

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Analýza lignolů pomocí hmotnostní spektrometrie**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: Bronislav Ondrušek

Studijní obor: Chemie

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.

2021 Olomouc

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Bronislav Ondrušek
Název práce:	Analýza lignolů pomocí hmotnostní spektrometrie
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2021
Anotace:	Cílem této bakalářské práce byla optimalizace parametrů hmotnostního spektrometru pro analýzu prekurzorových iontů následujících monolignolů: p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol, které byly po separaci analyzovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s využitím průtokové injekční analýzy. V získaných spektrech byly identifikovány fragmentační produkty a hledány společné trendy a rozdíly ve fragmentačních procesech jednotlivých monolignolů.
Klíčová slova:	fragmentace, hmotnostní spektrometrie, koniferylalkohol, monolignoly, p-kumarylalkohol, průtoková injekční analýza, sinapylalkohol, tandemová hmotnostní spektrometrie
Počet stran:	62
Počet příloh:	3
Jazyk:	Český

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Bronislav Ondrušek

Title: Analysis of lignols by mass spectrometry

Type of thesis: bachelor's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.

The year of submission: 2021

Annotation: The aim of this bachelor thesis was optimization of parameters of a mass spectrometer for the analysis of precursor ions of following monolignols: p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol and sinapyl alcohol, which were analyzed after separation by tandem mass spectrometry utilizing flow-injection analysis. Fragmentation products were identified in measured MS/MS spectra and common trends and differences in the fragmentation processes of individual monolignols were studied.

Keywords: coniferyl alcohol, flow-injection analysis, fragmentation, mass spectrometry, monolignols, p-coumaryl alcohol, sinapyl alcohol, tandem mass spectrometry

Number of pages: 62

Number of appendices: 3

Language: Czech

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 7. 8. 2021

.....

Bronislav Ondrušek

Velmi rád bych touto cestou poděkoval mému vedoucímu své práce panu RNDr. Ondřeji Kurkovi, Ph.D. za odborný přístup, čas, který mi věnoval a cenné připomínky při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a trpělivost.

## Obsah

Seznam zkratek .....	8
1 Úvod .....	10
2 Teoretická část.....	11
2.1 Monolignoly.....	11
2.1.1 Biosyntéza monolignolů.....	11
2.1.2 Syntetická příprava.....	13
2.2 Vlastnosti a využití monolignolů .....	14
2.3 Lignany .....	16
2.4 Lignin .....	17
2.4.1 Metody detekce .....	19
2.4.2 Metody depolymerace .....	20
2.4.3 Metody analýzy .....	20
2.5 Hmotnostní spektrometrie.....	21
2.5.1 Instrumentace .....	22
2.5.2 Iontový zdroj .....	22
2.5.3 Hmotnostní analyzátor .....	25
2.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS).....	29
2.6.1 Iontová aktivace (fragmentační mechanismy) .....	29
2.6.2 Trojitý kvadrupól (QqQ) .....	32
2.6.3 Kvadrupól – analyzátor doby letu (Q-TOF).....	33
3 Experimentální část .....	34
3.1 Chemikálie .....	34
3.2 Instrumentální vybavení.....	34
3.3 Příprava vzorků .....	34
3.4 Podmínky hmotnostně-spektrometrických měření .....	34
4 Diskuze a výsledky.....	36

4.1	Optimalizace parametrů iontového zdroje .....	36
4.1.1	Optimalizace napětí na sampling cone .....	36
4.1.2	Optimalizace napětí na extraction cone.....	41
4.2	Tandemová hmotnostní spektrometrie p-kumarylalkoholu .....	46
4.3	Tandemová hmotnostní spektrometrie koniferylalkoholu .....	49
4.4	Tandemová hmotnostní spektrometrie sinapylalkoholu .....	52
4.5	Společné znaky a rozdíly ve fragmentaci zkoumaných monolignolů.....	55
5	Závěr.....	57
6	Seznam literatury .....	58
7	Přílohy .....	63

## **Seznam zkratek**

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku

BER – borohydridová výměnná pryskyřice

BIRD – termální aktivace

BTX – aromatická rozpouštědla benzen, toluen a xylen

CA – koniferylalkohol

CE – kolizní energie

CI – chemická ionizace

CID – kolizně indukovaná disociace

DART – přímá analýza v reálném čase

DESI – desorpční elektrosprej

DIBAL – diisobutyl aluminium hydrid

ECD – disociace záchytem elektronu

EI – elektronová ionizace

EPR – elektronová spinová rezonance

ESI – ionizace elektrosprejem

ETD – disociace přenosem elektronu

FT – Fourierova transformace

GC/MS – plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICR – iontová cyklotronová rezonance

IRPMD – mnohofotonová disociace červeným zářením



$\text{LiAlH}_4$  – tetrahydridohlinitan lithný

MALDI – laserová desorpce/ionizace za účasti matrice

MRM – sledování mnohonásobné reakce

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

$\text{NaBH}_4$  – tetrahydridoboritan sodný

nESI – nanoelektrosprej

NMR – nukleární magnetická rezonance

OT – Orbitrap

Py-GC/MS – pyrolýza-plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie

Q – kvadrupólový analyzátor

reTOF – analyzátor doby letu s reflektorem

SA – sinapylalkohol

SBA-15 – Santa Barbara amorphous-15

SID – povrchově indukovaná disociace

SIM – selektivní záznam iontů

SRM – sledování vybrané reakce

TIC – intenzita iontového proudu

TOF – analyzátor doby letu

UV – ultrafialové záření

## 1 Úvod

Monolignoly – p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol – jsou malé organické molekuly, které jsou sekundárními metabolity rostlin. Patří mezi fenyylpropanoidy sloužící především jako prekurzory dimerních lignanů a polymerního ligninu. Protože lignany a lignin mají mnoho způsobů využití, výzkum těchto sekundárních metabolitů se ubírá především tímto směrem. V rámci teoretické práce byla proto provedena rešerše na téma monolignolů, jejich metody analýzy a využití.

Zájem o monolignoly pramení především z důvodu, že jsou základními stavebními jednotkami ligninu, který má vysoký potenciál stát se zdrojem energie v budoucnosti. V důsledku ubývajících zásob fosilních paliv může být lignin vhodnou náhradou, jelikož se jedná o obnovitelný a široce rozšířený biopolymer a jeho spálením se uvolňuje energie. Lignin je možné využít také jako příměs do plastů, betonů, polyuretanů atd., ale jeho primární funkcí je zpevnění rostlinných pletiv. Oxidační dimery monolignolů, lignany, zajišťují ochranu rostlin před škůdci a patogeny a získávají pozornost především díky svým biologickým vlastnostem, protože některé sloučeniny z této skupiny vykazují protinádorové, protirakovinné, antivirové a antioxidační vlastnosti, a proto jsou považovány za sloučeniny vedoucí k novým léčivým látkám. Lepším porozuměním jejich základním stavebním jednotkám by mohla být zlepšena práce se složitějšími strukturami.

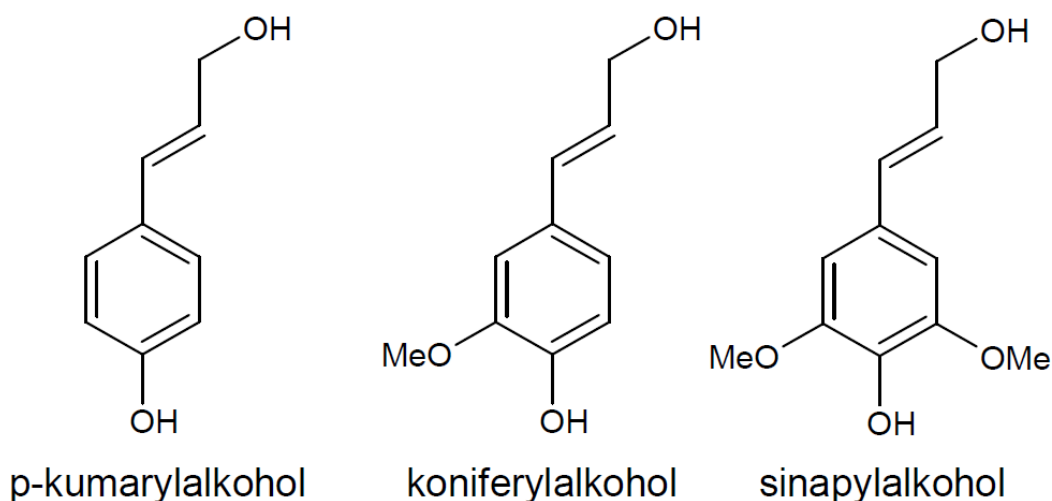
Vzhledem k výše naznačené užitečnosti ligninu a lignanů jsme se v experimentální části práce rozhodli prozkoumat jejich základní stavební jednotky (monolignoly) pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie a určit jejich fragmentační produkty. Předpokládáme, že fragmentační produkty typické pro jednotlivé monolignoly by mohly sloužit k objasnění složitějších struktur derivátů monolignolů a tato práce by mohla v budoucnu usnadnit analýzu lignanů i ligninu.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Monolignoly

Monolignoly řadíme mezi fenylypropanoidy, které jsou široce rozšířenými sekundárními metabolity rostlin. Jedná se o sloučeniny s aromatickým jádrem, postranním řetězcem, tvořeným třemi uhlíky s dvojnou vazbou, zakončeným hydroxylovou funkční skupinou a hydroxylovými či methoxylovými funkčními skupinami navázanými na aromatické jádro<sup>[1]</sup>.

Praktický význam monolignolů spočívá ve faktu, že jsou prekurzory dimerů těchto sloučenin – lignanů – které mají široké využití díky svým chemickým a biologickým vlastnostem shrnutými např. v práci Saleem a kol.<sup>[2]</sup>, a ligninu, který je jedním z nejrozšířenějších rostlinných biopolymerů a podílí se na zpevňování buněčné stěny. Mezi monolignoly jsou obvykle řazeny následující tři alkoholy: p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol (**Obr. 1**)<sup>[3]</sup>. Deriváty monolignolů mohou mít různé fyziologické či farmaceutické využití<sup>[4]</sup>.

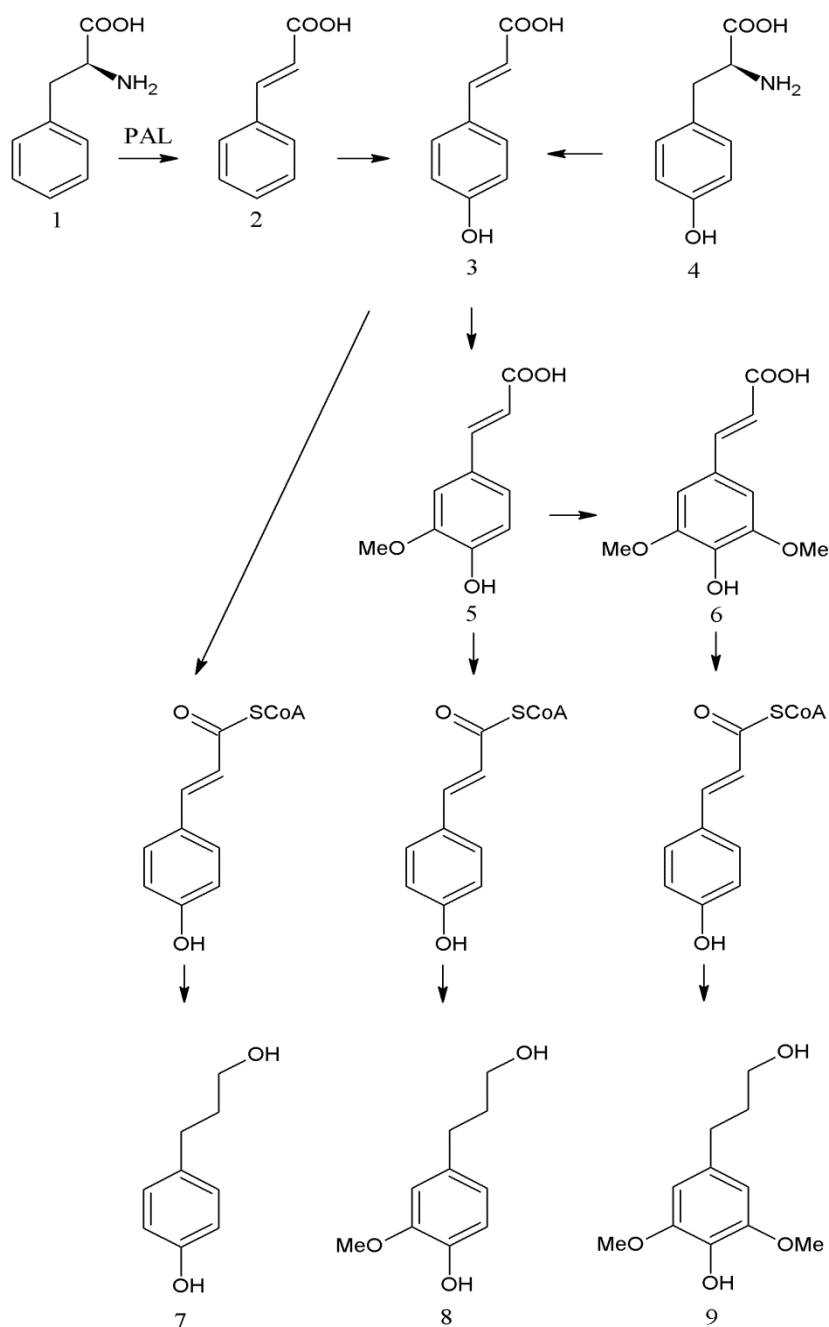


**Obr. 1:** Struktury tří alkoholů běžně označovaných jako monolignoly

#### 2.1.1 Biosyntéza monolignolů

Základními výchozími látkami pro biosyntézu monolignolů jsou aromatické aminokyseliny L-fenylalanin a L-tyrosin. Ty v organismech vznikají metabolickou dráhou kyseliny šikimové. Biosyntetická dráha všech monolignolů (**Obr. 2**) začíná L-fenylalaninem (1), který je deaminován pomocí fenylalanin amonium lyázy (PAL) na kyselinu skořicovou (2). Biosyntéza pokračuje hydroxylačními reakcemi na aromatickém

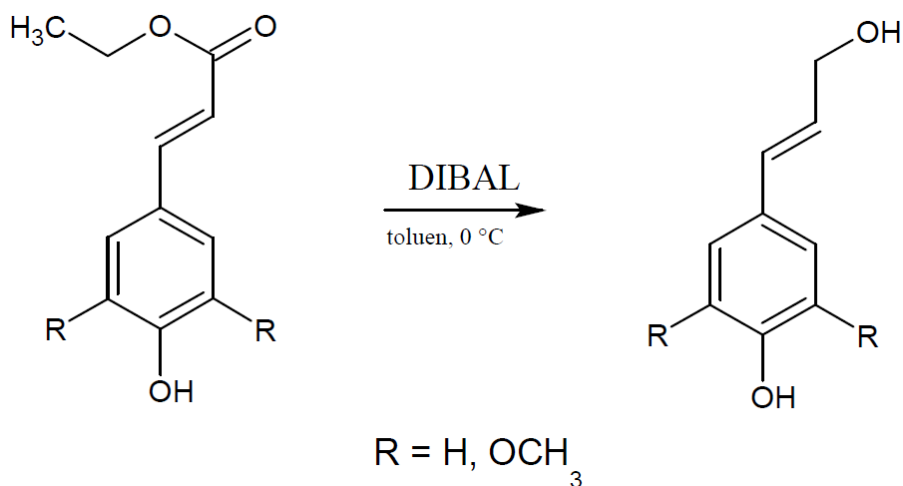
jádře kyseliny skořicové následovanými O-metylací hydroxylových skupin aromatického jádra, za vzniku derivátů kyseliny skořicové, jimiž jsou kyselina p-kumarová (3), kyselina ferulová (5) a kyselina sinapová (6). Výchozí látkou může být také L-tyrosin (4), z něhož deaminací vzniká kyselina p-kumarová. Redukcí karboxylových skupin výše zmíněných kyselin pomocí koenzymu A vznikají příslušné aldehydy, které jsou prostřednictvím NADPH redukovány na alkoholické skupiny za vzniku jednotlivých monolignolů p-kumarylalkoholu (7), koniferylalkoholu (8) a sinapylalkoholu (9) [1,3,5].



**Obr. 2:** Biosynetická dráha monolignolů

### 2.1.2 Syntetická příprava

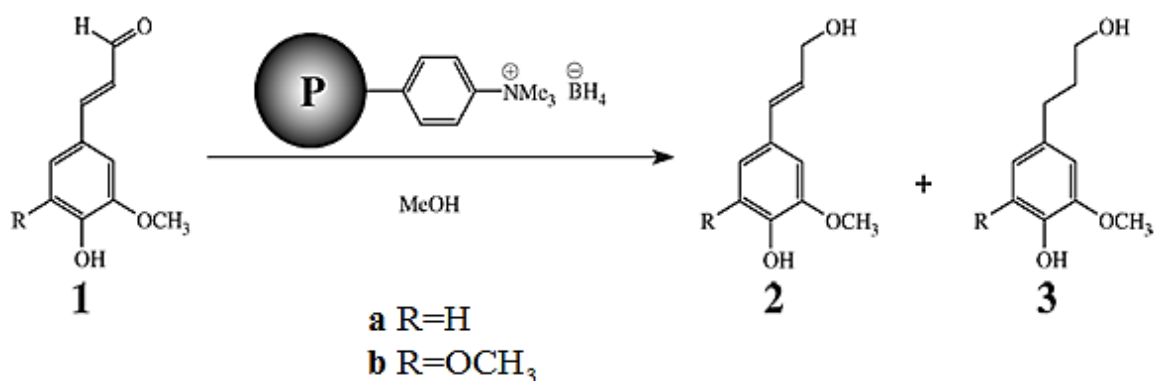
K přípravě i výrobě monolignolů bylo vyvinuto mnoho metod, které využívají relativně jednoduše komerčně dostupné materiály. Pro výrobu monolignolů v průmyslovém měřítku (v množstvích okolo 10–20 g <sup>[6]</sup>) lze využít se redukce esterů příslušných monolignolů pomocí LiAlH<sub>4</sub> (tetrahydridohlinitanu lithného), DIBAL (diisobutyl aluminium hydridu) či NaBH<sub>4</sub> (tetrahydridoboritanu sodného), viz **Obr. 3** <sup>[6-7]</sup>.



**Obr. 3:** Redukce esterů monolignolů na příslušný monolignol pomocí DIBALu

Výše uvedená reakce na **Obr. 3** poskytuje poměrně vysoký výtěžek žádaného produktu (77 % pro koniferylalkohol, 70 % pro sinapylalkohol a až 92 % pro p-kumarylalkohol) <sup>[6]</sup>.

Pro laboratorní přípravu monolignolů lze využít jednoduché redukční reakce, která spočívá v redukci příslušných komerčně dostupných aldehydů pomocí borohydridové výměnné pryskyřice (BER) v methanolu na příslušné alkoholy (**Obr. 4**). Oddělení alkoholů od ostatních reakčních látek je prováděno filtrací přes vatu a následným odpařením rozpouštědla na rotační odparce za vzniku žluté olejovité látky. Reakce má mnoho výhod, z nichž je velmi podstatné, že tato příprava je celkově dvakrát až třikrát levnější, než přímý nákup monolignolu. Největší výhodou je však příprava látky o vysoké čistotě (v případě koniferylalkoholu je nutno provést přečištění přes SPE kolonku se silikagelem a promytí ethylacetátem), jelikož komerčně dostupné monolignoly, především sinapylalkohol, mohou obsahovat produkty degradace. Výtěžky reakce se v laboratorních podmínkách pohybují mezi 60 a 75 %. Pokud chceme tuto reakci použít pro průmyslovou výrobu, výtěžky jsou zpravidla mírně nižší <sup>[7]</sup>.



**Obř. 4:** Redukce koniferylaldehydu a sinapylaldehydu pomocí BER <sup>[7]</sup>

Jak již bylo zmíněno monolignoly slouží k syntéze ligninu. Obrácením tohoto procesu, tj. rozkladem ligninu, můžeme získat monolignoly a jejich deriváty. Využití vhodných a účinných katalyzátorů na bázi molybdenu nebo niklu: práce Xiao a kol. uvádí, že nízkonákladový katalyzátor na bázi molybdenu s uhlíkovými nanotrubicemi (MoO<sub>x</sub>/CNT) má srovnatelné parametry (aktivita, znovupoužití a kompatibilita surovin) jako katalyzátory na bázi drahých kovů <sup>[8]</sup>. Velmi vhodným se jeví i další katalyzátor na bázi molybdenu se syntetickým mezoporézním materiálem SBA-15 (MoO<sub>x</sub>/SBA-15), protože ze srovnávaných katalyzátorů na bázi molybdenu má nejvyšší výtěžek monolignolů a jejich derivátů (43,4 %) a umožňuje využití tj. degradaci dalších lignocelulózových složek (celulózy a hemicelulózy) <sup>[9]</sup>.

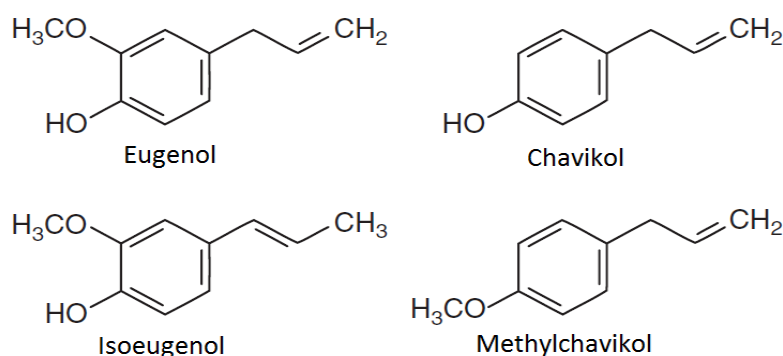
## 2.2 Vlastnosti a využití monolignolů

K produkci monolignolů může docházet také při spalování dřeva, které je jedním z hojných zdrojů částic znečišťujících životní prostředí. Při jeho hoření převládají emise spojené s pyrolýzou ligninu, přičemž až 45 % hmotnosti zplodin představují methoxyfenoly. Ty kondenzují již při okolní teplotě, a proto je považujeme za potenciální indikátory hoření dřeva. Mezi methoxyfenoly patří monolignol koniferylalkohol, který může být vhodným indikátorem, protože se vyskytuje v ligninu ve vysoké koncentraci <sup>[10]</sup>. Pyrolýza jednotlivých monolignolů poskytuje množství produktů, které mohou pomoci při jejich identifikaci. V práci Harman-Ware a kol. byla provedena pyrolýza koniferylalkoholu a sinapylalkoholu při teplotě 650 °C. Práce uvádí řadu produktů pyrolýzy (pyrolyzátů) pro oba dva lignoly, nejvýznamnějšími jsou pak koniferylferylaldehyd, vanilin a trans-isoeugenol (pro koniferylalkohol) a (E)-2,6-dimethoxy-4-(1-propenyl)fenol, 4-hydroxy-3,5dimethoxybenzaldehyd a canolol (pro sinapylalkohol). Použití výpočtu poměru ploch vhodných látek vzniklých při pyrolýze ligninu lze využít k získání poměru S:G

(syringyl:guajacyl) <sup>[11]</sup>. Byla studována také (frakční) pyrolýza p-kumarylalkoholu, a to Asatryanem a kol., kteří zjistili, že při nižších teplotách (pod 500 °C) vzniká převážně fenol a jeho deriváty (p-kresol, ethylfenol, propylfenol a propenylfenol), protože reakce probíhají především na postranním řetězci <sup>[12]</sup>. Při teplotách nad 500 °C vznikaly při pyrolýze p-kumarylalkoholu radikálové směsi s radikálem umístěným na kyslíku, což bylo prokázáno EPR spektroskopii <sup>[12]</sup>.

Jako chemická individua jsou monolignoly poměrně toxickými a nestabilními látkami, a proto se stabilizují glykosylací hydroxylové skupiny navázané na benzenovém jádře (glykosylace hydroxylové funkční skupiny na postranním řetězci je vzácná <sup>[13]</sup>) za vzniku monolignolglykosidů. Tato netoxická forma slouží k uchování a přepravě monolignolů v tkáních rostlin <sup>[5, 14-16]</sup>. V rostlinách se monolignoly akumulují především v této stabilní netoxické formě, aby z nich v případě potřeby mohl být syntetizován lignin. U koniferinu (glukosidu koniferylalkoholu) nebyla prozatím přímo prokázána jeho konverze na lignany, ale bylo potvrzeno, že v buňkách s rostoucí koncentrací lignanů klesá koncentrace koniferinu a naopak. Z tohoto tvrzení se lze domnívat, že se monolignoly stabilizují nejen ve formě glykosidů, ale i ve formě lignanů <sup>[13]</sup>.

Kromě hlavního biologického účelu (syntéza ligninu a lignanů) je možné monolignoly využít v oblasti průmyslu. Zde slouží k výrobě vonných látek, které hrají důležitou ekonomickou roli v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Jedná se například o jednoduché látky jako eugenol, isoeugenol, chavikol a methylchavikol (**Obr. 5**). Eugenol a isoeugenol vznikají acetylací koniferylalkoholu a jeho následným reduktivním štěpením pomocí eugenolsyntázy, resp. isoeugenolsyntázy. Chavikol a jeho methylovaný derivát vznikají redukcí z esterů (p-kumaryl acetátu a p-kumaryl kumarátu) <sup>[13]</sup>.

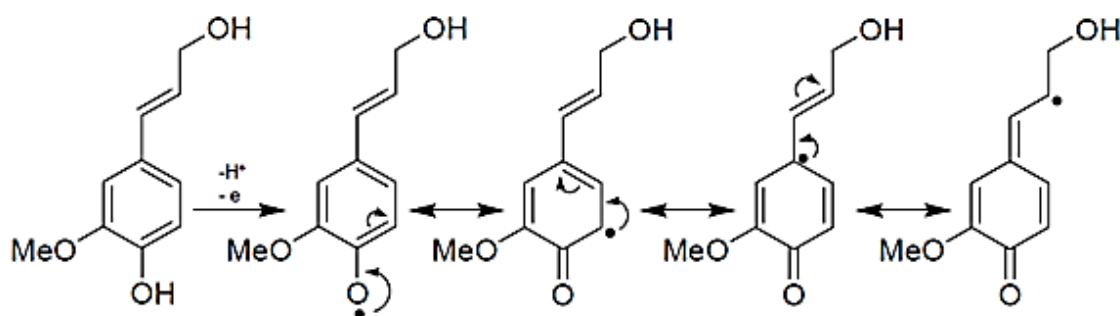


**Obr. 5:** Struktury eugenolu, isoeugenolu, chavikolu a methylchavikolu

Studie König a kol. se zabývá identifikací metabolických drah rozpustných fenylypropanoidů a ligninu. S ohledem na inhibici růstu hub bylo zjištěno, že vysoká koncentrace koniferinu (glukosid koniferylalkoholu) způsobuje vyšší odolnost při napadení dřeva houbami. Koniferin slouží jako netoxická forma koniferylalkoholu, který je přeměněn na kyselinu ferulovou inhibující růst houby. Rostliny s vyšší koncentrací syringinu (glukosid sinapylalkoholu) odolnější nejsou. Při napadení houbou se tento metabolizuje na syringaresinol a malé množství kyseliny sinapové – ani jedna z těchto sloučenin však nemá inhibiční účinky. Antimykotické účinky byly prozatím objeveny pouze u jediného derivátu sinapylalkoholu, a to u sinapylglukózy<sup>[14]</sup>.

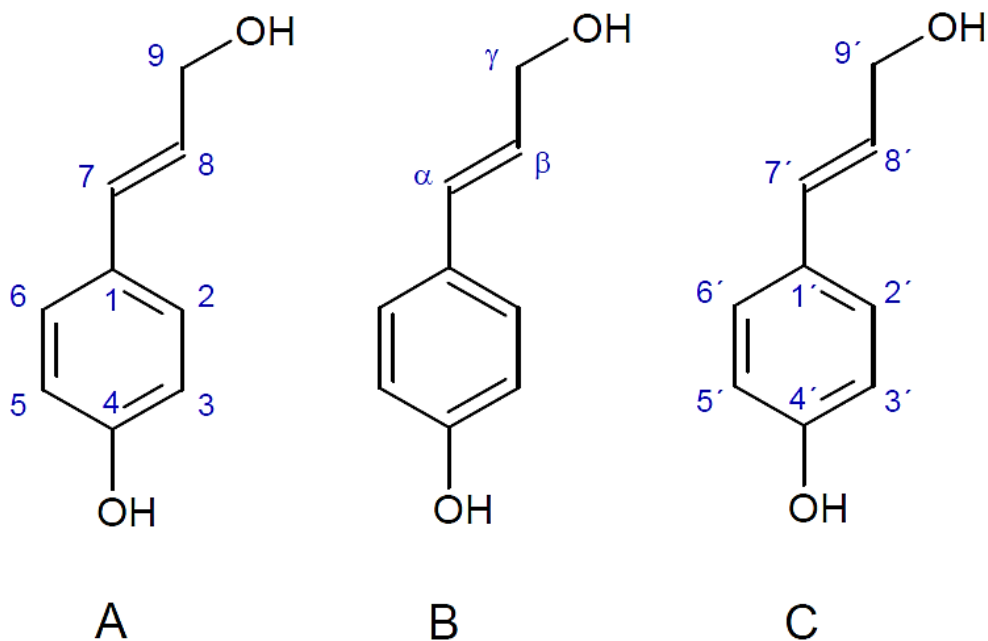
### 2.3 Lignany

Lignany jsou hojně rozšířeny v rostlinné říši; vznikají oxidativní dimerizací monolignolů v určitých polohách, což je způsobeno delokalizací elektronu v rezonančních strukturách – viz **Obr. 6**. (polohy jsou však důležité i v případě ligninu). V rostlinách se nacházejí ve větším množství než monolignoly<sup>[14]</sup> a mohou se vyskytovat v glykosylované i aglykonové formě. Jako lignany byly dříve označovány dimery monolignolů spojené vazbou C-C v polohách 8-8' (**Obr. 7A, Obr. 7C**). Dimery s vazbou mezi jinými uhlíky (např. 8-3', 3-3') nebo spojené přes etherovou vazbu (např.  $\beta$ -O-4) nazýváme *neolignany*. Později bylo navrženo, aby se termínem *lignany* nazývaly všechny sloučeniny bez ohledu na velikost (trimery – sesquilignany, tetramery – dilignany, ...) a spojení mezi jednotkami (8-8', 8-3', 8-O-4, ...). Mezi lignany řadíme i látky se strukturou difenylpentanu, označované jako *norlignany*. Ty jsou charakteristické ztrátou alespoň jednoho koncového uhlíku (propanového řetězce) v průběhu biosyntézy<sup>[13,17-18]</sup>.



**Obr. 6:** Delokalizace elektronu v rezonančních strukturách koniferylalkoholu





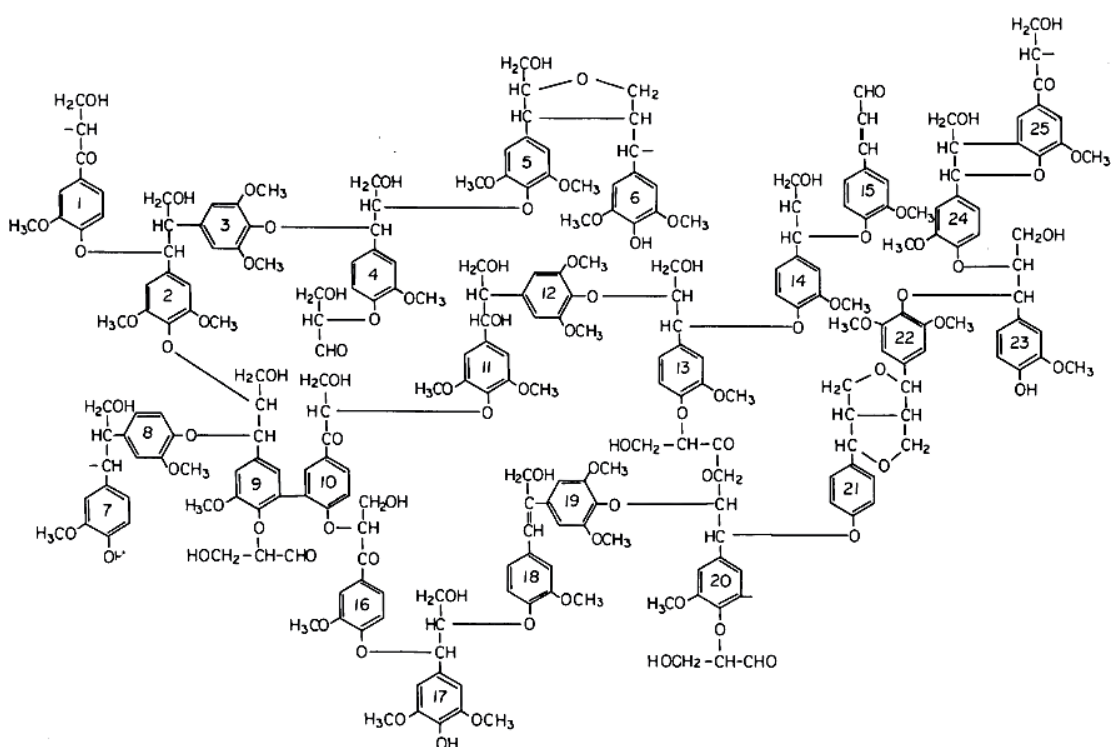
**Obr. 7:** Monolignoly označené čísly, řeckými písmeny

Kvůli svým biologickým vlastnostem, jako jsou protirakovinové (podofylotoxin, matairesinol, enterolakton, enterodiol), antimikrobiální (vitrofolal C), antimykotické (pinoresinol), antivirové (trachelosid), protizánětlivé (pinoresinol, isolariciresinol) a antioxidační (sesamin, lariciresinol) účinky přitahují velkou pozornost <sup>[2,17-18]</sup>. Stejně jako monolignoly a jejich deriváty se i lignany mohou podílet na obraně rostlin proti mikroorganismům <sup>[14]</sup>. V minulosti bylo dřevo kryptomerie japonské, cypřišku tupolistého a zeravu obrovského využíváno na stavbu obydlí, protože fungují jako přírodní insekticidy a domy z těchto dřevin nejsou napadány hmyzem <sup>[18]</sup>.

## 2.4 Lignin

Lignin je po celulóze druhým nejrozšířenějším biopolymerem (přibližně 30 % organického uhlíku v biosféře) a největším přírodním zdrojem aromatických sloučenin <sup>[19]</sup>. Nejčastěji se vyskytuje v sekundární buněčné stěně rostlin (xylém a sklerenchym), které propůjčuje mechanickou podporu, tuhost a voděodolnost. Tyto vlastnosti umožňují transport vody a v ní rozpuštěných látek po celé rostlině a růst rostliny do výšky <sup>[5]</sup>. Zároveň slouží rostlině jako ochrana před patogeny, býložravci a hmyzem. Z chemického hlediska je struktura ligninu tvořena mnoha různě spojenými monolignoly, které pomocí radikálové polymerace tvoří zesíťované struktury s molekulovými hmotnostmi až 10 000 Da <sup>[19]</sup> (každý z monomerů disponuje vazebnou variabilitou pro propojení s dalšími

monolignoly <sup>[18]</sup>, viz **Obr. 8**). Lignin je teoreticky tvořen pouze uhlíkem, vodíkem a kyslíkem, ale při zvětrávání nebo chemické degradaci se může zanášet nečistotami (heteroatomy), které mohou změnit jeho fyzikálně-chemické vlastnosti <sup>[19]</sup>. Procentuální zastoupení ligninu v rostlinách a jeho složení je různorodé. Například u stromů tvoří až 35 % hmotnosti sušiny <sup>[10]</sup>. Odlišnosti mohou být i v tvrdosti dřeva, obsah ligninu u měkkých dřev (jehličnany, z největší části koniferylalkohol <sup>[20]</sup>) se pohybuje mezi 20 a 25 % a u tvrdých dřev (ovocné stromy, koniferylalkohol a sinapylalkohol <sup>[20]</sup>) okolo 30 %. V travinách je lignin tvořen převážně p-kumarylalkoholem a vyskytuje se v nízkých množstvích <sup>[21]</sup>.



**Obr. 8:** Schéma vazeb v ligninu <sup>[22]</sup>

V důsledku ubývajících zásob fosilních paliv a velkého zastoupení ligninu v přírodě je lignin považován za možný budoucí zdroj energie. Degradční produkty ligninu mohou sloužit jako ideální náhrada toxických fenolů v průmyslu. Největším zdrojem ligninu je papírenský průmysl při výrobě buničiny (1 000 000 tun/rok <sup>[23]</sup>). Získaný lignin se využívá pro získání energie (jeho spalováním) a jako zdroj chemikálií <sup>[23]</sup>. S rozvojem účinných degradačních a extrakčních technik by mohl být využitelný jako biopalivo, protože obsahuje velký podíl malých aromatických molekul (šesti- až deseti-uhlíkatých). Výhodou biopaliva vyrobeného z ligninu by byly nižší obsahy dusíku, síry a skleníkových plynů <sup>[19]</sup>.

Výborně zachytává volné radikály, a proto slouží jako přírodní antioxidant. Lignin a jeho deriváty mohou (zatím pouze in vitro) u lidí vykazovat antibiotické, protirakovinné a antivirové účinky <sup>[21]</sup>. Lignin (neobsahující síru) byl přidáván do potravy zvířat a vykazoval probiotické účinky. Ligninsulfonáty mohou být použity k vychytávání prachových částic usazování nerozpustných částic nebo jako levná pojiva či chelatační sloučeniny (vykazují afinitu k některým kovům, např.  $\text{Fe}^{2+}$  <sup>[24]</sup>) <sup>[21]</sup>. Lignin lze využít i v zemědělství jako tzv. „materiál k zapouzdření pesticidů“, jelikož se jedná o biologicky rozložitelný přírodní polymer s nízkou cenou (principem je postupné uvolňování pesticidu s rozkladem ligninu) <sup>[23]</sup>. Vhodnou vlastností se ukázala i absorpce UV záření, která zvyšuje biologickou ochranu pesticidu před UV zářením. Použití zapouzdřených pesticidů snižuje znečištění životního prostředí i díky zvýšení jejich účinnosti <sup>[23]</sup>. V průmyslu se lignin z důvodu nízké ceny, obnovitelnosti a zlepšení vlastností přidává např. do uhlíkových vláken (pouze s nízkou kvalitou), plastů (zlepšuje jejich biologickou rozložitelnost), fenolových pryskyřic (snižuje jejich výrobní cenu), epoxidových pryskyřic (zvyšuje jejich tuhost a tepelné vlastnosti), polyuretanových pěn (při zahřívání uvolňuje pěna méně těkavých složek), betonu (natahuje do sebe vodu, čímž zvyšuje jeho pevnost), asfaltu (antioxidační vlastnosti ligninu přispívají k pomalejšímu stárnutí vozovky), atd. Depolymerizací ligninu získáváme řadu nízkomolekulárních látek, např. vanilin, dimethylsulfoxid, aktivní uhlí, guajakol, atd., avšak s rozvojem degradačních technik by v budoucnu mohl sloužit také jako zdroj BTX rozpouštědel, fenolu, chininu atd. <sup>[16,23]</sup>.

#### 2.4.1 Metody detekce

Jelikož je lignin složitý přírodní polymer s velkým komerčním potenciálem, je potřeba hledat vhodné metody pro jeho analýzu <sup>[25]</sup>. Lignin je tvořen fenylypropanoidy spojenými primárně  $\beta$ -O-4 vazbami. Tyto monomerní jednotky se mohou spojovat i jinými typy C-C a C-O vazeb. Zároveň se může lignin vázat na jiné polymery buněčné stěny, což znemožňuje jeho izolaci bez současné změny v jeho chemické struktuře.

K důkazu ligninu se nejčastěji používají vybarvovací reakce, při nichž jsou využívána jak organická, tak anorganická činidla. Nejpoužívanějším organickým činidlem pro důkaz ligninu je floroglucinol ve formě Wiesnerova činidla, tj. v roztoku s HCl (při pozitivní reakci pozorujeme změnu barvy z červené na žlutou) <sup>[26]</sup>. V anorganické analýze se často využívá Mäuleho reakce pro rozlišení tvrdého a měkkého dřeva (v první fázi reaguje vzorek s manganistanem draselným a 3% kyselinou chlorovodíkovou a v druhé

fázi s koncentrovaným hydroxidem amonným, při pozitivní reakci mění vzorek barvu ze světle hnědé na červenou pro tvrdé dřevo, resp. na tmavě hnědou pro měkké dřevo). Metody kvantifikace jsou založeny na gravimetrických (např. Klasonova metoda – odstranění rozpustných částí ligninu kyselinou sírovou) a spektrofotometrických metodách (např. acetylbromidová metoda – rozpuštění ligninu v acetylbromidu/kyselině octové s následným spektrofotometrickým stanovením) <sup>[23]</sup>.

#### **2.4.2 Metody depolymerace**

Lignin může být depolymerován různými degradačními technikami. Nejvyžívanější metodou degradace ligninu je thioacidolýza – reakce ligninu rozpuštěného v dioxanethanthiolu a diethyletherátu fluoridu boritého za kyselé katalýzy. Největší výhodou této metody je štěpení více typů vazeb v ligninu a lze ji využít k určení kvantity, procentuálního zastoupení a složení ligninu stanovením vzniklých monomerních a dimerních produktů plynové chromatografie (dimerní produkty až po odsíření) <sup>[22-23]</sup>. Jednodušší metodou degradace je acidolýza (kyselý rozklad), která probíhá zahříváním ligninu s HCl ve směsi dioxanu s vodou (9:1, v:v) <sup>[22]</sup>. Problémem acidolýzy je degradace uvolněných sacharidů, metoda je proto vhodná zejména, pokud nevyžadujeme podrobnou strukturální analýzu ani použití nevodného rozpouštědla <sup>[27]</sup>. Analyticky využitelná je v tomto ohledu také kapalinová chromatografie, která umožňuje např. detekci parahydroxybenzaldehydu, vanilinu a syringaldehydu uvolněných ze vzorku oxidací ligninu oxidem měďnatým nebo nitrobenzenem. Procentuální zastoupení jednotlivých vzniklých látek odráží procentuální zastoupení monolignolových podjednotek <sup>[22-23]</sup>.

#### **2.4.3 Metody analýzy**

Tato práce se zabývá hmotnostní spektrometrií, ale lignin může být analyzován i pomocí jiných instrumentálních metod, mezi které patří např. nukleární magnetická rezonance, UV absorpce, infračervená spektrometrie nebo Ramanova spektrometrie <sup>[22]</sup>.

##### **2.4.3.1 Pyrolyzní plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (Py-GC/MS)**

Analýza ligninu je obvykle zdlouhavý a časově náročný úkol z důvodu nutnosti jeho chemické degradace a izolace vzniklých produktů. Tento problém je však odstraněn při použití pyrolýzy v kombinaci s GC/MS, protože není nutná izolace produktů a lignin se rychle rozpadá působením tepla na vazbách s nízkou energií. Pyrolýzou vznikají degradační fragmenty v plynné fázi, které jsou analyzovány pomocí GC/MS. Techniku pyrolýzy GC/MS využili Harman-Ware a kol. k analýze složení ligninu – přesněji k určení

poměru S:G z ploch chromatografických píků markerů vzniklých pyrolýzou. Zjistili, že výběrem velkého množství vhodných markerů se můžeme při vyhodnocení přiblížit skutečnému poměru S:G. Pro usnadnění analýzy složení ligninu mohou být sestrojeny kalibrační křivky, které vycházejí z poměru součtů ploch vybraných markerů <sup>[11]</sup>.

#### 2.4.3.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Pro vysoce přesnou strukturální analýzu ligninu lze využít analýzu jeho <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spekter <sup>[28]</sup>. Signály ligninu v <sup>13</sup>C NMR můžeme rozdělit do 3 skupin: 1) 200–165 ppm odpovídající karbonylovým uhlíkům, 2) 165–100 ppm patřící aromatickým a alkenovým uhlíkům a 3) 100–10 ppm, zde patří alifatické uhlíky <sup>[22]</sup>. Přesnější hodnoty chemických posunů ve spektrech <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR nalezneme v práci Ralph a kol. <sup>[28]</sup>.

#### 2.4.3.3 Spektrální metody

Ligninové molekuly absorbují UV záření, protože obsahují konjugovaná aromatická jádra, která absorbují UV záření zejména v oblasti okolo 280 nm (k absorpci v této oblasti přispívají také přítomné hydroxylové a etherové skupiny <sup>[29]</sup>.

Pro analýzu ligninu pomocí FTIR je nejčastěji využívána analýza vzorků v pevné formě <sup>[22]</sup>. Pokud není čas na izolaci ligninu z roztoku, lze provést analýzu v roztoku. Vhodným rozpouštědlem pro tyto účely, které má pouze nízké signály v oblasti okolo 1210 cm<sup>-1</sup> a v rozmezí 780 a 720 cm<sup>-1</sup>, je chloroform. Bližší informace o absorpčních pásech skupin obsažených v ligninu (hydroxyl, karbonyl, karboxyl, methoxyl, aromatická C-H skupina a alifatická C-H skupina) jsou uvedeny v práci Todorcius a kol., která se zabývá analýzou ligninu ve slámě a travinách pomocí FTIR <sup>[29]</sup>. FTIR může při analýze ligninu v kombinaci s Ramanovou spektrometrií podat podrobnější informace týkající se složení. Zejména monolignoly, které se nacházejí v ligninu v nízkých množstvích (< 5 %), jsou Ramanovou spektrometrií lépe detekovatelné díky konjugovanému systému vazeb. Například Bock a Gierlinger se zaměřili na Ramanovu spektrometrii koniferylalkoholu, jehož přítomnost ve vzorku indikuje přítomnost pásu v oblasti okolo 1660 cm<sup>-1</sup> <sup>[30-31]</sup>.

## 2.5 Hmotnostní spektrometrie

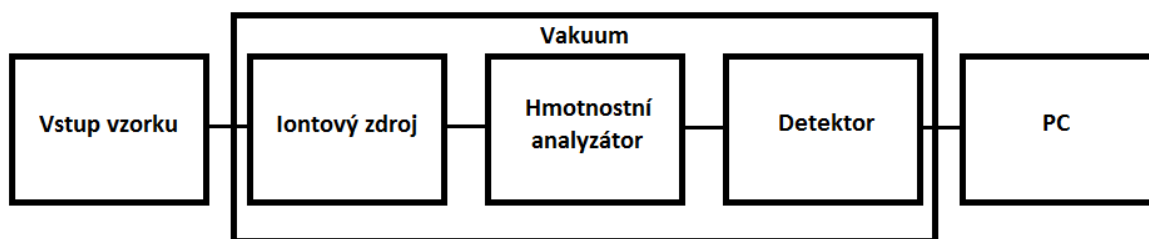
Hmotnostní spektrometrie je často využívaná a všestranná instrumentální metoda, která patří mezi metody spektrální, a zároveň ji řadíme mezi metody destrukční s velmi malou spotřebou vzorku (řádově okolo 1–100 μl/min). Je využitelná pro analýzu neznámých vzorků, jelikož dokáže poskytnout informace o elementárním složení, a

strukturu analytů a izotopických poměrech. Zároveň je využívána v kvantitativní analýze, protože dokáže stanovit stopová (méně než  $10^{-6}$  g) i ultrastopová množství (méně než  $10^{-15}$  g) analytu <sup>[32]</sup>.

Principem hmotnostní spektrometrie je převedení atomů či molekul na ionty v plynné fázi pomocí vhodně zvolené ionizační techniky, následná separace těchto iontů podle poměru hmotnosti ku náboji a zachycení signálu ve formě tzv. hmotnostního spektra. Poměr hmotnosti a náboje je bezrozměrné číslo, které značíme jako  $m/z$ . Náboj obecně uvádíme jako násobky elementárního náboje  $e$  ( $1 e = 1,602177 \cdot 10^{-19}$  C) a hmotnost uvádíme v násobcích atomové hmotnostní jednotky  $u$  ( $1 u = 1,660540 \cdot 10^{-27}$  kg). U molekul se používá pro vyjádření jejich molekulové hmotnosti jednotka dalton Da ( $1 \text{ Da} = 1 u$ ). Pro zjednodušení v interpretaci jednotky  $m/z$  byla zavedena nová jednotka Thompson Th ( $1 \text{ Th} = 1 m/z = 1,036426 \cdot 10^{-8} \text{ kg C}^{-1}$ ) <sup>[32-34]</sup>.

### 2.5.1 Instrumentace

Přístroj, ve kterém probíhá hmotnostně-spektrometrické měření, se nazývá hmotnostní spektrometr (**Obr. 9**). Každý hmotnostní spektrometr se skládá z tří hlavních částí, kterými jsou *iontový zdroj*, *hmotnostní analyzátor* a *detektor*. Dalšími částmi jsou vakuový systém, systém pro přívod vzorku, iontová optika a přístroj na zpracování signálu (zpravidla počítač). Některé části hmotnostního spektrometru, zejména hmotnostní analyzátor a detektor, pracují pod „vysokým“ vakuem ( $10^{-3}$ – $10^{-5}$  Pa) <sup>[32]</sup>, aby nedocházelo ke kolizím analyzovaných iontů s kontaminanty. Zbylé části přístroje mohou pracovat za „nízkého“ vakua ( $>10^{-2}$  Pa) nebo při atmosférickém tlaku.



**Obr. 9:** Schéma hmotnostního spektrometru

### 2.5.2 Iontový zdroj

V iontovém zdroji ionizujeme částice analytu, aby vznikly ionty, které jsou dále analyzovány. Jednotlivé ionizační techniky se liší zejména ve velikosti dodávané energie a

různých fyzikálních principech využívaných pro zavedení náboje na analyt. Vzorek při dodání dostatečné energie fragmentuje na menší části, tzv. fragmentové ionty. Vzhledem k dodané energii rozlišujeme tzv. „tvrdé“ a „měkké“ ionizační techniky. Tvrdé ionizační techniky (elektronová ionizace – EI) dodávají více energie, a molekula tak získá nadbytek vnitřní energie, což vede k její bohaté fragmentaci. Naproti tomu měkké ionizační techniky (elektrosprej – ESI, chemické ionizace – CI, matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace – MALDI, chemická ionizace za atmosférického tlaku – APCI a fotoionizace za atmosférického tlaku – APPI) dodávají vznikajícím iontům menší množství energie, ty jsou tak stabilnější a mají menší tendenci fragmentovat. Některé ionizační techniky (EI, CI, MALDI, ...) je možno realizovat pouze za sníženého tlaku (tzv. vakuové ionizační techniky), jiné (ESI, APPI, APCI, ...) mohou pracovat za atmosférického tlaku, za kterého pracují i ionizační techniky založené na přímé ionizaci vzorku (tzv. ambientní ionizační techniky, např. desorpční elektrosprej – DESI, nebo přímá analýza v reálném čase – DART). Dalším důležitým parametrem je správný výběr polaritního módu, protože většina ionizačních technik (vyjma EI) umožňuje měření v kladném i záporném módu; ochota analytu k tvorbě kationtu či aniontu však může být obecně různá a souvisí s jeho strukturou. Bazické sloučeniny (např. aminy) ochotně vytvářejí kationty, a proto je detekujeme v pozitivním módu, zatímco kyselé látky (např. alkoholy a karboxylové kyseliny) ochotně tvoří anionty, které jsou detekovány v negativním módu. Volba ionizační techniky může být závislá také na skupenství vzorku či jeho molekulové hmotnosti [32-34].

### 2.5.2.1 Elektrosprejová ionizace (ESI)

Elektrosprejová ionizace, někdy také elektrosprej (ES), patří mezi nejčastěji využívané ionizační zdroje, protože jde o jednoduchou techniku, která umožňuje vysoce citlivou analýzu a snadné spojení s HPLC [33]. Zároveň se jedná se o měkkou ionizační techniku, která je velmi šetrná a nevytváří téměř žádné fragmenty. Elektrosprej slouží zejména k ionizaci polárních až iontových látek [35]. Původně sloužila jako vhodná ionizační technika k analýze proteinů, ale začala se užívat i k analýze nízkomolekulárních látek [33]. Stejně jako většina ostatních ionizačních technik může být realizována v kladném nebo záporném polaritním módu („ESI+“, resp. „ESI-“) v závislosti na polaritě sprejovací kapiláry [36]. Ve spektru pak pro sledovaný analyt pozorujeme ionty  $[M+H]^+$ , respektive  $[M-H]^-$ . Zároveň mohou být pozorovány adukty, např. se sodíkem, lithiem, draslíkem, stříbrem či amoniakem v kladném módu. V záporném módu se mohou tvořit chloridy,

mravenčany nebo octany <sup>[32,37]</sup>. Výskyt aduktů ve spektru je často nevýhodou, protože snižují intenzitu prekurzorového iontu. Ale není tomu tak vždy, např. stříbrné ionty vykazují k nenasyceným uhlovodíkům či aromatickým sloučeninám vyšší afinitu než vodík, a je tedy možno využít jejich přídavek pro kvantitativní převedení všech iontů analytu na  $[M+Ag]^+$  formu, lithné kationty pak lze využít při určování struktury ligninu díky elektrostatické interakci mezi kationtem lithia a ligninovými monomery <sup>[38]</sup>.

Elektrosprej funguje jako rozprašovač roztoku v elektrickém poli, při němž se uvolňují velmi malé nabitě kapičky analytu. V elektrospreji probíhají tři základní procesy, těmi jsou 1) tvorba nabitých kapek, 2) redukce jejich velikosti a 3) produkce iontů v plynné fázi <sup>[36]</sup>. Analyt rozpuštěný ve vhodném polárním rozpouštědle (např. voda, methanol, atd.) přivádíme před vstup do hmotnostního analyzátoru pomocí kovové kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí (řádově kV). Na konci této kapiláry vzniká silné elektrické pole o vysoké intenzitě ( $10^5 - 10^6 \text{ V}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Při jeho dostatečné intenzitě se zdeformuje povrch kapaliny a vznikne tzv. Taylorův kužel. Špičku Taylorova kužele postupně opouštějí malé silně nabitě kapičky. V důsledku přebytku iontů se stejným nábojem v kapce se vlivem odpuzování iontů se souhlasným nábojem překoná při odstraňování rozpouštědla povrchové napětí iontu a dojde ke coulombické explozi <sup>[33]</sup>. Kapka se deformuje a z jejího konce se uvolní menší kapičky s nábojem, které pokračují do vakuované části (trasa vede pod úhlem, aby se minimalizovalo riziko znečištění nebo ucpání systému většími/neionizovanými částicemi) <sup>[36]</sup>.

Analyticky využitelnou vlastností elektrospreje je produkce vícenásobně nabitých iontů. Jejich přítomnost umožňuje analyzovat vysokomolekulární látky (např. proteiny) pomocí analyzátorů s omezeným hmotnostním rozsahem <sup>[32-34,36]</sup>.

Byla vyvinuta rovněž miniaturizovaná forma elektrospreje, tzv. nanoelektrosprej (nESI). Výhoda této modifikace tkví v menší spotřebě vzorku (tj. v řádech 10 nl/min oproti  $\mu\text{l}$ -ml/min u elektrospreje) a snížené tvorbě aduktů <sup>[36]</sup>.

### 2.5.2.2 Další druhy iontových zdrojů

Hmotnostní spektrometrie v současnosti disponuje celou řadou iontových zdrojů, které jsou využívány v závislosti na chemických vlastnostech vzorku tak, abychom docílili co nejlepšího signálu. Elektronová ionizace (EI), patřící mezi tvrdé iontové zdroje, se často využívá ve spojení s plynovou chromatografií (GC) pro analýzu plynných molekul. Princip

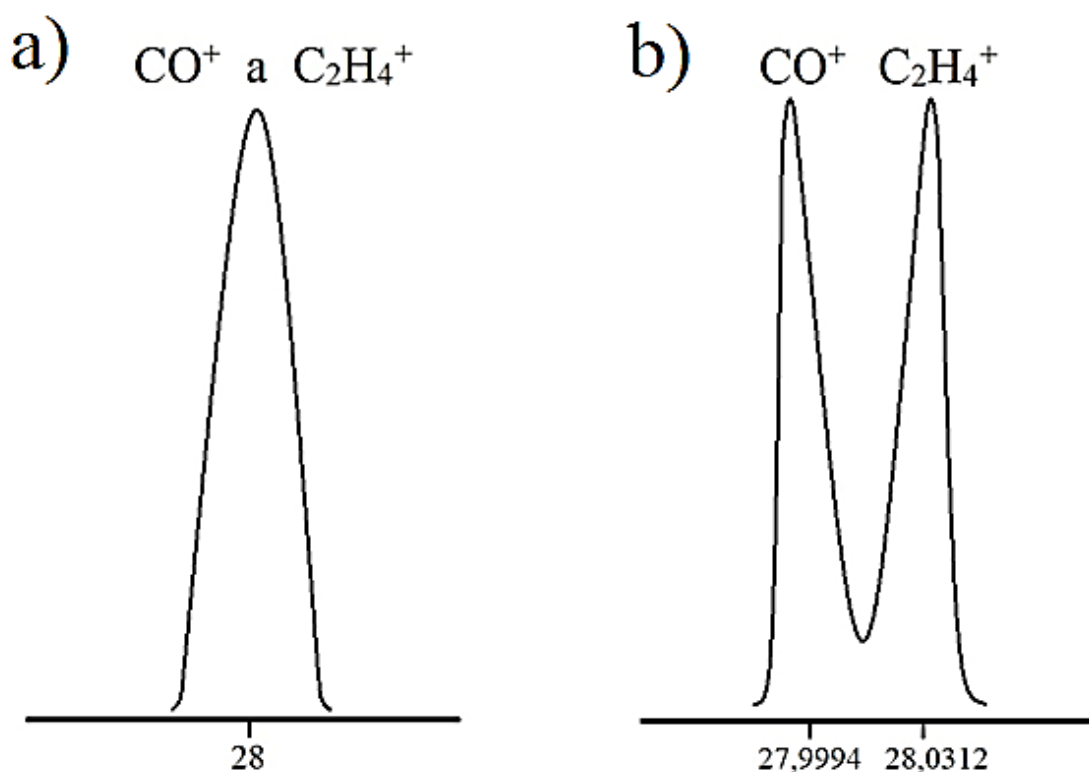


EI spočívá v ionizaci analytu pomocí proudu elektronů s vysokou energií, čímž zároveň dochází k fragmentaci molekulárního iontu (nemusí tedy vůbec dojít k jeho zaznamenání ve spektru). Velkým přínosem EI je také vysoká reprodukovatelnost naměřených spekter, která umožňuje porovnávat naměřená data s údaji v knihovných spekter. Měkkou ionizační technikou založenou na stejném principu jako EI je chemická ionizace (CI). Rozdílem mezi nimi je přítomnost reakčního plynu (např. methan či amoniak) v iontovém zdroji. Molekuly tohoto plynu jsou ionizovány vysokoenergetickými elektrony dříve než molekuly analytu, které jsou ionizovány až následně interakcí s reakčním plynem [39-40]. Další skupinou iontových zdrojů jsou laserově-desorpční techniky využívající laserového paprsku, který po dopadu na vzorek emituje ionty. Jejich nejznámějším zástupcem je technika MALDI (matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace), která využívá tzv. „matrici“, pomocnou látku (např. dithranol, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, kyselina pikolinová, ...) absorbující energii z laseru. Ionizace následně probíhá nejčastěji přenosem  $H^+$  z matrice na analyt buď před desorpcí, nebo v plynné fázi. MALDI je vhodná technika k analýze biomolekul, obecně látek labilních a fragmentujících při použití jiných iontových zdrojů [35]. Některé měkké techniky mohou být realizovány již za atmosférického tlaku – patří mezi ně dříve popsaná elektrosprejová ionizace (ESI), dále chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Jejich aplikovatelnost závisí na polaritě analyzovaných molekul: k ionizaci polárních molekul používáme přednostně ESI, pro středně polární molekuly APCI a pro nepolární molekuly APPI. APCI je založena na korónovém výboji na jehle za vytváření kyselých kationtů rozpouštědla, které protonují analyt. APPI má stejnou konstrukci jako APCI, rozdílem je použití výbojky (produkující fotony) namísto jehly s korónovým výbojem; ionizaci pomocné látky, která sekundárně ionizuje analyt (tzv. dopantu), pak zajišťují generované fotony [32-33].

### 2.5.3 Hmotnostní analyzátor

Z iontového zdroje míří do hmotnostního analyzátoru ionty v plynné fázi, které musí být před vstupem do detektoru rozděleny podle svého  $m/z$ , což probíhá právě v hmotnostním analyzátoru. Všechny hmotnostní analyzátoři oddělují ionty podle  $m/z$  za vysokého vakua s využitím elektrického nebo magnetického pole. Podle způsobu dělení iontů dělíme analyzátoři na skenující, průletové a iontové pasti. Skenující analyzátoři fungují na principu selektivního propouštění iontů s předem danou  $m/z$  hodnotou. Do této skupiny řadíme kvadrupólový analyzátor a magnetický sektorový analyzátor. Naproti tomu

průletové analyzátoři rozdělují ionty na základě jejich rozdílné doby letu k detektoru. Poslední skupinu, iontové pasti, charakterizuje zadržování iontů v pastech pomocí napětí a jejich následná analýza, jelikož zároveň fungují i jako detektor. Do této skupiny patří iontová past, Orbitrap a iontová cyklotronová rezonance <sup>[32-33,35]</sup>. Důležitým parametrem hmotnostních analyzátorů je jejich rozlišení, podle kterého se analyzátoři dělí na vysoko-rozlišovací (analyzátor doby letu, Orbitrap, iontová cyklotronová rezonance) a nízko-rozlišovací (kvadrupól, iontová past). Problém spočívá v rozlišení iontů s podobnými  $m/z$  (např.  $\text{CO}^+$  a  $\text{C}_2\text{H}_4^+$ , viz **Obr. 10**). Nízko-rozlišovací kvadrupól má přibližně jednotkové rozlišení (viz **Obr. 10a**), oproti tomu vysoko-rozlišovací analyzátor doby letu dokáže určit  $m/z$  iontů s přesností až na čtyři desetinná místa (viz **Obr. 10b**). S ohledem na experimentální část této práce se detailněji budeme zabývat pouze kvadrupólovým analyzátořem a analyzátořem doby letu.



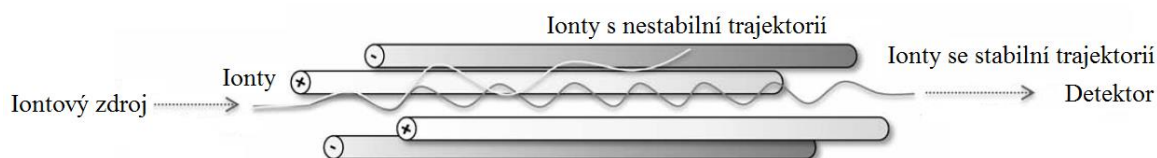
**Obr. 10:** Rozlišení iontů s podobnými  $m/z$

### 2.5.3.1 Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole, Q)

Pravděpodobně nejrozšířenějším analyzátořem ve hmotnostní spektrometrii je analyzátor kvadrupólový (**Obr. 11**), protože má nízké pořizovací náklady. Konstrukci tvoří čtyři kruhové nebo hyperbolické kovové tyče (dokonale rovnoběžné s trajektorií

procházejících iontů), na kterých působí vysokofrekvenční střídavé a stejnosměrné napětí. Na protilehlých tyčích je vždy aplikováno napětí stejné polarita, na sousedních je polarita opačná. Změnou velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí ovlivňujeme propustnost iontů o konkrétním poměru  $m/z$  středem kvadrupólu. Ostatní ionty budou ve stejném okamžiku vychýleny, neprojdou k detektoru a budou zachyceny na tyčích kvadrupólu.

Kvadrupólový analyzátor lze použít ve dvou módech. Prvním z nich je skenovací mód, ve kterém se postupně mění napětí na tyčích, a proto můžeme v krátkých časových intervalech měřit široký rozsah hodnot  $m/z$ . Další možností je tzv. SIM (single ion monitoring) mód, kdy kvadrupól po celou dobu analýzy propouští pouze ionty o zvolené hodnotě  $m/z$ . Výhodou SIM je vyšší citlivost než u skenovacího módu, proto jej využíváme zejména ke kvantifikaci <sup>[32,35,39,41]</sup>.

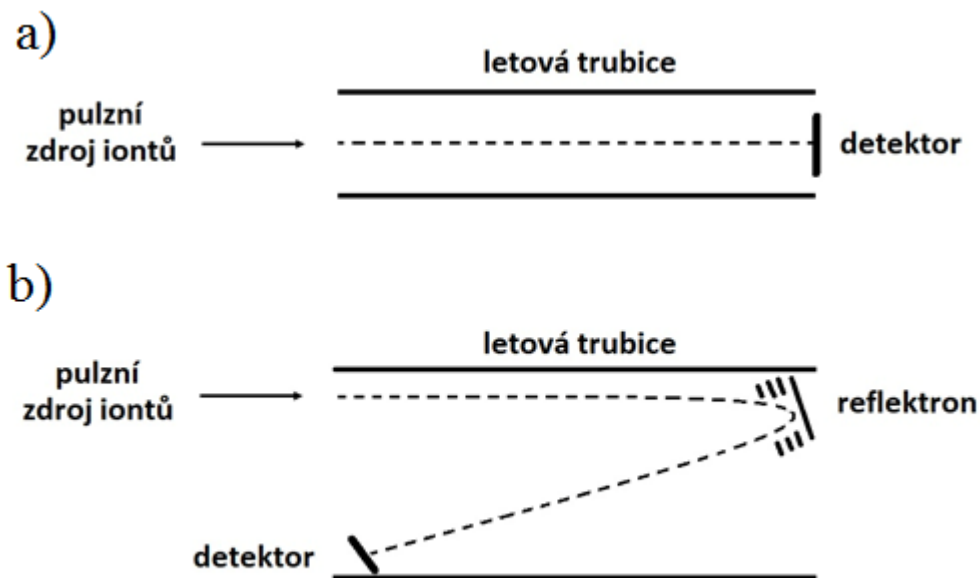


**Obr. 11:** Kvadrupólový analyzátor <sup>[35]</sup>

### 2.5.3.2 Analyzátor doby letu (Time of flight, TOF)

Analyzátor doby letu (**Obr. 12a**) rozlišuje jednotlivé ionty na základě rozdílů v jejich průletu vakuovanou letovou trubicí. Analyzátor pracuje v režimu krátkých iontových pulzů urychlených elektrickým polem. Změřením času, za který ion překoná dráhu mezi jeho zdrojem a detektorem, můžeme jednoduše spočítat jeho poměr  $m/z$ . Výhodou analyzátoru doby letu je jeho vysoká rozlišovací schopnost, teoreticky neomezený hmotnostní rozsah (při spojení s měkkou ionizační technikou) a velmi rychlé měření.

Pokud chceme zvýšit rozlišení TOF analyzátoru, můžeme použít variantu přístroje s reflektorem (reTOF, **Obr. 12b**). Prodloužením dráhy letu iontu získáme vyšší hodnoty doby letu, a tím zpřesnění hodnoty  $m/z$ . Zároveň se eliminuje rozdíl dodaných kinetických energií pomocí průniku do reflektoru, čímž se vyrovná dráha iontů o stejné  $m/z$  a různých kinetických energiích <sup>[32-33,41]</sup>.



Obr. 12: Analyzátor doby letu

### 2.5.3.3 Další druhy analyzátorů

Existuje mnoho dalších typů hmotnostních analyzátorů, které se liší svými měřicími charakteristikami (viz **Tab. I**). Pro každou analýzu může být vhodný jiný analyzátor, ale především rozhoduje cena, a proto na poli hmotnostních analyzátorů dominuje kvadrupól. Analyzátoři typu iontové pasti fungují na podobném principu jako kvadrupól. Na koncích jsou však opatřeny elektrodami, které umožňují zadržovat ionty uvnitř analyzátoru. Nejlepším analyzátořem, co se týče rozlišovací schopnosti, je iontová cyklotronová rezonance (ICR). Ionty zde obíhají po kruhových drahách, následně jsou vybuzeny energetickým pulzem, čímž dojde ke změně poloměru jejich oběžné dráhy. Detekcí proudu, který se vytváří průletem iontů v dosahu detekčních desek v závislosti na čase, získáváme pomocí Fourierovy transformace (FT) úhlové frekvence, které jsou typické pro ionty o určité m/z. Jednodušší a levnější variantou s mírně horšími parametry je Orbitrap. Ionty obíhají okolo vřetenové elektrody a vytvářejí proud na vnějších elektrodách. Stejně jako u ICR zde používáme FT a z měřeného proudu získáváme hmotnostní spektrum <sup>[42]</sup>.

**Tab. I:** Vybrané parametry hmotnostních analyzátorů <sup>[42]</sup>

Hmotnostní analyzátor	Rozlišovací schopnost ( $\times 10^3$ )	Správnost (ppm)	Horní limit rozsahu m/z ( $\times 10^3$ )	Rychlost (Hz)	Lineární dynamický rozsah	Cena
Q	3–5	>5	2–3	2–10	$10^5$ – $10^6$	nízká
IT	4–20	>5	4–6	2–10	$10^4$ – $10^5$	střední
TOF	10–60	1–5	10–20	10–50	$10^4$ – $10^5$	střední
Orbitrap	100–240	3–5	4	1–5	$5 \times 10^3$	vysoká
FT-ICR	1000–10000	0,3–1	4–10	0,5–2	$10^4$	vysoká

## 2.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) nazýváme metodu vícestupňové hmotnostní analýzy. Ve spojení s měkkými ionizačními technikami (ionty nefragmentují ve zdroji) nám umožňuje provádět fragmentační analýzu prekurzorového iontu, čímž získáme bližší informace o jeho struktuře. Fragmentační spektra pomáhají při studiu fyzikálně-chemických vlastností analyzovaných látek, jako jsou např. léčiva, proteiny, nukleové kyseliny atd. <sup>[43]</sup>. Rozlišujeme dva typy uspořádání MS/MS analýzy – v prostoru a v čase. Při analýze v prostoru využíváme nejčastěji zapojení dvou analyzátorů za sebou (dvoustupňová analýza), mezi nimiž se nachází kolizní cela, ve které dochází k fragmentaci. První analyzátor slouží k izolaci prekurzorového iontu, který v kolizní cele obdrží energii vhodně zvolenou aktivační metodou (CID, IRMPD, ...) za vzniku produktových (neboli fragmentových) iontů, které jsou následně separovány pomocí druhého analyzátoru. Uspořádání v prostoru umožňuje i vícestupňovou analýzu (prakticky pouze čtyřstupňovou kvůli postupnému poklesu signálu), se kterou ale roste cena a složitost přístroje. Provádění měření v čase probíhá pouze v jednom analyzátoru na principu iontové pasti (IT, OT, FTICR), ve kterém probíhají všechny úkony a můžeme dosáhnout až osmistupňové analýzy <sup>[44]</sup>, avšak můžeme provádět pouze měření produktových iontů <sup>[32]</sup> na rozdíl od měření v prostoru, kde můžeme provádět také měření neutrálních ztrát.

### 2.6.1 Iontová aktivace (fragmentační mechanismy)

Podle doby životnosti můžeme rozdělit ionty, které chceme fragmentovat, do tří skupin: 1) *stabilní* s životností větší než  $10^{-6}$  s, které jsou detekovány dříve, než dojde k

fragmentaci, 2) *nestabilní* s životností menší než  $10^{-7}$  s, které se rozpadají již v iontovém zdroji, a jsme tak schopni analyzovat pouze jejich fragmenty, a 3) *metastabilní* ionty se střední životností, spontánně fragmentující mezi iontovým zdrojem a detektorem (pravděpodobnost tohoto jevu je okolo 1 %<sup>[33]</sup>). K fragmentaci však může docházet také pomocí tzv. iontové aktivace. K té dochází zvýšením vnitřní energie iontu při interakci s jinou částicí nebo pohlcením elektromagnetického záření. Cílem iontové aktivace je zvýšit pravděpodobnost fragmentace prekurzorového iontu, což vede k lepšímu pochopení struktury sloučeniny<sup>[43]</sup>. V současnosti je známo několik fragmentačních mechanismů, které jsou popsány níže.

#### 2.6.1.1 Kolizně indukovaná disociace (CID)

Jedná se o nejčastěji používanou kolizní techniku v MS/MS. Fragmentace je založena na srážkách iontů s molekulami inertního kolizního plynu (dusík, argon, helium). Při kolizi dochází ke zvyšování vnitřní energie prekurzorového iontu, která vyvolá rozpad částice s daleko vyšší pravděpodobností než u metastabilních iontů. CID probíhá ve dvou krocích, protože rychlost aktivace je obecně řádově vyšší než rychlost disociace. Po nepružné srážce s plynem tedy dochází k rychlé konverzi translační energie na vnitřní energii, která se rozprostře po všech vazbách se stejnou pravděpodobností a uvede ion do excitovaného stavu. Pokud by došlo ke srážce pružné, ionty by pouze změnily směr letu<sup>[44]</sup>. V druhé části procesu nastává disociace nejslabších vazeb (v důsledku předpokládané rovnoměrné distribuce energie)<sup>[33,43]</sup>. Maximální množství energie přenesené srážkou může ovlivnit kinetická a vnitřní energie obou kolidujících částic, přičemž roli hraje také jejich chemické složení a hmotnost<sup>[44]</sup>.

Podle množství dodané energie rozlišujeme vysokoenergetickou aktivaci a nízkoenergetickou aktivaci<sup>[32]</sup>. U vysokoenergetické aktivace se míra dodávané energie pohybuje v jednotkách keV. Probíhá pouze v sektorových, TOF nebo hybridních analyzátoch. Kolizní plyn, nejčastěji helium přiváděné ve formě molekulárního paprsku, předává iontům velké množství energie, čímž dochází k jejich rozsáhlé fragmentaci. Vysoké množství energie předurčuje, že změna kolizních podmínek (tlak teplota, kolizní plyn) nemá téměř žádný vliv, a proto jsou vzniklá fragmentační spektra vysoce reprodukovatelná<sup>[32-33]</sup>. Nízkoenergetická aktivace s kolizní energií (CE) mezi 1 a 100 eV probíhá na přístrojích typu QqQ, iontových pastech (IT, FT-ICR) a hybridních přístrojích (např. QqTOF). Kolizní cela je naplněna inertním kolizním plynem, obvykle dusíkem nebo

argonem, a vícenásobnými srážkami v ní dojde k iontové aktivaci. Velkou roli hraje volba kolizních podmínek (tlak, hmotnost kolizního plynu), které ovlivňují počet srážek. Využití tato technika nachází např. ve farmacii, kde napomáhá k identifikaci metabolitů léčiv <sup>[32,43]</sup>.

#### 2.6.1.2 Ostatní druhy iontové aktivace

Kromě CID bylo vyvinuto několik dalších technik s vlastními jedinečnými vlastnostmi. Jednotlivé metody iontové aktivace se liší zejména v množství dodávané energie a následné míře fragmentace prekurzorového iontu. Povrchově indukovaná disociace (SID – surface induced dissociation) využívá k fragmentaci srážky iontu s povrchem pod úhlem 45°. Oproti CID je SID účinnější při přenosu energie <sup>[33]</sup>, ale může docházet k rozprašování částic na povrchu terče, reakcím iontů s povrchem terče či neutralizaci náboje iontů <sup>[44]</sup>. Jako povrch se užívají kovy nebo oxidy kovů (zlato, křemík) pokryté tenkou vrstvičkou organických látek (např. alkylthiolů) <sup>[33]</sup>. Multifotonová disociace infračerveným zářením (IRMPD – infrared multiphoton dissociation) a termální aktivace (BIRD – blackbody infrared radiative dissociation) využívají aktivaci fotony. U IRMPD proniká laserový paprsek infračerveného záření do ICR nebo IT cely a ionty absorbují jeho energii, dokud nedojde k jejich fragmentaci. Stejně probíhá excitace u BIRD, kde však záření vychází ze zahřátých stěn cely <sup>[44]</sup>. Disociace záchytem elektronu (ECD – electron capture dissociation) a disociace přenosem elektronu (ETD – electron transfer dissociation) slouží především k aktivaci vícenásobně nabitých iontů, které v případě ECD interagují s nízkoenergetickými elektrony (<0,2 eV <sup>[43]</sup>) za tvorby iontů s lichým počtem elektronů. Část iontu, která obsahuje nepárový elektron, díky přebytku energie fragmentuje. Stejného principu se využívá u ETD, pouze elektrony jsou v tomto případě generovány reakcí vícenásobně nabitých kationtů s anionty, které slouží jako donory elektronů (anthracen, fluoranthen, azulen atd.) <sup>[44]</sup>. Jako poslední zmiňme samovolnou fragmentaci metastabilních iontů za zdrojem (PSD – post source decay), kterou lze pozorovat v MALDI-reTOF. Všechny popsané metody jsou porovnány v **Tab. II.**

**Tab. II:** Srovnání iontových aktivací

Aktivační metoda	Hodnoty energií	Hmotnostní spektrometr	Výhody a nevýhody (srovnání s CID)
CID	vysoké	tandemový TOF, sektor	-
CID	nízké	QqQ, IT, QqTOF, QqIT, FTICR	
SID	vysoké	tandemový TOF, reTOF	Dostupnost na mnoha přístrojích. Efektivnější konverze energie. Při analýze na FTICR dosahuje lepšího rozlišení.
SID	nízké	QqQ, IT, FTICR	
IRMPD	nízké	FTICR, IT	Neselektivní metoda s dobře definovaným množstvím dodávané energie se srovnatelnou účinností. U FTICR rychlejší měření. Nevýhodou je vysoká cena a nejednoduchost určení fragmentační cesty bohatá fragmentační spektra
BIRD	nízké	FTICR, IT	Charakterizace fragmentačních drah díky zjištění prahových energií. BIRD je nejpomalejší technika.
ECD	nízké	FTICR	Disociace biomolekul na mnoha místech, energie není na všech vazbách stejná, takže metoda má odlišné způsoby fragmentace.
ETD	nízké	IT	
PSD	nízké	reTOF	Velmi citlivá technika umožňující studium metastabilních iontů.

### 2.6.2 Trojitý kvadrupól (QqQ)

Trojité kvadrupól se stal velmi oblíbenou variantou analyzátoru vzhledem k reprodukovatelným hmotnostním spektrům (vysoká citlivost) a nízké pořizovací ceně [35]. Jak již název napovídá, jde o spojení tří kvadrupólů v režimu MS/MS v prostoru, kdy dva kvadrupóly fungují jako analyzátor (Q1, Q2) a mezi nimi se nachází třetí, sloužící jako kolizní cela (q). Do něj je přiváděn kolizní plyn (např. dusík, argon), který se sráží s ionty přiváděnými z Q1 a předává jim energii, která způsobuje jejich následný rozpad. Jelikož QqQ disponuje dvěma analyzátorů, můžeme skenovat ve čtyřech módech:



- 1) **Snímání produktových iontů** – skenujeme všechny fragmentové ionty, které vznikly po fragmentaci v kolizní cele z předem definovaného prekurzorového iontu. Tento mód slouží hlavně k získání podrobnějších informací o prekurzorovém iontu (např. četnost fragmentů) <sup>[32]</sup>.
- 2) **Snímání prekurzorových iontů** – opačný mód k módu prvnímu, skenujeme prekurzory, ze kterých se po fragmentaci uvolňuje produkt o vybrané hodnotě m/z. Mód nachází využití např. u látek se stejnou funkční skupinou <sup>[35]</sup>, nebo k hledání potenciálních prekurzorů k výrobě konkrétních sloučenin <sup>[32]</sup>.
- 3) **Snímání neutrálních ztrát** – spočívá ve snímání všech prekurzorů a produktů lišících se mezi sebou o určitou nominální hodnotu m/z způsobenou ztrátou neutrálního fragmentu. Můžeme tak určit, o jakou skupinu látek se jedná (např. nitrolátky odštěpují NO<sub>2</sub> skupinu). Využití nachází tento mód i při screeningu metabolických chorob <sup>[43]</sup>.
- 4) **Snímání vybrané reakce (SRM – selected ion monitoring)** – soustředí se pouze na jednu fragmentační reakci (tzv. přechod). Oba analyzátoři jsou nastaveny na konkrétní hodnotu m/z, tedy neprobíhá skenování. Výhodou tohoto módu je vysoká citlivost a rychlost analýzy. V literatuře lze najít i označení MRM (multiple reaction monitoring), což je v podstatě více SRM událostí v jedné analýze <sup>[36,44]</sup>.

### 2.6.3 Kvadrupól – analyzátor doby letu (Q-TOF)

Jedná se o jednoduché hybridní spojení kvadrupólového analyzátoru, kolizní cely a analyzátoru doby letu. Velkou výhodou systému Q-TOF je vysoká rychlost a přesnost měření a vysoká rozlišovací schopnost. Zatímco trojitý kvadrupólový analyzátor nachází nejčastěji uplatnění v kvantitativní analýze, Q-TOF se nejvíce používá pro strukturální analýzu, protože umožňuje vysoce přesné měření m/z <sup>[33,42]</sup>. Q-TOF pracuje v módu snímání produktových iontů: kvadrupól slouží k selekci prekurzorového iontu, který je následně fragmentován, a vzniklé produktové ionty analyzujeme s vysokým rozlišením pomocí TOFu. Tento hybridní analyzátor použili např. Banoub a kol. k objasnění struktury ligninu <sup>[45]</sup>.

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Chemikálie

Methanol (HPLC – gradient grade, Fisher Scientific, UK), deionizovaná voda (Millipore, Francie), p-kumarylalkohol (99%, Phytolab, Německo), koniferylalkohol (98%, Sigma-Aldrich, Německo), sinapylalkohol (technical grade – 80%, Sigma-Aldrich, Německo)

#### 3.2 Instrumentální vybavení

K analýze vzorků byl použit hmotnostní spektrometr Q-TOF Premier (Waters, UK) s iontovým zdrojem ESI v negativním módu. Pro přívod vzorku byl použit ultraúčinný kapalinový chromatograf Acquity UPLC H-Class (Waters, UK) s tlakovým rozsahem 0-1034,2 bar a s PDA detektorem s rozsahem vlnových délek 190–500 nm.

#### 3.3 Příprava vzorků

Zásobní roztoky standardů p-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny rozpuštěním příslušných standardů ve směsi MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1 (v:v). Pracovní roztoky standardů o nižších koncentracích byly připraveny ředěním výše uvedených roztoků standardů směsí MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1 (v:v).

#### 3.4 Podmínky hmotnostně-spektrometrických měření

Optimalizované parametry hmotnostního spektrometru, při kterých byla prováděna MS analýza a tandemová hmotnostně-spektrometrická analýza, jsou zaznamenány v **Tab. III**. Vždy byl sledován stejný počet skenů (oblast píku ve FIA), ze kterých byla tvořena kombinovaná spektra. Jednalo se o signál ze skenů 45–123 (tj. čas 0,38–1,03 min), od kterých byl odečten signál pozadí ze skenů 23–44 a 131–154 (tj. časy 0,19–0,37 min a 1,10–1,29 min). Vybraný časový úsek odpovídá oblasti píku analytu ve FIA analýze a odečítaný signál pak představuje okolí tohoto píku.

**Tab. III:** Optimalizované parametry hmotnostního spektrometru pro MS analýzy a tandemové hmotnostně-spektrometrické analýzy

<b>Parametr</b>	<b>Hodnota</b>
Capillary voltage [kV]	2,0
Sampling cone [V]	20,0
Extraction cone [V]	4,0
Source temperature [°C]	120
Desolvation temperature [°C]	400
Cone gas flow [l/hod]	0
Desolvation gas flow [l/hod]	600
Trap collision energy [eV]	5–60
Trap gas flow [ml/min]	1,5
Rychlost průtoku mobilní fáze [μl/min]	100
Složení mobilní fáze MeOH:H <sub>2</sub> O [v:v]	4:1

## 4 Diskuze a výsledky

Cílem práce byla optimalizace parametrů iontového zdroje pro získání co nejvyšší intenzity pseudomolekulárních iontů p-kumarylalkoholu ( $[M-H]^- = 149$ ), koniferylalkoholu ( $[M-H]^- = 179$ ) a sinapylalkoholu ( $[M-H]^- = 209$ ), které byly následně podrobeny tandemovému hmotnostně-spektrometrickému měření. Z naměřených kolizních spekter byly určeny fragmentační produkty prekurzorového iontu získané při použití různých hodnot kolizní energie. Pro optimalizaci parametrů iontového zdroje bylo použito měření v MS módu (s využitím TOF analyzátoru) a pro získání tandemově-hmotnostních spekter pak MS/MS měření s využitím kombinace QqTOF. Při všech analýzách byl jako iontový zdroj použit ESI v negativním módu, jelikož fenoly/alkoholy jsou v tomto módu obecně lépe detekovatelné<sup>[46]</sup>.

### 4.1 Optimalizace parametrů iontového zdroje

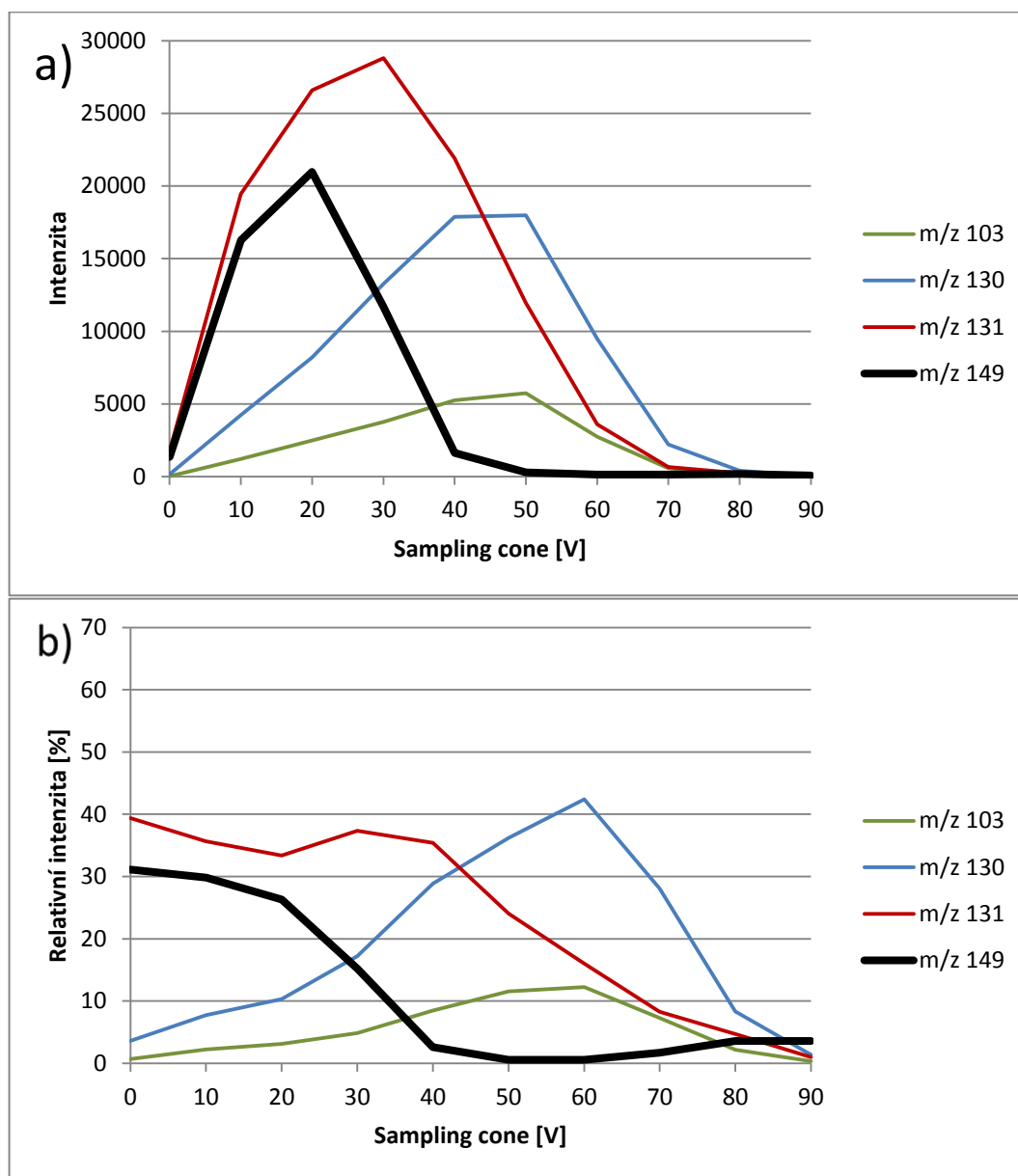
Optimalizace parametrů iontového zdroje (sampling cone, extraction cone) spočívala ve změně parametrů po předem určených krocích za účelem nalezení podmínek poskytujících: (1) co nejvyšší intenzitu prekurzorového iontu, (2) co nejvyšší relativní poměr intenzity píků prekurzorových iontů p-kumarylalkoholu ( $m/z$  149), koniferylalkoholu ( $m/z$  179) a sinapylalkoholu ( $m/z$  209) vůči sumě všech kvantifikovaných iontů v jejich spektrech (včetně jejich fragmentačních produktů) a (3) co nejvyšší relativní hodnotu intenzity celkového iontového proudu.

#### 4.1.1 Optimalizace napětí na sampling cone

Jako první byl testován vliv změny napětí na sampling cone. Na grafech (**Obr. 13–15**) je postupně pro všechny tři zkoumané monolignoly znázorněna změna intenzity prekurzorového iontu a dalších významných iontů z MS spektra v závislosti na měnícím se napětí na sampling cone v rozsahu 0–90 V a krocích po 10 V. Vždy byly cíleně měřeny stejné počty skenů, aby data šla mezi sebou porovnávat. **Příloha i, Tab. I–III** obsahují hodnotu intenzity prekurzorových iontů, relativní poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzity píků iontů ve spektru a relativní poměr intenzity iontového proudu vůči sumě iontových proudů při sampling cone v rozsahu 0–90 V pro jednotlivé analyty (p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol).

Graf na **Obr. 13a** reflektuje absolutní intenzitu signálu jednotlivých iontů, avšak hodnoty mohou podléhat chybě vzniklé kolísáním celkového signálu hmotnostního

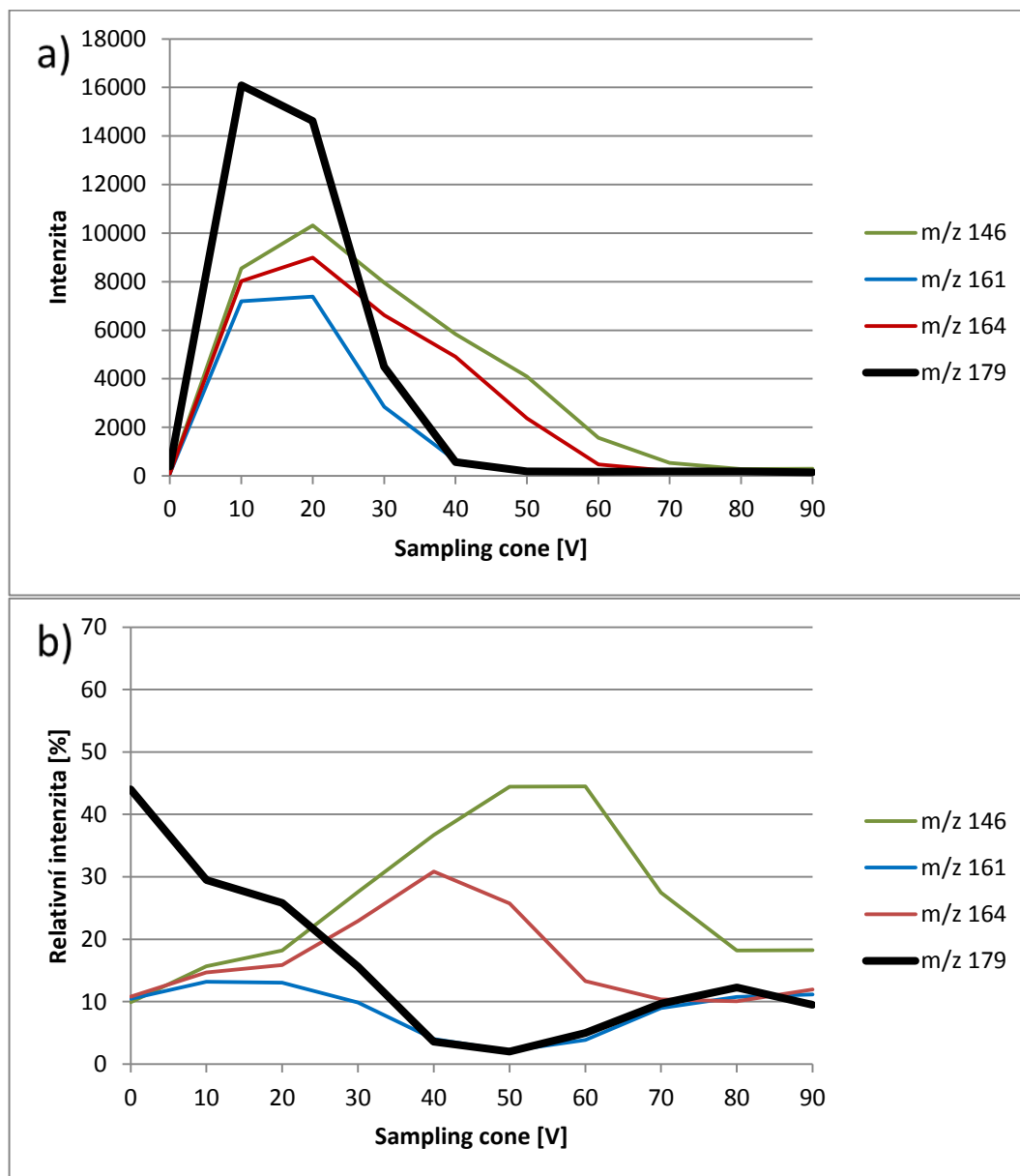
analyzátoru, proto byl ze stejných dat zkonstruován rovněž graf s hodnotami relativních intenzit poukazující zejména na poměry sledovaných iontů (**Obr. 13b**).



**Obr. 13:** a) absolutní a b) relativní intenzity vybraných iontů při MS analýze roztoku standardu p-kumarylalkoholu (prekurzorový iont m/z 149) v závislosti na změně napětí na sampling cone; prekurzorový iont je vyznačen tučně

Jako optimální hodnota sampling cone bylo zvoleno 20 V, jelikož prekurzorový iont (m/z 149) při této hodnotě vykazoval nejvyšší hodnotu absolutní intenzity a třetí nejvyšší relativní poměr intenzity vůči sumě iontů ve spektru. Zároveň toto měření vykazovalo i celkově vysokou hodnotu intenzity iontového proudu. Při použití hodnot

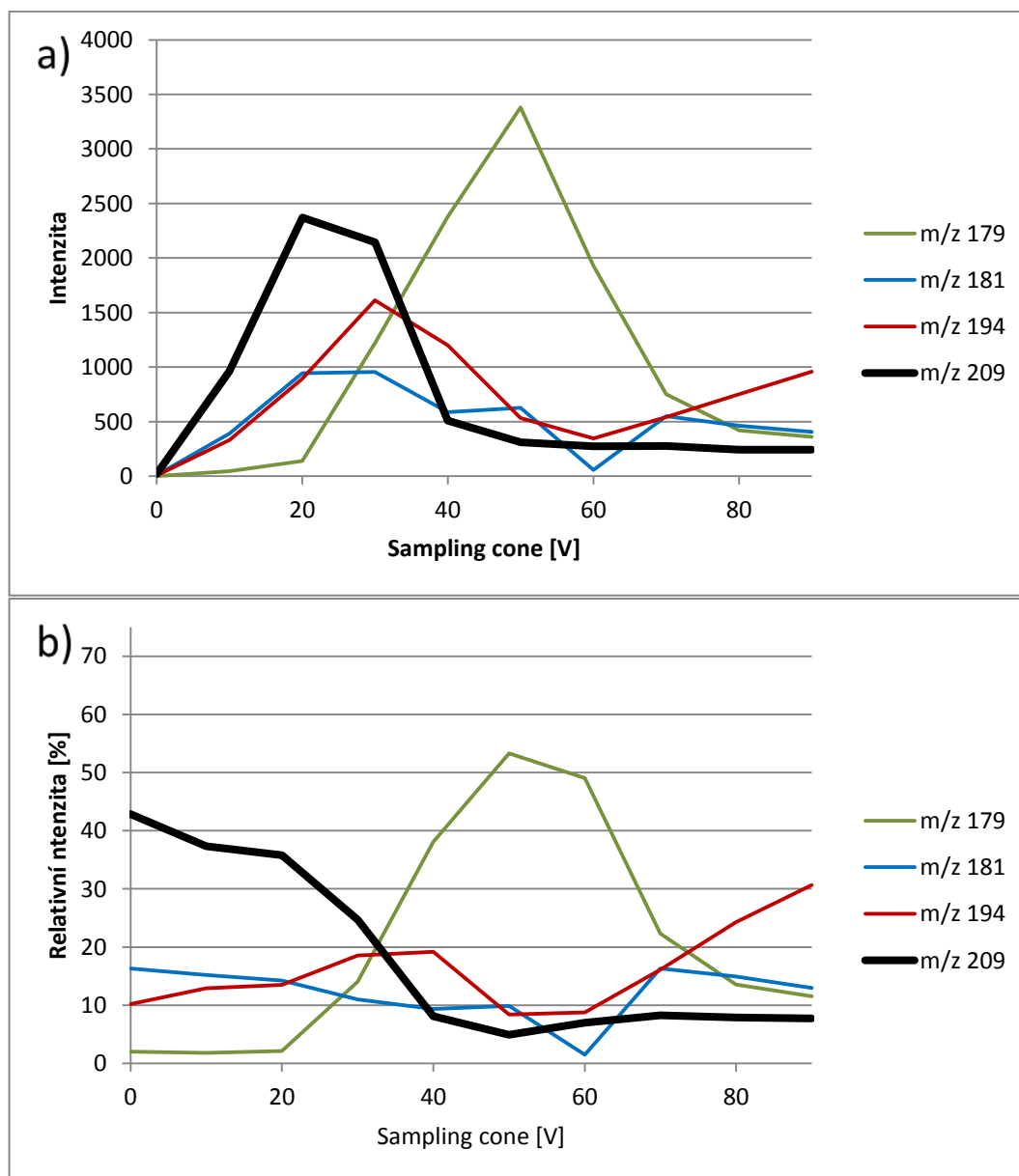
sampling cone v rozmezí 60–90 V výrazně klesala celková intenzita iontového proudu – tento trend je viditelně reflektován v grafech absolutní intenzity všech analyzovaných monolignolů.



**Obr. 14:** a) absolutní a b) relativní intenzity vybraných iontů při MS analýze roztoku standardu koniferylalkoholu (prekurzorový iont m/z 179) v závislosti na změně napětí na sampling cone; prekurzorový iont je vyznačen tučně

Jako optimální hodnota sampling cone bylo zvoleno 20 V. Přestože při této hodnotě neměl prekurzorový iont (m/z 179) nejvyšší intenzitu, naměřené spektrum dosáhlo jednoznačně nejvyšší hodnoty celkové intenzity iontového proudu. Na rozdíl od

p-kumarylalkoholu má koniferylalkohol optima všech vedlejších sledovaných iontů v rozmezí sampling cone 10–20 V, což odpovídá optimu prekurzorového iontu. Relativní intenzity všech iontů jsou proto v tomto rozmezí poměrně stabilní a nelze jednoduše získat vyšší výtěžek prekurzoru na úkor ostatních iontů.



**Obr. 15:** a) absolutní a b) relativní intenzity vybraných iontů při MS analýze roztoku standardu sinapylalkoholu (prekurzorový iont m/z 209) v závislosti na změně napětí na sampling cone; prekurzorový iont je vyznačen tučně

Stejně jako u předchozích alkoholů byla u sinapylalkoholu vybrána hodnota sampling cone 20 V, a to z důvodu nejvyšší absolutní intenzity prekurzorového iontu (m/z

209) a vysokého relativního poměru intenzity prekurzorového iontu vůči ostatním přítomným iontům při této hodnotě. Při srovnání grafů (**Obr. 13–15**) MS analýzy standardů všech tří alkoholů nalezneme odlišnost u koniferylalkoholu, protože všechny pozorované ionty mají optimum v podobné oblasti hodnot sampling cone jako prekurzorový iont (m/z 179). Podobný trend sleduje i sinapylalkohol, avšak jeden ze sledovaných iontů (m/z 179) preferuje vyšší hodnotu. Jelikož se pravděpodobně jedná o ion vzniklý tzv. in-source fragmentací (kdy prekurzor fragmentuje přímo v iontovém zdroji) odpovídající ztrátě dvou methylových radikálů (viz kapitola 4.4), předpokládáme, že k jeho vzniku je potřeba vyšší energie, která může být poskytnuta mj. právě nastavením sampling cone. U p-kumarylalkoholu se optima jednotlivých iontů odlišují více, což může souviset s mechanismem vzniku pozorovaných iontů, u nichž předpokládáme původ v in-source fragmentaci.

Na základě získaných dat byl vybrán rozsah hodnot, v němž byly dosaženy nejlepší výsledky (s ohledem na absolutní intenzitu prekurzorového iontu, relativní intenzitu prekurzorového iontu vůči všem iontům ve spektru a celkovou hodnotu iontového proudu v měření) a v něm byla provedena další dvě opakování měření. Jednalo se o hodnoty sampling cone 10–40 V pro všechny tři zkoumané monolignoly (výsledky jsou shrnuty v **Tab. IV–VI**).

**Tab. IV:** Intenzita signálu p-kumarylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty sampling cone

Sampling cone [V]	Intenzita iontu m/z 149 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
10	16490 ±403	29,35 ±0,50	13,12 ±0,16
20	21051 ±263	26,21 ±0,11	25,53 ±0,40
30	12242 ±380	15,46 ±0,20	30,05 ±0,55
40	1862 ±172	2,84 ±0,15	31,30 ±0,71

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (sampling cone 10–40 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními



**Tab. V:** Intenzita signálu koniferylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty sampling cone

Sampling cone [V]	Intenzita iontu m/z 179 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
10	9083 ±4954	29,59 ±0,46	6,85 ±9,26
20	10188 ±3176	24,89 ±0,68	19,60 ±10,87
30	4830 ±319	15,33 ±0,18	24,57 ±1,30
40	760 ±140	3,96 ±0,27	29,40 ±5,25

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (sampling cone 10–40 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními

**Tab. VI:** Intenzita signálu sinapylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty sampling cone

Sampling cone [V]	Intenzita iontu m/z 209 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
10	2324 ±1024	39,39 ±1,50	8,76 ±0,41
20	4622 ±1709	36,87 ±0,76	22,89 ±0,87
30	3957 ±1399	25,50 ±0,62	32,25 ±2,15
40	1022 ±380	7,94 ±0,19	36,10 ±1,70

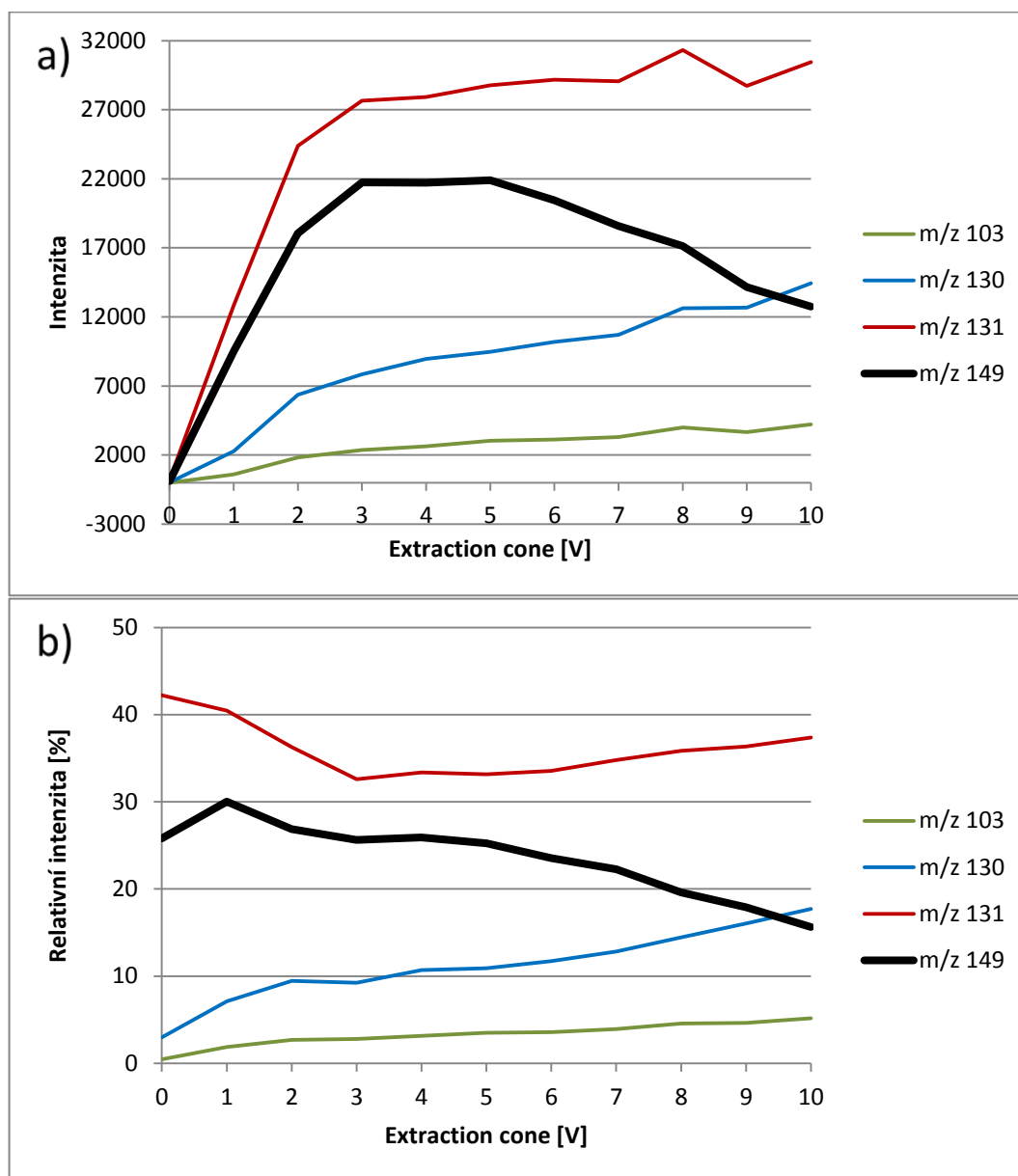
<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (sampling cone 10–40 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními

Na základě naměřených hodnot celkového iontového proudu, absolutní intenzity prekurzorového iontu a poměru intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru (uvedených v **Tab. IV–VI**) byla jako optimální pro všechny tři alkoholy vybrána hodnota sampling cone 20 V. Zároveň byl brán zřetel na poměrně široké kroky (po 10 V), ale zúžení kroků by pravděpodobně nevedlo k velkému zvýšení výtěžků prekurzorů.

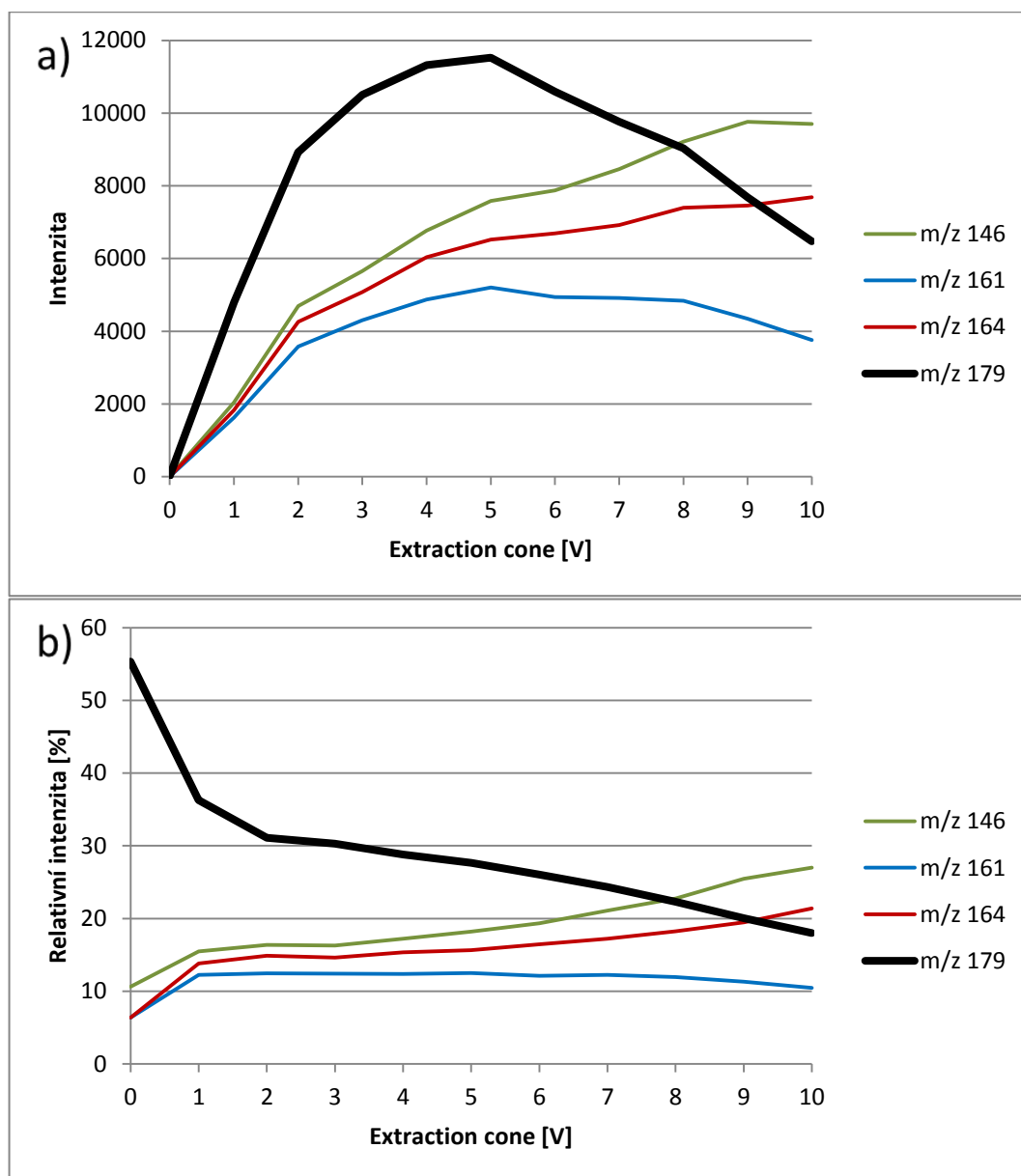
#### 4.1.2 Optimalizace napětí na extraction cone

Druhým optimalizovaným parametrem byla hodnota napětí na extraction cone. Počáteční měření byla provedena v celém rozsahu stroje (tj. 0–10 V) s kroky po 1 V. Na grafech (**Obr. 16–18**) je postupně pro všechny tři zkoumané monolignoly znázorněna změna intenzity prekurzorového iontu a dalších iontů z MS spektra vzniklých degradací p-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylakoholu v závislosti na měnícím se napětí

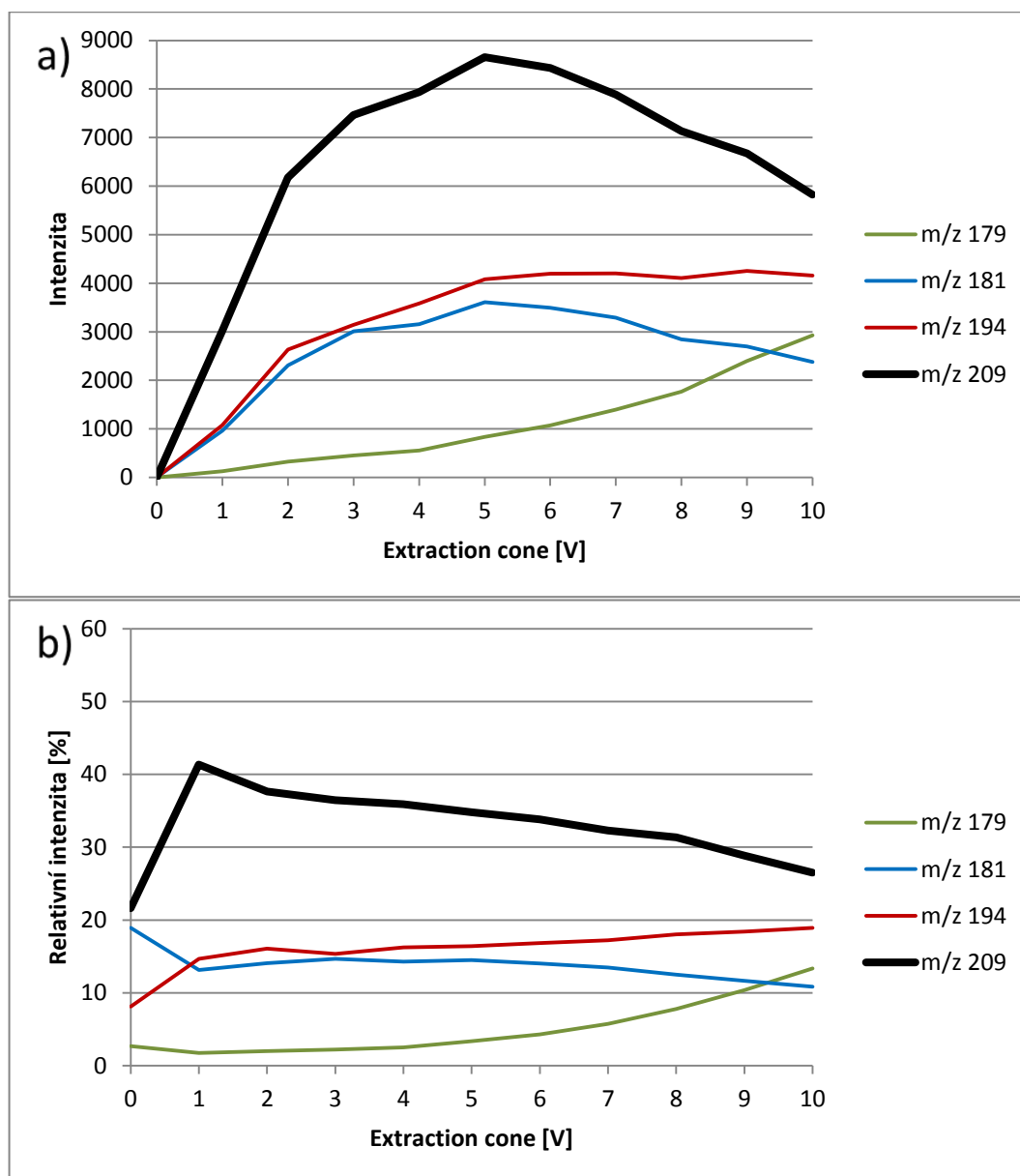
na extraction cone v rozsahu 0–10 V a krocích po 1 V. Hodnoty jsou shrnuty v **Příloze ii – Tab. I–III.**



**Obr. 16:** a) absolutní a b) relativní intenzity vybraných iontů při MS analýze roztoku standardu p-kumarylalkoholu (prekurzorový iont m/z 149) v závislosti na změně napětí na extraction cone; prekurzorový iont je vyznačen tučně



**Obr. 17:** a) absolutní a b) relativní intenzity vybraných iontů při MS analýze roztoku standardu koniferylalkoholu (prekurzorový iont m/z 179) v závislosti na změně napětí na extraction cone; prekurzorový iont je vyznačen tučně



**Obr. 18:** a) absolutní a b) relativní intenzity vybraných iontů při MS analýze roztoku standardu sinapylalkoholu (prekurzorový iont m/z 209) v závislosti na změně napětí na extraction cone; prekurzorový iont je vyznačen tučně

Při optimální hodnotě sampling cone (20 V) neovlivňují hodnoty extraction cone signál významným způsobem, ale i přesto má optimalizace tohoto parametru smysl. U p-kumarylalkoholu a koniferylalkoholu lze vypočítat, že ionty s nižšími hodnotami m/z mají hodnoty optim posunuty směrem k vyšším hodnotám extraction cone. U sinapylalkoholu tuto tendenci vykazuje opět iont s m/z 179, ale všechny ostatní sledované ionty mají optima téměř shodná s prekurzorem (m/z 209). Na základě získaných dat byla provedena další dvě opakování měření pro hodnoty extraction cone v rozsahu 3 – 6 V pro

p-kumarylalkohol a koniferylalkohol (shrnutí v **Tab. VII** a **VIII**) a 4 – 6 V pro sinapylalkohol (shrnutí v **Tab. IX**). Pro sinapylalkohol není uvedeno opakování pro hodnotu 3 V z důvodu poklesu maxima intenzity prekurzorového iontu o více než 10 %.

**Tab. VII:** Intenzita signálu p-kumarylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty extraction cone

Extraction cone [V]	Intenzita iontu m/z 149 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
3	21743 ±161	25,92 ±0,24	20,29 ±0,05
4	22206 ±362	25,20 ±0,51	20,88 ±0,53
5	22064 ±116	24,30 ±0,66	22,35 ±0,04
6	20974 ±384	23,11 ±0,30	22,07 ±0,94

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (extraction cone 3-6 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními

**Tab. VIII:** Intenzita signálu koniferylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty extraction cone

Extraction cone [V]	Intenzita iontu m/z 179 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
3	11091 ±473	29,91 ±0,28	18,95 ±0,60
4	11717 ±353	28,65 ±0,10	22,05 ±0,93
5	11189 ±711	27,54 ±0,31	21,56 ±0,31
6	10558 ±686	25,88 ±0,12	22,14 ±0,23

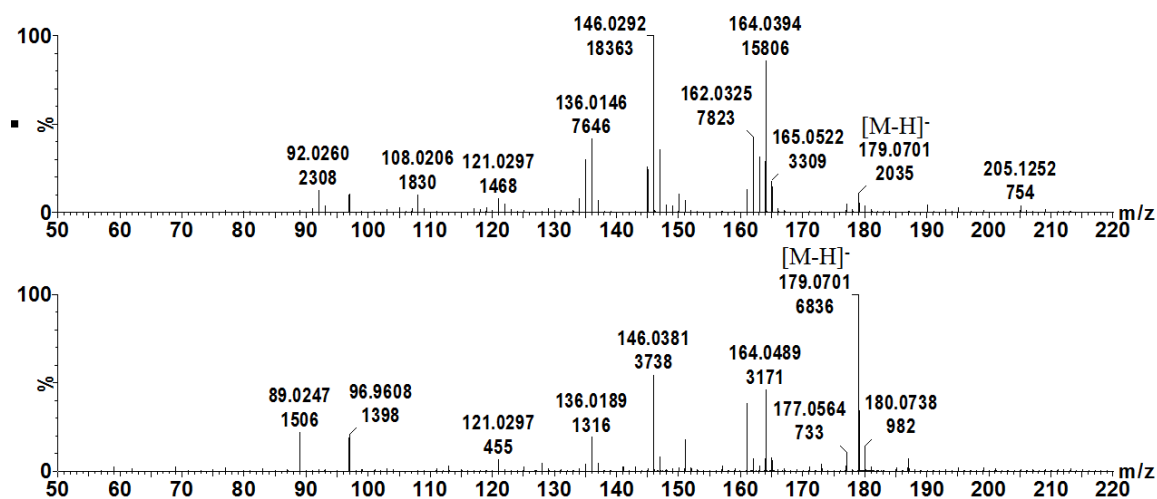
<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (extraction cone 3-6 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními

**Tab. IX:** Intenzita signálu sinapylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty extraction cone

Extraction cone [V]	Intenzita iontu m/z 209 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
4	8047 ±111	35,41 ±0,40	31,91 ±0,19
5	8236 ±299	34,44 ±0,26	33,35 ±0,09
6	8106 ±244	33,11 ±0,51	34,74 ±0,28

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (extraction cone 4-6 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními

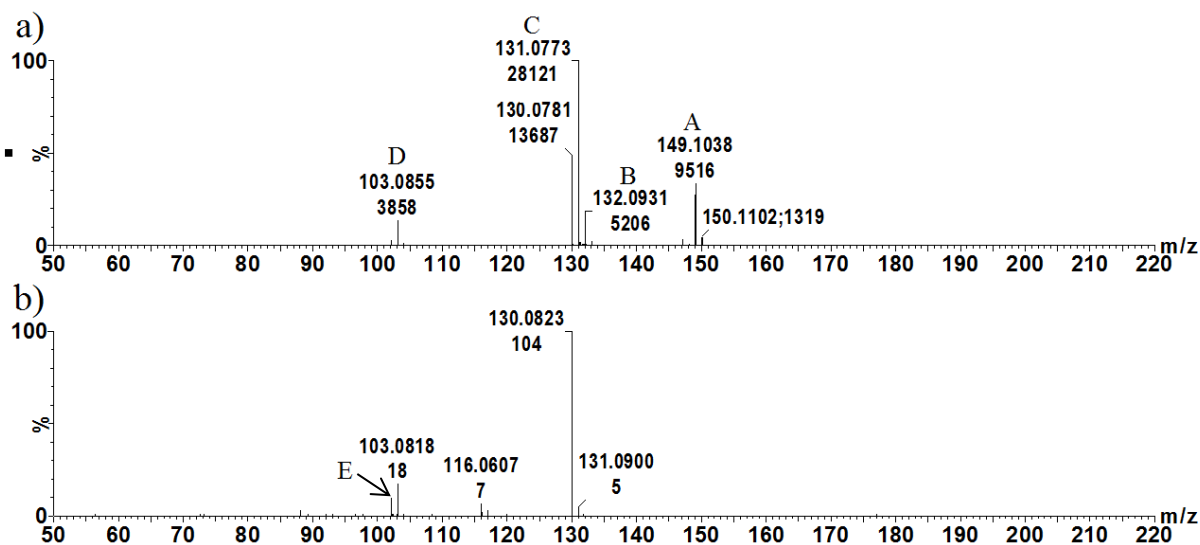
Na základě naměřených hodnot celkového iontového proudu, absolutní intenzity prekurzorového iontu a poměru intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru (uvedených v **Tab. VII – IX**) byla pro všechny tři alkoholy vybrána jako optimální hodnota extraction cone 4 V. Pro ilustraci je na **Obr. 19** porovnán rozdíl vzhledu hmotnostního spektra koniferylalkoholu ve skenovacím MS módu při měření za neoptimalizovaných – výchozích – podmínek stroje (parametry neuváděny) a optimalizovaných (viz kapitola 3.4) podmínek. Z tohoto porovnání vyplývá, že bez důkladné počáteční optimalizace parametrů iontového zdroje můžeme zbytečně ztrácet signál analytu – někdy až do té míry, že cílový iont se stává pouze minoritní složkou spektra.



**Obr. 19:** Rozdíl hmotnostních spekter koniferylalkoholu při měření a) za neoptimalizovaných podmínek a b) optimalizovaných podmínek

## 4.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie p-kumarylalkoholu

Za podmínek nastavení iontového zdroje uvedených v kapitole 3.4 v **Tab. III** bylo následně na stejném přístroji provedeno MS/MS měření, při němž byl na kvadrupólu izolován prekurzorový iont  $[M-H]^-$  s m/z 149, který byl následně fragmentován při hodnotách kolizní energie v rozmezí 5–60 eV (v krocích po 5 eV). Intenzity produktů se podstatně liší v závislosti na míře dodávané kolizní energie (**Obr. 20**). Fragmentační produkty, které se nám podařilo identifikovat, jsou shrnuty v **Tab. X**. Jejich intenzity jsou pak uvedeny v **Příloze iii – Tab. I** a znázorněny na **Obr. 21**.

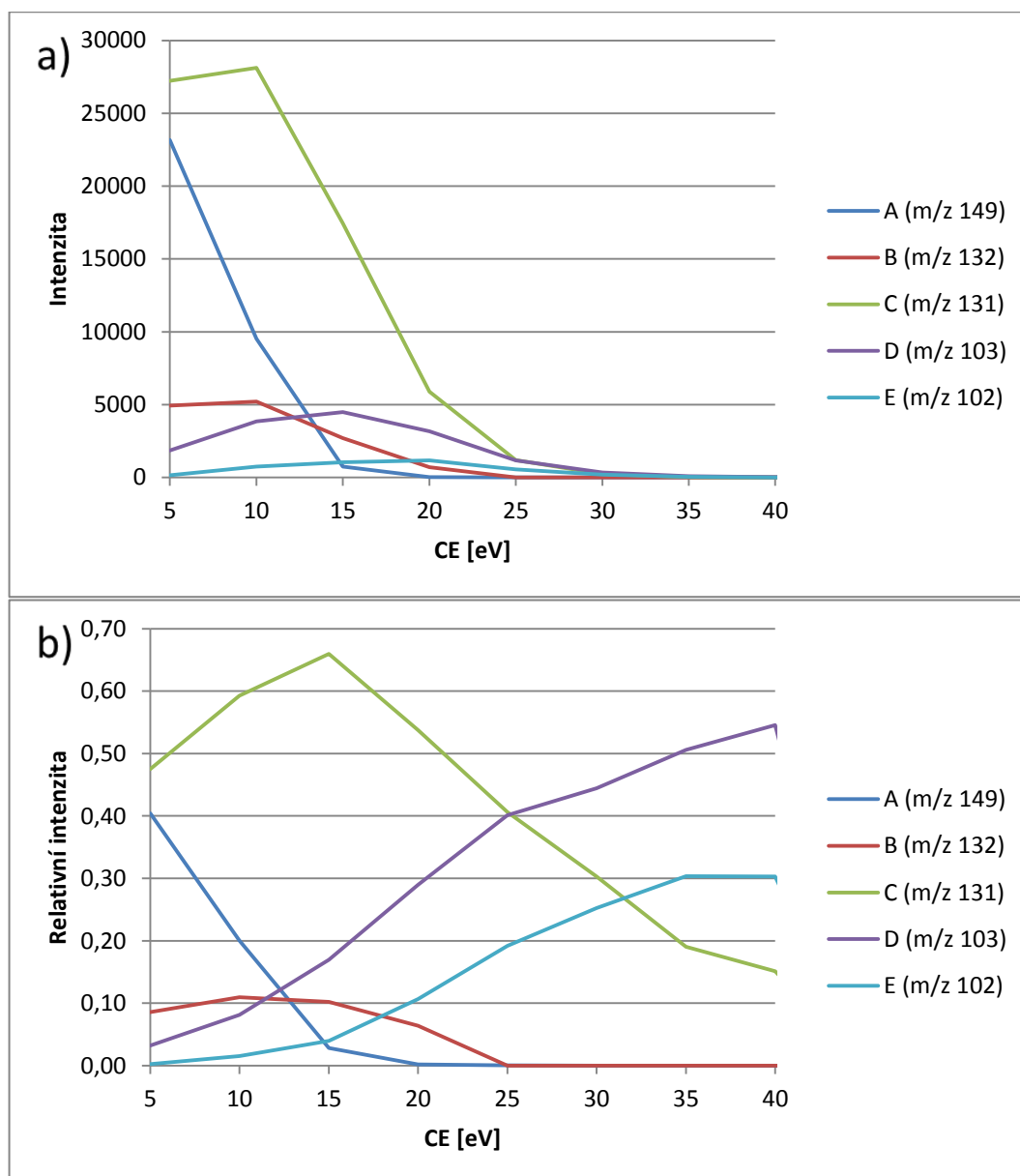


**Obr. 20:** Tandemová hmotnostní spektra prekurzorového iontu p-kumarylalkoholu ( $m/z$  149) při (a) CE = 10 eV a (b) CE = 40 eV

Z prezentovaných spekter (**Obr. 20**) vyplývá, že s nárůstem CE kompletně mizí signál prekurzorového iontu ( $m/z$  149) a vzrůstají výtěžky iontů s nižšími hodnotami  $m/z$ . Tento trend detailněji popisují **Příloha iii – Tab. I** a grafy na **Obr. 21**.

**Tab. X:** Identifikované fragmentační produkty p-kumarylalkoholu

Fragmentační produkt	Experimentální $m/z$	Teoretická $m/z$	Absolutní chyba [mDa]	Struktura iontu
A	149,0948	149,0603	-34,5	$[M-H]^-$
B	132,0931	132,0531	-40,0	$[M-H-OH]^{*-}$
C	131,0773	131,0453	-32,0	$[M-H-H_2O]^-$
D	103,0855	103,0503	-35,2	$[M-H-CO-OH]^{*-}$
E	102,0766	102,0425	-34,1	$[M-H-CO-H_2O]^-$



**Obr. 21:** a) absolutní a b) relativní intenzity fragmentačních produktů p-kumarylalkoholu v závislosti na dodávané CE

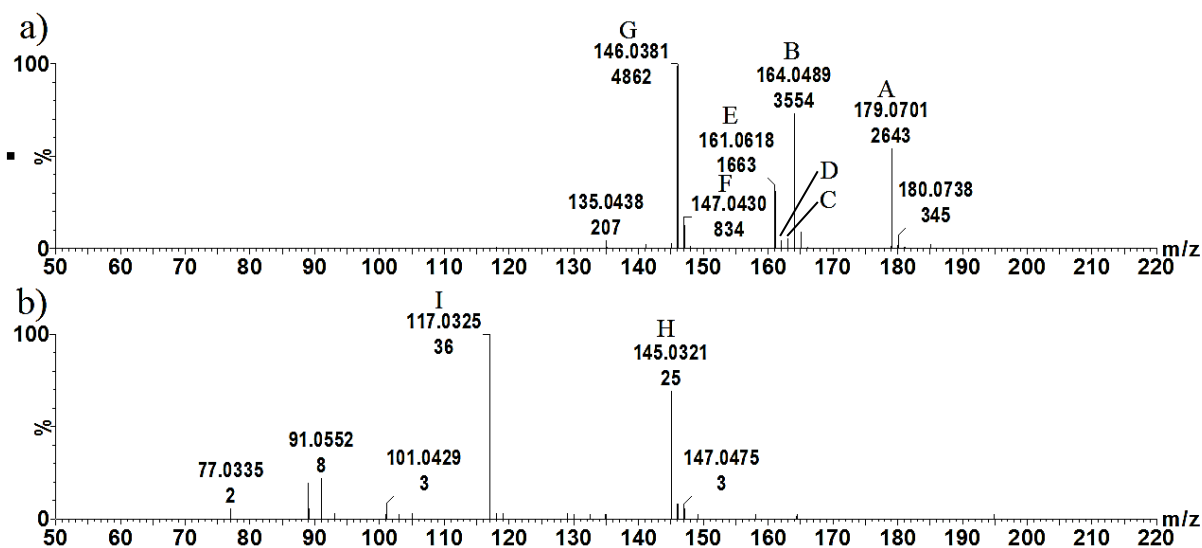
V grafu nejsou zobrazeny vyšší hodnoty kolizní energie (45–60 eV), přestože příslušná měření byla provedena, protože získaná kolizní spektra již poskytovala příliš slabý signál. Hodnoty v grafu (**Obr. 21b**) odpovídají poměru hodnoty intenzity daného iontu vůči sumě všech iontů v daném spektru. Graf s relativními hodnotami je uveden pro lepší přiblížení poměru vznikajících iontů, protože celková intenzita iontového proudu s rostoucími hodnotami CE klesala, jak lze vidět v grafu na **Obr. 21a**.



Naměřená data naznačují, že při dodání kolizní energie v rozmezí 5–10 eV odštěpuje p-kumarylalkohol molekulu vody (za vzniku iontu C) a hydroxylový radikál (iont B). Při použití vyšší kolizní energie (15–30 eV) se odštěpuje kromě vody také oxid uhelnatý (za vzniku iontu E), který se odštěpuje také s hydroxylovým radikálem (iont D). Zajímavostí je, že odštěpení oxidu uhelnatého je vždy vázáno na jinou ztrátu a v žádném z naměřených spekter nebyl pozorován významný pík odpovídající iontu  $[M-H-CO]^-$  (tj.  $m/z$  121). Dle očekávání leží optimum pro ionty s nižšími hodnotami  $m/z$  v oblasti vyšších CE (pro jejich vznik je potřeba přerušit více vazeb, k čemuž je potřeba dodat více energie). Použití vyšších hodnot kolizní energie (tj. 35–60 eV) již podstatně snižuje celkovou intenzitu spektra. Ve spektrech jsme pozorovali i další ionty, ale z důvodu nízké intenzity a vysoké odchylky od správné hmoty nebylo možné spolehlivě určit jejich identitu.

### 4.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie koniferylalkoholu

Stejným postupem byl analyzován také koniferylalkohol: izolován byl prekurzorový iont  $[M-H]^-$  s  $m/z$  179, který byl následně fragmentován s využitím kolizní energie v rozmezí 5–60 eV (v krocích po 5 eV). I u něj se poměry intenzit produktů liší v závislosti na míře dodávané kolizní energie (**Obr. 22**). Zároveň se nám podařilo identifikovat velké množství fragmentačních produktů, které jsou shrnuty v **Tab. XI** (oproti p-kumarylalkoholu obsahuje struktura koniferylalkoholu více substituentů, a proto má větší variabilitu při fragmentaci). Intenzity těchto produktů jsou pak uvedeny v **Příloze iii – Tab. II** a znázorněny na **Obr. 23**.

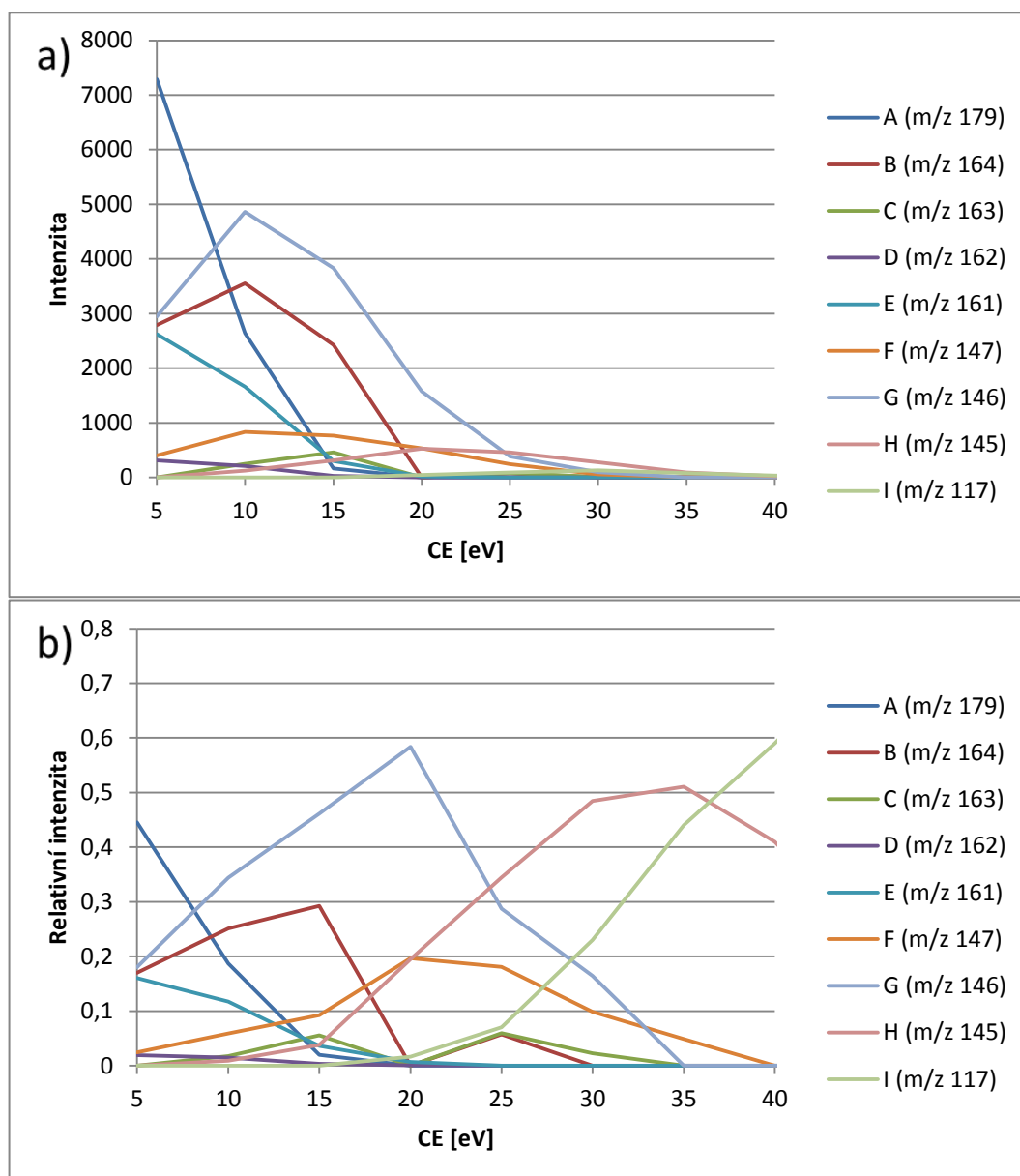


**Obr. 22:** Tandemová hmotnostní spektra prekurzorového iontu koniferyalkoholu ( $m/z$  179) při (a) CE = 10 eV a (b) CE = 40 eV

Také v tomto případě s nárůstem CE kompletně mizí signál prekurzorového iontu ( $m/z$  179) a výtěžky se posouvají k iontům s nižšími hodnotami  $m/z$  (viz **Obr. 22**). Tento trend detailněji popisují **Příloha iii – Tab. II** a grafy na **Obr. 23**.

**Tab. XI:** Identifikované fragmentační produkty koniferyalkoholu

Fragmentační produkt	Experimentální $m/z$	Teoretická $m/z$	Absolutní chyba [mDa]	Struktura iontu
A	179,0701	179,0708	-0,7	$[M-H]^-$
B	164,0489	164,0474	1,5	$[M-H-CH_3\bullet]^{*-}$
C	163,0391	163,0396	-0,5	$[M-H-CH_4]^-$
D	162,0654	162,0636	1,8	$[M-H-OH\bullet]^{*-}$
E	161,0618	161,0558	6,0	$[M-H-H_2O]^-$
F	147,0430	147,0402	2,8	$[M-H-CH_3\bullet-OH\bullet]^-$
G	146,0381	146,0324	5,7	$[M-H-CH_3\bullet-H_2O]^{*-}$
H	145,0277	145,0246	3,1	$[M-H-CH_4-H_2O]^-$
I	117,0325	117,0252	7,3	$[M-H-OH\bullet-CH_3\bullet-CH_2=O]^-$



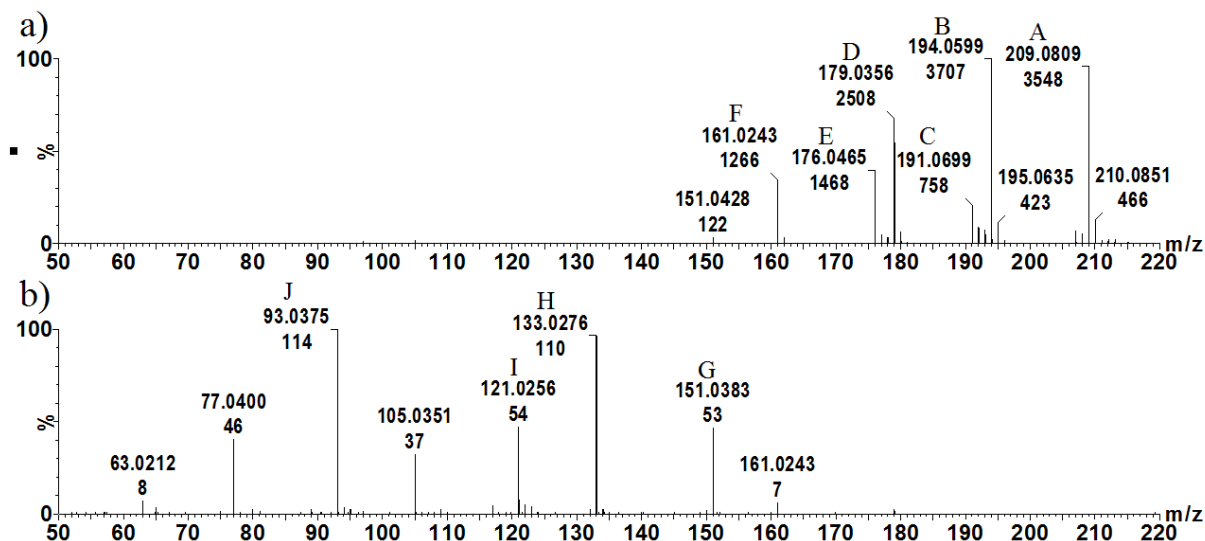
**Obr. 23:** a) absolutní a b) relativní intenzity fragmentačních produktů koniferylalkoholu v závislosti na dodávané CE

V grafu nejsou zobrazeny vyšší hodnoty kolizní energie (45–60 eV), přestože příslušná měření byla provedena, protože získaná kolizní spektra již poskytovala příliš slabý signál. Hodnoty v grafu (**Obr. 23b**) odpovídají poměru hodnoty intenzity daného iontu vůči sumě všech iontů v daném spektru. Graf s relativními hodnotami je uveden pro lepší přiblížení poměru vznikajících iontů, protože celková intenzita iontového proudu s rostoucími hodnotami CE klesala.

Z naměřených údajů vyplývá, že prekurzorový iont koniferylalkoholu při dodání nízké kolizní energie (v rozmezí 5–15 eV) odštěpuje zejména vodu (za vzniku fragmentového iontu E); jedná se o stejný rozsah, při němž dochází k analogické ztrátě i u p-kumarylalkoholu. Navíc v tomto rozsahu dochází i k odštěpení methylového radikálu (za vzniku iontu B) – tyto ztráty se také kombinují za vzniku iontu G. V menší míře probíhá také radikálové štěpení hydroxylové skupiny (iont D) a methanu (iont C). Při vyšší dodávané kolizní energii (20–45 eV) se může prekurzor ztrácet ketenovou skupinu společně s hydroxylovým a methylovým radikálem za vzniku iontu I (pro tento iont se nabízí i kombinace ztrát vody, methanu a oxidu uhelnatého, avšak pro detailnější ověření mechanismu by bylo potřeba měřit na přístroji, který zvládne vícestupňovou analýzu) a vodu s methanem (H). Při kolizní energii v rozpětí 50–60 eV byla již celková intenzita MS/MS spektra příliš slabá a nepodařilo se nám detekovat téměř žádné ionty. Zároveň nebyla za žádných podmínek pozorována ztráta oxidu uhelnatého ani v kombinaci s jinými ztrátami, a proto nemůžeme optima fragmentu vzniklých odštěpením oxidu uhelnatého porovnat s p-kumarylalkoholem.

#### 4.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie sinapylalkoholu

Ve stejném provedení jako u předchozích alkoholů byl izolován prekurzorový iont  $[M-H]^+$  s  $m/z$  209, který byl následně fragmentován při hodnotách kolizní energie v rozmezí 5–60 eV (v krocích po 5 eV). Intenzity produktů se podstatně liší v závislosti na míře dodávané kolizní energie (**Obr. 24**). Identifikované fragmentové ionty jsou shrnuty v **Tab. XII** a jejich intenzity jsou uvedeny v **Příloze iii – Tab. III** a znázorněny na **Obr. 25**.

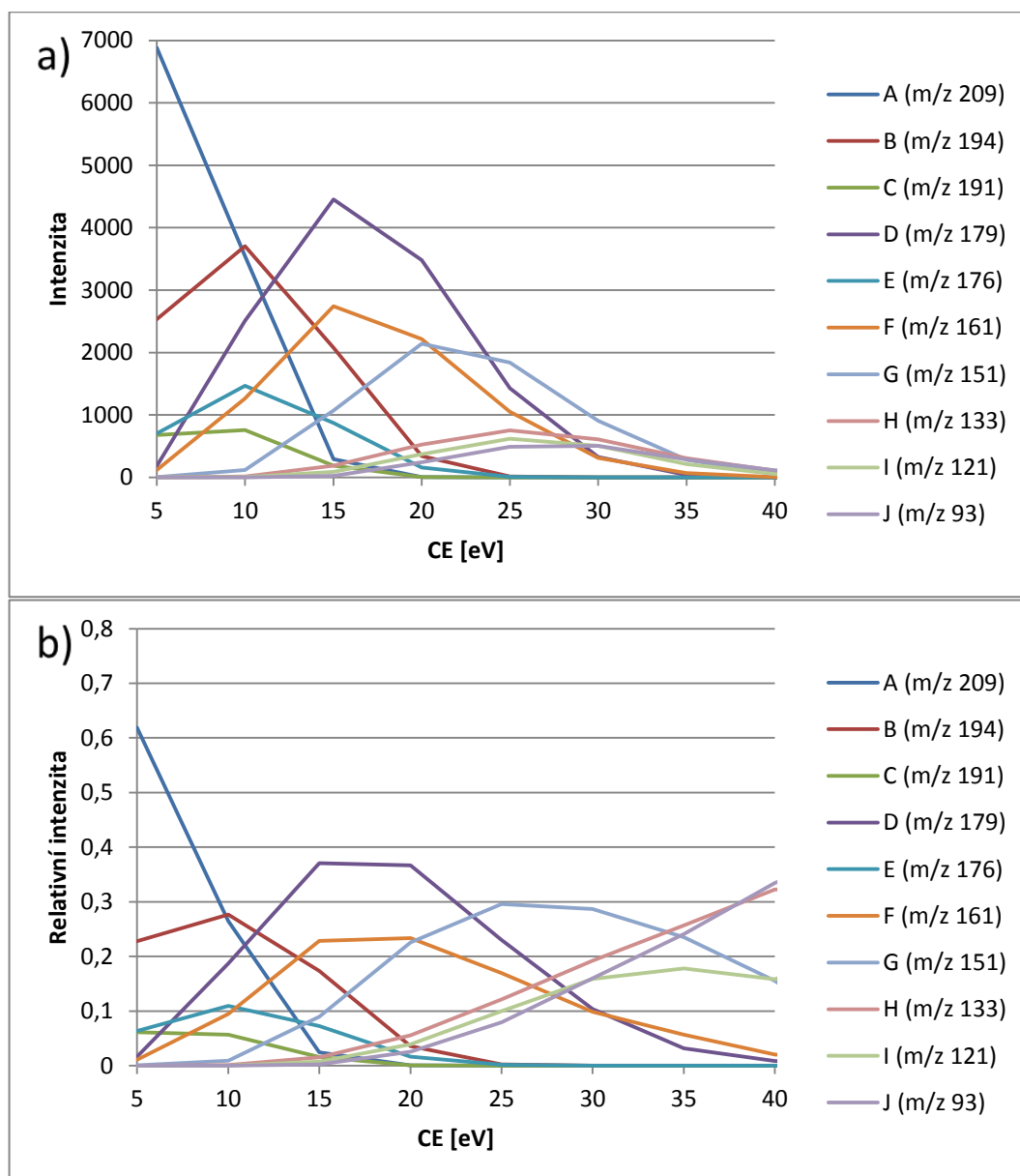


**Obr. 24:** Tandemová hmotnostní spektra prekurzorového iontu sinapylalkoholu ( $m/z$  209) při (a) CE = 10 eV a (b) CE = 40 eV

S nárůstem CE kompletně mizí signál prekurzorového iontu ( $m/z$  209) a výtěžky se posouvají k iontům s nižšími hodnotami  $m/z$  (viz **Obr. 24**). Tento trend detailněji popisují **Příloha iii – Tab. III** a grafy na **Obr. 25**.

**Tab. XII:** Identifikované fragmentační produkty sinapylalkoholu

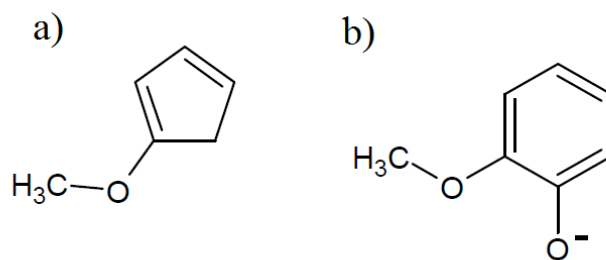
Fragmentační produkt	Experimentální $m/z$	Teoretická $m/z$	Absolutní chyba [mDa]	Struktura iontu
A	209,0809	209,0814	-0,5	$[M-H]^-$
B	194,0599	194,0580	1,9	$[M-H-CH_3]^+$
C	191,0699	191,0664	3,5	$[M-H-H_2O]^-$
D	179,0356	179,0346	1,0	$[M-H-2CH_3\bullet]^-$
E	176,0465	176,0430	3,5	$[M-H-CH_3\bullet-H_2O]^+$
F	161,0243	161,0196	4,7	$[M-H-2CH_3\bullet-H_2O]^-$
G	151,0383	151,0352	3,1	$[M-H-2CH_3\bullet-CO]^-$
H	133,0276	133,0202	7,4	$[M-H-2CH_3\bullet-CO-H_2O]^-$
I	121,0297	121,0202	9,5	$[M-H\bullet-OCH_3\bullet-CHCHCH_2OH]^-$
J	93,0340	93,0208	13,2	$[M-H\bullet-OCH_3-CO\bullet-CHCHCH_2OH]^-$



**Obr. 25:** a) absolutní a b) relativní intenzity fragmentačních produktů sinapylalkoholu v závislosti na dodávané CE

V grafu nejsou zobrazeny vyšší hodnoty kolizní energie (45–60 eV), přestože byly provedeny, protože získaná kolizní spektra již poskytovala příliš slabý signál. Hodnoty v grafu (**Obr. 25b**) odpovídají poměru hodnoty intenzity daného iontu vůči sumě všech iontů v daném spektru. Graf s relativními hodnotami je uveden pro lepší přiblížení poměru vznikajících iontů, protože celková intenzita iontového proudu s rostoucími hodnotami CE klesala.

Na základě naměřených dat můžeme usuzovat, že při dodání nízké kolizní energie (5–15 eV) fragmentuje sinapylalkohol podobně jako koniferylalkohol: odštěpuje molekulu vody (za vzniku iontu C) a methylový radikál (za vzniku iontu B), popřípadě opět dochází k oběma těmito ztrátám ve sledu za sebou (za vzniku iontu E). Největším rozdílem ve fragmentačním chování sinapylalkoholu oproti koniferylalkoholu je přítomnost fragmentového iontu vzniklého odštěpením dvou methylových radikálů (D) v jeho spektru. Tento iont se objevuje ve spektrech získaných s použitím kolizní energie v rozmezí 10–35 eV spolu s ionty odpovídajícími dalšímu následnému odštěpení molekuly vody (iont F), oxidu uhelnatého (G) nebo obou těchto molekul (H) z iontu D. Zajímavým výsledkem měření je podobný průběh iontů D a F v grafu relativních intenzit. Měření s využitím kolizní energie v rozmezí 25–30 eV poskytuje maximální intenzitu pro ionty I (odštěpení methoxy skupiny a postranního řetězce – námi navrhovaná struktura je zobrazena na **Obr. 26a**) a J (odštěpení methoxylové skupiny, postranního řetězce a oxidu uhelnatého – námi navrhovaná struktura je zobrazena na **Obr. 26b**). Skutečnost struktur na **Obr. 26** bude pravděpodobně jiná vzhledem k tomu, že u koniferylalkoholu pozorovány nebyly, i když by teoreticky pozorovány být měly. Určení jejich přesné struktury se v budoucnu můžeme věnovat. Použití ještě vyšších hodnot kolizní energie (tj. 45–60 eV) již podstatně snižuje celkovou intenzitu spektra.



**Obr. 26:** Navržené struktury iontů a) iont I a b) iont J

#### 4.5 Společné znaky a rozdíly ve fragmentaci zkoumaných monolignolů

Všechny tři alkoholy odštěpují vodu/hydroxyl, přičemž maxima relativní intenzity příslušných fragmentových iontů jsou pozorována při použití CE v rozmezí 5–15 eV. Výjimkou je sinapylalkohol, u něhož iont se ztrátou  $m/z$  17 (experimentální hodnota  $m/z$  192,0452) podle vypočtené absolutní chyby neodpovídá ztrátě hydroxylového radikálu (teoretická hodnota  $m/z$  192,0742 s absolutní chybou -29,0 mDa), ale vzniku oxidačního

produktu prekurzorového iontu se současnou ztrátou methylového radikálu (teoretická hodnota  $m/z$  192,0424 s absolutní chybou 2,8 mDa, přičemž absolutní chyba prekurzorového iontu činí -0,5 mDa). Při stejné kolizní energii byla pozorována ztráta methylového radikálu u koniferylalkoholu a sinapylalkoholu, ne však u *p*-kumarylalkoholu. Logickým vysvětlením tohoto rozdílu je, že původcem této ztráty je substituovaná methoxylová skupina, která u *p*-kumarylalkoholu chybí. Rozdílem v tandemových hmotnostních spektrech koniferylalkoholu a sinapylalkoholu byla přítomnost fragmentového iontu vzniklého ztrátou dvou methylových radikálů – tento iont vzniká pouze štěpením sinapylalkoholu, protože ten oproti koniferylalkoholu obsahuje jednu methoxy skupinu navíc. Tato atypická ztráta (30 Da) by mohla být charakteristická pro sloučeniny s více methoxylovými skupinami. V podobném duchu bychom mohli očekávat ionty  $[M-H-3CH_3\bullet]^-$  či  $[M-H-4CH_3\bullet]^-$ , za předpokladu systému s dostatkem substituovaných methoxylových skupin. Při použití kolizních energií vyšších než 35 eV jsme u žádného ze zkoumaných analytů nezaznamenali dostatečný celkový iontový proud pro interpretaci vzniklého spektra.

U žádného z alkoholů nebyla pozorována ztráta samotného oxidu uhelnatého (tj. přítomnost iontu  $[M-H-CO]^-$ ), přestože u jiných fenolických látek (např. epikatechinu) se odpovídající fragment často objevuje hned jako první ztráta <sup>[47]</sup>. Tento fakt může souviset s použitím negativního módu iontového zdroje, protože tato ztráta je typicky pozorována v módu pozitivním. V naší práci byla ztráta oxidu uhelnatého pozorována u všech tří alkoholů – vždy ale pouze v kombinaci s jinými ztrátami.



## 5 Závěr

Tato bakalářská práce se věnuje hmotnostně-spektrometrické analýze monolignolů. Teoretická část shrnuje biosyntézu, přípravu a vlastnosti monolignolů a sloučenin, které se z nich skládají – lignanů a ligninu. Popsána je rovněž hmotnostní spektrometrie jako instrumentální analytická technika využitá v experimentální části k analýze p-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. Detailněji je rozebíráno zejména její tandemové uspořádání, které umožňuje měření fragmentačních spekter.

Cílem experimentální části byla optimalizace parametrů hmotnostního spektrometru pro získání vysokého signálu prekurzorových iontů monolignolů. Za vhodně optimalizovaných podmínek byly separovány prekurzorové ionty p-kumarylalkoholu ( $m/z$  149), koniferylalkoholu ( $m/z$  179) a sinapylalkoholu ( $m/z$  209), kterým byla následně dodána kolizní energie v rozmezí 5–60 eV za účelem jejich fragmentace. Pro všechny tři alkoholy byla již při nízkých hodnotách CE pozorována typická ztráta vody/hydroxyly a pro monolignoly se substituovanou methoxylovou skupinou typická ztráta methylového radikálu. Při vyšších hodnotách CE se uvolňují všechny methylové radikály z přítomných methoxylových substituentů, což může být zajímavým poznávacím znakem jednotlivých monolignolů (případně i jejich oligomerů) v pozorovaných tandemových hmotnostních spektrech.

Jelikož jsou monolignoly, dle provedené rešerše, málo prozkoumanými molekulami, fragmentační spektra a produktové ionty, které poskytují p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol, by mohly pomoci při dalším studiu těchto látek.

## 6 Seznam literatury

- [1] C. Hano, M. Addi, L. Bensaddek et al., Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures, *Planta* 223 (2006) 975-989.
- [2] M. Saleem, H. J. Kim, M. S. Ali, Y. S. Lee, An update on bioactive plant lignans, *Nat. Prod. Rep.* 22 (2005) 696-716.
- [3] W. Boerjan, J. Ralph, M. Baucher, Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 (2003) 519-546.
- [4] Z. Chen, X. Sun, Y. Li, Y. Yan, Q. Yuan, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial synthesis of monolignols, *Metab. Eng.* 39 (2017) 102-109.
- [5] R. Whetten, R. Sederoff, Lignin Biosynthesis, *Plant Cell* 7 (1995) 1001-1013.
- [6] S. Quideau, J. Ralph, Facile Large-Scale Synthesis of Coniferyl, Sinapyl, and p-Coumaryl Alcohol, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1108-1110.
- [7] H. Kim, J. Ralph, Simplified Preparation of Coniferyl and Sinapyl Alcohols, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3693-3695.
- [8] L. P. Xiao, S. Wang, H. Li et al., Catalytic Hydrogenolysis of Lignins into Phenolic Compounds over Carbon Nanotube Supported Molybdenum Oxide, *ACS Catal.* 7 (2017) 7535-7542.
- [9] J. Sun, H. Li, L. P. Xiao et al., Fragmentation of Woody Lignocellulose into Primary Monolignols and Their Derivatives, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7 (2019) 4666-4674.
- [10] Ch. Liu, Y. He, X. Chen, Kinetic study on the heterogeneous degradation of coniferyl alcohol by OH radicals, *Chemosphere* 241 (2020) 125088.
- [11] A. E. Harman-Ware, M. Crocker, A. P. Kaur et al., Pyrolysis-GC/MS of sinapyl and coniferyl alcohol, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 99 (2013) 161-169.
- [12] R. Asatryan, H. Bennadji, J. W. Bozzelli, E. Ruckenstein, L. Khachatryan, Molecular Products and Fundamentally Based Reaction Pathways in the Gas-Phase Pyrolysis of the Lignin Model Compound p-Coumaryl Alcohol, *J. Phys. Chem. A* 121 (2017) 3352-3371.

- [13] M. Petersen, J. Hans, U. Matern, Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds, *Annu. Plant Rev.* 40 (2010) 182-257.
- [14] S. König, K. Feussner, A. Kaever et al., Soluble phenylpropanoids are involved in the defense response of *Arabidopsis* against *Verticillium longisporum*, *New Phytol.* 202 (2014) 823-837.
- [15] N. Speeckaert, N. M. Adamou, H. A. Hassane et al., Characterization of the UDP-glycosyltransferase UGT72 Family in Poplar and Identification of Genes Involved in the Glycosylation of Monolignols, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 5018.
- [16] E. E. Väisänen, A. I. Smeds, K. V. Fagerstedt et al., Coniferyl alcohol hinders the growth of tobacco BY-2 cells and *Nicotiana benthamiana* seedlings, *Planta* 242 (2015) 747-760.
- [17] J. Zhang, J. Chen, Z. Liang, Ch. Zhao, New Lignans and Their Biological Activities, *Chem. Biodiversity* 11 (2014) 1-54.
- [18] J. Harmatha, Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů, *Chem. Listy* 99 (2005) 622-632.
- [19] Y. Qi, D. A. Volmer, Chemical diversity of lignin degradation products revealed by matrix-optimized MALDI mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 6031-6037.
- [20] F. Lu, J. Ralph, The DFRC (Derivatization followed by reductive cleavage) method its applications for lignin characterization, v knize: F. Lu (ed.), *Lignin: structural analysis, applications in biomaterials and ecological significance*, Nova Science Publisher Inc., New York 2014, str. 27-65.
- [21] F. G. Calvo-Flores, J. A. Dobado, Lignin as Renewable Raw Material, *ChemSusChem* 3 (2010) 1227-1235.
- [22] S. Y. Lin, C. W. Dence, *Methods in lignin chemistry*, Springer-Verlag, Heidelberg 1992.
- [23] W. D. dos Santos, R. Marchiosi, F. C. M. Vilar et al., Polyvalent lignin: recent approaches in determination and applications, v knize: F. Lu (ed.), *Lignin: structural*

analysis, applications in biomaterials and ecological significance, Nova Science Publisher Inc., New York 2014, str. 1-25.

[24] A. Barapatre, A. S. Meena, S. Mekala, A. Das, H. Jha, In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 443-453.

[25] F. Chen et al., A rapid thioacidolysis method for biomass lignin composition and tricin analysis, *Biotechnol. Biofuels* 14 (2021) 18.

[26] F. Pomar, F. Merino, A. R. Barceló, O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction, *Protoplasma* 220 (2002) 17-28.

[27] C. Lapierre, B. Monties, C. Rolando, Thioacidolysis of lignin: comparison with acidolysis, *J. Wood Chem. Technol.* 5 (1985) 277-292.

[28] J. Ralph, Y. Zhang, R. M. Ede, Preparation of synthetic lignins with superior NMR characteristics via isotopically labeled monolignols, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1998) 2609-2613.

[29] T. Todorciuc, A. M. Capraru, I. Kratochvílová, V. I. Popa, Characterization of non-wood lignin and its hydroxymethylated derivatives by spectroscopy and self-assembling investigations, *Cellulose Chem. Technol.* 43 (2009) 399-408.

[30] P. Bock, N. Gierlinger, Infrared and Raman spectra of lignin substructures: Coniferyl alcohol, abietin, and coniferyl aldehyde, *J. Raman Spectrosc.* 50 (2019) 778-792.

[31] B. Prats-Mateu, P. Bock, M. Schroffnegger, J. L. Toca-Herrera, N. Gierlinger, Following laser induced changes of plant phenylpropanoids by Raman microscopy, *Sci. Rep.* 8 (2018) 11804.

[32] K. Záruba a kol., *Analytická chemie*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2016.

[33] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, third ed., J. Wiley & Sons, Chichester 2007.

- [34] J. H. Gross, Mass Spectrometry, A textbook, third ed., Springer International Publishing AG, Cham 2017.
- [35] D. Friedecký, K. Lemr, Úvod do hmotnostní spektrometrie, Klin. Biochem. Metab. 20 (2012) 152-157.
- [36] K. Lemr, L. Borovcová, Ionizace elektrosprejem, Chem. Listy, 114 (2020) 169-178.
- [37]  
<https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/Materialy%20pro%20studenty/MS%20prednaska%2010.pdf>, staženo 15. března 2020
- [38] A. U. Jackson, T. Shum, E. Sokol, A. Dill, R. G. Cooks, Enhanced detection of olefins using ambient ionization mass spectrometry: Ag<sup>+</sup> adducts of biologically relevant alkenes, Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 367-376.
- [39] [https://holcapek.upce.cz/teaching/Mol\\_spek/Mol\\_spek\\_prednaska6\\_MS.pdf](https://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf), staženo 1. března 2021.
- [40] K. Lemr, L. Borovcová, Chemická ionizace, Chem. Listy 114 (2020) 163-168.
- [41] V. Havlíček, F. Tureček, Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti, Chem. Listy 114 (2020) 106-112.
- [42] M. Holčapek, R. Jirásko, M. Lísa, Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques, J. Chromatogr. A 1259 (2012) 3-15.
- [43] L. Sleno, D. A. Volmer, Ion activation methods for tandem mass spectrometry, J. Mass Spectrom. 39 (200) 1091-1112.
- [44] M. Sadílek, Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie, Che. Listy 114 (2020) 133-144.
- [45] J. H. Banoub, B. Benjelloun-Mlayah, F. Ziarelli, N. Joly, M. Delmas, Elucidation of the complex molecular structure of wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 2867-2888.

[46] L. Bajpai, M. Varshney, CH. N. Seubert, Mass Spectral Fragmentation of the Intravenous Anesthetic Propofol and Structurally Related Phenols, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16 (2005) 814-824

[47] T. Křížová, Komplexy zinečnatých solí a flavonoidů, bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha 2010.

## 7 Přílohy

### Příloha i – Závislost signálu na napětí na sampling cone

**Tab. I:** Intenzita signálu p-kumarylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty na sampling cone

Sampling cone [V]	Intenzita iontu m/z 149 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
0	1357	31,12	0,30
10	16273	29,84	7,07
20	20965	26,30	13,49
30	11708	15,18	15,54
40	1624	2,62	17,01
50	290	0,58	15,57
60	134	0,60	11,60
70	136	1,72	8,39
80	179	3,59	7,21
90	69	3,61	3,83

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (sampling cone 0–90 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními; vybraná hodnota sampling cone je vyznačena šedě

**Tab. II:** Intenzita signálu koniferylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty na sampling cone

Sampling cone [V]	Intenzita iontu m/z 179 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
0	391	44,03	0,17
10	16087	29,48	8,16
20	14617	25,82	14,30
30	4495	15,58	9,41
40	573	3,60	9,05
50	184	1,99	6,92
60	176	4,98	4,89
70	190	9,69	5,82
80	190	12,27	3,05
90	151	9,51	3,91

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (sampling cone 0–90 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními; vybraná hodnota sampling cone je vyznačena šedě

**Tab. III:** Intenzita signálu sinapylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty na sampling cone

Sampling cone [V]	Intenzita iontu m/z 209 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
0	21	42,86	0,05
10	961	37,33	3,32
20	2372	35,80	9,36
30	2144	24,70	13,93
40	508	8,13	13,53
50	312	4,92	15,50
60	275	6,99	14,03
70	278	8,27	11,48
80	244	7,88	9,74
90	242	7,75	9,08

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (sampling cone 0–90 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními; vybraná hodnota sampling cone je vyznačena šedě



## Příloha ii – Závislost signálu na napětí na extraction cone

**Tab. I:** Intenzita signálu p-kumarylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty na extraction cone

Extraction cone [V]	Intenzita iontu m/z 149 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
0	113	25,80	0,14
1	9524	30,03	4,38
2	18058	26,87	6,94
3	21736	25,64	10,97
4	21706	25,92	11,67
5	21902	25,24	12,15
6	20450	23,53	12,50
7	18592	22,26	11,67
8	17133	19,62	9,57
9	14162	17,92	10,99
10	12740	15,63	9,02

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (extraction cone 0–10 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními; vybraná hodnota extraction cone je vyznačena šedě

**Tab. II:** Intenzita signálu kumarylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty na extraction cone

Extraction cone [V]	Intenzita iontu m/z 179 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
0	26	55,32	0,02
1	4799	36,28	2,99
2	8921	31,10	8,00
3	10507	30,30	9,27
4	11320	28,79	11,57
5	11528	27,66	10,78
6	10592	26,02	11,33
7	9763	24,32	12,24
8	9036	22,31	11,39
9	7682	20,05	10,60
10	6474	18,02	11,81

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (extraction cone 0–10 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními; vybraná hodnota extraction cone je vyznačena šedě

**Tab. III:** Intenzita signálu sinapylalkoholu v závislosti na nastavení hodnoty na extraction cone

Extraction cone [V]	Intenzita iontu m/z 209 [counts] <sup>1)</sup>	Relativní poměr [%] <sup>2)</sup>	Relativní intenzita [%] <sup>3)</sup>
0	8	21,62	0,06
1	3033	41,32	3,24
2	6174	37,65	7,43
3	7464	36,44	10,03
4	7938	35,92	10,97
5	8658	34,79	11,47
6	8435	33,83	11,91
7	7886	32,28	11,97
8	7135	31,34	11,19
9	6676	28,84	11,19
10	5823	26,52	10,53

<sup>1)</sup> Absolutní intenzita prekurzorového iontu; <sup>2)</sup> Poměr intenzity prekurzorového iontu vůči sumě intenzit všech iontů ve spektru; <sup>3)</sup> Poměr celkové intenzity iontového proudu (TIC) vůči sumě TIC při všech měřeních (extraction cone 0–10 V); údaje odpovídají měření se třemi opakováními; vybraná hodnota extraction cone je vyznačena šedě

**Příloha iii** – Intenzity vybraných iontů v MS/MS spektrech zkoumaných monolignolů

**Tab. I:** Intenzity fragmentačních produktů p-kumarylalkoholu v závislosti na dodávané CE

Kolizní energie [eV]	A	B	C	D	E
	m/z 149	m/z 132	m/z 131	m/z 103	m/z 102
5	23165	4923	27232	1851	153
10	9516	5206	28121	3858	739
15	754	2705	17454	4494	1053
20	23	700	5897	3178	1168
25	1	0	1193	1179	564
30	0	0	228	334	190
35	0	0	32	85	51
40	0	0	5	18	10
45	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0

**Tab. II:** Intenzity fragmentačních produktů koniferylalkoholu v závislosti na dodávané CE

Kolizní energie [eV]	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	m/z 179	m/z 164	m/z 163	m/z 162	m/z 161	m/z 147	m/z 146	m/z 145	m/z 117
5	7287	2787	0	315	2623	403	2950	0	0
10	2643	3554	250	208	1663	834	4862	128	0
15	166	2429	460	29	300	768	3830	315	0
20	0	0	0	2	19	532	1578	527	44
25	0	77	80	0	0	242	385	462	94
30	0	0	13	0	0	57	95	280	133
35	0	0	0	0	0	9	0	94	81
40	0	0	0	0	0	0	0	25	36
45	0	0	0	0	0	0	0	6	19
50	0	0	0	0	0	0	0	6	5
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	2

**Tab. III:** Intenzity fragmentačních produktů sinapylalkoholu v závislosti na dodávané CE

Kolizní energie (eV)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	m/z 209	m/z 194	m/z 191	m/z 179	m/z 176	m/z 161	m/z 151	m/z 133	m/z 121	m/z 93
5	6882	2534	682	184	705	122	7	1	0	0
10	3548	3707	758	2508	1468	1266	122	13	4	2
15	293	2080	189	4452	872	2741	1073	187	89	27
20	5	341	5	3483	158	2218	2144	527	373	245
25	0	14	1	1428	10	1052	1838	754	618	492
30	0	0	0	330	0	313	909	609	504	507
35	0	0	0	38	0	68	281	307	213	288
40	0	0	0	3	0	7	53	110	54	114
45	0	0	0	0	0	1	4	29	20	36
50	0	0	0	0	0	0	3	7	1	8
55	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1