

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Interakce nízkoenergetických elektronů
s izolovanými a hydratovanými biomolekulami

Autor: Bc. Barbora Sedmidubská
Vedoucí: Ing. Marie Davídková, CSc.
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Barbora Sedmidubská**

Studijní program: Aplikace přírodních věd

Obor: Jaderná chemie

Název práce: **Interakce nízkoenergetických elektronů s izolovanými a hydratovanými biomolekulami**
(česky)

Název práce: **Interactions of low energy electrons with isolated and hydrated biomolecules**
(anglicky)

Pokyny pro vypracování:

1. Provést rešerši literatury s cílem i) obeznámit se s problematikou sekundárních nízkoenergetických elektronů v radiační chemii biologických systémů a ii) výběru vhodných modelových molekul pro studium vplyvu vodního prostředí na poškození DNA a chromozomů sekundárními nízkoenergetickými elektrony. [1,2]
2. Obeznámit se s experimenty používanými v Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR ke studiu interakce nízkoenergetických elektronů s izolovanými molekulami [3] a jejich klastry [4]
3. Provést vlastní experimentální studii fragmentace vybraných izolovaných biomolekul po interakci s elektrony o energiích 0 – 70 eV.
4. Provést vlastní experimentální studii fragmentace vybraných biomolekul ve vodních klastrech po interakci s elektrony o energiích 0 – 70 eV a interpretovat získaná data v kontextu relevantních publikovaných výsledků (např. [5,6]).
5. Provést vlastní experimentální studii energetických závislostí pro záchyt elektronů na vybraných biomolekulách ve vodních klastrech a interpretovat získaná data vzhledem k jejich možnému využití při návrhu léčiv pro kombinovanou chemo-radiační terapii (např. [7]).

Doporučená literatura:

- [1] von Sonntag, C. The Chemical Basis of Radiation Biology: Radiobiology (Taylor & Francis, London) (1987).

- [2] Alizadeh, E., Orlando, T. M., Sanche, L. Biomolecular Damage Induced by Ionizing Radiation: The Direct and Indirect Effects of Low-Energy Electrons on DNA Annual Review of Physical Chemistry 66, 379-398 (2016)
- [3] Langer, J., Zawadzki, M., Fárník, M., Pinkas, J., Fedor, J., Kočišek, J., Electron interactions with Bis(pentamethylcyclopentadienyl) titanium(IV) dichloride and difluoride, EPJD, 72,112 (2018)
- [4] Kočišek, J., Pysanenko, A., Fárník, M. and Fedor, J. Microhydration prevents fragmentation of Uracil and Thymine by low-energy electrons. J Phys Chem Lett. 7(17), 3401–3405 (2016).
- [5] Nomura, S., Tsuchida, H., Kajiwara, A., Yoshida, S., Majima, T. and Saito, M. Dissociation of biomolecules in liquid environments during fast heavy-ion irradiation. J Chem Phys. 147, 225103 (2017).
- [6] Kitajima, K., Tsuchida, Majima, T. and Saito, M. Secondary electron-induced biomolecular fragmentation in fast heavy-ion irradiation of microdroplets of glycine solution. J Chem Phys. 150, 095102 (2019).
- [7] Schürmann, R., Vogel, S., Ebel, K., Bald, I., The Physico-Chemical Basis of DNA Radiosensitization: Implications for Cancer Radiation Therapy, Chemistry A European Journal 24, 10271-10279, 2018

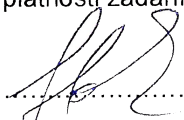
Jméno a pracoviště vedoucího práce:

Ing. Marie Davidková, CSc., Oddělení dozimetrie záření, Ústav jaderné fyziky AV ČR

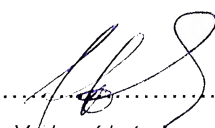
Datum zadání diplomové práce: 21. 10. 2019

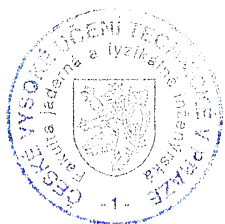
Termín odevzdání diplomové práce: 4. 5. 2020

Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.

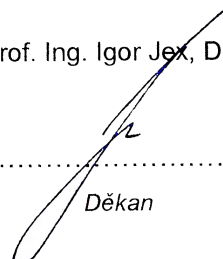

.....
Garant oboru

prof. Ing. Jan John, CSc.


.....
Vedoucí katedry



prof. Ing. Igor Jex, DrSc.


.....
Děkan

V Praze dne 21. října 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu.

V Praze

.....
Bc. Barbora Sedmidubská

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, bez kterých by tato práce nevznikla.

Konkrétně děkuji Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské za možnost zpracovat toto zajímavé téma, jako pokračování mé bakalářské práce a výzkumného úkolu.

Velmi děkuji mé školitelce, paní doktorce Davidkové, z Ústavu jaderné fyziky AV ČR za předání cenných zkušeností, konzultace a korekci této práce.

Velké poděkování patří mému školiteli - specialistovi, panu doktoru Kočiškovi z Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, za ochotu, trpělivost a vynikající podmínky při odborném vedení a za dlouhodobé rozšiřování mých znalostí a dovedností při výzkumné činnosti. Rovněž děkuji celému pracovnímu kolektivu za přátelskou atmosféru a pomoc při získávání praktických a teoretických poznatků.

Bc. Barbora Sedmidubská

Název práce: **Interakce nízkoenergetických elektronů s izolovanými a hydratovanými biomolekulami**

Autor: Bc. Barbora Sedmidubská

Obor: Jaderná chemie

Druh práce: Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Marie Davidková, CSc., Oddělení dozimetrie záření, Ústav jaderné fyziky AV ČR, v.v.i.

Konzultant: Mgr. Jaroslav Kočišek, PhD., Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, v.v.i.

Abstrakt: Motivací této práce je lepší pochopení chemických procesů v buňce podstupující ozařování, kdy vzniká velké množství iontů a sekundárních elektronů. Následkem interakcí těchto částic se složkami buňky dochází k poškození buněčných struktur jako jsou DNA, lipidy a proteiny. Cílem práce bylo studium primárních procesů poškození proteinů zářením pomocí metody elektronové záchytové spektroskopie. Tato práce se zaměřuje na interakce nízkoenergetických elektronů, tedy elektronů s energiemi při kterých nedochází k ionizaci molekuly, ale k záhytu elektronu (typicky 0 - 10 eV). Při těchto energiích je významný zejména proces disociativního elektronového záhytu, který často vede k fragmentaci při subexcitačních energiích. Do práce byly vybrány molekuly sloužící jako model pro peptidy. Zvoleny byly dvě aminokyseliny L-cystein a L-valin a dva amidy navržené jako jednoduché modely pro peptidovou vazbu: formamid a N-methylacetamid. Tyto sloučeniny byly měřeny v jejich izolované a klastrové formě. Měření hydratovaných klastrů umožnilo studium vlivu okolního prostředí na reakce.

Klíčová slova: Elektronová záchytová spektroskopie, sekundární elektrony, L-cystein, L-valin, formamid, N-methylacetamid

***Title:* Interactions of low energy electrons with isolated and hydrated biomolecules**

Author: Bc. Barbora Sedmidubská

Abstract: The motivation of this work is a better understanding of the chemical processes in cells undergoing irradiation where a large number of secondary electrons and ions is formed. Many cellular components such as: DNA, lipids (forming membranes) and proteins (performing many vital functions in the cell) get damaged due to the interaction with these products. The aim of this work was to follow the initial damage of proteins using the method of electron capture spectroscopy. This work focuses on low-energy electron-induced reactions, i.e. electrons with energies that do not cause ionisation of molecules but electron capture (typically 0 - 10 eV). These energies are particularly important for the process of dissociative electron capture, that often leads to fragmentation at subexcitation energies. Molecules serving as model compounds for peptides were selected for the work. Four model compounds were selected: two aminoacids L-cysteine, L-valine and two amides proposed as simple models for peptide bonds: formamide, and N-methylacetamide. These molecules were studied in their isolated and cluster forms. The measurement of hydrated clusters enables to examine the effect of the solvent.

Key words: Electron attachment spectroscopy, secondary electrons, L-cysteine, L-valine, formamide, N-methylacetamide

Obsah

Úvod	8
1 Úvod do problematiky	9
1.1 Interakce ionizujícího záření s hmotou	9
1.2 Radiolýza proteinů, peptidů a aminokyselin	11
1.3 Sekundární elektrony a disociativní záchyt elektronu	17
1.4 Motivace pro studii DEA na vybraných biomolekulách	21
1.5 Fyzikálně-chemické vlastnosti a biologická funkce studovaných biomolekul	23
2 Experimentální studie	25
2.1 CLUB - CLUster Beam apparatus	25
2.1.1 Experimentální zařízení	25
2.1.2 Kalibrace energetické škály	29
2.2 Elektronový záchytový spektrometr	30
2.2.1 Experimentální zařízení	30
2.2.2 Kalibrace energetické škály pomocí SF ₆	32
2.3 Rozlišení hmotnostních spektrometrů	33
3 Výsledky a diskuze	39
3.1 L-cystein	39
3.2 L-valin	48
3.3 Formamid	52
3.4 N-methylacetamid	61
4 Závěrečná diskuze	66
Závěr	69
Literatura	70

Úvod

Tato diplomová práce se zabývá interakcemi nízkoenergetických elektronů s amidovou vazbou v peptidech. Jsou studovány reakce disociativního elektronového záchyty na molekulách aminokyselin: L-cysteinu a L-valinu a amidů: formamidu a N-methylacetamidu v izolované formě i ve formě klastrů.

Cílem teoretické části práce bylo seznámení se s problematikou nízkoenergetických elektronů v radiální chemii biologických systémů a výběr vhodných modelových molekul pro studium vlivu vodného prostředí na poškození chromozomů sekundárními nízkoenergetickými elektrony. Úkolem experimentální části práce bylo seznámit se s experimentálními metodami užívanými v Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR ke studiu interakce nízkoenergetických elektronů s izolovanými molekulami a jejich klastry. Dále bylo mým úkolem provést vlastní experimentální studii fragmentace vybraných izolovaných biomolekul a biomolekul ve vodném prostředí po interakci s elektrony o energiích 0 - 70 eV a následně interpretovat získaná data v kontextu poškození peptidů ionizujícím zářením. Součástí vlastních měření bylo také určit energetické závislosti pro záchyt elektronů na vybraných biomolekulách ve vodních klastrech. Provedené experimenty budou společně se získanými výsledky v této práci popsány a diskutovány.

Motivací diplomové práce je lépe porozumět chemickým procesům v ozářené buňce. Ionizující záření procházející hmotou dává vzniknout velkému množství iontů a sekundárních nízkoenergetických elektronů. Ty hrají významnou roli při procesech radiálního poškození živých organismů vzhledem k jejich velkému množství a vysoké reaktivitě. Interakce těchto vzniklých částic se složkami v buňce pak vede k poškození všech buňčných struktur - DNA, lipidů tvořících membrány i proteinů, které plní řadu pro buňku životně důležitých funkcí. Existuje mnoho důvodů pro zkoumání chování buňky ve stresových podmínkách, které mohou vést k mutaci, či k buněčné smrti. Pochopení dějů a reakčních mechanismů, které nastávají v buňce po jejím ozáření, jsou základem pro efektivní ochranu člověka před zářením, ale i využíváním ionizujícího záření v lékařských aplikacích, zejména v radioterapii nádorových onemocnění. Tato práce zkoumá reakce aminokyselin cysteinu a valinu a amidů formamidu a N-methylacetamidu s elektrony nízkých energií.

Pro měření disociativního elektronového záchyty na molekulách L-cysteinu, L-valinu, formamidu a N-methylacetamidu byla zvolena metoda elektronové záchytové spektroskopie, EAS (Electron Attachment Spectroscopy).

Úvod do problematiky

V rešeršní části této práce budou nejprve popsány základy interakce ionizujícího záření s hmotou a následné vlivy na její fyzikální, chemické a biologické vlastnosti. Dále se zaměřím na radiolýzu proteinů, peptidů a bílkovin, protože tato kapitola a v ní obsažené souvislosti podtrhují účel diplomové práce zaměřené na studium interakce sekundárních elektronů s vybranými modelovými sloučeninami pro amidovou vazbu v peptidech. Také zde popíši vznik a vlastnosti sekundárních elektronů a osvětlím princip klíčové reakce této práce - disociativního elektronového záchytu. Poté objasním motivaci pro studii disociativního elektronového záchytu na vybraných biomolekulách a v závěru představím vybrané biomolekuly (L-cystein, L-valin, formamid a N-methylacetamid) na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností. Kapitoly 1.1 1.2 a částečně i 1.3 byly zpracovány již dříve v rámci výzkumného úkolu [1], na který tato diplomová práce úzce navazuje.

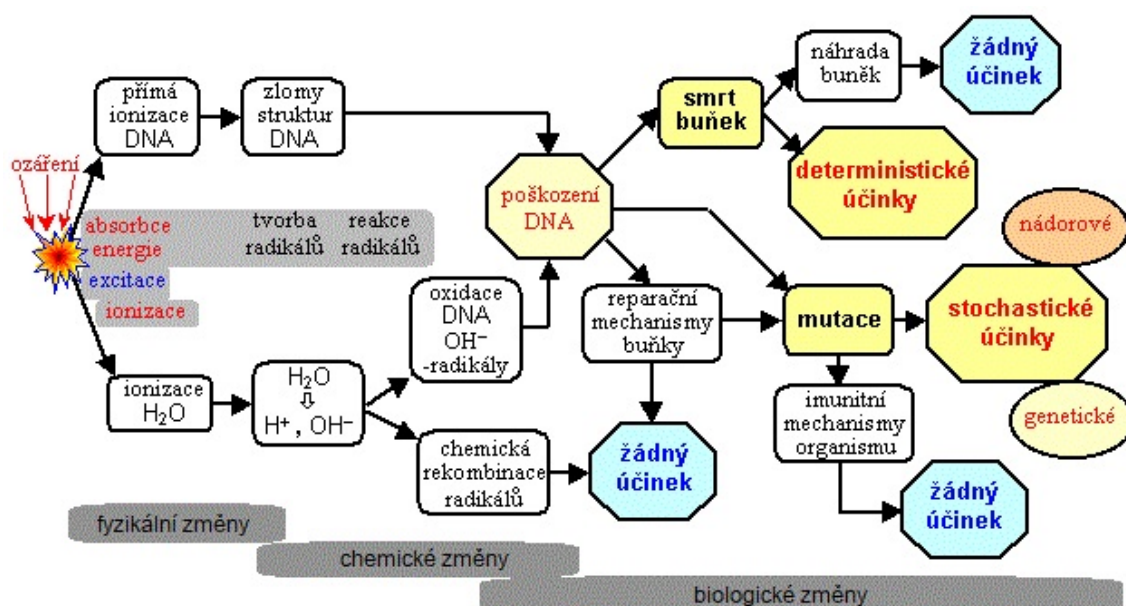
1.1 Interakce ionizujícího záření s hmotou

Reakce ionizujícího záření s hmotou dává vzniknout primárním produktům, jež jsou kvalitativně stejné bez ohledu na druh ionizujícího záření. Primárními produkty jsou excitované a ionizované částice, elektrony, molekuly nebo i horké atomy [2]. U krystalických látek se podél dráhy svazku objevují strukturální poruchy jako vakance a dislokace. [1]

Radiační procesy je možné z časového hlediska dělit do čtyř po sobě jdoucích intervalů. Rozlišujeme tak a) fyzikální stádium b) fyzikálně-chemické stádium c) chemické stádium a d) stádium biologické. Fyzikální stádium se vyznačuje uvolněním elektronů a vznikem excitovaných a ionizovaných stavů. Toto stádium trvá od 10^{-17} s do 10^{-16} s a nabitě částice vytváří takzvanou stopu záření. Fyzikálně-chemické stádium probíhá od 10^{-15} s do 10^{-13} s a dochází k přeměnám elektronické excitace na vibrační, ale i translační nebo rotační pohyby molekul. Takové jevy mohou vést k disociaci chemických vazeb. Vznikají radikály a ion-radikály. Elektrony jsou termalizovány a solvatovány. Časový interval od 10^{-12} s do 10^{-6} s pokrývá chemické stádium. [3] Projevuje se difúzí složek stopy, která tak zániká a nastoluje se nová chemická rovnováha. Poté následuje biologické stádium, jehož doba trvání může být velmi specifická. Biologické změny jsou vyvolány chemickými změnami, tedy změnami chemické rovnováhy. Procesy probíhající v těchto stádiích jsou shrnuty v další podkapitole. [4] [1]

Fyzikální, chemické a biologické změny

Vliv ionizujícího záření na fyzikální vlastnosti hmoty lze pozorovat kupříkladu ve změně elektrické vodivosti, tepelné vodivosti, optických vlastností, povrchu nebo krystalické mřížky. U pevných látek ovlivňuje křehkost, tvrdost, pevnost, apod. [4] Ovlivnění fyzikálních vlastností ionizujícím zářením se věnovali například profesor Eugene Surdutovich a profesor Andrey Solovyov. [2] Chemické změny jsou způsobeny procesy radiačně-chemické povahy. Takové reakce probíhají mezi primárními produkty, jakými jsou: elektrony, excitované molekuly, radikály a ion-radikály. Každý z těchto produktů podléhá množství různých reakcí, které probíhají s velkou rychlostí a jejichž kinetika závisí na nejpomalejším ději celého procesu - difúzi. Ozářovaná látka často obsahuje vodu a radiolýzou vody, tak vzniká $H\cdot$ a $OH\cdot$, molekulární vodík, peroxid vodíku a solvatované elektrony. [4] Změny biologických vlastností pak nastávají ze stejných příčin jako změny fyzikálních či chemických vlastností. Dochází k excitacím a ionizacím atomů a molekul, vznikají radikály a sekundární elektrony, dochází k přestavbě molekul uvnitř buňky. Klíčovou roli pak z biologického pohledu hrají radikály $H\cdot$, $OH\cdot$ a $HO_2\cdot$. Čím složitější molekuly ozáříme, tím nabývá radiační excitace molekul na významu. Také vznikají sekundární elektrony, dochází k elektronovému záchytu a zanedbat nelze ani průchod neutronů látkou o dosahu v řádu cm, kterým vznikají silně ionizující protony. Pokud se z radionuklidů, které vznikly záchytem, stanou vnitřní zářiče, následky mohou být závažné. [4] [1]



Obrázek 1.1: Schématické znázornění důležitých procesů a jejich časové posloupnosti při účincích ionizujícího záření na živou tkáň. [5]

K jednomu z nejtěžších poškození dochází po interakci ionizujícího záření se sulfhydrylovou skupinou SH, přítomnou v organické látce. Přítomnost takové skupiny je ale zároveň nutnou podmínkou k uskutečnění mitózy, buněčnému růstu a k regulaci látkové výměny uvnitř buňky. Dalším důležitým jevem, ke kterému dochází

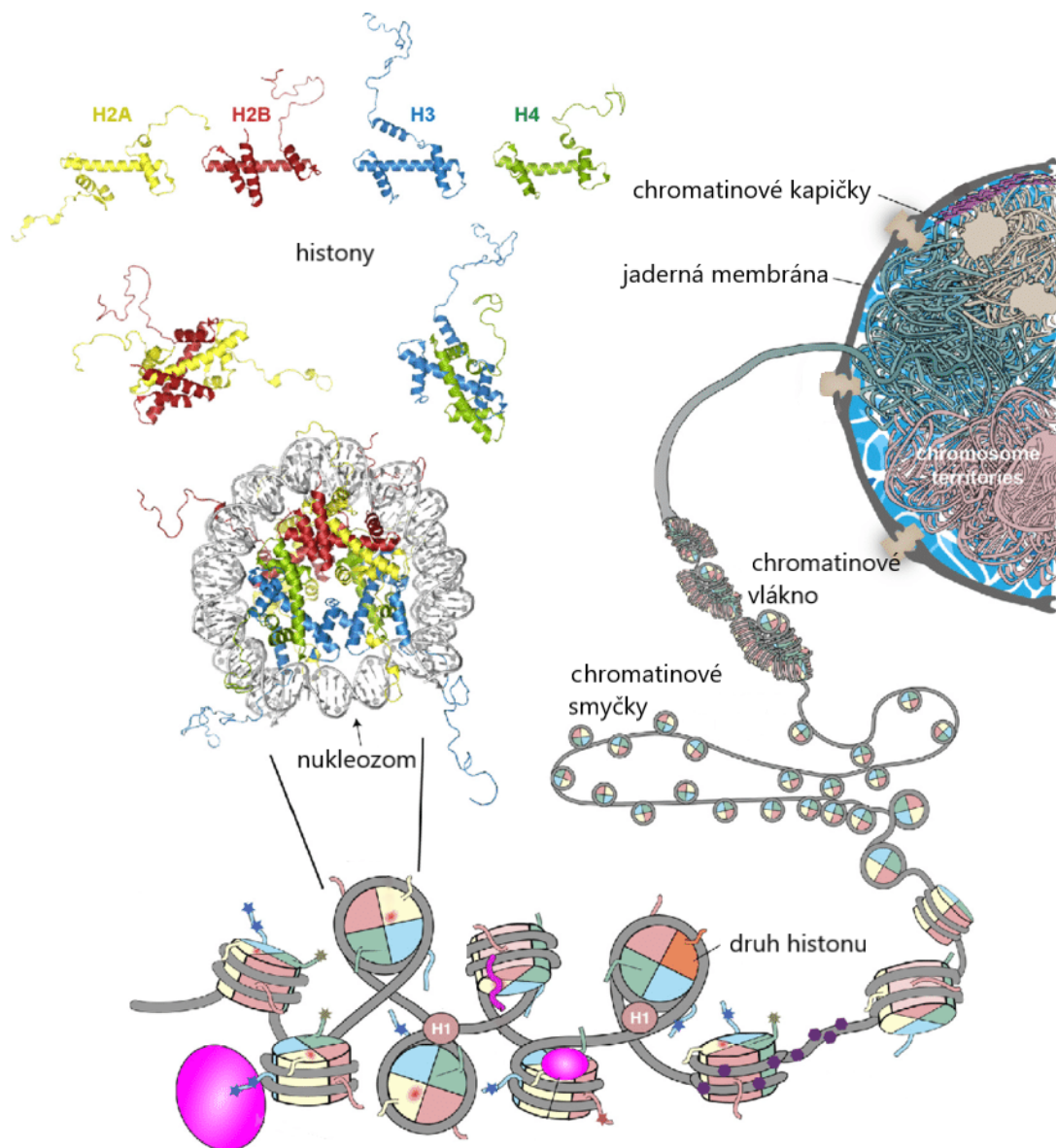
po expozici buňky, je denaturace bílkovin. Ovšem nejvýraznější interakcí ionizujícího záření s buňkou je přímé poškození molekul deoxyribonukleové kyseliny, nacházející se v chromozomech uložených v buněčném jádru. Změny na chromozomech mají za následek genetické poruchy (mutace) nebo přímé ohrožení života jednotlivých buněk. Meiózou (buněčným dělením) pak mohou přecházet na další generace. [4] Problematikou radiační biofyziky a biologie se ve svých publikacích zabývali E. L. Alpen [6], či T. Alper [7]. [1]

1.2 Radiolýza proteinů, peptidů a aminokyselin

Aminokyseliny, peptidy a bílkoviny patří mezi základní kameny všech živých buněk. Studie radiolýzy proteinů, peptidů i aminokyselin, znalost jejich reakčních produktů a mechanismů jsou nezbytné pro pochopení základů radiačního poškození biologických a biochemických v systémech. Vlivem ozáření dochází k poškození všech struktur v buňce (DNA, chromozomy, atd.) s různě závažnými následky pro buňku. [1]

Chromozomy jsou buněčné struktury schopné rovnoměrně rozdělit genetickou informaci do dceřinných buněk, jedná se o komplexy složené z nukleové kyseliny = DNA a proteinů - zde histonů. Hlavní jednotkou chromozomu je nukleozom složený ze 2 kopií molekul 8 proteinů tzv. histonů, kolem kterých je stočena sekvence 146 bp DNA. Nukleozomy jsou stočené do chromatinových vláken a ty pak dále do struktury chromozomu. Existuje mnoho studií zabývajících se radiačním poškozením DNA. S postupem času a novými objevy je věnován stále větší prostor i pro výzkum radiolýzy bílkovin, které se díky svým jedinečným funkcím v buňce a bezprostřední vzdálenosti s DNA jeví jako neméně závažná. Studiu radiolýzy proteinů a peptidů byla například věnována práce O. H. Wheelera [8]. Na téma radiační chemie aminokyselin a peptidů ve vodných roztocích publikoval své výsledky již v roce 1978 také M. G. Simic [9]. A efektem ionizujícího záření na biomolekuly, reakčními mechanismy poškození peptidů a jejich možným využitím pro zlepšení radiační terapie se zabývala skupina J. A. Reisz [10]. Problematiku shrnul rovněž třeba W. M. Garrison [11] anebo E. R. Stadtman [12]. [1]

Bílkoviny, peptidy a aminokyseliny se v buňce dostávají do interakce s oksyločným vodným prostředím. Proto, dojde-li k ozáření buňky a následné radiolýze vody, která zcela jistě nastane, dojde velmi pravděpodobně i k radiolýze těchto základních složek. Vliv ionizujícího záření na buňku je dán následnými reakcemi částic vznikajících při radiolýze vody. Důležitými produkty vznikajícími při radiolýze vody jsou především solvované elektrony a hydroxylové radikály. Tyto mohou dále vstupovat do reakcí s hmotou v buňce a způsobovat různé změny vratného či nevratného charakteru, které mohou dále vést až k mutaci, či buněčné smrti (nekróza nebo apoptóza). V případě popisu radiolýzy postranních řetězců peptidů a bílkovin jsem se zaměřila na postranní řetězce alifatické a ty obsahující síru - vzhledem ke studovaným aminokyselinám cysteinu a valinu. [1]



Obrázek 1.2: Struktura chromozomu. [13]

Bílkoviny

Bílkoviny neboli proteiny jsou vysokomolekulární přírodní látky o relativních molekulových hmotnostech $10^3 - 10^6$ a jejich základ tvoří aminokyseliny. Podle počtu aminokyselin dělíme takové biopolymerní řetězce na oligopeptidy (2 až 10 aminokyselin), polypeptidy (11 až 100 aminokyselin) a vlastní proteiny (100 a více). Proteiny dále dělíme dle struktury a vlastností na fibrilární a globulární. Fibrilární proteiny (skleroproteiny) jsou nerozpustné ve vodě a mají protáhlý, vláknitý tvar. Naproti tomu globulární proteiny (sferoproteiny) se ve vodě rozpouští a jejich tvar je kulovitý či elipsoidní. Proteiny mají obecně primární, sekundární a terciární strukturu, u některých pak existuje i struktura kvartérní. Primární struktura je dána pořadím aminokyselin v řetězci, sekundární struktura vypovídá o geometrii řetězce v rámci

menšího úseku aminokyselin a zde rozlišujeme α -helix, β -skládaný list a neuspořádanou geometrii. Terciální struktura charakterizuje prostorové uspořádání ve smyslu globulární struktury (tvar klubka) nebo fibrilární (tvar vlákna) a jejími podjednotkami jsou prvky sekundární struktury. Kvartérní struktura zahrnuje uspořádání na bázi nekovalentních interakcí (především vodíkové vazby, hydrofobní efekt) polypeptidických podjednotek ve složitějších komplexech bílkovin. Proteiny zastávají v těle několik funkcí. Plní funkci transportní a skladovací (hemoglobin, transferin), dále funkci stavební (kolagen, elastin, keratin), zajišťují pohyb (aktin, myozin) a katalyzují, regulují a řídí biochemické procesy (enzymy, receptory, hormony, apod.). A konečně také zastávají funkci obrannou a ochrannou (imunoglobulin, fibrin, fibrinogen). K proteosyntéze dochází v buňce na ribozómech a konkrétně se jedná o přenos genetického kódu z mRNA do daného pořadí aminokyselin v polypeptidickém řetězci. Každá aminokyselina je definována trojicí bází - tzv. tripletem/kodónem na mRNA. [14] [1]

Peptidy

Peptidy jsou organické sloučeniny tvořené aminokyselinami vázanými kovalentní peptidovou vazbou -CO-NH-. Stejně tak jako bílkoviny, i peptidy se tvoří ve formě neaktivních prekurzorů a svoji biologickou aktivitu získávají až po potřebné chemické změně. [14] [1]

Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou sloučeniny obsahující aminovou -NH₂ a karboxylovou -C=O skupinu. V nejužším slova smyslu z pohledu biochemického a molekulárně-biologického máme na mysli 20 - 23 α -L-aminokyselin, které tvoří základní stavební kameny všech bílkovin. Protein se syntetizuje na ribozómech připojováním aminokyselin. Vlastnosti aminokyselin jsou různorodé. Chirální a tedy opticky aktivní jsou všechny kromě glycinu, jež má na svém α -uhlíku navázané dva vodíky a tedy má rovinu symetrie. Chirální molekula obsahuje asymetrický uhlík. Nicméně nejde o nutnou podmínku. Zásadní je, aby izomery (antipody či enantiomery; pravotočivé nebo levotočivé) byly sobě navzájem zrcadlovým obrazem a přitom je nebylo možné vzájemně překrýt žádným pootočením v prostoru. Jinými slovy chirální sloučeniny nedisponují středem ani rovinou symetrie, ani rotační symetrií a jsou schopné stáčet rovinu polarizovaného světla. Pro tuto práci není podstatná optická stáčivost, ale spíše prostorové uspořádání molekuly, které silně ovlivňuje způsob průběhu a typ reakcí. V této práci byly studovány pouze α -L-aminokyseliny. Pro každou aminokyselinu obsahující karboxylovou a aminovou skupinu schopné disociace existuje izoelektrický bod, v němž se aminokyselina nachází jako amfion-obojetný iont a celkový elektrický náboj aminokyseliny je nulový. [14] [1]

Radiolýza aminokyselin

Jedním z hlavních produktů, které vznikají radiolýzou polárních α -aminokyselin v pevném skupenství je amoniak. Ten vzniká jako důsledek redukční deaminace

aminokyseliny, na které se podílí disociativní záchyt elektronu. Například při radiolýze indukované γ zářením na molekuly glycinu a alaninu v pevné fázi dochází ke vzniku ketokyselin a mastných kyselin jako hlavních produktů radiolýzy. Podobnost radiační chemie takovýchto jednodušších aminokyselin v pevném skupenství a v roztoku je značná. Hlavním způsobem, jakým dochází k "odstranění" elektronu u většiny α -aminokyselin v pevném skupenství během radiolýzy, je jeho zpětné pohlcení aminokyselinou za vzniku radikálu. Methionin a cystein, aminokyseliny obsahující thiolovou S-H skupinu, podléhají v reakci s hydratovanými elektrony štěpení C-S vazby. K tomuto dochází především ve vodném roztoku, naopak v pevném skupenství je popsáno štěpení relativně zanedbatelné. [11] Radiolýze aminokyselin v pevném stavu obsahujících síru se ve své studii detailně věnovali F. Cataldo a kol. [15]. Radiolýzou aminokyselin s thiolovou skupinou v pevném stavu i ve vodných roztocích se zabýval Zhigang Ke a kol. [16] [1]

Radiolýza peptidů

Radiolýza peptidů v pevném skupenství

Mezi hlavní poškození peptidů vlivem radiace patří radiolytické štěpení peptidové vazby C-N. Toto štěpení bylo poprvé pozorováno během radiačně-chemických studií N-acyl alaninu a polyaminoacidických derivátů alaninu [17], [18], [19]. V důsledku radiolýzy peptidů γ zářením může docházet k několika různým reakcím. V prvním reakčním kanále dochází kromě vzniku dalších produktů i ke vzniku dvou totožných dlouho žijících radikálů, které v případě solvatace pevného peptidu ve vodě bez molekulárního kyslíku podléhají dimerizaci. V druhém reakčním kanále může docházet k dehydrogenaci peptidů za vzniku dehydropeptidů. Ty jsou ale nestabilní a ve vodném prostředí podléhají hydrolyze za vzniku ketokyseliny a dalšího amidu. Také bylo ukázáno, že vznikající konečný dlouhodobě žijící radikál je v podstatě pro všechny alifatické zbytky stejný. Je jím α -uhlíkový radikál RCONH \dot{C} R₂. V případě radiolýzy peptidů o menší molekulové hmotnosti než má thyrosin a cystein vzniká jako výsledný produkt α -uhlíkový radikál, oxid uhličitý a N-acylamid. Pokud dojde k radiolýze derivátu peptidu alifatických aminokyselin, nastane štěpení peptidového hlavního řetězce za vzniku aminu a mastné kyseliny. Jestliže budeme hovořit konkrétně o radiolýze peptidů obsahujících methionin a cystein, pak vazba C=O je vhodným místem pro záchyt elektronu. U derivátů peptidů s postranními řetězci fenylalaninu, thyrosinu (aromatické aminokyseliny) a histidinu postranní řetězce derivátu soutěží o elektron s hlavním řetězcem. Amfoterní ionty, tzv. zwitterionty, di-, tri- a tetrapeptidových derivátů obsahují C=O vazbu u kladně nabitého N-koncového zbytku, která dokáže zachytit elektron. U triglycinu tento záchyt vede až k deaminaci. [11] [1]

Radiolýza peptidů ve vodných roztocích

Chemické změny, ke kterým dochází vlivem ionizujícího záření, jsou dány reakcemi produktů radiolýzy vody především OH \cdot a e_{aq}⁻. Na hlavním peptidovém řetězci u peptidů glycinu a alaninu v bezkyslíkatém roztoku byl pozorován vznik amoniaku, ketokyseliny, mastné kyseliny a v malé míře docházelo i k dimerizaci vzniklých

radikálových zbytků kyselin a vzniku labilních derivátů kyselin. Pouze u jednodušších α -kyselin se solvovaný elektron e_{aq}^- zachytával na C=O vazbě. Tento záchyt vedl k následnému rozpadu na amoniak a radikálový zbytek aminokyseliny. Hydroxylový radikál $\text{OH}\cdot$ atakuje všechny C-H vazby na delších postranních řetězcích. Vedlejší řetězce nenasycených kyselin (Phe, Tyr, His) jsou napadány $\text{OH}\cdot$ a e_{aq}^- . U cysteinu tyto produkty radiolýzy vody reagují pouze s SH skupinou. Pokud je přítomen kyslík v dostatečné koncentraci v roztoku, pak dochází k blokování redukční deaminace. V takovém roztoku také dochází ke vzniku hydroperoxylového radikálu $\text{HO}_2\cdot$ z e_{aq}^- , O_2 a molekul vody. [11] V roce 2017 byly publikovány výsledky studie štěpení aminokyselin z peptidů a bílkovin vlivem působení $\text{OH}\cdot$. [20] [1]

V okysličeném roztoku jsou postranní alifatické řetězce kromě glycinu a alaninu atakovány hydroxylovým radikálem $\text{OH}\cdot$ a čím delší je hlavní řetězec s C-H vazbami, tím více dochází k reakcím na postranním řetězci a k hydroxylové a karbonylové substituci. Také existuje případ, kdy atak hydroxylového radikálu na vedlejší řetězec vede k oxidativní degradaci hlavního peptidového řetězce. Rovněž je důležité zdůraznit obecný vliv pH na radiolýzu ve vodném roztoku. [1]

V evakuovaném roztoku jsou postranní řetězce alifatických zbytků aminokyselin atakovány solvovanými elektrony e_{aq}^- v místě karbonylové skupiny C=O. V nepřítomnosti kyslíku jsou hydroxylovými radikály a solvovanými elektrony atakovány jak vedlejší řetězce, tak řetězec hlavní a dochází i k dimerizaci. [11] [1]

V případě vedlejších řetězců obsahující síru v roztoku nasyceném kyslíkem dochází u cysteinového zbytku k ataku $\text{OH}\cdot$ výhradně na thiolovou skupinu -SH a vzniku radikálu a vody. Nicméně i zde zásaditý nebo kyselý charakter roztoku hraje velkou roli a má vliv na probíhající reakce a výsledné produkty. Methionin v peptidu dává reakci s $\text{OH}\cdot$ vzniknout thiétheru. V bezkyslíkatých roztocích dochází u cysteinového zbytku k relativně rychlému zachytu e_{aq}^- na skupině -SH a vzniku SH^- a radikálového zbytku. Radikálové zbytky jsou schopny dimerizace, například z cysteinu se stává cystin, který je schopen zachytávat solvovaný elektron. Vzniká tak aniontový radikál a ten se pak v závislosti na pH dále rovnoměrně hmotnostně rozpadá na radikál a aniont. Jinak je tomu v případě methioninu, kde e_{aq}^- atakuje karbonylovou C=O skupinu na hlavním řetězci. [11] Radiačními modifikacemi síry v aminokyselinách tvořících peptidy a proteiny se zabývala skupina profesora Ch. Chatgililoglu. [21] [1]

Radiolýza bílkovin

Radiolýza bílkovin v pevném skupenství

K inaktivaci jedné makromolekulární jednotky enzymu stačí absorpce energie v řádu asi 100 eV. K poškození může docházet i při nižších dávkách kvůli přítomnému pozadí. Bylo pozorováno, že radiolýzou globulárních a fibrilárních proteinů iniciovanou γ zářením za nepřítomnosti kyslíku vznikají produkty jako amidy, karbonylové sloučeniny, mastné kyseliny a dlouho žijící radikály. Také existuje hypotéza, že přechodné procesy platné pro peptidy a polypeptidy platí rovněž i u proteinů. Dalším důležitým zjištěním bylo to, že dochází k rozdělení dlouho žijících radiačně vzniklých radikálů mezi veškeré různé aminokyselinové zbytky v proteinech. Jako nejvíce aktivní aminokyseliny ve většině bílkovin byly objeveny biomolekuly prolinu,

lysinu, methioninu, histidinu, serinu a threoninu. Při radiolýze fibrilárních a globulárních bílkovin v pevném skupenství dojde ke štěpení hlavního řetězce a k formaci dvou stěžejních produktů, jakými jsou aminokyseliny a mastné kyseliny. Zajímavý je i efekt redukce měďnatého iontu, který v poměru 1 kationt / 10 aminokyselinových zbytků zcela blokuje tvorbu zlomů hlavního řetězce v ozářeném pevném kolagenu při dávce 0,25 MGy. Globulární proteiny, narozdíl od fibrilárních podléhají štěpení hlavního řetězce v menším měřítku. Při rozpouštění fibrilárních proteinů nebo polyaminokyselin ve vodě nasycené vzduchem jsou vzniklé radikálové fragmenty zachyceny rozpuštěným kyslíkem. Ale u globulárních proteinů brání v přístupu kyslíku do uskupení sekundární a terciální struktura bílkoviny. Zlom se tedy na hlavním řetězci v globulárních proteinech maskují jako intramolekulární zesílení (crosslinks). Zlom hlavního řetězce doprovází vznik dvou uhlíkových radikálů. Pokud by globulární proteiny byly ozářeny ve vzduchu, potom se většina dlouho žijících radikálů zachytí molekulárním kyslíkem, což bylo pozorováno právě v případě ribonukleáz. [11] [1]

Radiolýza bílkovin ve vodných roztocích

Ve vodných roztocích syčených kyslíkem dochází k oxidativní degradaci hlavního peptidového řetězce způsobené atakem hydroxylového radikálu na vazbu hlavního řetězce C-H. Vzniká amoniak a ketokyseliny. U proteinů obsahujících více aminokyselin na bázi síry a nenasycených aromátů bylo pozorováno menší štěpení hlavního řetězce. V roztocích bez kyslíku dochází k zachytávání solvatovaného elektronu e_{aq}^- na karbonylové skupině C=O peptidové vazby jednodušších proteinů. Tato reakce je konkurenční reakcí zachytu e_{aq}^- na -SH vazbě cysteinu či protonovaném zbytku histidinu. Studie chromozomálních proteinů vedly ke zjištění, že e_{aq}^- napadá karbonylovou vazbu na histonu H1. Také byl zjištěn elektronový transfer přes vodíkové vazby mezi prvotním místem zachytu e_{aq}^- (karbonylovou skupinou) na hlavním řetězci a zbytky cysteinu a histidinu. [11] [1]

Postranní řetězce bílkovin obsahující síru mohou být v místě -SH vazby napadány OH \cdot (neopravitelné poškození), O $_2^-$ (opravitelné poškození) a H $_2$ O $_2$ (neopravitelné poškození) v rámci radiačně indukovaných oxidačních procesů. Hlavními místy pro zachyt e_{aq}^- v bezkyslíkatém roztoku jsou disulfidické zesíťování, C=O karbonylová část peptidické skupiny a postranní řetězce histidinu. [11] Oxidativním poškozením aminokyselin, peptidů i bílkovin se ve své práci věnovali například i K. S. Ambe a A. L. Tappel [22] nebo K. J. A. Davies, M. E. Delsignore a Sharon W. Lin [23]. Poškození proteinů singletním kyslíkem a jeho následky byly předmětem vědecké studie M. J. Daviese. [24] [1]

V případě, že mají postranní řetězce alifatický charakter, může na alifatických zbytcích aminokyselin docházet k ataku hydroxylových radikálů. A třeba u histonů, jejichž součástí jsou chromozomální proteiny složené z aminokyselin, bylo pozorováno radiační poškození proteinového řetězce a samotných aminokyselin vlivem OH \cdot [25]. Přitom chromozomální proteiny fungují jako ochranné složky DNA a většina OH \cdot se zachytí právě na histonech. Histony jsou také určující pro transkripční vlastnosti chromozomů a stejně tak jejich strukturu. Pokud tedy dojde k radiačnímu poškození na jednom a více aminokyselinových zbytcích (oxidativní štěpení hlavního řetězce histonu hydroxylovým radikálem), pak se stabilita nukleozomu snižuje

a to může zapříčinit následnou disfunkci buňky. γ záření zase způsobuje zesíťování ve struktuře nukleozomu v bezkyslíkatém roztoku. Kyslík tento efekt inhibuje, neboť reaguje s radikály DNA a chromozomálních proteinů. [11] [1]

1.3 Sekundární elektrony a disociativní záchyt elektronu

Sekundární elektrony jsou obecně nazývány veškeré elektrony vzniklé vyražením v důsledku ionizujícího záření z elektronového obalu atomu. [1]

Vznik a vlastnosti sekundárních elektronů

Sekundární elektrony vznikají ve velkém množství a v důsledku interakce všech druhů primárního ionizujícího záření různých energií. V případě ionizujícího záření máme na mysli β -záření, α -záření, rentgenové záření a paprsky γ , dále hovoříme o štěpných fragmentech a urychlených těžkých iontech s energiemi dostatečnými pro překonání ionizačního potenciálu. [1]

Letící elektrony o dostatečně vysokých energiích mohou z místa primární ionizace unikat na významnou vzdálenost a iniciovat další ionizace. Takové elektrony byly J. J. Thomsonem pojmenovány paprsky delta. Tyto paprsky jsou elektrony vyražené z orbitalů rychle letícími těžkými nabitými částicemi (např.: částicemi alfa). Lze je pozorovat v mlžné komoře v začátku stopy těžké nabitě částice. [4] [1]

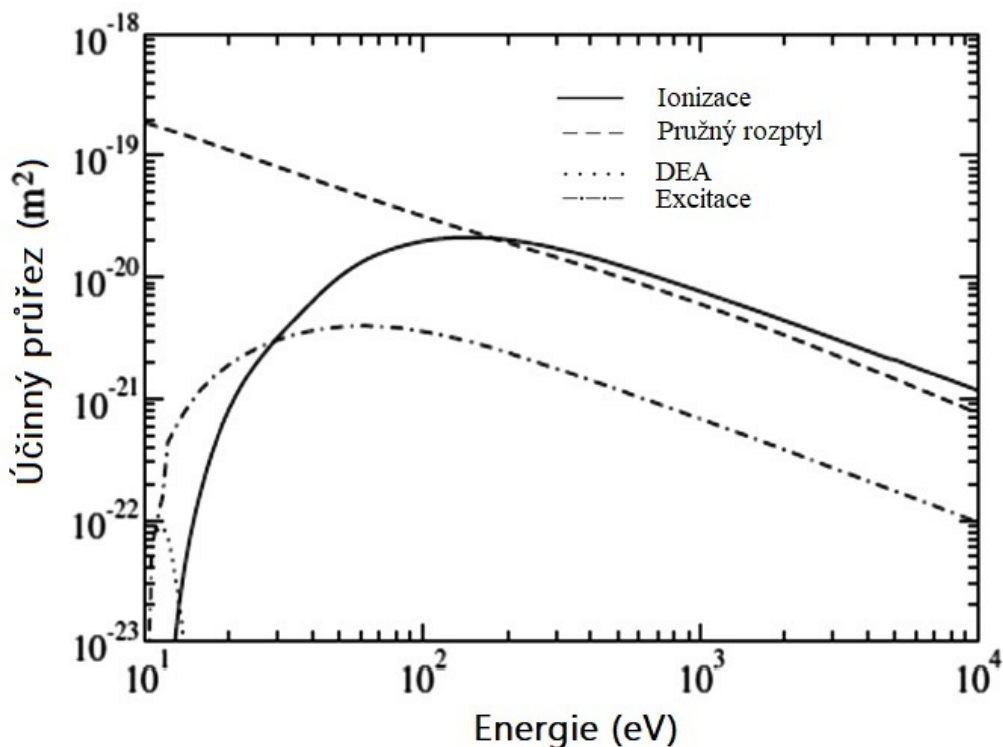
Ne všechny sekundární elektrony ale dosahují vysokých energií. Vznikem sekundárních elektronů a jejich energetickou distribucí se zabývali například M. Dingfelder [26] nebo S. M. Pimblott s J. A. LaVernem [27]. Tito modelovali srážení atomů vodíku (^1H) různých energií s molekulami vody a jedním z výsledků jejich práce je pozorovaný vznik 40 000 sekundárních elektronů, každý s energií přibližně 10 eV, při srážení s ^1H o energiích 100 MeV s molekulami vody. [27] [1]

Vznikem a reakcemi sekundárních elektronů se zabývá E. Alizadeh a L. Sanche [28]. Na obrázku 1.3 jsou v grafu znázorněny závislosti účinných průřezů (pravděpodobnosti) pro jednotlivé možné děje na energii sekundárního elektronu. [1] Obrázek 1.4 prezentuje konvoluci těchto účinných průřezů s distribuční funkcí energií sekundárních elektronů, a tak velmi vypovídá o relativní důležitosti těchto procesů v radiační chemii. Z grafu jsou patrné čtyři možné způsoby interakce nízkoenergetických elektronů s hmotou. Při nejnižších energiích elektronů může docházet k pružnému rozptylu, kdy se potenciální energie molekuly nemění [1]:



k nepružnému rozptylu, kdy nastává vibrační, rotační, anebo elektronická excitace molekuly:



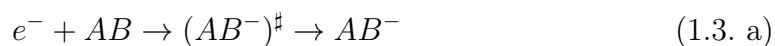


Obrázek 1.3: Závislost účinných průřezů pro DEA, excitaci, pružný rozptyl a ionizaci na energii elektronů v kapalné vodě. [28]

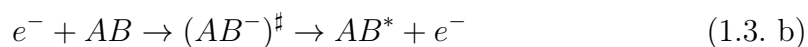
k záchytu elektronu a vzniku přechodného záporného iontu:



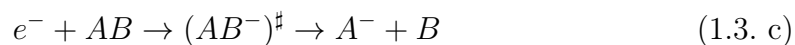
ten se poté může stabilizovat za vzniku stabilního anionu (associative attachment):



nebo se rozpadnout oddělením elektronu (autodetachment):



anebo se rozpadnout na fragmenty (dissociative electron attachment). Tato reakce je popsána v této podkapitole níže.

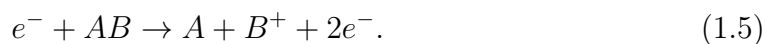


Při vyšších energiích pak nastává elektronová ionizace:

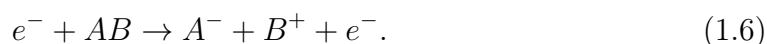
1. molekulová:



2. disociativní:



3. za vzniku iontového páru:



V této práci jsou stěžejní elektrony o nízkých energiích, interagující s hmotou rozptylem nebo záchytem, jež je popsán v kapitole 1.4. Z hlediska radiálního poškození je významný zejména disociativní záchyt elektronu. [28] [1]

Disociativní záchyt elektronu (DEA) obecně nastává v případě zachycení elektronu atomem či molekulou AB. Vzniká přechodný záporný iont $(AB^{-})^{\ddagger}$, který se dále rozpadá několika reakčními kanály na různé anionty A^{-} a různé neutrální štěpné fragmenty B dle rovnice 1.3.c.

Studium DEA je zajímavé z mnoha důvodů:

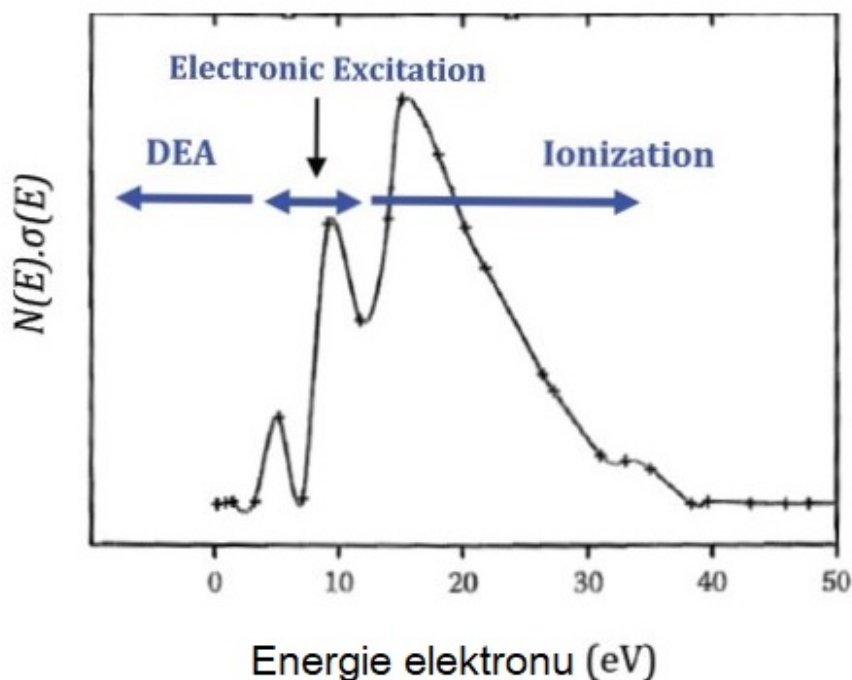
1. Jedná se o rezonanční proces. Pravděpodobnost procesu prudce roste z 0 na hodnoty typické pro jiné disociační děje jakým je fotodisociace. Rezonance lze najít v souvislosti s teorií rozptylu v kvantové mechanice. Problematika rozptylu se zabývá změnou vlnové funkce částice v silovém poli atomu nebo molekuly. Pojem rezonance jsou označovány částice nebo jejich excitační stavy s velice krátkou dobou života - v grafech pro účinné průřezy srážek jsou reprezentovány píky. U molekul lze najít rezonance v blízkosti definované energetické hladiny. Každá rezonance vypovídá o vnitřních energetických hladinách ve struktuře molekuly. Reciproká hodnota šířky rezonance pak odpovídá době života částice. V interakci s elektronem rozlišujeme:

Feshbachovu rezonanci - ta nastává v případě rozptylu, pokud se rovná energie vázaného stavu (molekuly) a kinetická energie srážejících se elektronů.

"Shape" rezonanci - jedná se o metastabilní zachycení elektronu v důsledku tvaru potenciálové bariéry, kdy nedochází k elektronické excitaci molekuly.

Specifickým typem rezonance pozorované při vyšších energiích interagujících elektronů je tzv. Fanova rezonance. Tvar křivky této rezonance je způsoben interferencí mezi dvěma amplitudami. Amplitudou rozptylu (rozptyl uvnitř kontinua, proces na pozadí) a amplitudou rezonanční (excitace diskrétního stavu, rezonanční proces). Podmínkou, aby se Fanova rezonance projevila, je hodnota energie rezonančního procesu odpovídající energetickému rozsahu stavů kontinua. Za této podmínky se amplituda rozptylu pozadí mění s energií, zatímco rezonanční amplituda se mění rychle ve fázi a ve velikosti, což způsobuje asymetrii píku. Elektron je zachycen na tak vysoké energetické hladině, že může dojít k autoionizaci (reakce simultánní). Nicméně tuto rezonanci, jak již bylo naznačeno, můžeme nalézt u elektronového rozptylu, nikoliv u reakce DEA. [29] [30] [1]

2. DEA může být indukován také solvatovanými elektrony. DEA na rozdíl od fotodisociace může nastat i při tzv. subexcitačních energiích elektronů. Je to způsobeno elektronovou afinitou produktů reakce, která mnohdy umožňuje disociaci i při nulové energii elektronu, nebo interakcí se solvatovanými elektrony, které jsou ve vodě vázány s energií 1.5 eV [31]. Role sekundárních elektronů před i po solvataci v radiální chemii byla předmětem studie E. Alizadeh a L. Sanche. [28]



Obrázek 1.4: Závislost součinu účinného průřezu (součet účinných průřezů pro DEA, excitaci a ionizaci) a distribuce energie elektronů na energii elektronu. [28]

3. DEA proces je selektivní. Specifická energie rezonance vede k disociaci specifické vazby v molekule. Tento fakt v kombinaci se složitým teoretickým popisem rezonancí způsobuje, že experimenty, jako jsou prezentovány v této práci, zůstávají primárním zdrojem informací o DEA procesu.

Z pohledu radiační chemie v živých organizmech je důležitý proces DEA na molekule vody. V případě DEA na molekule vody nejprve dojde k zachycení elektronu o energii 5 - 25 eV, vytvoří se přechodný nestabilní molekulární aniont, který okamžitě disociuje na H^- a OH^\cdot radikál. S menší pravděpodobností může docházet i k disociaci na O^- a H_2 nebo na OH^- a H . [32] DEA je významný také v interakci s dalšími komponentami buňky. Nejzávažnější je přímé poškození DNA [33], [34]. V minulosti byly proto intenzivně studovány DEA reakce komponent DNA. V této práci se soustředíme na aminokyseliny a amidy, jak je popsáno v následující kapitole.

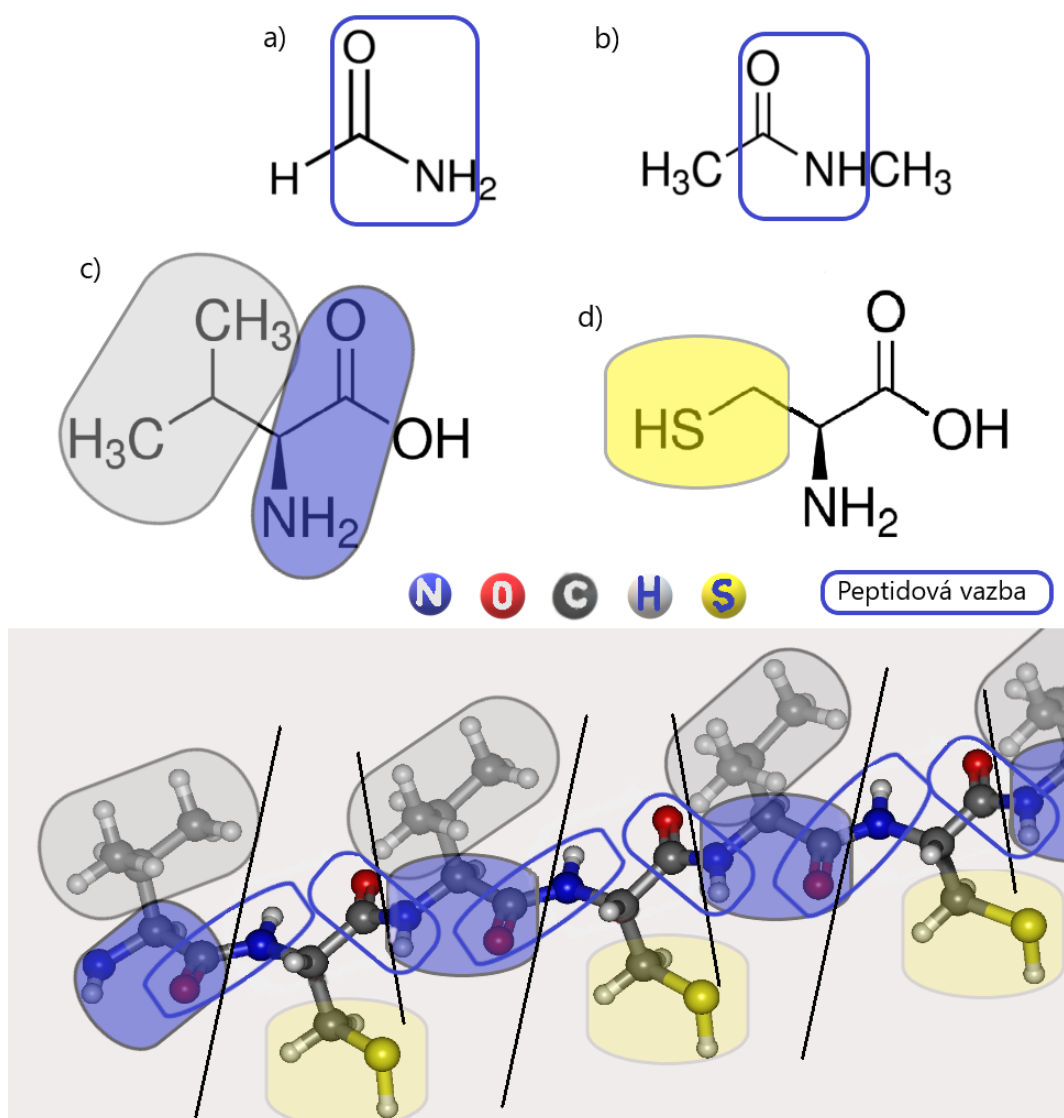
1.4 Motivace pro studii DEA na vybraných biomolekulách

Tato práce si klade za cíl experimentálně studovat reakce nízkoenergetických elektronů s vybranými biomolekulami za účelem prohloubení porozumění chemickým procesům v buňkách vystavených ionizujícímu záření.

Je obecně známo, že buňka je tvořena cytoplasmou s přibližným obsahem 75 % vody a že mezi základní stavební kameny všech živých buněk patří aminokyseliny, peptidy a bílkoviny. Jak již bylo popsáno, vlivem průchodu ionizujícího záření hmotou dochází ke vzniku velkého množství iontů a sekundárních elektronů a že sekundární elektrony, vzhledem k jejich značnému množství a vysoké reaktivitě, zastávají významnou úlohu v procesech radiačního poškození u živých organismů. Předchozí studie se soustředily zejména na roli DEA při poškození DNA. DNA se v buněčném jádře stáčí kolem proteinů, tzv. histonů, jejichž poškození může také ovlivnit biologické funkce v buňce. Vzhledem ke známé detekci negativních iontů síry, vznikajících při radiolýze peptidů a proteinů, lze předpokládat, že DEA proces bude důležitý zejména pro peptidy a proteiny mající ve struktuře aminokyseliny cysteinu nebo methioninu. Motivace ke studiu aminokyseliny cysteinu byla navíc podpořena zjištěním, že tato aminokyselina je ze všech dříve studovaných aminokyselin (alanin, glycin a cystein) nejvíce senzitivní při interakci s nízkoenergetickými elektrony. Taková citlivost aminokyseliny závisí na formě, ve které se vyskytuje. Například forma zwitteriontu aminokyseliny citlivost snižuje. Naopak je tomu u radikálové neutrální molekuly. Senzitivita je také ovlivněna délkou a charakterem zbytku aminokyseliny. Přítomnost thiolové skupiny SH^- značně zvyšuje fragmentaci aminokyseliny [35].

Dalším důležitým faktorem při poškození peptidů DEA reakcí je stabilita peptidové vazby. V nedávné práci S. Ptasinské [40] bylo postulováno, že DEA může efektivně disociovat peptidovou vazbu v rezonancích při energiích 5 - 8 eV. Tyto byly připsány specifickému typu dipolově vázaných shape rezonancí. Vzhledem k energetickému překryvu pozorovaných rezonancí s energetickými stavy studovaných molekul je však mnohem pravděpodobnější, že jde o Feshbachovy rezonance. [41] Zatímco Feshbachovy rezonance ve vodném prostředí typicky narůstají na intenzitě, dipolově vázané rezonance vznikají kvůli indukci dipólu v molekule elektronem přicházejícím z kontinua a v prostředí roztoku tedy nejsou možné. Rozhodli jsme se k vyřešení této otázky přispět studiem amidů ve vodních klastrech.

Ve výsledku byly zvoleny 4 sloučeniny, z toho 2 amidy: formamid a N-methylacetamid, jejichž struktura je zachycena na obr. 1.5 (a), resp. (b) a 2 aminokyseliny: L-valin a L-cystein, znázorněné na obr. 1.5 (c), resp.(d). Na obrázku dole je ukázán polypeptid složený z aminokyselin L-cysteinu a L-valinu. Na tomto peptidu jsou pak barevně vyznačeny vybrané vazby potenciálně důležité pro tuto práci a studium DEA na těchto aminokyselinách. Také je zde modrou barvou ohraničena peptidová vazba, kterou jsme v rámci této práce studovali na modelových sloučeninách formamidu a



Obrázek 1.5: Strukturální vzorce vybraných sloučenin formamidu (a) [36], N-methylacetamidu (b) [37], L-valinu (c) [38] a L-cysteinu (d) [39]. A znázornění pro studii významných vazeb ve vzorci pro polypeptid složený z aminokyselin valinu a cysteinu.

N-methylacetamidu. Všechny sloučeniny byly měřeny ve formě hydratovaných klastrů, s cílem demonstrovat i vliv prostředí.

1.5 Fyzikálně-chemické vlastnosti a biologická funkce studovaných biomolekul

Ústředními sloučeninami této práce byly tyto biomolekuly: 2 amidy formamid a N-methylacetamid, se strukturami vykreslenými na obrázcích 1.5 (a), resp. (b) a 2 aminokyseliny L-valin a L-cystein, jejichž struktura je znázorněna na obrázcích 1.5 (c), resp.(d).

L-cystein, (Cys, $C_3H_7NO_2S$, $M_m = 121,1582$ g/mol [42]) je neesenciální, ve vodě rozpustná aminokyselina, obsahující velmi reaktivní thiolovou -SH skupinu. Vyskytuje se v přírodě a lze ji nalézt v potravě bohaté na proteiny, např.: v sójových bobech a v kuřecím či vepřovém mase. Cystein je významným stavebním kamenem bílkovin, který má určující vliv na jejich strukturu a stabilitu, tvoří v nich totiž disulfidické můstky. Vyskytuje se téměř ve všech proteinech, ačkoliv je v nich průměrně zastoupen řádově pouze v jednotkách procent [43]. U člověka, v případě nedostatku aminokyseliny cysteinu, je pro jeho syntézu potřebný methionin, esenciální aminokyselina, jež je zdrojem síry. Další funkcí cysteinu v buňce je udržování vhodného oxidačně-redukčního prostředí. Také je součástí množství metabolických drah a jeho deriváty vykazující antioxidantní účinky mají schopnost tlumit dopady oxidačního stresu. [44] Jeho derivát N-acetylcystein se podává při těžké otravě těžkými kovy, neboť skupina -SH v cysteinu vůči těžkým kovům vykazuje vysokou afinitu. Bylo prokázáno, že jedinci postižení HIV mají hladinu cysteinu v krvi nižší a to vede k oslabení imunitního systému [45]. V případě nadměrné koncentrace cysteinu v organismu, dochází k deaktivaci inzulinu [46]. Vzácně je cystein schopen tvořit i ledvinové kameny (Cystinurie) [47]. Dvě kovaletně vázané molekuly cysteinu dávají vznik molekule cystinu a to přes disulfidický můstek. V roce 1955 byla americkému profesorovi, Vincentu du Vigneaud, udělena za tento objev Nobelova cena za chemii.

L-valin, (Val, $C_5H_{11}NO_2$, $M_m = 117,1463$ g/mol [42]) je esenciální α -aminokyselinou nerozpustnou ve vodě s nepolárním a nereaktivním postranním řetězcem. Tuto sloučeninu lze nalézt například v mléčných výrobcích, v rybím a drůbežím mase, v sóje, apod. Nedostatek této aminokyseliny může vést k nemoci javorového sirupu [48]. Valin je kódován čtyřmi kodóny: GUA, GUU, GUC a GUG. Z důvodu jeho hydrofobního charakterem. Existují případy, kdy v proteinu dojde k záměně valinu s jinou aminokyselinou. Následkem může být srpková anémie, kde je hydrofilní kyselina glutamová v pozici 6 na povrchu proteinu zaměněna za valin. Po této mutaci se hemoglobin v hypoxickém prostředí shlukuje do sebe, a to vede k poškození červené krvinky. Valin se svými vlastnostmi podobá leucinu, který obsahuje jen o jednu methylovou skupinu více. Aminokyselina valinu je součástí směsi aminokyselin BCCA (společně s leucinem a isoleucinem), která se užívá jako výživový doplněk v oblasti kulturistiky, neboť valin je zodpovědný za nárůst a vývin svalové hmoty. [49] Mimo to také reguluje hladinu cukru v krvi [50] a ovlivňuje funkci nervového systému [51]. Může být napomocen při léčbě závislosti na alkoholu či drogách.[52]

Formamid, (HCONH_2 , $M_m = 45,0406 \text{ g/mol}$ [42]) je amid, derivát kyseliny mravenčí, který je olejovitou bezbarvou kapalinou mísitelnou s vodou. Má relativně nízký bod tání $2 \text{ }^\circ\text{C}$ a bod varu $210 \text{ }^\circ\text{C}$ [53]. Zápach je podobný zápachu amoniaku. Tato sloučenina je rovněž organickým činidlem, které při pokojové teplotě zprostředkovává denaturaci a renaturaci nukleových kyselin. Běžně se využívá pro renaturaci DNA a hybridizaci DNA-RNA, neboť formamid snižuje tepelnou stabilitu u dvouřetězcových nukleových kyselin [54]. Jeho využití lze nalézt v kryokonzervaci tkání a orgánů, je součástí těchto ochranných směsí. Užit lze také v gelové elektroforéze RNA, kde deionizuje RNA. Bylo dokázáno, že při teplotě $130 \text{ }^\circ\text{C}$ za působení ultrafialového záření dochází v roztoku formamidu na přeměnu molekuly formamidu na DNA bázi guanin. Z tohoto důvodu hraje sloučenina formamidu jednu z klíčových rolí v některých teoriích o vzniku života na Zemi [55]. Za teploty $180 \text{ }^\circ\text{C}$ a atmosférického tlaku se formamid začíná rozpadat na oxid uhličitý a amoniak. V roce 1920 bylo zjištěno, že formamid lze touto reakcí, ale opačného směru a za podtlaku, rovněž získávat. V roce 2014 byly simulovány srážky asteroidů a meteorů na základě bombardování formamidu a jílu vysoce výkonným laserem. Produkty reakce byly kromě jiných všechny čtyři báze dusíkové báze, které tvoří DNA. Výzkum se uskutečnil v ÚFCH Jaroslava Heyrovského AV ČR a na laserovém měřícím zařízení PALS (Prague Asterix Laser System) v Ústavu fyziky plazmatu AV ČR [56].

N-methylacetamid, ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$, $M_m = 73,0938 \text{ g/mol}$ [42]) lze klasifikovat jako amid karboxylové kyseliny, konkrétně se jedná o amid kyseliny octové, obsahující kovalentní vazbu CONH. Vyskytuje se v pevné formě jako krystalický bezbarvý prášek. Jde o sloučeninu rozpustnou ve vodě, také v chloroformu, ethanolu, benzenu a acetonu. Tato chemická látka je rovněž hygroskopická, málo těkává a málo hořlavá s mírným zápachem. Její bod tání se pohybuje mezi $(26 - 28) \text{ }^\circ\text{C}$ a bod varu je dosažen při $(204 - 206) \text{ }^\circ\text{C}$ [57]. Používá se jako rozpouštědlo v elektrochemii a je meziproduktem při výrobě agrochemikálií.

Experimentální studie

Experimenty popsané v této diplomové práci se uskutečnily v Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR. Metodou pro měření byla zvolena elektronová záchytová spektrometrie (EAS), která bude v této kapitole popsána. Předmětem měření byl disociativní záchyt nízkoenergetických elektronů na vybrané molekuly L-cysteinu, L-valinu, formamidu a N-methylacetamidu v jejich hydratované formě. Experimenty byly provedeny s použitím dvou různých experimentálních zařízení. Naprostá většina měření pro všechny vybrané sloučeniny byla realizována na experimentálním zařízení CLUB (CLUster Beam Apparatus). Pouze molekula L-cysteinu byla změřena i v izolované formě na disociativním záchytovém spektrometru. Účelem tohoto dodatkového měření L-cysteinu byla snaha o bližší prověření příčin jeho dekompozice s použitím spektrometru s lepším energetickým rozlišením.

Reflektronový spektrometr na experimentu CLUB disponuje vysokým hmotnostním rozlišením a při každém měření je zaznamenáno kompletní hmotnostní spektrum. Iontový zdroj spektrometru ale nedisponuje elektronovým monochromátorem a energetické rozlišení je tedy nižší $\approx 0,7$ eV. Z důvodu velké reakční zóny spektrometru 4 cm dochází také k velkému poklesu proudu elektronů při nízkých energiích a od 1 eV není možné zabránit rozšíření elektronového svazku v důsledku Coulombické repulze.

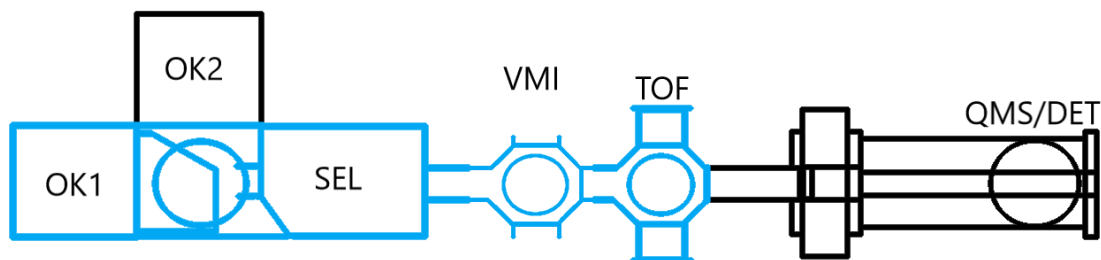
Na elektronovém záchytovém spektrometru (EZS) je možné studovat výlučně izolované molekuly v plynné fázi. EZS disponuje kvadrupolovým hmotnostním spektrometrem, který umožňuje dlouhá měření na jedné hmotě a ve spojení s elektronovým monochromátorem tak lze měřit energetické závislosti pro disociativní záchyt elektronů s vysokým energetickým rozlišením a dobrou statistikou měření. Rovněž je možné měřit při velmi nízkých energiích elektronů od 50 meV.

2.1 CLUB - CLUster Beam apparatus

2.1.1 Experimentální zařízení

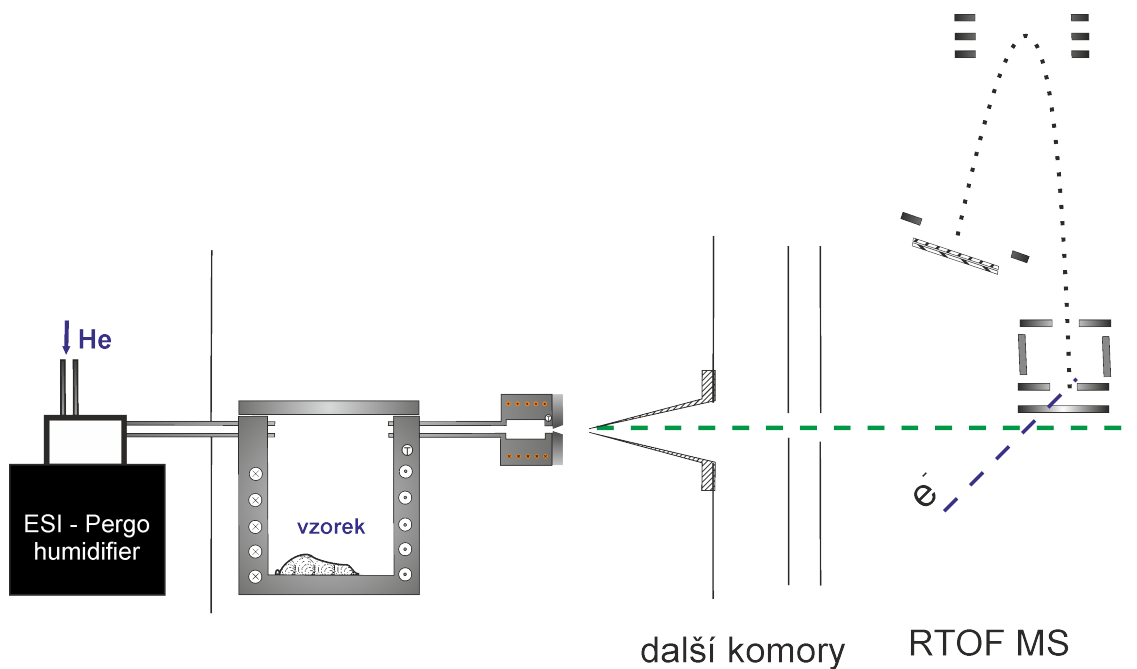
Experimentální zařízení CLUB je univerzální přístroj užívaný pro rozličné experimenty s klastry. Díky němu lze studovat molekuly v hydratovaném prostředí. Název přístroje byl odvozen a to od jeho anglického názvu "CLUster Beam apparatus". V přístroji se nachází 7 vakuových komor s různorodým využitím jako například zdroj klastrů, dále VMI systém, celým názvem "Velocity Map Imaging", užívaný ke studiu fotodisociace a také reflektronový hmotnostní spektrometr

(rTOF), užitý v práci, a kvadrupólový hmotnostní spektrometr. Na následujícím obrázku 2.1 je znázorněno základní schéma tohoto experimentálního zařízení.



Obrázek 2.1: Schéma experimentálního zařízení CLUB. Části aparatury vyznačené modrou barvou byly aktivně využity v této práci.

Detailnější grafické znázornění celého experimentu je na obrázku 2.2.



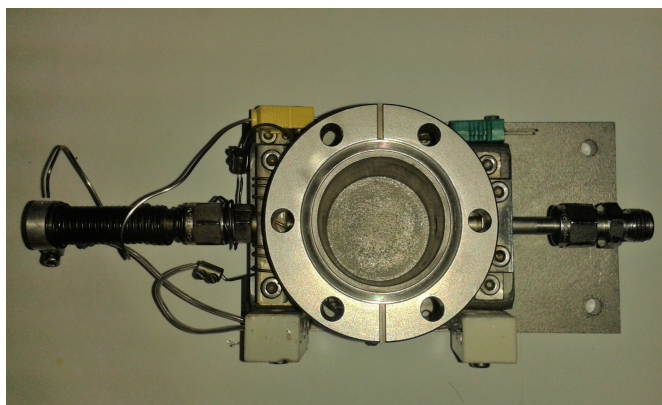
Obrázek 2.2: Profilové schéma pro vnitřní uspořádání experimentálního zařízení CLUB.

V rámci této práce byla užitá pouze část aparatury. Toto experimentální uspořádání je pak vyznačeno modrou barvou na obrázku 2.1 a podrobněji zobrazeno na obrázku 2.2. V přístroji CLUB, ve vakuové komoře OK1, je zaveden napouštěcí systém (obr. 2.3, 2.4). Tento obsahuje kovovou, někdy i skleněnou nádobu (dle požadavků), kam je umístěn vzorek (obr. 2.5). Vzorek je pak za vhodné teploty sublimován a společně s nosným plynem expandován do vakua, kde dochází ke tvorbě klastru.

Klastry vybrané sloučeniny se pak kříží s elektrony emitovanými žhaveným drátkem. K tomu dochází v reakční komoře pod pravým úhlem 90°. Vzniklé ionty jsou vyextrahovány do rTOF, kde jsou analyzovány na základě rozdílných dob průletu a detekovány. V této kapitole bude detailněji popsán napouštěcí systém pro vzorek a rovněž užitý rTOF detektor.

Systém napouštění vzorku a příprava klastru

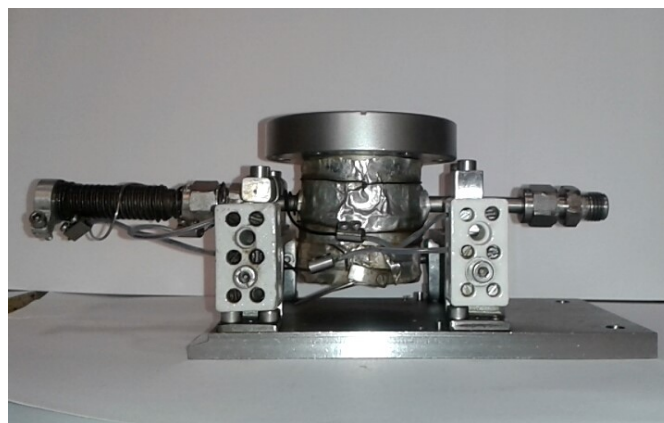
Systém napouštění vzorku je vyjímatelnou součástí vakuové komory. Napouštěcí systém z půdorysu i profilu lze vidět na obrázcích 2.3 a 2.4. Ústředním prvkem systému je centrálně soustředěná vyhřívaná kovová nádoba vyhrazená pro vzorek. V této práci byla použita i menší skleněná nádoba (obrázek 2.5), která sloužila k zamezení interakce kovové části aparatury se zahříváním vzorkem. Na vnější straně kovové nádoby byl instalován senzor teploty typu K. Vzorky byly postupně zahřívány až na teplotu 180 °C (pro L-cystein), 197 °C (pro L-valin), 127 °C (pro formamid) a 102 °C (pro N-methylacetamid). Tyto teploty jsou ale orientační vzhledem ke konstantnímu proudu nosného plynu o teplotě 36 °C nádobou a s ohledem na umístění čidel z vnější strany nádoby. Před každým měřením vybrané sloučeniny bylo nutné vyjmout napouštěcí systém z komory, vyčistit jej ve vodě, v acetonu a v ultrazvukové lázni pro zajištění co nejvyšší možné čistoty v rámci měření. Pro měření jsme použili následující vzorky: L-cystein ve formě bílého, krystalického prášku ($M_r = 121,16$ g/mol, BioUltra, $\geq 98,5$ %, Sigma Aldrich), L-valin ve formě bílé pevné látky ($M_r = 117,15$ g/mol, BioUltra, $\geq 99,5$ %, Sigma Aldrich), formamid ve formě průhledné kapaliny ($M_r = 45,04$ g/mol, BioUltra, $\geq 99,5$ %, Sigma Aldrich) a N-methylacetamid ve formě krystalického bezbarvého prášku ($M_r = 73,09$ g/mol, BioUltra, ≥ 99 %, Sigma Aldrich).



Obrázek 2.3: Pohled shora na systém napouštění vzorku vyjmutý z vakuové komory experimentálního zařízení CLUB.

Hmotnostní spektrometr rTOF

Reflektronový hmotnostní spektrometr rTOF (Reflectron time of flight mass spectrometer) je pulsním hmotnostním analyzátozem, jenž měří dobu letu (pro tuto práci řádově v μs), za kterou nabitě částice doletí po určité dráze na detektor. Ionty jsou nejdříve extrahovány z reakčního prostoru pomocí napěťového pulsu a akcelerovány na energii 8 keV. Poté letí 0,5 m dlouhou trubicí bez elektrického pole. Nakonec



Obrázek 2.4: Profilový pohled na napouštěcí systém vyjmutý z experimentálního zařízení CLUB.



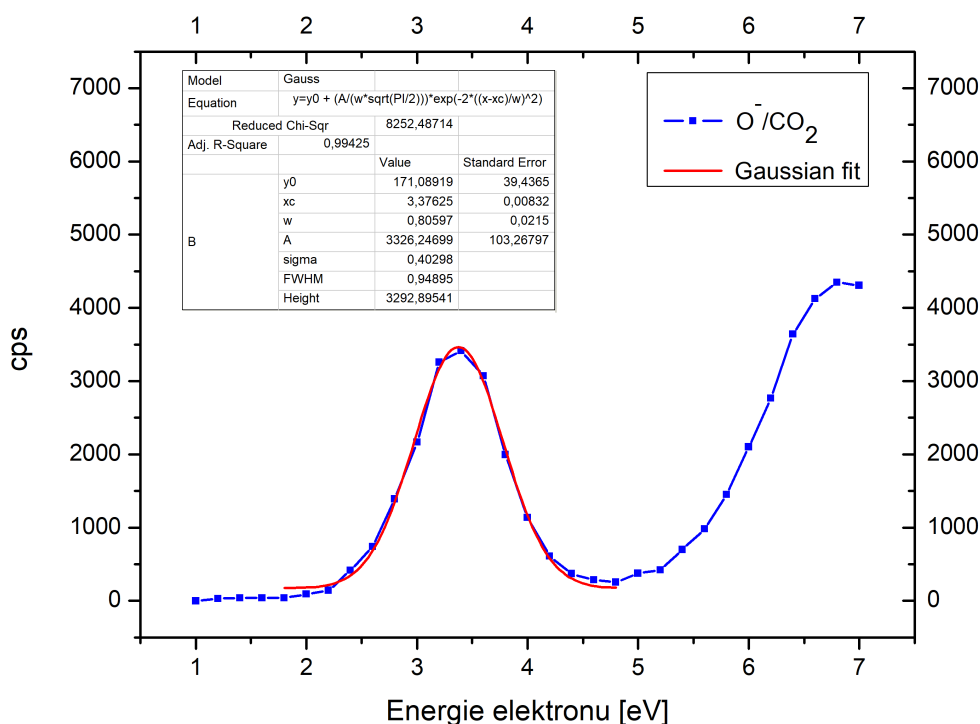
Obrázek 2.5: Skleněná mistička se vzorkem krystalků L-cysteinu zbarvených dohněda vlivem zahřívání během měření.

dopadají ionty o různých energiích na reflektoru. Čím větší kinetickou energií ionty disponují (bez ohledu na jejich m/z), tím pronikají do větší hloubky odrazového pole. Úlohou reflektoru je vyrovnat kinetické energie iontů a tím navýšit hmotnostní rozlišení detektoru. Poté co jsou ionty z reflektoru odraženy, letí druhou částí spektrometru, rovněž s délkou 0,5 m, až nakonec v různých časech dopadají na detektor v závislosti na poměru jejich m/z (čas průletu je přímo úměrný odmocnině m/z).

Pomocí rTOF lze měřit m/z molekul a klastrů a to ve dvou různých módech. Výsledkem měření v pozitivním módu je detekce kationtů, zatímco v negativním módu detekujeme anionty. Naše experimenty byly z většiny provedeny, vzhledem ke studiu reakce disociativního elektronového záchytu na vybraných sloučeninách, v negativním módu.

2.1.2 Kalibrace energetické škály

Prvním krokem, který předcházela jakémukoliv měření na experimentálním zařízení CLUB, byla vždy kalibrace energetické stupnice. Kalibraci jsme provedli pomocí molekuly CO_2 . Molekuly oxidu uhličitého jsou běžným prvkem zemské atmosféry. Oxid uhličitý je těžší než vzduch a je pro něj známá charakteristická energetická rezonance s maximem odpovídajícím 4,3 eV [58] pro reakci:



Obrázek 2.6: Kalibrace energetické stupnice pomocí molekul CO_2 .

Cílem kalibrace je převést hodnoty pro urychlovací napětí elektronů na skutečné hodnoty energie elektronů v jednotkách eV. Byla změřena závislost signálu iontu O^- z molekuly CO_2 na urychlovacím napětí. Získaná křivka byla následně porovnána s již známými daty [58] a proložena gaussovskou funkcí. Tak jsme získali posun škály napětí vůči reálné energetické škále a tím provedli kalibraci.

Kalibraci je možné vidět na obrázku 2.6. V grafu lze vidět dva píky - dvě rezonance. První rezonance náleží elektronům nižších energií, druhá pak elektronům o energiích vyšších. Pro kalibraci je určující rezonance pro elektrony o nižších energiích, a proto byl právě tento pík proložen Gaussovskou funkcí. Maximum tohoto píku lze nalézt při hodnotě energie elektronů 3,376 eV. Vzhledem k námi naměřené

hodnotě energie elektronů bylo nutné posunout naši energetickou škálu o přibližně 0,9 eV ve směru k vyšším energiím.

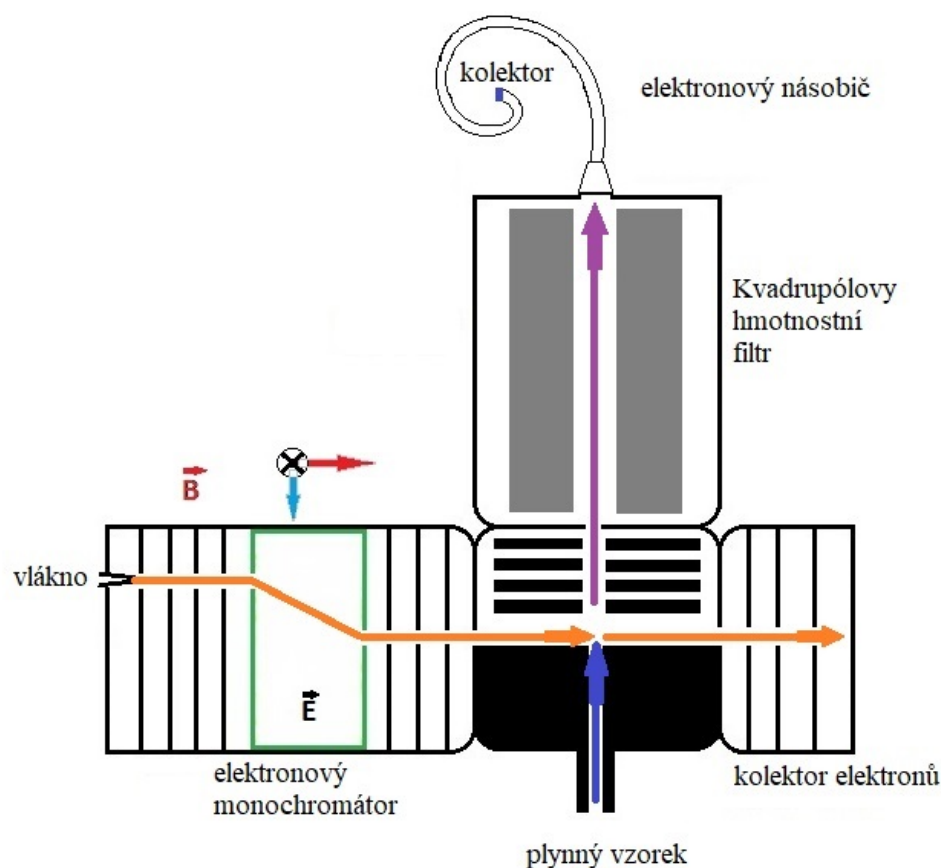
2.2 Elektronový záchytový spektrometr

2.2.1 Experimentální zařízení

V elektronovém záchytovém spektrometru se kříží elektronový svazek z trochoidálního elektronového monochromátoru (TEM) s terčovým plynovým svazkem. Aniony jsou pak detekovány hmotnostním spektrometrem. TEM i hmotnostní spektrometr se nachází uvnitř vakuové komory, kde se tlak pohybuje v řádu 10^{-7} mbar. Tento způsob uspořádání dává možnost provádět dva typy experimentů. Buď lze měřit hmotnostní spektra při konstantní energii elektronů a pro tuto energii pak identifikovat jednotlivé kanály DEA reakce, nebo lze měřit počet vzniklých iontů daného typu (o daném poměru hmotnosti ku náboji, m/z) v závislosti na energii elektronů, čímž lze získat účinný průřez reakce. Schéma elektronového záchytového spektrometru znázorňuje obrázek 2.1. Komponenty tohoto experimentálního zařízení, které umožňují bezsrážkový transport elektronů do reakčního prostoru a vzniklých iontů do detektoru, budou v této kapitole podrobněji popsány.

Trochoidální elektronový monochromátor

Funkce TEM spočívá v selekci elektronů stejné energie, a to má za následek navýšení rozlišovací schopnosti spektrometru. Tento monochromátor je po designové stránce kopií originálu od profesora M. Allana [59] a v jeho laboratoři byl také zkonstruován. TEM je zhotoven z molybdenu, ale ostatní části elektronového záchytového spektrometru jsou vyrobeny z nerezové nemagnetické oceli, která je vhodná pro vysoké vakuum. V principu jsou nejdříve emitovány elektrony ze žhaveného iridiového vlákna (s povrchovou úpravou yttria) vychýleného 1,6 mm od osy symetrie monochromátoru. Podmínkou pro emisi elektronů je vlákno zahříváné na teplotu ~ 2500 K. Energetická distribuce elektronů je charakterizována gaussovským rozdělením. Hodnota šířky píku v polovině jeho výšky (FWHM) nabývá velikosti $\sim 0,7$ eV. Pohyb elektronů je usměrňován systémem tří elektrod a paralelním magnetickým polem. Magnetické pole je generováno cívkami, nacházejícími se ve vakuu, v Helmholtzově konfiguraci. Vakuum lze nalézt v místech zkříženého elektrického pole, tedy v monochromátoru (obrázek 2.7 - zeleně). Zde je pohyb elektronů udáván dvěma složkami: cykloidální ($v \times B$) a driftovou ($E \times B$). Výsledkem složení těchto dvou složek je trochoidální trajektorie elektronu, proto se monochromátor nazývá trochoidální. Po průchodu monochromátorem jsou elektrony vedeny dále v ose monochromátoru. V monochromátoru jsou vybrány pouze elektrony o velikosti celkového vychýlení driftem $E \times B$ 1,6 mm. Celkové vychýlení závisí na vstupní energii elektronu a na době průletu elektronu monochromátorem. Takto v principu dochází ke snížení energetické distribuce elektronů za monochromátorem. [60] Na zde popsaném monochromátoru je pokles z původní šířky rozdělení energií elektronů $\approx 0,7$ eV



Obrázek 2.7: Schéma elektronového záchytového spektrometru.

FWHM na $\approx 0,1$ eV FWHM. Následně se elektrony urychlí v systému elektrod na takové energie, při kterých již interagují s námi vybranými molekulami v reakční komoře. Po průchodu reakční komorou jsou elektrony detekovány ve Faradayově válci, který je tvořen systémem tří elektrod a monitoruje elektronový proud v průběhu měření. [59]

Kvadrupólový hmotnostní spektrometr

V reakční komoře dochází ke vzniku iontů, které jsou následně extrahovány slabým elektrickým polem a urychleny souborem paralelních elektrod až do vstupu kvadrupólového hmotnostního filtru. Vybrané ionty s určitým poměrem hmoty ku náboji m/z jsou pak akcelerovány na channeltron napětím 1 kV. Toto napětí je dostatečné pro vyrazení elektronu z povrchu channeltronu. Vyražené elektrony jsou urychleny na konečné napětí 3,7 kV a srážkami se stěnami channeltronu pak vyrážejí další elektrony z jeho povrchu. Vzniká elektronová lavina, která má za následek zesílení náboje v řádu 10^9 . Znásobené pulsy jsou od vysokonapěťového výstupu násobiče odděleny kondenzátorem, poté jsou zesíleny, zpracovány čítecí elektronikou a převedeny do počítače. Akvizice dat i samotné řízení experimentu probíhá v programu ELS, který byl vyvinut v laboratoři oddělení dynamiky molekul a klastrů

v ÚFCH JH. Kvadrupólový hmotnostní spektrometr patří mezi analyzátoři s nízkým rozlišením. V našich měřeních byla typická hodnota rozlišení $m/\Delta m = 100$, jak je detailněji popsáno v podkapitole 2.3 věnující se hmotnostnímu rozlišení R.

Průběh měření L-cysteinu

Na elektronovém záchytové spektrometru byla měřena pouze sloučenina L-cysteinu. Pro měření disociativního záchyty elektronu na molekule L-cysteinu v plynné fázi, byl použit L-cystein ve formě bílého, krystalického prášku ($M_r = 121,16$ g/mol, BioUltra, $\geq 98,5$ %, Sigma Aldrich). L-cystein jsme vysublimovali za tlaku v řádu 10^{-4} mbar, zatímco tlak v reakční komoře byl stabilizován v řádu 10^{-7} mbar. Vzhledem ke schopnosti L-cysteinu rozkládat se při teplotách vyšších než 216 °C [61], probíhalo měření L-cysteinu v rozmezí teplot 126 °C až 150 °C. Během měření ale vzorek kondenzoval na stěnách aparatury. Příčinou tohoto nežádoucího jevu byl fakt, že zařízení nebylo vyhříváno a rovněž bylo nutné aplikovat větší množství vzorku kvůli nízkému účinnému průřezu pro reakci DEA na molekule L-cysteinu.

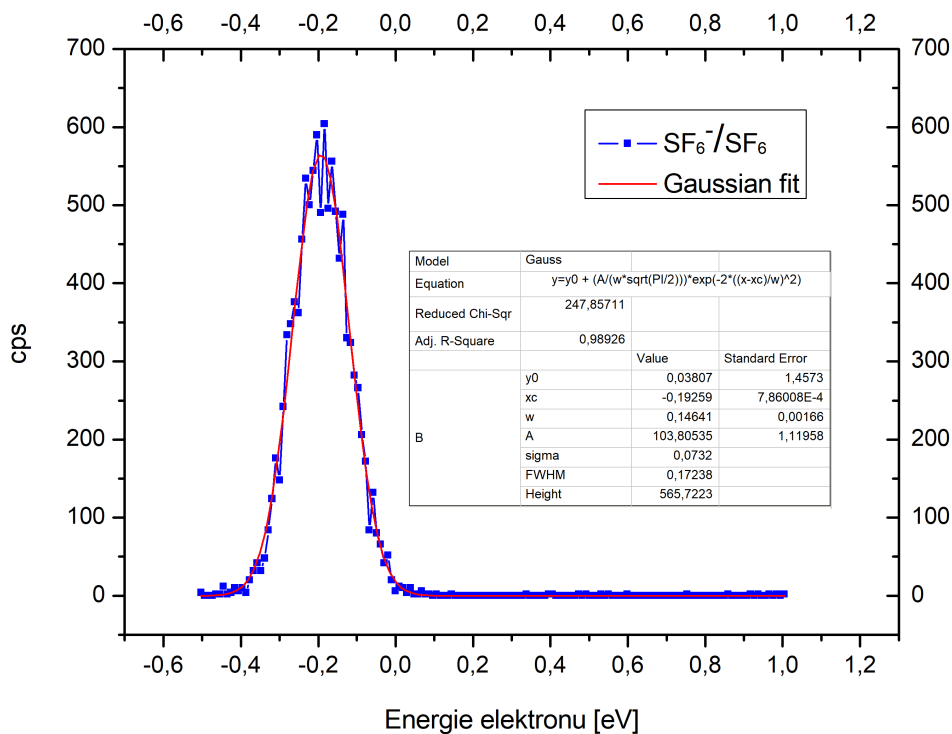
2.2.2 Kalibrace energetické škály pomocí SF_6

Stejně jako v případě měření na aparatuře CLUB, i v EZS je potřebné převést energie urychlovacího napětí elektronů na jejich skutečnou kinetickou energii. V případě experimentů s cysteinem jsme se soustředili na rezonance při nízkých energiích a použili jsme proto pro kalibraci fluorid sírový SF_6 s charakteristickou rezonancí pro tvorbu mateřského aniontu při nulové energii elektronů.

Molekuly SF_6 se vyskytují v atmosféře. Jedná se o stabilní, těžké molekuly vyznačující se jedním z nejvyšších účinných průřezů pro elektronový záchyt. Při tomto typu reakce je maximální účinný průřez dosažen při nulové energii elektronu.

Změřili jsme závislost iontového signálu pro aniont SF_6^- z molekuly SF_6 na urychlovacím napětí. Tím jsme provedli kalibraci, tedy získali posun škály napětí ve vztahu ke skutečné energetické škále. Posun energetické škály je dán maximem píku SF_6 vzhledem k charakteristické nulové hodnotě. V tomto experimentu byl změřený posun roven -193 meV vůči charakteristické hodnotě 0 eV.

Kalibrace energetické stupnice je zachycena v grafu na obrázku 2.8. Z tohoto grafu je možno určit maximum změřeného píku při hodnotě energie elektronů -193 meV. Vzhledem k faktu, že šířka 0 eV rezonance je řádově v meV (REF), je možné použít měřenou FWHM jako hodnotu energetického rozlišení. V grafu vidíme gaussovskou funkci, díky níž bylo možné určit i hodnotu energetického rozlišení, tedy šířku proloženého nejvyššího píku v polovině jeho výšky. V našem případě jsme získali hodnotu energetického rozlišení 172 meV, které bylo společně se zkalibrovanou energetickou stupnicí platné pro všechna provedená měření DEA na molekule L-cysteinu.



Obrázek 2.8: Kalibrace energetické stupnice pomocí SF₆.

2.3 Rozlišení hmotnostních spektrometrů

Experimenty byly měřeny na dvou typech hmotnostních spektrometrů. EZS obsahuje kvadrupólový hmotnostní spektrometr, který umožňuje měřit jednu hmotu po dlouhou dobu. Ve spojení s elektronovým monochromátorem je používán k měření energetických závislostí pro disociativní elektronový záchyt s vysokým energetickým rozlišením a dobrou statistikou měření pro izolované molekuly. Pro většinu experimentů bylo použito experimentální zařízení CLUB s reflektorným TOF spektrometrem. Spektrometr disponuje hmotnostním rozlišením větším než 1000, které je příznivé pro studium velkých klastrů jak bude popsáno dále.

Rozlišovací schopnost spektrometru je definována:

$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

kde M je hmotnost detekovaného iontu a ΔM představuje buď šířku píku v polovině jeho výšky nebo jde o rozdíl mezi naměřenou hmotností a její nejbližší hmotností, která je od ní ve spektru rozlišitelná.

V této kapitole budou uvedeny příslušné výpočty pro dostačující a pro skutečnou rozlišovací schopnost rTOF hmotnostního spektrometru a pro porovnání zde bude ukázána i rozlišovací schopnost pro kvadrupólový hmotnostní spektrometr.

Rozlišovací schopnost R pro rTOF hmotnostní spektrometr:

Vzhledem k zaměření práce na studium vlivu vodného prostředí na DEA, proběhly téměř všechny experimenty na experimentálním zařízení CLUB, které disponuje klastrovým zdrojem. Většina měření proběhla s nižším hmotnostním rozlišením, které můžeme vyhodnotit z naměřeného hmotnostního spektra N-methylformamidu. Toto hmotnostní spektrum je uvedeno na obrázku 2.9.

$$R = \frac{M^-}{FWHM} = \frac{57,90845u}{0,03889u} \cong 1489$$

kde M^- je hmotnost aniontu mateřské molekuly N-methylformamidu a hodnota FWHM získaná z fitu představuje šířku píku v polovině jeho výšky.

Ve většině měření toto rozlišení není potřebné vzhledem k tomu, že potřebujeme rozlišit ionty s rozdílem hmot 1 Da a studujeme malé klastry s hmotami několika set Da. V některých případech je však vysoké rozlišení důležité. Příkladem bylo měření formamidu.

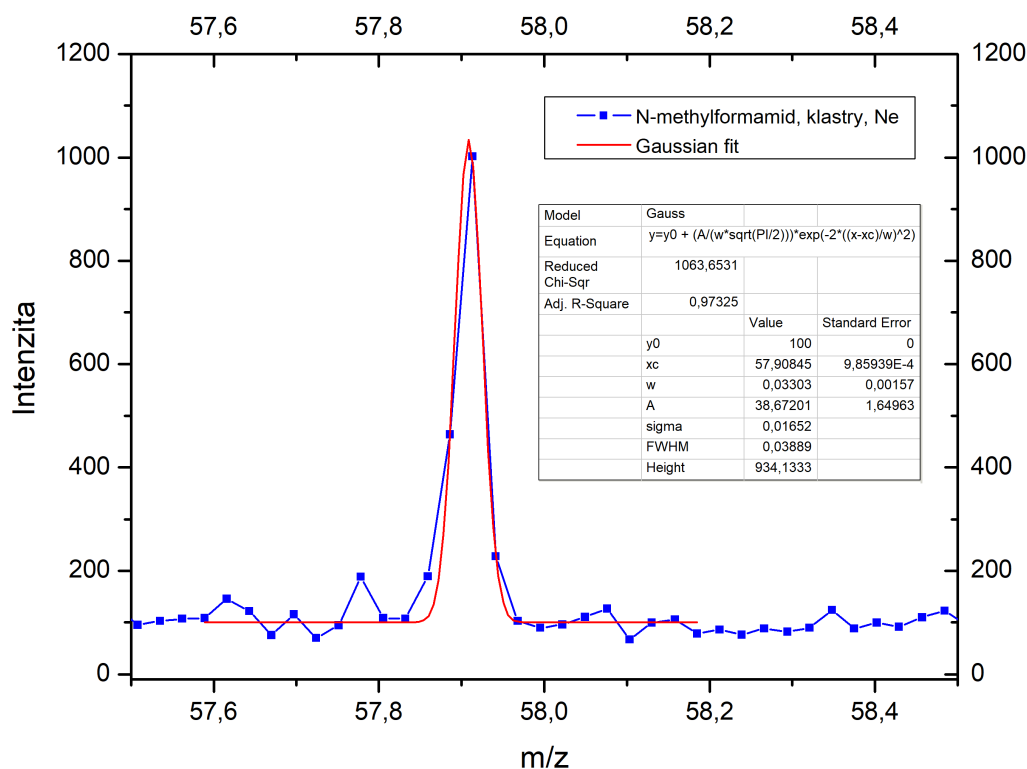
Pro separaci signálů O^- a NH_2^- , by bylo postačující rozlišení spektrometru: $R = 690$. Za předpokladu, že $A_r(O^-) = 15,9999$ a $M_r(NH_2^-) = 16,0231$ [62].

$$R = \frac{A_r(O^-)}{A_r(O^-) - M_r(NH_2^-)} = \frac{15,9999}{15,9999 - 16,0231} \cong 690$$

kde $A_r(O^-)$ je relativní atomová hmotnost aniontu kyslíku a $M_r(NH_2^-)$ je relativní molekulová hmotnost aniontu. Oba anionty pochází z izolované molekuly formamidu.

Vidíme, že rozlišení spektrometru 1489 je tedy postačující i k separaci těchto dvou iontů. Při standardním nastavení akvizice dat však tyto píky nedokážeme rozlišit z důvodu nastavení šířky měřicího intervalu. Sběr změřených dat z rTOF analyzátoru probíhá v tzv. TDC (time to digital conversion) módu, kdy sběrná elektronika čeká, až iont dopadne na detektor v intervalu dané šířky = bin. Pokud je v tomto intervalu iont detekován, zaznamená se čas jeho příletu vzhledem ke start pulzu, který je totožný se sepnutím napěťového pulzu pro extrakci iontů do spektrometru. V případě, že není iont detekován, nezaznamená se nic. Tímto způsobem je pro každý pulz extrakce zaznamenáno TOF spektrum s maximální hodnotou 1. Extrakce je pulzovaná s frekvencí 12 kHz, zaznamenáme tedy 12000 spekter za sekundu. TOF spektrum je pak histogramem jednotlivých hmot. Nejmenší hodnotou pro interval měření (= bin) je v našem experimentu 250 ps. Při typických dobách letu pro molekuly studované v této práci a jejich klastry v desítkách mikrosekund se při takto malém kroku měření dostáváme na stovky tisíc hodnot pro jedno hmotnostní spektrum. Toto množství dat pak zpomaluje jejich analýzu. Zároveň je takto malý

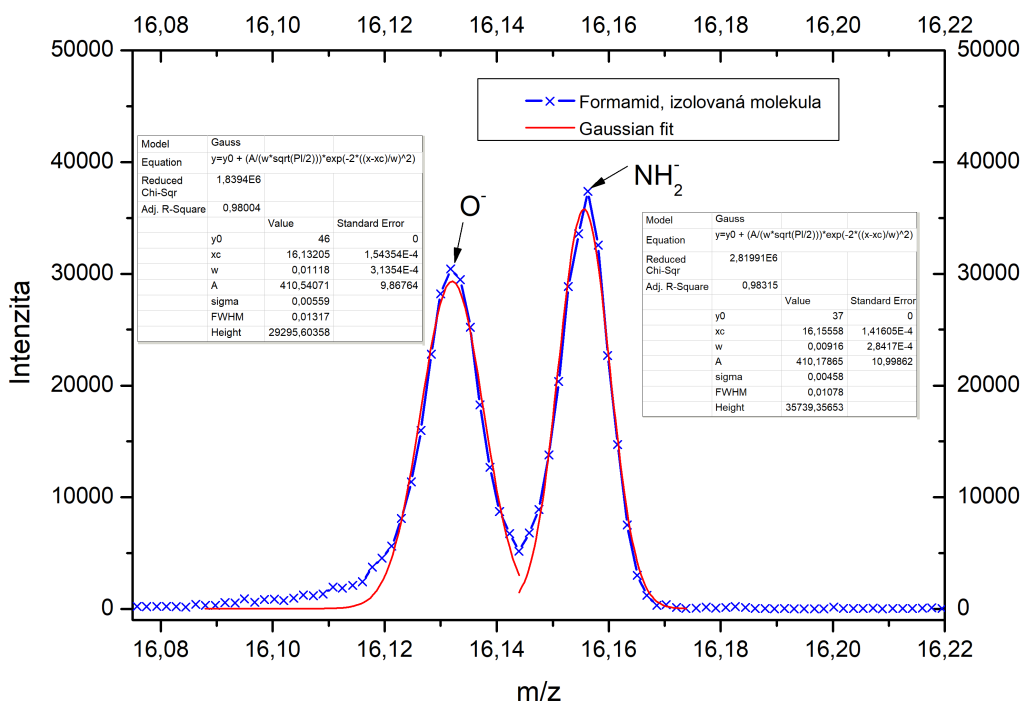
interval měření korespondující s časovým krokem TOF spektra ve většině případů zbytečný. Při hmotách molekul a klastrů v řádu stovek Da, to vede na hmotnostní spektra s několika stovkami bodů na jednu hmotu. Ve většině případů je proto měříme s intervalem 4 ns (bin = 16 x 250 ps = 4 ns) a tedy desítkami tisíc bodů. Příklad měření a příslušný výpočet rozlišení je na obr. 2.9. Pokud je vyžadováno měření s vysokým rozlišením, je třeba si uvědomit vliv šířky měřícího intervalu, jak je znázorněno na tvarech píků na obr. 2.11. V našem případě šlo o měření molekul formamidu, kde byla snaha o rozlišení dvou píků pro anionty O^- a NH_2^- na hmotě 16 Da.



Obrázek 2.9: Detail hmotnostního spektra měřené molekuly N-methylformamidu (ve formě klastrů) pro výpočet hmotnostního rozlišení: pík pro aniont mateřské molekuly je proložený Gaussovskou funkcí.

Vyšší rozlišovací schopnost R pro rTOF spektrometr byla vypočtena na základě parametrů z fitu (obr. 2.10) pro rozlišitelné píky aniontů o hmotě 16 Da pocházejících z měření izolované molekuly formamidu proloženého Gaussovskou funkcí,

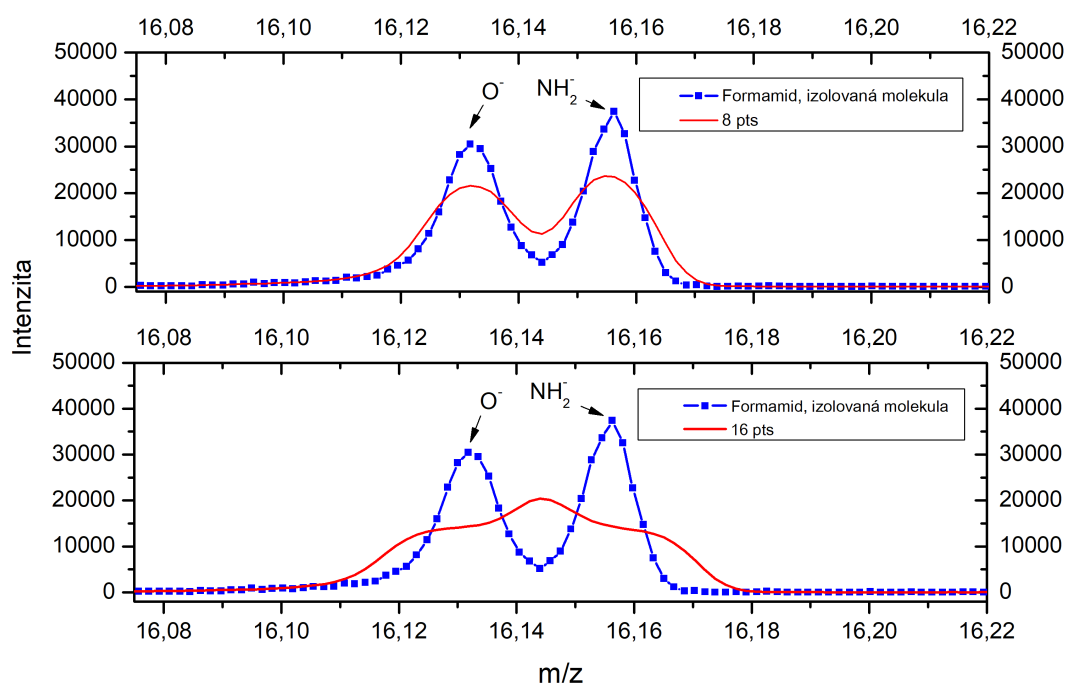
$$R = \frac{M^-}{FWHM} = \frac{16,15558u}{0,01078u} \cong 1498$$



Obrázek 2.10: Detail hmotnostního spektra izolované molekuly formamidu: píky pro anionty O^- a NH_2^- , pocházející z mateřské molekuly, jsou proloženy Gaussovskou funkcí.

kde M^- je změřená hmotnost pro aniont NH_2^- pocházející z mateřské molekuly formamidu a hodnota FWHM získaná z fitu představuje šířku píku v polovině jeho výšky.

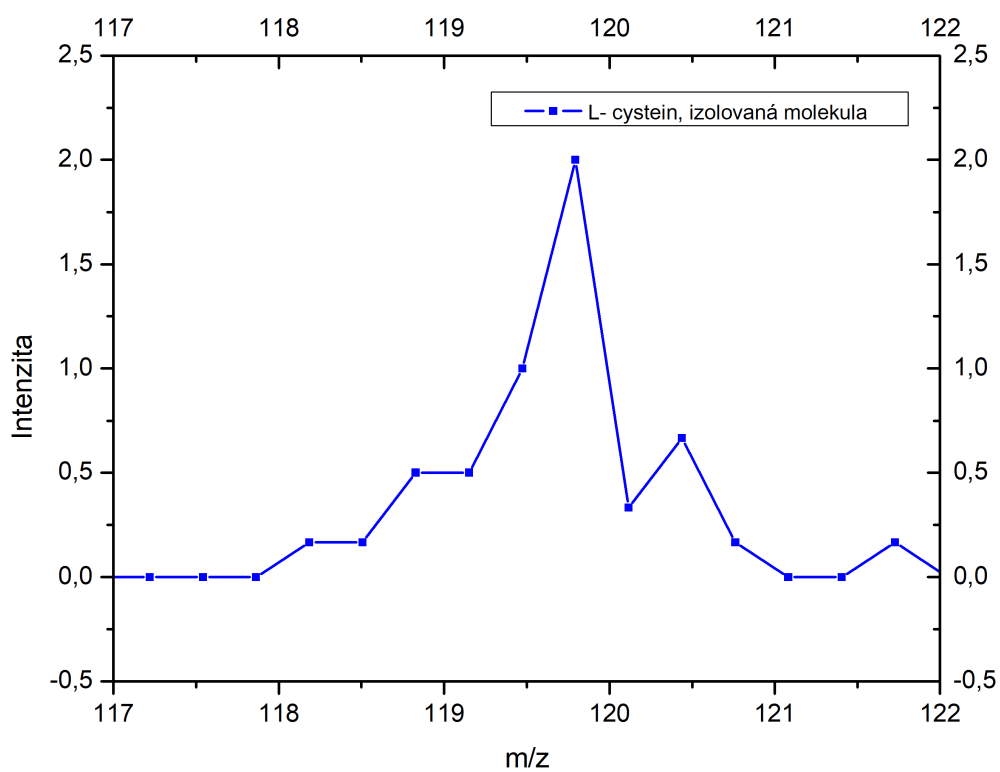
Na dalším obrázku 2.11 jsou červeně znázorněny píky, které bychom získali při použití běžných rozlišení 8×250 ps pro měření hmotnostních spekter v kladném módu a 16×250 ps pro měření hmotnostních spekter v záporném módu. Naopak píky skutečně naměřené vyznačené modře byly získány při rozlišení cca 2×250 ps. Jak vidíme z obrázku, běžně používaná šířka měřicího intervalu 4 ns (16×250 ps) by však neumožnila separaci těchto hmot ani při reálně vyšším rozlišení spektrometru. V případě TOF spektrometrů, které nedisponují dostatečně rychlým sběrem dat je pak jedinou možností prodloužení doby letu iontů.



Obrázek 2.11: Detail hmotnostního spektra izolované molekuly formamidu: píky pro anionty O^- a NH_2^- , pocházející z mateřské molekuly, a červeně proložené tak, jako by byl krok měření 8 x 250 ps nebo 16 x 250 ps.

Rozlišovací schopnost R pro kvadrupólový hmotnostní spektrometr:

Jak již bylo uvedeno, kvadrupólový hmotnostní spektrometr se vyznačuje spíše energetickým rozlišením, než tím hmotnostním. Pro ilustraci hmotnostního rozlišovací schopnosti R je na obr. 2.12 vykreslen pík aniontu $[M - H]^-$ z L-cysteinu měřeného v jeho izolované formě podléhající reakci DEA na kvadrupólovém hmotnostním spektrometru. Hmotnostní rozlišení R se pohybuje kolem hodnoty 100 a tato hodnota je i maximální hodnotou rozlišení R, která může být na na tomto hmotnostním analyzátoru dosažena.



Obrázek 2.12: Detail hmotnostního spektra izolované molekuly L-cysteinu pro ilustraci hmotnostního rozlišení R kvadrupólového hmotnostního spektrometru: změřený pík pro deprotonovaný aniont mateřské molekuly L-cysteinu.

Výsledky a diskuze

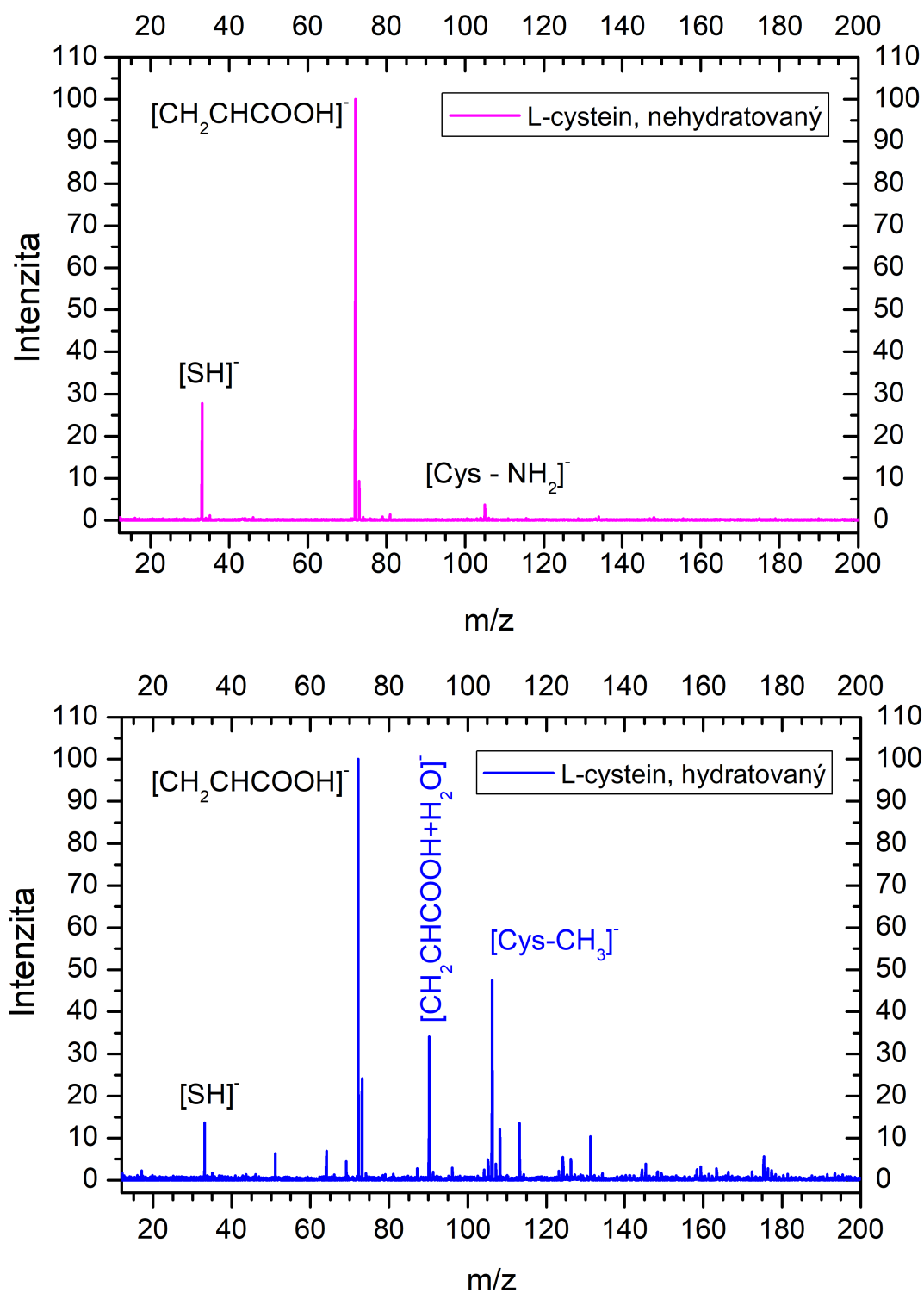
Tato kapitola shrnuje vlastní výsledky získané měřením disociativního záchytu elektronu na vybraných molekulách aminokyselin: L-cysteinu a L-valinu a na molekulách amidů: formamidu a N-methylacetamidu. Tyto výsledky byly získány pouze v rámci měření na experimentálním zařízení CLUB, které umožňuje studovat hydratované i nehydratované molekuly a tedy i bezprostřední vliv prostředí na reakci. V případě měření molekuly L-cysteinu jsou zde navíc uvedeny i výsledky měření pro DEA na izolované molekule L-cysteinu v její plynné fázi za použití elektronového záchytového spektrometru. Účelem tohoto dodatkového měření L-cysteinu byla snaha o bližší prověření příčin jeho dekompozice porovnáním experimentů za přesně definovaných podmínek s předchozími experimentálními studiemi pro izolovanou molekulu. Měření pro molekuly L-cystein a L-valin proběhlo již v rámci výzkumného úkolu [1]. Tato práce je rozšířena o měření sloučenin formamidu a N-methylacetamidu a podrobnou analýzu všech výsledků.

Studovaná reakce DEA na vybraných sloučeninách je obecně charakterizována zachycením nízkoenergetického elektronu na molekule aminokyseliny/amidu a vznikem přechodného mateřského iontu (v této práci se jedná o $(\text{Cys}^-)^*$, $(\text{Val}^-)^*$, $(\text{formamid}^-)^*$, $(\text{N-methylacetamid}^-)^*$). Takový přechodný iont je nestabilní a v důsledku nadbytku energie se rozkládá mnoha reakčními kanály (viz. rovnice 1.3 a-c). V práci jsem se zaměřila na studium vlivu vodného prostředí na proces DEA. Získané výsledky měření pro studované reakce za různých experimentálních podmínek budou v této kapitole porovnávány společně s již dříve naměřenými daty a následně diskutovány.

3.1 L-cystein

Disociativní elektronový záchyt na molekule L-cysteinu

Na experimentálním zařízení CLUB jsme studovali disociativní záchyt nízkoenergetických elektronů na nehydratované a hydratované molekule L-cysteinu a pozorovali jsme tak vliv vodného prostředí na reakční kanály reakce. Výsledkem tohoto měření jsou dvě naměřená hmotnostní spektra v záporném módu uspořádaná na obrázku 3.1. Při měření se interval energií elektronů pohyboval v rozmezí hodnot od 0,9 do 4,9 eV s krokem 0,2 eV. [1] Výsledné spektrum je tedy vždy součtem 21 spekter. Na každém z grafů je hmotnostní spektrum změřené pro molekulu nehydratovaného a hydratovaného L-cysteinu.



Obrázek 3.1: Změřená hmotnostní spektra pro L-cystein v jeho nehydratované (nahore) a hydratované formě (dole) na experimentálním zařízení CLUB. [1]

Na grafu nahoře na obrázku 3.1 (fialově) jsou vyneseny intenzity pro ionty vzniklé z DEA na nehydratovaném L-cysteinu při tlaku He 1 bar. V tomto grafu lze vidět

pouze tři výraznější píky a to pro $m/z = 33, 72$ a 105 . Hmotu 33 Da byla určena jako thiolová skupina SH^- , záporný iont o $m/z = 72$ jsme určili jako $(\text{CH}_2\text{CHCOOH})^-$, tedy $(\text{Cys-NH}_2\text{-SH})^-$. Dále hmotu 105 Da jsme přiřadili aniontu cysteinu bez amino skupiny, tedy $(\text{Cys-NH}_2)^-$. Nedetekovali jsme iont $(\text{Cys})^-$, ani jeho deprotonovanou formu $(\text{Cys-H})^-$ typickou pro disociativní záchyt na aminokyseliny [61]. [1]

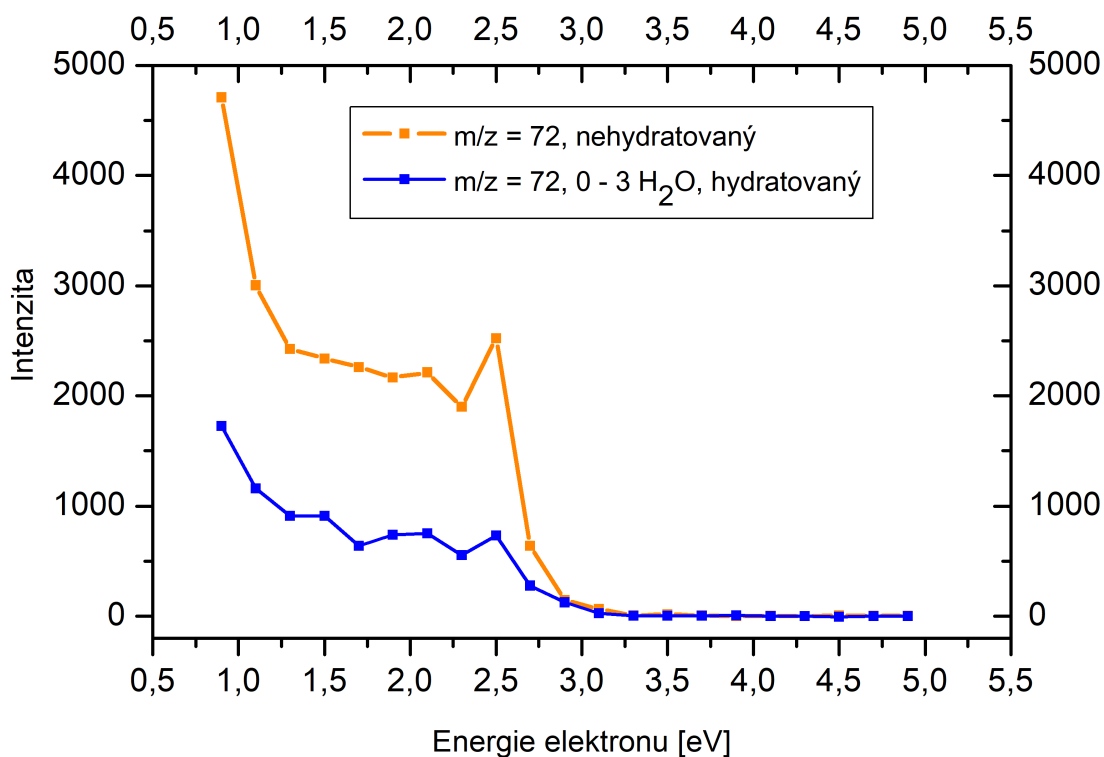
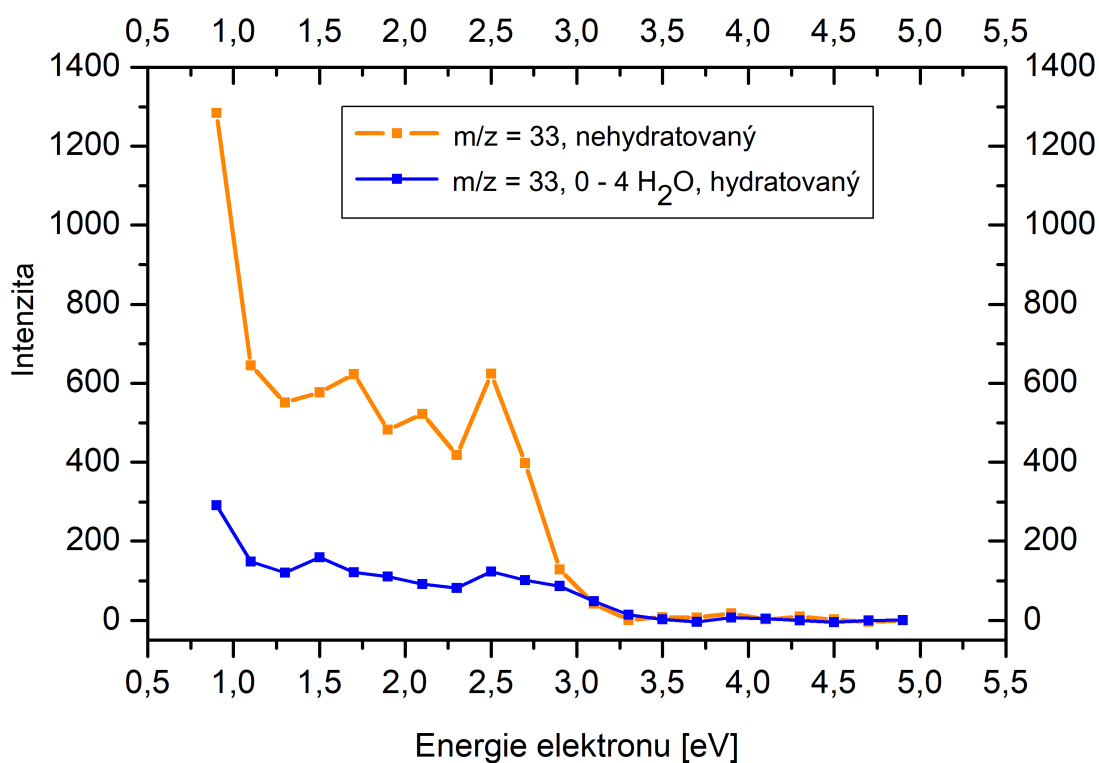
Graf dole na obrázku 3.1 (modře) znázorňuje získaná data pro disociativní záchyt elektronu na hydratované molekule L-cysteinu za tlaku He $1,5$ bar. Na tomto grafu lze vidět nejintenzivnější píky pro $m/z = 33, 72, 90, 106, 108, 113$ a 131 . Ostatní méně intenzivní píky lze vidět při $m/z = 50, 64$, atd. Pík pro hmotu 33 Da jsme určili jako aniont thiolové skupiny SH^- , pík 72 Da byl přiřazen aniontu $(\text{CH}_2\text{CHCOOH})^-$ - tedy $(\text{Cys-NH}_2\text{-SH})^-$ stejně jako v případě izolované molekuly. Další dva intenzivní píky o $m/z = 90$ a 108 jsou iontové fragmenty $(\text{Cys-NH}_2\text{-SH})^-$ s vodou, tedy ionty $(\text{CH}_2\text{CHCOOH} + \text{H}_2\text{O})^-$ a $(\text{CH}_2\text{CHCOOH} + 2 \text{H}_2\text{O})^-$. Hmotu 106 Da jsme určili jako aniont $(\text{Cys} - \text{CH}_3)^-$. Píky $m/z = 113$ a 131 se rovněž liší o 18 Da odpovídajícím molekule vody a přiřadili jsme je k iontům $(\text{M-CO}_2+2\text{H}_2\text{O})^-$ a $(\text{M-CO}_2+3\text{H}_2\text{O})^-$. [1]

Na obrázku 3.2 lze vidět příklad energetických spekter pro anionty s $m/z = 33$ a 72 zároveň detekované při měření DEA na L-cysteinu v jeho hydratované i nehydratované formě. Energetické závislosti byly měřeny v intervalu energií elektronů od $0,9$ eV do $4,9$ eV. [1]

V grafu nahoře na obrázku 3.2 jsou vyneseny dvě závislosti relativních intenzit aniontů SH^- na energii elektronů. Oranžová křivka představuje tuto závislost pro nehydratovanou formu, modrá křivka vykresluje tutéž závislost, ale pro hydratovanou formu, kde thiolovou skupinu obklopují řádově jednotky molekul vody. Z tohoto grafu je vidět, že tento disociační kanál je mnohem intenzivnější, pokud je vzorek v nehydratované formě a k interakci dochází, pokud je energie elektronu méně než 3 eV. Nejvyšší účinný průřez reakce roste pro elektrony, jejichž energie klesá k námi nejnižší měřitelné hodnotě $0,9$ eV. [1]

Na obrázku 3.2 v grafu dole jsou vyneseny opět dvě závislosti relativních intenzit aniontů $[\text{Cys-NH}_2\text{-SH}]^-$ na energii elektronů. Závislost pro nehydratovanou formu symbolizuje oranžová křivka, modrá křivka představuje tutéž závislost pro hydratovanou formu, kde je aniont obklopen řádově jednotkami molekul vody. Z tohoto grafu je stejně jako v grafu nahoře vidět, že účinný průřez reakce, ať už v hydratovaném nebo nehydratovaném prostředí, roste s klesající energií elektronu. A pravděpodobnost vzniku tohoto aniontu reakcí s elektrony o energiích vyšších než 3 eV se blíží nule. Reakce je intenzivnější, pokud probíhá v nehydratovaném prostředí. [1]

Vzhledem k nižšímu energetickému rozlišení, rTOF není vhodný k měření energetických spekter pro záchyt elektronů. Spektra na obr. 3.2 uvádím jen jako příklad možného měření energetických závislostí pro disociativní záchyt. Intenzita elektronového proudu na zařízení rTOF prudce klesá pro energie elektronů pod 1 eV. Kombinace nízkého rozlišení a poklesu elektronového proudu způsobuje, že energetická



Obrázek 3.2: Změřené energetické závislosti relativních intenzit aniontů SH⁻ a (Cys-NH₂-SH)⁻ na energii elektronů pro L-cystein v jeho hydratované a nehydratované formě na experimentálním zařízení CLUB. [1]

spektra pro rezonance při nízkých energiích jsou téměř totožná. Proto další energetická spektra v práci neuvádím, s výjimkou spekter potřebných k diskuzi. [1]

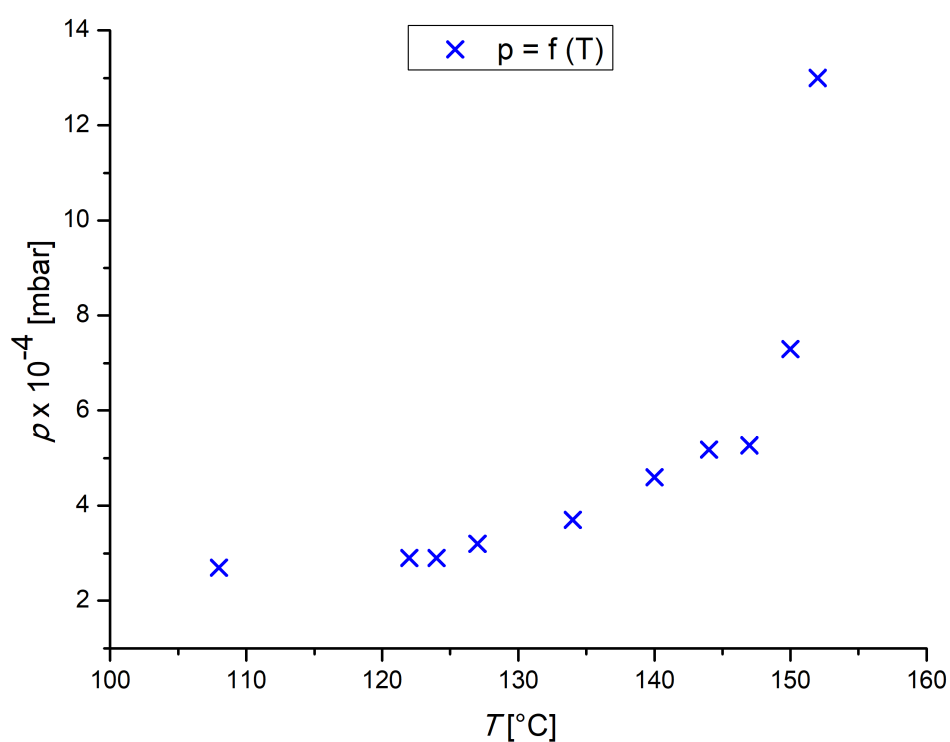
Měřením disociativního elektronového záchyty na molekule L-cysteinu v hydratovaném a nehydratovaném prostředí jsme získali dvě hmotnostní spektra. Porovnejme naše výsledky pro nehydratovanou molekulu s existujícími experimentálními daty pro izolovanou molekulu z experimentu v Berlíně [61]. V Berlíně detekovali ionty s $m/z = 16, 32, 33, 60, 71, 102$ a 120 . Naopak v námi provedeném experimentu byl změřen pouze pík o $m/z = 33$. Například pík odpovídající aniontu deprotonované mateřské molekuly s $m/z = 120$ nebyl v porovnání s berlínským experimentem změřen. Vzhledem k nízké rozlišovací schopnosti hmotnostního spektrometru použitého v Berlíně lze předpokládat, že fragmenty o $m/z = 71$ a 102 detekované v Berlínském experimentu jsou fragmenty s $m/z = 72$ a 104 detekované na experimentu CLUB. V porovnání s berlínským experimentem jsme nenaměřili píky o $m/z = 16, 32, 60$ a 120 . [61] [1]

Rozdíly mezi námi naměřenými hmotnostními spektry na rTOF a spektry z Berlína můžeme přičítat použití jiného typu detektoru, dále odlišným teplotním podmínkám měření nebo možným zbytkům fragmentů v reakčních komorách z předchozích měření. Otázkou zůstává, zda interakce s vodou nemění strukturu cysteinu a tím neovlivňuje výsledky měření. Nenaměřili jsme totiž deprotonovaný mateřský iont. Je možné, že L-cystein v trysce s vodou podléhal oxidaci za vzniku cystinu, který se ještě dále tepelně rozkládá na L-cystein, SH^- a S^- . K zabránění oxidace L-cysteinu ve vodě lze přispět např. odplyněním vody N_2 , aby se snížila koncentrace kyslíku. Nicméně naše měření probíhala v inertní atmosféře He nebo Ne, a z tohoto důvodu není třeba oxidaci uvažovat. K oxidaci vzorku by tak mohlo v našem případě docházet pouze před jeho umístěním do napouštěcího systému. Proto jsme měření provedli ještě s jiným vzorkem. Toto měření ale přineslo tytéž výsledky jako v případě předešlého vzorku, a tak efekt oxidace považujeme za málo pravděpodobný. Detekce hydratovaného fragmentu $m/z = 72$ může napovídat, že se molekula L-cysteinu rozpadá teplem v sublimační komoře a v trysce s vodou klastruje pouze vzniklý fragment. Jinak řečeno, experiment mohl být zatížen tepelným rozkladem L-cysteinu za teploty blízké 216°C [61], ačkoliv naše experimentální teplota dosahovala v maximu 180°C . Je tak možné, že cystein sublimuje a v plynné fázi dochází při studované teplotě k jeho rozkladu. To by vysvětlovalo i přítomnost iontů o $m/z = 113$ a 131 . Typickým produktem dekompozice aminokyselin je CO_2 [63], fragmenty 113 Da a 131 Da , tedy $(\text{M}-\text{CO}_2+2\text{H}_2\text{O})^-$ a $(\text{M}-\text{CO}_2+3\text{H}_2\text{O})^-$. Z tohoto důvodu jsme se chtěli ujistit, že jsme schopni v izolované formě reprodukovat předcházející výsledky z Berlína a uskutečnili jsme experimenty na elektronovém záchytové spektrometru. [1]

Disociativní elektronový záchyt na molekule L-cysteinu v izolované formě

Tato podkapitola je věnována měření disociativního elektronového záchyty na molekule L-cysteinu v jeho plynné fázi. Cílem měření s izolovanou molekulou bylo identifikovat pravou příčinu dekompozice molekuly L-cysteinu (možný vliv teploty/ vod-

ného prostředí), která byla pozorována během měření na experimentálním zařízení CLUB. V grafu na obr. 3.3 je pro disociativní záchytový spektrometr a jeho napouštěcí systém se vzorkem vykreslena závislost změřeného tlaku na teplotě. Z této závislosti lze pozorovat rostoucí trend tlaku s teplotou. S rostoucí teplotou se tlak mírně zvyšuje a to až do teploty 145 °C. V teplotní oblasti 145 - 150 °C dochází k saturaci tlaku a poté k zanesení trysky provážené prudkým nárůstem tlaku v napouštěcím systému spektrometru. Sublimované molekuly nebyly odčerpávány do reakční komory spektrometru a proto tlak v napouštěcí části se vzorkem začal prudce vzrůstat. Stagnaci tlaku od hodnoty přibližně 145 °C lze považovat za znak dekompozice, ačkoliv v literatuře je tento děj připisován teplotám od 216 °C [61] [1].



Obrázek 3.3: Závislost tlaku na teplotě pro případ napouštěcího systému elektronového záchytového spektrometru. [1]

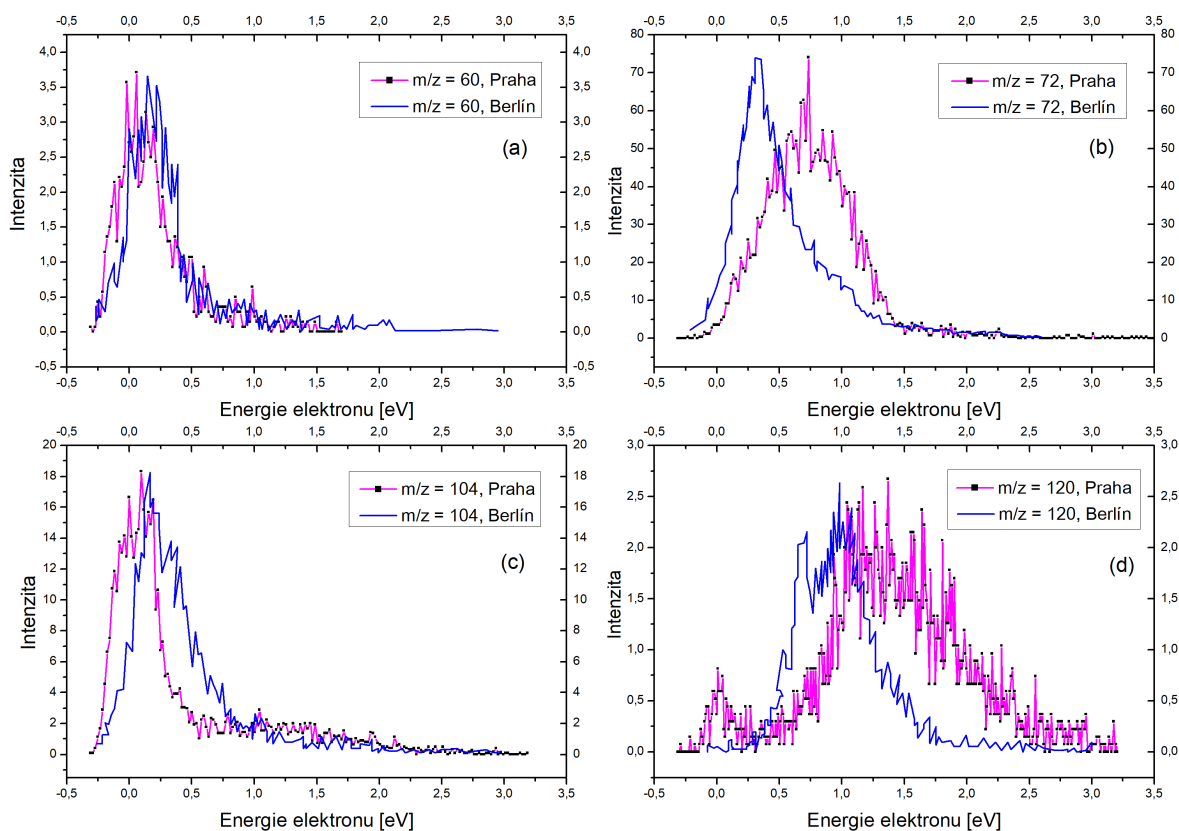
Studiem reakce disociativního elektronového záchytu na molekule L-cysteinu v jeho plynné fázi se ve své práci z roku 2003 zabývala skupina profesora E. Illenbergera z Freie Universität v Berlíně. [61] Náplní jejich práce bylo studium interakcí nízkenergetických elektronů (< 10 eV) s izolovanými molekulami cysteinu. Studium probíhalo na aparatuře podobné našemu spektrometru. Motivací pro studium této reakce bylo mimo jiné snaha o pochopení mechanismů radiačního poškození v biologických systémech. Pro měření bylo použito přibližně 50 mg vzorku cysteinu ve formě prášku (99 %, Sigma Aldrich). Teplota během měření dosahovala 116 °C, aby se zabránilo rozkladu molekuly. Aby předešli kondenzování vzorku na stěnách měřící komory, bylo třeba udržovat konstantní teplotu pomocí dvou halogenových lamp. Tlak v reakční komoře byl 3×10^{-8} mbar. Energetickou škálu kalibrovali pomocí molekul SF₆. [61] [1]

Měření odhalila vznik několika fragmentů v širokém intervalu energií elektronů od 0 do 10 eV. Jednalo se o fragmenty $m/z = 16, 32, 33, 60, 71$ a 102. Fragmenty s $m/z = 60, 71$ a 102 nebyly blíže popsány, protože anionty nebyly stanoveny v každém případě jednoznačně, nicméně byla snaha alespoň orientačně přiřadit jim stochiometricky odpovídající aniont. Zvláště aniontem s hmotou 102 Da si zřejmě nebyli příliš jisti, neboť je v práci zaměněna a určována jako hmota 101 Da. Hmota 60 Da určena vůbec nebyla. Signál $m/z = 71$ přiřadili k aniontu (C₃H₃O₂)⁻ a konečně signál při $m/z = 101$ identifikovali jako iont (C₃H₃NOS)⁻ vzniklý odtržením molekuly vody a molekulárního vodíku od mateřské molekuly cysteinu. [61] [1]

Vzhledem k tomu, že se uvedené ionty nepodařilo přiřadit, soustředili se v práci na méně intenzivní fragmenty s $m/z = 16, 32, 33$ a 120. Tyto hmoty pak byly přiřazeny jednotlivým aniontům. Mateřský přechodný aniont ochuzený o vodík (Cys-H)⁻ odpovídal hmotě 120 Da, hmota o $m/z = 32$ představovala aniont síry S⁻, hmota 33 Da byla přiřazena k aniontu thiolu SH⁻. Nejnižší výrazná hmota o $m/z = 16$ byla přiřazena aniontu kyslíku O⁻, nicméně stejně tak odpovídá i iontu amidu NH₂⁻, jehož existence zde není vyloučená. Z těchto 4 fragmentů jsou pak nejzákladnější fragmenty mateřský přechodný aniont ochuzený o vodík (Cys-H)⁻ a thiol SH⁻. Dále byl po štěpení vazby C-H navržen vznik radikálu alaninu a samotného alaninu během formování aniontů síry S⁻ a thiolu SH⁻. Tímto bylo ukázáno, že aminokyseliny mohou podléhat strukturním změnám za působení sekundárních nízkenergetických elektronů a že modifikace struktury aminokyselin může vést ke změně struktury proteinu, což vede ke ztrátě aktivity takového proteinu nebo enzymu. [61] [1]

Naše měření proběhlo na elektronovém záchytovém spektrometru, kde byl změřen disociativní záchyt elektronu na molekule L-cysteinu v plynné fázi. Výstupem měření v záporném módu jsou čtyři grafy (a)-(d) uspořádané na obrázku 3.4. V každém z těchto grafů je vynesena závislost intenzity iontu o určitém poměru hmotnosti k náboji na energii měřených elektronů pro vybrané hmoty $m/z = 60, 72, 104$ a 120. Tyto vybrané hmoty byly zároveň nejintenzivnějšími píky v naměřeném hmotnostním spektru. Sledovaný interval energií elektronů se pohyboval v rozmezí 0 - 10 eV. Intenzity Feshbachových rezonancí při vyšších energiích ale byly pod detekčním limitem našeho experimentu. Na grafu 3.4 proto zobrazujeme jen část spekter 0 - 3,5 eV. Naše naměřené závislosti jsou zároveň porovnávány se závislostmi získanými

skupinou profesora Illenbergera v Berlíně [61]. Naše data jsou znázorněna fialově, data získaná v Berlíně pak modře. [1]



Obrázek 3.4: Relativní intenzity aniontů s vybranými hodnotami m/z jako funkce energie elektronů naměřené s TEMP QMS v Praze v porovnání s daty z experimentu v Berlíně [61]. [1]

Na obrázku v grafu 3.4 (a) jsou vyneseny dvě závislosti relativních intenzit aniontu na energii dopadajících elektronů pro $m/z = 60$. Tato hmota může být aniont $(C_2H_2O_2)^-$. Závislost je charakteristická právě jedním píkem, který byl změřen jak v rámci experimentální části této práce (fialová křivka), tak také již dříve v Berlíně (modrá křivka). V případě našich naměřených hodnot pík dosahoval maxima při hodnotě 0,06 eV. V případě berlínského experimentu bylo dosaženo maxima při hodnotě 0,15 eV. Posun našeho získaného spektra vůči berlínským hodnotám byl 0,09 eV ve směru klesajících energií. [61] [1]

V grafu (b) na obrázku 3.4 jsou vykresleny energetické závislosti relativních intenzit aniontu $(CH_2CHCOOH)^-$ o hmotě 72 Da. V našem případě jsme pozorovali rezonanci při 0,75 eV. Skupina profesora Illenbergera změřila rezonanci při 0,32 eV. Naše naměřené spektrum vůči spektru získanému již dříve v Berlíně bylo posunuto o 0,43 eV ve směru rostoucích energií. [61] [1]

Graf (c) na obrázku 3.4 obsahuje závislost relativních intenzit aniontu na energii dopadajících elektronů pro $m/z = 104$, které jsme přiřadili iont $(\text{Cys-OH})^-$. Fialová křivka představuje naše získaná data pro energetickou závislost elektronů o energiích v rozmezí -1,3 eV do 3,18 eV. V námi změřeném spektru lze nalézt pík v oblasti 0,1 eV. V Berlíně byl naměřen téměř totožný charakter spektra, jemuž dominovala právě jedna rezonance při přibližně 0,17 eV. Posun našeho spektra vůči berlínskému spektru byl roven 0,07 eV ve směru klesajících energií. [61] [1]

Na obrázku v grafu 3.4 (d) lze vidět dvě křivky závislosti relativních intenzit aniontu na energii dopadajících elektronů pro $m/z = 120$. Tato hmota odpovídá deprotonované mateřské molekule L-cysteinu $(\text{Cys-H})^-$. Námi naměřená data jsou zde prezentována fialovou křivkou, naopak modrá křivka prezentuje data získaná v Berlíně. Obě spektra vykazují tvarově velmi podobnou nejsilnější rezonanci, která v našem měření dosahuje maxima při 1,38 eV a v případě berlínského experimentu se maximum pohybuje v oblasti 0,99 eV. V našem případě jsem změřili ještě jednu méně intenzivní rezonanci pro energie elektronů 0 eV. Energetický posun našeho spektra se pohyboval kolem 0,39 eV ve směru rostoucích energií vzhledem ke spektru naměřenému skupinou profesora Illenbergera. [61] [1]

Ve všech případech jsme naměřili spektra přibližně kopírující svým tvarem energetická spektra získaná profesorem Illenbergerem a jeho pracovním týmem. Ovšem zjištěné posuny mezi našimi a jejich spektry, které se neshodují ani ve velikosti a ani ve směru zůstávají předmětem k diskuzi. Posuny ve spektrech pro $m/z = 60$ a 104 jsou nižší než energetické rozlišení v experimentu, které bylo 170 meV. A můžeme je proto pokládat za potvrzení předchozích experimentů s tím rozdílem, že hmota 102 Da z berlínského experimentu je ve skutečnosti hmota 104 Da. Pro $m/z = 120$ a 72 vidíme výrazný posun kolem 400 meV. Zde předpokládáme, že je to způsobeno rozdílnou teplotou experimentů. Rezonance pro píky $m/z = 120$, resp. 72 určené jako anionty $(\text{M-H})^-$, resp. $(\text{Cys-NH}_2\text{-SH})^-$, jsou vibrační Feshbachovy rezonance. Jejich účinný průřez výrazně závisí na vibrační excitaci molekul. Vyšší teplota vede k otevření DEA reakčních kanálů pro elektrony nižších energií. To znamená, že DEA může probíhat i za níže položeného vibračního stavu. Záchytný spektrometr o vysokém rozlišení umožňuje pozorovat růst nového píku posunutého o energii vibračního vzbuzení molekuly ve směru disociační koordináty. V případě $m/z = 120$ jde o excitaci OH^- skupiny při 0,3 eV [61]. Tento posun je v souladu s posunem pozorovaným v našem případě. Tomuto vysvětlení nasvědčuje i spektrum pro hmotu 120 Da z berlínského experimentu, které má strukturu dvou píků. Toto vysvětlení je plně v souladu s teplotami sublimace v našem experimentu 63 - 67 °C, zatímco v berlínském experimentu prováděli experiment za teploty 116 °C. V experimentech s izolovanou molekulou jsem tak ukázala, že k dekompozici dochází již při 145 °C a tedy rezonance závisí na teplotě. Obě tyto skutečnosti ovlivňují spektra pro klastry měřené na spektrometru CLUB při vyšší teplotě. Ztížené podmínky měření byly způsobeny i nízkými reakčními průřezy pro reakci disociativního elektronového záchytu na molekule L-cysteinu. Proto jsme pracovali s vyšším elektronovým proudem a nižším rozlišením experimentu 170 meV. Tato korekce se projevila i na námi naměřených spektrech, která vykazovala větší šířku v porovnání s experimenty z Berlína. [1]

3.2 L-valin

Studium DEA na molekulách L-valinu v hydratovaném prostředí

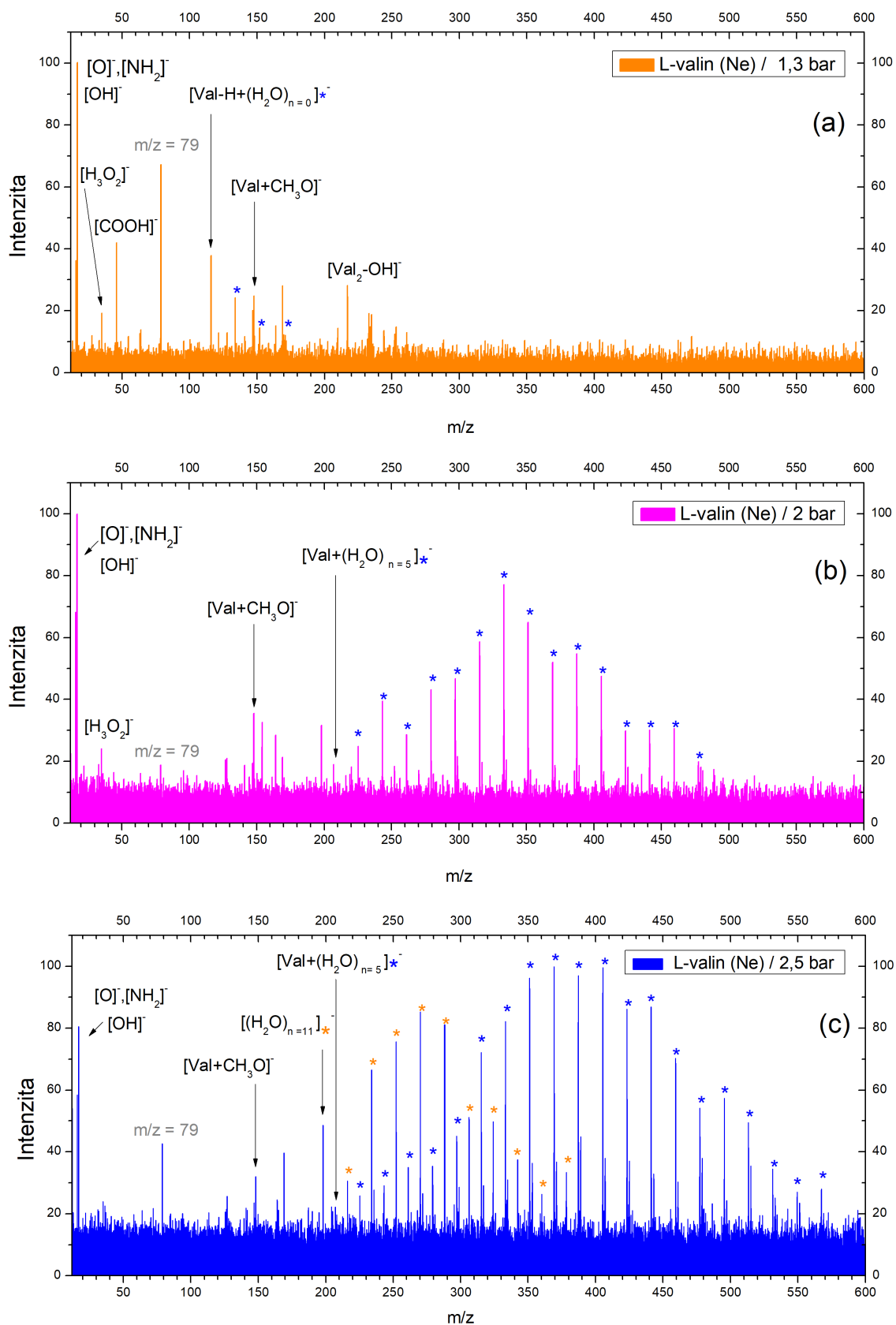
V případě molekuly valinu jsme neměřili spektrum pro nehydratovanou molekulu, neboť účinný průřez pro záchyt nebyl dostatečný pro detekci v molekulovém paprsku. Vliv prostředí proto diskutujeme na základě měření při různém stupni hydratace a v porovnání s předchozími experimenty s izolovanou molekulou publikovanými P. Pappem a kol. [64] Získali jsme tři hmotnostní spektra v záporném módu uvedená na obrázku 3.5. Reakce byly měřeny při energiích elektronů od 0,1 do 4,9 eV. [1]

Na obrázku 3.5 v grafu (a) je (oranžově) vyobrazeno hmotnostní spektrum L-valinu v hydratovaném prostředí při tlaku neonu 1,3 bar. Nejintenzivnějšími naměřenými píky tu jsou ty s $m/z = 16, 17, 45, 79, 116, 134, 148, 169$ a 217. Signál s $m/z = 16$ odpovídá aniontu NH_2^- . Hmotu o $m/z = 17$ jsme přiřadili hydroxylovému aniontu OH^- , aniont o hmotě 45 Da by mohl být HOCO^- nebo CHO_2^- . Aniont o $m/z = 35$ by mohl odpovídat $(\text{OH}^- + \text{H}_2\text{O})$. Pík o hmotě 116 Da je deprotonovaným aniontem mateřské molekuly $(\text{Val-H})^-$. Píky o vyšších m/z odpovídají klastrům aniontů s vodou (píky označené modrou hvězdičkou). Např. posloupnost hmot s $m/z = 116, 134, 152$ je posloupností aniontů lišících se od sebe pouze o další molekulu vody. [1]

V grafu na obrázku 3.5 (b) lze vidět hmotnostní spektrum pro L-valin (fialově) v hydratovaném prostředí za tlaku neonu 2 bar. Mezi nejintenzivnější změřené píky patří ty pro $m/z = 16, 17, 35, 148, 154, 164, 198, 225, 243, 261, 279, 297, 315, 333, 351, 369, 387, 405, 423, 441$ a 459. V porovnání s nižší hydratací jsme zde změřili aniont s $m/z = 35$ o nižší intenzitě. Pík pro iont mateřské molekuly o $m/z = 116$ zde nevidíme. Posloupnost hmot začíná hmotou 207 Da, která je iontem $(\text{Val} + (\text{H}_2\text{O})_5)^-$, a pokračuje hmotami o $m/z = 225, 243, 261, 279, 297, 315, 333, 351, 369, 387, 405, 423, 441$ a 459. Řada je příkladem posloupnosti aniontů, které se ode sebe liší pouze o další molekulu vody (píky značené modrou hvězdičkou). [1]

Graf (c) na obrázku 3.5 reprezentuje hmotnostní spektrum L-valinu (modře) v hydratovaném prostředí za tlaku neonu 2,5 bar. Hmoty vznikající s nejvyšší intenzitou jsou $m/z = 17, 79, 148, 169, 198, 235, 252, 261, 270, 279, 288, 297, 306, 315, 325, 333, 342, 351, 369, 387, 405, 423, 442, 460, 478, 496, 512$ a 530. Hmoty o vyšších m/z vznikly navázáním molekul vody. Píky s $m/z = 207, 225, 243, 261, 279, 297, 315, 333, 351, 369$, apod. značené modrou hvězdičkou představují stejné ionty jako v předchozím případě na obr. 3.5 (b). Píky označené oranžovou hvězdičkou jsou čistými klastry molekul vody. Řada počíná hmotou 198 Da $(\text{H}_2\text{O})_{11}^-$ a pokračuje posloupností iontů o $m/z = 216, 234, 252, 270, 288, 306, 324, 342, 360$ a 378. [1]

Hmotnostní spektra pro DEA na L-valin v hydratovaném prostředí byly získány při třech různých tlacích Ne: 1,3 bar, 2 bar, 2,5 bar. S nárůstem tlaku rostl počet molekul vody obklopující molekulu valinu v neutrálním klastru připravovaném během



Obrázek 3.5: Změřená hmotnostní spektra pro L-valin v jeho hydratované formě na experimentálním zařízení CLUB. [1]

expanze. V hmotnostních spektrech jsme pak pozorovali nárůst iontů o hmotách vyšších než je hmotnost mateřské molekuly L-valinu $(\text{Val-H})^-$. Také můžeme pozorovat zdánlivý pokles podílu signálu šumu s rostoucím tlakem nosného plynu. To je způsobeno skutečností, že všechna spektra byla měřena ve stejném dynamickém rozsahu (1 milion sweeps) a se stejnou intenzitou elektronového svazku. Ve spektru roste počet detekovaných píků. Pokud je tento nárůst rychlejší, než nárůst účinného průřezu pro záchyt elektronu, dochází k zdánlivému nárůstu šumu v porovnání se signálem. Ve skutečnosti však podíl šumu klesá. Vyhodnotit je to možné na základě poměru integrovaného signálu k šumu na stejném intervalu pro všechna spektra. Tento poměr roste s hydratací a účinný průřez se zvyšuje. Vypočtené poměry signál/šum jsou pro všechna tři uvedená spektra ve směru růstu tlaku: 0,455; 1,130 a 1,691. Signál tedy narůstá rychleji než šum. [1]

Ve všech třech spektrech jsme změřili fragment o $m/z = 79$, který jsme nebyli schopni identifikovat. Přítomnost bromidu byla vyloučena, neboť pak by byl v rámci izotopů ve spektru přítomen i pík o $m/z = 81$. Při nízké hydrataci detekujeme ionty $[(\text{M-H})+(\text{H}_2\text{O})_n]^-$, zatímco při vysoké hydrataci vznikají ionty $[\text{M}+(\text{H}_2\text{O})_n]^-$. V závislosti na počtu zachycených molekul vody tedy dochází k uzavírání tohoto reakčního kanálu pro DEA reakci vedoucí na dehydrogenovaný mateřský iont. Zdá se, že se jedná o prahový jev, neboť chování molekuly L-valinu při různé hydrataci se takto mění skokově. Důvod může být čistě energetický. S nárůstem počtu molekul vody se kanál pro vznik klastrů $[(\text{M-H})+(\text{H}_2\text{O})_n]^-$ uzavírá. Exotermní proces odštěpení vodíku od mateřské molekuly je s rostoucím počtem okolních molekul vody tlumen, až k odštěpení nedochází vůbec, neboť molekuly vody pohltnou nadbytečnou energii mateřské molekuly, vedoucí jinak k její disociaci. Druhou možnou příčinou takové změny chování může být změna struktury valinu z neutrální formy v plynném stavu na zwitterion, když dosahuje klastr mateřské molekuly a molekul vody určité velikosti. Na základě výpočtů bylo ukázáno, že molekula aminokyseliny valinu ve formě zwitterionu je stabilní, když je obklopena alespoň 5 molekulami vody. [65] Pro DNA báze bylo pozorováno uzavření kanálu pro vznik aniontu M-H už za nízké hydratace. [1]

Pro některé hmoty v této práci by bylo teoreticky možné nalézt více struktur. V tom případě bylo třeba nalézt hodnoty elektronových afinit pro možné vzniklé ionty. Elektronová afinita vyjadřuje množství energie uvolněné v ději, kdy z atomu v základním stavu vzniká aniont. V případě, že existuje více aniontů, které lze přiřadit jedné hmotě, pak s největší pravděpodobností vzniká ten, jehož elektronová afinita je nejvyšší. Nicméně u fragmentace molekuly valinu reakcí DEA bylo možné určit strukturu fragmentu ihned, neboť se vždy ukázalo, že z hypotetických struktur existuje dle údaje o elektronové afinitě právě jedna. V případě valinu se jednalo pouze o dvě neurčené hmoty a to $m/z = 31$ a 45 s hypotetickými strukturami CH_3O^- nebo $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ a HOCO^\bullet nebo HCO_2^- . V databázi NIST jsme pak našli stabilní anionty jen pro struktury CH_3O^- a HOCO^\bullet s afinitami 1,569 eV a 1,510 eV [62]. [1]

Studium DEA na molekulách L-valinu v jeho plynné fázi

Disociativní elektronový záchyt na izolované molekule L-valinu byl studován a následně publikován roku 2006 skupinou na Univerzitě Komenského v Bratislavě

rovněž na aparatuře se zkříženými svazky. Měření byla provedena s energiemi elektronů od 0 do 14 eV a s energetickým rozlišením 150 meV. Spektra byla zkalibrována pomocí molekul SF₆. Valin v pevném stavu byl sublimován při teplotě 140 °C. [64] [1]

Výstupem práce [64] byla změřená energetická spektra pro nejvíce intenzivní detekované ionty. Při energii elektronů 1,12 eV byl pozorován vznik mateřského aniontu ochuzeného o vodík (Val-H)⁻ s m/z = 116. Dále vznikaly anionty CHOO⁻ a COOH⁻ s m/z = 45. Také byl detekován fragment s m/z = 17, který představuje hydroxylový aniont OH⁻ a pro který lze pozorovat nejvyšší rezonance kolem 5 a 8 eV. Další fragmenty nižších intenzit vznikaly interakcí valinu s elektrony o energiích vyšších než 5 eV. Mezi tyto naměřené fragmenty patří i ty o m/z = 100, 72, 56 a 26. Aniont s hmotou m/z = 26 byl určen jako CN⁻. Fragment o m/z = 56 určili jako C₃H₄O⁻ nebo C₃H₆N⁻. Fragment o m/z = 72 byl přiřazen k aniontu valinu bez karboxylové skupiny (V-COOH)⁻ a aniont o hmotě 100 Da byl určen jako valin ochuzený o hydroxylovou skupinu (V-OH)⁻. [64] [1]

Závěrem jejich práce je zjištění, že většina produktů z DEA na valinu vznikla prostřednictvím přesmyku a nikoliv prostřednictvím přímé disociace. Základem pro takovou hypotézu je porovnání jejich vlastních provedených termodynamických výpočtů se získanými experimentálními výsledky. Fakticky si lze tohoto přeuspořádání povšimnout na formaci CN⁻ při energii elektronů 1,2 eV. Tato hodnota je od vypočtených hodnot posunuta o 9 eV pod prahovou energii reakce za předpokladu, že nevznikají nové vazby. [64] [1]

Naše experimenty probíhaly ve vodném prostředí, zatímco bratislavský experiment byl určen přímo pro izolované molekuly L-valinu [64]. Elektronový záchyt pak výrazně ovlivňuje vodné prostředí. Vidíme, že s rostoucí hydratací celkový iontový signál narůstá, účinný průřez pro záchyt je tedy větší. Na druhé straně už nedochází k fragmentaci, vyjma formování NH₂⁻ iontů. Ačkoliv by mohl v tomto případě existovat pro hmotu o m/z = 16 ještě aniont kyslíku O⁻, v dřívějších pracích bylo ukázáno (ať už experimentálně, resp. na základě termodynamických výpočtů), že tento iont za námi studovaných energií elektronů (< 5 eV) nevzniká [64], resp. [66]. Při nejvyšší hydrataci (až několik desítek molekul vody v klastru) prakticky dochází k úplnému potlačení jakékoliv fragmentace. [1]

Porovnejme naše výsledky s výsledky z měření pro izolovanou molekulu [64]. Hmoty, které se ani v jednom z našich tří změřených spekter neobjevily, byly m/z = 26 (CN⁻), 56 (C₃H₄O⁻ nebo C₃H₆N⁻), m/z = 72 (Val-COOH)⁻ a m/z = 100 (Val-OH)⁻. Vznik aniontu OH⁻ z valinu při nízkých energiích nebyl popsán. V dřívější práci byl uveden termodynamický práh pro přímou disociaci 2,6 eV [64]. Rovněž lze říci, že tento fragment nemůže pocházet z molekuly vody, neboť ta disociuje za energie elektronů > 5 eV. Tento předpoklad potvrzuje pokles signálu OH⁻ s narůstající hydratací. Lze tak předpokládat, že iont vzniká z valinu po přesmyku vodíku [64]. Fragmenty s hmotami 72 a 56 Da vznikají výhradně v rezonancích při energiích elektronů > 5 eV. Měření v této energetické oblasti jsme rovněž uskutečnili a v současné době pracujeme na jejich analýze. Hlavní rozdíl je, že nepozorujeme

hmoty 26 Da a 100 Da. V práci P. Pappa byly provedeny výpočty termodynamických prahů pro tyto reakční kanály poukazující na fakt, že ani jeden z iontů není možné vytvořit v rámci pozorování nízkoenergetické rezonance [64]. Komplikovaným přeskupením atomů ve výsledném neutrálním ko-fragmentu k vzniklému aniontu bylo dosaženo posunutí teoretického prahu do oblasti pozorované nízkoenergetické rezonance, nikoliv však na její práh. Může to tedy znamenat, že tyto fragmenty tvořily pozadí v experimentu v Bratislavě, nebo vznikají z molekuly při vyšších teplotách. Během našeho experimentu jsme naměřili vyšší teploty v rozmezí 195 - 201 °C, při kterých vzorek sublimoval. Molekuly jsou pak okamžitě po sublimaci unášeny proudem He/Ne za teploty 36 °C a dále chlazeny v adiabatické expanzi na teploty nižší než -173 °C. V Bratislavském experimentu je sublimovaný vzorek veden efuzivní kapilárou na stejné teplotě, molekuly tedy měly teplotu 142 °C. V dalším pokračování studie by proto bylo vhodné změřit i spektrum pro izolovanou molekulu při různých teplotách. [1]

3.3 Formamid

Molekuly formamidu v izolované formě i v hydratovaném prostředí byly ostřelovány nízkoenergetickými elektrony o energii 0 - 15 eV a byl studován vliv vodného prostředí na DEA reakci. Výstupem z tohoto měření je hmotnostní spektrum pro izolovanou molekulu formamidu na obrázku 3.6 a pak hmotnostní spektrum pro molekulu formamidu ve vodném prostředí, které je pro lepší srovnání rozděleno do dvou grafů na obrázcích 3.7, resp. 3.8. Obě hmotnostní spektra byla změřena v záporném módu.

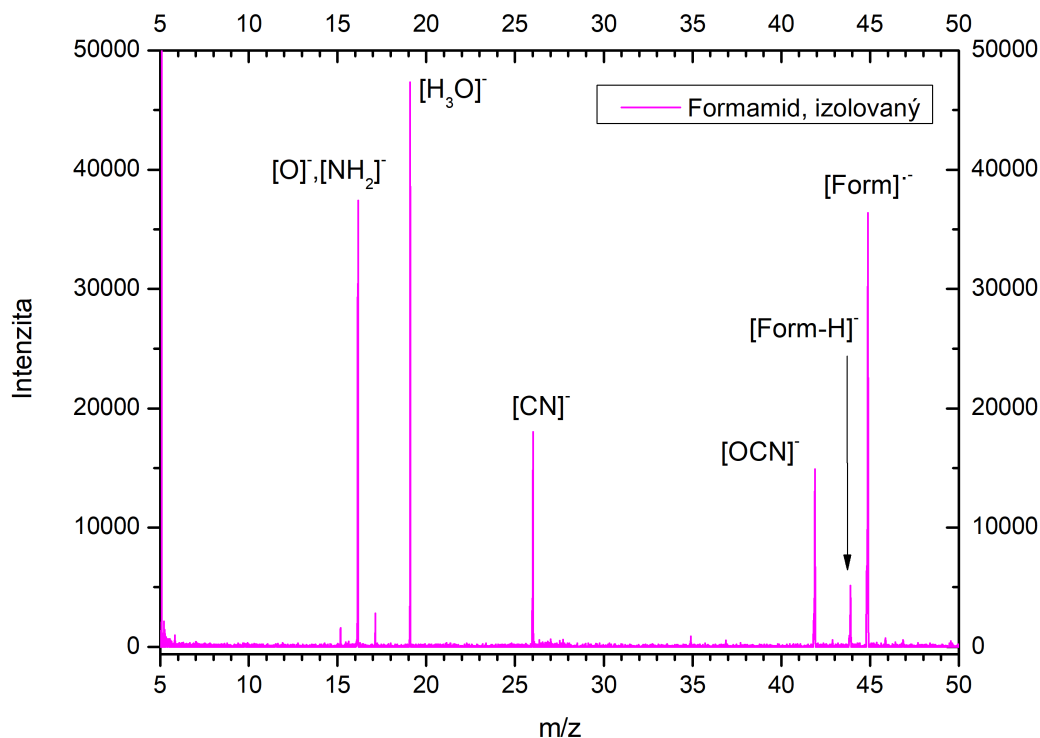
V této části budou rovněž diskutovány a porovnávány výsledky měření pro izolovaný formamid a formamid v hydratované formě s daty získanými skupinou P. Scheiera [67] z měření formamidu v plynném stavu. Také jsou zde uvedena energetická spektra na obrázcích 3.9 a 3.10 pro vybrané anionty pocházející z izolované molekuly formamidu získaná námi a experimentální skupinou v Innsbrucku a energetické spektrum iontu o hmotě 44 Da z nehydratované molekuly formamidu ve formě klastrů. Energetická spektra dokládají posun energetických rezonancí k vyšším energiím pro formu klastru, zatímco fragmenty z izolované molekuly byly získávány i při nižších energiích elektronů.

Studium DEA na molekulách formamidu v jeho plynné fázi

Nejprve jsme změřili izolovanou molekulu formamidu podléhající reakci DEA.

Graf na obrázku 3.6 představuje naměřené hmotnostní spektrum molekuly formamidu (fialově), v jeho izolované formě, podrobené reakci disociativního elektronového záchytu při měření napouštěním par formamidu do reakční komory experimentálního zařízení CLUB za teploty 50 - 60 °C. V tomto grafu lze vidět tři nejintenzivnější píky. Jedním z nich je pík pro anionty mateřské molekuly o $m/z = 45$. Dalším intenzivním píkem je $m/z = 16$, odpovídající aniontům kyslíku O^- a amidu NH_2^- . Detail pro tyto dva píky je zachycen na obr. 2.10. Nejintenzivnějším píkem je pík

pro hmotu 19 Da, který lze určit jako H_3O^- . V pořadí klesajících intenzit pak lze rozlišit píky pro $m/z = 26, 42, 44, 17$ a 15 . Anionty s $m/z = 26$ jsme přiřadili k CN^- , anionty s $m/z = 42$ jsme identifikovali buď jako OCN^- , nebo CNO^- (fulminát) a pík s $m/z = 44$ byl určen jako aniont $[\text{M}-\text{H}]^-$. Dále změřený pík s $m/z = 17$ byl přiřazen aniontu OH^- a pík s $m/z = 15$ pravděpodobně odpovídá aniontu CH_3^- .



Obrázek 3.6: Hmotnostní spektrum s vyznačenými hmotami pro izolovanou molekulu formamidu po interakci s elektronem formou DEA.

Disociativní elektronový záchyt na izolované molekule formamidu studoval T. Hamman a kol. [67]. Motivací zde uvedené experimentální práce s molekulou formamidu byla hypotéza, následkem které byla tato molekula uvažována jako potenciální činidlo pro elektronem indukované reakce na površích. Cílem práce bylo zjistit, jaké zde probíhají nízkoenergetickým elektronem indukované dominantní procesy a zda existuje reakční kanál vedoucí ke vzniku fragmentů se stechiometrií NH_2^- . Výzkum byl proveden ve spolupráci Univerzity Brémy a Univerzity Innsbruck. Předmětem studie byl disociativní záchyt elektronu v intervalu energií 0 - 18 eV na izolované molekule formamidu v plynné fázi. Experimenty byly provedeny pomocí techniky zkřížených elektron-molekulových svazků. Ionty byly detekovány na hmotnostním spektrometru sektorového pole (VG-ZAB) s fokusací druhého řádu a s vysokým rozlišením hmot. Celý napouštěcí systém a komora byly kontinuálně zahřívány na teplotu 55 °C, tlak pro přívod formamidu dosahoval $1,8 \times 10^{-5}$ - 2×10^{-5} mbar. Celý iontový zdroj byl zahříván na teplotu od 210 - 220 °C, čímž chtěli předejít kondenzaci na stěnách reakční komory a čoček. Kalibrace energetické škály přístroje byla

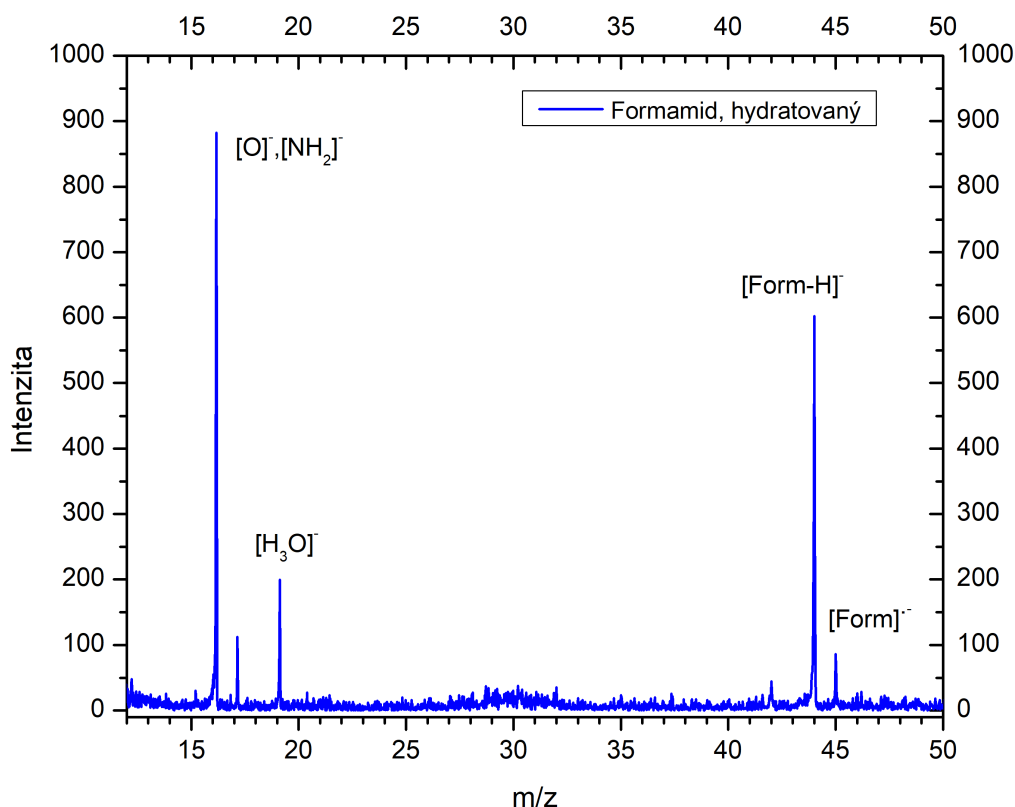
provedena pomocí molekul SF₆. Pro rozlišení rozličných způsobů štěpení vedoucích k totožnému fragmentu byla použita technika deuterace. [67]

Výsledkem jejich měření byla hmotnostní spektra měřená v záporném módu a energetická spektra pro vybrané anionty s energetickým rozsahem 0 - 18 eV. Ve změřených hmotnostních spektrech pro anionty pozorovali píky s významnou intenzitou pro hmoty: 26 Da (CN⁻), 42 Da (OCN⁻), 44 Da ([M-H]⁻), 1 Da (H⁻) a 16 Da (O⁻, NH₂⁻). V některých případech jedna hmota přiřazená k jednomu sumárnímu vzorci vede k různým strukturním vzorcům, což může být způsobeno reorganizací skeletu formamidu během disociace. K tomu však z termodynamického hlediska dochází pouze při vyšších energiích elektronů. V jejich práci byli schopni odlišit fragmenty O⁻ a NH₂⁻ o hmotě 16 Da pomocí deuterace a měřením hmotnostního spektra s vysokým rozlišením. Z energetických spekter, např. pro hmoty 42, 44 a 45 Da, lze pozorovat rezonance mezi 2 - 2,6 eV, 6,5 - 6,9 eV a mezi 11,3 - 12 eV. Pro hmotu 16 Da lze v grafu pro energetickou závislost elektronů pozorovat maximum při 5,5 eV. Pro hmotu 29 Da je maximum rezonance v oblasti 5,2 eV. DEA na molekule formamidu vedoucí ke vzniku aniontů tak zjevně probíhá prostřednictvím alespoň 3 různých rezonancí. Nejintenzivnějším píkem byl ten přiřazený aniontu CN⁻ na hmotě 26 Da. Vznik takového aniontu by ale musel být doprovázen rozsáhlou vazebnou přeargancí. Tento jev je v práci vysvětlován možnou dekompozicí formamidu ve zdroji iontů. Tepelná dekompozice formamidu je dobře známá a dochází k ní při teplotách od 210 °C. Jejimi možnými produkty jsou NH₃ s CO nebo dvojice molekul HCN a H₂O. Nicméně ani jedna z uvedených dvou možností v případě jejich měření zřejmě nenastala. Ačkoliv druhý z uvedených případů byl částečně podpořen detekcí aniontu kyslíku O⁻ s rezonancí v maximu při 6,5 eV, další dvě charakteristické rezonance při 8,5 a 11,8 eV pro tento aniont vzniklý z molekuly H₂O už namereny nebyly. [67] bylo nalezeno pouze první maximum. Vysvětlení spočívá v tom, že detekovaná hmota 16 Da není aniontem kyslíku O⁻ z H₂O, ale naopak aniontem NH₂⁻. Tento iont ale nevznikl tepelným rozkladem z molekuly amoniaku NH₃, neboť nebyla kromě rezonance při 5,6 eV pozorována zároveň další charakteristická rezonance pro tento děj při 10 eV. Tepelná dekompozice formamidu byla v jejich práci vzhledem k výsledkům vyloučena. Vznik aniontu CN⁻ při nízké energii elektronů za přeuspořádání vazeb byl pozorován i u jiných molekul např. valinu, acetonitrilu, acetamidu, apod. [67] a je způsobena vysokou elektronovou afinitou CN (3,862 eV, [62]).

Závěrem práce T. Hammana a kol. [67], která je zaměřena na elektronem indukované reakce na površích, jsou následující pozorování. Při energiích elektronů 2 eV, 6,5 eV a 7 eV se formují anionty CN⁻, a OCN⁻ a HCONH⁻ o hmotách 26, 42 a 44 Da. Aniont NH₂⁻ může vzniknout až v sekundárním procesu následujícím proces aktivace či rekombinace, při kterém dojde k odtržení vodíkového radikálu H· a ke vzniku aniontu CONH₂⁻. Dále bylo ukázáno, že disociace vazby C-H nastává v horizontu energií elektronů od 6 do 8 eV a naopak k disociaci vazby N-H dochází v oblasti nejnižších rezonancí [67]. Existuje předpoklad, že podobné rezonance by mohly způsobovat poškození peptidové vazby nízkenergetickými elektrony [40]. V našich měřeních s izolovanou molekulou formamidu jsme v porovnání s daty z Innsbrucku detekovali všechny výše uvedené hmoty a dále jsme pozorovali další intenzivní píky pro hmoty 19 Da a 45 Da, které jsme přiřadili k iontům H₃O⁻ a [M]⁻.

Disociativní elektronový záchyt na molekule formamidu v hydratovaném prostředí

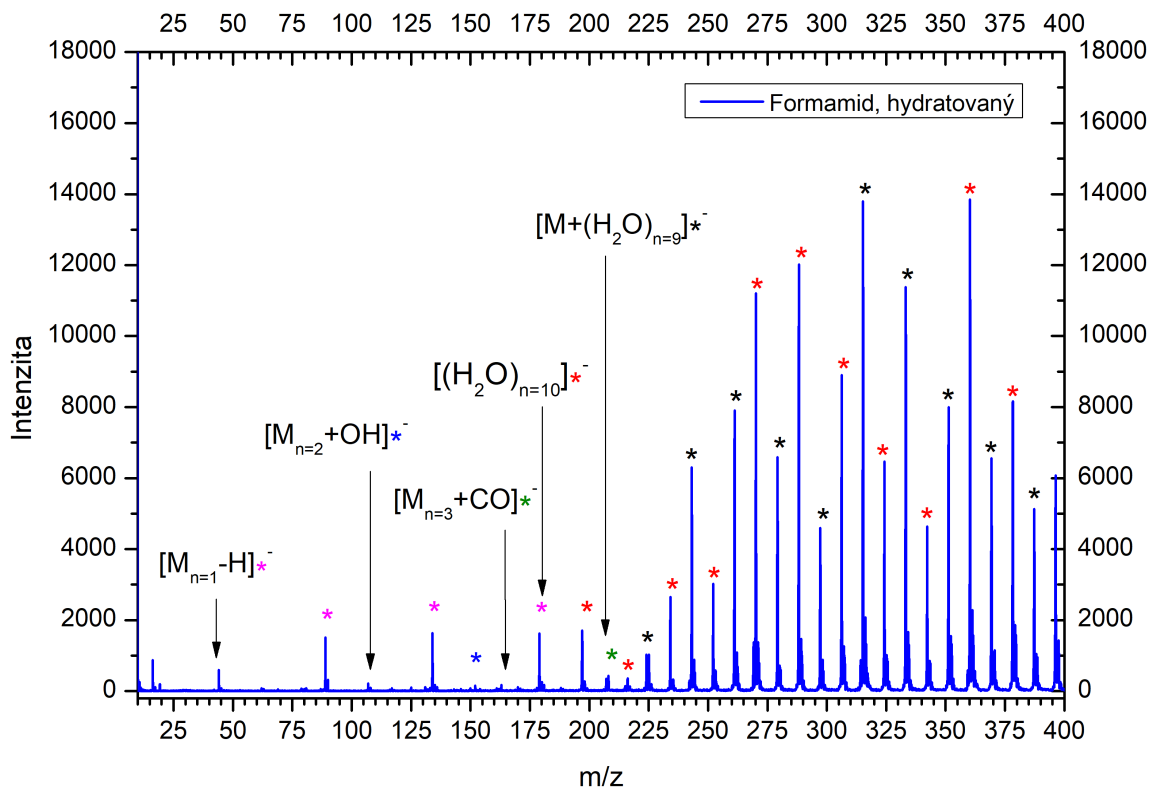
Po měření molekuly v izolované formě jsme provedli experiment i pro molekulu v hydratovaném prostředí.



Obrázek 3.7: Hmotnostní spektrum pro hydratovaný formamid po interakci s elektronem formou DEA, detailní přiblížení do $m/z = 50$.

Na grafu na obrázku 3.7 je vykreslen detail hmotnostního spektra hydratovaného formamidu (modře) podléhajícího reakci DEA. Tento detail spektra umožňuje porovnání rozdílů ve změřených hmotnostních spektrech pro hydratovaný a nehydratovaný formamid. Celé hmotnostní spektrum lze pak vidět na obrázku 3.8. Na přiblíženém hmotnostním spektru zobrazeném do $m/z = 50$, lze pozorovat 6 detekovaných píků, z toho dva o vyšších intenzitách. Ve směru klesající intenzity změřených píků vidíme nejdříve pík o hmotě 16 Da, který jsme určili jako aniont kyslíku O^- nebo amidu NH_2^- . Dále si lze povšimnout rovněž intenzivního píku s poměrem $m/z = 44$, který byl přiřazen aniontu $[M-H]^-$. Další změřené píky už nenabývají takových intenzit. Pík o hmotě 19 Da jsme identifikovali jako aniont H_3O^- . Záporný iont o $m/z = 17$ jsme určili jako hydroxylový aniont OH^- . Píky o hmotách 45, resp. 42 Da jsme určili jako píky pro aniont mateřské molekuly formamidu, resp. pro aniont OCN^- nebo

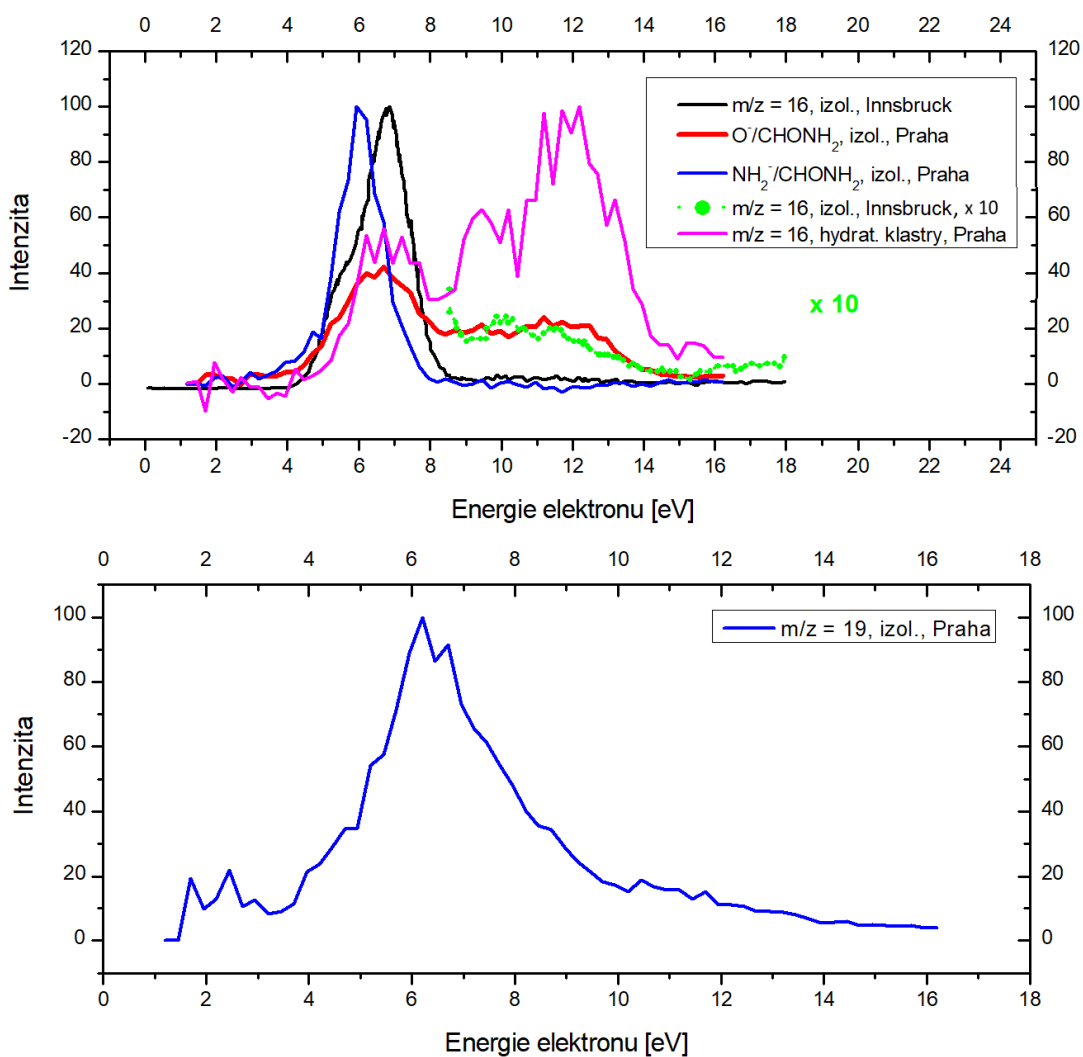
CNO^- (fulminát). Aniont CNO^- je známý a stabilní iont, ačkoliv v tomto případě by jeho vzniku musel zřejmě předcházet přesmyk v molekule formamidu. Naopak ze znalosti struktury formamidu by šlo předpokládat, že snáze bude vznikat aniont OCN^- .



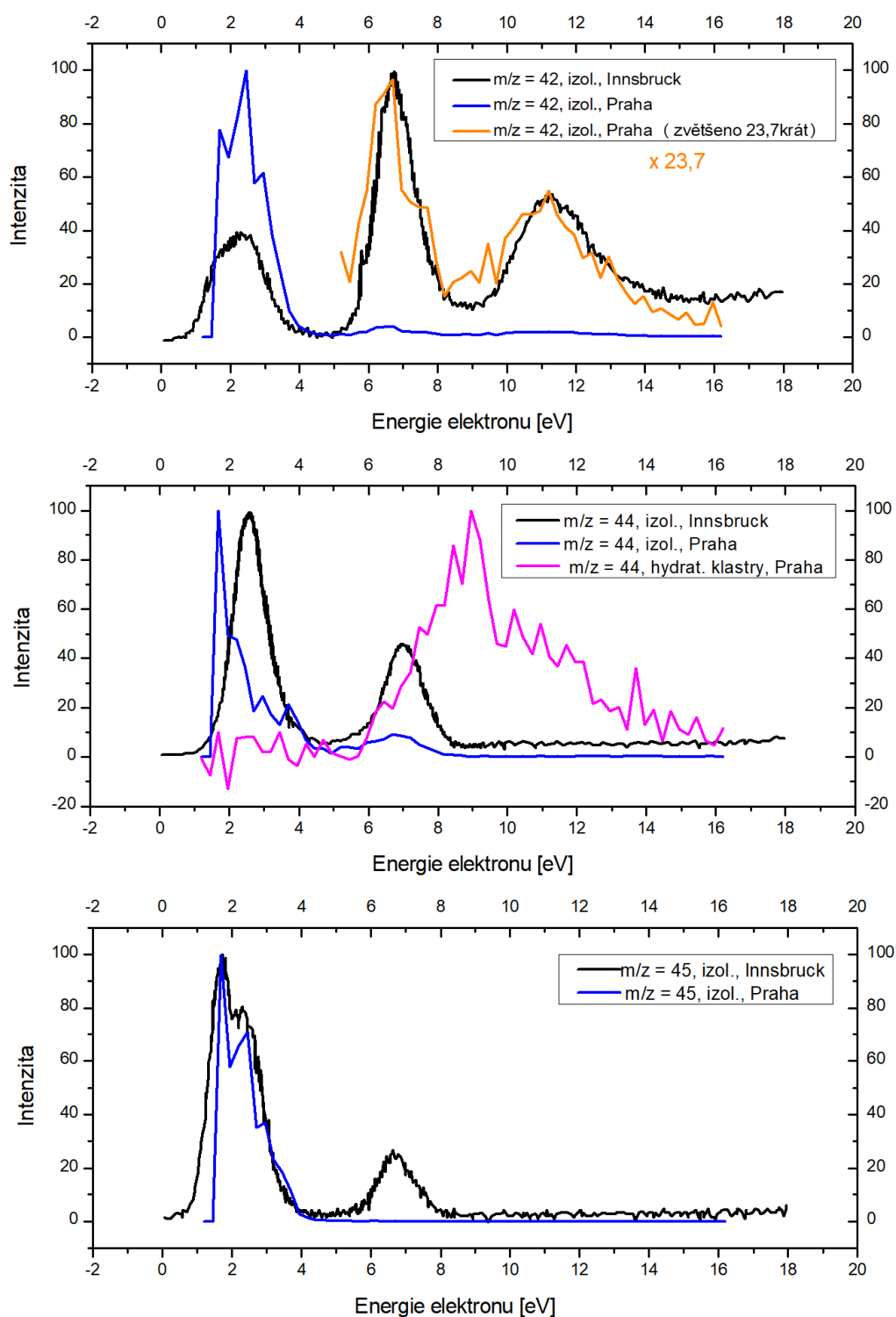
Obrázek 3.8: Hmotnostní spektrum pro hydratovaný formamid po interakci s elektronem formou DEA.

Na grafu na obrázku 3.8 jsou (modře) vyneseny intenzity iontů s poměrem m/z vzniklé jako produkty reakce DEA na hydratované molekule formamidu za tlaku Ne 1,5 bar a za teploty 107 °C. V tomto spektru si můžeme povšimnout nejintenzivnějších píků v oblasti vyšších hmot, které představují vodní klastry formamidu a čisté vodní klastry. Ve směru rostoucích hmot jsme detekovali píky pro hmoty 89 Da, 134 Da a 179 Da, které jsme určili jako anionty $[\text{M}_2\text{-H}]^-$, $[\text{M}_3\text{-H}]^-$ a $[\text{M}_4\text{-H}]^-$, lišící se o molekulu formamidu a tvořící řadu (vyznačenou růžovou hvězdičkou) počínající hmotou 44 Da. Hmoty 107 Da a 152 Da by mohly představovat dvojici iontů $[\text{M}_2\text{-H}+\text{H}_2\text{O}]^-$ a $[\text{M}_3\text{-H}+\text{H}_2\text{O}]^-$, lišící se opět o molekulu formamidu. Tato řada je vyznačena modrou hvězdičkou. Píky $m/z = 163$ a 208 by mohly odpovídat aniontům $[\text{M}_3+\text{CO}]^-$ a $[\text{M}_4+\text{CO}]^-$ a jsou označeny zelenou hvězdičkou. Pík s $m/z = 180$ představuje intenzitu vzniklého aniontu $[\text{M}_4]^-$ nebo klastru čisté vody $[\text{H}_2\text{O}]^-$ (řada označena červenou hvězdičkou) a společně s molekulami vody tvoří další ionty a klastry reprezentované píky $m/z = 198, 216, 234, 252, 270, \dots$ Píky $m/z = 207, 225, 243, 261$ a další odpovídají řadě, jejíž členy se liší o molekulu vody (černá hvězdička).

Řada začíná hmotou 207 reprezentující aniont $[M+(H_2O)_9]^-$. V hydratovaném prostředí jsme nezměřili mateřský iont, pouze jeho deprotonovanou formu. Naproti tomu anionty mateřské molekuly s navázanou vodou mají charakter $[M+(H_2O)_n]^-$.



Obrázek 3.9: Relativní intenzity aniontů s vybranými hodnotami $m/z = 16$ (nahore) a $m/z = 19$ (dole) jako funkce energie elektronů naměřené s rTOF v Praze (modře a červeně). Energetická závislost pro hmotu 16 Da byla rovněž porovnána i s daty z experimentu z Innsbrucku (černě) [67] a v tomto případě lze v červené křivce rozpoznat energetické rezonance pro aniont kyslíku O^- z molekuly formamidu. Modrá křivka je pro aniont NH_2^- , zelená křivka v grafu nahore představuje 10krát znásobené relativní intenzity pro hmotu 16 Da (černě) změřené v Innsbrucku. Růžová křivka v grafu nahore zobrazuje energetickou závislost pro hmotu 16 Da a nehydratované klastry měřené v Praze. Ostatní zde uvedené závislosti jsou pak pro izolovanou molekulu. [67]



Obrázek 3.10: Relativní intenzity aniontů s vybranými hodnotami $m/z = 42$ (nahore), $m/z = 44$ (uprostřed) a $m/z = 45$ (dole) jako funkce energie elektronů naměřené s rTOF v Praze. Oranžová křivka v grafu nahore představuje 23,7krát znásobené relativní intenzity pro hmotu 42 Da (modře) změřené v Praze. Všechny tři energetické závislosti jsou porovnávány zároveň s energetickými závislostmi z experimentu z Innsbrucku (černě) a zelená křivka prezentuje energetickou závislost pro hmotu 44 Da pro hydratované klastry změřené v Praze. [67]

Iont, který jsme zaznamenali s největší intenzitou u izolované molekuly formamidu byl aniont H_3O^- . Tento iont byl detekován jak v případě izolovaného formamidu, tak v případě jeho klastrové formy podléhající reakci DEA, nicméně tam už jeho intenzita byla mnohem nižší. V práci T. Hammana však tento aniont nefiguje [67]. V grafu na obr. 3.9 dole lze vidět energetickou závislost hmoty 19 Da pro případ měření na izolované molekule formamidu. Maximum rezonance lze nalézt při cca 6,5 eV.

Na obr. 3.9. nahoře vidíme energetické spektrum pro anionty detekované s hmotou 16 Da, korespondující s anionty O^- a NH_2^- . Na základě uvedených energetických závislostí pro tuto hmotu získaných při měření v Praze a v Innsbrucku lze konstatovat, že v případě izolované molekuly vznikaly oba dva ionty s velmi podobnou intenzitou. To je ovšem patrné i z obr. 2.10. V případě hydratovaných klastrů vidíme z profilu energetické závislosti pro hmotu 16 Da podobnost s rezonancemi pro aniont kyslíku vzniklý z izolované molekuly formamidu. Rovněž si lze povšimnout, že s rostoucí hydratací je posun a nárůst rezonancí ve směru k vyšším energiím.

Anionty s $m/z = 26$ byly změřeny pouze na izolované formě a to jak u nás, tak v Innsbrucku. Vznik tohoto iontu z izolované molekuly valinu [64], acetamidu [68], formamidu [67] a dalších byl pozorován již dříve a jeho vznik je dán přeuspořádáním vazeb. Aniont s $m/z = 42$ je více dominantní pro hmotnostní spektrum izolované molekuly než pro hmotnostní spektrum molekuly formamidu ve formě klastrů, kde je jeho intenzita téměř zanedbatelná. V energetických spektrech panuje vysoká podobnost pro tuto hmotu z izolovaného formamidu měřeného v Praze i v Innsbrucku. Jak je ale pro všechny hmoty patrné, v našem případě jsou rezonance při nízkých energiích <3 eV intenzivnější. Intenzita elektronového svazku je zde při těchto energiích elektronů nízká. To je zřejmě způsobeno mnohem kratším časem pro detekci aniontů v našem experimentu. Naznačuje to, že anionty formované při nízkých energiích mají krátkou dobu života. Energetické spektrum pro hmotu 42 Da lze vidět na obr. 3.10 nahoře. Rozlišujeme tři rezonance. Od 1 - 4 eV, dále od 6 - 8 eV a poslední energetická rezonance se nachází v oblasti mezi 10 až 14 eV. Hmotu 44 Da určená jako aniont mateřské molekuly $[\text{M-H}]^-$ je patrná hlavně v měřeních s formamidem v hydratovaných klastrech, u izolované formy je intenzita mnohem nižší. Pro tuto hmotu rozlišujeme dvě struktury podle místa odtržení H. Jednou z možností je vznik HCONH^- s nízkou energetickou rezonancí kolem 2 eV, kdy dochází k porušení vazby N-H. Naproti tomu může rozkladem vazby C-H vznikat aniont CONH_2^- v oblasti energetických rezonancí od 6 do 8 eV. Námi změřené energetické rezonance pro tuto hmotu jsou na obr. 3.10 uprostřed. Již dříve bylo ukázáno, že vodík může být odštěpen z hydroxylové skupiny, a to je prezentováno rezonancí kolem 1 eV. [69] U hydratovaných klastrů první rezonanci nepozorujeme a druhá rezonance se nachází v mnohem širším intervalu energií (od 6 - 16 eV) s maximem kolem 9 eV. Dalším rozdílem v měřeních představuje pík pro hmotu 45 Da $[\text{M}]^-$, který je v experimentech s izolovanou molekulou velmi intenzivní na rozdíl od měření s hydratovanou molekulou. V grafu na obrázku 3.10 dole jsou vykresleny jeho energetické závislosti pro izolovaný formamid měřený v Praze a v Innsbrucku. Námi změřené energetické závislosti se pro hmotu 45 Da od energetických závislostí těžší hmoty změřených v Innsbrucku liší chybějící rezonancí s maximem na 6,4 eV.

Hmotnostní spektrum pro DEA na formamidu v klastrech navíc obsahuje dehydrogenované, záporně nabitě asociáty pro 2, 3 a 4 molekuly formamidu a jejich hydratované formy s posloupností lišící se o molekulu vody.

Obecně lze říci, že izolovaný formamid vytváří radikál-anionty, zatímco u formamidu ve formě klastrů je podporováno odtržení vodíku z mateřské molekuly. Izolovaná forma podporuje vznik ko-fragmentů H_3O^- a CN^- . U klastrové formy je detekce těchto iontů vůči sobě úměrně nekolikanásobně nižší. Naše energetická spektra pro uvedené ionty vzniklé z izolovaného formamidu víceméně kopírovala energetická spektra pro tytéž ionty z izolovaného formamidu měřeného v Innsbrucku. Z energetického spektra pro hmotu 16 Da na obr. 3.9 a tvaru píků by bylo možné odvodit, že při měření v Innsbrucku detekovali mnohem více aniontů amidu NH_2^- než aniontů kyslíku O^- . Jedním z možných vysvětlení by mohla být tepelná dekompozice. Tuto možnost podporuje i současná detekce iontu CN^- . Nicméně nemusí tomu tak vůbec být, neboť nadbytek změřeného NH_2^- vůči O^- lze také vysvětlit typem použitého hmotnostního analyzátoru. V Innsbrucku byl používán sektorový hmotnostní spektrometr, u kterého je zásadní na jakou hmotu je v průběhu měření energetického spektra nastaven. Z jejich uvedené naměřené energetické závislosti pro hmotu 16 Da tak lze soudit, že změřený soubor signálů se blížil hmotě 16 Da pro aniont NH_2^- . Pro klastrovou formu formamidu byl pozorován posun rezonancí spíše k vyšším energiím elektronů a nárůst rezonancí při vyšších energiích.

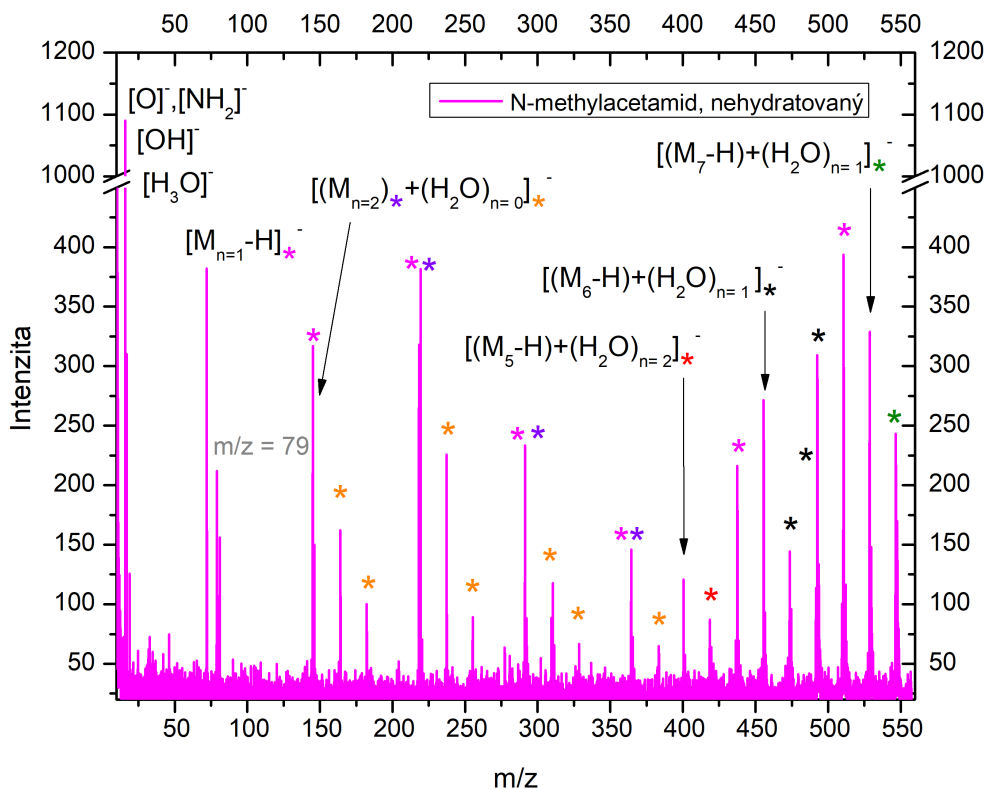
3.4 N-methylacetamid

Poslední sloučeninou studovanou byl N-methylacetamid. Získali jsme dvě hmotnostní spektra v negativním módu pro klastry s různým stupněm hydratace uvedená na obrázcích 3.11, 3.12 a 3.13 s rozmezím energií elektronů od 0 - 15 eV. Získaná data budou vzájemně v této kapitole porovnávána, částečně i s výsledky pro tvorbu klastrů N-methylacetamidu získanými v Japonsku [70].

DEA na molekule N-methylacetamidu v hydratovaném a nehydratovaném prostředí

Prvním výstupem z našich měření je hmotnostní spektrum na obr. 3.11 pro N-methylacetamid ve formě klastru s menším zastoupením molekul vody podléhající reakci DEA. Pro nižší m/z vidíme píky s $m/z = 16, 17$ a 19 , které jsme přiřadili k iontům kyslíku O^- nebo amidu NH_2^- pro $m/z = 16$, hydroxylovému aniontu OH^- pro $m/z = 17$ a aniontu H_3O^- pro $m/z = 19$. Dále jsme detekovali nepříliš intenzivní ionty v oblasti 32 - 46 Da. Hmotě 35 Da jsme přiřadili záporný iont $H_3O_2^-$. Dalšími málo intenzivními píky jsou ty pro hmoty 42 Da a 46 Da. Pík s $m/z = 42$ byl přiřazen iontu $C_2H_4N^-$. Píky o $m/z = 32, 33$ a 46 pocházely z pozadí, neboť byl předtím v aparatuře měřen thiofenol. Píky jsme v pořadí přiřadili aniontům S^- , SH^- a NO_2^- . Pík 72 Dapatrii dehydrogenované mateřské molekule $[M-H]^-$. Vzniklé klastry mateřské molekuly ochuzené o jeden vodík tvoří řadu označenou růžově. Řada se skládá z následujících fragmentů o $m/z = 145 [M_2-H]^-$, $218 [M_3-H]^-$, $291 [M_4-H]^-$, $364 [M_5-H]^-$, $437 [M_6-H]^-$, $510 [M_7-H]^-$. V hmotnostním spektru lze dále pozorovat řadu z píků o $m/z = 146 [M_2]^-$, $219 [M_3]^-$, $292 [M_4]^-$, $365 [M_5]^-$ (označeno fialovou hvězdičkou). Oranžovou hvězdičkou označené píky představují klastry vody s nejbližším klastrem N-methylacetamidu. Vidíme řadu počínající hmotou 146 Da $[(M_{m=1})+(H_2O_{n=0})]^-$, kdy v jednom případě roste pouze počet mateřských molekul m a pro každý z těchto případů pak existuje ještě podřada, kdy roste i počet molekul vody n . Zaznamenané tedy řady $146 [(M_2)]^-$, $164 [(M_{m=2})+(H_2O)]^-$, $182 [(M_{m=2})+(H_2O)_2]^-$, apod. Červeně, černě a zeleně jsou znázorněny tři řady. V každé z nich se klastry liší o molekulu vody H_2O a řady začínají píky o $m/z = 400 [(M_5-H)+(H_2O)_2]^-$, $455 [(M_6-H)+(H_2O)]^-$ a $528 [(M_7-H)+(H_2O)]^-$.

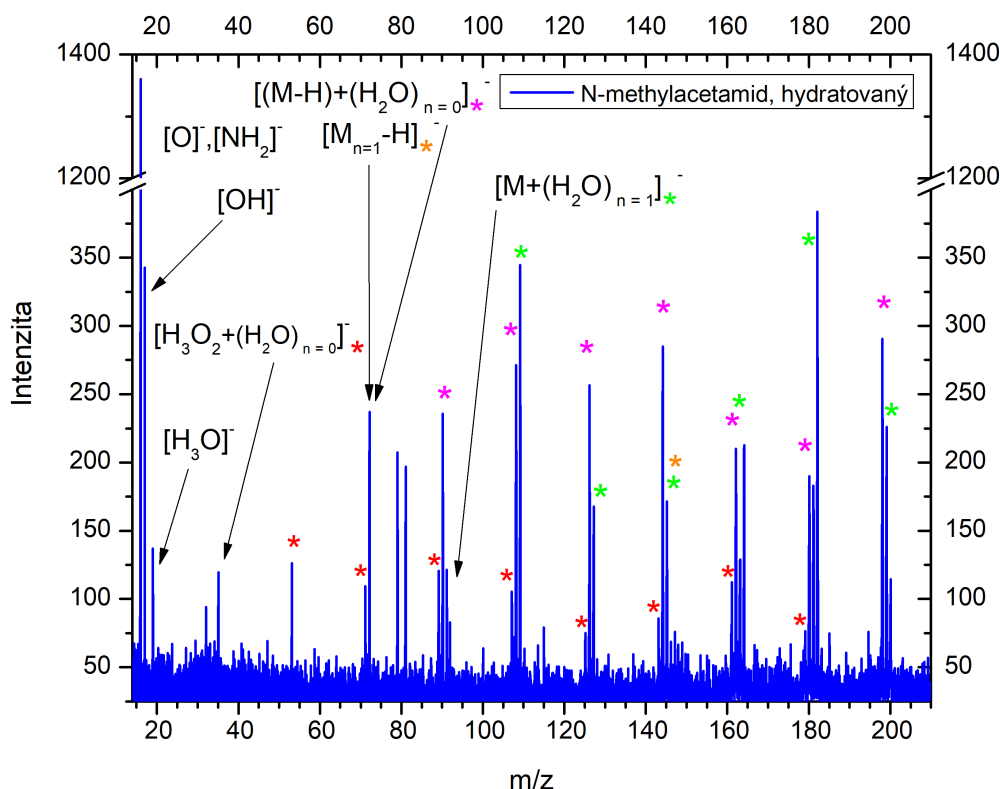
Druhým výstupem z měření bylo hmotnostní spektrum pro hydratovaný N-methylacetamid ve formě klastrů. Hmotnostní spektrum je pro větší přehlednost rozděleno do dvou grafů na obrázcích 3.12 ($m/z = 10 - 210$) a 3.13 ($m/z = 200 - 425$). V grafu na obrázku 3.12, stejně jako v předchozím diskutovaném grafu na obrázku 3.11, nalezneme píky o $m/z = 16, 17$ a 19 . Z pozadí jsme naměřili hmotu o $m/z = 32$ odpovídající iontu S^- . Anionty o hmotě 35 Da, naměřené i pro nehydratovaný N-methylacetamid ve formě klastrů jsou $H_3O_2^-$. Naopak nově tu lze detekovat hmotu 53 Da, která by mohla být aniontem $[H_3O_2+H_2O]^-$ a dále se vyvíjí v řadu lišící se o jednotku molekuly vody ve směru hmot o $m/z = 71, 89, 107, 125, 143, 161$ a 179 . Dále jsme detekovali jsme pík 72 Da. Tento představuje deprotonovanou mateřskou molekulu $[M-H]^-$, která je počátkem řady, v níž se její členové liší o hmotu mateřské molekuly. Řada pokračuje píky o $m/z = 145$ a 218 (viz graf na obr. 3.13)



Obrázek 3.11: Hmotnostní spektrum pro nehydratovaný N-methylacetamid ve formě klastru po interakci s elektronem formou DEA.

a je označena oranžovou hvězdičkou. Další řada je označena růžovou hvězdičkou a začíná rovněž hmotou 72 Da, jedná se o iont $[(M-H)+(H_2O)_0]^-$ a řada pokračuje dalšími členy lišícími se o násobky molekul vody. Řada pokračuje hmotami 90 Da, 108 Da, 126 Da, 144 Da, a dalšími. Vzhledem k tomu, že tato řada obsahuje molekulu vody až od hmoty 90 Da, nepředpokládáme, že by hmota 90 Da mohla představovat klastry čisté vody. Navíc již v předchozím hmotnostním spektru na obr. 3.11 jsme se setkali s řadou $[(M-H)+(H_2O)_0]^-$. Předposlední řada je totožná s poslední uvedenou. Začíná hmotou 91 Da, přiřazenou k aniontu $[M+(H_2O)_1]^-$ a vyvíjí se ve směru hmot o $m/z = 109, 127, 145$, apod. Je označena zelenou hvězdičkou. Hmotnostní spektrum pokračuje v grafu na obrázku 3.13. V této části spektra s hmotami od 200 do 425 Da vidíme konečné píky pro řady znázorněné růžovou a oranžovou hvězdičkou a pokračující řadu označenou zelenou hvězdičkou. Vidíme zde řadu klastrů čistých vod počínající hmotou 252 Da $[(H_2O)_{14}]^-$. Řada dále postupuje hmotami o $m/z = 270, 288$, atd. a je označena modrou hvězdičkou.

Elektronovému záchytu na klastrech molekuly N-methylacetamidu se ve své práci věnovali Toshihiko Maeyama a Naohiko Mikami z Tohoku University v Japonsku, výsledky práce publikovali roku 2004 [70]. V jejich experimentech byl mimo jiné zkoumán vznik negativně nabitých klastrů sloučeniny N-methylacetamidu vhněním pomalých elektronů do oblasti supersonické expanze. Tato sloučenina sloužila

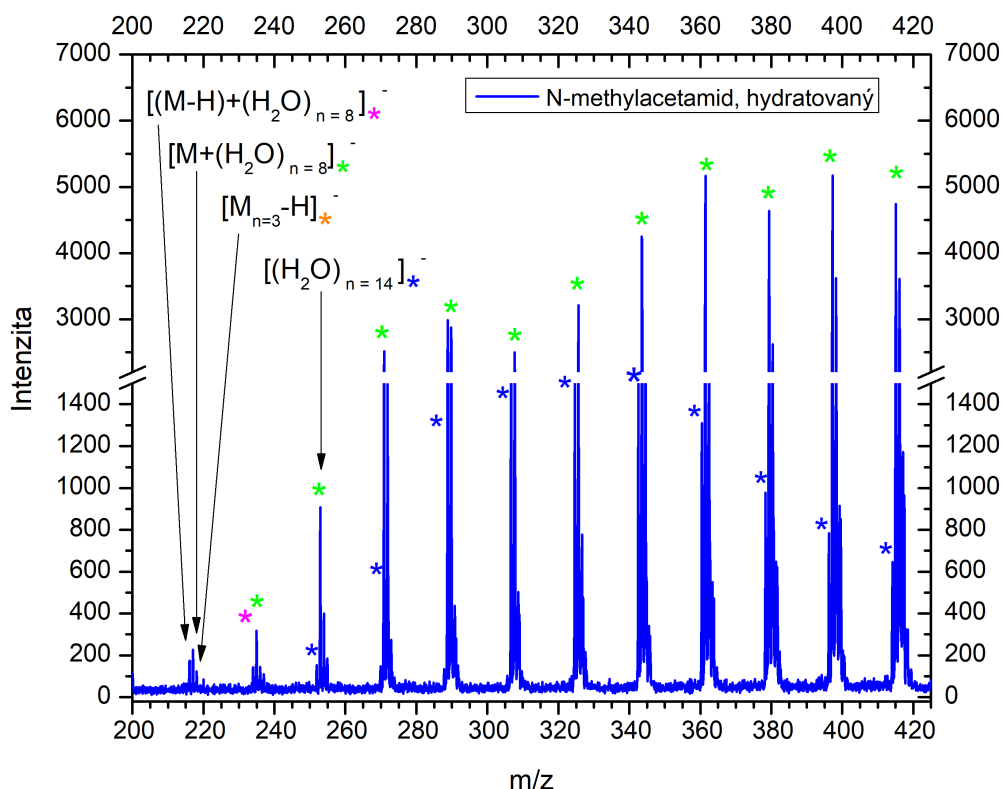


Obrázek 3.12: Hmotnostní spektrum pro hydratovaný N-methylacetamid ve formě klastru po interakci s elektronem formou DEA pro $m/z = 10 - 200$.

jako reprezentativní sloučenina pro modelování silového pole v proteinech. Výsledky měření z infračervené a Ramannovy spektroskopie provedené na této molekule vedly k názoru, že N-methylacetamid v aprotických rozpouštědlech tvoří vodíkové vazby $\text{NH}\dots\text{O}=\text{C}$ s analogií struktury krystalů. [70].

V jejich experimentu byly páry vzorku s Ne za tlaku 5 atm vpraveny do vakuové komory pomocí supersonické expanze přes pulsní ventil pracující s frekvencí 10 Hz. Tryska se vzorkem byla vyhřívána na teplotu 100 °C. Nízkoenergetické elektrony vznikaly fotoemisí ze Zr a následně byly termalizovány srážkami s Ne. Růst klastrů byl po elektronovém záchytu podpořen několikanásobnými srážkami v oblasti supersonické expanze.

V práci prezentují hmotnostní spektrum NMA v rozsahu od monomeru až po klastry s maximálním počtem 25 molekul NMA. Ve spektru nepozorovali monomer. To je možné vysvětlit absencí elektronů s velmi nízkou energií. Elektronová afinita NMA je nízká (přibližně 0,015 eV [70]) a doba života aniontů vzniklých při vyšších energiích bude krátká. Absenci elektronů s nízkou energií napovídá i celkový tvar spektra, výrazně strukturovaný s výrazným nárůstem signálu pro $n > 6$. Taková struktura spektra byla již v minulosti pozorována např. pro vodní klastry připravované podobnou metodou [71], [72] a opět souvisí s krátkou dobou života vytvořených klastrů.



Obrázek 3.13: Hmotnostní spektrum pro hydratovaný N-methylacetamid ve formě klastru po interakci s elektronem formou DEA.

Ve spektrech NMA z našich experimentů vidíme jak monomer, tak i menší klastry. Je to způsobené tím, že dokážeme do reakčního prostoru dodat více elektronů s nízkou energií a rovněž tím, že TOF detektor je v našich experimentech mnohem kratší. Zatímco v experimentu provedeném v Japonsku byly doby letu pro $(\text{NMA})_n^-$, kde $n = 2$ a $n = 7$, 42 a 78 μs , v našem případě byly doby letu jen 14 a 26 μs . Detekovali jsme tak i ionty s mnohem kratší dobou života, a proto taky naše spektrum není výrazně strukturované. Stále jsou ale v našem spektru intenzivnější signály klastrů s vyšším n - právě kvůli jejich vyšší stabilitě.

Zajímavý je fakt, že navzdory měření homogenních klastrů NMA, byly v Japonském experimentu pozorovány i adukty s molekulou vody. Ty byly pozorovány jen pro $n > 6$ a zřejmě vznikaly z důvodu malého množství vody v nosném plynu. V práci nejsou blíže diskutovány.

Na základě podrobné analýzy spekter v našem experimentu vidíme, že adukty pro $n > 6$ mají charakter $[(M_n-H)+(H_2O)_n]$, zatímco adukty pro $n \leq 6$ mají charakter $[M+(H_2O)_n]$. Za výraznou stabilizací klastrů pro $n > 6$ tak může být změna struktury NMA. V úvahu přichází keto-enol tautomerie. Disociace vodíku z OH skupiny je efektivní již za nízkých energií elektronů, zatímco NH_2 skupina disociuje ve formě NH_2^- aniontu.

Klastr zformovaný interakcí konjugované báze NMA s neutrální molekulou NMA je velice stabilní [73], což směřuje k dalšímu možnému vysvětlení. V případě, že by exotermicita reakce aniontu s neutrální molekulou rostla s velikostí klastru, mohlo by při nižším počtu molekul docházet k zachycení vodíku v klastru, přičemž pro větší klastry by docházelo k jeho disociaci.

Změřili jsme molekulu N-methylacetamidu při dvou stupních hydratace. V obou případech jsme detekovali pík pro hmotu 72 Da, konkrétně pro aniont mateřské molekuly, který byl při měření nehydratované molekuly jedním z nejintenzivnějších píků, zatímco v rámci měření molekuly v hydratovaném prostředí dosahoval pík mnohonásobně nižších intenzit. Důležité je zjištění, že adukty NMA s n molekulami vody, kdy $n \leq 6$ mají tvar $[M+(H_2O)_n]$. Když je $n > 6$, mají charakter $[(M-H)+(H_2O)_n]$. To může být způsobeno tautomerií NMA z keto formy do enolové formy, ke které dochází vlivem prostředí [70].

Závěrečná diskuze

V této práci byla studována reakce disociativního záhytu elektronů nízkých energií na dvou aminokyselinách L-cysteinu a L-valinu a na dvou amidech formamidu a N-methylacetamidu.

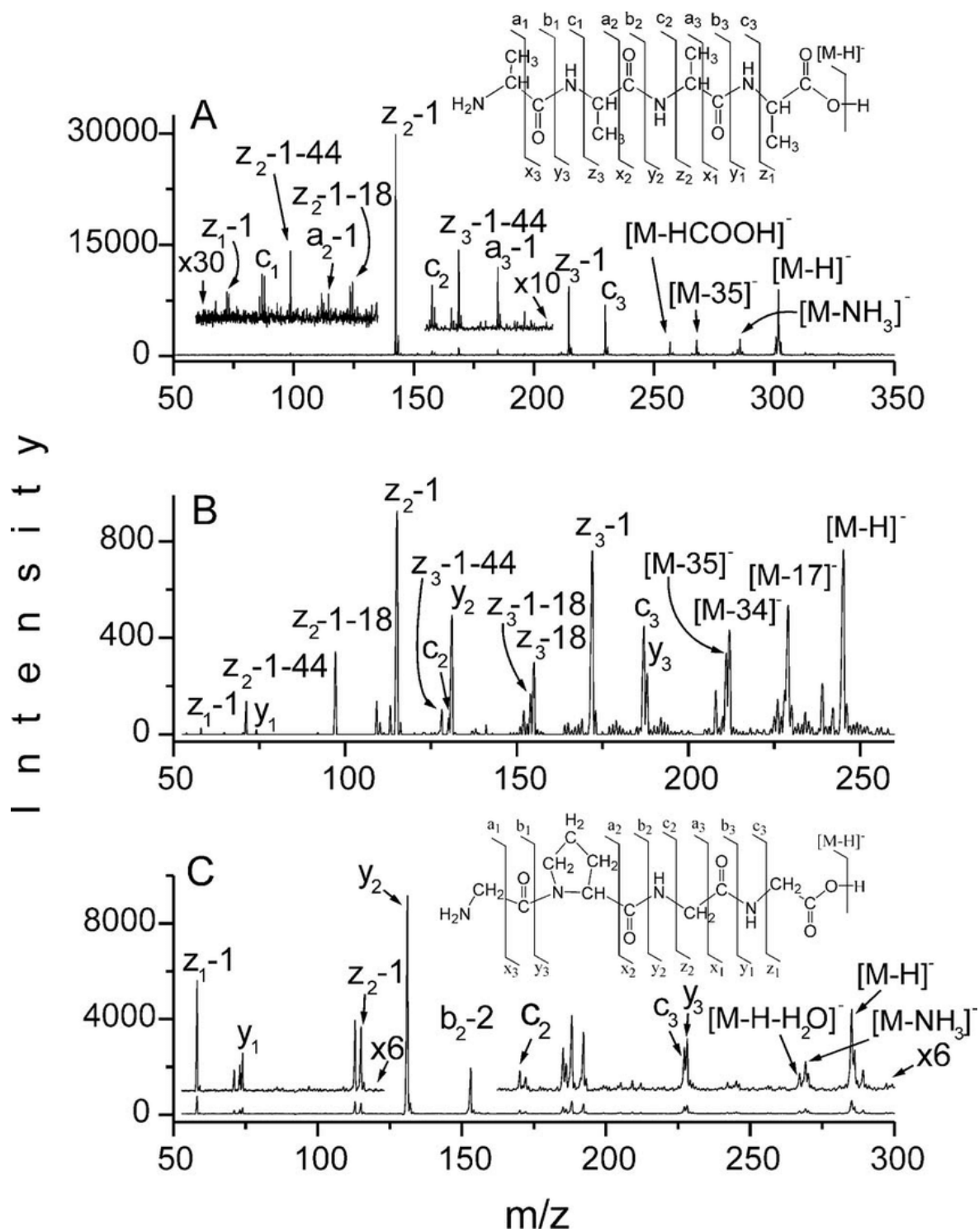
Naše měření pro izolovanou molekulu potvrzují předchozí zjištění, že při nízkých energiích elektronů < 3 eV je primární DEA reakcí deprotonace za vzniku $[M-H]^-$. Tento reakční kanál byl pozorován také pro jednoduché peptidy [74]. Vzniklý volný vodíkový atom má důležitou roli ve fragmentaci malých peptidů po DEA [75]. V prostředí buňky po ozáření pak mohou vodíkové atomy, vzniklé reakcí DEA na aminokyselinách a peptidech, vstupovat i do dalších reakcí. [76]

Dalšími důležitými fragmenty, které jsme pozorovali při nízkých energiích elektronů jsou fragmenty NH_2^- . U aminokyselin s thiolovou skupinou jsou navíc intenzivní i vysoce reaktivní fragmenty SH^- a S^- , což bylo přepokládáno. V případě aminokyseliny valinu naopak vznikaly fragmenty OH^- a CN^- .

Také byl pozorován obecný vliv prostředí na strukturu studovaných molekul a jejich následné štěpení. Ve vodném prostředí dochází k poklesu až potlačení fragmentace. Ukázali jsme, že valin disociuje jen při velmi nízké hydrataci. V případě měření cysteinu tomu tak není, neboť pozorujeme hydratované fragmenty. To ale také mohlo být s největší pravděpodobností způsobeno tepelnou dekompozicí. S rostoucí hydratací se zvyšuje intenzita vzniklých klastrů s vodou. A nejvyšší hydratace vede ke zcela úplnému potlačení veškeré fragmentace. Samotný aniont cysteinu se nám nepodařilo naměřit. Molekula je citlivá na teplotu a podléhá tepelné dekompozici za teploty nižší než 216 °C, která je uvedena v literatuře [61].

Měření amidů formamidu a N-methylacetamidu, jakožto jednoduchých modelových sloučenin pro peptidovou vazbu, vedla k následujícím závěrům: stejně jako v případě aminokyselin, i amidy podléhají reakci DEA za působení nízkoenergetických elektronů vedoucí ke změně jejich struktury a k disociaci vazeb. Izolovaná forma formamidu ve studii pro reakci DEA silně podporovala vznik radikálového aniontu mateřské molekuly $[M]^-$, H_3O^- a CN^- , CNO^-/OCN^- . Pro případ tepelného rozkladu byly (v případě formamidu) předpokládány dva možné kanály rozpadu: NH_3 a CO , nebo HCN a H_2O . V našem případě velmi pravděpodobně nedošlo k tepelnému rozkladu žádným z těchto dvou kanálů. Nebyly pozorovány rezonance pro NH_2^-/NH_3 při 5,5 eV a 10 eV, ani rezonance pro O^-/O při 10 eV. Byl však pozorován zánik vazby $CONH$, která je pro peptidy charakteristická, přímo přes reakci DEA. Nehydratované klastry podporovaly vznik aniontů $CONH_2^-$ či OCN^- v případě formamidu, zde můžeme hovořit o porušení amidové vazby. V případě N-methylacetamidu docházelo ke vzniku H_3O^- , jehož intenzita s rostoucí hydratací

klesá. Nicméně v našich experimentech vznikaly s velkou intenzitou i anionty O^- vedle aniontů NH_2^- a aniont mateřské molekuly $[M-H]^-$. Hydratované klastry obecně naopak posouvaly energetické rezonance k vyšším energiím, tlumily vznik aniontu mateřské molekuly $[M-H]^-$ a ostatních fragmentů a dávaly vzniknout klastrům s vodou o velkých intenzitách.



Obrázek 4.1: Názorná ukázka značení pro rozpad polypeptidu tetraglycinu [75].

Jaký je ale přínos našich experimentů s modelovými molekulami v kontextu poškození peptidů sekundárními elektrony? DEA na peptidy byl studován např. v pracích M. V. Muftakhova [77] a B. Puschnigga [74]. Příklad standardního značení pro disociaci polypeptidů je na obr. 4.1. V jejich práci věnované elektronovému záchytu na dialaninu a metyldialaninu byl pozorován vznik následujících fragmentů: $[M-H]^-$, $[M-COOH]^-$, $[M-HCOOH]^-$, O^- , NH_2^- a OH^- [74]. Výsledky našich experimentů poukazují na to, že fragmentace je při nízkých energiích potlačena a naopak nebudou vznikat ionty $[M-H]^-$, NH_2^- a OH^- . Také je možné, že dojde k výraznému poklesu fragmentace spojené s vodíkovým přesmykem. Ten je spojen s tvorbou

M-H

$^-$ z jednotlivých stavebních prvků. Pro valin pozorujeme vznik tohoto aniontu při nízké hydrataci a uzavření reakčního kanálu při vyšší hydrataci. V případě amidů tento ion vzniká při nižších i při vyšších energiích, přičemž v okolí rezonance při vyšší energii narůstá jeho intenzita. Proto lze předpokládat, že procesy probíhající při vyšších energiích budou důležité. Další studie prokázaly, že pro fragmentaci peptidového základního řetězce postačují energie elektronů v rozsahu 1 až 2 eV. [75] V práci M. V. Muftakhova a P. V. Schunkina [77] byl diskutován vznik $[M-COOH]^-$ z Gly-Ala a Ala-Ala, který pro samotné izolované aminokyseliny není typický. Nicméně tento proces vzniku záleží na několika faktorech. Například se jedná o počet aktivních vibračních stupňů volnosti rozpadajícího se iontu, kterými může akumulovat svoji vnitřní energii. [77] V případě aniontu ve vodném prostředí může být tato energie efektivně redistribuována mezi molekuly vody [78]. Mnohem významnější úlohu v poškození peptidů nízkoenergetickými elektrony budou hrát Feshbachovy rezonance v oblasti peptidové vazby, spíše než nízkoenergetické rezonance aminokyselin.

Závěr

V této diplomové práci jsem se seznámila se základními interakcemi nízkoenergetických elektronů s biomolekulami z pohledu radiační chemie. V teoretické části jsem se krátce věnovala vlivu ionizujícího záření na hmotu. Poté jsem se zaměřila na radiolýzu proteinů, peptidů a aminokyselin. Dále jsem popsala vznik a vlastnosti sekundárních elektronů a s nimi související disociativní záchyt elektronu. Blíže jsem vysvětlila motivaci pro výběr studovaných aminokyselin L-cysteinu, L-valinu a amidů formamidu a N-methylacetamidu a popsala jejich fyzikálně chemické vlastnosti. Také jsem se seznámila s již provedenými experimenty zaměřenými na disociativní elektronový záchyt na těchto molekulách.

V rámci experimentální části této práce jsem provedla vlastní experimentální studii založenou na disociativním záchytu nízkoenergetických elektronů na molekulách L-cysteinu, L-valinu a na amidech formamidu a N-methylacetamidu za různých experimentálních podmínek. Molekuly byly měřeny metodou elektronové záchytové spektroskopie v jejich klastrové formě v hydratovaném, či nehydratovaném prostředí a byl zkoumán vliv prostředí na reakci. Experimenty jsem uskutečnila v Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR. Získané výsledky prezentuji v této práci.

Přínosem této práce jsou získaná hmotnostní spektra a vybrané účinné průřezy pro reakci disociativního elektronového záchytu na molekulách L-cysteinu, L-valinu, formamidu a N-methylacetamidu za různých experimentálních podmínek (tlak, ne/vodné prostředí).

Z měření provedených pro každý typ molekul jsme získali čtyři zajímavá pozorování. Vznik aniontu $[M-H]^-$ z molekuly valinu závisí na počtu molekul vody v jeho okolí. Možným vysvětlením této závislosti je transformace molekuly valinu na zwitterionovou formu. Také bylo zjištěno, že molekula cysteinu je velmi senzitivní na teplotu, a proto jí nebylo možné studovat naší metodou. Nicméně vezmeme-li v úvahu fyzikální procesy po ozáření, je pravděpodobné, že námi detekované vzniklé anionty mohou vznikat i v reálném prostředí. Dalším zjištěním byl fakt, že klastry s molekulou formamidu mají vždy tvar $[M-H]^-$, zatímco hydratované klastry zaujímají pouze tvar $[M+(H_2O)_n]^-$. Poslední měřenou byla molekula N-methylacetamidu. Klastry této sloučeniny $[M_n]^-$ jsou s molekulami vody stabilní jen pro $n \leq 6$. Při vyšších n se klastry methylacetamidu s vodou vyskytují ve formě $[M_n-H]^-$. Stabilizace může být dána keto-enol tautomerií, anebo klastrováním konjugované báze methylacetamidu s neutrální molekulou N-methylacetamidu.

Literatura

- [1] B. Sedmidubská, *Interakce nízkoenergetických elektronů s izolovanými a hydratovanými aminokyselinami*. FJFI ČVUT v Praze, 2019, výzkumný úkol.
- [2] E. Surdutovich and A. V. Solov'yov, "Multiscale approach to the physics of radiation damage with ions," *The European Physical Journal D*, vol. 68, no. 11, p. 353, 11 2014.
- [3] A. Mozumder, *Fundamentals of Radiation Chemistry*. Academic Press, 1999, první vydání.
- [4] V. Můčka, *Aplikace radiačních metod*. Vydavatelství ČVUT, 2003, nové vydání.
- [5] V. Ullmann, [cit. 13.1.2018]. [Online]. Available: <http://astronuklfyzika.cz/RadiacniUcinky1.gif>
- [6] E. L. Alpen, *Radiation Biophysics*. Academic Press, 1998, druhé vydání.
- [7] T. Alper, *Cellular Radiobiology*. New York: Cambridge University Press, 1979.
- [8] O. H. Wheeler, "Radiolysis of peptides and proteins," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 7, pp. 675 – 681, 01 2008.
- [9] M. G Simic, "Radiation chemistry of amino acids and peptides in aqueous solutions," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 26, pp. 6–14, 01 1978.
- [10] J. Haines, N. Bansal, J. Qian, W. Zhao, and C. Furdai, "Effects of ionizing radiation on biological molecules—mechanisms of damage and emerging methods of detection," *Antioxidants & redox signaling*, vol. 21, 07 2014.
- [11] W. M. Garrison, "Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins," *Chemical Reviews*, vol. 87, 04 1987.
- [12] E. Stadtman, "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 62, p. 797–821, 1993.
- [13] C. L. van Emmerik and H. Van Ingen, "Unspinning chromatin: Revealing the dynamic nucleosome landscape by nmr," *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, vol. 110, 02 2019.
- [14] M. Kodíček, O. Valentová, and R. Hynek, *BIOCHEMIE*. VŠCHT Praha, 2015, první vydání.

- [15] F. Cataldo, P. Ragni, S. Iglesias-Groth, and A. Manchado, "Solid state radiolysis of sulphur-containing amino acids: Cysteine, cystine and methionine," *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 287, pp. 573–580, 02 2011.
- [16] K. Zhigang, Q. Huang, B. Dang, L. Yilin, H. Yuan, S. Zhang, and Z. Yu, "A study of low-energy ion induced radiolysis of thiol-containing amino acid cysteine in the solid and aqueous solution states," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol. 268, pp. 2729–2734, 09 2010.
- [17] H. Makada and W. Garrison, "Radiolytic oxidation of peptide derivatives of glycine in aqueous solution," *Radiation Research*, vol. 50, pp. 48–55, 05 1972.
- [18] W. Garrison, M. Jayko, M. Rodgers, H. Sokol, and W. Bennett-Corniea, "Ionization and excitation in peptide radiolysis," *Adv. Chem.*, vol. 81, 01 1968.
- [19] W. Bennett-Corniea, H. Sokol, and W. Garrison, "Reductive deamination in the radiolysis of oligopeptides in aqueous solution and in the solid state." 01 1970.
- [20] F. Liu, S. Lai, H. Tong, P. Lakey, M. Shiraiwa, M. G. Weller, U. Pöschl, and C. Kampf, "Release of free amino acids upon oxidation of peptides and proteins by hydroxyl radicals," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 409, 01 2017.
- [21] C. Chatgialloglu, C. Ferreri, A. Torreggiani, A. M. Salzano, G. Renzone, and A. Scaloni, "Radiation-induced reductive modifications of sulfur-containing amino acids within peptides and proteins," *Journal of Proteomics*, vol. 74, pp. 2264–73, 03 2011.
- [22] K. S. Ambe and A. L. Tappel, "Oxidative damage to amino acids, peptides and protein by radiation," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 26, p. 448–451, 07 1961.
- [23] K. J. A. Davies, M. E Delsignore, and S. W Lin, "Protein damage and degradation by oxygen radicals. ii. modification of amino acids," *The Journal of biological chemistry*, vol. 262, pp. 9902–7, 08 1987.
- [24] M. J. Davies, "Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 305, no. 3, pp. 761 – 770, 2003.
- [25] L. K. Mee and S. J. Adelstein, "Radiation damage to histone H2A by the primary aqueous radicals," *Radiation Research*, 04 1987.
- [26] M. Dingfelder, A. Travia, R. A. McLawhorn, J. L. Shinpaugh, and L. H. Toburen, "Electron emission from foils and biological materials after proton impact." *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 77, pp. 1213–1217, 11 2008.
- [27] S. Pimblott and J. A. LaVerne, "Production of low-energy electrons by ionizing radiation," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 76, pp. 1244–1247, 09 2007.

- [28] E. Alizadeh and L. Sanche, “Precursors of solvated electrons in radiobiological physics and chemistry,” *Chemical Reviews*, vol. 112, 11 2012.
- [29] E. Merzbacher, “Quantum mechanics,” *SERBIULA (sistema Librum 2.0)*, 06 2019.
- [30] C. Cohen-Tannoudji, B. Diu, and F. Laloe, “Quantum mechanics,” *Quantum Mechanics*, vol. 1, p. 898, 06 1986.
- [31] A. Kumar, J. A. Walker, D. M. Bartels, and M. D. Sevilla, “A simple ab initio model for the hydrated electron that matches experiment,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 119, no. 34, pp. 9148–9159, 2015.
- [32] J. Fedor, P. Cicman, B. Coupier, S. Feil, M. Winkler, K. Gluch, J. Husarik, D. Jaksch, B. Farizon, N. Mason, P. Scheier, and T. Märk, “Fragmentation of transient water anions following low-energy electron capture by H₂O/D₂O,” *Journal of Physics B Atomic Molecular and Optical Physics*, vol. 39, p. 3935–3944, 09 2006.
- [33] F. H. Martin, P. D. Burrow, Z. Cai, P. Cloutier, D. J. Hunting, and L. Sanche, “DNA strand breaks induced by 0 - 4 eV electrons: the role of shape resonances.” *Physical review letters*, vol. 93 6, p. 068101, 08 2004.
- [34] B. Boudaïffa, “Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons,” *Science*, vol. 287, pp. 1658–1660, 03 2000.
- [35] H. Abdoul-Carime and L. Sanche, “Alteration of protein constituents induced by low-energy (< 40 eV) electrons. III. the aliphatic amino acids,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, 12 2003.
- [36] Sigma-Aldrich, formamide, [cit. 3.3.2020]. [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure9/194/mfcd00007941.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00007941-large.png
- [37] Sigma-Aldrich, N-methylacetamide, [cit. 3.3.2020]. [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure5/064/mfcd00008683.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00008683-large.png
- [38] Sigma-Aldrich, L-valine, [cit. 11.6.2019]. [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure8/129/mfcd00064220.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00064220-large.png
- [39] Sigma-Aldrich, L-cysteine, [cit. 11.6.2019]. [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure9/059/mfcd00064306.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00064306-medium.png
- [40] Z. Li, M. Ryszka, M. Dawley, I. Carmichael, K. Bravaya, and S. Ptasinska, “Dipole-supported electronic resonances mediate electron-induced amide bond cleavage,” *Physical Review Letters*, vol. 122, 02 2019.

- [41] J. Fedor, “Comment on “dipole-supported electronic resonances mediate electron-induced amide bond cleavage”,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 124, p. 199301, 05 2020.
- [42] NIST, [cit. 21.3.2020]. [Online]. Available: https://physics.nist.gov/cgi-bin/Compositions/stand_alone.pl
- [43] D. Whitford, *Proteins: Structure and Function*, 01 2005.
- [44] R. A McPherson and G. Hardy, “Clinical and nutritional benefits of cysteine-enriched protein supplements,” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 14, pp. 562–8, 11 2011.
- [45] W. Dröge, “Cysteine and glutathione deficiency in aids patients: A rationale for the treatment with n-acetyl-cysteine,” *Pharmacology*, vol. 46, pp. 61–5, 02 1993.
- [46] Y. Kaneko, Y. Kimura, H. Kimura, and I. Niki, “L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic β -cell: Possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter,” *Diabetes*, vol. 55, pp. 1391–7, 06 2006.
- [47] A. Mattoo and S. David, “Cystinuria,” *Seminars in Nephrology*, vol. 28, no. 2, pp. 181–191, 2008.
- [48] P. Blackburn, J. Gass, F. Vairo, K. M Farnham, H. K Atwal, S. Macklin, E. Klee, and P. Atwal, “Maple syrup urine disease: Mechanisms and management,” *The Application of Clinical Genetics*, vol. Volume 10, pp. 57–66, 09 2017.
- [49] G. Ganzit, S. Benzio, M. Filippa, B. Goitre, B. Severin, and C. Gribaudo, “Effects of oral branched-chain amino acids supplementation in bodybuilders,” *Medicina dello Sport*, vol. 50, pp. 293–303, 09 1997.
- [50] I. Arrieta-Cruz, Y. Su, and R. Gutierrez-Juarez, “Suppression of endogenous glucose production by isoleucine and valine and impact of diet composition,” *Nutrients*, vol. 8, p. 79, 02 2016.
- [51] E. Roberts, S. Frankel, and P. J. Harman, “Amino acids of nervous tissue,” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, vol. 74, pp. 383–7, 07 1950.
- [52] R. Gupta, “Amino acids in pathological gambling and in its alleviation: Pharmacological approaches,” *The Open Addiction Journal*, vol. 3, pp. 9–23, 01 2010.
- [53] IFA, [cit. 21.3.2020]. [Online]. Available: [http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/033650.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/033650.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0)
- [54] C. Sadhu, S. Dutta, and K. Gopinathan, “Influence of formamide on the thermal stability of DNA,” *Journal of Biosciences*, vol. 6, pp. 817–821, 12 1984.

- [55] R. Saladino, C. Crestini, S. Pino, G. Costanzo, and E. D. Mauro, “Formamide and the origin of life,” *Physics of Life Reviews*, vol. 9, no. 1, pp. 84–104, 03 2012.
- [56] M. Ferus, D. Nesvorný, J. Sponer, P. Kubelík, R. Bruhova Michalcikova, V. Shestivska, J. Sponer, and S. Civiš, “High-energy chemistry of formamide: A unified mechanism of nucleobase formation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, 12 2014.
- [57] IFA, [cit. 21.3.2020]. [Online]. Available: [http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/033650.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/033650.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0)
- [58] R. Dressler and M. Allan, “Energy partitioning in the O^-/CO_2 dissociative attachment,” *Chemical Physics*, vol. 92, pp. 449–455, 01 1985.
- [59] M. Allan, “Study of triplet states and short-lived negative ions by means of electron impact spectroscopy,” *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, vol. 48, pp. 219–351, 09 1989.
- [60] A. Stamatovic and G. J. Schulz, “Characteristics of the trochoidal electron monochromator,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 41, pp. 423 – 427, 04 1970.
- [61] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, and E. Illenberger, “Conversion of amino-acids by electrons at subexcitation energies,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 6, 01 2004.
- [62] NIST, [cit. 25.4.2020]. [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov>
- [63] P. Cannington and N. S. Ham, “The photoelectron spectra of amino-acids : A survey,” *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, vol. 15, no. 1, pp. 79 – 82, 1979, the International Journal on Theoretical and Experimental Aspects of Electron Spectroscopy.
- [64] P. Papp, J. Urban, S. Matejcik, M. Stano, and O. Ingólfsson, “Dissociative electron attachment to gas phase valine: A combined experimental and theoretical study,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 125, p. 204301, 12 2006.
- [65] J.-Y. Kim, D.-S. Ahn, S.-W. Park, and S. Lee, “Gas phase hydration of amino acids and dipeptides: Effects on the relative stability of zwitterion vs. canonical conformers,” *RSC Advances*, vol. 4, p. 16352, 04 2014.
- [66] J. Kočíšek, P. Papp, P. Mach, Y. Vasil’ev, M. Deinzer, and S. Matejcik, “Resonance electron capture by serine,” *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 114, pp. 1677–1683, 01 2010.
- [67] T. Hamann, A. Edtbauer, F. Ferreira da Silva, S. Denifl, P. Scheier, and P. Swiderek, “Dissociative electron attachment to gas-phase formamide,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, pp. 12305–13, 07 2011.

- [68] C. Koenig-Lehmann, J. Kopyra, I. Dabkowska, J. Kočíšek, and E. Illenberger, “Excision of cn and ocn from acetamide and some amide derivatives triggered by low energy electrons,” *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, vol. 10, pp. 6954–61, 01 2009.
- [69] H. D. Flosadóttir, S. Denifl, F. Zappa, N. Wendt, A. Mauracher, A. Bacher, H. Jonsson, T. Märk, P. Scheier, and O. Ingólfsson, “Combined experimental and theoretical study on the nature and the metastable decay pathways of the amino acid ion fragment $(M-H)^-$,” *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 46, pp. 8057–9, 10 2007.
- [70] T. Maeyama and N. Mikami, “Characteristic distributions of negatively charged n-monosubstituted amide clusters generated by electron attachment in supersonic expansions,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 6, 05 2004.
- [71] J. Kim, I. Becker, O. Cheshnovsky, and M. A. Johnson, “Photoelectron spectroscopy of the ‘missing’ hydrated electron clusters $(H_2O)_n^-$, $n=3, 5, 8$ and 9 : Isomers and continuity with the dominant clusters $n=6, 7$ and 11 ,” *Chemical Physics Letters*, vol. 297, no. 1, pp. 90 – 96, 1998.
- [72] T. Maeyama, T. Tsumura, A. Fujii, and N. Mikami, “Photodetachment of small water cluster anions in the near-infrared through the visible region,” *Chemical Physics Letters*, vol. 264, no. 3, pp. 292 – 296, 1997.
- [73] NIST, [cit. 26.7.2020]. [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C79163&Units=SI&Mask=40#Ion-Cluster>
- [74] B. Puschnigg, S. E. Huber, M. Probst, K. Tanzer, V. Vizcaino, F. Ferreira da Silva, P. Scheier, P. Limão-Vieira, and S. Denifl, “Electron attachment to the dipeptide dialanine: influence of methylation on site selective dissociation reactions,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, pp. 3834–3840, 2013.
- [75] Y. Vasil’ev, B. Figard, J. Morré, and M. Deinzer, “Fragmentation of peptide negative molecular ions induced by resonance electron capture,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 131, p. 044317, 08 2009.
- [76] O. Mozziconacci, K. Bobrowski, C. Ferreri, and C. Chatgililoglu, “Reactions of hydrogen atoms with met-enkephalin and related peptides,” *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 13, pp. 2029–33, 02 2007.
- [77] M. Muftakhov and P. Shchukin, “Dissociative electron attachment to glycylglycine, glycyl-alanine and alanyl-alanine,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, pp. 4600–6, 03 2011.
- [78] J. Poštulka, P. Slaviček, J. Fedor, M. Fárnik, and J. Kočíšek, “Energy transfer in microhydrated uracil, 5-fluorouracil and 5-bromouracil,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 121, p. 8965–8974, 08 2017.