

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studium chemických přeměn anthokyanidinových barviv

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Ondřej Kurka

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Bednář Ph.D.

Datum odevzdání práce:

22.4.2011

Shrnutí:

Předložená práce se zabývá problematikou přeměn anthokyanidinových barviv v modelových roztocích. Teoretická část shrnuje prozatím dosažené výsledky v poli výzkumu kondenzace anthokyaninů. Také diskutuje separační a identifikační techniky využívané pro analýzu těchto látek s důrazem na hmotnostní spektrometrii. Experimentální část práce je věnována přípravě modelových roztoků pro přípravu kondenzovaných barviv odvozených od pelargonidinu a následné analýze vzniklých směsí s využitím separace pomocí HPLC spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Bylo zjištěno, že za konkrétních podmínek reaguje pelargonidin s epikatechinem v přítomnosti acetaldehydu, resp. s acetonem za tvorby očekávaných produktů: 8-(1-epikatechin-8-ylethyl)-pelargonidinu resp. 5-methylpyranopelargonidinu. 5-methylpyranopelargonidin byl z reakční směsi izolován semipreparativní chromatografií a v současné době je blíže studován jeho in-vitro metabolismus.

Klíčová slova: anthokyaniny, anthokyanidiny, pelargonidin, kondenzace, aceton, acetaldehyd, kyselina pyrohroznová, epikatechin, HPLC, MS, ESI, MALDI, QqTOF, iontová past

Summary:

Presented thesis deals with transformations of anthocyanidin-based pigments in model solutions. Theoretical part summarizes state-of-art in the field of research of condensed anthocyanin dyes. It also discusses separation and identification techniques applicable for analysis of such compounds with emphasis on mass spectrometry. Experimental part is dedicated to preparation of condensed dyes derived from pelargonidin and subsequent analysis of those reaction mixtures using HPLC coupled to mass spectrometry. It was found that under specific conditions, reaction of pelargonidin with epicatechin in presence of acetaldehyde and with acetone provided expected products: 8-(1-epicatechin-8-ylethyl)-pelargonidin and 5-methylpyranopelargonidin. 5-methylpyranopelargonidin was isolated from reaction mixture using semipreparative chromatography and subjected for study of its in-vitro metabolism.

Keywords: anthocyanins, anthocyanidins, pelargonidin, condensation, acetone, acetaldehyde, pyruvic acid, epicatechin, HPLC, MS, ESI, MALDI, QqTOF, ion trap

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Ondřej Kurka

Tímto bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Petru Bednářovi Ph.D. za cenné rady, trpělivost a optimismus při řešení problémů s experimenty, rodině a přátelům za podporu a připomínky k práci a všem zaměstnancům a studentům Katedry analytické chemie za ochotu a vstřícnost.

Obsah:

1. Úvod:	1
2. Teoretická část:	2
2.1 <i>Principy použitých instrumentálních metod:</i>	2
2.1.1 HPLC:	2
2.1.1.1 Součásti chromatografu:.....	2
2.1.1.2 Typy separačních systémů podle použitých rovin 3	3
2.1.1.3 Chromatografie na obrácených (reverzních) fázích (RP - HPLC):..... 4	4
2.1.1.4 Detektory v HPLC:.....	5
2.1.2 Hmotnostní spektrometrie (MS):.....	6
2.1.2.1 Iontové zdroje:.....	6
2.1.2.2 Hmotnostní analyzátoři.....	8
2.1.2.3 Ionizace elektrosprejem (ESI):	9
2.1.2.4 Matricí asistovaná desorpce/ionizace laserem (MALDI):	10
2.2 <i>Anthokyaniny a pelargonidin:</i>	12
2.2.1 Anthokyaniny – výskyt, vlastnosti a nomenklatura:.....	12
2.2.2 Separace a identifikace anthokyaninů:	13
2.2.3 Studium cyklizačních reakcí anthokyaninů s molekulami s polarizovanou dvojnou vazbou: 17	17
2.2.3.1 Vitisiny a 5-methylpyranoanthokyaniny:	18
2.2.3.2 Fenolové pyranoanthokyaniny (pinotiny):.....	24
2.2.4 Studium reakcí anthokyaninů s jinými flavonoidy:.....	26
2.2.4.1 Produkty přímé reakce anthokyanin–flavanol:	27
2.2.4.2 Vznik aduktů anthokyanin–flavanol s můstkem tvořeným malou molekulou:..... 32	32
2.2.4.3 Vznik aduktů pyranoanthokyanin–flavanol:.....	38
2.2.4.4 Vinylflavanolové adukty pyranoanthokyaninů (portisiny):	40
2.2.5 Pelargonidin a jeho dosud popsaná reaktivita:	41
2.3 <i>Hmotnostní spektrometrie anthokyaninů a pigmentů z nich odvozených</i>	45
2.3.1 Fragmentace anthokyaninů.....	46
2.3.1.1 Fragmentace glykosidů.....	46
2.3.1.2 Fragmentace aglykonů.....	46
2.3.2 Fragmentace flavanolů	48
2.3.3 Fragmentace pyranoanthokyaninů.....	48
2.3.4 Fragmentace aduktů flavanolů s anthokyaniny	49
3. Experimentální část:	51
3.1 <i>Chemikálie:</i>	51
3.2 <i>Příprava vzorků:</i>	51
3.2.1 Příprava 5-methylpyranopelargonidinu	51
3.2.2 Reakce pelargonidinu s epikatechinem v přítomnosti acetaldehydu	51
3.2.3 Reakce pelargonidinu s acetaldehydem.....	52
3.2.4 Reakce pelargonidinu s kyselinou pyrohroznovou.....	52
3.3 <i>Instrumentace:</i>	53
3.3.1 Použité přístroje:	53
3.3.2 Použité SPE, HPLC a UPLC kolony:.....	53
3.3.3 Parametry iontových zdrojů:	54
3.3.3.1 Parametry ESI-QqTOF:.....	54
3.3.3.2 Parametry MALDI (ve spojení s Q-TOF Premier):.....	54
3.3.3.3 Parametry ESI-IT:.....	54
3.4 <i>Podmínky analýz:</i>	54
3.4.1 SPE extrakce:	54
3.4.2 HPLC separace:.....	55
3.4.3 UPLC separace:.....	56

3.4.4	Přímý nástřik do systému ESI-Q-TOF a ESI-IT	57
3.4.5	Analýza pomocí MALDI-Q-TOF	57
3.4.6	Podmínky analýz jednotlivých vzorků:	58
4.	Diskuze a výsledky:.....	61
4.1	<i>Studium reakce pelargonidinu s acetonem:</i>	<i>61</i>
4.1.1	Frakcionace 5-methylpyranopelargonidinu	65
4.1.2	Fragmentace 5-methylpyranopelargonidinového iontu	65
4.2	<i>Studium reakce pelargonidinu s epikatechinem za přítomnosti acetaldehydu</i>	<i>73</i>
4.3	<i>Studium reakce pelargonidinu s acetaldehydem:.....</i>	<i>88</i>
4.4	<i>Studium reakce pelargonidinu s pyruvátém:.....</i>	<i>90</i>
5.	Závěr:.....	95
6.	Literatura:	96
7.	Použité zkratky:	104

1. Úvod:

Anthokyaniny patří k významným antioxidantům s příznivými účinky na lidské zdraví a zároveň k výrazným barvivům, dodávajícím potravinám charakteristický vzhled. Anthokyaniny se v potravinách snadno přeměňují na látky s odlišnými vlastnostmi (pyranoanthokyaniny, oligomerní adukty s jinými flavanoly, fenolické kyseliny atd.). Proto je důležité studovat, jaké faktory mají na přeměnu anthokyaninů ve směsích vliv. Následně je možné přizpůsobit skladování takových produktů zjištěným závěrům. Znalosti procesů přeměn anthokyaninů jsou významné pro zlepšování procesů výroby a skladování potravin s ohledem na jejich nutriční hodnotu i organoleptické vlastnosti. Tato práce se zabývá cyklizačními a kondenzačními reakcemi pelargonidinu, což je jeden z šesti základních anthokyanidinů, běžně přítomných v rostlinách. Pozornost je v této práci věnována především schopnosti a ochotě pelargonidinu vstupovat do cyklizačních a kondenzačních reakcí a studiu vzniklých sloučenin.

2. Teoretická část:

2.1 Principy použitých instrumentálních metod:

2.1.1 HPLC:

HPLC (high performance liquid chromatography) neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie je moderní separační technika, používaná pro kvalitativní i kvantitativní analýzu převážně organických látek v různých matricích. Principem separace je průtok mobilní fáze unášející rozpuštěnou zónu vzorku systémem, kde se na imobilizované stacionární fázi jednotlivé složky vzorku dělí na základě ustavování různých typů rovnováh (podle použitého systému, jak bude popsáno dále) a opouštějí systém v různém tzv. elučním čase, což umožňuje jejich detekci.

Počátky kapalinové chromatografie jsou spojeny s plošnou chromatografií na papíře (PC)^[1], tenké vrstvě (TLC)^[2] nebo sloupcově na koloně za atmosférického tlaku (CC)^[3]. Základy kapalinové chromatografie se datují již do počátku 20. století, kdy ruský botanik M. S. Cvet rozdělil listová barviva na sloupci sorbentu^[4]. Tomuto experimentu vděčí chromatografie za své jméno („chromos“ = barva).

2.1.1.1 Součásti chromatografu:

Přístroj (chromatograf) je složen ze zásobníků (jednoho či více) mobilní fáze, což je nádoba o vhodném objemu, dále z čerpadel mobilní fáze (sestavení se liší pro přístroje s nízkotlakým a vysokotlakým gradientem), tlumiče pulzů, mixéru (směšovače mobilních fází), odplyňovače, nástřikového zařízení (šesticestný ventil se smyčkou), analytické kolony (které může předcházet přečišťovací předkolona), detektoru a záznamového zařízení (v současnosti téměř výhradně reprezentováno počítačem). Volitelným doplňkem může být např. kolektor frakcí. Celý systém je spojen trubicemi o vhodném vnitřním objemu.

Čerpadla jsou v HPLC nutnou součástí z důvodu vysokých odporových tlaků kolony, které mohou dosáhnout až 400 bar. Moderní čerpadla pracují na principu elektronicky řízeného mechanického pístu a rozlišujeme dva typy: velkoobjemové a s malým objemem činné části. Výhodou velkoobjemového čerpadla je např. absence tlakových pulzů, výhodou maloobjemového pak kompatibilita s nízkotlakým gradientem.

Dávkování v HPLC je problémem vzhledem k použitým tlakům, kdy se nedá dávkovat stříkačkou přímo do proudu mobilní fáze. V současnosti je výhradním řešením použití šesticestného dávkovacího ventilu, kdy se vzorkem naplní tzv. smyčka, která se přepnutím ventilu vymyje do toku mobilní fáze.

„Srdcem“ chromatografického systému, místem kde se uskutečňuje samotný separační proces, je kolona. Kolona je trubice z inertního materiálu, která je vyplněna částicemi stacionární fáze. Typické kolony pro HPLC mají délku mezi 10 a 25 cm, vnitřní průměr 3-5 mm a velikost částic se pohybuje mezi 2 a 5 μm . Existují různé typy částic, nejčastěji tzv. plně porézní a povrchově porézní částice^[5]. Parametry kolony ovlivňuje také typ separace – nejčastěji provádíme tzv. analytickou separaci (kdy dávkujeme takové množství vzorku, které vyvolá změnu v odezvě detektoru), ale výjimkou není ani semipreparativní a preparativní separace. Nedílnou částí chromatografu je detektor, jehož úkolem je měření konkrétní vlastnosti eluátu, u které dochází změně při eluci námi žádaného analytu. Nejběžnější typy detektorů pro HPLC a mechanismy, kterými detekují analyt, budou zmíněny později.

2.1.1.2 Typy separačních systémů podle použitých rovin

Podle volené kombinace stacionární a mobilní fáze rozlišujeme několik typů systémů v HPLC.. Historicky prvním typem je *systém normálních fází (NP)*, kdy stacionární fáze je polárnější než mobilní. Typickým příkladem je kombinace silikagelu jako stacionární fáze a hexanu s polárním modifikátorem (typicky např. propanol) jako nepolárního rozpouštědla, tvořícího mobilní fázi. Vzhledem k tomu, že principem separace je zde adsorpce analytu na povrch stacionární fáze, která je polární, roste retence analytů v pořadí od nepolárních k polárním. Definovaná vzájemná poloha adsorpčních center také umožňuje dělení polohových izomerů^[5]. Důležitou podmínkou úspěšného dělení je absolutní nepřítomnost vody v mobilní fázi. Již stopy v řádu desetin procenta se silně adsorbují na stacionární fázi a vedou ke změně interakcí analytů se stacionární fází (retenčního mechanismu) a následně k nereprodukovatelné retenci..

Dalším typem je *systém s reverzními fázemi (RP)*, což je systém s mobilní fází polárnější než stacionární. Tento systém je v současnosti používán cca v 80% aplikací a vzhledem k tomu, že byl použit i při analýzách v této diplomové práci, bude mu níže věnována samostatná kapitola.

Z koncepce NP-HPLC formálně vychází *hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)*. Zde cíleně do mobilní fáze přidáváme vodu v řádu jednotek až desítek procent, což při separaci způsobí, že se na povrchu polární stacionární fáze vytváří reprodukovatelný vodní film a analyt se rozděluje mezi mobilní fázi (tvořenou směsí organického rozpouštědla a vody) a vodním filmem na povrchu. Principem separace je zde tedy rozdělování a jsou používána rozpouštědla jako u RP-HPLC. Polární látky jsou v tomto módu zadržovány silněji než látky nepolární.

Iontově výměnná chromatografie (IEC) je založena na interakci analytu s tzv. měniči iontů (ionexy), chemicky vázanými na povrchu stacionární fáze. Pokud máme analyt kationtové povahy, použijeme katex, neboli měnič kationtů. Tím je funkční skupina zakotvená na nosiči nesoucí záporný náboj. V koloně dochází k rozdílným elektrostatickým interakcím složek vzorku se stacionární fází a tím k separaci. Analogický postup je volen v případě aniontového chování analytu, kde je použit anex. Typickými katexy jsou SO_3^- skupiny (silné katexy) a COO^- skupiny (slabé katexy). Pro výměnu kationtů jsou používány NR_3^+ soli (silné anexy) a NH_3^+ soli (slabé anexy).

Sloučeniny iontového charakteru umožňují dělit také *chromatografie iontových párů (IPC)*. Stacionární fáze je však v tomto případě nepolární (používají se stejné fáze jako v RP-HPLC). Rozdíl oproti RP-HPLC spočívá ve složení mobilní fáze, kam se přidává tzv. ionpárovací činidlo, které s analytem utvoří nepolární iontový asociát. Ten má oproti analytu nižší polaritu a tím i vyšší afinitu k nepolární stacionární fázi.

Gelová permeační chromatografie (GPC) se od předchozích technik odlišuje tím, že analyty se zde nedělí podle polaritu ani náboje, ale podle velikosti molekul. Jako stacionární fáze zde slouží fyzikálně či chemicky utvořený gel o definované velikosti a distribuci pórů. Velké molekuly do těchto pórů nemohou proniknout a jsou proto v gelu nejméně zadržovány a eluují se jako první. Eluční čas analytu roste se snižující se velikostí částic. Praktické využití GPC se nabízí zejména v oblasti separace proteinů a dalších makromolekul.

2.1.1.3 Chromatografie na obrácených (reverzních) fázích (RP - HPLC):

Jako systém s reverzními fázemi (RP-HPLC – reverse phase HPLC) je obecně označováno uspořádání, při kterém má mobilní fáze vyšší polaritu než fáze stacionární. Vhodné polarity mobilní fáze je dosaženo použitím směsi organického rozpouštědla s vodou, hydrofobnosti stacionární fáze pak chemickým (kovalentním) pokrytím

silikagelu v koloně uhlovodíkovými zbytky. Nejčastěji jsou na pokrytí používány oktadecylové řetězce (mluvíme pak o tzv. C18 kolonách), běžné jsou také oktylové (C8 kolony) nebo fenylové zbytky. Rozpouštědly používanými v kombinaci s vodou jsou nejčastěji methanol a acetonitril, je však možno využít i jiná, např. propanol, tetrahydrofuran.

Mechanismus separace u reverzní fáze není i přes její rozšíření v praxi stále detailně teoreticky objasněn. Většinou se pro jeho popis používá slovní spojení „nespecifické hydrofobní interakce“. Mechanismus, kterým se interakce na reverzní fázi často vysvětluje, je tzv. solvofobní efekt. Předpokládáme, že analyt je rozpuštěn v hydrofilní mobilní fázi a mobilní fáze jej musí solvatovat a uspořádat se kolem analytu, čímž dochází k poklesu entropie v systému. Pokud analyt interaguje se stacionární fází, solvatující složky mobilní fáze jsou uvolněny a entropie se zvětší (molekuly rozpouštědla jsou méně uspořádány). Tento stav je poté upřednostňován – interakce je řízena entropickým členem. Čím nepolárnější je analyt, tím méně se vyskytuje v mobilní fázi a tím později v systému reverzních fází eluuje z kolony.

2.1.1.4 Detektory v HPLC:

Mezi běžně používané patří detektory refraktometrické^[5], spektrofotometrické^[6], fluorescenční^[7], evaporative light scattering^[8], elektrochemické^[5], radiometrické^[9] atd. Zvláštní místo potom z hlediska identifikačních možností má spojení chromatografie s hmotnostní spektrometrií, infračervenou spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí.

Nejběžnějším detektorem používaným v HPLC je *UV/VIS detektor*. Ten měří (nejčastěji) absorbanci eluátu v detekční cele. V případě DAD (diode array detektor – detektor diodového pole) nám detektor umožňuje současné měření na několika různých vlnových délkách^[6].

V posledních letech je oblíbeným detektorem používaným ve spojení s HPLC *hmotnostní spektrometr*, jak pro kvantitativní, tak pro kvalitativní analýzu (v současné době jedna z nejlepších možností stanovení struktury v online kombinaci se separační technikou). Vzhledem k tomu, že podstatná část diplomové práce se věnuje použití hmotnostního detektoru, je mu v rešeršní části práce věnována samostatná kapitola.

2.1.2 Hmotnostní spektrometrie (MS):

Hmotnostní spektrometrie je v současné době oblíbenou a široce využívanou analytickou technikou. Principem této techniky je ionizace analytu ve vhodném iontovém zdroji, následná separace vzniklých iontů podle hodnoty m/z a detekce prošlých iontů. Výsledkem experimentu je tzv. hmotnostní spektrum, proto je metoda řazena mezi spektrální. Jednotlivé přístroje se liší jednak iontovými zdroji (prostředím a podmínkami, za kterých je analyt ionizován), jednak způsobem separace a detekce (způsob zjištění poměru m/z). Separace vytvořených iontů a detekce probíhá ve vakuu. Přítomnost dalších molekul (nejčastěji) v prostoru analyzátoru může vyústit v kolizi s ionizovaným analytem, které mohou vést k produkci fragmentů. Tohoto jevu se cíleně využívá při tzv. kolizí indukované disociaci (CID), kdy štěpíme vybraný ion a zkoumáním vzniklých fragmentů usuzujeme na strukturu původního iontu.

2.1.2.1 Iontové zdroje:

Účelem iontového zdroje v hmotnostním spektrometru je ionizovat (nabít) analyt, aby byl později separovatelný v analyzátoru a zaznamatelný v detektoru. Ionizace může probíhat několika způsoby, z nichž každý vyžaduje jiné podmínky a je vhodný pro jiné typy vzorků.

V průběhu času byla zkonstruována řada iontových zdrojů. Jedním z kritérií, podle kterého se dají iontové zdroje rozdělit, je množství energie dodané analytu. Techniky jsou poté označovány jako tvrdé, pokud je ionizace provázená zvýšenou tvorbou fragmentů, příp. měkké, je-li získána převážně intaktní ionizovaná molekula. Významné iontové zdroje s krátkou charakteristikou uvádí následující výčet:

A. „Tvrdé“ iontové zdroje:

1) *Ionizace elektronem (EI)* – principem je emise elektronů žhaveným vláknem. Je využívána nejčastěji ve spojení s GC^[10].

2) *Induktivně vázané plasma (ICP – induction coupled plasma)* – ionty vznikají ve vysokoteplotním plasmatu generovaném elektromagnetickou indukcí^[11].

B. „Měkké“ iontové zdroje:

3) *Chemická ionizace (CI)* – modifikace EI, instrumentace je podobná, CI využívá přenos náboje z přidávaného pomocného plynu na analyt^[10].

4) *Ionizace polem (FI – field ionisation)* – zplyněný vzorek je ionizován na břitové anodě, na kterou je přiváděno napětí v řádu kV^[10], modifikací je:

5) *Desorpce polem (FD – field desorption)* – vzorek nanášíme v rozpouštědle na anodu, rozpouštědlo odpaříme, čímž dostáváme analyt v pevném stavu a poté ionizujeme. Nevýhodou je nemožnost online spojení se separační technikou a omezení času analýzy naneseným množstvím vzorku^[12].

6) *Fast atom bombardment (FAB)* – analyt je smíchán s matricí a bombardován urychlenými neutrálními atomy Ar^[12]. Variací na FAB je:

7) *Fast ion bombardment (FIB)* neboli *SIMS (secondary ions MS)* – analyt je bombardován přímo ionty, nejčastěji Cs⁺^[12].

8) *Matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI)*^[13,14] – analyt je smíchán s matricí a ozařován laserem, matrice se ionizuje a předá náboj analytu

9) *Nano-assisted laser desorption ionisation (NALDI)* – analyt je ozařován laserem na speciální podložce z nanomateriálu, který umožní přenos energie laseru ve formě náboje na analyt^[15].

Samostatnou kapitolou měkkých ionizačních technik jsou techniky pracující za atmosférického tlaku - API (atmospheric pressure ionisation). Hlavní výhodou těchto iontových zdrojů je, že ke své činnosti nepotřebují vakuum ani plynný vzorek, proto se hodí k online spojení s kapalinovými separačními technikami. Patří mezi ně:

- *APCI (atmospheric pressure chemical ionisation)* – ionizace probíhá pomocí výboje na jehle, ionizováno je rozpouštědlo, to předává náboj analytu podobně jako u CI^[10].

- *APPI (atmospheric pressure photoionisation)* – analyt je sprejován s přídavkem dopantu, což je látka následně cíleně ionizovaná zářením, která získaný náboj předá analytu^[10].

- *ESI (electrospray)* – principem je vznik nabitých kapiček rozprašováním analytu za současného působení napětím a zmenšování (odpařování) těchto kapiček až na jednotlivé ionty^[16].

- *TSP (thermospray)* – ionty vznikají odpařováním rozpouštědla z rozprašovaných kapek za zvýšené teploty^[12].

Vzhledem k tomu, že elektrosprej a MALDI patří mezi iontové zdroje použité v experimentální části této diplomové práce, jsou jim věnovány samostatné kapitoly.

2.1.2.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory mají za úkol rozdělit vzniklé ionty podle jejich poměru m/z a takto separované ionty transportovat k detektoru, kde jsou kvantifikovány (většinou ve formě impulzů = dopadů).

Hmotnostní analyzátory se liší fyzikálním principem, na kterém je založena separace iontů a také analytickým výkonem (zejména přesnost a správnost měření m/z , rozlišením a rychlostí skenování). Jednotlivé analyzátory mohou být s výhodou spojeny, čímž je usnadněno získávání informací o struktuře analytu. Nejčastěji je separace iontů realizována těmito analyzátory:

1) *Sektorové přístroje (zkracovány podle typu: E – electric, B – magnetic)* – fokusují ionty a ovlivňují jejich trajektorii pomocí vnějšího magnetického a/nebo elektrického pole v závislosti na hodnotě jejich m/z . Sektorů je většinou zařazeno více v sérii (např. BEB)^[10].

2) *Kvadrupólový analyzátor (Q – quadrupole)* – obsahuje čtyři kovové tyče, na které je vloženo stejnosměrné a střídavé napětí, kombinací těchto parametrů je zvolen ion, který neodchýlen proletí k detektoru^[17].

3) *Iontová past [(Q)IT – (quadrupole) ion trap]* – třídimenziální kvadrupól, obsahuje dvě koncové elektrody a jednu středovou. V první fázi separace dochází k plnění pasti ionty, poté následuje jejich vypuzování podle rostoucí hodnoty m/z zvyšováním napětí na středové elektrodě^[18].

4) *Iontová cyklotronová rezonance (ICR)* – nedestruktivní analyzátor, ionty krouží uvnitř analyzátoru vlivem silného magnetického pole, frakce s vybraným m/z je excitována napěťovým pulzem a následně detekována elektrodami, signál je zpracován Fourierovou transformací (FT)^[19] – systémy jsou proto označovány v drtivé většině případů jako FTICR.

5) *Orbitální past (orbitrap)* – ionty pod vlivem elektrostatického pole vykonávají cyklicky se opakující pohyb po složité trajektorii kolem vřetenové elektrody^[20]. Naměřená hodnota m/z je potom úměrná frekvenci axiální oscilace iontů v orbitální pasti.

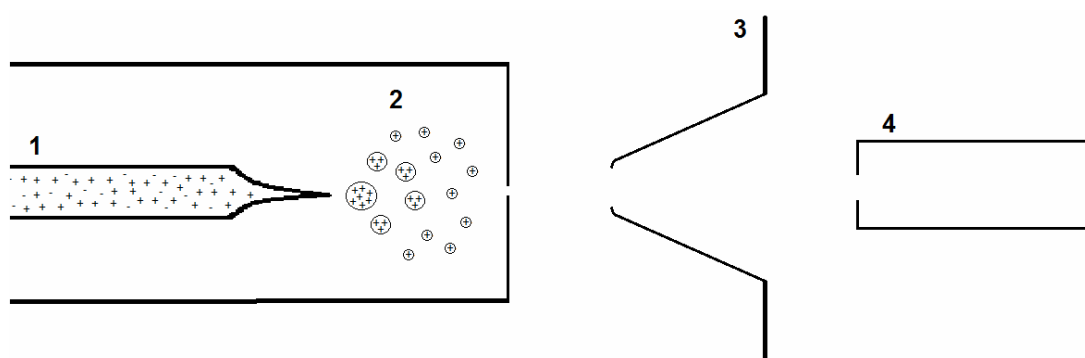
6) *Analyzátor doby letu (TOF – time of flight)* – ionty jsou na počátku dráhy urychleny shodným potenciálem => shodnou energií, která se projeví různou rychlostí iontů s různým m/z ; ionty jsou poté detekovány v čase, který roste se zvyšujícím se m/z ; pro zpřesnění měření je využívána iontová optika, tzv. reflektrom, který fokusuje ionty o shodném m/z a různé rychlosti (dané distribuční křivkou)^[21].

Pro řadu aplikací se osvědčila tzv. tandemová MS detekce (spojení více hmotnostních analyzátorů v sérii). Tímto způsobem je možné podrobovat vybrané ionty kolizí indukované disociaci a následně analyzovat vzniklé fragmenty. Nejčastějšími variantami tandemové MS detekce jsou trojitý kvadrupól (QqQ - malým q je označen kvadrupól sloužící jako kolizní cela), případně systémy QqTOF a iontová past

2.1.2.3 Ionizace elektrosprejem (ESI):

Ačkoliv princip elektrospreje byl fyzikům znám již delší dobu a s jeho pomocí bylo zkoumáno chování nabitých kapek, jeho využití pro tvorbu iontů pro MS bylo objeveno až roku 1984 M. Yamashitou a J. Fennem^[22].

Ionizace elektrosprejem je v současné době preferovanou metodou pro spojení HPLC s MS. Principem ionizace je přívod roztoku vzorku (resp. eluátu z kolony) nabitou kapilárou, na jejímž konci se tvoří nabité kapičky, které se odtrhávají z konce kapiláry. Tento jev je někdy ještě podporován pomocnou kapalinou či plynem, který může být přiváděn podél kapiláry. Z nabitých kapiček je dále ve vyhřívaném iontovém zdroji odpařováno rozpouštědlo až do okamžiku, kdy hustota povrchového náboje kapky překročí kritickou hranici (Rayleighův limit) a dojde k tzv. coulombické explozi. Kapka se rozpadne na několik menších, kde je hodnota hustoty povrchového náboje opět podkritická. Tento proces se několikrát opakuje, až se kapičky přemění v plynné ionty samotného analytu.



Obrázek 1: Uspořádání pro ionizaci elektrosprejem; 1 – kapilára, na kterou je přiváděno napětí a kterou protéká vzorek, 2 – tvorba nabitých kapiček, 3 – skimmer (rozhraní atmosférického tlaku a vakua), 4 – hmotnostní analyzátor

Ve finální fázi procesu se uvažuje dvojitá možnost vzniku iontů z kapiček: a) *model zbytkového náboje*, kdy v kapce zůstane jediný ion v malém množství rozpouštědla, které se odpaří a tím dá vzniknout iontu v plynné fázi, nebo b) *model iontového vypařování*, kdy dochází při zmenšení poloměru kapky pod kritickou hranici k přímému odpařování plynných iontů^[16]. Vzniklé ionty jsou následně iontovou optikou směřovány do analyzátoru. ESI řadíme mezi měkké ionizační techniky, výhodou např. oproti MALDI (která bude diskutována později) je, že poskytuje i vícekrát nabitě ionty, což může být využito např. při kvalitativní analýze proteinů nebo polymerů. Selektivita ionizace může být ovlivňována jednak výběrem mobilní fáze, která přivádí analyt (potažmo její protonovou afinitou), jednak změnou parametrů kapiláry, jako je teplota, napětí kapiláry a rychlost průtoku použitých kapalin a plynů.

Pracujeme-li s nízkými průtoky rozpouštědla, typicky při přímém zavádění vzorku do iontového zdroje nebo ve spojení s kapilární chromatografií, musíme tomu přizpůsobit i parametry ionizační kapiláry. Pro tento účel byl vyvinut tzv. nanoelektrosprej (označován nanoESI, nESI, příp. NSI), který má průtoky řádově nižší než klasický ESI. Instrumentace je náročnější na konstrukci (odpařovací špička s průtoky v řádech nl/min), ovšem na druhou stranu není nutné používat pomocný plyn.

2.1.2.4 Matricí asistovaná desorpce/ionizace laserem (MALDI):

Zkratka této ionizační techniky pochází z anglického „matrix assisted laser desorption ionisation“ a principem je ionizace analytu pomocí laserového paprsku o vhodné vlnové délce. Aby docházelo k účinnější ionizaci, je do analytu přimíchávána matrice (matrix), která absorbuje na vlnové délce laserového záření a takto získanou energii s vysokou účinností předává analytu, který se tímto ionizuje. Pracujeme za vakua. Nevýhodou metody je práce offline – neumožňuje přímé spojení se separačními technikami. Pro analýzu vzorku je nutné jej rozpustit ve vhodném rozpouštědle a smíchat s matricí. Tato směs se pak nanese na „maldi plate“ – destičku z nerezové oceli a nechá se odpařit do sucha. Poté je destička vložena do iontového zdroje v přístroji a příslušná místa s naneseným vzorkem jsou ozařovány laserem, který ionizuje analyty. Nemožnost online spojení MALDI s HPLC částečně kompenzují zařízení, která umožňují automaticky dávkovat na destičku definovaný objem eluátu z kolony podle zadaných podmínek. Vzhledem k tomu, že maldi plate obsahuje řádově

desítky „spotů“ čili dávkovacích míst, může být chromatografická analýza tímto způsobem zaznamenána a následně vyhodnocena i MS analýzou.

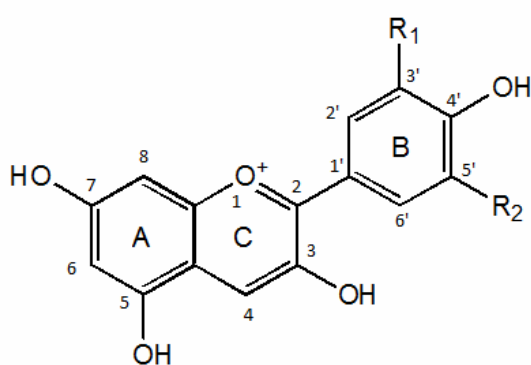
Charakteristickým znakem MALDI je, že molekula analytu je vždy ionizována pouze jedenkrát (narozdíl např. od ESI). MALDI je s výhodou používána pro analýzu proteinů, protože je schopna ionizovat molekuly o hmotnosti až desítky či stovky tisíc Da. Tomu musí být samozřejmě uzpůsoben analyzátor. Tím je nejčastěji TOF. V proteinové analýze je např. na medicínských pracovištích klasickým spojením MALDI-TOF uspořádání hmotnostního spektrometru.

2.2 Anthokyaniny a pelargonidin:

2.2.1 Anthokyaniny – výskyt, vlastnosti a nomenklatura:

Anthokyaniny (z řeckého „anthos“ = „květ“ a „kyanos“ = „modrý“) patří mezi důležitá rostlinná barviva. Nachází se především ve květech a plodech vyšších rostlin a propůjčují jim charakteristické spektrum barev od oranžovočervené po modrou. Typickými zástupci rostlin obsahujících anthokyaninová barviva jsou jahody, borůvky, fíky, granátová jablka, červené hroznové víno a další. Chemicky jsou anthokyaniny glykosylovanými anthokyanidiny. Glykosylace základního skeletu znázorněného na obrázku 2 zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě i chemickou stabilitu^[23].

Anthokyanidiny (aglykony anthokyaninů) patří mezi flavonoidy a jsou významnými sekundárními metabolity rostlin. V současnosti je známo 27 anthokyanidinů a z nich odvozených 539 anthokyaninů^[24]. Nejběžnějšími šesti anthokyanidiny ve vyšších rostlinách jsou delfinidin (běžně zkracován jako Dp), kyanidin (Cy), malvidin (Mv), pelargonidin (Pg), peonidin (Pn) a petunidin (Pt). Jejich glykosylace probíhá nejčastěji v polohách 3 a 5. Číslování skeletu je znázorněno na obrázku 2 spolu s označením jednotlivých cyklů anthokyanidinu jako A, B a C podle nomenklatury používané pro flavonoidy^[25].



Název:	R ₁ :	R ₂ :
Delfinidin (Dp)	-OH	-OH
Kyanidin (Cy)	-OH	-H
Malvidin (Mv)	-OCH ₃	-OCH ₃
Pelargonidin (Pg)	-H	-H
Peonidin (Pe)	-OCH ₃	-H
Petunidin (Pt)	-OCH ₃	-OH

Obrázek 2: Anthokyaninový skelet

V přírodě se anthokyaniny nejčastěji vyskytují jako 3-O-glykosidy, avšak existují i v jiných formách, zde nejčastěji jako 3,5-diglykosidy^[26,27,28], výjimečně i 3,7-diglykosidy a jiné vzácnější polyglykosidy^[29]. Navíc mohou být cukerné zbytky dále acylovány. V extraktu fazolí byl dokonce zaznamenán i výskyt aglykonů^[30].

Anthokyaniny jsou významnými antioxidanty a vychytávači volných radikálů. Také je známo, že jejich přítomnost ve stravě příznivě působí proti vzniku rakoviny, cukrovky, kardiovaskulárních a nervových onemocnění^[31]. Díky těmto efektům roste potřeba potravin obsahujících vyšší množství anthokyaninů a potravinových doplňků s jejich obsahem. Hlavním problémem při využití těchto látek je jejich malá chemická stabilita. S tímto faktem souvisí otázka trvanlivosti příslušných potravin zejména při delším skladování. Stabilita anthokyaninových barviv může být zvýšena tzv. kopigmentací, což je reakce, při níž reaguje anthokyanin s jinou přírodní molekulou kovalentními či slabými vazebnými interakcemi. Oba tyto způsoby obvykle zvýrazňují a stabilizují barvu roztoků anthokyaninů^[32]. Důležitým faktorem při kopigmentaci je množství organického rozpouštědla ve směsi, neboť přítomnost vysoké hladiny rozpouštědla brání prvotnímu kontaktu anthokyaninu a partnerské molekuly a znesnadňuje tak tvorbu stabilnějšího útvaru^[33].

2.2.2 Separace a identifikace anthokyaninů:

Pro určování struktur flavonoidů bylo v minulosti využíváno GC-EI/MS^[34]. Tato metoda se však potýkala s nedostatky, vyplývajícími z malé těkavosti těchto analytů. Pro separaci a analýzu je bylo nutné derivatizovat např. trimethylsilylací^[35]. Konkrétně v oblasti anthokyanidinů byly zkoumány Cy, Mv a Pg metodou GC-MS a to po derivatizaci, která zahrnovala převedení na oximy a následnou silylací^[36] (pozorovaná fragmentace je rozebírána v kapitole 2.3.1.2). Z dalších prací můžeme zmínit např. práci využívající derivatizaci anthokyaninů v extraktu plodů brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*). V tomto případě byla zvolena derivatizace pomocí trimethylchlorsilanu (TMCS) a hexamethyldisilazanu (HMDS) pro převedení anthokyaninů na těkavé deriváty chinolinu a detekce pomocí EI-MS^[37]. Existují také postupy, kdy je po hydrolýze a derivatizaci možné stanovit cukerný zbytek v původním barvivu^[38], příp. stanovit aglykon po fragmentaci na příslušné fragmenty fenolického charakteru^[39].

Počátky LC analýzy anthokyaninů jsou spojeny s papírovou^[40] a tenkovrstevnou^[41] chromatografií. Průlom přichází v roce 1978, kdy Wulf a Nagel provedli první analýzu pigmentů ve víně metodou HPLC na koloně s reverzními fázemi a úspěšně separovali 20 anthokyaninů. Identifikace probíhala po hydrolýze pigmentů^[42]. HPLC se stala vyhledávanou technikou pro analýzu těchto málo těkavých sloučenin, nejčastějším

způsobem detekce byla UV/VIS^[43,44] a později i s MS. V oblasti separace anthokyaninů v současnosti dominují systémy RP-HPLC^[27,45,46], které nacházejí využití především při screeningu reálných vzorků. Novější literatura zmiňuje také využití HILIC kolon pro analýzu rostlinných extraktů polyfenolů^[47]. S úspěchem byla použita také kombinace iontově výměnné chromatografie a reverzní fáze^[26,48]. Ionově-výměnná chromatografie samotná nebyla doposud v analýze anthokyaninů použita. Pro hrubé přečišťování rostlinných extraktů je s oblibou využívána adsorpce na koloně plněné ionexy Amberlite před následnou analýzou v systému reverzních fází^[49,50]. Jako mobilní fáze v RP-HPLC se obvykle používá kombinace acetonitrilu a vody s přídatkem těkavé kyseliny (mravenčí, trifluoroctová atd.) – separace probíhá při $\text{pH} < 2$. Zajímavou alternativou, která umožňuje v reálných vzorcích stanovovat anthokyaniny vedle jiných přírodních fenolických látek, je použití pufru kyseliny octové a octanu sodného o $\text{pH} = 2,55$ opět v kombinaci s acetonitrem^[51].

V analýze anthokyaninů byly s úspěchem použity i kapilární elektromigrační techniky. První separace pomocí CZE byla provedena v roce 1996 s využitím borátového pufru o $\text{pH} = 8$ a PDA detektoru^[52]. Později byla metodika změněna a byl použit fosfátový pufr o $\text{pH} 2,1$ a kationtový tenzid - CTAB (cetyltrimethylammonium-bromid) pro ovlivnění elektroosmotického toku (EOF). I v tomto případě byla využita UV/VIS detekce^[53]. Byl také zkoumán vliv pokrytí kapiláry (polyakrylamidem) oproti nepokryté křemenné kapiláře při separaci anthokyaninů v silně kyselém prostředí (fosfátový pufr v prostředí voda-acetonitril 70/30 v/v). Práce si mimo jiné kladla za cíl zjistit, zda nepokryté silanolové skupiny významně interagují s analyty. Porovnáním elektroferogramů bylo zjištěno, že migrační pořadí zůstává shodné u pokryté i nepokryté kapiláry (u pokryté kapiláry byly naměřeny delší migrační časy). V obou systémech bylo dosaženo dobré účinnosti a dobrého tvaru píku i rozlišení, což indikuje, že nedochází k interakci anthokyaninů s povrchem kapiláry^[54]. Interakce se stěnou kapiláry totiž většinou vede ke zhoršení těchto parametrů (zejména tvaru píků). Jako slibná technika se jeví také MEKC (micelární elektrokinetická chromatografie) s využitím dodecylsulfátu sodného (SDS)^[55,56]. Zkoumáním dvou různých micelárních systémů bylo zjištěno, že SDS má lepší stabilizační účinky (zabránění degradace anthokyaninů v roztoku) než dodecylbenzensulfonát sodný (SDBS). To zřejmě souvisí s přítomností aromatického jádra v SDBS a tím pádem jiným druhem interakcí mezi ním a anthokyaninem oproti SDS^[57].

V řadě prací se objevuje použití hmotnostní spektrometrie bez předchozí separace. Mezi výhody těchto technik patří rychlost analýzy a stálý signál cílového iontu např. pro zlepšení odstupu signálu od šumu akumulací většího počtu spekter (nejsme omezeni šířkou píku jako u separačních technik). Nevýhodou je zejména fakt, že do iontového zdroje proudí všechny složky směsi najednou, může tedy docházet k řadě nežádoucích jevů – interference s izobarickými ionty, suprese signálu, reakce v iontovém zdroji apod.

Nejpoužívanějším iontovým zdrojem pro přímou infuzi vzorku je ESI. Elektrosprej je s oblibou využíván pro identifikaci anthokyaninů v extraktech potravinových vzorků. Následným analyzátozem může být např. jednoduchý kvadrupól^[58] nebo iontová past^[59,60] umožňující MSⁿ. Drahým, avšak kvalitním analyzátozem, umožňujícím získat rozlišení vyšší než 100000, je FT-ICR, rovněž úspěšně použitým pro přímou analýzu vín za účelem jejich identifikace (fingerprintingu)^[61]. ESI-MS s přímou infuzí byla srovnávána i s jinými ionizačními technikami, např. s APPI-MS a APCI-MS jako metodami pro identifikaci anthokyaninů ve víně a pro rozlišení jednotlivých odrůd. V případě APPI byl jako dopant byl použit toluen. Parametry této metody byly optimalizovány. V této práci bylo technikou APPI dosaženo lepších výsledků než pomocí ESI-MS s přímou infuzí (lepší odstup signálu od šumu)^[62]. Také použití APCI-MS umožnilo rozlišení různých druhů vín na základě měření anthokyaninových profilů. Zároveň tato práce odhalila, že použití vhodného druhu ionizační techniky a polaroty ionizace umožňuje dobře analyzovat různé skupiny látek (s různou chemickou povahou a tedy různou schopností se ionizovat). Jejich analýza potom může ve spojení s vhodným statistickým zpracováním posloužit k rozlišení jednotlivých odrůd vína^[63].

Kromě elektrospreje byl pro měření anthokyaninů ve víně použit i desopční elektrosprej (DESI). Jeho výhodou je, že můžeme přímo analyzovat povrch materiálu často bez potřeby složité úpravy vzorku. Kritickým experimentálním parametrem, který je obvykle potřeba precizně optimalizovat je složení a průtok sprejovací kapaliny a její zaměření na analyt. Optimalizovaná metoda využívající nanoDESI (řádově menší průměr sprejovací kapiláry oproti DESI) umožnila odlišit profily některých druhů vín (shoda potvrzena nezávislými LC-MS experimenty) a dokonce určit i poměr dvou odrůd v připravené směsi metodou kalibrační křivky^[64]. Jinou, novější modifikací elektrospreje je pak PESI (probe ESI), kdy je vzorek nanesen na tenkou jehlu a na ní je pak generováno napětí, vyvolávající efekt elektrospreje. Tento typ iontového zdroje byl

kombinován s TOF analyzátozem. Takto byly identifikovány sloučeniny v pletivech tulipánů a mezi nimi i anthokyaniny^[65].

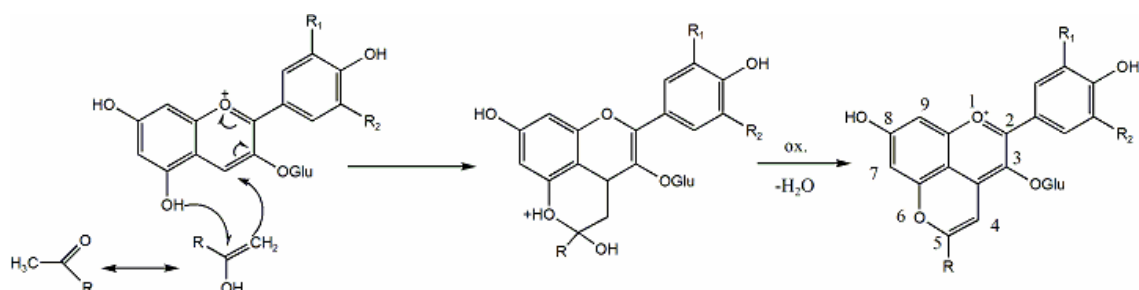
Další MS metodou používanou pro analýzu anthokyaninů je MALDI. Pro efektivní výrobu iontů laserovou desorpcí/ionizací je obvykle třeba vzorek smíchat s matricí. Pro analýzu anthokyaninů a 3-deoxyanthokyaninů z extraktu široku dvoubarevného byla jako matrice využita α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina. Detekční limity pro zkoumané sloučeniny se pohybují v řádu jednotek až desítek pmol/l^[66]. Pro analýzu anthokyaninů z hlohu (*Cretagus opaca*) byla rovněž využita MALDI technika. Jako matrice zde byla použita 3-indolakrylová kyselina. Negativním jevem byl vznik aduktů rodičovských molekul s ionty alkalických kovů^[67]. MALDI analýze polyfenolového složení extraktů z různých plodů rostlinného původu se věnoval tým J. Reeda. Tito autoři použili jako matrici s úspěchem opět kyselinu 3-indolakrylovou^[68]. Sporns a Wang porovnávali výhody MALDI-TOF techniky oproti HPLC při kvantifikaci anthokyaninů v borůvkách. Logickým závěrem jejich studie je, že MALDI (bez analyzátoru dovolujícího tandemová měření) dovoluje rychlou analýzu anthokyaninů s odlišným aglykonem. HPLC, ač zdlouhavější, dovoluje odlišit izomerní anthokyaniny. Matricí použitou pro MALDI analýzu byl v této studii 2',4',6'-trihydroxyacetofenon (THAP)^[69].

Jako ionizační zdroje pro spojení se separačními technikami jsou pro flavonoidy nejčastěji používány APCI a ESI. Zatímco pro většinu flavonoidů je dosahováno nejvyšší citlivosti při ionizaci pomocí ESI v záporném módu za použití acetátu amonného jako pufru^[70], pro anthokyaniny je vzhledem k jejich kationtové povaze (flavyliová forma) citlivější ESI ionizace v kladném módu. Mobilní fáze je v tomto případě obohacena nejčastěji kyselinou mravenčí^[27,45,46]. Tato kyselina je v současnosti řadou autorů upřednostňována před dříve běžnou kyselinou trifluoroctovou. O kyselině trifluoroctové je známo, že tvoří iontové páry, snižující výtěžek ionizace. Tím může následně docházet ke zhoršení parametrů ESI-MS detekce^[24]. Je také důležité zmínit, že MS detekce není omezena na spojení s GC a LC, ale bylo realizováno i spojení kapilární zónové elektroforézy s hmotnostní spektrometrií a to ve spojení CE-ESI/MS jak s kyselým tak s bazickým elektrolytem (chloroacetátový, popř. borátový pufr)^[71].

2.2.3 Studium cyklizačních reakcí anthokyaninů s molekulami s polarizovanou dvojnou vazbou:

Jak již bylo zmíněno dříve, kondenzace anthokyaninů s jinými molekulami může poskytnout produkty stabilnější než jsou původní barviva. Tento jev se v posledních patnácti letech stal předmětem rozsáhlého výzkumu. Vzhledem k tomu, že většina výzkumných týmů v této oblasti se zabývá chemií vína, lze nejvíce informací najít v souvislosti s reakcemi malvidin-3-glukosidu (dále uváděn jako „Mv-3-glu“), jelikož je to majoritní anthokyanin přítomný v plodech hroznového vína (*Vitis vitifera*)^[72]. Deriváty ostatních anthokyaninů byly většinou pouze identifikovány v přírodním materiálu a v některých případech izolovány. Jejich cílené syntézy však doposud nebyla věnována pozornost.

Vznik složitějších barviv je nejčastěji spojen a) s tvorbou dalšího cyklu na anthokyanidinové kostře nebo b) se vzájemným propojením dvou nebo více molekul barviv a/nebo jiných látek (typicky fenolického charakteru). V této kapitole je pozornost věnována prvnímu bodu, tedy cyklizačním reakcím. Všechna sledovaná cyklizační činidla mají společnou vlastnost a to polarizovatelnou dvojnou vazbu, která umožňuje cykloadici na uhlík C4 původního anthokyaninu. Lze předpokládat, že podobné vlastnosti mohou mít i další sloučeniny s polarizovatelnou dvojnou vazbou, jako například kyselina α -ketoglutarová a jiné^[73], což dále rozšiřuje skupinu teoreticky připravitelných derivátů. Tato kapitola se blíže věnuje produktům reakcí s kyselinou pyrohroznovou, acetaldehydem, acetonem a deriváty skořicové kyseliny (a z nich odvozenými vinylfenoly). Oproti anthokyaninům obsahuje kostra pyranoanthokyaninů navíc pyranový kruh (někdy označovaný jako D) a číslování skeletu se mění – viz obrázek 3^[23].

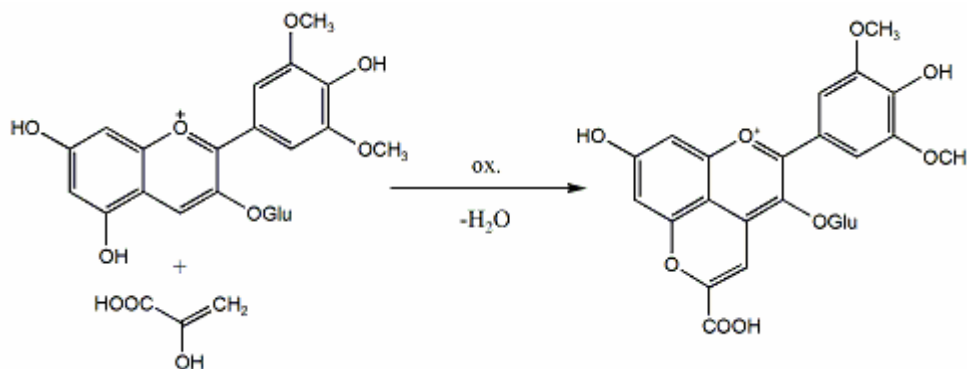


Obrázek 3: Obecné schéma vzniku pyranoanthokyaninů a číslování nově vzniklé struktury

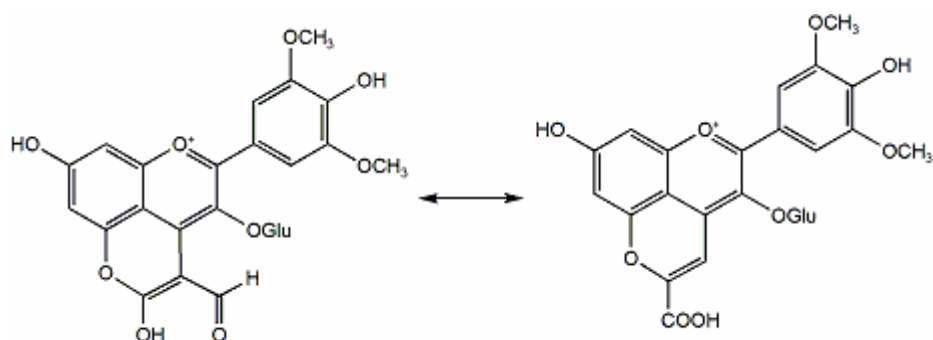
Klíčovou metodou studia těchto látek je hmotnostní spektrometrie - ideálně ve spojení s kapalinovou chromatografií. Důvodem pro volbu separace v mobilní fázi je netěkavost anthokyaninů (jak bylo zmíněno výše). Tandemová hmotnostní spektrometrie je v současnosti základem pro jednoznačnou identifikaci separovaných nebo izolovaných pigmentů. V naprosté většině případů je pro jednoznačné určení struktury potřeba doplnit i data z nukleární magnetické rezonance popř. jiných metod.

2.2.3.1 Vitisiny a 5-methylpyranoanthokyaniny:

V souvislosti s intenzivním výzkumem produktů zrání vína byla již v osmdesátých letech nalezena ve víně látka označená jako vitisin A^[74]. Mechanismus vzniku této látky a jejích derivátů byl ve vinném extraktu detailně studován^[75] a bylo postulováno, že na vzniku se podílí kyselina pyrohroznová, která kondenzuje s jádrem Mv-3-glu (konkrétně uhlíkem v poloze C4 a hydroxylem na uhlíku C5) mechanismem elektrofilní adice, spojené s následnou dehydratací a rearomatizací systému (viz obrázek 4). Struktura vitisinu A, navržená v původní práci^[74] byla pomocí NMR experimentů korigována v práci týmu H. Fulcrand^[75] a momentálně je v této problematice uznávána jako pravděpodobnější varianta (viz obrázek 5).



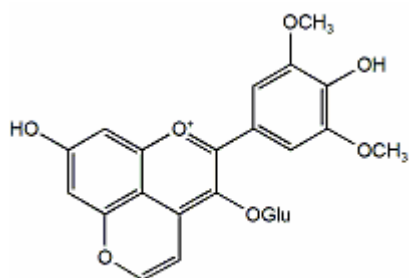
Obrázek 4: Reakce vzniku vitisinu A



Obrázek 5: struktura vitisinu A (původní a korigovaná)

Bylo dále zjištěno, že mechanismus reakce zahrnuje i oxidační krok, protože bez přístupu vzduchu byla produkce vitisinu A ve vzorku vína po 12 měsících ukončena (obsah vitisinu A dokonce klesal) i přesto, že ve směsi byly nadále k dispozici jak Mv-3-glu, tak kyselina pyrohroznová^[76]. Autoři zmíněného výzkumu předpokládají, že oxidantem je v tomto případě (podle jejich vyjádření) „aktivovaná forma kyslíku“, kterou produkují kvasinky. Existuje také řada prací, věnovaných výzkumu kinetiky tvorby vitisinu A a vlivu proměnlivých veličin (pH, teplota) na tento proces^[77,78,79].

Ve stejné práci jako vitisin A je popisován i vitisin B^[74] (viz obrázek 6). Jedná se o strukturu velice podobnou vitisinu A a principem vzniku je reakce Mv-3-glu s acetaldehydem.



Obrázek 6: struktura vitisinu B

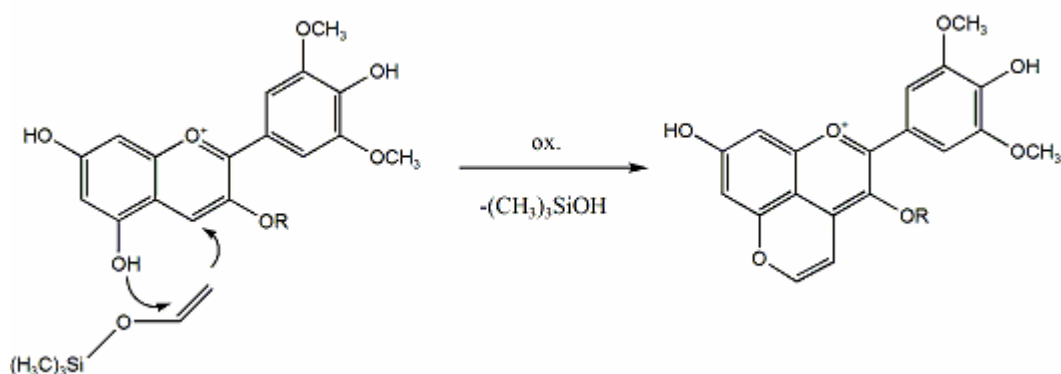
MS/MS analýza vitisinů izolovaných semipreparativní HPLC potvrdila, že na jádře je navázána glukosa popř. acetylglukosa (v kolizním spektru pozorovány ztráty 162 Da a 204 Da).

Obě látky (vitisin A i B), případně jejich acylderiváty se od anthokyaninů, z nichž vycházejí, liší zejména změnou profilu spektra v UV/VIS oblasti, kde absorpční maximum ($\lambda = 518$ nm pro Mv-3-glu) vykazuje hypsochromní posun v rozsahu 20-40

nm v závislosti na použitém rozpouštědle^[74]. Sloučeniny jsou tedy oproti původním červeným anthokyaninům spíše oranžové. Substituce v poloze 4 je také zodpovědná za lokální absorpční maximum v poloze kolem 350 nm a za odolnost vůči degradaci pomocí SO₂. Původní anthokyaniny se při použití SO₂ odbarvují^[80].

V následných pracích byla např. zkoumána kinetika vzniku těchto barviv ve vínech, záměrně obohacených acetaldehydem, příp. kyselinou pyrohroznovou. Experiment trval 10 týdnů a bylo zjištěno, že pro vznik nových barviv je příznivější jednorázový přídavek konkrétního množství cyklizačního činidla, než desetkrát opakovaný přídavek desetkrát nižší dávky (tzn. při zachování celkového množství přidaného činidla). Také bylo zjištěno, že hladina vitisinu B je vyšší spíše na počátku testovacího období, zatímco vitisin A se formuje ve větších koncentracích až v pozdější fázi^[81].

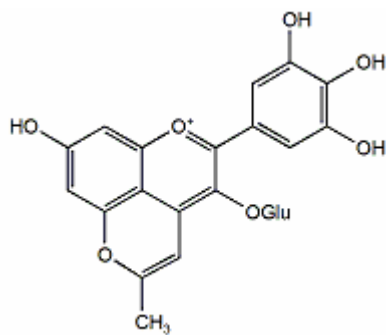
Odlišným přístupem k syntéze vitisinu B se zabývá práce J. Olivieri a spol., kde je navržena a úspěšně realizována syntéza této sloučeniny reakcí Mv-3-glu (resp. jeho p-kumaryl derivátu) s vinyloxytrimethylsilanem, kde po odštěpení hydroxytrimethylsilanu vzniká vitisin B, popř. jeho p-kumaryl derivát (viz obrázek 7). Identita získaných derivátů byla jednoznačně potvrzena NMR analýzou. Výtěžky příslušných reakcí se pohybovaly zhruba na úrovni 30% a ani změnou molárních poměru reaktantů se je nepodařilo zvýšit^[82].



Obrázek 7: Schéma vzniku vitisinu B reakcí s vinyloxytrimethylsilanem

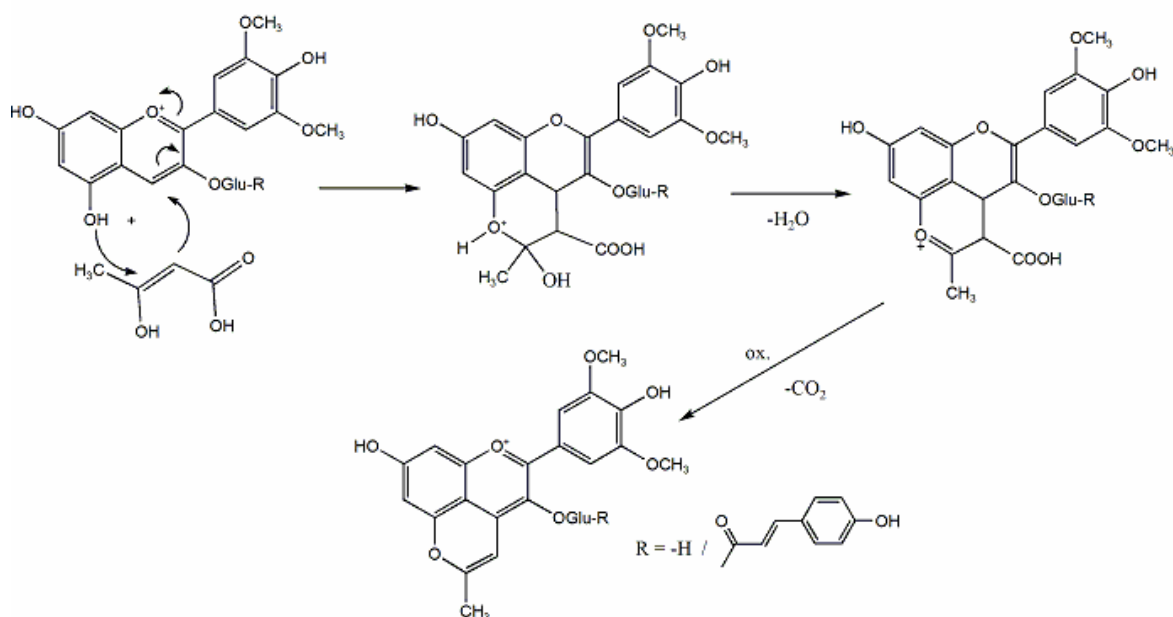
Jako vitisiny označujeme deriváty Mv-3-glu vzniklé reakcí s kyselinou pyrohroznovou (vitisin A) a acetaldehydem (vitisin B). Skupina pyranoanthokyninů je však podstatně širší a zahrnuje např. i 5-methylpyranoanthokyaniny vzniklé reakcí

anthokyaninů reakcí s acetonem. Tyto látky byly objeveny při extrakci anthokyaninů z černého rybízu acetonem^[83]. V této studii vznikají tedy 5-methylpyranoderiváty uměle při extrakci a jsou jedním z příkladů komplikací analýzy při nevhodně voleném složení extrakčního média^[84]. Byl prokázán vznik odpovídajících derivátů malvidinu, kyanidinu a delphinidinu (viz obrázek 8) a všechny struktury byly podrobeny 2D NMR analýze. 5-methylpyranoanthokyaniny byly identifikovány LC/MS technikou také v extraktech z plodů zimolezu kamčatského (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica*). Tyto deriváty vznikaly opět v extrakčním kroku a pouze pokud byl k extrakci použit aceton (nebo jeho směs s methanolem)^[28]. Reakce tohoto typu probíhají velice snadno s vysokým výtěžkem.



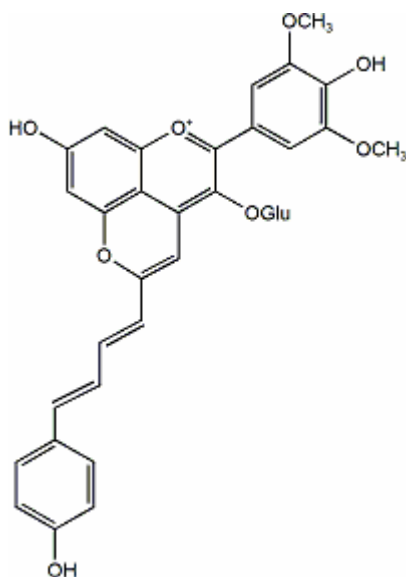
Obrázek 8: Struktura 5-methylpyranodelphinidin-3-glukosidu

Látky tohoto typu (tzn. s methylem v poloze 5) však mohou vznikat i přírodní cestou, kdy je cyklizačním činidlem kyselina acetoctová a syntéza kromě adice a oxidace obsahuje ještě dekarboxylační krok^[85] (viz obrázek 9). Citovaná práce se zabývá tématem pigmentů v portském víně, odpovídajícími prekurzory jsou Mv-3-glu a malvidin-3-p-kumarylglukosid. Oba 5-methylpyranoderiváty byly izolovány pomocí semipreparativní HPLC a jejich identita byla potvrzena NMR.



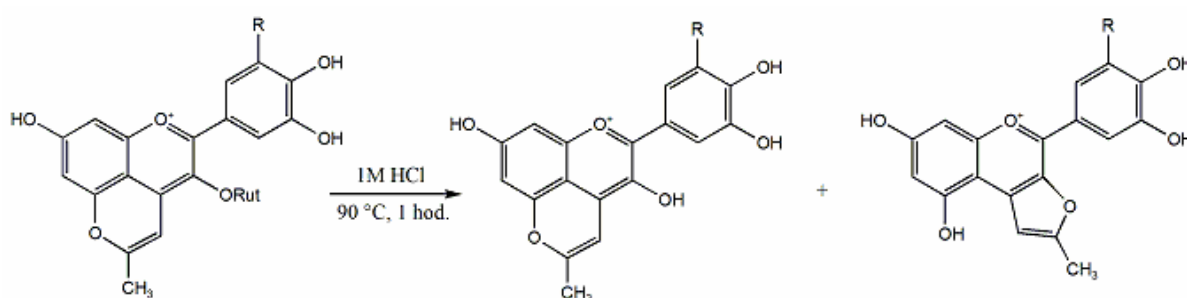
Obrázek 9: Schéma konverze malvidin-3-(*p*-kumaryl)glukosidu na odpovídající 5-methylpyranoderivát pomocí kyseliny acetocové

V laboratoři připravený 5-methylpyranomalvidin-3-glukosid byl úspěšně podroben reakci se sinapaldehydem za vzniku produktu, jehož struktura je uvedena na obrázku 10. Pro mechanismus jeho vzniku autoři navrhují nový mechanismus. Původní představa zahrnuje deprotonaci methylu 5-methylpyranoMv-3-glu a reakci vzniklého methylenu s aldehydem. Později bylo ale prokázáno, že demethylace probíhá až při alkalickém pH. Vzhledem k tomu, že autoři studie reakci se sinapaldehydem úspěšně provedli v kyselém prostředí (pH = 4), navrhují jiný reakční mechanismus, zahrnující přenos náboje po vytvoření dočasné π - π interakce mezi oběma aromatickými strukturami (článek obsahuje reakční schéma pro oba mechanismy). Produkt byl přečištěn semipreparativní HPLC a charakterizován UV/VIS, MS a NMR spektry. Také byly studovány jeho disociační rovnováhy (bylo pozorováno odštěpování protonu ze všech tří fenolových skupin) a v práci jsou uvedeny příslušné konstanty^[86].



Obrázek 10: Struktura produktu reakce 5-methylpyranoMv-3-glu a sinapaldehydu

Studiem chování 5-methylpyranoanthokyaninů bylo zjištěno, že v kyselém prostředí podstupují hydrolýzu vedoucí k tvorbě pyranoanthokyanidinů, které přesmykují na furanoanthokyanidiny (viz obrázek 11). Varem výchozích látek v kyselině chlorovodíkové byly získány oba typy látek, které byly dále přečištěny semipreparativní HPLC a identifikovány na základě 2D NMR spekter. Ve článku je prezentován návrh reakčního schématu kyselě katalyzovaného přesmyku^[87].



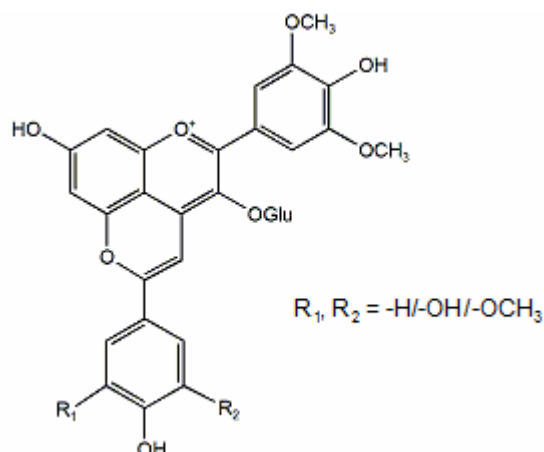
Obrázek 11: Hydrolýza 5-methylpyranoanthokyaninů (R: -OH / -H)

V jedné z novějších prací byly také izolovány a pomocí MSⁿ a NMR prostudovány glykosylované 5-karboxypyranokyanidiny a 5-karboxypeonidiny vyskytující se v nápojích z třešní^[88].

2.2.3.2 Fenolové pyranoanthokyaniny (pinotiny):

Kromě substituentů jako je karboxylová nebo methylová funkční skupina, může být na pozici 5 pyranoanthokyaninu navěšena i objemnější jednotka, jako např. deriváty fenolu. Taková analoga vitisinů (sloučeniny vycházející z Mv-3-glu) pak označujeme jako pinotiny. Poprvé byly pinotiny popsány v roce 1996^[89]. V jedné z prací věnovaných identifikaci těchto látek byla navržena hypotéza, že všechny typy pinotinů se ve víně vytváří reakcí Mv-3-glu s derivátem vinylfenolu, vzniklým enzymatickou dekarboxylací příslušné kyseliny^[90]. Tým M. Schwarze, který izoloval a spektrálně popsal pinotin A (viz obrázek 12)^[91] a zabýval se i vlivem faktorů na jeho vznik ve víně^[92], ale později dokázal, že reakce probíhá i v modelových vzorcích, kde je kromě anthokyaninu přítomna pouze dotyčná kyselina. Tento proces je pomalejší, než u přímé reakce s vinylfenoly (kde ke kvantitativní přeměně dochází během hodin). Nízká rychlost tak ovšem vysvětluje výsledky měření, kde se hladiny příslušných pinotinů ve zkoumaných vzorcích vína zvyšovaly ještě po letech, přičemž enzymatická přeměna kyselin na fenoly kvasinkami byla inhibována dalšími látkami přítomnými ve víně. Reakce tedy musela probíhat přímo mezi kyselinou a anthokyaninem^[93]. Citovaná práce obsahuje také návrh reakčního schématu. Zabývá se také kladným vlivem přítomnosti elektrondonorových skupin na benzenovém jádře příslušné kyseliny, které zvyšují rychlost přeměny.

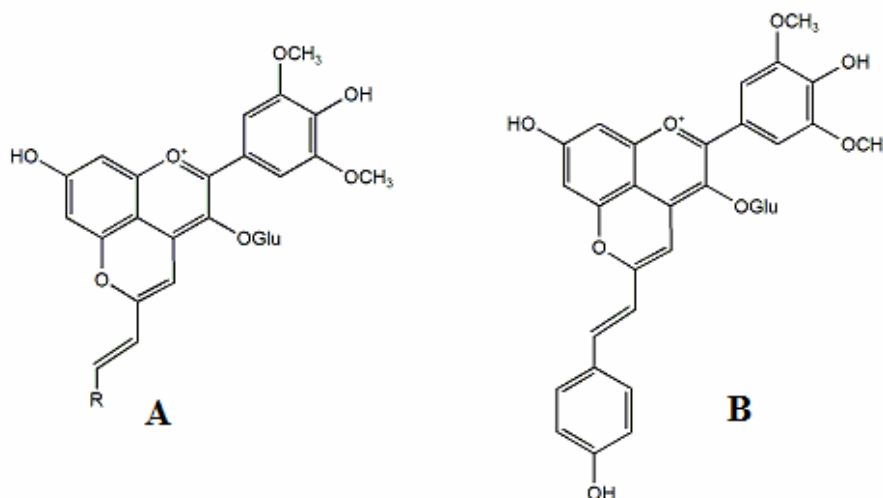
Tvorba pinotinů byla studována i v přítomnosti různých druhů kvasinek rodu *Saccharomyces*, které dekarboxylují kyseliny kávovou, ferulovou a p-kumarovou (deriváty skořicové kyseliny) na příslušné vinylfenoly. Směs těchto kyselin byla přidána do vína spolu s různými odrůdami kvasinek a byla hodnocena účinnost přeměny jednotlivých kyselin a následná cyklizace s anthokyaninem. Bylo zjištěno, že každý druh kvasinek metabolizuje kyseliny různou rychlostí, což vede k různé rychlosti produkce příslušných pinotinů^[94]. V další práci byl pak u vybraných druhů kvasinek sledován vliv pH, teploty a koncentrace SO₂ a to jak na produkci pinotinů (v práci je zmíněn derivát guajakolu), tak na produkci vitisinu A a B^[95].



Obrázek 12: Obecná struktura pinotinů (pinotin A: $R_1 = H$, $R_2 = OH$)

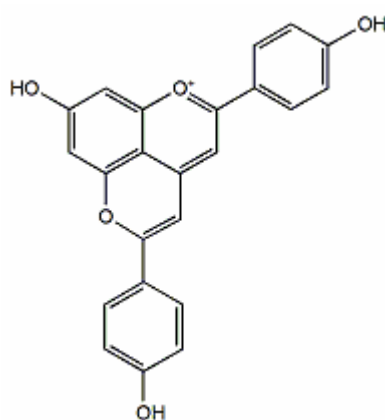
V portském víně byl nalezen také p-(vinylpyranomalvidin-3-O-glukosid)-fenol^[96]. Tento pigment je podobný pinotinům, ale obsahuje navíc vinylovou vazbu mezi anthokyanidinovým jádrem a fenolem, takže formálně je řazen mezi tzv. portisiny. Tak označujeme struktury s obecnou strukturou **A** (obr. 13). Vzhledem k tomu, že většina portisinů obsahuje jako substituent „R“ flavanoly, je jim níže věnována samostatná kapitola.

Produkt **B** (obr. 13) byl izolován frakcionací vína a následnou HPLC separací vybrané frakce. Identifikace byla provedena na základě vyhodnocení MS a NMR spekter. Pro kontrolu byl tento pigment také syntetizován v modelovém roztoku 20% ethanolu o $pH = 2,6$ reakcí vitisinu A a 4-vinylfenolu v poměru 1 : 250. Zajímavým rysem zkoumané látky je, že narozdíl od ostatních pyranoanthokyaninů nevykazuje hypsochromní, ale bathochromní posun (je zbarvena více do fialova)^[96].



Obrázek 13: **A**: obecná struktura portisinů, **B**: struktura p-(vinylpyranomalvidin-3-glukosid)-fenolu

Zajímavým pigmentem, který již nepatří mezi pinotiny, je pyrano-apigenidin 4-vinylfenol (obrázek 14). Tento symetrický derivát apigenidinu byl extrahován z listů rostliny *Sorghum bicolor*, izolován pomocí HPLC (hmotnost získaného individua činila 0,5 mg) a identifikován UV/VIS, MS a NMR spektry. Unikátnost tohoto produktu ještě zvyšuje fakt, že se jedná o první 3-deoxypyrananthokyanidin nalezený v přírodě^[97]. Významná je také stabilita této látky, která kombinuje dva důležité stabilizační principy v chemii anthokyaninů: čtvrtý (pyranový) cyklus a absenci hydroxyly v poloze 3. Přítomnost tohoto hydroxyly v molekule anthokyaninu zvyšuje náchylnost anthokyanidinového jádra vůči hydrataci, která vede k otevření C-kruhu^[98].



Obrázek 14: pyrano-apigenidin 4-vinylfenol

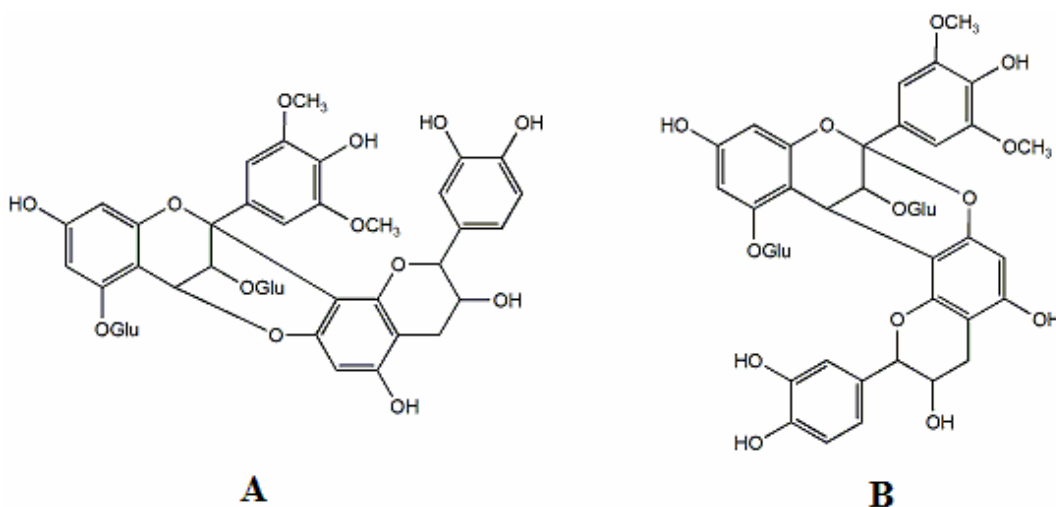
2.2.4 Studium reakcí anthokyaninů s jinými flavonoidy:

Vzhledem k aromaticitě flavonoidů může mezi anthokyaniny a jinými zástupci flavonoidů docházet k tvorbě π -komplexů, vázaných slabými interakcemi – kopigmentaci. Takovýto komplex vykazuje poté obecně jiné spektrální charakteristiky, např. odlišné absorpční maximum v UV/VIS oblasti^[99,100]. Kromě toho tvoří anthokyaniny s jinými flavonoidy ale i samy mezi sebou kovalentní vazby, přičemž vznikají složitější struktury. Jednotlivé typy budou probrány v následujících kapitolách. V této práci je pozornost věnována zejména kondenzaci anthokyaninů s katechinem a jeho epimerem – epikatechinem, jehož studium je předmětem části této práce.

Analytické techniky používané v oblasti studia těchto složitějších barviv odpovídají postupům používaným pro anthokyaniny - preferenčně HPLC-MSⁿ. Vzhledem k faktu, že reakcemi flavonoidů mezi sebou vznikají často oligomery i polymery, nachází zde podstatně vyšší využití spojení MALDI-TOF^[68].

2.2.4.1 Produkty přímé reakce anthokyanin–flavanol:

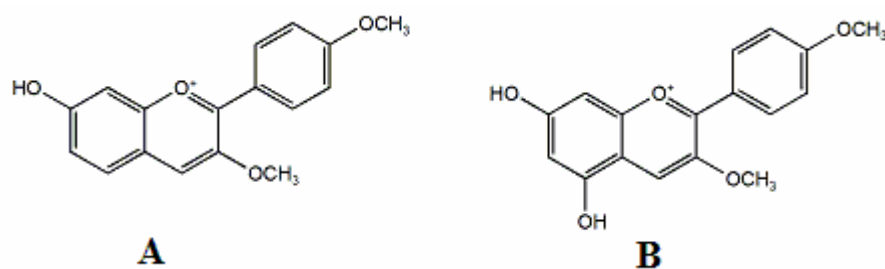
V roce 1984 byl pozorován vznik bicyckického aduktu malvidin-3,5-diglukosidu a katechinu v modelovém roztoku. Tento produkt byl bezbarvý, absorboval však v oblasti okolo 280 nm. V horké směsi butanol-HCl popř. v horké zředěné TFA poskytl intenzivní červené zbarvení, což je charakteristická reakce pro proanthokyanidiny. V souladu s výsledky NMR analýzy autoři předpokládali zánik aromaticity na malvidinovém kruhu C – viz obrázek 15^[101].



Obrázek 15: Navržené varianty struktury přímého aduktu malvidin-3,5-diglukosidu a katechinu

Jako zásadní je zdůrazňován nález pouze jednoho produktu kondenzace, což by svědčilo o vysoké stereospecifitě této reakce – dvě navržené struktury vyplývají z nejistoty autorů práce ohledně způsobu navázání katechinu. Jako klíčovou uvádějí autoři glykosylaci malvidinu v poloze 5, jelikož analogickou reakci Mv-3-glu s katechinem se za stejných podmínek nepovedlo realizovat^[101].

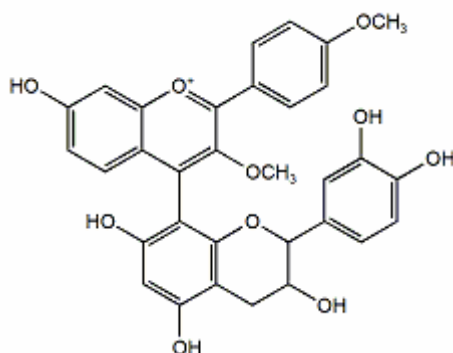
V modelovém roztoku byla možnost přímé kondenzace studována také s využitím dvou syntetických anthokyaninů, které byly připraveny smícháním anthokyaninu s katechinem v poměru 2:1 ve vodném 20% roztoku kyseliny octové (pH = 2) a stáním roztoku v temnu za pokojové teploty. U těchto derivátů uvedených na obrázku 16 byla zvolen jako substituent v poloze 3 methoxyl kvůli snadnosti přípravy, podobnosti s přírodními glykosidy a menšímu sterickému bránění při kondenzaci, což zvyšuje rychlost reakce těchto látek. I přesto pro dosažení dostatečných výtěžků pro následné analýzy reakce probíhala u obou látek po dobu čtyř měsíců^[102].



Obrázek 16: Struktura syntetických anthokyaninů pro přímou reakci s katechinem

Každá ze sloučenin vykazovala odlišné reakce. Sloučenina **A** (obr. 16) reagovala s katechinem za vzniku sloučeniny na obrázku 17. Návrh struktury je podpořen NMR spektry, která odhalují absenci signálu protonu na uhlíku C4, kterým se tedy anthokyanin váže na katechin. Autoři ale současně přiznávají, že není jisté, zda u katechinu vazba vychází z uhlíku C6 nebo C8 (i když uhlík C8 je obecně u flavanolů považován za reaktivnější).

Sloučenina **B** (obr. 16) vykazovala nižší reaktivitu než **A** (obr. 16), což je v souladu s kvantově chemickými výpočty, podle kterých hydroxyl v poloze 5 snižuje elektrofilitu centra na C4^[102]. Na základě charakteru UV/VIS spekter nalezených pigmentů byla vyslovena hypotéza, že sloučenina **B** (obr. 16) s katechinem vytváří analoga xanthyliových solí^[103], avšak autoři neposkytli žádná další data, která by tuto teorii potvrdila. Dále se práce věnovala také aduktům s můstkem tvořeným acetaldehydem, které budou probrány dále v příslušné kapitole.



Obrázek 17: Přímý adukt katechinu a syntetického anthokyaninu

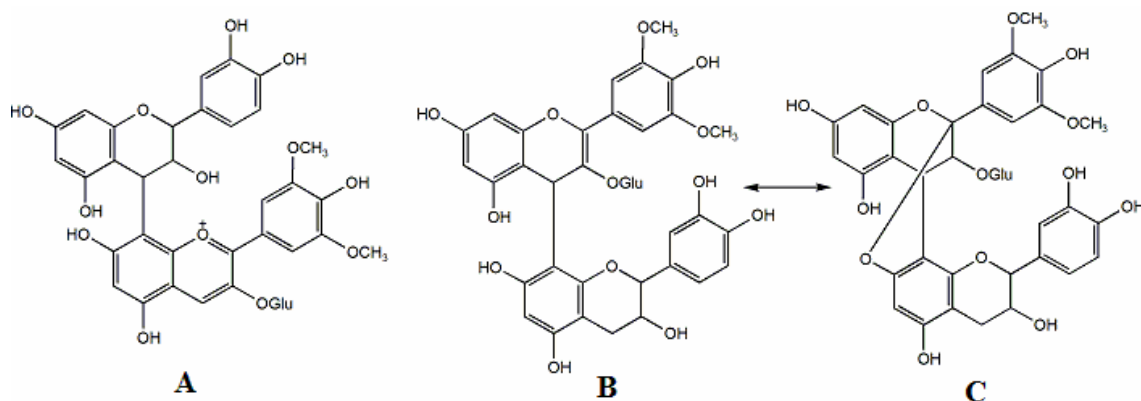
Strukturu kondenzovaných pigmentů je možné zkoumat také pomocí thiolýzy toluen- α -thiolem. Principem této metody je odlišení koncových a spojovacích jednotek

oligomerů. Středové monomery jsou přeměněny na benzylthioethery a koncové jednotky jsou uvolněny ve formě čistých monomerů^[104]. Takto byl pozorován výskyt přímých aduktů Mv-3-glu a epikatechinu v reálném vzorku vína odrůdy Cabernet Sauvignon. Autoři vycházeli z nálezů Mv-3-glu po thiolýze vodných extraktů frakcí vína. Pokud by tento anthokyanin byl výsledkem thiolýzy aduktů s ethylenovým můstkem (produkt kondenzační reakce s účastí acetaldehydu), byly by ve směsi přítomny také příslušné vinylderiváty jak Mv-3-glu, tak epikatechinu. Ty však nebyly nalezeny, z čehož autoři usuzují, že muselo dojít k thiolýze přímého aduktů obou látek^[105].

Pro strukturu aduktů byly navrženy dvě hypotézy. První spočívá ve faktu, že dříve zmiňované thioethery vznikají pouze ze sloučenin, které jsou vázány přes uhlík C4. Vzhledem k tomu, že ve směsi nebyly nalezeny, musí být ve zkoumaném aduktu Mv-3-glu vázán přes uhlík C6 nebo C8 (tzv. „F-A“ adukt, F = flavanol, A = anthokyanin – viz struktura **A** na obrázku 18). F-A adukty vznikají nukleofilním atakem hemiketalové formy anthokyaninu na elektrofilní karbokation flavanolu, vzniklý rozštěpením interflavanické vazby původního taninu (který obsahuje monomer flavanolu). Vzniká bezbarvý produkt F-AOH, který dehydratuje na flavyliovou strukturu typu F-A⁺^[106,107].

Existuje však i druhá hypotéza, podle které by Mv-3-glu s thiolem nereagoval v případě, že by byl vázán přes uhlík C4, pokud by byl z aduktů uvolněn v kationtové formě. Důvodem nereaktivity by v tomto případě mohla být delokalizace kladného náboje. Struktura s vazbou anthokyaninu vycházející z uhlíku C4 (tzv. A-F adukt) vzniká atakem kationtové formy anthokyaninu (A⁺) na uhlík C6 nebo C8 na A-kruhu flavanolu a vzniká produkt s flavenovou (z angl. „flavene“) strukturou původního anthokyaninu (struktura **B**, obrázek 18)^[105].

V chromatogramu jedné z frakcí extraktu vína byly nalezeny dva píky s odpovídající hmotou, které byly přiřazeny jednotlivým formám navrhovaných struktur **A** a **B**. Pro kontrolu byly pigmenty připraveny i v modelovém roztoku, kde bylo zjištěno, že k reakci nedochází v kyselém vodném prostředí, ale v ethanolu při teplotě 40 °C^[105].



Obrázek 18: Struktury přímých aduktů katechinu a Mv-3-glu; F-A derivát s vazbou na uhlíku C8 anthokyaninu (**A**); A-F derivát s vazbou na uhlíku C4 anthokyaninu ve flavenové (**B**) a v bicyckické (**C**) formě

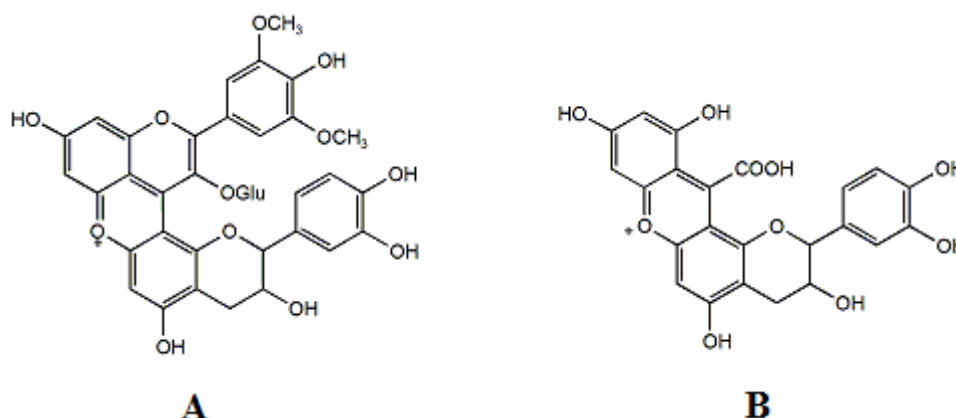
Otázka struktury A-F aduktu dále stejným autorským kolektivem dále rozebírána v následné práci. Vzhledem k tomu, že analyzované látky byly v původním extraktu vína přítomny ve velice malém množství, byly připraveny v modelovém roztoku podle výše zmíněného postupu. Vzniklé sloučeniny byly analyzovány HPLC/ESI-MS a hlavní produkt pak i pomocí NMR. Modelový roztok poskytl tři sloučeniny typu A-F^[108].

Podobně jako v předchozích experimentech byla provedena thiolýza směsi, která měla vyloučit nebo potvrdit flavenovou strukturu těchto tří sloučenin. Vzhledem k tomu, že sloučeniny se nerozložily, byla vyloučena flavenová struktura **B** z obrázku 18, protože ta by thiolýzou by poskytla čistý Mv-3-glu. Práce se dále věnovala jen hlavnímu aduktu ve směsi, u kterého byla potvrzena bicyckická struktura ve spojující části molekuly **C** (obrázek 18). Produkt byl dále charakterizován hmotnostními spektry a NMR včetně 2D technik. Jako alternativa k přeměně intermediátové flavenové formy na flavyliovou se tedy nabízí přeměna v bicyckickou strukturu s vazbami C-C a C-O-C (tzv. vazba typu A)^[108]. Dalším autorům^[101] se nepodařilo tuto strukturu připravit. To je zřejmě zapříčiněno rozdílným složením modelových roztoků použitých ve srovnávaných pracích (práce^[101]: směs Mv-3-glu a katechinu v molárním poměru 1:4 v 10 % vodném roztoku HCl, dusíková atmosféra, 38 °C; práce^[108]: ekvimolární směs Mv-3-glu a katechinu, ethanol, argonová atmosféra, 35 °C).

Pozornost byla věnována také vlivu pH na přímou kondenzaci Mv-3-glu a epikatechinu. V práci byl použit monomer flavanolu, aby nedocházelo ke vzniku F-A aduktu mechanismem uvedeným dříve (tzn. rozkladem prokyanidinu). V souladu

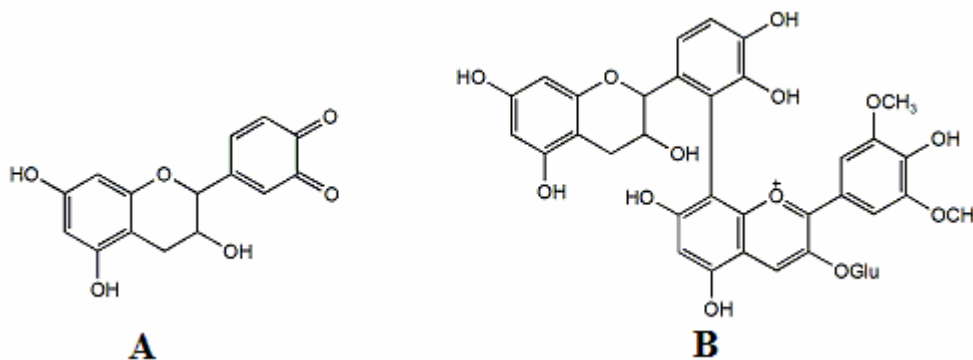
s předchozími pracemi bylo zjištěno, že vzniká flaven **B** (obr. 18) , který při pH = 2 přechází na adukt s vazbou typu A **C** (obr. 18)^[109].

Při hodnotách pH mezi 3,2 a 6 vznikají z flavenu **B** (obr. 18) xanthyliové soli. Předpokládaná struktura **A** (obr. 19) ale neodpovídá iontům pozorovaným v MS. Proto byla navržena hypotéza o přeměně flavenu na nestabilní A-F adukt, který se rozpadá na fragmenty, z nichž se sekundárně formuje strukturně odlišná pozorovaná xanthyliová sůl **B** (obr. 19). Jinou možností je tvorba navržené soli **A** (obr. 19) a její oxidativní rozklad na sloučeninu **B** (obr. 19)^[109].



Obrázek 19: předpokládaná (**A**) a pozorovaná (**B**) struktura vzniklé xanthyliové soli

Struktura **B** na obrázku 20 je výsledkem vyhodnocení MS³ spektra sloučenin vznikajících při pH ≥ 4 a detekovaných při m/z 781. Pozorovaná fragmentace neodpovídá A-F ani F-A typu aduktu, ale je v dobré shodě s pozorováním chování oxidovaných forem epikatechinu a je proto navrženo, že se jedná o izomery aduktu, kde se anthokyanin váže na epikatechin v oxidované chinoidní formě přes jeho B-kruh. Pro kontrolu byl připraven modelový roztok o-chinonu katechinu (sloučenina **A**, obr. 20) a Mv-3-glu, ve kterém byly následně identifikovány shodné produkty. V takto připraveném modelovém roztoku nebyly nalezeny ionty xanthyliové soli. U sloučenin **B** z obr. 19 a **B** z obr. 20 je v článku diskutován mechanismus jejich vzniku^[109].



Obrázek 20: **A**: o-chinon katechinu, **B**: adukt s vazbou přes B-kruh epikatechinu

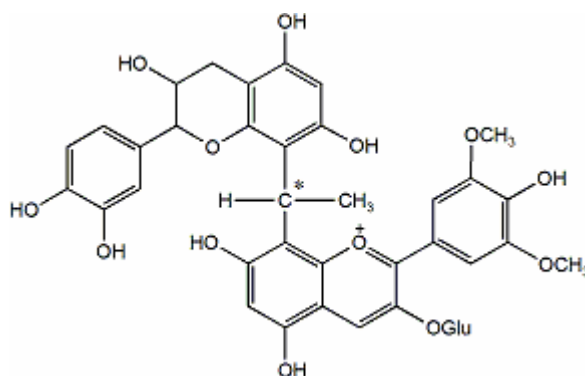
2.2.4.2 Vznik aduktů anthokyanin–flavanol s můstkem tvořeným malou molekulou:

Již v roce 1976 byla prováděna studie modelových roztoků obsahujících anthokyaniny, flavanoly a acetaldehyd, která měla objasnit barevné změny vína v čase. Bylo zjištěno, že anthokyaniny reagují velice pomalu, jsou-li v roztoku samy, nebo pouze s flavanoly, zatímco v přítomnosti acetaldehydu dochází k výraznému nárůstu zabarvení roztoku a úbytku koncentrace původních polyfenolů. V práci je sledována reaktivita jednotlivých komponent a je navrženo reakční schéma zachycující vznik nových sloučenin v roztoku. Ty jsou tvořeny kondenzací anthokyaninu s flavanolem přes acetaldehydový můstek^[110].

Vzhledem k tomu, že tato práce nerozkryla dostatečně strukturu nově vzniklých pigmentů, věnovala se od té doby dané problematice řada vědeckých kolektivů. Největší pozornost je stále věnována reakcím Mv-3-glu. Pomocí HPLC s DAD detekcí byly ve směsi Mv-3-glu, katechinu a acetaldehydu objeveny dva absorbující pigmenty s bathochromním posunem absorpčního maxima^[111]. Struktura těchto sloučenin byla dále zkoumána a jako pravděpodobný mechanismus reakce byla navržena reakce acetaldehydu s katechinem, vedoucí ke karbokationtu, který reaguje s anthokyaninem^[112].

Hypotéze předcházela příprava modelových roztoků obsahujících pouze anthokyanin a acetaldehyd, kde autoři nezaznamenali při pH = 3,2 žádnou změnu v roztoku, zatímco v roztoku acetaldehydu a katechinu došlo ke tvorbě tří různých sloučenin^[112]. Tento závěr je zjevně v rozporu s výsledky prací o vitisinu B. Rivas-Gonzalo a kol. uvádějí, že modelový roztok obsahoval Mv-3-glu a acetaldehyd (není uveden poměr látek), pH roztoku bylo 3,2 a roztok byl uchováván za laboratorní teploty.

Během třiceti dnů v něm nedošlo k žádné výraznější reakci a došlo víceméně jen k degradaci anthokyaninu za vzniku bezbarvých produktů^[112]. Oproti tomu práce Bakker a Moraty popisují výskyt vitisinu B ve víně^[74], resp. ve víně cíleně obohaceném acetaldehydem^[81]. Přesto, že tyto dvě práce nebyly uskutečněny v modelovém roztoku, je s podivem, že reakce v tomto případě probíhala s vysokými výtěžky – během dvou týdnů vzrostla koncentrace vitisinu B ve víně obohaceném acetaldehydem z 0,28 mg/l na 2,20 mg/l^[81]. Výše zmíněné neznámé tři sloučeniny vzniklé v roztoku acetaldehydu a katechinu byly izolovány preparativní HPLC a byly ponechány reagovat s Mv-3-glu. V jednom případě byly získány dříve zmíněné dva pigmenty^[111], zatímco ostatní dvě látky s anthokyaninem nereagovaly. Struktura těchto tří intermediátů vzniklých v roztoku katechinu a acetaldehydu není v práci uvedena, autoři však navrhli struktury finálních aduktů. Vzhledem k existenci jediného intermediátu reakce (produkt kondenzace acetaldehydu s epikatechinem) se autoři domnívají, že reakce je stereospecifická a acetaldehyd je jak na anthokyanin, tak na katechin vázán výlučně v poloze 8. Přítomnost dvou autoři vysvětlují chiralitou můstkového uhlíku (viz obrázek 21)^[112].



Obrázek 21: Struktura můstkových aduktů Mv-3-glu, katechinu a acetaldehydu^[112]

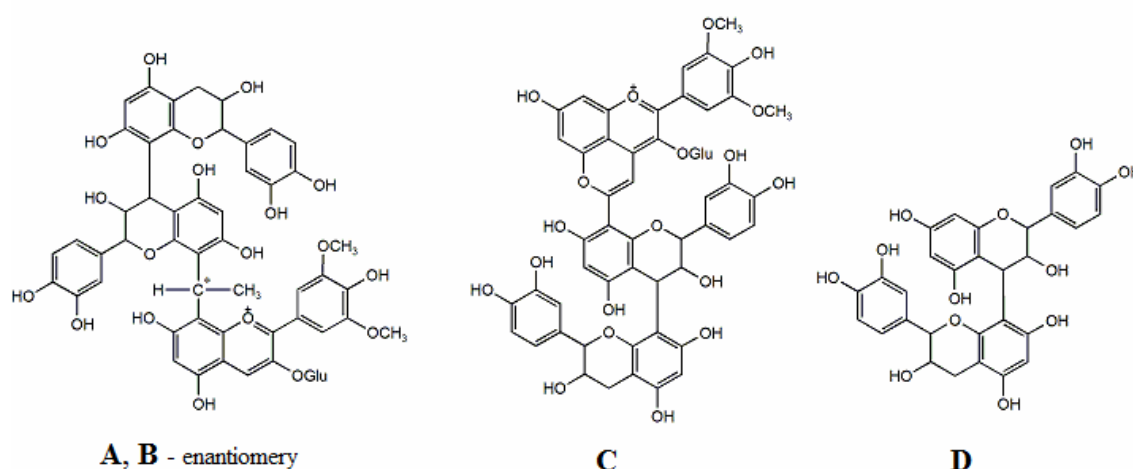
Reakce probíhá lépe při nižším pH (srovnáván úbytek Mv-3-glu při pH = 3,2 a 4,0), avšak vzhledem k mechanismu je nižší pH důležité pro vznik kationtu z acetaldehydu a ne pro flavyliovou strukturu anthokyaninu. Při vyšší teplotě vznikají v modelovém roztoku rychleji polymerní pigmenty, takže pro vznik dimerů je vhodnější teplota nižší (srovnávána teplota 15 a 32 °C). Přítomnost můstkových aduktů spolu s dalšími pigmenty byla později prokázána i ve vzorcích vína^[49,113].

Rychlý vznik můstkových sloučenin anthokyaninu a katechinu byl pozorován i v případě použití syntetického anthokyaninu **B** (obrázek 16). Také zde je pozorován

vznik dvou izomerů, pro které bylo pomocí NOE NMR zjištěno, že jak katechin, tak anthokyanin jsou vázány přes uhlík C8. I v tomto případě autoři jako jedinou odlišnost obou izomerů udávají konfiguraci na chirálním uhlíku. Reakce s anthokyaninem **A** z obr. 16 neproběhla. Vysvětlením je, že acetaldehyd dobře reaguje jen s jádrem podobnými floroglucinolu. Anthokyanin **A** (obr. 16) je strukturně výrazně odlišný – postrádá hydroxyl v poloze 5^[102].

Analogicky reaguje Mv-3-glu v přítomnosti acetaldehydu také s prokyanidinem B2 (struktura **D**, obrázek 22), kdy vznikají tři různé produkty (**A**, **B** a **C**, obrázek 22). Produkty **A** a **B** jsou analoga dříve pozorovaných derivátů vzniklých reakcí s katechinem. Produkt **C** spadá do kategorie pyranoanthokyaninů, ovšem reziduem na pyranovém kruhu (označovaném jako D) je v tomto případě prokyanidin B2. Mechanismus vzniku produktu **C** není v článku diskutován, autoři se ale opírají o výzkumy v oblasti pyranoanthokyaninů, přičemž usuzují, že reakčním činidlem je v tomto případě 8-vinylprokyanidin B2, který vzniká rozpadem oligomerů flavanolů vázaných ethylenovým můstkem^[114]. Mechanismus vzniku vinylflavanolů bude dále probrán v samostatné kapitole.

U produktu **C** byla měření UV/VIS spekter prokázána vyšší odolnost vůči zvýšení pH a vůči odbarvování pomocí SO₂ oproti původnímu anthokyaninu. Produkt **C** vzniká pomaleji než pigmenty **A** a **B**, ale nejeví tendenci k polykondenzaci, takže v roztoku je stabilnější. Při použití jiných flavanolů (katechin, epikatechin, prokyanidin B3) místo prokyanidinu B2 je tvorba pigmentů s pyranovým kruhem silně utlumena oproti klasickým můstkovým sloučeninám^[114].



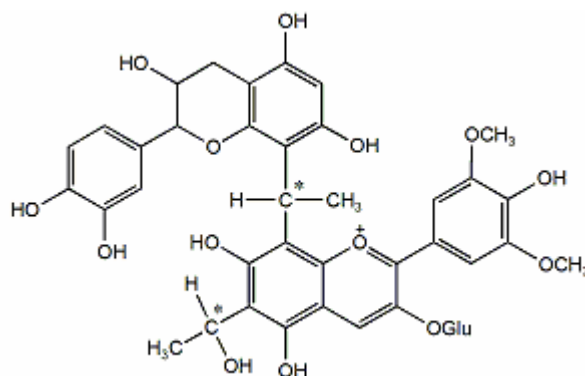
Obrázek 22: **A**, **B**, **C**: adukty Mv-3-glu, **D**: prokyanidin B2

Studium vyšších oligomerů (kondenzací Mv-3-glu s epikatechinem) ukázalo, že tyto látky obsahují vždy nejvýše dvě anthokyaninové jednotky a to v terminálních (koncových) polohách. Mezi nimi však může být acetaldehydem vázáno více molekul flavanolu^[115].

Konkrétně byly nalezeny dimery, trimery a tetramery obsahující vždy jednu anthokyaninovou jednotku. Dále byl identifikován tetramer obsahující dvě anthokyaninové jednotky v terminálních polohách (nalezen jako dvakrát nabitý ion). V roztoku nebyla zjištěna přítomnost dimeru složeného pouze z Mv-3-glu ani meziprojektu, který by vznikl reakcí acetaldehydu aktivovaného protonací s Mv-3-glu. Naproti tomu byla zjištěna přítomnost ethyl- a ethanolderivátů epikatechinu prokazující, že prvním krokem při kondenzaci je atak karbokationtu acetaldehydu na flavanol.

Thiolýza produktů ukázala, že ze dvojice vazeb typu anthokyanin-ethyliden a flavanol-ethyliden má větší náchylnost ke štěpení druhá z nich. Také bylo zjištěno (porovnáním teplot potřebných k rozkladu), že vazba flavanol-ethyliden je mnohem stabilnější v aduktu flavanolu s anthokyaninem, než v můstkovém dimeru flavanolu^[115].

Při zkoumání vlivu koncentrace kyseliny vinné na vznik můstkových sloučenin Mv-3-glu s epikatechinem byly kromě očekávaných produktů **A** a **B** (obr. 22) nalezeny i čtyři zcela nové sloučeniny^[116], kterým byla na základě jejich spektrálních charakteristik (UV/VIS, MS) přiřazena obecná struktura uvedená na obr. 23. Taková struktura byla spolu s dalšími pozorována již dříve stejným autorským kolektivem u sloučenin ve víně^[117]. Přítomnost čtyř sloučenin se stejnou hodnotou m/z autoři připisují existenci dvou chirálních center v molekule a pozorované pigmenty jsou dle jejich závěrů diastereomery^[116]. Byla pozorována závislost mezi úbytkem izomerů sloučeniny z obr. 21 a vznikem dvojic izomerů nových sloučenin, odpovídajících látkám se strukturou z obr. 23. To by potvrdzovalo hypotézu o optické izomerii všech těchto látek. Z každé ze dvojice sloučenin z obr. 21 by pak navázáním dalšího chirálního centra vznikly dva nové izomery (celkem tedy čtyři).

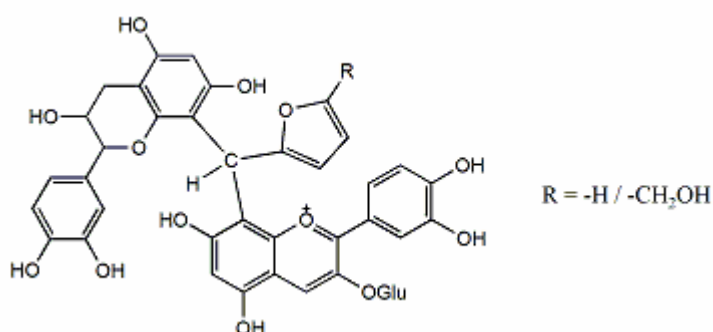


Obrázek 23: Struktura nových pigmentů nalezených v modelovém roztoku

Na celou problematiku navázal výzkum reakcí, kdy je můstkujícím činidlem jiná molekula s karbonylovou funkční skupinou. Takto byla např. v modelovém roztoku porovnávána reaktivita acetaldehydu, kyseliny glyoxylové, furfuralu a 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF)^[118]. Bylo zjištěno, že acetaldehyd reaguje nejrychleji, za vzniku fialových produktů, které jsou v roztoku stabilní, zatímco u zbylých tří sloučenin byly fialové adukty nalezeny v malé míře a převažující formou byly bezbarvé sloučeniny odpovídající dimerům flavanolu, tedy vzniklé bez účasti Mv-3-glu. Tyto bezbarvé produkty byly schopné dále přecházet na deriváty odpovídajících xanthyliových solí příp. dále polymerovat. Analoga těchto bezbarvých produktů, která by vznikala při reakci s acetaldehydem, nebyla nalezena. Při porovnání rychlosti reakce katechinu s furfurelem a HMF monitorováním úbytku katechinu z reakční směsi byl jako reaktivnější vyhodnocen furfural. Také bylo zjištěno, že úbytek Mv-3-glu v reakční směsi s katechinem a furfurelem neodpovídá přírůstku příslušných barviv a molekula Mv-3-glu tedy v prostředí furfuralu zároveň degraduje. To dále snižuje výtěžek kondenzační reakce. Přestože má kyselina glyoxylová, furfural a HMF nízkou schopnost tvořit kondenzované produkty a tím stabilizovat barvu, je možné působení těchto látek prakticky využít. Produkty jejich reakcí s katechinem a jemu podobnými sloučeninami snižují trpkou a hořkou chuť potravinových přípravků, způsobených přítomností těchto taninů.

Řada můstkových pigmentů vzniklých spojením anthokyaninů a flavanolů byla dále rozšířena o deriváty obsahující můstek tvořený dalšími alifatickými aldehydy a benzaldehydem^[119], přičemž v případě propionaldehydu byla identifikace produktu potvrzena i NMR analýzou izolované sloučeniny^[120].

Byla sledována i rychlost reakce v případě změny anthokyaninové jednotky s následujícími výsledky: při reakci s prokyanidinem B2 a acetaldehydem bylo pořadí reaktivity ve vybrané trojici anthokyaninů následující: peonidin-3-glukosid > kyanidin-3-glukosid > malvidin-3-glukosid. Tento výsledek zdůrazňuje význam substituce na B-kruhu anthokyaninu ve vztahu k jeho následné reaktivitě v roztoku. Kyanidin-3-glukosid byl také podroben reakci s katechinem a furfurelem resp. HMF^[121] za vzniku příslušných barevných produktů (viz obrázek 24) doprovázených bezbarvými adukty stejně jako ve výše zmíněné práci zkoumající reakce Mv-3-glu^[118].



Obrázek 24: Adukt katechinu a kyanidin-3-glukosidu s furfuralovým můstkem

Jedna z nejnovějších prací zabývající se studiem procesů ve víně kombinuje poznatky shrnuté v této a předcházející kapitole. V modelovém roztoku byla zkoumána možnost kondenzace přímých aduktů typu F-A s dalšími jednotkami katechinu prostřednictvím aldehydických (ethylidenových) můstků a dimerizace F-A aduktů přes aldehydický můstek. Nejprve byla dle starších postupů provedena syntéza F-A aduktu (katechin-(4,8)-malvidin-3-glukosid) za využití kyselého katalyzovaného štěpení interflavanické vazby v prokyanidinu B2. Následně byl tento produkt přečištěn semipreparativní HPLC a v roztoku 20% ethanolu okyseleného HCl na pH = 3,0 smíchán s přebytkem acetaldehydu a příp. katechinu. V případě kondenzace s katechinem byl očekáván vznik až osmi izomerů (vazba přes uhlíky C6 a C6; C6 a C8; C8 a C6; C8 a C8 obou katechinů účastnících se reakce). Významnou odezvu měly při chromatografické analýze čtyři izomery, z nichž u dvou nejzastoupenějších se předpokládá vazba C8-C8 a R nebo S izomerie. Produkty byly identifikovány na základě tandemových MS spekter (bylo pozorováno především štěpení glukosy a epikatechinových jednotek). V případě dimeru F-A aduktu s ethylidenovým můstkem

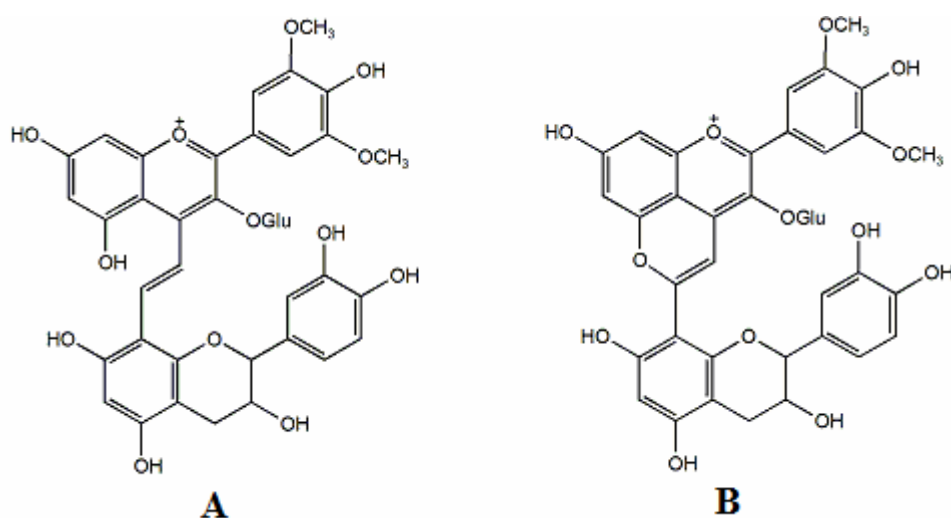
byl nalezen dvakrát nabitý produkt, což bylo mimo jiné prověřeno sledováním izotopických píků. Opět byly zkoumány čtyři nejvýznamnější píky spektra. Tandemová MS spektra potvrdila předpokládanou strukturu (kritéria byla podobná jako v předchozím případě), navíc bylo zjištěno, že tyto produkty je možno nalézt i v první reakční směsi – tzn. F-A adukt soutěží s katechinem při adici na karbokation typu ethylden-F-A⁺. Tyto sloučeniny byly zároveň úspěšně nalezeny ve vzorcích vína, z čehož vyplývá, že autory navrhovaný mechanismus zde probíhá. Důležitým faktem však zůstává, že autoři neposkytlí data ohledně stereochemické konfigurace jednotlivých izomerů zejména ve vztahu k jejich intenzitě ve spektru, navíc tyto produkty jsou jen minoritní složkou mezi velkým množstvím jiných produktů v reakční směsi^[122].

2.2.4.3 Vznik aduktů pyranoanthokyanin–flavanol:

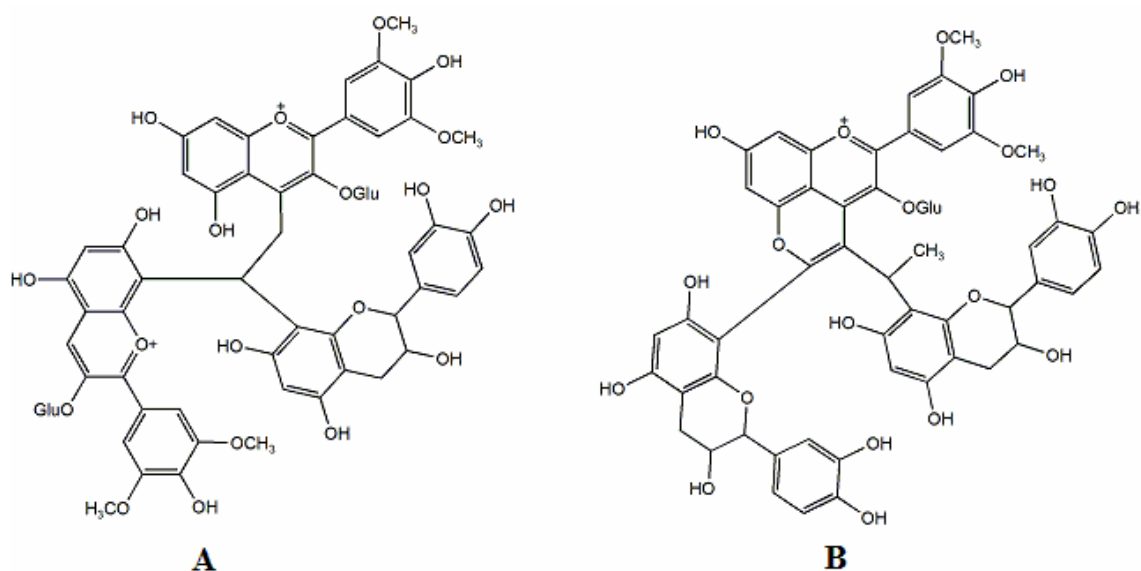
Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, při zkoumání kondenzace Mv-3-glu s prokyanidinem B2 byl získán adukt, odpovídající přímé kondenzaci pyranomalvidin-3-glukosidu s tímto prokyanidinem přes polohu 5, tedy přes nově vzniklý pyranocyklus^[114] (viz sloučenina **B**, obr. 22). Podobné adukty byly nalezeny přímo ve vzorcích vína, kde byl na pyranocyklus navázán katechin^[49,90] a prokyanidin B2^[49] a anthokyaninem byl Mv-3-glu^[49,90], příp. jeho acetyl- a p-kumaryl-deriváty^[49]. Deriváty odvozené od katechinu, epikatechinu a prokyanidinu B3 byly rovněž nalezeny ve vzorcích vína a potvrzeny NMR spektry^[123].

Předpokládaným mechanismem vzniku flavanol-pyranoanthokyaninů je reakce anthokyaninu s 8-vinylflavanelem. Synteticky byl z katechinu připraven 8-vinylkatechin^[124]. Zajímavé je zjištění, že 8-vinylkatechin je nestabilní v kyselých roztocích, kde podstupuje kysele katalyzovanou dimerizaci. Dimery byly zkoumány pomocí MS a NMR a byl nalezen nejstabilnější izomer^[125]. Následně byla již cíleně provedena syntéza pyranomalvidin-3-glukosid-katechinu **B** (obr. 25) v modelovém roztoku obsahujícím Mv-3-glu a 8-vinylkatechin^[126]. Kromě dimeru 8-vinylkatechinu vznikajícího kyselou katalýzou již v rané fázi reakce byl nalezen přímý adukt vinylkatechinu a Mv-3-glu **A** (obr. 25) s $m/z = 807$. Ten postupně ze směsi ubýval za přírůstkem žádaného pyranoanthokyaninu **B** (obr. 25) s $m/z = 805$. Maxima koncentrace látky **B** v roztoku bylo dosaženo po dvaceti dnech reakce. Kromě tohoto produktu byly ve směsi nalezeny dva trimery, strukturně vycházející z látek **A** a **B**, kdy

v prvním případě dvojnou vazbu vinylu **A** atakuje hemiacetalová forma Mv-3-glu a v druhém případě aktivovaná (protonovaná) molekula 8-vinylkatechinu za vzniku sloučenin o strukturách **A** popř. **B** (obr. 26). Ve směsi vzniká také můstkový adukt (obr. 21), který je ale přítomen v malé míře. Přednostním mechanismem, který dává vzniknout pyranocyklu **B** (obr. 25) je tedy zřejmě nukleofilní atak 8-vinylkatechinu na pyranový kruh anthokyaninu. Struktura sloučeniny **B** (obr. 25) byla potvrzena NMR spektry (po izolaci pomocí LC)^[126].



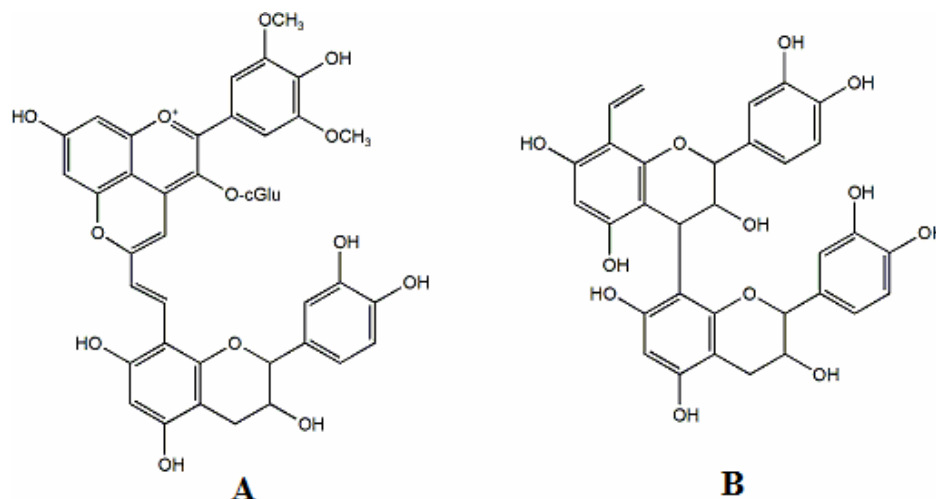
Obrázek 25: **A**: přímý adukt 8-vinylkatechinu a Mv-3-glu, **B**: pyranocyklus vzniklý oxidativní cyklizací **A**



Obrázek 26: Trimerní adukty Mv-3-glu a 8-vinylkatechinu

2.2.4.4 Vinyflavanolové adukty pyranoanthokyaninů (portisiny):

Sloučeniny tohoto typu byly poprvé popsány v roce 2003 jako nově nalezené pigmenty v extraktu portského vína^[127]. Mají intenzivní modrou barvu, která vychází z jejich struktury obsahující vysoký počet konjugovaných dvojných vazeb. Strukturně se jedná o kondenzáty pyranoanthokyaninů s vinyflavanoly jak ukazuje obrázek 27.

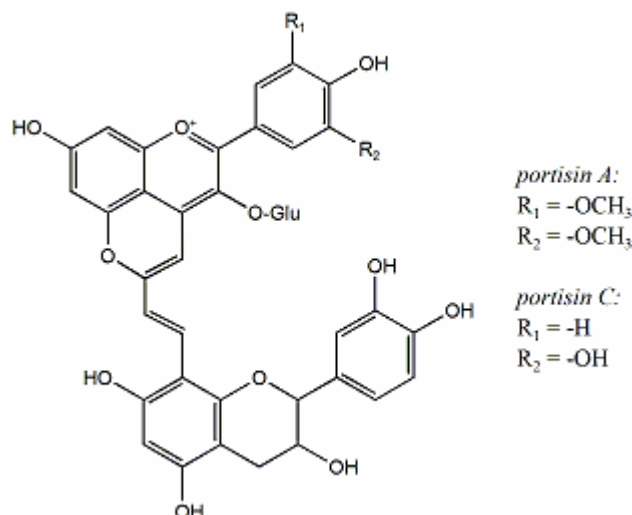


Obrázek 27: **A**: portisin B (cGlu = p-kumarylglukosyl), **B**: vinylprokyanidin B2

V extraktu byly identifikovány adukty vinylprokyanidinu B2 (**B**, obr. 27) a pyranoMv-3-glu, příp. pyranomalvidin-3-p-kumarylglukosidu. Vazba vzniká na pyranoanthokyaninu v poloze 5. Byl diskutován mechanismus vzniku tohoto typu látek a pro jeho ověření byl připraven modelový roztok, z něhož byl získán adukt pyranomalvidin-3-p-kumarylglukosidu a 8-vinylkatechinu (portisin B). U všech zmíněných struktur byla pořízena UV/VIS, NMR a MS/MS spektra, která jsou ve shodě s navrhovanou strukturou^[127].

V další práci byl poté v modelovém roztoku připraven také adukt Mv-3-glu s 8-vinylkatechinem - portisin A (viz obrázek 28) - a rovněž analyzován pomocí UV/VIS, NMR a MS^{MS}^[128]. Vybrané portisiny byly také syntetizovány, zkoumány z hlediska stability v různém pH a při vystavení působení SO₂ a byly určeny jejich molární absorpční koeficienty (ϵ)^[129]. Jako jeden z vybraných derivátů byl v tomto případě úspěšně syntetizován adukt pyranokyanidin-3-glukosidu s 8-vinylkatechinem - portisin C (viz obrázek 28).

Závěrem je důležité zmínit, že portisiny byly prvními popsány pigmenty odvozenými od anthokyaninů, které nevznikají přímo reakcí přírodních anthokyaninů, ale reakcí produktů jejich cyklizace (tzn. pyranoanthokyaninů)^[127].

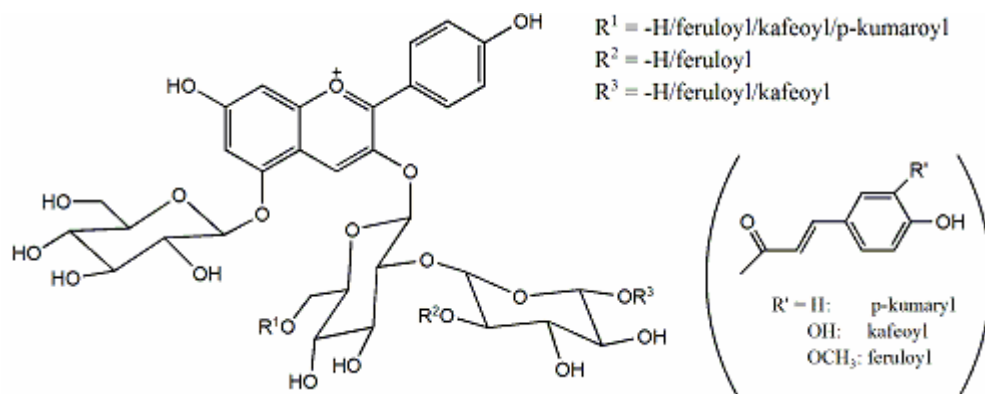


Obrázek 28: Struktura portisinů A a C

2.2.5 Pelargonidin a jeho dosud popsaná reaktivita:

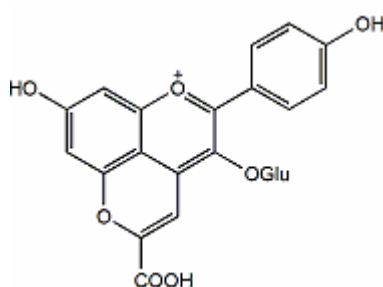
Pelargonidin je nejjednodušším z šesti hlavních anthokyanidinů (viz obr. 2). Je majoritním anthokyanidinem např. v jahodách^[130,131,132] (zde je přítomen jako 3-glukosid - callistephin) a v ředkvičkách^[133,134] (zde převážně ve formě různě acylovaných glukosidů). Biosyntéza callistephinu byla studována izotopovým značením různých sloučenin (kyselina octová, kyselina skořicová aj.) uhlíkem ^{14}C ^[132]. Již léta jsou známy také syntetické způsoby, kterými lze pelargonidin a jeho deriváty připravit z jiných flavonoidů^[135]. Mezi méně běžné deriváty můžeme zařadit např. pelargonidin glykosylovaný cukernými zbytky v různých polohách tak, jak byl nalezen HPLC-MS/MS analýzou v jahodách^[136]. Dalšími běžnými deriváty jsou acylované pelargonidintriglukosidy, které byly nalezeny a identifikovány v ředkvičkách metodou HPLC-DAD-FAB/MS a následnou NMR analýzou. Acylovými zbytky zde byla rezidua kyseliny ferulové, kávové a p-kumarové^[133] (viz obrázek 29).

Z hlediska reaktivity nebyla pelargonidinu doposud věnována příliš velká pozornost. Práce na téma jeho derivátů jsou v naprosté většině zaměřeny na detekci, identifikaci a příp. kvantifikaci těchto sloučenin v reálných vzorcích.



Obrázek 29: Struktura acylovaných triglukosidů pelargonidinu

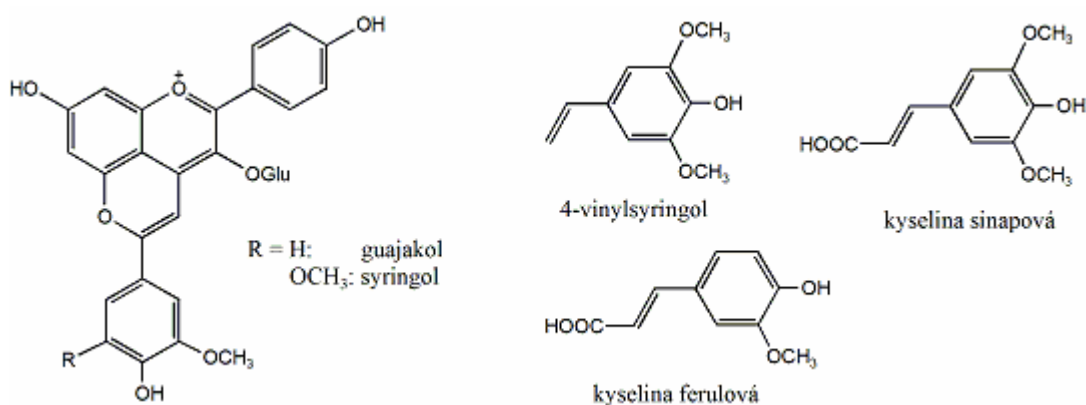
Ze sloučenin, kde dochází k modifikaci přímo na anthokyaninovém skeletu je nejznámějším derivátem strukturální analog vitisinu A, tedy 5-karboxypyranopelargonidin-3-glukosid (viz obrázek 30). Tato sloučenina byla nalezena v extraktu červené cibule^[137] a dále také v extraktu mražených jahod různých odrůd^[131,138]. Identifikace byla provedena metodou LC-ESI-MS. Andersen a kol. potvrdili strukturu 5-karboxypyranopelargonidin-3-glukosidu NMR experimentem po předchozí izolaci preparativní chromatografií. Byla také měřena UV/VIS spektra této látky a porovnána se spektry původního anthokyaninu. Stejně jako u vitisinu A byla pozorována vyšší stabilita oproti původnímu anthokyaninu při zvýšení pH^[138].



Obrázek 30: 5-karboxypyranopelargonidin-3-glukosid

Dalšími z pyranoanthokyaninových derivátů pelargonidinu, v tomto případě nalezenými v jahodovém džusu, jsou analoga pinotinů – adukty vinylguajakolu a vinylsyringolu^[139] (viz obrázek 31). Tvorba těchto produktů i u derivátů pelargonidinu stejným mechanismem byla předpokládána právě na základě prací o pinotinech^[89, 90,93]. Pro tvorbu těchto produktů musel být džus uměle obohacen o příslušné kyseliny

(ferulovou a sinapovou), protože se v něm přirozeně nevyskytují. Pro porovnání reaktivity kyseliny a fenolu byl jeden ze vzorků obohacen přímo 4-vinylsyringolem (dekarboxylační produkt kyseliny sinapové). Kromě reakcí v džusu byly paralelně připraveny také modelové roztoky pelargonidin-3-glukosidu (dále také jako „Pg-3-glu“) a cyklizačních činidel – v tomto případě pouze kyselin. Jak v modelových roztocích, tak ve vzorcích džusu došlo k reakci mezi anthokyaninem a cyklizačním činidlem. Produkty reakce byly separovány HPLC a analyzovány pomocí nanoESI-IT/MSⁿ. V UV/VIS spektrech aduktu s vinylsyringolem byl pozorován bathochromní posun absorpčního maxima (na 510 nm oproti 500 nm u Pg-3-glu). Je zajímavé, že v případě vinylguajakolu k posunu maxima nedochází. Reakce probíhala jak ve sterilních tak v nesterilních džusech, ve dříve jmenovaných ovšem pomaleji. V této práci je navrženo také reakční schéma těchto kondenzací vycházející z Michaelovy adice kyselin na anthokyanin^[139].

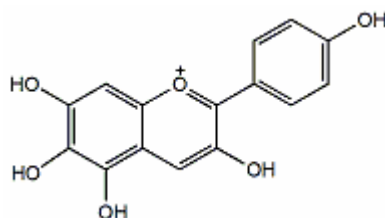


Obrázek 31: fenolické adukty pyranopelargonidin-3-glukosidu a cyklizační činidla

Již v roce 1964 byl v rostlině rodu *Impatiens* nalezen aglykon 6-hydroxypelargonidinu (pojmenovaný jako aurantinidin – viz obrázek 32)^[140]. Rozboru struktury tohoto anthokyanidinu se věnovali Jurd a Harborne. Tito autoři se pokusili o syntézu 6-hydroxypelargonidinu a 8-hydroxypelargonidinu. Obě tyto látky byly úspěšně připraveny. Bylo zjištěno, že oba izomery mohou při zvýšení pH otevřením C-kruhu přecházet jeden v druhý. UV/VIS spektra jejich roztoků pak naznačují, že 6-hydroxypelargonidin je stabilnější^[141].

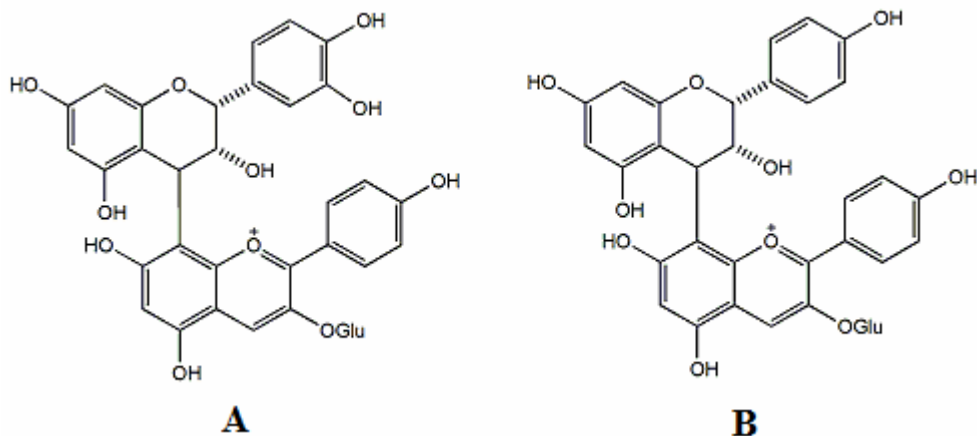
Mnohem později byl 6-hydroxypelargonidin znovu nalezen, tentokrát v květech rodu *Alstroemeria* ve formě glykosidů, konkrétně rhamnosylglukosidu a glukosidu. Tyto deriváty byly získány extrakcí, purifikací na koloně, preparativní HPLC a TLC a

identifikovány na základě retenčních dat, UV/VIS, FAB-MS spekter a následně i NMR analýzou^[142]. Syntéza 6-hydroxypelargonidinu i 8-hydroxypelargonidinu popsaná v práci Jurda a Harborna posloužila k potvrzení identifikace nalezené látky. Mechanismus biosyntézy tohoto neobvyklého pigmentu nebyl v této práci diskutován.



Obrázek 32: 6-hydroxypelargonidin

V jahodách byly jinými autory nalezeny i čtyři adukty pelargonidin-3-glukosidu s (epi)katechinem (**A** obr. 33) a (epi)afzelechinem (**B**, obr. 33). Tyto pigmenty byly získány purifikací extraktu na koloně a následnou preparativní HPLC a posléze identifikovány pomocí UV/VIS spektroskopie a NMR analýzou^[143].



Obrázek 33: adukty Pg-3-glu a **A** (epi)katechinu, **B** (epi)afzelechinu

2.3 Hmotnostní spektrometrie anthokyaninů a pigmentů z nich odvozených

Pro citlivou a selektivní analýzu anthokyaninových barviv hmotnostní spektrometrií je klíčové vhodně zvolit iontový zdroj a analyzátor. Mezi iontové zdroje obecně používané pro analýzu flavonoidů historicky patří ionizace nárazem elektronu (EI)^[34,36] a s úspěchem používaná FAB ionizace^[74,77,102,142,144]. V řadě aplikací se osvědčuje použití APCI^[70,145] a MALDI^[66,67,68,146] (zde je nevýhodou nemožnost online spojení se separační technikou). Méně často jsou analýzu anthokyaninů používány termosprej^[147,148] a APPI^[62]. Nejpoužívanějším zdrojem je bezesporu elektrosprej (ESI)^[27,45,48,72,75,93,109,126] (viz kapitola 2.1.2.3). Tento iontový zdroj poskytuje pro většinu strukturních typů flavonoidů včetně anthokyaninů dobrý výtěžek iontů. Ionizace flavonoidů je uskutečnitelná jak v kladném, tak v záporném módu, přičemž záporný mód přináší pro většinu sloučenin z této skupiny lepší limity detekce^[70]. Pro analýzu anthokyaninů je ovšem vzhledem k jejich kationtové povaze (stabilitě flavyliové formy) vhodnější ionizovat kladnými potenciály (jak již bylo zmíněno dříve v kapitole 2.2.2). Nejběžnějším analyzátozem využívaným pro jednoduchou LC-MS detekci je kvadrupól^[75,81,94,95,105,109]. Dnes již rutinním spojením v oblasti analýzy neznámých flavonoidů je tandemová hmotnostní spektrometrie (spojení LC-MS/MS). Patrně nejrozšířenější je trojitý kvadrupól (QqQ)^[27,90]. Vedle toho je dobrou alternativou i použití hybridního analyzátoru založeného na kombinaci kvadrupólu s kolizní celou a analyzátozem doby letu (QqTOF), umožňující měření přesně a správné hmotnosti^[28,72]. Nejpoužívanějším tandemovým analyzátozem je však patrně iontová past^[27,45,46,48,85,127]. Vzácně jsou využity i jiné systémy, např. hybridní EBqQ (kombinace sektorového přístroje a kvadrupólu)^[144]. Použití MALDI ionizace je nejčastěji kombinováno s analyzátozem doby letu (TOF)^[66,67,68].

Pro efektivní využití hmotnostní spektrometrie v oblasti analýzy anthokyaninových barviv je nezbytné detailně znát procesy rozpadu analytů po jejich kolizí indukované disociaci (nejčastěji) v kolizní cele. Řada fragmentačních pochodů je pro anthokyaniny charakteristická a proto analyticky velmi dobře využitelná. Studium kolizních spekter je výborným nástrojem pro identifikaci neznámých barviv.

2.3.1 Fragmentace anthokyaninů

Jak již bylo uvedeno, je pro MS analýzu anthokyaninů využita v naprosté většině prací ionizace kladnými potenciály. Za těchto podmínek vzniká přímo flavyliový kation $[M]^+$, který je dominujícím iontem ve spektrech prvního řádu. Tento ion podrobený následné kolizi indukované disociaci poskytuje spektra, ze kterých můžeme určit stupeň a typ glykosylace a případně acylace a identifikovat aglykon.

2.3.1.1 Fragmentace glykosidů

V analýze 3-glykosidů je charakteristickým fragmentem aglykon (molekulární ion ztrácí jednu glykosylovou jednotku). Nejběžnější ztráty jsou 162 (hexosa), 146 (deoxyhexosa) a 132 (pentosa)^[149]. V MS/MS 3,5-diglykosidů vidíme tři fragmenty, dva odpovídající ztrátě jednotlivých cukerných jednotek (tzn. 3-glykosid a 5-glykosid) a jeden odpovídající aglykonu. V případě, že jde o monoglykosylovaný anthokyanin, který má v poloze 3 navázán disacharid, vidíme v MS/MS spektru často pouze aglykon (odštěpuje se celá sacharidová jednotka). Fragment odpovídající štěpení glykosidické vazby mezi cukry je obvykle minoritní. Tento druh štěpení byl pozorován např. u anthokyaninů glykosylovaných rutinosou (β -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukosou), kde je pozorován fragment odpovídající 3-glukosidu (odštěpuje se rhamnosa)^[27,150]. U acylovaných (p-kumaryl, feruloyl, kafeoyl, malonyl) anthokyaninů nebyl v MS/MS spektru pozorován rozpad vazby mezi cukrem a acylem - rodičovský ion ztrácí acyly vždy současně s cukrem, na němž jsou navázány^[150].

V této souvislosti cennou doplňující informaci poskytuje také UV/VIS spektrometrie. 3,5-diglykosidy postrádají oproti 3-glykosidům absorpční rameno (shoulder) v oblasti kolem 440 nm. Také je možno rozeznat p-kumarylové a kávové acyly, které látkám poskytují absorpční rameno v oblasti kolem 310-325 nm^[23].

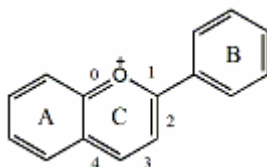
2.3.1.2 Fragmentace aglykonů

V analýze aglykonů všech flavonoidů je nejdůležitější fragmentačním mechanismem retro-Diels-Alderovo (RDA) štěpení^[151]. Toto štěpení probíhá na kruhu C a vznikají vždy dva fragmenty, jeden se zachovaným kruhem A a jeden se zachovaným kruhem B. Vzhledem k tomu, že ke štěpení na C-kruhu může docházet v různých polohách, byla pro vznikající fragmenty navržena nomenklatura, která popisuje vznikající ionty kombinací $^{i,j}X^+$, kde i a j označuje vazby na původním C-kruhu,

kteře byly rozštěpeny a X je nahrazeno písmenem A nebo B podle toho, který kruh původního aglykonu fragment obsahuje^[144]. Nejčastějšími druhy RDA štěpení jsou u flavonoidů obecně: 0/2, 0/3, 0/4, 1/3, a 2/4^[151] – polohy vazeb viz obrázek 34.

V případě anthokyanidinů byly zkoumány typy RDA štěpení, ke kterým dochází přednostně a jako nejdůležitější dva byly označeny 0/2 a 0/3. Studie byla prováděna pomocí hmotnostního spektrometru typu ESI-*oa*-TOF (*oa* = „orthogonal acceleration“) při vyšších kolizních energiích (400 eV) a produkty byly opět ^{*i*}*j*A⁺ a ^{*i*}*j*B⁺ ionty. Při zvolených kolizních energiích byly častým produktem 0/2 štěpení radikálové ^{0,2}A⁺ ionty. Práce také obsahuje návrh fragmentačních schémat vedoucích ke vzniku iontů mechanismem 0/2 a 0/3 štěpení a souhrnnou tabulku fragmentových iontů jednotlivých anthokyanidinů^[152].

Kromě retro-Diels-Alderova štěpení jsou jak pro molekulární ion, tak pro ionty fragmentů běžné ztráty malých molekul jako H₂O, CO, CH₃OH (v případě přítomnosti methoxyskupin) a CH₂=C=O. Za přítomnosti methoxyskupin dochází rovněž k odštěpování radikálu ·CH₃^[36,144,152]. U methoxylovaných anthokyaninů je pozorována také ztráta 16 Da (odpovídající methanu), zapříčiněná zřejmě současným odštěpením methylového a vodíkového radikálu (CH₃· a H·)^[152]. Zkoumáním menších ztrát z iontů aglykonů Cy, Dp, Mv, Pe a Pt pomocí nESI-MS/MS bylo možno anthokyanidiny rozdělit do 2 skupin s rozdílným sledem vznikajících fragmentů. Do první skupiny patří Mv, Pe a Pt (s charakteristickou první ztrátou 15 popř. 16 Da), do druhé pak Cy a Dp (s charakteristickou první ztrátou 18 Da)^[90].



Obrázek 34: Polohy vazeb v retro-Diels-Alderově štěpení anthokyaninů

Anthokyanidiny Cy, Mv a Pg byly zkoumány také metodou GC-MS a to po derivatizaci^[36]. Byl zkoumán rozdíl ve fragmentacích trimethylsilylderivátů (vzniklých přímou silylací anthokyaninů) a trimethylsilyloximů (vzniklých dvoukrokově – nejprve byly anthokyaniny přeměněny na oximy a ty následně silylovány). V případě oximů vzniká molekulární ion (pozorovaný ale jen u Pg při *m/z* = 574), který dále ztrácí B-kruh za vzniku ketenu (*m/z* = 382) a tento následně ztrácí

molekulu CO, čímž vzniká třetí fragment ($m/z = 355$). Pokud proběhne pouze silylace, dochází v MS k celkovému rozpadu struktury a detekujeme pouze derivát příslušné karboxylové kyseliny, vznikající z kruhu B.

2.3.2 Fragmentace flavanolů

Jak bylo uvedeno, obsahuje řada anthokyaninových barviv ve své molekule navázanou flavanolovou strukturu. Proto je tato kapitola věnována charakteristickým rysům ve fragmentačním chování těchto sloučenin. Při RDA štěpení (epi)katechinu vzniká ion $[M - 152 + H]^+$. Tento typ RDA štěpení je výrazným procesem nejen u (epi)katechinu^[153], ale i u jeho derivátů, např. 8-vinylkatechinu^[126] a prokyanidinu B2^[154] a také u jeho aduktů s jinými flavonoidy – ať už můstkových^[49], přímých^[107], nebo u xanthyliových soli^[100]. Stejnému RDA štěpení podléhá i B-kruh horní jednotky prodelfinidinu B3 za vzniku fragmentu $[M - 168 + H]^+$ ^[155].

Pozornost byla v literatuře věnována rovněž fragmentaci prokyanidinů (dimerů, trimerů i složitějších taninů). K MSⁿ detekci byl využit ESI v negativním módu v kombinaci s iontovou pastí^[155]. V práci je použita dříve navržená nomenklatura pro proanthokyanidiny: označení jednotek proanthokyanidinu jako horní – top = „T“ (připojená vazbou na C4), spojovací – middle = „M“ (připojená alespoň 2 vazbami – C4 a C6 a/nebo C8) a spodní – base = „B“ (připojená pouze C6 nebo C8)^[156].

Bylo zjištěno, že u zkoumaného trimeru galokatechin-(4 α →8)-galokatechin-(4 α →8)-katechin dochází k degradaci až na soubor monomerů, jejichž hmoty závisí na pozici v původní struktuře následovně: $[M_T - 3H]^-$, $[M_M - 3H]^-$ a $[M_B - H]^-$. Vzhledem k mechanismu, kterým tento proces probíhá, autoři očekávají, že analogicky bude možné z produktů fragmentace identifikovat i vyšší proanthokyanidinové oligomery^[155].

2.3.3 Fragmentace pyranoanthokyaninů

Fragmentace glykosylovaných pyranoanthokyaninů se v mnoha znacích shoduje s fragmentací anthokyaninů (viz kapitola 2.3.1) – to se týká např. ztráty cukerných jednotek a fragmentace aglykonu na charakteristický sled malých hmot.

Analýza fragmentačního chování vitisinu A pomohla v určení jeho struktury, která byla původně mylně považovaná za derivát obsahující hydroxylovou a

formylovou funkční skupinu na nově vzniklém pyranovém jádře (viz obrázek 5). Vitisin A totiž vykazoval ztrátu 44 Da, která odpovídá molekule oxidu uhličitého. Vzhledem k tomu, že je nepravděpodobná ztráta CO₂ z cukerné jednotky navázané na Mv-3-glu, muselo dojít k této ztrátě na aglykonu. Ten je po ztrátě CO₂ stále o 24 Da větší než Mv-3-glu, což odpovídá právě dvěma uhlíkovým atomům, které formují pyranový kruh^[75].

Také struktura 5-methylpyranokyanidin-3-hexosidu je podpořena závěry z vyhodnocených MS³ spekter, kdy v MS² došlo k odštěpení hexosy a v MS³ pak ke ztrátám CO a ke ztrátě radikálu CH₃· (15 Da). Taková ztráta je běžná u anthokyaninů obsahujících methoxyskupiny, ale u kyanidinu, který je neobsahuje, značí, že došlo k odštěpení methylového radikálu z pyranového kruhu. Toto fragmentační chování je pro 5-methylpyranoanthokyaniny charakteristické^[28].

Při fragmentaci aglykonů vitisinu A a aduktu 4-vinylfenolu s Mv-3-glu (zkoumaných v červeném víně pomocí HPLC-nanoESI-MS/MS) dochází k řadě podobných fragmentačních procesů, jaké jsou pozorovány u Mv-3-glu. Autoři citované studie usuzují, že kolizní spektra aglykonů nejběžnějších anthokyaninů bude možné do budoucna použít pro odhad struktury základních jednotek složitých kondenzovaných anthokyaninů. Sledování fragmentové řady také mimo jiné umožnilo autorům rozlišit aglykon 5-hydroxypyranomalvidin-3-glukosidu od aglykonu 5-karboxypyranodelfinidinu, které mají stejnou hodnotu m/z, avšak liší se právě sledem fragmentů v kolizním spektru^[90].

2.3.4 Fragmentace aduktů flavanolů s anthokyaniny

Fragmentační mechanismy aduktů flavanolů s anthokyaniny byly studovány ve víně a pro porovnání byly analyze podrobeny i adukty vzniklé v modelových roztocích. Hlavním cílem této studie bylo ověřit identitu zkoumaných pigmentů vzniklých reakcí katechinu a Mv-3-glu. Pro tento proces byl předpokládán vznik struktury typu F-A⁺ (viz kapitola 2.2.4.1). Jako ionizační zdroj byl použit ESI v kladném módu a analyzátozem byla iontová past. Hlavními fragmenty zachycenými v MS² z rodičovského iontu o m/z = 781 byly ionty typu [M - H₂O]⁺ a [M - 126]⁺, který odpovídá ztrátě C₆H₆O₃, která podle autorů nemůže pocházet z anthokyaninu. Rozborem kolizního spektra je možno prokázat, že flavanol je horní jednotkou (v souvislosti s výše citovanou prací Friedricha a kol.^[155]) a sledovaná sloučenina tedy odpovídá aduktu typu F-A⁺^[107].

Dále byl připraven roztok proanthokyanidinu B2-3'-O-galátu (horní jednotka = katechin, spodní jednotka = galokatechin) a Mv-3-glu v kyselém prostředí, kde bylo zkoumáno, zda s anthokyaninem reaguje produkt interflavanického rozpadu. Byl pozorován stejný ion jako v předchozím případě (m/z 791) se stejným fragmentačním chováním, z čehož vyplývá, že reagentem je karbokation horní jednotky katechinu vzniklý kysele katalyzovaným rozkladem interflavanické vazby v proanthokyanidinu^[107].

Detailní rozbor kolizního spektra umožnil také identifikaci produktu kondenzace 8-vinylkatechinu s Mv-3-glu^[90].

Při analýze xanthyliových solí vzniklých reakcí katechinu s Mv-3-glu byly pozorovány neznámé produkty a k odhalení struktury opět významně přispěla data z kolizních spekter. Bylo zjištěno, že molekula ztrácí fragment odpovídající kyselině syringové. Na základě této znalosti byla navržena struktura sloučeniny, která nevzniká přímo z obou reaktantů, ale v případě Mv-3-glu až z produktu jeho degradace. Rovněž u produktu reakce, který hodnotou m/z odpovídal přímému aduktu katechinu a Mv-3-glu bylo tandemovou MS analýzou zjištěno, že nalezený fragment o m/z = 481 [M - 138]⁺ neodpovídá strukturám typu A-F ani F-A, ale odpovídá bifenylovému typu vazby. Díky tomu byla struktura identifikována jako adukt, vázaný přes B-kruh katechinu (viz obrázek 20)^[109].

3. Experimentální část:

3.1 Chemikálie:

Redestilovaná voda (deionizační stanice Milipore, Molsheim, Francie), methanol (Biosolve, pro LC-MS), acetonitril (Baker, pro HPLC), kyselina mravenčí (Lachema, Brno, ČR p.a.), kyselina trifluoroctová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, pro spektrofotometrii), kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR p.a.), kyselina fosforečná (Lachema, Brno, ČR p.a.), kyselina pyrohroznová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 98 %), pyruvát sodný (Lachema, Brno, ČR, p.a.), acetaldehyd (Lachema, Brno, ČR, p.a.), epikatechin (Fluka, Buchs, Švýcarsko, p.a.), pelargonidin-chlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), aceton (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, pro HPLC), 2',4',6'-trihydroxyacetofenon (Fluka, Buchs, Švýcarsko, p.a.), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, p.a.), dithranol (Fluka, Buchs, Švýcarsko, p.a.), leucin-enkefalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, p.a.)

3.2 Příprava vzorků:

3.2.1 Příprava 5-methylpyranopelargonidinu

I. Vodný roztok pro sledování příslušné reakce (AC1) byl připraven rozpuštěním 1,51 mg pelargonidin-chloridu v 5 ml 0,0736 % (v/v) vodného roztoku acetonu okyseleného kyselinou mravenčí na pH = 3,08.

II. Methanolický roztok pro sledování příslušné reakce (AC2) byl připraven rozpuštěním 0,09 mg pelargonidin-chloridu v 1 ml roztoku obsahujícím methanol, aceton a kyselinu fosforečnou v poměru 50 : 50 : 0,1 (v/v/v).

III. Vzorek pro frakcionaci 5-methylpyranopelargonidinu (AC3) připraven rozpuštěním 3,24 mg pelargonidin-chloridu v 5 ml roztoku acetonu, methanolu a kyseliny fosforečné v poměru 50 : 50 : 0,1 (v/v/v).

3.2.2 Reakce pelargonidinu s epikatechinem v přítomnosti acetaldehydu

I. Vzorek (EP1) byl připraven rozpuštěním 1,50 mg pelargonidin-chloridu a 1,47 mg epikatechinu v 5 ml směsi voda (okyselená kyselinou mravenčí na pH = 3,08), acetaldehyd a methanol v poměru 4 : 0,0028 : 1 (v/v/v).

II. Vzorek (EP2) byl připraven rozpuštěním 1,57 mg pelargonidin-chloridu a 1,51 mg epikatechinu v 5 ml směsi voda (okyselená kyselinou mravenčí na pH = 3,08) a acetaldehyd v poměru 5 : 0,0028 (v/v).

III. Vzorek (EP3) byl připraven rozpuštěním 0,12 mg pelargonidin-chloridu a 0,15 mg epikatechinu v 1 ml roztoku obsahujícího methanol, acetaldehyd a kyselinu fosforečnou v poměru 50 : 50 : 0,1 (v/v/v).

IV. Vzorek (EP4) byl připraven rozpuštěním 1,52 mg pelargonidin-chloridu a 1,69 mg epikatechinu v 5 ml směsi voda (okyselené kyselinou mravenčí na pH = 3,08) a acetaldehyd v poměru 5:0,0028 (v/v).

V. Vzorek (EP5) byl připraven rozpuštěním 0,2 mg pelargonidin-chloridu a 0,25 mg epikatechinu v 1 ml směsi methanol - acetaldehyd v poměru 25,26 : 1 (v/v).

3.2.3 Reakce pelargonidinu s acetaldehydem

I. Vzorek (AL1) byl připraven rozpuštěním 1,52 mg pelargonidin-chloridu v 5 ml směsi vody (okyselená kyselinou mravenčí na pH = 3,08) a acetaldehydu v poměru 5 : 0,0028 (v/v).

II. Vzorek (AL2) byl připraven rozpuštěním 0,12 mg pelargonidin-chloridu v 1 ml roztoku obsahujícím methanol, acetaldehyd a kyselinu fosforečnou v poměru 50 : 50 : 0,1 (v/v/v).

3.2.4 Reakce pelargonidinu s kyselinou pyrohroznovou

I. Vzorek (PY1) byl připraven rozpuštěním 1,51 mg pelargonidin-chloridu a 5,50 mg pyruvátu sodného v 5 ml redestilované vody okyselené kyselinou mravenčí na pH = 3,08.

II. Vzorek (PY2) byl připraven rozpuštěním 0,09 mg pelargonidin-chloridu a 1,06 mg pyruvátu sodného v 1 ml roztoku obsahujícího methanol a kyselinu fosforečnou v poměru 100 : 0,1 (v/v).

III. Vzorek (PY3) byl připraven rozpuštěním 0,25 mg pelargonidin-chloridu v 1 ml roztoku obsahujícím methanol a 98% kyselinu pyrohroznovou v objemovém poměru 1 : 1.

3.3 Instrumentace:

3.3.1 Použité přístroje:

I. Modulární HPLC chromatograf Knauer (Berlín, Německo) vybavený čerpadlem Smartline Pump 1000, jednotkou Smartline Manager 5000 a PDA detektorem Smartline UV Detector 2600.

II. Modulární μ HPLC systém CapLC XE (Waters, Milford, USA) vybavený čerpadlem CapLC XE, autosamplerem (smyčka o objemu 1 μ l), CapLC 2996 PDA detektorem a ventilem CapLC Selector Valve.

III. Modulární systém Acquity UPLC (Waters, Milford, USA) obsahující Acquity PDA Detector, Acquity Column Manager, Acquity Sample Manager (autosampler) a Acquity Binary Solvent Manager.

IV. Q-TOF Premier (Waters, USA) s ortogonálním uspořádáním analyzátoru typu QqTOF, vybavený iontovým zdrojem ESI s využitím ZSpray technologie a iontové optiky T-Wave a s možností měření přesné a správné hmotnosti iontů (systém LockSpray), popř. iontovým zdrojem typu MALDI s dusíkovým laserem ($\lambda = 337$ nm).

V. Finnigan LCQ Classic (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) s iontovým zdrojem typu ESI se sprejovací kapilárou umístěnou mimo osu (off-axis) vůči vstupu do vyhřívané kapiláry.

3.3.2 Použité SPE, HPLC a UPLC kolony:

I. SPE kolonka Strata SDB-L C18 (200 mg / 5 ml)

II. Semipreparativní kolona Gemini 5u C18 110A (Phenomenex, USA), 150 x 10 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$

III. Analytická kolona Gemini 5u C18 110A (Phenomenex, USA), 150 x 2,1 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$

IV. Mikrokolona Gemini 5u C18 110A (Phenomenex, USA), 150 x 0,3 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$

V. kolona Acquity UPLC BEH C18 (Waters, USA), 50 x 3 mm, $d_p = 1,7 \mu\text{m}$

3.3.3 Parametry iontových zdrojů:

3.3.3.1 Parametry ESI-QqTOF:

Napětí na sprejovací kapiláře: + 3,2 kV

Teplota iontového zdroje: 120°C

Teplota desolvatačního plynu: 150°C

Průtok plynů: (zmlžovací 300 l/hod, resp. 400 l/hod; cone gas flow 0 l/hod, resp. 30 l/hod)

Kolizní energie: v rozsahu 5-70 eV, podle typu experimentu

Doba skenu: v rozsahu 0,2-1 s, podle typu experimentu (interscan delay 0,02 s)

Pro zjištění přesné hmoty byl v systému LockMass jako standard použit leucin-enkefalin.

3.3.3.2 Parametry MALDI (ve spojení s Q-TOF Premier):

Polarita: +

Frekvence laseru: 20 Hz

Energie laseru (maldi laser energy): 250 μJ

Chladicí plyn (cooling gas): 10 l/hod

3.3.3.3 Parametry ESI-IT:

Napětí na sprejovací kapiláře + 5,6 kV

Průtok zmlžovacího plynu: 30 arbitrárních jednotek

Průtok pomocného plynu: 0 arbitrárních jednotek

Teplota iontového zdroje 200 °C

Kolizní energie: NCE 0-70 %, podle typu experimentu

3.4 Podmínky analýz:

3.4.1 SPE extrakce:

Metoda I:

Kolona Strata SDB-L C18 byla promyta 1 ml 0,01% HCl v methanolu, poté 3 ml 0,01% HCl ve vodě. Na kolonu byl nanesen 1 ml roztoku vzorku a promyt 5 ml okyselené vody. Následně byla barevná frakce vzorku vymyta okyseleným methanolem a vzniklý roztok byl odpařen do sucha pod proudem dusíku.

Metoda II:

Kolona Strata SDB-L C18 byla propláchnuta methanolem, následně byla promývána 1,418 M roztokem HCOOH ve vodě. Ve vodě rozpustná část vzorku byla vymyta na kolonu dvakrát objemem 400 µl okyselené vody a kolona byla poté dále promyta okyselenou vodou. Následně byla dvakrát promyta zásobní lahvička se vzorkem a to vždy 400 µl okyseleného methanolu (směs methanolu a HCl v poměru 100 : 0,01 (v/v)) a tento podíl byl rovněž nanesen na kolonu. Vzorek byl z kolony vymyt postupným přidávkem dalších 2400 µl okyseleného methanolu.

3.4.2 HPLC separace:

Metoda I:

Separace probíhala na chromatografu Knauer s PDA detekcí a online spojením s MS detekcí (přístroj Q-TOF Premier). Jako mobilní fáze A byla použita směs vody, acetonitrilu a TFA v poměru 95 : 5 : 0,12 (v/v/v), jako mobilní fáze B byla použita směs acetonitrilu a TFA v poměru 100 : 0,12 (v/v). Odparek vzorku byl rozpuštěn ve 100 µl mobilní fáze A a nastříkovan (přeplnění smyčky o objemu 20 µl). Průtok činil 0,2 ml/min. Byla použita gradientová eluce s následujícím průběhem gradientu: 0-5 minut 10 % B, 5-10 minut 10-20 % B, 10-30 minut 20-30 % B, 30-40 minut 30-50 % B, 40-50 minut 50-70 % B, 50-54 minut 70-100 % B, 54-60 minut 100 % B. Poté byla kolona vždy ještě 10 minut ekvilibrována.

Metoda II:

Separace probíhala na chromatografu Knauer s PDA detekcí a online spojením s MS detekcí (přístroj Q-TOF Premier). Jako mobilní fáze A byl použit 1,418 mol/l vodný roztok kyseliny mravenčí, jako mobilní fáze B 1,418 mol/l roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Odparek vzorku byl rozpuštěn v 1000 µl mobilní fáze A a nastříkovan (přeplnění smyčky o objemu 20 µl). Průtok činil 0,2 ml/min. Byl proměřen i blank – 1,418 mol/l roztok kyseliny mravenčí ve vodě. Byla použita gradientová eluce s následujícím průběhem gradientu: 0-5 minut 20 % B, 5-10 minut 20-30 % B, 10-30 minut 30 % B, 30-40 minut 30-50 % B, 40-50 minut 50-100 % B, 50-70 minut 100 % B. Poté byla kolona vždy ještě 10 minut ekvilibrována.

Metoda III:

Separace probíhala na chromatografu Knauer s PDA detekcí a online spojením s MS detekcí (přístroj Q-TOF Premier). Jako mobilní fáze A byl použit 1,418 mol/l vodný roztok kyseliny mravenčí, jako mobilní fáze B 1,418 mol/l roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Vzorek byl naředěn 1:4 mobilní fází A a nastříkovan přeplněním smyčky o objemu 20 μ l. Průtok činil 0,2 ml/min. Při separaci byla využita gradientová eluce s následujícími parametry: 0-5 minut 20 % B, 5-10 minut 20-30 % B, 10-30 minut 30 % B, 30-40 minut 30-50 % B 40-50 minut 50-100 % B. Poté byla kolona vždy ještě 10 minut ekvilibrována.

Metoda IV:

Separace probíhala na chromatografu Knauer s PDA detekcí a online spojením s MS detekcí (přístroj Q-TOF Premier). Jako mobilní fáze A byl použit 1,418 mol/l vodný roztok kyseliny mravenčí, jako mobilní fáze B 1,418 mol/l roztok kyseliny mravenčí v methanolu. Sediment vzorku byl rozpuštěn v 1 ml methanolu a nastříkovan přeplněním smyčky o objemu 20 μ l. Průtok činil 0,2 ml/min. Při separaci byla využita gradientová eluce s následujícími parametry: 0-5 minut 20 % B, 5-15 minut 20-100 % B, 15-65 minut 100 % B. Poté byla kolona vždy ještě 15 minut ekvilibrována.

Metoda V:

Separace probíhala na chromatografu Knauer s PDA detekcí. Byla využita izokratická eluce, mobilní fází byl 1,418 mol/l roztok kyseliny mravenčí ve směsi vody a acetonitrilu v poměru 80 : 20 (v/v). Nastříkováno bylo vždy 200 μ l vzorku (přeplněním smyčky). Frakce 5-methylpyranopelargonidinu byla sbírána manuálně v rozmezí elučních časů 16,2 – 19,2 minut na základě absorbance eluátu (eluce majoritního píku sledovaného při $\lambda = 500$ nm). Izolované frakce z jednotlivých nástřiků byly spojeny a lyofilizovány.

3.4.3 UPLC separace:

Metoda I:

Pro separaci byl použit systém Waters CapLC XE s online spojením s MS detekcí (přístroj Q-TOF Premier). Jako mobilní fáze A byla použita směs vody, acetonitrilu a TFA v poměru 95 : 5 : 0,12 (v/v/v), jako mobilní fáze B byla použita směs acetonitrilu a TFA v poměru 100 : 0,12 (v/v). Odparek vzorku byl rozpuštěn ve 100 μ l mobilní fáze A

a nastříkovan (přeplnění smyčky o objemu 20 μ l). Průtok činil 4 μ l/min. Byla použita gradientová eluce s následujícím průběhem gradientu: 0-5 minut 10 % B, 5-10 minut 10-20 % B, 10-30 minut 20-30 % B, 30-40 minut 30-50 % B, 40-50 minut 50-70 % B, 50-54 minut 70-100 % B, 54-60 minut 100 % B. Poté byla kolona vždy ještě 10 minut ekvilibrována.

Metoda II:

Pro separaci byl použit systém Waters Acquity UPLC s online spojením s MS detekcí (přístroj Q-TOF Premier). Mobilní fáze A obsahovala směs vody a kyseliny mravenčí v poměru 95 : 5 (v/v), mobilní fáze B obsahovala směs acetonitrilu a kyseliny mravenčí v poměru 95 : 5 (v/v). Předupravený vzorek byl zcentrifugován, supernatant přefiltrován přes PTFE filtr a nastříkovan z autosampleru (objem nástřiku činil 5 μ l). Průtok činil 0,250 ml/min. Při separaci byla využita gradientová eluce s následujícími parametry: 0-1,4 minut 0-10 % B, 1,4-2,8 minut 10-20 % B, 2,8-8,6 minut 20-30 % B, 8,6-11 minut 30-70 % B, 11-11,3 minut 70-90 % B, 11,3-13 minut 90 % B. Poté byla kolona ještě 2 minuty ekvilibrována.

3.4.4 Přímý nástřik do systému ESI-Q-TOF a ESI-IT

Vzorek byl bez dalších úprav nastříkovan. Průtok činil 5 μ l/min.

3.4.5 Analýza pomocí MALDI-Q-TOF

Metoda I:

Ze vzorku bylo odebráno 100 μ l homogenizované suspenze, ta byla centrifugována 5 minut při 14000 rpm. 5 μ l supernatantu vzorku bylo smícháno s 5 μ l matrice a 1 μ l vzniklého roztoku byl dávkován na MALDI destičku. Matrice byla připravena rozpuštěním 10 mg THAP v 1 ml směsi vody a acetonitrilu v poměru 1 : 1 (v/v).

Metoda II:

Ze vzorku bylo odebráno 100 μ l homogenizované suspenze, ta byla centrifugována 5 minut při 14000 rpm. Sediment byl rozpuštěn ve 100 μ l roztoku matrice a ze vzniklého roztoku byl 1 μ l dávkován na MALDI destičku. Matrice byla

připravena rozpuštěním 10 mg THAP v 1 ml směsi vody a acetonitrilu v poměru 1 : 1 (v/v).

Metoda III:

Bylo odebráno 5 μ l roztoku vzorku, smícháno s 5 μ l příslušné matrice a 1 μ l roztoku byl dávkován na MALDI destičku. Matrice byla připravena rozpuštěním 10 mg THAP v 1 ml směsi vody a acetonitrilu v poměru 1 : 1 (v/v).

Metoda IV:

5 μ l vzorku bylo vždy smícháno s 5 μ l matrice a ze vzniklého roztoku byl 1 μ l dávkován na MALDI destičku. Matrice byly připraveny následovně: a) THAP: 10 mg bylo rozpuštěno v 1 ml směsi vody a acetonitrilu v poměru 1 : 1 (v/v), b) DT: 20 mg bylo rozpuštěno v 1 ml tetrahydrofuranu, c) DHB: 10 mg bylo rozpuštěno v 1 ml směsi vody a acetonitrilu v poměru 7 : 3 (v/v).

Metoda V:

5 μ l roztoku upraveného vzorku bylo smícháno s 5 μ l matrice a 1-2 μ l směsi byly dávkovány na MALDI destičku. MS spektrum bylo proměřeno s nastavením kolizní energie 5 eV, energie pro sběr MSMS spekter (fragmentace zvolených iontů) pak 30-50 eV. Matrice byla připravena rozpuštěním 10 mg THAP v 1 ml směsi vody a acetonitrilu v poměru 1 : 1 (v/v).

3.4.6 Podmínky analýz jednotlivých vzorků:

Tabulka 1: Podmínky analýz jednotlivých vzorků

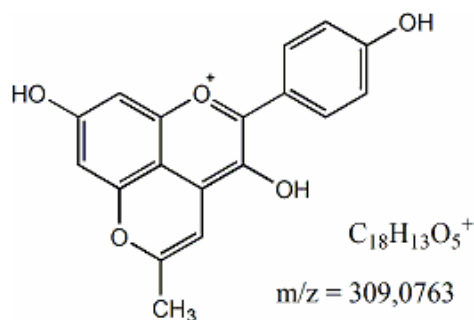
vzorek	doba odběru (od založení pokusu)	úprava vzorku	metoda analýzy	použitá kolona
AC1	96 dní	SPE (I)	HPLC (II)	III
	105 dní	SPE (I)	HPLC (IV)	III
	125 dní	SPE (I)	MALDI (I)	-
	125 dní	SPE (I)	MALDI (II)	-
	315 dní	SPE (I), odparek byl rozpuštěn ve 100 µl methanolu	MALDI (V)	-
AC2	1 den	vzorek byl naředěn methanolem v poměru 1 : 4 (v/v)	ESI-Q-TOF	-
	3 dny	vzorek nebyl před analýzou upravován	HPLC (III)	III
	16 dní	vzorek byl naředěn methanolem v poměru 1 : 4 (v/v)	HPLC (IV)	III
	29 dní	vzorek nebyl před analýzou upravován	MALDI (III)	-
	44 dní	vzorek nebyl před analýzou upravován	MALDI (IV)	-
213 dní	SPE (II)	ESI-IT	-	
AC3	27 dní	vzorek nebyl před analýzou upravován	HPLC (V)	II
	56 dní	malé množství 5-methylpelargonidinu bylo rozpuštěno ve 250 µl mobilní fáze A (viz kapitola 3.4.3)	UPLC (II)	V
AL1	83 dní	SPE (I)	HPLC (I)	III
	91 dní	SPE (I)	HPLC (II)	III
	125 dní	SPE (I)	MALDI (I)	-
	125 dní	SPE (I)	MALDI (II)	-
	315 dní	SPE (I)	MALDI (V)	-
AL2	1 den	vzorek byl naředěn methanolem v poměru 1 : 4 (v/v)	ESI-Q-TOF	-
	8 dní	vzorek nebyl před analýzou upravován	HPLC (III)	III
	29 dní	vzorek nebyl před analýzou upravován	MALDI (III)	-
EP1	14 dní	SPE (I)	UPLC (I)	IV
	112 dní	SPE (I)	HPLC (II)	III
	132 dní	SPE (I)	HPLC (IV)	III
	146 dní	SPE (I)	MALDI (I)	-
	146 dní	SPE (I)	MALDI (II)	-
	336 dní	SPE (I), odparek byl rozpuštěn ve 100 µl methanolu	MALDI (V)	-
EP2	14 dní	SPE (I)	UPLC (I)	IV
	112 dní	SPE (I)	HPLC (II)	III
	133 dní	SPE (I)	HPLC (IV)	III
	146 dní	SPE (I)	MALDI (I)	-
	146 dní	SPE (I)	MALDI (II)	-
	336 dní	SPE (I), odparek byl rozpuštěn ve 100 µl methanolu	MALDI (V)	-

EP3	1 den	vzorek byl naředěn methanolem v poměru 1 : 4 (v/v)	ESI-Q-TOF	-
	3 dny	vzorek nebyl před analýzou upravován	HPLC (III) MALDI	III
	29 dní	vzorek nebyl před analýzou upravován	(III)	-
	350 dní	SPE (II), vzorek byl naředěn methanolem v poměru 1 : 4 (v/v)	UPLC (II)	V
EP4	14 dní	vzorek byl naředěn methanolem v poměru 1 : 8 (v/v)	UPLC (II)	V
	29 dní	vzorek naředěn 1 : 1 (v/v) mobilní fází A (viz kapitola 3.4.3)	UPLC (II)	V
	117 dní	vzorek naředěn 1 : 4 (v/v) mobilní fází A (viz kapitola 3.4.3)	UPLC (II)	V
	124 dní	200 µl vzorku bylo zcentrifugováno a k supernatantu bylo přidáno 800 µl methanolu	ESI-Q-TOF	-
	124 dní	200 µl vzorku bylo zcentrifugováno a sediment byl rozpuštěn v 1000 µl methanolu	ESI-Q-TOF	-
EP5	19 dní	vzorek byl naředěn 1 : 4 (v/v) mobilní fází A (viz kapitola 3.4.3)	UPLC (II)	V
	26 dní	100 µl vzorku bylo odfoukáno do sucha a rozpuštěno v 500 µl methanolu	ESI-Q-TOF	-
PY1	96 dní	SPE (I)	HPLC (II)	III
	111 dní	SPE (I)	HPLC (IV)	III
	125 dní	SPE (I)	MALDI (I)	-
	125 dní	SPE (I)	MALDI (II)	-
	315 dní	SPE (I), odparek vzorku byl rozpuštěn ve 100 µl methanolu	MALDI (V)	-
PY2	1 den	vzorek byl naředěn methanolem v poměru 1 : 4 (v/v)	ESI-Q-TOF	-
	8 dní	vzorek nebyl před analýzou upravován	HPLC (III) MALDI	III
	29 dní	vzorek nebyl před analýzou upravován	(III)	-
PY3	20 dní	50 µl vzorku bylo odfoukáno do sucha a rozpuštěno ve 150 µl mobilní fáze A (viz kapitola 3.4.3)	UPLC (II)	V
	39 dní	vzorek byl naředěn 1 : 4 (v/v) mobilní fází A (viz kapitola 3.4.3)	UPLC (II)	V
	46 dní	vzorek byl naředěn methanolem v poměru 1 : 4 (v/v)	ESI-Q-TOF	-

4. Diskuze a výsledky:

4.1 Studium reakce pelargonidinu s acetonem:

V první fázi experimentu byl zvolen postup analogický k dříve prováděné práci zabývající se syntézou vitisinu A^[75] a byl připraven roztok AC1 s cílem získat 5-methylpyranopelargonidin (obrázek 35). Při první analýze (96 dnů starého) vzorku nebyl nalezen hledaný ion 309. Ve spektru bylo v retenčním okně 40-50 min (předpokládaný čas eluce hledaných barviv na základě elučního času standardu pelargonidinu: $t_R = 44,5$ min z nezávislé analýzy) nalezeno několik výraznějších píků, které nebyly obsaženy ve slepém vzorku. Výsledky analýzy jsou shrnuty v tabulce 2.



Obrázek 35: Struktura 5-methylpyranopelargonidinu a její správná molekulová hmotnost

Tabulka 2: Významné ionty pozorované při HPLC analýze frakce vodného roztoku pelargonidinu obohaceného acetonem

retenční čas píku [min]	pozorované hmoty [m/z]	intenzita [impulsy]
45,01	255,060	1300
45,43	608,388	640
	297,083	1120
46,21	411,071	2000
47,31	451,060	530
48,67	593,082	130
	555,095	280
	433,056	1600
49,42	587,080	985
	391,083	13000
51,38	753,112	540

Po dalším týdnu byla provedena HPLC analýza sedimentu roztoku AC1, tentokrát za jiných experimentálních podmínek (viz kapitola 3.4.6). Ani zde nebyl žádaný ion nalezen. V oblasti předpokládaného retenčního okna (opět podle retenčního času standardu pelargonidinu: $t_R = 17,50$ min, za jiného profilu gradientu) byl nalezen jediný pík odlišný od blanku a to v čase 18,01 min s výskytem iontu m/z 525,080 a intenzitou 1240. Ionty nalezené v obou analýzách nebyly doposud identifikovány.

Supernatant i sediment byly po dalších třech týdnech analyzovány technikou MALDI-QqTOF. Ani zde nebyl nalezen očekávaný ion, byly však zjištěny jiné ionty s vysokou intenzitou ve spektru. Tabulka 3 uvádí dominantní ionty vyskytující se v supernatantu.

Tabulka 3: MALDI spektra supernatantu vzorku AC1

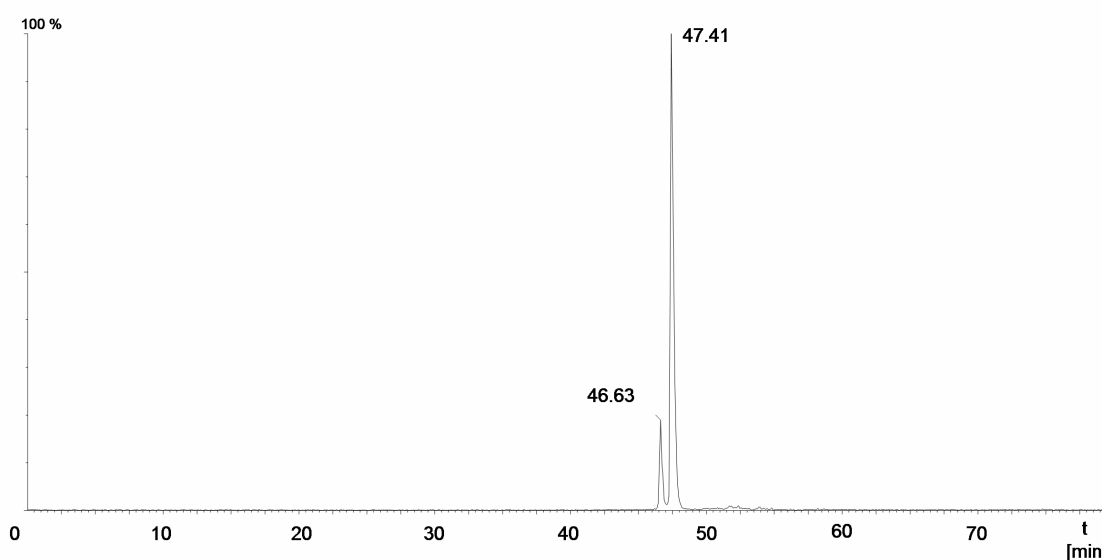
AC1 - supernatant	
fragmentovaný ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]
305,0385	287,0101 243,0012 154,9286
593,2587	575,1707 473,1742 425,0857 381,1017 351,1167 207,0441 189,0263 121,0389
609,2150	565,2556 551,1823 489,1844 471,1496 441,1603 369,1208 207,0495 143,0267 121,0389

MALDI analýza byla opakována ještě po dalších 6 měsících (stáří vzorku 315 dní), ovšem ani zde nebyl nalezen očekávaný ion 309. Převažujícími ionty ve spektru byly: 207,0465; 361,1243 a 375,1037. Tyto ionty nebyly z hlediska struktury dále studovány. Výsledky měření ukazují, že postup použitý k přípravě roztoku AC1 (viz kapitola 3.2.1) nevede k efektivní tvorbě 5-methylpyranopelargonidinu.

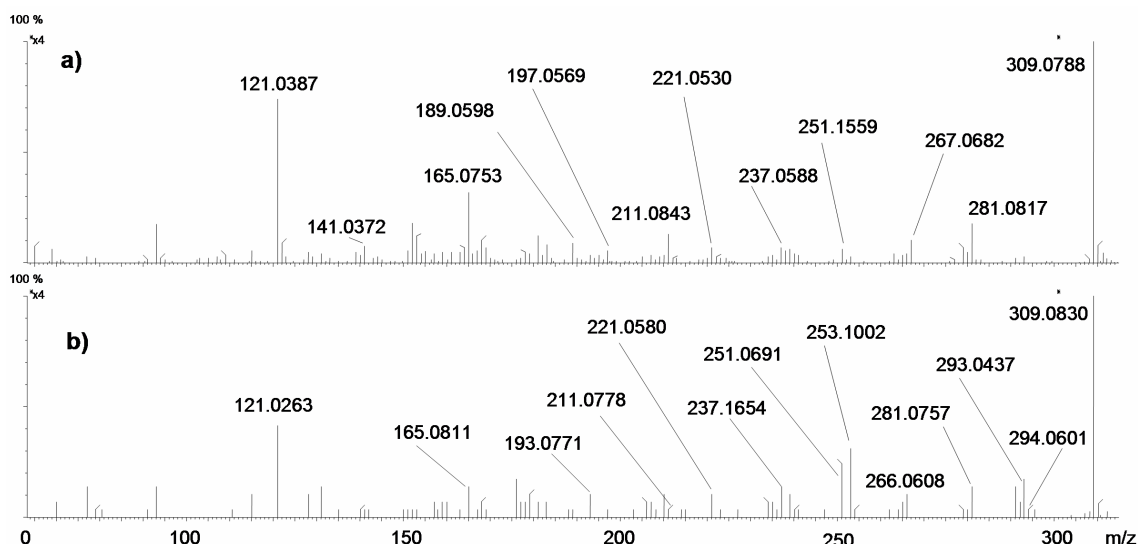
Vzhledem k tomu, že ion 309 nebyl nalezen žádnou z popsaných metod, byla připravena nová reakční směs – methanolický roztok pelargonidinu s nadbytkem acetonu (viz kapitola 3.2.1). Tento roztok obsahuje v počáteční fázi pelargonidin a aceton v molárním poměru 1 : 23250.

Již druhý den byl při MS analýze přímou infuzí roztoku do iontového zdroje spektrometru Q-TOF pozorován pík žádaného produktu v poměru 1 : 8 k výchozímu pelargonidinu (poměr intenzit příslušných iontů). Po dalších třech dnech byla provedena analýza pomocí HPLC-DAD-ESI-Q-TOF. Vznikající produkt byl úspěšně

chromatograficky separován od pelargonidinu. Poměr intenzity iontu produktu k iontu pelargonidinu se změnil na 1 : 1 (poměr intenzit iontů). Naměřená hodnota m/z molekulárního iontu vznikajícího produktu je 309,0759 (odchylka $\delta = 1,3$ ppm vůči teoretické hmotě 309,0763 Da). Tato analýza odhalila vedle sledovaného pyranoderivátu ještě přítomnost minoritní izobarické látky (m/z 309,0782) eluující před sledovanou látkou (viz obrázek 36). Fragmentační chování látek přítomných v majoritním a minoritním píku v MS^2 se do značné míry shoduje. Jedinou odlišností je poměr intenzit pozorovaných fragmentů iontu m/z 309 a výše zmíněné retenční časy. Kolizní spektra obou izomerů jsou zobrazena na obrázku 37. Vzhledem k podobnosti obou sloučenin se jako jedna z variant nabízí, že v případě minoritního pigmentu se jedná o furanoanthokyanidin, jelikož přesmyk pyranoanthokyanidinů na furanoanthokyanidiny byl již popsán^[87].



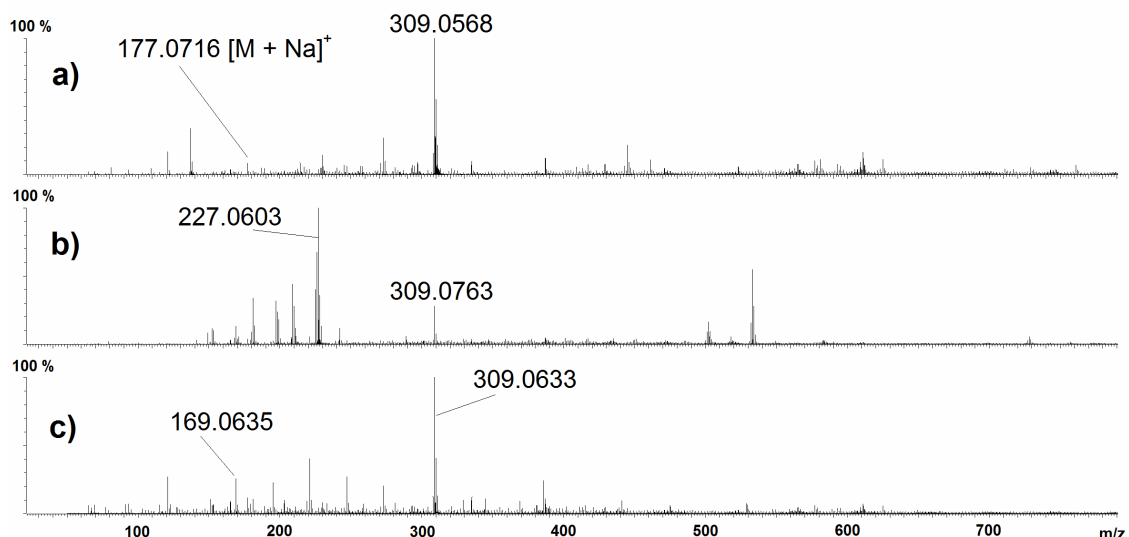
Obrázek 36: Chromatogram methanolického roztoku obohaceného acetonem s XIC (extrahovaný iontový proud) pro $m/z = 309,06$



Obrázek 37: Kolizní spektra **a)** majoritního a **b)** minoritního produktu kondenzace pelargonidinu a acetonu, relativní intenzita fragmentových iontů vůči rodičovskému iontu je 4x navýšena

Byla provedena rovněž analýza tohoto vzorku metodou MALDI. Byla získána kvalitní MS a MS/MS spektra a výsledky ukazují, že MALDI lze dobře použít pro běžnou kontrolu pyranoanthokyaninů. Kolizní spektra získaná MALDI se dobře shodují se spektry získanými pomocí ESI. Při MALDI experimentech byl studován vliv matrice na vzhled spektra a signál vznikajícího pyranoderivátu. Použitými matricemi byly THAP (2',4',6'-trihydroxyacetofenon běžně používaný v naší laboratoři pro MALDI analýzu anthokyaninů), DHB (2,5-dihydroxybenzoová kyselina) a DT (dithranol). Bylo zjištěno, že THAP a DHB poskytují kvalitní spektra s mírně vyšším signálem pro DHB, ale lepší shodou vzhledu MSMS spektra s ESI pro THAP, zatímco DT je pro analýzu téměř nepoužitelný vzhledem k silnému signálu iontu matrice, který dominuje spektru – oproti předchozím dvěma matricím, kdy je základním píkem ion analytu. MS spektra vzorku AC2 při použití různých matric vidíme na obrázku 38.

Logickým následným krokem po úspěšné syntéze 5-methylpyranopelargonidinu byla izolace tohoto individua z reakční směsi.



Obrázek 38: Záznam MALDI-MS spekter vzorku AC2 získaných za použití **a)** DHB, **b)** DT, **c)** THAP jako matrice; označené ionty odpovídají vždy signálu 5-methylpyranopelargonidinu ($m/z = 309$) a iontu matrice ($[M + H]^+$)

4.1.1 Frakcionace 5-methylpyranopelargonidinu

K frakcionaci byla využita semipreparativní kolona, použité mobilní fáze byly stejné jako v případě analytické separace. Vzhledem k plánované recyklaci mobilní fáze bylo upuštěno od původní gradientové eluce. Na základě průměrného složení eluátu při gradientové eluci byl navržen izokratický systém. Složení mobilní fáze bylo poté dále optimalizováno. Kolekce frakce majoritního produktu probíhala ručně, kritériem byl nárůst absorpce záření při vlnové délce $\lambda = 500$ nm v kombinaci se známým elučním časem. Po frakcionaci byl roztok obsahující sledované barvivo lyofilizován a část vzorku postoupena k NMR analýze a biotransformačním experimentům (in-vitro metabolizace lidskými hepatocyty), které jsou prováděny v současné době.

4.1.2 Fragmentace 5-methylpyranopelargonidinového iontu

Fragmentace produktu získaného z methanolického roztoku byla provedena jak po HPLC separaci následnou ESI-Q-TOF analýzou, která poskytla měření přesné a správné hmoty, tak na analyzátoru typu iontové pasti, který pomohl s odhalením původu jednotlivých fragmentů. Na základě porovnání těchto dvou zdrojů bylo navrženo

schéma s teoretickými návrhy struktur fragmentů. Sledované fragmentační pochody však mohou odpovídat jak majoritnímu, tak minoritnímu produktu o hmotě 309 v původním vzorku, neboť v systému ESI-IT byl přímou infuzí analyzována neseparovaná reakční směs (minoritní fragment představuje cca 10% obsahu majoritní látky). Pro potvrzení pozorovaných fragmentačních pochodů jsou do budoucna naplánovány kolizní experimenty s chromatograficky přečištěným produktem. Významné pozorované fragmentové ionty o přesné hmotě jsou uvedeny v tabulce 4 s návrhy odpovídajících struktur (s odchylkami oproti očekávaným hmotám) a s odpovídajícími intenzitami tak, jak byly naměřeny pomocí HPLC-ESI-Q-TOF.

Tabulka 4: Významné ionty fragmentačního spektra 5-methylpyranopelargonidinu měřeného systémem ESI-Q-TOF po online chromatografické separaci

m/z iontu	intenzita [impulsy]	předpokládaná struktura iontu	odchylka [ppm]
309,0735	15350	[M] ⁺	9,1
281,0772	1000	[M - CO] ⁺	14,9
267,0654	460	[M - CH ₂ =C=O] ⁺	1,1
266,0544	280	[M - CO - CH ₃ ·] ⁺	13,2
253,0580	300	[M - 2CO] ⁺	112,6
239,0553	420	[M - CO - CH ₂ =C=O] ⁺	64,8
238,0422	280	[M - 2CO - CH ₃ ·] ⁺	87,4
211,0668	850	[M - 2CO - CH ₂ =C=O] ⁺	43,1
189,0405	500	viz obrázek 39	77,8
165,0555	1320	fragment neznámého původu	-
149,0400	550	^{0,3} B ⁺ fragment	108,0
121,0360	4830	viz obrázek 39	62,8

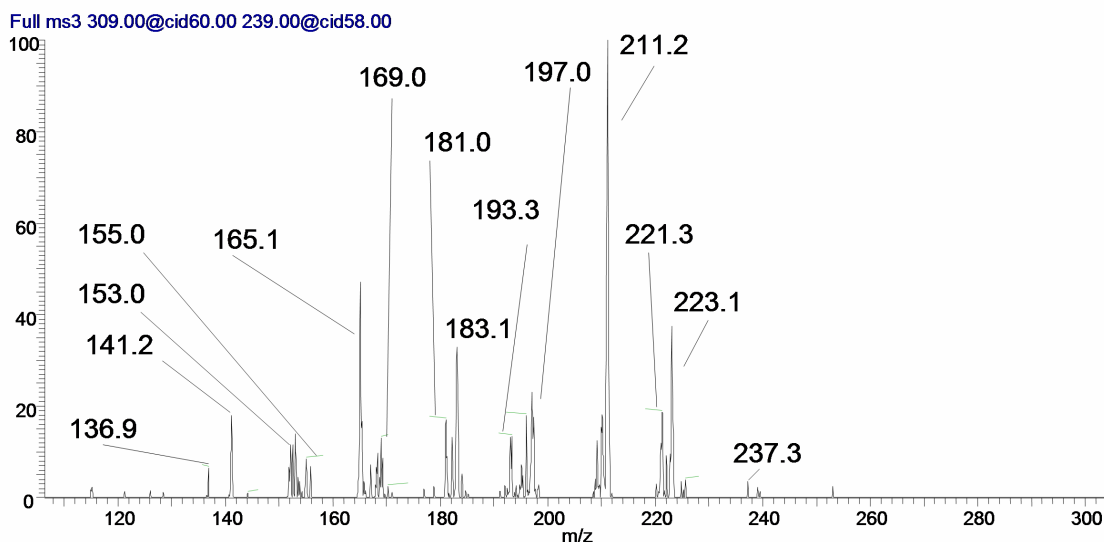
Fragmentační spektrum iontu 309 (MS²) při NCE (normalizované kolizní energii) 50 % poskytlo v největším výtěžku ionty m/z 281; 267; 253; 239; 211 a 189. Při zvýšení NCE až na 70 % došlo k výraznému úbytku signálu rodičovského iontu a zvýšil se signál iontů 211 a 165 na úkor ostatních hmot, absolutní intenzita iontu m/z 281 zůstala stejná. Ion 281 byl v obou případech základním píkem spektra. Nejvyšší absolutní odezva byla pro tento ion naměřena při NCE 55 %. Ion 281 ([M - 28]⁺) je přímým produktem rozpadu rodičovského iontu (narozdíl od některých jiných iontů spektra, které mohou být také výsledkem sekundárních fragmentací). Rozdíl hmot činí 28, takže odštěpenou částicí je zde molekula CO (diference naměřené ztráty od teoretické činí 79 ppm, v případě, že by se jednalo o ztrátu molekuly ethylenu, by diference činila 1220 ppm). Ztráta CO je typická pro fenoly, ovšem bez ověření např. kvantovými

výpočty nelze jednoznačně určit, které místo v molekule ztráta postihuje popř. zda je možné, aby ztráta probíhala na více místech a tím vznikala směs fragmentů. Rovněž ion m/z 267 ($[M - 42]^+$) vzniká přímo z iontu 309 a to ztrátou částice C_2H_2O , která odpovídá ketenové jednotce $CH_2=C=O$ (diference naměřené ztráty oproti teoretické činí 0 ppm). V níže diskutovaném kolizním spektru iontu m/z 281 byl ion m/z 267 objeven ve velice nízké intenzitě, takže může vznikat rovněž odstupem částice $|CH_2$ z tohoto iontu. Odstup ketenové jednotky při fragmentaci $309 \rightarrow 267$ může probíhat na různých částech rodičovského iontu a není možné určit přesné místo ztráty pouze na základě dat z MS. V malé míře se v kolizním spektru iontu m/z 309 vyskytuje i ion m/z 291 odpovídající ztrátě vody z rodičovského iontu. Dále je na tomto místě vhodné zmínit, že v kolizním spektru iontu m/z 309 úplně chybí ion m/z 294 odpovídající přímému odštěpení methylového radikálu z rodičovského iontu. Preferovanými ději pozorovanými při fragmentaci rodičovského iontu jsou tedy eliminace CO a H_2O a radikálové štěpení je dějem minoritním.

Vzhledem k vysoké intenzitě iontu m/z 281 v MS^2 spektru ($309 \rightarrow$) bylo možné jej dále fragmentovat (MS^3). Největší výtěžek tohoto iontu byl získán při kolizní energii (NCE) 58 %. Hlavními fragmenty iontu m/z 281 (MS^3 : $309 \rightarrow 281 \rightarrow$) jsou ionty m/z 266; 253 a 238. Vedle toho byly pozorovány méně intenzivní ionty m/z 251; 237; 211; 197 a 165. Pro potvrzení identity 5-methylpyranopelargonidinu je klíčový nález iontu 266 ($[M - 15]^+$). Vzhledem k absenci methoxyskupin v původním anthokyanidinu je ztráta 15 Da možná pouze odštěpením methylového radikálu $CH_3\cdot$ vyskytujícího se na pyranovém kruhu. Dalšími fragmenty iontu m/z 281 jsou pak ion m/z 253 ($[M - 28]^+$) odpovídající opět ztrátě molekuly CO (diference naměřené ztráty oproti teoretické činila 11 ppm) a konečně ion m/z 238. Tento ion se sudou hmotou vzniká buď ztrátou molekuly CO z radikálu m/z 266 a nebo odštěpením methylového radikálu z fragmentu m/z 253. Odpověď na otázku původu iontu m/z 238 je tak nutno hledat ve fragmentačních spektrech těchto iontů, která jsou diskutována níže.

Ion m/z 267 byl rovněž fragmentován (MS^3 : $309 \rightarrow 267 \rightarrow$; NCE 58 %) za vzniku fragmentů m/z 239; 238; 237; 221; 211; 197; 183 a 165, kdy základním píkem spektra byl ion m/z 211. Ion m/z 239 ($[M_F - 28]^+$, kde „ M_F “ je obecně hmotnost štěpeného fragmentu) je pravděpodobně opět produktem typické ztráty molekuly CO, zatímco přítomnost iontu 238 ($[M_F - 29]^+$) by mohla být vysvětlena nejlépe ztrátou skupiny $CH_3-CH_2\cdot$ z kruhu D fragmentu 267. Jedná se však pouze o hypotézu. Ion m/z 267 také ochotně ztrácí vodíkový radikál ($H\cdot$) za vzniku radikál-kationtu m/z 266.

V MS³ byl proměřen i ion 239 při (MS³: 309 → 239 → ; NCE 58 %). Ion poskytl kvalitní spektrum, v němž byly zřetelné píky m/z 223; 211; 197; 183; 165 a 141 (spektrum viz obrázek 40). Druhý jmenovaný pak byl za těchto podmínek píkem základním. Ion m/z 211 vzniká pravděpodobně odštěpením částice CO (vzhledem k nízké intenzitě iontu m/z 239 v ESI-QqTOF nebyla zjištěna přesná diference ztráty). Identita odstupující částice při vzniku iontu 223 ([M_F - 16]⁺) rovněž nebyla objasněna vzhledem ke slabé odezvě obou iontů v ESI-QqTOF spektru při měření přesných a správných hmot. Ke vzniku iontu m/z 197 dochází pravděpodobně ztrátou ketenové jednotky CH₂CO z iontu 239, čemuž odpovídá i výsledek měření přesné hmoty (ion s elementárním složením odpovídajícím ztrátám dvou C₂H₂O jednotek a molekuly CO z rodičovského iontu 309 poskytuje odchylku 46 ppm oproti experimentálně zjištěné hodnotě).

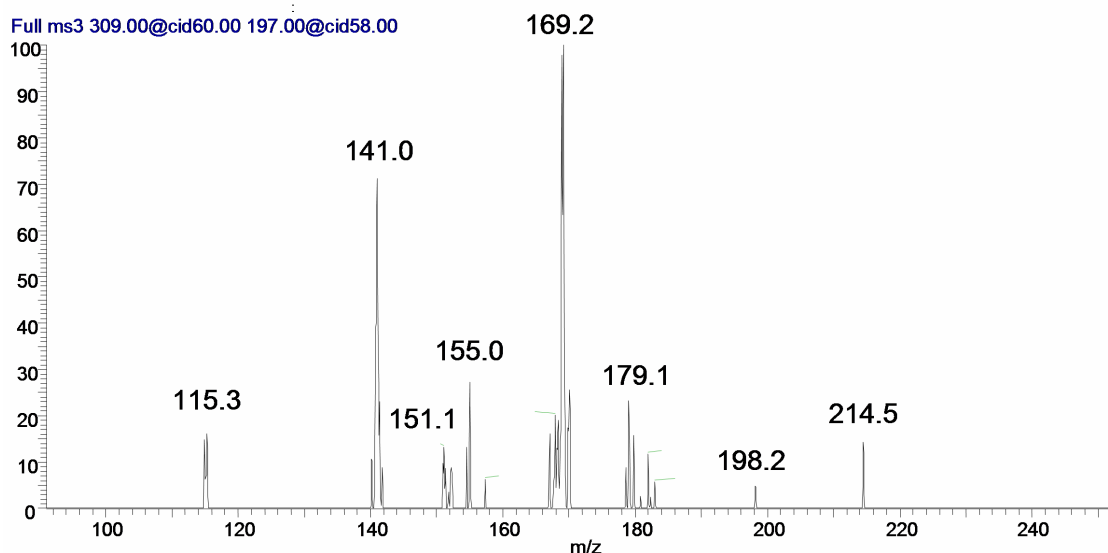


Obrázek 40: Kolizní spektrum iontu m/z 239 získaného fragmentací iontu m/z 309

Dalším iontem fragmentovaným v MS³ přímo z iontu m/z 309 byl ion m/z 211 (MS³: 309 → 211 → ; NCE 58 %). Jeho hlavními fragmenty jsou ionty m/z 183 ([M_F - 28]⁺) a 165 ([M_F - 46]⁺). Jejich vznik je způsoben ztrátami molekul CO a vody. Ve spektru se ovšem zřetelně vyskytují i fragmenty m/z 197 a 193. Z iontu m/z 211 by mohl ion m/z 197 vznikat neobvyklou ztrátou částice CH₂. Ion m/z 193 pak vzniká dehydratací iontu m/z 211.

Fragmentován byl i ion m/z 197 (MS³: 309 → 197 → ; NCE 58 %). V jeho poměrně kvalitním fragmentačním spektru byly pozorovány hmoty 179 ([M_F - 18]⁺),

169 ($[M_F - 28]^+$) a 141 ($[M_F - 56]^+$). V tomto případě se však měřením přesné a správné hmotnosti jako pravděpodobnější jeví v případě iontu 169 ztráta molekuly ethylenu spíše než ztráta molekuly CO. V případě iontu 141 zřejmě dochází ke kombinované ztrátě molekuly ethylenu a molekuly oxidu uhelnatého. Kolizní spektrum iontu m/z 197 vidíme na obrázku 40.



Obrázek 41: Kolizní spektrum (MS^3) iontu 197

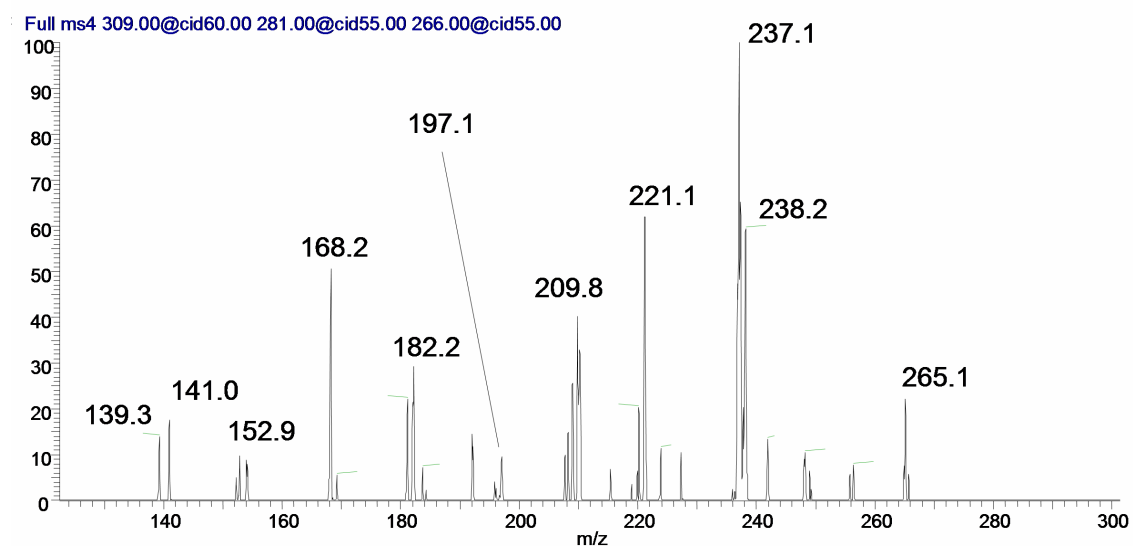
Dalším studovaným fragmentem byl ion m/z 189. Pro tuto částici byla na základě jejího nálezu v kolizním spektru iontu m/z 281 navržena struktura zobrazená na obrázku 41. Při fragmentaci tohoto iontu (MS^3 : $309 \rightarrow 189 \rightarrow$; NCE 58 %) vznikaly ionty m/z 161 ($[M_F - 28]^+$), 143 ($[M_F - 46]^+$), 133 ($[M_F - 56]^+$), 121 ($[M_F - 68]^+$) a 105 ($[M_F - 84]^+$). Jejich vznik lze připsat opakovaným ztrátám molekul vody a CO.

Struktura dalších iontů s menší hodnotou m/z mimo výše zmíněné není diskutována.

U vybraných hmot byl změřeno i MS^4 spektrum, ale intenzity fragmentů byly v těchto experimentech velmi slabé. Výjimku tvoří spektra získaná fragmentací nejintenzivnějších fragmentů iontu 281 (tedy sledem fragmentací $309 \rightarrow 281 \rightarrow$ vybraný ion \rightarrow fragmenty).

Cílem byla fragmentace radikálového iontu m/z 266 (MS^4 : $309 \rightarrow 281 \rightarrow 266 \rightarrow$; NCE 60/55/55 %), který může být potenciálně využit jako diagnostický ion pro 5-methylpyranoanthokyaniny. V kolizním spektru byly nalezeny ionty m/z 238 ($[M_F -$

28]⁺), 237 ([M_F - 29]⁺), 221 ([M_F - 45]⁺), 210 ([M_F - 56]⁺), 182 ([M_F - 84]⁺), 168 ([M_F - 98]⁺), 153 ([M_F - 113]⁺) a 141 ([M_F - 125]⁺). Ion 238 je produktem ztráty molekuly CO z ion-radikálu m/z 266. Dalším zajímavým iontem je ion 237 – základní pík spektra. Pozorovanou diferencí hodnot m/z obou iontů (29 Da) není možné vysvětlit odštěpením skupiny CH₃-CH₂· jako u iontu 267, protože tímto uskupením podle navržených prekurzorů (viz obrázek 39) ion m/z 266 nedisponuje. Možným vysvětlením je zde odštěpení molekuly CO a současné odštěpení radikálu vodíku. Kolizní spektrum iontu m/z 266 vidíme na obrázku 42.



Obrázek 42: Kolizní spektrum (MS⁴) iontu m/z 266

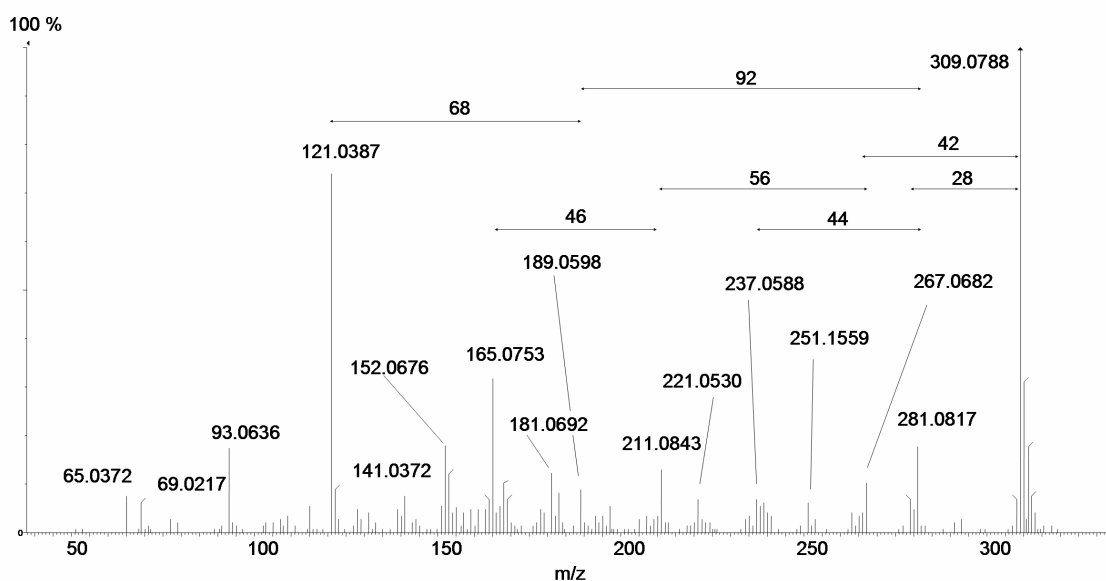
Zkoumán byl také ion 253 (MS⁴: 309 → 281 → 253 → ; NCE 60/50/50 %). Hlavním fragmentem je ion m/z 238 – vznikající odštěpením methylového radikálu a ion 211 ([M_F - 42]⁺) vznikající pravděpodobně odštěpením ketenové jednotky. Z těchto dat vyplývá, že ion 238 vzniká odštěpením radikálu CH₃· a molekuly CO z iontu 281 v libovolném pořadí. Dalšími hmotami přítomnými ve spektru jsou 225 ([M_F - 28]⁺), 207 ([M_F - 46]⁺), 183 ([M_F - 70]⁺), 178 ([M_F - 75]⁺), 169 ([M_F - 84]⁺) a 153 ([M_F - 100]⁺).

Kolizní spektrum radikálového iontu 238 (MS⁴: 309 → 281 → 238 → ; NCE 60/50/50 %) poskytlo převážně ionty se sudou hodnotou m/z: fragmenty m/z 221 ([M_F - 17]⁺), dále ionty m/z 197 ([M_F - 41]⁺), 181 ([M_F - 57]⁺), 168 ([M_F - 70]⁺), 153 ([M_F - 85]⁺) a 141 ([M_F - 97]⁺), kde logicky dochází k odštěpení radikálu a vzniku iontu se sudým počtem elektronů.

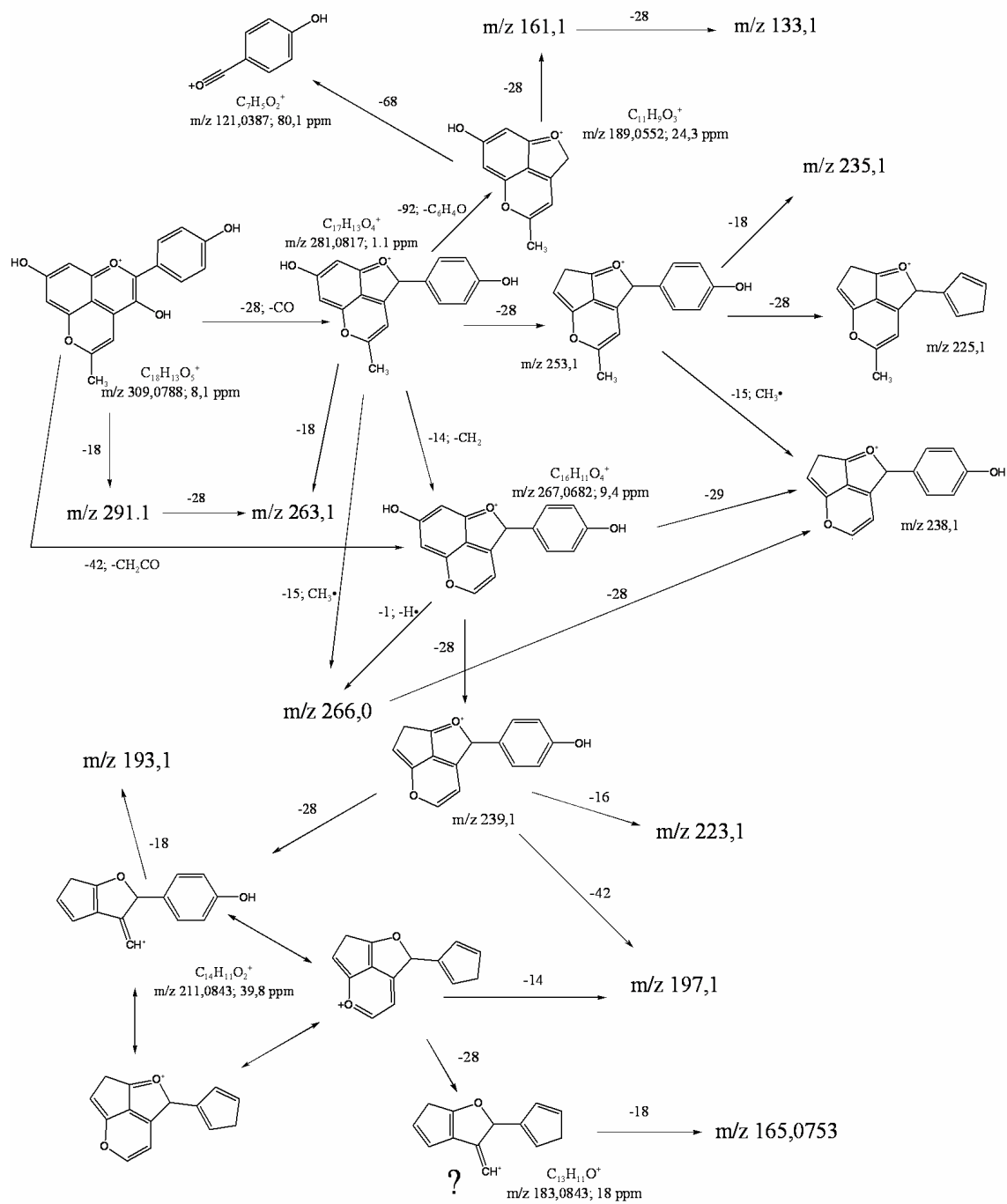
Dalším experimentem bylo detailní sledování fragmentace iontu m/z 211 (MS^4 : $309 \rightarrow 281 \rightarrow 211 \rightarrow$; NCE 60/60/55 %). Hlavními fragmenty iontu m/z 211 jsou ionty m/z 193 ($[M_F - 18]^+$), 183 ($[M_F - 28]^+$), 181 ($[M_F - 30]^+$), 165 ($[M_F - 46]^+$), 155 ($[M_F - 56]^+$) a 141 ($[M_F - 70]^+$). Opět můžeme pozorovat ionty vzniklé odštěpením molekul vody, oxidu uhelnatého a ketenu (a jejich kombinace). Výjimkou je v tomto ohledu ion 181 vzniklý ztrátou 30 Da. Identita odstupující částice a vzniklého fragmentu prozatím zůstává neobjasněna.

Z výše uvedených závěrů bylo sestaveno hypotetické schéma, naznačující nejpravděpodobnější mechanismy rozpadu iontu m/z 309 a jeho fragmentů v kolizním spektru (obrázek 39), šipkami jsou tedy spojeny ty fragmenty, které byly prokázány odpovídajícími (následnými) MS^n experimenty. Struktury, které mají uvedeno elementární složení byly získány měřením přesné a správné hmoty odpovídajících iontů, uvedená hodnota m/z odpovídá experimentálně získané, za hodnotou m/z následuje údaj o relativní odchylce od teoretické hmoty. U iontů, kde nebyla dosažena požadovaná intenzita signálu pro změření přesné a správné hmoty, je uvedena pouze nominální hodnota (zaokrouhlená na desetiny Da).

Pro shrnutí zjištěných závěrů je přiložen rovněž záznam kolizního spektra (ESI-QqTOF) iontu m/z 309 po chromatografické separaci, kde je naznačen sled fragmentací vybraných iontů ověřený v systému ESI-IT (viz obrázek 43).



Obrázek 43: ESI-QqTOF spektrum iontu m/z 309 po chromatografické separaci a naznačené vztahy fragmentových iontů



Obrázek 39: Návrh struktur fragmentů 5-methylpyranopelargonidinu (legenda uvedena v textu výše)

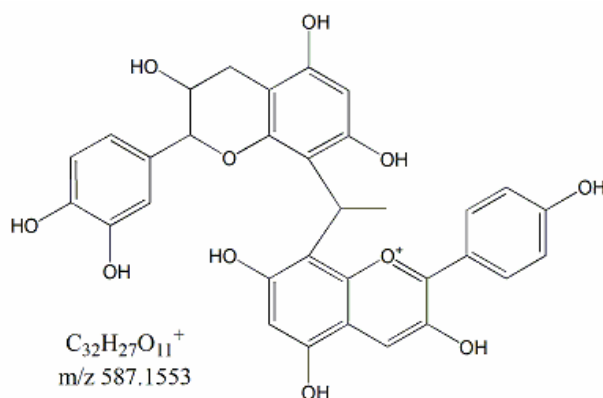
4.2 Studium reakce pelargonidinu s epikatechinem za přítomnosti acetaldehydu

Cílem této studie bylo zjistit, zda pelargonidin (Pg) v přítomnosti acetaldehydu kondenzuje s epikatechinem (Epi) a vytváří složitější barviva. Kondenzace anthokyaninů s flavanoly je v literatuře popisována zejména u malvidin-3-glukosidu v souvislosti s procesy probíhajícími ve víně.

Pro tento účel byly v první fázi experimentu připraveny dva roztoky (EP1 a EP2). Prostředí 20 % roztoku methanolu bylo u prvního vzorku zvoleno za účelem zjištění, zda v částečně methanolických a čistě vodných podmínkách podstupuje směs stejné reakce. Roztoky byly krátce ultrazvukovány pro dokonalé rozpuštění složek směsi a poté uschovány ve tmě za laboratorní teploty.

O dva týdny později byly oba roztoky podrobeny HPLC-DAD-ESI-Q-TOF analýze (viz tabulka 1).

V roztoku obsahujícím methanol (EP1) byl nalezen v pík s $t_R = 31,47$ min. a hmotností odpovídající aduktu pelargonidinu a epikatechinu přes acetaldehydový můstek při $m/z = 587,1526$ (odchylka $\delta = 4,6$ ppm vůči teoretické hmotě 587,1553 Da); intenzita iontu byla 1310 impulsů (counts). Struktura předpokládaného produktu je znázorněna na obrázku 44.



Obrázek 44: adukt pelargonidinu a epikatchinu s ethylidenovým můstkem

V kolizním spektru tohoto iontu byly pozorovány ionty s m/z 297 Da (odpovídá odštěpení epikatechinové jednotky tzn. iontu $[M-290]^+$) a 271 Da (odštěpení vinylkatechinu tzn. $[M-316]^+$), což podporuje hypotézu o struktuře produktu. Kromě tohoto iontu bylo v retenčním okně 30-40 min. nalezeno několik dalších zajímavých píků. Jejich výčet a ionty v nich detekované shrnuje tabulka 5.

Tabulka 5: Analyzované píky z chromatogramu vodného roztoku EP1

retenční čas píku [min]	pozorované hmoty [m/z]	intenzita [impulsy]	poznámka
30,69	613,152	110	- možný vinylový derivát aduktu Pg a Epi přes aldehydový můstek
	571,081	60	
	415,028	60	
32,69	725,098	15	
	555,085	530	
	435,059	120	
	391,110	150	
34,08	587,119	40	} fragmenty iontu 587 pozorovány jen při vyšší kolizní energii
	467,085	90	
	315,030	70	
	283,020	130	
36,50	555,085	230	- při vyšší kolizní energii
	390,057	50	
37,50	455,087	110	
37,70	297,071	200	pravděpodobně vinylpelargonidin
38,88	725,034	20	- při vyšší kolizní energii
	595,085	110	
	573,099	140	
	407,075	300	
	391,084	550	
	271,054	260	
39,06	555,075	100	

Analýza roztoku bez přídavku methanolu (označeného jako EP2) za stejných chromatografických podmínek jako výše odhalila přítomnost iontu odpovídajícího můstkovému aduktu v časech 27,21 min. a 30,78 min; intezity iontu m/z 587 byly 420 resp. 1510 impulsů (větší odezva než v methanolickém roztoku). Vzhledem k souhlasu naměřené hmoty s teoretickou ($\delta = 3,9$ ppm resp. 3,2 ppm pro první a druhý pík) a k podobnosti fragmentačního chování (jsou pozorovány pouze pouze ionty $[M-290]^+$ a $[M-316]^+$) se jedná s největší pravděpodobností o polohové izomery můstkového aduktu. V retenčním okně 30-40 min. se opět vyskytuje několik zajímavých píků, které jsou shrnuty v tabulce 6. Zajímavé je, že v odpovídajícím retenčním čase, v jakém byl pozorován ion m/z 587 v roztoku EP1, je v roztoku EP2 eluován ion m/z 585. Identita tohoto iontu doposud nebyla vysvětlena. V čase 38,70 min byl pozorován shluk píků, s velmi blízkými hodnotami retenčních časů Tyto píky jsou shrnuty v tabulce jako ionty píku v čase 38,70 min. Roztoky EP1 i EP2 byly proměřeny znovu po třech měsících

(viz kapitola 3.4.6). V obou roztocích byl zaznamenán výrazný pokles intenzity iontu m/z 587.

Tabulka 6: Pozorované ionty ve vodném roztoku EP2

retenční čas píku [min]	pozorované hmoty [m/z]	intenzita [impulsy]	poznámka
31,47	585,106	140	- shodný t_R s iontem 587 u EP1
34,34	593,149	60	
38,70	725,039	110	
	595,083	340	
	573,101	370	
	527,073	260	
	435,060	270	
	407,073	690	
	391,086	1450	
	271,064	80	- molekulární ion pelargonidinu

V průběhu experimentů došlo v reakčních směsích EP1 a EP2 k vysrážení materiálu a k tvorbě stálého barevného sedimentu. Proto byla po 132 dnech od založení provedena HPLC-DAD-MS analýza těchto sedimentů. V obou roztocích byl detekován ion m/z 587. Vyšší intenzita tohoto iontu byla pozorována v roztoku EP1. V obou případech však vykazoval odchylku od přesné hmoty cca 0,05 Da. Jeho výskyt provázal silný signál doprovodných iontů 227 a 139 (druhý jmenovaný je jedním z fragmentačních produktů RDA štěpení epikatechinu). Ostatní ionty jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7: Významné ionty z analýzy EP1 a EP2 po 132 dnech od založení pokusu

EP1			
retenční čas píku [min]	pozorované hmoty [m/z]	intenzita [impulsy]	poznámka
33,43	573,099	1560	
	409,089	990	
	219,146	280	
	136,029	2560	
34,84	587,119	1040	
	343,118	1020	
	227,127	7760	
	189,104	1080	
	139,104	1140	
35,84	387,089	580	

EP2			
retenční čas píku [min]	pozorované hmoty [m/z]	intenzita [impulsy]	poznámka
34,59	573,101	830	} při vyšší kolizní energii
	523,111	90	
	453,077	70	
	435,077	150	
	283,025	190	
	244,137	20	
	136,027	120	
37,29	529,113	2370	- při vyšší kolizní E
	257,048	610	

Jak supernatant, tak sediment barevné frakce roztoku EP1 a EP2 byly po 146 dnech podrobeny analýze pomocí MALDI za použití matrice THAP. Nebyly nalezeny ionty odpovídající očekávaným produktům. Tabulka 8 shrnuje ionty nalezené v MALDI spektru a jejich fragmenty pozorované v MS/MS spektru. Identita těchto iontů nebyla doposud objasněna.

Tabulka 8: Ionty z roztoků EP1 a EP2 podrobené fragmentaci a jejich fragmenty

EP1						
sediment			supernatant			
rodičovský ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]		rodičovský ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]		
242,1201	213,1062	197,1037	491,4360	473,4317	455,4081	
	185,1012	173,0908		437,3863	378,3204	
	168,0913	157,0952		360,2941	342,2765	
	155,0714	141,0870		323,1104	282,2377	
	131,0616	121,0348		265,1893	247,1695	
477,2366	327,1108	309,0948		497,2070	207,0388	189,0314
	281,0772	207,0441			161,0133	152,0602
	189,0263	171,0193			121,0023	
	161,0227	145,0196			479,1692	455,2109
	121,0063				361,1509	329,1202
			345,1352		285,1151	
			303,1105		207,0388	
			251,0976		161,0133	
			189,0212		145,0152	
			121,0023			
			671,3583	519,2871	381,1955	
				229,1054	207,0441	
				189,0263	161,0180	
			735,6262	567,1912	525,1681	
				399,0953	361,1509	
				315,1375	277,1050	

	235,0828	211,0704
	189,0314	

EP2			
sediment		supernatant	
rodičovský ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]	rodičovský ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]
225,0597	207,0441	551,2170	533,1890
	189,0314		399,1101
	171,0097		383,1400
	161,018		361,1509
145,0196	126,9947		343,1391
			319,1281
			277,0989
			233,1025
			211,0704
			189,0212
		735,2853	567,2000
			399,1101
			381,1017
			361,1509
			343,1322
			337,0971
			319,1149
			315,1244
		277,1050	
		249,0217	
		233,1025	
		211,0651	
		189,0263	

Po dalších 5 měsících byly roztoky EP1 a EP2 opět podrobeny analýze MALDI. Bylo zjištěno, že nejintenzivnějšími ionty jsou v obou případech ionty 207, 361 a 375, avšak jejich původ není objasněn. Vzhledem k hodnotě m/z Pg a Epi je jasné, že tyto ionty neodpovídají produktům kondenzace, ale spíše jiným produktům přeměny Pg a Epi nebo fragmentům nestálých produktů. Seznam iontů podrobených fragmentaci a jejich fragmentů je shrnut v tabulce 9.

Tabulka 9: Fragmentované ionty a z nich vzniklé fragmenty v roztocích EP1 a EP2 (tučně jsou vyznačeny ionty odpovídající pelargonidinu a vinylpelargonidinu)

EP1				
fragmentovaný ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]			
361,0962	343,1036	319,0933	315,0975	301,0828
	277,0783	253,0882	233,0933	211,0656
	193,0582	165,0649		

EP2				
fragmentovaný ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]			
551,1633	383,0933	361,1103	207,0465	191,0501
	112,9462			
581,1388	583,1933	585,192	587,1879	(ionty s vyšším m/z)
	567,1254	537,1155	525,1198	495,1057
	431,1394	413,0562	399,0591	369,0567
	351,0443	327,0467	325,0709	297,1254

	271,1052	207,0465	191,0450	165,0364
	121,0763	96,9729		
721,2857	569,1874	553,1092	383,0933	362,1085
	361,1032	207,0465	112,9462	96,9729
735,2227	717,1613	689,1843	621,1793	585,174
	567,1342	523,1308	361,1103	207,0519

Vzhledem k pozorovaným změnám složení vzorku v čase byl pro nová pozorování počátečních fází reakce založen vzorek EP4 za stejných podmínek jako u vzorku EP2. Při kontrolní analýze v den, kdy byl roztok připraven, byly v UV/VIS spektru detekovány pouze tři píky. Dva z nich odpovídaly pelargonidinu a epikatechinu, třetí (absorbující pouze v UV oblasti se spektrem výrazně podobným epikatechinu), obsahoval v MS spektru řadu iontů (599,0579; 525,2690; 452,2199; 373,0197; 308,1502; 289,0794; 121,0397) a jeho identitu se nepodařilo zjistit.

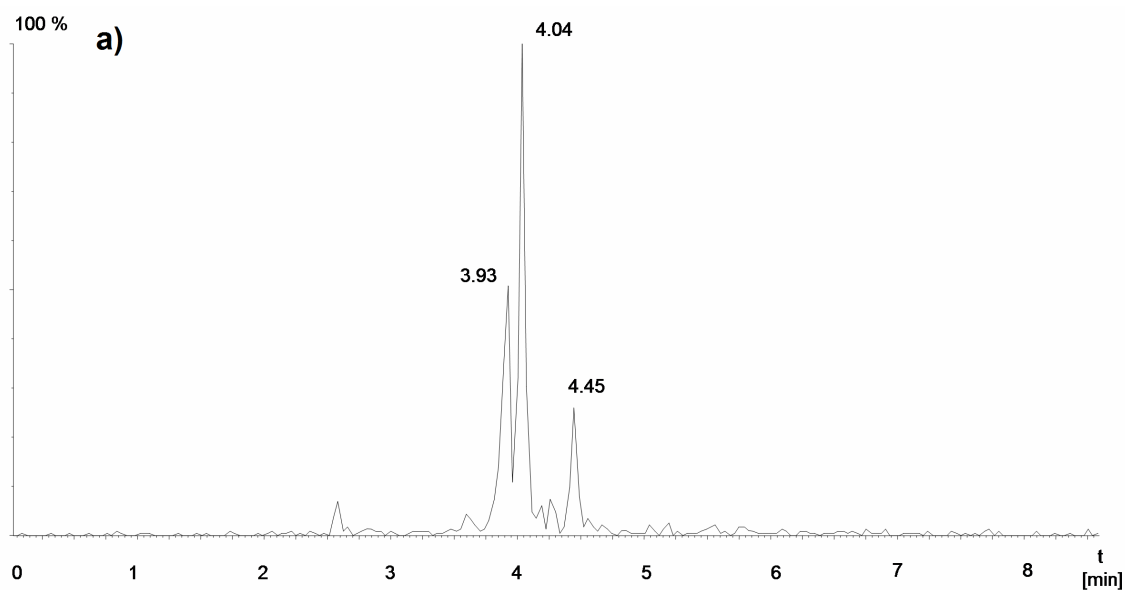
Přítomnost iontu m/z 121 by mohla naznačovat rozpad pelargonidinové jednotky (acyliový ion 4-hydroxybenzoové kyseliny, viz fragmentace 5-methylpyranopelargonidinu v kapitole 4.1.2).

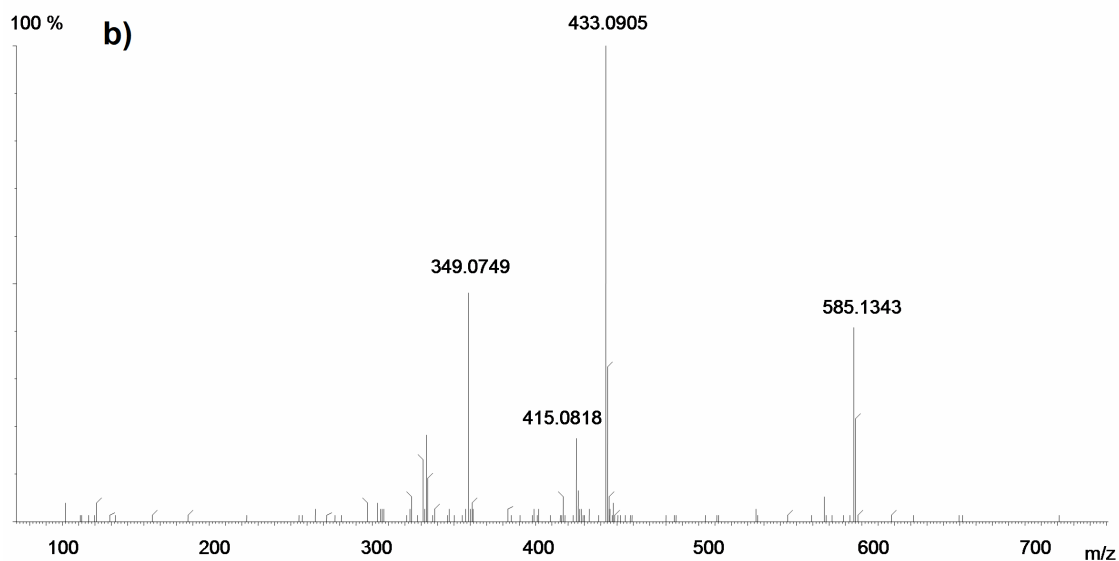
Roztok EP4 byl po 14 dnech podroben UPLC-DAD-ESI-Q-TOF analýze a u píků vykazujících absorbanci v oblasti kolem $\lambda = 500$ nm (tzn. podezřelé na přítomnost anthokyaninového jádra) byla vyhodnocena MS spektra. Bylo objeveno několik píků v těsné blízkosti u sebe, jedním z nich byl pelargonidin ($t_R = 3,08$ min.). Jejich přehled udává tabulka 10.

Tabulka 10: Píky vzorku EP4 absorbující ve viditelné oblasti spektra po 14 dnech

retenční čas píku [min]	pozorované hmoty [m/z]	intenzita [impulsy]
2,45	393,173	260
2,97	525,288	80
3,08	271,081	120
3,13	569,308	130
3,28	613,333	160
3,41	657,355	40
3,83	435,053	40
	573,103	430
3,93	613,325	260
	875,213	210
4,04	875,220	330
4,45	583,319	270
	875,220	80

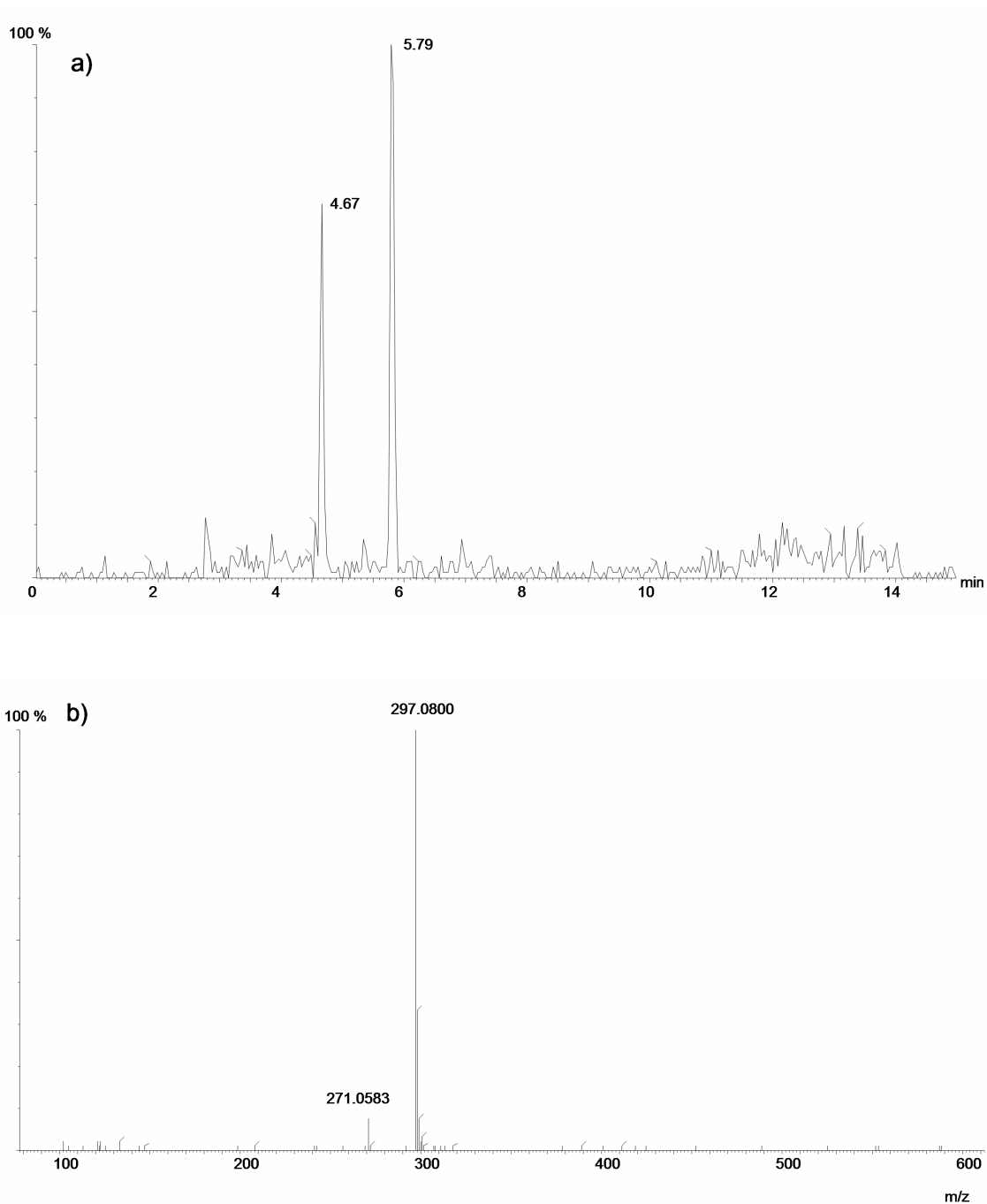
V této oblasti se vyskytovaly tři píky, jejichž hlavní součástí byl ion $m/z = 875$ - viz obrázek 45 a). Ze všech tří píků byly kolizí indukovanou disociací (MS^2) iontu $m/z 875$ získána spektra obsahující ionty $m/z 585$; 433 a 415 - viz obrázek 45 b). Ion 585 odpovídá hodnotou m/z aduktu epikatechinu a pelargonidinu přes vinylový můstek a vztah k rodičovskému iontu: $[M - 290]^+$ naznačuje, že rodičovský ion by mohl být aduktem obsahujícím dvě epikatechinové a jednu pelargonidinovou jednotku a vinylový můstek (pravděpodobně spojující anthokyanidin a flavanol - vzhledem k navrhované struktuře iontu $m/z 585$). Rozdíl přesných hodnot m/z činí 290,0858 Da, což odpovídá epikatechinové jednotce s přesností 23,4 ppm. Ion 433 pak odpovídá struktuře $[M - 290 - 152]^+$ a naznačuje RDA štěpení typické pro (epi)katechin probíhající na iontu $m/z 585$. Tato ztráta by byla očekávaná u námi navrhované struktury a podporuje hypotézu o struktuře iontu $m/z 875$, potažmo $m/z 585$. Rovněž data získaná měřením přesných hmot jsou v souladu s navrhovanou strukturou iontu $m/z 433$ (odchylka od teoretické ztráty činí 6,6 ppm).





Obrázek 45: **a)** extrahovaný iontový proud pro ion m/z 875, **b)** MSMS spektrum iontu 875 získané průměrováním z píku v čase 4,04 min

Hlavním úspěchem byl však nález dvou píků iontu 587 v retenčních časech $t_R = 4,67$ a $5,80$ min (viz obrázek 46). Tento ion odpovídá můstkovému aduktu pelargonidinu, epikatechinu a acetaldehydu (s naměřenou odchylkou přesné hmoty $\delta = 5,1$ ppm). Existence dvou píků stejně jako v roztoku EP2 podporuje hypotézu o dvou polohových izomerech aduktu. Intenzita iontu byla nízká (zřejmě v důsledku toho, že reakce byla teprve v počáteční fázi), byla však změřena kolizní spektra tohoto iontu pro oba píky a v obou případech byl detekován fragment o $m/z = 297$ ($[M - 290]^+$), který vzniká odštěpením epikatechinové jednotky (stejně jako u vzorku EP2) a fragment o $m/z 271$ odpovídající pelargonidinu (odštěpení vinylepikatechinu z rodičovského iontu: $[M - 316]^+$).



Obrázek 46: **a)** extrahovaný iontový proud (XIC) pro ion s m/z 587 po UPLC separaci roztoku EP4, **b)** MSMS spektrum iontu m/z 587 získané průměrováním píky v čase 5,79 min

Kromě toho byl ve směsi nalezen také ion 559, který odpovídá přímému aduktu pelargonidinu a epikatechinu. Ion s touto nominální hodnotou m/z obsahovaly tři píky eluující velmi blízko po sobě (v časech 3,18, 3,41 a 4,00 min). Byla proměřena kolizní spektra (MS^2) pro všechny tři píky, avšak signál fragmentových iontů byl velmi slabý.

Po 29 dnech od založení experimentu došlo k novému proměření roztoku EP4 pomocí UPLC/MS. Ve vzorku došlo k výraznému úbytku iontu m/z 587 i m/z 559 natolik, že nebyly detekovány. Ve směsi se však objevily nové píky absorbující při vlnové délce 500 nm. Původní ionty uvedené v tabulce 10 zůstaly zachovány, avšak u iontů m/z 393 a 613 došlo k poklesu signálu, což může být zapříčiněno další přeměnou těchto látek, zřejmě za vzniku nových barevných produktů detekovaných ve spektru. Souhrn nalezených píků při $\lambda = 500$ nm (včetně těch, které byly v roztoku detekovány již dříve) podává tabulka 11.

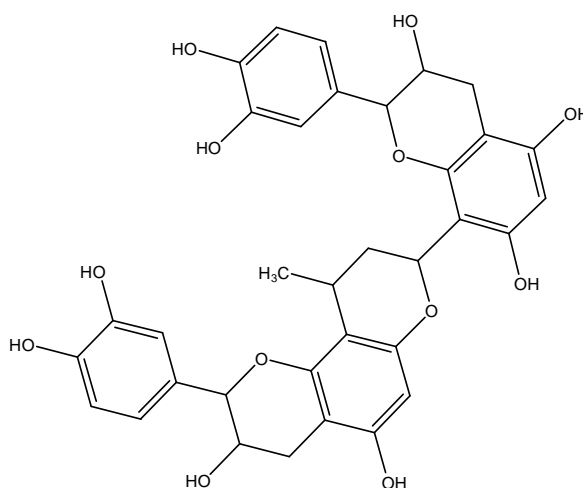
Tabulka 11: Absorbující píky vzorku EP4 po 29 dnech zrání směsi

retenční čas píku [min]	pozorované hmoty [m/z]	intenzita [impulsy]
3,01	393,173	40
3,05	155,038	150
3,28	437,239	100
3,46	481,261	140
3,61	525,277	120
3,79	569,317	140
3,95	613,332	80
4,14	657,372	60
4,31	701,381	40
6,03	332,095	300

Po dalších třech měsících byla další část roztoku EP4 analyzována technikou UPLC-DAD-ESI-Q-TOF. Bylo zjištěno, že ve spektru již nejsou detekovány píky, které by absorbovaly ve viditelné oblasti spektra. Byla provedena rovněž analýza supernatantu i roztoku sedimentu v methanolu přímým nástřikem do systému ESI-Q-TOF.

Supernatant obsahoval zbytkové množství epikatechinu ($m/z = 291$) a vinylepikatechinový dimer s $m/z = 633$ (viz obrázek 47), v oblasti vyšších hmot se zajímavými jevíly pouze píky m/z 603, 777 a 945, které byly následně fragmentovány. Pík iontu o m/z 603,1481 poskytl fragmenty o m/z 453,1329; 313,0663 ($[M - 290]^+$ základní ion spektra) a 121,0423. Jeho totožnost nebyla úplně objasněna. Je ale zřejmé, že na jeho stavbě se podílí nejméně jedna epikatechinová jednotka. Při fragmentaci iontu 777,1895 bylo získáno velmi slabé MS/MS spektrum. Mezi zachycenými fragmenty se vyskytují hmoty 619,1039 ($[M - 158]^+$), 487,1144 ($[M - 290]^+$) a 329,0598 ($[M - 290 - 158]^+$). Ani zde nebyla struktura iontu objasněna, i když vzhledem

k pozorovaným ztrátám obsahuje ve své struktuře alespoň jednu epikatechinovou jednotku. Mnohem kvalitnější spektrum poskytl pík 945,2438, jehož dominujícím fragmentem je za daných podmínek ion m/z 655,1681 (opět $[M - 290]^+$). Další ionty jsou již méně výrazně a patří mezi ně např. m/z 503,1190 ($[655 - 152]^+$), který naznačuje přítomnost druhé epikatechinové jednotky, která po ztrátě první jednotky z rodičovské struktury podléhá RDA štěpení. Dalšími ionty jsou 365,0157 ($[655 - 290]^+$, který potvrzuje přítomnost druhé epikatechinové jednotky) a ion m/z 339,0821. Tento ion ($[655 - 316]^+$) odpovídá ztrátě vinylepikatechinové jednotky. Ztráta vinylepikatechinu je často pozorovaným jevem v kolizních spektrech můstkových oligomerů flavanolů. U rodičovského iontu m/z 945 tedy zřejmě dochází k odštěpení první epikatechinové jednotky a následný fragment má strukturu epikatechin-vinyl-, „jádro“, přičemž jádrem je v tomto případě myšlena část molekuly, která zůstává nedotčena fragmentačními pochody. Identita iontu m/z 945 prozatím zůstává neobjasněna a pro detailní informaci struktury bude potřeba tuto látku izolovat.



Obrázek 47: Struktura dimeru vinylepikatechinu

Sediment vzorku EP4 poskytl v oblasti nižších hmot podobné spektrum jako supernatant; v oblasti hmot nad 600 Da byla pozorována intenzivní iontová série. Tato série iontů vyšších hmot odpovídá zřejmě určitému typu aduktů, neboť vykazují posloupnost v hmotách $[615+x\cdot74]^+$ pro $x \in \langle 0;5 \rangle$. Tyto ionty neposkytují při fragmentaci ionty využitelné pro identifikaci. I přes detailní optimalizaci podmínek kolizních experimentů (kolizní energie, tlak plynu v kolizní cele) byl ve spektru patrný pouze rodičovský ion a při vysokých kolizních energiích (100 eV) jsou ve spektru

patrné ionty m/z 70 a 79. Jinými pozorovatelnými fragmenty byla pouze hmota 236 v kolizním spektru iontu 763 a ion 121 (indikující možný pelargonidinový základ struktury) ve spektrech iontů 763 a 837. Struktury těchto sloučenin nebyly na základě získaných dat odhaleny.

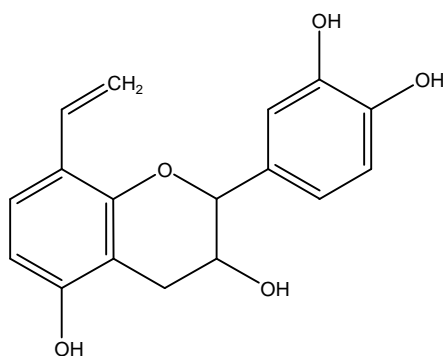
Pro posouzení vlivu reakčního prostředí na průběh kondenzačních reakcí byl založen také methanolický roztok epikatechinu a pelargonidinu – EP3 (viz kapitola 3.2.2). Druhý den po založení pokusu byla z reakční směsi odebrána část vzorku. U této části bylo proměřeno MS spektrum (přímou infuzí do ESI-Q-TOF). Po této krátké době od založení reakční směsi nebyl nalezen ani ion m/z 587 odpovídající můstkovému aduktu Pg, Epi a acetaldehydu, ani ion 559 odpovídající přímému aduktu Pg a Epi. Navíc spektrum neobsahovalo již ani ionty 271 a 291 odpovídající reaktantům. Základní pík tohoto spektra má $m/z = 257$ a jeho fragmenty spolu s fragmenty dalších štěpených iontů jsou shrnuty v tabulce 12. Struktura nalezených iontů nebyla dále detailněji studována.

Tabulka 12: Ionty a jejich fragmenty z přímého nástřiku vzorku EP3 jeden den po založení

fragmentovaný ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]			
257,1402	225,1154	199,1012	169,0893	98,9943
273,0971 (slabé spektrum)	157,0774	141,0841	121,0783	117,0744
	101,0449	97,0240	87,0607	71,0527
357,1963	313,1633	269,1284	243,1219	225,1075
	199,1058	181,0844	155,0724	137,0542
	115,0819	71,0553		
401; 445; 533	adukty $[357 + x \cdot 44]^+$ vzhledem k podobnosti spekter			
663,3900	607,4072	551,3368	495,2726	439,2017
	383,1445	327,0851		

Tři dny po založení roztoku EP3 byla provedena jeho HPLC analýza. Bylo potvrzeno téměř úplné vymizení pelargonidinu i epikatechinu ze směsi. Pelargonidin byl objeven pouze v píku v čase 2,98 min v čisté formě ($m/z = 271$) a ve formě vinylpelargonidinu ($m/z = 297$). V obou případech se ale jednalo o stopová množství (intenzita 130 resp. 230). Epikatechin byl nalezen pouze ve formě vinylového aduktu o $m/z = 317$ v čase 3,24 min (struktura 8-vinylepikatechinu viz obrázek 48). Jeho intenzita byla poněkud vyšší než u pelargonidinu - dosáhla 800 impulsů. Přeměna pelargonidinu (ať už jakýmkoli pochodem) probíhá v methanolu mnohem rychleji než

ve vodném prostředí. Vzhledem k absenci barvy vzorku je možné, že pelargonidin nekondenzuje za vzniku vyšších barviv, ale agresivním prostředím methanolu a acetaldehydu dochází k rozpadu na kruhu C za vzniku bezbarvých produktů. Ve vzorku byly rovněž zachyceny látky elující v časovém rozmezí 3 - 7 minut. Retenční časy a hodnoty m/z těchto látek jsou uvedeny v tabulce 13. V oblasti vyšších retenčních časů nebyly objeveny žádné intenzivní ionty.



Obrázek 48: Struktura 8-vinylepikatechinu

Tabulka 13: Píky vzorku EP3 s malou retencí a příslušné ionty

čas píku [min]	ionty přítomné ve spektru průměrovaném přes chromatografický pík [m/z]			
2,82	489,1297	313,0374	265,0590	221,0320
	199,1091	115,0868	69,0963	
3,24	441,1536	353,1079	317,0962	
4,72	243,1193	(také v čase 2,65)		
6,13	136,0827			
6,21	277,0861			
6,30	215,1206			

Navíc bylo v případě této analýzy zaznamenáno několik iontů, které eluovaly v několika retenčních časech. Mohou to být buď polohové izomery jedné sloučeniny nebo produkty rozpadu různých struktur se společnou základní jednotkou. Hodnoty m/z těchto iontů uvádí tabulka 14. Vzorek EP3 byl následně analyzován UPLC ještě po dalších cca 7 měsících (stáří vzorku 350 dnů; po SPE extrakci). V roztoku ale nebyly přítomny žádné píky absorbující ve viditelné oblasti spektra.

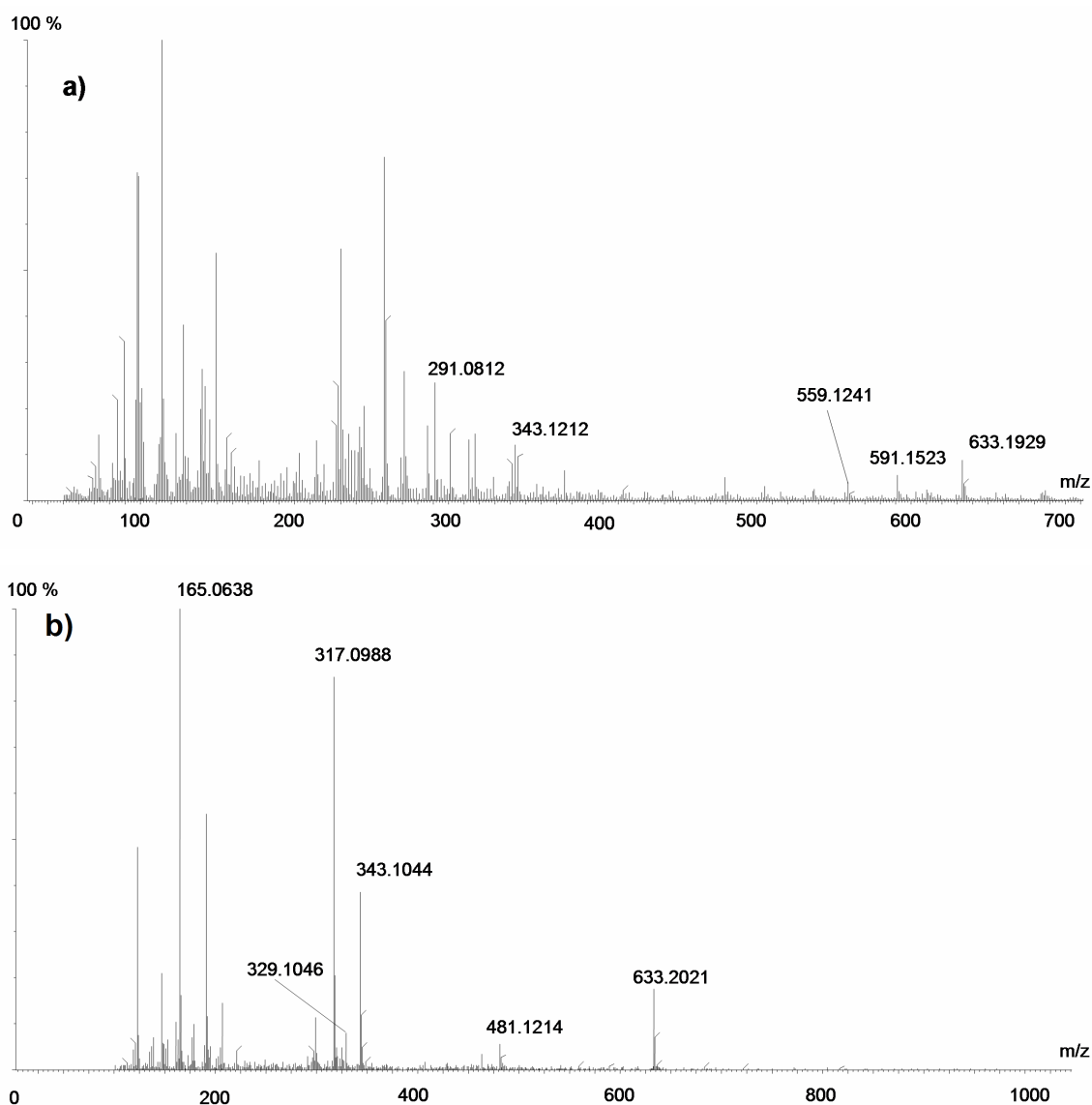
Tabulka 14: Ionty vyskytující se opakovaně v chromatogramu vzorku EP3

213,1081	257,1368	269,1359	313,1620
319,1063	327,1765	357,1888	419,1535

Stejný vzorek byl připraven ještě jednou (EP5) a po 19 dnech analyzován UPLC-DAD-ESI-Q-TOF. V tomto roztoku byly ve stopové koncentraci nalezeny v čase 3,83 min ionty s m/z 271 (pelargonidin) a m/z 297 (vinylpelargonidinem). V čase 2,77 min byl pak nalezen epikatechin ($m/z = 291$). Ve chromatogramu pořízeném DAD při vlnové délce $\lambda = 500$ nm je patrný i další pík s kratším retenčním časem oproti Pg (3,42 min). Mezi ionty přítomnými ve spektru průměrovaném přes tento pík byla nejvyšší odezva zjištěna pro ion 317,09, který by mohl odpovídat vinylepikatechinu.

Po 26 dnech od založení pokusu byla provedena analýza vzorku EP5 v přímém nástřiku do ESI-Q-TOF (MS spektrum na obrázku 49). Byla zjištěna řada iontů, v oblasti hmot nad 400 Da byly vybrány ionty s vyšší intenzitou a ty fragmentovány (viz tabulka 15). Hlavní pozornost byla věnována dvěma iontům. Ion o $m/z = 633$ odpovídá dimeru vinylepikatechinu (viz obrázek 47) nebo odpovídající izomerní struktuře. Návrh této struktury podporují i kolizní spektra, kde je hlavním produktem štěpení ion vinylepikatechinu m/z 317, dále je pozorován produkt jednoduchého a v malé míře i dvojitého RDA štěpení z rodičovského iontu (fragmenty m/z 481 a 329) a štěpení epikatechinové jednotky (ion m/z 343). Ve spektru lze také pozorovat RDA štěpení vinylepikatechinu za vzniku iontu m/z 165. Kolizní spektrum iontu m/z 633 je zobrazeno na obrázku 49. Tato data jsou v souladu s daty popisovanými pro tuto sloučeninu v literatuře^[125].

Dalším významným iontem je m/z 559. V tomto případě by mohlo jít o přímý adukt pelargonidinu a epikatechinu (odchylka změřené přesné hmoty od vypočtené činí 3,6 ppm) a ve spektru je pozorovatelný produkt RDA štěpení na epikatechinu o hmotě $m/z = 407$ (odchylka činí 7,6 ppm). Proti této teorii však stojí absence nálezu iontu 271 ($[M - 290]^+$). Ztráta (neutrální) epikatechinové jednotky je typická pro oligomery flavonoidů, které jej obsahují. Ani případně vznikající ion epikatechinu ($m/z = 291$) nebyl ve fragmentačním spektru iontu m/z 559 pozorován.



Obrázek 49: a) MS spektrum vzorku EP5 po 26 dnech, b) kolizní spektrum iontu m/z 633

Tabulka 15: Ionty spektra vzorku EP5 z přímého nástřiku

fragmentovaný ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]			
479,0941	345,0075	327,0072	317,0152	301,9839
	251,0036	206,9711	194,9809	176,9684
	160,9947	98,6177		
505,0958	441,0715	415,0099	370,9996	342,9964
	312,9835	285,0085	266,9657	176,9934
537,1400	505,0821	415,0090	371,0010	343,0100
	312,9842	281,0545	266,9807	147,0612
	73,0485			
559,1260	541,1254	419,0597	407,0798	389,0576
	379,0890	361,0705	333,0636	311,0552
	267,0362	123,0594		

Pro shrnutí chemie epikatechinu a pelargonidinu v modelovém roztoku obohaceném acetaldehydem tedy dle zjištěných výsledků platí: reakce za tvorby můstkového i přímého aduktu probíhá, avšak pouze ve vodném prostředí s mírným nadbytkem acetaldehydu. Jsou-li použity agresivnější podmínky (zejména silný nadbytek acetaldehydu), dochází k rozkladu reaktantů (především pelargonidinu) a odbarvení roztoku. Navíc bylo prokázáno, že s časem můstkového aduktu ve směsi ubývá, což zřejmě souvisí s rozkladnými reakcemi ve směsi, eventuálně s tvorbou vyšších oligomerních pigmentů, které však nebyly v odpovídajících MS spektrech nalezeny.

4.3 Studium reakce pelargonidinu s acetaldehydem:

HPLC/MS analýza vzorku AL1 (stáří vzorku 83 dní) neprokázala přítomnost očekávaného pyranopelargonidinového iontu o $m/z = 295$. Ve směsi nebyl nalezen ani ion pelargonidinu ($m/z 271$). Byly však nalezeny ionty odpovídající vinylpelargonidinu ($m/z 297$). V tabulce 16 jsou označeny tučně.

Tabulka 16: Ionty vzorku AL1 s odpovídajícími retenčními časy po analýze 83 dní starého vzorku

retenční čas píku [min]	pozorované hmoty [m/z]
9,43	255,0728 155,0360
10,30	223,1575
43,13	451,0583
44,09	227,1227
45,39	433,0582
46,52	587,0794 287,2254 227,1242
47,74	289,2501
48,35	291,2673
52,19	609,3428 401,3074
52,28	537,3051
52,45	493,3180
54,28	923,6143 763,6063 531,3212 393,2983 259,189
55,41	425,2864 (i v čase 56,36)
58,45	601,4656 439,3376
61,68	937,8646 702,2152 643,5902 625,5767 445,1220 429,0894 371,1027 355,0931 297,0871 281,0530 223,0670
63,32	407,3411 312,3157

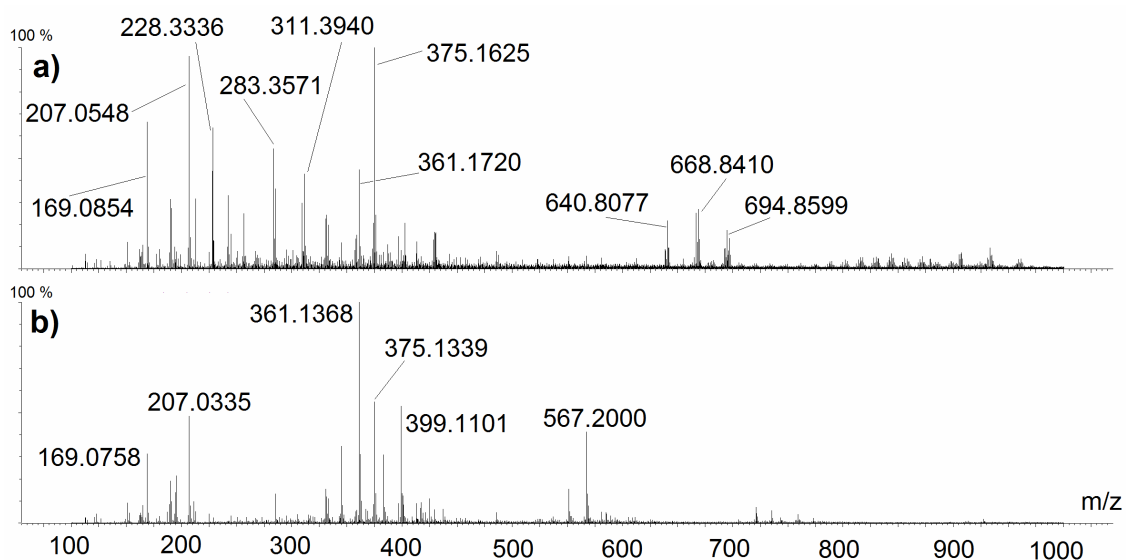
64,19	911,1508	776,2341	741,1966	725,1697
	503,1086	445,1222	429,0901	371,1026
	355,0738	297,0874	281,0536	223,0667

Po 91 dnech od založení pokusu byla znovu provedena analýza vzorku AL1 pomocí HPLC. Opět nebyl zaznamenán výskyt iontu 295. Tabulka 17 shrnuje nalezené hmoty

Tabulka 17: Významné píky v analýze vzorku AL1 po 91 dnech

retenční čas píku [min]	pozorované hmoty [m/z]
11,41	155,0363
42,46	242,2676
53,26	223,0709 207,0485

Sediment a supernatant roztoku AL1 byly po 125 dnech od založení pokusu odděleně zkoumány rovněž pomocí MALDI-Q-TOF. Naměřená MS spektra se značně lišila, zejména v oblasti hmot nad 500 Da, jak ukazuje obrázek 50.



Obrázek 50: MS spektrum a) supernatantu a b) sedimentu vzorku AL1

Po dalších sedmi měsících byl vzorek AL1 znovu prověřen analýzou MALDI-Q-TOF. V tomto vzorku byl nalezen ion m/z 567,1518. V tomto případě by mohlo jít o adukt dvou pelargonidinových jednotek přes acetaldehydový můstek. Diference oproti teoretické hodnotě m/z je však poněkud vyšší (40 ppm). Ion m/z 567 poskytl v kolizním

spektru následující fragmenty: 553,1439 ($[M - 14]^+$), 525,1282 ($[M - 42]^+$), 399,0813 ($[M - 168]^+$), 383,0933 ($[M - 184]^+$), 361,1173 ($[M - 206]^+$), 355,0801 ($[M - 212]^+$), 207,0519 ($[M - 360]^+$), 191,0552 ($[M - 376]^+$) a 112,6501 ($[M - 455]^+$). Jak je vidět, neobsahuje toto spektrum ion m/z 271 ani ion m/z 297 odpovídající pelargonidinu resp. vinylpelargonidinu, takže tato struktura pro daný ion zřejmě nevyhovuje.

Protože nebyl získán žádaný produkt, byl připraven methanolický roztok s vyšším podílem cyklizačního činidla (AL2, viz kapitola 3.2.3). Jeden den po založení byl proveden přímý nástřik vzorku do ESI-Q-TOF. Vzorek poskytl totožné spektrum jako dříve diskutovaný vzorek EP3 analyzovaný ve stejný den (viz kapitola 4.2). Podobné výsledky poskytla také HPLC/MS analýza po dalších třech dnech.

Získaná spektra naznačují, že v případě směsi pelargonidinu a acetaldehydu nedochází v modelovém roztoku ke vzniku pyranopelargonidinu. V reakční směsi zřejmě dochází k rapidnímu úbytku pelargonidinu vlivem zvýšené koncentrace acetaldehydu. Toto bylo potvrzeno i sledováním barevné změny roztoku, kdy roztok AL2 již po týdnu úplně ztratil zabarvení způsobené pelargonidinem (jako jediný z roztoků). V literatuře je popsáno, že při reakcích s jinými anthokyaniny k takto výraznému odbarvení nedochází. Naopak dochází ke změně odstínu popř. sytosti barvy. Rozpor s výsledky studií na téma vitisinu B je možno přičíst buď jiné substituci na kruhu B, a nebo zejména absence cukerné jednotky, která zřejmě zvyšuje stabilitu substrátu vůči degradaci, takže cyklizační reakce má „čas proběhnout“.

4.4 Studium reakce pelargonidinu s pyruvátem:

V souladu s pracemi na téma syntézy vitisinu A byl připraven modelový roztok za účelem přípravy 5-karboxypyranopelargonidinu. Reakčním činidlem byl pyruvát sodný. Výpočtem bylo zjištěno, že záměna kyseliny za sodnou sůl neovlivní příliš pH směsi vzhledem k použitému reakčnímu prostředí (roztok kyseliny mravenčí ve vodě o $pH = 3$), proto byl vzorek připraven shodným postupem jako vodné vzorky ostatních cyklizačních činidel (detailně popsáno v kapitole 3.2.4).

Po téměř tříměsíčním zrání roztoku byla provedena SPE a o dva týdny později byl vzorek proměřen s využitím HPLC. V roztoku bylo nalezeno zbytkové množství pelargonidinu ($t_R = 41,77$ min – zvýrazněný ion). Ion žádaného produktu (m/z 339) nebyl detekován. Souhrn nalezených iontů je prezentován v tabulce 18. Zajímavý je zejména ion 155 (v tabulce zvýrazněn), který by jako i v případě ostatních reakčních

směsí mohl poukazovat na rozklad pelargonidinu za vzniku floroglucinaldehydu. Odchylka naměřené přesné hmoty od teoretické činí $\delta = 9,7$ ppm. Kromě toho byly opět nalezeny hmoty, přítomné ve více elučních časech. Jedná se o ionty 223,1587 a 571,0847.

Tabulka 18: hmoty přítomné v HPLC analýze vzorku PY1, zvýrazněné ionty byly komentovány výše

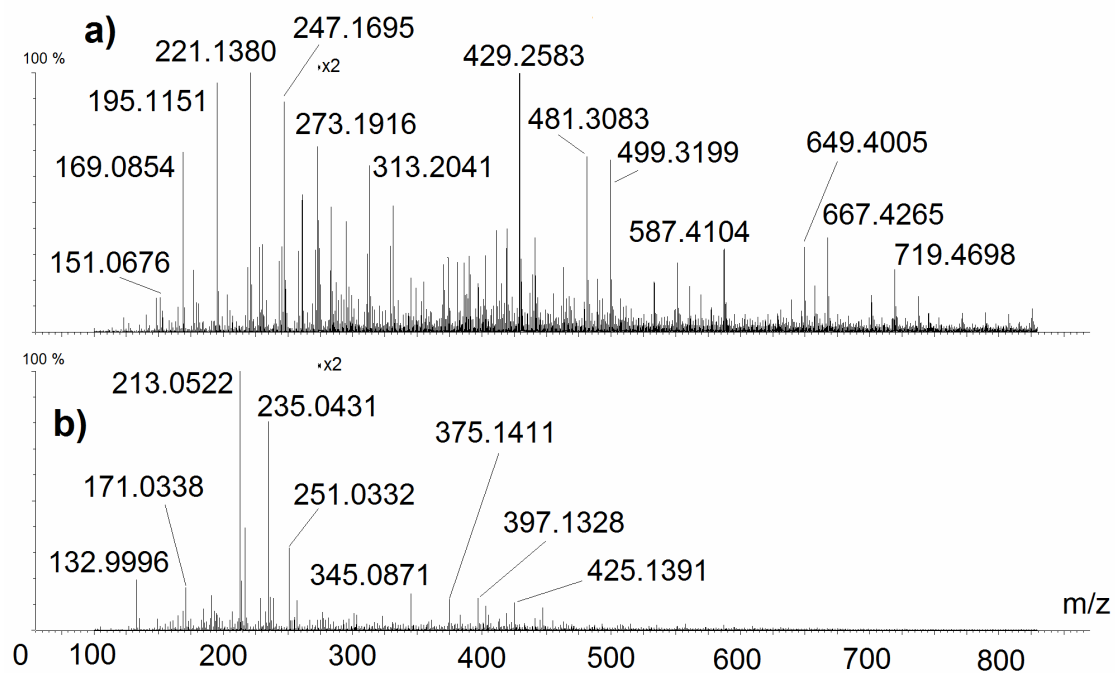
retenční čas [min]	ionty získané průměrováním píku [m/z]
14,82	468,0125 329,9842 237,9612 139,0460
	121,0301
19,66	341,0690
20,77	155,0359
21,71	289,0414
25,90	314,0136 257,0437 121,0328
36,51	467,0544 329,0355 121,0331
40,32	437,2057 432,2753 415,2437
41,26	571,0803
41,95	459,2672
42,02	476,3102
42,11	223,1627
41,70	573,1038 391,0848 271,0654
43,65	564,3570 255,0612
44,07	827,1214 297,0767
46,11	451,0666

Po 111 dnech od založení pokusu bylo provedeno oddělení supernatantu a sedimentu u vzorku PY1 a následně byl analyzován samotný sediment tohoto vzorku. Očekávaný produkt 5-karboxypyranopelargonidin ani výchozí látka (pelargonidin) nebyly nalezeny.

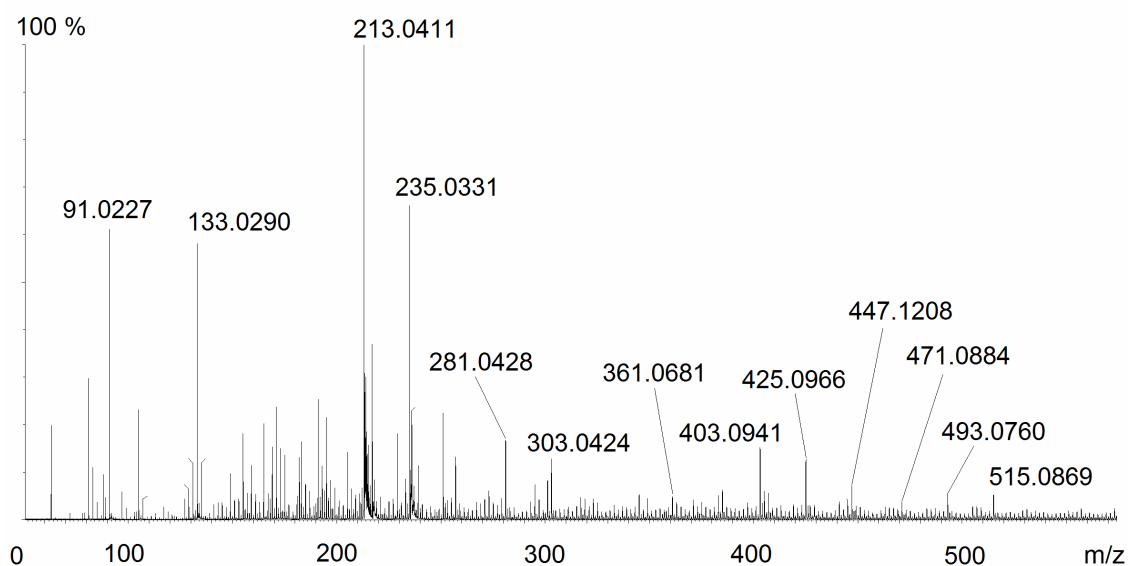
Sediment i supernatant vzorku PY1 byly po dalších dvou týdnech podrobeny také analýze MALDI-Q-TOF. Spektra obou se celkem výrazně lišila jak v oblasti nižších hmot ($m/z < 300$), tak v oblasti vyšších hmot, kde spektrum supernatantu neobsahovalo téměř žádné píky, zatímco spektrum sedimentu bylo na výskyt hmot $m/z > 400$ Da velmi bohaté. Ani zde nebyl ani v jednom případě nalezen ion očekávaného produktu. Spektra supernatantu i sedimentu jsou znázorněna na obrázku 51.

Po dalších 6 měsících (celkem po 315 dnech od založení) byla provedena další kontrola vzorku pomocí MALDI. Ani zde nebyl nalezen ion očekávaného produktu. Základním píkem byl ion m/z 213,0411, dalšími významnými ionty byly ionty m/z 235; 251; 303 a 403. Záznam MS spektra této analýzy vidíme na obrázku 52. Tabulka 19

popisuje fragmentaci iontů s vysokou intenzitou nalezených v uvedeném MALDI-MS spektru.



Obrázek 51: MS spektra **a)** sedimentu a **b)** supernatantu vzorku PY1 po 125 dnech (u vyšších hmot je počínaje značkou „x2“ v obou spektrech uměle zdvojnásobena relativní intenzita iontů)



Obrázek 52: MALDI-MS spektrum vzorku PY1 po 315 dnech

Tabulka 19: MALDI analýza 10 měsíců starého roztoku PY1

fragmentovaný ion [m/z]	fragменты [m/z]			
403,0941	235,0444	213,0573	191,0552	133,0375
425,0966	409,0314	383,0788	235,0387	217,0360
	213,0627	191,0552	171,0542	63,0357
447,0973	429,0617	405,0560	383,0788	363,0448
	361,0681	297,0298	279,0138	257,0259
	239,0225	235,0444	217,0360	191,0552
	133,0375			
493,0678	477,0206	447,0739	425,0890	405,0634
	381,0916	361,0120	303,0359	251,0224
	235,0444	213,0627		
515,0869	499,0208	447,0661	405,0634	383,0716
	235,0444	213,0627	133,0375	

Vzhledem k tomu, že vodný roztok pelargonidinu a pyruvátu nevyprodukoval v rozmezí cca 5 měsíců žádaný produkt, bylo přistoupeno k použití odlišných podmínek a připraven methanolický roztok s desetinásobným hmotnostním přebytkem pyruvátu sodného oproti pelargonidinu (PY2).

Tento roztok byl již druhý den po založení analyzován přímým nástřikem do systému ESI-Q-TOF. Vzhledem k tomu, že nebyl nalezen žádaný ion, byla provedena studie fragmentace iontů vyskytujících se v odpovídajícím MALDI-MS spektru (tabulka 20). V roztoku byl přítomen nespotřebovaný pelargonidin, takže jeho reaktivita v tomto prostředí není tak vysoká jako ve směsích obsahujících acetaldehyd, ve kterých už druhý den nebyl ion pelargonidinu detekován.

Tabulka 20: Ionty a jejich fragmenty nalezené ve vzorku PY2 přímým nástřikem

fragmentovaný ion [m/z]	pozorované fragmenty [m/z]			
149,0284	121,0403	993,0455	65,0508	
473,3220	267,1264	200,0674	131,9994	69,0705
556,8408	262,9174	244,8992	164,9341	142,9315
571,1713	539,1161	511,1620	473,3132	200,0634
	121,0282			
578,8304	382,8655	284,8944	266,9108	164,9480

Vzhledem k tomu, že reakční směs neposkytla žádaný ion v MS spektru, byl vytvořen nový modelový roztok v methanolickém prostředí, nyní již přímo s nadbytkem kyseliny pyrohroznové (použité místo sodné soli) (detaily v kapitole 3.2.4). Tento roztok byl po cca 20 dnech podroben UPLC analýze. Ani zde ovšem nebyl nalezen 5-karboxypyranopelargonidin. Bylo však objeveno několik separovaných látek

absorbujících ve viditelné oblasti spektra a byly získány informace o iontech, které jsou v nich obsaženy. Souhrn podává tabulka 21.

Tabulka 21: Absorbující látky separované a detekované při UPLC/MS analýze vzorku PY3

retenční čas píku [min]	ionty přítomné v píku [m/z]
3,88	745,1202 458,2483 449,2381 292,1041
5,00	187,0651 155,0408
5,10	309,0675 287,0781
5,58	179,0379
5,76	417,0827
6,51	599,1569 499,0777 327,0478 311,0739
6,85	323,0753
10,14	321,0590 197,0505

Po dalších 20 a 27 dnech byl roztok znovu proměřen pomocí UPLC/MS a přímým nástřikem. Ve vzorcích získaných oběma odběry nebyl nalezen očekávaný ion m/z 339. Tento výsledek ukazuje, že pelargonidin (aglykon) se chová výrazně odlišně od glykosylovaných anthokyaninů studovaných v řadě původních prací.

V případě zamýšlené kondenzace pelargonidinu a kyseliny pyrohroznové nebylo dosaženo plánovaného průběhu reakce. Bylo zjištěno, že cyklizace neprobíhá ani při použití sodné soli ani v případě, že použijeme přímo kyselinu pyrohroznovou. Methanolický roztok sice po 20 dnech vykazoval jistou variabilitu ve složení reprezentovanou množstvím absorbujících sloučenin, detekovaných pomocí HPLC-DAD, již po dalších 20 dnech však tyto píky nebylo možné za shodných podmínek detekovat, jde tedy patrně o poměrně labilní produkty vstupující do následných reakcí. Rozklad pelargonidinu tedy zřejmě probíhá i zde, pouze jiným způsobem a výrazně pomaleji než v případě acetaldehydu.

5. Závěr:

Pelargonidin reaguje s acetonem v jeho silném nadbyku v methanolickém prostředí za kvantitativní přeměny na 5-methylpyranopelargonidin. Tento pyranoderivát byl izolován semipreparativní HPLC a v současné době jsou měřena NMR spektra této látky a zkoumány mechanismy in-vitro biologické přeměny této sloučeniny sloučeniny lidskými jaterními buňkami na spolupracujícím pracovišti Katedry molekulární biologie a genetiky, PřF UP.

Bylo také zjištěno, že ve vodném prostředí reaguje pelargonidin se směsí epikatechinu a acetaldehydu za tvorby můstkového i přímého aduktu. Reakce však probíhá pouze v malém výtěžku. Kromě toho se tyto vzniklé sloučeniny postupem času dále buď rozpadají a nebo kondenzují za vzniku složitějších struktur. Ty však v této práci nebyly identifikovány.

Při studiu přímé reakce pelargonidinu s acetaldehydem bylo zjištěno, že nadbytek acetaldehydu způsobuje rychlý rozklad pelargonidinu v reakční směsi a nedochází ke vzniku očekávaného pyranoderivátu.

Ani v případě posledního zkoumaného kondenzačního činidla – kyseliny pyrohroznové – nedošlo k cyklizační reakci, při níž by vznikal žádaný derivát pyranopelargonidinu. Kyselina pyrohroznová nemá zdaleka takové rozkladné účinky na pelargonidin jako acetaldehyd.

V průběhu experimentů bylo použito dvou iontových zdrojů a dvou hmotnostních analyzátorů v řadě různých experimentálních uspořádání (ESI-IT, ESI-QqTOF, MALDI-QqTOF, HPLC/MS a UPLC/MS). Tyto metodiky poskytly celou řadu zajímavých informací o průběhu reakcí souvisejících s tvorbou očekávaných fragmentů. Vedle toho byla získána řada informací o sloučeninách, které vznikají a/nebo jsou přítomny v příslušných reakčních směsích. Jejich detailní strukturu se v řadě případů nepodařilo osvětlit pouze na základě MS, MS/MS, případně MSⁿ spekter. Do budoucna bude nutné provést izolaci vybraných látek a jejich identitu dále potvrdit NMR analýzou.

6. Literatura:

- 1 – Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P.: *Biochem. J.* **38**, 224 (1944).
- 2 – Beyerinck M. W.: *Z. Phys. Chem* **3**, 110 (1889).
- 3 – Kuhn R., Winterstein A., Lederer E.: *Z. Phys. Chem.* **197**, 141 (1931).
- 4 – Cvet M.: *Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci. Biol. Sec.* **14**, 20 (1903).
- 5 – Churáček J., Jandera P.: *Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie*. SNTL, Praha 1981.
- 6 – McMaster M. C.: *HPLC, a practical user's guide*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken 2007.
- 7 – Wheals B. B., Vaughan C. G., Whitehouse M. J.: *J. Chromatogr. A* **106**, 109 (1975).
- 8 – Kohler M., Christen P.: *Trends Anal. Chem.* **16**, 475 (1997).
- 9 – Van Urk-Schoen A. M., Huber J. F. K.: *Anal. Chim. Acta* **52**, 519 (1970).
- 10 – de Hoffmann E., Stroobant V.: *Mass spectrometry, Principles and applications*. John Wiley & Sons, Chippingham 2007.
- 11 – Houk R. S., Fassel V. A., Flesch G. D., Svec H. J., Gray A. L., Taylor C. E.: *Anal. Chem.* **52**, 2283 (1980).
- 12 – Hunt D. F.: *Int. J. Mass Spectrom.* **45**, 111 (1982).
- 13 – Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151 (1988).
- 14 – Karas M., Hillenkamp F.: *Anal. Chem.* **60**, 2299 (1988).
- 15 – Kang M.-J., Pyun J.C., Lee J.C., Choi Y.-J., Park J.-H., Park J.-G., Lee J.-G., Choi H.-J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 3166 (2005).
- 16 – Cole R. B.: *Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications*. John Wiley & Sons Inc., New York 1997.
- 17 – Swingler D. L.: *Vacuum* **18**, 669 (1968).
- 18 – Dawson P. H., Lambert C.: *Int. J. Mass Spectrom.* **16**, 269 (1975).
- 19 – Comisarow M. B., Marshall A. G.: *Chem. Phys. Lett.* **25**, 282 (1974).
- 20 – Makarov A.: *Anal. Chem.* **72**, 1156 (2000).
- 21 – Bergmann T., Martin T. P., Schaber H.: *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 792 (1989).
- 22 – Yamashita M., Fenn J.: *J. Phys. Chem.* **88**, 4451 (1984).
- 23 – C. Santos-Buelga, G. Williamson (editors): *Methods in Polyphenol Analysis*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2003.

- 24 – Valls J., Millan S., Marti M. P., Borrás E., Arola L.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 7143 (2009).
- 25 – Niessen W. M. A.: *Liquid chromatography: Mass spectrometry*. CRC Press, Boca Raton 2006.
- 26 – McCallum J. L., Yang R., Young J. C., Strommer J. N., Tsao R.: *J. Chromatogr. A* **1148**, 38 (2007).
- 27 – Tian Q., Giusti M. M., Stoner G. D., Schwartz S. J.: *J. Chromatogr. A* **1091**, 72 (2005).
- 28 – Myjavcová R., Marhol P., Křen V., Šimánek V., Ulrichová J., Palíková I., Papoušková B., Lemr K., Bednář P.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 7932 (2010).
- 29 – Bloor S. J.: *Phytochemistry* **58**, 923 (2001).
- 30 – Macz-Pop G. A., Rivas-Gonzalo J. C., Pérez-Alonso J. J., González-Paramás A. M.: *Food Chem.* **94**, 448 (2006).
- 31 – Konczak I., Zhang W.: *J. Biomed. Biotechnol.* **5**, 239 (2004).
- 32 – Rein M. J., Ollilainen V., Vahermo M., Yli-Kauhaluoma J., Heinonen M.: *Eur. Food Res. Technol.* **220**, 239 (2005).
- 33 – Boulton, R.: *Am. J. Enol. Viticult.* **52**, 67 (2001).
- 34 – Hedin P. A., Phillips V. A.: *J. Agric. Food Chem.* **40**, 607 (1992).
- 35 – Greenaway W., Whatley F. R.: *J. Chromatogr. A* **519**, 145 (1990).
- 36 – Füzfai Zs., Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr. A* **1149**, 88 (2007).
- 37 – Baj A., Bombardelli E., Gabetta B., Martinelli E.M.: *J. Chromatogr. A* **279**, 365 (1983).
- 38 – Pale E., Kouda-Bonafos M., Nacro M., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastre R.: *Phytochemistry* **64**, 1395 (2003).
- 39 – Keppler K. Humpf H.-U.: *Bioorgan. Med. Chem.* **13**, 5195 (2005).
- 40 – Van Buren J. P., Bertino J. J., Einset J., Remaily G. W., Robinson W. B.: *Am. J. Enol. Vitic.* **21**, 117 (1970).
- 41 – Fong R. A., Kepner R. E., Webb A. D.: *Am. J. Enol. Vitic.* (1971) **22**, 150.
- 42 – Wulf L. W., Nagel C. W.: *Am. J. Enol. Vitic.* **29**, 42 (1978).
- 43 – Bakker J.: *Vitis* **25**, 203 (1986).
- 44 – Hebrero E., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C.: *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 227 (1988).
- 45 – Pati S., Liberatore M. T., Gambacorta G., Antonacci D., La Notte E.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 3864 (2009).

- 46 – Mertz C., Gancel A.-L., Gunata Z., Alter P., Dhuique-Mayer C., Vaillant F., Perez A. M., Ruales J., Brat P.: *J. Food Compos. Anal.* **22**, 381 (2009).
- 47 – de Villiers A., Kalili K. M., Malan M., Roodman J.: *LC GC Eur.* **23**, 466 (2010).
- 48 – Vergara C., Mardones C., Hermosín-Gutiérrez I., von Baer D.: *J. Chromatogr. A* (2010) **1217**, 5710.
- 49 – Mateus N., de Pascual-Teresa S., C.Rivas-Gonzalo J., Santos-Buelga C., de Freitas V.: *Food Chem.* **76**, 335 (2002).
- 50 – Fiorini M.: *J. Chromatogr. A* **692**, 213 (1995).
- 51 – Tsao R., Yang R.: *J. Chromatogr. A* **1018**, 29 (2003).
- 52 – Bridle P., García-Viguera C., Tomás-Barberan F. A.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **19**, 537 (1996).
- 53 – Bicard V., Fougerousse A., Brouillard R.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **22**, 541 (1999).
- 54 – da Costa C. T., Nelson B. C., Margolis S. A., Horton D.: *J. Chromatogr. A* **799**, 321 (1998).
- 55 – Bednář P., Tomassi A. V., Presutti C., Pavlíková M., Lemr K., Fanali S.: *Chromatographia* **58**, 283 (2003).
- 56 – Watanabe T., Yamamoto A., Nagai S., Terabe S.: *Anal. Sci.* **14**, 839 (1998).
- 57 – Mulinacci N., Romani A., Pinelli P., Gallori S., Giaccherini C., Vincieri F. F.: *Int. J. Pharm.* **216**, 23 (2001).
- 58 – Mauri P., Pietta P.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**, 61 (2000).
- 59 – Favretto D., Riccardo Flamini R.: *Am. J. Enol. Vitic.* **51**, 55 (2000).
- 60 – McDougall G., Martinussen I., Stewart D.: *J. Chromatogr. B* **871**, 362 (2008).
- 61 – Cooper H. J., Marshall A. G.: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5710 (2001).
- 62 – Gómez-Ariza J. L., García-Barrera T, Lorenzo F., *Anal. Chim. Acta* **570**, 101 (2006).
- 63 – Mazerolles G. , Preys S., Bouchut C., Meudec E., Fulcrand H., Souquet J. M., Cheynier V.: *Anal. Chim. Acta* **678**, 195 (2010).
- 64 – Hartmanová L., Ranc V., Papoušková B., Bednář P., Havlíček V., Lemr K.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 4223 (2010).
- 65 – Yu Z., Chen L. C., Suzuki H., Ariyada O., Erra-Balsells R., Nonami H., Hiraoka K.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 2304 (2009).
- 66 – Sugui J. A., Bonham C., Lo S.-C., Wood K. V., Nicholson R. L.: *Phytochemistry* **48**, 1063 (1998).

- 67 – Trappey II A., Bawadi H. A., Bansode R. R., Losso J. N.: Food Chem. **91**, 665 (2005).
- 68 – Reed J. D., Krueger C. G., Vestling M. M.: Phytochemistry **66**, 2248 (2005).
- 69 – Wang J., Kalt W., Sporns P.: J. Agric. Food Chem. **48**, 3330 (2000).
- 70 – Rauha J. P., Vuorela H., Kostianen R.: J. Mass Spectrom. **36**, 1269 (2001).
- 71 – Bednář P., Papoušková B., Müller L., Barták P., Stávek J., Pavloušek P., Lemr K.: J. Sep. Sci. **28**, 1291 (2005).
- 72 – Liang Z., Wu B., Fan P., Yang C., Duan W., Zheng X., Liu C., Li S.: Food Chem. **111**, 837 (2008).
- 73 – Benabdeljalil, C., Cheynier, V., Fulcrand, H., Hakiki, A., Mosaddak, M., & Moutounet, M.: Sci. Aliment. **20**, 203 (2000).
- 74 – Bakker J., Timberlake C. F.: J. Agric. Food Chem. **45**, 35 (1997).
- 75 – Fulcrand H., Benabdeljalil C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M.: Phytochemistry **47**, 1401 (1998).
- 76 – Asenstorfer R. E., Markides A. J., Iland P. G., Jones G. P.: Aust. J. Grape Wine Res. **9**, 40 (2003).
- 77 – Romero C., Bakker J.: J. Agric. Food Chem. **47**, 3130 (1999).
- 78 – Romero C., Bakker J.: J. Agric. Food Chem. **48**, 2135 (2000).
- 79 – Romero C., Bakker J.: Int. J. Food Sci. Technol. **35**, 129 (2000).
- 80 – Timberlake, C. F., Bridle, P.: *Flavylum salts resistant to sulphur dioxide*. Chem. Ind., London 1968.
- 81 – Morata A., Calderón F., González M. C., Gómez-Cordovés M.C., Suárez J. A.: Food Chem. **100**, 1144 (2007).
- 82 – Oliveira J., de Freitas V., Mateus N.: Tetrahedron Lett. **50**, 3933 (2009).
- 83 – Lu Y., Sun Y., Foo L. Y.: Tetrahedron Lett. **41**, 5975 (2000).
- 84 – Lu Y., Foo L. Y.: Tetrahedron Lett. **42**, 1371 (2001).
- 85 – He, J., Santos-Buelga C., Silva A. M. S., Mateus N., de Freitas V.: J. Agric. Food Chem. **54**, 9598 (2006).
- 86 – Oliveira J., Mateus N., de Freitas V.: Tetrahedron Lett. **52**, 1996 (2011).
- 87 – Lu Y., Foo L. Y.: Tetrahedron Lett. **43**, 715 (2002).
- 88 – Rentsch M., Quast P., Hillebrand S., Mehnert J., Winterhalter P.: Innov. Food Sci. Emerg. Technol. **8**, 333 (2007).
- 89 – Fulcrand H., Cameira-dos-Santos P.-J., Sarni-Manchado P., Cheynier V., Favre-Bonvin J.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 735 (1996).

- 90 – Hayasaka Y., Asenstorfer R. E.: *J. Agric. Food Chem.* **50**, 756 (2002).
- 91 – Schwarz M., Jerz G., Winterhalter P.: *Vitis* **42**, 105 (2003).
- 92 – Schwarz M., Hofmann G., Winterhalter P.: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 498 (2004).
- 93 – Schwarz M., Wabnitz T. C., Winterhalter P.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3682 (2003).
- 94 – Morata A., González C., Suárez-Lepe J. A., *International Journal of Food Microbiology* **116**, 144 (2007).
- 95 – Morata A., Gómez-Cordovés M. C., Calderón F., Suárez J. A.: *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 123 (2006).
- 96 – Mateus N., Oliveira J., Pissarra J., González-Paramás A. M., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C., Silva A. M. S., de Freitas V.: *Food Chem.* **97**, 689 (2006).
- 97 – Khalil A., Baltenweck-Guyot R., Ocampo-Torres R., Albrecht P.: *Phytochemistry Letters* **3**, 93 (2010).
- 98 – Brouillard R., Iacobucci G. A., Sweeny J. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7585 (1982).
- 99 – González-Manzano S., Dueñas M., Rivas-Gonzalo J. C., Escribano-Bailón M. T., Santos-Buelga C.: *Food Chem.* **114**, 649 (2009).
- 100 – Gómez-Míguez M., Gonzáles-Manzano S., Escribano-Bailón T., Heredia F. J., Santos-Buelga C.: *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5422 (2006).
- 101 – Bishop P. D., Nagel C. W.: *J. Agric. Food Chem.* **32**, 1022 (1984).
- 102 – Escribano-Bailón T., Dangles O., Brouillard R.: *Phytochemistry* **41**, 1583 (1996).
- 103 – Hrazdina G., Borzell A. J.: *Phytochemistry* **10**, 2211 (1971).
- 104 – Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M.: *Phytochemistry* **36**, 781 (1994).
- 105 – Remy S., Fulcrand H., Labarbe B., Cheynier V., Moutounet M.: *J Sci Food Agric* **80**, 745 (2000).
- 106 – Ribéreau-Gayon P: *The Anthocyanins of Grapes and Wines. Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press, New York, 1982.
- 107 – Salas E., Atanasova V., Poncet-Legrand C., Meudec E., Mazauric J. P., Cheynier V.: *Anal. Chim. Acta* **513**, 325 (2004).
- 108 – Remy-Tanneau S., Le Guernevé C., Meudec E., Cheynier V.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3592 (2003).
- 109 – Duenas M., Fulcrand H., Cheynier V.: *Anal. Chim. Acta* **563**, 15 (2006).
- 110 – Timberlake C. F., Bridle P.: *Am. J. Enol. Vitic.* **27**, 97 (1976).
- 111 – Roggero J. P., Coen S., Archier P., Rocheville-Divorne C.: *Connais. Vigne Vin* **21**, 163 (1987).

- 112 – Rivas-Gonzalo J. C., Bravo-Haro S., Santos-Buelga C.: *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1444 (1995).
- 113 – Vivar-Quintana A.M., Santos-Buelga C., Francia-Aricha E.: *Food Sci. Technol. Int.* **5**, 347 (1999).
- 114 – E. M. Francia-Aricha, M. T. Guerra, J. C. Rivas-Gonzalo, and C. Santos-Buelga: *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2262 (1997).
- 115 – Es-Safi N.E., Fulcrand H., Cheynier V., Moutounet M.: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2096 (1999).
- 116 – Sun B., Barradas T., Leandro C., Santos C., Spranger I.: *Food Chem.* **110**, 344 (2008).
- 117 – Sun B., Santos C. P. R., Leandro M. C., de Freitas V., Spranger M. I.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 2227 (2007).
- 118 – Es-Safi N.-E., Cheynier V., Moutounet M.: *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5571 (2002).
- 119 – Pissarra J., Lourenço S., González-Paramás A. M., Mateus N., Santos-Buelga C., de Freitas V.: *Anal. Chim. Acta* **513**, 215 (2004).
- 120 – Pissarra J., Lourenco S., González-Paramás A. M., Mateus N., Santos Buelga C., Silva A. M. S, de Freitas V.: *Food Chem.* **90**, 81 (2005).
- 121 – Es-Safi N.-E., Cheynier V., Moutounet M.: *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5586 (2002).
- 122 – Nave F., Teixeira N., Mateus N., de Freitas V.: *Food Chem.* **121**, 1129 (2010).
- 123 – Mateus N., Silva A. M. S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C, de Freitas V.: *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2110 (2002).
- 124 – Cruz L., Borges E., Silva A. M. S., Mateus N., de Freitas V.: *Lett. Org. Chem.* **5**, 530 (2008).
- 125 – Cruz L., Brás N. F, Teixeira N., Fernandes A., Mateus N., Ramos M. J., Rodríguez-Borges J., de Freitas V.: *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10341 (2009).
- 126 – Cruz L., Teixeira N., Silva A. M. S., Mateus N., Borges J., de Freitas V.: *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10980 (2008).
- 127 – Mateus N., Silva A M. S., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C., de Freitas V.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1919 (2003).
- 128 – Mateus N., Oliveira J., Santos-Buelga C., Silva A. M. S., de Freitas V.: *Tetrahedron Lett.* **45**, 3455 (2004).
- 129 – Oliveira J., Santos-Buelga C., Silva A. M. S., de Freitas V., Mateus N.: *Anal. Chim. Acta* **563**, 2 (2006).

- 130 – Lopes da Silva F., Escribano-Bailón M. T., Alonso J. J. P., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C.: *LWT – Food Sci. Technol.* **40**, 374 (2007).
- 131 – Cerezo A. B., Cuevas E., Winterhalter P., Garcia-Parrilla M. C., Troncoso A. M.: *Food Chem.* **123**, 574 (2010).
- 132 – Co H., Markakis P.: *Phytochemistry* **5**, 755 (1966).
- 133 – Otsuki T., Matsufuji H., Takeda M., Toyoda M., Goda Y.: *Phytochemistry* **60**, 79 (2002).
- 134 – Ishikura, N., Hayashi, K.: *Bot. Mag. Tokyo* **75**, 28 (1962).
- 135 – Krishnamurty H. G., Krishnamoorthy V., Seshard T. R.: *Phytochemistry* **2**, 47 (1963).
- 136 – Lopes-da-Silva F., de Pascual-Teresa S., Rivas-Gonzalo J., Santos-Buelga C.: *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 248 (2002).
- 137 – Fossen T., Andersen O. M.: *Phytochemistry* **62**, 1217 (2003).
- 138 – Andersen O. M., Fossen T., Torskangerpoll K., Fossen A., Hauge U.: *Phytochemistry* **65**, 405 (2004).
- 139 – Rein M. J., Ollilainen V., Vahermo M., Yli-Kauhaluoma J., Heinonen M.: *Eur. Food Res. Technol.* **220**, 239 (2005).
- 140 – Clevenger S.: *Can. J. Biochem.* **42**, 154 (1964).
- 141 – Jurd L., Harborne J. B.: *Phytochemistry* **7**, 1209 (1968).
- 142 – Tatsuzawa F., Saito N., Murata N., Shinoda K., Shigihara A., Honda T.: *Phytochemistry* **62**, 1239 (2003).
- 143 – Fossen T., Rayyan S., Andersen O. M.: *Phytochemistry* **65**, 1421 (2004).
- 144 – Ma Y. L., Li Q. M., Van den Heuvel H., Claeys M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1357 (1997).
- 145 – Zhang Z., Kou X., Fugal K., McLaughlin J.: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 688 (2004).
- 146 – Sporns P., Wang J.: *Food Res. Int.* **31**, 181 (1998).
- 147 – Kiehne A., Engelhardt U. H.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **202**, 48 (1996).
- 148 – Lin Y. Y., Ng K. J., Yang S.: *J. Chromatogr.* **629**, 389 (1993).
- 149 – Wolfender J. L., Maillard M., Marston A., Hostettmann K.: *Phytochem. Anal.* **3**, 193 (1992).
- 150 – Giusti M. M., Rodríguez-Saona L. E., Griffin D., Wrolstad R. E.: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4657 (1999).
- 151 – Cuyckens F., Claeys M.: *J. Mass Spectrom.* **39**, 1 (2004).

- 152 – Oliveira M. C., Esperanca P., Ferreira M. A. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 1525 (2001).
- 153 – de Souza L. M., Cipriani T. R., Iacomini M., Gorin P. A. J., Sasaki G. L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 59 (2008).
- 154 – Benavides A., Montoro P., Bassarello C., Piacente S., Pizza C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 639 (2006).
- 155 – Friedrich W., Eberhardt A., Galensa R.: *Eur. Food Res. Technol.* **211**, 56 (2000).
- 156 – Porter L. J.: *The flavonoids: advances in research since 1980*. Chapman and Hall, London 1988.

7. Použité zkratky:

angl. - anglicky

APCI – atmospheric pressure chemical ionisation (chemická ionizace za atmosférického tlaku)

API – atmospheric pressure ionisation (ionizace za atmosférického tlaku)

APPI – atmospheric pressure photoionisation (fotoionizace za atmosférického tlaku)

CE – capillary electrophoresis (kapilární elektroforéza)

CI – chemical ionisation (chemická ionizace)

Da – Dalton (jednotka molekulové hmotnosti)

DAD – diode array detector (detektor diodového pole)

DESI – desorption electrospray ionisation (desorpční ionizace elektrosprejem)

DHB – kyselina 2,5-dihydroxybenzoová

DT - dithranol

EI – electron ionisation (ionizace elektronem)

ESI – electrospray ionisation (ionizace elektrosprejem)

FT – Fourier transformation (Fourierova transformace)

GPC – gel permeation chromatography (gelová permeační chromatografie)

HMF – 5-hydroxymethylfurfural

HPLC – high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

ICR – ion cyclotron resonance (iontová cyklotronová rezonance)

IEC – ion-exchange chromatography (iontově výměnná chromatografie)

IPC – ion-pair chromatography (ion-párovací chromatografie)

IT – ion trap (iontová past)

MALDI – matrix assisted laser desorption ionisation (laserová desorpční ionizace za účasti matrice)

MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie

MS – mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)

NCE – normalized collision energy (normalizovaná kolizní energie)

NMR – nukleární magnetická rezonance

NP – normal phase (normální fáze)

PDA – photodiode array (detektor diodového pole)

PESI – probe electrospray ionisation (sondová ionizace elektrosprejem)
PTFE - polytetrafluoethylen
RDA – retro-Diels-Alderovo štěpení
RP – reverse phase (obrácené fáze)
rpm – rotations per minute (otáčky za minutu)
SDBS – sodium dodecylbenzensulphonate (dodecylbenzensulfonát sodný)
SDS – sodium dodecylsulphate (dodecylsulfát sodný)
TFA – trifluoroacetic acid (kyselina trifluoroctová)
THAP – 2',4',6'-trihydroxyacetofenon
TIC – total ion current (celkový iontový proud)
TOF – time of flight (detektor doby letu)
XIC – extracted ion current (extrahovaný iontový proud)