

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Fakulta přírodovědecká**

**Katedra analytické chemie**

**VYUŽITÍ VÝPOČETNÍ CHEMIE PŘI STUDIU  
FRAGMENTACE VYBRANÝCH FLAVONOIDŮ V KOLIZNÍ  
CELE HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká**

**Katedra analytické chemie**

## **VYUŽITÍ VÝPOČETNÍ CHEMIE PŘI STUDIU FRAGMENTACE VYBRANÝCH FLAVONOIDŮ V KOLIZNÍ CELE HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce:

Studijní obor:

Vedoucí diplomové práce:

Konzultant:

Bc. Petra Skácelová

Analytická chemie

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Mgr. Ondřej Kurka

**Olomouc 2016**

# **PALACKÝ UNIVERSITY OLMOUC**

**Faculty of Science**

**Department of Analytical Chemistry**

## **UTILIZATION OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY IN THE STUDY OF FRAGMENTATION OF SELECTED FLAVONOIDS IN COLLISION CELL OF MASS SPECTROMETER**

**MASTER THESIS**

Author:

Bc. Petra Skácelová

Study programme:

Analytical Chemistry

Supervisor:

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Consultant:

Mgr. Ondřej Kurka

**Olomouc 2016**

## SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá studiem fragmentačních reakcí pelargonidinu při jeho kolizí indukované disociaci v kolizní cele hmotnostního spektrometru. Byla provedena interpretace hmotnostních spekter tohoto analytu a následné srovnání takto navržených fragmentačních cest s výsledky kvantově-chemických výpočtů. Z provedených experimentů a vypočítaných hodnot energií vyplývá, že při fragmentaci pelargonidinu dochází především ke ztrátám malých neutrálních molekul, jako jsou oxid uhelnatý, voda a keten, zatímco retro Diels-Alderovo štěpení benzenového kruhu je u tohoto anthokyanidinu minoritním jevem. Kvantově-chemické výpočty naznačují, že preferenční pozice jsou shodné pro odštěpení vody i oxidu uhelnatého a nacházejí se na A- a C-kruhu. Zatímco ztráta CO je termodynamicky řízený proces, štěpení H<sub>2</sub>O je řízeno kineticky.

**Klíčová slova:** pelargonidin, anthokyaniny, anthokyanidiny, CID-MS, ESI, fragmentace, výpočetní chemie, DFT

## SUMMARY

This master thesis deals with the study of fragmentation mechanisms of pelargonidin submitted to collision induced dissociation in a collision cell of mass spectrometer. The mass spectra of analyte were interpreted and proposed fragmentation reactions were compared with results of quantum chemical calculations. Based on the experimental and theoretical outcomes the most probable fragmentation pathways of pelargonidin were established. The preference of losses of small neutral molecules (carbon monoxide, water, ethenone) was shown, while the retro Diels-Alder cleavage of aromatic ring seems to be minor phenomenon. Quantum chemical calculations suggest the preferable positions of water and carbon monoxide cleavage are the same and they are situated in A- and C-ring. While the loss of CO is thermodynamically driven process, the loss of H<sub>2</sub>O is kinetically driven action.

**Keywords:** pelargonidin, anthocyanins, anthocyanidins, CID-MS, ESI, fragmentation, computational chemistry, DFT

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

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

V Olomouci dne .....

.....

Vlastnoruční podpis

Děkuji svému vedoucímu doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za trpělivé vedení, podporu a vlídný přístup při tvorbě diplomové práce, RNDr. Ondřeji Kurkovi za jeho cenné rady a připomínky i slova povzbuzení a celému kolektivu katedry analytické chemie za pomoc, poskytnutou po oba roky studia.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Anthokyaniny a jejich deriváty</b> .....	<b>2</b>
2.1.1	Výskyt a vlastnosti anthokyaninů .....	2
2.1.2	Reaktivita.....	5
2.1.3	Pelargonidin.....	6
<b>2.2</b>	<b>Hmotnostní spektrometrie</b> .....	<b>7</b>
2.2.1	Iontové zdroje .....	8
2.2.1.1	Ionizace elektrosprejem.....	9
2.2.2	Hmotnostní analyzátory .....	11
2.2.2.1	Kvadrupólový analyzátor a iontová past .....	12
2.2.2.2	Průletový analyzátor.....	12
2.2.3	Hmotnostní spektrometrie anthokyaninů .....	14
2.2.4	Kolizí indukovaná disociace .....	15
2.2.5	Chování anthokyaninových barviv v kolizní cele hmotnostního spektrometru .....	17
<b>2.3</b>	<b>Výpočetní chemie</b> .....	<b>19</b>
2.3.1	Úvod do kvantové chemie.....	19
2.3.2	Metody výpočetní chemie .....	21
2.3.3	Použití kvantově-chemických metod při studiu anthokyaninů .....	23
2.3.4	Výpočetní chemie ve výzkumu fragmentačních procesů .....	25
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Přístrojové vybavení</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Chemikálie</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Pracovní postupy</b> .....	<b>28</b>
3.3.1	Postupy kvantově-chemických výpočtů.....	28
3.3.2	Technika měření MS spekter .....	29
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Fragmentace pelargonidinu v kolizní cele hmotnostního spektrometru</b> .....	<b>32</b>
4.1.1	Využití iontově-mobilitní separace při studiu fragmentačních mechanismů pelargonidinu .....	37
4.1.2	Srovnání fragmentace deuterovaného a nedeuterovaného pelargonidinu .....	39
<b>4.2</b>	<b>Výpočetní část práce</b> .....	<b>47</b>
4.2.1	Optimalizace geometrie molekuly a výběr nejstabilnějšího konformeru .....	47
4.2.2	Energeticky preferovaná cesta vedoucí k odtržení molekuly vody z pelargonidinu .....	51
4.2.3	Energeticky preferovaná cesta vedoucí k odtržení molekuly oxidu uhelnatého .....	55

4.2.4	Energie potřebná k přesunu deuteria.....	57
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>62</b>



# 1 ÚVOD

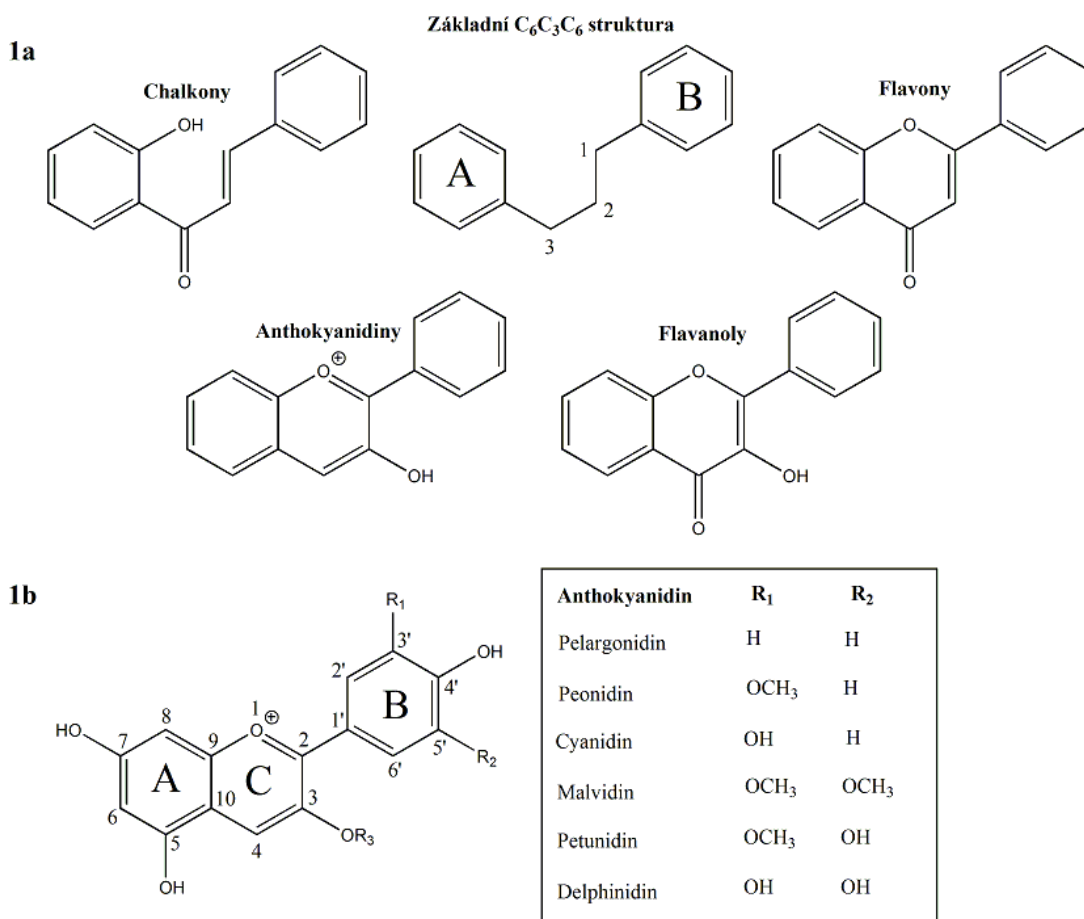
Pelargonidin patří mezi anthokyanidiny, polyfenolické látky, jež jsou základním strukturním motivem anthokyaninových barviv a dodávají květům a plodům rostlin charakteristické zbarvení. Vzhledem k nejnižšímu počtu hydroxoskupin navázaných na flavyliový skelet (pouze jedna hydroxylová skupina připojená k B-kruhu) jej lze považovat za základní anthokyanidin. Tento fakt z něj činí vhodný objekt výzkumu typických fragmentačních mechanismů, jimž podléhají anthokyaniny v kolizní cele hmotnostního spektrometru. Z tohoto důvodu byl v této diplomové práci vybrán pelargonidin k podrobnému výzkumu, zabývajícimu se jeho chováním při kolizí indukované disociaci a nahlížejícimu na hmotnostně-spektrometrické principy pohledem metod výpočetní chemie. Největší pozornost byla v této práci věnována studiu preferenčních pozic ztráty malých neutrálních molekul z iontu prekurzoru, přičemž tyto fragmentační jevy byly zkoumány jak experimentálně, tak za využití *ab initio* metod výpočetní chemie. Poodhalení principů typických fragmentačních cest pelargonidinu umožní predikci chování anthokyaninů při jejich analýze s využitím hmotnostní spektrometrie a snadnější identifikaci jejich fragmentačních spekter.<sup>[1]</sup>

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Anthokyaniny a jejich deriváty

#### 2.1.1 Výskyt a vlastnosti anthokyaninů

Anthokyaniny jsou přírodní polyfenolická barviva, vyskytující se v rostlinných orgánech, především v květech a plodech, jimž dodávají zbarvení v širokém rozmezí barev od žluté až po fialovou. Jejich označení bylo poprvé použito německým lékárníkem L. C. Marquartem ve spojitosti s modrým květenstvím chrpy (*Centaurea*)<sup>[2]</sup> a vzniklo spojením řeckých výrazů anthos (květina) a kyanos (modrý). Jsou to barevné sloučeniny patřící mezi flavonoidy. Základní strukturní motiv, který mají společný i s dalšími rostlinnými barvivy, např. chalkony, flavony a flavanoly, je uveden na Obrázku 1a ( $C_6C_3C_6$  uhlíková kostra).



**Obrázek 1:** Flavonoidní barviva. 1a: základní struktura a od ní odvozené sloučeniny, 1b: struktura flavyliového kationtu a její číslování, tabulka v přírodě běžných anthokyanidinů<sup>[3]</sup>

Specifický je pro ně centrální heterocyklický kruh, tvořící 2-fenylbenzopyrylium neboli flavylium. Základní strukturu anthokyaninů a její číslování ukazuje Obrázek 1b. Označení skeletu jako  $C_6C_3C_6$  vychází ze struktury, kterou tvoří 2 benzenová jádra (kruhy A a B) spojená třemi alifatickými uhlíky. Pokud tyto uhlíky vytvoří cyklus, jako je tomu u anthokyaninů, je tento nově vzniklý kruh označován jako C. V přírodě nalzáme anthokyaninová barviva převážně ve formě glykosidů, přičemž ke glykosylaci dochází preferenčně v polohách 3, 5 a 7. Cukerná část může být dále acylována různými organickými kyselinami. Hydrolyticky se pak tyto látky rozkládají na příslušný aglykon (anthokyanidin) a cukr (deglykosylace). Anthokyanidiny jsou labilnější a méně rozpustné ve vodě než anthokyaniny a volně se v přírodě téměř nevyskytují.<sup>[4]</sup>

Jednotlivé anthokyanidiny se liší stupněm a typem substituce flavyliového skeletu, tj. počtem hydroxy- a methoxy- skupin navázaných na aromatické uhlíky v polohách 3' a 5'. Tyto rozdíly jsou důvodem pro různorodost barevných odstínů anthokyaninových barviv. Systém osmi konjugovaných, snadno excitovatelných dvojných vazeb ve struktuře anthokyanidinů má za následek absorpci světla molekulou v rozmezí 465 až 550 nm ve viditelné oblasti a slabý absorpční pás mezi 270 a 280 nm v UV-oblasti spektra. Substituce aromatického systému pak způsobuje posun absorpčního maxima a tím změnu barevného odstínu. Vlivem hydroxylace resp. methoxylace aromatického systému dochází k bathochromnímu posunu  $\lambda_{max}$ , přičemž  $-OCH_3$  skupina působí výraznější posun směrem k vyšším vlnovým délkám než skupina  $-OH$ .<sup>[3]</sup> Přímou souvislost mezi počtem hydroxy- a methoxyskupin a zbarvením anthokyanidinu ilustruje také Tabulka I.

Díky velké strukturní variabilitě sacharidů a organických kyselin a možných kombinací jejich substituce na anthokyanidinový skelet existuje velké množství těchto látek - je známo více než 600 různých přírodních anthokyaninů.<sup>[5]</sup> Nejběžnější přírodní anthokyaninová barviva jsou tvořena pouze šesti anthokyanidiny, které se vyskytují v pletivech vyšších rostlin (jejich souhrn a struktury podávají Tabulka I a Obrázek 1).<sup>[6]</sup> Procentuálně nejzastoupenějším anthokyanidem v ovoci a zelenině je kyanidin, který se, na rozdíl od pelargonidinu či delfinidinu, nalzá nejen v plodech a květech, ale i v červeně zbarvených listech řady rostlin.<sup>[7]</sup>

**Tabulka I:** Nejběžnější anthokyanidiny vyskytující se v pletivech vyšších rostlin<sup>[7–12]</sup>

název	zkratka	vypočtená hodnota m/z	$\lambda_{\max}$ [nm]	zbarvení	obsah*	hlavní výskyt v plodech rostlin
Pelargonidin	Pg	271,0601	520	šarlatová	12 %	hrozny, jahody, ředkvičky, červené fazole, kukuřice
Peonidin	Pn	301,0707	532	rudá	12 %	hrozny, třešně, borůvky, brusinky, švestky
Kyanidin	Cy	287,0550	535	nachová	50 %	hrozny, jahody, ořechy, rebarbora, černý rybíz, třešně, brusinky, černý bez, švestky, hrozny, maliny, borůvky, červené zelí a cibule, kukuřice
Malvidin	Mv	331,0812	542	purpurová	7 %	hrozny, borůvky
Petunidin	Pt	317,0656	543	purpurová	7 %	hrozny, borůvky, plody šichy a vlochyňe
Delfinidin	Dp	303,0499	546	purpurová	12 %	hrozny, borůvky, černý rybíz

\*procentuální zastoupení jednotlivých anthokyanidinů (vztaženo k sumě všech anthokyanidinů ve zkoumaném vzorku ovoce) ve vybraném ovoci a zelenině podle Konga a kol. 2003

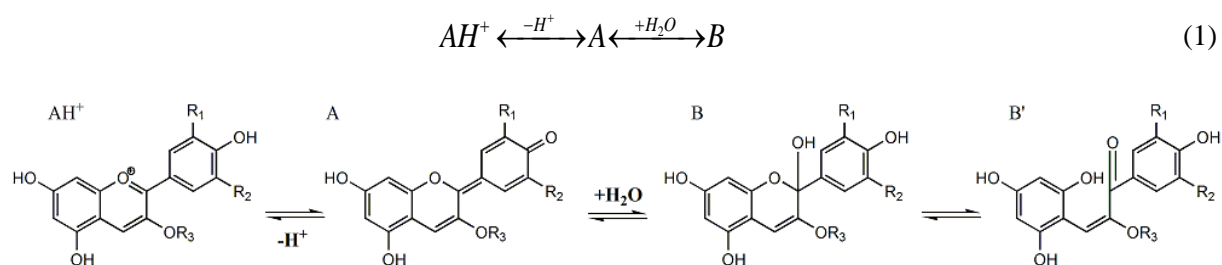
Anthokyaninová barviva jsou přirozenou součástí lidské stravy, neboť jsou obsažena v barevných plodech a potravinách z nich vyrobených. V bobulovitém ovoci se jejich koncentrace pohybuje od jednotek až po stovky mg na 100 g čerstvých plodů.<sup>[10]</sup> Díky vizuálně přitažlivému zbarvení je směs anthokyaninů v extraktu ze slupek hroznů používána jako aditivum v potravinářském průmyslu (barvivo E163).<sup>[13]</sup> Řada studií z let 1998 až 2011 navíc prokázala protizánětlivé a protirakovinné účinky anthokyaninů. Studie *in vitro* prokázaly inhibici růstu rakovinných buněk vlivem působení anthokyaninů,

epidemiologické studie na lidech však tento závěr nepotvrdily.<sup>[8,14–16]</sup> Na základě výzkumů z let 2005 a 2009 se předpokládá, že tyto látky také snižují riziko obezity a diabetu.<sup>[17–19]</sup>

Mechanismy jejich působení jsou často spojovány s antioxidační aktivitou obecně vlastní fenolickým látkám.<sup>[20]</sup> Schopnost anthokyaninů zachycovat volné radikály vychází z jejich ochoty poskytovat elektron a vodíkový atom z volné -OH skupiny. Antioxidační kapacita klesá s druhem substituentu ve směru: -OH > -OCH<sub>3</sub> >> -H, a tudíž také s druhem aglykonu v pořadí: Dp > Pt > Mv = Cy > Pn > Pg.<sup>[21]</sup>

### 2.1.2 Reaktivita

Anthokyaniny jsou reaktivní sloučeniny, podléhající strukturním změnám, jež jsou ovlivněny teplotou, světlem, přítomností vzduchu nebo změnami pH roztoku.<sup>[3,22]</sup> Ve vodném prostředí mohou anthokyanidiny a potažmo i anthokyaniny existovat v závislosti na pH ve čtyřech možných strukturních formách. Červený flavyliový kationt AH<sup>+</sup> je stálý pouze v kyselých roztocích (pH < 2) a se zvyšujícím se pH odštěpuje proton za vzniku modré chinonové báze A.<sup>[23]</sup> Anthokyaniny také podléhají nukleofilní adici vody na uhlík C2 (a to jak ve formě chinonové báze, tak i kationtu) za vzniku hemiacetalové formy B přesmykující na chalkon B' (Obrázek 2).<sup>[24]</sup> Rovnováhu mezi těmito reakcemi popisuje rovnice:



**Obrázek 2:** Strukturní změny anthokyaninů v závislosti na pH<sup>[25]</sup>

Druh a počet substituentů na aglykonu ovlivňuje nejen zbarvení, ale i reaktivitu anthokyaninů. Zatímco se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin stabilita těchto sloučenin klesá, se vzrůstající methoxylací se naopak molekula stabilizuje, protože dochází k blokaci reaktivních -OH skupin. Rozdíly v reaktivitě jednotlivých anthokyaninů lze přičítat také různým cukerným jednotkám navázaným na anthokyanidin. Studium chování složitěji substituovaných nativních anthokyaninů je však stále předmětem výzkumu.<sup>[3]</sup>

Anthokyaniny mohou být buď přeměněny na bezbarvé či hnědé, často nerozpustné, produkty, nebo mohou tvořit adukty s malými molekulami a jinými přírodními barvivy. Častým procesem probíhajícím například v červeném víně je reakce anthokyaninu s pyrohroznovou kyselinou. Takto vzniká např. 5-karboxypyranomalvidin-3-glukosid, známý též jako vitisin A.<sup>[24]</sup> Podobně reaguje i aceton. Složitějším procesem je kondenzace anthokyaninů s flavanoly (často prostřednictvím acetaldehydu vznikajícího oxidací ethanolu). S těmi může docházet také k intermolekulární kopigmentaci anthokyaninů (tvorbě slabého komplexu s původně bezbarvou látkou, tzv. kopigmentem, např. flavanolem), jež vede obecně ke stabilizaci anthokyaninů – vznikající barviva jsou například odolná vůči působení oxidu siřičitého, který s volnými anthokyaniny reaguje za vzniku bezbarvého produktu (tzv. bělení anthokyanových barviv). Zároveň také dochází k bathochromnímu posunu, prohloubení a zintenzivnění odstínu, takže tato barviva odvozená od anthokyaninů mohou být i modrá.<sup>[26,27]</sup>

### 2.1.3 Pelargonidin

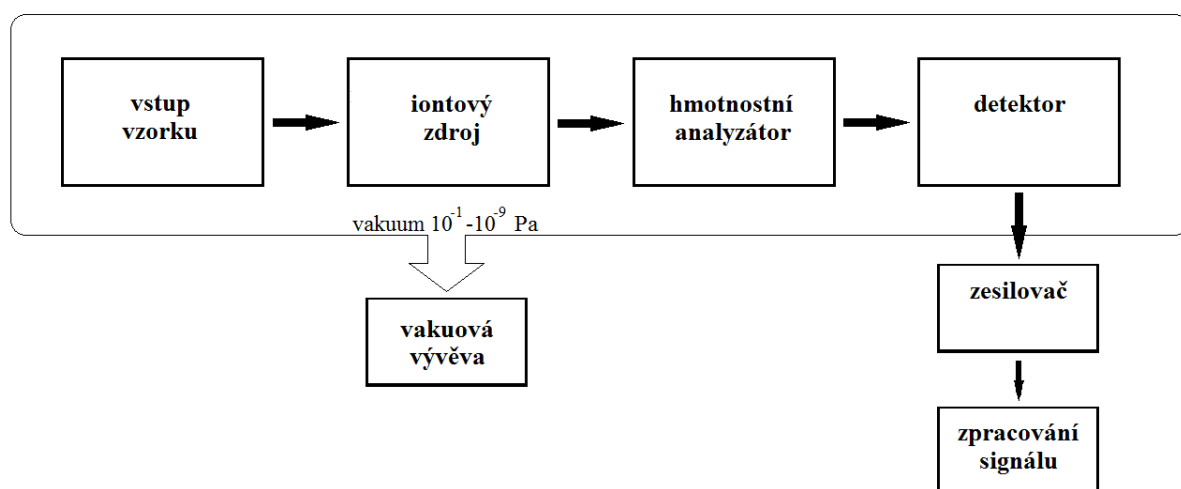
Pelargonidin, molekula, která byla studována v této práci, je nejjednodušším ze šesti běžně se vyskytujících anthokyanidinů, neboť B-kruh v jeho struktuře není substituován v polohách 3' a 5' (viz Obrázek 1b). V přírodě jej nalzáme mj. ve formě 3-O-glukosidu (callistephin, dominantní anthokyanin v jahodách<sup>[28]</sup>, zkráceně Pg-3-Glu), 3,5-O-diglukosidu (pelargonin, charakteristický pro květy rostlin rodu *Pelargonium*<sup>[29]</sup>), triglukosidu (přítomného v červených bramborách<sup>[30]</sup>) a 3-soforosid-5-glukosidu (hlavní anthokyanin v ředkvičkách<sup>[31]</sup>). Kvůli nejnižšímu počtu -OH skupin vykazuje pelargonidin nižší antioxidační kapacitu než ostatní aglykony z Tabulky I.<sup>[32]</sup> Ve srovnání s dosud studovanými anthokyanidiny má však zároveň nejvyšší biodostupnost. Také jeho metabolismus v gastrointestinálním traktu člověka a následná urinální exkrece probíhají rychle. Po požití ovoce s obsahem Pg-3-Glu lze v moči nalézt jeho metabolity (příslušné glukoronidy a sulfát) spolu se stopovým množstvím původního anthokyaninu a jeho aglykonu.<sup>[28]</sup> Pelargonidin je také ze známých anthokyanidinů nejstabilnější v neutrálním pH. Ačkoliv je flavyliový kation pelargonidinu (převládající při pH < 2) jeho nejstabilnější formou, i u něj v kyselém prostředí dochází s časem k odbarvování za vzniku hemiacetalu.<sup>[33]</sup>

## 2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. „Mass Spectrometry“) je moderní instrumentální analytickou technikou. Na začátku procesu analýzy je molekulám analytu udělen náboj některou z ionizačních technik. Takto vzniklé nabité částice jsou rozděleny na základě poměru jejich hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) v hmotnostním analyzátoru a následně detekovány (zachyceny vhodným detektorem). Výstupem této metody je hmotnostní spektrum, které je záznamem četnosti iontů dopadajících na detektor v závislosti na jejich hodnotách  $m/z$ . Hmotnostní spektrum je silně ovlivněno podmínkami ionizace i typem hmotnostního analyzátoru, a tudíž není fyzikální vlastností molekuly.<sup>[34]</sup>

Za zakladatele MS je považován britský fyzik J. J. Thomson, který se zabýval výzkumem elektrického výboje v plynech za sníženého tlaku a v r. 1910 zkonstruoval tzv. parabolový spektrograf. V tomto přístroji byla zkoumaná látka bombardována elektrony za vzniku kladně nabitých iontů, jež byly dále urychlovány a procházely elektrickým a magnetickým polem, v nichž zakřivovaly svou dráhu podle poměru  $m/z$ . Detekce probíhala jednoduše vizualizací iontů dopadajících na fotografickou desku, na níž se tvořily série parabolických křivek odpovídajících jednotlivým fragmentům dané molekuly.<sup>[35]</sup>

Dnešní hmotnostní spektrometry sestávají ze tří základních částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru připojeného k zařízení pro zpracování signálu (počítač). Zjednodušené schéma hmotnostního spektrometru ukazuje Obrázek 3.<sup>[36]</sup>



**Obrázek 3:** Schéma instrumentálního uspořádání hmotnostního spektrometru při ionizaci za sníženého tlaku

Problematika iontových zdrojů i hmotnostních analyzátorů bude dále diskutována v samostatných kapitolách 2.2.1 a 2.2.2.

Detektory jsou v současnosti obecně založeny na principu elektronového násobiče. Výjimkou jsou hmotnostní analyzátoři typu iontové cyklotronové rezonance (ICR) a orbitrap, u nichž dochází k detekci iontů na základě frekvence jejich pohybu v elektrickém poli. Je-li použit elektronový násobič, může být tento zapojen ve dvou odlišných uspořádáních – jednakanálově – zaznamenává postupný dopad elektronů v jednom místě a bývá využit u přístrojů s kvadrupólem či sektorovým hmotnostním analyzátořem – nebo multikanálově – dříve v podobě fotografické desky, dnes jako pole osazené soustavou elektronových násobičů (sběr iontů se odehrává simultánně po celé ploše detektoru).<sup>[37]</sup>

### **2.2.1 Iontové zdroje**

Iontový zdroj je zařízení generující z molekul analytu nabitě částice v plynném skupenství. Ty mohou být nabity jak kladně, tak záporně - podle zvoleného ionizačního módu. Princip ionizace se u jednotlivých ionizačních technik liší, obecně je však založen na přenosu náboje při interakci molekul analytu s elektrony nebo při ion-molekulových reakcích s ionty pomocného plynu, kapaliny či pevné matrice. Ionizace probíhá buď za sníženého tlaku, nebo za atmosférického tlaku. Za sníženého tlaku pracuje elektronová a chemická ionizace (EI, z angl. „Electron Impact“, a CI, z angl. „Chemical Ionization“). Snížený tlak umožňuje vznik urychlených volných elektronů a jejich přežívání po dobu nezbytnou pro interakci s analyty a jejich ionizaci. Střední volná dráha molekul je při ionizaci za sníženého tlaku dostatečně dlouhá na to, aby docházelo pouze k monomolekulárním reakcím (kolize se stěnami iontového zdroje). Při ionizaci analytu se však mohou uplatňovat také srážky s molekulami v okolí a tvorba iontů může probíhat i bez použití elektronů a za atmosférického tlaku (API z angl. „Atmospheric Pressure Ionization“).

V dnešní době dokážeme úspěšně ionizovat vzorky všech skupenství. Již zmíněné EI a CI probíhají v plynné fázi, při API dochází k ionizaci molekul z roztoku - mezi API techniky patří např. ionizace elektrosprejem, (ESI, z angl. „Electrospray Ionization“), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, z angl. „Atmospheric Pressure Chemical Ionization“), a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, z angl. „Atmospheric Pressure Photoionization“) a pro pevné vzorky je vhodná metoda desorpce laserem za asistence



matrice (MALDI, z angl. „Matrix Assisted Laser Desorption Ionization“), desorpce elektrosprejem (DESI, z angl. „Desorption Electrospray Ionization“) nebo spektrometrie sekundárních iontů (SIMS, z angl. „Secondary Ions Mass Spectrometry“).<sup>[38]</sup> Pro účely této práce bude podrobněji popsán pouze princip ionizace elektrosprejem.

### 2.2.1.1 Ionizace elektrosprejem

Za otce ionizační techniky ESI lze považovat Malcolma Dolea, který v r. 1968 přišel s myšlenkou využití elektrospreje (do té doby používaného k nanášení laků v automobilovém průmyslu). V 80. letech 20. století na Doleův výzkum navázal John Fenn, který tuto techniku zdokonalil a uvedl do analytické praxe. Za rozvoj ESI byla J. Fennovi v r. 2002 udělena Nobelova cena za chemii.<sup>[39]</sup>

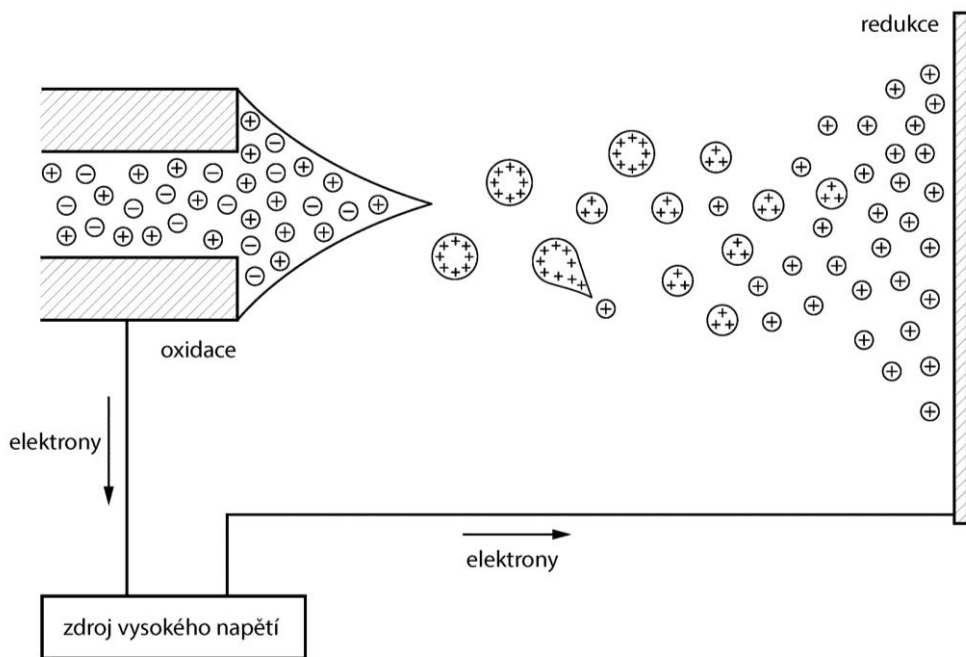
Princip ionizace elektrosprejem spočívá ve zmlžení roztoku analytu za jeho současné ionizace a následném odpaření takto vzniklých nabitých částic do plynné fáze. Působení silného elektrického pole vytvořeného mezi zmlžovací kapilárou zapojenou do elektrického obvodu a protilehlou elektrodou vede k vytvoření vrstvy shodně nabitých iontů na špičce kapiláry, odpuzování iontů se stejným nábojem a k rozptylu nabitých kapiček do prostoru. Schéma elektrospreje ukazuje Obrázek 4.

Proces ionizace při ESI lze rozdělit do čtyř po sobě jdoucích kroků: 1) vznik nabitých kapiček roztoku analytu na špičce sprejovací kapiláry a jejich uvolnění do prostoru, 2) odpařování rozpouštědla z povrchu těchto kapiček a opakované zmenšování jejich velikosti, vyvolané elektrostatickými silami (coulombická exploze), 3) přechod iontů z malých, vysoce nabitých kapek do plynné fáze, 4) sekundární ion-molekulové reakce analytu s částicemi v plynné fázi, a to jak za atmosférického tlaku, tak při přechodu do evakuovaných částí hmotnostního spektrometru.

Chování kapek uvolněných z povrchu kapaliny popisuje Rayleighova rovnice. Vyjadřuje podmínky, za kterých elektrostatické odpuzování iontů o stejném náboji převýší povrchové napětí kapaliny a dochází ke coulombické explozi - nabitě kapičky přestávají být stabilní, pokud jejich náboj a průměr dosáhnou kritických hodnot.

Mechanismus přechodu iontů z malých silně nabitých kapek do plynné fáze se snaží objasnit dvě teorie – *model zbytkového náboje* (charged residue model), který navrhl M. Dole,

a myšlenka *iontového vypařování* (ion evaporation model), se kterou přišli Iribarne a Thomson. Model zbytkového náboje předpokládá, že náboj zůstává lokalizován v původní kapce až do úplného odpaření rozpouštědla.<sup>[40]</sup> Model iontového vypařování je platný pro zředěné roztoky tvořící silně nabitě kapky – vyhoví-li tyto Rayleighově podmínce, dochází k jejich explozi, přičemž nově vytvořené částice jsou nositeli náboje.<sup>[41]</sup>



**Obrázek 4:** Schéma uspořádání a principu ESI v kladném ionizačním módu

Instrumentální uspořádání ESI sestává z přívodu vzorku do nebulizéru (průměr zmlžovací kapiláry se obvykle pohybuje v řádu desetin mm), kde může být vzorek dopován pomocnou kapalinou (sheath liquid). Kužel zmlženého roztoku je usměřňován pomocným plynem k protielektrodě, mezi níž a nebulizérem je napětí obvykle v řádu jednotek kV. Vzájemná pozice nebulizéru a otvoru pro vstup iontů do hmotnostního analyzátoru je optimalizována tak, aby byl eliminován vstup neutrálních částic a kapalných nečistot do evakuované části spektrometru. Vzorek pro ESI bývá rozpuštěn v polárním rozpouštědle (např. methanol), do kterého se přidává těkavý elektrolyt, sloužící jako pufr a napomáhající ionizaci molekul analytu.<sup>[42]</sup>

## 2.2.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor je vřazen za iontový zdroj a jeho úkolem je rozdělit prolétající nabitě částice podle poměru  $m/z$ . V počátcích vývoje MS byly k tomuto účelu využívány výhradně sektorové přístroje, separující ionty na základě rozdílného chování v elektrickém a/nebo magnetickém poli. Nejčastějším instrumentálním řešením těchto přístrojů je kombinace elektromagnetu o kruhové výseči a radiálně vkládaného elektrického pole, přičemž rozlišujeme dva základní konstrukční systémy této dvojité fokusace – uspořádání podle Mattaucha-Herzoga a Nier-Johnsonovu geometrii. S měnící se intenzitou magnetického pole a vkládaným napětím vstupují do štěrbin detektoru postupně ionty s různým poměrem  $m/z$ .<sup>[43]</sup> Protože dráhu letu iontů určuje působení statických polí, jsou tyto typy analyzátorů také někdy nazývány statickými.

Součástí moderní MS se staly tzv. analyzátory dynamické, v nichž je trajektorie prolétajících iontů determinována frekvencí vkládaného střídavého napětí a tím generovaného radiofrekvenčního pole.<sup>[44]</sup> Hojně využívanými zástupci této skupiny analyzátorů jsou např. kvadrupólový analyzátor (QMF, z angl. „Quadrupole Mass Filter“), iontová past (QIT, z angl. „Quadrupole Ion Trap“), iontová cyklotronová rezonance (ICR, z angl. „Ion Cyclotron Resonance“) nebo orbitrap. Do samostatné skupiny hmotnostních analyzátorů patří průletový analyzátor (TOF, z angl. „Time Of Flight“).

Ať už převod molekul analytu do podoby nabitých částic probíhá za sníženého, či za atmosférického tlaku, v dalších částech přístroje je třeba zajistit iontům volnou dráhu letu tak, aby na jejich cestě z iontového zdroje až k detektoru nedocházelo ke srážkám s jinými molekulami v plynné fázi. Za tímto účelem je prostor hmotnostního analyzátoru evakuován na hodnotu tlaku až  $10^{-10}$  Pa. Výjimkou je cílené srážení analytu s molekulami kolizního plynu prováděné především v tzv. kolizní cele za účelem zisku fragmentů analytu. Problematice kolizí indukované disociace se věnuje kapitola 2.2.4.<sup>[38]</sup>

V následujících dvou podkapitolách budou podrobněji popsány analyzátory, které byly využity v experimentální části této práce.

### 2.2.2.1 Kvadrupólový analyzátor a iontová past

V 60. letech byl do praxe uveden kvadrupólový analyzátor, jehož nízké výrobní náklady a jednoduchost ovládání zapříčinily, že se zanedlouho stal používanějším, než klasické sektorové přístroje. QMF je tvořen čtyřmi rovnoběžnými kovovými tyčemi ideálně eliptického tvaru<sup>Ⓜ</sup>, z nichž vždy dvě protilehlé mají shodnou polaritu a jsou připojeny ke zdroji napětí se stejnosměrnou i střídavou složkou. Kombinace frekvence střídavé složky a hodnoty stejnosměrné složky napětí zajišťuje výběr iontů s charakteristickým poměrem  $m/z$ . Částice, které dané podmínce nevyhovují, jsou odchýleny ze své dráhy letu a vybijí se na tyčích QMF.<sup>[45]</sup>

Na stejném principu jako QMF je založena také iontová past. Jedná se o kvadrupólový filtr tvořený prstencovou středovou elektrodou (namísto první dvojice elektrod) a dvěma koncovými elektrodami (nahrazují druhou dvojici elektrod). Zatímco QMF je schopen fokusovat svazek nabitých částic pouze ve směru dvou os, bez vlivu na jeho pohyb souběžný s tyčemi analyzátoru, QIT ovlivňuje pohyb iontů ve všech třech možných dimenzích, čímž umožňuje zadržet je v daném prostoru po delší časový úsek. Ve středu QIT jsou nejprve akumulovány ionty v širokém rozmezí  $m/z$ , a poté jsou radiofrekvenčním napětím o určité frekvenci vypuzovány částice charakteristického poměru  $m/z$ , jež opouští past a jsou směřovány na detektor. Stabilita iontů v QIT je zvyšována chlazením a celý prostor je vyplněn lehkým inertním plynem (helium), který snižuje kinetickou energii částic a pomáhá je udržovat ve středu pasti.<sup>[46]</sup> Ionty, opouštějící prostor pasti, jsou obvykle detekovány pomocí elektronových násobičů různých konstrukcí. Za rozvoj QIT techniky byli v r. 1989 vyznamenáni Nobelovou cenou němečtí vědci Hans G. Dehmelt a Wolfgang Paul. QMF i QIT jsou široce rozšířenými součástmi hmotnostních spektrometrů, jejich nevýhodou je však relativně nízké rozlišení ( $R \approx$  několik tisíc), a tyto techniky tudíž nedovolují měření přesné hmoty s vysokým rozlišením (HRMS, z angl. „High-Resolution Mass Spectrometry“).<sup>[47]</sup>

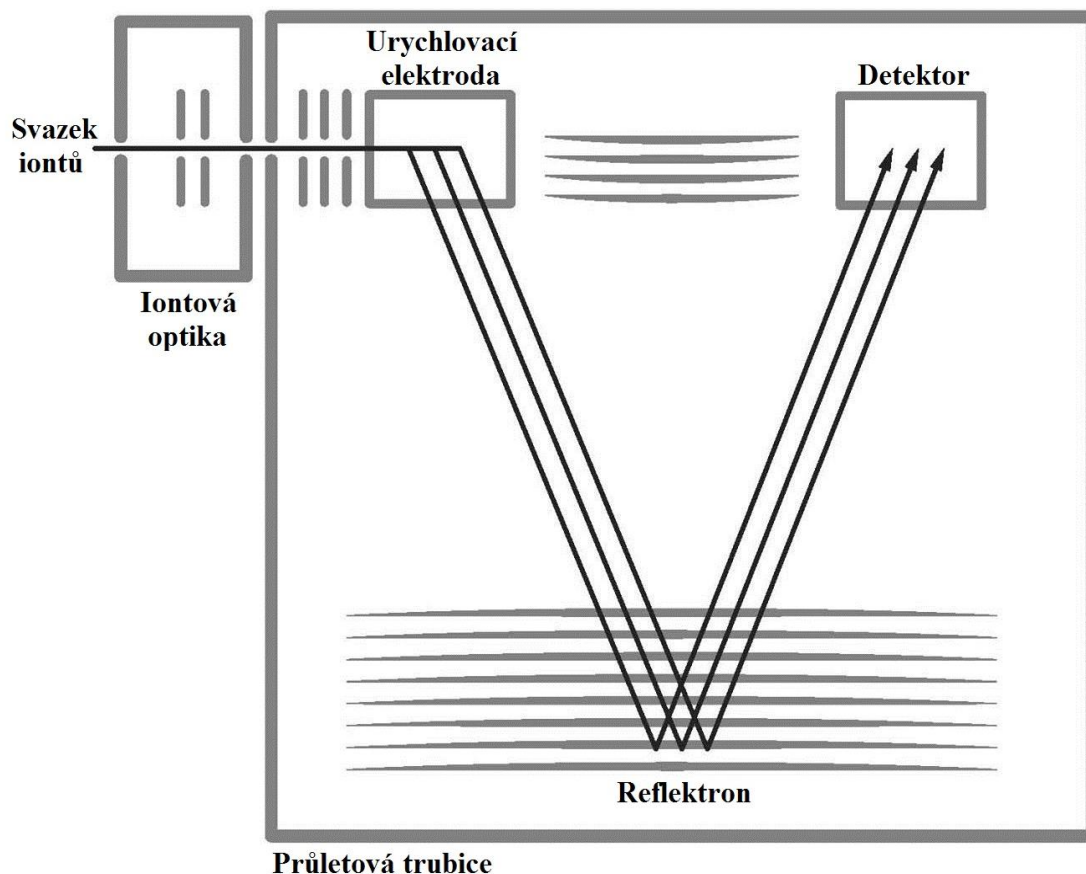
### 2.2.2.2 Průletový analyzátor

Průletový analyzátor (nebo také „analyzátor doby letu“) je zařízením, které nepatří ani do jedné z dosud jmenovaných skupin hmotnostních analyzátorů – jeho principem není

---

<sup>Ⓜ</sup> Ideální hyperbolické pole je aproximováno polem čtyř tyčí kruhového průřezu.

rozlišování iontů podle  $m/z$  na základě různého chování ve statickém či dynamickém poli, ale je založen na měření doby letu nabitých částic od jejich vzniku v iontovém zdroji po dopad na detektor. Schéma TOF je ukázáno na Obrázku 5.



**Obrázek 5:** Schéma instrumentace TOF v ortogonálním uspořádání<sup>[48]</sup>

Poté, co je všem iontům udělena urychlovací elektrodou stejná kinetická energie  $E_k$ , prochází částice směrem k detektoru, přičemž jejich rychlost se liší podle poměru  $m/z$ . Urychlovací elektroda a detektor mohou být vzájemně v lineárním nebo ortogonálním uspořádání a může mezi ně být vřazen reflektron, elektrostatické iontové zrcadlo, které slouží ke kompenzaci odchylek v  $E_k$  dodané částicím se shodným  $m/z$ . Detekce iontů probíhá nejčastěji pomocí mikrokanálové destičky s krátkou časovou konstantou.<sup>[37]</sup> Vzhledem k tomu, že vzdálenost mezi iontovým zdrojem a detektorem se v případě TOF pohybuje mezi 1-2 m, zvyšuje se u tohoto typu hmotnostního analyzátoru pravděpodobnost srážek iontů s neutrálními

částicemi. Z tohoto důvodu jsou u TOF nároky na vakuum vyšší, než u všech výše zmiňovaných hmotnostních analyzátorů. Dalším problémem bývá nízké rozlišení u lineárních TOF zařízení ( $R \approx 1000$ ), u ortogonálně uspořádaných přístrojů s reflektorem však lze dosáhnout značně užších píků, a měřit tak s vysokým rozlišením (v HRMS módu). Výhodami TOF analyzátoru jsou jeho univerzálnost (v principu umožňuje průlet iontů s neomezenou hodnotou  $m/z$ , čímž se stává nejvhodnějším pro spojení s MALDI) a rychlost měření (skenování řádově v ns je předností především při spojení s některou ze separačních technik).<sup>[45]</sup>

### 2.2.3 Hmotnostní spektrometrie anthokyaninů

Nejrozšířenější hmotnostně spektrometrickou technikou pro analýzu anthokyaninů (a flavonoidních látek obecně) je bezesporu API-MS, která poskytuje analytickému chemikovi dvě výhody: 1) ionizace za atmosférického tlaku je kompatibilní s kapalinovou chromatografií (HPLC, z angl. „High Performance Liquid Chromatography“), umožňující separaci netěkavých složek vzorku, jakými jsou i anthokyaninová barviva, před vlastním MS experimentem a 2) měkké ionizační techniky dovolují bez nadměrné fragmentace ionizovat i poměrně vysokomolekulární látky, mezi něž patří mj. glykosylované a acylované anthokyanidiny a jejich kondenzační produkty. Práce publikované v posledních 15 letech zmiňují především využití ESI-MS při strukturní analýze anthokyaninových barviv. Méně často jsou využívány APCI a MALDI ionizace.<sup>[25]</sup>

K analýze anthokyaninů spojenými technikami HPLC-MS lze přistupovat více různými způsoby. Rutinní kvalitativní analýzu lze provádět pomocí kombinace jednostupňové MS na jednodušším hmotnostním analyzátoru, vybaveném např. QMF, (a příp. pomocí simultánní UV-VIS detekce) a srovnání získaných retenčních dat se standardy. Analýzu složitých směsí, jejichž složky nejsou přesně známy, lze s výhodou realizovat za použití vícestupňové (tandemové) MS/MS, resp.  $MS^n$  na tandemových přístrojích (Q-TOF, QIT, ICR či orbitrap). Tento postup často umožní strukturní analýzu neznámé složky vzorku i bez nutnosti srovnávání retenčních dat. Zatímco první přístup je omezen na identifikaci anthokyaninů, jejichž standardy jsou dostupné a přesné retenční časy tudíž známy, je-li použita  $MS^n$ , lze z poměrů intenzit signálů jednotlivých dceřiných iontů usuzovat, o který z možných izomerních flavonoidů se jedná. Tímto postupem je odlišitelný např. pelargonidin od apigeninu (flavon) a genisteinu (isoflavon), jež mají shodnou hodnotu  $m/z = 271,0606$ ,

a lze tak provádět necílenou analýzu anthokyaninových barviv ve složitých reálných vzorcích. Tento postup poskytuje rozlišení izomerních sloučenin se stejným elementárním složením.<sup>[49]</sup> U izobarů (látky s různým elementárním složením, ale blízkou monoisotopickou hmotností), jež není možné rozlišit ani za použití víceúrovňové MS, se stává řešením měření přesné a správné hodnoty  $m/z$  na vysokorozlišujících přístrojích (HRMS). Často je také využívána kombinace několika výše zmíněných přístupů a identifikace sloučenin probíhá na základě srovnávání retenčních časů, zaznamenaných při HPLC, a MS a MS/MS spekter získaných ESI-MS.<sup>[5,11,26,27,50]</sup>

#### 2.2.4 Kolizí indukovaná disociace

Při EI je ionizace vzorku založena na střetu molekul analytu s vysokoenergetickými elektrony ( $E \approx 70$  eV). Takovéto srážky vyvolávají obvykle vznik ion-radikálové částice  $[M]^{+\bullet}$  nebo  $[M]^{\bullet}$ , která je vysoce nestabilní a prakticky okamžitě se rozpadá za vzniku řady fragmentových iontů. Výsledkem je bohaté fragmentační spektrum, v němž může zcela chybět signál původního molekulového iontu  $[M]^{+\bullet}$ . Díky tomuto faktu je EI považována za tzv. tvrdou ionizační techniku. Většina ostatních ionizačních technik umožňuje vyvolávat tzv. měkké ionizační události, založené na interakci molekul analytu s ionty pomocné látky (plynu, kapaliny či pevné matrice), a vést tak k tvorbě stabilních (pseudo)molekulových iontů  $[M+H]^+$  nebo  $[M-H]^-$ . Ve spektru jsou pak signály těchto částic (iontů) zřetelné, často dominantní, a k fragmentaci prakticky nedochází. To usnadňuje určení hmoty pseudomolekulového iontu, a tudíž elementárního složení analytu. Pro studium struktury je potom potřeba MS analýzu doplnit vhodným kolizním experimentem poskytujícím v dostatečném výtěžku charakteristické fragmenty.<sup>[37]</sup>

Již zmiňovaný nositel Nobelovy ceny J. J. Thomson si při svých experimentech s parabolovým spektrografem povšimnul na fotografické desce signálů, odpovídajících iontům se stejným  $m/z$ , ale lišícím se rychlostí, s níž na desku dopadají. Vysvětlením tohoto jevu je, že zatímco některé ionty setrvávají po celou dobu svého života (tj. od chvíle ionizace až po dopad na detektor) v nezměněné podobě, jiná část těchto iontů vznikla z původně větší molekuly v průběhu MS experimentu; takže ačkoliv se neliší hodnotou  $m/z$ , rychlost, kterou se pohybují, je o to nižší, o čí déle tyto ionty setrvaly v podobě původní molekuly. Intenzita signálu, jehož původcem je tento typ iontů, se zvyšuje se stoupajícím tlakem uvnitř spektrometru. Z toho lze vyvozovat, že vznik takovýchto fragmentových iontů je podmíněn

přítomností dalších částic v prostoru, s nimiž se mohou molekuly střetnout (molekuly plynu přítomného v prostoru analyzátoru). Tento jev je nazýván „kolizí indukovaná disociace“ (CID, z angl. „Collision-Induced Dissociation“).<sup>[51]</sup>

V praxi se CID uskutečňuje v kolizní cele, jež může být zároveň hmotnostním analyzátozem (např. QIT, ICR). Procesů, vyvolávajících fragmentaci iontů analytu je několik, vždy však při nich dochází k přeměně kinetické energie na vnitřní energii molekuly analytu, což vede k jejímu rozpadu (disociaci). Tento proces je obecně dvoufázový; v prvním (rychlejší) kroku je molekula aktivována a vzniká metastabilní ion, v druhém se tato vysokoenergetická částice rozpadá na fragmenty. Nejpoužívanějším způsobem aktivace molekul je střet s kolizním plynem, obvykle He, N<sub>2</sub> nebo Ar. Dalšími možnostmi jsou pak srážka s povrchem, fotodisociace nebo záchyt elektronu, v plynné fázi může být analyt aktivován také pomocí záření z infračervené oblasti světla (IRMPD, z angl. „Infrared Multiphoton Dissociation“). Vysokoenergetická CID je prováděna za dodání energie v řádu keV, běžnější je však nízkoenergetická CID, při níž kolizní energie nepřekračuje 60 eV.<sup>[52]</sup>

CID se stává ve spojení s měkkými ionizačními technikami účinným nástrojem pro tvorbu fragmentačních spekter. Z hlediska jejich reprodukovatelnosti je však zapotřebí rozlišovat, v jaké části hmotnostního spektrometru k fragmentaci iontů dochází. Zatímco spektra vznikající při EI-MS jsou dobře reprodukovatelná a mechanismy fragmentačních reakcí při EI jsou důkladně prozkoumány, při ionizaci měkkými ionizačními technikami s následnou CID může docházet k celé řadě ion-molekulových reakcí, znesnadňujících interpretaci výsledných spekter. Velmi často se při interpretaci fragmentačních procesů používá porovnávání spekter s databázemi a predikce fragmentačních dějů pomocí speciálních programů simulujících fragmentace pomocí fragmentačních pravidel a analogií se známými strukturami. Simulace však často trpí nadhodnocováním počtu možných fragmentačních cest. Vzhledem k tomu, že známé mechanismy fragmentace vycházejí primárně z EI ionizace, je správný popis procesů probíhajících při ionizaci měkkými ionizačními technikami a následné CID stále problematický a výzkum v této oblasti zdaleka není ukončený.<sup>[53]</sup>

K fragmentaci při CID dochází obecně štěpením nejslabších vazeb v molekule a/nebo za vzniku nejstabilnějších produktů. Takovéto fragmentační události generují vždy ion a neutrální částici (pozorovanou ve spektru jako rozdíl mezi signály iontu prekurzoru a odpovídajícího fragmentu). Výtěžek fragmentů (efektivita procesu jejich vzniku a doba jejich



přežívání) je přímo spojen s možností stabilizace vznikající struktury. Tak například eliminací vody dochází ke vzniku násobné vazby (zvýšení konjugovanosti systému) nebo vzniku cyklu v molekule. Procesy při CID probíhají v řádech mili- až mikrosekund, což umožňuje také přesmyky v molekule, jsou-li energeticky preferovány.<sup>[54]</sup>

### 2.2.5 Chování anthokyaninových barviv v kolizní cele hmotnostního spektrometru

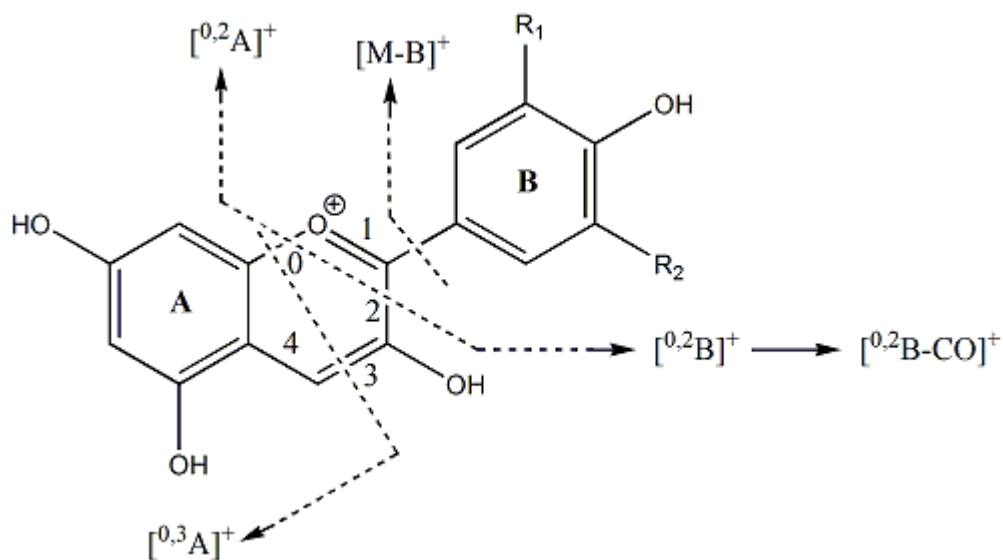
Vzhled fragmentačních spekter anthokyaninů je dán především kombinací dvou nejvýraznějších strukturních rysů těchto sloučenin – přítomností flavonoidního skeletu a jeho glykosylací.<sup>[55]</sup> Protože O-glykosidová vazba je relativně křehká, dochází při CID snadno k jejímu štěpení. Ve spektrech anthokyaninů lze potom nalézt píky, jejichž m/z odpovídá ztrátě jedné či více cukerných jednotek (např. ztráta odpovídající číselně dehydratované glukose). Ve spektrech jsou obvykle také patrné charakteristické série několika fragmentů s velkým m/z (různé neutrální ztráty z cukerné části iontu prekursoru).<sup>[54]</sup>

Flavyliový kation anthokyaninů je stabilní a při použití měkkých ionizačních technik vykazuje pouze slabou fragmentaci, takže v ESI-MS spektrech (v pozitivním módu) dominuje intenzivní molekulový ion aglykonu  $M^+$ . Během fragmentace flavyliového skeletu po jeho kolizí indukované aktivaci dochází ke ztrátám malých neutrálních molekul, jako jsou  $H_2O$ ,  $CO$  a méně často i k odštěpení vodíkového radikálu.<sup>[55]</sup> U methoxylovaných anthokyanidinů je možno pozorovat také odštěpení methanu a methylového radikálu ( $\bullet CH_3$ ). Odštěpení radikálu je, pokud uvažíme kolizní aktivaci malými energiemi, na první pohled překvapivé, ale u flavonoidních látek poměrně hojně. Důvodem je možnost stabilizace vznikajícího iontu s lichým počtem elektronů jejich delokalizací na aromatickém skeletu molekuly. Dalším procesem pozorovaným u methoxylovaných anthokyaninů je přímé odštěpení methanolu. Oliveira a kol. pozorovali taktéž odštěpení hydroxylových radikálů za vzniku  $[M-OH]^{+\bullet}$  iontů.<sup>[55]</sup>

Působením vyšší kolizní energie může docházet k zániku několika vazeb v C-kruhu v průběhu jednoho fragmentačního procesu. Tento proces je označován jako retro-Diels-Alderovo štěpení (RDA). Nejčastější je v případě flavyliového kationtu vznik fragmentů  $[^{0,2}B]^+$  (ten může dále fragmentovat na  $[^{0,2}B-CO]^+$ ),  $[^{0,2}A]^+$ , případně resonančně stabilizovaného  $[^{0,2}A]^{+\bullet}$ . Vedle toho jsou pozorovány i štěpení ostatních vazeb tvořících heterocyklus (např.  $[^{0,3}A]^+$ ). Poměr jednotlivých RDA fragmentů je dán chemickým okolím C-kruhu. Tyto procesy jsou

pro jednotlivé flavonoidní struktury charakteristické, a tudíž jsou klíčové pro jejich identifikaci. U anthokyaninů je vedle RDA procesů často pozorována i ztráta celého B-kruhu. U látek flavonoidní povahy bylo prokázáno, že pravděpodobnost tohoto typu fragmentace souvisí se stupněm hydroxylace B-kruhu. Např. u flavonů s dvěma a více hydroxyskupinami na B-kruhu dochází snadněji k jeho odštěpení (spolu s uhlíkem z C-kruhu) a vzniku produktových iontů typu  $[^{1,2}A]^+$  nebo  $[^{1,2}B]^+$ .<sup>[56]</sup> Obrázek 6 shrnuje nomenklaturu typických fragmentačních reakcí anthokyanidinů.<sup>[57]</sup>

Ačkoliv jsou anthokyaninová barviva nejčastěji studována v kladném módu ESI-MS, může přinášet použití záporného módu při CID užitečné strukturální informace napomáhající snadné identifikaci anthokyaninů a, jak již bylo uvedeno dříve, jejich odlišení od jiných polyfenolů se shodným elementárním složením, a tudíž i shodnou hodnotou m/z. Fragmentací a měřením v záporném módu ESI tak lze rozlišit např. delfinidin-3-O-glukosid od quercetin-3-O-glukosidu, což je při použití CID v kladném módu problematické. Ačkoliv se obě látky v kladném módu vyznačují stejnou hodnotou přesné hmoty ( $m/z = 465,1028$ ), jejich fragmentační spektra v záporném módu se liší intenzitami signálů i přítomností některých píků.<sup>[58]</sup>

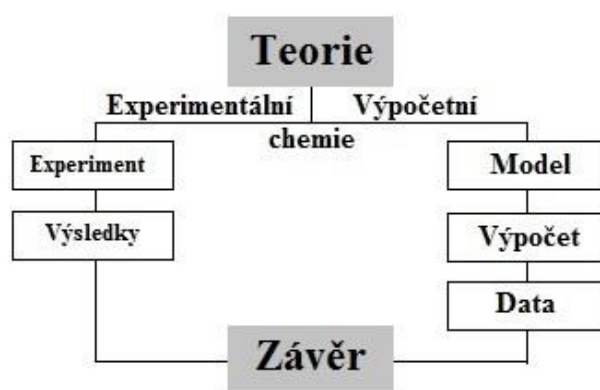


**Obrázek 6:** Značení fragmentových iontů vznikajících štěpením vazeb uhlík-uhlík v C-kruhu flavyliového kationtu; velká písmena popisují, který z benzenových kruhů je základem fragmentu, číslice oddělené čárkou označují vazby kruhu C, k jejichž štěpení došlo.<sup>[59]</sup>

## 2.3 Výpočetní chemie

### 2.3.1 Úvod do kvantové chemie

Výpočetní chemie je jedním z rychle se rozvíjejících vědních oborů, umožňující atomistický pohled na rozmanité chemické problémy. Její rozvoj je umožněn zejména díky prudkému zvyšování výpočetní rychlosti současných počítačů a výpočetních klastrů a poměrně dobré dostupnosti spolehlivých softwarových nástrojů. Obecné schéma postupu při aplikaci výpočetní chemie znázorňuje Obrázek 7. Teoretické základy algoritmů, implementovaných do takovýchto počítačových programů sloužících k simulaci chemických pochodů, vycházejí především z poznatků kvantové chemie. Jejich úloha je přitom dvojitá: *interpretace* a *predikce* chování zkoumaných částic v mikrosvětě. Chování objektů na atomární a molekulové úrovni je značně odlišné od chování nám důvěrně známého makrosvěta. Při popisu vlastností základních stavebních jednotek hmoty (tj. atomů a molekul) selhávají zákony klasické mechaniky a ke slovu se dostávají jiné principy. Ty nelze odvodit z klasických fyzikálních postulátů, jejich platnost je však ověřitelná srovnáním výsledků kvantových výpočtů se závěry vycházejícími z experimentu. Kvantová mechanika umožňuje dobrou aproximaci procesů probíhajících v mikrosvětě a pomáhá tak stimulovat další cílené experimenty vedoucí k detailnímu pochopení studovaného děje.<sup>[60]</sup>



Obrázek 7: Srovnání pracovního postupu experimentální a výpočetní chemie

Chceme-li realisticky popsat chování molekuly při chemickém procesu, musíme zohlednit, že je tvořena atomy s určitým počtem elektronů, a zaměřit se tedy v důsledku na popis molekulových orbitalů těchto elektronů (zkráceně MO). Popis MO lze získat aplikací teorie

MO-LCAO, která říká, že MO jsou lineární kombinací orbitalů atomových (zkráceně AO). Klasická fyzika rozlišuje dva základní objekty, částici a vlnu. Elektron je objekt, jenž se nepodobá ani vlně ani částici v pravém slova smyslu (podobně lze nahlížet i na další mikročástice). Proto musel být navržen nový, kvantově-chemický systém popisu částic mikrosvěta, jehož autorem je E. Schrödinger.<sup>[61]</sup> Ten přiřadil každému objektu vlnovou funkci  $\Psi$ , veličinu, charakterizující časově nezávislý stav částice. Ze zákona o zachování energie vyplývá, že energie každého objektu je dána součtem jeho kinetické a potenciální energie:

$$E = E_k + E_p \quad (2)$$

Fyzikální veličiny systému lze také v klasické fyzice vyjádřit pomocí jeho souřadnic a hybnosti. Energie hmotného bodu je tedy závislá na jeho hybnosti  $p$  a trajektorii pohybu  $x$ , jež shrnuje Hamiltonova funkce  $H$ :

$$E = H(p, x) \quad (3)$$

Z rovnic (3) a (4) lze získat Schrödingerovu vlnovou rovnici, která je základem kvantově-chemického popisu MO (nejedná se o klasické matematické odvození):

$$E\Psi = \hat{H}\Psi \quad (4)$$

kde  $\hat{H}$  je operátor Hamiltonovy funkce, tzv. hamiltonián. Tato rovnice vyjadřuje závislost vlnové funkce na prostorových souřadnicích částice (elektronu). Druhá mocnina vlnové funkce  $\Psi^2$  pak udává hustotu pravděpodobnosti výskytu elektronu v daném prostoru.<sup>[62]</sup>

S výjimkou několika nejjednodušších systémů není Schrödingerova rovnice řešitelná exaktně a musíme se spokojit s jejím přibližným řešením. K tomu nám dopomáhá řada matematických aproximací. První z nich, Born-Oppenheimerova, zjednodušuje výpočet celkového hamiltoniánu. Ten by v exaktním vyjádření zahrnoval příspěvky všech kinetických i potenciálních energií daného elektronu a jádra atomu, způsobené jejich vzájemnou interakcí. Born-Oppenheimerova aproximace zanedbává operátor kinetické energie jádra, neboť uvažuje, že to je vzhledem k pohybu elektronu nehybné. Dalším zjednodušením je úvaha, zakládající se na faktu, že většina molekul obsahuje sudý počet elektronů, a tudíž je v jejím základním energetickém stavu její celkový spin roven nule. Takovýto systém se označuje jako systém s uzavřenými slupkami, a jak vyplývá z podmínky sudého počtu

elektronů, není aplikovatelný na radikálové částice. Na základě obou zmíněných aproximací lze vytvořit soustavu Hartree-Fockových rovnic, kterou však opět nelze pro běžný systém řešit. Z tohoto důvodu nastupuje iterační způsob řešení, jenž mj. neuvažuje všechny interakce jednotlivých elektronů, ale předpokládá, že každý elektron je obklopen pouze silovým polem, tvořeným ostatními elektrony systému. Tento postup při řešení Hartree-Fockových rovnic se nazývá metoda konzistentního pole, (zkráceně SCF, z anglického „Self-Consistent Field“) někdy též Hartree-Fockova metoda (zkráceně HF).<sup>[60]</sup>

### 2.3.2 Metody výpočetní chemie

Nejpoužívanější výpočetní metody lze rozdělit do tří velkých skupin: metody *ab initio* („od počátku“), semiempirické a empirické metody. Metody *ab initio* jsou buď založeny na již zmíněné teorii SCF, nebo využívají k výpočtu energie systému jiný přístup, např. studium elektronové hustoty systému, které bude diskutováno později. Aproximace vlastní všem *ab initio* metodám je zavedení tzv. bázi, které zastupují samotné vlnové funkce elektronů. Tyto báze fungují na principu MO-LCAO a jsou souhrnem Slaterových nebo Gaussových funkcí, reprezentujících AO jednotlivých elektronů v molekule. Slaterovy atomové orbitály lze vytvořit lineární kombinací dvou až šesti orbitalů Gaussových (jinak též gaussianů) a jejich výpočet je tedy složitější. Počet gaussianů zahrnutých do výpočtu se obvykle píše do kulatých závorek, takže např. výraz (9s 5p) značí, že se jedná o bázi složenou z 9 gaussovských AO typu s a 5 gaussianů typu p. V hranatých závorkách nalezneme informaci o počtu a typu použitých Slaterových AO. Značnou nevýhodou *ab initio* přístupu je nutnost výpočtu integrálů všech těchto funkcí, čímž se zvyšuje časová i softwarová náročnost metody. Naproti tomu semiempirické metody zavádějí řadu aproximací vedoucí ke snížení počtu těchto integrálů, navíc se některé z nich nepočítají, ale dosazují se za ně určité hodnoty tak, aby výsledek výpočtu odpovídal experimentální skutečnosti. U empirických metod dokonce k výpočtu integrálů nedochází vůbec, neboť jsou při nich místo jednotlivých gaussianů používána předem stanovená čísla. Díky těmto zjednodušením jsou jak semiempirické, tak empirické výpočetní metody časově i výpočtově jednodušší, než metody *ab initio*.<sup>[60]</sup>

Jednou z prvních vyvinutých semiempirických metod je metoda CNDO (z angl. „Complete Neglect of Differential Overlap“), která při výpočtech zohledňuje pouze valenční elektrony v systému, a navíc zanedbává překryvové integrály, tj. nezohledňuje vzájemné repulze

elektronů. Její obměnou je INDO (z angl. „Intermediate Neglect of Differential Overlap“), jež používá překryvový integrál elektronů téhož atomu a tím zpřesňuje výpočet.<sup>[63]</sup>

Speciálním případem *ab initio* metody je výpočet založený na teorii funkcionalu hustoty (zkratka DFT, z anglického „Density Functional Theory“). Tato teorie vychází z myšlenky, že existuje vztah mezi energií systému v základním stavu  $E_0$  a jeho elektronovou hustotou  $\rho_0$ , kterou lze odvodit ze struktury MO. Při DFT výpočtech nedochází k sestavení vlnových funkcí systému, ale jeho energie je zde počítána jako funkce elektronové hustoty molekuly. Na rozdíl od HF metody, jejímž výsledkem je energetická hodnota nazývaná Hartree-Fockova limita  $E_{HF}$ , se DFT pokouší nalézt přesnou hodnotu celkové energie  $E_0$ . Mezi těmito dvěma čísly je vztah:

$$E_{kor} = E_0 - E_{HF} \quad (5)$$

Korelační energie  $E_{kor}$  zahrnuje coulombické repulze elektronů a nabývá záporných hodnot, neboť  $E_0$  i  $E_{HF} < 0$  a zároveň  $|E_0| > |E_{HF}|$ .<sup>[64]</sup>

Přestože korelační energie získaná pomocí DFT je vysoce přesná, její výpočet opět vyžaduje jistou aproximaci, již je dosaženo použitím tzv. hybridního funkcionalu. Ten zahrnuje jak Hartree-Fockovu limitu, tak energii získanou empiricky nebo *ab initio*, a dobře popisuje např. délky vazeb v systému nebo jeho vibrační frekvence. Jedním z obvyklých funkcionalů je B3LYP, jehož pojmenování vychází ze jmen jeho tvůrců – jedná se o kombinaci tříparametrového Beckeho funkcionalu<sup>[65]</sup> s funkcionalém vyvinutým Leem, Yangem a Parrem.<sup>[66]</sup>

Výčet některých metod výpočetní chemie a jejich vlastnosti shrnuje Tabulka II.

**Tabulka II:** Přehled vybraných metod používaných ve výpočetní chemii<sup>[60]</sup>

metody	<i>ab initio</i>	semiempirické	empirické
příklady metod	HF, IEPA, DFT	CNDO (INDO/MINDO), AM1	EHT, HMO
výhody	přesnost	menší výpočetní náročnost, než u metod <i>ab initio</i>	výpočetně nejméně náročné
nevýhody	časová a výpočetní náročnost	dopouští se více chyb	nepřesné

### 2.3.3 Použití kvantově-chemických metod při studiu anthokyaninů

Tak, jak začínají kvantově-chemické výpočetní metody nalézat uplatnění ve stále více vědních disciplínách, lze v posledních padesáti letech sledovat také jejich použití ve výzkumu chemie flavonoidních látek a konkrétně i anthokyaninů.<sup>[67]</sup> Již v roce 1965 využili Boyd a Singer empirickou metodu HMO (Hückelova metoda molekulových orbitalů) při studiu solí 2-fenylbenzopyrylia a hledání souvislosti mezi jejich energií v základním stavu a experimentálně určeným absorpčním maximem v UV-VIS oblasti.<sup>[68]</sup> V devadesátých letech se s rozvojem počítačové techniky, a tudíž zpřístupněním výpočtově náročnějších metod většímu počtu vědeckých skupin, začaly široce uplatňovat semiempirické metody, jako je např. AM1 (z anglického „Austin Method“), která dokázala osvětlit význam substituce flavyliového kationtu, ale nedovedla přesně popsat konjugovaný  $\pi$ -elektronový systém této struktury.<sup>[67]</sup> V posledních dvou dekádách nalézá nejširší uplatnění v oblasti chemie anthokyaninů metoda DFT, konkrétně její modifikace, používající hybridní funkcionály, tj. kombinaci jednoduché funkce elektronové hustoty a její první i vyšší derivace.<sup>[64]</sup>

Jednou z důležitých informací, již je možné získat pomocí kvantově-chemických výpočtů, je preference molekuly z hlediska její geometrie. Energeticky upřednostňované jsou konformery (tj. geometrické izomery, jež se mohou měnit jeden v druhý pouhou rotací kolem jednoduché vazby) s nejnižší energií v základním stavu. Tu lze získat pomocí výpočetní chemie v několika různých podobách. Tým K. Sakaty použil ke studiu molekuly pelargonidinu metodu založenou na DFT a hybridním funkcionálu B3LYP. Studie uvádí, že je energeticky preferováno planární uspořádání flavyliového kationtu této molekuly v plynné fázi, tzn. dihedralní (torzní) úhel mezi B-kruhem a C-kruhem pelargonidinu se blíží 180°.<sup>[69]</sup> Ke stejnému závěru dospěli také další autoři, kteří tento postulát rozšířili i na zbývajících pět přírodně se vyskytujících anthokyanidinů.<sup>[70–72]</sup> Při studiu elektronové hustoty pelargonidinu metodou QTAIM (z anglického „Quantum Theory of Atoms in Molecules“) byla zároveň lokalizována vodíková vazba, spojující kruhy B a C, jež by mohla být vysvětlením pro preferenci planárního uspořádání molekuly v jejím základním stavu.<sup>[71]</sup>

Provedené DFT výpočty jsou přesné při popisu molekul anthokyaninů v plynné fázi. Pro zohlednění interakcí částic v roztoku je zapotřebí DFT rozšířit o model rozpouštědla. Ten může být buď explicitní (modely jednotlivých molekul rozpouštědla zasazené do bezprostředního okolí studované molekuly) nebo implicitní (solvent je reprezentován

homogenním dielektrikem, jež obklopuje molekuly studované látky). Jedna z metod, využívajících tento postup (implicitní model rozpouštědla), je PCM (z anglického „Polarizable Continuum Model“). Při jejím použití lze předpovídat změny struktury anthokyaninů v závislosti na pH (srovnáním jejich Gibbsových energií získaných při výpočtu) nebo určit  $pK_a$  zkoumané látky. Slabinou tohoto přístupu je zanedbání změn v rozpouštědle v závislosti na čase, neboť spočtený hamiltonián je časově nezávislý.<sup>[67,73]</sup>

Kromě základního stavu molekul anthokyaninů lze pomocí *ab initio* metod studovat také jejich excitované stavy.<sup>[67]</sup> Takovýto výzkum byl také součástí již zmiňované práce K. Sakaty, v níž byly metodou SE-CI (z anglického „Single Excitation-Configuration Interaction“) počítány excitační energie pelargonidinu, kyanidinu a delfinidinu.<sup>[69]</sup> Podobná práce byla provedena také za použití semiempirické metody ZINDO (metoda vycházející z INDO po obměně Michaelem Zernerem<sup>[63]</sup>), v níž byly z vypočtených excitačních energií vyvozovány hodnoty  $\lambda_{max}$  (vlnové délky elektromagnetického záření, které jsou molekulami maximálně absorbovány). Tyto výsledky byly srovnávány s experimentálně získanými vlnovými délkami nejnižšího elektronového přechodu v UV-VIS oblasti. Ze studovaných molekul se získané  $\lambda_{max}$  nejvíce rozcházel s experimentálními daty u pelargonidinu.<sup>[74]</sup>

Vzhledem k tomu, že anthokyaniny jsou přírodními barvivy s absorpčními maximy ve viditelné oblasti světla, stojí v popředí zájmu chemiků *in silico* určování jejich  $\lambda_{max}$  a srovnávání vypočítaných hodnot s experimentálně získanými daty. Freitas a jeho tým srovnávali výsledky semiempirických metod (INDO a AM1) a DFT v kombinaci s PCM při hledání absorpčního maxima osmnácti různých solí flavyliu. Zatímco DFT metoda měla tendence hodnoty  $\lambda_{max}$  obecně podhodnocovat, metoda INDO byla přesná při výpočtech  $\lambda_{max}$  flavyliového kationtu. Na druhou stranu ale selhávala při popisu chinonové báze.<sup>[75]</sup>

Kromě výše zmíněných příkladů použití výpočetních metod při studiu vlastností volných anthokyaninů byly kvantově-chemické metody využity také pro účely výzkumu produktů kopigmentace a komplexace anthokyaninových barviv a s nimi spojených nekovalentních interakcí. Při hledání optimální geometrie nekovalentních komplexů anthokyaninových barviv není přesnost klasické DFT metody dostatečná, proto byly vyvinuty další speciální funkcionály, zahrnující disperzní síly, jež jsou součástí van der Waalových interakcí. Nekovalentní komplexy je možno zkoumat také s ohledem na jejich spektrální vlastnosti. Díky RSH funkcionálu (z angl. „Range-Separated Hybrid“) lze na základě DFT predikovat také



velikost posunu absorpčního maxima v UV-VIS oblasti pro vzniklý komplex ve srovnání s původním anthokyaninem.<sup>[67,76]</sup>

### 2.3.4 Výpočetní chemie ve výzkumu fragmentačních procesů

Pro interpretaci fragmentačních spekter získaných při CID experimentu je využíváno řady postupů, které jsou často obsaženy ve specializovaném software. Způsoby (počítačového) vyhodnocování MS spekter lze obecně rozdělit do několika skupin: predikce fragmentačních spekter na základě fragmentačních pravidel, kombinatorický přístup, predikce molekulového „otisku prstu“ (z anglického „molecular fingerprint“) a interpretace na základě metod výpočetní chemie. První tři jmenované postupy jsou založeny na rozsáhlých databázích a vyžadují tak manuální tvorbu základních algoritmů, s jejichž pomocí jsou fragmentační spektra generována nebo přiřazena k určité molekule či skupině látek. Na základě fragmentačních pravidel fungují programy Mass Frontier (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), ACD/MS Fragmenter (Advanced Chemistry Labs, Toronto, Kanada) a další. Ty vyvozují mechanismy štěpení dané molekuly z algoritmu pro reakce v EI a zároveň prohledávají databázi spekter přejatých z relevantní literatury. Při kombinatorickém přístupu jsou automaticky generovány veškeré fragmenty vznikající při štěpení všech vazeb v molekule (čímž ovšem dochází k nadhodnocování počtu reálných fragmentačních cest). Kompetitivní modelování fragmentačních spekter kombinuje oba předchozí postupy – na základě fragmentačních pravidel vysvětluje pouze signály skutečně nalezené ve spektru. Predikce molekulového „otisku prstu“ vychází z manuálně sestavených fragmentačních schémat, jež byly experimentálně ověřeny pro jednotlivé skupiny látek.<sup>[77]</sup> Tyto přístupy (na rozdíl od kvantově chemických výpočtů) nevycházejí přímo z termodynamických dat vztahujících se ke studovaným fragmentačním dějům, ani neberou v potaz MO a jejich vliv na (de)protonaci molekuly, a v důsledku tedy na štěpení vazeb při CID.<sup>[78]</sup>

Naproti tomu metody výpočetní chemie umožňují zpřesnit a racionalizovat možné fragmentační cesty, neboť postihují chování molekul až na subatomární úrovni (tzn. vlastnosti vycházející z povahy AO). Při výpočtech navíc nemusí být používány metody, zohledňující vliv rozpouštědla, neboť procesy doprovázející CID se odehrávají v plynné fázi ve vakuu (prostor kolizní cely) nebo v prostředí, kde se tlak mění od atmosférického až po vysoké vakuum (atmosférický nebo vakuový iontový zdroj a části iontové optiky před a za kolizní celou). Jedním z možných postupů dobře popisujících například proces ESI je srovnávání

energií molekuly při její protonizaci na různých atomech (atomy uhlíku a heteroatomy přítomné ve skeletu molekuly) a sledování změn v délce vazeb a vazebných úhlů mezi atomy tvořícími jednotlivé vazby.<sup>[53]</sup>

V oblasti fragmentací jsou využívány jak semiempirické, tak *ab initio* metody. Například Holman se svým týmem ve své práci využil metodu AM1 k předběžné optimalizaci 3D struktury 4-benzensulfinyl-3-methylfenylaminu, aby následně počítal protonovou afinitu této látky v plynné fázi za použití DFT a funkcionálu B3LYP.<sup>[79]</sup> Metody AM1 a DFT (B3LYP) také zmiňují P. Wright, A. Alex a F. Pullen ve spojitosti se studiem fragmentačních cest patnácti vybraných látek, jakožto zástupců různých skupin analytů zkoumaných pomocí CID-MS. Své úvahy o místě preferované protonizace molekul zakládali na prodlužování vazby mezi protonizovaným heteroatomem a sousedním uhlíkem (štěpení vazeb uhlík-uhlík nebylo při experimentech pozorováno, a tudíž nebylo bráno v potaz). Obě použité kvantově-chemické metody šly ke shodným výsledkům, z tohoto důvodu upřednostnili autoři semiempirickou metodu AM1, jež je výpočetně méně náročná.<sup>[53]</sup> Také výzkumníci z Lisabonské univerzity založili svou práci na semiempirických metodách. Z jejich studie vyplývá, že semiempirické metody neposkytují tak přesné hodnoty protonových afinit vybraných aminokyselin, jaké dokáží generovat metody *ab initio*. Pro posouzení preferencí protonizačních míst jsou však dostatečně správné.<sup>[80]</sup>

Vědecká skupina Patricie Wright ověřovala shodu DFT (B3LYP) výpočtů s CID-MS experimentem na pestré škále látek, od jednoduchých fenolů, kortizonu a reserpinu až po léčiva a jejich metabolity.<sup>[53,78,81,82]</sup> V práci, zabývající se fragmentací sulfoxidů, bylo provedeno také srovnání metod na bázi DFT s HF metodou.<sup>[83]</sup>

Studii, zabývající se fragmentací pelargonidin-3,5-diglukosidu a kyanidin-3,5-diglukosidu v kolizní cele hmotnostního spektrometru a používající zároveň k osvětlení pravděpodobných fragmentačních cest kvantově-chemické výpočty, publikovali J. Barnes a K. Schug. Zkoumané anthokyaniny byly extrahovány z okvětních lístků růží, separovány pomocí HPLC a analyzovány za použití ESI-QIT-TOF-MS. Paralelně s experimentálními pokusy, na jejichž základě byla provedena interpretace štěpení vazeb uhlík-uhlík uvnitř C-kruhu aglykonu, byly tyto procesy zkoumány DFT/B3LYP metodou. Nejpravděpodobnější produkty fragmentačních reakcí byly vybrány na základě nejnižších energií získaných pomocí výpočtů.<sup>[84]</sup> Obdobný přístup zvolili také Kurka a kol., kteří zkoumali fragmentaci molekuly

5-methylpyranopelargonidinu při CID v ESI-QqTOF-MS (tj. dvojitý kvadrupól spojený s průletovým analyzátorem). Experimentálně získaná data byla v této práci srovnávána s Gibbsovými energiemi získanými metodou DFT/B3LYP, jež pomohly odhalit energeticky preferované přesuny vodíku v rámci molekuly a místa pravděpodobného štěpení vody a oxidu uhelnatého.<sup>[85]</sup>

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístrojové vybavení

Pro hmotnostně-spektrometrické studium pelargonidinu byly použity tyto přístroje:

- hmotnostní spektrometr Synapt G2-S (Waters, Millford, USA) vybavený elektrosprejem, kvadrupólem pro selekci iontů, dvěma kolizními celami, celou pro měření iontové mobility a analyzátozem doby letu v ortogonálním uspořádání a s ESI jako iontovým zdrojem
- hmotnostní spektrometr LCQ Deca (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) s elektrosprejem a analyzátozem na principu iontové pasti

### 3.2 Chemikálie

V praktické části diplomové práce byly využity následující chemikálie: pelargonidin-chlorid purum, methanol ( $\geq 99,9\%$ ), deuterovaný methanol ( $99,8\%$  D), kyselina mravenčí pro MS ( $\sim 98\%$ ); vše od Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

### 3.3 Pracovní postupy

#### 3.3.1 Postupy kvantově-chemických výpočtů

Veškeré kvantově-chemické výpočty v této práci byly provedeny za pomoci software Gaussian 09 (Gaussian, Inc., Wallingford, USA). Jako metoda byla použita DFT s funkcionálem B3LYP a sadou bází 6-311+G(2d,p). V několika případech byl výpočetní čas nutný k dosažení výsledku zkrácen předzpracováním výpočtu za použití semiempirické metody AM1 (rovněž v programu Gaussian 09), nebo silového pole MMFF94 v programu Avogadro 1.1.1 (GNU General Public License). Optimalizace geometrie molekuly probíhala na základě hledání lokálního minima (energetické minimum, zkráceně OPT) nebo sedlového bodu (tranzitní stav, zkráceně TS) na ploše potenciální energie. Zároveň byla při každém výpočtu prováděna analýza frekvencí – vykazovala-li optimalizovaná molekula přesně jednu imaginární frekvenci, byla tato struktura označena za tranzitní stav, pokud záporná frekvence nalezena nebyla, byla struktura považována za minimum. Pro podrobné studium plochy

potenciální energie molekuly pelargonidinu (závislost celkové energie systému na jeho geometrii) byl použit sken plochy potenciální energie (PES sken, z angl. „Potential Energy Surface scan“). V případě, kdy nebyl nalezen vhodný TS, byl tento nahrazen single point výpočtem energie molekuly v místě nejnižší energie na křivce PES. Výpočty, zkoumající TS deuteria při jeho pohybu po perdeuterované molekule, byly zadány pomocí modifikace (iso=2), dosazené do řádku příslušného vodíku. Při hledání preferovaných energetických minim a tranzitních stavů byly srovnávány hodnoty Gibbsovy energie nalezených optimalizovaných struktur (při výpočtech byla použita teplotní korekce). Nomenklatura používaná ve výpočtové části diplomové práce je shodná s tou, již uvádí Obrázky 1 a 6, přičemž číslování kyslíků a vodíků je odvozeno od čísla skeletálního uhlíku, na něž jsou tyto atomy navázány (více v kapitole 4.2.1).

### 3.3.2 Technika měření MS spekter

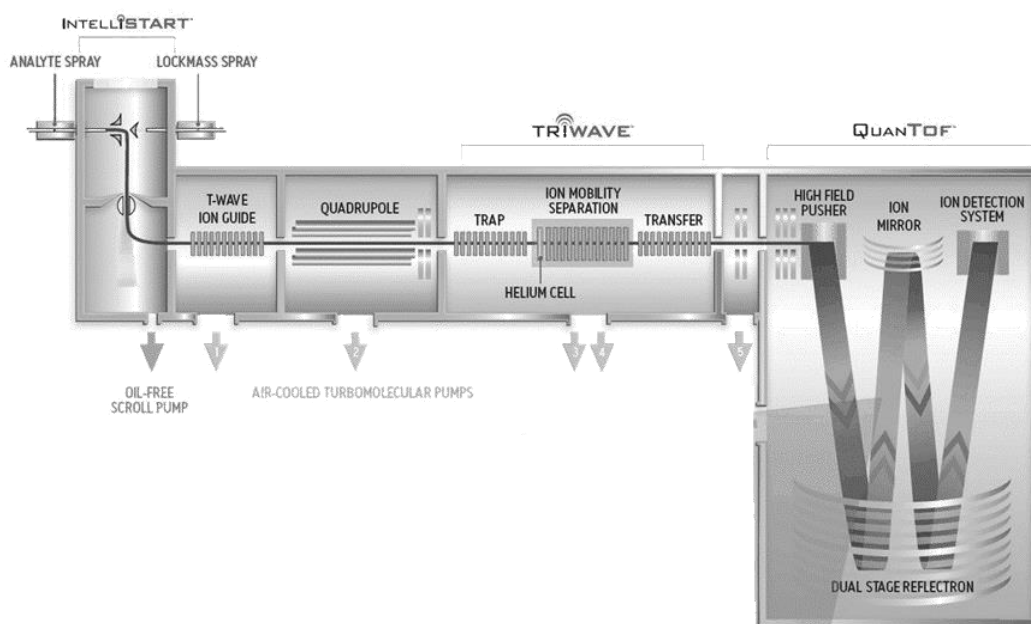
Pro studium fragmentace pelargonidinu byla provedena řada experimentů, při níž byl rodičovský ion izolován příslušným analyzátozem (kvadrupól nebo iontová past), kolizně aktivován a v tandemovém experimentu byly proměřeny ionty vznikající rozpadem rodičovské molekuly. Takto získaná data byla interpretována na základě známých fragmentačních pravidel a výsledků podobných studií publikovaných v původní literatuře, zabývajících se chováním anthokyanidinů při CID-MS. Struktury vznikajících produktových iontů byly potvrzovány také s využitím programu Mass Frontier (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).<sup>[1,47,49,55]</sup> Získaná data a navržené struktury byly následně porovnávány s kvantově-chemickými výpočty.

Měření hmotnostních spekter čistého standardu pelargonidinu proběhlo na dvou přístrojích. Při použití přístroje Synapt G2-S byl nastříkovaný Pg (c = 10 mg/l) rozpuštěný v okyseleném methanolu (methanol : voda : kys. mravenčí 80 : 20 : 1 -v/v/v). Nastavení parametrů měření bylo následující:

- ionizační mód: ESI+
- průtok vzorku (přímé zavádění roztoku pelargonidinu do iontového zdroje): 5  $\mu$ l/min
- teplota vyhřívané kapiláry: 250 °C
- napětí na kapiláře: 2,5 kV

- snímaný rozsah  $m/z$ : 50 – 1200 Da
- při dvojnásobné CID pelargonidinu (před a za iontově-mobilitní separací) byly použity energie 45 eV v první kolizní cele („Trap“) a/nebo 40 eV v druhé kolizní cele („Transfer“)

Přístroj je vybaven kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem, dvěma kolizními celami, iontově-mobilitním separátorem (IMS) a analyzátozem typu TOF. Toto uspořádání hmotnostního spektrometru umožňuje izolaci rodičovského iontu pomocí kvadrupólu, jeho fragmentaci v první kolizní cele („Trap“), separaci vznikajících fragmentů za pomoci IMS, a následně další fragmentaci takto separovaných produktových ionů v druhé kolizní cele („Transfer“). Tímto způsobem lze rozlišit první i druhou generaci fragmentů (v analogii k  $MS^2$  a  $MS^3$  experimentům). Na závěr ionty procházejí ortogonálním TOF (sekce „QuanTOF“), kde jsou separovány podle poměru  $m/z$  a detekovány. Měření s využitím hmotnostního spektrometru umožňovalo tedy měření přesné a správné hmotnosti vznikajících fragmentů a jejich separaci na základě rozdílů v hodnotách iontové mobility. Tento přístroj by rovněž použit pro studium vlivu kolizní energie na výtěžek jednotlivých fragmentů pelargonidinu. Popsaný princip fragmentace a separace iontů ilustruje Obrázek 8.



**Obrázek 8:** Schéma fragmentace analytu uvnitř přístroje Synapt G2-S<sup>[86]</sup>

Při použití přístroje LCQ Deca bylo provedeno měření roztoku Pg ( $c = 60 \text{ mg/l}$ ) v methanolu a deuterovaném methanolu. Nastavení parametrů měření bylo následující:

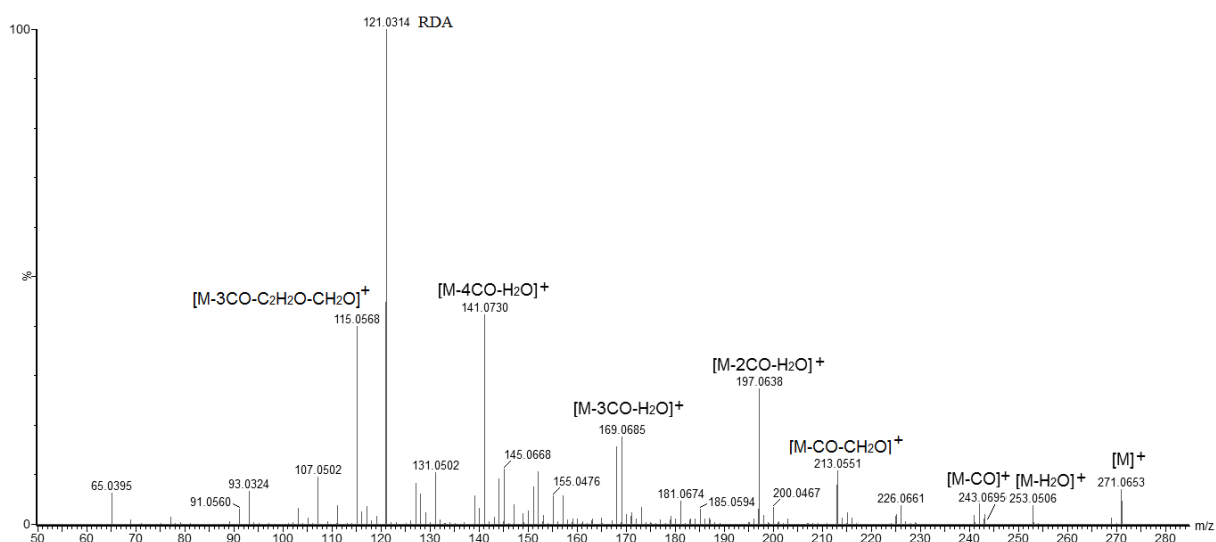
- ionizační mód: ESI+
- průtok vzorku (přímé zavádění roztoku pelargonidinu do iontového zdroje):  $5 \text{ } \mu\text{l/min}$
- teplota vyhřívání kapiláry:  $275 \text{ } ^\circ\text{C}$
- snímaný rozsah  $m/z$ :  $65 - 300 \text{ Da}$
- šířka vybíraného okna pro  $\text{MS}^n$ :  $0,6 \text{ Da}$
- parametr  $q$ :  $0,3$

## 4 VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE

### 4.1 Fragmentace pelargonidinu v kolizní cele hmotnostního spektrometru

Při nízkoenergetické CID dochází k fragmentaci anthokyanidinů za vzniku produktových iontů, jejichž část se od prekurzorového iontu liší o násobky 18 a 28 jednotek  $m/z$ . Chování takových iontů odpovídá kaskádě postupných ztrát oxidu uhelnatého a vody, které je vlastní jak anthokyanidinům<sup>[87]</sup>, tak polyfenolickým látkám obecně.<sup>[47]</sup>

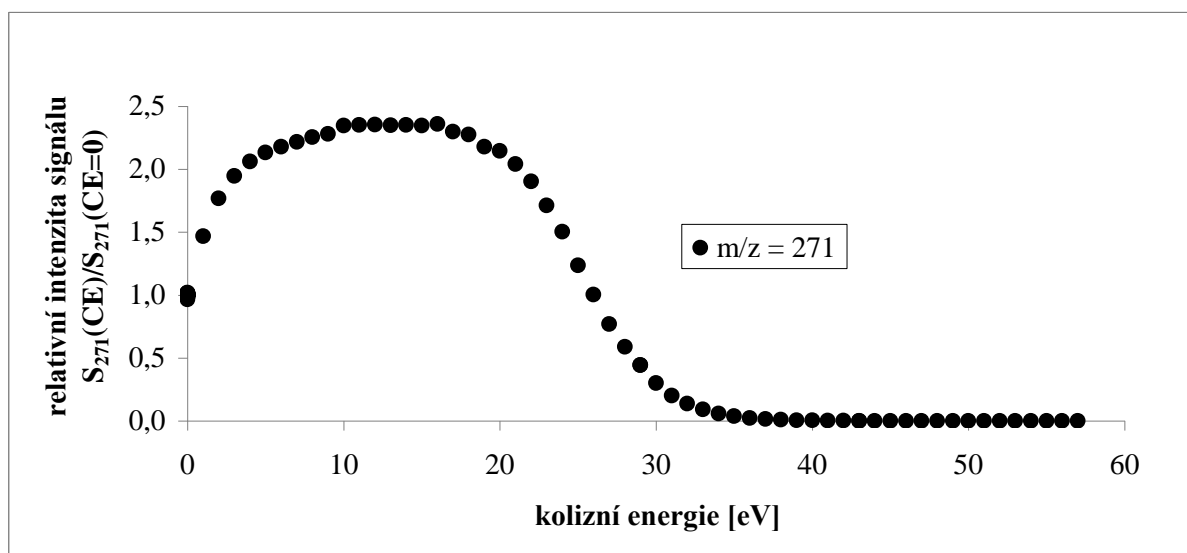
Typické fragmentační spektrum Pg je ukázáno na Obrázku 9. Se zvyšující se kolizní energií lze pozorovat změny ve fragmentačním spektru pelargonidinu, neboť ion prekurzoru se snadněji rozpadá na produktové ionty (viz Obrázek 10) a ty jsou dále štěpeny za vzniku stále menších fragmentů (Obrázek 11). Z poměru jednotlivých signálů lze obecně usuzovat, které fragmentační cesty jsou preferovány kineticky (probíhá taková reakce, jež má nižší aktivační bariéru) a které termodynamicky (probíhá taková reakce, jejíž produkt má nižší energii v základním stavu) – signál, jenž je dominantní při nižších kolizních energiích, patří kineticky řízenému ději, signál převládající při vyšší kolizní energii souvisí s termodynamicky poháněným procesem (Obrázek 12)<sup>[88]</sup>



**Obrázek 9:** Fragmentační spektrum iontu  $m/z = 271,0653$  s návrhy složení produktových iontů vznikajících ztrátami malých molekul (vznik dominantního píku  $m/z = 121,0314$  a dalších fragmentů bude vysvětlen později); k fragmentaci molekuly Pg izolované pomocí kvadrupólu docházelo v kolizní cele „Trap“ při kolizní energii 40 eV; intenzita signálu základního píku je  $1,47 \cdot 10^7$

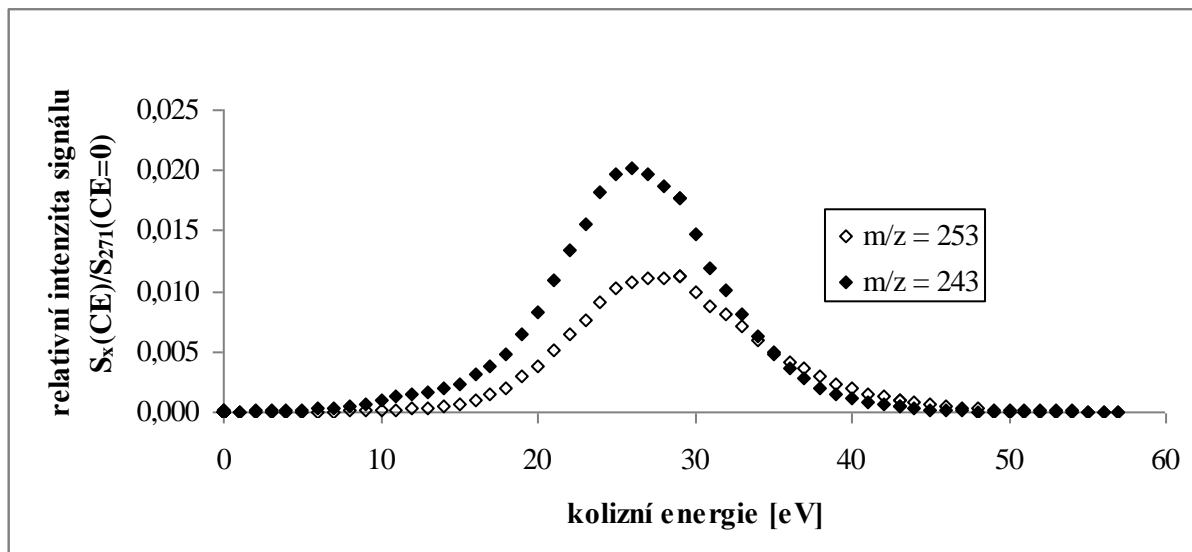


Při dodání potřebné energie se z ionizované molekuly pelargonidinu  $[M]^+$ ,  $m/z = 271,0653$  (odchylka od teoretické přesné hmoty  $d = +4,7$  mDa), nejprve odštěpuje oxid uhelnatý za vzniku iontu  $[M-CO]^+$ ,  $m/z = 243,0695$  ( $d = +3,8$  mDa), a voda za vzniku iontu  $[M-H_2O]^+$ ,  $m/z = 253,0506$  ( $d = +0,5$  mDa). Změny relativních intenzit těchto produktových iontů s rostoucí kolizní energií ukazuje Obrázek 11. Je patrné, že intenzita fragmentu vznikajícího po odštěpení CO je daleko vyšší, než intenzity fragmentu po odštěpení vody. Obrázek 12 ukazuje změny v poměrech intenzit obou těchto fragmentů ( $S_{[M-CO]^+}/S_{[M-H_2O]^+}$ ). S výjimkou prvního měřeného bodu dochází u malých kolizních energií k nárůstu tohoto poměru, což naznačuje, že ztráta oxidu uhelnatého je kineticky preferována. Při vyšších kolizních energiích již dochází k poklesu tohoto poměru, což je dáno následnými fragmentacemi z obou iontů.

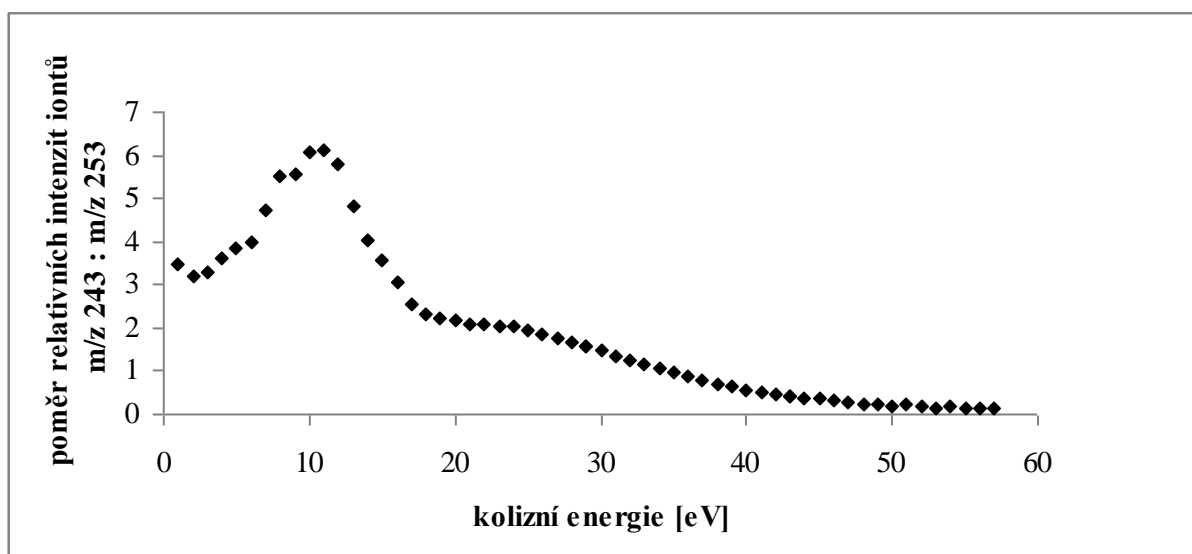


**Obrázek 10:** Závislost relativní intenzity signálu pelargonidinu ( $m/z = 271,0653$ ) na kolizní energii;  $S_{271}(CE=0)$  odkazuje k intenzitě signálu prekurzorového iontu při použití nulové kolizní energie

Dalšími procesy vznikají menších fragmenty, které mohou být buď produkty odštěpení dalších molekul CO a H<sub>2</sub>O, případně jiných neutrálních molekul (např. ketenu), nebo rozpadu uhlíkového skeletu molekuly za současného rozštěpení většího počtu vazeb (např. RDA). Tabulka III shrnuje významné píky přítomné ve spektru Pg při jeho CID (tabulka byla vytvořena na základě spektra z Obrázku 9).



**Obrázek 11:** Změna intenzity signálu produktových iontů, odpovídajících štěpení vody ( $m/z = 253,0506$ ) a oxidu uhelnatého ( $m/z = 243,0695$ ) se vzrůstající kolizní energií;  $S_{271}(CE=0)$  odkazuje k intenzitě signálu prekurzorového iontu při použití nulové kolizní energie

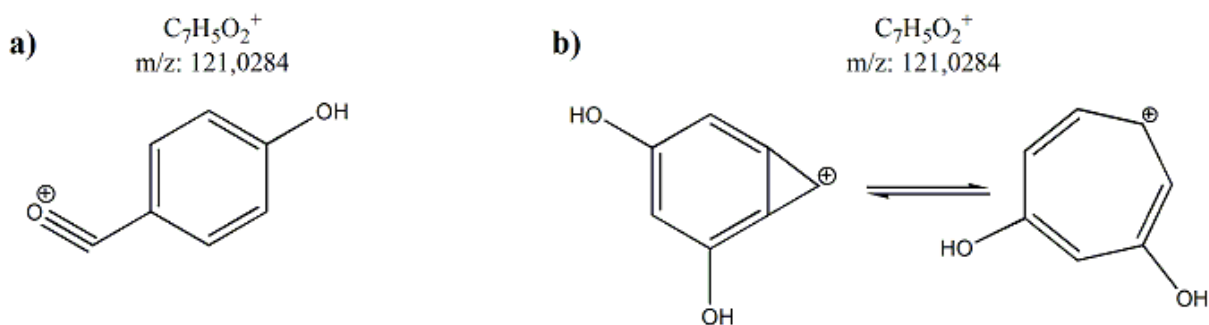


**Obrázek 12:** Změna poměru signálu iontů 243 a 253 se zvyšující se kolizní energií;  $S_{271}(CE=0)$  odkazuje k intenzitě signálu prekurzorového iontu při použití nulové kolizní energie

**Tabulka III:** Signály pozorované při fragmentaci pelargonidinu v MS/MS skenu a jejich navrhované složení

navrhovaný fragment	vypočtená (teoretická) hodnota m/z [Da]	naměřená hodnota m/z [Da]	d [mDa]
[M] <sup>+</sup>	271,0606	271,0653	4,7
[M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	253,0501	253,0506	0,5
[M-CO] <sup>+</sup>	243,0657	243,0695	3,8
[M-OH-CO] <sup>+•</sup>	226,0630	226,0661	3,1
[M-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>	225,0552	225,0566	1,4
[M-2CO] <sup>+</sup>	215,0708	215,0731	2,3
[M-CO-CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	213,0552	213,0551	-0,1
[M-H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup>	197,0603	197,0638	3,5
[M-2CO-CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	185,0603	185,0594	-0,9
[M-H <sub>2</sub> O-3CO] <sup>+</sup>	169,0653	169,0685	3,2
[M-2CO-CH <sub>2</sub> O-OH] <sup>+•</sup>	168,0575	168,0598	2,3
[M-H <sub>2</sub> O-2CO-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	155,0497	155,0476	-2,1
[M-2H <sub>2</sub> O-3CO] <sup>+</sup>	151,0548	151,0573	2,5
[M-3CO-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	145,0653	145,0668	1,5
[M-H <sub>2</sub> O-4CO] <sup>+</sup>	141,0704	141,073	2,6
[M-2CO-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	131,0497	131,0502	0,5
[M-H <sub>2</sub> O-3CO-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	127,0548	127,0539	-0,9
<sup>0,3</sup> A <sup>+</sup> nebo <sup>0,2</sup> B <sup>+</sup>	121,0290	121,0314	2,4
[M-4CO-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	117,0704	117,0693	-1,1
[M-3CO-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	115,0548	115,0568	2,0
<sup>0,3</sup> A <sup>+</sup> -CO nebo <sup>0,2</sup> B <sup>+</sup> -CO	93,0340	93,0324	-1,6
<sup>0,3</sup> A <sup>+</sup> -2CO nebo <sup>0,2</sup> B <sup>+</sup> -2CO	65,0391	65,0395	0,4

Při použití kolizní energie v rozsahu 25 až 45 eV je pozorovaným dominantním signálem (základním píkem ve spektru) fragmentový ion s m/z = 121,0290. Tento fragment vzniká retro Diels-Alderovým štěpením a skrývá v sobě dva různé strukturní izomery, které jsou oba produkty štěpení dvou vazeb v C-kruhu, z nichž ovšem jeden je pozůstatkem A-kruhu (<sup>0,3</sup>A<sup>+</sup>) a základem druhé formy je B-kruh (<sup>0,2</sup>B<sup>+</sup>) (struktura fragmentů viz Obrázek 13). Tyto dva izomery od sebe nelze ve spektru Pg odlišit, diferenciaci však lze dosáhnout použitím izotopového značení, viz kapitola 4.1.2.



**Obrázek 13:** Ukázka dvou možných struktur iontu s m/z = 121: a) fragment  $^{0,2}B^+$ , b) fragment  $^{0,3}A^+$

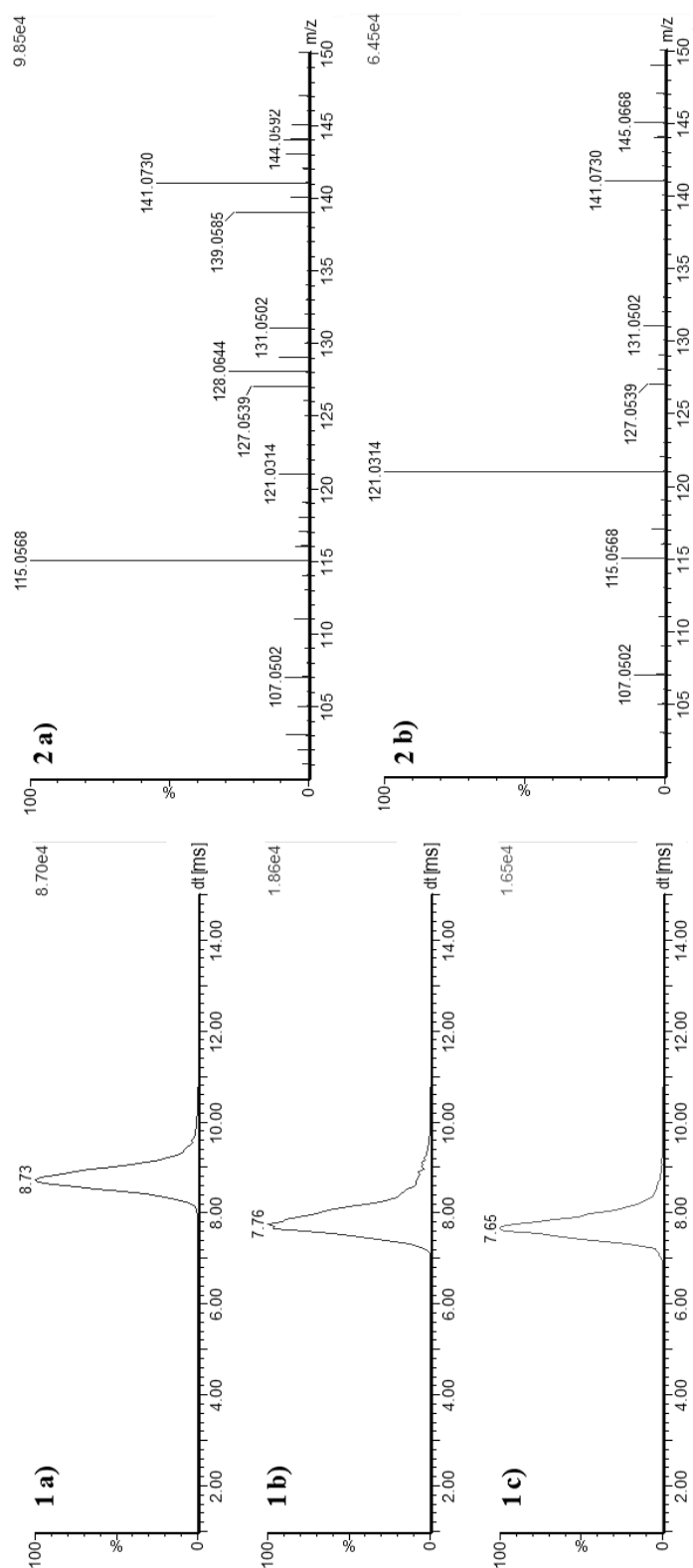
Vedle výše zmíněných obvyklých fragmentačních mechanismů, které jsou charakteristické pro celou skupinu anthokyanidinů<sup>[87]</sup> i mnohé další flavonoidní látky<sup>[54]</sup>, jsou v CID pelargonidinu pozorovány také některé méně běžné a zajímavé fragmentační procesy. Z molekuly Pg se v dalších krocích může odštěpovat keten ( $C_2H_2O$ , ztráta 42 jednotek m/z), v literatuře nalezneme také zmínky o štěpení formaldehydu ( $CH_2O$ , ztráta 30 jednotek m/z). Takovéto ztráty stojí pravděpodobně za vznikem iontů s m/z = 213; 185; 168; 155; 145; 131; 127; 117 a 115. Takovéto štěpení jsou navrhována také Barnesem a Schugem<sup>[84]</sup> nebo Oliveirou a kol.<sup>[55]</sup>

V MS/MS spektru byl zaznamenán také poměrně silný signál fragmentu s m/z 226 (jeho intenzita dosahovala maxima při kolizní energii 28 eV). Tento signál byl přiřazen iontu  $[M-OH-CO]^+$ , vznikajícímu ztrátou CO po odštěpení -OH radikálu. Fragment vznikající homolytickým štěpením vazby mezi hydroxylem a uhlíkem, který je ve spektru rovněž pozorován (slabý signál s m/z 254) by mohl být prekurzorem významného produktového iontu s m/z 226. Obdobným způsobem by mohl vznikat také produktový ion s m/z 168 (po odstupu dalšího CO a formaldehydu z iontu 226). Tuto teorii podporují výsledky experimentu s deuterovaným pelargonidinem, které lze nalézt v kapitole 4.1.2. Ztráta hydroxylového radikálu není při fragmentaci flavonoidních látek zcela neobvyklým jevem. Tento proces pozorovali při fragmentaci anthokyanidinů, jejichž B-kruh je substituován pouze hydroxylovými skupinami, také Oliveira a kol. (vznik  $[M-OH-CO]^+$  při vysokoenergetické CID Dp, Mv, Pn a Cy za použití kolizní energie 400 eV) – viz teoretická část, kapitola 2.2.5.<sup>[55]</sup>

#### 4.1.1 Využití iontově-mobilitní separace při studiu fragmentačních mechanismů pelargonidinu

Fragmentační MS spektra zkonstruovaná po měření na přístroji Synapt G2-S způsobem popsaným v kapitole 3.3.2 posloužila k potvrzení navrhovaných vzorců pro některé pozorované signály v Tabulce III, neboť umožnila sledování další fragmentace těchto produktových iontů Pg. Takto bylo např. prokázáno, že ion s  $m/z$  121 skutečně fragmentuje za vzniku iontu 93 (potvrzení schématu v Obrázku 21 na konci kapitoly 4.1.2). Provedená IMS také umožnila separovat a následně fragmentovat produktové ionty  $[M-H_2O]^+$  ( $m/z = 253$ ) a  $[M-CO]^+$  ( $m/z = 243$ ). Fragmentace těchto iontů pomocí QIT (více v další kapitole) nedovoluje pozorovat jejich produktové ionty s malou hodnotou  $m/z$  (např. ion 121), neboť tyto jsou v iontové pasti diskriminovány a intenzita jejich signálu je velmi malá.<sup>[89]</sup> Srovnání spekter z Obrázků 9 a 15 ukazuje, že výtěžnost iontu 121 je dostatečná při použití přístroje s jiným hmotnostním analyzátozem (Synapt G2-S). Z tohoto důvodu byla s využitím IMS vytvořena MS/MS spektra iontů  $[M-H_2O]^+$  a  $[M-CO]^+$  a ta byla poté srovnávána s MS/MS spektrem Pg. Tato spektra jsou uvedena na Obrázku 14.

Ačkoliv lze na základě těchto spekter s jistotou říci, že ion 121 vzniká také z iontu 253 a/nebo 243, výtěžek tohoto produktového iontu z molekuly prekurzoru je významně vyšší, než ze zmíněných fragmentů. Takto byla potvrzena relevance schématu v Obrázku 18 následující kapitoly (fragmentační mechanismus popisující postupný vznik iontů  $271 \rightarrow 215 \rightarrow 149 \rightarrow 121$ ), zároveň však lze vyvozovat, že navržený mechanismus není jediný možný. Při pohledu na poměr intenzit produktových iontů s  $m/z = 121$  a 115 (složení viz Tabulka III) ve spektrech  $[M]^+$  a  $[M-H_2O]^+/[M-CO]^+$  se nabízí představa, že zatímco ion 121 je především výsledkem RDA štěpení intaktního prekurzorového iontu Pg, po ztrátě malé molekuly ( $H_2O$  nebo  $CO$ ) dochází snadněji ke štěpení dalších neutrálních ztrát a vzniku iontu 115.<sup>[84]</sup> Tento jev také podporuje hypotézu, že ion 121 odpovídá  $^{0,3}A^+$  nebo  $^{0,2}B^+$ , a tudíž při ztrátě  $H_2O$  nebo  $CO$  klesá pravděpodobnost následného vzniku takovéto struktury.



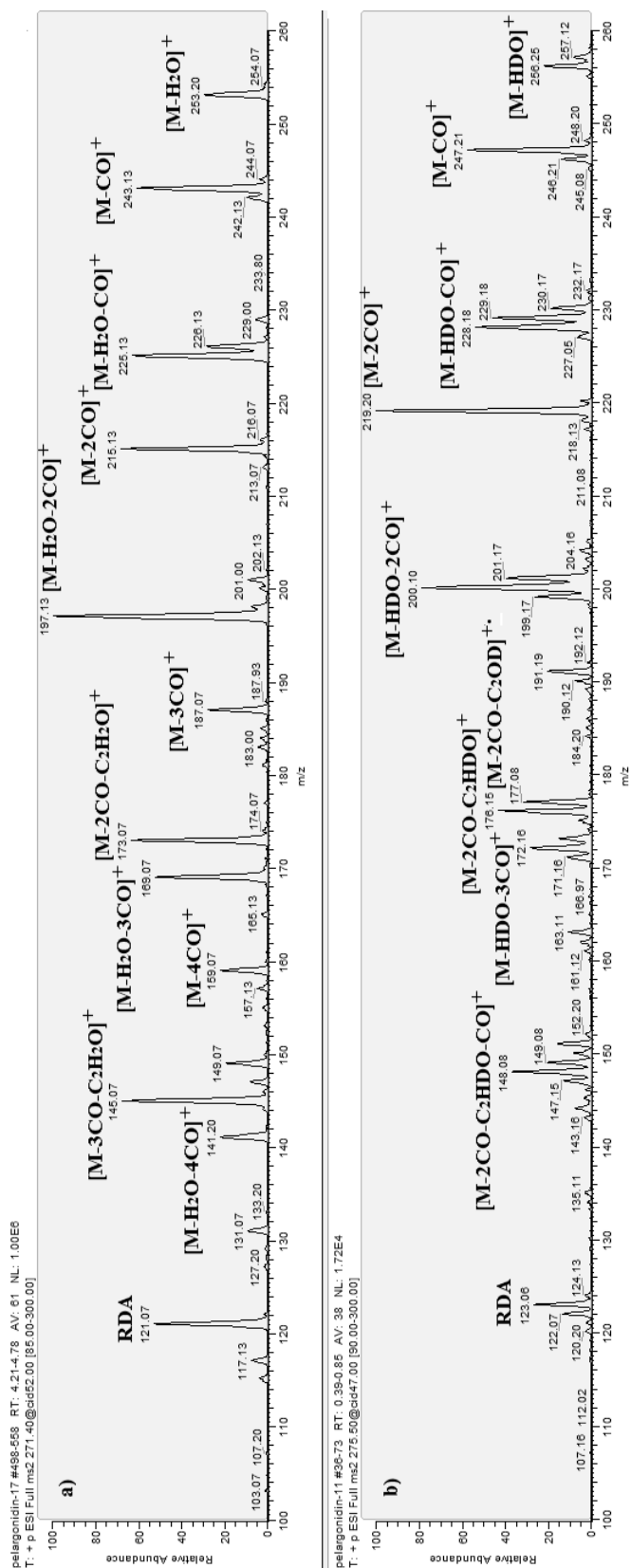
**Obrázek 14:** Mobilogramy Pg (1a), iontu 253 (1b) a iontu 243 (1c) a příslušná iontově-mobilitní MS/MS spektra iontů 243/253 (2a, jejich spektra nebylo možné oddělit z důvodu příliš blízkých driftových časů z IMS) a Pg (2b); intenzity základních piků jsou uvedeny vždy v pravém horním rohu

#### 4.1.2 Srovnání fragmentace deuterovaného a nedeuterovaného pelargonidinu

Anthokyanidiny mohou protony v hydroxylech vyměňovat za vodíky protického rozpouštědla. Na základě shodného mechanismu může docházet k záměně lehčího izotopu vodíku  $^1\text{H}$  v molekule pelargonidinu za těžší deuterium  $^2\text{H}$  neboli D, je-li látka rozpouštěna v deuterovaném rozpouštědle.<sup>[88]</sup> Pro získání analogických fragmentačních dat, jež se však liší počtem D navázaných na pelargonidin, byl Pg rozpouštěn jak v běžném, tak v perdeuterovaném methanolu ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), a následně byly obě tyto formy Pg fragmentovány pomocí ESI-QIT-MS přístroje. Získaná fragmentační spektra byla analogická – většina pozorovaných fragmentačních cest se nelišila pro deuterovanou a nedeuterovanou formu pelargonidinu, což potvrzuje vhodnost použití deuterovaných analogií anthokyanidinů pro studium jejich chování při CID. Avšak současný pohled na některé rozdíly v chování těchto dvou forem Pg v iontové pasti může také přinášet lepší pochopení probíhajících fragmentačních mechanismů.<sup>[90]</sup>

Při solvataci Pg deuterovaným methanolem dochází k záměně až čtyř protonů za deuterium. Takto vzniká série iontů s  $m/z = 271; 272; 273; 274$  a  $275$ , jež jsou generovány zhruba v poměru  $1 : 2,5 : 2,5 : 1,75 : 1$  (stanoveno pomocí vnitřní normalizace). Pro jednoduchost byl k dalším fragmentacím vybírán pouze ion s  $m/z = 275$ , jenž odpovídá Pg se všemi čtyřmi H nahrazenými D (perdeuterovanému Pg, D-Pg). Jeho fragmentační spektra byla srovnávána se spektry iontu  $m/z = 271$ , odpovídajícího nedeuterovanému Pg. Fragmentaci obou forem Pg v prvním kroku a návrhy možných vznikajících produktových iontů ukazuje Obrázek 15.

Ve spektrech získaných měřeními v iontové pasti dominují signály, jež jsou důsledkem neutrálních ztrát ( $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  apod.) a RDA štěpení C-kruhu je minoritním jevem. Toto pozorování je ve shodě se závěry práce J. Kanga a kol.<sup>[90]</sup> V prvním kroku dochází k odštěpení vody v podobě  $\text{H}_2\text{O}$  v případě Pg a jejích deuterovaných forem v případě D-Pg. Poměr intenzit produktových iontů vznikajících ztrátou  $\text{HDO}$  a  $\text{D}_2\text{O}$  je asi  $12 : 1$ . Možným vysvětlením dominance iontu  $[\text{M-HDO}]^+$  je fakt, že vazba C-D vznikající při přenosu D z jednoho hydroxylu přes skeletální uhlíky k druhému hydroxylu je asi o  $5 \text{ kJ/mol}$  silnější, než vazba C-H<sup>[90]</sup>. Snadněji proto dochází k přenosu skeletálního H na -OD skupinu za vzniku odštěpené molekuly  $\text{HDO}$ . Tuto teorii podporují také výsledky kvantově-chemických výpočtů, provedených na D-Pg (více v kapitole 4.2.4) a závěry práce D. Bilusicha a kol., v níž byla analogicky srovnávána ztráta  $\text{HDS/D}_2\text{S}$ .<sup>[91]</sup>



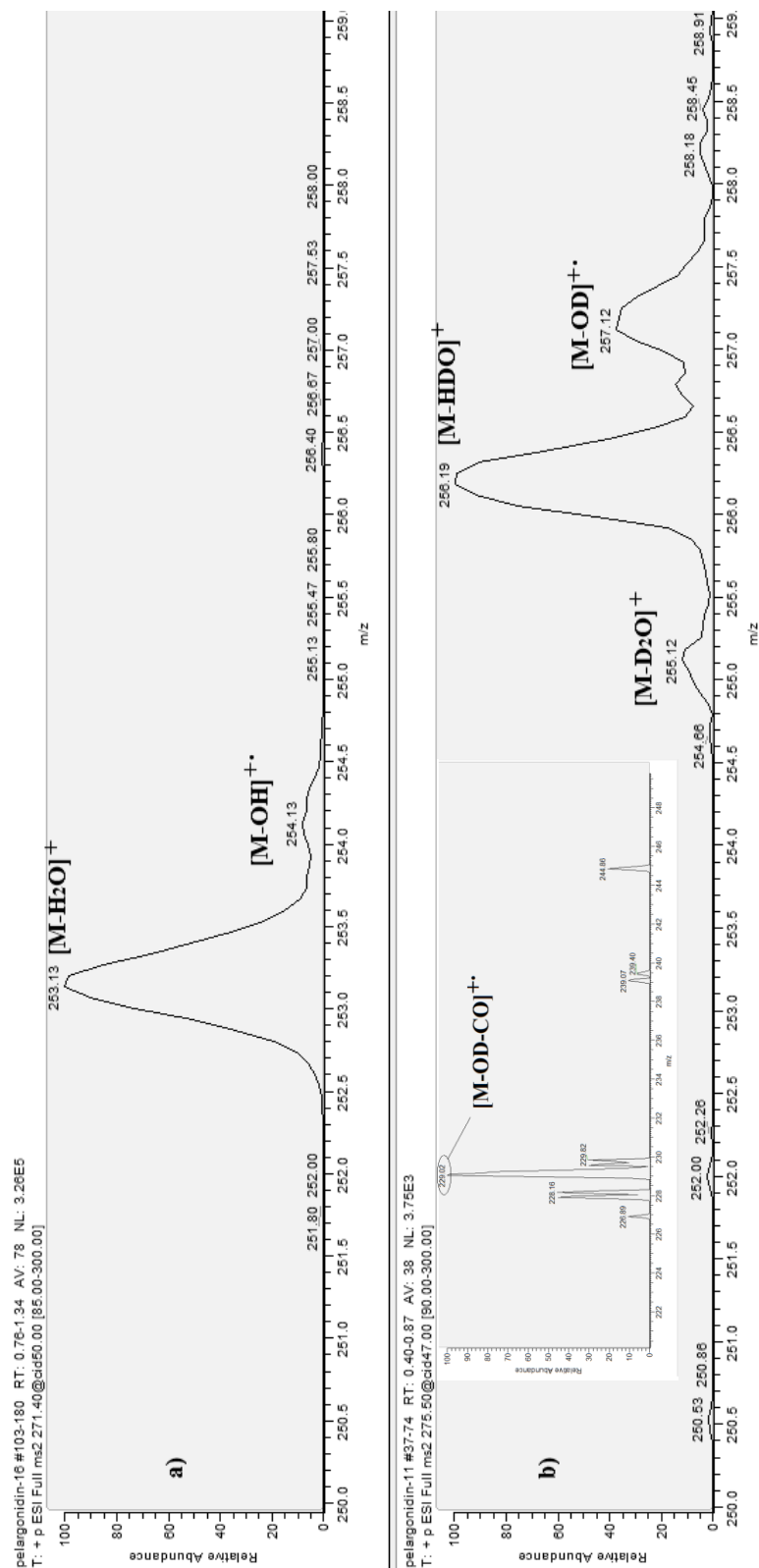
**Obrázek 15:** Fragmentace Pg a D-Pg s návrhy složení vznikajících produktových iontů; MS<sup>2</sup> iontů s m/z 271 a 275 probíhala při normalizované kolizní energii 52 resp. 47, intenzita signálu základního píku je 1-10<sup>6</sup> (Pg) a 1,72-10<sup>4</sup> (D-Pg)



Ve spektrech Pg i D-Pg byly navíc pozorovány píky odpovídající iontům  $[M-OH-CO]^{+\bullet}$  ( $m/z = 226$ ) a  $[M-OD-CO]^{+\bullet}$  ( $m/z = 229$ ). Navržené složení těchto fragmentů potvrzuje také přítomnost jejich prekurzorů  $[M-OH]^{+\bullet}$ , resp.  $[M-OD]^{+\bullet}$  ( $m/z = 254$ , resp. 257), jejichž signál je viditelný u obou forem Pg, ale u deuterované dokonce dosahuje asi čtvrtiny intenzity signálu iontu  $[M-HDO]^+$  (viz Obrázek 16). To, že fragment  $[M-OD-CO]^{+\bullet}$  vzniká skutečně z iontu  $[M-OD]^{+\bullet}$  dokazuje přítomnost signálu 229 ve spektru 257 (detail v Obrázku 16b).

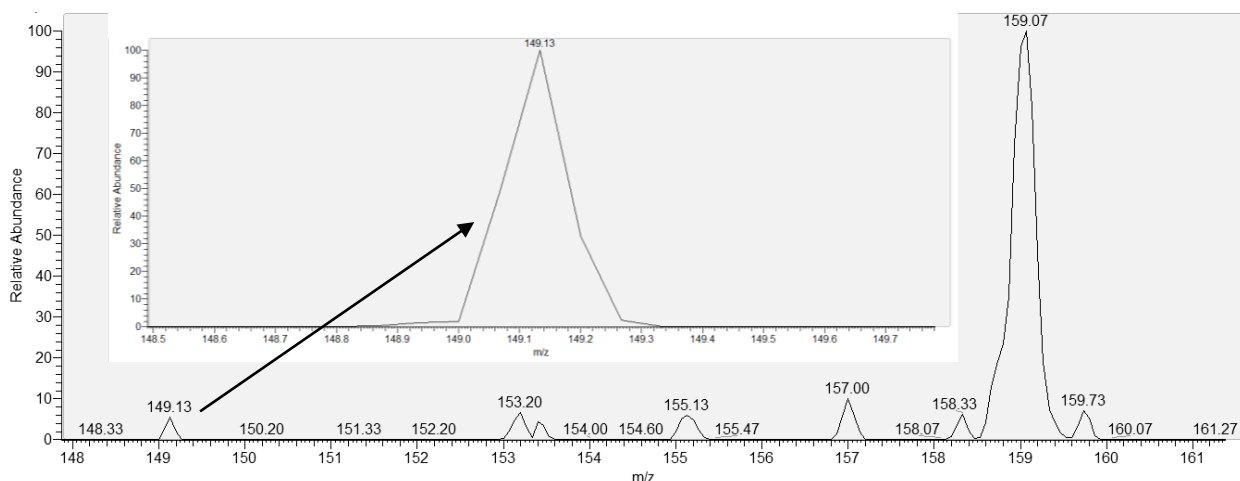
Další výraznou ztrátou je odštěpení oxidu uhelnatého, které generuje u obou forem pelargonidinu shodné neutrální ztráty, lze tedy pozorovat řetězec produktových iontů lišících se vždy o 28 jednotek  $m/z$  a vzájemně posunutý o čtyři jednotky  $m/z$ . Za zmínku stojí rozdíly v intenzitách fragmentů vznikajících následnými ztrátami vody a CO. Následné odštěpení CO z fragmentů  $[M-H_2O]^+$  resp.  $[M-HDO]^+$  probíhá u Pg i D-Pg poměrně snadno. Naproti tomu následná fragmentace v prohozeném pořadí neutrálních ztrát, tj. odštěpení molekuly vody z fragmentu  $[M-CO]^+$ , dává ve spektru Pg slabý signál (následuje kaskáda ztrát CO). Vysvětlením tohoto jevu by mohlo být pravidlo, podle něhož se snadněji štěpí taková malá neutrální molekula, která má vyšší ionizační energii (přičemž ionizační energie oxidu uhelnatého je 14,014 eV a vody 12,627 eV a ionizační energie HDO je asi o 0,003 eV vyšší, než ionizační energie  $H_2O$ ).<sup>[1,92,93]</sup>

Po odštěpení dvou CO dochází v případě Pg i D-Pg ke ztrátě ketenu  $C_2H_2O$  ( $m/z = 42$ ) resp.  $C_2HDO$  ( $m/z = 43$ ). Důvodem pro to, že se keten s významnějším výtěžkem odštěpuje až ve třetím kroku, může být opět výše zmíněné pravidlo, neboť  $C_2H_2O$  má ze všech malých neutrálních ztrát nejnižší ionizační energii (9,619 eV).<sup>[94]</sup> Ztrátou ketenu vzniká ion s  $m/z = 173$  resp. 176 (v případě Pg resp. D-Pg). Ve spektru D-Pg lze pozorovat také signál odpovídající iontu 177, jenž vzniká z iontu  $[M-2CO]^+$  ztrátou 42 jednotek  $m/z$ . Vysvětlením takovéto sudé ztráty může být štěpení radikálu  $\bullet C_2OD$ , které ovšem nemůže být vysvětleno běžnými procesy pozorovanými u studované molekuly. Ačkoli jde o poměrně neobvyklý jev, vznik radikálů, kontrakce a expanze šestičlenných cyklů a vznik nových kruhů jsou u polyfenolických látek v literatuře popisovány.<sup>[95]</sup> Navržená hypotéza však vyžaduje potvrzení dalšími experimenty a výpočty, které přesahují rámec této diplomové práce.

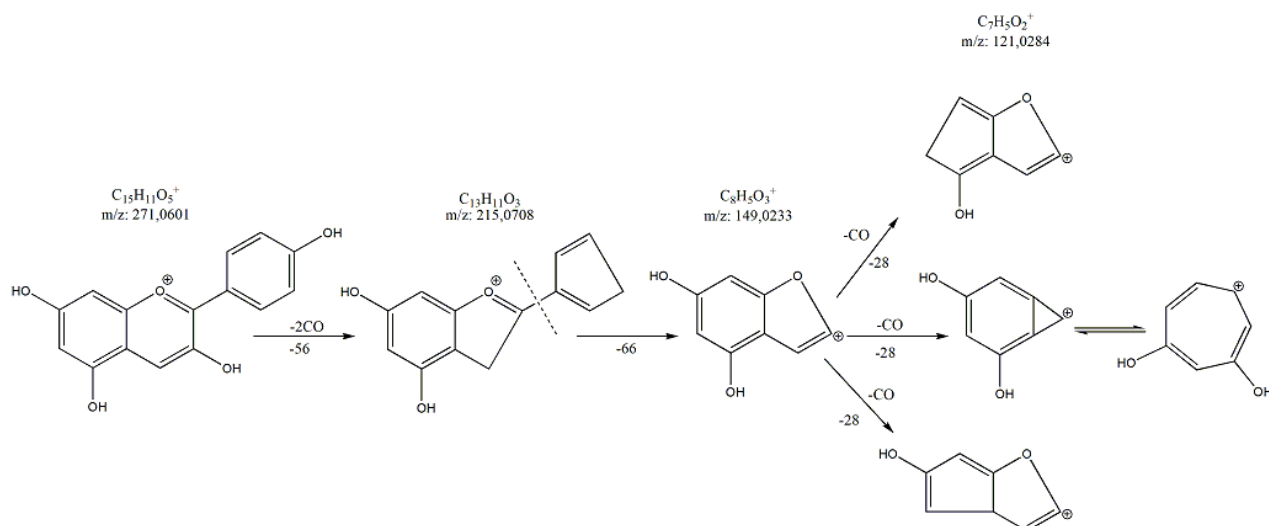


**Obrázek 16:** Detail spekter a) Pg a b) D-Pg ukazující signály fragmentů s lichým počtem elektronů, tj. radikál-kationtů ( $MS^2$  iontů s  $m/z$  271 a 275 probíhalo při normalizované kolizní energii 52 resp. 47, intenzita signálu základního píku je zobrazena v levém horním rohu každého spektra); součástí b) je také detail  $MS^3$  spektra radikál-kationtu  $m/z = 257$  (měření proběhlo při normalizované kolizní energii 45) s vyznačeným iontem  $m/z = 229$  (intenzita tohoto základního píku je 212)

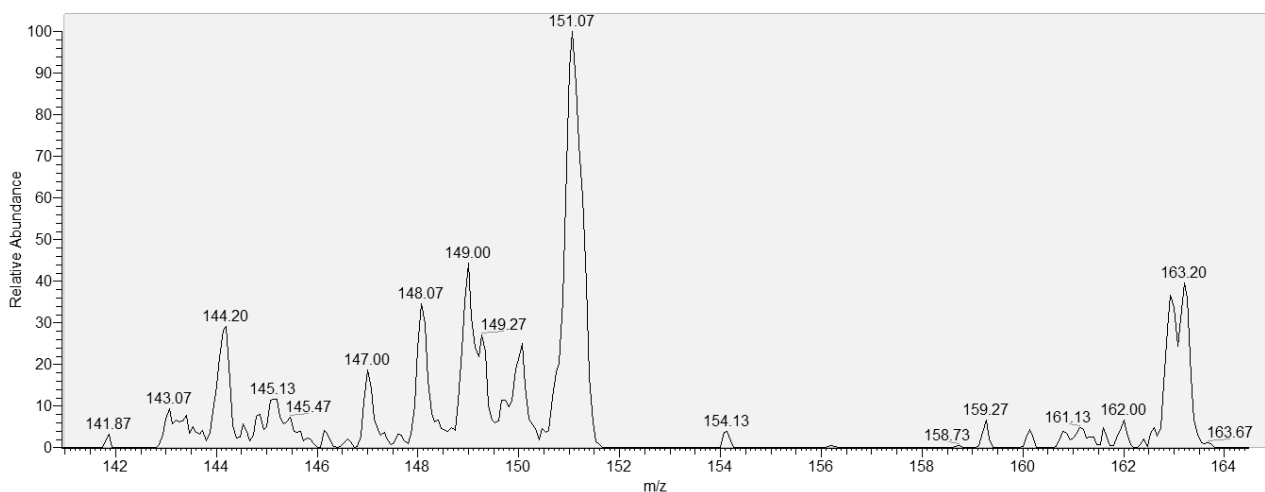
V kolizních spektrech Pg a D-Pg lze s relativně vysokou intenzitou nalézt rovněž píky s  $m/z = 151$  (ve spektru D-Pg) resp.  $m/z = 149$  (ve spektru Pg). Tyto fragmenty jsou také zřejmě produkty následné fragmentace iontů  $[M-2CO]^+$  ( $m/z = 215$  a  $m/z = 219$ ), což bylo potvrzeno cílenými  $MS^n$  experimenty. Na základě experimentů, porovnávajících chování nedeuterovaného a deuterovaného pelargonidinu, lze fragmentační cestu vedoucí k jejich vzniku formulovat následovně: Nejdříve dojde k již popisované ztrátě dvou CO z původní molekuly a vzniku iontu  $m/z 215$ , resp.  $m/z 219$ . V dalším kroku dochází k odštěpení B-kruhu a vzniku iontů  $m/z 149$ , resp.  $m/z 151$  (Obrázky 18 a 20). Signály iontů 149/151 lze pozorovat v  $MS^3$  fragmentačních spektrech produktových iontů 215/219, jež jsou generovány z Pg/D-Pg (Obrázky 17 a 19). V následujícím kroku ( $MS^4$ ) již není výtěžnost iontů dostatečná, důkaz o přítomnosti iontů 121/123 byl nalezen opět v  $MS^3$  fragmentačních spektrech 149/151 vznikajících přímo z Pg/D-Pg. Přítomnost signálů při  $m/z 215$  a 149 ve spektru Pg byla potvrzena také při měření na přístroji Synapt G2-S. Naměřené přesné hmoty těchto iontů  $m/z = 215,0731$  a  $m/z = 149,0256$  se liší od teoretických o +2,3 resp. +1,7 mDa.



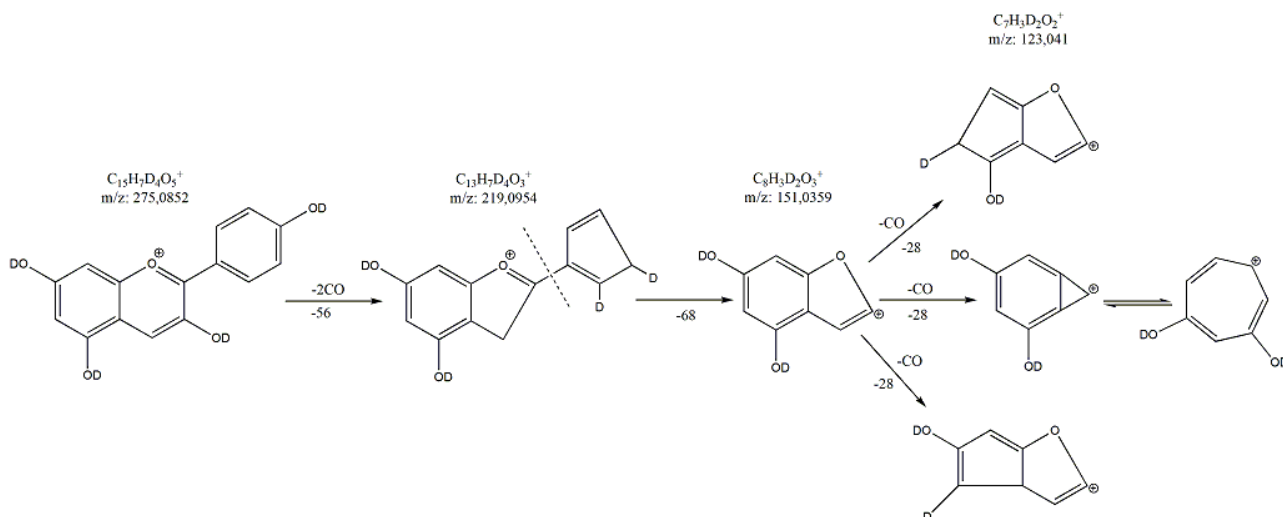
**Obrázek 17:**  $MS^3$  spektrum Pg s detailem iontu s  $m/z = 149$ ; v prvním kroku byl v QIT fragmentován ion 271 (Pg) při normalizované kolizní energii 45 za vzniku iontu 215 a ten dále fragmentován při normalizované kolizní energii 40; intenzita signálu základního píku je 21500, pík 149 má intenzitu 1200



**Obrázek 18:** Navrhovaný fragmentační mechanismus pro vznik iontů s  $m/z$  215, 149 a 121 (místo štěpení je naznačeno přerušovanou čarou)

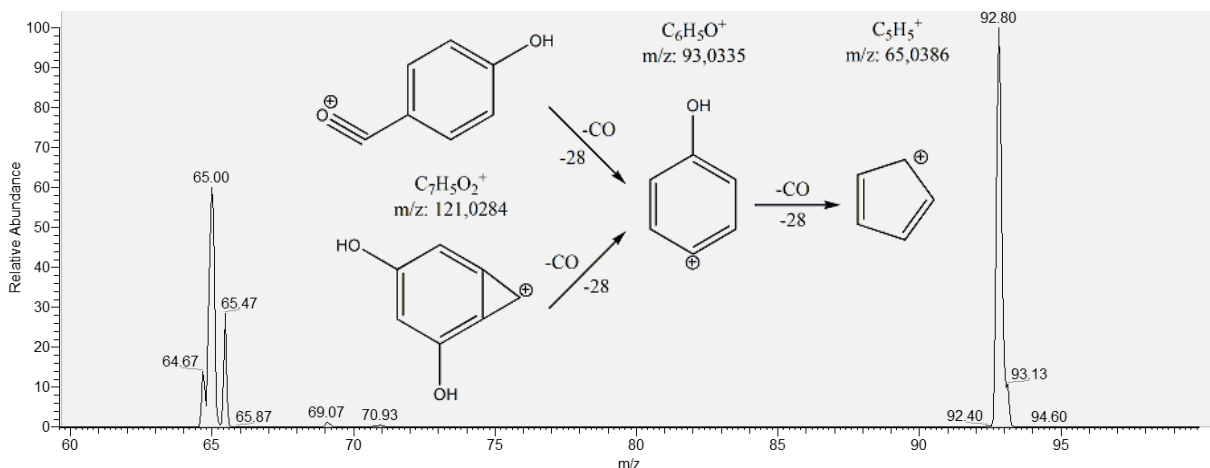


**Obrázek 19:**  $MS^3$  spektrum D-Pg v okolí iontu s  $m/z = 151$ ; v prvním kroku byl v QIT fragmentován ion 275 (D-Pg) při normalizované kolizní energii 47 za vzniku iontu 219 a ten dále fragmentován při normalizované kolizní energii 45; intenzita signálu základního píku je 596

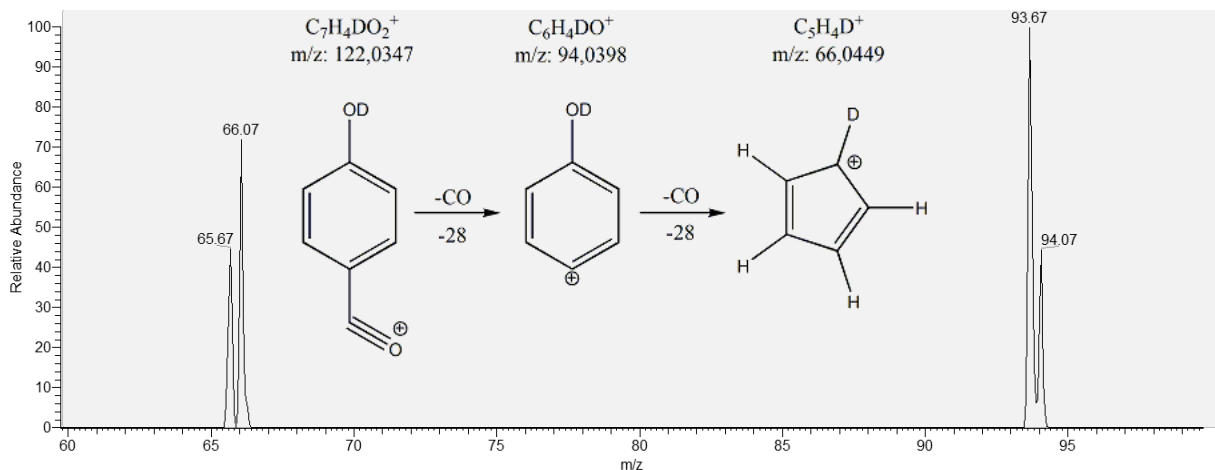


**Obrázek 20:** Navrhovaný fragmentační mechanismus pro vznik iontů s  $m/z$  219, 151 a 123 (místo štěpení je naznačeno přerušovanou čarou)

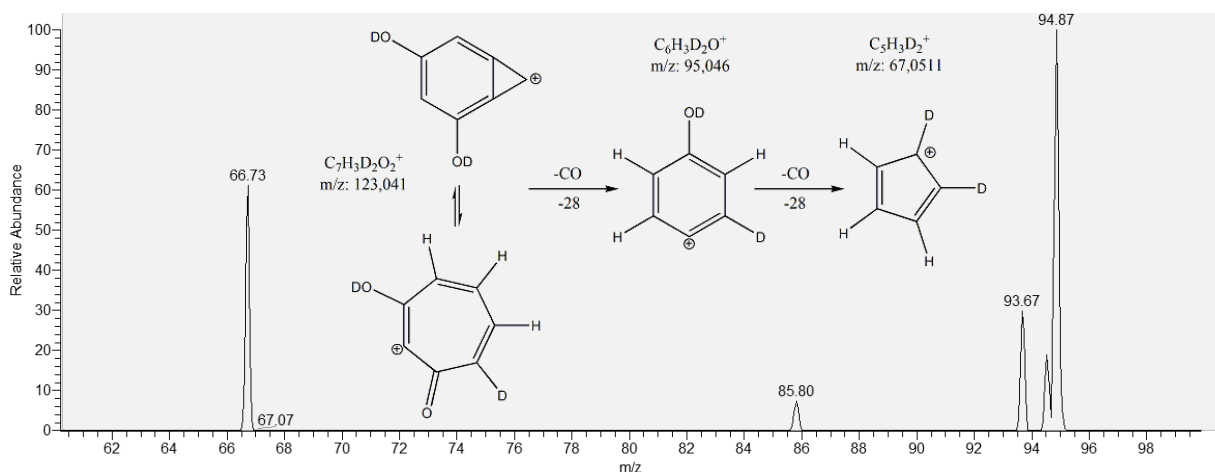
Produktové ionty s  $m/z = 121$  (Pg) a 123 (D-Pg) mohou vznikat buď výše popsaným mechanismem, nebo RDA štěpením dvou vazeb v C-kruhu. To bylo diskutováno již na straně 37 a může mít za následek vznik fragmentů s  $m/z = 121$  (Pg) nebo  $m/z = 122$  a 123 (D-Pg). Zatímco u Pg jsou ionty  $^{0,3}A^+$  a  $^{0,2}B^+$  izobarické (tj. mají shodnou hodnotu  $m/z$ ), při štěpení D-Pg lze  $^{0,3}A^+$  ( $m/z = 123$ ) od  $^{0,2}B^+$  ( $m/z = 122$ ) odlišit. Záznamy CID spekter těchto produktových iontů spolu s navrženými fragmentačními mechanismy jsou ukázány na Obrázcích 21, 22 a 23.



**Obrázek 21:** MS<sup>3</sup> spektrum iontů s  $m/z = 121$  a navrhovaný fragmentační mechanismus; v prvním kroku byl v QIT fragmentován ion 271 (Pg) při normalizované kolizní energii 45 za vzniku iontu 121 a ten dále fragmentován při normalizované kolizní energii 50; intenzita signálu základního píku je 3720



**Obrázek 22:** MS<sup>3</sup> spektrum iontu s  $m/z = 122$  a navržený fragmentační mechanismus; v prvním kroku byl v QIT fragmentován ion 275 (D-Pg) při normalizované kolizní energii 47 za vzniku iontu 122 a ten dále fragmentován při normalizované kolizní energii 40; intenzita signálu základního píku je 26,9



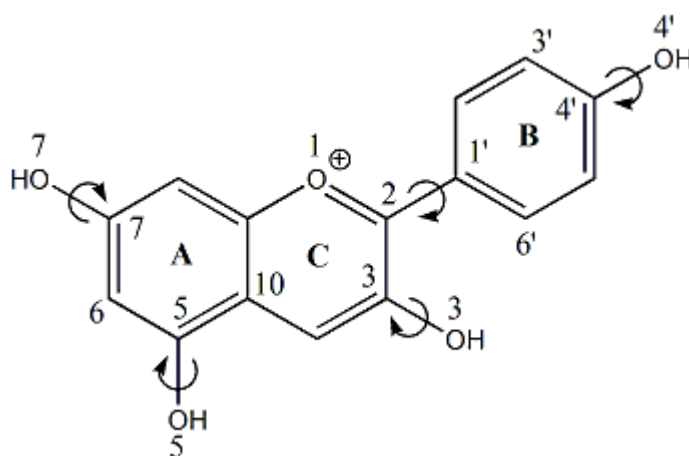
**Obrázek 23:** MS<sup>3</sup> spektrum iontu s  $m/z = 123$  a navržený fragmentační mechanismus; v prvním kroku byl v QIT fragmentován ion 275 (D-Pg) při normalizované kolizní energii 47 za vzniku iontu 123 a ten dále fragmentován při normalizované kolizní energii 35; intenzita signálu základního píku je 90,6

Uvedené experimenty jednoznačně ukazují, jak významné informace pro pochopení procesů probíhajících v kolizní cele hmotnostního spektrometru poskytuje srovnání fragmentace anthokyanidinu a jeho deuterovaného analoga. Následující kapitola přináší další informace o těchto pochodech na základě nezávislých výpočetních experimentů.

## 4.2 Výpočetní část práce

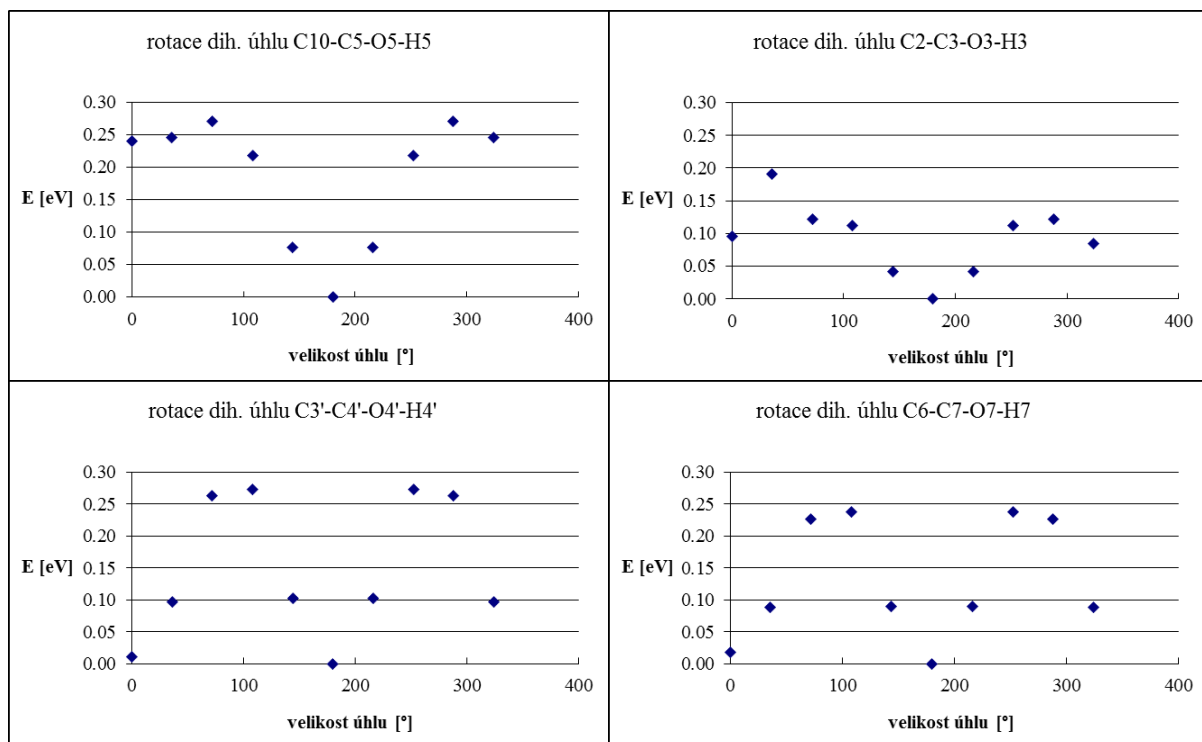
### 4.2.1 Optimalizace geometrie molekuly a výběr nejstabilnějšího konformeru

Pelargonidin ve formě kationtu obsahuje čtyři hydroxylové skupiny, jež mohou zaujímat různé pozice vůči zbytku molekuly – velikost dihedrálního úhlu mezi vodíkem a kyslíkem v hydroxyly a dvěma příslušnými skeletálními uhlíky může nabývat hodnot 0 až 360°. Dalším významným dihedrálním úhlem v molekule pelargonidinu je úhel, určující vzájemnou pozici B-kruhu vůči C- a A-kruhu. Všechny tyto pro nás významné úhly a číslování okolních atomů ukazuje Obrázek 24.



**Obrázek 24:** Molekula pelargonidinu s vyznačenými významnými dihedrálními úhly a číslováním atomů použitým v této práci

Se změnou velikosti těchto úhlů dochází také ke změně celkové energie molekuly  $P_g$  podle toho, zda je dané geometrické uspořádání (konformace molekuly) stericky preferováno, či nikoliv. Pro všechny čtyři dihedrální úhly související s hydroxyly byl proveden sken PES pro rotaci těchto úhlů v rozmezí hodnot od 0 do 360°, přičemž celková energie byla zaznamenána vždy po otočení úhlu o 36°. Při každém z těchto výpočtů nabývaly ostatní dihedrální úhly fixní velikosti 180°. Také dihedrální úhel mezi kruhy B a C byl neměnný a odpovídal planárnímu uspořádání molekuly. Změny energie molekuly v základním stavu při provedených PES skenech jsou zaznamenány v grafech v Obrázku 25 (v tomto případě nebyly srovnávány Gibbsovy energie, ale HF energie systému, jež jsou výstupem skenu PES). Energeticky nejvýhodnější se ukázala být velikost všech úhlů 180° (druhá nejvýhodnější 0°). Z tohoto důvodu byla následná konformační analýza prováděna za použití úhlů 180° a 0°.



**Obrázek 25:** Grafy změn celkové energie systému v závislosti na velikosti vybraného dihedrálního úhlu souvisejícího s pozicí hydroxyly (energie jsou vztaženy k nejnižší vypočtené hodnotě, jež je považována za arbitrární nulu)

Pro další studium kvantově-chemického chování molekuly pelargonidinu v plynné fázi (v prostředí simulujícím kolizní celu hmotnostního spektrometru) byl hledán takový její konformer, jenž je energeticky preferován, tj. ten, jenž vykazuje nejnižší Gibbsovu energii v základním stavu. Energie této konformace pelargonidinu byla poté brána jako arbitrární nula, k níž byly vztahovány energie veškerých ostatních struktur, zkoumaných v dalších krocích. Tato základní myšlenka je shodná s postupem, jenž byl aplikován v již citovaných pracích, studujících pelargonidin a další anthokyanidiny kvantově-chemickými metodami.<sup>[69–71,85]</sup>

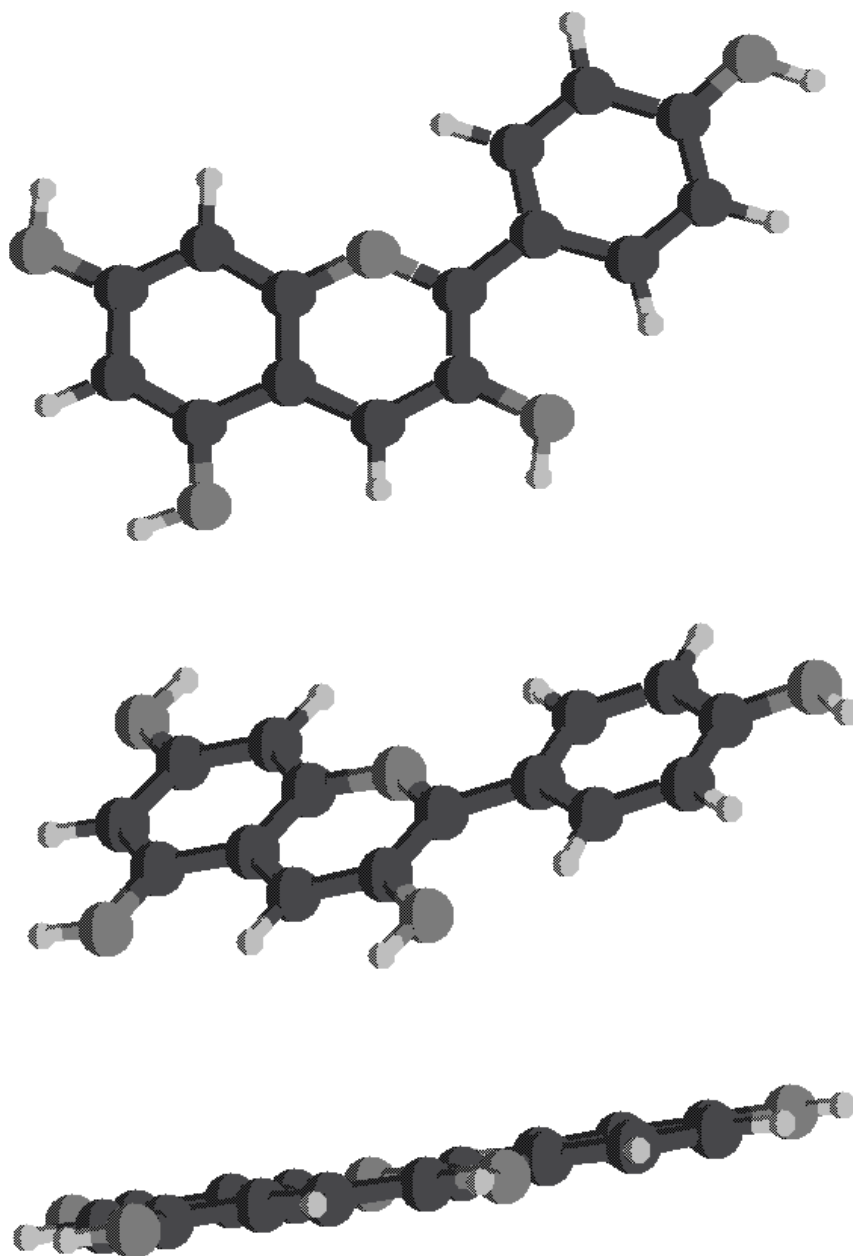
Optimalizace molekuly v základním stavu byla provedena pro celkem 32 uvažovaných konformerů pelargonidinu (byly zkoumány změny pěti různých dihedrálních úhlů). U šestnácti z nich byla vzájemná pozice B a C kruhů planární, u zbývajících 16 nikoliv. Energetické minimum nebylo nalezeno u osmi těchto struktur, jejichž společnými znaky byly neplanarita molekuly a velikost dihedrálního úhlu C2-C3-O3-H3 180°. Tento fakt naznačuje, že v případě neplanárního uspořádání molekuly dovolují sterické vlivy zmiňovanému dihedrálnímu úhlu (C2-C3-O3-H3) nabývat hodnoty 0°. Při optimalizaci geometrie byla



pozorována preference této pozice a natočení příslušného vodíku (H3) směrem k B-kruhu (poloha odpovídá úhlu 0°). Na základě výsledků výpočtů, jejichž souhrn podává Tabulka IV, byla vybrána energeticky preferovaná geometrie molekuly v základním stavu v plynné fázi. Ta se kvalitativně shoduje s nejstabilnějšími konformery pelargonidinu i dalších anthokyanidinů, nalezenými autory předchozích studií.<sup>[70,71,85]</sup> Tato struktura je planární a veškeré její hydroxylové skupiny svírají se skeletálními uhlíky úhel 180° (v pořadí, v němž jsou tyto C uvedeny v Tabulce IV). Preferovaný konformer Pg je zobrazen na Obrázku 26. Preferenci planarity lze vysvětlit možností vzniku intramolekulární vodíkové vazby mezi atomy O3 a H6', jež byla pozorována v práci Rosy Guzmán.<sup>[70]</sup>

**Tabulka IV:** Popis uvažovaných konformací pelargonidinu a jejich energie získané DFT metodou (velikosti úhlů jsou uvedeny ve stupních); preferovaná konformace je vyznačena tučně

číslo základní struktury	pozice B-kruhu	úhel mezi C2-C3-O3-H	úhel mezi C10-C5-O5-H	úhel mezi C6-C7-O7-H	úhel mezi C3'-C4'-O4'-H	Gibbsova energie [eV]
1	planární	180	0	0	180	-25965,178
2	planární	180	180	0	180	-25965,362
<b>3</b>	<b>planární</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>-25965,383</b>
4	planární	180	180	180	0	-25965,377
5	planární	180	180	0	0	-25965,357
6	planární	180	0	180	0	-25965,152
7	planární	180	0	180	180	-25965,157
8	planární	180	0	0	0	-25965,176
9	planární	0	180	180	0	-25965,088
10	planární	0	0	180	0	-25964,912
11	planární	0	0	0	0	-25964,989
12	planární	0	0	0	180	-25964,987
13	planární	0	0	180	180	-25964,911
14	planární	0	180	0	180	-25965,078
15	planární	0	180	180	180	-25965,088
16	planární	0	180	0	0	-25965,081
17	neplanární	0	180	180	0	-25965,262
18	neplanární	0	0	180	0	-25965,088
19	neplanární	0	0	0	0	-25965,111
20	neplanární	0	0	0	180	-25965,110
21	neplanární	0	0	180	180	-25965,090
22	neplanární	0	180	0	180	-25965,251
23	neplanární	0	180	180	180	-25965,264
24	neplanární	0	180	0	0	-25965,251



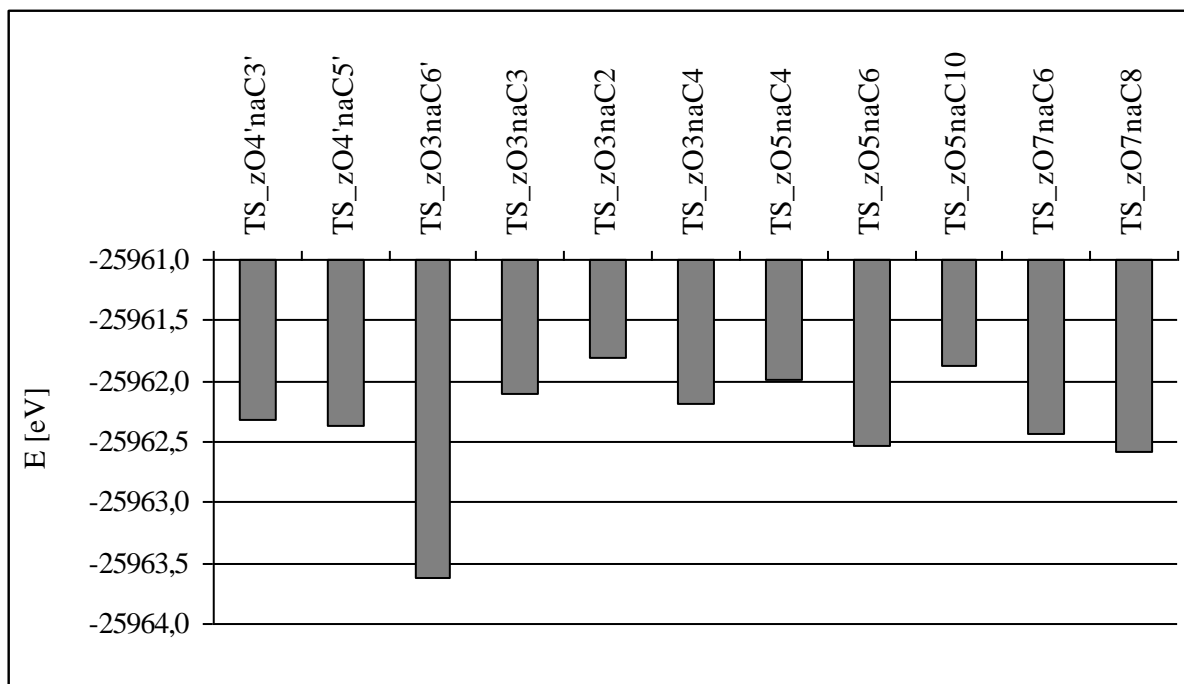
**Obrázek 26:** Energeticky preferované prostorové uspořádání molekuly pelargonidinu v základním stavu (struktura č. 3 v Tabulce IV) v pohledu a) zepředu, b) shora a c) ze strany; tato geometrie byla vybrána jako výchozí pro další výpočty

#### 4.2.2 Energeticky preferovaná cesta vedoucí k odtržení molekuly vody z pelargonidinu

Pro ztrátu vody z prekurzorového iontu, pozorovanou experimentálně v kolizní cele hmotnostního spektrometru, je nutný přesun protonu ze skeletu molekuly na některý z hydroxylů za vzniku skupiny  $\text{-H}_2\text{O}^+$ . Tento vodík pravděpodobně pochází z některého z ostatních hydroxylů (zvolený přístup bude dále diskutován na konci této kapitoly).

Z mateřské skupiny  $\text{-OH}$  je po dodání energie iontu v kolizní cele atom H transportován několika kroky po skeletálních uhlících až k cílové  $\text{-OH}$  skupině. Model použitý v této práci je uvažován pro oblast nízkoenergetických CID procesů (množství vložené energie je relativně malé a umožňuje molekule podstupovat i kineticky „pomalejší“ vícestupňové procesy). V prvním kroku byly srovnávány energie tranzitních stavů přesunu protonu ze všech čtyř  $\text{-OH}$  skupin na okolní skeletální uhlíky. Pro zajištění porovnatelnosti a konzistence výpočtů byly veškeré TS přesunu vodíku v této diplomové práci modelovány v rovině skeletu molekuly, případně nad touto rovinou. Stejným způsobem postupovali ve své práci Kurka a kol.<sup>[85]</sup> Energeticky nejvýhodnějším se ukázal být přesun protonu z O3 na C6', což lze vysvětlit vznikem dočasněho šestičlenného kruhu mezi kruhy B a C. Toto zjištění je ve shodě s výsledky výše zmiňované studie<sup>[85]</sup>, a zároveň v rozporu se závěry Barnese a Schuga, kteří se domnívají, že H3 přechází z O3 na C2.<sup>[84]</sup> Daný TS je však podle výsledků této diplomové práce o 1,8 eV náročnější, než TS mezi O3 a C6'. Na rozdíl od postupu Barnese a Schuga, metodika použitá v této práci nezohledňuje pouze energii konečné struktury, ale také průběh děje. Asi o 2 eV vyšší energii než TS mezi O3 a C6' pak vykazují přesuny H z O7 na C8 a z O5 na C6. Naopak nejvíce energeticky náročné jsou TS mezi O3 a C2 a také mezi O5 a C10. Srovnání Gibbsových energií jednotlivých TS poskytuje Obrázek 27.

Dalšími kroky k nalezení optimální cesty při transferu vodíku po molekule pelargonidinu byly výpočty energie optimalizovaných struktur ve všech kombinacích přesunu právě jednoho hydroxylového vodíku na všechny skeletální uhlíky. Takto bylo zkoumáno celkem  $4 \times 15$  variant lokálního minima (čtyři hydroxylové H vs. patnáct C pelargonidinu). Nejnižší energie vykazují struktury, v nichž je H5 navázán na C6 nebo C8, H7 navázán na C8 nebo je H3 připojen k C4. Byly také vytvořeny návrhy všech možných struktur, jež mohou vzniknout úplným odtržením  $\text{H}_2\text{O}$  z molekuly Pg (tj. celkem  $4 \times 3$  možností) a tyto byly optimalizovány. Opět byly zjištěny hodnoty energie odpovídajících OPT a došlo k jejich porovnání.



**Obrázek 27:** Gibbsovy energie TS vodíku z mateřského hydroxyly na okolní skeletální uhlík získané při výpočtech používajících funkcionál B3LYP a sadu bazí 6-311+G(2d,p); názvy TS zahrnují označení mateřského kyslíku a cílového uhlíku – orientaci v názvech TS usnadní pohled zpět na Obrázky 1 a 24

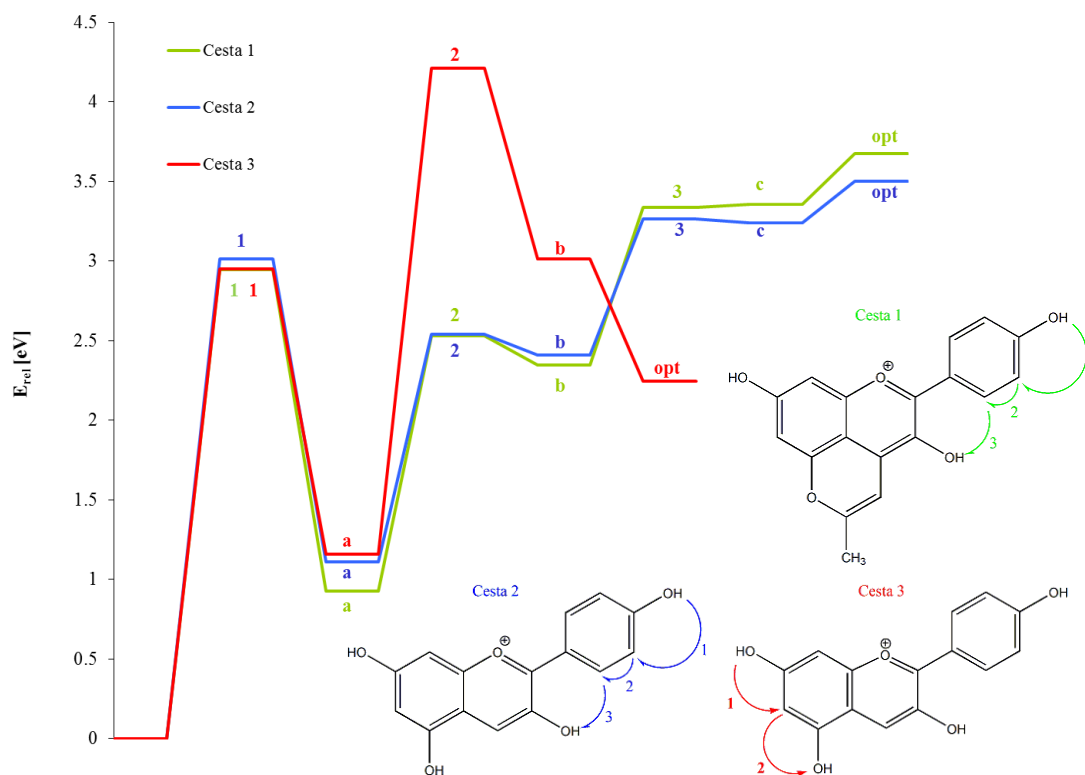
Na základě interpretace všech uvedených kombinací výpočtů, tj. hodnoty energie TS vodíku mezi mateřským hydroxyly a skeletálními uhlíky v jeho okolí, hodnoty energie OPT pro tento H navázaný na některý ze skeletálních C a hodnoty energie optimalizované struktury Pg po úplném odtržení vody, byly vybrány energeticky nejvýhodnější cesty přesunu protonu po molekule. Tímto způsobem byla zamítnuta cesta H začínající jeho transferem z O3 na C6', ačkoliv tento TS vykazuje absolutně nejnižší energii – další TS na cestě protonu H3 k jakékoliv jiné -OH skupině jsou vysoce energeticky náročné. Kandidáty na pozici energeticky preferovaného transferu H pro vytvoření skupiny  $-H_2O^+$  se staly dvě varianty cesty: přesun protonu z kyslíku O4' na kyslík O3 (přes uhlíky C5' a C6', Cesta 2) a transfer protonu z kyslíku O7 na kyslík O5 (přes uhlík C6, Cesta 3). Z energie jednotlivých TS a OPT, jež jsou součástí těchto cest, lze vyvozovat, že zatímco Cesta 2 bude preferována kineticky (nejnižší energie TS), Cesta 3 je preferována termodynamicky (nejnižší energie OPT molekuly po odtržení příslušné  $H_2O$ ).

Srovnáme-li tyto dva nejpravděpodobnější způsoby transferu vodíku po molekule pelargonidinu s jeho preferovanou cestou po molekule pyrano-derivátu Pg (zkoumané v práci

O. Kurky a kol., Cesta 1), je patrné, že pro odštěpení molekuly vody z Pg je zapotřebí nižší energie, než pro tentýž proces u 5-methylpyranopelargonidinu.<sup>[85]</sup> Energie jednotlivých tranzitních stavů a optimalizovaných minim, jež jsou součástí všech výše zmíněných cest, shrnuje Tabulka V, jejich vizuální srovnání nabízí Obrázek 28.

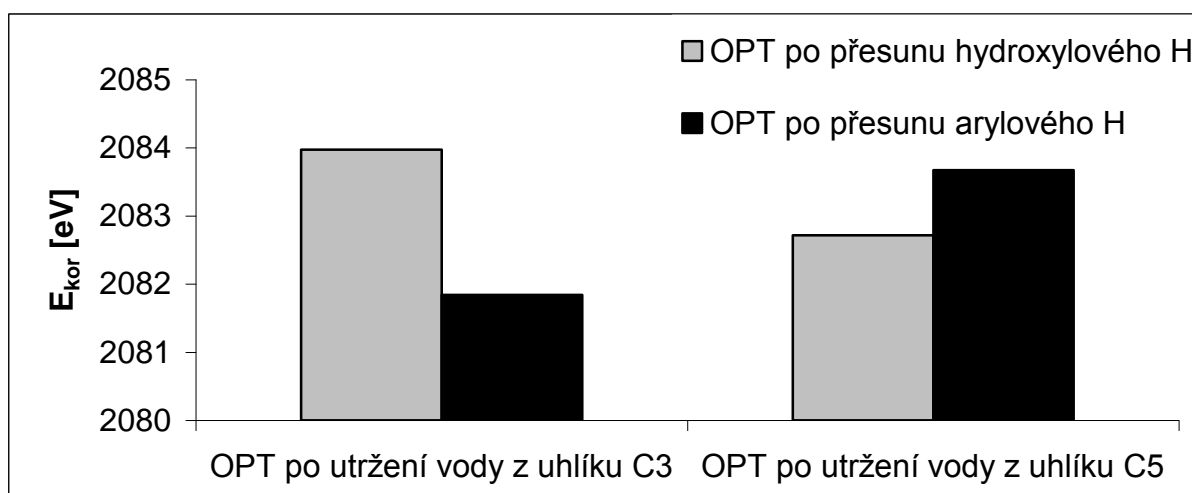
**Tabulka V:** Energie jednotlivých kroků (tj. TS a OPT) cest vedoucích k odštěpení vody z molekuly Pg; značení kroků koresponduje s Obrázkem 28 (čísla pro TS, písmena pro OPT a heslo „opt“ pro OPT struktury po odštěpení příslušné H<sub>2</sub>O) a energie jsou vztaženy k energii Pg v základním stavu (viz Tabulka IV)

krok	1	a	2	b	3	c	opt
<b>Cesta 1</b> E/E <sub>zákl</sub> [eV]	2,945	0,926	2,533	2,349	3,337	3,359	3,677
<b>Cesta 2</b> E/E <sub>zákl</sub> [eV]	3,014	1,112	2,541	2,409	3,265	3,239	3,503
<b>Cesta 3</b> E/E <sub>zákl</sub> [eV]	2,952	1,159	4,213	3,013	-	-	2,244



**Obrázek 28:** Energie jednotlivých kroků Cest 1, 2 a 3 vyneseny do grafu; jednotlivé kroky jsou označeny (čísla pro TS, písmena pro OPT a heslo „opt“ pro OPT molekuly bez příslušné H<sub>2</sub>O) a také naznačeny šipkami v obrázcích těchto cest; energie E<sub>rel</sub> jsou vztaženy k energii Pg v základním stavu (viz Tabulka IV)

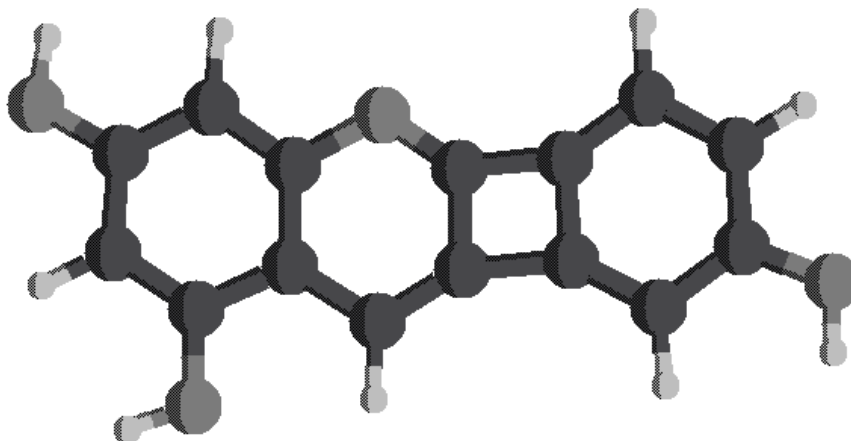
Pokud porovnáme transfery hydroxylových a arylových vodíků, dojdeme k zajímavým závěrům. Ačkoliv kvantově-chemické výpočty ukázaly, že (veškeré nalezené) transfery hydroxylových H na některé z ostatních -OH skupin jsou energeticky náročnější, než TS mezi -OH a H navázanými na okolní skeletální uhlíky. Např. odtržení H<sub>2</sub>O z polohy C5 je však z termodynamického hlediska znevýhodněno v případě, že tato voda obsahuje arylový H, oproti hydroxylovému vodíku (Cesta 3). OPT iontu, vznikajícího transferem H po Cestě 3 (viz Obrázek 28) vykazuje nižší energii, než OPT struktur, vzniklých odtržením vody obsahující arylový H<sub>6</sub> nebo H<sub>4</sub> (Obrázek 29). Vysvětlením tohoto fenoménu by mohla být preference vzniku karbonylové skupiny před porušením  $\pi$ -elektronového systému aromatických jader.<sup>[88]</sup> Tento uvažovaný mechanismus se liší od mechanismu štěpení HDO z D-Pg, při němž je na -OD skupinu transportován arylový H ze skeletu molekuly preferenčně (viz kapitola 4.1.2).



**Obrázek 29:** Srovnání relativních energií optimalizovaných molekul po odstupu vody z preferovaných pozic (energie jsou vztaženy k energii Pg v základním stavu);  
v prvním případě srovnání OPT po transferu H z O4' vs. C6', v druhém po transferu H z O7 vs. C6

V případě Cesty 2 má vznikající struktura konkurenci v podobě iontu, který je vytvořen po odtržení -H<sub>2</sub>O<sup>+</sup> skupiny, obsahující arylový H<sub>6</sub>'. Tento ion má nízkou Gibbsovu energii (první černý sloupec v Obrázku 29), přestože při hledání jeho OPT dochází k tvorbě čtyřčlenného kruhu, u něhož je možno očekávat nezanedbatelné pnutí. Optimalizovanou geometrii tohoto iontu ukazuje Obrázek 30. Vznik takovéto struktury však nebyl podpořen nalezením příslušného TS arylového H<sub>6</sub>' na hydroxylový kyslík O3. Z výše uvedených závěrů a z CID pokusů provedených na molekule D-Pg vyplývá, že může docházet k transferu

blízkého skeletálního H na některou z -OH skupin a následnému odštěpení takto vzniklé  $\text{-H}_2\text{O}^+$  skupiny. Tento mechanismus však nebyl považován za preferovaný, neboť se ukázal být termodynamicky nevýhodný (v případě Cesty 3) nebo nebyl nalezen příslušný TS (v případě Cesty 2). Pro lepší pochopení vlivu původu protonu na chování anthokyanidinů při jejich CID bude zapotřebí hlubšího výzkumu, jenž je však nad rámec této diplomové práce.



**Obrázek 30:** Optimalizovaná struktura molekuly, vznikající odštěpením vody obsahující arylový vodík H6'

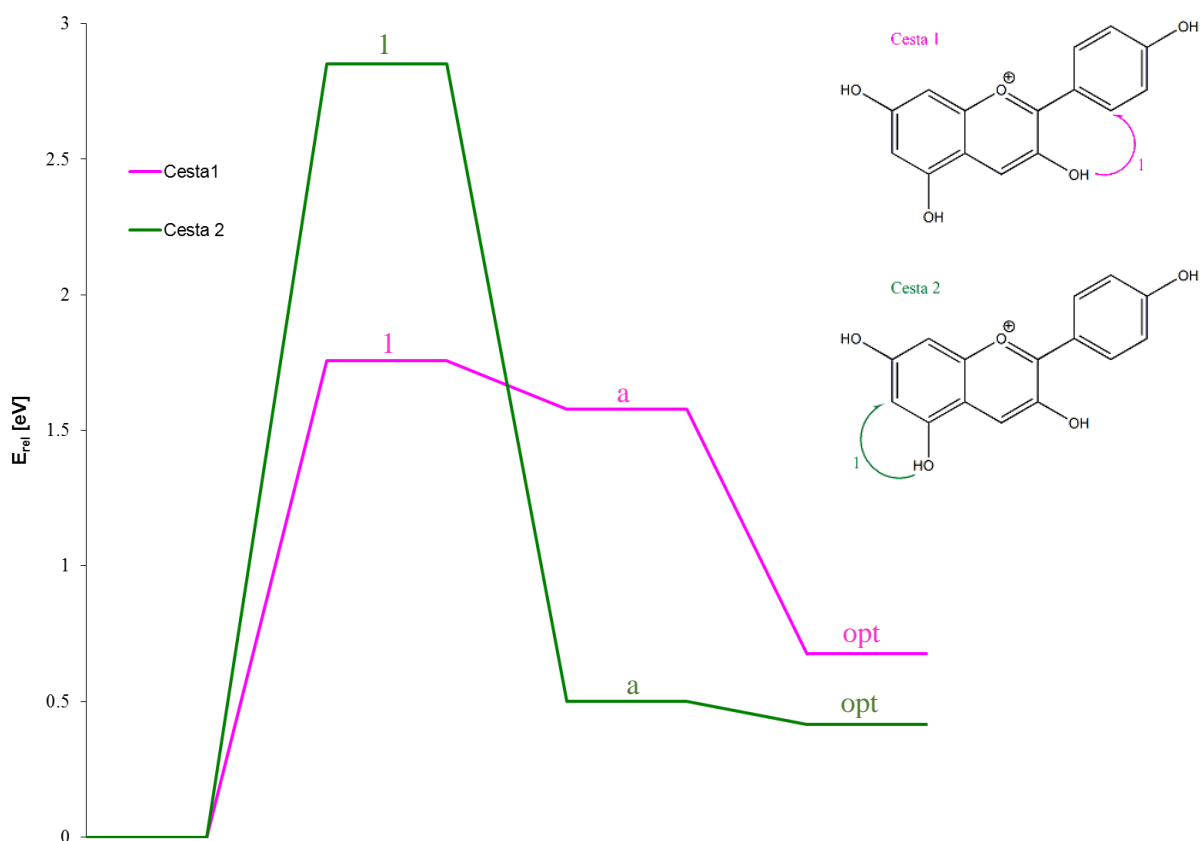
#### 4.2.3 Energeticky preferovaná cesta vedoucí k odtržení molekuly oxidu uhelnatého

Při hledání preferované pozice pro odštěpení molekuly CO musí dojít nejprve k převedení protonu z hydroxylové skupiny na uhlíkový skelet molekuly pelargonidinu, a následně k rozštěpení obou C-C vazeb karbonylové skupiny (postupně nebo současně). Transfer vodíku z hydroxylové skupiny lze studovat analogicky jako při prvním kroku mechanismu odštěpení vody (viz předchozí kapitola). Tentokrát však byly brány v potaz pouze energie prvního tranzitního stavu H (z hydroxyly na uhlík) a následného minima (proton navázán na tento uhlík). Tento postup vychází z myšlenky, že další osud protonu a jeho pohyb po molekule již nehrají při odtržení molekuly CO významnější roli (a určují spíše možnosti následujících fragmentací, jejichž studium přesahuje rámec této práce), neboť odštěpení oxidu uhelnatého nastává bezprostředně po odkrytí kyslíku v mateřské hydroxylové skupině ( $\text{C-OH} \rightarrow \text{C-O}$ ). Vzhledem ke zjištěným energiím (porovnání nejnižších energií tranzitních stavů) byly k podrobnějšímu zkoumání vybrány struktury, vzniklé přenosem H3 na C6', H7 na C8 a H5 na C6. Poté byla informace o energiích těchto TS zkombinována s hodnotami energií OPT

struktur, jež vzniknou odtržením CO z molekuly. Protože molekula, vznikající odtržením C7 a O7 po transferu H7, vykazovala vysokou energii OPT, lze za energeticky preferované považovat štěpení CO z polohy 3 (kinetická preference, Cesta 1) nebo 5 (termodynamická preference, Cesta 2). Přehled jednotlivých energií kroků těchto cest a jejich numerické hodnoty shrnují Tabulka VI a Obrázek 31.

**Tabulka VI:** Energie jednotlivých kroků (tj. TS a OPT) cest vedoucích k odštěpení oxidu uhelnatého z molekuly Pg; značení kroků koresponduje s Obrázkem 31 (čísla pro TS, písmena pro OPT a heslo „opt” pro OPT struktury po odštěpení příslušného CO) a energie jsou vztaženy k energii Pg v základním stavu (viz Tabulka IV)

krok	1	a	opt
<b>Cesta 1</b> E/E <sub>zákl</sub> [eV]	1,757	1,579	0,676
<b>Cesta 2</b> E/E <sub>zákl</sub> [eV]	2,852	0,502	0,416

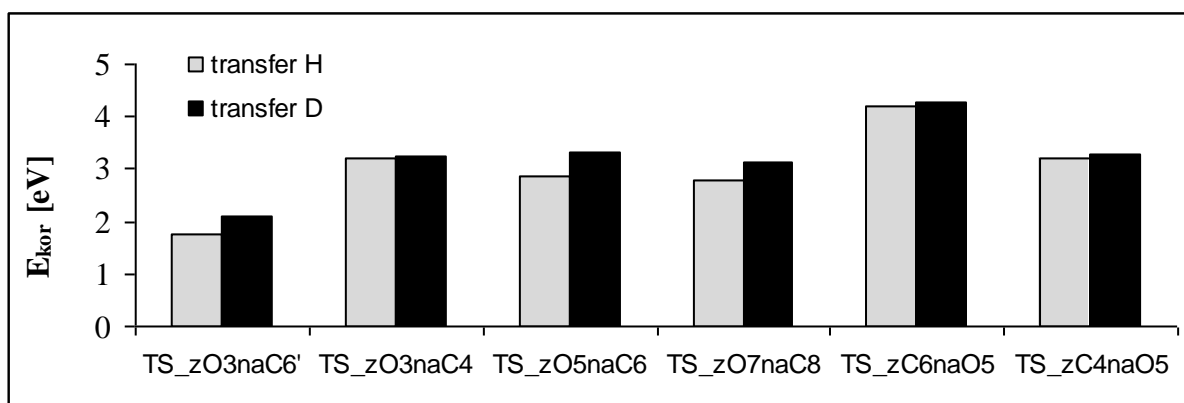


**Obrázek 31:** Energie jednotlivých kroků Cest 1 a 2 vyneseny do grafu; jednotlivé kroky jsou označeny (čísla pro TS, písmena pro OPT a heslo „opt” pro OPT molekuly bez příslušného CO) a také naznačeny šipkami v obrázcích těchto cest; energie  $E_{rel}$  jsou vztaženy k energii Pg v základním stavu (viz Tabulka IV)



#### 4.2.4 Energie potřebná k přesunu deuteria

Pro srovnání energií některých vybraných TS s analogickými procesy probíhajícími v případě těžšího izotopu vodíku byly provedeny kvantově-chemické výpočty operující s molekulou perdeuterovaného pelargonidinu. Nejprve byla optimalizována molekula D-Pg v základním stavu (geometrie vycházela z preferované geometrie pro Pg) a k její energii byly poté vztaženy veškeré Gibbsovy energie získané pro TS deuteria. Hodnoty takto spočtených relativních energií ( $E_{rel}$ ) ve všech případech převyšovaly energie příslušných TS protonu při jeho přesunu po molekule Pg (viz Obrázek 32). Tento fakt vysvětluje preferenci ztráty HDO před ztrátou D<sub>2</sub>O, pozorovanou při CID D-Pg v QIT (kapitola 4.1.2)



**Obrázek 32:** Gibbsovy energie vybraných TS vodíku po Pg (šedě) a deuteria po D-Pg (černě) při jejich přesunu z mateřského hydroxyly na okolní skeletální uhlík nebo ze skeletálního uhlíku na cílový hydroxyl (názvy TS zahrnují označení mateřského O a cílového C nebo mateřského C a cílového O); energie byly vztaženy k energiím optimalizované molekuly Pg resp. D-Pg v základním stavu

## 5 ZÁVĚR

Závěry, vyplývající z kolizí indukované disociace molekul pelargonidinu v plynné fázi, nám umožňují určit pravděpodobné fragmentační mechanismy, jimž tento anthokyanidin podléhá při hmotnostně-spektrometrickém experimentu. Pokud je navíc předpokládán průběh těchto procesů podpořen výsledky kvantově-chemických výpočtů, lze usuzovat, která místa štěpení molekuly jsou preferována a jakou podobu mohou mít výsledné produktové ionty. Tyto informace pomáhají rozšířit naše znalosti o procesech stojících za vzhledem fragmentačního spektra analytu a stávají se tak podkladem pro identifikaci látky při použití hmotnostní spektrometrie při analýze komplexních vzorků.

Výsledky této práce předkládají návrhy vzorců a struktur produktových iontů, vznikajících při nízkoenergetické CID. Kombinace fragmentačních spekter a hodnot vypočtených DFT metodou s B3LYP funkciónálem a sadou bází 6-311+G(2d,p) umožnila navrhnout termodynamicky a kineticky preferované fragmentační reakce pelargonidinu. Na základě srovnání Gibbsových energií získaných pomocí kvantově-chemických výpočtů byly také predikovány pravděpodobné pozice štěpení vody a oxidu uhelnatého. Ty jsou shodné pro obě tyto neutrální ztráty, přičemž ztráta malé neutrální molekuly z pozice 5 je preferována termodynamicky, z pozice 3 pak kineticky. Námětem pro další detailnější výzkum je úloha arylových vodíků v procesu eliminace vody z kinetického úhlu pohledu.

Chování anthokyanidinu v kolizní cele je ovlivněno také přítomností deuteria v jeho struktuře. Závěry MS-experimentu provedeného na deuterovaném analogu pelargonidinu jsou ve shodě s výsledky DFT výpočtů a ukazují, že transfer těžšího izotopu vodíku po molekule je energeticky náročnější, a tudíž méně pravděpodobný. Tento rozdíl poukazuje na fakt, že izotopicky značené standardy nemusí vykazovat při fragmentaci identické chování jako vlastní analyty, a je tedy nezbytné detailní prozkoumání těchto rozdílů při tvorbě MS metody.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AM1 = Austin method 1 (Austinova semiempirická metoda výpočetní chemie)

AO = atomový orbital

APCI = atmospheric pressure chemical ionization (chemická ionizace za atmosférického tlaku)

API = atmospheric pressure ionization (ionizace za atmosférického tlaku)

APPI = atmospheric pressure photoionization (fotoionizace za atmosférického tlaku)

B3LYP = tříparametrový Becke-Lee-Yang-Parrův funkcionál

CI = chemical ionization (chemická ionizace)

CID = collision-induced dissociation (kolizí indukovaná disociace)

CNDO = complete neglect of differential overlap (semiempirická metoda výpočetní chemie)

Cy = kyanidin

DESI = desorption electrospray ionization (desorpce elektrosprejem)

DFT = teorie funkcionálu hustoty

Dp = delfinidin

D-Pg = deuterovaná forma pelargonidinu s  $m/z = 275$

EHT = extended Hückel's theory, rozšířená Hückelova metoda molekulových orbitalů (empirická metoda výpočetní chemie)

EI = electron ionization (elektronová ionizace)

ESI = electrospray ionization (ionizace elektrosprejem)

HF = Hartree-Fockova metoda

HMO = (empirická metoda výpočetní chemie)

HPLC = high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

HRMS = high-resolution mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením)

ICR = ion cyclotron resonance (iontová cyklotronová rezonance)

IEPA = independent electron pair approximation, přiblížení nezávislých elektronových párů

IMS = ion mobility spectrometry (měření iontové mobility)

INDO = intermediate neglect of differential overlap (semiempirická metoda výpočetní chemie)

MALDI = matrix assisted laser desorption ionization (desorpce laserem za asistence matrice)

MINDO = modified intermediate neglect of differential overlap (semiempirická metoda výpočetní chemie)

MO = molekulový orbital

MO-LCAO = teorie molekulových orbitalů jako lineární kombinace orbitalů atomových

MS = mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)

Mv = malvidin

OPT = energetické minimum

PCM = polarizable continuum model (implicitní model vody jako kontinuálního dielektrika)

PES = potential energy surface scan (sken plochy potenciální energie)

Pg = pelargonidin

Pg-3-Glu = pelargonidin-3-O-glukosid

Pn = peonidin

Pt = petunidin

QIT = quadrupole ion trap (iontová past)

QMF = quadrupole mass filter (kvadrupólový analyzátor)

QTAIM = quantum theory of atoms in molecules (*ab initio* metoda výpočetní chemie)

RDA = retro Diels-Alderovo štěpení

RSH = range-separated hybrid (funkcionál založený na škálově oddělených Coulombických interakcích)

SCF = self-consistent field (metoda konzistentního pole)

SE-CI = single excitation-configuration interaction (*ab initio* metoda výpočetní chemie)

SIMS = secondary ions mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů)

TOF = time of flight (průletový analyzátor)

TS = tranzitní stav

UV-VIS = ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

ZINDO = Zerner's intermediate neglect of differential overlap (semiempirická metoda výpočetní chemie)

## 7 SEZNAM LITERATURY

- [1] F. W. McLafferty, F. Tureček. *Interpretation of Mass Spectra*. American Chemical Society, Mill Valley, **1994**.
- [2] R. Ikan. *Natural Products: A Laboratory Guide*. Elsevier, **1991**.
- [3] S. Damodaran, K. L. Parkin, O. R. Fennema. *Fennema's Food Chemistry, Fourth Edition*. CRC Press, **2008**.
- [4] L. M. L. Nollet. *Handbook of Food Analysis: Physical Characterization and Nutrient Analysis*. **2004**.
- [5] X. Wu, R. L. Prior. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2589.
- [6] J. Kong. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 923.
- [7] P. Matile, Vacuole, in *Plant Biochemistry*, (Eds: J. Bonner, J.E. Varner). Elsevier, **1976**, pp. 189–224.
- [8] M. Garcia-Alonso, A.-M. Minihane, G. Rimbach, J. C. Rivas-Gonzalo, S. de Pascual-Teresa. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *J. Nutr. Biochem.* **2009**, *20*, 521.
- [9] H. Wang, G. H. Cao, R. L. Prior. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 304.
- [10] K. R. Määttä-Riihinen, A. Kamal-Eldin, P. H. Mattila, A. M. González-Paramás, R. Törrönen. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4477.
- [11] M. P. Kähkönen, J. Heinämäki, V. Ollilainen, M. Heinonen. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 1403.
- [12] I. Rau. Electronic Structure, Optical and Electrochemical Properties of Malvidin Molecule Extracted From Grapes. *Disp. Imagigng* **2014**, *1*, 175.
- [13] C. J. F. C. Alimentarius. *Codex Alimentarius, Volume 1, Part 1*. Food And Agriculture Organization Of The United Nations, **1995**.
- [14] S. C. Forester, P. Oteiza, A. L. Waterhouse. Identification and Cancer Therapeutic Properties of Microfloral Anthocyanin Metabolites. *J. Wine Res.* **2011**, *22*, 171.
- [15] Y. J. Zhang, N. P. Seeram, R. Lee, L. Feng, D. Heber. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell anti proliferative properties. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 670.
- [16] H. Nagase, K. Sasaki, H. Kito, A. Haga, T. Sato. Inhibitory effect of delphinidin from *Solanum melongena* on human fibrosarcoma HT-1080 invasiveness in vitro. *Planta Med.* **1998**, *64*, 216.
- [17] Y. Qin, M. Xia, J. Ma, Y. Hao, J. Liu, H. Mou, L. Cao, W. Ling. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with

- the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90*, 485.
- [18] B. Jayaprakasam, S. K. Vareed, L. K. Olson, M. G. Nair. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 28.
- [19] T. Tsuda, Y. Ueno, H. Kojo, T. Yoshikawa, T. Osawa. Gene expression profile of isolated rat adipocytes treated with anthocyanins. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1733*, 137.
- [20] C. Rice-Evans, N. Miller, G. Paganga. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 152.
- [21] E. Pojer, F. Mattivi, D. Johnson, C. S. Stockley. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 483.
- [22] L. Verbeyst, I. Oey, I. Van der Plancken, M. Hendrickx, A. Van Loey. Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. *Food Chem.* **2010**, *123*, 269.
- [23] R. Brouillard, J.-E. Dubois. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1359.
- [24] V. de Freitas, N. Mateus. Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (Review). *Environ. Chem. Lett.* **2006**, *4*, 175.
- [25] A. Castañeda-Ovando, M. D. L. Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. a. Rodríguez, C. A. Galán-Vidal. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859.
- [26] D. Blanco-Vega, S. Gómez-Alonso, I. Hermosín-Gutiérrez. Identification, content and distribution of anthocyanins and low molecular weight anthocyanin-derived pigments in Spanish commercial red wines. *Food Chem.* **2014**, *158*, 449.
- [27] F. L. da Silva, M. T. Escribano-Bailón, J. J. Pérez Alonso, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 374.
- [28] W. Mullen, C. a. Edwards, M. Serafini, A. Crozier. Bioavailability of pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 713.
- [29] K. a. Mitchell, K. R. Markham, M. R. Boase. Pigment chemistry and colour of Pelargonium flowers. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 355.
- [30] J. Lachman, K. Hamouz, M. Šulc, M. Orsák, V. Pivec, A. Hejtmánková, P. Dvořák, J. Čepl. Cultivar differences of total anthocyanins and anthocyanidins in red and purple-fleshed potatoes and their relation to antioxidant activity. *Food Chem.* **2009**, *114*, 836.
- [31] L.-S. Wang, X.-D. Sun, Y. Cao, L. Wang, F.-J. Li, Y.-F. Wang. Antioxidant and pro-oxidant properties of acylated pelargonidin derivatives extracted from red radish (*Raphanus sativus* var. *niger*, Brassicaceae). *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2712.
- [32] Y. Noda, T. Kaneyuki, A. Mori, L. Packer. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: Delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 166.
- [33] Y. Matsui, A. Sunouchi, T. Yamamoto. Inhibitory Effect of Cyclodextrins on the Discoloration Reaction of an Anthocyanidin, Pelargonidin Chloride, in Acidic Media. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **n.d.**, *32*, 57.

- [34] V. Hanuš, Postavení hmotnostní spektrometrie mezi spektroskopickými metodami, in *I. Škola Hmotnostní Spektrometrie*. Spektroskopická Společnost Jana Marci Marci, Praha, **1986**, pp. 9–13.
- [35] V. Stučka. *Instrumentální Metody Chemické Analýzy II. Hmotnostní Spektrometrie Organických Molekul*. Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc, **1996**.
- [36] J. B. P. D., J. Barker, D. J. Ando. *Mass Spectrometry: Analytical Chemistry by Open Learning*. John Wiley & Sons, **1999**.
- [37] C. G. Herbert, R. A. W. Johnstone. *Mass Spectrometry Basics*. CRC Press, **2002**.
- [38] E. de Hoffmann, V. Stroobant. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, **2013**.
- [39] R. B. Cole, Ed. . *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*. John Wiley & Sons, **2011**.
- [40] J. Fernandez De La Mora. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 93.
- [41] J. V. Iribarne. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2287.
- [42] R. B. Cole, Ed. . *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*. Wiley, **1997**.
- [43] J. Leško, Sektorové hmotnostné spektrometrie, prístroje s dvojistou fokusáciou, vysoké rozlíšenie, detekcia metastabilných iontov, in *I. Škola Hmotnostní Spektrometrie*. Spektroskopická Společnost Jana Marci Marci, Olomouc, **1986**, pp. 48–54.
- [44] V. Hanuš, Dynamické analyzátory v hmotnostní spektrometrii, in *I. Škola Hmotnostní Spektrometrie*. Spektroskopická Společnost Jana Marci Marci, Olomouc, **1986**, pp. 55–62.
- [45] J. T. Watson, O. D. Sparkman. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*. John Wiley & Sons, **2013**.
- [46] W. Paul. Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles(Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1990**, 29, 739.
- [47] M. Holcapek, R. Jirásko, M. Lísa. Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 3908.
- [48] J.-L. H. Jiwan, P. Wallemacq, M.-F. Hérent. HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory? *Clin. Biochem.* **2011**, 44, 136.
- [49] L. Abrankó, B. Szilvássy. Mass spectrometric profiling of flavonoid glycoconjugates possessing isomeric aglycones. *J. mass Spectrom.* **2015**, 71.
- [50] F. Lopes-da-Silva, S. de Pascual-Teresa, J. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, 214, 248.
- [51] R. G. Cooks. Special feature: Historical. Collision-induced dissociation: Readings and commentary. *J. Mass Spectrom.* **1995**, 30, 1215.



- [52] W. M. A. Niessen, Experimental Methods and Instrumentation, in *Ion/Molecule Attachment Reactions: Mass Spectrometry*, (Ed: T. Fujii). Springer, Tokyo, **2015**, p. 332.
- [53] P. Wright, A. Alex, F. Pullen. Predicting collision-induced dissociation spectra: semi-empirical calculations as a rapid and effective tool in software-aided mass spectral interpretation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, 28, 1127.
- [54] A. R. Johnson, E. E. Carlson. Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Natural Product Structure Elucidation. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 10668.
- [55] M. C. Oliveira, P. Esperança, M. A. Almoester Ferreira. Characterisation of anthocyanidins by electrospray ionisation and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, 15, 1525.
- [56] F. Cuyckens, M. Claeys. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, 39, 1.
- [57] P. Alberts, M. A. Stander, A. de Villiers. Advanced ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for the screening of red wine anthocyanins and derived pigments. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1235, 92.
- [58] J. Sun, L. Lin, P. Chen. Study of the mass spectrometric behaviors of anthocyanins in negative ionization mode and its applications for characterization of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26, 1123.
- [59] Y. L. Ma, Q. M. Li, H. Van den Heuvel, M. Claeys. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, 11, 1357.
- [60] R. Polák, R. Zahradník. *Kvantová Chemie, Základy Teorie a Aplikace*. SNTL - Nakladatelství Technické Literatury, Bratislava, **1985**.
- [61] E. Schrödinger. An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules. *Phys. Rev.* **1926**, 28, 1049.
- [62] M. Born. Zur Quantenmechanik der Stoßvorgänge. *Zeitschrift für Phys.* **1926**, 37, 863.
- [63] J. Ridley, M. Zerner. An intermediate neglect of differential overlap technique for spectroscopy: Pyrrole and the azines. *Theor. Chim. Acta* **1973**, 32, 111.
- [64] W. Koch, M. C. Holthausen. *A Chemist ' S Guide to Density Functional Theory*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2001**.
- [65] A. D. Becke. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648.
- [66] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785.
- [67] P. Trouillas, F. Di, J. Gierschner, M. Linares, J. C. Sancho-garcía, M. Otyepka. Optical properties of wine pigments : theoretical guidelines with new methodological perspectives. *Tetrahedron* **2015**, 71, 3079.
- [68] G. V. Boyd, N. Singer. Molecular orbital calculations of the first transition energy of substituted pyrylium salts. *Tetrahedron* **1965**, 21, 1263.

- [69] K. Sakata, N. Saito, T. Honda. Ab initio study of molecular structures and excited states in anthocyanidins. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3721.
- [70] R. Guzmán, C. Santiago, M. Sánchez. A density functional study of antioxidant properties on anthocyanidins. *J. Mol. Struct.* **2009**, *935*, 110.
- [71] L. Estévez, R. A. Mosquera. A Density Functional Theory Study on Pelargonidin. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 11100.
- [72] L. Lu, M. Qiang, F. Li, H. Zhang, S. Zhang. Theoretical investigation on the antioxidative activity of anthocyanidins: A DFT/B3LYP study. *Dye. Pigment.* **2014**, *103*, 175.
- [73] R. A. Mosquera, L. Estévez, M. G. Bugarín, Computational Studies on Conformation, Electron Density Distributions, and Antioxidant Properties of Anthocyanidins, in *Advanced Protocols on Oxidative Stress III*, (Ed: D. Armstrong). Springer Science+Business Media, New York, **2015**, pp. 257–276.
- [74] K. Torskangerpoll, K. J. Børve, Ø. M. Andersen, L. J. Sæthre. Color and substitution pattern in anthocyanidins. A combined quantum chemical–chemometrical study. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1999**, *55*, 761.
- [75] A. A. Freitas, K. Shimizu, F. H. Quina. A Computational Study of Substituted Flavylium Salts and their Quinonoidal Conjugate- Bases: S 0 → S 1 Electronic Transition, Absolute pK. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1537.
- [76] F. Di Meo, J. C. Sancho Garcia, O. Dangles, P. Trouillas. Highlights on Anthocyanin Pigmentation and Copigmentation: A Matter of Flavonoid  $\pi$ -Stacking Complexation To Be Described by DFT-D. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 2034.
- [77] F. Hufsky, S. Böcker. Mining molecular structure databases : Identification of small molecules based on fragmentation mass spectrometry data. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *9999*, 1.
- [78] A. Alex, S. Harvey, T. Parsons, F. S. Pullen, P. Wright, J.-A. Riley. Can density functional theory (DFT) be used as an aid to a deeper understanding of tandem mass spectrometric fragmentation pathways? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2619.
- [79] S. W. Holman, P. Wright, G. J. Langley. High-throughput approaches towards the definitive identification of pharmaceutical drug metabolites. 1. Evidence for an ortho effect on the fragmentation of 4-benzenesulfinyl-3-methylphenylamine using electrospray ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 2355.
- [80] P. J. Amorim Madeira, P. D. Vaz, R. J. N. Bettencourt da Silva, M. H. Florêncio. Can Semi-empirical Calculations Help Solve Mass Spectrometry Problems? Protonation Sites and Proton Affinities of Amino Acids. *Chempluschem* **2013**, *78*, 1149.
- [81] P. Wright, A. Alex, T. Nyaruwata, T. Parsons, F. Pullen. Using density functional theory to rationalise the mass spectral fragmentation of maraviroc and its metabolites. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2010**, *24*, 1025.
- [82] P. Wright, A. Alex, S. Harvey, T. Parsons, F. Pullen. Understanding collision-induced dissociation of dofetilide: a case study in the application of density functional theory as an aid to mass spectral interpretation. *Analyst* **2013**, *138*, 6869.
- [83] P. Wright, A. Alex, D. Gibson, R. Jones, P. Macrae. Characterisation of sulphoxides by atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2006.

- [84] J. S. Barnes, K. a. Schug. Structural characterization of cyanidin-3,5-diglucoside and pelargonidin-3,5-diglucoside anthocyanins: Multi-dimensional fragmentation pathways using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *308*, 71.
- [85] O. Kurka, J. Roithová, P. Bednář. Examination of small molecule losses in 5-methylpyranopelargonidin MS/MS CID spectra by DFT calculations. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 1314.
- [86] L. Mullin, A. Ladak. Increasing Sensitivity for ToF-MS Detection of Polychlorinated Biphenyls ( PCBs ) Using ToF MRM. *Technol. Br.* **2015**, 1.
- [87] P. Bednář, B. Papoušková, L. Müller, P. Barták, J. Stávek, P. Pavloušek, K. Lemr. Utilization of capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MSn) for the study of anthocyanin dyes. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1291.
- [88] J. McMurry. *Organická Chemie*. VUTIUM, Praha, **2007**.
- [89] W. Paul. Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles. *Nobel Lect.* **1989**, DOI 10.1002/anie.199007391.
- [90] J. Kang, L. a Hick, W. E. Price. A fragmentation study of isoflavones in negative electrospray ionization by MS n ion trap mass spectrometry and triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 857.
- [91] D. Bilusich, C. S. Brinkworth, A. M. McAnoy, J. H. Bowie. The fragmentations of [M-H]<sup>-</sup> anions derived from underivatised peptides. The side-chain loss of H<sub>2</sub>S from Cys. A joint experimental and theoretical study. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2488.
- [92] R. Botter, J. Carlier. Spectre de photoélectrons et calcul des facteurs de franck-condon pour H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O, HDO. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena* **1977**, *12*, 55.
- [93] P. Erman, A. Karawajczyk, E. Rachlew-Källne, C. Strömholm, J. Larsson, A. Persson, R. Zerne. Direct determination of the ionization potential of CO by resonantly enhanced multiphoton ionization mass spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *215*, 173.
- [94] B. Niu, D. a Shirley, Y. Bai. High-resolution photoelectron spectroscopy and femtosecond intramolecular dynamics of formaldehyde radical ion(1+) and formaldehyde-d<sub>2</sub> radical ion(1+) (H<sub>2</sub>CO<sup>+</sup> and D<sub>2</sub>CO<sup>+</sup>). *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 4377.
- [95] R. Vessecchi, G. J. Zocolo, D. R. Gouvea, F. Hübner, B. Cramer, M. R. R. de Marchi, H.-U. Humpf, N. P. Lopes. Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry: experimental and computational studies. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 2020.