

**Títol del treball:**

**Predicció de les fragmentacions d'aminoàcids en espectrometria de masses**

---

Estudiant: Yasmina Lakhlifi El Alami  
Correu electrònic: yasminasj994@gmail.com

Grau en Química

Tutor: Pedro Salvador Sedano  
Cotutor\*:  
Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: Pedro Salvador Sedano

Nom del cotutor\*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): pedro.salvador@udg.edu

\*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 25 de maig del 2017

## RESUM

L'espectrometria de masses (MS) és una de les tècniques instrumentals més importants. En el cas de l'espectrometria per ionització d'electrons (MS-EI) les molècules ionitzades pateixen diferents fragmentacions que donen els pics característics de l'espectre. Hi ha dues maneres de predir aquestes senyals: utilitzant regles genèriques o mitjançant càlculs teòrics.

Aquest treball es centra en la predicció de les principals senyals dels espectres, és a dir, fragmentacions esperades d'aminoàcids en estat radical catió amb l'ajut de la descomposició de l'energia molecular. Amb aquest mètode, podem fer càlculs d'estructura electrònica de les espècies neutra i radical catió, però no cal plantejar l'estudi sistemàtic de totes les possibles reaccions unimoleculares de descomposició que pot patir l'espècie ionitzada.

Per tal de fer l'estudi el més complet possible s'han volgut tenir en compte factors que no han estat coberts en els estudis previs similars, com és ampliar el nombre d'aminoàcids a estudiar, fer un estudi conformacional a fons per a cada aminoàcid en les seves formes neutra i radical catió, i tenir en compte tant la relaxació electrònica com la nuclear en les espècies ionitzades.

Els resultats obtinguts son força satisfactoris ja que, a partir de les estructures de mínima energia de les espècies neutra i radical catió de cada aminoàcid s'han pogut predir correctament el pic principal de l'espectre MS-EI en 9 dels 10 casos estudiats.

## RESUMEN

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas instrumentales más importantes. En el caso de la espectrometría por ionización de electrones (MS-EI), las moléculas ionizadas sufren diferentes fragmentaciones que dan los picos característicos del espectro. Hay dos maneras de predecir estas señales: utilizando reglas genéricas o mediante cálculos teóricos.

Este trabajo se centra en la predicción de las principales señales de los espectros, es decir, fragmentaciones esperadas de aminoácidos en estado radical catión con la ayuda de la descomposición de la energía molecular. Con este método, podemos hacer cálculos de estructura electrónica de las especies neutra y radical catión, pero no hay que plantear el estudio sistemático de todas las posibles reacciones unimoleculares de descomposición que puede sufrir la especie ionizada.

Para hacer el estudio lo más completo posible se han querido tener en cuenta factores que no han sido cubiertos en los estudios previos similares, como es ampliar el número de aminoácidos a estudiar, hacer un estudio conformacional a fondo para cada aminoácido en sus formas neutra y radical catión, y tener en cuenta tanto la relajación electrónica como la nuclear en las especies ionizadas.

Los resultados obtenidos sueñan bastante satisfactorios puesto que, a partir de las estructuras de mínima energía de las especies neutra y radical catión de cada aminoácido se han podido predecir correctamente el pico principal del espectro MS-EI en 9 de los 10 casos estudiados.

## **ABSTRACT**

The mass spectrometry (MS) is one of the most important instrumental techniques. In the case of electron ionization spectrometry (MS-EI), the ionized molecules undergo different fragmentations that give the characteristic peaks of the spectrum. There are two ways of predicting these signals: using generic rules or using theoretical calculations.

This work focuses on the prediction of the major signals of the spectra, that is, expected fragmentations of amino acids in the cation radical state, with the help of the so-called molecular energy decomposition schemes. With this method, we can make electronic structure calculations of the neutral and radical cation species, but we do not have to consider the systematic study of all the possible unimolecular decomposition reactions that the ionized species can suffer.

To make the study as complete as possible, we have tried to take into account factors that have not been covered in similar previous studies, such as expanding the number of amino acids to be studied, making a full conformational study for each amino acid in its neutral and radical cation states, and take into account both electronic and nuclear relaxation in ionized species.

The results obtained were quite satisfactory since, from the minimal energy structures of the neutral and cation radical species of each amino acid, the main peak of the MS-EI spectrum was correctly predicted in 9 of the 10 cases studied.

## ÍNDEX

RESUM.....	I
RESUMEN .....	II
ABSTRACT .....	III
ÍNDEX DE -FIGURES .....	V
ÍNDEX DE TAULES .....	VI
ABREVIATURES.....	VII
1. INTRODUCCIÓ .....	1
1.1. L'espectrometria de masses .....	1
1.2. Prediccions de senyals amb mètodes "clàssics" .....	3
1.3. Mètodes de descomposició de l'energia molecular .....	4
1.4. Aplicació a prediccions de l'espectrometria de masses .....	5
2. OBJECTIVES .....	7
3. METODOLOGIA.....	8
3.1. Estudi conformacional .....	8
3.2. Descomposició de l'energia molecular.....	9
3.3. Detalls computacionals.....	10
3.4. Nota sobre sostenibilitat .....	10
4. RESULTATS I DISCUSIÓ. ....	12
4.1. Estudi conformacional .....	12
4.2. Descomposició energètica dels aminoàcids .....	14
4.3. Anàlisi de càrregues parcials dels possibles fragments .....	18
5. CONCLUSIONS .....	19
BIBLIOGRAFIA .....	20

## ÍNDIX DE -FIGURES

<b>Figura 1</b> Esquema d'un espectròmetre de masses amb una font d'ionització per impacte electrònica (EI-MS).....	1
<b>Figura 2</b> Espectre EI-MS per l'Ala ( $M_m=89$ g/mol ). .....	2
<b>Figura 3</b> Possibles reaccions de fragmentació en un MS-EI, on R representa la cadena lateral que depèn de l'aminoàcid. Imatge extreta de la referència 6.....	4
<b>Figura 4</b> Diagrama d'orbitals representant el procés d'ionització sota l'aproximació de Koopmans. ....	6
<b>Figura 5</b> Confòrmers/isòmers possibles per la molècula d'alanina. ....	8
<b>Figura 6</b> Representació esquemàtica de la definició de fragments. R representa la cadena lateral que caracteritza cada aminoàcid. ....	9
<b>Figura 7</b> Representació de la conformació més estable per l'Ala neutra. ....	13
<b>Figura 8</b> Representació de les estructures de mínima energia per la Gln en estat neutre (IVB) i radical catió (IV(+)), on es mostra la transposició del $H_a$ . ....	13
<b>Figura 9</b> Representació de la Glutamina IV(+). El H9 és qui es canvia d'unió i les línies vermelles representa les fragmentacions predites. ....	17

## ÍNDIX DE TAULES

<b>Taula 1</b> Numero de isòmers/confòrmers que es troben dins el criteri energètic considerat per cada aminoàcid (entre parèntesi nombre total d'estructures trobades). En tots casos s'ha començat amb 9 possibles confòrmers excepte pels aminoàcids Gly amb 5 i Tyr amb 18.....	12
<b>Taula 2</b> Isòmer/confòrmer més estable per cada aminoàcid segons l'estat (per la nomenclatura utilitzada, veure fig. 5) .....	12
<b>Taula 3</b> Energies (en unitats atòmiques) d'interacció de cada fragment amb el C $\alpha$ per les estructures neutres de la Gly.....	14
<b>Taula 4</b> Energies (en unitats atòmiques) d'interacció de cada fragment amb el C $\alpha$ per les estructures neutres de la Gly en estat radical catió. ....	14
<b>Taula 5</b> Energies (en unitats atòmiques) d'interacció de cada fragment amb el C $\alpha$ per les estructures radical catió de la Gly.....	14
<b>Taula 6</b> Diferències d'energia d'interacció entre fragments (a.u.) entre estat radical catió i neutre amb diferents metodologies. En negreta s'indica la interacció que ha patit un canvi més gran per cada mètode. ....	15
<b>Taula 7</b> Enllaç que patiria trencament segons l'anàlisi amb diferents metodologies i la dada corresponent experimental.....	15
<b>Taula 8</b> Principals diferències d'energia diatòmiques de la Gln. Càlculs realitzats amb la metodologia MBA.....	16
<b>Taula 9</b> Enllaç que patiria trencament segons l'anàlisi amb diferents metodologies i amb el funcional MPWB1K. Codi de colors: coincideix amb el mètode B3LYP i experimental (negre), no coincideix amb el mètode B3LYP (blau); no coincideix amb l'experimental (vermell); no coincideix ni amb experimental ni amb mètode B3LYP (lila) .....	17
<b>Taula 10</b> Distribució de la càrrega parcial para l'Ala radical catió. ....	18
<b>Taula 11</b> Predicció del fragment carregat a partir de les dades MBA de càrregues parcials .....	19

## ABREVIATURES

<b>DFT</b>	Density Functional theory
<b>EI</b>	Electron Impact
<b>EI-MS</b>	Electron Impact-Mass Spectrometry
<b>ESI</b>	Electrospray Ionization
<b>MALDI</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
<b>MBA</b>	Maxwell-Boltzmann average
<b>RHF</b>	Restricted Hartree-Fock



## 1. INTRODUCCIÓ

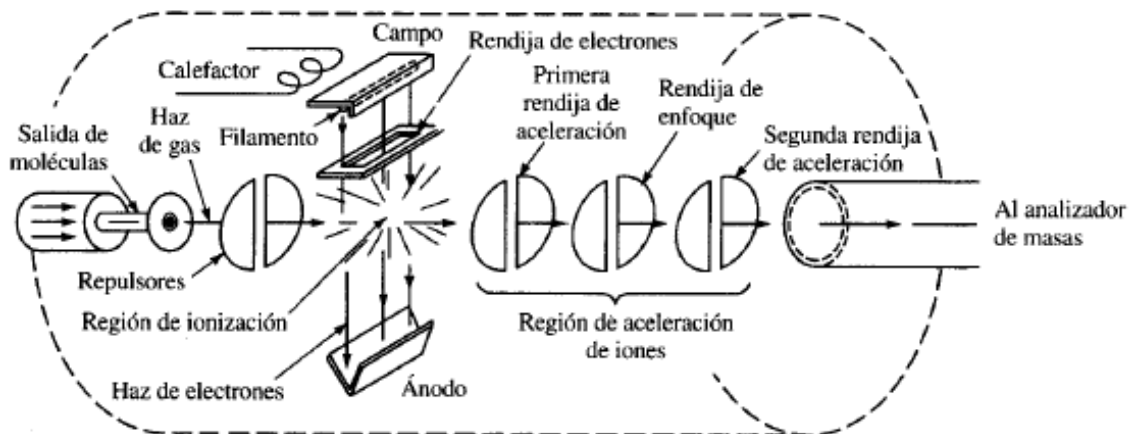
### 1.1. L'espectrometria de masses

L'espectrometria de masses és una tècnica analítica que té una ampla aplicació<sup>1</sup> i això és degut al fet que ens pot proporcionar varietat d'informació com la composició elemental, les estructures de les molècules orgàniques i inorgàniques, composició qualitativa i quantitativa de barreges complexes, relacions isotòpiques d'àtoms en les mostres entre d'altres.

Els tres components bàsics d'un espectròmetre de masses són la font de ionització, on hi ha diferents tipus segons si és per espectròmetre de masses atòmiques o molecular, analitzador de masses i detector d'ions.

Dintre de la font de ionització<sup>2</sup> d'espectres moleculars podem trobar gran varietat, depenen si són de desorció o en fase gasosa. Exemples de desorció trobem ionització per electronebulització (ESI) o desorció assistida per una matriu (MALDI) i en el cas de fase gasosa, trobem ionització química, per impacte d'electrons (EI) i entre d'altres.

El treball es centrarà sobretot en l'espectròmetre de masses amb font d'ionització per impacte electrònic.



**Figura 1** Esquema d'un espectròmetre de masses amb una font d'ionització per impacte electrònic (EI-MS).

A la figura 1 es mostra el diagrama d'una font de ionització per impacte d'electrons. Els electrons són emesos per un filament calent de wolfram o de reni i s'accelera mitjançant un potencial que s'aplica entre el filament i l'ànode. L'anàlit passa per la font i col·lisió contra els electrons, fet que provoca la seva ionització.

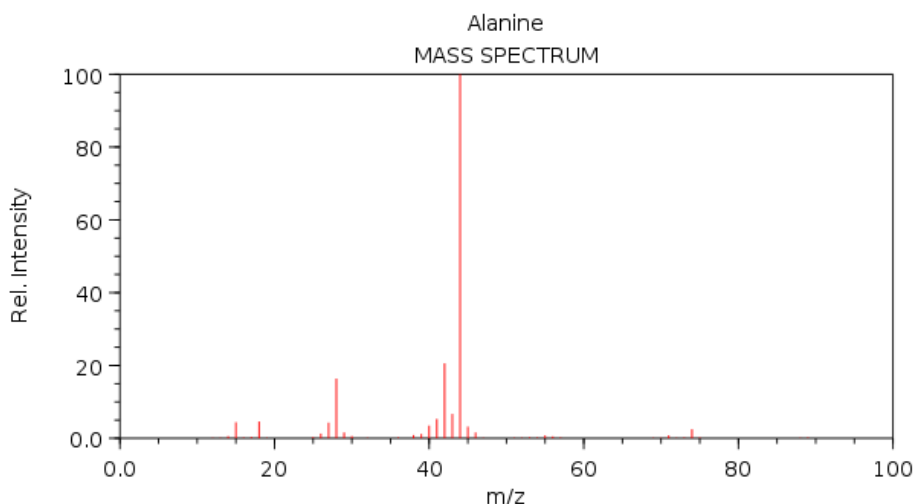
El producte primari són ions d'una única càrrega positiva que es forma quan els electrons d'elevada energia s'apropen el més a prop possible com per causar pèrdues d'electrons per repulsió electrostàtica a les molècules de l'anàlit. Malgrat això, la ionització per impacte d'electrons no és molt eficaç i només una petita part (del ordre d'una molècula entre un milió) experimenta la reacció primària de ionització següent on GX representa la molècula i  $GX^+$  el seu ió molecular:



Aquest ió pot patir fragmentacions simples<sup>3</sup> dintre de les següents possibilitats, depenent de com es produeix el trencament de l'enllaç corresponent (homolític o heterolític) i del nombre d'electrons de cada fragment (parell o imparell)



Després, els ions positius produïts són atrets a través de l'esclatxa cap a la primera placa d'acceleració, mitjançant una petita diferència de potencial que s'aplica entre aquesta placa i les plaques repulsives i així contínuament fins arribar a l'analitzador de masses. El resultat final és una espectre com el que es mostra la figura 2, a on s'indica la massa dels fragments moleculars (estrictament el rati massa càrrega,  $m/z$ ) que han arribat al detector i la seva intensitat relativa.



**Figura 2** Espectre EI-MS per l'Ala (Mm=89 g/mol).

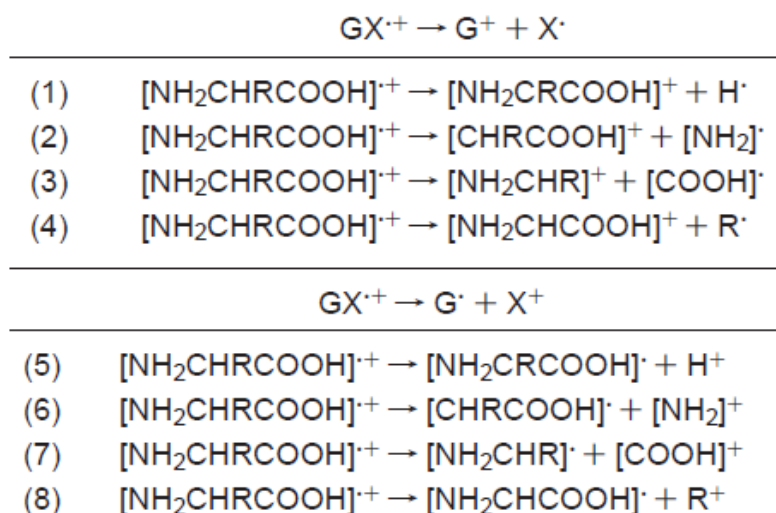
En aquest treball volem predir les senyals, o si més no el pic més intens, d'un EI-MS mitjançant càlculs computacionals d'estructura electrònica. Com que dintre de l'espectròmetre es donen fragmentacions de l'anàlit, a priori caldria tenir en compte totes les possibilitats i calcular teòricament totes les reaccions explicades en l'equació 2 per tots els possibles fragments. Malgrat la complexitat que té aquest mètode, afortunadament, ja se n'han fet alguns estudis que, tot i que no tenen com a objectiu principal la predicció d'espectres MS, si estudien aminoàcids ionitzats i consideren possibles fragmentacions.

### 1.2. Prediccions de senyals amb mètodes "clàssics"

Per arribar a predir les senyals d'un MS es pot fer mitjançant càlculs o sense a partir de la bibliografia. A la mateixa biblioteca trobem taules d'elucidació<sup>4</sup> que sorgeixen a partir d'unes regles de trencament segons el tipus de molècula, és a dir que es pot fer una predicció aproximada coneixent el pes molecular de l'anàlit que es vol determinar.

Per altra banda, es poden fer servir càlculs d'estructura electrònica. L'any 2005, Simon i col·laboradors varen publicar un treball<sup>5</sup> centrat en l'estudi de l'estructura i la fragmentació de quatre aminoàcids (Gly, Ala, Ser i Cys). Els autors inicialment busquen l'isòmer/conformació més estable de cada espècie ionitzada (radical catió), i posteriorment calculen la diferència d'energia interna associada a una colla de possibles descomposicions unimolecular. En concret consideren el trencament de qualsevol enllaç que involucri el carboni alfa (4 possibilitats), i per cadascuna d'elles es plantegen les diferents opcions descrites a l'equació 2. Utilitzen com a mètode de càlcul el funcional B3LYP amb la base 6-31++G(d,p). Així, es necessita calcular l'energia de cada component per l'isòmer més estable, és a dir, de tots els productes i reactius, tal i com es mostra a la figura 2. D'aquesta manera obtenen la variació d'energia interna per cada cas i així arriben a determinar quina reacció és més propensa a que es produeixi, permetent així determinar el pic.

La conclusió a què es va arribar va ser que la pèrdua del COOH• és en general la més favorable. Això si, per aquells aminoàcids amb una cadena lateral més gran, la formació dels fragments R• i R<sup>+</sup> comença a ser competitiva.



**Figura 3** Possibles reaccions de fragmentació en un MS-EI, on R representa la cadena lateral que depèn de l'aminoàcid. Imatge extreta de la referència 4.

L'any 2007, Gil i col·laboradors<sup>6</sup> tornen a fer un estudi similar però ampliant el número d'aminoàcids a estudiar (en aquest cas Gly, Ala, Ser, Cys, Asp, Gln, Phe, Tyr i His) i utilitzant dos funcionals (B3LYP i MPWB1K). A destacar de la publicació és l'estudi a aminoàcids amb R aromàtic ja que presenten competitivitat entre  $R^{\cdot}$  i  $R^{+}$ , per la qual cosa corrobora la conclusió anterior on descrivia que com més gran R més competitiva es torna la reacció de fragmentació que el produeix.

### 1.3. Mètodes de descomposició de l'energia molecular

En general, el resultat més important en càlculs de química quàntica és l'energia total del sistema molecular. Malgrat això, en ser una sola dada no aporta gaire informació química i, per aquesta raó, s'han cercat mètodes que puguin proporcionar més informació. Una opció és la descomposició de l'energia total en contribucions que siguin rellevants des del punt de vista químic, com a exemple serien l'energia dels àtoms dins de la molècula i les interaccions entre parells d'àtoms.

L'any 2001, Salvador i col·laboradors<sup>7</sup> van proposar un esquema de descomposició de l'energia total d'una molècula, on aquesta s'escriu de manera exacta en contribucions atòmiques ( $E_A$ ) i diatòmiques ( $E_{AB}$ )

$$E = \sum_A E_A + \sum_{A,B < A} E_{AB} \quad (3)$$

Les contribucions atòmiques tenen en compte l'energia efectiva de cada àtom dins la molècula, en canvi els termes de diatòmic descriu les interaccions

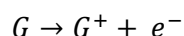
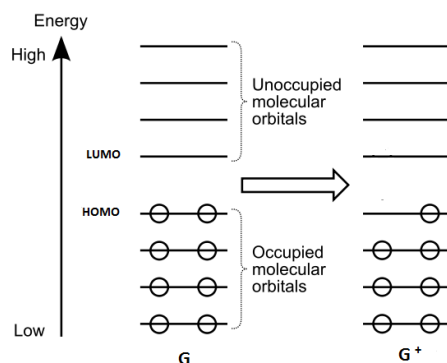
atractives/repulsives entre el parell d'àtoms, que són responsables de la estabilitat de la molècula. Per dur a terme la descomposició és necessari aplicar una partició de l'espai 3D en dominis atòmics, és a dir, cal introduir una definició de l'àtom dins de la molècula. Una altra possibilitat és considerar en la descomposició grups funcionals o fragments moleculars, i per tant obtenir l'energia total de la molècula com a suma de les energies de cada fragment definit i les energies d'interacció (atractives o repulsives) entre ells.

La idea es fer servir aquest mètode per poder predir les fragmentacions de les espècies ionitzades sense haver de considerar explícitament totes les possibles reaccions de descomposició unimolecular.

#### **1.4. Aplicació a prediccions de l'espectrometria de masses**

L'estratègia és determinar com canvien les energies dels fragments i les seves interaccions dins de la molècula **quan aquesta pateix la ionització**. En principi, la contribució d'interacció entre fragments que més es vegi afectada (disminuïda) amb la ionització serà la que donarà lloc a la fragmentació.

Hi ha alguns precedents a la bibliografia on s'han fet anàlisis similars, també per aminoàcids. L'any 2001, Mayer i col·laboradors<sup>8</sup> van analitzar els canvis en els ordres d'enllaç d'una sèrie de molècules quan pateixen una ionització, calculats amb el mètode Hartree-Fock. La variació del valor d'aquest terme va ser utilitzat per predir quins enllaços simples en són més afectats i que per tant poden donar lloc a trencaments. En conseqüència es va concloure que la força d'enllaç en la molècula neutra no era crucial, però sí el seu canvi durant la ionització. Tot i això, no varen fer servir diferències en energies d'enllaç sinó en ordres d'enllaç (un paràmetre que hi està parcialment relacionat). A més, els autors no varen calcular explícitament els ordres d'enllaç de la molècula ionitzada, sinó que només varen tenir en compte l'efecte de treure un electró de l'orbital frontera HOMO (o altres prop d'aquest). Els autors identifiquen el mètode com "quasi-Koopmans". Això vol dir que es considera que tots els orbitals dels ions positius es mantenen iguals als orbitals de la molècula neutra, per exemple, canvien només el número d'ocupació en els orbitals però els coeficients dels orbitals es mantenen fixos.



$$\Delta E = E_{G^+} - E_G \approx -E_G^{HOMO}$$

**Figura 4** Diagrama d'orbitals representant el procés d'ionització sota l'aproximació de Koopmans.

D'aquesta forma, per fer l'estudi de possibles fragmentacions només es requereix el càlcul de la molècula neutra. Aquest tipus d'aproximació no té en compte ni la relaxació dels orbitals deguda a la ionització, ni el possible canvi geomètric en la molècula radical catíon (ionització vertical).

Finalment, el pòster de Ramos-Cordoba<sup>9</sup> ja es pot considerar un precedent a aquest treball. L'objectiu va ser la predicció de la fragmentació de cinc aminoàcids (Gly, Ala, Ser, Cys i His) aplicant el mètode de la descomposició d'energia a nivell Hartree-Fock. A diferència del treball d'en Mayer, aquí sí es va tenir compte l'efecte de la reorganització electrònica, calculant la diferència entre els termes d'energia del radical catíon i de la molècula neutra a la geometria optimitzada d'aquesta. Els resultats que es van obtenir eren prometedors, però no van tenir continuïtat degut a l'elevat error numèric associat a la descomposició de l'energia i al fet de poder tractar funcions d'ona i energies Hartree-Fock.

## 2. OBJECTIVES

The main goal of this work is to see if molecular energy decomposition schemes can be used to predict the fragmentation patterns, or at least the main peak, in EI-MS spectra. That is, without explicitly considering all possible unimolecular decomposition reactions of the ionized molecules.

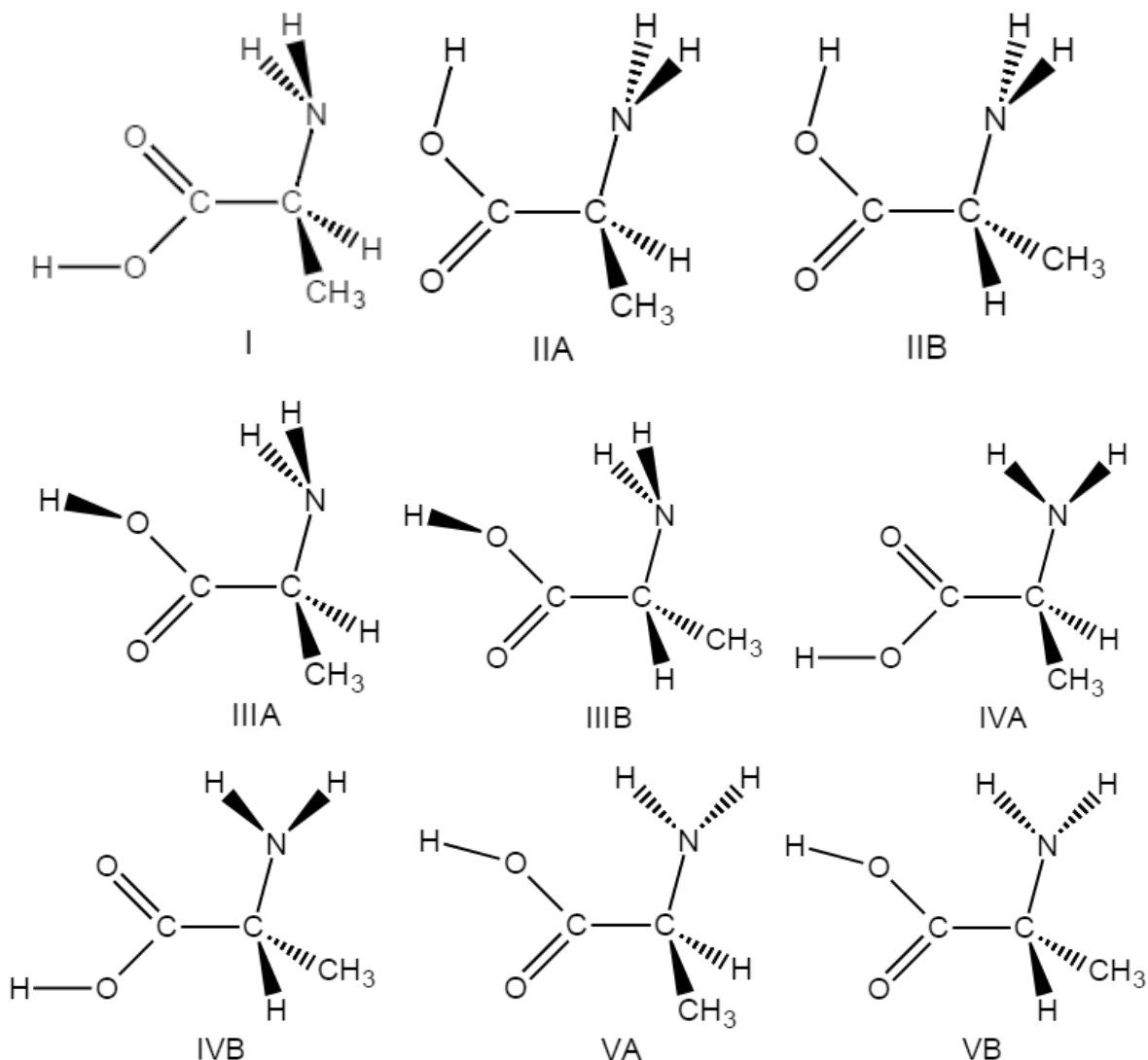
To make the study as comprehensive as possible we want to take into account many factors that have not been covered in previous similar studies. In particular, we aim to:

- Consider a greater number of different types of amino acids (hydrophobic, hydrophilic, acidic, basic, aromatic side chains, etc.)
- Make a thorough conformational study for each amino acid in its radical cation and neutral forms
- Perform various analyses for fragmentation prediction, considering i) vertical ionizations (without nuclear relaxation of the radical species), ii) considering nuclear relaxation but only considering the global minimum energy structures, and iii) analyzing the effect of all isomers/conformers by performing MB averaging.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Estudi conformacional

Cada aminoàcid pot tenir una gran varietat de conformacions a degut a l'elevat nombre de graus de llibertat presents. A més, també es poden trobar amb diferents estereoquímica. Per iniciar l'estudi dels isòmers s'ha partit del mateix criteri de l'article<sup>6</sup> esmentat anteriorment. Per tant s'inicia amb 9 isòmers a excepció de la Gly i la Tyr, que són 5 i 18, tal com es mostra a la figura 5.



**Figura 5** Confòrmers/isòmers possibles per la molècula d'alanina.

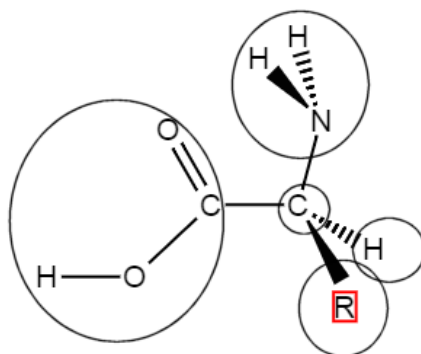
Una vegada representats amb el programa GaussView, es va fer una optimització de geometria de tots els possibles isòmers. En aquest punt es va trobar que moltes conformacions acaben derivant a d'altres, fet que molts coincidien i és reduïa el nombre de conformacions finals.



Per cada isòmer/confòrmer diferent es va fer un càlcul de l'energia del radical catió corresponent (ionització vertical). Finalment, es va dur a terme una optimització de geometria dels isòmers/confòrmer radical catió. Igualment, en molts casos s'arriben a conformacions iguals. A la Taula 1 de resultats es troben recollides el nombre d'estructures totals localitzades en l'estudi conformacional.

### 3.2. Descomposició de l'energia molecular

Una vegada trobats els isòmers/confòrmer de cada aminoàcid en estat neutre i radical, el següent pas ha estat aplicar el mètode de descomposició de l'energia molecular per determinar les energies dels fragments i les seves interaccions. Els fragments que s'han definit (cinc) estan representats en la figura 6. Cal afegir que no se n'ha calculat la descomposició de totes les estructures, sinó aquelles que entren dintre del criteri d'una diferència energètica de 2.5 kcal/mol respecte l'estructura de mínima energia. El motiu per aquest criteri és que s'ha vist amb la distribució Maxwell-Boltzmann (MB) que aquells que tenen una diferència d'energia superior al valor esmentat contribuïen en menys d'un 1%.



**Figura 6** Representació esquemàtica de la definició de fragments. R representa la cadena lateral que caracteritza cada aminoàcid.

A partir de les diferències entre les interaccions entre fragments en la forma neutra i radical s'ha trobat quins enllaços han perdut més energia i per tant són propensos al trencament. Val a dir que d'entre els  $5 \times 4 / 2 = 10$  termes d'interacció entre fragments només 4 (aquells que involucren el carboni alfa) poden donar lloc a fragmentacions, i són els únics que cal tenir en compte en l'anàlisi.

Els resultats que no tenen en compte la relaxació nuclear de les espècies radical catió s'indiquen amb el nom **Vertical**. Quan es calculen les diferències energètiques

entre les estructures de mínima energia de l'espècie neutra i radical catió, respectivament, els resultats s'indiquen amb la nomenclatura **Min-Min**. Finalment, per tal de tenir en compte el possible efecte de tenir més d'un isòmer/confòrmer s'ha aplicat la distribució de Maxwell-Boltzmann per trobar les energies mitjanes a una temperatura de 300 K. Aquests resultats es presenten com a Maxwell-Boltzmann average (**MBA**).

Per altra banda, s'han realitzat també càlculs puntuals d'energia total a totes les estructures trobades amb un altre funcional<sup>6</sup> (MPWB1K), per analitzar el possible efecte de la tria del funcional DFT en l'ordenació energètica de les estructures.

Finalment s'ha realitzat un anàlisi de càrregues parcials per fragments per verificar si la càrrega positiva del fragment també coincideix amb el pic de l'espectre MS-EI l'experimental.

### 3.3. Detalls computacionals

Per fer l'estudi conformacional s'han dissenyat per cada aminoàcid totes les conformacions descrites a la figura 4 mitjançant el software Gaussview i s'han realitzat les optimitzacions de geometria corresponents a nivell B3LYP/cc-pVDZ. Per cadascun dels diferents isòmers/confòrmer trobats s'han calculat les energies dels sistemes ionitzats (radical catió) verticals i s'han dut a terme optimitzacions de geometria. S'han realitzat també càlculs puntuals d'energia a nivell MPWB1K/cc-pVDZ per totes les estructures trobades.

S'ha dut a terme una anàlisi de descomposició de l'energia en fragments per cada espècie (neutre i radical catió) amb el programa APOST3D. Dins d'aquest s'ha fet servir la definició atòmica TFVC (*topological fuzzy Voronoi cells*), i un set d'integració de 110 punts radials i 434 angulars per cada àtom. Les càrregues parcials i densitats d'espín dels àtoms/fragments s'han obtingut també amb el mètode TFVC amb el programa APOST3D.

### 3.4. Nota sobre sostenibilitat

La química computacional utilitza ordinadors per generar informació com propietats de les molècules o els resultats experimentals simulats. S'ha convertit en una forma útil per a investigar materials que són molt difícils de trobar o massa cars per comprar. També ajuda als químics per obtenir un major coneixement de la química i fer

prediccions abans d'executar els experiments reals, perquè puguin estar més ben preparats per fer observacions.

Des d'un punt de vista sostenible, la química computacional és:

- i) més segura, perquè la química experimental té un perill intrínsec associat als experiments
- ii) més neta, perquè no hi ha malbaratament de productes químics durant les nostres proves
- iii) més eficaç, en comparació amb la realització d'experiments.

## 4. RESULTATS I DISCUSIÓ.

### 4.1. Estudi conformacional

Inicialment s'ha fet un estudi conformacional on s'ha visualitzat que cada aminoàcid pateix canvis al llarg de la ionització. En la següent taula es resumeix les diferents conformacions que s'han arribat a trobar i segons el criteri energètic comentat anteriorment, les conformacions que se'ls ha calculat l'energia per fragmentacions. Per comprendre-ho millor posem com a exemple el cas de la cisteïna on dels 9 aminoàcids inicials neutres s'ha derivat a 7 i, pel criteri d'energia, se n'ha utilitzat 3 per fer la descomposició de l'energia en fragments

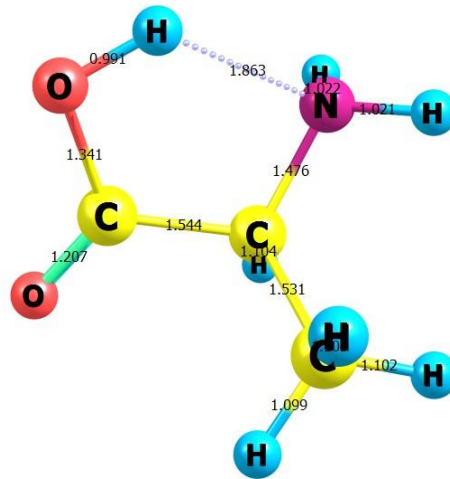
**Taula 1** Numero de isòmers/confòrmers que es troben dins el criteri energètic considerat per cada aminoàcid (entre parèntesi nombre total d'estructures trobades). En tots casos s'ha començat amb 9 possibles confòrmers excepte pels aminoàcids Gly amb 5 i Tyr amb 18.

Estat	Ala	Cys	Gly	His	Ser	Gln	Pro	Phe	Asp	Tyr
<b>Neutre</b>	6 (6)	3 (7)	4 (4)	2 (9)	2 (8)	3 (9)	5 (8)	5 (8)	2 (8)	7 (11)
<b>Radical (vertical)</b>	1	3	1	3	3	4	4	3	1	3
<b>Radical (optimitzat)</b>	1 (3)	2 (5)	2 (4)	5 (7)	4 (5)	2 (8)	3 (3)	3 (4)	5 (6)	4 (7)

Per altra banda, els isòmers/confòrmers més estables es presenten a la Taula 2. Tots els isòmers neutres coincideixen en la presència d'un enllaç de pont d'hidrogen entre el grup amino i l'hidroxil del grup carboxílic, i gràcies aquest enllaç reben més estabilitat a diferència d'altres.

**Taula 2** Isòmer/confòrmer més estable per cada aminoàcid segons l'estat (per la nomenclatura utilitzada, veure fig. 5)

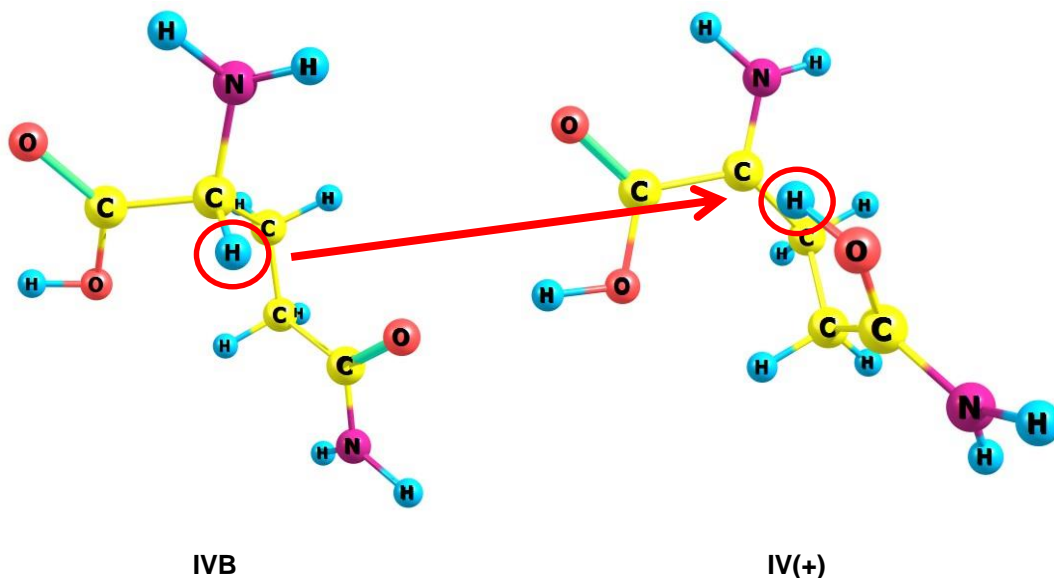
Estat	Ala	Cys	Gly	His	Ser	Gln	Pro	Phe	Asp	Tyr
<b>Neutre</b>	IIA	IVB	I	IIA	IIA	IIB	IIA	IIB	IIB	IIB_I
<b>Radical (vertical)</b>	IIIA	IVB	III	I	IIIA	IIIB	IIA	IIIA	VA	IIIB_O
<b>Radical (optimitzat)</b>	IIIA	IVB	III	I	IIIB	IVB	VA	IVA	IVB	VB_I



**Figura 7** Representació de la conformació més estable per l'Ala neutra.

En el cas dels radicals catió es pot observar que a mesura que l'aminoàcid presenta una cadena lateral R més gran, el tipus de conformer més estable que adopten va canviant en el procés de ionització. És a dir, si per l'Ala o la Cys l'estructura de mínima energia radical catió coincideix amb la de la forma neutra (IIIA i IVB, respectivament), a partir de la Ser i aminoàcids amb cadena més llarga ja són diferents. Realment l'Asp és l'únic aminoàcid que en l'estat radical catió presenta un enllaç d'hidrogen entre els 10 aminoàcids, per lo qual no és el motiu principal per l'estabilitat com en el cas neutre.

Com a cas excepcional trobem la Gln, que pateix una transposició del  $H_{\alpha}$  i passa a formar un grup OH a la cadena lateral tal i com es veu a la figura 8.



**Figura 8** Representació de les estructures de mínima energia per la Gln en estat neutre (IVB) i radical catió (IV(+)), on es mostra la transposició del  $H_{\alpha}$ .

Com es veu en la figura 8, al llarg de la ionització hi ha hagut una transposició del  $H_{\alpha}$  al O de la cadena lateral formant un OH amb la qual cosa ens va afectar a l'hora de fer els càlculs pertinents i es va haver de fer una anàlisi de la descomposició energètica de tots els enllaços de l'aminoàcid, i no únicament per fragments. D'aquesta forma permet veure amb més detall quins enllaços pateixen més canvi.

#### 4.2. Descomposició energètica dels aminoàcids

Per entendre com s'ha arribat als resultats que posteriorment es presentaran en forma de taules, es mostra com exemple el cas de l'aminoàcid més senzill (Gly).

**Taula 3** Energies (en unitats atòmiques) d'interacció de cada fragment amb el  $C_{\alpha}$  per les estructures neutres de la Gly.

Estructura	$C_{\alpha} - H$	$C_{\alpha} - NH_2$	$C_{\alpha} - COOH$	$C_{\alpha} - R$
I	-0,239	-0,397	-0,240	-0,239
II	-0,241	-0,398	-0,217	-0,240
III	-0,238	-0,398	-0,246	-0,238
IV	-0,239	-0,388	-0,230	-0,246
<b>MBA</b>	<b>-0,240</b>	<b>-0,397</b>	<b>-0,234</b>	<b>-0,240</b>

**Taula 4** Energies (en unitats atòmiques) d'interacció de cada fragment amb el  $C_{\alpha}$  per les estructures neutres de la Gly en estat radical catíó.

Estructura	$C_{\alpha} - H$	$C_{\alpha} - NH_2$	$C_{\alpha} - COOH$	$C_{\alpha} - R$
I	-0,202	-0,376	-0,169	-0,202
II	-0,208	-0,372	-0,149	-0,210
III	-0,207	-0,365	-0,184	-0,207
IV	-0,202	-0,366	-0,201	-0,182
<b>MBA</b>	<b>-0,207</b>	<b>-0,365</b>	<b>-0,184</b>	<b>-0,207</b>

**Taula 5** Energies (en unitats atòmiques) d'interacció de cada fragment amb el  $C_{\alpha}$  per les estructures radical catíó de la Gly.

Estructura	$C_{\alpha} - H$	$C_{\alpha} - NH_2$	$C_{\alpha} - COOH$	$C_{\alpha} - R$
I	-0,194	-0,524	-0,135	-0,199
II	-0,195	-0,597	-0,081	-0,195
IV	-0,181	-0,465	-0,202	-0,181
III	-0,238	-0,398	-0,246	-0,238
<b>MBA</b>	<b>-0,216</b>	<b>-0,461</b>	<b>-0,191</b>	<b>-0,218</b>

**Taula 6** Diferències d'energia d'interacció entre fragments (a.u.) entre estat radical catió i neutre amb diferents metodologies. En negreta s'indica la interacció que ha patit un canvi més gran per cada mètode.

Mètode	C <sub>α</sub> - H	C <sub>α</sub> - NH <sub>2</sub>	C <sub>α</sub> - COOH	C <sub>α</sub> - R
<b>MBA</b>	0,024	-0,064	<b>0,044</b>	0,021
<b>Min-Min</b>	0,046	-0,127	<b>0,105</b>	0,040
<b>Vertical</b>	0,038	0,021	<b>0,071</b>	0,038

En aquest cas en concret veiem tots tres criteris que coincideixen en que on hi ha una diferència energètica més gran és a la interacció entre el C<sub>α</sub> i el fragment COOH, i per tant serà la ruptura més probable. Vist aquest exemple es presenta la taula 7 amb les fragmentacions que s'han predit per cada aminoàcid i mètode.

**Taula 7** Enllaç que patiria trencament segons l'anàlisi amb diferents metodologies i la dada corresponent experimental. En vermell les fragmentacions que no són consistents amb les dades experimentals.

Amino àcid	MBA	Min-Min	Vertical	Fragmentació experimental
<b>Ala</b>	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH
<b>Cys</b>	C <sub>α</sub> -R	C <sub>α</sub> -R	C <sub>α</sub> -R	C <sub>α</sub> -R
<b>Gly</b>	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH
<b>His</b>	C <sub>α</sub> -R	C <sub>α</sub> -R	<b>C<sub>α</sub>-COOH</b>	C <sub>α</sub> -R
<b>Ser</b>	<b>C<sub>α</sub>-R</b>	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH
<b>Gln**</b>	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH
<b>Pro</b>	C <sub>α</sub> -R	C <sub>α</sub> -R	<b>C<sub>α</sub>-COOH</b>	C <sub>α</sub> -R
<b>Phe</b>	C <sub>α</sub> -R	C <sub>α</sub> -R	C <sub>α</sub> -R	C <sub>α</sub> -R
<b>Asp</b>	<b>C<sub>α</sub>-R</b>	<b>C<sub>α</sub>-R</b>	C <sub>α</sub> -COOH	C <sub>α</sub> -COOH
<b>Tyr</b>	C <sub>α</sub> -R	C <sub>α</sub> -R	<b>C<sub>α</sub>-COOH</b>	C <sub>α</sub> -R

\*\*Cas particular on hi ha una transposició de l'H<sub>α</sub>, seguida de la fragmentació esperada C<sub>α</sub>-COOH i un altre trencament dintre de la cadena lateral.

Per veure si els resultats coincideixen o no s'han comparat amb dades experimentals, pics que presenten un 100% d'intensitat a l'espectre extrets de la base de dades del NIST.<sup>10</sup> S'ha intentat de fer-ho primerament agafant tots els isòmers/confòrmers d'un aminoàcid, i per cada fragment proposat, fer la seva mitjana MBA. Per provar si realment cal fer-ho d'aquesta forma, s'ha agafat els isòmers més estables tant del neutre com el radical optimitzat (Min-Min) i a més a més també mirant

verticalment, és a dir, tenint en compte la conformació més estable del neutre i aquesta mateixa en el catió no optimitzat.

Es pot veure que els enllaços que més es veuen afectats són els C $\alpha$ -R i C $\alpha$ -COOH, dels quals en el procés de ionització poden sorgir diferents senyals. El mètode vertical, però, falla en tres casos, a més del cas del Gln a on es produeix la reorganització molecular en l'estat radical catió (vegeu a sota). Els càlculs amb el mètode Min-Min només fallen en el cas del Asp, ja que prediuen el trencament de l'enllaç amb el grup carboxílic. Si es tenen en compte les energies mitjanes amb el mètode MBA, a més del cas de l'Asp també falla per la Ser. En general els resultats són molt satisfactoris.

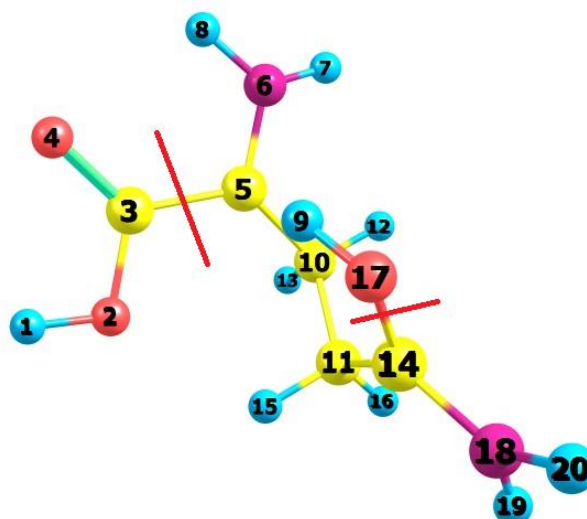
En el cas de la Gln no s'ha pogut fer la predicció per fragments a causa de la transposició del H, que fa que la definició de fragments a l'espècie radical catió sigui diferent a la definició original de l'estat neutre. Per aquest motiu s'ha buscat una alternativa, que és mirant la diferència d'energia de tots els enllaços de l'aminoàcid després de la ionització. Els resultats es troben a la taula 8.

**Taula 8** Principals diferències d'energia diatòmiques de la Gln. Càlculs realitzats amb la metodologia MBA.

Enllaç	$\Delta$ Energia diatòmica (kcal/mol)
C <sub>3</sub> -O <sub>2</sub>	20,7
O <sub>4</sub> -C <sub>3</sub>	23,6
C <sub>5</sub> -C <sub>3</sub>	36,7
H <sub>9</sub> -C <sub>5</sub>	182,9
O <sub>17</sub> -C <sub>14</sub>	108,6

Segons els resultats, qui perd més energia al llarg del procés és l'enllaç entre el H9-C5 que concorda amb la transposició del H ja comentada (veure figura 9). L'altre enllaç que es veu més afectat involucra els àtoms O<sub>17</sub>-C<sub>14</sub> i donaria lloc a una pèrdua del grup OH. Per últim, un trencament de l'enllaç C<sub>5</sub>-C<sub>3</sub>, donaria lloc a la pèrdua del grup carboxílic i per tant a un fragment NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CNH<sub>2</sub><sup>+</sup>, que coincidiria amb el pic de més intensitat a l'espectre experimental amb un pes molecular de m/z=84





**Figura 9** Representació de la Glutamina IV(+). El H9 és qui es canvia d'unió i les línies vermelles representa les fragmentacions predites.

Per altra banda, s'han fet càlculs puntuals d'energia per totes les estructures amb el funcional MPWB1K i la mateixa base. A l'article de Gil i col·laboradors<sup>6</sup> es va veure que aquest funcional donava millors energies relatives entre els isòmers. Per tant, l'efecte de canviar de funcional aquí és bàsicament que canviï l'isòmer/confòrmer de més baixa energia i també la mitjana MBA. Els resultats obtinguts es presenten resumits en la següent taula

**Taula 9** Enllaç que patiria trencament segons l'anàlisi amb diferents metodologies i amb el funcional MPWB1K. En vermell les fragmentacions que no son consistents amb les dades experimentals. En blau s'indica que hi ha concordança amb la dada experimental i no hi era amb el mètode B3LYP

Aminoàcid	MBA	Min-Min	Vertical	Fragmentació experimental
Ala	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -COOH
Cys	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R
Gly	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -COOH
His	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R
Ser	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -COOH
Gln	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -COOH
Pro	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -R
Phe	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R
Asp	C $_{\alpha}$ -H	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -NH <sub>2</sub>	C $_{\alpha}$ -COOH
Tyr	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -R	C $_{\alpha}$ -COOH	C $_{\alpha}$ -R

A primera vista comparant amb les dades experimentals no varia gaire el nombre de diferències. És a dir que pel fet de canviar de mètode els resultats es mantenen en general. A destacar la Gly i Asp que semblen ser els que menys coincideixen amb el canvi. El motiu pel qual canviï els resultats d'un mètode a un altre pot esdevenir del pes del isòmer considerat a fer els càlculs. En el cas de la Gly, l'energia dels fragments segons l'isòmer sobre tot en estat radical, tant no optimitzat com si, no arriba de ser similars entre ells:

L'exemple que representa aquesta explicació són els mateixos resultats de la Gly exposats ja anteriorment on és veu com l'energia d'interacció del fragment  $C_{\alpha}$ -COOH, mirant el radical optimitzat, varia segons el isòmer, passant de -0.081 u.a. en l'isòmer II a -0.202 u.a. al IV.

### 4.3. Anàlisi de càrregues parcials dels possibles fragments

A més de determinar les fragmentacions s'ha realitzat un estudi per veure quin fragment es quedaria la càrrega positiva després de la fragmentació, i per tant és el que sortiria en el detector de l'espectrometria de masses. Per a això s'analitza la càrrega parcial dels fragments definits per les estructures radical catió dels aminoàcids. A la taula 10 es presenten com a exemple els resultats obtinguts per l'Ala, a partir de l'estructura mínima energia.

**Taula 10** Distribució de la càrrega parcial para l'Ala radical catió.

Fragment	Càrrega
$C_{\alpha}$	0.68
H	0.02
$NH_2$	-0.16
COOH	0.26
R	0.20

En el cas de l'Ala, la fragmentació predita donaria lloc als fragments COOH i la resta de l'aminoàcid. Així, segons la taula 10, el fragment COOH tindria una càrrega de +0.26 mentre que la resta de la molècula en conjunt, per tant, tindria una càrrega de +0.74. Segons això, el fragment que esperaríem que presentés la càrrega positiva, i per tant fos el detectat a l'espectre MS-EI seria el  $NH_2C_{\alpha}RH^+$ . Això coincideix amb el que s'observa experimentalment.<sup>8</sup> A continuació es mostra una taula resum amb els resultats MBA per la resta d'aminoàcids.

**Taula 11** Predicció del fragment carregat a partir de càrregues parcials de les estructures de mínima energia radical catí. L'aminoàcid Asp no s'ha inclòs per que no es va predir correctament la fragmentació. Indicat en vermell els casos on no es prediu correctament la càrrega del fragment.

Aminoàcid	Relació de càrregues entre fragments	Fragment carregat	Pic M+ experimental
Ala	+0.74 / +0.26	$\text{NH}_2\text{C}_\alpha\text{RH}^+$	$\text{NH}_2\text{C}_\alpha\text{RH}^+$
Cys	+0.43 / +0.57	$\text{R}^+$	$(\text{COOH})(\text{NH}_2)\text{C}_\alpha\text{H}^+$
Gly	+1.14 / -0.14	$\text{NH}_2\text{C}_\alpha\text{RH}^+$	$\text{NH}_2\text{C}_\alpha\text{RH}^+$
His	+0.73 / +0.27	$\text{R}^+$	$\text{RH}^+$
Ser	+0.75 / +0.25	$\text{NH}_2\text{C}_\alpha\text{RH}^+$	$\text{NH}_2\text{C}_\alpha\text{RH}^+$
Gln	+1.79 / -0.79	$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CNH}_2^+$	$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CNH}_2^+$
Pro	+0.94 / +0.06	$\text{R}^+$	$\text{R}^+$
Phe	+0.49 / +0.51	$(\text{COOH})(\text{NH}_2)\text{C}_\alpha\text{H}^+$	$\text{R}^+$
Tyr	+0.83 / +0.17	$\text{R}^+$	$\text{R}^+$

A excepció de la Cys i la Phe, que s'ha predit la fragmentació però no coincideix la càrrega, totes les prediccions dels fragments dels altres 7 aminoàcids coincideixen també per càrrega.

## 5. CONCLUSIONS

The conformational study indicates that one can find a large number of amino acid isomers/conformers, many with very small differences in energy (below 2 kcal/mol) with respect to the global minimum. This has been observed both for the neutral and the radical cation forms.

We have used the molecular energy decomposition analysis within different frameworks (MPA, Min-Min and Vertical) grouping the contributions by predefined fragments. We have observed that both Min-Min and MPA give very similar results, and somewhat superior to consider only vertical ionizations. This is particularly the case for Gln, which suffers a transposition of the alpha H atom induced by ionization. In this case, the change of connectivity does not permit to apply the fragment approach. Instead we have analyzed each diatomic bonding contribution and came up with a fragmentation that coincides with the peak of the experimental spectrum.

To see the conformational effect of some amino acids we also calculated the energy of each isomer changing the DFT functional. The results are not too dependent of the ordering of the energies of the isomers, except in the case of amino acids Asp

and Gly. We can thus conclude that the B3LYP results are sufficiently good for the objective of this work.

## BIBLIOGRAFIA

1. Urban, J., Afseth, N. K., Stys, D. (2014). Fundamental definitions and confusions in mass spectrometry about mass assignment, centroiding and resolution. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 53, 126-136.
2. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (2001). *Principios de Anàlisis instrumental (5a ed.)*. Madrid : McGRAW-HILL.
3. Cooks, R. G., Chen, H., Ouyang, Z., Tao, A., Xia, Y., Li, L. *MS Short Course at Tsinghua* [Apunts acadèmics].
4. Pretsch, Ernö, (2001 ). Determinación estructural de compuestos orgánicos. Ed. Masson. Barcelona.
5. Simon, S., Gil, M., Sodupe, M., Bertrán, J. (2005). Structure and fragmentation of glycine, alanine, serine and cysteine radical cations. A theoretical study. *Journal of Molecular Structure: TEOCHEM*, 727, 191-197.
6. Gil, A., Simon, S., Rodríguez-Santiago, L., Bertrán, J., Sodupe, M. (2007). *Journal of Chemical Theory and Computation*, 3, 2210-2220.
7. Salvador, P.; Duran, M, Mayer, I. (2001) *Journal of Chemical Physics*, 115, 1153.
8. Mayer, I., Gömöry, A. (2001). Predicting primary mass spectrometric cleavages: a 'quasi-Koopmans' ab initio approach. *Chemical Physics Letters*, 344, 553-564.
9. Ramos-Cordoba, E., Salvador, P. (2011). *Application of an energy decomposition scheme for the prediction of the fragmentation pattern of amino acids*. Pòster presentat al WATOC 2011, Santiago de Compostela.
10. Libro del Web de Química del NIST. Recuperat el 23 de novembre 2016 de <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>.