ kompleksowania z kwasami organicznymi na rozdział jonów wybranych epimerów tripeptydowych zawierających reszty argininowe [A3]. Wykorzystanie efektu rozpoznania reszt aminokwasowych poprzez kompleksowanie z kwasami nie jest nowym podejściem i stanowi racjonalny wybór. Ponieważ siły elektrostatyczne są ze swojej natury zwiększone w próżni, kompleksy pomiędzy dodatnio naładowanymi miejscami (oligo)peptydów i ujemnie naładowanymi kwasami są wystarczająco stabilne, aby można je było wykorzystać do zliczania i identyfikacji miejsc podstawowych w różnych układach chemicznych za pomocą spektrometrii mas, z pewnymi ograniczeniami zależnymi od struktury kwasu.³⁴⁻³⁶

Istotnie, zaobserwowałam tworzenie się stabilnych niekowalencyjnych kompleksów pomiędzy analizowanymi epimerycznymi tripeptydami zawierającymi resztę argininową a karboksylowymi lub sulfonowymi monokwasami i dikwasami w fazie gazowej pod

wpływem zwiększonego ciśnienia w komorze ruchliwości jonów. Kompleksowanie to wywołało reorganizację konformacyjną epimerycznych peptydów wokół miejsc anionu/ów karboksylanowego/ych kwasów, aby zapewnić efektywną solwatację ładunków ujemnych przez atomy wodoru z grup donorowych peptydów. Ogólnie rzecz biorąc, kompleksowanie z kwasem prowadziło do poprawy rozróżnienia epimerów peptydów w porównaniu z analizą czystych epimerów, a efektywność tej separacji była związana ze strukturą kwasu. Kompleksowanie z kwasem dibenzoilo-*D*-winowym pozwoliło na rozróżnienie wcześniej nierozróżnialnych lub słabo rozróżnialnych jonów epimerycznych peptydów za pomocą IM-MS z efektywnością rozdziału R_{p-p} pomiędzy 1 a 1,8 (Rysunek 4).



Rysunek 4. Rozkład czasów dryfów wybranych jonów odpowiadających a) protonowanym peptydom i b) trzem różnym typom asocjatów epimerów peptydów z kwasem dibenzoilo-*D*-winowym (Kwas).

Zaobserwowane zmiany przesunięć czasów dryfów związanych z kompleksowaniem kwasu dibenzoilo-*D*-winowego udało mi się wyjaśnić dzięki szczegółowym badaniom strukturalnym, polegającym na wyznaczeniu eksperymentalnych wartości przekroju czynnego analizowanych jonów i odniesieniu tych wartości do wartości teoretycznych uzyskanych dla struktur modelowych.

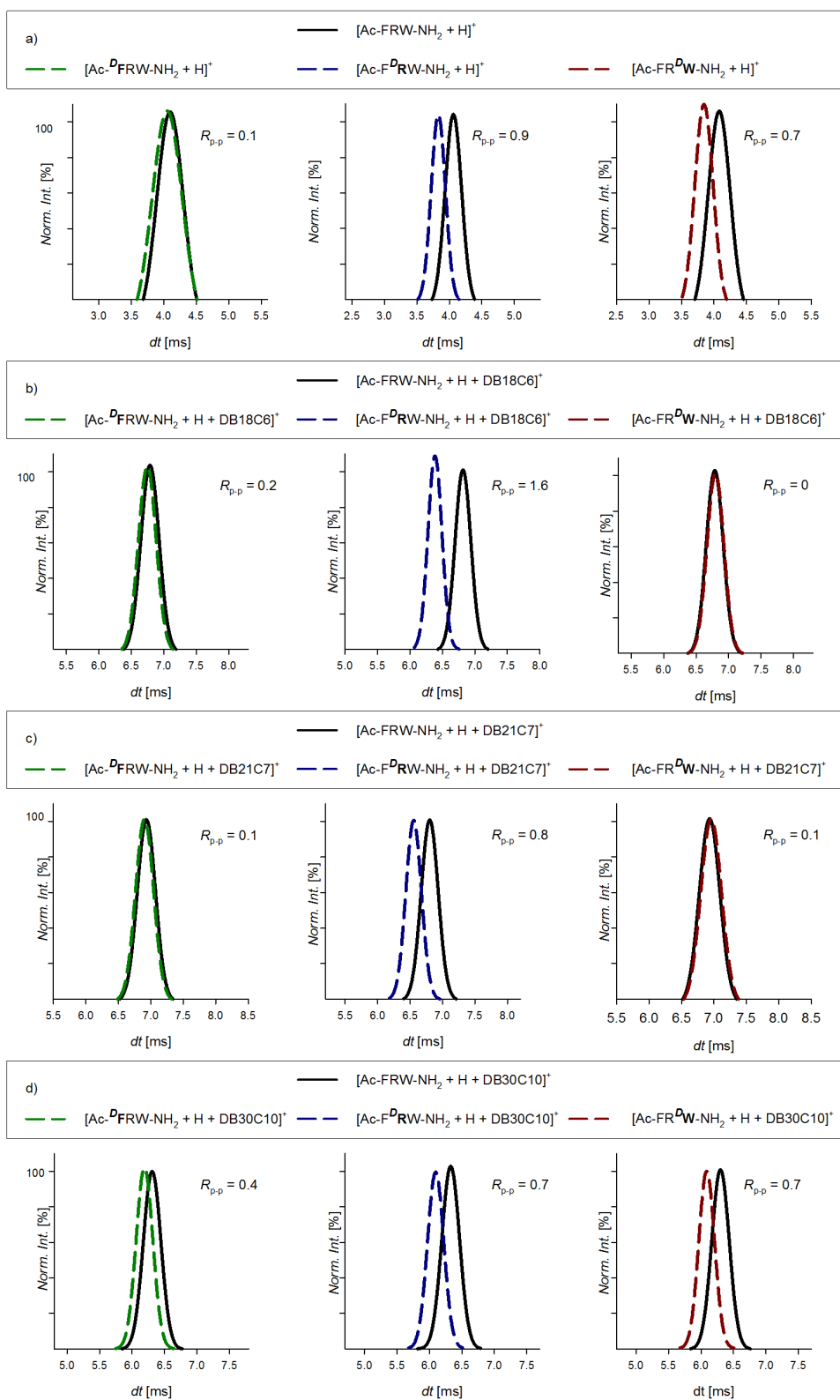
W moich badaniach wykazałam, że wykorzystanie kwasów organicznych jako odczynników różnicujących czasy dryfu epimerów peptydów prowadzi do zwiększenia selektywności rozdziału w IM-MS, niemniej jednak związana z tym analiza w trybie jonów ujemnych ma swoją znaną wadę, a mianowicie zmniejszoną czułość w porównaniu z analizą w trybie jonów dodatnich. Aby poradzić sobie z tą niedogodnością, zamiast dianionów można zastosować zwitterjony, jednak ze względu na możliwą obecność ujemnie naładowanych łańcuchów bocznych w sekwencjach peptydowych, takie podejście może mieć ograniczone zastosowanie. W związku z tym, zwróciłam uwagę na odczynniki przesunięcia IM o charakterze neutralnym, które rozpoznane przez daną resztę jednostki peptydowej mogą zróżnicować przesunięcia ruchliwości jonów epimerów peptydów, zachowując jednocześnie zalety analizy w trybie jonów dodatnich.

Jako odczynniki przesunięcia IM wybrałam etery koronowe. Ze względu na dostępne bogate zróżnicowanie strukturalne zarówno pod względem wielkości pierścieni, jak i podstawników, etery koronowe należą do ważnej grupy odczynników kompleksujących stosowanych w rozpoznawaniu jonów i konstrukcji molekularnych.^{37, 38} Zdolność eterów koronowych do wiązania dodatnio naładowanych łańcuchów bocznych lizyny i argininy³⁹⁻⁴¹ została wykorzystana w określaniu struktury i charakterystyki powierzchni peptydów i białek przy użyciu spektrometrii mas z metodą jonizacji elektrosprej (ESI-MS).⁴²⁻⁴⁵ Na przykład 18-korona-6 (18C6) skutecznie solwatowała łańcuch boczny reszty lizynowej w białku, dostarczając informacji o jej zewnętrznej ekspozycji. Selektywność asocjacji dibenzo-30-korony-10 (DB30C10) i 18-korony-6 została wykorzystana do określenia odpowiednio obecności odpowiednio argininy lub lizyny w sekwencjach peptydowych.⁴³

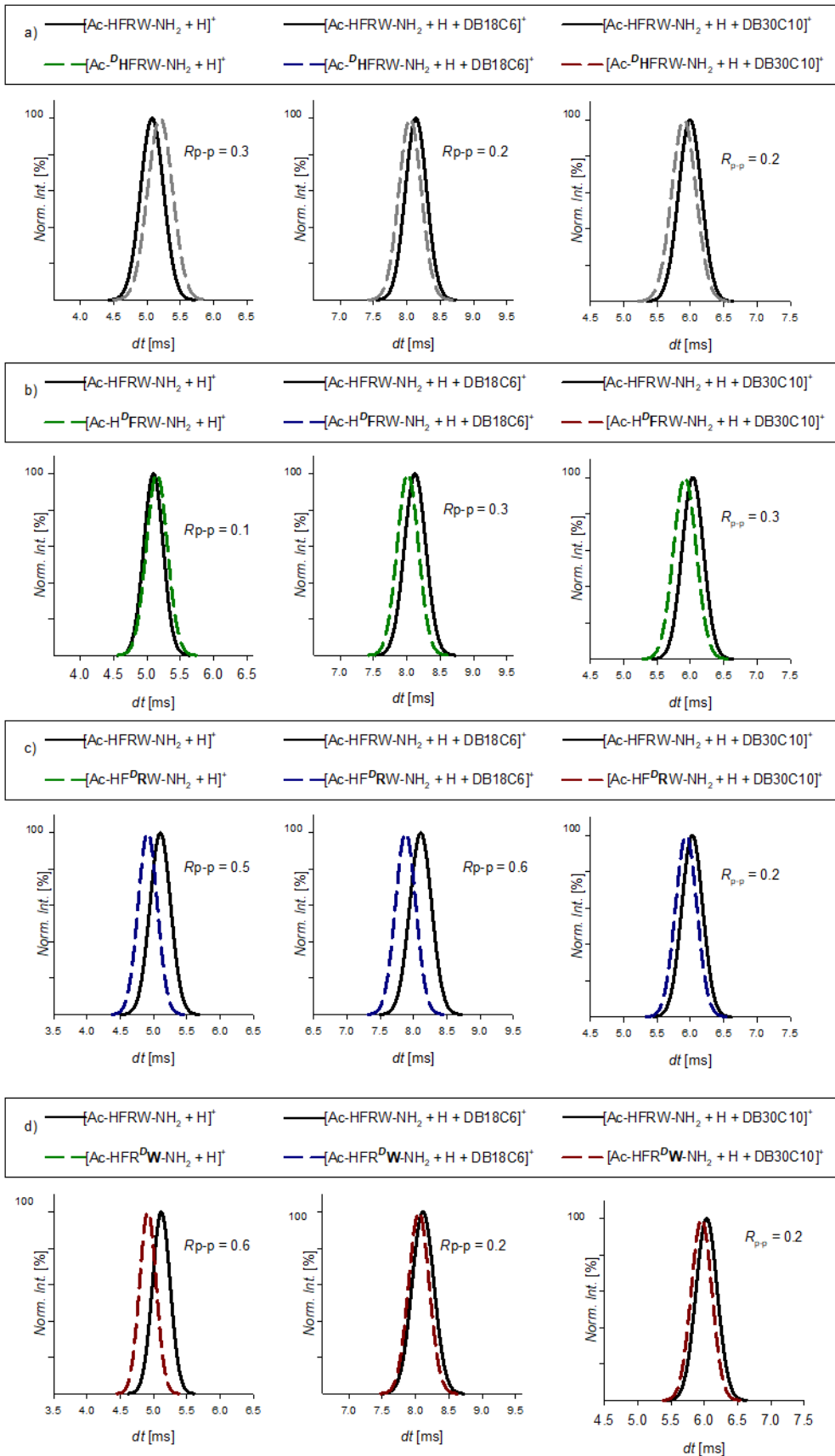
Seria eterów koronowych była wcześniej badana jako odczynniki różnicujące czasy dryfu w analizie peptydów metodą spektrometrii ruchliwości jonów. Badania te koncentrowały się jednak na rozróżnieniu jonów izobarycznych lub jonów, które mają podobne przekroje czynne, ale różne wartości *m/z*. Obserwowane przesunięcia w IM-MS były głównie związane z tworzeniem się kompleksów różniących się stechiometrią, co wynikało z różnej sekwencji peptydów, a nie ze specyficznym trybem koordynacji pomiędzy eterem koronowym a peptydem. Dotychczasowe badania dostarczyły więc jedynie fragmentarycznych informacji na temat wpływu obecności eteru koronowego na rozróżnienie izomerycznych peptydów.

Zmotywowana tym faktem postanowiłam wypełnić tę lukę i określić wpływ mikrosolvatacji łańcucha bocznego aminokwasu (argininy) za pomocą eteru koronowego na rozdział epimerów peptydów: tri- i tetrapeptydów zawierających resztę argininową [A4]. Różne etery koronowe o różnej wielkości pierścieni i podstawnikach (18-korona-6, dibenzo-18-korona-6, dicykloheksano-18-korona-6, chiralny eter kwasu tetrakarboksyłowego-18-korona-6, dibenzo-21-korona-7, i dibenzo-30-crown-10) wybrałam do zbadania zarówno

skuteczności solwatacji grupy guanidynowej arginyiny przez eter koronowy, jak i wpływu grup podstawnikowych wbudowanych w pierścień koronowy na rozróżnienie i rozdzielanie epimerów modelowych peptydów.



Rysunek 5. Efekt mikrosolvatacji grupy guanidynowej arginyiny (efektywność solwatacji zwiększa się w szeregu: DB18C6 < DB21C7 < DB30C10) na selektywność rozdziału badanych epimerów tripeptydu.



Rysunek 6. Efekt mikrosolvatacji grupy guanidynowej arginyiny na selektywność rozdzielu badanych epimerów tetrapeptydu.

W fazie gazowej konformacja peptydu związana jest z rosnącą rolą oddziaływań elektrostatycznych, w wyniku czego istotne stają się oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe pomiędzy naładowanymi, protonowanymi łańcuchami bocznymi a grupami karbonyłowymi szkieletu. Zmiany konformacyjne w wyniku wzrostu znaczenia tych wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań zaobserwowano w przypadku jonów białkowych po ich przeniesieniu z roztworu do fazy gazowej.⁴⁶ Stąd mikrosolvatacja zasadowych łańcuchów bocznych peptydów może drastycznie zmienić konformacje peptydów, prowadząc do przesunięcia ich czasów dryfów i ostatecznie do ich selektywnego rozdziału, jak wykazano wcześniej w przypadku polipeptydów.⁴⁷

W moich badaniach wykazałam, że ogólny efekt związany z wpływem kompleksowania przez eter koronowy na rozróżnienie badanych epimerów peptydów wynika z połączonej efektywności solwatacji reszt zasadowych aminokwasów, oddziaływań pomiędzy podstawnikami eteru koronowego i łańcuchami bocznymi peptydów oraz długości peptydu. Ogólnie rzecz biorąc, efektywna mikrosolvatacja zmniejsza separację epimerów, chociaż pewne oddziaływania steryczne mogą być nadal istotne i mogą zmienić tę tendencję (Rysunek 5). Wydłużenie sekwencji peptydu z tri- do tetrapeptydu drastycznie zmniejsza pozytywny efekt związany z kompleksowaniem eteru koronowego na proces rozdziału epimerów (Rysunek 6). Ponadto, wykryte miejscowo-specyficzne rozróżnienie epimeru ^DR (*D*-arginina) spowodowane głównie czynnikami sterycznymi jest zależne od długości peptydu, co ujawnia się poprzez obserwację jedynie niewielkiego wzrostu selektywności rozdziału w przypadku tetrapeptydu (Rysunek 6c) w porównaniu ze znacznym jej wzrostem w przypadku tripeptydu (Rysunek 5b).

Uzyskane wyniki doprowadziły mnie do ogólnego wniosku, że mikrosolvatacja z wykorzystaniem eterów koronowych jako metoda mająca na celu zwiększenie rozdziału epimerycznych peptydów za pomocą IM-MS ma ograniczone zastosowanie. Ponadto, ponieważ selektywność kompleksowania eterów koronowych nie koreluje ze wzrostem selektywności rozdziału IM, należy spodziewać się dodatkowego spadku czułości przy zastosowaniu tego podejścia.

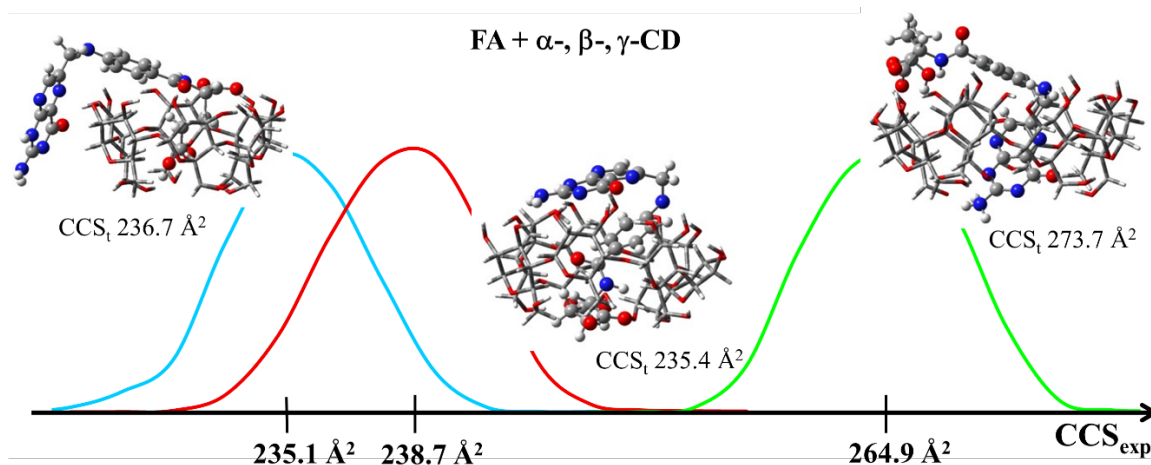
Ostatnie dwie publikacje [A5 i A6] z mojej serii dotyczą zastosowania IM-MS do trójwymiarowego opisu strukturalnego związków chemicznych. Niewątpliwie temat ten cieszy się coraz większym zainteresowaniem ze względu na jego przydatność w dostarczaniu szczegółowych informacji o układach, których nie można jednoznacznie scharakteryzować tradycyjnymi metodami, takimi jak krystalografia rentgenowska, magnetyczny rezonans jądrowy czy spektroskopia w podczerwieni, ze względu na niemożność tworzenia kryształów, złożoność matrycy, brak zmian w charakterystycznych pasmach lub złożoność badanych układów. Do takich układów należą kompleksy supramolekularne kwasu foliowego (FA) z natywnymi cyklodekstrynami (α -CD, β -CD i γ -CD).

Badania różnorodności strukturalnej kompleksów FA-CD przyciągnęły uwagę naukowców ze względu na możliwość zwiększenia rozpuszczalności, szybkości rozpuszczania, biodostępności i stabilności FA i innych strukturalnie pokrewnych związków bioaktywnych poprzez włączenie ich do kompleksu inkluzyjnego z receptorem CD.^{48, 49}

Niestety, szczegółowa rentgenowska analiza strukturalna tych kompleksów nie była możliwa, ponieważ one nie krystalizują. W swojej pracy [A5] wykazałam, że IM-MS może być z powodzeniem wykorzystana jako alternatywne podejście, aby zapewnić wgląd w sposób niekowalencyjnego łączenia się cząsteczek pomiędzy FA i natywnymi cyklodekstrynami.

Wykonane przeze mnie eksperymenty z użyciem techniki IM-MS i obliczenia półempiryczne, poprzedzone badaniami dokowania, dostarczyły wyczerpujących informacji strukturalnych o kompleksach FA/CD. Ostatecznie zaproponowano dwa różne sposoby niekowalencyjnego łączenia się FA i CD: kompleks ekskluzyjny dla FA/ α -CD oraz strukturę typu rotaksanowego, przypisaną kompleksom FA z β - i γ -CD (Rysunek 7). W kompleksie typu rotaksanowego FA/ β -CD reszta glutaminianowa i aromatyczny pierścień pterydynowy FA oddziałują odpowiednio z pierwszo- i drugorzędowymi resztami hydroksylowymi obwódki CD, podczas gdy część aminobenzoesowa pozostaje wewnątrz wnęki β -CD.

Podobna struktura dla FA/ γ -CD okazała się mniej stabilna niż sposób asocjacji, w którym aromatyczny pierścień pterydynowy wnika do wnęki γ -CD, podczas gdy reszta glutaminianowa z częścią aminobenzoesową FA znajduje się na zewnątrz stożka CD przy jego szerszej krawędzi. Dalszy wgląd w strukturę kompleksów FA i CD uzyskałam z obliczeń termodynamicznych, które wykazały, że proces tworzenia kompleksów jest wysoce egzotermiczny. Stabilność kompleksu w fazie gazowej wzrasta zgodnie z kolejnością FA/ α -CD < FA/ β -CD < FA/ γ -CD. Kolejność ta jest zgodna z wcześniej wyznaczoną względną stabilnością tych kompleksów w fazie gazowej, ustaloną na podstawie krzywych dysocjacji kompleksów FA/CD.⁴⁹



Rysunek 7. Teoretyczne wartości przekroju czynnego (CCS_t) obliczone dla najkorzystniejszych energetycznie struktur niekowalencyjnych kompleksów FA z α -CD, β -CD i γ -CD porównane z wartościami doświadczalnymi (CCS_{exp}).

Badania strukturalne za pomocą IM-MS wymagają zarówno dokładnego określenia wartości przekroju czynnego badanego jonu na podstawie pomiaru jego ruchliwości w gazie buforowym (CCS_{exp}), jak i wyczerpujących obliczeń teoretycznych w celu uzyskania struktur modelowych i obliczenia dla nich teoretycznego przekroju czynnego CCS_t który stanowi podstawę do dalszych rozważań i weryfikacji eksperymentalnej. Dokładność

CCS_{exp} jest omawiana głównie w odniesieniu do wtórnych metod IM, które z kolei dostarczają wtórnych wartości CCS_{exp} uzyskanych na drodze kalibracji komory ruchliwości jonów względem wybranych wzorców. Ogólne wymagania dotyczące jonów kalibracyjnych dla pomiarów TWIM obejmują dopasowanie w obrębie naładowania jonu (pojedynczo lub wielokrotnie naładowane, dodatnie, ujemne) oraz klasy chemicznej w celu uzyskania podobnych efektów relaksacji.⁵⁰ Pomiary ruchliwości jonów odpowiadających kompleksom FA/CD przy użyciu TWIM wymagały zatem odpowiednich wzorców kalibracyjnych. Powszechnie stosowane w IM-MS wzorce nie spełniały takich wymagań jak odpowiedni ładunek i podobieństwo strukturalne do jonów mierzonych, dlatego zaproponowałam i z powodzeniem wdrożyłam inne podejście polegające na zastosowaniu w procedurze kalibracji teoretycznych wartości przekrojów czynnych obliczonych dla jonów FA i CD.

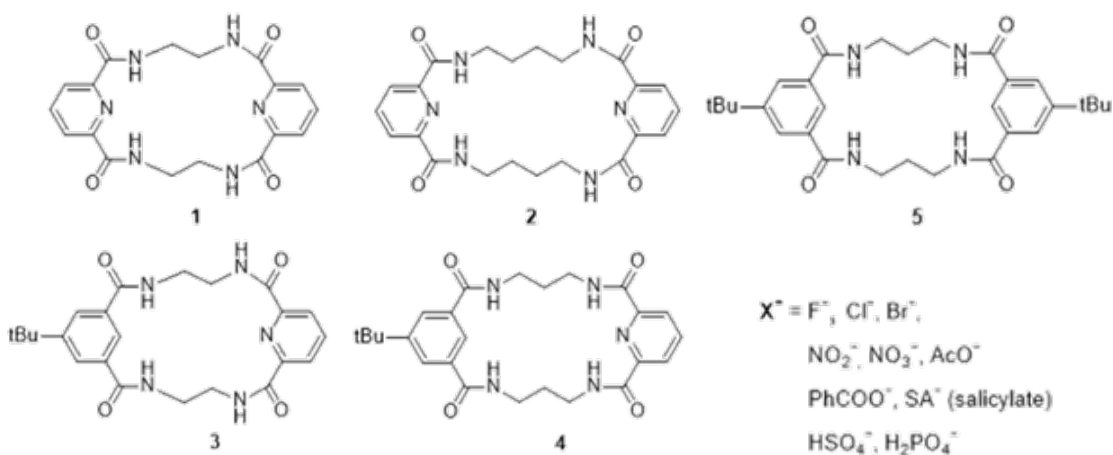
Badania IM-MS wsparte obliczeniami teoretycznymi oraz związana z nimi wdrożona metodologia wyznaczania CCS_{exp} , odpowiednia dla pomiarów TWIM, umożliwiły kompleksowy opis strukturalny kompleksów FA/CD z podziałem na inkluzyjne i ekskluzyjne sposoby asocjacji. Warto podkreślić, że wszelkie badania oparte na spektrometrii mas, w tym IM-MS, choć zasadniczo wykonywane w fazie gazowej, mogą nieść ważne i dokładne informacje o strukturze związków chemicznych w roztworze, gdy stosowana jest technika miękkiej jonizacji. Postuluje się, że odparowaniu związku podczas jonizacji elektropray (ESI) towarzyszy chłodzenie i powstanie stanów zamrożonych w fazie gazowej, które są energetycznie ustabilizowane po usunięciu rozpuszczalnika. Z tego powodu, w badaniach wykorzystujących spektrometrię mas, w przypadku dużych biomolekuł i kompleksów, często odwołuje się do stanów natywnych, w których, ze względu na wielokierunkową interaktywność, konformacja natywna jest zachowana po przejściu z roztworu do fazy gazowej.^{51, 52} To założenie o zachowaniu konformacji otworzyło nowe możliwości zastosowania IM-MS do analizy strukturalnej supramolekularnych układów anion - makrocycliczny receptor w roztworze, co z powodzeniem wykazałam w publikacji [A6].

Aniony są reaktywnymi substancjami istotnymi w sztucznych, przemysłowych procesach oraz naturalnych zjawiskach obserwowanych w naukach biologicznych i środowiskowych. Badania nad oddziaływaniami anionów z różnymi związkami i ich rozpoznaniem są obecnie prowadzone w bardzo licznych jednostkach naukowych. Projektowanie i synteza receptorów umożliwiających selektywne, specyficzne i czułe rozpoznanie anionów jest szczególnie pożądane, dlatego też stało się jednym z głównych celów badawczych wielu chemików organicznych. Funkcjonalność receptorów anionowych (zarówno syntetycznych, jak i biologicznych) jest podyktowana ich strukturą i dostępnymi sposobami oddziaływania. Ważnym wyzwaniem przy projektowaniu nowych receptorów dedykowanych anionom jest więc ich analiza strukturalna. Tradycyjne metody analizy strukturalnej, szeroko stosowane w badaniach nad rozpoznaniem anionów, pozwalają na opisanie kompleksów anion-receptor w stanie stałym w kryształach za pomocą analizy dyfrakcji rentgenowskiej, w stanie stałym za pomocą spektroskopii NMR ciała stałego (ssNMR), a w roztworze za pomocą standardowej spektroskopii NMR. Oprócz tych najbardziej powszechnych metod analitycznych, inne techniki spektroskopowe również dobrze nadają się do badań rozpoznania anionów, podobnie jak do analizy innych struktur

supramolekularnych. Trudności powszechnie związane z tymi metodami obejmują: niepożądaną postać strukturalną (efekty upakowania, niekryształiczność), nierozpuszczalność (lub słabą rozpuszczalność) kompleksu anion-receptor, niską czułość i dużą złożoność analizowanego układu dla danej metody analitycznej (nieadekwatna zdolność rozdzielcza). Dlatego, aby uzyskać pełne zrozumienie zjawiska rozpoznania anionów, często stosuje się kombinacje różnych metod analitycznych uzupełnione obliczeniami teoretycznymi.

IM-MS jest jedną z metod analitycznych, która dzięki swojej wysokiej czułości i selektywności pozwala przezwyciężyć wiele z tych trudności. W pracy metodologicznej opisaną w publikacji [A6] rozważałam wiele aspektów związanych z zastosowaniem IM-MS do opisu strukturalnego kompleksów anion-makrocykl, w tym korelację pomiędzy doświadczalnie wyznaczonymi przekrojami czynnymi a wartościami teoretycznymi obliczonymi na podstawie modeli strukturalnych, strategię kalibracji jako ważnego czynnika decydującego o dokładności uzyskanych wartości doświadczalnych CCS oraz dokładność pośrednich pomiarów CCS.

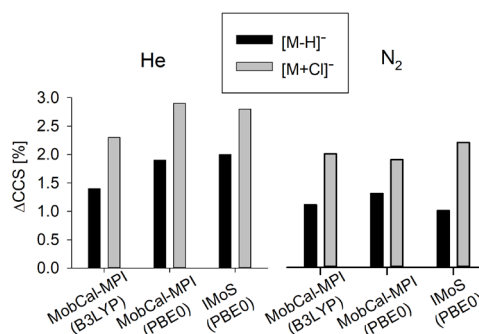
Zbadałam makrocykle tetralaktamowe o różnej elastyczności (1 i 3 sztywne, 2 elastyczne) i o różnych właściwościach strukturalnych (tj. 4 i 5 przyjmujące specyficzną strukturę złożoną w kształcie litery U po kompleksowaniu z anionem), co pozwoliło na ocenę podejścia IM-MS do badania nowych receptorów (Schemat 1).



Schemat 1. Makrocykle (1-5) i badane aniony (X^-).

Zaplanowane i wykonane, dokładne i bezpośrednie pomiary ruchliwości z wykorzystaniem zwykłej komory dryfu sprzężonej ze spektrometrem mas (DTIM-MS), umożliwiły mi przeprowadzenie szczegółowej dyskusji na temat specyfiki analizy IM-MS w badaniach strukturalnych kompleksów anion-makrocykl. W szczególności zajęłam się następującymi zagadnieniami:

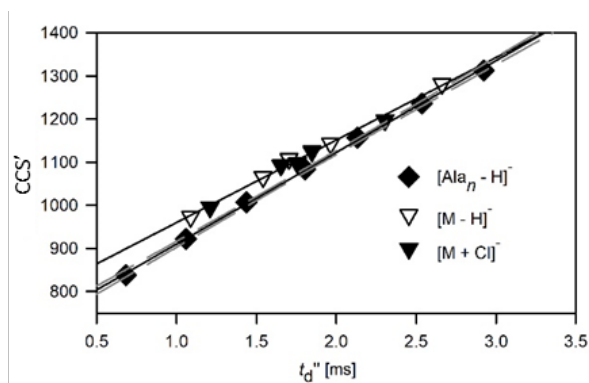
a) różnice pomiędzy doświadczalnie wyznaczonymi i teoretycznie obliczonymi wartościami CCS, w zależności od użytego gazu dryfującego (Rysunek 8) – stwierdziłam, że podejścia teoretyczne, różniące się nieco sposobem traktowania całek do opisu zderzeń między jonem a cząsteczkami gazu buforowego i dostępnością parametrów Lennarda-Jonesa (L-J) dla niektórych atomów, oferują podobny poziom dokładności.



Rysunek 8. Porównanie różnych podejść teoretycznych w celu uzyskania teoretycznych wartości CCS dla makrocykli i ich kompleksów.

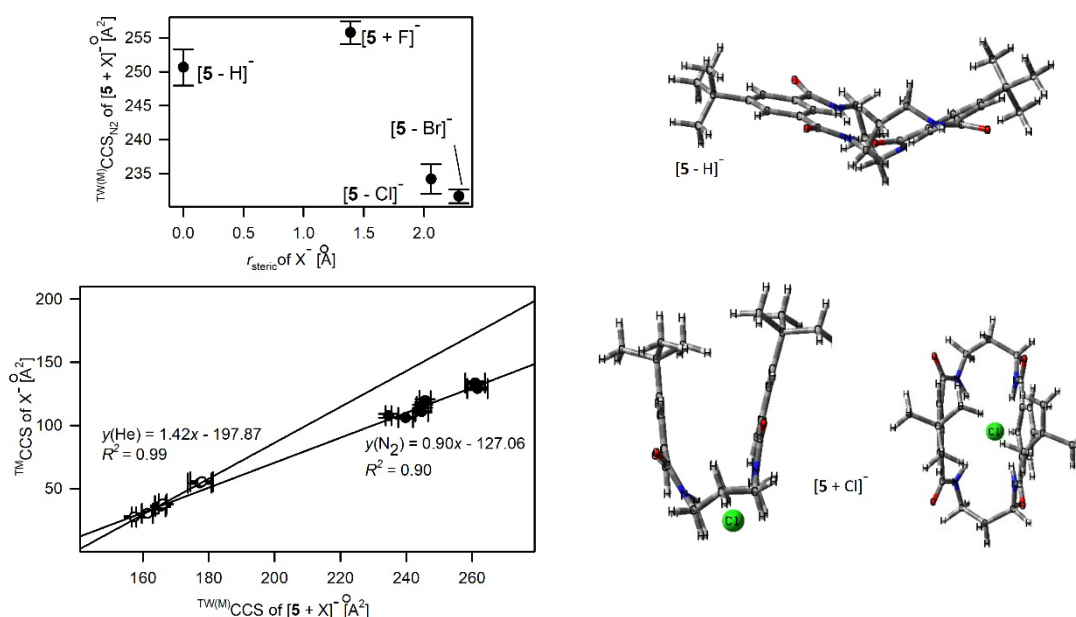
b) metoda kalibracji w pośrednich pomiarach TWIM (Rysunek 9) – udowodniłam, że przesunięcie kalibracyjne klasy związków, na które wskazuje obserwacja przesunięcia krzywej kalibracji anionów polialaniny $[Ala_n - H]^-$ w stosunku do krzywej uzyskanej dla jonów makrocyklicznych: $[M - H]^-$ i $[M + Cl]^-$, a które związane jest głównie z różnicą w relaksacji, jakiej doświadczają jony należące do różnych klas związków w nieustannie zmieniającym się polu elektrycznym w urządzeniu z falą wędrującą (TWIM), może prowadzić do istotnych błędów w wyznaczaniu doświadczalnych wartości CCS, gdy w trakcie procedury kalibracyjnej stosowane są jony

polialaniny – popularnego wzorca do kalibracji TWIM.



Rysunek 9. Zależność między krzywymi kalibracji otrzymanymi dla anionów polialaniny (Ala_n , $n = 4 - 10$) i anionów makrocykli: $[M - H]^-$ i ich kompleksów $[M + Cl]^-$ zarejestrowana dla N_2 jako gazu buforowego.

c) wgląd w zmiany konformacyjne makrocyklu podczas kompleksowania anionami, które są kluczowe dla termodynamiki procesu kompleksowania – zaproponowałam, że korelacja pomiędzy CCS anionów wieloatomowych lub promieniem anionu w przypadku anionów monoatomowych a uzyskanymi doświadczalnie wartościami CCS jest właściwą metodą, którą można wykorzystać do rozróżnienia możliwych konformacji kompleksu (Rysunek 10).



Rysunek 10. Zależność pomiędzy promieniem anionu X^- , r_{steric} (górną część) lub CCS w przypadku anionów wieloatomowych X^- i doświadczalnej wartości CCS kompleksu $[5 + X]^-$. Zmiana konformacji receptora makrocyklu po związaniu Cl^- pokazana jest po prawej stronie.

Doświadczalne wartości CCS dla większości kompleksów $[5 + X]^-$ są znacznie niższe w porównaniu do zdeprotonowanego makrocyklu, co definitywnie wskazuje na konformacyjne skurczenie się **5** w procesie wiązania anionu. W przypadku anionów monoatomowych nie ma takiej bezpośredniej zależności pomiędzy promieniem anionu a uzyskanymi doświadczalnie wartościami CCS, stąd dwie konformacje **5**, wyraźnie rozróżniane na podstawie wartości CCS: wydłużona, w przybliżeniu płaska (zdeprotonowany **5** i dla kompleksu $[5 + F]^-$) oraz złożona konformacja w kształcie litery U (istotna dla kompleksów z Cl^- i Br^-). Konformacje kompleksów ujawnione w wyniku analizy IM-MS uzupełnionej obliczeniami teoretycznymi są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dla roztworu, zgodnie z oczekiwaniami.

d) zachowanie dominującej w roztworze konformacji – stwierdziłam, że złożona konformacja jonu odpowiadającego zdeprotonowanemu **5**, w kształcie litery U, chociaż przewidywana przez rozkład Boltzmana ($\Delta G = 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$), nie jest obserwowana w eksperymentach IM-MS. Zamiast tego wykryłam obecność wydłużonej, z grubsza planarnej konformacji podobnej do opisanej dla neutralnego **5**. Obserwacja ta sugeruje, że podczas jonizacji ESI oraz w eksperymentalnej skali czasowej i energetycznej wszelkie zmiany konformacyjne są zahamowane, a zatem struktura $[5 - H]^-$ jest podobna do natywnej konformacji jego neutralnego odpowiednika. Odkrycie to wpisuje się w ogólny postulat o zachowaniu natywnej konformacji dużych biomolekuł i kompleksów po ich przejściu do fazy gazowej i wskazuje, że to zjawisko może również dotyczyć struktur makrocyklicznych o częściowo ograniczonej swobodzie konformacyjnej.

Szeroki zakres zagadnień poruszonych i omówionych w [A6] pozwolił mi stwierdzić, że IM-MS wsparta badaniami teoretycznymi jest odpowiednim narzędziem analitycznym do strukturalnego badania kompleksowania anionów przez związki makrocykliczne. Oferuje

ona wiele zalet w porównaniu z klasycznymi metodami analitycznymi, szczególnie na wczesnych etapach badań wiązania anionów, kiedy poszukuje się odpowiednich cząsteczek receptorowych.

W serii publikacji [A1-A6] omówiłam, rozwinęłam i rozszerzyłam zastosowanie techniki IM-MS wspartej badaniami teoretycznymi do kompleksowego opisu strukturalnego wybranych związków bioaktywnych. Wykazałam, że przejście od niepełnego do wyczerpującego opisu struktur kilku ważnych związków bioaktywnych jest możliwe, gdy w procesie ich analizy uwzględnimy IM-MS. W szczególności rozważyłam i wykazałam przydatność tej metody do efektywnego i selektywnego rozdzielania blisko spokrewnionych strukturalnie związków bioaktywnych: epimerów katechiny, diastereoizomerów β -laktamów, epimerów peptydów oraz do szczegółowej analizy strukturalnej wybranych niekowalencyjnych kompleksów FA-CD i anionów-makrocycli.

Za kluczowe osiągnięcia mojej serii publikacji [A1-A6] uważam:

- ocenę zastosowania IM-MS do selektywnego rozdzielania bioaktywnych związków izomerycznych, w tym: epimerów katechin, diastereoizomerów β -laktamów i epimerów peptydów;
- opracowanie metod wspomagających rozdzielanie blisko spokrewnionych strukturalnie izomerycznych związków bioaktywnych;
- pomyślnie zastosowanie metod teoretycznych w dyskusji i racjonalnym wyjaśnieniu obserwowanych efektów związanych z analizą IM-MS;
- pomyślnie zastosowanie kombinacji IM-MS i metod teoretycznych w celu uzyskania wglądu w sposób niekowalencyjnego wiązania FA przez natywne cyklodekstryny: α -CD, β -CD i γ -CD;
- wdrożenie techniki IM-MS uzupełnionej obliczeniami teoretycznymi do szczegółowej analizy układów anionowo-makrocyclicznych, dzięki czemu ta technika analityczna może być wykorzystana do czułego, selektywnego i szybkiego wykrywania kompleksów anionów oraz opisu ich struktury i konformacji;
- podkreślenie zachowania dominującej w roztworze konformacji w układach makrocyclicznych i anionowo-makrocyclicznych w populacji jonów w fazie gazowej podczas eksperymentów IM-MS, dzięki czemu IM-MS pozwala uzyskać „odcisk palca” konformacji typowej dla roztworu.

W ostatnich latach można zaobserwować znaczną poprawę zdolności rozdzielczej dostępnych urządzeń IM (Tabela 1). Zwiększona rozdzielczość IM powoduje jednak jedynie przesunięcie problemu separacji w kierunku związków o mniejszej różnicy CCS. Tak więc badania poświęcone poprawie rozdzielania IM poprzez manipulację warunkami doświadczalnymi i/lub zastosowanie odczynników przesunięcia umożliwiających selektywne rozróżnienie izomerycznych struktur nadal pozostają aktualne. Nieodłączne ograniczenia niektórych technik IM w dostarczaniu wyczerpujących informacji strukturalnych mogą dodatkowo potwierdzić znaczenie moich badań. Należą do nich: niemożność wyznaczenia wartości CCS dla FAIMS, wymóg stosowania procedury kalibracyjnej dla TWIM, TIMS, oraz raczej nieznanie i trudne do przewidzenia zmiany strukturalne, jakich należy się spodziewać w przypadku urządzeń IM o najwyższej zdolności

rozdzielczej – SLIM, cykliczny IM (zwiększona zdolność rozdzielcza dzięki długiej drodze pomiaru ruchliwości jonów). Wszystkie te ograniczenia mogą wzmocnić rolę metod, które mimo mniejszej zdolności rozdzielczej dostarczają wyczerpującego opisu strukturalnego badanych związków.

Niewątpliwie technika IM-MS wsparta obliczeniami teoretycznymi stanowi potężne narzędzie do niezwykle czułego wykrywania i wszechstronnego opisu strukturalnego wielu rodzajów związków chemicznych. Jest to odpowiednia technika do uzyskania wyczerpującego opisu strukturalnego, zwłaszcza gdy klasyczne metody analityczne pozostawiają ten opis niepełny. Początkowo badania IM-MS koncentrowały się głównie na proteomice strukturalnej, jednak jej unikalne właściwości wraz z ostatnimi postęпами w rozwoju urządzeń do pomiarów ruchliwości jonów umożliwiły jej zastosowanie w różnych obszarach badawczych, takich jak metabolomika, lipidomika, badania supramolekularne czy odkrywanie biomarkerów. Dalsza ocena i rozwój IM-MS może w znacznym stopniu przyczynić się do wsparcia szeroko stosowanych technik NMR, spektroskopii i rentgenografii w badaniu struktury i właściwości różnych układów chemicznych. To właśnie w tym obszarze badań zamierzam wnieść swój dalszy wkład i na nim skoncentrować moje przyszłe zainteresowania i cele badawcze. Stwierdzenie „Każda pojedyncza analiza kryje w sobie górę lodową niepewności”⁵³ mogę dokończyć, dodając następujące zdanie: „Zastosowanie jednocześnie wielu metod analitycznych może ją ujawnić”, aby podkreślić znaczenie, jakie IM-MS ma w repozytorium metod analitycznych.

Piśmiennictwo

1. E. W. McDaniel, D. W. Martin and W. S. Barnes, *Rev. Scien. Inst.*, 1962, **33**, 2.
2. F. W. McLafferty, *Science*, 1981, **214**, 280.
3. C. Wu, W. F. Siems, G. R. Asbury and H. H. Hill, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4929.
4. M. Tabrizchi and F. Rouholahnejad, *Talanta*, 2006, **69**, 87.
5. E. J. Davis, K. F. Grows, W. F. Siems and H. H. Hill, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 4858.
6. M. Tabrizchi, *Talanta*, 2004, **62**, 65-70.
7. J. C. May and J. A. McLean, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.*, 2003, **16**, 85.
8. P. Dwivedi, C. Wu, L. M. Matz, B. H. Clowers, W. F. Siems and H. H. Hill, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 8200.
9. L. S. Fenn and J. A. McLean, *Chem. Commun.*, 2008, 5505.
10. R. Pérez-Míguez, B. Bruyneel, M. Castro-Puyana, M. L. Marina, G. W. Somsen and E. Domínguez-Vega, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 3277.
11. B. H. Clowers and H. H. Hill Jr, *J. Mass Spectrom.*, 2006, **41**, 339.
12. M. D. Howdle, C. Eckers, A. M. F. Laures and C. S. Creaser, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1.
13. V. Domalain, M. Hubert-Roux, V. Tognetti, L. Joubert, C. M. Lange, J. Rouden and C. Afonso, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 3234.
14. J. L. Campbell, J. C. Y. Le Blanc and B. B. Schneider, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 7857.
15. S. J. P. Marlton, B. I. McKinnon, B. Ucur, J. P. Bezzina, S. J. Blanksby and A. J. Trevitt, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2020, **11**, 4226.

16. I. E. Dreosti, M. J. Wargovich and C. S. Yang, *Critical Rev. Food Sci. Nut.*, 1997, 37, 761.
17. M. Nakayama, K. Shimatani, T. Ozawa, N. Shigemune, T. Tsugukuni, D. Tomiyama, M. Kurahachi, A. Nonaka and T. Miyamoto, *Food Control*, 2013, 33, 433.
18. M. M. Y. Chan, D. Fong, C.-T. Ho and H.-I. Huang, *Biochem. Pharmacol.*, 1997, 54, 1281.
19. G. Cao, E. Sofic and R. L. Prior, *J. Agricult. Food Chem.*, 1996, 44, 3426.
20. H. M. Merken and G. R. Beecher, *J. Agricult. Food Chem.*, 2000, 48, 577.
21. D. Tsimogiannis, M. Samiotaki, G. Panayotou and V. Oreopoulou, *Molecules*, 2007, 12, 593.
22. M. Stobiecki, *Phytochem.*, 2000, 54, 237.
23. C. Borges, P. Martinho, A. Martins, A. P. Rauter and M. A. A. Ferreira, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001, 15, 1760.
24. R. Fernandes, P. Amador and C. Prudêncio, *Rev. Res. Med. Microbiol.*, 2013, 24, 7.
25. B. Alcaide and P. Almendros, *Curr. Med. Chem.*, 2004, 11, 1921.
26. J. Gidden, T. Wyttenbach, A. T. Jackson, J. H. Scrivens and M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 4692.
27. V. Domalain, V. Tognetti, M. Hubert-Roux, C. M. Lange, L. Joubert, J. Baudoux, J. Rouden and C. Afonso, *J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom.*, 2013, 24, 1437.
28. M. F. Bush, I. D. G. Campuzano and C. V. Robinson, *Anal. Chem.*, 2012, 84, 7124.
29. D. Zhang, M. Kabir, H. Lee and W. Donald, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2018, 428, 1.
30. X. Pang, C. Jia, Z. Chen and L. Li, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2017, 28, 110.
31. S. Ha, I. Kim, T. Takata, T. Kinouchi, M. Isoyama, M. Suzuki and N. Fujii, *PLOS ONE*, 2017, 12, e0189972.
32. L. Bai, S. Sheeley and J. V. Sweedler, *Bioanal. Rev.*, 2009, 1, 7.
33. D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 858.
34. J. L. Stephenson and S. A. McLuckey, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 281.
35. S. D. Friess and R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2001, 12, 810.
36. T. G. Flick, S. I. Merenbloom and E. R. Williams, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 2210.
37. G. W. Gokel, W. M. Leevy and M. E. Weber, *Chem. Rev.*, 2004, 104, 2723.
38. M. Göth, F. Lermyte, X. J. Schmitt, S. Warnke, G. von Helden, F. Sobott and K. Pagel, *Analyst*, 2016, 141, 5502.
39. J. P. Behr, J. M. Lehn and P. Vierling, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1976, 621.
40. J. P. Behr, J. M. Lehn and P. Vierling, *Helv. Chim. Acta*, 1982, 65, 1853.
41. R. R. Julian and J. L. Beauchamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2004, 15, 616.
42. R. R. Julian and J. L. Beauchamp, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2001, 210-211, 613.
43. R. R. Julian, M. Akin, J. A. May, B. M. Stoltz and J. L. Beauchamp, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2002, 220, 87.
44. R. R. Julian and J. L. Beauchamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2002, 13, 493.
45. R. R. Julian, J. A. May, B. M. Stoltz and J. L. Beauchamp, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2003, 228, 851.
46. S. Warnke, G. von Helden and K. Pagel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 1177.

47. J. Y. Ko, S. W. Heo, J. H. Lee, H. B. Oh, H. Kim and H. I. Kim, *J. Phys. Chem. A*, 2011, *115*, 14215.
48. R. Challa, A. Ahuja, J. Ali and R. K. Khar, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2005, **6**, E329.
49. M. Ceborska, M. Zimnicka, M. Pietrzak, A. Troć, M. Koźbiał and J. Lipkowski, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, *10*, 5186.
50. K. Richardson, D. Langridge and K. Giles, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2018, *428*, 71.
51. T. Wyttenbach and M. T. Bowers, *J. Phys. Chem. B*, 2011, *115*, 12266.
52. H. Choi, Y.-H. Oh, S. Park, S.-S. Lee, H. B. Oh and S. Lee, *Scie. Rep.* 2022, *12*, 8169.
53. E. J. Wagenmakers, A. Sarafoglou and B. Aczel, *Nature*, 2022, *605*, 423.

5. INFORMACJA O WYKAZANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

Instytucja	Aktywność naukowa	Okres
University of Oslo, Department of Chemistry, Mass Spectrometry Laboratory, Oslo, Norwegia	Tygodniowy staż naukowy w grupie badawczej prof. E. Uggeruda związany z realizacją projektu „Reactions of nitrophenide and halonitrophenide ions with acrylonitrile and alkyl acrylates in the gas phase: addition to the carbonyl group versus Michael addition”.	Listopad, 2007 (1 tydzień)
University of Washington, Department of Chemistry, Seattle, USA	Staż podoktorski w grupie badawczej prof. F. Turečka związany z realizacją projektu „Implementation of the project on the development of ETD and ECD techniques for peptide sequencing”.	Listopad 2009 – Grudzień 2010

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ.

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Data i miejsce	Informacja
Listopad 2021 – Luty 2022 Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk	Seria wykładów (15 h) dla doktorantów Warszawskiej Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Biomedycznych: „Zaawansowane metody identyfikacji związków organicznych”

2011 – 2015 Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk	Promotorka pomocnicza pracy doktorskiej „Badanie struktur wybranych grup związków organicznych i ich kompleksów z wykorzystaniem techniki pomiaru mobilności jonów sprzężonej ze spektrometrią mas.” (Anna Troć, 2015)
2020 – 2021 Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk	Opiekunka pracy magisterskiej „Badania swobodnej i wspomaganej asocjacji peptydowych kawitandów za pomocą spektrometrii ruchliwości jonów” (Magdalena Gąsiorek, Politechnika Warszawska, 2021)
22-26.04.2018 6 Konferencja Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas Miedzeszyn	Seminarium dla uczestników warsztatów ze spektrometrii mas podczas konferencji Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas. Temat: Zastosowanie techniki ruchliwości jonów sprzężonej ze spektrometrią mas do badań strukturalnych
2012 – 2021 Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk	Opieka nad studentami i stażystami z Uniwersytetu Warszawskiego, Politechniki Warszawskiej i Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego. (10 studentów, każdy przynajmniej 1 miesiąc praktyk)

6.1. Osiągnięcia organizacyjne

Pozycja	Obowiązki służbowe
Kierowniczka Zespołu (Zespół 1a) Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk (12/2012 –)	Prowadzenie badań w zakresie: <ul style="list-style-type: none"> właściwości strukturalnych (trójwymiarowy kształt, rozróżnienie konformacyjne, badania stabilności, właściwości termodynamicznych) małych i średnich cząsteczek i ich niekowalencyjnych związków w fazie gazowej metodami spektrometrii mas i metodami sprzężonymi (spektrometria ruchliwości jonów, IM-MS); zależności między właściwościami strukturalnymi cząsteczek i układów supramolekularnych w roztworze i fazie gazowej;

	<ul style="list-style-type: none"> zastosowania obliczeń teoretycznych do opisu właściwości termodynamicznych i strukturalnych cząsteczek i ich niekowalencyjnych związków.
<p>Członkini Rady Naukowej Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk</p> <p>(06/2022 –)</p>	<p>Zgodne z regulaminem Rady Naukowej Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk.</p>

6.3. Osiągnięcia popularyzatorskie

Data i Miejsce	Informacja
<p>01/2020</p> <p>Technikum Chemiczne nr 3, Warszawa</p>	<p>Wykład popularnonaukowy na temat spektrometrii mas.</p>

7. OPRÓCZ KWESTII WYMIENIONYCH W PKT. 1-6 WNIOSKODAWCA MOŻE Podać INNE INFORMACJE , WAŻNE Z JEGO PUNKTU WIDZENIA, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ.

7.1. Granty naukowe

Grant	Information
<p>IUVENTUS PLUS (2012)</p> <p>(Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego)</p>	<p>Kierowniczka</p> <p>Tytuł: Badania właściwości i struktury układu tioamidowego w modelowych ditiopeptoidach – potencjalnych jednostkach budulcowych w syntezie związków biologicznie czynnych.</p>
<p>SONATA (2012)</p> <p>(Narodowe Centrum Nauki)</p>	<p>Kierowniczka</p> <p>Temat: Badania właściwości niekowalencyjnych kompleksów ligandów receptorów melanokortynowych.</p>

7.2. Dane naukometryczne (według Web of Science – 02.06.2022)

Parametr	Informacja
Sumaryczna liczba publikacji	26
Sumaryczna liczba cytowań bez autocytowań	293
Indeks Hirscha	9

7.3. Aktywność naukowa

Rodzaj aktywności	Informacja
Prezentacje ustne na konferencjach międzynarodowych	2
Wykłady plenarne na konferencjach międzynarodowych	2
Wykłady na zaproszenie	2
Plakaty na konferencjach międzynarodowych	16
Aktywność ewaluacyjna	> 15 Recenzji (<i>Molecules, J. Org. Chem., ACS Omega, Sci. Rep., Anal. Chem., APPA, Encyclopedia, J. Mass Spectrom., Int. J. Mass Spectrom., Rapid Commun. Mass Spectrom.</i>)

Magdalena Zimnicka
(podpis wnioskodawcy)