

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Fragmentace kondenzovaných anthokyaninů

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:	RNDr. Ondřej Kurka
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
Datum odevzdání práce:	7. 4. 2017

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Ondřej Kurka

Děkuji tímto svému školiteli, doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph. D., za trpělivý přístup v průběhu mého studia, za užitečné rady a za cenné podněty, které podstatně přispěly k získání dosažených výsledků. Káje, Zuzce a své rodině děkuji za podporu při studiu a psaní této práce, paní laborantce Hance Staškové a všem pracovníkům katedry analytické chemie PřF UP za příjemnou a inspirativní atmosféru na pracovišti.

Práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2016_016, IGA_PrF_2017_020).

Souhrn

Disertační práce se zabývá studiem fragmentačního chování kondenzovaných anthokyaninů v kolizní cele hmotnostního spektrometru. Teoretická část práce je věnována přehledu kondenzovaných anthokyaninových derivátů s detailnější diskusí pyranoanthokyaninů a furanoanthokyaninů, dále možnostem hmotnostní spektrometrie pro studium fragmentačního chování a také výpočetním metodám v chemii a jejich využití v tandemové MS analýze.

První část práce je věnována semisyntéze dvou nových izomerních anthokyaninových barviv – 5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu – reakcí pelargonidinu s acetonem. Byl sledován časový vývoj obou izomerů ve směsi v čase a po dosažení dostatečného výtěžku těchto barviv byla tato ze směsi izolována semipreparativní chromatografickou metodou vyvinutou pro tento účel. Identita izolovaných barviv byla ověřena pomocí NMR.

Druhá část práce se zabývá vývojem rychlé chromatografické metody pro separaci obou derivátů a nativního anthokyaninu – pelargonidinu. Byla vyvinuta gradientová UHPLC/MS metoda využívající reverzní stacionární fáze a jednoduchých vodně-organických mobilních fází, která dovozovala tyto látky separovat v čase kratším než 1 minuta. Pro použití v uspořádání bez hmotnostního spektrometru byla optimalizována také izokratická UHPLC/PDA metoda.

Třetí část práce se věnuje sledování fragmentačního chování izolovaných pelargonidinových derivátů v MS/MS a porovnání jejich fragmentačních spekter. Obě látky poskytují shodné fragmenty, liší se ale v jejich relativních intenzitách a na základě pozorovaných rozdílů je možné obě látky odlišit. Významnými sledovanými fragmentačními procesy jsou ztráta molekuly vody, methanu, oxidu uhelnatého a retro-Diels-Alderovské (RDA) štěpení. Na experimentálně získaná data navazuje studie využívající výpočetní metody (DFT), pomocí kterých je studována energetická stabilita studovaných fragmentů. Bylo zjištěno, že fragmentový ion má vyšší intenzitu v MS/MS spektru toho izomeru, pro který má nižší vypočtenou energii (je stabilnější). Ztráta vody, methanu a dvou molekul oxidu uhelnatého je tak preferována u 5-methylpyranopelargonidinu, zatímco RDA štěpení u 4-methylfuranopelargonidinu. U 5-methylpyranopelargonidinu byla provedena také podrobnější studie zkoumající kinetickou preferenci štěpení molekuly oxidu uhelnatého a molekuly vody. Závěry ukazují, že výpočetní metody jsou užitečným nástrojem při odhalování rozdílů ve fragmentačním chování derivátů anthokyaninů včetně izomerních barviv.

Poslední část práce se zabývá přípravou a analýzou ovocného (jahodového) vína. V připraveném víně jsou s využitím UHPLC/MS detekovány anthokyaniny a jejich deriváty a je

studována změna obsahu vybraných anthokyaninů během procesu kvašení. V jahodovém víně byly nalezeny mimo jiné i studované izomery (5-methylpyranopelargonidin a 4-methylfuranopelargonidin), které tak byly vůbec poprvé detekovány v potravinovém produktu.

Summary

The dissertation thesis deals with the study of fragmentation behaviour of condensed anthocyanins in the collision cell of a mass spectrometer. The theoretical part of the thesis is devoted to an overview of condensed anthocyanin derivatives with detailed discussion of pyranoanthocyanins and furoanthocyanins, to possibilities of study of fragmentation behaviour using mass spectrometry and to computational methods in chemistry and their utilization in tandem MS analysis.

The first part of the thesis deals with semisynthesis of two new isomeric anthocyanin dyes – 5-methylpyranopelargonidin and 4-methylfuranopelargonidin – by the reaction of pelargonidin with acetone. Changes of content of both isomers in time were studied and when sufficient yield of both derivatives was obtained, the dyes were isolated from the reaction mixture using a semipreparative LC method developed for this purpose. Identity of isolated compounds was verified using NMR.

The second part of the thesis is devoted to the development of a fast chromatographic method to separate both derivatives and the native anthocyanin – pelargonidin. A gradient UHPLC/MS method was developed using reversed stationary phase and simple aqueous-organic mobile phases. It allows to separate target compounds in less than 1 minute. An isocratic UHPLC/PDA method was developed as well to be used in instruments without the possibility of MS detection.

The third part of the thesis studies fragmentation behaviour of isolated pelargonidin derivatives in MS/MS and compares their fragmentation spectra. Both compounds provide identical fragments, however their relative intensities differ and based on these differences both compounds can be distinguished. Important examined fragmentation processes involve loss of a water molecule, loss of methane molecule, loss of carbon monoxide and retro-Diels-Alder (RDA) fission. Experimentally obtained data are followed by a computational study using DFT methods aimed to investigate the energetic stability of studied fragments. It was found that a fragment ion has higher relative intensity in the MS/MS spectrum of that isomer, for which the energy of the fragment ion is lower (i.e. the fragment is more stable). Losses of water, methane and two molecules of carbon monoxide are preferred in 5-methylpyranopelargonidin, while RDA fission is preferred in 4-methylfuranopelargonidin. For 5-methylpyranopelargonidin a detailed study investigating kinetic preference of carbon monoxide and water fission was performed. The results show that computational methods are a valuable tool to assess differences

in fragmentation behaviour of anthocyanin derivatives including isomeric dyes. The final part of the thesis deals with preparation and analysis of a fruit (strawberry) wine. Anthocyanins and their derivatives were detected in prepared wine using UHPLC/MS and change of content of selected anthocyanins during the fermentation process was studied. Apart from other derivatives, studied dyes (i. e. 5-methylpyranopelargonidin a 4-methylfuranopelargonidin) were detected in strawberry wine which is the first mention of their detection in a food product.

Obsah

1. Úvod	1
2. Teoretická část	3
2.1. Anthokyaniny a jejich deriváty.....	3
2.1.1. Anthokyaniny.....	3
2.1.2. Deriváty anthokyanidinů.....	4
2.1.3. Methylpyranoanthokyaniny.....	6
2.1.4. Deriváty pelargonidinu.....	9
2.2. Kapalinová chromatografie v analýze anthokyaninů.....	10
2.3. Tandemová MS v analýze anthokyaninů.....	13
2.4. Využití výpočetní chemie pro studium fragmentace anthokyaninových barviv.....	16
2.4.1. Kvantová chemie a DFT metody.....	16
2.4.2. Využití kvantové chemie pro studium fragmentací v tandemové MS.....	18
2.5. Využití kvantové chemie v analýze anthokyaninů.....	21
3. Cíle disertační práce	24
4. Experimentální část	25
4.1. Chemikálie.....	25
4.2. Příprava vzorků.....	25
4.2.1. Příprava modelových směsí pro syntézu 5-methylpyranopelargonidinu.....	25
4.2.2. Výroba jahodového vína.....	25
4.2.3. Příprava vzorků pro kontrolu jahodového vína.....	26
4.2.4. Příprava vzorků pro měření kalibrační křivky pelargonidinu.....	26
4.3. Použitá instrumentace.....	27
4.3.1. Kolony použité pro separace.....	27
4.3.2. Použité chromatografické systémy a hmotnostní spektrometry.....	27
4.4. Chromatografické metody.....	27
4.5. Podmínky studie vlivu kolizní energie (MS/MS).....	29

4.6. NMR analýza izolovaných pelargonidinových derivátů	30
4.7. Výpočty energetických hladin fragmentů 5-mePyPg a 4-meFuPg.....	31
5. Diskuze a výsledky	32
5.1. Syntéza 5-mePyPg a 4-meFuPg	32
5.2. Separace pelargonidinových derivátů pomocí semipreparativní HPLC v systému reverzních fází	34
5.3. Vývoj rychlých UHPLC metod pro separaci modelové směsi.....	36
5.4. Studium fragmentace 5-mePyPg a 4-meFuPg.....	40
5.5. Výpočty energetické náročnosti fragmentačních procesů pomocí kvantové chemie.....	47
5.5.1. <i>Optimalizace struktury 5-mePyPg a 4-meFuPg.....</i>	<i>47</i>
5.5.2. <i>Porovnání energetické náročnosti vzniku charakteristických fragmentů u 5-mePyPg a 4-meFuPg s využitím DFT výpočtů.....</i>	<i>50</i>
5.5.3. <i>Energetický rozbor vybraných fragmentačních cest pro iont 5-mePyPg</i>	<i>53</i>
5.6. Analýza anthokyaninů a jejich derivátů v jahodovém víně.....	57
6. Závěr	63
7. Seznam zkratk.....	65
8. Literatura	68
Přílohy	86

1. Úvod

Anthokyaniny jsou přírodní barviva s řadou důležitých protektivních a regulačních funkcí v rostlinné říši. Současně jsou oceňovány pro své pozitivní účinky na lidské zdraví. Vyskytují se hojně zejména v potravinách vyrobených z bobulovitých plodů. Tyto látky jsou z chemického hlediska nepříliš stabilní a zejména v roztoku podléhají rozkladu (rychlost rozkladu výrazně ovlivňuje pH, teplota, přítomnost kovů a další), ale i reakcím s řadou reaktivních organických molekul. Vzhledem k významu těchto látek je velké úsilí věnováno vývoji metod pro identifikaci a kvantifikaci anthokyaninů v reálných vzorcích. Pro tento účel je velmi vhodné spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Znalost fragmentačních procesů anthokyaninů probíhajících v kolizní cele hmotnostního spektrometru je důležitá nejen pro identifikaci již známých látek, ale také pro zjišťování struktury látek nově objevených. Součástí moderních přístupů k interpretaci analytických dat je využití výpočetní chemie, která v řadě případů umožňuje věrohodnou simulaci chemických dějů. V současnosti využívané výpočetní modely umí s poměrně vysokou přesností určit energie základních stavů nabitých i nenabitých molekul i tranzitních stavů odpovídajících přeměnám reaktantů v produkty. Kombinace experimentálních a teoretických dat poskytuje synergicky velmi cenné informace pro charakterizaci zkoumaných sloučenin.

Předkládaná disertační práce se věnuje syntéze dvou nových izomerních anthokyaninových derivátů (5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu), vývoji analytické a semipreparativní metody pro jejich izolaci a kontrolu jejich čistoty a detailnímu sledování jejich fragmentace v kolizní cele hmotnostního spektrometru. V práci jsou identifikovány charakteristické ionty ve fragmentačních spektrech a oba izomery jsou rozlišeny na základě intenzity signálu těchto fragmentových iontů v jejich MS/MS spektrech. Cílové struktury jsou paralelně studovány také s využitím výpočetní chemie s důrazem na optimalizaci základního stavu rodičovských iontů a klíčových fragmentů. Experimentálně získaná data jsou porovnávána s daty získanými teoretickými výpočetními metodami a spojením těchto dvou přístupů je možné rozlišit studovaná barviva na základě jejich MS/MS spektra. V případě 5-methylpyranopelargonidinu jsou probíhající procesy detailně prostudovány i z kinetického hlediska (energie tranzitních stavů) a jsou hledány preferované cesty pro experimentálně pozorované fragmentační procesy. Syntetizované látky byly spolu

s dalšími anthokyaninovými deriváty detekovány a kvantifikovány pomocí UHPLC/MS² v připraveném vzorku jahodového vína.

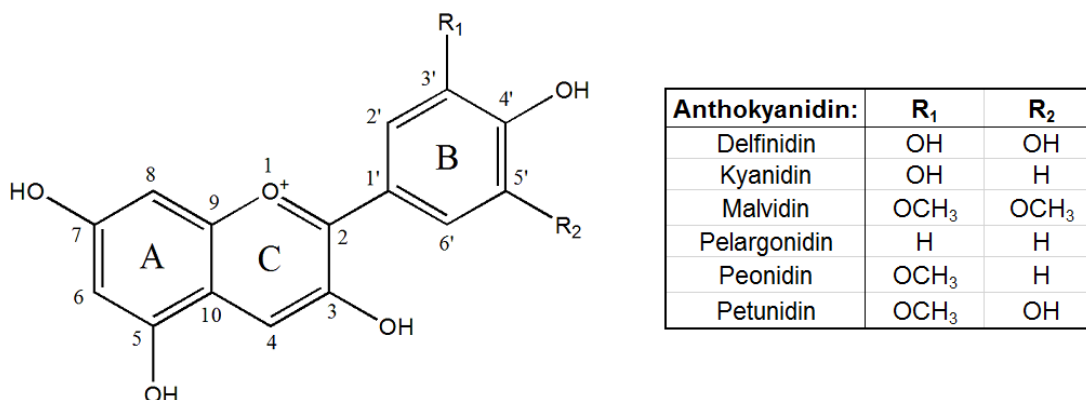
2. Teoretická část

2.1. Anthokyaniny a jejich deriváty

2.1.1. Anthokyaniny

Anthokyaniny jsou sekundárními metabolity rostlin. Jsou to charakteristicky červená až modrofialová barviva, patří mezi flavonoidy a v rostlinách vznikají tzv. šikimátovou dráhou [1]. Základními stavebními jednotkami anthokyaninů jsou jejich aglykony, běžně nazývané anthokyanidiny. Molekula anthokyanidinu se skládá ze tří aromatických jader pojmenovaných A, B a C podle pořadí, ve kterých jsou biosyntetizovány. V přírodě se nejčastěji vyskytuje šest základních anthokyanidinů [2] (obrázek 1), které se liší v substituci na B-kruhu.

Glykosylované anthokyanidiny jsou označovány jako anthokyaniny. V případě monoglykosylovaných anthokyaninů je nejčastěji glykosylován hydroxyl navázaný v poloze 3, v případě vícenásobně glykosylovaných anthokyaninů jsou následně glykosylovány hydroxyly A-kruhu, tj. polohy 5 a 7, méně pak hydroxyly B-kruhu [2] (obrázek 1). Cukerná jednotka může být dále modifikována acylací organickými kyselinami. Díky velké možnosti kombinací stavebních jednotek tvořících molekulu anthokyaninu je v současnosti známo více než 700 různých anthokyaninů [3]. Vzhledem k vysokému obsahu anthokyaninů v jedlých plodech řady rostlin je významné sledovat vliv těchto látek na člověka. Konzumace anthokyaninů je spojována s řadou pozitivních efektů na lidské zdraví. Farmakologické chování anthokyaninů a jejich vliv na lidské zdraví jsou shrnuty v přehledovém článku Smeriglia a kol. [4]. Práce se věnuje mimo jiné i účinkům těchto látek na živočišné buňky (*in vitro*) i na celý organismus (*in vivo*) a eviduje přes 60 dokončených či právě probíhajících klinických zkoušek zahrnujících anthokyaniny.



Obrázek 1. Struktura anthokyanidinů.

Stabilita anthokyaninů není vysoká. Podléhají chemickým změnám vlivem zvýšení teploty, kyslíku a působením záření. V roztoku ovlivňuje výrazně jejich stabilitu také pH, přítomnost kationtů kovů, jiných flavonoidů a dalších reaktivních látek [5,6]. Podle podmínek může docházet k jejich rozkladu, kdy typickými produkty jsou floroglucinaldehyd a hydroxybenzoové kyseliny [7] nebo naopak k jejich kondenzaci se vhodnými činidly. V případě kovových iontů může docházet ke vzniku chelátů [8]. V případě reakce s organickou molekulou dochází buďto k nekovalentní interakci, označované jako kopigmentace [9], kdy se uplatňují především π - π interakce nebo přímo k chemické reakci.

2.1.2. Deriváty anthokyanidinů

Jak již bylo zmíněno, velkou skupinou derivátů anthokyanidinů jsou jejich glykosidy [2]. V literatuře se objevuje řada poznatků o vlivu glykosylace na biologickou aktivitu anthokyaninů [10]. Cukerné jednotky pak mohou být dále acylovány. Acylační reakce a vliv acylace na chemické vlastnosti anthokyaninů jsou popsány v přehledovém článku Zhao a kol [11], vliv acylace na biologické vlastnosti pak diskutován v článku Yoshimota a kol. [12]. Velké množství derivátů anthokyaninů vzniká reakcí anthokyanidinového skeletu s řadou organických sloučenin. Snadno dochází např. k reakcím, které vedou ke vzniku dalšího aromatického kruhu v kostře anthokyanidinu. Vzniklé produkty jsou potom označovány jako pyranoanthokyanidiny (obrázek 2) a jejich glykosidy jako pyranoanthokyaniny. První práce popisující sloučeniny tohoto druhu pochází z roku 1997 [13]. Sloučeninou popsanou v této práci je 5-karboxypyranomalvidin-3-O-glukosid nazvaný autory vitisin A. Vitisin A vzniká ve

odvozeným od pelargonidinu (dále označován jako Pg) a kyanidinu (Cy) [26], peonidinu (Pn) [27], petunidinu (Pt) [28] a delfinidinu (Dp) [29]. Významným poznatkem řady studií je, že pyranoanthokyaniny jsou obecně stabilnější než nativní anthokyaniny a lépe odolávají změnám pH roztoku, zvýšené teplotě i rozkladu působením oxidu siřičitého [30-32].

Informace o některých vlastnostech pyranoanthokyaninů se však v literatuře rozcházejí. Problematické je například porovnání jejich antioxidační aktivity s původními (nativními) anthokyaniny. Ve studii Azevedy a kol. bylo provedeno stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH (reakce s 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylem, podle kterého je metoda pojmenována). Byly zkoumány deriváty malvidinu a většina pyranoanthokyaninů vykazovala vyšší aktivitu než nativní anthokyanin, pouze v případě oxo- a methylpyranomalvidinu byla antioxidační aktivita srovnatelná s nativním anthokyaninem. Výsledkem citované studie tak je, že produkty cyklizačních přeměn malvidinu nesnižují jeho antioxidační aktivitu, ale v některých případech ji mohou dokonce zvýšit [33]. Tento závěr je však v rozporu s prací P. Marhola a kol. [34], kde je antioxidační aktivita 5-karboxypyranomalvidin-3-O-glukosidu, stanovovaná pomocí FRAP (z angl. „ferric reducing antioxidant potential“) a DPPH v obou případech nižší než pro odpovídající nativní anthokyanin (malvidin-3-O-glukosid). Ke stejnému závěru (tj. že nativní anthokyaniny mají vyšší antioxidační kapacitu než jejich odpovídající 5-karboxypyranoderiváty) dospěli také García-Alonso a kol. [35]. Ve studii Jordheim a kol. [28] se pak vztah antioxidační aktivity nativních anthokyaninů a odpovídajících 5-karboxypyrananthokyaninů liší v závislosti na substituci B-kruhu anthokyaninu (tzn. na druhu aglykonu).

Další deriváty anthokyaninů mohou vznikat přímo C-C vazbou mezi několika molekulami anthokyaninů, mezi anthokyaniny a jinými flavonoidy [36], případně pomocí můstku tvořeného malou organickou molekulou (např. acetaldehydem). První práce zaměřená na studium můstkových konjugátů se datuje již do roku 1976 [37]. Mezi flavonoidy, které nejčastěji takto reagují s anthokyaniny, patří flavanoly a proanthokyanidiny [38,39].

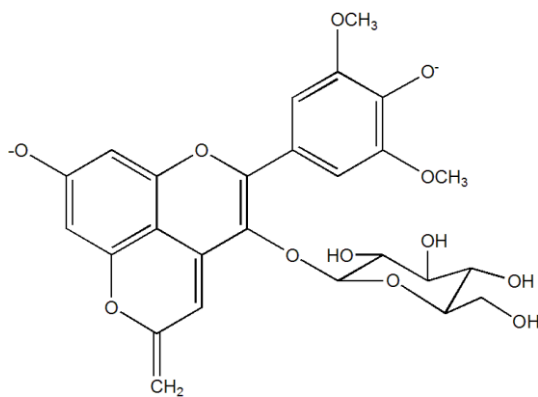
2.1.3. Methylpyranoanthokyaniny

Methylpyranoanthokyaniny jsou pyranoanthokyaniny s methylovým substituentem na D-kruhu. Vznikají reakcí anthokyaninů s acetonem [29], nebo s kyselinou acetoctovou

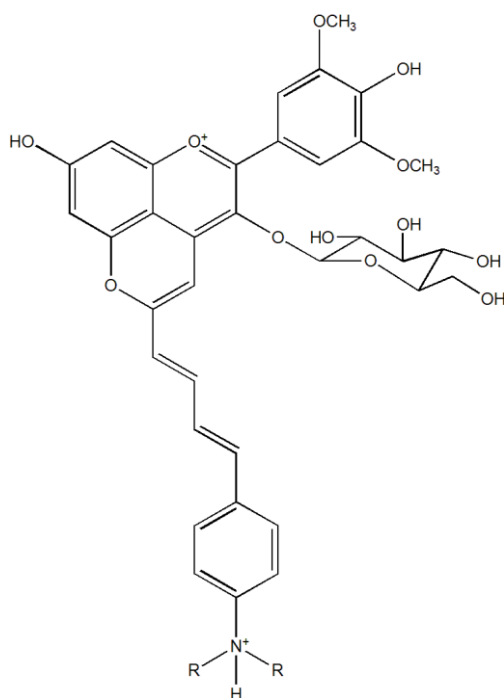
[40]. Reakce s acetonem je rychlá a kvantitativní – dochází k ní dokonce i při extrakci anthokyaninů acetonem z reálných vzorků [29,41]. Po zjištění, že nalezené sloučeniny jsou produktem reakce nativních anthokyaninů vzorku s rozpouštědlem, byl tento postup využit i pro cílenou přípravu 5-methylpyranomalvidin-3-O-glukosidu z příslušného nativního anthokyaninu. Struktura nově syntetizované látky byla potvrzena 2D NMR [42]. Na druhou stranu reakce anthokyaninů s kyselinou acetocetovou probíhá v modelových vzorcích s malými výtěžky např. oproti reakci s pyruvátém (kdy vznikají karboxypyrananthokyaniny). Je zajímavé, že methylpyrananthokyaniny byly nalezeny i ve vzorcích obohacených pouze pyruvátém, což naznačuje, že oba děje – vznik karboxy- a methylderivátů – by mohly do jisté míry souviset [23].

V literatuře byla popsána řada methylpyrananthokyaninů: methylpyranokyanidin-3-O-glukosid a methylpyranodelfinidin-3-O-glukosid [41], methylpyranokyanidin-3-O-sambubiosid [43], methylpyranodelfinidin-3-O-rhamnosid [29], methylpyranomalvidin-3-O-glukosid (5-mePyMvGlu) [40], methylpyranomalvidin-3-O-kumarylglukosid [40] a ester methylpyranomalvidinu-3-O-glukosidu a kyseliny kaftarové [44]. Tato disertační práce je věnována 5-methylpyranopelargonidinu (dále označovanému jako 5-mePyPg), který byl poprvé syntetizován na našem pracovišti a výsledky studia této sloučeniny publikovány ve třech studiích [45-47] a jeho izomernímu derivátu 4-methylfuranopelargonidinu (4-meFuPg).

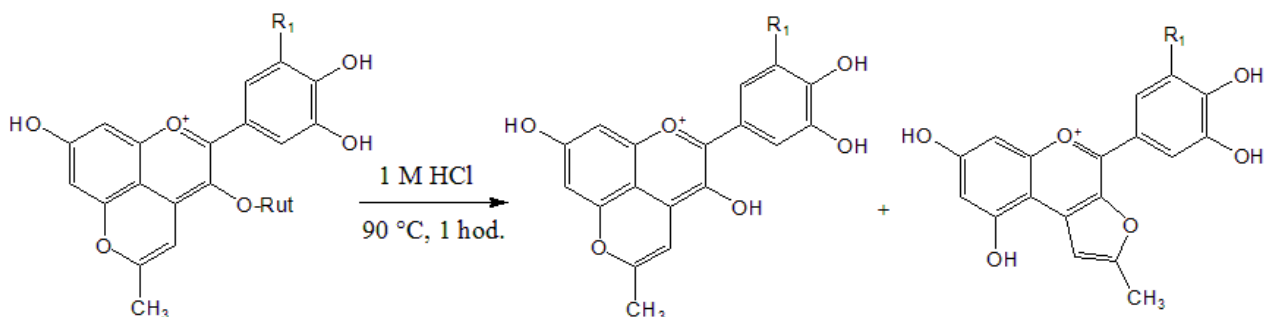
Methylpyrananthokyaniny mohou deprotonovat za vzniku methylenové skupiny na D-kruhu. K deprotonizaci dochází až při vysokém pH (>11,5) (obrázek 3) [48]. Přesto však mohou reagovat svou methylovou skupinou, a to pravděpodobně mechanismem přenosu náboje („charge-transfer“), např. za vzniku aduktu methylpyranomalvidin-3-O-glukosidu a sinapaldehydu [49]. Stejný proces byl využit také pro reakce methylpyranomalvidin-3-O-glukosidu s aminoderiváty aldehydu kyseliny skořicové (konkrétně dimethyl- a diethylaminoderiváty). Výsledné adukty mají v kyselém prostředí červenou barvu, kterou způsobuje jejich dikationická povaha (obrázek 4) [50]. Další reakcí popsanou pro methylpyrananthokyaniny je kysele katalyzovaná hydrolýza. Ta poskytuje příslušné aglykony a v menší míře rovněž sloučeniny identifikované pomocí NMR jako methylfurananthokyanidiny (obrázek 5) [51].



Obrázek 3. Struktura deprotonovaného pyranoanthokyaninu popisovaného v práci Oliveiry a kol. [48].



Obrázek 4. Dikationty vzniklé reakcí methylpyranomalvidinu-3-O-glukosidu s aminoderiváty aldehydu kyseliny skořicové. R = -CH₃ / -CH₂CH₃.



Obrázek 5. Kyselá katalyzovaná hydrolýza methylpyranoanthokyaninů spojená s přesmykem. R = -H / -OH, Rut = rutinosid.

Jak bylo zmíněno výše, pyranoanthokyaniny se přirozeně vyskytují v potravinách rostlinného původu a jejich vyšší stabilita v roztocích je tak potenciálně využitelná v potravinářském průmyslu. Přes jejich přirozený výskyt i potenciální využití jsou jejich vlastnosti oproti nativním anthokyaninům poměrně málo prostudovány. Existují pouze dvě práce zabývající se jejich toxicitou a biotransformací. Zhu a kol. zkoumali na myších toxicitu methylpyranomalvidin-3-O-glukosidu a jeho protektivní vliv proti poškození buněk peroxidem vodíku (jako modelu oxidativního stresu). Studie zjistila, že pro myši je tato sloučenina netoxická, zvyšuje odolnost MRC-5 buněk vůči poškození peroxidem vodíku a mohla by se tedy stát vhodným potravním aditivem [52]. Pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC/MS) byla spolu s dalšími látkami studována metabolizace 5-methylpyranopelargonidinu připraveného v laboratoři na našem pracovišti. Bylo zjištěno, že pyranoderivát je metabolizován ve větší míře než nativní anthokyanin. Hlavními metabolizačními procesy pro 5-methylpyranopelargonidin jsou hydroxylace, glukosidace a glukuronidace [47].

2.1.4. Deriváty pelargonidinu

Pelargonidin je nejjednodušším přírodním anthokyaninem – na B-kruhu obsahuje pouze hydroxylovou skupinu v poloze 4'. V literatuře je mu věnována poměrně menší pozornost než ostatním základním anthokyaninům – pravděpodobně proto, že v nejčastěji analyzovaném zdroji anthokyaninů (tj. v červených hroznech a produktech z nich) nebyl do roku 2003 nalezen [53] a vyskytuje se zde v řádově nižších koncentracích než ostatní aglykony [54]. Nejvýznamnějším přírodním zdrojem pelargonidinu jsou jahody [55], vyskytuje se ale také

např. v malinách [56], ředkvičkách [57], červených variantách brambor [58], červené a černé mrkvi [59,60], fazolích [61], granátovém jablku [62], ficích [63] a také ve květech některých rostlin [64,65].

Kromě existence různě glykosylovaných derivátů pelargonidinu [57,60,66,67], které však obsahují jeho základní skelet, byly identifikovány také sloučeniny, kde je pozměněn základní skelet pelargonidinu. Ve květech alstromérie byly objeveny 6-hydroxy- a 8-hydroxyderiváty pelargonidinu [68]. Ve květech barvínkovce růžového byly nalezeny deriváty methylovaného pelargonidinu: 7-O-methylpelargonidin-3-O-[6-O-(rhamnosyl)-galaktosid] a 7-O-methylpelargonidin-3-O-galaktosid [69]. Druhý z těchto derivátů byl později objeven také v exokarpu (vnější slupce) pepřovce brazilského [70]. V jahodách byly nalezeny dimerní sloučeniny pelargonidinu s katechinem, epikatechinem, afzelechinem a epiafzelechinem [71]. V jahodovém džusu uměle obohaceném o kyselinu ferulovou, sinapovou a o 4-vinylsyringol byly nalezeny pyranopelargonidiny, kde je substituentem na D-kruhu hydroxylovaný či methoxylovaný fenylový kruh [26]. V jahodách byl rovněž objeven analog vitisinu A – 5-karboxypyranopelargonidin-3-O-glukosid [72]. Jiným týmem byla tato látka později v jahodách analyzována pomocí HPLC s coulometrickou detekcí a pro ni a další látky byl proměřen hydrodynamický voltamogram (odezva coulometrického detektoru v závislosti na oxidačním potenciálu) [73]. V jiné práci byla pomocí coulometrické detekce zkoumána antioxidační aktivita této látky, výsledky byly srovnávány s redukční kapacitou hodnocenou pomocí FRAP testu. V obou testech 5-karboxypyranopelargonidin vykazoval nejslabší antioxidační aktivitu ze všech zkoumaných anthokyaninů i karboxypyrananthokyaninů [28].

2.2. Kapalinová chromatografie v analýze anthokyaninů

Kapalinová chromatografie (LC, z angl. „liquid chromatography“) je běžně používanou technikou pro separaci anthokyaninů a jejich derivátů. Nejčastěji používanými stacionárními fázemi jsou fáze obrácené (reverzní) využívající silikagel chemicky modifikovaný oktadecylovým řetězcem (C18) [40,63,66,74-78]. Byly však použity i pentafluorfenylové (PFP) [77], či fenyl-hexylové [79] fáze. Jako mobilní fáze se využívají voda (složka s nižší eluční silou), methanol a/nebo acetonitril (jako složky s vyšší eluční silou) a jejich směsi [74,75]. Tato rozpouštědla jsou okyselena vhodnou kyselinou (typicky kyselina mravenčí

[75], nebo trifluoroctová [66], dále také např. kyselina fosforečná [80,81]), příp. dále upravena puřrem (např. fosfátovým [76] nebo acetátovým [82] – v obou případech citovaných prací na pH 2,6). Okyselení mobilní fáze posouvá acidobazickou rovnováhu anthokyaninů a jejich derivátů výrazně ke kladně nabitě a stabilní flavyliové formě. Chromatografické vlastnosti zlepšuje zvýšení teploty chromatografické kolony (do 50 °C). Vyšší teplota vede ke zvýšení účinnosti pravděpodobně vlivem rychlejší interkonverze mezi flavyliovou a karbinolovou formou a snížením viskozity. Při časech analýzy kratších než 2 hodiny nebyl pozorován tepelný rozklad analytů [83]. V systému reverzních fází byly anthokyaniny z červeného vína separovány také pomocí iontově-párovací chromatografie, kdy byl jako ionpárovací činidlo použit hydrogensíran tetrabutylammonný; separace probíhala v gradientu rozpouštědel voda-methanol-acetonitril okyselených kyselinou fosforečnou. Eluční pořadí monoglukosidů anthokyanidinů zůstává za těchto podmínek nezměněno oproti klasickému systému reverzních fází a látky eluují v pořadí podle klesající polarity (tj. delfinidin, kyanidin, petunidin, peonidin, malvidin) [80].

Anthokyaniny lze separovat i v HILIC módu (z angl. „hydrophilic interaction liquid chromatography“) módu. Oproti reverzním fázím jde však o postup daleko méně obvyklý. V jednodimenzionálním uspořádání byly separovány anthokyaniny z přírodních zdrojů (borůvky, červené zelí, ředkvičky, slupky hroznového vína a černé fazole) na silikagelové, diolové, aminové, kyanopropylové a amidové stacionární fázi [84]. Pro separaci a kvantifikaci kyanidin-3-O-glukosidu, peonidin-3-O-glukosidu, delfinidin-3-O-glukosidu a malvidin-3-O-glukosidu ve víně byla využita zwitteriontová kolona ZIC-HILIC [85]. V nedávné době vyšly také dvě publikace zabývající se dvoudimenzionální LC separací anthokyaninů – v obou případech jde o kombinaci systému reverzních fází a systému HILIC. V jednom případě bylo spojení obou systémů využito pro preparativní izolaci nového anthokyaninu z kustovnice ruthénské [86], v druhém případě byl analyzován anthokyaninový profil zralých vín [87]. V literatuře nebyly nalezeny žádné práce zabývající se separacemi pyranoanthokyaninů v módu HILIC. Anthokyaniny ani jejich deriváty nebyly podle dostupných informací separovány v systému normálních fází. Existuje však zajímavá studie využívající pro separaci anthokyaninů (včetně pyranoanthokyaninů) v červeném víně kolonu se směsným módem dělení (tzv. „mixed-mode column“), v tomto případě konkrétně kolonu Primesep B2 kombinující reverzní fázi a aniontovou výměnu. Kolona je v citované práci srovnávána

s konvenční kolonou typu C18. Poskytuje odlišnou selektivitu, avšak rozlišení i celkový čas analýzy je v případě jejího použití horší, resp. delší. Podle autorů je hlavní výhodou odlišnost její selektivity, která může být uplatněna např. ve dvoudimenzionální kapalinové chromatografii [81].

Kromě konvenční vysokoúčinné kapalinové chromatografie se k analýze anthokyaninů a jejich derivátů využívá i ultraúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) [47,88,89] a kapilární kapalinová chromatografie („nano-liquid chromatography“) [90,91]. S výběrem rozměrů separačního systému často souvisí i volba mezi izokratickou a gradientovou elucí. Izokratická eluce se tak používá typicky v kapilárním uspořádání [90], kde je instrumentálně obtížnější dosáhnout reprodukovatelného gradientu, dále při vývoji metod pro starší přístroje, které nepodporují gradientovou eluci, a také v (semi)preparativním uspořádání [34,92]. Její výhodou je, že odpadá časová prodleva spojená s ekvilibrací kolony po analýze [93]. Gradientová eluce se používá v případech, kdy je analyzována složitá směs látek s výrazně různou retencí analytů (zapříčiněnou zejména jejich rozdílnou polaritou). Jde typicky o analýzy rostlinné extraktů a potravin. [62,66,64].

Detekce anthokyaninů v LC se většinou realizuje pomocí UV/VIS nebo (tandemové) MS. Při detekci pomocí UV/VIS se využívá absorpce anthokyaninů ve viditelné oblasti. Pro sledování obsahu anthokyaninů je typická detekce při 520 nm [66,94,95,96]. V závislosti na struktuře sledovaných anthokyaninů a jejich derivátů však byly v různých studiích použity vlnové délky v rozpětí od 510 nm [78] až do 535 nm [97]. Spojení kapalinové chromatografie s MS detekcí je realizováno v naprosté většině případů pomocí iontových zdrojů pracujících za atmosférického tlaku (API, z angl. „atmospheric pressure ionization“), tj. chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI, z angl. „atmospheric pressure chemical ionization“) a spektry z ionizace elektrosprejem (ESI, z angl. „electrospray ionization“) [98]. V této kapitole jsou zmíněny techniky jednoduché MS detekce, tandemová hmotnostní spektrometrie pak bude probrána zvlášť v kapitole 2.3. Při jednoduché MS detekci se využívá nejčastěji skenu přes větší rozsah hodnot m/z s následným výběrem požadované hmoty a rekonstrukcí iontového proudu extrahovaného pro danou hodnotu m/z (XIC, z angl. „extracted ion current“). Takto byly kvantifikovány např. anthokyaniny ve slupkách hroznového vína odrůdy Cardinal [99]. Další možností je sledování pouze iontů o konkrétní hodnotě m/z (tzv. SIM – z angl. „single ion monitoring“, popř. označované také jako SIR – „single ion recording“

[100]). Výhodou použití SIM módu je zvýšená citlivost detektoru [101] – přístroj detekuje pouze vybrané ionty, ne celé spektrum. Nevýhodou tohoto přístupu je, že jsou detekovány pouze předem známé látky a další případné složky nejsou analýzou odhaleny. Při analýze anthokyaninů byl tento mód použit pro stanovení úbytku anthokyaninů vlivem zvýšené teploty ve vinných hroznech odrůdy Cabernet Sauvignon [102].

Ke kvantifikaci identifikovaných látek pak existuje několik přístupů. Zřejmě nejpřesnějším je kvantifikace na základě setu vnějších standardů, kdy se pro každou kvantifikovanou látku konstruuje kalibrační křivka s použitím příslušného standardu. Tento přístup byl zvolen např. při kvantifikaci anthokyaninů v plodech muchovníku [94] a kapustoně brazilské [95]. Časté je rovněž použití jediného standardu a přepočtení koncentrací všech kvantifikovaných látek na tento standard. Zřejmě vzhledem k faktu, že je chrysanthemin (kvanidin-3-O-glukosid) je nejrozšířenějším anthokyaninem v přírodě [51], je také nejčastěji používaným standardem. Tento anthokyanin byl použit pro kvantifikaci anthokyaninů v barevných odrůdách rýže [103] a plodech amazonských hroznů (*Pourouma cecropiifolia*) [104]. Jelikož velmi často analyzovaným materiálem je také červené víno a hrozny, je dalším často používaným standardem oenin (malvidin-3-O-glukosid) [96,105]. Existují i studie využívající takto pelargonidin-3-O-glukosid [106,107]. Jakýmsi mezistupněm mezi oběma výše uvedenými přístupy je použití sady látek jako zástupců jednotlivých analyzovaných skupin. Takto byly např. ve studii 283 vzorků vína vybrány malvidin-3-O-glukosid jako standard pro anthokyaniny a flavanol-anthokyaninové konjugáty. Pro karboxypyrananthokyaniny a nesubstituované pyrananthokyaniny byly použity vitisin A, resp. vitisin B. Pinotin A byl standardem pro 5-hydroxyfenyl-pyrananthokyaniny a konečně 5-(*p*-hydroxyphenyl)-pyranomalvidin-3-O-glukosid byl využit jako standard pro stanovení 5-hydroxyfenyl-pyrananthokyaninů a 5-flavanol-pyrananthokyaninů [108].

2.3. Tandemová MS v analýze anthokyaninů

Hmotnostní spektrometrie je významnou analytickou technikou pomáhající při identifikaci neznámých látek a umožňující rovněž kvantifikaci. Pro analýzu anthokyaninů je nejčastěji využívána v kombinaci se separačními technikami (převážně kapalinovou chromatografií), kde se uplatňují API techniky. Existují i její aplikace bez předchozí separace

využívající ESI [109-111], příp. MALDI (matricí asistovaná laserová desorpce-ionizace) [44,46,112-115]. V oblasti zobrazovací („imaging“) hmotnostní spektrometrie byla využita rovněž MALDI, kde byl prokázán zvýšený výskyt anthokyaninů ve slupce vinných hroznů [116] a desorpční nanoelektrosprej pro rychlé profilování anthokyaninů ve vzorcích vín [117]. Metodologicky je pak desorpční elektrosprej v zobrazovacím („imaging“) módu testován při analýze anthokyaninů v otiscích jahod na TLC desce. Citovaná práce se zabývá vlivem teploty a extrakce analytu rozpouštědlem na odezvu signálu [118].

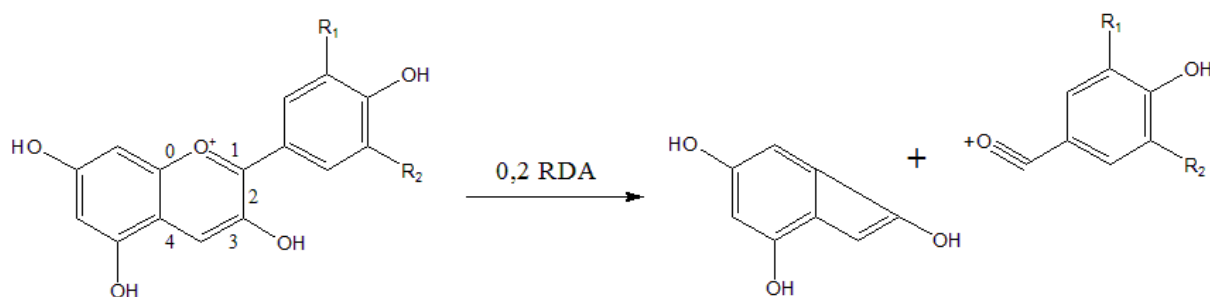
Měkké ionizační techniky poskytují obvykle vysoký výtěžek rodičovských iontů a pro studium jejich fragmentace je nezbytné jim v průběhu MS experimentu (obvykle po jejich izolaci v analyzátoru) dodat dostatečnou energii. Výsledkem jsou tandemová spektra. Je známo, že oproti spektrům produkovaným s využitím „tvrdé“ elektronové ionizace (poskytující fragmenty přímo) jsou fragmentační spektra získaná kombinací měkké ionizace a následné fragmentace v tandemovém experimentu daleko méně reprodukovatelná. Fragmentační spektra stejných sloučenin se mohou výrazně lišit v závislosti na zvolené ionizační technice, typu a konstrukci kolizní cely, kolizní energii, tlaku kolizního plynu atd. Pro sjednocení záznamů tandemových MS spekter byl autory Hopleyem a kol. navržen systematický přístup spočívající v kalibraci fragmentačních podmínek. V práci navržené schéma vychází z nastavení přístroje tak, aby MS/MS spektrum reserpinu (m/z 609) obsahovalo jeho fragment o m/z 397 s 80 % intenzitou vůči rodičovskému iontu. Autoři za těchto podmínek naměřili fragmentační spektra 48 sloučenin na 11 hmotnostních spektrometrech různých druhů a podařilo se jim dosáhnout více než 70 % shody spekter ve 27 % případů (pro hodnocení shody použili autoři parametr označený v práci jako „fit score“), přičemž toto číslo se ještě dále zvyšovalo, pokud byly srovnávány pouze analyzátoři stejného druhu, nebo přístroje stejného výrobce [119].

Užitečnou informací při výběru vhodných podmínek pro fragmentaci iontu je optimální kolizní energie požadovaných fragmentů, tedy energie, při které má fragmentový iont nejvyšší relativní intenzitu. Vzhledem k tomu, že pro vznik různých fragmentů z daného rodičovského iontu je třeba dodat různé kolizní energie, je získání charakteristického fragmentačního spektra většinou výsledkem kompromisu. Nejjednodušším a logickým způsobem optimalizace výtěžku charakteristických fragmentů je proměření MS/MS spekter při různých kolizních energiích a jejich srovnání. Tento přístup bylo použito např. při sledování CID

fragmentací oligosacharidů [120], buprenorfinu [121], či vybraných seskviterpenových laktonů [122]. Anthokyaniny ani jejich deriváty prozatím tímto způsobem charakterizovány nebyly s výjimkou publikace vzniklé na našem pracovišti [46].

Nejběžnějším procesem při fragmentaci glykosylovaných anthokyaninů je ztráta (dehydratované) cukerné jednotky. Typicky je pozorována ztráta monoglykosidů (ztráta 162 Da), diglykosidů (324 Da), v případě acylace na cukru také acetylglykosidů (208 Da), malonylglykosidů (248 Da) a kafeoylglukosidů (324 Da) [89]. Méně obvyklými ztrátami jsou například glukuronidy (176 Da) [62]. Ztráty glykosidických jednotek byly pozorovány i v MS/MS vybraných pyranoanthokyaninů [32,123].

Fragmentace samotného anthokyanidinu pak sleduje tři dráhy: první z nich je retro-Diels-Alderovské štěpení (RDA). Při tom se rozpadá C-kruh anthokyaninu za vzniku dvou fragmentů, z nichž jeden obsahuje zachovaný A-kruh a druhý zachovaný B-kruh. U nativních anthokyanidinů bylo s vysokým výtěžkem pozorováno 0,2 a 0,3 RDA štěpení (označení vychází z polohy vazeb, které při štěpení zanikají, viz obrázek 6) [89,111]. Tato štěpení umožňují určit substituci na B-kruhu a tím druh původního nativního anthokyaninu. Na obrázku 6 je pro ilustraci uvedeno štěpení 0,2.



Obrázek 6. Číslování vazeb v anthokyanidinu pro účely nomenklatury RDA štěpení a příklad 0,2 RDA štěpení bez přenosu náboje.

Druhou možností fragmentace aglykonu je ztráta celého B-kruhu přímým štěpením vazby mezi kruhy B a C [89]. V citované práci studující fragmentaci aglykonů delfinidinu, kyanidinu, petunidinu, peonidinu a malvidinu však iont odpovídající ztrátě B-kruhu poskytovaly pouze delfinidin a malvidin, nejedná se tedy zřejmě o častý mechanismus.

Dalším mechanismem fragmentace je postupná ztráta malých molekul z aglykonu. Těmi

jsou nejčastěji molekuly vody a oxidu uhelnatého [124], v případě methoxylovaných anthokyanidinů (peonidin, petunidin, malvidin) ale rovněž methyl či přímo methan [89]. Přestože tyto ztráty jsou samy o sobě nespecifické a není možné na jejich základě identifikovat původní anthokyanidin, počet a poměry signálů, které jsou s těmito procesy spojeny, jsou pro jednotlivé anthokyanidiny typické. Tohoto jevu využili Hayasaka a Asenstorfer. Tito autoři ve své práci sestavili tabulku ztrát malých molekul, podle které je možné z fragmentačního spektra usuzovat na povahu nativního anthokyanidinu [125]. Ve stejné práci byla znalost těchto typických ztrát využita pro návrh struktur detekovaných anthokyaninových derivátů (vitisinových a pinotinových derivátů). Ztráta malých molekul může být kombinována s výše zmíněnými mechanismy, např. při vzniku iontu [$^{0,2}\text{B-CO}$]⁺ z delphinidinu [89].

2.4. Využití výpočetní chemie pro studium fragmentace anthokyaninových barviv

Tato disertační práce využívá pro studium jevů probíhajících ve hmotnostním spektrometru nástroje kvantové chemie. Její princip, používané postupy, možnosti a omezení jsou tedy krátce diskutovány v následujících kapitolách. Detailní popis této metody přesahuje rámec tématu disertační práce a zvláště je zejména její praktické uplatnění ve hmotnostní spektrometrii.

2.4.1. Kvantová chemie a DFT metody

Kvantová chemie je cenným nástrojem při určování mnoha charakteristik zkoumaných látek – např. jejich optimální geometrie, ionizační energie, protonové afinity, disociační konstanty, UV/VIS, IČ, NMR, či CD spekter. Teoreticky vychází ze Schrödingerovy rovnice (obrázek 7), která popisuje časový a prostorový vývoj vlnové funkce systému. Vlnovou funkcí pak rozumíme soubor veškerých informací o kvantovém systému, v tomto kontextu pak zejména pravděpodobnosti výskytu částic v prostoru a čase. Na tento základní princip je

navázána řada níže zmíněných aproximací a postupů, které umožňují její řešení (s omezenou přesností). Metody pracující s vlnovou funkcí se obecně mohou dělit na tzv. *ab initio* metody (vycházejí pouze z fyzikálních předpokladů) a (semi)empirické metody, které ve výpočtech využívají empiricky získané parametry.

$$\hat{H}\psi(\mathbf{r}) = E\psi(\mathbf{r})$$

Obrázek 7. Stacionární tvar Schrödingerovy rovnice.

Pro zjištění energie systému je významný tzv. variační princip. Toto pravidlo říká, že všechny vlnové funkce systému poskytují právě energii základního stavu, nebo energii vyšší a cílem je tedy prozkoumat prostor vlnových funkcí a najít tu, pro kterou je energie nejnižší. Silové pole molekuly se obecně skládá z polí jader atomů a elektronů. S ohledem na poměr jejich hmotností se jádra v praxi považují za statická vzhledem k pohybujícím se elektronům, takže je možné řešit pohyby elektronů a jader odděleně. Toto zjednodušení se označuje jako Born-Oppenheimerova (BO) aproximace. Při výpočtu vlnové funkce je i při využití BO aproximace nutné vypočítat n -elektronovou vlnovou funkci pro částici s n elektrony. Je však možné sestavit matici n pozic jednotlivých elektronů, tzn. 1-elektronových vlnových funkcí (molekulových orbitalů). Determinant takovéto matice označujeme jako Slaterův determinant. Ten je vlnovou funkcí popisovaného systému.

Důležitou aproximací v kvantové chemii je Hartree-Fockova (HF) aproximace. Ta využívá zjednodušení, že elektron není v interakci se všemi ostatními elektrony zároveň, ale interaguje pouze s jednou entitou – průměrným silovým polem všech ostatních elektronů. Řešení Hartreeho rovnice, která je úpravou výše zmíněné Schrödingerovy rovnice, pomocí HF aproximace vyžaduje iterativní postup. Zjednodušeně řečeno je vylepšená geometrie orbitalů vypočtena na základě sebe samých. Jednotlivými výpočetními kroky se řešení stále zpřesňuje. Jakmile je velikost změny mezi dvěma kroky menší než předem daná mez, je výsledek považován za konečný. Tato metoda se také označuje jako model nezávislých částic (SCF, z angl. „self-consistent field“). Výsledky z HF výpočtů nejsou přesným řešením Schrödingerovy rovnice a jejich řešením je tzv. HF limita. Rozdíl mezi HF limitou a správnou hodnotou energie představuje tzv. korelační energie – energie vzájemné repulze elektronů,

kteřá v HF přístupu není uvažována.

Korelační energii je možné spočítat např. pomocí Møller-Plessetovy poruchové teorie (MPx metody), kde korelační energii dopočítáváme jako tzv. „poruchu“ (malý příspěvek) k celkové energii systému. Tento „porušený“ systém skládající se z „neporušeného“ (HF) hamiltoniánu a hamiltoniánu představujícího „poruchu“ je početně možno řešit. Další metody zahrnují konfigurační interakci (CI), kde je jeden Slaterův determinant nahrazen kompletní sadou zahrnující i excitované stavy, nebo metodou vázaných klastrů (CC, z angl. „coupled clusters“).

S korelační energií pracují i metody na bázi teorie funkcionálu hustoty (DFT, z angl. „density functional theory“). Na rozdíl od výše zmíněných *ab initio* metod nepracují tyto metody s vlnovou funkcí (čili polohou jednotlivých elektronů), ale pouze s elektronovou hustotou v okolí zkoumané molekuly. Elektronová hustota v tomto přístupu znamená pravděpodobnost, že se v daném prostoru bude vyskytovat některý z elektronů systému. Pomocí elektronové hustoty můžeme sestavit hamiltonián systému a tím řešit Schrödingerovu rovnici. Teoretickým podkladem pro použití DFT jsou Hohenberg-Kohnovy teoremy spojující tzv. externí potenciál (coulombickou interakci elektronů s jádry, tedy pozici jader v systému) s elektronovou hustotou a zavádějící varianční princip pro elektronovou hustotu (hledáme elektronovou hustotu s co nejnižší energií). Prakticky se DFT výpočty provádějí s využitím Kohn-Shamových rovnic. Jejich řešením získáme elektronovou hustotu, kterou dosadíme do funkcionálu energie. Používanými aproximacemi v DFT jsou aproximace lokální hustoty (LDA, z angl. „local density approximation“), popř. aproximace zobecněného gradientu hustoty (GGA, z angl. „general gradient approximation“), které aproximují výměnně-korelační potenciál elektronovou hustotou, příp. jejím gradientem, v konkrétních bodech v prostoru. [126].

2.4.2. Využití kvantové chemie pro studium fragmentací v tandemové MS

Výpočetní chemie je užitečným nástrojem pro objasňování fragmentačních procesů probíhajících ve hmotnostním spektrometru. Klíčovými parametry pro predikci vzhledu fragmentačního spektra může být celá řada fyzikálně-chemických charakteristik rodičovského iontu, ale i vznikajících fragmentových iontů. Následující kapitola shrnuje aktuální poznatky

v oblasti kombinace výpočetní chemie a experimentálních dat a podává přehled o parametrech zkoumaných iontů, které mají vliv na vzhled kolizního spektra.

Porovnáním experimentálních dat z infračervené multifotonové disociační spektroskopie (IRMPD – z angl. „infrared multiphoton dissociation spectroscopy“) a kolizí indukované disociace (CID – z angl. „collision-induced dissociation“) s DFT výpočty bylo objasněno fragmentační chování *p*-aminofenolu. U této jednoduché modelové molekuly byly vypočteny energie vzniku pozorovaných fragmentových iontů a na jejich základě byly tyto ionty klasifikovány jako termodynamicky či kineticky preferované. Experimentálně naměřená data pro IRMPD (termodynamicky preferovaná) a CID (kineticky preferovaná) pak potvrdila v MS/MS spektrech výskyt iontů odpovídající teoretické preferenci [127]. Dalším zajímavým využitím výpočetní chemie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro analýzu izomerů je práce Galezowské a kol. Tito autoři pozorovali dobrou shodu mezi experimentálně zjištěnými intenzitami fragmentů v MS/MS spektrech vybraných derivátů chinazolinu a Boltzmannovým rozdělením těchto fragmentů založeném na vypočtených enthalpiích jejich protonace [128]. Práce Crottiho a kol. se věnuje fragmentacím vybraných laktonů. V závislosti na struktuře laktonu (nasycený vs. nenasycený) dochází k různým preferencím ztrát (voda či amoniak jsou preferovány u nasycených laktonů a oxid uhelnatý v druhém případě). Experimentálně je pozorována tendence iontu fragmentovat tak, aby vznikal co nejstabilnější karbokationt. Výpočty energií fragmentových iontů tuto teorii potvrzují [129]. Výpočetní chemie také umožnila odlišit rozdílné funkční izomery metabolitů tyrosinu – na základě pozorovaných neutrálních ztrát a výpočtů energií vedoucích k těmto ztrátám je mezi metabolity možné odlišit hydroxy- a aminoderiváty od karboxylových kyselin [130].

Predikcí fragmentačního chování molekul na základě důsledků jejich protonace v iontovém zdroji se dlouhodobě zabývá skupina autorů vedená F. Pullenem. Tito autoři vycházejí z předpokladu, že nejvhodnějšími místy pro štěpení jsou vazby, které se po protonaci prodlouží. Takto byla predikována např. fragmentace dofetilidu a jeho derivátů – bylo zjištěno, že protonace analytu v iontovém zdroji je důležitým faktorem, jelikož způsobuje prodloužení některých vazeb v molekule, které jsou poté náchylnější ke štěpení [131]. Zkoumáním fragmentace sulfoxidů stejnými autory bylo zjištěno, že protonace na kyslíku u těchto sloučenin vede k vyššímu výskytu radikálových iontů ve fragmentačním spektru, díky čemuž je možné odlišit S-oxidy od N- a C-oxidů [132]. Tento tým zkoumal také

vliv prodloužení vazeb po protonaci v iontovém zdroji na fragmentaci léčiva maravirocu a dvou jeho metabolitů. Kromě potvrzení předpokladu autorů („prodloužení vazeb v důsledku protonace vede k jejich štěpení“) nabízí práce i další zajímavé poznatky. Je studován rozdíl mezi spektry získanými pomocí APCI a ESI. Autoři na základě teoretických výpočtů předpokládají odlišná místa protonizace analytů v roztoku (ESI) a v plynné fázi (APCI), přesto jsou u obou ionizačních technik v praxi pozorována shodná fragmentační spektra. Tuto shodu autoři vysvětlují pravděpodobnou migrací protonu ve vzniklém iontu. Ten je přesunut na tzv. disociační centrum a poté se uskuteční fragmentace [133]. Koncept rozlišování protonačního centra (rozhodnutí, kam je navázán proton při kontaktu s molekulou) a disociačního centra (rozhodnutí, kde je proton přítomen v momentu fragmentace) zavedl již dříve Tu, který předpokládá jako důležitý krok transfer protonu mezi těmito dvěma místy, aby k pozorované fragmentaci mohlo dojít [134]. V obecné rovině pak byly srovnávány fragmentace kationtů a aniontů v CID. Bylo zjištěno, že predikce fragmentace podle prodloužení délky vazby u aniontů neplatí, a to ani u sloučenin, kde při kladné ionizaci predikce funguje. Jako vysvětlení je v práci uvedeno a diskutováno pravidlo aktivace vazeb (BAR, z angl. „bond activation rule“), které říká, že protonace na elektronegativnějším atomu zvyšuje polaritu vazby a tím ji oslabuje. Při deprotonaci je pozorován opačný trend – vazebné elektrony jsou od deprotonovaného atomu odpuzovány, čímž polarita vazby klesá [135]. Tento tým také porovnával výsledky z výpočtů pomocí DFT a AM1 (semiempirická metoda) zaměřených na predikci fragmentace vazeb na základě jejich prodloužení. V práci je zmíněna kritická hodnota prodloužení vazby, při které dochází k jejímu rozpadu: 0,039 Å [136].

Sporný je přístup k hodnocení výpočtů pomocí tranzitních stavů přesunů vodíku. O energii tranzitních stavů zahrnujících transfer vodíku se opírají závěry několika prací. Kromě dříve zmíněné fragmentace *p*-aminofenolu [127] byla studována např. také fragmentace protonovaných enamionů [137], *S*-methylbenzenylmethylenhydrazin-dithiokarboxylátu [138] a fragmentace dvojné vazby C=C v protonovaném ketotifenu, kdy byla pozorována sekvence několika migračních procesů [139]. Porovnáním energií tranzitních stavů bylo zjištěno, že eliminace benzenu z protonovaného *N*-benzylindolinu je způsobena transferem benzylového kationtu, a ne transferem protonu [140]. U všech výše zmíněných prací byla MS analýza prováděna v kladném ionizačním módu. Z prací zabývajících se fragmentacemi v záporném módu ionizace je vhodné zmínit práci Lu a kol., kteří zkoumali

fragmentaci deprotonovaných N,2-difenylacetamidů. Autoři pozorovali vznik dvou iontů přímým štěpením a dvou iontů vznikajících důsledkem transferu protonu v rámci iontově-neutrálního komplexu. Energie jimi nalezených tranzitních stavů dobře popisují experimentálně pozorované chování fragmentovaných iontů [141]. Pro výpočet tranzitních stavů fragmentací alkylsulfidů byl týmem Schuhfrieda a kol. používán DFT funkcionál M06-2X navržený pro přesný výpočet energií tranzitních stavů [142]. Stejný funkcionál použili i Stolić a kol. pro výpočet tranzitních stavů fragmentace diamidových derivátů 3,4-ethylendioxythiofenu [143]. Použitá výpočetní metoda poskytla výsledky konzistentní s daty získanými experimentálně pomocí MS a odhalila průběh přeměn jednotlivých iontových forem mezi sebou. Na druhou stranu však byla v nedávné době publikována studie, která význam tohoto jevu (transferu protonu) jako limitujícího kroku snižuje. Podle této studie je energie transferu protonu nízká vzhledem k běžně používaným kolizním energiím (cca 5-50 eV) a proto je za běžných podmínek v CID proton plně mobilní a fragmentace je způsobena dalšími jevy po přesunu protonu na místo, kde způsobí prodloužení vazeb vedoucí k fragmentaci [144].

2.5. Využití kvantové chemie v analýze anthokyaninů

Anthokyaniny a jejich deriváty byly metodami výpočetní chemie (*in silico*) studovány z různých úhlů pohledu. Pomocí DFT metod ve spojení s modelem polarizovaného kontinua (PCM z angl. „polarized continuum model“) byla studována lokalizace pozitivního a negativního náboje na nabitých anthokyaninech [145]. PCM model je aproximací při výpočtech zahrnujících kromě analytu také rozpouštědlo. Rozpouštědlo je charakterizováno jako nerozlišené kontinuum se společnými vlastnostmi (v případě PCM je zásadním parametrem jeho relativní permitivita). Stejní autoři využili kombinaci DFT metod a PCM modelu také pro studium kationické, chinoidní a anionické formy pelargonidinu v plynné fázi a v roztoku. Byly nalezeny jejich optimalizované struktury a odpovídající ionizační potenciály [146]. Spojením NMR a teoretické chemie byly studovány konformery vybraných portisinů. Teoretické výpočty odhalily výskyt více stavů s různými hodnotami dihedrálního úhlu pro vazbu spojující pyranoanthokyanin a fenolickou část molekuly. Tyto výsledky se shodují s daty z NMR, která ukazují na to, že v systému existuje směs signálů

odpovídající interkonverzi jednotlivých konformerů [147]. Další z prací, kde byla výpočetní chemie použita v kombinaci s NMR, je porovnávací studie stínících konstant devíti anthokyaninů v pevném stavu. Experimentální data byla porovnána s výsledky z DFT výpočtů a spojením obou přístupů byly odhadnuty nejpravděpodobnější geometrie zkoumaných látek v pevném stavu. Jedním ze závěrů práce je, že uspořádanost (krystalinita) anthokyaninů v pevném stavu klesá se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin [148]. V práci Annouara a kol. byla na základě teoretických výpočtů predikována predikována UV/VIS spektra přírodních polyfenolů včetně tří anthokyaninů. Studie se věnuje také výběru vhodné báze použité pro výpočet těchto spekter. Jako funkcionál je zvolen hybridní B3P86 a jako báze 6-311+G(d,p), která je vhodným kompromisem mezi přesností a výpočetním časem [149]. Dobrou schopnost predikce UV/VIS spekter vybraných studovaných pyranoanthokyaninů v plynné fázi i v roztoku prokázaly časově-závislé DFT (TDDFT z angl. „time-dependent DFT“) a ab initio metody. [150]. Nejvíce prací je však zaměřeno na studium antioxidační kapacity anthokyanidinů. Příklady mohou být např. DFT studie Guzmána a kol. [151] nebo Hartree-Fock (HF) a restricted open-shell Hartree-Fock (ROHF) studie, které publikovali Popová a kol. [152] a Sakata a kol. [153]. Antioxidační aktivita (aproximovaná jako funkce disociační energie O-H vazby) byla studována také pro vybrané pyranoanthokyanidiny [154]. Podrobná studie oxovitisinu podniknutá Alcarem a kol. zjišťovala jeho schopnost zhášet radikály („radical scavenging activity“) pomocí výpočtu metodou DFT/B3LYP. V práci byly vypočteny disociační energie O-H vazby (BDE, z angl. „bond dissociation energy“), ionizační energie (IE), protonová afinita (PA) a vazebná energie kov-oxovitisin pro kationty Fe^{2+} . Tyto parametry byly vypočteny pro plynnou fázi a roztoky oxovitisinu ve vodě a v benzenu. Z výpočtu vazebné energie komplexu Fe^{2+} -oxovitisin vyplývá, že oxovitisin je vhodným kandidátem na zachytávání iontu dvojmocného železa, čímž mu znemožňuje účastnit se Fentonovy reakce [155]. Stejně parametry – IE, BDE O-H vazby a disociační energie protonu (PDE, z angl. „proton dissociation energy“) OH vazby – byly v jiné práci stanoveny pro delfinidin [156]. Studie Lu a kol. popisuje různé mechanismy zodpovědné za antioxidační aktivitu vybraných anthokyaninů a identifikuje jednotlivé hydroxylové skupiny odpovědné za klíčové přesuny elektronů a atomů vodíku [157]. Zajímavou prací popisující využití výpočetní chemie pro fragmentaci anthokyaninů v MS/MS experimentu je studie Barnese a Schuga. Autoři v této práci využili pro výpočet energií fragmentů pelargonidin-3,5-O-diglukosidu a kyanidin-3,5-O-diglukosidu vzniklých RDA štěpením v MS/MS metodu DFT (B3LYP/6-

31G) [158]. Vedle toho byla publikována studie naší výzkumné skupiny zabývající se studiem fragmentace 5-methylpyranopelargonidinu s využitím kombinace tandemové hmotnostní spektrometrie na přístroji s vysokým rozlišením a výpočetní chemie, konkrétně DFT metod (hybridního B3LYP funkcionalu a báze 6-31G*) [46].

3. Cíle disertační práce

Cíle této disertační práce lze shrnout do následujících bodů:

- nalezení vhodné metody pro přípravu a chromatografickou purifikaci 5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu,
- detailní prostudování MS/MS spekter obou látek s pomocí vysokorozlišujícího tandemového hmotnostního spektrometru,
- zhodnocení energetické náročnosti vzniku charakteristických fragmentů a posouzení jejího vlivu na výtěžek charakteristických fragmentů v MS/MS spektrech obou studovaných barviv,
- vývoj UHPLC/MS² metody pro rychlou analýzu pyrano a furanoanthokyaninů v ovocných vínech

Nejvýznamnější výsledky uvedené v této práci byly publikovány ve dvou impaktovaných publikacích [45,46] a rukopis další práce je v recenzním řízení (viz Příloha 4).

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie

Na přípravu modelových roztoků, mobilních fází a kalibračních roztoků byl použit pelargonidin chlorid (Sigma-Aldrich, USA), voda (HPLC grade, Lab-Scan, Poland), methanol (HPLC grade, VWR International, USA), acetonitril (HPLC grade, VWR International, USA), aceton (HPLC grade, Sigma-Aldrich, USA), kyselina chlorovodíková (p.a., Lach-Ner, Česká Republika), kyselina mravenčí (gradient grade, Sigma-Aldrich, USA), leucin-enkefalin (HPLC, Sigma-Aldrich, USA) a hydroxid sodný (p.a., Penta, Česká Republika). Na přípravu vzorku jahodového vína byly použity mražené zahradní jahody, řepný cukr, potravinářská kyselina citronová, pekařské droždí (vše zakoupeno v místním supermarketu) a destilovaná voda.

4.2. Příprava vzorků

4.2.1. Příprava modelových směsí pro syntézu 5-methylpyranopelargonidinu

5-methylpyranopelargonidin a 4-methylfuranopelargonidin byly připraveny semisyntézou s využitím reakce pelargonidinu a acetonem v kyselém prostředí a v přítomnosti methanolu – byla použita směs 3 mg pelargonidin chloridu, 2,5 ml methanolu, 2,5 ml acetonu a 20 μ l koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Reakce probíhala v temnu a za laboratorní teploty. Pro sledování změn v koncentracích sledovaných anthokyaninových derivátů v čase bylo z této směsi v jednom případě v pravidelných intervalech odebíráno po 10 μ l směsi, jejíž složení bylo kontrolováno UHPLC/MS (použitá metoda je popsána dále).

4.2.2. Výroba jahodového vína

167 g řepného cukru a 5 g kyseliny citronové bylo za horka rozpuštěno v 0,3 l horké převařené destilované vody a následně zchlazeno na laboratorní teplotu. Mražené jahody byly

rozmrazeny (stáním při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny) a poté homogenizovány tyčovým mixérem. 450 g homogenizátu bylo přidáno k cukernému roztoku a promícháno. Vzniklá směs byla zředěna destilovanou vodou na objem 0,8 l. Ke směsi bylo přidáno 5 g pekařského droždí a výsledný kvas byl uzavřen v lahvi o objemu 1 litru pomocí kvasné zátky. Takto byly připraveny tři nádoby s kvasem. Po uplynutí 35 dní (kdy směs přestala produkovat oxid uhličitý) bylo kvašení zastaveno filtrací směsi přes gázu.

4.2.3. Příprava vzorků pro kontrolu jahodového vína

Během kvašení byly přes vzduchotěsné septum pomocí dlouhé jehly odebírány vzorky kapalného podílu reakční směsi. Ty byly dále zpracovány pomocí extrakce tuhou fází (SPE). Extrakce probíhala na kolonkách Strata SDB-L (200 mg / 3 mL). Ty byly nejprve kondicionovány 2 ml 0,1 % HCl v methanolu (v/v) a promyty 3 ml 0,1 % HCl ve vodě (v/v). 1,5 ml odebrané směsi bylo centrifugováno po dobu 5 minut rychlostí 14000 otáček za minut. Po centrifugaci byl odebrán 1 ml supernatantu a nanesen na SPE kolonku. Vzorek byl promyt 3 ml 0,1 % HCl ve vodě (v/v). Anthokyaninová barviva byla eluována 2 ml 0,1 % HCl v methanolu (v/v) a odpařena do sucha v proudu dusíku. Poté byly vzorky uschovány do mrazničky, kde byly skladovány při -18 °C do doby analýzy.

4.2.4. Příprava vzorků pro měření kalibrační křivky pelargonidinu

Byl připraven zásobní roztok pelargonidin-chloridu o koncentraci 1 mg/ml ve směsi vody a acetonitrilu v poměru 9:1 (v/v) s přidavkem kyseliny mravenčí (5 %, v/v). Ze zásobního roztoku byla postupným ředěním touto směsí připravena série roztoků o koncentracích 1; 5; 10; 50; 100; 500; 1000; 2500; 5000 a 10000 µg/l.

4.3. Použitá instrumentace

4.3.1. Kolony použité pro separace

Na vývoj analytické metody pro semipreparativní izolaci 5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu byla použita semipreparativní kolona Gemini C18 (Phenomenex, Torrance, USA) o rozměrech 150 × 10 mm a průměru částic 5 μm. UHPLC analýzy probíhaly na kolonách Acquity BEH C18, dp = 1,7 μm (Waters, Milford, USA) s rozměry 100 × 2,1 mm a 50 × 2,1 mm.

4.3.2. Použité chromatografické systémy a hmotnostní spektrometry

Semipreparativní separace 5-mePyPg a 4-meFuPg z modelové směsi byla provedena s využitím modulárního kapalinového chromatografu Smartline (Knauer, Berlín, Německo) skládajícího se z následujících částí: Smartline Pump 1000, Smartline Manager 5000 a Smartline UV/VIS Detector 2600. Analýzy kontroly čistoty izolovaných pelargonidinových derivátů a vývoj rychlých UHPLC metod probíhal na ultraúčinném kapalinovém chromatografu ACQUITY UPLC H-Class vybaveném eλ PDA detektorem a spojeném online s tandemovým hmotnostním spektrometrem Q-TOF Premier (vybaveném elektrosprejem a hybridním analyzátozem typu kvadrupól-kolizní cela-detektor doby letu), výrobce Waters, Milford, USA. Analýzy anthokyaninového profilu v jahodovém víně byly měřeny na kapalinovém chromatografu ACQUITY UPLC I-Class vybaveném eλ PDA detektorem a spojeném online s tandemovým hmotnostním spektrometrem Synapt G2S vybaveným elektrosprejem a hybridním analyzátozem obsahujícím kvadrupól, 1. kolizní celu (Trap), celu pro iontově mobilní separaci, 2. kolizní celu (Transfer) a detektor doby letu (Waters).

4.4. Chromatografické metody

Izolace studovaných pelargonidinových derivátů byly provedena s využitím semipreparativní chromatografie. Odparek modelové směsi byl rozpuštěn v 6 ml 5 % (v/v) vodném roztoku kyseliny mravenčí. Z takto připraveného vzorku byl opakovaně dávkován 1 ml (přeplněním smyčky). Separace probíhala na výše zmíněné koloně Gemini C18. Byla

použita izokratická eluce, jako mobilní fáze byl použit 5 % roztok kyseliny mravenčí ve směsi voda/acetonitril 5:1 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 5 ml/min, pro detekci byly zvoleny dvě vlnové délky: 280 nm a 490 nm. Záchyt obou barviv probíhal manuálně – byl změřen objem vývodní kapiláry za UV/VIS detektorem, z jejího objemu a průtoku mobilní fáze bylo spočítáno zpoždění mobilní fáze na výstupu z kapalinového chromatografu oproti záznamu v detektoru a sběr byl realizován výměnou vialek a odpadní lahve na základě pozorovaného signálu se započítáním zpoždění. Symetrie píku byly počítány automaticky v softwaru Clarity jako poměr levé a pravé pološířky píku v pěti procentech výšky.

Čistota izolovaných izomerů byla kontrolována pomocí UHPLC-PDA-MS s využitím gradientové eluce na koloně Acquity BEH C18 (100 × 2,1 mm). Jako mobilní fáze byly použity 5 % (v/v) kyselina mravenčí ve vodě (dále uváděná jako mobilní fáze A) a 5 % (v/v) kyselina mravenčí v acetonitrilu (dále uváděná jako mobilní fáze B). Vzorek byl rozpuštěn v mobilní fázi A na koncentraci 100 mg/l. Dávkováno bylo 5 µl tohoto roztoku. Byla použita gradientová eluce s následujícím profilem gradientu: 0-5 min: 65-10 % A; 5-9 min: 10 % A; 9-9,3 min: 10-65 % A; 9,3-12 min: 65 % A, a průtok mobilní fáze 0,25 ml/min. Detekce probíhala při vlnové délce 500 nm a pomocí MS (m/z 271,1 pro pelargonidin a 309,1 pro oba kondenzované deriváty). Byly použity tyto parametry pro MS detekci: napětí na kapiláře 2,5 kV, napětí na sampling cone 30 V, teplota iontového zdroje 120 °C, desolvační teplota 250 °C, čas skenu 0,2 s, interscan delay 0,02 s, kolizní energie pro MS skeny 5 eV. Pro měření správné a přesné hmoty byly signály korigovány pomocí lock-spray techniky. Pro lock-spray byl použit roztok leucin-enkefalinu (500 µg/l ve směsi mravenčí kyselina/voda/acetonitril 0,1/50/50, v/v/v; průtok 10 µl/min).

Pro rychlé analýzy bylo 10 µl roztoku modelové směsi obsahující pelargonidin, 5-mePyPg a 4-meFuPg odpařeno do sucha a následně rozpuštěno ve 100 µl mobilní fáze A. Vzorek byl analyzován na kolonách Acquity BEH C18 o rozměrech 50 × 2,1 a 100 × 2,1 mm. Nastříkováno bylo vždy 5 µl vzorku. V případě UHPLC/PDA uspořádání bylo složení mobilní fáze A:B 72:28 (v/v) pro kolonu o rozměrech 50 × 2,1 mm a A:B 67:33 (v/v) pro kolonu o rozměrech 100 × 2,1 mm. Průtok činil 0,25 ml/min. Detekce píků probíhala při vlnové délce 500 nm. Pro UHPLC/MS analýzu byl použit následující profil gradientu: 0-2 min 80-10 % A, 2-3 min: 10 % A, 3-3,15 min 10-80 % A, 3,15-4 min: 80 % A (pro kolonu 50 × 2,1 mm, průtok činil 0,9 ml/min). Pro kolonu o rozměru 100 × 2,1 mm byl gradient upraven

na následující profil: 0-3 min: 80-10 % A, 3-4 min: 10 % A, 4-4,15 min: 10-80 % A, 4,15-6 min: 80 % A, průtok činil 0,48 ml/min. Podmínky MS měření se shodují s podmínkami pro kontrolu čistoty.

Pro analýzu barviv přítomných v jahodovém víně byly vzorky vína přečištěné pomocí SPE rozpuštěny v 0,5 ml směsi mobilních fází A a B v poměru 9:1 (v/v) a touto směsí ještě 10x zředěny. Dávkováno bylo 5 µl ředěného roztoku. Gradient mobilních fází byl následující: 0-6 min: 80-10 % A; 6-8 min: 10 % A, 8-8,3 min: 10-80 % A, 8,3-10 min: 80 % A. Pro MS měření byly použity následující parametry: napětí na kapiláře 2,5 kV, napětí na sampling cone 30 V, teplota iontového zdroje 100 °C, desolvační teplota 250 °C, čas skenu 0,2 s, interscan delay 0,015 s. Byly střídány dva skeny bez diskriminace iontů nebo jejich předvýběru na kvadrupólu (MS^E mód). Pro první MS sken byla nastavena nízká kolizní energie (Trap: CE = 5 eV, Transfer: CE = 2 eV). Pro druhý sken byla nastavena vyšší kolizní energie (Trap: rampa CE = 15-70 eV, Transfer: 2 eV). Pro MS/MS skeny byla na Trap vložena CE 35 eV, kolizní energie na Transferu byla nastavena na 2 eV.

4.5. Podmínky studie vlivu kolizní energie (MS/MS)

Pro studii vlivu kolizní energie na fragmentaci byl použit následující postup: Roztok studované sloučeniny (50 mg/L v methanolu okyseleném 1 % kyselinou mravenčí) byl dávkován do elektrospreje za průtoku 5 µl/min. Efekt vlivu kolizní energie (CE, z angl. „collision energy“) na výtěžek fragmentů v CID-MS/MS byl studován v rozsahu 0-105 eV (v intervalech 5 eV). Jako kompenzace případné nestability signálu byl po každých třech skenech proveden sken s CE = 0 eV. Z těchto měření byly následně vypočítány relativní intenzity fragmentových iontů jako poměr průměru absolutních intenzit iontu při dané kolizní energii k průměru absolutních intenzit rodičovského iontu (m/z 309) ve skenech s CE = 0 eV. Napětí na kapiláře bylo 2,5 kV, napětí na sampling cone 30 V, teplota iontového zdroje 120 °C, desolvační teplota 250 °C, čas skenu 0,2 s, interscan delay 0,02 s, kolizní energie pro MS skeny 5 eV. Pro měření správné a přesné hmoty byly signály korigovány pomocí lock-spray techniky. Pro lock-spray byl použit roztok leucin-enkefalinu (500 µg/l ve směsi mravenčí kyselina/voda/acetonitril 0,1/50/50, v/v/v; průtok 10 µl/min).

4.6. NMR analýza izolovaných pelargonidinových derivátů

Obě chromatograficky izolované frakce (tj. 5-mePyPg a 4-meFuPg) byly detailně analyzovány pomocí NMR za účelem přiřazení struktur. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker AVANCE III 700 MHz (700,13 MHz pro ^1H , 176,05 MHz pro ^{13}C) v $\text{CD}_3\text{CN}/\text{TFA} = 9:1$ při 293 K. Jako vnitřní standard byl použit zbytkový signál acetonitrilu (δ_{H} 1,941 ppm, δ_{C} 1,41 ppm). S využitím softwaru standardně poskytovaného výrobcem byla naměřena ^1H NMR, ^{13}C NMR, gCOSY, gHSQC, gHMBC a ROESY NMR spektra. S využitím uvedeného vybavení bylo možno vypočítat chemické posuny vodíků s přesností na tři desetinná místa a chemické posuny uhlíků na dvě desetinná místa. Struktura látek byla určena porovnáním s literaturou (viz tabulka 1).

Tabulka 1. Srovnání ^1H a ^{13}C NMR dat pro 5-mePyPg a 4-meFuPg (měřeno v CD_3CN) s publikovanými daty pro pyrano- and furanokyanidiny (měřenými v CD_3OD) [42].

5-mePyPg					4-meFuPg				
Atom	$\delta_{\text{C}}^{\text{exp}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{lit}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{exp}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{lit}}$	Atom	$\delta_{\text{C}}^{\text{exp}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{lit}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{exp}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{lit}}$
2	160,21	160,41	-	-	2	155,68	155,87	-	-
3	134,46	135,60	-	-	11	143,28	142,26	-	-
11	147,54	147,08	-	-	12	147,55	147,85	-	-
13	154,62	155,05	-	-	6	158,10	159,86	-	-
7	101,16	101,49	7,030	7,00	7	103,33	103,54	6,758	6,69
8	166,49	167,98	-	-	8	165,55	167,51	-	-
9	100,81	100,81	7,152	7,08	9	96,80	96,33	7,045	6,87
10	153,66	154,00	-	-	10	156,39	157,08	-	-
12	109,45	109,28	-	-	13	104,45	104,55	-	-
4	101,70	101,64	6,956	6,97	5	109,49	109,70	7,456	7,50
5	174,25	173,52	-	-	4	178,41	177,67	-	-
5-me	22,6	21,84	2,588	2,31	4-me	16,09	15,82	2,799	2,84

Data z B-kruhu nejsou zahrnuta vzhledem k odlišné struktuře referenčních sloučenin, číslování

struktur viz obrázek 8.

4.7. Výpočty energetických hladin fragmentů 5-mePyPg a 4-meFuPg

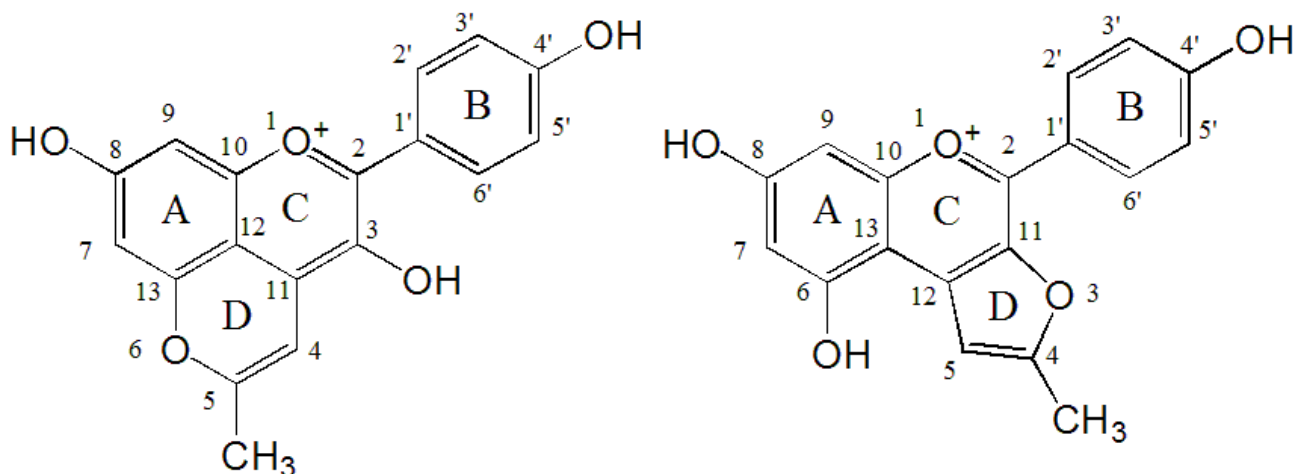
Kvantově-chemické výpočty energetických hladin minim a tranzitních stavů rodičovských iontů 5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu byly počítány s využitím DFT metody B3LYP [159-163] ve spojení se sadou bazí 6-31G(d) implementovaných v programu Gaussian 09 [164]. U všech optimalizovaných struktur byly provedeny analýzy frekvencí a na jejich základě byly struktury označeny jako minima (bez imaginárních frekvencí) nebo tranzitní stavy (s jednou imaginární frekvencí) na ploše potenciální energie. Byly spočítány rovněž vibrační energie nulového bodu (ZPVE, z angl. „zero-point vibrational energies“). Byla provedena teplotní korekce na Gibbsovu energii a hodnoty uvedené v této práci odpovídají Gibbsovým energiím zkoumaných iontových struktur. Gibbsovy energie byly vypočteny pro teplotu 298,15 K a tlak 1 atm. Všechny energie jsou prezentovány jako relativní hodnoty vztažené vůči nejstabilnějšímu konformeru odpovídajícího rodičovského iontu, jehož energetická hodnota byla za tímto účelem nastavena jako arbitrární nula.

Pro výpočty byl využit server skládající se ze dvou serverů typu i-T321T-M5V vybavených procesory Intel Xeon E5-2420 (1,9 GHz @ 7,2 GT, 15 MB cache, 6core) a operační pamětí 8 GB 1866 MHz DDR3.

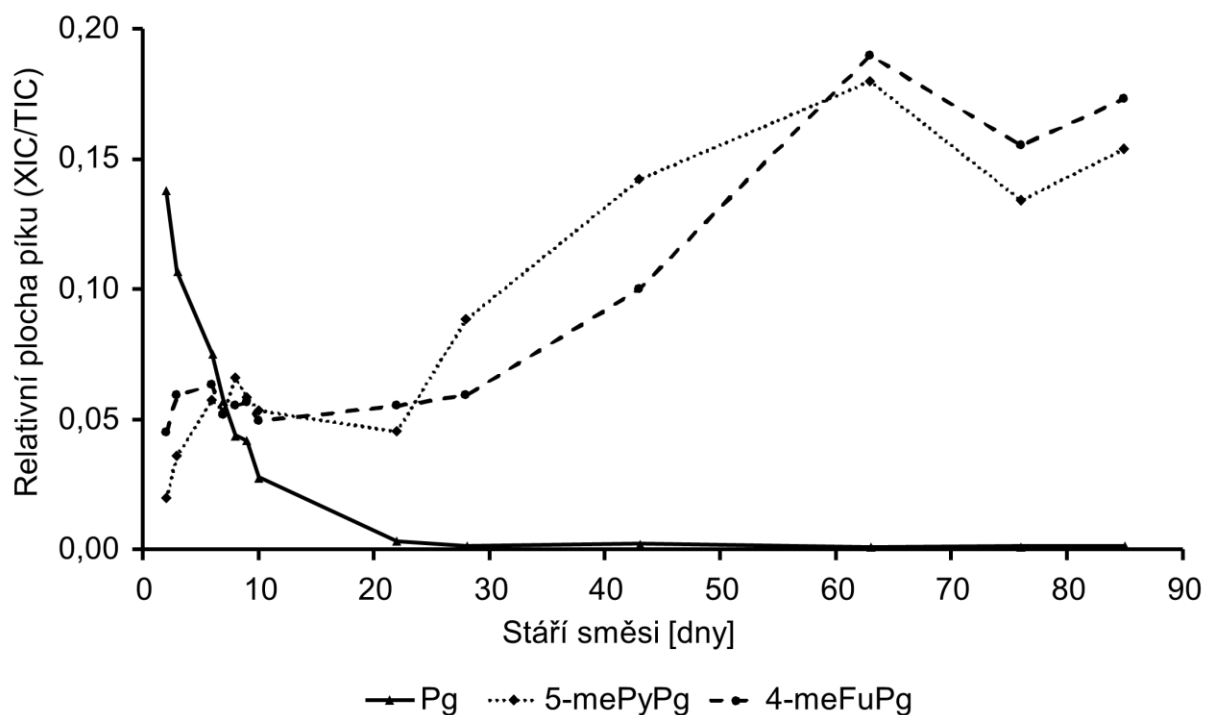
5. Diskuze a výsledky

5.1. Syntéza 5-mePyPg a 4-meFuPg

Tato kapitola se zabývá semisyntézou dvou derivátů pelargonidinu – 5-methylpyranopelargonidinu (5-mePyPg) a 4-methylfuranopelargonidinu (4-meFuPg) (obrázek 8). Příprava obou látek vychází z obecně známého faktu, že anthokyaniny jsou schopny reagovat s vhodnou malou reaktivní molekulou a vytvořit ve své struktuře další pyranový nebo furanový kruh. Proces reakce anthokyaninu s reaktivní molekulou (konkrétně s pyrohroznovou kyselinou) byl poprvé pozorován ve víně [15]. Bylo zjištěno, že přidáním koreaktantu do reakční směsi lze dosáhnout významné zvýšení výtěžku barviv [21]. Methylpyranoanthokyaniny vznikají dokonce už při extrakci nativních anthokyaninů acetonem, který s anthokyaniny ochotně reaguje [41,42]. Pro syntézu 5-mePyPg a 4-meFuPg byl nejprve testován postup simulující procesy probíhající ve víně, tj. byl použit okyselený vodný roztok s desetinásobným molárním přebytkem acetonu jako reakčního činidla (v analogii k experimentům s modelovým vínem [23,24]). Reakce však neposkytovala očekávané produkty ve využitelném výtěžku. Důvodem může být hydrolýza anthokyaninu ve vodném roztoku probíhající jako konkurenční reakce. Výrazného zvýšení výtěžku bylo dosaženo při použití směsi 3 mg pelargonidin chloridu, 2,5 ml methanolu, 2,5 ml acetonu a 20 μ l kyseliny chlorovodíkové. Při použití nevodného prostředí patrně nedochází k hydrolýze, methanol velmi dobře rozpouští pelargonidin i vznikající 5-mePyPg a 4-meFuPg a aceton je jako reaktant přítomen v daleko větším množství oproti směsi připravené v analogii k modelovému vínu. Přídavek kyseliny udržuje v reakční směsi v přebytku stálou flavyliovou (kationtovou) formu [45]. Jelikož anthokyaniny jsou náchylné na rozklad působením světla, byla směs uchovávána v temnu. Z reakční směsi byly v průběhu reakce odebírány kontrolní vzorky, které byly analyzovány UHPLC/MS. Jejich analýza poskytla informaci o produkci obou barviv v čase a o úbytku původního pelargonidinu v roztoku, jak ukazuje obrázek 9.



Obrázek 8. Struktura a číslování atomů a kruhů 5-mePyPg a 4-meFuPg.



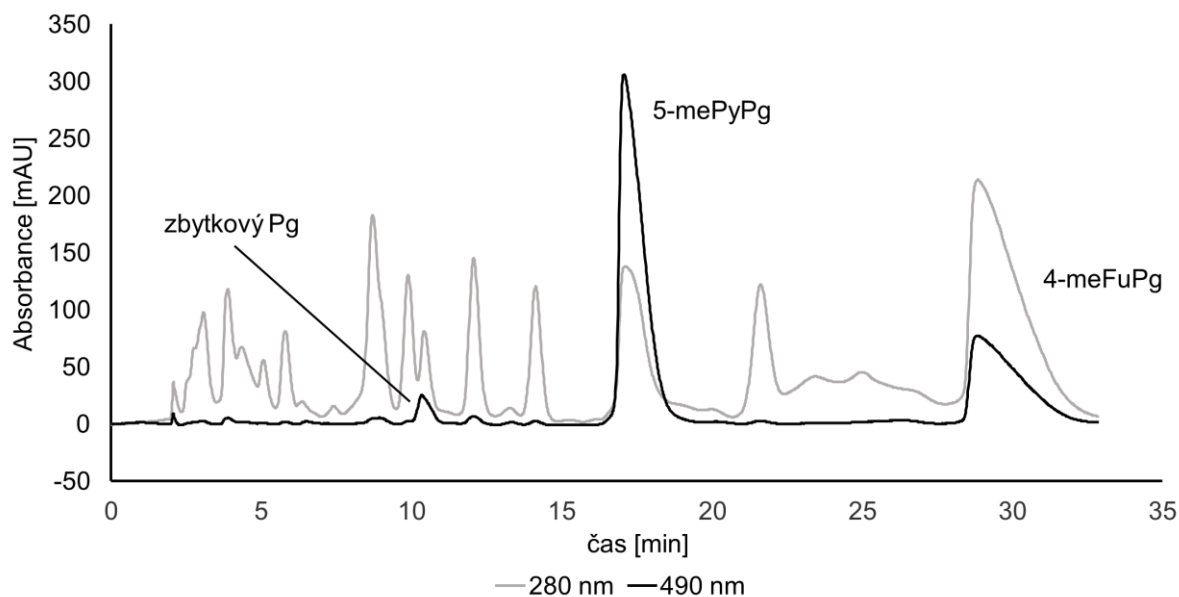
Obrázek 9. Změny v koncentracích Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg v reakční směsi. V grafu jsou vyneseny poměry intenzit m/z sledovaných iontů (271,1 pro Pg a 309,1 pro oba izomery) k celkové intenzitě iontového proudu ve spektru průměrovaném přes chromatografický pík každého barviva.

Z grafu v obrázku 9 vyplývá, že veškerý pelargonidin ve směsi je spotřebován během

prvních tří týdnů zrání směsi. Obě barviva se ve směsi začínají tvořit hned v počáteční fázi reakce, ale jejich obsah ve směsi pozvolna stoupá a maximální koncentrace obou látek jsou dosaženy přibližně po 60 dnech zrání reakční směsi.

5.2. Separace pelargonidinových derivátů pomocí semipreparativní HPLC v systému reverzních fází

Dalším krokem studie byla izolace obou syntetizovaných barviv v jejich čisté formě. Vzhledem k povaze látek byla jako separační metoda zvolena kapalinová chromatografie na reverzních fázích, široce používaná pro analýzu a frakcionaci materiálů obsahujících anthokyaniny. Jako mobilní fáze byla použita směs vody a acetonitrilu v poměru 5:1 (v/v) okyselená 5 % (v/v) kyselinou mravenčí. Separace probíhala v izokratickém módu, a to ze dvou důvodů. Jednak je možné mobilní fázi s konstantním složením během analýzy recyklovat a snížit tak spotřebu čistých rozpouštědel (významný parametr zejména při preparativní analýze), a jednak při použití stálého složení mobilné fáze nebylo třeba kolonu mezi analýzami ekvilibrovat. Vzhledem k tomu, že i v podmínkách izokratické eluce bylo dosaženo dostatečné separace píků obou barviv v přijatelném čase analýzy, metoda pro gradientovou eluci nebyla v semipreparativním módu dále uvažována. Chromatogram separace obou barviv je znázorněn na obrázku 10 – je vidět, že modelová směs obsahuje v době sběru i přes jednoduché počáteční složení pestrou škálu látek, které absorbují při vlnové délce 280 nm. Vzhledem k tomu, že absorpce v této oblasti vlnových délek je charakteristická pro aromatické systémy a jak bylo dříve uvedeno, anthokyaniny se mohou rozkládat za vzniku derivátů hydroxybenzoových kyselin a floroglucinaldehydu, je pravděpodobné, že píky mimo viditelnou oblast spektra odpovídají produktům rozkladu pelargonidinu a produktům jejich vzájemných reakcí. Odpařená reakční směs obsahující oba cílové deriváty byla rekonstituovaná v optimalizované mobilní fázi a separována opakovanými nástřiky do systému v semipreparativním uspořádání.



Obrázek 10. Semipreparativní separace 5-mePyPg a 4-meFuPg z modelové směsi.

Frakce byly z kolony zachytávány manuálně. Vzhledem k dalším látkám přítomným ve vzorku viditelným v chromatogramu při $\lambda = 280$ nm, které vstupují do mobilní fáze, nebyla v průběhu frakcionačních experimentů používána recyklovaná mobilní fáze. Základní chromatografické parametry jsou použité metody jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2. Základní analytické parametry semipreparativní metody pro izolaci izomerů 5-mePyPg a 4-meFuPg.

	5-mePyPg	4-meFuPg
retenční čas [min]	17,07 ± 0,74 %	28,76 ± 1,17 %
RSD plochy píku	5,34 %	2,65 %
symetrie píku	4,32 ± 4,36 %	6,88 ± 4,11 %

Eluované frakce byly lyofilizovány a po lyofilizaci rozpuštěny v malém objemu methanolu, přeneseny do malé vialky, odpařeny do sucha v proudu dusíku a před dalšími experimenty ponechány v mrazničce (-18 °C). Vyvinutá semipreparativní chromatografická metoda umožňuje při nástřiku 1 ml reakční směsi o koncentraci cca 500 mg/l izolaci přibližně 0,25 mg každého z izomerů jednou analýzou, což odpovídá přibližně 10 mg každé z látek

za 24 hodin. Čistota získaných frakcí byla kontrolována UHPLC/PDA/MS analýzou. Izomerní čistota 5-mePyPg odpovídá přibližně 92 % a izomerní čistota 4-meFuPg zhruba 99 %. Získané látky byly rovněž charakterizovány nukleární magnetickou rezonancí, viz kapitola 4.6 v Experimentální části. Tato měření potvrzují strukturu izolovaných látek.

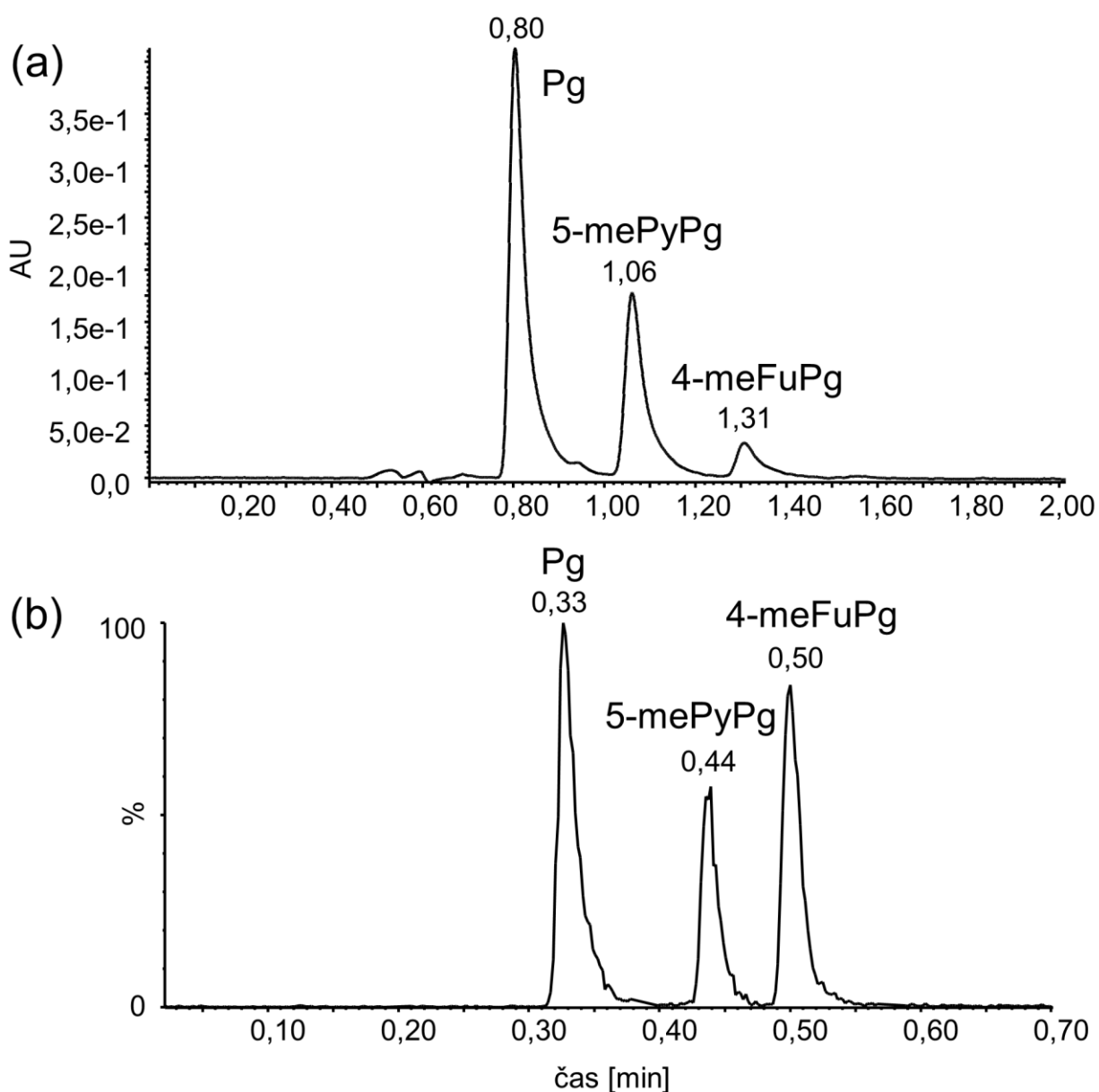
5.3. Vývoj rychlých UHPLC metod pro separaci modelové směsi

Bylo zjištěno, že obě studovaná izomerní barviva mají dostatečnou retenci na reverzních fázích. Kolona Acquity BEH C18 umožňovala separaci obou izomerů a pelargonidinu s dobrým rozlišením. Pro jejich analýzu byla vyvinuta UHPLC/MS metoda využívající gradientové eluce. Při vývoji UHPLC/MS metody nebyl připojen UV/VIS detektor z důvodu tlakového omezení UV/VIS detekční cely a chromatografická kolona byla připojena přímo k iontovému zdroji hmotnostního spektrometru. Průtok mobilní fáze při MS analýze byl optimalizován tak, aby bylo dosaženo co největší rychlosti separace, ale nebyl překročen tlakový limit přístroje (tj. 1000 bar). Byla studována rychlost skenování při hmotnostní detekci. Při použití krátké doby skenu 0,1 s je možno získat v nejrychlejších uspořádání zhruba 20 bodů na pík při dostatečném signálu analytů a vyhovující kvalitě MS spekter (běžně se u použitého vysokorozlišujícího hmotnostního spektrometru nastavuje 0,2-1 s). Pomocí gradientové UHPLC/MS metody je dosaženo separace s rozlišením na základní linii za 35 sekund (viz obrázek 11b).

Sledované látky vzhledem ke své struktuře dobře absorbují ve viditelné oblasti spektra a je možné je detekovat při vlnové délce kolem 500 nm. Pro rutinní použití v laboratořích, které nedisponují hmotnostním spektrometrem, byla optimalizována izokratická separace Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg a jejich detekce spektrofotometrickým detektorem (UHPLC-PDA). Možnost izokratické separace snižuje nároky na vybavení kapalinového chromatografu. Při optimalizaci se vycházelo z výše uvedené gradientové UHPLC-MS metody a hlavním optimalizovaným parametrem byl v tomto případě poměr mobilních fází A a B. Optimální separace na kratší koloně (50 × 2,1 mm) bylo dosaženo s mobilní fází připravenou smícháním mobilní fází A a B použitých při gradientové eluci v poměru 72:28 (v/v). V tomto uspořádání byl poté proměřen vzorek obsahující všechny tři látky. Metoda byla transferována také na kolonu o rozměrech 100 × 2,1 mm, kde byl jako nejvhodnější zvolen poměr mobilních fází

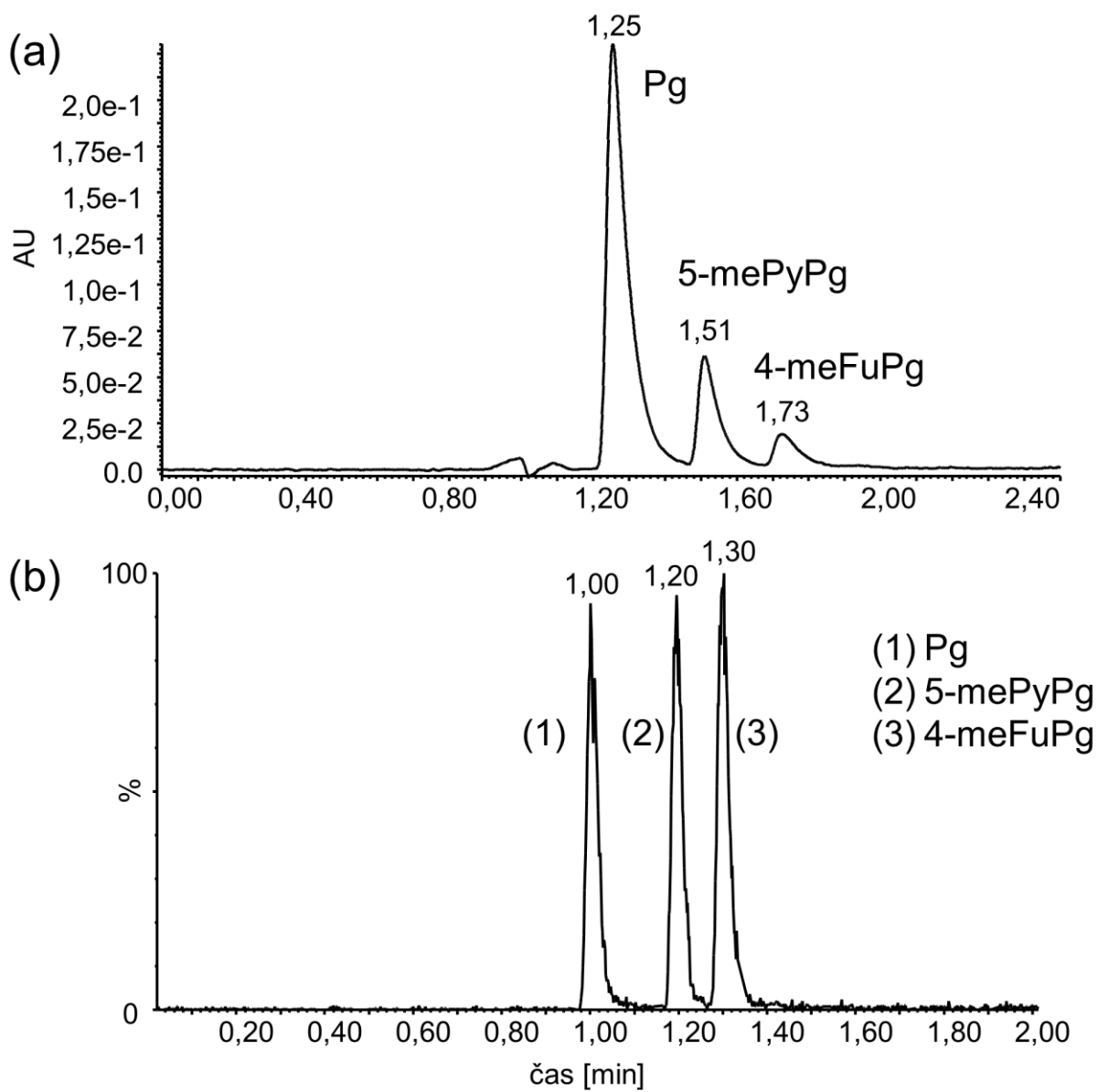
A a B 67:33 (v/v).

Separace studovaných látek na koloně s rozměry $50 \times 2,1$ mm oběma optimalizovanými metodami je uvedena na obrázku 11. Optimalizované separace na delší koloně o rozměru $100 \times 2,1$ mm, který je v praxi používán častěji, jsou uvedeny na obrázku 12. Měření směsi obsahující Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg bylo na obou kolonách provedeno v pěti opakováních a zjištěné analytické parametry optimalizovaných metod jsou uvedeny v tabulce 3.



Obrázek 11. Analytická separace Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg na koloně BEH C18 $50 \times 2,1$

mm v módu (a) UHPLC-PDA, (b) UHPLC-MS.



Obrázek 12. Analytická separace Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg na koloně BEH C18 100 × 2,1 mm, v módu (a) UHPLC-PDA, (b) UHPLC-MS.

Tabulka 3. Analytické parametry separace Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg v UHPLC/MS a UHPLC/PDA módu na kolonách o rozměrech 50 × 2,1 mm a 100 × 2,1 mm.

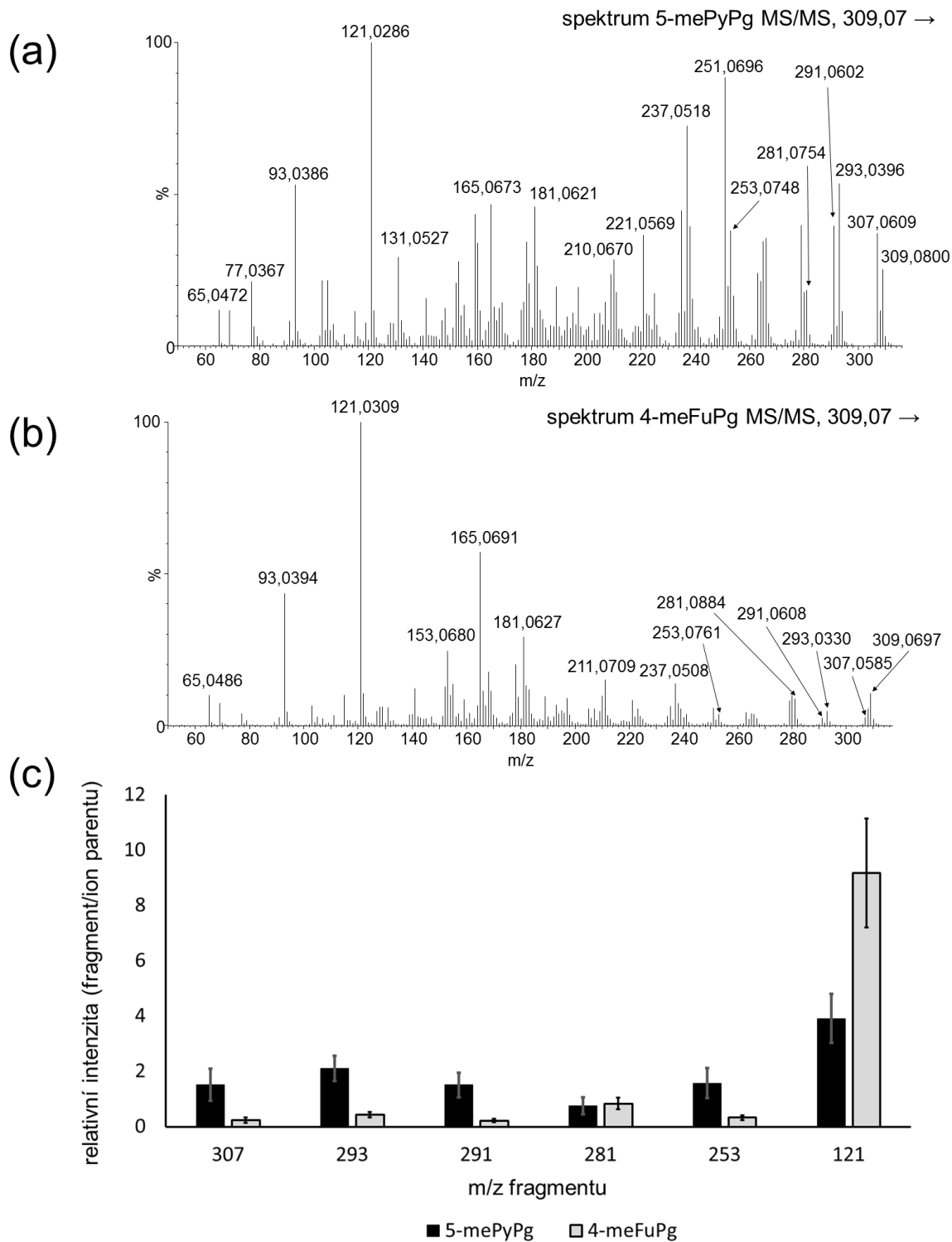
UPLC-MS			
kolona 50 mm	Pg	5-mePyPg	4-meFuPg
retenční čas [min]	0,33 ± 0,00 %	0,44 ± 0,00 %	0,50 ± 0,00 %
plocha píku	12,3714 ± 9,17 %	6,0252 ± 8,90 %	9,655 ± 9,16 %
rozlišení	4,1	2,1	
kolona 100 mm	Pg	5-mePyPg	4-meFuPg
retenční čas [min]	1,002 ± 0,45 %	1,196 ± 0,46 %	1,298 ± 0,34 %
plocha píku	7,777 ± 2,49 %	8,045 ± 2,17 %	9,483 ± 4,06 %
rozlišení	3,3	1,6	
UPLC-PDA			
kolona 50 mm	Pg	5-mePyPg	4-meFuPg
retenční čas [min]	0,802 ± 0,56 %	1,062 ± 0,42 %	1,312 ± 0,34 %
plocha píku	6353,6164 ± 2,71 %	2848,7342 ± 1,59 %	510,5506 ± 4,82 %
rozlišení	3,3	2,5	
kolona 100 mm	Pg	5-mePyPg	4-meFuPg
retenční čas [min]	1,228 ± 0,36 %	1,478 ± 0,30 %	1,694 ± 0,32 %
plocha píku	5130,27 ± 0,29 %	2739,8656 ± 1,55 %	616,336 ± 2,69 %
rozlišení	1,9	1,5	

Výsledky získané při optimalizaci chromatografických metod lze shrnout následovně. Všechny studované látky bylo možné s využitím vyvinutých metod separovat v časech kratších než 2 minuty. Metody poskytují vysokou přesnost retenčních časů (relativní směrodatná odchylka, RSD < 1,35 % pro všechny 4 optimalizované metody) a ploch píků (RSD < 5 % s vyloučením nejrychlejší metody, kde patrně dochází ke zvýšení rozptylu ploch vlivem sníženého počtu bodů na pík – cca 20 pro kratší kolonu vs. cca 30 pro delší kolonu). Všechny popisované metody separují cílové látky na úroveň základní linie ($R \geq 1,5$). Pro detekci je možné v závislosti na dostupném vybavení použít buď UV/VIS detekci (při vlnové délce 500 nm) nebo MS detekci (m/z hledaných látek 271,1 a 309,1). Při použití nejrychlejší gradientové metody dochází k eluci píků do 35 sekund. Celková doba analýzy je u gradientových elucí prodloužena ekvilibrací kolony. Ekvilibrace kolony v nejrychlejším uspořádání trvá celkem 1 minutu.

5.4. Studium fragmentace 5-mePyPg a 4-meFuPg

Hmotnostní spektrometrie bez předchozí separace není běžně považována za ideální metodu pro rozlišení strukturních izomerů. Existuje však řada prací, které ukazují, že detailním rozborem fragmentačních MS/MS spekter je možné v některých případech nalézt charakteristické rozdíly v signálech izomerních struktur a na jejich základě tyto izomery odlišit [165-167]. S výhodou lze použít také rozlišení izomerů iontovou mobilitou [168]. 5-methylpyranopelargonidin a 4-methylfuranopelargonidin představují zajímavý izomerní pár a jejich MS/MS spektra byla detailně prostudována pomocí vysokorozlišovacího tandemového hmotnostního spektrometru typu QqTOF. Oba rodičovské ionty produkují fragmenty o stejných hodnotách m/z , ale MS/MS spektra obou sloučenin se liší poměrem intenzit těchto iontů a na jejich základě mohou být oba izomery rozlišeny. MS/MS spektra studovaných izomerů získaná izolací jejich rodičovského iontu na kvadrupólu a jeho fragmentací po kolizi indukované disociací jsou znázorněna na obrázku 13. Rozdíly v relativních intenzitách vybraných fragmentů obou látek byly následně korelovány s výsledky dat, získanými pomocí výpočetních metod (viz kapitola 5.5.).

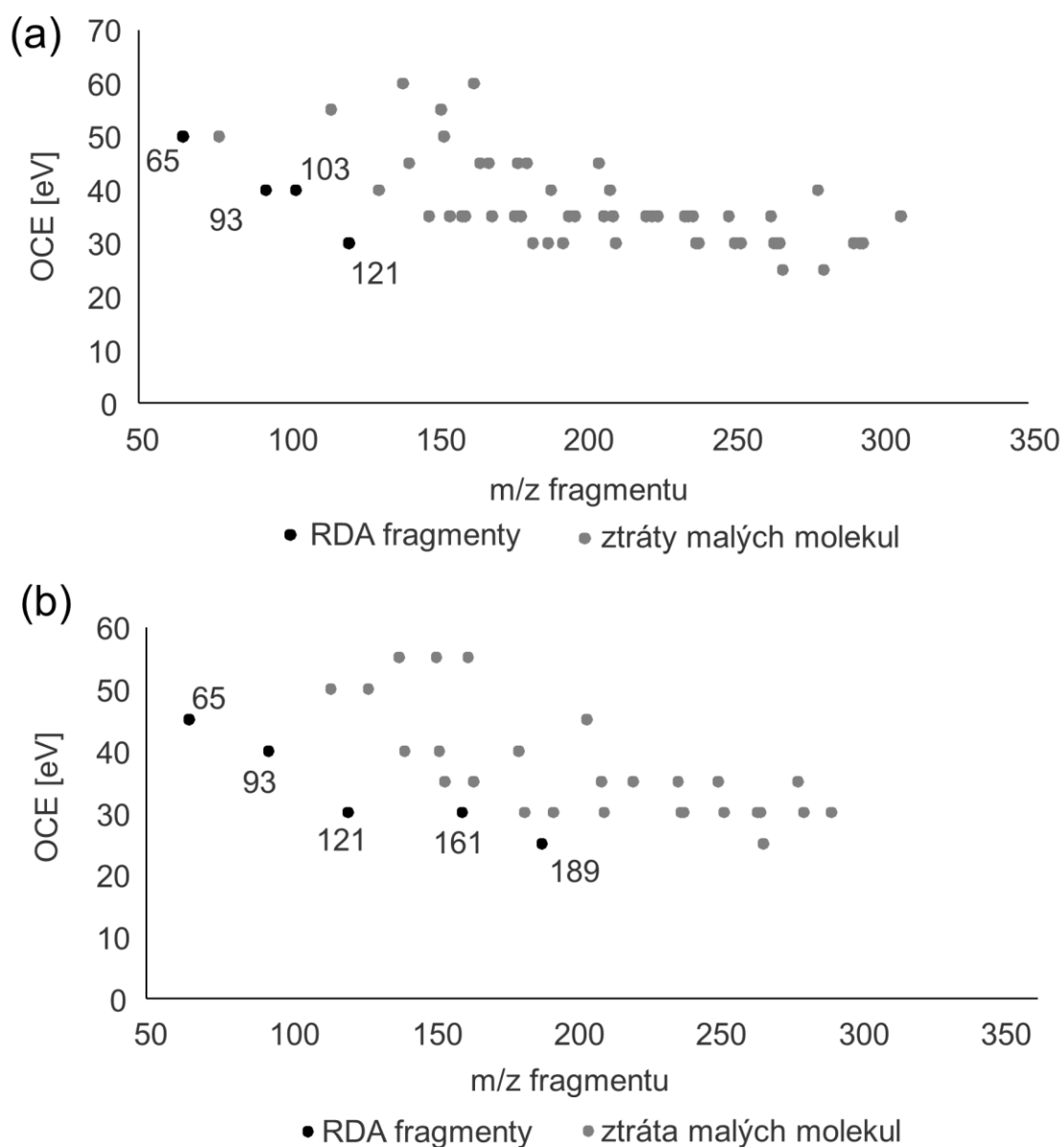
5-mePyPg a 4-meFuPg mohou být rozlišeny na základě šesti charakteristických fragmentů v jejich MS/MS spektrech. Ty odpovídají ztrátě molekuly vodíku (m/z 307,0609 pro 5-mePyPg a 307,0585 pro 4-meFuPg, elementární složení fragmentu: $C_{18}H_{11}O_5^+$), methanu (m/z 293,0396 a 293,0330, $C_{17}H_9O_5^+$), vody (m/z 291,0602 a 291,0608, $C_{18}H_{11}O_4^+$), dvou molekul oxidu uhelnatého (m/z 253,0748 a 253,0761, $C_{16}H_{13}O_3^+$) a produktu $^{0,2}B^+$ retro-Diels-Alderovského (RDA) štěpení (m/z 121,0286 a 121,0309, $C_7H_5O_2^+$). Relativní intenzity fragmentů odpovídajících ztrátě jedné molekuly oxidu uhelnatého (m/z 281,0754 a 281,0884, $C_{17}H_{13}O_4^+$) se při kolizní energii 40 eV v MS/MS spektrech obou derivátů významně neliší.



Obrázek 13. MS/MS spektra (a) 5-mePyPg a (b) 4-meFuPg, (c) poměr intenzit pozorovaných fragmentů k intenzitě odpovídajícího rodičovského iontu. MS/MS spektra a intenzity fragmentových iontů byly měřeny při kolizní energii 40 eV. V grafu (c) jsou pro jednoduchost uvedeny pouze nominální hodnoty m/z, přesné naměřené hodnoty m/z těchto iontů jsou

uvedeny v MS/MS spektrech (a) a (b).

Pro jednoznačnou identifikaci iontu musí jeho MS/MS spektrum obsahovat co nejvíc charakteristických fragmentových iontů v dostatečné intenzitě. U obou zkoumaných izomerů byl proto sledován vliv kolizní energie na relativní intenzity fragmentových iontů. Kolizní energie poskytující nejvyšší relativní intenzity každého fragmentu (optimální kolizní energie, OCE) byly vyneseny do grafu proti m/z hodnotám těchto fragmentů. Tyto grafy jsou pro obě látky uvedeny na obrázku 14. Hodnoty m/z významných fragmentů a jejich odpovídající OCE jsou uvedeny v tabulce 4. V případě 5-mePyPg a 4-meFuPg se OCE fragmentových iontů pohybuje v rozmezí 25-55 eV. Fragменты, které byly identifikovány jako produkty RDA štěpení (a jejich fragmenty) jsou vyznačeny černě. Z grafu na obrázku 14 je patrné, že tyto fragmenty mají při daném m/z nižší OCE, než fragmenty vznikajícími jinými procesy (zejména opakovanými ztrátami malých molekul – vody, oxidu uhelnatého, methanu, ketenu apod.). Každá ztráta malé molekuly vyžaduje určitou aktivační energii, a proto má ion s nižší hodnotou m/z (vznikající větším počtem ztrát malých molekul) vyšší hodnotu OCE (pro tvorbu tohoto iontu je potřeba vynaložit energii i pro všechny předchozí fragmentace vedoucí k jeho vzniku). Naproti tomu během RDA fragmentací se ion rozštěpí na dvě části přerušením dvou vazeb (nacházejících se na C-kruhu). Jinými slovy, potřeba energie pro vznik fragmentu pomocí RDA je nižší než pro vznik fragmentu pomocí ztrát malých molekul, mají-li oba tyto fragmenty srovnatelnou hodnotu m/z . RDA fragmenty mohou být rozeznány podle polohy ve „spodní“ části grafu. Graf „ m/z vs. OCE“ může poskytovat doplňující informace pro identifikaci neznámých fragmentů a tím obecně i pro identifikaci rodičovských iontů. V případě pyrano- a furanoanthokyaninů umožňuje interpretace RDA fragmentů určit substituci aglykonu. A^+ ionty v tomto případě nesou informaci o substituci na D-kruhu a B^+ ionty informaci o substituci B-kruhu, tj. o struktuře anthokyaninu, ze kterého detekovaný derivát vznikl.



Obrázek 14. Závislost optimální kolizní energie na hodnotě m/z fragmentového iontu (a) pro 5-mePyPg a (b) pro 4-meFuPg. Popisky jsou označeny ionty ze skupiny RDA fragmentů.

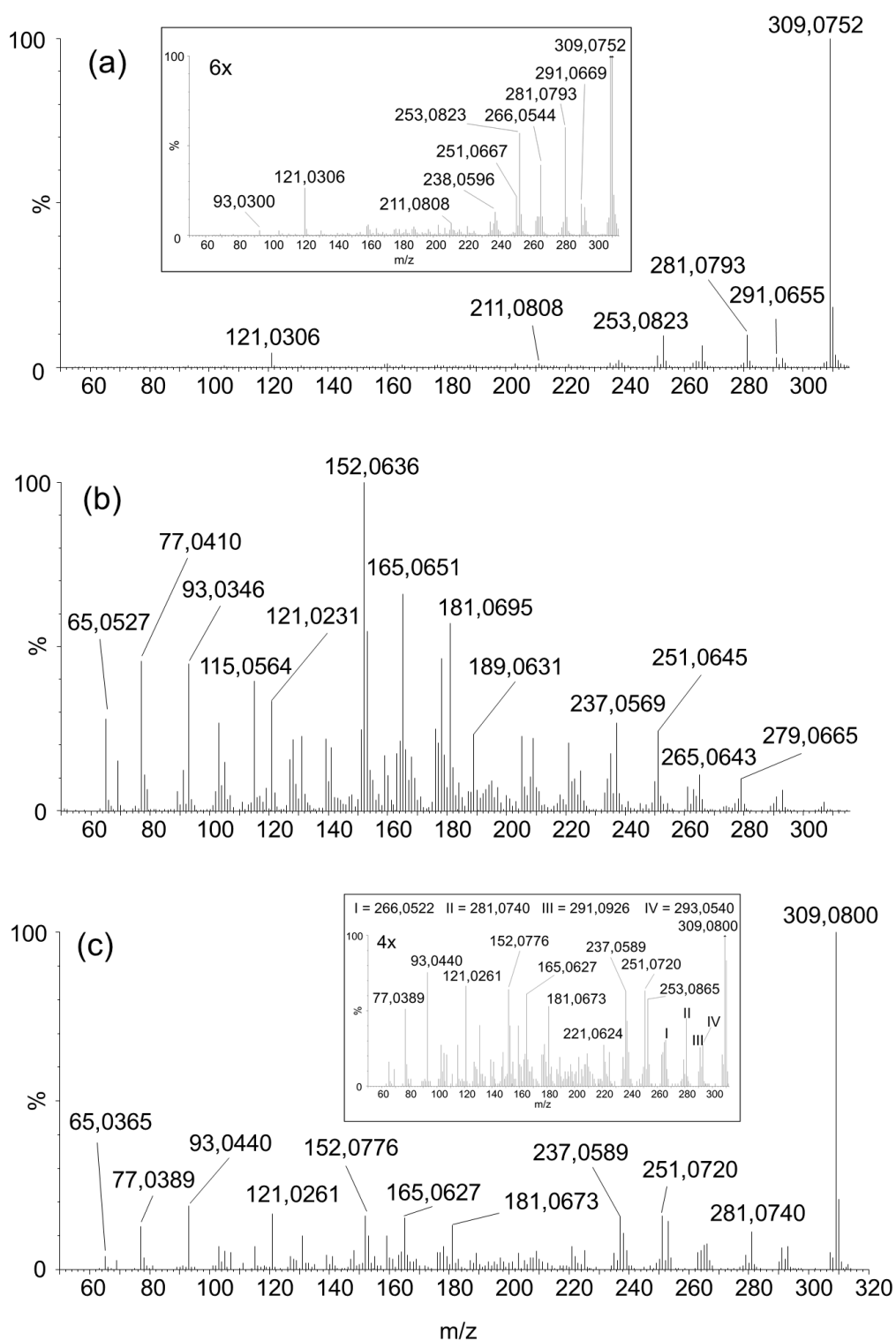
Tabulka 4. Významné fragmentové ionty v MS/MS spektrech 4-meFuPg a 5-mePyPg a jejich optimální kolizní energie (vybrány byly ionty s relativní intenzitou větší než 10 % dominujícího iontu ve spektru a ionty odpovídající ztrátě jedné molekuly vody a dvou molekul CO).

4-meFuPg		5-mePyPg		5-mePyPg	
m/z iontu	OCE [eV]	m/z iontu	OCE [eV]	m/z iontu	OCE [eV]
291,0594 [M-H ₂ O] ⁺	30	307,0609 [M-H ₂] ⁺	35	221,0563 [M-CH ₂ CO-CO-H ₂ O] ⁺	35
281,0844 [M-CO] ⁺	30	294,0736 [M-CH ₃ ·] ⁺	30	211,0735 [M-CH ₂ CO-2CO] ⁺	30
267,0618 [M-CH ₂ CO] ⁺	25	293,0414 [M-CH ₄] ⁺	30	210,0668 [M-3CO-CH ₃ ·] ⁺	35
253,0754 [M-2CO] ⁺	30	291,0615 [M-H ₂ O] ⁺	30	209,0520	40
239,0717 [M-CH ₂ CO-CO] ⁺	30	281,0799 [M-CO] ⁺	25	197,0686 [M-2CH ₂ CO-CO] ⁺	35
211,0705 [M-CH ₂ CO-2CO] ⁺	30	279,0660 [M-CH ₂ O] ⁺	40	181,0621	45
189,0653 [^{0,2} A] ⁺	25	267,0629 [M-CH ₂ CO] ⁺	25	178,0679	45
183,0698 [M-CH ₂ CO-3CO] ⁺	30	266,0540 [M-CO-CH ₃ ·] ⁺	30	165,0697	45
181,0627	40	265,0507	30	160,0453	35
165,0695	35	264,0669	30	159,0391	35
153,0679	40	263,0683 [M-CO-H ₂ O] ⁺	35	153,0623	50
152,0629	55	253,0731 [M-2CO] ⁺	30	152,0646	55
121,031 [^{0,2} B] ⁺	30	251,0696	30	131,0522	40
93,0389 [^{0,2} B-CO] ⁺	40	239,0619 [M-CH ₂ CO-CO] ⁺	30	121,0284 [^{0,2} B] ⁺	30
		238,0562 [M-2CO-CH ₃ ·] ⁺	30	93,0376 [^{0,2} B-CO] ⁺	40
		237,0519	35	77,0368	50
		235,0777 [M-2CO-H ₂ O] ⁺	35		

Fenomén OCE znamená na druhou stranu také jistý problém při charakterizaci rodičovského iontu pomocí MS/MS. Jak bylo výše uvedeno, zvolená kolizní energie v MS/MS experimentu ovlivňuje do velké míry vzhled spektra (zastoupení jednotlivých fragmentů). Problematická je volba kolizní energie v případech kdy v MS/MS spektru vznikají fragmenty v širokém rozmezí m/z hodnot, což je i případ studovaných látek. Kolizní energie potřebné pro jejich vznik se výrazně liší. Řešením tohoto problému je využití rampy kolizní energie. Při použití této rampy je kolizní energie lineárně zvyšována z jedné hodnoty na druhou. Tím dochází ke vzniku velkých fragmentů vyžadujících pro svůj vznik malou kolizní energii a k jejich následné aktivaci a fragmentaci vedoucí částečně k jejich rozpadu a vzniku fragmentů menších. Tento postupný „ohřev iontů“ vede k výrazným rozdílům oproti spektrům získaným vložením konstantní kolizní energie v průběhu celého skenu. Rampa kolizní energie byla využita pro necílenou fragmentaci anthokyaninů ve studovaném vzorku jahodového vína, která bude zmíněna níže v příslušné kapitole. V tomto místě je pro srovnání uveden vzhled MS/MS spekter 5-mePyPg při nízké a vysoké kolizní energii (odpovídající nejnižší a nejvyšší zjištěné hodnotě OCE) a při použití rampy energie (obrázek 15).

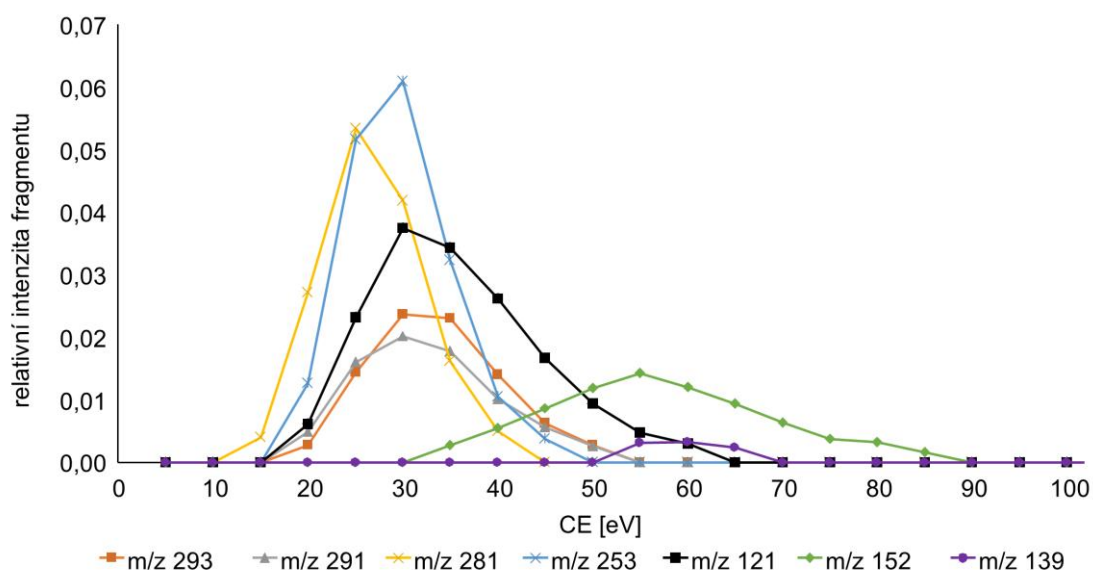
Ze vzhledu MS/MS spekter vyplývá, že při použití nízké kolizní energie (obrázek 15a) vznikají zejména ionty tvořené malým počtem ztrát – ztráta 1 molekuly vody (m/z 291), 1 či 2 molekul oxidu uhelnatého (m/z 281, resp. m/z 253) a RDA štěpení za vzniku B⁺ iontu

(m/z 121). Zůstává také výrazně zachován signál rodičovského iontu (m/z 309). Naopak při použití vysoké kolizní energie (obrázek 15b) nejsou ionty z prvního spektra téměř vůbec přítomny a naopak se projevují signály iontů s nižšími m/z hodnotami tvořenými převážně postupnými ztrátami. Pokud použijeme pro fragmentaci rampu kolizní energie (obrázek 15c), je i přes její rozsah, překračující výrazně horní limit OCE 5-mePyPg, profil spektra víceméně vyrovnaný a objevují se v něm fragmenty v celém rozsahu hodnot m/z . Obrázek 16 ukazuje na příkladu vybraných charakteristických iontů závislost výtěžku fragmentů na kolizní energii. U iontů lze pozorovat relativně úzkou oblast kolizních energií, ve kterých se vyskytují ve spektru. Úbytek těchto iontů při vyšších kolizních energiích je způsoben jejich následným štěpením. Ionty s nižší hodnotou m/z (v obrázku 16 ionty m/z 152 a m/z 139) se vyskytují v oblasti vyšších kolizních energií (a jsou tedy produkty ztrát malých molekul), oproti tomu iont m/z 121 se vyskytuje v oblasti nižších kolizních energií i přes nízkou hodnotu m/z , což podporuje teorii o jeho vzniku pomocí RDA štěpení.



Obrázek 15. Porovnání vzhledu kolizního spektra 5-mePyPg při použití (a) fixní kolizní energie 25 eV, (b) fixní kolizní energie 55 eV a (c) rampy kolizní energie v rozsahu 15-70 eV. V insetech obrázků (a) a (c) jsou přibližné úseky MS/MS spekter, faktor přiblížení (vertikální

zoom) je uveden vždy v příslušném insetu.



Obrázek 16. Vliv kolizní energie na relativní intenzitu fragmentového iontu pro 5-mePyPg.

Důkladné studium fragmentací iontů 5-mePyPg a 4-meFuPg pomohlo najít a popsat charakteristické fragmenty vznikající v kolizní cele tandemového hmotnostního spektrometru. Na základě kolizních spekter bylo možné rozlišit oba studované izomery. V následující kapitole jsou výtěžky vybraných charakteristických fragmentů srovnány pro obě látky s výsledky kvantových výpočtů.

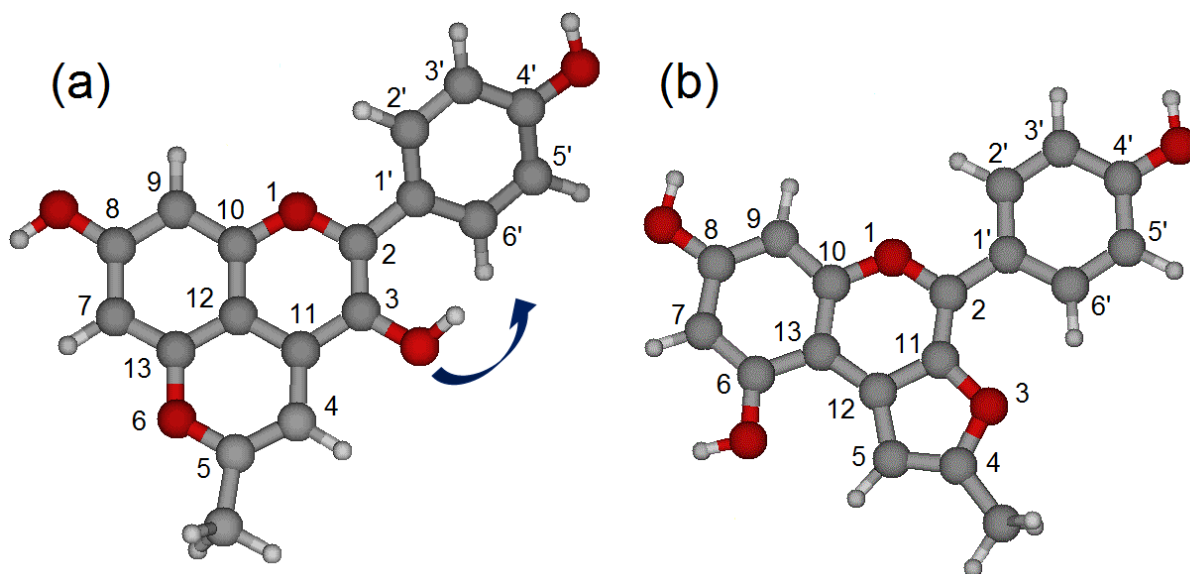
5.5. Výpočty energetické náročnosti fragmentačních procesů pomocí kvantové chemie

5.5.1. Optimalizace struktury 5-mePyPg a 4-meFuPg

Základním krokem při zjišťování struktury a energie rodičovského a fragmentových iontů bylo nalezení optimální základní struktury a nejnižší energie obou sloučenin v iontovém stavu v plynné fázi. Tento proces spočíval optimalizaci konformace – orientace tří hydroxylových skupin a rotace B-kruhu vůči zbytku molekuly. Pro každý parametr bylo

navoleno několik různých počátečních podmínek a systém byl ponechán relaxovat do lokálního energetického minima. Z takto získaných minim byla poté pro každou sloučeninu zvolena geometrie odpovídající nejnižší energii a ta použita jako výchozí. Pro nativní anthokyaniny (včetně pelargonidinu) literatura udává, že nejstabilnější struktura je planární [153]. Naše výsledky ukazují, že nejstabilnějším izomerem 5-mePyPg je struktura kdy je rovina B-kruhu mírně vychýlena vzhledem ke zbytku molekuly – dihedralní úhel C3-C2-C1'-C6' (viz obrázek 17a) se v tomto případě rovná 33°. Toto vychýlení je ve shodě s výsledky prezentovanými v práci Leopoldiniho a kol., kde byly studovány přímo pyranoanthokyaniny. U studovaných molekul (vitisin A, pinotin A a další) byly zjištěny dihedralní úhly okolo 20° [154]. Woodford ve své práci pozoroval dokonce torzi B-kruhu přímo u kationtu flavylia, který je základní stavební jednotkou anthokyaninů (příslušný dihedralní úhel činí 7,52°), u nativního Pg je však podle jeho práce preferováno téměř planární uspořádání (dihedralní úhel 1,82°) [169].

S ohledem na orientaci hydroxylových skupin má u 5-mePyPg v případě hydroxyly navázaného na uhlík C3 jeho vodík tendenci orientovat se v konformacích s vychýleným B-kruhem směrem k tomuto kruhu (viz obrázek 17a). Pozice vodíku na kyslíku O4' má zanedbatelný vliv na celkovou energii iontu; malý energetický rozdíl byl zjištěn také pro rozdílné polohy vodíku na kyslíku O8. Nejstabilnější struktura 5-mePyPg je zobrazena na obrázku 17a. Všechny zkoumané konformace 5-mePyPg jsou zaznamenány v tabulce 5. Tato data jsou součástí naší práce věnující se fragmentacím 5-mePyPg [46].



Obrázek 17. Optimalizované struktury (a) 5-mePyPg a (b) 4-meFuPg v plynné fázi. Šipkou je v obrázku (a) naznačena preferovaná orientace vodíku hydroxyly C3 směrem k B-kruhu.

Tabulka 5. Přehled všech optimalizovaných konformerů 5-mePyPg. Tučně je vyznačen nejstabilnější konformer, jehož energie je brána jako arbitrární nula, energie ostatních konformerů jsou poté vztaženy k této hodnotě. Pro číslování atomů viz obrázek 17.

konformer	C3-C2-C1'-C6' [°]	C2-C3-O3-H [°]	C3'-C4'-O4'-H [°]	C7-C8-O8-H [°]	rozdíl Gibbs. energií [eV]
1	0	0	0	0	0,2915
2	0	0	0	180	0,2826
3	0	0	180	0	0,1313
4	0	0	180	180	0,1343
5	0	180	0	0	0,2969
6	0	180	0	180	0,2912
7	0	180	180	0	0,1358
8	0	180	180	180	0,1379
9	33	22	0	0	0,0000
10	34	21	0	180	0,0051
11	33	23	180	0	0,0027
12	34	22	180	180	0,0053

Obdobně bylo postupováno v případě optimalizace struktury 4-meFuPg. Na rozdíl od 5-mePyPg nebyla u 4-meFuPg nalezena žádná stabilní struktura s vychýleným B-kruhem oproti zbytku molekuly – všechny nalezené konformery jsou planární. Rozdíl v energiích je u nich tedy způsobem pouze polohou jednotlivých hydroxylů. Nejstabilnější struktura je

znázorněna na obrázku 17b, geometrie a energie všech nalezených konformerů shrnuje tabulka 6.

Tabulka 6. Přehled optimalizovaných konformerů 4-meFuPg. Tučně je vyznačen nejstabilnější konformer, jehož energie je brána jako arbitrární nula, energie ostatních konformerů jsou poté vztaženy k této hodnotě. Pro číslování atomů viz obrázek 17.

konformer	C3'-C4'-O4'-H [°]	C13-C6-O6-H [°]	C7-C8-O8-H [°]	rozdíl Gibbs. energií [eV]
1	0	0	0	0,2254
2	0	0	180	0,2493
3	0	180	0	0,0146
4	0	180	180	0,0000
5	180	0	0	0,2306
6	180	0	180	0,2512
7	180	180	0	0,0186
8	180	180	180	0,0009

5.5.2. Porovnání energetické náročnosti vzniku charakteristických fragmentů u 5-mePyPg a 4-meFuPg s využitím DFT výpočtů

Fragmentační chování studovaných derivátů pelargonidinu může být charakterizováno na základě rozdílů energetických stavů rodičovských iontů obou látek a jejich fragmentů. Je také možné sledovat velikosti aktivačních bariér vedoucích k fragmentačním procesům (tj. energie tranzitních stavů) a uvažovat jejich velikost vzhledem ke kolizním energiím používaným při MS/MS experimentech. Rozdíly mezi energií optimalizované struktury rodičovského iontu a součtem energií vznikajícího fragmentu a odštěpené neutrální části mohou být podle literatury korelovány s intenzitou tohoto fragmentu v MS/MS spektru [170]. Jak již bylo dříve popsáno, důležité procesy během fragmentace 5-mePyPg a 4-meFuPg zahrnují eliminaci molekuly vodíku, methanu, vody, oxidu uhelnatého a RDA štěpení. U demethylace a dehydratace je navrhovaným mechanismem přesun vodíku na místo štěpení a následný odstup příslušné molekuly, zatímco pro dekarboxylaci je potřeba vodík přesunout z hydroxylové skupiny na jinou část molekuly, čímž se odkryje C-O skupina schopná následného odštěpení. Ve všech těchto případech jsou jako možní poskytovatelé/příjemci přesouvaných vodíkových atomů uvažovány jednak hydroxylové skupiny a jednak uhlíky

sousedící s centry štěpení. Byly modelovány fragmenty vznikající za těchto podmínek. V případě RDA štěpení není pro tvorbu $^{0,2}B^+$ iontu potřeba přesouvat vodík, tento ion vzniká pouhým přerušением existujících vazeb. Vzhledem k tomu, že dehydrogenace je silně nesespecifický proces a v rámci molekuly existuje velké množství případných izomerů, nebyly pro účely této práce fragmentové ionty odpovídající struktuře $[M-H_2]^+$ modelovány. Rozdíly energií jednotlivých fragmentových iontů (vybrán byl vždy nejstabilnější z celé sady uvažovaných izomerů fragmentu) a odpovídajícího rodičovského iontu jsou uvedeny v tabulce 7.

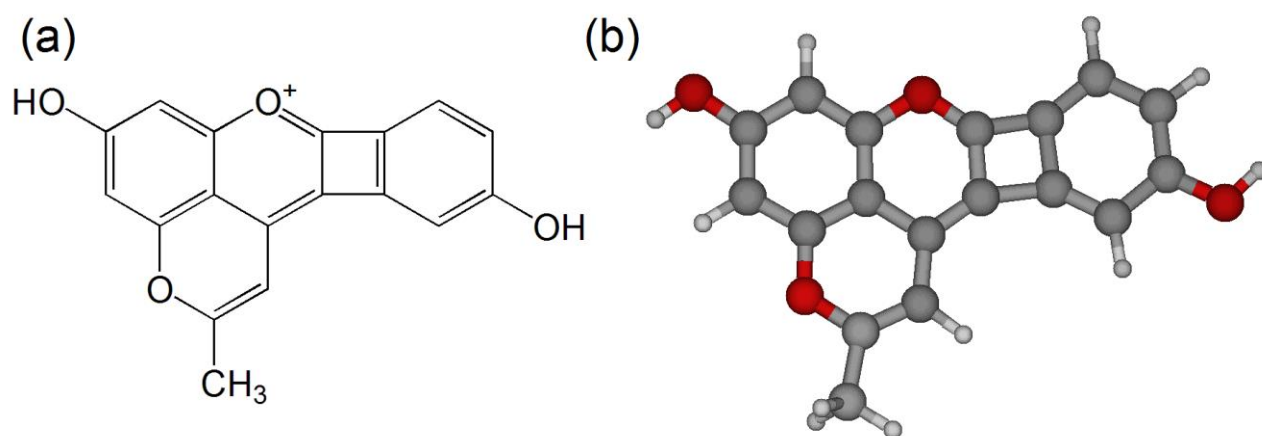
Tabulka 7. Rozdíly v Gibbsových energiích rodičovského iontu a součtu energií odpovídajících produktů (tj. nabitě a neutrální části vzniklé štěpením).

fragmentový iont	rozdíl Gibbsových energií [eV]		geometrie iontu*	
	5-mePyPg	4-meFuPg	5-mePyPg	4-meFuPg
$[M-CH_4]^+$ (m/z 293)	3,33	4,64	O3	O4'
$[M-H_2O]^+$ (m/z 291)	1,69	3,25	O3-C6'	O8-O6
$[M-CO]^+$ (m/z 281)	0,80	0,53	O4'-C5'	O6-C7
$[M-2CO]^+$ (m/z 253)	0,54	1,37	O3-C6'	O4'-C5'
RDA $^{0,2}B^+$ (m/z 121)	5,15	4,78	-	-

*Geometrie iontů jsou udávány pomocí zkratk. U iontu $[M-CH_4]^+$ je uveden atom poskytující vodík, který je přesunut na methylovou skupinu a odštěpen spolu s ní. U iontu $[M-H_2O]^+$ je před pomlčkou uveden odstupující atom kyslíku a za pomlčkou atom původně nesoucí vodík přesunutý na tento kyslík. U iontů $[M-CO]^+$ a $[M-2CO]^+$ je před pomlčkou uveden odstupující atom kyslíku a za pomlčkou pak atom uhlíku, který přijme atom vodíku vázaný původně na odstupujícím kyslíku (fragment $[M-2CO]^+$ je zde předpokládán jako produkt vznikající z odpovídajícího $[M-CO]^+$ fragmentu uvedeného v této tabulce). RDA $^{0,2}B^+$ ion má stejnou strukturu pro 5-mePyPg i 4-meFuPg (acyliový iont 4-hydroxybenzoové kyseliny). Pro označení atomů viz obrázek 17.

Vypočtené hodnoty energií a jejich rozdíly dobře korespondují s rozdíly signálů v MS/MS spektrech mezi oběma studovanými izomerními deriváty pelargonidinu (při nižším rozdílu energií je pozorován vyšší signál odpovídajícího fragmentu, viz obrázek 13c). Ionty odpovídající demethylaci, dehydrataci a ztrátě dvou molekul oxidu uhelnatého jsou tedy více zastoupeny v MS/MS spektru 5-mePyPg, ionty odpovídající ztrátě jedné molekuly oxidu uhelnatého se objevují v porovnatelné intenzitě v MS/MS spektrech obou látek a RDA $^{0,2}B^+$

fragment má vyšší intenzitu v MS/MS spektru 4-meFuPg. Zajímavý je velký rozdíl energií $[M-H_2O]^+$ iontů zapříčiněný neobvyklou, velmi stabilnou strukturou fragmentu odvozeného od 5-mePyPg (viz obrázek 18). Dobrá shoda signálů charakteristických fragmentů získaných MS/MS experimenty a teoreticky vypočtených rozdílů energií ukazuje, že kvantové výpočty jsou velmi užitečným nástrojem pro interpretaci procesů probíhajícím při fragmentaci pyranoanthokyaninů v kolizní cele hmotnostního spektrometru a mohou tedy přispět k identifikaci tohoto druhu molekul.



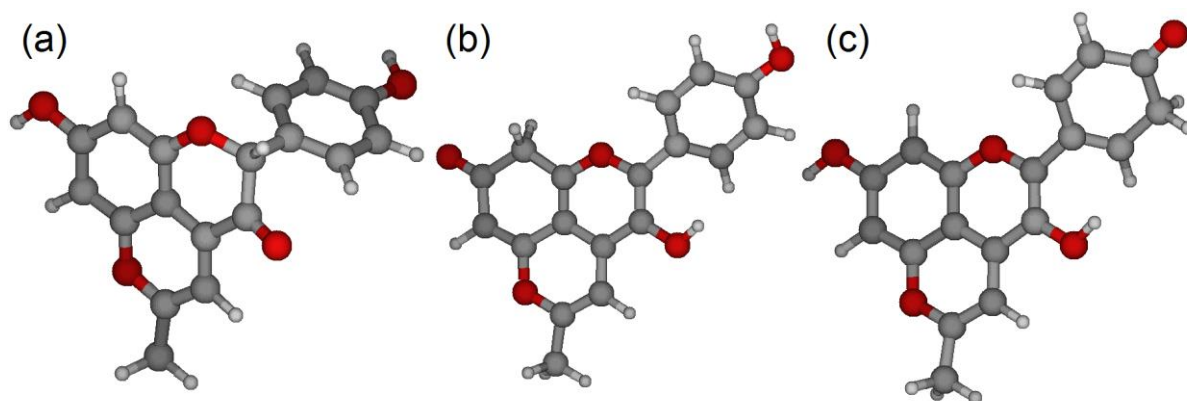
Obrázek 18. (a) neobvyklá struktura fragmentového iontu $[M-H_2O]^+$ odvozeného od 5-mePyPg, (b) geometrie této struktury optimalizovaná výpočetním softwarem.

Bylo studováno rovněž kinetické chování těchto iontů. Energetické bariéry (vyjádřené jako nejvyšší tranzitní stavy v energeticky preferovaných fragmentačních cestách) jsou do velké míry spojené s pohybem vodíku po molekule. Hodnoty těchto energií jsou v rozsahu 1,43 až 5,49 eV. Na druhou stranu, optimalizace tranzitních stavů představujících jednoduché štěpení vazby mají podle literatury tendence selhat a příslušný sken potenciálové plochy pak vykazuje kontinuální nárůst energie při prodlužování zkoumané vazby [142,143]. Stejná situace byla pozorována i při naší práci. Hodnoty energií, které byly nalezeny, jsou výrazně nižší, než kolizní energie použité během prováděných (a v praxi běžně používaných) MS/MS experimentů (řádově v desítkách eV, viz např. rozsah OCE pro 5-mePyPg a 4-meFuPg) a všechny pozorované procesy tedy z tohoto hlediska mohou probíhat. Zjištěné energie tranzitních stavů však zároveň naznačují, že aktivační bariéry nejsou nutně klíčovým

parametrem pro určení mechanismů zodpovědných za fragmentaci molekuly. Toto musí být vedeno v patrnosti zejména v případě přesunu vodíku, jak uvádí rovněž práce Wrightové a kol. [144]. Studium energií tranzitních stavů ovšem nabývá velkého významu v experimentech využívajících efektivně nižší hodnoty kolizních energií nebo při infračervené multifotonové disociační spektroskopii (IRMPD).

5.5.3. Energetický rozbor vybraných fragmentačních cest pro iont 5-mePyPg

Výše uvedené kapitoly popisují srovnání energií 5-mePyPg a 4-meFuPg. 5-mePyPg byl použit jako modelová sloučenina pro detailnější zkoumání mechanismů fragmentace. Byly studovány detaily dvou procesů – ztráty molekuly vody a ztráty molekuly oxidu uhelnatého. Při hodnocení energií možných procesů nastávajících v průběhu fragmentací byly brány v potaz dvě kritéria – co nejnižší energie tranzitních stavů (pro eliminaci vody i oxidu uhelnatého) a předpoklad transferu vodíku z počátečního umístění do bodu nejnižšího energetického minima v rámci dané konfigurace molekuly (pro odstup oxidu uhelnatého). Za tímto účelem byly nejdříve zmapovány pohyby všech hydroxylových vodíků po molekule 5-mePyPg a vybrány polohy s nejnižší energií pro nové umístění každého hydroxylového vodíku. Uvedeným postupem byla nalezena tato minima: minimum s vodíkem O3 hydroxyly přesunutým na atom C2 (energie 0,70 eV), minimum s vodíkem O4' hydroxyly přesunutým na atom C5' (0,93 eV) a minimum s vodíkem hydroxyly O8 přesunutým na atom C9 (0,78 eV) – minima jsou znázorněna na obrázku 19. Zajímavým společným rysem těchto minim je, že se vždy jedná o struktury, kdy je vodík přesunut na uhlík sousedící s uhlíkem, který váže původní hydroxyl. Byly spočítány rovněž všechny související tranzitní stavy zahrnující přesuny všech hydroxylových vodíků mezi libovolnými dvěma atomy v molekule. Dále již byly cesty hodnoceny podle konkrétní ztráty. Výběr nejpravděpodobnější cesty z více možností byl realizován takto: Ze všech možných cest uvažovaných pro daný děj, byla vybrána cesta obsahující tranzitní stav s nejvyšší energií a odstraněna z výběru. Takto se pokračoval do okamžiku, kdy zbývala právě jediná cesta, která je proto energeticky nejvýhodnější.

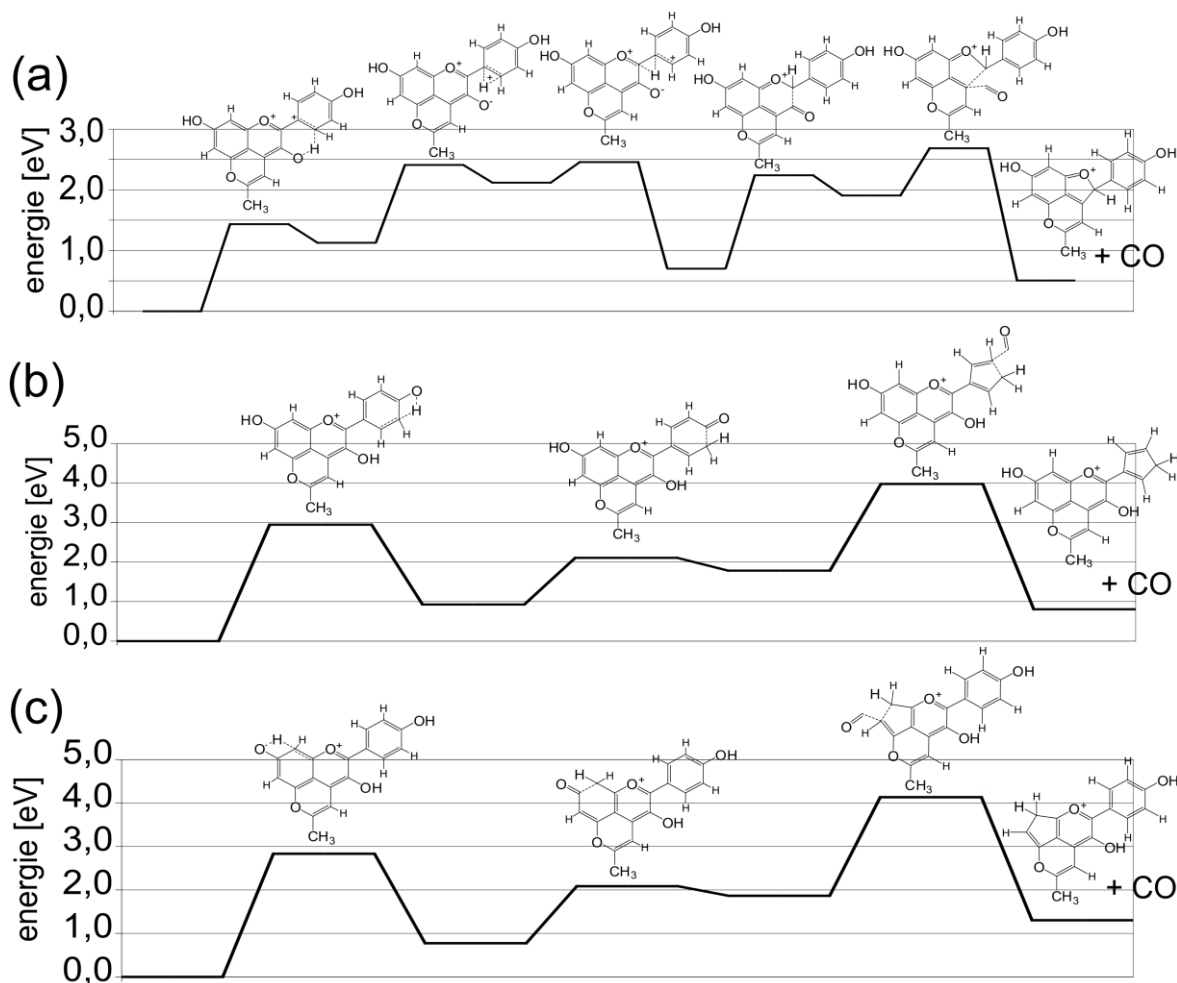


Obrázek 19. Minima pro polohy přesunů jednotlivých hydroxylových vodíků 5-mePyPg. (a) vodík C3 hydroxyly přesunutý na uhlík C2, (b) vodík C8 hydroxyly přesunutý na uhlík C9, (c) vodík C4' hydroxyly přesunutý na uhlík C5'.

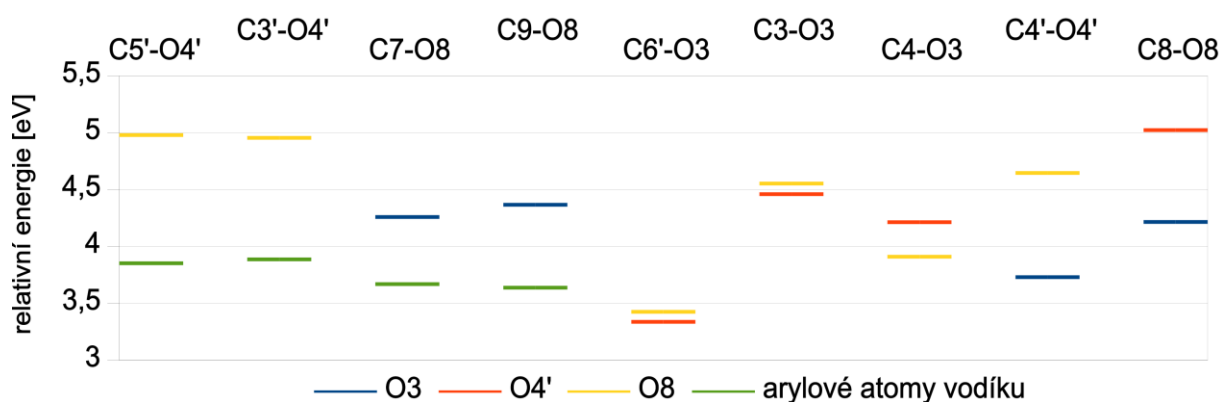
Pro ztrátu oxidu uhelnatého dojde po dosažení příslušného minima (viz obrázek 19) k prasknutí jedné z vazeb mezi karbonylovým uhlíkem, na němž se nachází odštěpovaný kyslík a sousedním atomem uhlíku. Tento děj je následován recyklizací, čímž vzniká pětičlenný kruh a následně je ze vzniklé struktury odštěpena molekula oxidu uhelnatého (schematicky vyjádřeno na obrázku 20). Srovnání všech tří možných cest (za ztráty atomů C3O3, C8O8 a C4'O4') je znázorněno na obrázku 20. Podle tohoto srovnání je energeticky nejvýhodnější cestou přesun vodíku z hydroxyly O3 a z termodynamického hlediska by tedy měla být preferována ztráta molekuly oxidu uhelnatého právě v této poloze. Rozdíl energií (vypočtený jako energie rodičovského iontu odečtená od sumy energií vzniklého fragmentu a oxidu uhelnatého) je v tomto případě 0,51 eV. Nejvyšším bodem na křivce popisující energie jednotlivých struktur, kterými rodičovský iont prochází, je tranzitní stav odpovídající vzniku pětičlenného kruhu (viz obrázek 20). Jeho energie je 2,69 eV. Pro porovnání byly energie stejného tranzitního stavu vypočítány i pro jinam přesunutý atom vodíku, konkrétně do pozic C4 a C6' (oproti původně uvažované pozici C2). V obou případech byly energie odpovídajících tranzitních stavů vyšší (5,27 eV a 5,04 eV pro C4, resp. C6') a jsou tedy energeticky méně výhodné.

V procesu eliminace molekuly vody z rodičovského iontu studovaného pyranobarviva je potřeba nejprve vytvořit H₂O skupinu přesunem vodíku na hydroxylovou skupinu (tuto H₂O

skupinu je možno následně odštěpit). To je možné provést s využitím vodíku z jiného hydroxyly nebo s využitím arylového vodíku. Bylo nalezeno devět různých párů těžkých atomů (C a O), které se mohou účastnit této výměny. Při každém z odpovídajících přesunů vodíku tento vodík pochází buď z jedné z ostatních hydroxylových skupin přítomných v molekule, nebo je arylovým vodíkem nacházejícím se na uhlíku sousedícím s uhlíkem, na který je navázán hydroxyl, který tento vodík přijímá (např. uhlíky C7 a C9 pro hydroxyl C8). Grafické srovnání tranzitních stavů popisujících závěrečný krok transferu vodíku znázorňuje obrázek 21.

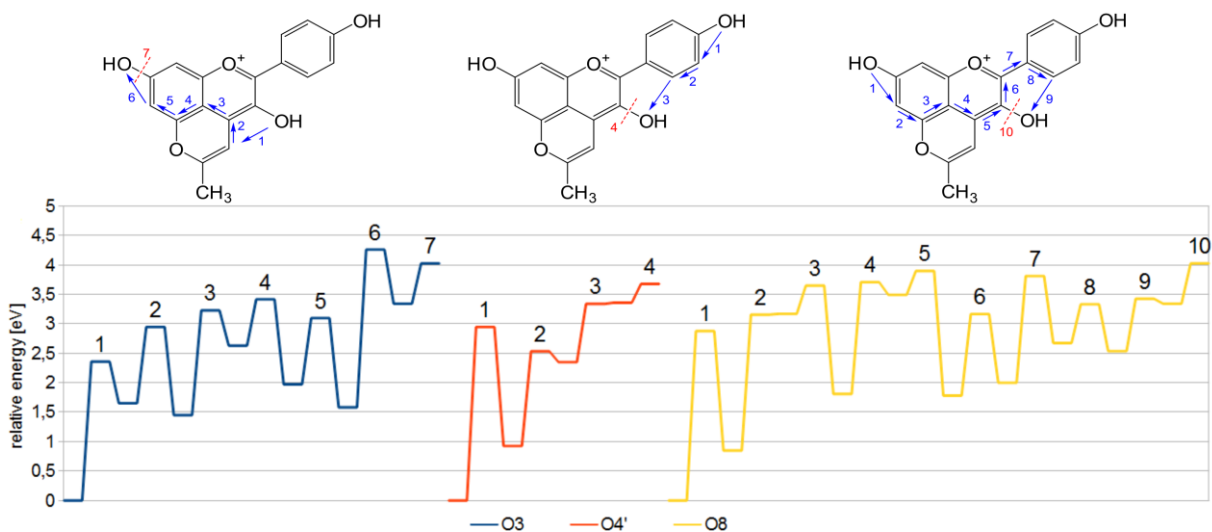


Obrázek 20. Srovnání fragmentačních cest vedoucích k odštěpení oxidu uhelnatého z rodičovského iontu 5-mePyPg.



Obrázek 21. Porovnání energetických hladin tranzitních stavů posledního kroku přesunu vodíku na hydroxyl pro odštěpení molekuly vody. Pro číslování atomů viz obrázek 17.

Bylo zjištěno, že přesun arylových vodíků vyžaduje méně energie, než poslední krok přesunu hydroxylových vodíků, pokud přesun probíhá pomocí stejných atomů (levá část grafu v obrázku 21). Vzhledem k tomu, že v případě arylových vodíků je to jediný potřebný krok, měl by být takový přesun preferován. Celkově nejnižší energie posledního kroku přesunu vodíku byla však nalezena pro přesun vodíku z hydroxylu O4' přes uhlík C6' na kyslík O3. Výše popsaným postupem (viz „výběr nejpravděpodobnější cesty“) byly postupně eliminovány jednotlivé možné fragmentační cesty, dokud nezůstala právě jedna pro každý hydroxylový atom vodíku. Tyto cesty jsou graficky znázorněny na obrázku 22. „Nejkratší možná cesta vodíku“ (přesun vodíku z hydroxylu O4' na hydroxyl O3) je současně nejvýhodnější ve smyslu energetické náročnosti jednotlivých tranzitních stavů. Při srovnání je energie jejího posledního kroku nižší i vůči energiím odpovídajícího procesu při transferu arylových vodíků. To znamená, že tato cesta je ve srovnání s procesy vycházejícími z arylových vodíků preferovaná.



Obrázek 22. Srovnání fragmentačních cest v 5-mePyPg vedoucích k odštěpení molekuly vody.

Shrnutím výše uvedených informací je, že jak ztráta oxidu uhelnatého, tak ztráta molekuly vody z 5-mePyPg se z energetického hlediska odehrává preferenčně na atomu C3. Ztrátou kyslíku z polohy C3 se v obou případech zároveň geometrie vznikajícího fragmentu planarizuje (oproti původní struktuře s vychýleným B-kruhem), což může být dalším z faktorů, který průběh prezentovaných mechanismů usnadňuje. Tyto výsledky byly publikovány v práci [46]. Pro získání výše uvedených informací bylo provedeno celkem zhruba 600 výpočtů energií tranzitních stavů a minim (odpovídá přibližně 1800 hodin výpočetního času při použití výpočetního serveru uvedeného v experimentální části).

5.6. Analýza anthokyaninů a jejich derivátů v jahodovém víně

Během fermentace ovocných nápojů probíhá mnoho reakcí nativních anthokyaninů s malými reaktivními molekulami [171]. V jahodách se z nativních anthokyaninů vyskytují ve významném množství především glykosidy a acylglykosidy Pg, kyanidinu (Cy) a delphinidinu (Dp), dále pak i samotné aglykony [172]. Jejich deriváty vznikající během fermentace a zrání jahodového vína byly analyzovány s využitím UHPLC-MS/MS. Pozornost byla zaměřena především na detekci a charakterizaci přítomných pyrano- a furanoanthokyaninů. Experimenty ukázaly, že UHPLC/MS poskytuje dostatečnou selektivitu pro charakterizaci

přítomných barviv. Pro chromatografickou separaci byla jako výchozí použita stejná metoda, která se osvědčila pro analýzu složení reakční směsi obsahující Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg. Bylo potřeba pouze upravit profil gradientu tak, aby bylo dosaženo lepší vzájemné rozlišení přítomných pigmentů. To vedlo k prodloužení analýzy (celková délka analýzy byla 10 minut). Prodloužení (zpomalení) analýzy ovšem umožnilo prodloužit délku MS skenů, použít MS^E experiment a případně přidat mezi skenovací události i cílené MS/MS skeny. Tímto způsobem byla získána většina spekter v dostatečné kvalitě i dostatečný počet bodů na pík umožňující kvantifikaci nalezených barviv (optimalizované parametry použité UHPLC/MS metody jsou uvedeny v experimentální části).

Tabulka 8. Anthokyaniny a jejich deriváty nalezené v jahodovém víně.

RT [min]	MS m/z	dtm* [mDa]	charakteristické fragmenty [†]	sloučenina [‡]
0,89	465,1205	17,2	303,0508 (100); 285,0306 (28); 275,0213 (36); 257,0213 (27); 247,0332 (6); 241,0199 (4); 231,0310 (14) ^a	Dp-Glu
1,10	449,1079	-0,5	287,0585 (100); 245,1137 (8); 185,0270 (6) ^b	Cy-Glu
1,13	579,1714	0,0	271,0588 (100); 139,0382 (1); 121,0301 (0,6) ^a	Pg-Rut ^d
1,14	647,1589	-2,3	647,1582 (34); 339,0497 (100) ^b	5-cbxPyPg-Rut ^d
1,17	433,1143	0,8	271,0588 (9); 253,0476 (3); 213,0531 (9); 197,0587 (27); 169,0631 (19); 141,0678 (53); 121,0252 (100); 115,0518 (66); 93,0316 (16) ^a	Pg-Glu
1,25	501,1028	-0,5	339,0464 (100); 311,0595 (1); 295,0617 (3); 283,0652 (1) ^a	5-cbxPyPg-Glu
1,31	487,1237	-0,3	325,0675 (100); 297,0741 (3); 283,0578 (1); 255,0647 (1); 213,0531 (1); 153,0140 (1); 121,0252 (1) ^a	5-mePyCy-Glu
1,36	457,1112	-2,3	457,1139 (17); 295,0617 (100) ^b	PyPg-Glu
1,36	587,1029	-0,8	339,0464 (100); 295,0617 (19) ^b	5-cbxPyPg-malGlu
1,41	519,1136	-0,3	271,0588 (100) ^b	Pg-malGlu
1,45	617,1889	1,9	309,0769 (100) ^a	5-mePyPg-Rut ^d
1,46	303,0519	1,4	257,0409 (20); 229,0502 (57); 201,0545 (55); 153,0194 (100); 137,0234 (54) ^a	Dp
1,54	287,0547	-0,9	269,0474 (9); 241,0347 (36); 231,0465 (9); 213,0290 (95); 185,0227 (25); 171,063 (28); 157,0208 (47); 136,9738 (59) ^a	Cy
1,54	471,1279	-1,2	309,0769 (100); 293,0487 (1); 2291,0650 (1); 281,0863 (3); 253,0823 (3); 121,0301 (2) ^a	5-mePyPg-Glu
1,73	339,0494	-1,1	295,0542 (100); 267,0646 (33); 239,0708 (69); 237,0576 (62); 121,0252	5-cbxPyPg

			(36); 120,0766 (38) ^a	
1,80	325,0703	-0,9	n.d. ^c	5-mePyCy
1,84	271,0607	0,1	253,0476 (5); 243,0616 (6); 226,0616 (6); 213,0531 (7); 197,0587 (31); 169,0631 (22); 141,0678 (47); 121,0301 (100); 115,0518 (30); 93,0316 (15) ^a	Pg
1,87	325,0701	-1,1	n.d. ^c	4-meFuCy
1,96	473,1065	-1,9	311,0518 (100) ^b	5-OHMePyPg-Glu
2,04	695,1965	-1,1	387,0898 (100) ^b	5-p-hydroxyfenyl-PyPg-Rut ^d
2,12	295,0592	-1,4	n.d. ^c	PyPg
2,16	549,1398	0,1	387,0898 (100); 359,0932 (1); 331,0984 (1) ^b	5-p-hydroxyfenyl-PyPg-Glu
2,23	309,0750	-1,3	309,0769 (100); 291,0650 (5); 281,0789 (5); 266,0529 (5); 235,0730 (6); 221,0571 (5); 189,0734 (5); 165,0697 (6); 131,0469 (11); 121,0252 (5) ^a	5-mePyPg
2,23	579,1487	-1,6	417,0954 (100); 402,0684 (22); 271,0554 (3) ^a	5-guajakol-PyPg-Glu
2,24	635,1401	0,0	387,0851 (100); 359,0926 (18); 331,0967 (11); 313,0864 (5) ^a	5-p-hydroxyfenyl-PyPg-malGlu
2,45	309,0744	-1,9	309,0769 (100); 281,0789 (11); 253,0892 (6); 169,0688 (9); 165,0697 (12); 137,0591 (7); 121,0301 (11) ^a	4-meFuPg
2,87	387,0858	-1,1	359,0932 (100); 331,0905 (92); 313,0792 (61); 237,0576 (46) ^b	5-p-hydroxyfenyl-PyPg

* dtm = odchylka od teoretické hmoty (z angl. „difference from theoretical mass“)

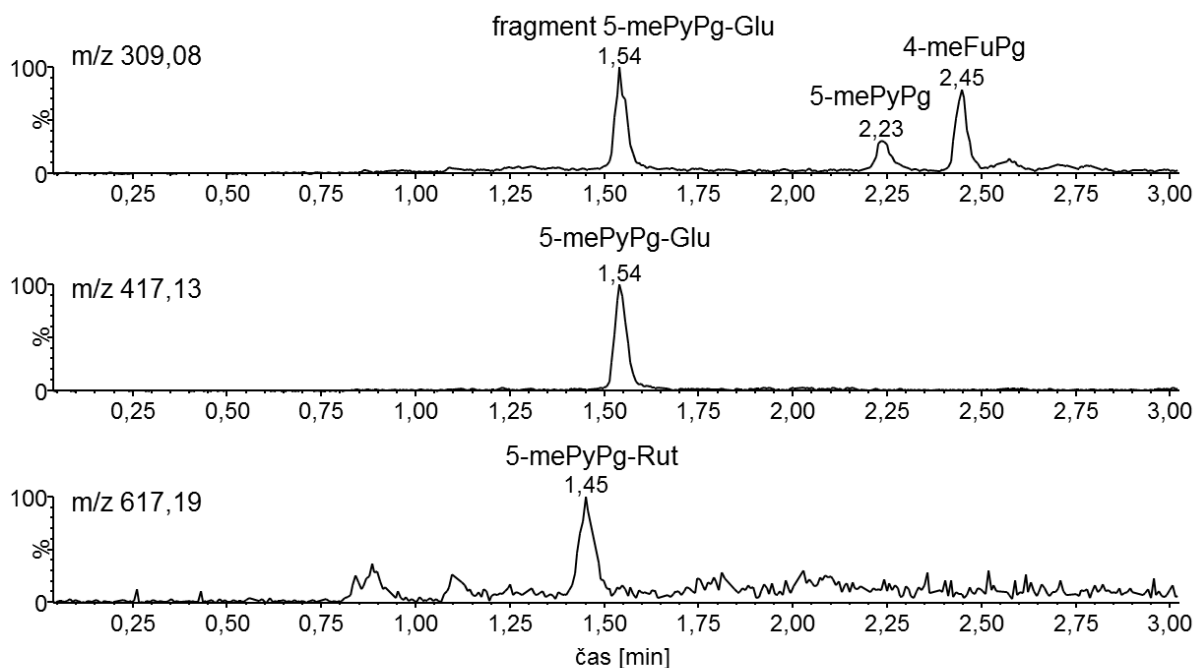
† Fragменты získané pomocí (a) cílených MS/MS experimentů (CE 35 eV), (b) MS^E skenu s rampou kolizní energie (CE 15-70 eV), nebo (c) bez detekce charakteristických fragmentů – sloučeniny byly vzhledem k malé kvalitě fragmentačních spekter identifikovány pouze na základě retenčního času a měření přesné a správné hodnoty m/z.

‡ Identifikace sloučenin: Dp = delfinidin, Cy = kyanidin, Pg = pelargonidin, cbx = karboxyl, me = methyl, OH = hydroxy, Py = pyrano, Fu = furano, mal = malonyl, Glu = 3-O-glukosid, Rut = 3-O-rhamnosylglukosid (rutinosid).

Tabulka 8 uvádí barviva odvozená od anthokyaninů, která byla nalezena v připraveném jahodovém víně. Identifikace je založena na kombinaci retenčního času, měření přesné a správné hodnoty m/z, fragmentaci rodičovského iontu (MS/MS či MS^E) a v případě Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg také na srovnání s připravenými standardy. Dominantním procesem pozorovaným v MS/MS spektrech nalezených glykosidů jsou ztráty dehydratované glukózy

(Δ m/z 162), rutinózy (Δ m/z 308) a malonylglukózy (Δ m/z 248). Pozorované charakteristické procesy pro fragmentace aglykonů zahrnují ztráty methyly (Δ m/z 15), vody (Δ m/z 18), oxidu uhelnatého (Δ m/z 28) a RDA štěpení. S využitím znalosti fragmentace anthokyanidinů v oblasti malých ztrát [125], byly identifikovány aglykony a glukosidy Pg, Cy a Dp. Obsah glukosidů je obecně vyšší než obsah aglykonů (pro Pg viz tabulka 9). V případě Pg (jako dominantního anthokyanidinu) byl identifikován také jeho malonylglukosid. Byl pozorován také výskyt látky, která pravděpodobně odpovídá rutinosidu odvozenému od pelargonidinu. Retence této látky je ve srovnání s dříve publikovanými daty nižší [55], ale naměřená hodnota m/z je identická s elementárním složením uvažovaného rutinosidu a signál aglykonu v MS/MS spektru této látky odpovídá pelargonidinu. Rozdíl v retenci by mohl být způsoben odlišnými chromatografickými podmínkami (použití kolony AQUA C18 a trifluoroctové kyseliny jako aditiva ve výše citované práci oproti koloně Acquity BEH C18 a kyselině mravenčí v naší studii). V průběhu studie byly i pro další čtyři látky předběžně určené jako rutinosidy pozorovány kratší retenční časy než u odpovídajících glukosidů, viz níže).

Jak již bylo naznačeno, byla v analyzovaném víně vedle nativních anthokyaninů nalezena i řada pyranoanthokyaninů. Jednoznačně byly ve směsi identifikovány 5-mePyPg, 4-meFuPg a 5-mePyPg-3-O-glukosid. Struktura barviva s m/z 617,1889 byla vzhledem k výše diskutovaným rozdílům v retenci předběžně připsána 5-mePyPg-3-O-rutinosidu. Separace těchto látek v jahodovém víně je uvedena v obrázku 23.



Obrázek 23. Separace 5-mePyPg, jeho glykosidů a 4-meFuPg v jahodovém víně (izolační šířka 10 mDa).

Ve směsi nebyly vedle 5-mePyPg-Glu nalezeny další glykosidy s m/z hodnotou 471. 4-meFuPg tedy netvoří odpovídající glykosid. Logickým vysvětlením je že, O3 kyslík (který je preferenčním místem glykosylace anthokyaninů) je blokován přítomným furano-kruhem. Přítomnost aglykonu 4-meFuPg je tedy zřejmě výsledkem přesmyku ve struktuře aglykonu 5-mePyPg, tak jak je popisována v literatuře [51]. Ve směsi byly dále nalezeny 5-karboxypyranopelargonidin (analog vitisinu A [173]), jeho 3-O-glukosid, 3-O-malonylglukosid, 3-O-rutinosid, pyranopelargonidin-3-O-glukosid (analog vitisinu B [173]), jeho aglykon a také stopy 5-hydroxypyranopelargonidin-3-O-glukosidu (derivát typu oxovitisinu [17]). Jako zástupci složitějších pyranoanthokyaninů byly ve směsi nalezeny 5-*p*-hydroxyfenyl-PyPg, jeho 3-O-glukosid, 3-O-malonylglukosid, 3-O-rutinosid a 5-guajakol-PyPg-3-O-glukosid. Tvorba guajakolových derivátů je popsána v jahodových džusech uměle obohacených kyselinou ferulovou (která může dekarboxylovat v reakční činidlo, jímž je vinylguajakol) [26], což nepřímo potvrzuje i naše výsledky. Ve víně byla nalezena také malá množství některých pyrano- a furanoderivátů kyanidinu. Jejich MS/MS spektra neposkytla dostatečně intenzivní signály, a proto je jejich identifikace založená na porovnání retenčních

časů a přesném a správné hodnotě m/z. V tomto místě je vhodné zmínit, že vedle předkládané práce se identifikací anthokyaninových barviv ve fermentovaných produktech z jahod zabývali ve své práci pouze Hornedo-Ortega a kol. [174]. Jejich práce zkoumá produkty fermentace jahodových pyré pomocí bakterie *Gluconobacter japonicus*. Toto kvašení způsobuje přeměnu glukózy na kyselinu glukonovou a výsledné produkty jsou tak vhodné ke konzumaci např. pro diabetiky. Kromě flavonoidů již dříve zmiňovaných s ohledem na jejich výskyt v jahodách, byl v těchto produktech nalezen 5-cbxPyPg-Glu, ale ne 5-mePyPg, jeho glykosidy, ani 4-meFuPg. Tím pádem jsou 4-meFuPg, 5-mePyPg, jeho 3-O-glukosid a (předběžně identifikovaný) 3-O-rutinosid v předkládané disertační práci identifikovány jako součást fermentovaného produktu z jahod vůbec poprvé.

Tabulka 9 ukazuje změny v obsahu Pg, jeho 3-O-glukosidu a vybraných pyrano- a furanoderivátů v připraveném jahodovém víně. Obsah Pg-Glu je řádově vyšší než obsah pyrano- a furanoanthokyaninů. Tento anthokyanin dominoval v jahodovém víně v celém průběhu jeho přípravy i ve finálním produktu, jeho obsah však v čase klesal. Tento pokles může být vysvětlen třemi procesy: deglykosylace (ztráta cukerné jednotky), rozklad na *p*-hydroxybenzoovou kyselinu a floroglucinaldehyd mechanismy, které jsou již známy z literatury [175], a přeměnou v komplexnější barviva včetně nalezených pyranoanthokyaninů a furanopelargonidinu. Obsah 5-mePyPg-Glu se v průběhu fermentace významně neměnil. Obsah jemu odpovídajícího aglykonu prošel zhruba v polovině doby fermentace maximem a obsah 4-meFuPg se téměř po celou dobu zvyšoval. Vysvětlením pro pozorované chování látek by mohla být vzájemná konverze jednotlivých forem: deglykosylace 5-mePyPg-Glu, kterou vzniká 5-mePyPg, a jeho následný přesmyk za vzniku 4-meFuPg. Obsah 5-mePyPg-Glu a 5-mePyPg ve směsi se výrazně nemění. Možným vysvětlením je, že dochází ke srovnatelně rychlému přírůstku obsahů těchto barviv přeměnou počátečního Pg-Glu a Pg a úbytku vlivem přeměny na 4-meFuPg. Obsah 5-cbxPyPg-Glu se rychle zvýšil na začátku zrání (během prvních 24 hodin – jahodové víno během této doby viditelně kvasilo nejvíce) a od té chvíle zůstal prakticky konstatní, podobně jako tomu bylo u 5-mePyPg-Glu. Obsah aglykonu 5-cbxPyPg dosahuje maxima během prvních šesti dnů studie a jeho celkový obsah se během celého experimentu zvýšil zhruba pětikrát. Celý proces zrání má za následek nárůst sumy obsahu pozorovaných pyrano- a furanoanthokyaninů, což je velmi pravděpodobně spojeno s probíhajícími fermentačními procesy (tvorba kyseliny octové, acetonu, kyseliny

pyrohroznové aj.).

Tabulka 9. koncentrace vybraných sloučenin v jahodovém víně.

sloučenina	průměrná koncentrace [µg/L]*							
	stáří směsi [dny]	Pg	Pg-Glu	5-mePyPg	4-meFuPg	5-mePyPg-Glu	5-cbxPyPg	5-cbxPyPg-Glu
	0	152,37	47291,67	11,70	6,19	31,52	1,55	133,84
	1	3038,82	30253,13	15,39	7,33	39,10	1,55	250,45
	2	2757,86	21955,71	21,23	9,61	38,38	5,53	252,32
	3	1247,30	22915,50	17,30	7,18	42,62	4,23	291,80
	4	1040,99	21128,79	32,57	12,67	37,90	9,57	269,86
	5	2635,38	16769,71	35,65	15,36	40,87	12,05	269,96
	6	4711,09	12124,85	44,34	13,69	27,95	19,57	210,81
	7	2624,13	14445,75	27,39	11,34	35,55	5,73	271,10
	14	2448,32	11587,90	26,96	17,51	38,07	11,52	284,13
	21	476,53	9489,52	13,94	17,07	40,82	6,80	285,12
	28	132,45	4979,02	11,71	14,53	36,73	5,18	173,74
	35	86,47	5063,77	12,33	15,95	34,04	8,11	248,29

* Koncentrace všech látek jsou vyjádřeny jako ekvivalenty PgCl.

6. Závěr

V rámci předkládané práce byla provedena semisyntéza dvou anthokyaninových barviv – 5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu. Byl sledován vývoj obsahu těchto barviv v reakční směsi v čase a následně provedena izolace obou látek pomocí optimalizované semipreparativní HPLC metody. Zvolené chromatografické podmínky umožňují izolovat 10 mg každého izomeru za 24 hodin. Byly vyvinuty analytické UHPLC/PDA a UHPLC/MS metody pro rychlou kontrolu směsi s ohledem na obsah původního anthokyaninu (pelargonidinu) a obou vznikajících derivátů. Všechny tři látky lze pomocí UHPLC/MS separovat za 35 sekund. Přechištěné izomery byly detailně studovány

pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Mezi významné fragmentační procesy pozorované při MS/MS experimentech patří dehydrogenace, eliminace methanu, vody, oxidu uhelnatého a retro-Diels-Alderovské štěpení. Pro pozorované fragmenty byla zjištěna jejich optimální kolizní energie, tj. kolizní energie poskytující v MS/MS největší relativní výtěžek příslušných iontů. Pro všechny významné fragmenty v MS/MS spektru 5-methylpyranopelargonidinu i 4-methylfuranopelargonidinu se optimální kolizní energie pohybuje v rozmezí 25-55 eV. Rovněž systém vkládání kolizní energie (konstantní / použití rampy energie) ovlivňuje do značné míry vzhled fragmentačního spektra. Kolizní spektra obou izomerů jsou rozdílná co do intenzit fragmentů vznikajících výše uvedenými procesy. Vznik fragmentů ztrátou molekuly vodíku, molekuly vody, molekuly methanu a dvou molekul oxidu uhelnatého je preferován v MS/MS spektru pyranoderivátu. RDA štěpení za vzniku $^{0,2}B^+$ iontu je naproti tomu preferováno v MS/MS spektru furanoderivátu. Tyto výsledky byly porovnány s daty získanými pomocí výpočetních DFT metod. V rámci výpočtů byla optimalizována geometrie základního stavu iontů studovaných látek v plynné fázi a vypočtena energie zkoumaných fragmentů. Bylo zjištěno, že vypočtené hodnoty reflektují experimentálně pozorované rozdíly mezi fragmentačními spektry obou látek. Při porovnání fragmentačních spekter naměřených za shodných podmínek je pozorována vyšší intezita fragmentů u toho z izomerů, jehož fragment má nižší energetickou hodnotu (a je tedy stabilnější). Pro ion 5-methylpyranopelargonidinu byla dále provedena rozsáhlejší studie, kdy byly pomocí výpočtu energií tranzitních stavů nalezeny optimální fragmentační cesty vedoucí k odštěpení molekuly vody a molekuly oxidu uhelnatého. Jako preferovaná se v obou případech jeví taková ztráta, kdy vzniká planární fragmentový ion. Obě studované látky (5-mePyPg a 4-meFuPg) byly nalezeny v ovocném víně laboratorně připraveném fermentací jahod. S využitím optimalizované UHPLC/MS metody byl detailně popsán profil anthokyaninů a jejich derivátů v tomto ovocném víně a změny v koncentracích majoritního pelargonidinu, odpovídajícího glukosidu i přítomných pyrano- a furanoderivátů během fermentace.

Výsledky prezentované v této disertační práci byly publikovány ve dvou impaktovaných časopisech a rukopis další práce je v recenzním řízení. Výsledky těchto studií byly formou plakátových sdělení prezentovány na domácích i mezinárodních konferencích.

7. Seznam zkratek

4-meFuPg – 4-methylfuranopelargonidin

5-mePyMvGlu – 5-methylpyranomalvidin-3-O-glukosid

5-mePyPg – 5-methylpyranopelargonidin

angl. – anglicky

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

API – ionizace za atmosférického tlaku

BAR – pravidlo aktivace vazeb

BO – Born-Oppenheimer

BDE – vazebná disociační energie

cbx – karboxy-

CC – vázané klastry

CD – cirkulární dichroismus

CE – kolizní energie

CI – konfigurační interakce

CID – kolizí indukovaná disociace

COSY – korelační spektroskopie

Cy - kyanidin

DFT – teorie funkcionálu hustoty

Dp - delfinidin

DPPH – metoda stanovení antioxidační aktivity pomocí 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu

dtm – odchylka od teoretické hmoty

ESI – ionizace elektrosprejem

FRAP – antioxidační potenciál pro redukci Fe^{3+} iontů („ferric reducing antioxidant potential“)

HF – Hartree-Fock (*ab initio* výpočetní metoda)

HILIC – chromatografie hydrofilních interakcí

HMBC – heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy (2D NMR technika sledující interakce atomů různého druhu přes více vazeb)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HSQC – heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy (2D NMR technika sledující interakce atomů různého druhu sousedících přes jednu vazbu)

IČ – infračervená (spektroskopie)

IE – ionizační energie

IRMPD – infračervená multifotonová disociační spektroskopie

LC – kapalinová chromatografie

LDA – lokální aproximace hustoty

MALDI – matricí asistovaná laserová desorpční ionizace

me – methyl-

MP - Møller-Plesset (*ab-initio* výpočetní metoda zahrnující elektronovou korelaci)

MS – hmotnostní spektrometrie

NMR – nukleární magnetická rezonance

OCE – optimální kolizní energie

OH – hydroxy-

PA – protonová afinita

PCM – model polarizovaného kontinua

PDE – disociační energie protonu

PFP – pentafluorfenyl

Pg – pelargonidin

Pn – peonidin

Pt – petunidin

RDA – retro-Diels-Alderovo štěpení

ROESY - rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy (2D NMR technika sledující interakce atomů, které jsou ve vzájemné blízkosti, ale ne vzájemně vázány)

ROHF – restricted open-shell Hartree-Fock (varianta HF metody pro systémy s otevřenou slupkou minimalizující spin systému)

RSD – relativní směrodatná odchylka

SCF – self-consistent field

SIM, SIR – selektivní záznam iontu

SPE – extrakce pevnou fází

TDDFT – časově-závislé DFT metody

TFA – kyselina trifluoroctová

TIC – celkový iontový proud

TLC – tenkovrstevná chromatografie

UHPLC – ultraúčinná kapalinová chromatografie

XIC – extrahovaný iontový proud

ZIC-HILIC – zwitteriontová hydrofilní interakční chromatografie

ZPVE – vibrační energie nulového bodu

8. Literatura

- [1] R. Bentley, E. Haslam, The shikimate pathway – A metabolic tree with many branches, *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, 25 (1990) 307–384.
- [2] C. Santos-Buelga, G. Williamson, *Methods in polyphenol analysis*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2003, 340.
- [3] O. M. Andersen, M. Jordheim, Basic anthocyanin chemistry and dietary sources, in: T. C. Wallace, M. M. Giusti (editors), *Anthocyanins in Health and Disease*, CRC Press, Boca Raton, 2014, 13–90.
- [4] A. Smeriglio, D. Barreca, E. Bellocco, D. Trombetta, Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins, *Phytother. Res.* 30 (2016) 1265–1286.
- [5] A. Castañeda-Ovando, Ma. de Lourdes Pacheco-Hernández, Ma. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez, C. Andrés Galán-Vidal, Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chem.* 113 (2009) 859–871.
- [6] R. N. Cavalcanti, D. T. Santos, M. A. A. Meireles, Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview, *Food Res. Int.* 44 (2011) 499–509.
- [7] P. Furtado, P. Figueiredo, H. C. das Neves, F. Pina, Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 75 (1993) 113–118.
- [8] G. T. Sigurdson, R. J. Robbins, T. M. Collins, M. M. Giusti, Evaluating the role of metal ions in the bathochromic and hyperchromic responses of cyanidin derivatives in acidic and alkaline pH, *Food Chem.* 208 (2016) 26–34.
- [9] M. J. Eiro, M. Heinonen, Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 7461–7466.
- [10] C. L. Zhao, Z. J. Chen, X. S. Bai, C. Ding, T. J. Long, F. G. Wei, K. R. Miao, Structure–activity relationships of anthocyanidin glycosylation, *Mol. Divers.* 18 (2014) 687–700.
- [11] C.-L. Zhao, Y.-Q. Yu, Z.-J. Chen, G.-S. Wen, F.-G. Wei, Q. Zheng, C.-D. Wang, X.-L. Xiao, Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation, *Food Chem.* 214 (2017) 119–128.
- [12] M. Yoshimoto, S. Okuno, M. Yamaguchi, O. Yamakawa, Antimutagenicity of deacylated

anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato, *Biosci. Biotechnol. Biochem* 65 (2001) 1652–1655.

[13] J. Bakker, P. Bridle, T. Honda, H. Kuxvano, N. Saito, N. Terahara, C. F. Timberlake, Identification of an anthocyanin occurring in some red wines, *Phytochemistry* 44 (1997) 1375–1382.

[14] H. Fulcrand, C. Benabdeljalil, J. Rigaud, V. Cheynier, M. Moutounet, A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins, *Phytochemistry* 47 (1998) 1401–1407.

[15] J. Bakker, C. F. Timberlake, Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 35–43.

[16] J. Oliveira, N. Mateus, J. E. Rodriguez-Borges, E. J. Cabrita, A. M. S. Silva, V. de Freitas, Synthesis of a new pyranoanthocyanin dimer linked through a methyl-methine bridge, *Tetrahedron Lett.* 52 (2011) 2957–2960.

[17] J. He, J. Oliveira, A. M. S. Silva, N. Mateus, V. de Freitas, Oxovitisins: A new class of neutral pyranone-anthocyanin derivatives in red wines, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8814–8819.

[18] H. Fulcrand, P.-J. Cameira dos Santos, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, J. Favre-Bonvin, Structure of new anthocyanin-derived wine pigments, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1996) 735–739.

[19] N. Mateus, A. M. S. Silva, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, V. de Freitas, A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1919–1923.

[20] J. Oliveira, V. de Freitas, N. Mateus, A novel synthetic pathway to vitisin B compounds, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 3933–3935.

[21] A. Morata, F. Calderón, M. C. González, M. C. Gómez-Cordovés, J. A. Suárez, Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde, *Food Chem.* 100 (2007) 1144–1152.

[22] A. Morata, C. González, J. Antonio Suárez-Lepe, Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids *Int. J. Food Microbiol.* 116 (2007) 144–152.

- [23] D. Blanco-Vega, F. J. López-Bellido, J. M. Alía-Robledo, I. Hermosín-Gutiérrez, HPLC-DAD-ESI-MS/MS characterization of pyranoanthocyanins, pigments formed in model wine, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 9523–9531.
- [24] C. Romero, J. Bakker, Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin and colour evolution, *Int. J. Food Sci. Tech.* 35 (2000) 129-140.
- [25] A. Marquez, M. P. Serratos, J. Merida, Pyranoanthocyanin derived pigments in wine: Structure and formation during winemaking, *Journal of Chemistry* 2013, Article ID 713028, 15 pages.
- [26] M. J. Rein, V. Ollilainen, M. Vahermo, J. Yli-Kauhaluoma, M. Heinonen, Identification of novel pyranoanthocyanins in berry juices, *Eur. Food Res. Technol.* 220 (2005) 239–244.
- [27] M. Rentzsch, P. Quast, S. Hillebrand, J. Mehnert, P. Winterhalter, Isolation and identification of 5-carboxy-pyranoanthocyanins in beverages from cherry (*Prunus cerasus* L.), *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8 (2007) 333–338.
- [28] M. Jordheim, K. Aaby, T. Fossen, G. Skrede, Ø. M. Andersen, Molar absorptivities and reducing capacity of pyranoanthocyanins and other anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 10591–10598.
- [29] Y. Lu, Y. Sun, L. Y. Foo, Novel pyranoanthocyanins from black currant seed, *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 5975–5978.
- [30] M. Schwarz, P. Winterhalter, A novel synthetic route to substituted pyranoanthocyanins with unique colour properties, *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 7583–7587.
- [31] P. Sarni-Manchado, H. Fulcrand, J.-M. Souquet, V. Cheynier, M. Moutounet, Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments, *J. Food Sci.* 61 (1996) 938–941.
- [32] C. Alcalde-Eon, M. T. Escribano-Bailón, C. Santos-Buelga, J. C. Rivas-Gonzalo, Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 305–318.
- [33] J. Azevedo, J. Oliveira, L. Cruz, N. Teixeira, N. F. Brás, V. de Freitas, N. Mateus, Antioxidant features of red wine pyranoanthocyanins: experimental and theoretical Approaches, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 7002–7009.
- [34] P. Marhol, P. Bednář, E. Tománková, B. Papoušková, J. Stávek, P. Híc, P. Barták V. Křen,

- J. Balík, Preparative purification and isolation of pyranoanthocyanins from red wine and evaluation of their antioxidant activity, *Chromatographia* 76 (2013) 1107–1115.
- [35] M. García-Alonso, G. Rimbach, J. C. Rivas-Gonzalo, S. de Pascual-Teresa, Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins as studied in platelets, monocytes, and human endothelial cells, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3378–3384.
- [36] M. Duenas, H. Fulcrand, V. Cheynier, Formation of anthocyanin–flavanol adducts in model solutions, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 15–25.
- [37] C. F. Timberlake, P. Bridle, Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines, *Am. J. Enol. Vitic.* 27 (1976) 97–105.
- [38] F. Weber, P. Winterhalter, Synthesis and structure elucidation of ethylen-linked anthocyanin - flavan-3-ol oligomers, *Food Res. Int.* 65 (2014) 69–76.
- [39] P. M. Aron, J. A. Kennedy, Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity, *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (2008) 79–104.
- [40] J. He, C. Santos-Buelga, A. M. S. Silva, N. Mateus, V. de Freitas, Isolation and structural characterization of new anthocyanin-derived yellow pigments in aged red wines, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9598–9603.
- [41] R. Myjavcová, P. Marhol, V. Křen, V. Šimánek, J. Ulrichová, I. Palíková, B. Papoušková, K. Lemr, P. Bednář, Analysis of anthocyanin pigments in *Lonicera* (*Caerulea*) extracts using chromatographic fractionation followed by microcolumn liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7932–7941.
- [42] Y. Lu, L. Y. Foo, Unusual anthocyanin reaction with acetone leading to pyranoanthocyanin formation, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 1371–1373.
- [43] M. del P. Guzmán-Figueroa, A. E. Ortega-Regules, A. B. Bautista-Ortín, E. Gómez-Plaza, C. Anaya-Berrios, New pyranoanthocyanins synthesized from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanins, *J. Mex. Chem. Soc.* 60 (2016) 13–18.
- [44] J. Oliveira, M. A. da Silva, N. Teixeira, V. de Freitas, E. Salas, Screening of anthocyanins and anthocyanin-derived pigments in red wine grape pomace using LC-DAD/MS and MALDI-TOF techniques, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 7636–7644.
- [45] O. Kurka, R. Myjavcová, P. Bednář, Možnosti přípravy vybraných kondenzovaných anthokyaninů v modelových podmínkách a studium jejich vlastností, *Chem. Listy* 105 (2011)

37-39.

- [46] O. Kurka, J. Roithová, P. Bednář, Examination of small molecule losses in 5-methylpyranopelargonidin MS/MS CID spectra by DFT calculations, *J. Mass Spectrom.* 49 (2014) 1314–1321.
- [47] R. Myjavcová, P. Bednář, A. Srovnalová, Z. Dvořák, B. Papoušková, Ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry study of metabolism of 5-methylpyranopelargonidin, *Chromatographia* 78 (2015) 189–201.
- [48] J. Oliveira, V. Petrov, A. J. Parola, F. Pina, J. Azevedo, N. Teixeira, N. F. Brás, P. A. Fernandes, N. Mateus, M. J. Ramos, V. de Freitas, Chemical behavior of methylpyranomalvidin-3-O-glucoside in aqueous solution studied by NMR and UV - visible spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 1538–1545.
- [49] J. Oliveira, N. Mateus, V. de Freitas, Synthesis of a new bluish pigment from the reaction of a methylpyranoanthocyanin with sinapaldehyde, *Tetrahedron Lett.* 52 (2011) 1996–2000.
- [50] J. Oliveira, P. Araújo, A. Fernandes, N. Mateus, V. de Freitas, Synthesis and structural characterization of amino-based pyranoanthocyanins with extended electronic delocalization, *Synlett* 27 (2016) 2459-2462.
- [51] Y. Lu, L. Y. Foo, Unexpected rearrangement of pyranoanthocyanidins to furoanthocyanidins, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 715–718.
- [52] Z. Zhu, N. Wu, M. Kuang, O. Lamikanra, G. Liu, S. Li, J. He, Preparation and toxicological evaluation of methyl pyranoanthocyanin, *Food Chem. Toxicol.* 83 (2015) 125–132.
- [53] H. Wang, E. J. Race, A. J. Shrikhande, Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1839–1844.
- [54] A. Marquez, M. Dueñas, M. P. Serratos, J. Merida, Formation of vitisins and anthocyanin–flavanol adducts during red grape drying, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 6866–6874.
- [55] F. L. da Silva, M. T. Escribano-Bailón, J. J. P. Alonso, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, Anthocyanin pigments in strawberry, *LWT* 40 (2007) 374–382.
- [56] G. J. McDougall, P. Dobson, P. Smith, A. Blake, D. Stewart, Assessing potential

bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5896–5904.

[57] T. Otsuki, H. Matsufuji, M. Takeda, M. Toyoda, Y. Goda, Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus* L.), *Phytochemistry* 60 (2002) 79–87.

[58] J. Lachman, K. Hamouz, Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition – a review, *Plant Soil Environ.* 51 (2005) 477–482.

[59] H. Li, Z. Deng, H. Zhu, C. Hu, R. Liu, J. C. Young, R. Tsao, Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities, *Food Res. Int.* 46 (2012) 250–259.

[60] D. Kammerer, R. Carle A. Schieber, Detection of peonidin and pelargonidin glycosides in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *Atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2407–2412.

[61] M.-G. Choung, B.-R. Choi, Y.-N. An, Y.-H. Chu, Y.-S. Cho, Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7040–7043.

[62] U. A. Fischer, R. Carle, D. R. Kammerer, Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSⁿ, *Food Chem.* 127 (2011) 807–821.

[63] M. Duenas, J. J. Pérez-Alonso, C. Santos-Buelga, T. Escribano-Bailón, Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.), *J. Food Comp. Anal.* 21 (2008) 107–115.

[64] Y.-Z. Cai, J. Xing, M. Sun, Z.-Q. Zhan, H. Corke, Phenolic antioxidants (hydrolyzable tannins, flavonols, and anthocyanins) identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from *Rosa chinensis* flowers, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 9940–9948.

[65] T. S. Lu, N. Saito, M. Yokoi, A. Shigihara, T. Honda, Acylated pelargonidin glycosides in the red-purple flowers of *Pharbitis nil*, *Phytochemistry* 31 (1992) 289–295.

[66] 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.* 214 (2002) 248–253.

[67] M. M. Giusti, L. E. Rodríguez-Saona, R. E. Wrolstad, Molar absorptivity and color

characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4631-4637.

[68] F. Tatsuzawa, N. Saito, N. Murata, K. Shinoda, A. Shigihara, T. Honda, 6-hydroxypelargonidin glycosides in the orange-red flowers of *Alstroemeria*, *Phytochemistry* 62 (2003) 1239-1242.

[69] F. Tatsuzawa, 7-O-Methylpelargonidin Glycosides from the Pale Red Flowers of *Catharanthus roseus*, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 1095-1097.

[70] M. M. Feuereisen, J. Hoppe, B. F. Zimmermann, F. Weber, N. Schulze-Kaysers, A. Schieber, Characterization of phenolic compounds in Brazilian Pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) exocarp, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 6219-6226.

[71] T. Fossen, S. Rayyan, Ø. M. Andersen, Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols, *Phytochemistry* 65 (2004) 1421-1428.

[72] Ø. M. Andersen, T. Fossen, K. Torskangerpoll, A. Fossen, U. Hauge, Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin, *Phytochemistry* 65 (2004) 405-410.

[73] K. Aaby, D. Ekeberg, G. Skrede, Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 4395-4406.

[74] J. Valls, S. Millán, M. P. Martí, E. Borràs, L. Arola, Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7143-7172.

[75] M. O. Downey, S. Rochfort, Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin, *J. Chromatogr. A* 1201 (2008) 43-47

[76] A. Soriano, P. M. Pérez-Juan, A. Vicario, J. M. González, M. S. Pérez-Coello, Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy, *Food Chem.* 104 (2007) 1295-1303.

[77] I. Regos, D. Treutter, Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*), *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6169-6177.

- [78] G. Mousavinejad, Z. Emam-Djomeh, K. Rezaei, M. H. H. Khodaparast, Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars, *Food Chem.* 115 (2009) 1274–1278.
- [79] I. Tomaz, L. Maslov, Simultaneous determination of phenolic compounds in different matrices using phenyl-hexyl stationary phase, *Food Anal. Methods* 9 (2016) 401–410.
- [80] A. Peña, V. Garcia, Ma. de la Luz Romero, S. Capella, Reversed-phase ion-pair chromatography of anthocyanins in red wines, *J. Chromatogr. Sci.* 35 (1997) 161–164.
- [81] C. Vergara, C. Mardones, I. Hermosín-Gutiérrez, D. von Baer, Comparison of high-performance liquid chromatography separation of red wine anthocyanins on a mixed-mode ion-exchange reversed-phase and on a reversed-phase column, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5710–5717.
- [82] R. Tsao, R. Yang, Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1018 (2003) 29–40.
- [83] A. de Villiers, D. Cabooter, F. Lynen, G. Desmet, P. Sandra, High performance liquid chromatography analysis of wine anthocyanins revisited: Effect of particle size and temperature, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3270–3279.
- [84] C. M. Willemse, M. A. Stander, A. de Villiers, Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins, *J. Chromatogr. A* 1319 (2013) 127–140.
- [85] Y. Sun, B. Xia, X. Chen, C. Duanmu, D. Li, C. Han, Rapid quantification of four anthocyanins in red grape wine by hydrophilic interaction liquid chromatography/triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 98 (2015) 1628–1631.
- [86] H. Jin, J. Zhao, W. Zhou, A. Shen, F. Yang, Y. Liu, Z. Guo, X. Zhang, Y. Tao, X. Peng, X. Liang, Preparative separation of a challenging anthocyanin from *Lycium ruthenicum* Murr. by two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography, *RSC Adv.* 5 (2015) 62134–62141.
- [87] C. M. Willemse, M. A. Stander, J. Vestner, A. G. J. Tredoux, A. de Villiers, Comprehensive two-Dimensional hydrophilic interaction chromatography (HILIC) × reversed-phase liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (RP-LC-UV-MS) analysis of anthocyanins and derived pigments in red wine, *Anal. Chem.* 87 (2015)

12006–12015.

- [88] L.-Z. Lin, J. Sun, P. Chen, J. Harnly, UHPLC-PDA-ESI/HRMS/MSⁿ analysis of anthocyanins, flavonol glycosides, and hydroxycinnamic acid derivatives in red mustard greens (*Brassica juncea* Coss variety), *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 12059–12072.
- [89] 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* 1235 (2012) 92–102.
- [90] L. Kučera, S. Fanali, Z. Aturki, T. Pospíšil, P. Bednář, Comparison of nano and conventional liquid chromatographic methods for the separation of (+)-catechin-ethylmalvidin-3-glucoside diastereoisomers, *J. Chromatogr. A* 1428 (2016) 126–133.
- [91] C. Fanali, L. Dugo, G. D’Orazio, M. Lirangi, M. Dachà, P. Dugo, L. Mondello, Analysis of anthocyanins in commercial fruit juices by using nano-liquid chromatography electrospray-mass spectrometry and highperformance liquid chromatography with UV-vis detector, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 150–159.
- [92] C. G. Grigoras, E. Destandau, S. Zubrzycki, C. Elfakir, Sweet cherries anthocyanins: An environmental friendly extraction and purification method, *Sep. Purif. Technol.* 100 (2012) 51–58.
- [93] T. Ichiyanagi, Y. Hatano, S. Matsugo, T. Konishi, Structural dependence of HPLC separation pattern of anthocyanins from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.), *Chem. Pharm. Bull.* 52 (2004) 628–630.
- [94] D. P. Adhikari, J. A. Francis, R. E. Schutzki, A. Chandra, M. G. Nair, Quantification and characterisation of cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory anthocyanins in fruits of *Amelanchier*, *Phytochem. Anal.* 16 (2005) 175–180.
- [95] A. L. S. Dias, E. Rozet, G. Chataigné, A. C. Oliveira, C. A. S. Rabelo, P. Hubert, H. Rogez, J. Quetin-Leclercq, A rapid validated UHPLC–PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits, *J. Chromatogr. B* 907 (2012) 108–116.
- [96] A. Antonioli, A. R. Fontana, P. Piccoli, R. Bottini, Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec, *Food Chem.* 178 (2015) 172–178.
- [97] X. Q. Chen, N. Nagao, T. Itani, K. Irifune, Anti-oxidative analysis, and identification and

quantification of anthocyanin pigments in different coloured rice, *Food Chem.* 135 (2012) 2783–2788.

[98] W. M. A. Niessen, *Liquid chromatography: Mass spectrometry*, Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006.

[99] I. Romero, M. T. Sanchez-Ballesta, M. I. Escribano, C. Merodio, Individual anthocyanins and their contribution to total antioxidant capacity in response to low temperature and high CO₂ in stored Cardinal table grapes, *Postharvest Biol. Tec.* 49 (2008) 1–9.

[100] H. Hernández, J. R. Cushnir, P. B. Farmer, J. H. Lamb, S. Naylor, A comparison of artefactual GC/MS responses with selected ion recording and multiple-reaction monitoring scan modes, *Rapid Commun. Mass Sp.* 10 (1996) 399–404.

[101] C. Zeigler, K. MacNamara, Z. Wang, A. Robbat Jr., Total alkylated polycyclic aromatic hydrocarbon characterization and quantitative comparison of selected ion monitoring versus full scan gas chromatography/mass spectrometry based on spectral deconvolution, *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) 109–116.

[102] K. Mori, N. Goto-Yamamoto, M. Kitayama, K. Hashizume, Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature, *J. Exp. Bot.* 58 (2007) 1935–1945.

[103] M. Bordiga, S. Gomez-Alonso, M. Locatelli, F. Travaglia, J. D. Coisson, I. Hermosin-Gutierrez, M. Arlorio, Phenolics characterization and antioxidant activity of six different pigmented *Oryza sativa* L. cultivars grown in Piedmont (Italy), *Food Res. Int.* 65 (2014) 282–290.

[104] D. Lopes-Lutz, J. Dettmann, C. Nimalaratne, A. Schieber, Characterization and quantification of polyphenols in amazon grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius), *Molecules* 15 (2010) 8543–8552.

[105] V. Amico, E. M. Napoli, A. Renda, G. Ruberto, C. Spatafora, C. Tringali, Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar ‘Nerello Mascalese’, *Food Chem.* 88 (2004) 599–607.

[106] M. C. Díaz-García, J. M. Obón, M. R. Castellar, J. Collado, M. Alacid, Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices, *Food Chem.* 138 (2013) 938–949.

[107] J. Oszmiajski, A. Wojdyło, Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices, *Eur. Food Res. Technol.* (2009)

228:623–631.

[108] 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.* 158 (2014) 449–458.

[109] S. Oancea, F. Moiseenco, P. Traldi, Total phenolics and anthocyanin profiles of Romanian wild and cultivated blueberries by direct infusion ESI-IT-MS/MS, *Rom. Biotech. Lett.* 18 (2013) 8350–8360.

[110] R. Flamini, F. Agnolin, R. Seraglia, M. De Rosso, A. Panighel, F. De Marchi, A. D. Vedova, P. Traldi, A fast and selective method for anthocyanin profiling of red wines by direct-infusion pneumatic spray mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 355–362.

[111] M. C. Oliveira, P. Esperanca, M. A. A. Ferreira, Characterisation of anthocyanidins by electrospray ionisation and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1525–1532.

[112] J. R. Homoki, A. Nemes, E. Fazekas, G. Gyémánt, P. Balogh, F. Gál, J. Al-Asri, J. Mortier, G. Wolber, L. Babinszky, J. Remenyik, Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and α -amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus* L.), *Food Chem.* 194 (2016) 222–229.

[113] G. Picariello, P. Ferranti, G. Garro, G. Manganiello, L. Chianese, R. Coppola, F. Addeo, Profiling of anthocyanins for the taxonomic assessment of ancient purebred *V. vinifera* red grape varieties, *Food Chem.* 146 (2014) 15–22.

[114] V. I. Petropulos, A. Dörnyei, M. Stefova, T. Stafilov, B. Vojnoski, L. Márk, I. Hermosín-Gutiérrez, F. Kilar, Application of a novel small-scale sample cleanup procedure prior to MALDI-TOF-MS for rapid pigment fingerprinting of red wines, *Food Anal. Methods* 7 (2014) 820–827.

[115] G. Picariello, P. Ferranti, L. Chianese, F. Addeo, Differentiation of *Vitis vinifera* L. and hybrid red grapes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis of berry skin anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 4559–4566.

[116] Y. Yoshimura, H. Enomoto, T. Moriyama, Y. Kawamura, M. Setou, N. Zaima, Visualization of anthocyanin species in rabbiteye blueberry *Vaccinium ashei* by matrix-

assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 403 (2012) 1885–1895.

[117] L. Hartmanová, V. Ranc, B. Papoušková, P. Bednář, V. Havlíček, K. Lemr, Fast profiling of anthocyanins in wine by desorption nano-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4223–4228.

[118] E. C. Cabral, M. F. Mirabelli, C. J. Perez, D. R. Ifa, Blotting assisted by heating and solvent extraction for DESI-MS imaging, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24 (2013) 956–965.

[119] C. Hopley, T. Bristow, A. Lubben, A. Simpson, E. Bull, K. Klagkou, J. Herniman, J. Langley, Towards a universal product ion mass spectral library – reproducibility of product ion spectra across eleven different mass spectrometers, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 1779–1786.

[120] J. Zaia, M. J. C. Miller, J. L. Seymour, C. E. Costello, The role of mobile protons in negative ion CID of oligosaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 952–960.

[121] B. Biri, J. Kalmár, L. Nagy, A. Sipos, M. Zsuga, S. Kéki, Energy-dependent collision-induced dissociation study of buprenorphine and its synthetic precursors, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 41–49.

[122] L. R. Sartori, R. Vessecchi, H.-U. Humpf, F. B. Da Costa, N. P. Lopes, A systematic investigation of the fragmentation pattern of two furanoheliangolide C-8 stereoisomers using electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 723–730.

[123] S. Pati, I. Losito, G. Gambacorta, E. La Notte, F. Palmisano, P. G. Zambonin, Simultaneous separation and identification of oligomeric procyanidins and anthocyanin-derived pigments in raw red wine by HPLC-UV-ESI-MSⁿ, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 861–871.

[124] P. Montoro, C. I. G. Tuberoso, A. Perrone, S. Piacente, P. Cabras, C. Pizza, Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 232–240.

[125] Y. Hayasaka, R. E. Asenstorfer, Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food*

Chem. 50 (2002) 756–761.

[126] W. Koch, M. C. Holthausen, A chemist's guide to density functional theory, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001.

[127] A. Škríba, Š. Janková, J. Váňa, Barták, P. Bednář, P. Fryčák, L. Kučera, O. Kurka, K. Lemr, P. Macíková, E. Marková, P. Nováková, B. Papoušková, J. Skopalová, H. Švecová, J. Roithová, Protonation sites and fragmentations of para-aminophenol, *Int. J. Mass Spectrom.* 337 (2013) 18–23.

[128] A. Galezowska, M. W. Harrison, J. M. Herniman, C.-K. Skylaris, G. J. Langley, A predictive science approach to aid understanding of electrospray ionisation tandem mass spectrometric fragmentation pathways of small molecules using density functional Calculations, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 964–970.

[129] A. E. M. Crotti, T. Fonseca, H. Hong, J. Staunton, S. E. Galembeck, N. P. Lopes, P. J. Gates, The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 232 (2004) 271–276.

[130] S. Bourcier, Y. Hoppilliard, Use of diagnostic neutral losses for structural information on unknown aromatic metabolites: an experimental and theoretical study, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 93–103.

[131] 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* 138 (2013) 6869–6880.

[132] P. Wright, A. Alex, D. Gibson, R. Jones, P. Macrae, Characterisation of sulphoxides by atmospheric pressure ionisation mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2005–2014.

[133] 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.* 24 (2010) 1025–1031.

[134] Y.-P. Tu, Dissociative protonation sites: Reactive centers in protonated molecules leading to fragmentation in mass spectrometry, *J. Org. Chem.* 71 (2006) 5482–5488.

[135] P. A. Wright, A. Alex, F. S. Pullen, Can computational chemistry be used to predict CID fragmentation of anions?, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 2309–2315.

- [136] 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.* 28 (2014) 1127–1143.
- [137] C. Guo, J. Wan, N. Hu, K. Jiang, Y. Pan, An experimental and computational investigation on the fragmentation behavior of enaminones in electrospray ionization mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* 45 (2010) 1291–1298.
- [138] K. Jiang, G. Bian, N. Hu, Y. Pan, G. Lai, Coordinated dissociative proton transfers of external proton and thiocarbamide hydrogen: MS experimental and theoretical studies on the fragmentation of protonated S-methyl benzenylmethylenediazine dithiocarboxylate in gas phase, *Int. J. Mass Spectrom.* 291 (2010) 17–23.
- [139] Y. Chai, L. Wang, L. Wang, How does a C=C double bond cleave in the gas phase? Fragmentation of protonated ketotifen in mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 51 (2016) 1105–1110.
- [140] C. Guo, L. Yue, M. Guo, K. Jiang, Y. Pan, Elimination of benzene from protonated N-benzylindoline: Benzyl cation/proton transfer or direct proton transfer?, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24 (2013) 381–387.
- [141] Z. Lu, Y. Chai, J. Wang, Y. Pan, C. Sun, S. Zeng, A mechanistic study of fragmentation of deprotonated N,2-diphenylacetamides in electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 1641–1648.
- [142] E. Schuhfried, M. Probst, J. Limtrakul, S. Wannakao, E. Aprea, L. Cappellin, T. D. Märk, F. Gasperic, F. Biasioli, Sulfides: chemical ionization induced fragmentation studied with Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry and density functional calculations, *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 367–378.
- [143] I. Stolić, I. Bratoš, G. Kovačević, M. Bajić, Fragmentation of diamide derivatives of 3,4-ethylenedioxythiophene, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 1023–1031.
- [144] P. Wright, A. Alex, F. Pullen, Predicting collision-induced dissociation mass spectra: understanding the role of the mobile proton in small molecule fragmentation, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30 (2016) 1163–1175.
- [145] L. Estévez, R. A. Mosquera, Conformational and substitution effects on the electron distribution in a series of anthocyanidins, *J. Phys. Chem. A* 113 (2009) 9908–9919.

- [146] L. Estévez, R. A. Mosquera, A density functional theory study on pelargonidin, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 11100–11109.
- [147] A. R. F. Carvalho, J. Oliveira, V. de Freitas, A. Silva, N. Mateus, A. Melo, A computational study of vinylpyranoanthocyanin-phenolic pigments (portisins), *J. Mol. Struct.-Theochem* 946 (2010) 113–118.
- [148] M. Wolniak, I. Wawer, ¹³C CPMAS NMR and DFT calculations of anthocyanidins, *Solid State Nucl. Mag.* 34 (2008) 44–51.
- [149] E. H. Anouar, J. Gierschner, J.-L. Duroux, P. Trouillas, UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study, *Food Chem.* 131 (2012) 79–89.
- [150] A. D. Quartarolo, N. Russo, A computational study (TDDFT and RICC2) of the electronic spectra of pyranoanthocyanins in the gas phase and solution, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 1073–1081.
- [151] R. Guzmán, C. Santiago, M. Sánchez, A density functional study of antioxidant properties on anthocyanidins, *J. Mol. Struct.* 935 (2009) 110–114.
- [152] R. Pop, M. N. Ștefănuț, A. Căta, C. Tănăsie, M. Medeleanu, Ab initio study regarding the evaluation of the antioxidant character of cyanidin, delphinidin and malvidin, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 180–186.
- [153] K. Sakata, N. Saito, T. Honda, Ab initio study of molecular structures and excited states in anthocyanidins, *Tetrahedron* 62 (2006) 3721–3731.
- [154] M. Leopoldini, F. Rondinelli, N. Russo, M. Toscano, Pyranoanthocyanins: A theoretical investigation on their antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8862–8871.
- [155] S. Alcaro, S. G. Chiodo, M. Leopoldini, F. Ortuso, Antioxidant efficiency of oxovitisin, a new class of red wine pyranoanthocyanins, revealed through quantum mechanical investigations, *J. Chem. Inf. Model.* 53 (2013) 66–75.
- [156] L. Estévez, R. A. Mosquera, Molecular structure and antioxidant properties of delphinidin, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 10614–10623.
- [157] L. Lu, M. Qiang, F. Li, H. Zhang, S. Zhang, Theoretical investigation on the antioxidative activity of anthocyanidins: A DFT/B3LYP study, *Dyes Pigments* 103 (2014) 175–182.

- [158] 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.* 308 (2011) 71–80.
- [159] C. Lee, G. Yang, R. G. Parr, Development of the Colic-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785–789.
- [160] S. H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1200–1211.
- [161] A. D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098–3100.
- [162] A. D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact Exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [163] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 11623–11627.
- [164] Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [165] M. M. Kushnir, G. J. Nelson, E. L. Frank, A. L. Rockwood, High-throughput analysis of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine by LC-MS/MS. Method for analyzing isomers without chromatographic separation, *Clinical applications of mass spectrometry in*

biomolecular analysis: Methods and protocols, Book Series: Methods in Molecular Biology 1378 (2016) 159–173.

[166] L. E. M. Fernández, N. Obel, H. V. Scheller, P. Roepstorff, Differentiation of isomeric oligosaccharide structures by ESI tandem MS and GC–MS, *Carbohyd. Res.* 339 (2004) 655–664.

[167] C. G. Zampronio, S. P. Gurden, L. A. B. Moraes, M. N. Eberlin, A. K. Smilde, R. J. Poppi, Direct sampling tandem mass spectrometry (MS/MS) and multiway calibration for isomer quantitation, *Analyst* 127 (2002) 1054–1060.

[168] A. B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H. H. Hill Jr., Ion mobility–mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 1–22.

[169] J. N. Woodford, A DFT investigation of anthocyanidins, *Chem. Phys. Lett.* 410 (2005) 182–187.

[170] O. I. Obolensky, W. W. Wu, R.-F. Shen, Y.-K. Yu, Using dissociation energies to predict observability of b- and y-peaks in mass spectra of short peptides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 915–920.

[171] M. Rentzsch, M. Schwarz, P. Winterhalter, Pyranoanthocyanins – an overview on structures, occurrence, and pathways of formation, *Trends Food Sci. Tech.* 18 (2007) 526–534.

[172] A. B. Cerezo, E. Cuevas, P. Winterhalter, M. C. Garcia-Parrilla, A. M. Troncoso, Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry, *Food Chem.* 123 (2010) 574–582.

[173] A. Morata, F. Calderón, M. C. González, M. C. Gómez-Cordovés, J. A. Suárez, Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde, *Food Chem.* 100 (2007) 1144–1152.

[174] R. Hornedo-Ortega, M. A. Álvarez-Fernández, A. B. Cerezo, A. M. Troncoso, M. C. García-Parrilla, Influence of storage conditions on the anthocyanin profile and colour of an innovative beverage elaborated by gluconic fermentation of strawberry, *J. Funct. Foods* 23 (2016) 198–209.

[175] B. Piffaut, F. Kader, M. Girardin, M. Metche, Comparative degradation pathways of

malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments, *Food Chem.* 50 (1994) 115–120.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

AUTOREFERÁT

k disertační práci

Fragmentace kondenzovaných anthokyaninů

Autor práce:

RNDr. Ondřej Kurka

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2017

Souhrn

Disertační práce se zabývá studiem fragmentačního chování kondenzovaných anthokyaninů v kolizní cele hmotnostního spektrometru. Teoretická část práce je věnována přehledu kondenzovaných anthokyaninových derivátů s detailnější diskusí pyranoanthokyaninů a furanoanthokyaninů, dále možnostem hmotnostní spektrometrie pro studium fragmentačního chování a také výpočetním metodám v chemii a jejich využití v tandemové MS analýze.

První část práce je věnována semisyntéze dvou nových izomerních anthokyaninových barviv – 5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu – reakcí pelargonidinu s acetonem. Byl sledován časový vývoj obou izomerů ve směsi v čase a po dosažení dostatečného výtěžku těchto barviv byla tato ze směsi izolována semipreparativní chromatografickou metodou vyvinutou pro tento účel. Identita izolovaných barviv byla ověřena pomocí NMR.

Druhá část práce se zabývá vývojem rychlé chromatografické metody pro separaci obou derivátů a nativního anthokyaninu – pelargonidinu. Byla vyvinuta gradientová UHPLC/MS metoda využívající reverzní stacionární fáze a jednoduché vodně-organické mobilní fáze, která dovolovala tyto látky separovat v čase kratším než 1 minuta. Pro použití v uspořádání bez hmotnostního spektrometru byla optimalizována také izokratická UHPLC/PDA metoda.

Třetí část práce se věnuje sledování fragmentačního chování izolovaných pelargonidinových derivátů v MS/MS a porovnání jejich fragmentačních spekter. Obě látky poskytují shodné fragmenty, liší se ale v jejich relativních intenzitách a na základě pozorovaných rozdílů je možné obě látky odlišit. Významnými sledovanými fragmentačními procesy jsou ztráta molekuly vody, methanu, oxidu uhelnatého a retro-Diels-Alderovské (RDA) štěpení. Na experimentálně získaná data navazuje studie využívající výpočetní metody (DFT), pomocí kterých je studována energetická stabilita studovaných fragmentů. Bylo zjištěno, že fragmentový ion má vyšší intenzitu v MS/MS spektru toho izomeru, pro který má nižší vypočtenou energii (je stabilnější). Ztráta vody, methanu a dvou molekul oxidu uhelnatého je tak preferována u 5-methylpyranopelargonidinu, zatímco RDA štěpení u 4-methylfuranopelargonidinu. U 5-methylpyranopelargonidinu byla provedena také podrobnější studie zkoumající kinetickou preferenci štěpení molekuly oxidu uhelnatého a molekuly vody. Závěry ukazují, že výpočetní metody jsou užitečným nástrojem při odhalování rozdílu

ve fragmentačním chování derivátů anthokyaninů včetně izomerních barviv.

Poslední část práce se zabývá přípravou a analýzou ovocného (jahodového) vína. V připraveném víně jsou s využitím UHPLC/MS detekovány anthokyaniny a jejich deriváty a je studována změna obsahu vybraných anthokyaninů během procesu kvašení. V jahodovém víně byly nalezeny mimo jiné i studované izomery (5-methylpyranopelargonidin a 4-methylfuranopelargonidin), které tak byly vůbec poprvé detekovány v potravinovém produktu.

Summary

The dissertation thesis deals with the study of fragmentation behaviour of condensed anthocyanins in the collision cell of a mass spectrometer. The theoretical part of the thesis is devoted to an overview of condensed anthocyanin derivatives with detailed discussion of pyranoanthocyanins and furoanthocyanins, to possibilities of study of fragmentation behaviour using mass spectrometry and to computational methods in chemistry and their utilization in tandem MS analysis.

The first part of the thesis deals with semisynthesis of two new isomeric anthocyanin dyes – 5-methylpyranopelargonidin and 4-methylfuranopelargonidin – by the reaction of pelargonidin with acetone. Changes of content of both isomers in time were studied and when sufficient yield of both derivatives was obtained, the dyes were isolated from the reaction mixture using a semipreparative LC method developed for this purpose. Identity of isolated compounds was verified using NMR.

The second part of the thesis is devoted to the development of a fast chromatographic method to separate both derivatives and the native anthocyanin – pelargonidin. A gradient UHPLC/MS method was developed using reversed stationary phase and simple aqueous-organic mobile phases. It allows to separate target compounds in less than 1 minute. An isocratic UHPLC/PDA method was developed as well to be used in instruments without the possibility of MS detection.

The third part of the thesis studies fragmentation behaviour of isolated pelargonidin derivatives in MS/MS and compares their fragmentation spectra. Both compounds provide identical fragments, however their relative intensities differ and based on these differences both compounds can be distinguished. Important examined fragmentation processes involve loss of a water molecule, loss of methane molecule, loss of carbon monoxide and retro-Diels-Alder (RDA) fission. Experimentally obtained data are followed by a computational study using DFT methods aimed to investigate the energetic stability of studied fragments. It was found that a fragment ion has higher relative intensity in the MS/MS spectrum of that isomer, for which the energy of the fragment ion is lower (i.e. the fragment is more stable). Losses of water, methane and two molecules of carbon monoxide are preferred in 5-methylpyranopelargonidin, while RDA fission is preferred in 4-methylfuranopelargonidin. For

5-methylpyranopelargonidin a detailed study investigating kinetic preference of carbon monoxide and water fission was performed. The results show that computational methods are a valuable tool to assess differences in fragmentation behaviour of anthocyanin derivatives including isomeric dyes. The final part of the thesis deals with preparation and analysis of a fruit (strawberry) wine. Anthocyanins and their derivatives were detected in prepared wine using UHPLC/MS and change of content of selected anthocyanins during the fermentation process was studied. Apart from other derivatives, studied dyes (5-methylpyranopelargonidin a 4-methylfuranopelargonidin) were detected in strawberry wine which is the first mention of their detection in a food product.

Obsah

1. Úvod	1
2. Přehled aktuálního stavu problematiky	2
3. Cíle disertační práce	4
4. Experimentální část	5
4.1. Příprava modelových směsí pro syntézu 5-mePyPg	5
4.2. Výroba jahodového vína	5
4.3. Příprava vzorků pro kontrolu jahodového vína	5
4.4. Chromatografické metody	6
4.5. Podmínky studie vlivu kolizní energie (MS/MS)	7
4.6. NMR analýza izolovaných pelargonidinových derivátů	8
4.7. Výpočty energetických hladin fragmentů 5-mePyPg a 4-meFuPg	8
5. Diskuze a výsledky	9
5.1. Syntéza 5-mePyPg a 4-meFuPg	9
5.2. Separace pelargonidinových derivátů pomocí semipreparativní HPLC v systému reverzních fází	10
5.3. Vývoj rychlých UHPLC metod pro separaci modelové směsi	11
5.4. Studium fragmentace 5-mePyPg a 4-meFuPg	12
5.5. Výpočty energetické náročnosti fragmentačních procesů pomocí kvantové chemie	17
5.5.1. <i>Optimalizace struktury 5-mePyPg a 4-meFuPg</i>	17
5.5.2. <i>Porovnání energetické náročnosti vzniku charakteristických fragmentů u 5-mePyPg a 4-meFuPg s využitím DFT výpočtů</i>	18
5.5.3. <i>Energetický rozbor vybraných fragmentačních cest pro iont 5-mePyPg</i>	19
5.6. Analýza anthokyaninů a jejich derivátů v jahodovém víně	22
6. Závěr	25
7. Literatura	27
Curriculum vitae	31

1. Úvod

Anthokyaniny jsou přírodní barviva s řadou důležitých protektivních a regulačních funkcí v rostlinné říši. Současně jsou oceňovány pro své pozitivní účinky na lidské zdraví. Vyskytují se hojně zejména v potravinách vyrobených z bobulovitých plodů. Z chemického hlediska jsou nepříliš stabilní a zejména v roztoku podléhají rozkladu, ale i reakcím s řadou reaktivních organických molekul. Vzhledem k významu těchto látek je velké úsilí věnováno vývoji metod pro identifikaci a kvantifikaci anthokyaninů v reálných vzorcích. Pro tento účel je velmi vhodné spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Znalost fragmentačních procesů anthokyaninů probíhajících v kolizní cele hmotnostního spektrometru je důležitá nejen pro identifikaci již známých látek, ale také pro zjišťování struktury látek nově objevených. Součástí moderních přístupů k interpretaci analytických dat je využití výpočetní chemie, která v řadě případů umožňuje věrohodnou simulaci chemických dějů. V současnosti využívané výpočetní modely umí s poměrně vysokou přesností určit energie základních stavů nabitých i nenabitých molekul i tranzitních stavů odpovídajících přeměnám reaktantů v produkty. Kombinace experimentálních a teoretických dat poskytuje velmi cenné informace pro charakterizaci zkoumaných sloučenin.

Předkládaná disertační práce se věnuje syntéze dvou nových izomerních anthokyaninových derivátů (5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu), vývoji analytické a semipreparativní metody pro jejich izolaci a kontrolu jejich čistoty a detailnímu sledování jejich fragmentace v kolizní cele hmotnostního spektrometru. V práci jsou identifikovány charakteristické ionty ve fragmentačních spektrech a oba izomery jsou rozlišeny na základě intenzity signálu těchto iontů v jejich MS/MS spektrech. Cílové struktury jsou paralelně studovány také s využitím výpočetní chemie s důrazem na optimalizaci základního stavu rodičovských iontů a klíčových fragmentů. Experimentálně získaná data jsou porovnávána s daty získanými výpočetními metodami a spojením těchto dvou přístupů je možné rozlišit studovaná barviva na základě jejich MS/MS spektra. V případě 5-methylpyranopelargonidinu jsou probíhající procesy prostudovány i z kinetického hlediska a jsou hledány preferované cesty pro experimentálně pozorované fragmentační procesy. Syntetizované látky byly spolu s dalšími anthokyaninovými deriváty detekovány a kvantifikovány pomocí UHPLC/MS² v připraveném vzorku jahodového vína.

2. Přehled aktuálního stavu problematiky

Anthokyaniny jsou sekundárními metabolity rostlin. Jsou to charakteristicky červená až modrofialová barviva, která patří mezi flavonoidy. Základními stavebními jednotkami anthokyaninů jsou jejich aglykony, běžně nazývané anthokyanidiny. Glykosylované anthokyanidiny jsou označovány jako anthokyaniny. Díky velké možnosti kombinací stavebních jednotek tvořících molekulu anthokyaninu je v současnosti známo více než 700 různých anthokyaninů [1]. Konzumace anthokyaninů je spojována s řadou pozitivních efektů na lidské zdraví [2]. Velké množství jejich derivátů vzniká reakcí anthokyanidinového skeletu s řadou organických sloučenin. Jednou ze skupin derivátů anthokyaninů jsou pyranoanthokyaniny, které mají ve struktuře oproti nativním anthokyaninům navíc pyranový kruh [3,4]. Pyranoanthokyaniny jsou obecně stabilnější než nativní anthokyaniny [5]. Methylpyranoanthokyaniny vznikají reakcí anthokyaninů s acetonem [6] a kyselé katalyzovanou hydrolýzou mohou přesmykovat na methylfuranoanthokyanidiny [7]. Tato disertační práce je věnována 5-methylpyranopelargonidinu (dále označovanému jako 5-mePyPg), který byl poprvé syntetizován na našem pracovišti a výsledky studia této sloučeniny publikovány ve třech studiích [8-10] a jeho izomernímu derivátu 4-methylfuranoopelargonidinu (4-meFuPg).

Kapalinová chromatografie v analýze anthokyaninů využívá nejčastěji obrácené (reverzní) fáze [11]. Jako mobilní fáze se nejčastěji používají okyselená voda, methanol a/nebo acetonitril [12,13]. Detekce anthokyaninů v LC se většinou realizuje pomocí UV/VIS (typicky při vlnové délce 500 nm) [14] nebo (tandemové) hmotnostní spektrometrie, nejčastěji s využitím ionizace elektrosprejem [15]. Při fragmentaci glykosylovaných anthokyaninů jsou pozorovány ztráty cukerných jednotek. Fragmentace samotného anthokyanidinu pak probíhá retro-Diels-Alderovským štěpením (RDA) [16] nebo postupnou ztrátou malých molekul (voda, oxid uhelnatý aj.) [17].

Kvantová chemie je cenným nástrojem při určování mnoha charakteristik zkoumaných látek. Porovnáním experimentálních a výpočetních dat je možné identifikovat procesy probíhající v kolizní cele hmotnostního spektrometru [18]. Pro predikci fragmentovaných vazeb se dá využít např. sledování změn jejich délek při protonaci analytu v iontovém zdroji [19]. Výpočty mohou využívat také energie tranzitních stavů [20]. Anthokyaniny a jejich deriváty byly metodami výpočetní chemie (*in silico*) studovány z různých úhlů pohledu.

Nejvíce prací je zaměřeno na studium antioxidační kapacity anthokyanidinů [21,22]. Využití výpočetní chemie pro objasnění fragmentace anthokyaninů v MS/MS zmiňují pouze Barnes a Schug [23] a výzkumná skupina autora této disertační práce v publikaci věnované fragmentaci 5-methylpyranopelargonidinu [9].

3. Cíle disertační práce

Cíle této disertační práce lze shrnout do následujících bodů:

- nalezení vhodné metody pro přípravu a chromatografickou purifikaci 5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu,
- detailní prostudování MS/MS spekter obou látek s pomocí vysokorozlišujícího tandemového hmotnostního spektrometru,
- zhodnocení energetické náročnosti vzniku charakteristických fragmentů a posouzení jejího vlivu na výtěžek charakteristických fragmentů v MS/MS spektrech obou studovaných barviv,
- vývoj UHPLC/MS² metody pro rychlou analýzu pyrano a furanoanthokyaninů v ovocných vínech

Nejvýznamnější výsledky uvedené v této práci byly publikovány ve dvou impaktovaných publikacích [8,9] a rukopis další práce je v recenzním řízení (viz Příloha 4).

4. Experimentální část

4.1. Příprava modelových směsí pro syntézu 5-mePyPg

5-methylpyranopelargonidin a 4-methylfuranopelargonidin byly připraveny semisyntézou s využitím reakce pelargonidinu a acetonem v kyselém prostředí a v přítomnosti methanolu – byla použita směs 3 mg pelargonidinu chloridu, 2,5 ml methanolu, 2,5 ml acetonu a 20 μ l koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Reakce probíhala v temnu a za laboratorní teploty. Pro sledování změn v koncentracích sledovaných anthokyaninových derivátů v čase bylo z této směsi v jednom případě v pravidelných intervalech odebíráno po 10 μ l směsi, jejíž složení bylo kontrolováno UHPLC/MS.

4.2. Výroba jahodového vína

167 g řepného cukru a 5 g kyseliny citronové bylo za horka rozpuštěno v 0,3 l horké převařené destilované vody a následně zchlazeno na laboratorní teplotu. Mražené jahody byly rozmrazeny (stáním při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny) a poté homogenizovány tyčovým mixérem. 450 g homogenizátu bylo přidáno k cukernému roztoku a promícháno. Vzniklá směs byla zředěna destilovanou vodou na objem 0,8 l. Ke směsi bylo přidáno 5 g pekařského droždí a výsledný kvas byl uzavřen v lahvi o objemu 1 litru pomocí kvasné zátky. Takto byly připraveny tři nádoby s kvasem. Po uplynutí 35 dní (kdy směs přestala produkovat oxid uhličitý) bylo kvašení zastaveno filtrací směsi přes gázu.

4.3. Příprava vzorků pro kontrolu jahodového vína

Během kvašení byly přes vzduchotěsné septum pomocí dlouhé jehly odebírány vzorky kapalného podílu reakční směsi. Ty byly dále zpracovány pomocí extrakce tuhou fází (SPE). Extrakce probíhala na kolonkách Strata SDB-L (200 mg / 3 mL). Ty byly nejprve kondicionovány 2 ml 0,1 % HCl v methanolu (v/v) a promyty 3 ml 0,1 % HCl ve vodě (v/v). 1,5 ml odebrané směsi bylo cenrifugováno po dobu 5 minut rychlostí 14000 otáček za minut. Po centrifugaci byl odebrán 1 ml supernatantu a nanesen na SPE kolonku. Vzorek byl promyt 3 ml 0,1 % HCl ve vodě (v/v). Anthokyaninová barviva byla eluována 2 ml 0,1 % HCl v methanolu (v/v) a odpařena do sucha v proudu dusíku. Poté byly vzorky uschovány

do mrazničky, kde byly skladovány při -18 °C do doby analýzy.

4.4. Chromatografické metody

Izolace studovaných pelargonidinových derivátů byly provedena s využitím semipreparativní chromatografie. Odparek modelové směsi byl rozpuštěn v 6 ml 5 % (v/v) vodném roztoku kyseliny mravenčí. Z takto připraveného vzorku byl opakovaně dávkován 1 ml (přeplněním smyčky). Separace probíhala na výše zmíněné koloně Gemini C18. Byla použita izokratická eluce, jako mobilní fáze byl použit 5 % roztok kyseliny mravenčí ve směsi voda/acetonitril 5:1 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 5 ml/min, pro detekci byly zvoleny dvě vlnové délky: 280 nm a 490 nm.

Čistota izolovaných izomerů byla kontrolována pomocí UHPLC-PDA-MS s využitím gradientové eluce na koloně Acquity BEH C18 (100 × 2,1 mm). Jako mobilní fáze byly použity 5 % (v/v) kyselina mravenčí ve vodě (dále uváděná jako mobilní fáze A) a 5 % (v/v) kyselina mravenčí v acetonitrilu (dále uváděná jako mobilní fáze B). Vzorek byl rozpuštěn v mobilní fázi A na koncentraci 100 mg/l. Dávkováno bylo 5 µl tohoto roztoku. Byla použita gradientová eluce s následujícím profilem gradientu: 0-5 min: 65-10 % A; 5-9 min: 10 % A; 9-9,3 min: 10-65 % A; 9,3-12 min: 65 % A, a průtok mobilní fáze 0,25 ml/min. Detekce probíhala při vlnové délce 500 nm a pomocí MS (m/z 271,1 pro pelargonidin a 309,1 pro oba kondenzované deriváty). Byly použity tyto parametry pro MS detekci: napětí na kapiláře 2,5 kV, napětí na sampling cone 30 V, teplota iontového zdroje 120 °C, desolvační teplota 250 °C, čas skenu 0,2 s, interscan delay 0,02 s, kolizní energie pro MS skeny 5 eV. Pro měření správné a přesné hmoty byly signály korigovány pomocí lock-spray techniky. Pro lock-spray byl použit roztok leucin-enkefalinu (500 µg/l ve směsi mravenčí kyselina/voda/acetonitril 0,1/50/50, v/v/v; průtok 10 µl/min).

Pro rychlé analýzy bylo 10 µl roztoku modelové směsi obsahující pelargonidin, 5-mePyPg a 4-meFuPg odpařeno do sucha a následně rozpuštěno ve 100 µl mobilní fáze A. Vzorek byl analyzován na kolonách Acquity BEH C18 o rozměrech 50 × 2,1 a 100 × 2,1 mm. Nastříkováno bylo vždy 5 µl vzorku. V případě UHPLC/PDA uspořádání bylo složení mobilní fáze A:B 72:28 (v/v) pro kolonu o rozměrech 50 × 2,1 mm a A:B 67:33 (v/v) pro kolonu o rozměrech 100 × 2,1 mm. Průtok činil 0,25 ml/min. Detekce píků probíhala při vlnové délce 500 nm. Pro UHPLC/MS analýzu byl použit následující profil gradientu: 0-2 min 80-10 % A,

2-3 min: 10 % A, 3-3,15 min 10-80 % A, 3,15-4 min: 80 % A (pro kolonu 50 × 2,1 mm, průtok činil 0,9 ml/min). Pro kolonu o rozměru 100 × 2,1 mm byl gradient upraven na následující profil: 0-3 min: 80-10 % A, 3-4 min: 10 % A, 4-4,15 min: 10-80 % A, 4,15-6 min: 80 % A, průtok činil 0,48 ml/min. Podmínky MS měření se shodují s podmínkami pro kontrolu čistoty.

Pro analýzu barviv přítomných v jahodovém víně byly vzorky vína přečištěné pomocí SPE rozpuštěny v 0,5 ml směsi mobilních fází A a B v poměru 9:1 (v/v) a touto směsí ještě 10x zředěny. Dávkováno bylo 5 µl ředěného roztoku. Gradient mobilních fází byl následující: 0-6 min: 80-10 % A; 6-8 min: 10 % A, 8-8,3 min: 10-80 % A, 8,3-10 min: 80 % A. Pro MS měření byly použity následující parametry: napětí na kapiláře 2,5 kV, napětí na sampling cone 30 V, teplota iontového zdroje 100 °C, desolvační teplota 250 °C, čas skenu 0,2 s, interscan delay 0,015 s. Byly střídány dva skeny bez diskriminace iontů nebo jejich předvýběru na kvadrupólu (MS^E mód). Pro první MS sken byla nastavena nízká kolizní energie (Trap: CE = 5 eV, Transfer: CE = 2 eV). Pro druhý sken byla nastavena vyšší kolizní energie (Trap: rampa CE = 15-70 eV, Transfer: 2 eV). Pro MS/MS skeny byla na Trap vložena CE 35 eV, kolizní energie na Transferu byla nastavena na 2 eV.

4.5. Podmínky studie vlivu kolizní energie (MS/MS)

Pro studii vlivu kolizní energie na fragmentaci byl použit následující postup: Roztok studované sloučeniny (50 mg/L v methanolu okyseleném 1 % kyselinou mravenčí) byl dávkován do elektrospreje za průtoku 5 µl/min. Efekt vlivu kolizní energie (CE, z angl. „collision energy“) na výtěžek fragmentů v CID-MS/MS byl studován v rozsahu 0-105 eV (v intervalech 5 eV). Jako kompenzace případné nestability signálu byl po každých třech skenech proveden sken s CE = 0 eV. Z těchto měření byly následně vypočítány relativní intenzity fragmentových iontů jako poměr průměru absolutních intenzit iontu při dané kolizní energii k průměru absolutních intenzit rodičovského iontu (m/z 309) ve skenech s CE = 0 eV. Napětí na kapiláře bylo 2,5 kV, napětí na sampling cone 30 V, teplota iontového zdroje 120 °C, desolvační teplota 250 °C, čas skenu 0,2 s, interscan delay 0,02 s, kolizní energie pro MS skeny 5 eV. Pro měření správné a přesné hmoty byly signály korigovány pomocí lock-spray techniky. Pro lock-spray byl použit roztok leucin-enkefalinu (500 µg/l ve směsi mravenčí kyselina/voda/acetonnitril 0,1/50/50, v/v/v; průtok 10 µl/min).

4.6. NMR analýza izolovaných pelargonidinových derivátů

Obě chromatograficky izolované frakce (tj. 5-mePyPg a 4-meFuPg) byly detailně analyzovány pomocí NMR za účelem přiřazení struktur. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker AVANCE III 700 MHz (700,13 MHz pro ^1H , 176,05 MHz pro ^{13}C) v $\text{CD}_3\text{CN}/\text{TFA} = 9:1$ při 293 K. Jako vnitřní standard byl použit zbytkový signál acetonitrilu ($\delta_{\text{H}} 1,941$ ppm, $\delta_{\text{C}} 1,41$ ppm). S využitím softwaru standardně poskytovaného výrobcem byla naměřena ^1H NMR, ^{13}C NMR, gCOSY, gHSQC, gHMBC a ROESY NMR spektra. S využitím uvedeného vybavení bylo možno vypočítat chemické posuny vodíků s přesností na tři desetinná místa a chemické posuny uhlíků na dvě desetinná místa. Struktura látek byla určena porovnáním s literaturou.

4.7. Výpočty energetických hladin fragmentů 5-mePyPg a 4-meFuPg

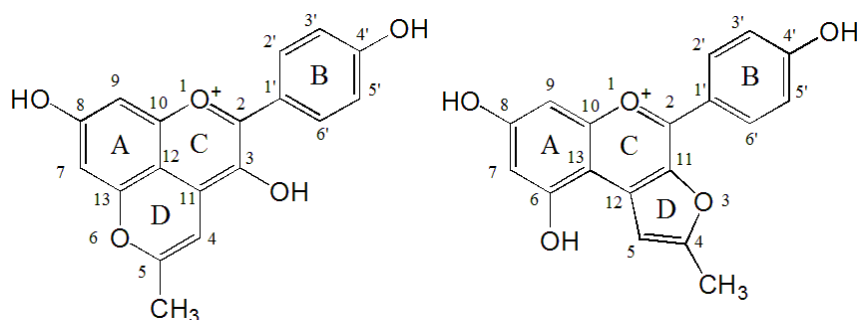
Kvantově-chemické výpočty energetických hladin minim a tranzitních stavů rodičovských iontů 5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu byly počítány s využitím DFT metody B3LYP [24-28] ve spojení se sadou bazí 6-31G(d) implementovaných v programu Gaussian 09 [29]. U všech optimalizovaných struktur byly provedeny analýzy frekvencí a na jejich základě byly struktury označeny jako minima (bez imaginárních frekvencí) nebo tranzitní stavy (s jednou imaginární frekvencí) na ploše potenciální energie. Byly spočítány rovněž vibrační energie nulového bodu (ZPVE, z angl. „zero-point vibrational energies“). Byla provedena teplotní korekce na Gibbsovu energii a hodnoty uvedené v této práci odpovídají Gibbsovým energiím zkoumaných iontových struktur. Gibbsovy energie byly vypočteny pro teplotu 298,15 K a tlak 1 atm. Všechny energie jsou prezentovány jako relativní hodnoty vztažené vůči nejstabilnějšímu konformeru odpovídajícího rodičovského iontu, jehož energetická hodnota byla za tímto účelem nastavena jako arbitrární nula.

5. Diskuze a výsledky

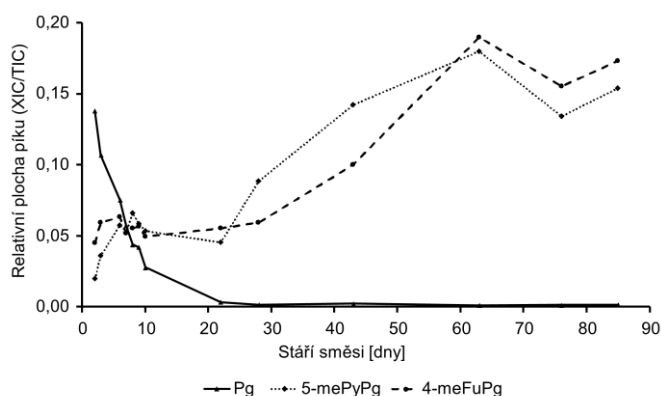
5.1. Syntéza 5-mePyPg a 4-meFuPg

Pro syntézu 5-mePyPg a 4-meFuPg (obrázek 1) byl nejprve okyselený vodný roztok s desetinásobným molárním přebytkem acetonu jako reakčního činidla (v analogii k experimentům s modelovým vínem [30]). Reakce však neposkytovala očekávané produkty ve využitelném výtěžku. Výrazného zvýšení výtěžku bylo dosaženo při použití směsi 3 mg pelargonidin chloridu, 2,5 ml methanolu, 2,5 ml acetonu a 20 μ l kyseliny chlorovodíkové. Směs byla ponechána v temnu a v průběhu reakce z ní byly odebírány kontrolní vzorky, které byly analyzovány UHPLC/MS. Jejich analýza poskytla informaci o produkci obou barviv v čase a o úbytku původního pelargonidinu v roztoku, jak ukazuje obrázek 2.

Obrázek 1. Struktura a číslování atomů a kruhů 5-mePyPg a 4-meFuPg.



Obrázek 2. Změny v koncentracích Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg v reakční směsi. V grafu jsou vyneseny poměry intenzit m/z sledovaných iontů (271,1 pro Pg a 309,1 pro oba izomery) k celkové intenzitě iontového proudu ve spektru průměrovaném přes chromatografický pík každého barviva.



Z grafu v obrázku 2 vyplývá, že veškerý pelargonidin ve směsi je spotřebován během prvních tří týdnů zrání směsi. Obě barviva se ve směsi začínají tvořit hned v počáteční fázi

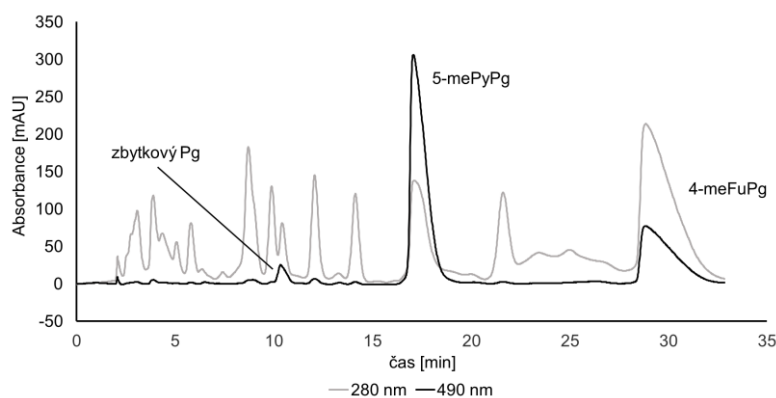
reakce, ale jejich obsah ve směsi pozvolna stoupá a maximální koncentrace obou látek jsou dosaženy přibližně po 60 dnech zrání reakční směsi.

5.2. Separace pelargonidinových derivátů pomocí semipreparativní HPLC v systému reverzních fází

Jako mobilní fáze pro semipreparativní izolaci byla použita směs vody a acetonitrilu v poměru 5:1 (v/v) okyselená 5 % (v/v) kyselinou mravenčí. Separace probíhala v izokratickém módu. Chromatogram separace obou barviv je znázorněn na obrázku 3 – je vidět, že modelová směs obsahuje v době sběru i přes jednoduché počáteční složení pestrou škálu látek, které absorbují při vlnové délce 280 nm. Odpařená reakční směs obsahující oba cílové deriváty byla rekonstituovaná v optimalizované mobilní fázi a separována opakovanými nástřiky do systému v semipreparativním uspořádání.

Obrázek 3.

Semipreparativní separace 5-mePyPg a 4-meFuPg z modelové směsi.

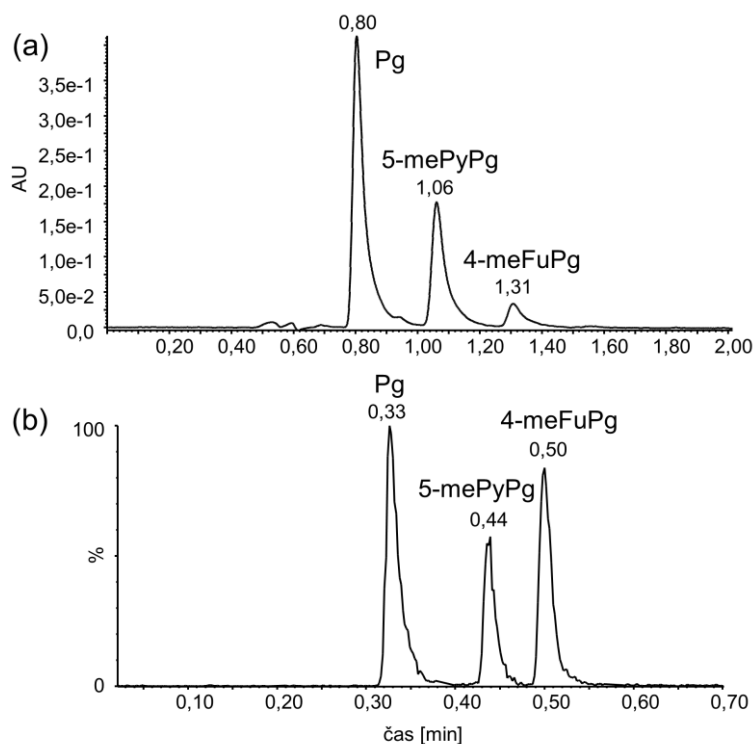


Vyvinutá semipreparativní chromatografická metoda umožňuje při nástřiku 1 ml reakční směsi o koncentraci cca 500 mg/l izolaci přibližně 0,25 mg každého z izomerů jednou analýzou, což odpovídá přibližně 10 mg každé z látek za 24 hodin. Čistota získaných frakcí byla kontrolována UHPLC/PDA/MS analýzou. Izomerní čistota 5-mePyPg odpovídá přibližně 92 % a izomerní čistota 4-meFuPg zhruba 99 %. Získané látky byly rovněž charakterizovány nukleární magnetickou rezonancí, viz kapitola 4.6 v Experimentální části. Tato měření potvrzují strukturu izolovaných látek.

5.3. Vývoj rychlých UHPLC metod pro separaci modelové směsi

Pro jejich analýzu studovaných barviv byla vyvinuta UHPLC/MS metoda využívající gradientovou eluci. Při vývoji UHPLC/MS metody nebyl připojen UV/VIS detektor z důvodu tlakového omezení UV/VIS detekční cely a chromatografická kolona byla připojena přímo k iontovému zdroji hmotnostního spektrometru. Pomocí gradientové UHPLC/MS metody je dosaženo separace s rozlišením na základní linii za 35 sekund (viz obrázek 4b). Byla optimalizována také izokratická separace Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg a jejich detekce spektrofotometrickým detektorem (UHPLC-PDA). Separace studovaných látek na koloně s rozměry 50 × 2,1 mm oběma optimalizovanými metodami je uvedena na obrázku 4.

Všechny studované látky bylo možné s využitím vyvinutých metod separovat v časech kratších než 2 minuty. Metody poskytují vysokou přesnost retenčních časů a ploch píků. Všechny popisované metody separují cílové látky na úroveň základní linie ($R \geq 1,5$). Pro detekci je možné v závislosti na dostupném vybavení použít buď UV/VIS detekci (při vlnové délce 500 nm) nebo MS detekci (m/z hledaných látek 271,1 a 309,1). Při použití nejrychlejší gradientové metody dochází k eluci píků do 35 sekund. Celková doba analýzy je u gradientových elucí prodloužena ekvilibrací kolony. Ekvilibrace kolony v nejrychlejších uspořádání trvá celkem 1 minutu.

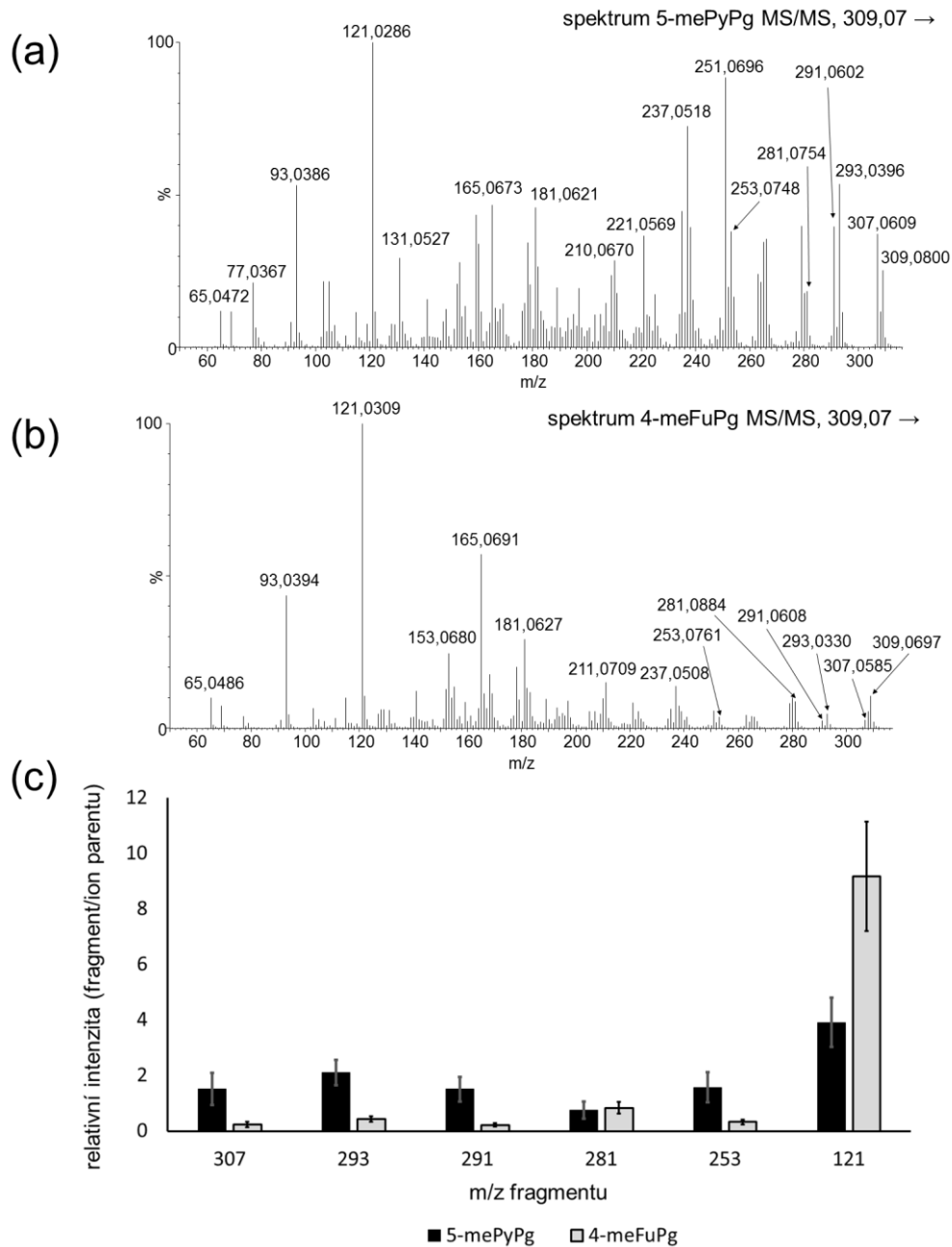


Obrázek 4. Analytická separace Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg na koloně BEH C18 50 × 2,1 mm v módu (a) UHPLC-PDA, (b) UHPLC-MS.

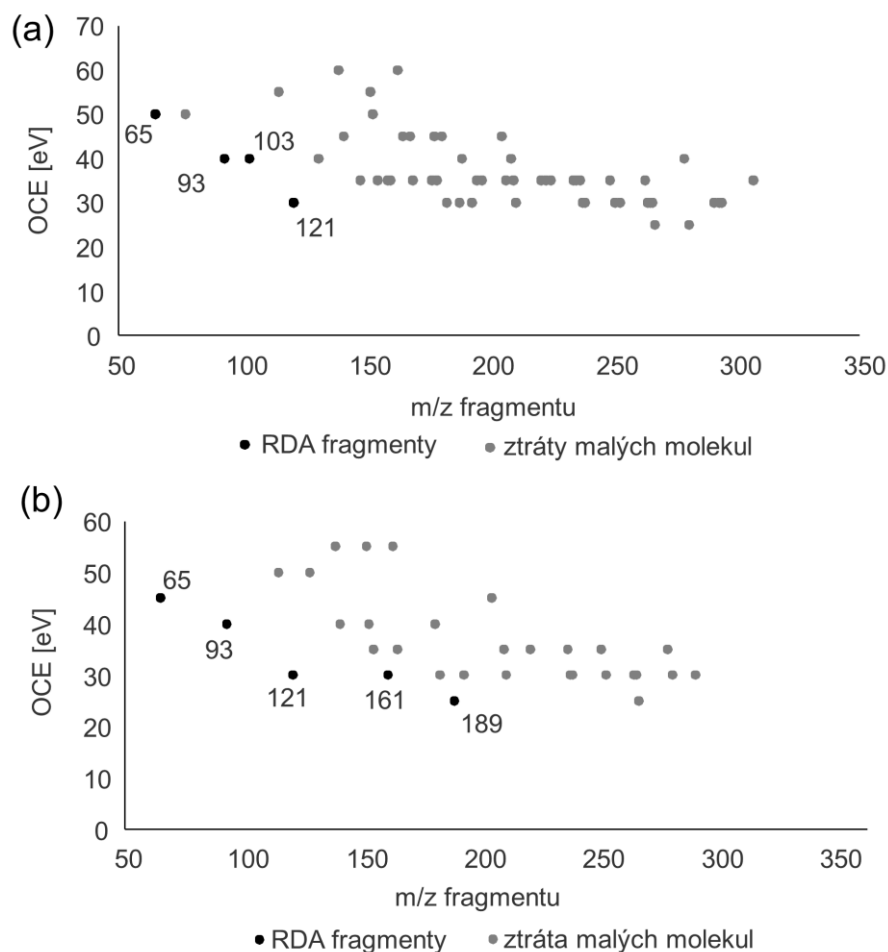
5.4. Studium fragmentace 5-mePyPg a 4-meFuPg

Oba rodičovské ionty produkují fragmenty o stejných hodnotách m/z , ale MS/MS spektra obou sloučenin se liší poměrem intenzit těchto iontů a na jejich základě mohou být oba izomery rozlišeny. MS/MS spektra studovaných izomerů získaná izolací jejich rodičovského iontu na kvadrupólu a jeho fragmentací po kolizí indukované disociaci jsou znázorněna na obrázku 5. 5-mePyPg a 4-meFuPg mohou být rozlišeny na základě šesti charakteristických fragmentů v jejich MS/MS spektrech. Ty odpovídají ztrátě molekuly vodíku (m/z 307,0609 pro 5-mePyPg a 307,0585 pro 4-meFuPg, elementární složení fragmentu: $C_{18}H_{11}O_5^+$), methanu (m/z 293,0396 a 293,0330, $C_{17}H_9O_5^+$), vody (m/z 291,0602 a 291,0608, $C_{18}H_{11}O_4^+$), dvou molekul oxidu uhelnatého (m/z 253,0748 a 253,0761, $C_{16}H_{13}O_3^+$) a produktu $^{0,2}B^+$ retro-Diels-Alderovského (RDA) štěpení (m/z 121,0286 a 121,0309, $C_7H_5O_2^+$). Relativní intenzity fragmentů odpovídajících ztrátě jedné molekuly oxidu uhelnatého (m/z 281,0754 a 281,0884, $C_{17}H_{13}O_4^+$) se při kolizní energii 40 eV v MS/MS spektrech obou derivátů významně neliší.

U obou zkoumaných izomerů byl sledován vliv kolizní energie na relativní intenzity fragmentových iontů. Kolizní energie poskytující nejvyšší relativní intenzity každého fragmentu (optimální kolizní energie, OCE) byly vyneseny do grafu proti m/z hodnotám těchto fragmentů (viz obrázek 6). Fragmenty, které byly identifikovány jako produkty RDA štěpení (a jejich fragmenty) jsou v grafu vyznačeny černě. Tyto fragmenty mají při daném m/z nižší OCE, než fragmenty vznikajícími jinými procesy (zejména opakovanými ztrátami malých molekul – vody, oxidu uhelnatého, methanu, ketenu apod.). Každá ztráta malé molekuly vyžaduje určitou aktivační energii, a proto má ion s nižší hodnotou m/z (vznikající větším počtem ztrát malých molekul) vyšší hodnotu OCE než ionty vzniklé pomocí RDA (kde zaniká méně vazeb). RDA fragmenty mohou být rozeznány podle polohy ve „spodní“ části grafu. Graf „ m/z vs. OCE“ může poskytovat doplňující informace pro identifikaci neznámých fragmentů a tím obecně i pro identifikaci rodičovských iontů.

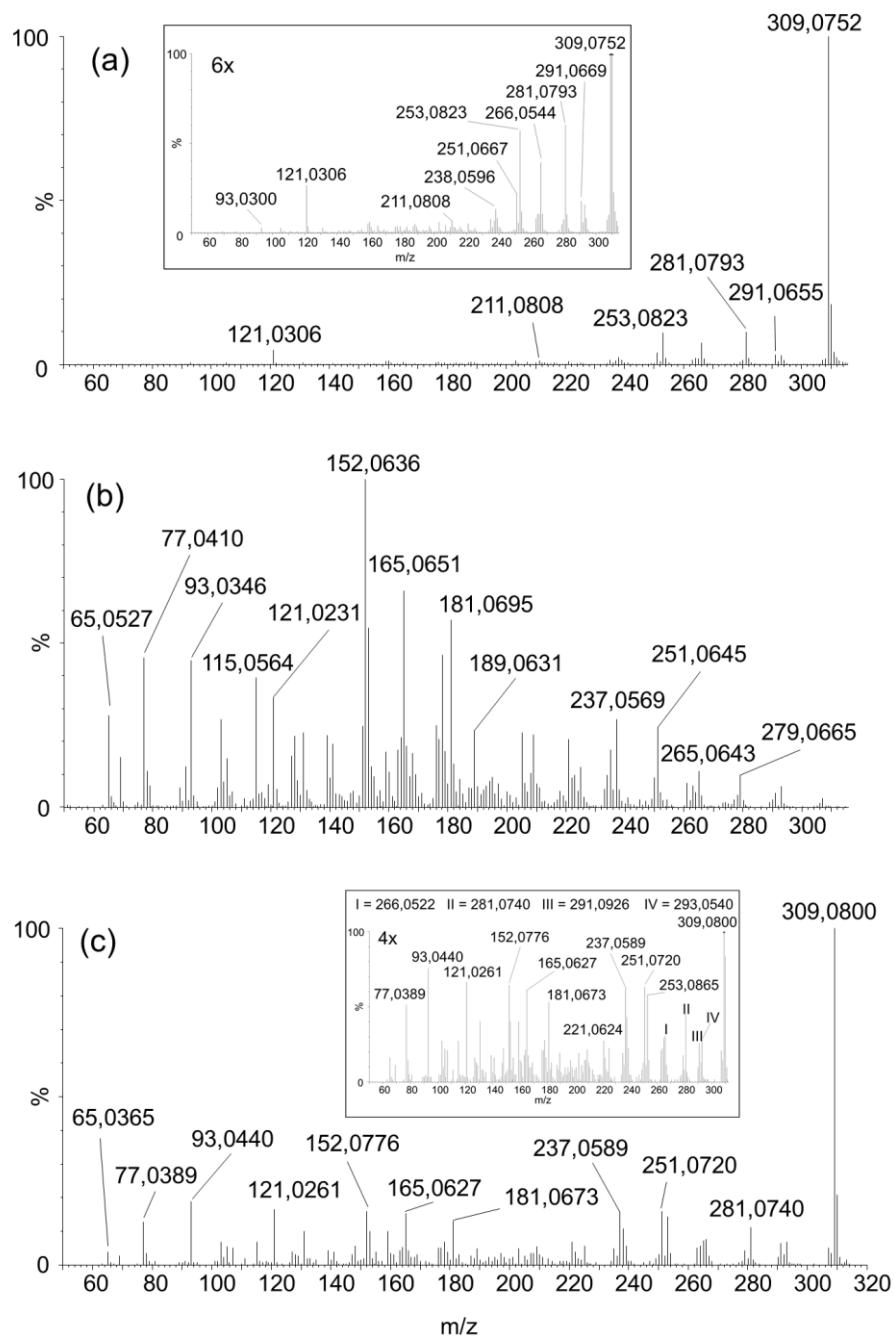


Obrázek 5. MS/MS spektra (a) 5-mePyPg a (b) 4-meFuPg, (c) poměr intenzit pozorovaných fragmentů k intenzitě odpovídajícího rodičovského iontu. MS/MS spektra a intenzity fragmentových iontů byly měřeny při kolizní energii 40 eV. V grafu (c) jsou pro jednoduchost uvedeny pouze nominální hodnoty m/z, přesné naměřené hodnoty m/z těchto iontů jsou uvedeny v MS/MS spektrech (a) a (b).

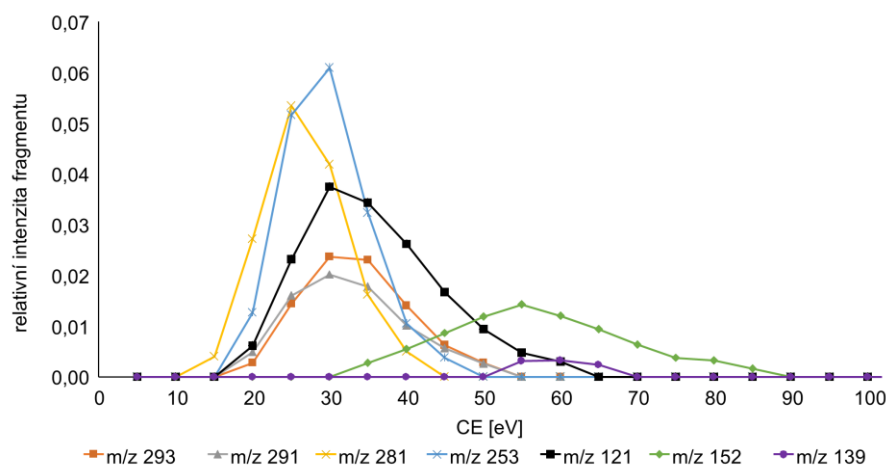


Obrázek 6. Závislost optimální kolizní energie na hodnotě m/z fragmentového iontu (a) pro 5-mePyPg a (b) pro 4-meFuPg. Popisky jsou označeny ionty ze skupiny RDA fragmentů.

Volba kolizní energie je problematická v případech kdy v MS/MS spektru vznikají fragmenty v širokém rozmezí m/z hodnot, což je i případ studovaných látek. Kolizní energie potřebné pro jejich vznik se výrazně liší. Řešením tohoto problému je využití rampy kolizní energie. Při použití této rampy je kolizní energie lineárně zvyšována z jedné hodnoty na druhou. Tím dochází ke vzniku velkých fragmentů vyžadujících pro svůj vznik malou kolizní energii a k jejich následné aktivaci a fragmentaci vedoucí částečně k jejich rozpadu a vzniku fragmentů menších. Tento postupný „ohřev iontů“ vede k výrazným rozdílům oproti spektrům získaným vložením konstantní kolizní energie v průběhu celého skenu. Na obrázku 8 je porovnán vzhled MS/MS spekter 5-mePyPg při nízké a vysoké kolizní energii (odpovídající nejnižší a nejvyšší zjištěné hodnotě OCE) a při použití rampy energie (obrázek 7).



Obrázek 7. Porovnání vzhledu kolizního spektra 5-mePyPg při použití (a) fixní kolizní energie 25 eV, (b) fixní kolizní energie 55 eV a (c) rampy kolizní energie v rozsahu 15-70 eV. V insetech obrázků (a) a (c) jsou přiblížené úseky MS/MS spekter, faktor přiblížení (vertikální zoom) je uveden vždy v příslušném insetu.



Obrázek 8. Vliv kolizní energie na relativní intenzitu fragmentového iontu pro 5-mePyPg.

Při použití nízké kolizní energie (obrázek 7a) vznikají zejména ionty tvořené malým počtem ztrát a zůstává také výrazně zachován signál rodičovského iontu (m/z 309). Naopak při použití vysoké kolizní energie (obrázek 7b) nejsou ionty z prvního spektra téměř vůbec přítomny, a naopak se projevují signály iontů s nižšími m/z hodnotami tvořenými převážně postupnými ztrátami. Pokud použijeme pro fragmentaci rampu kolizní energie (obrázek 7c), je i přes její rozsah, překračující výrazně horní limit OCE 5-mePyPg, profil spektra víceméně vyrovnaný a objevují se v něm fragmenty v celém rozsahu hodnot m/z . Obrázek 8 ukazuje na příkladu vybraných charakteristických iontů závislost výtěžku fragmentů na kolizní energii. U iontů lze pozorovat relativně úzkou oblast kolizních energií, ve kterých se vyskytují ve spektru. Úbytek těchto iontů při vyšších kolizních energiích je způsoben jejich následným štěpením. Ionty s nižší hodnotou m/z (v obrázku 8 ionty m/z 152 a m/z 139) se vyskytují v oblasti vyšších kolizních energií (a jsou tedy produkty ztrát malých molekul), oproti tomu iont m/z 121 se vyskytuje v oblasti nižších kolizních energií i přes nízkou hodnotu m/z , což podporuje teorii o jeho vzniku pomocí RDA štěpení.

Důkladné studium fragmentací iontů 5-mePyPg a 4-meFuPg pomohlo najít a popsat charakteristické fragmenty vznikající v kolizní cele tandemového hmotnostního spektrometru. Na základě kolizních spekter bylo možné rozlišit oba studované izomery. V následující kapitole jsou výtěžky vybraných charakteristických fragmentů srovnány pro obě látky

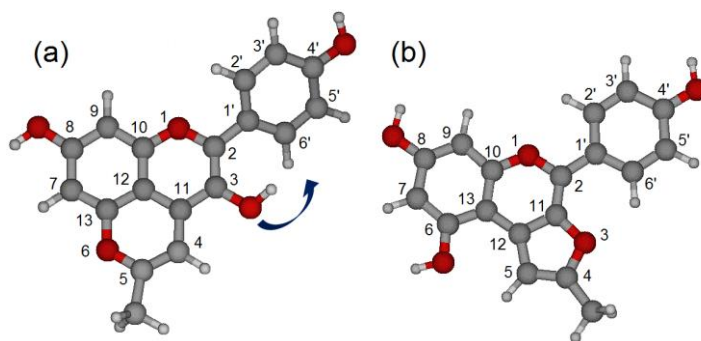
s výsledky kvantových výpočtů.

5.5. Výpočty energetické náročnosti fragmentačních procesů pomocí kvantové chemie

5.5.1. Optimalizace struktury 5-mePyPg a 4-meFuPg

Pro obě látky byla optimalizována základní struktura a energie obou sloučenin v iontovém stavu v plynné fázi. Tento proces spočíval optimalizaci konformace – orientace tří hydroxylových skupin a rotace B-kruhu vůči zbytku molekuly. Pro každý parametr bylo navoleno několik různých počátečních podmínek a systém byl ponechán relaxovat do lokálního energetického minima. Z takto získaných minim byla poté pro každou sloučeninu zvolena geometrie odpovídající nejnižší energii a ta použita jako výchozí. Výsledky jsou kvalitativně v souladu v práci Leopoldiniho a kol., zaměřenou rovněž na pyranoanthokyaniny – je pozorováno vychýlení B-kruhu vůči zbytku molekuly [31]. Nejstabilnější struktura 5-mePyPg je zobrazena na obrázku 9a. Tato data jsou součástí práce věnující se fragmentacím 5-mePyPg [9].

Obrázek 9. Optimalizované struktury (a) 5-mePyPg a (b) 4-meFuPg v plynné fázi. Šipkou je v obrázku (a) naznačena preferovaná orientace hydroxyly C3.



Obdobně bylo postupováno v případě optimalizace struktury 4-meFuPg. Na rozdíl od 5-mePyPg nebyla u 4-meFuPg nalezena žádná stabilní struktura s vychýleným B-kruhem oproti zbytku molekuly – všechny nalezené konformery jsou planární. Rozdíl v energiích je u nich tedy způsoben pouze polohou jednotlivých hydroxylů. Nejstabilnější struktura je znázorněna na obrázku 9b.

5.5.2. Porovnání energetické náročnosti vzniku charakteristických fragmentů u 5-mePyPg a 4-meFuPg s využitím DFT výpočtů

Fragmentační chování studovaných derivátů pelargonidinu může být charakterizováno na základě rozdílů energetických stavů rodičovských iontů obou látek a jejich fragmentů. Rozdíly mezi energií rodičovského iontu a součtem energií vznikajícího fragmentu a odštěpené neutrální části mohou být podle literatury korelovány s intenzitou tohoto fragmentu v MS/MS spektru [32]. Důležité procesy během fragmentace 5-mePyPg a 4-meFuPg zahrnují eliminaci molekuly vodíku, methanu, vody, oxidu uhelnatého a RDA štěpení. U demethylace a dehydratace je navrhovaným mechanismem přesun vodíku na místo štěpení a následný odstup příslušné molekuly, zatímco pro dekarboxylaci je potřeba vodík přesunout z hydroxylové skupiny na jinou část molekuly, čímž se odkryje C-O skupina schopná následného odštěpení. Ve všech těchto případech jsou jako možní poskytovatelé/příjemci přesouvaných vodíkových atomů uvažovány jednak hydroxylové skupiny a jednak uhlíky sousedící s centry štěpení. Byly modelovány fragmenty vznikající za těchto podmínek. V případě RDA štěpení není pro tvorbu $^{0,2}B^+$ iontu potřeba přesouvat vodík, tento ion vzniká pouhým přerušením existujících vazeb. Vzhledem k tomu, že dehydrogenace je silně nespecifický proces a v rámci molekuly existuje velké množství případných izomerů, nebyly pro účely této práce fragmentové ionty odpovídající struktuře $[M-H_2]^+$ modelovány. Rozdíly energií jednotlivých fragmentových iontů (vybrán byl vždy nejstabilnější z celé sady uvažovaných izomerů fragmentu) a odpovídajícího rodičovského iontu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Rozdíly v Gibbsových energiích rodičovského iontu a součtu energií odpovídajících produktů (tj. nabitě a neutrální části vzniklé štěpením).

fragmentový iont	rozdíl Gibbsových energií [eV]		geometrie iontu*	
	5-mePyPg	4-meFuPg	5-mePyPg	4-meFuPg
$[M-CH_4]^+$ (m/z 293)	3,33	4,64	O3	O4'
$[M-H_2O]^+$ (m/z 291)	1,69	3,25	O3-C6'	O8-O6
$[M-CO]^+$ (m/z 281)	0,80	0,53	O4'-C5'	O6-C7
$[M-2CO]^+$ (m/z 253)	0,54	1,37	O3-C6'	O4'-C5'

RDA $^{0.2}B^+$ (m/z 121)	5,15	4,78	-	-
---------------------------	------	------	---	---

*Geometrie iontů jsou udávány pomocí zkratk. U iontu $[M-CH_4]^+$ je uveden atom poskytující vodík, který je přesunut na methylovou skupinu a odštěpen spolu s ní. U iontu $[M-H_2O]^+$ je před pomlčkou uveden odstupující atom kyslíku a za pomlčkou atom původně nesoucí vodík přesunutý na tento kyslík. U iontů $[M-CO]^+$ a $[M-2CO]^+$ je před pomlčkou uveden odstupující atom kyslíku a za pomlčkou pak atom uhlíku, který přijme atom vodíku vázaný původně na odstupujícím kyslíku (fragment $[M-2CO]^+$ je zde předpokládán jako produkt vznikající z odpovídajícího $[M-CO]^+$ fragmentu uvedeného v této tabulce). RDA $^{0.2}B^+$ ion má stejnou strukturu pro 5-mePyPg i 4-meFuPg (acyliový iont 4-hydroxybenzoové kyseliny). Pro označení atomů viz obrázek 9.

Vypočtené hodnoty energií a jejich rozdíly dobře korespondují s rozdíly signálů v MS/MS spektrech mezi oběma studovanými izomerními deriváty pelargonidinu (při nižším rozdílu energií je pozorován vyšší signál odpovídajícího fragmentu, viz obrázek 5c). Dobrá shoda signálů charakteristických fragmentů získaných MS/MS experimenty a teoreticky vypočtených rozdílů energií ukazuje, že kvantové výpočty jsou velmi užitečným nástrojem pro interpretaci procesů probíhajícím při fragmentaci pyranoanthokyaninů v kolizní cele hmotnostního spektrometru a mohou tedy přispět k identifikaci tohoto druhu molekul.

Bylo studováno rovněž kinetické chování těchto iontů. Vypočítané energetické bariéry se pohybují v rozsahu 1,43 až 5,49 eV. V literatuře je popisován kolaps optimalizace některých tranzitních stavů představujících jednoduché štěpení vazby [33], stejná situace byla pozorována i při naší práci. Hodnoty energií, které byly nalezeny, jsou výrazně nižší, než kolizní energie použité během prováděných (a v praxi běžně používaných) MS/MS experimentů (řádově v desítkách eV) a všechny pozorované procesy tedy z tohoto hlediska mohou probíhat. Zjištěné energie tranzitních stavů však zároveň naznačují, že aktivační bariéry nejsou nutně klíčovým parametrem pro určení mechanismů zodpovědných za fragmentaci molekuly. Toto musí být vedeno v patrnosti zejména v případě přesunu vodíku, jak uvádí rovněž práce Wrightové a kol. [34].

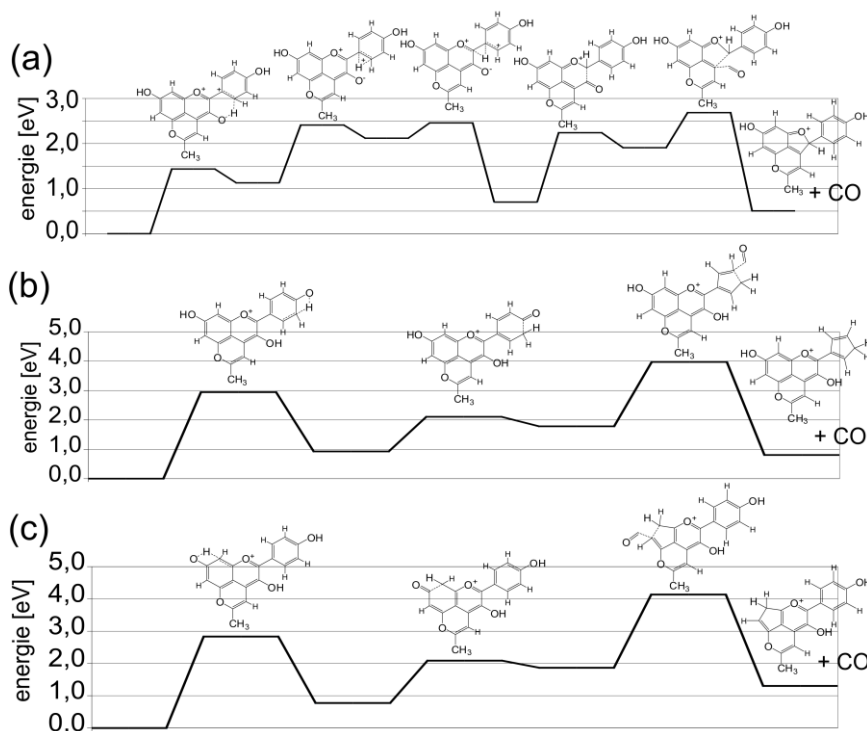
5.5.3. Energetický rozbor vybraných fragmentačních cest pro iont 5-mePyPg

5-mePyPg byl dále použit jako modelová sloučenina pro detailnější zkoumání

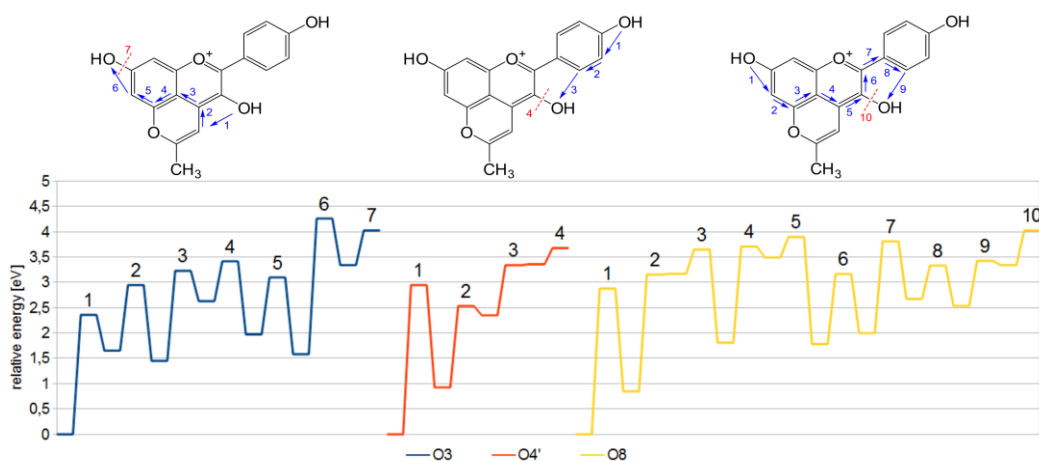
mechanismů fragmentace. Byly studovány detaily dvou procesů – ztráty molekuly vody a ztráty molekuly oxidu uhelnatého. Při hodnocení energií možných procesů nastávajících v průběhu fragmentací byly brány v potaz dvě kritéria – co nejnižší energie tranzitních stavů (pro eliminaci vody i oxidu uhelnatého) a předpoklad transferu vodíku z počátečního umístění do bodu nejnižšího energetického minima v rámci dané konfigurace molekuly (pro odstup oxidu uhelnatého). Za tímto účelem byly nejprve zmapovány pohyby všech hydroxylových vodíků po molekule 5-mePyPg a vybrány polohy s nejnižší energií pro nové umístění každého hydroxylového vodíku. Byly spočítány rovněž všechny související tranzitní stavy zahrnující přesuny všech hydroxylových vodíků mezi libovolnými dvěma atomy v molekule. Dále již byly cesty hodnoceny podle konkrétní ztráty. Výběr nejpravděpodobnější cesty z více možností byl realizován takto: Ze všech možných cest uvažovaných pro daný děj, byla vybrána cesta obsahující tranzitní stav s nejvyšší energií a odstraněna z výběru. Takto se pokračoval do okamžiku, kdy zbývala právě jediná cesta, která je proto energeticky nejvýhodnější.

Pro ztrátu oxidu uhelnatého dojde po dosažení minima k prasknutí jedné z vazeb mezi karbonylovým uhlíkem, na němž se nachází odštěpovaný kyslík a sousedním atomem uhlíku. Tento děj je následován recyklizací, čímž vzniká pětičlenný kruh a následně je ze vzniklé struktury odštěpena molekula oxidu uhelnatého (schematicky vyjádřeno na obrázku 10). Srovnání všech tří možných cest (za ztráty atomů C3O3, C8O8 a C4'O4') je znázorněno na obrázku 10. Podle tohoto srovnání je energeticky nejvýhodnější cestou přesun vodíku z hydroxyly O3 a z termodynamického hlediska by tedy měla být preferována ztráta molekuly oxidu uhelnatého právě v této poloze. Rozdíl energií (vypočtený jako energie rodičovského iontu odečtená od sumy energií vzniklého fragmentu a oxidu uhelnatého) je v tomto případě 0,51 eV. Nejvyšším bodem na křivce popisující energie jednotlivých struktur, kterými rodičovský ion prochází, je tranzitní stav odpovídající vzniku pětičlenného kruhu (viz obrázek 10). Jeho energie je 2,69 eV.

Obrázek 10. Srovnání fragmentačních cest vedoucích k odštěpení oxidu uhelnatého z rodičovského iontu 5-mePyPg.



Analogicky bylo postupováno při řešení výběru preferované fragmentační cesty pro ztrátu molekulu vody (obrázek 11). „Nejkratší možná cesta vodíku“ (přesun vodíku z hydroxylu O4' na hydroxyl O3) je současně nejvýhodnější ve smyslu energetické náročnosti jednotlivých tranzitních stavů. Při srovnání je energie jejího posledního kroku nižší i vůči energiím odpovídajícího procesu při transferu arylových vodíků. To znamená, že tato cesta je ve srovnání s procesy vycházejícími z arylových vodíků preferovaná.



Obrázek 11. Srovnání fragmentačních cest v 5-mePyPg vedoucích k odštěpení molekulu vody.

Shrnutím výše uvedených informací je, že jak ztráta oxidu uhelnatého, tak ztráta molekuly vody z 5-mePyPg se z energetického hlediska odehrává preferenčně na atomu C3. Ztrátou kyslíku z polohy C3 se v obou případech zároveň geometrie vznikajícího fragmentu planarizuje (oproti původní struktuře s vychýleným B-kruhem), což může být dalším z faktorů, který průběh prezentovaných mechanismů usnadňuje. Tyto výsledky byly publikovány v práci [9]. Pro získání výše uvedených informací bylo provedeno celkem zhruba 600 výpočtů energií tranzitních stavů a minim (odpovídá přibližně 1800 hodin výpočetního času při použití výpočetního serveru uvedeného v experimentální části).

5.6. Analýza anthokyaninů a jejich derivátů v jahodovém víně

Během fermentace ovocných nápojů probíhá mnoho reakcí nativních anthokyaninů s malými reaktivními molekulami [35]. V jahodách se z nativních anthokyaninů vyskytují ve významném množství především glykosidy a acylglykosidy Pg, kyanidinu (Cy) a delfinidinu (Dp), dále pak i samotné aglykony [36]. Jejich deriváty vznikající během fermentace a zrání jahodového vína byly analyzovány s využitím UHPLC-MS/MS. Pozornost byla zaměřena především na detekci a charakterizaci přítomných pyrano- a furanoanthokyaninů. Experimenty ukázaly, že UHPLC/MS poskytuje dostatečnou selektivitu pro charakterizaci přítomných barviv. Pro chromatografickou separaci byla jako výchozí použita stejná metoda, která se osvědčila pro analýzu složení reakční směsi obsahující Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg. Bylo potřeba pouze upravit profil gradientu tak, aby bylo dosaženo lepší vzájemné rozlišení přítomných pigmentů. To vedlo k prodloužení analýzy (celková délka analýzy byla 10 minut). Prodloužení (zpomalení) analýzy ovšem umožnilo prodloužit délku MS skenů, použít MS^E experiment a případně přidat mezi skenovací události i cílené MS/MS skeny. Tímto způsobem byla získána většina spekter v dostatečné kvalitě i dostatečný počet bodů na pík umožňující kvantifikaci nalezených barviv (optimalizované parametry použité UHPLC/MS metody jsou uvedeny v experimentální části).

Identifikace látek je založena na kombinaci retenčního času, měření přesné a správné hodnoty m/z, fragmentaci rodičovského iontu (MS/MS či MS^E) a v případě Pg, 5-mePyPg a 4-meFuPg také na srovnání s připravenými standardy. Dominantním procesem pozorovaným v MS/MS spektrech nalezených glykosidů jsou ztráty dehydratované glukózy (Δ m/z 162),

rutinózy ($\Delta m/z$ 308) a malonylglukózy ($\Delta m/z$ 248). Pozorované charakteristické procesy pro fragmentace aglykonů zahrnují ztráty methyly ($\Delta m/z$ 15), vody ($\Delta m/z$ 18), oxidu uhelnatého ($\Delta m/z$ 28) a RDA štěpení. S využitím znalosti fragmentace anthokyanidinů v oblasti malých ztrát [37], byly identifikovány aglykony a glukosidy Pg, Cy a Dp. Obsah glukosidů je obecně vyšší než obsah aglykonů (pro Pg viz tabulka 2). V případě Pg (jako dominantního anthokyanidinu) byl identifikován také jeho malonylglukosid. Byl pozorován také výskyt látky, která pravděpodobně odpovídá rutinoidu odvozenému od pelargonidinu. Retence této látky je ve srovnání s dříve publikovanými daty nižší [38], ale naměřená hodnota m/z je identická s elementárním složením uvažovaného rutinoidu a signál aglykonu v MS/MS spektru této látky odpovídá pelargonidinu. Rozdíl v retenci by mohl být způsoben odlišnými chromatografickými podmínkami (použití kolony AQUA C18 a trifluoroctové kyseliny jako aditiva ve výše citované práci oproti koloně Acquity BEH C18 a kyselině mravenčí v naší studii). V průběhu studie byly i pro další čtyři látky předběžně určené jako rutinoidy pozorovány kratší retenční časy než u odpovídajících glukosidů, viz níže).

Ve směsi nebyly vedle 5-mePyPg-Glu nalezeny další glykosidy s m/z hodnotou 471. 4-meFuPg tedy tvoří odpovídající glykosid. Logickým vysvětlením je že, O3 kyslík (který je preferenčním místem glykosylace anthokyaninů) je blokován přítomným furano-kruhem. Ve směsi byly dále nalezeny 5-karboxypyranopelargonidin (analog vitisinu A [39]), jeho 3-O-glukosid, 3-O-malonylglukosid, 3-O-rutinosid, pyranopelargonidin-3-O-glukosid (analog vitisinu B [39]), jeho aglykon a také stopy 5-hydroxypyranopelargonidin-3-O-glukosidu (derivát typu oxovitisinu [40]). Jako zástupci složitějších pyranoanthokyaninů byly ve směsi nalezeny 5-*p*-hydroxyfenyl-PyPg, jeho 3-O-glukosid, 3-O-malonylglukosid, 3-O-rutinosid a 5-guajakol-PyPg-3-O-glukosid. Tvorba guajakolových derivátů je popsána v jahodových džusech uměle obohacených kyselinou ferulovou (která může dekarboxylovat v reakční činidlo, jímž je vinylguajakol) [41], což nepřímo potvrzuje i naše výsledky. Vedle předkládané práce se identifikací anthokyaninových barviv ve fermentovaných produktech z jahod zabývali ve své práci pouze Hornedo-Ortega a kol. [42]. Jejich práce zkoumá produkty fermentace jahodových pyré pomocí bakterie *Gluconobacter japonicus*. Toto kvašení způsobuje přeměnu glukózy na kyselinu glukonovou a výsledné produkty jsou tak vhodné ke konzumaci např. pro diabetiky. Kromě flavonoidů již dříve zmiňovaných s ohledem na jejich výskyt v jahodách, byl v těchto produktech nalezen 5-cbxPyPg-Glu, ale ne 5-mePyPg, jeho

glykosidy, ani 4-meFuPg. Tím pádem jsou 4-meFuPg, 5-mePyPg, jeho 3-O-glukosid a (předběžně identifikovaný) 3-O-rutinosid v předkládané disertační práci identifikovány jako součást fermentovaného produktu z jahod vůbec poprvé. Tabulka 2 ukazuje změny v obsahu sledovaných látek v připraveném jahodovém víně. Celý proces zrání má za následek nárůst sumy obsahu pozorovaných pyrano- a furanoanthokyaninů, což je velmi pravděpodobně spojeno s probíhajícími fermentačními procesy (tvorba kyseliny octové, acetonu, kyseliny pyrohroznové aj.).

Tabulka 2. koncentrace vybraných sloučenin v jahodovém víně.

sloučenina stáří směsi [dny]	průměrná koncentrace [µg/L]*						
	Pg	Pg-Glu	5-mePyPg	4-meFuPg	5-mePyPg-Glu	5-cbxPyPg	5-cbxPyPg-Glu
0	152,37	47291,67	11,70	6,19	31,52	1,55	133,84
1	3038,82	30253,13	15,39	7,33	39,10	1,55	250,45
2	2757,86	21955,71	21,23	9,61	38,38	5,53	252,32
3	1247,30	22915,50	17,30	7,18	42,62	4,23	291,80
4	1040,99	21128,79	32,57	12,67	37,90	9,57	269,86
5	2635,38	16769,71	35,65	15,36	40,87	12,05	269,96
6	4711,09	12124,85	44,34	13,69	27,95	19,57	210,81
7	2624,13	14445,75	27,39	11,34	35,55	5,73	271,10
14	2448,32	11587,90	26,96	17,51	38,07	11,52	284,13
21	476,53	9489,52	13,94	17,07	40,82	6,80	285,12
28	132,45	4979,02	11,71	14,53	36,73	5,18	173,74
35	86,47	5063,77	12,33	15,95	34,04	8,11	248,29

* Koncentrace všech látek jsou vyjádřeny jako ekvivalenty PgCl.

6. Závěr

V rámci předkládané práce byla provedena semisyntéza dvou anthokyaninových barviv – 5-methylpyranopelargonidinu a 4-methylfuranopelargonidinu. Byl sledován vývoj obsahu těchto barviv v reakční směsi v čase a následně provedena izolace obou látek pomocí optimalizované semipreparativní HPLC metody. Zvolené chromatografické podmínky umožňují izolovat 10 mg každého izomeru za 24 hodin. Byly vyvinuty analytické UHPLC/PDA a UHPLC/MS metody pro rychlou kontrolu směsi s ohledem na obsah původního anthokyaninu (pelargonidinu) a obou vznikajících derivátů. Všechny tři látky lze pomocí UHPLC/MS separovat za 35 sekund. Přечиštěné izomery byly detailně studovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Mezi významné fragmentační procesy pozorované při MS/MS experimentech patří dehydrogenace, eliminace methanu, vody, oxidu uhelnatého a retro-Diels-Alderovské štěpení. Pro pozorované fragmenty byla zjištěna jejich optimální kolizní energie, tj. kolizní energie poskytující v MS/MS největší relativní výtěžek příslušných iontů. Pro všechny významné fragmenty v MS/MS spektru 5-methylpyranopelargonidinu i 4-methylfuranopelargonidinu se optimální kolizní energie pohybuje v rozmezí 25-55 eV. Rovněž systém vkládání kolizní energie (konstantní / použití rampy energie) ovlivňuje do značné míry vzhled fragmentačního spektra. Kolizní spektra obou izomerů jsou rozdílná co do intenzit fragmentů vznikajících výše uvedenými procesy. Vznik fragmentů ztrátou molekuly vodíku, molekuly vody, molekuly methanu a dvou molekul oxidu uhelnatého je preferován v MS/MS spektru pyranoderivátu. RDA štěpení za vzniku $^{0,2}B^+$ iontu je naproti tomu preferováno v MS/MS spektru furanoderivátu. Tyto výsledky byly porovnány s daty získanými pomocí výpočetních DFT metod. V rámci výpočtů byla optimalizována geometrie základního stavu iontů studovaných látek v plynné fázi a vypočtena energie zkoumaných fragmentů. Bylo zjištěno, že vypočtené hodnoty reflektují experimentálně pozorované rozdíly mezi fragmentačními spektry obou látek. Při porovnání fragmentačních spekter naměřených za shodných podmínek je pozorována vyšší intezita fragmentů u toho z izomerů, jehož fragment má nižší energetickou hodnotu (a je tedy stabilnější). Pro ion 5-methylpyranopelargonidinu byla dále provedena rozsáhlejší studie, kdy byly pomocí výpočtu energií tranzitních stavů nalezeny optimální fragmentační cesty vedoucí k odštěpení molekuly vody a molekuly oxidu uhelnatého. Jako preferovaná se v obou případech jeví taková ztráta, kdy vzniká planární fragmentový ion. Obě studované látky

(5-mePyPg a 4-meFuPg) byly nalezeny v ovocném víně laboratorně připraveném fermentací jahod. S využitím optimalizované UHPLC/MS metody byl detailně popsán profil anthokyaninů a jejich derivátů v tomto ovocném víně a změny v koncentracích majoritního pelargonidinu, odpovídajícího glukosidu i přítomných pyrano- a furanoderivátů během fermentace.

Výsledky prezentované v této disertační práci byly publikovány ve dvou impaktovaných časopisech a rukopis další práce je v recenzním řízení. Výsledky těchto studií byly formou plakátových sdělení prezentovány na domácích i mezinárodních konferencích.

7. Literatura

- [1] O. M. Andersen, M. Jordheim, Basic anthocyanin chemistry and dietary sources, in: T. C. Wallace, M. M. Giusti (editors), *Anthocyanins in Health and Disease*, CRC Press, Boca Raton, 2014, 13–90.
- [2] A. Smeriglio, D. Barreca, E. Bellocco, D. Trombetta, Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins, *Phytother. Res.* 30 (2016) 1265–1286.
- [3] J. Bakker, P. Bridle, T. Honda, H. Kuxvano, N. Saito, N. Terahara, C. F. Timberlake, Identification of an anthocyanin occurring in some red wines, *Phytochemistry* 44 (1997) 1375–1382.
- [4] J. Bakker, C. F. Timberlake, Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 35–43.
- [5] M. Schwarz, P. Winterhalter, A novel synthetic route to substituted pyranoanthocyanins with unique colour properties, *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 7583–7587.
- [6] Y. Lu, Y. Sun, L. Y. Foo, Novel pyranoanthocyanins from black currant seed, *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 5975–5978.
- [7] Y. Lu, L. Y. Foo, Unexpected rearrangement of pyranoanthocyanidins to furoanthocyanidins, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 715–718.
- [8] O. Kurka, R. Myjavcová, P. Bednář, Možnosti přípravy vybraných kondenzovaných anthokyaninů v modelových podmínkách a studium jejich vlastností, *Chem. Listy* 105 (2011) 37–39.
- [9] O. Kurka, J. Roithová, P. Bednář, Examination of small molecule losses in 5-methylpyranopelargonidin MS/MS CID spectra by DFT calculations, *J. Mass Spectrom.* 49 (2014) 1314–1321.
- [10] R. Myjavcová, P. Bednář, A. Srovnalová, Z. Dvořák, B. Papoušková, Ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry study of metabolism of 5-methylpyranopelargonidin, *Chromatographia* 78 (2015) 189–201.
- [11] J. He, C. Santos-Buelga, A. M. S. Silva, N. Mateus, V. de Freitas, Isolation and structural characterization of new anthocyanin-derived yellow pigments in aged red wines, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9598–9603.
- [12] J. Valls, S. Millán, M. P. Martí, E. Borràs, L. Arola, Advanced separation methods of food

- anthocyanins, isoflavones and flavanols, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7143–7172.
- [13] M. O. Downey, S. Rochfort, Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin, *J. Chromatogr. A* 1201 (2008) 43–47
- [14] 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.* 214 (2002) 248–253.
- [15] W. M. A. Niessen, *Liquid chromatography: Mass spectrometry*, Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006.
- [16] 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* 1235 (2012) 92–102.
- [17] P. Montoro, C. I. G. Tuberoso, A. Perrone, S. Piacente, P. Cabras, C. Pizza, Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 232–240.
- [18] A. Škríba, Š. Janková, J. Váňa, Barták, P. Bednář, P. Fryčák, L. Kučera, O. Kurka, K. Lemr, P. Macíková, E. Marková, P. Nováková, B. Papoušková, J. Skopalová, H. Švecová, J. Roithová, Protonation sites and fragmentations of para-aminophenol, *Int. J. Mass Spectrom.* 337 (2013) 18–23.
- [19] 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* 138 (2013) 6869–6880.
- [20] C. Guo, L. Yue, M. Guo, K. Jiang, Y. Pan, Elimination of benzene from protonated N-benzylindoline: Benzyl cation/proton transfer or direct proton transfer?, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24 (2013) 381–387.
- [21] R. Guzmán, C. Santiago, M. Sánchez, A density functional study of antioxidant properties on anthocyanidins, *J. Mol. Struct.* 935 (2009) 110–114.
- [22] R. Pop, M. N. Ștefănuț, A. Căta, C. Tănăsie, M. Medeleanu, Ab initio study regarding the evaluation of the antioxidant character of cyanidin, delphinidin and malvidin, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 180–186.

- [23] 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.* 308 (2011) 71–80.
- [24] C. Lee, G. Yang, R. G. Parr, Development of the Colic-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785–789.
- [25] S. H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1200–1211 .
- [26] A. D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098–3100.
- [27] A. D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact Exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [28] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 11623–11627.
- [29] Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [30] D. Blanco-Vega, F. J. López-Bellido, J. M. Alía-Robledo, I. Hermosín-Gutiérrez, HPLC-DAD-ESI-MS/MS characterization of pyranoanthocyanins, pigments formed in model wine, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 9523–9531.
- [31] M. Leopoldini, F. Rondinelli, N. Russo, M. Toscano, Pyranoanthocyanins: A theoretical investigation on their antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8862–8871.
- [32] O. I. Obolensky, W. W. Wu, R.-F. Shen, Y.-K. Yu, Using dissociation energies to predict

observability of b- and y-peaks in mass spectra of short peptides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 915–920.

[33] E. Schuhfried, M. Probst, J. Limtrakul, S. Wannakao, E. Aprea, L. Cappellin, T. D. Märk, F. Gasperic, F. Biasioli, Sulfides: chemical ionization induced fragmentation studied with Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry and density functional calculations, *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 367–378.

[34] P. Wright, A. Alex, F. Pullen, Predicting collision-induced dissociation mass spectra: understanding the role of the mobile proton in small molecule fragmentation, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30 (2016) 1163–1175.

[35] M. Rentzsch, M. Schwarz, P. Winterhalter, Pyranoanthocyanins – an overview on structures, occurrence, and pathways of formation, *Trends Food Sci. Tech.* 18 (2007) 526–534.

[36] A. B. Cerezo, E. Cuevas, P. Winterhalter, M. C. Garcia-Parrilla, A. M. Troncoso, Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry, *Food Chem.* 123 (2010) 574–582.

[37] Y. Hayasaka, R. E. Asenstorfer, Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 756–761.

[38] F. L. da Silva, M. T. Escribano-Bailón, J. J. P. Alonso, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, Anthocyanin pigments in strawberry, *LWT* 40 (2007) 374–382.

[39] A. Morata, F. Calderón, M. C. González, M. C. Gómez-Cordovés, J. A. Suárez, Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde, *Food Chem.* 100 (2007) 1144–1152.

[40] J. He, J. Oliveira, A. M. S. Silva, N. Mateus, V. de Freitas, Oxovitisins: A new class of neutral pyranone-anthocyanin derivatives in red wines, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8814–8819.

[41] M. J. Rein, V. Ollilainen, M. Vahermo, J. Yli-Kauhaluoma, M. Heinonen, Identification of novel pyranoanthocyanins in berry juices, *Eur. Food Res. Technol.* 220 (2005) 239–244.

[42] R. Hornedo-Ortega, M. A. Álvarez-Fernández, A. B. Cerezo, A. M. Troncoso, M. C. García-Parrilla, Influence of storage conditions on the anthocyanin profile and colour of an innovative beverage elaborated by gluconic fermentation of strawberry, *J. Funct. Foods* 23 (2016) 198–209.

[43] B. Piffaut, F. Kader, M. Girardin, M. Metche, Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments, *Food Chem.* 50 (1994) 115–120.

Curriculum vitae

RNDr. Ondřej Kurka

narozen 11. října 1986 v Ostravě, ČR

trvalé bydliště: Horymírova 112, 700 30, Ostrava-Zábřeh

Vzdělání:

2011-dosud postgraduální studium na PřF UP v Olomouci, obor Analytická chemie

2015 rigorózní zkouška, PřF UP v Olomouci, obor Analytická chemie

2009-2011 navaz. magisterské studium na PřF UP v Olomouci, obor Analytická chemie

2006-2009 bakalářské studium na PřF UP v Olomouci, obor Chemie

Vědecké stáže:

- University of Texas at Arlington, Arlington, Texas, USA, 29. 9. - 20. 12. 2013 (prof. Kevin A. Schug, Ph.D.).

Odborné vědecké zaměření:

Analytická chemie, hmotnostní spektrometrie malých molekul, analytická a semipreparativní kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, chirální analýza, výpočetní chemie.

Účast na výzkumných projektech:

- Člen řešitelského týmu projektu GA ČR GAČR 17-17346S: Moderní chemická analýza zbytků organických materiálů v archeologickém kontextu (2017- 2019)
- Člen řešitelského týmu projektu GA ČR 13-01809S: Enantiospecifické interakce mezi klinicky užívanými léčivy a regulačními drahami humánních cytochromů P450 (2013-2017)

- Člen řešitelského týmu projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0029: Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe (2011-2013)
- Člen řešitelského týmu projektů PrF_2012_020, IGA_PrF_2013_030, IGA_PrF_2014031 a IGA_PrF_2015_020

Pedagogická činnost:

- vyučující předmětů Cvičení z analytické chemie, Matematický seminář
- vedoucí bakalářské práce (Monika Cechová – Štúdium reakcií antokyaninů s acetaldehydom, obhájeno úspěšně dne 4. 6. 2013)
- konzultant diplomové práce (Bc. Petra Skácelová – Využití výpočetní chemie při studiu fragmentace vybraných flavonoidů v kolizní cele hmotnostního spektrometru, úspěšně obhájeno dne 17. 5. 2016)

Publikace:

- Možnosti přípravy vybraných kondenzovaných anthokyaninů v modelových podmínkách a studium jejich vlastností. Ondřej Kurka, Renáta Myjavcová, Petr Bednář, *Chem. Listy* **105** (2011), 37-39.
- Protonation sites and fragmentations of para-aminophenol. Anton Škríba, Štěpánka Janková, Jiří Váňa, Petr Barták, Petr Bednář, Petr Fryčák, Lukáš Kučera, Ondřej Kurka, Karel Lemr, Pavla Macíková, Eva Marková, Petra Nováková, Barbora Papoušková, Jana Skopalová, Hana Švecová, Jana Roithová, *International Journal of Mass Spectrometry* **337** (2013), 18-23.
- Examination of small molecule losses in 5-methylpyranopelargonidin MS/MS CID spectra by DFT calculations. Ondřej Kurka, Jana Roithová, Petr Bednář, *J. Mass Spectrom.* **49** (2014), 1314-1321.
- Electrochemical oxidation of zopiclone. Jakub Táborský, Martin Švidrnoch, Ondřej Kurka, Lucie Borovcová, Petr Bednář, Petr Barták, Jana Skopalová, *Monatsh. Chem.* **147** (2016), 53-60.
- Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of *Coffea arabica* L. coffee beans. Lukáš Kučera, Roman Papoušek, Ondřej Kurka, Petr Barták, Petr Bednář, *Food Chem.* **199** (2016), 727-735.

- Analytical and semipreparative chiral separation of *cis*-itraconazole on cellulose stationary phases by high-performance liquid chromatography. Ondřej Kurka, Lukáš Kučera, Petr Bednář, *J. Sep. Sci.* **39** (2016), 2736-2745.
- Optical isomers of dihydropyridine calcium channel blockers display enantiospecific effects on the expression and enzyme activities of human xenobiotics-metabolizing cytochromes P450. Martina Štěpánková, Kristýna Krasulová, Aneta Dořičáková, Ondřej Kurka, Pavel Anzenbacher, Zdeněk Dvořák, *Toxicol. Lett.* **262** (2016), 173-186.
- Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry – Tool for the study of polyphenol profile changes during micro-scale biogas digestion of grape marcs. Lukáš Kučera, Ondřej Kurka, Petr Barták, Petr Bednář, *Chemosphere* **166** (2017), 463-472.

Prezentace na odborných setkáních:

- Studium vybraných kondenzovaných anthokyanidinových barviv pomocí tandemové MS. Ondřej Kurka, Renáta Myjavcová, Petr Bednář: Česká konference hmotnostní spektrometrie, 19.-21. 10. 2011, Hradec Králové, ČR, poster ThP-014.
- Pyranoanthocyanins: Study on fragmentation. Ondřej Kurka, Renáta Myjavcová, Petr Bednář: Twelfth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analysers, 1.-3. 2. 2012, Brugge, Belgie, poster HTC-F14.
- Pyranoanthocyanins: Study on fragmentation. Ondřej Kurka, Renáta Myjavcová, Lukáš Kučera, Barbora Papoušková, Petr Marhol, Vladimír Křen, Jan Stávek, Josef Balík, Petr Bednář: Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2012, 11.-14. 6. 2012, Olomouc, ČR, poster.
- Examination of small molecule losses in 5-methylpyranopelargonidin MSMS CID spectra by DFT calculations. Ondřej Kurka, Petr Bednář: Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2014, 10.-14. 2. 2014, Olomouc, ČR, poster P31.

- Analytical and semipreparative separation of itraconazole enantiomers by HPLC. Ondřej Kurka, Petr Bednář: 30th International Symposium on Chromatography, 14.-18. 9. 2014, Salzburg, Rakousko, poster P531.
- Analytical and semipreparative chiral separation of itraconazole. Ondřej Kurka, Petr Bednář: HPLC 2015, 21.-25. 6. 2015, Ženeva, Švýcarsko, poster PSB-PHARM-23.
- Study of analytical properties of 5-methylpyranopelargonidin and 5-methylfuropelargonidin and development of fast UPLC-MSMS method for their separation, Ondřej Kurka, Lukáš Kučera, Petr Bednář: Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiral 2016, 6.-9. 6. 2016, Olomouc, ČR, poster P26.
- Influence of solvent on the optical rotation of alpha-benidipine enantiomers, Ondřej Kurka, Lukáš Kučera, Petr Bednář: 31th International Symposium on Chromatography, 28.8.-1. 9. 2016, Cork, Irsko, poster P02-002-060.