

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**SPEKTROMETRIE IONTOVÉ POHYBLIVOSTI VE SPOJENÍ
S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ V ANALÝZE CUKRŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Lucie Pušová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí bakalářské práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Konzultant:

Mgr. Volodymyr Pauk

Olomouc 2015

SOUHRN

Diplomová práce se zaměřuje na problematiku analýzy sacharidů. Jejich analýza je obecně komplikována rozsahem molekulových hmotností (monosacharidy až polysacharidy), rozmanitostí konfigurací, vzájemných vazeb a větvením řetězců. Teoretická část představuje sacharidy jako takové, jejich struktury, vlastnosti i použití. Je zde uvedena také jejich analýza jak klasickými metodami, například volumetrií, polarimetrií, refraktometrií atd., tak instrumentálně náročnějšími analytickými metodami, jako jsou nukleární magnetická rezonance, plynová chromatografie, ale hlavně kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Aplikace vybraných metod pro forenzní účely a odhalení pančování potravin jsou zde zmíněny podrobněji. Závěr teoretické části je věnován analýze sacharidů spektrometrií iontové pohyblivosti. Experimentální část se zabývá vývojem metody pro analýzu sacharidů kapalinovou chromatografií spojenou s iontovou mobilitou a hmotnostní spektrometrií s cílem odhalit příčiny separace jednotlivých analytů při iontově mobilním experimentu. Zkoumána byla ionizace a fragmentace sedmi monosacharidů a dvou alduronových kyselin (mimo jiné použitelných pro identifikaci přírodních pryskyřic). Sacharidy se nejlépe ionizují v kladném módu, kdy poskytují ion $[M+Na]^+$, kyseliny v negativním za vzniku iontu $[M-H]^-$. Samotná hmotnostní spektra neposkytla dostatek informací pro odlišení izobarických látek, podobně ani iontová mobilita nenabídla jejich jednoznačnou identifikaci. U některých ze studovaných látek byla pozorována separace iontovou mobilitou, a to dokonce pro jednotlivé analyty. Nově vyvinutá metoda spojující separaci anomerů kapalinovou chromatografií s iontově mobilní separací a hmotnostní spektrometrií potvrdila, že iontovou mobilitou jsou separovány různé struktury aduktů sacharidů se sodíkem. Navržený postup může být použit obecněji při studiu jednoduchých i složitějších sacharidů a k hlubšímu porozumění chemii sacharidů.

SUMMARY

The thesis deals with the analysis of all groups of saccharides. Their analysis is complicated due to wide range of molecular masses (monosaccharides – polysaccharides), variability of their configuration, bonding of monomeric units and branching of their chains. The theoretical part describes structures, properties and usability of saccharides. Further, various analytical methods (volummetry, polarimetry, refractometry etc.) including sophisticated ones (nuclear magnetic resonance, gas chromatography and especially liquid chromatography and mass spectrometry) employed for the analysis of saccharides are mentioned. Applications of selected methods for forensic analysis and detection of counterfeits are also shown. A large section is devoted to the analysis of saccharides by ion mobility spectrometry. In the experimental part, seven monosaccharides was analysed by a new method, combination of high performance liquid chromatography with ion mobility and mass spectrometry. The aim was to reveal reasons of single analyte separation by ion mobility. First ionization and fragmentation of seven monosaccharides and two alduronic acids were investigated (the selected compounds can be potentially markers of different natural resins). Saccharides are better ionized in positive mode as $[M+Na]^+$, acids in negative as $[M-H]^-$. Mass spectra did not provide enough information to distinguish isobaric compounds; ion mobility did not allow their unambiguous identification too. Some of the compounds were separated by ion mobility (even single saccharide was analyzed). Newly developed methods combined anomeric separation by liquid chromatography with ion mobility separation and mass spectrometry confirmed ion mobility separation of different structures of sodiated molecules of saccharides. The proposed procedure can be also used in the study of other saccharides, monosaccharides as well as more complicate ones and to deeper understanding of saccharide chemistry.

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

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

V Olomouci dne

.....
Bc. Lucie Pušová

Poděkování

Děkuji panu prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné rady a připomínky, ochotu i čas, který mi věnoval. Děkuji také mému konzultantovi Mgr. Volodymyru Paukovi za obětavost, ochotu, trpělivost a čas, který se mnou strávil při měření. Nakonec bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za psychickou podporu.

OBSAH	Strana
1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1. SACHARIDY VŠUDE KOLEM NÁS	7
2.2. PŘEHLED METOD STANOVENÍ SACHARIDŮ.....	9
2.2.1. <i>Optické a spektrální metody</i>	10
2.2.2. <i>Enzymové metody</i>	11
2.2.3. <i>Separční metody</i>	12
2.2.4. <i>Hmotnostní spektrometrie</i>	19
2.3. ANALÝZA SACHARIDŮ PRO ODHALOVÁNÍ PANČOVÁNÍ POTRAVIN A FOREZNÍ APLIKACE	21
2.3.1. <i>Pančování potravin</i>	21
2.3.2. <i>Forezní aplikace</i>	24
2.4. ANALÝZA SACHARIDŮ SPOJENÍM IONTOVÉ POHYBLIVOSTI S HMO TNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
3.1. CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	32
3.2. PRACOVNÍ POSTUP	34
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	36
4.1. IONIZACE A FRAGMENTACE VYBRANÝCH SACHARIDŮ	36
4.2. IONTOVÁ POHYBLIVOST	39
4.3. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRÁFIE S IONTOVOU POHYBLIVOSTÍ A HMO TNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ	41
5. ZÁVĚR.....	50
6. LITERATURA.....	51
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	54
8. SEZNAM OBRÁZKŮ	56
9. SEZNAM TABULEK.....	57

1. ÚVOD

Když se řekne cukr, vybaví se asi většině lidí bílé kostky nebo krystalický prášek, kterým si sladíme čaj. Dětem pak bonbony a jiné sladkosti. Sacharidy, jak se správně označují cukry, ovšem neznamenají jen zubní kazy a nadváhu. Jsou všude kolem nás, dokonce i tam, kde bychom to na první pohled nečekali. Celá houba nebo dokonce rostlina je složená z chemickou vazbou spojených monosacharidových jednotek glukosy, dohromady tvořících polysacharid celulosu. Naše DNA je výsledkem velkého množství chemických reakcí a vazeb, jejichž nepostradatelnou součástí je opět malý monosacharid deoxyribosa. Jak my, tak rostliny potřebujeme sacharidy jako primární zdroj energie, bez nich by živé organismy nemohly existovat.

Díky jejich jedinečným vlastnostem a složení jsou nepostradatelnou surovinou v celé řadě průmyslových odvětví. Dokonce našly uplatnění jako alternativní zdroj chemické energie. Ovšem mohou být i zneužity teroristy při výrobě výbušnin.

Vedle syntézy je velmi důležitá také analýza sacharidů. Není to vůbec jednoduchý úkol. Právě kvůli tomu, že jsou sacharidy tak specifické, schopné spolu reagovat více způsoby, zaujímat při tom různá prostorová uspořádání a k tomu tvořit izomery, nenašla se pro ně žádná analytická technika, která by jim byla „ušíťá na míru“. Snad spektrometrie iontové pohyblivosti s hmotnostní spektrometrií by mohla být tou metodou, kterou hledáme.

Tato práce se právě problematikou analýzy sacharidů zabývá. V první části jsou uvedeny obecné postupy analýzy sacharidů jak klasickými, tak analytickými metodami a dále jejich využití pro odhalení pančování potravin a forenzní aplikace. Větší důraz je kladen na kapalinovou chromatografii, hmotnostní spektrometrii, ale hlavně spektrometrii iontové pohyblivosti (mobility).

Druhá část je věnována analýze sacharidů s možností využití při ověřování pravosti uměleckých děl. Nejprve byla studována ionizace a fragmentace sacharidů za účelem jejich odlišení. Poté byly cukry separovány iontovou mobilitou a nakonec byla vyvinuta metoda pro analýzu sacharidů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s iontovou mobilitou a hmotnostní spektrometrií. Podařilo se separovat α a β anomery a různé konformace aduktů sacharidů se sodíkem.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Sacharidy všude kolem nás

Jako sacharidy označujeme polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, které mají alespoň tři alifaticky vázané atomy uhlíku, a také látky, které se tvoří jejich vzájemnou kondenzací za současného vzniku acetalových vazeb. Deriváty, vznikající ze sacharidů substitučními, oxidačními, redukčními a jinými reakcemi, můžeme také řadit k sacharidům, stejně jako cyklitoly (polyhydroxycyklohexany), díky jejich podobným chemickým a fyzikálním vlastnostem.

Sacharidy jsou nejrozšířenějšími látkami v přírodě a tvoří většinu její organické hmoty. Vznikají primárně při fotosyntéze v rostlinách, obsahujících zelené barvivo chlorofyl. V živých organismech jsou nepostradatelné jako zdroj a zásoba energie nebo jako metabolické meziprodukty při biosyntéze např. lipidů, proteinů atd. Díky své jednoduché struktuře, oproti lipidům nebo bílkovinám, jsou nejrychlejším zdrojem energie. U rostlin, hub a bakterií mají sacharidy i jinou funkci, a to stavební. Tvoří základy jejich buněčných stěn, díky schopnosti sacharidů řetězit se. Dále jsou součástí nukleových kyselin, koenzymů, glykolipidů, glykoproteinů atd. ^{1,2}

V chemickém, biotechnologickém, potravinářském a textilním průmyslu jsou sacharidy nepostradatelnými surovinami. Organická chemie je využívá jako meziprodukty, protože cukerné stavební jednotky obsahující skupiny definovaných chirálních center velmi usnadňují syntézu složitých chirálních molekul, ať už přírodních nebo syntetických. Užitečná je i možnost jejich použití jako alternativního zdroje chemické energie při nedostatku fosilních paliv. Velké množství antibiotik používaných v medicíně obsahuje ve své struktuře sacharidy, např. daunomycin nebo streptomycin. ¹

Podle molekulové hmotnosti se sacharidy dělí na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Monosacharidy jsou nejmenší sloučeniny, které po rozštěpení ztrácí sacharidovou povahu. Oligosacharidy jsou složeny ze dvou až deseti monosacharidů spojených glykosidovou vazbou a kyselou hydrolýzou je možné je rozštěpit na menší

sacharidovou jednotku, tedy monosacharid. Polysacharidy jsou složeny z více než deseti monosacharidů, zpravidla jich je mnohonásobně víc, a jejich molekulová hmotnost se pohybuje kolem 10^5 g/mol. Opět se kyselou hydrolyzou štěpí na mono- nebo oligosacharidy. Mono- a oligosacharidy se často označují jako cukry, protože mají sladkou chuť.^{1,2}

Z monosacharidů jsou zajímavé např. **D-xyloza**, která se používá v lékařství k diagnóze malabsorpčního syndromu. **D-ribosa** je součástí nukleotidů (ATP, NAD) a nukleosidů (RNA), a vyrábí se z ní vitamin B (riboflavin). **D-glukosa** (hroznový cukr) tvoří spolu s D-fruktosou hlavní podíl medu, 0,1% je jí obsaženo v krvi a je základní stavební jednotkou pro nejdůležitější oligosacharidy (laktosa, sacharosa atd.) a polysacharidy (škrob, celulosa, glykogen atd.). V lékařství se používá jako umělá výživa, v přírodě slouží jako zdroj energie živočichům i rostlinám a z ní může při alkoholickém kvašení vznikat ethanol. **D-galaktosa** spolu s D-glukosou tvoří laktosu (mléčný cukr). Jaterními enzymy se epimerizuje na D-glukosu, čehož se využívá při testování funkce jater.

Nejznámější oligosacharid je **sacharosa**, jež se získává z cukrové řepy a tvoří ji D-glukosa a D-fruktosa. Reakcí se sulfurylchloridem v pyridinu vzniká sukralosa, tj. umělé sladidlo, které má 600 krát vyšší sladivost než sacharosa. **Laktosa** se skládá z D-galaktosy a D-glukosy. Obsahuje ji mléko savců a pro část populace je nestravitelná. V bazickém prostředí izomeruje za vzniku laktulose, která se používá při léčbě střevních problémů a cirhózy jater.^{1,2}

Homopolysacharid **škrob** vzniká fotosyntézou, je hlavním zdrojem živočišné potravy a zásobním sacharidem rostlin. Využívá se v potravinářském, papírenském a textilním průmyslu. Považením se škrob v kyselém prostředí štěpí na sacharidy s nižší molekulovou hmotností schopné tvořit stálé filmy, čehož se využívá při výrobě cukrovinek a v textilním průmyslu. Dalším štěpením vznikají tzv. dextriny, které se používají např. jako lepidla. **Celulosa** tvoří buněčné stěny všech rostlin, a je proto nejrozšířenější organickou sloučeninou v přírodě. Bavlna, len, konopí a juta jsou víceméně čistá celulosa. Pro komerční účely se nazývá buničina a vyrábí se z ní papír, nitráty celulosy (z nich lze připravit tzv. celuloid, jenž je nejdéle známou plastickou hmotou), acetáty celulosy (které se zpracovávají na acetátové hedvábí, velice odolné laky atd.), xantogenáty celulosy (používané k výrobě viskózoého hedvábí a celofánové folie) a ethery celulosy (které slouží jako základ ve vodě rozpustných filmů v potravinářském i farmaceutickém průmyslu). **Dextrany** slouží jako náhražka krevní

plazmy. **Chitin** je nejrozšířenější dusíkatý polysacharid v přírodě. Má podobnou funkci jako celulóza a vyskytuje se navíc v kutikulách hmyzu a krunýřích korýšů. Z něj připravený chitosan má uplatnění v medicíně, farmacii, kosmetice, potravinářství atd.

Heteropolysacharidy, jako například **rostlinné gummy** (pryskyřice) mají v průmyslu uplatnění jako plnidla a stabilizátory emulzí. **Alginová kyselina** se získává z řas a používá se ve farmacii, papírenství, textilnictví a potravinářství pro zlepšení konzistence a stability zmrzlin, ovocných nápojů atd. **Agarosa** spolu s agaropektinem tvoří agar, živnou půdu používanou v mikrobiologii. **Kyselina hyaluronová** se nachází v pupeční šňůře, sklivci a kloubní tekutině, kde chrání proti infekcím a působí jako mazadlo, podobně jako polysacharid **chondroitin**. **Heparin** se vyskytuje v těle savců a má antitrombotické a antikoagulační účinky na krev.^{1,2}

2.2. Přehled metod stanovení sacharidů

Analýza sacharidů je velmi komplikovaná, protože tvoří izomery, mohou zaujímat různé konformace a mohou se vázat k jiným monosacharidům různými způsoby. Navíc konfigurace glykosidové vazby může být α nebo β . Oligo- a polysacharidy mohou tvořit lineární, cyklické nebo větvené struktury, a v neposlední řadě obsahují sacharidy substituenty jako aminoskupiny, methyletery, různé druhy esterů atd. Existence velkého množství různých typů sacharidů, které se od sebe jen velmi málo liší, znesnadňuje identifikaci jednotlivých sacharidů ve směsi. Sacharidy jsou velmi polární, netěkavé, nemají snadno ionizovatelné skupiny a většina nefluoreskuje ani neabsorbuje světlo v přijatelných vlnových délkách.^{3,4}

Kvantitativní i kvalitativní analýza sacharidů je důležitá pro celou řadu oblastí, například studium přírodních látek, kontrolu kvality farmaceutických a potravinářských výrobků, v lékařské diagnostice, ale také pro samotnou syntézu sacharidů. Zdokonalování analytických přístrojů umožnilo značný pokrok v analýze sacharidů. Kromě toho, že se stále používají titrační, kolorimetrické nebo optické metody, hrají hlavní roli v analýze sacharidů kapalinová a plynová chromatografie nebo kapilární elektroforéza a hmotnostní spektrometrie.

Prvním krokem analýzy je izolace sacharidů, nejčastěji extrakce vodou nebo 80% ethanolem. Jako další následuje čiření, neboli odstranění koloidních, barevných a nežádoucích opticky aktivních látek z roztoku například octanem olovnatým. A poté se může přejít k důkazu sacharidů. Zajímavá je například barevná reakce, kdy koncentrovaná kyselina sírová dehydratuje cukry za vzniku derivátů furalu, dojde ke kondenzaci s α -naftolem a vzniknou barevné červenofialové produkty. Reakce se nazývá Molischova. Známa je i Fehlingova nebo Tollensova reakce pro důkaz redukujících cukrů.^{3, 4}

2.2.1. Optické a spektrální metody

Pro stanovení sacharidů se z fyzikálních metod používá **refraktometrie**, kde se ovšem musí dbát na udržení konstantní teploty při měření kvůli reprodukovatelnosti výsledků.

Polarimetrie je další metoda vhodná pro stanovení sacharidů. Zde se využívá jejich chiralitu, díky níž stáčí rovinu polarizovaného světla. Úhel otočení závisí na koncentraci roztoku.

Redukující cukry redukují za varu v alkalickém prostředí měďnatou sůl na oxid měďný a nezreagovaný nadbytek měďnaté soli se stanoví jodometricky nebo komplexometricky. Nebo naopak, vzniklý oxid měďný se stanoví například gravimetricky nebo po reakci s železitou solí se železnaté ionty stanoví manganometricky.

K rychlým metodám určování struktury sacharidů patří metody založené na difrakci záření rentgenových paprsků, elektronových paprsků nebo toku neutronů.

Spektroskopie v ultrafialové (UV) a infračervené (IR) oblasti záření poskytuje informace o charakteristických skupinách v molekule sacharidů, například karbonylových, nitrilových, sulfonylových nebo o dvojných a glykosidových vazbách.^{3, 4, 5}

Stanovení obsahu sacharidů, netvořících základní skelet organismů, a škrobu v rostlinném pletivu vyšších rostlin je možné spektrofotometricky. Po zahřátí sacharidu s reakčním činidlem anthronem v kyselém prostředí vzniká zelený kondenzační produkt, který se měří při vlnové délce 625 nm. Množství sacharidů se určí z kalibrační křivky sestavené ze směsi D-fruktosy a D-glukosy pro nestavební sacharidy a z D-glukosy pro stanovení škrobu.

Vytvořená metoda byla použita pro experiment studující vliv zvýšené koncentrace CO₂ na asimilační aparát buku a smrku.⁶

Nejen monosacharidy, ale i oligosacharidy, polysacharidy, glykoproteiny, glykolipidy, oligonukleotidy a mnoho dalších je možné analyzovat **nukleární magnetickou rezonancí (NMR)**, která poskytuje informace o struktuře a konformaci analyzované látky.¹

2.2.2. Enzymové metody

Enzymové metody nejsou tolik rozšířené, mají ovšem řadu výhod. Jsou velmi specifické s ohledem na čistotu použitého enzymu. Tím je myšleno například stanovení sacharidů v nápojích, kde je přítomno mnoho jiných podobných sacharidů, které by mohly být příčinou interferencí. Dají se použít pro kvalitativní i kvantitativní účely ve značně komplikovaných směsích, například stanovení glukosy v tělních tekutinách, přičemž v běžné praxi se používá výhradně tato metoda. Enzymatické stanovení mohou rušit některé těžké kovy, které inaktivují enzymovou aktivitu. V průběhu reakce se sacharid zoxiduje a vzniklé produkty se stanovují spektrofotometricky, potenciometricky, titračně atd.^{1,5}

Enzymové reakce jsou i podstatou biosenzorů, které se rovněž používají pro stanovení sacharidů. Biologická část senzoru rozpozná sacharid a převodník tento signál převede na nějakou měřitelnou fyzikální veličinu, například proud, napětí atd. Z hodnoty proudu nebo napětí je možné určit koncentraci sacharidu. Monosacharid glukóza je nejčastěji stanovovaným sacharidem, a byla také prvním analytem stanoveným biosenzory.⁷

Synytsya a kol. stanovovali obsah β -glukanů v infikovaném a neinfikovaném zrně ječmene. Na zrně napadeném plísněmi se objevují i β -glukany mikrobiálního původu, které mají jinou strukturu než β -glukany cereální. Pomocí enzymové metody zjistili, že obsah β -glukanů cereálních je mnohem nižší v napadeném zrně než ve zdravém, což umožňuje odhalit případnou infekci v zrnech ječmene.⁸

2.2.3. Separační metody

Plynová chromatografie (GC) je v dnešní době často používanou technikou v analýze sacharidů. Hodí se převážně pro sacharidy s menší molekulovou hmotností a je zapotřebí je před analýzou derivatizovat. Nejčastěji se jedná o trimethylsilyl nebo methylové deriváty. Hlavní předností je její pohodlné spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). Tohoto spojení bylo využito v analýze rostlinných gum a pryskyřic a jiných polysacharidových substancí, které byly využívány ve starém Egyptě jako ingredience do mumifikačních balzámů, jako pojivo pigmentů při výrobě barev a mnoho dalšího.⁹

Dále byla GC s plamenoionizačním detektorem (FID) využita k analýze monosacharidů v kyselých hydrolyzátech rostlinných buněčných stěn. Sacharidy se redukovaly tetrahydridoboritanem sodným v dimethylsulfoxidu a vzniklé alditoly byly acetylovány 1-methylimidazolem. Byl určen celkový obsah monosacharidů v buňkách rostlinných stěn.¹⁰

Velmi podobného postupu bylo využito v analýze sacharidů z brambor. Sacharidy byly převedeny na alditol acetáty a analyzovány GC-FID. Jako vnitřní standard byla použita allosa. Stanovena byla glukosa, fruktosa a celkové redukující sacharidy v pěti odrůdách brambor.¹¹

Swallow a Low použili **tenkovrstevnou chromatografii (TLC)** ve spojení s GC, LC a ¹³CNMR k identifikaci stopového množství oligosacharidů v komerčním řepném invertním sirupu. Dinitrosalicylková kyselina byla použita jako činidlo pro určení, zda separované oligosacharidy byly redukující nebo neredukující a anthronové činidlo určilo přítomnost nebo nepřítomnost ketosy.¹²

Pro **vysokoučinnou kapalinovou chromatografii (HPLC)** se používají nejrůznější dělicí principy, například systém kapalina-pevná látka, kapalina-kapalina, iontově výměnná chromatografie nebo gelová vylučovací chromatografie. Tak jako GC může sloužit k analytickým i preparativním účelům.¹

HPLC s refraktometrickým detektorem (RI) byla použita pro sledování změn obsahu laktosy a dalších metabolitů, jako je glukosa, galaktosa a mléčná kyselina, během fermentace

syrovátky sušenou jogurtovou kulturou. Metoda byla nejprve validována, byly vytvořeny kalibrační křivky a následně byl měřen úbytek laktosy a nárůst jejích metabolitů při fermentaci syrovátky. Vzorčky syrovátky byly před analýzou upraveny čiřením dle Carreze. Koncentrace laktosy klesla o 15% a obsah glukosy, galaktosy a mléčné kyseliny vzrostl na osmi- až desetinásobek původního množství. Přesto se nepodařilo snížit obsah laktosy na maximálně 10 g/kg, jak nařizuje vyhláška, aby mohla být syrovátka doporučována osobám s laktosovou intolerancí. Bezlaktosové potraviny mohou obsahovat dokonce pouze 0,1 g/kg.¹³

Ve vodě rozpustné organické sloučeniny mají významný vliv na změnu radiační rovnováhy atmosféry, přispívají k acidifikaci a eutrofizaci půdy a vody a mají nepříznivý vliv na lidské zdraví. Pocházejí většinou ze spalování biomasy a fosilních paliv, silničního prachu, cigaretového kouře, otěrů pneumatik a asfaltu, případně z biogenních emisí (primární organický aerosol), ale mohou pocházet i z transformačních reakcí v atmosféře (sekundární organický aerosol). Zástupci těchto látek jsou například huminovým kyselinám podobné sloučeniny, anhydridy monosacharidů, sacharidy, karboxylové kyseliny, pryskyřičné kyseliny a methoxyfenoly. Analýza anhydridů monosacharidů a sacharidů se provádí nejen plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (GC-MS), ale také kapalinovou chromatografií (LC) nebo iontovou chromatografií (IC) s pulzním amperometrickým detektorem (PAD) nebo s MS.¹⁴

HPLC byla použita pro strukturní analýzu N-glykanů. Nejprve bylo zapotřebí použít glykoamidasu A k uvolnění N-glykanů z glykopeptidů, poté jim dodat fluorescenční vlastnosti reakcí s 2-aminopyridinem a nakonec použít tři různé HPLC kolony k separaci a identifikaci derivátů N-glykanů. Použití různého nastavení podmínek separace a různých kolon přineslo užitečné informace, především jistější identifikaci daného glykanu. Tento postup analýzy se nazývá multidimenzionální mapování.⁹

HPLC separace na β -cyklodextrinové koloně s mobilní fází o složení ethyl-acetát : methanol : voda v poměru 80 : 14 : 6, v/v/v s refraktometrickým detektorem byla použita k separaci anomerních cukrů. Poměr α a β anomerů nezávisí na pH v rozmezí hodnot 3,5 až 8,0. Separovány mohou být nejen pyranosové, ale také furanosové formy sacharidů.¹⁵

Anomery sacharidů lze separovat také metodou HPLC na iontoměničích v režimu anex s SO_4^{2-} skupinou. Mobilní fázi lze použít vodný roztok ethanolu a detekce probíhá refraktometricky. Je možné takto separovat monosacharidy i disacharidy.¹⁶

Vysokoučinnou iontově-výměnnou chromatografií (HPAEC) v alkalické oblasti byly separovány neutrální oligosacharidy podle velikosti molekul, zastoupení monosacharidů a propojení monosacharidových jednotek. Metoda je schopna rozlišit 1-3, 1-4 a 1-6 polohové izomery neutrálních oligosacharidů na základě dvou faktorů, relativní acidity hydroxylových skupin a dostupnosti oxyaniontů oligosacharidů pro interakci s funkční skupinou stacionární fáze. Redukující oligosacharidy měli mnohem větší retenci než redukované. Detekovány byly amperometrickým detektorem.¹⁷

V jednom kroku lze separovat monosacharidy arabinosu, ribosu, mannosu, fukosu, xylosu, lyxosu, glukosu a fruktosu, a současně α a β anomery od každého D a L enantiomeru pomocí HPLC s chirální kolonou Chiralpak AD-H. Detekce probíhala refraktometricky a pomocí detektoru s diodovým polem (DAD). Metoda byla aplikována na vzorky, jež jsou součástí potravního řetězce a důležité pro lidské zdraví. Konkrétně byl analyzován portugalský med, Portske víno a přírodní cukry uváděné na trh jako výživové doplňky. Výše zmíněné sacharidy byly analyzovány nejprve na koloně pro analýzu sacharidů (Waters), a oba enantiomery každého sacharidu poskytly jeden pík. Analýza na chirální koloně poskytla čtyři píky pro každý cukr (enantiomery α -D, β -D, α -L, β -L). Teplota kolony měla vliv na eluční profily sacharidů. Pro xylosu se s rostoucí teplotou zhoršoval, kdežto glukosa ho měla nejlepší při 40 °C. Teplota 25 °C byla zvolena jako univerzální pro analýzu všech sacharidů. Padělaný nebo špatně skladovaný med může mít jiné cukerné složení. Dobrý med obsahuje převážně glukosu a fruktosu, které je více než glukosy. Monosacharidový profil Portskeho vína byl zaznamenán pro případné odhalení falšování tohoto vína. D-glukosa a D-fruktosa jsou zde hlavními složkami. Cukerné doplňky nebo náhražky obsahují přírodní monosacharidy jako fruktosu nebo glukosu, které jsou dražší než běžně používaný cukr sacharosa. Odhalení falšování doplňků stravy sacharózou je možné z jejich sacharidového profilu.¹⁸

HPLC systém používající 2-kyanoacetamid jako postkolonové fluorescenční činidlo může být užitečný pro přímou i nepřímou analýzu glykosaminoglykanů, které se nacházejí v biologickém materiálu jako moč, plazma a vzorky tkáně. Rychlá separace nenasycených

disacharidů získaných specifickým enzymatickým štěpením se provádí pomocí iontově párové chromatografie na reverzních fázích (RP-IPC) s gradientovou elucí.

Délku řetězce škrobu je možné stanovit iontově výměnnou chromatografií (HPAEC) s PAD detektorem. HPAEC rozseparovala amyloextriny lišící se počtem glukosových jednotek, enzymatický reaktor způsobil hydrolyzu každého amyloextrinu na příslušný počet glukosových jednotek, z jejichž množství, určeného PAD detektorem, byla vyhodnocena délka řetězce škrobu. Nevýhodou tohoto systému je velmi dlouhá doba analýzy, skoro 4 hodiny. Výhoda oproti analýze bez enzymatického štěpení je zlepšení citlivosti, protože s rostoucí délkou řetězce amyloextrinu klesá odezva PAD detektoru. Pro analýzu velmi dlouhých řetězců amyloextrinů je lepší použít jinou metodu.⁹

Gelová chromatografie (SEC) s detektorem rozptylu světla (LSD) byla použita k analýze škrobu (amylosy i amylopektinu), celulosy i jejich derivátů, pektinu, glykoproteinů, kyseliny hyaluronové, heparinu atd.⁹

Li a kol. vytvořili rychlou a praktickou analytickou metodu pro analýzu mono- a oligosacharidů, která může být použita v biokonverzních procesech při výrobě paliva a xylooligosacharidů z lignocelulósové biomasy. Použili předkolonovou derivatizaci pomocí 1-fenyl-3-methylpyrazol-5-onu (PMP) k analýze monosacharidů a oligosacharidů v hydrolyzátech lignocelulósové biomasy. Separace probíhala na RP-HPLC s UV detekcí při 254 nm. Kromě toho je tato metoda praktická pro určení monosacharidového složení ozdobnice čínské a pro vyhodnocování produkce xylooligosacharidů z enzymatického štěpení surového xylanu.¹⁹

1-(4-isopropyl) fenyl-3-methylpyrazol-5-on (PPMP) byl použit jako derivatizační činidlo pro analýzu 13 monosacharidů metodou RP-HPLC-ESI-MS. Nejprve byly optimalizovány podmínky pro měření a poté byla nasbírána a uložena fragmentační data. Byla zjištěna linearita mezi plochami píků a koncentracemi monosacharidů v širokém rozsahu koncentrací monosacharidů (až 0,02 - 1,0 mmol/l) a dobrá reprodukovatelnost. Metoda byla úspěšně použita k analýze monosacharidového složení sinice rodu *spirulina*.²⁰

RP-HPLC s fluorescenčním detektorem byla použita pro stanovení 9 monosacharidů z různých tříd neutrálních sacharidů (hexosy, pentosy, deoxyhexosy a alduronové kyseliny). Separace probíhala na C18 koloně po předchozí derivatizaci cukrů p-aminobenzoovou

kyselinou. Byla prokázána silná závislost účinnosti separace na pH mobilní fáze. Optimální pH bylo 5,5. Použitím tohoto derivatizačního činidla se dosáhlo zatím nejnižšího LOD pro neutrální sacharidy (6,1 µg/l pro arabinosu). Metoda byla použita při analýze pomerančového extraktu bohatého na pektin. Ukázalo se, že matrice nemá téměř žádný vliv na průběh stanovení a že je tato metoda vhodná pro stanovení extraktů bohatých na polysacharidy z různých matic.²¹

Další studie zkoumala potenciální použití zbytků po zemědělském mletí mungo fazolí (*vigna mungo*) jako zdroj sacharidů. Sacharidy byly extrahovány do směsi rozpouštědel methanol : dichlormethan : voda v poměru 0,3 : 4 : 1, v/v/v. Pro analýzu sacharidů byla použita RP-HPLC s detektorem rozptylu záření po odpaření mobilní fáze (ELSD) a ESI-MS. TLC analýza s mobilní fází n-butanol : aceton : pyridin : voda (10 : 10 : 5 : 5, v/v/v/v) sloužila k prvotnímu potvrzení přítomnosti cukrů. Spolu se standardy cukrů byly nanášeny frakce vzorku a byla potvrzena přítomnost rhamnosy, arabinosy, xylozy, mannosy, galaktosy a glukosy.²²

Dimethylfenylsilyl deriváty monosacharidů mohou být analyzovány HPLC s UV detektorem (deriváty obsahují chromofor a nejsou těkavé).²³

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) byla použita pro separaci monosacharidů běžných v N-vázaných oligosacharidech v glykoproteinech. K detekci byl použit detektor rozptylu světla po odpaření mobilní fáze (ELSD) a podařilo se separovat D-fukosu, D-galaktosu, D-mannosu, N-acetyl-D-glukosamin, N-acetylneuraminovou kyselinu a D-glukuronovou kyselinu.²⁴

Analýza polárních sacharidů **superkritickou fluidní chromatografií (SFC)** vyžaduje buď derivatizaci za účelem zlepšení rozpustnosti v oxidu uhličitém, nebo přidání polárního rozpouštědla do mobilní fáze. Po přidavku polárního modifikátoru již není možné použít například plameno-ionizační detektor (FID), musí být použit jiný detektor pro přímou analýzu sacharidů, například hmotnostní spektrometr. Vhodné ovšem je také použití například detektoru rozptylu světla po odpaření mobilní fáze (ELSD). Stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy v tabáku je možné na nepolární stacionární fázi s mobilní fází CO₂ : methanol a detektorem ELSD. Oproti kapalinové chromatografii s mobilní fází acetonitril : voda je

rozlišení směsí glukosa-mannosa nebo glukosa-mannitol-sorbitol vyšší, když je použita v SFC eluční směs CO₂ : methanol.²⁵

SFC polárních látek, například glykosidů, glukosinolátů a alkylovaných nebo nealkylovaných polyethylenglykolů, s detektorem rozptylu světla (LSD), je skvělá alternativa k refraktometrickému detektoru, jehož nevýhoda je, že nemůže být použit s gradientovou elucí, kdežto LSD ano.²⁶

Subkritická fluidní chromatografie byla úspěšně použita pro separaci nederivatizovaných sacharidů a polyolů. Analýza funguje dobře na silikagelu i na stacionárních fázích modifikovaných tetramethylsilanem (TMS). Nejvyššího rozlišení a účinnosti bylo dosaženo při složení mobilní fáze CO₂ s přidavkem methanolu, vody a triethylaminu jako polárních modifikátorů. Se zvyšujícím se obsahem vody v mobilní fázi se zvyšovala retence monosacharidů a polyolů, opačně tomu bylo u glykolipidů.²⁷

Rychlá separace a detekce sladidel a sacharidů v potravinách a nápojích je možná s využitím SFC s ELSD detektorem. Výborné vlastnosti této metody byly ukázány na analýze populárního nealkoholického nápoje. V jedné analýze bylo možné separovat směs kofeinu, fruktosy, glukosy, sacharosy a neohesperidin dihydrochalkonu. Dále byla metoda aplikována na analýzu dvou sportovních nápojů s rozdílným obsahem cukru nebo sladidla.²⁸

Kapilární elektroforéza (CE) je výborná technika pro stanovení sacharidů ve farmacii, potravinářství atd., která má dobrou účinnost a nabízí vysoké rozlišení při malé spotřebě vzorku. Její nevýhodou je ovšem možnost ucpání kapiláry a nízká reprodukovatelnost při různých koncentracích solí ve vzorcích. Aby bylo možné stanovit sacharidy pomocí CE, musí mít náboj. Toho lze docílit například silně alkalickým pH, při kterém sacharidy disociují, vytvořením aduktů sacharid + ion nebo derivatizací. Detekce může být například elektrochemická (oxidace na povrchu kovových elektrod), optická (absorpce analytu nebo pozadí), hmotnostní spektrometrie a mnoho dalších. Pořadí migrace sacharidů je závislé na stupni ionizace. Nejméně disociující sacharidy doputují k detektoru jako první, protože mají menší schopnost migrovat proti elektroosmotickému toku v nepokryté křemenné kapiláře. Sacharidy tvoří adukty jak s anionty (nejčastěji se používá borát, ale jsou známy adukty s germananem, cíničitanem, arsenitanem, molybdenanem,

wolframanem, vanadičnanem atd.), tak s kationty (vápenatými, lanthanitými, měďnatými atd.). Této tvorby aduktů lze rovněž v CE využít.²⁹

CE s elektrochemickou detekcí byla použita ke stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy v běžných nápojích, jako jsou jablečné šťávy atd. Díky přidaným borátovým iontům se zlepšila separace sacharidů s blízkými pK_a nebo bylo možné oddělit od sebe sacharidy s nepatrným rozdílem typu vazby například glukosové dimery maltosu, isomaltosu a celobiosu.

Sacharidy mohou mít v CE úlohu nejen stanovované látky, ale také aditiva při stanovení jiných látek. Polysacharidy mohou sloužit jako média, ve kterých se látky dělí podle velikosti. Tato modifikace byla využita například pro separaci polystyrenových částic nebo DNA. Dále cyklodextriny byly použity jako chirální selektory pro rozlišení enantiomerů mechanismem inkluzních komplexů, heparin a chondroitin sulfát A, B a C pro enantiomerní rozdělení některých farmaceutických substancí atd. Sacharidové mohou být i povlaky kapilár pro CE, které slouží k reprodukovatelným separacím derivátů oligosacharidů a glykoforem proteinů v pufrech o vysokém pH.²⁹

Kapilární elektrochromatografie (CEC) v sobě spojuje vlastnosti kapilární elektroforézy a kapalinové chromatografie. Profil laminárního toku je zploštělý oproti laminárnímu toku generovanému čerpadlem, tím je dosaženo lepší separace. CEC je použitelná nejen pro mono- a oligosacharidy, ale i velké molekuly jako glykolipidy. Stanovení sukralosy bylo provedeno CEC s oktadecylsilanizovanou (ODS) kapilárou se spektrofotometrickou detekcí.⁹

Separace tokem v silovém poli (FFF) je metoda, která dělí látky podle jejich difuzních koeficientů, a tudíž podle molárních hmotností. Byla použita pro stanovení polysacharidů jako dextran, pullulan, deriváty celulosy, škrob, arabská guma atd.⁹

2.2.4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je cenný nástroj pro určení molekulové hmotnosti a struktury sacharidů a k analýze fragmentů složitějších sloučenin na bázi sacharidů. Protože jsou tyto látky schopné zaujímat různé tvary v prostoru, mají různé izomery a anomery, je jejich analýza komplikovaná. Pomoci může i fragmentace, například kolizí indukovanou disociací (CID) nebo záchytem elektronu (ECD). Nejčastěji používané ionizační metody jsou elektrosprejová ionizace (ESI) a laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI).³⁰

Sacharidy hrají důležitou roli ve fermentačních procesech. V pivovarnictví ovlivňuje koncentrace maltooligosacharidů vlastnosti piva, a proto má jejich analýza praktický význam. K identifikaci a charakterizaci těchto sacharidů v pivu byla použita MS s ionizací elektrosprejem. Před analýzou stačí vzorek piva 1000x naředit a nastříknout do přístroje. Metoda je vhodná pro automatizaci a rutinní analýzu sacharidů ve vzorcích piva, případně jiných potravin.³¹

Hmotnostní spektrometrie v pozitivním režimu je zatím nejčastěji využívaným nástrojem pro strukturní analýzu neutrálních sacharidů. Nicméně jejich chování v tomto režimu není vždy dostatečné pro identifikaci struktury oligosacharidů. Alternativu nabízí fragmentace $[M-H]^-$ iontů nebo aniontových aduktů. Hlavní nevýhodou práce v negativním režimu je nízká citlivost. Bylo tedy testováno několik solí, jako přísad pro zlepšení citlivosti. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s $NH_4H_2PO_4$ tvořící $[M+H_2PO_4]^-$ adukt, který zvýšil citlivost jak v MS, tak v MS^n spektrech. V porovnání s jinými solemi obsahovala fragmentační spektra další fragmenty, které zlepšily možnost identifikace struktury. Metoda byla aplikována na vzorky z pivovarnictví, kde byly detekovány a identifikovány oligosacharidy odvozené od škrobu, fruktany a oligosacharidy ze skupiny rafinos.³²

MALDI-MS má široké možnosti použití. Existuje velké množství matic používaných při analýze nejrůznějších sacharidových sloučenin, jako jsou například sacharidy z rostlin (fruktany, pektiny, xylany), z řas (β -glukany), z mléka, z piva, dále cyklodextriny, glykoproteiny, glykopeptidy, N- a O-glykany a mnoho dalších.³³

Malé neutrální sacharidy, které se obtížně ionizují pomocí MALDI, mohou být efektivně ionizovány povrchově asistovanou laserovou desorpcí/ionizací (SALDI) se zlatými

nanočásticemi jako matrice. Tato varianta má výhodu například ve snadné přípravě vzorku a vysoké účinnosti ionizace. Pro validaci této metody byla použita moč s přídavkem standardu glukosy. Metoda má možné využití v diagnostice.³⁴

Pro lepší detekci hmotnostní spektrometrií jsou molekuly sacharidů často derivatizovány. Typ tohoto značení může ovlivnit profil fragmentace a může zjednodušit strukturní analýzu látek. Derivatizace glykanů pomocí fenylylhydrazinu způsobila zlepšení detekce a umožnila analýzu HPLC, ESI nebo MALDI bezprostředně po derivatizaci. Po MSⁿ byly získány užitečné informace pro objasnění struktury oligosacharidů. Dále tento postup pomohl odhalit nové izomerní struktury glykanů známého i neznámého složení a byl úspěšně použit pro profilování N-glykanů získaných ze vzorků séra a z nádorových buněk.³⁵

Vodný roztok acetonitrilu obsahující oligosacharidy a matrici (2, 5-dihydroxybenzoovou kyselinu) byl zmrazen při teplotě 100 K před analýzou hmotnostní spektrometrií s UV-MALDI. Zmražený roztok generuje více oligosacharidových iontů a méně fragmentů vzniklých fragmentací za zdrojem. Navíc signál iontu je delší a účinnost generování iontů je 20 až 30 krát vyšší než u konvenční usušené směsi.³⁶

Chemické složky nepoškozeného rostlinného materiálu včetně živých rostlin byly zkoumány jednoduchou sprejovou metodou, která poskytla v reálném čase informace o sacharidech, aminokyselinách, mastných kyselinách, alkaloidech a lipidech. Experiment je možné provádět na jakékoli části rostliny a jakémkoliv rostlinném druhu. List rostliny byl uchycen do měděné svorky a vložilo se na něj vysoké napětí (4,5 kV). List mohl být navlhčen sprejovacím rozpouštědlem, ale nemusel, stačila jeho vlastní míza. Z listu se generovaly nabitě kapičky nesoucí informaci o chemickém složení přímo do vstupu hmotnostního spektrometru. Vzdálenost listu od vstupu byla přibližně 10 mm. Tato metoda je velmi užitečná pro farmaceutický průmysl, pro výzkum přírodních produktů, ale také pro porozumění metabolismu rostlin.³⁷

2.3. Analýza sacharidů pro odhalování pančování potravin a forenzní aplikace

2.3.1. Pančování potravin

Zdraví lidské populace je ovlivňováno kvalitou potravin, která je zase v přímé souvislosti s jakostí surovin a použitou technologií výroby. Je velice důležité, aby potraviny byly zdravotně nezávadné a odpovídaly deklarovanému složení. S případy falšování potravin se můžeme setkat od doby, kdy začaly být vyráběny za účelem prodeje. Jak se vyvíjely metody falšování, vyvíjely se i metody odhalování padělků.

Za zakladatele analytických postupů používaných k těmto účelům je považován Fridrich Accum, který žil na přelomu 18. a 19. století v Londýně. Podle dobových záznamů se v té době objevilo mnoho potravin, které kvůli šizení byly životu nebezpečné. Například použité lístky čaje byly „regenerovány“ varem v síranu železnatém a výluhu z ovčího hnoje, poté byly barveny octanem měďnatým, pruskou modří, mořidlem z kamepeškového dřeva (*Haematoxylum campechianum*), taninem nebo sazemi a znovu prodávány jako pravý černý čaj.³⁸

Jak odhalit toto falšování uvedl Accum ve své knize Pojednání o falšování potravin a kulinářské jedy. Nejprve jsou lístky zkoumány z botanického hlediska a srovnávány s čerstvými lístky. Hodnotí se barva, struktura povrchu, žilkování, okraje listu atd. a to všechno po 24 hodinách louhování ve vodě. Zfalšovaný černý čaj (barvený uhličitanem mědi) zanechává po navlhčení na bílém papíru modro-černé skvrny, které po pokapání kyselinou sírovou okamžitě zčervenají. Pravý čaj dává jantarovou barvu, která po přidání kyseliny nezčervená.³⁹

Nejčastěji jsou falšovány luxusní a drahé potraviny (víno, lihoviny, koření) nebo naopak potraviny, které jsou prodávány ve velkých objemech (masné a mléčné výrobky, oleje, tuky, ovocné šťávy atd.). Způsobů falšování je mnoho. Záměna potraviny za jinou a levnější, nastavování potravin levnější složkou nebo složkou pro zlepšení chuti, přítomnost nedeklarovaných složek, uvádění vyššího nebo nižšího obsahu složky, zneužití známé značky atd.

Analýza stabilních izotopů je používána při ověřování pravosti potravin. Analyzován je nejčastěji poměr $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Poměr izotopů uhlíku je závislý na typu metabolického procesu a způsobu využívání oxidu uhličitého ze vzduchu. Rozvoj instrumentálních metod, například místně specifická frakcionace přirozených izotopů (SNIF-NMR) nebo hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů (IRMS), umožnil široké aplikace, zejména autentizaci vín, prokazování ředění vín vodou, rozlišení kvasného a syntetického octa, kvasného a syntetického lihu, přísadků hydrolyzátů kukuřičného škrobu do medu i určení geografického původu různých rostlin a jejich produktů. Analýza poměru izotopů $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ se využívá k ověřování organických nebo bio produktů, například hnůj obsahuje více izotopu ^{15}N než syntetická hnojiva.³⁸

Infračervenou spektroskopii (IR) lze použít pro stanovení kvality kakaového prášku. Spektra všech vzorků byla naměřena v blízké (NIR) i střední (MIR) oblasti, byl stanoven obsah tuku podle Soxhleta a vlhkost. Izolované vysokomolekulární látky byly po hydrolýze a derivatizaci analyzovány GC. Vše bylo vyhodnoceno metodou nejmenších čtverců a analýzou hlavních komponent. Touto metodou bylo možné určit odlehlý vzorek, který se lišil nižším obsahem tuku, vyšším obsahem škrobu a vyšším obsahem glukosy od ostatních analyzovaných vzorků.⁴⁰

Infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací a NIR byly odhalovány příměsi jako třtinový a řepný invertní sirup nebo cukr v javorovém sirupu. Na přípravu 1 l javorového sirupu je potřeba 35 l stromové mízy. Jelikož se nejedná o levnou záležitost a ve složení javorového sirupu je převážně sacharóza, existují snahy o její nahrazení sacharózou z levnějších surovin. Po naměření spekter všech příměsí a vzorků a vyhodnocení metodou nejmenších čtverců a analýzou hlavních komponent byly určeny zfalšované vzorky.⁴¹

K analýze glukosy, fruktosy, sacharosy a celkového cukerného složení v reálných vzorcích džusů a ovocných šťáv byla použita NIR a metoda nejmenších čtverců. Spektra se měřila při různých vlnových délkách. Při 1393 nm bylo dosaženo nejvyšší citlivosti, ale nejnižších rozdílů mezi třemi stanovovanými sacharidy, naopak při 1472, 2254 a 2286 nm bylo možné stanovit specifickou sloučeninu ve směsi.⁴²

Odhalení umělých sladidel v ovocných džusech je komplikované, protože jejich složení je podobné cukernému složení džusů. Rychlá metoda sloužící těmto účelům je

CE-MALDI-TOF-MS. Přídavek levných umělých sladidel (sacharosa z cukrové třtiny nebo řepy a škrobové hydrolyzáty) vede ke změnám poměru koncentrace hlavních sacharidů a/nebo k přítomnosti sloučenin, které v ovocných džusech nemají být přítomny. Detekce větších oligosacharidů MALDI-TOF-MS odhaluje použití škrobového hydrolyzátu. Profil koncentrací mono- a oligosacharidů získaný CE odráží přídavek jak sacharosy, tak hydrolyzovaného škrobu. Soli, organické kyseliny a nízkomolekulární sacharidy neruší stanovení oligosacharidů metodou MALDI-TOF-MS, protože koncentrace stanovovaných látek je ve vzorku dostatečně vysoká na to, aby byly detekovány s dostatečnou citlivostí.⁴³

Detekce nečistot ve vzorcích pražené a mleté kávy metodou HPAEC-PAD se používá zejména za účelem ověření původu kávových zrn. Kávové slupky nebo obilí, nejčastěji používané suroviny při padělání kávy, se liší svým sacharidovým složením. Byly připraveny směsi o různém obsahu těchto kontaminantů v kávě a výsledky měření se vyhodnotily statistickými metodami. Bylo zjištěno, že čistá káva obsahuje vyšší koncentrace galaktosy a mannosy, kdežto slupky obsahují hlavně mannitol, arabinosu a xylosu, a obilí hlavně glukosu. Kvalita kávy se hodnotí prostřednictvím koncentrace celkových sacharidů například v arabské kávě.⁴⁴

Stanovení sacharidů v saké HPLC s upraveným fotometrickým detektorem (PPD) probíhalo na koloně modifikované karbamoylovou skupinou. PPD byl konstruován vložením dvou lineárních polarizátorů po obou stranách průtokové cely v konvenčním UV-VIS fotometrickém detektoru, který umožňuje měření optické otáčivosti chirální sloučeniny jako změnu absorbance. Analyzováno bylo několik druhů domácího a syntetického saké a na základě přítomnosti či nepřítomnosti toho kterého sacharidu, popřípadě poměru jejich koncentrací ve vzorku, mohlo být odlišeno syntetické saké od domácího. Domácí saké obsahovalo glukosu, ethyl α -D-glukosid, isomaltosu a isomaltotriosu, kdežto syntetické saké obsahovalo vyšší koncentrace malto-oligosacharidů (maltosu, maltotriosu a maltotetraosu).⁴⁵

2.3.2. Forezní aplikace

Ricin je bílkovinný jed, který inhibuje syntézu proteinů. Získává se ze semen skočce obecného a řadí se mezi látky kontrolované Úmluvou o chemických zbraních. Níže uvedená studie se zabývá možnostmi izolace ricinu, které slouží jako důkaz toho, že byl ricin získáván za účelem zneužití. První možnost je určení hmotnostního procenta ricinolejové kyseliny. Kyselinu analyzovali plynovou chromatografií po předchozí derivatizaci na methylester. Při izolaci toxinu je potřeba snížit obsah ricinového oleje, tím pádem i ricinolejové kyseliny. Její úbytek tedy dokazuje zneužití. Druhou možností je stanovení obsahu celkových monosacharidů. Jejich obsah byl opět stanoven GC po převedení na alditol acetáty. V semenech jsou přítomny hlavně jako škrob a v buněčných stěnách. Při izolaci ricinu je potřeba se těchto složek zbavit, tudíž ubývá i celkové množství monosacharidů. Naměřené změny v obsahu mastných kyselin a sacharidů byly vyhodnoceny analýzou hlavních komponent a získané výsledky odlišily různé metody izolace toxinu ze semen bez ohledu na jejich původ.⁴⁶

Biologické materiály jako vakcíny, probiotika, biopesticidy atd. vyžadují stabilizaci, aby si zachovali aktivitu nebo životaschopnost v suché formě, ve které jsou distribuovány. Stejně metody a materiály mohou být použité i pro patogeny biologického ohrožení, například *bacillus anthracis*. Stabilizátorů je více druhů, ale základ mají společný. Vždy obsahují cukerné alkoholy (mannitol a sorbitol) a disacharidy (laktosa, sacharosa, trehalosa). Metoda MALDI-MS sloužila jako screeningový nástroj pro analýzu nativních sacharidů, proteinů, peptidů atd., a k rozlišení hexos, hexitolů a disacharidů, za použití velmi malého množství vzorku (několik mikrolitrů). GC-MS umožnila lepší detekci sacharidů, které byly před analýzou redukovány na alkoholy a poté převedeny na trimethylsilyl deriváty. Kombinací těchto dvou metod vznikl účinný nástroj pro detekci stabilizátorů biologických materiálů.⁴⁷

Kvantitativní analýza sacharidů umožňuje také získat informace o povaze a složení výbušnin na bázi sacharidů. Sarazin C. a kol. validovali metodu pro analýzu devíti sacharidů ve forezních a farmaceutických vzorcích a ve vzorcích nápojů. Nederivatizované sacharidy byly analyzovány CE s přímou UV detekcí při 270 nm. Lze říci, že analýzu nerušily žádné matricové efekty. Metoda byla aplikována na reálné vzorky jako červené víno, jablečný džus, sirup na kašel, prášek z dýmavnice, zbytky po výbuchu atd.⁴⁸

V laboratoři Prefecture de Police v Paříži simulovali bombový útok v autobusu. Bomba byla vyrobena z dusičnanu amonného a moučkového cukru. Sesbírané zbytky byly analyzovány CE za účelem určení složení nálože. Metoda je schopná analyzovat anorganické kationty i anionty a sacharidy. Na základě přítomnosti sacharosy a jejích degradačních produktů (glukosy a fruktosy) lze potvrdit přítomnost cukerné složky při výrobě bomby. Pro rychlejší analýzu bezprostředně po výbuchu je snaha vytvořit přenosný přístroj.⁴⁹

CZE s nepřímou UV detekcí při 350 nm za použití 2,6-dipiridindikarboxylové kyseliny a hexadecyltrimethylamonium hydroxidu o pH 12,1 jako pozadí, dovolila stanovení devatenácti sacharidů a dalších více než třiceti látek (aminokyselin, organických kyselin, anorganických aniontů aj.) Limit detekce pro sacharidy byl od 23 do 37 mg/l. Metodou lze analyzovat více než padesát sacharidů, zahrnujících kyselé a neutrální sacharidy, aminosacharidy, fosforylované sacharidy atd. V tomto článku byla metoda použita k analýze mořského ježka a saké. Byl zkoumán vliv přítomnosti či nepřítomnosti aminokyselin a dalších látek, na chuť ježka. Měření koncentrace látek v saké pomáhá sledovat metabolické produkty fermentace, které korelují s jeho chutí.⁵⁰

Karbohydrát deficitní transferin (CDT) je látka, podle které se určuje míra alkoholismu u lidí. Používá se například při opětovném vydání řidičského průkazu, který byl zabaven za řízení pod vlivem alkoholu, při lékařských prohlídkách pracovníků na pracovní místa se zvýšenými nároky na bezpečnost (letecká doprava, armáda atd.) nebo kontrolách pacientů po protialkoholické léčbě atd. Je dáno zákony, že stanovení musí být provedeno alespoň dvěma metodami. V tomto článku porovnávali imunonefelometrickou metodu (INA) a multi-CE, přičemž HPAEC s UV-VIS detektorem sloužila k ověření správnosti výsledků. Žádných falešně negativních výsledků nebylo dosaženo, všechny metody jsou použitelné.⁵¹ Poměr CDT/transferin bývá obvykle <20%. Chronický těžký alkoholismus může způsobit CDT výsledky > 20%. Nad 30% jsou to pozoruhodné výsledky způsobené dlouhodobým extrémním chronickým alkoholismem.⁵²

2.4. Analýza sacharidů spojením iontové pohyblivosti s hmotnostní spektrometrií

V současné době je většina komplexních sacharidů analyzována technikami na bázi hmotnostní spektrometrie (MS). Problém ovšem nastane při měření molekulové hmotnosti cukrů, protože celé třídy monosacharidů mají identický sumární vzorec, a tím i molekulovou hmotnost. Řešením může být přidání další separace a to separace v plynné fázi za použití spektrometrie iontové pohyblivosti / mobility (IMS). Působením elektrického pole a inertního plynu jsou zde molekuly separovány na základě odlišného tvaru (srážkového průřezu). Metoda má široké uplatnění v analýze sacharidů, od monosacharidů, přes oligosacharidy až třeba k velkým molekulám N-glykanů.

Jedním z možných technických řešení tohoto spektrometru je iontová mobilita s využitím putující vlny (travelling wave – TW-IMS). Vzhledem k nehomogenosti elektrického pole putující vlny, používané v těchto přístrojích, nelze přímo ze změřeného driftového času určit srážkový průřez, jenž je charakteristickou veličinou pro danou látku. Je nutné použít externí kalibraci pomocí sloučenin se známým srážkovým průřezem a podobnou molekulovou identitou jako analyzovaná látka. Pro sacharidy jsou to například sodné adukty N-glykanů.⁵³

Dvacet strukturních izomerů monosacharidových methylglykosidů bylo analyzováno s využitím dvou různých přístrojů s iontovou mobilitou. Iontovou mobilitou s driftovou trubicí (drift time – DT-IMS) a TW-IMS. Všechny sloučeniny byly analyzovány jako ionty $[M+Na]^+$ v pozitivním módu. Ukázalo se, že výše zmíněné izomery vykazují rozdílné mobility. Relativní driftové časy izomerů (vztaženo na ionty se známým srážkovým průřezem) se shodovaly na obou přístrojích. Vyšší rozlišovací schopnost byla pozorována u DT-IMS. Pro sacharidové izomery byly vypočítány hodnoty srážkových průřezů z DT-IMS a byla sestrojena kalibrační křivka srážkových průřezů pro TW-IMS. Bylo dokázáno, že užitím pouze jednoho druhu separačního plynu (v tomto případě dusíku) v DT-IMS i TW-IMS a jednoho alkalického kovu (sodíku) tvořícího nabitý adukt, bylo možné oddělit řadu izomerních sloučenin, které mají pouze jemné strukturní rozdíly. Pomocí jiných separačních plynů a kovových iontů by mohlo být docíleno separace i jiných párů izomerů.

Síla koordinace, konfigurace –OH a –OCH₃ skupin, koordinační geometrie sodných aduktů atd., to vše ovlivňuje driftový čas různých izomerů.⁵⁴

Iontová mobilita s využitím asymetrické vlny o vysoké intenzitě elektrického pole (high-field asymmetric waveform – FA-IMS) poskytla dobré výsledky při oddělení izomerů disacharidů, a navíc s vysokou citlivostí a rychlostí. Analyzované roztoky cukrů měly koncentraci 1 μmol/l v methanolu s vodou (9 : 1, v/v) s 0,2 mM octanem amonným. V pozitivním módu byly k roztokům přidány chloridy lithný, sodný, draselný, rubidný a cesný o koncentraci 25 μmol/l. V negativním módu byl testován přídavek amoniaku do koncentrace 0,05%, chloridu amonného, octanu amonného a devíti halogenoctových kyselin (dichloroctové kyseliny, tribromoctové kyseliny, bromodichloroctové kyseliny atd.) o koncentraci 25 μmol/l.⁵⁵ Separace disacharidů v pozitivním módu ukázala, že kompenzační napětí roste s velikostí použitého iontu kovu a že stejný kovový adukt s jiným anomerem disacharidu nemá stejné kompenzační napětí. Nejlepší separace α a β anomerů bylo dosaženo pro adukty s rubidiem a cesiem. Vazebné izomery disacharidů byly nejlépe separovány v aduktu se sodíkem nebo jako protonované molekuly. Disacharidy s různou funkční skupinou mají různou molekulovou hmotnost a mohou být odlišeny samotnou hmotnostní spektrometrií. Experimenty s FA-IMS ukázaly, že charakter navázané skupiny je významným příspěvkem k jejich separačním vlastnostem a struktura sacharidu se jeví důležitější než jeho velikost. V negativním módu byly analyzovány disacharidy jako deprotonované molekuly nebo adukty s anionty odvozenými od halogenoctových kyselin. Tyto adukty, kromě aduktu s chloridovým aniontem, jsou nestabilní a není možné je odlišit hmotnostní spektrometrií. Anomery byly v negativním módu separovány lépe než v pozitivním. Kompenzační napětí pro anomery ve formě deprotonovaných molekul nebo aduktů s chloridovým aniontem byla shodná, ovšem vazebné izomery byly v těchto dvou formách separovány nejlépe. Nebyl pozorován jednoznačný trend v závislosti velikosti aniontu na kompenzačním napětí. Ve spektrech polohových izomerů disacharidů bylo možné pozorovat vícenásobné píky (multiple peaks), které korespondují s různými konformacemi aduktů.⁵⁵

Srážkové průřezy a separační charakteristiky pro disacharidy izolované z hovězího mucinu a trisacharidy melecitosu, rafinosu a izomaltotriosu byly získány iontovou mobilitou za atmosférického tlaku s hmotnostním spektrometrem s průletovým analyzátozem a ionizací

elektrosprejem (ESI-AP-IMS-TOF-MS). Úspěšně se od sebe podařilo oddělit jednotlivé di- a trisacharidy pomocí tvorby aduktů se sodíkem.⁵⁶

Anomery methylglykosidových isomerů a isomery redukujících cukrů byly separovány jako adukty s ionty kovů metodou ESI-AP-IMS-TOF-MS. Methylglykosidy měly ve spektru jen jeden pík, ale redukující monosacharidy poskytly více než jeden pík, což by mohl být důsledek rozdělení cyklických forem majících různou anomerní konfiguraci a/nebo formu cyklu. Míra separace jak methylglykosidů, tak monosacharidů byla významně ovlivněna povahou driftového plynu a charakterem kovových aduktů. Jak velikost molekul plynu, tak jeho polarizovatelnost mají významný dopad na celkový driftový čas a separační faktory molekul. Dwivedi P. a kol. sledovali relativní účinnost He, Ar, N₂, CO₂ při dělení α - a β -methylglykosidových aduktů se sodíkem. Výrazně odlišné separační faktory byly pozorovány v souvislosti s použitým plynem. Například α - a β -methyl-mannopyranosid nebylo možné oddělit při použití N₂, ale s CO₂ už to možné bylo. Bez ohledu na druh plynu nebo iontu bylo zjištěno, že α -methylglykosidy mají větší srážkové průřezy než β -methylglykosidy.⁵⁷

Fasciotti M. a kol. také zkoumali účinky CO₂ jako alternativního driftového plynu. Na rozdíl od dusíku dosáhli lepšího rozlišení při analýze tří párů disacharidů (cellobiosa a sacharosa, maltosa a sacharosa, maltosa a laktosa).⁵⁸

Metoda AP-IMS s kvadrupólovou iontovou pastí byla použita pro analýzu izomerů oligosacharidů. Izomery byly separovány s vysokým rozlišením a poté zkoumány jejich fragmenty pomocí MS³ experimentu. Pro ilustraci byly vybrány oligosacharidy získané z hovězího mucinu, aby bylo možné ukázat užitečnost této techniky při řešení řady problémů, které samotná technika MSⁿ nedokáže efektivně řešit, například vazebné a strukturní izomery, anomery atd. Obzvláště cenná je při hodnocení izomerní heterogenity, kdy MS/MS spektra dvou izomerů obsahují stejné produktové ionty, které se mohou lišit v relativním zastoupení. V budoucnu můžeme očekávat objevení neznámé molekuly třeba v nějakém složitém biologickém vzorku, protože AP-IMS-MSⁿ má velkou výhodu v tom, že může odhalit přítomnost izomerů, aniž bychom předem tušili něco o struktuře látky, a navíc může poskytnout fragmentační spektra separovaných izomerů.⁵⁹

IMS-MS má potenciál pro diagnostiku lidských onemocnění, jako například vrozené poruchy glykosylace (CDG). Moč pacienta s touto poruchou byla dříve analyzována

HPAEC-PAD, MALDI-TOF-MS, nanoESI/MALDI-Q-TOF-MS aj., ovšem zde je problém v automatizovaném přiřazování sumárních vzorců molekulovým iontům při jejich identifikaci pomocí fragmentace. Způsobeno je to tím, že vzorek obsahuje velké množství iontů, které mohou být i vícekrát nabitě, a vše se vzájemně překrývá. IMS-MS přineslo zjednodušení a zrychlení celé analýzy. Driftový čas (změřený metodou IMS) versus m/z (získaný z MS) poskytly obrázek, ve kterém bylo možné odlišit skupiny iontů, které byly jednou nebo vícekrát nabitě. Jednotlivé skupiny byly zpětně použité k vytvoření spekter, zvláště pro jednou nabitě ionty, dvakrát nabitě ionty atd., která jsou již přehledná a vhodná k vyhodnocení.⁶⁰

Huang Y. a kol. zkoumali adukty s kationty kovů ($[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Rb]^+$ a $[M+Cs]^+$) čtyř skupin izomerů sacharidů (pět disacharidů, čtyři trisacharidy, dva pentasacharidy a dva hexasacharidy). Výsledky ukazují, že srážkové průřezy cukerných aduktů s kovy závisely na poloměrech kovů specifickým způsobem. Driftové časy trisacharidových izomerů maltotriose a izomaltotriose ve formě $[M+Li]^+$ aduktů byly rozlišitelné, kdežto ve formě $[M+Na]^+$ aduktů byly časy shodné. Navíc adukt $[M+Cs]^+$ obrátil pořadí látek. Dále byla sestrojena závislost srážkového průřezu na velikosti kationtu, z čehož vyplynulo, že jeho velikost jednoznačně ovlivňuje velikost srážkového průřezu. Vhodnou volbou kovu lze zlepšit separaci izomerů sacharidů. U práce s neznámou látkou je třeba postupovat opatrně při identifikaci mobilních spekter. Izomer sacharidu může zaujímat více různých struktur při tvorbě aduktu s kovem a ve výsledku se mohou objevit dva píky (naznačená separace). Abychom se vyhnuli falešné pozitivní indikaci dvou izomerů, bylo doporučeno použít více než jeden kov pro analýzu.⁶¹

K derivatizaci sacharidů byla použita i kyselina boritá, konkrétně její deriváty ferrocenboritá kyselina (FBA) a 4-[2',6'-diisopropylfenoxy)methyl]fenylboritá kyselina (PBA). Analyzovány byly sacharidy lakto-N-fukopentosa 1 a 2 z lidského mléka metodou MALDI-IMS-TOF. Srážkové průřezy bylo možné určit z driftového času a nastavených experimentálních parametrů, například intenzita elektrického pole, tlak atd. Za účelem zhodnocení účinků derivatizace boritou kyselinou byly stanoveny srážkové průřezy i pro protonované $[M+H]^+$ a sodné $[M+Na]^+$ adukty. Pro FBA deriváty byly oba adukty pozorovány v téměř stejném množství, ovšem u PBA derivátů byla 98% převaha sodných aduktů, proto zde nebyly srážkové průřezy protonovaných molekul uvažovány pro porovnání. Kyselina boritá se váže na vicinální dioly sacharidů a použitím jejích různých derivátů může být driftový čas sacharidů prodloužen o různou dobu, jako tomu bylo v tomto článku. Tento

typ derivatizace má několik výhod, možnost optimalizace z hlediska separace izomerů, zvýšenou ionizační účinnost (u FBA derivatizace se zvýšila 2x) a poskytuje nové možnosti pro další charakterizaci, identifikaci a kvantifikaci různých druhů sacharidů například v glykomice a glykoproteomice.⁶²

Dwivedi P. a kol. zavedli pojem chirální spektrometrie iontové mobility (CIMS) a uvedli příklady demonstrující separaci plynem pro enantiomery z různých oblastí, například farmaceutika, aminokyseliny, sacharidy atd. CIMS je podobná klasické IMS, ale kromě separace podle tvarů a velikostí dojde ještě k oddělení iontů na základě jejich stereospecifické interakce s chirální těkavou látkou. Aby se dosáhlo chirální separace, bylo asymetrické prostředí vytvořeno dopováním driftového plynu těkavým chirálním činidlem, konkrétně (S)-(+)-butan-2-olem. Jednotlivé enantiomery vykazují jinou iontovou pohyblivost a mohou být separovány v čase. Separovány byly enantiomery atenololu, serinu, methioninu, threoninu, glukosy, penicilaminu atd. z jejich příslušné racemické směsi.⁶³

Izomery oligosacharidů kyseliny hyaluronové modifikované tyraminem (HAT) byly analyzovány iontovou mobilitou ve spojení s ionizací elektrosprejem jako deprotonované molekuly. Rozlišení překrývajících se izomerů ve spektru bylo vyřešeno redukčním značením (pomocí NaBH₄) nebo značením stabilními izotopy (pomocí NaBD₄). K identifikaci izomerů ve směsi a určení jejich poměru bylo nutné iontovou mobilitou separovat deprotonované molekuly a fragmentovat je. Redukované izomery poskytly pro ně charakteristické fragmenty. K potlačení vzniku vícenásobně nabitých iontů, které by komplikovaly analýzu, bylo používáno vyšší napětí na vzorkovacím kónusu. Správnost výsledků byla ověřena nukleární magnetickou rezonancí. Tento postup je možné uplatnit při analýze i jiných sacharidů.⁶⁴

Metodou TW-IMS byly odděleny N-glykany od ostatních sloučenin v matrici, například glykopeptidů, a byly také rozlišeny jejich izomery. N-glykany byly uvolněny z hovězího fetuinu a ionizovány elektrosprejem. Ke strukturní identifikaci byla použita CID fragmentace negativních iontů. Fragmentové ionty se mohou objevit v glykanových profilech, kde mohou být zaměněny za deprotonované molekuly glykanu. Bylo ovšem zjištěno, že fragmenty a deprotonované molekuly mají různé driftové časy, což umožňuje jejich odlišení. Metoda byla aplikována na zkoumání N-glykanů uvolněných z houby březovníku obecného, kdy byly separovány různé druhy sacharidů přítomných v biologickém extraktu.⁶⁵

Analýza glykosylace z nativních biologických vzorků je často omezená malým množstvím dostupného materiálu. N-glykany uvolněné z obalového glykoproteinu z lidského viru HIV byly analyzovány metodou ESI-IMS-MS z méně než mikrogramového množství glykoproteinů. Data mohla být naměřena ze surové inkubační směsi obsahující povrchově aktivní látky, bez předchozího čištění.⁶⁶

S rostoucími možnostmi analýzy N-glykanů roste možnost uplatnění v oblasti medicíny. Kombinace iontové mobility, hmotnostní spektrometrie a analýzy hlavních komponent pomohla v lékařské diagnostice k diferenciaci tří skupin klinických vzorků (rakovina jater, cirhóza jater a „zdravé“ vzorky). Do budoucna se očekává velký přínos této metody v diagnostice onemocnění.⁶⁷

Heparin je lineární sulfonovaný polysacharid široce používaný v medicíně kvůli jeho antikoagulačním vlastnostem. Různé možnosti sulfonace nebo acetylace heparinu umožňují různé změny konformace kolem glykosidové vazby. Tím je umožněná změna jeho antikoagulační funkce například na použití jako protirakovinné nebo antivirové léčivo. Charakterizace těchto struktur je důležitá pro objasnění jejich působení. K tomu byla použita iontová mobilita s tandemovou hmotnostní spektrometrií.⁶⁸

Vzhledem k tomu, jak je přínosné připojit IMS k běžnému MS, dalo by se očekávat, že tento trend bude stále více populární. Zlepšení poměru signál/šum, klasifikace struktur, separace izomerů, rozpoznávání prostorových uspořádání atd., to vše jen vybízí k tomu, aby se tato metoda dále rozvíjela a stala se robustním a praktickým nástrojem v analýze složitých směsí. Jak se bude stávat IMS více komerčně dostupnou, mohla by se v budoucnu stát běžnou součástí hmotnostního spektrometru.⁶⁹

Analýzou vybraných sacharidů, které se vyskytují v přírodních pryskyřicích, pomocí IMS-MS ve spojení s kapalinovou chromatografií se zabývá i tato práce. Po studiu ionizace a fragmentace byly zhodnoceny možnosti iontové mobility při jejich separaci. Některé sacharidy vykazovaly dva píky na mobilogramu. S cílem rozpoznat, zda se jedná o separaci anomerů nebo konformerů byla vyvinuta metoda založená na separaci anomerů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a následné analýze oddělených zón iontovou pohyblivostí.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie a přístrojové vybavení

Všechny experimenty byly měřeny na hmotnostním spektrometru s vysokou rozlišovací schopností Synapt G2-S HDMS (Waters, Manchester, UK) s iontovou mobilitou, kvadrupólovým a průletovým analyzátozem a elektrosprejem. Separace byla prováděna na kapalinovém chromatografu ACQUITY UPLC I-Class System (Waters, Manchester, UK). Použitá kolona byla chirální β -cyklodextrinová kolona Nucleodex β -OH, 200 x 4 mm (Macherey-Nagel, Düren, Germany).



Obr. 1 - Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem

Měřeny byly standardy sedmi cukrů a dvou kyselin (vše Sigma Aldrich, Praha, Česká republika): L-arabinoza, D-xyloza, D-glukosa, D-galaktosa, D-mannosa, D-fukosa, L-rhamnosa, D-glukuronová kyselina a D-galakturonová kyselina.

Tab. I: Struktury, názvy (zkratky názvů) a monoizotopové hmotnosti sacharidů a kyselin

$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2 \end{array} $
L-arabinoza (Ara) 150,0528 g/mol	D-xyloza (Xyl) 150,0528 g/mol	D-galaktosa (Gal) 180,0634 g/mol	D-glukosa (Glu) 180,0634 g/mol	D-mannosa (Man) 180,0634 g/mol
$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $		$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{C}-\text{OH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{C}-\text{OH} \end{array} $
L-rhamnosa (Rham) 164,0685 g/mol	L-fukosa (Fuc) 164,0685 g/mol		D-glukuronová kyselina (GluAc) 194,0427 g/mol	D-galakturonová kyselina (GalAc) 194,0427 g/mol

Používaná rozpouštědla: methanol kvality HPLC gradient grade, ethyl-acetát kvality pro LC-MS a voda kvality pro HPLC. Další používané chemikálie (hydrogenuhličitan sodný a octan sodný) byly čistoty p. a.

3.2. Pracovní postup

Byly připraveny zásobní roztoky standardů cukrů o koncentraci 10 mmol/l ve vodě, které se následně ředily na požadované koncentrace methanolem nebo směsí methanol : voda (1 : 1, v/v). Zdrojem sodných iontů byl roztok octanu sodného o koncentraci 1 g/l, jenž byl přidáván do mobilní fáze, roztoku přidávaného za kolonou nebo do roztoku měřeného cukru podle požadované výsledné koncentrace $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Hmotnostní spektrometr byl mezi analýzami promýván směsí methanol : voda (1 : 1, v/v). Jako kalibrant sloužil roztok mravenčanu sodného. Pro přímou infuzi byla koncentrace roztoků cukrů $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Kolizní plyn používaný pro fragmentaci byl argon.

LC metoda byla inspirována vědeckým článkem¹⁵ a upravena pro spojení s MS. Mobilní fáze pro kapalinovou chromatografii byla ethyl-acetát : methanol : voda (80 : 16 : 4, v/v/v) a používal se průtok 1 ml/min. Pro kapalinovou chromatografii byly vzorky cukru ředěny jen methanolem na koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Za kolonou byla přimíchávána směs methanol : voda (66 : 34, v/v) s průtokem 1 ml/min.

Tab. II: Parametry analýzy pro přímou infuzi do MS

Parametry analýzy pro přímou infuzi do MS	
Rozsah m/z	50 - 1000
Polarita	ES+
Napětí na kapiláře (kV)	2.35
Teplota zdroje (°C)	100
Vzorkovací konus (V)	30
Offset zdroje (V)	90
Teplota desolvatace (°C)	250
Průtok plynu konusem (N ₂ , l/h)	0.0
Průtok desolvatačního plynu (l/h)	550
Délka scanu (s)	1
Průtok vzorku (μl/min)	5

Tab. III: Parametry analýzy pro přímou infuzi do IMS-MS

Parametry analýzy pro přímou infuzi do IMS-MS	
Rozsah m/z	50 - 1200
Polarita	ES+
Napětí na kapiláře (kV)	2.5
Teplota zdroje (°C)	100
Vzorkovací konus (V)	25
Offset zdroje (V)	80
Teplota desolvatace (°C)	500
Průtok plynu konusem (N ₂ , l/h)	40
Průtok desolvatačního plynu (l/h)	600
Rychlost vlny (m/s)	1600
Výška vlny (V)	40
Průtok plynu v heliové cele	180
Průtok driftového plynu (N ₂ , ml/min)	110
Délka scanu (s)	1
Průtok vzorku (μl/min)	5

Tab. IV: Parametry analýzy pro LC-MS a LC-IMS-MS

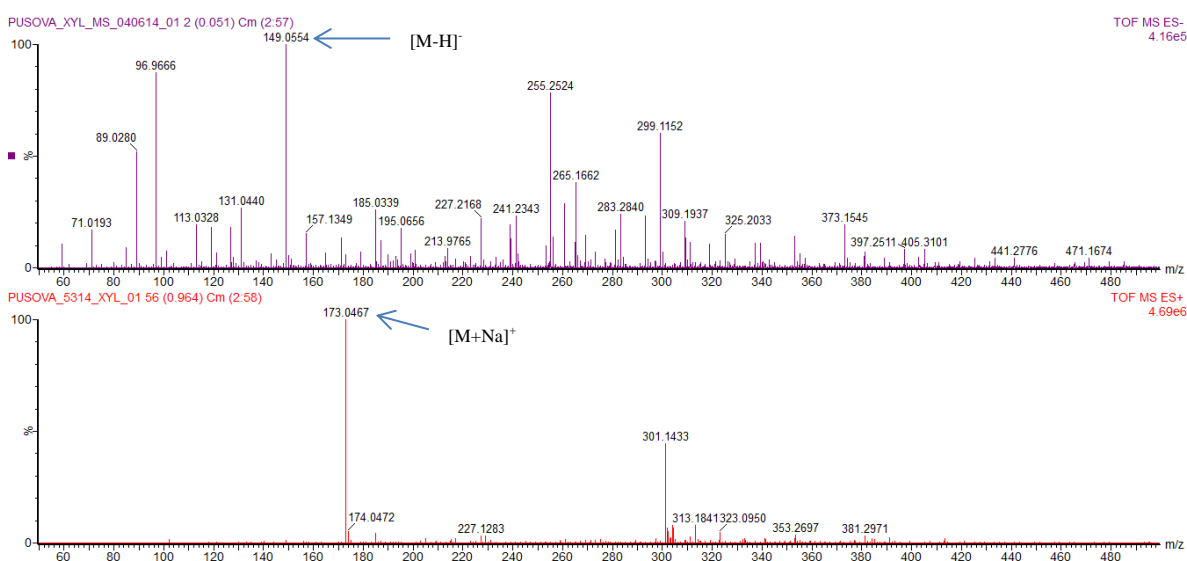
Parametry analýzy pro LC-MS a LC-IMS-MS	
Rozsah m/z	50 - 1200
Polarita	ES+
Napětí na kapiláře (kV)	2.9
Teplota zdroje (°C)	150
Vzorkovací konus (V)	25
Offset zdroje (V)	80
Teplota desolvatace (°C)	150
Průtok plynu konusem (N ₂ , l/h)	90
Průtok desolvatačního plynu (l/h)	1000
Rychlost vlny (m/s)	1200
Výška vlny (V)	40
Průtok plynu v heliové cele	200
Průtok driftového plynu (N ₂ , ml/min)	100
Teplota kolony (°C)	25
Délka scanu (s)	1
Délka analýzy (min)	15
Průtok vzorku (ml/min)	1

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Ionizace a fragmentace vybraných sacharidů

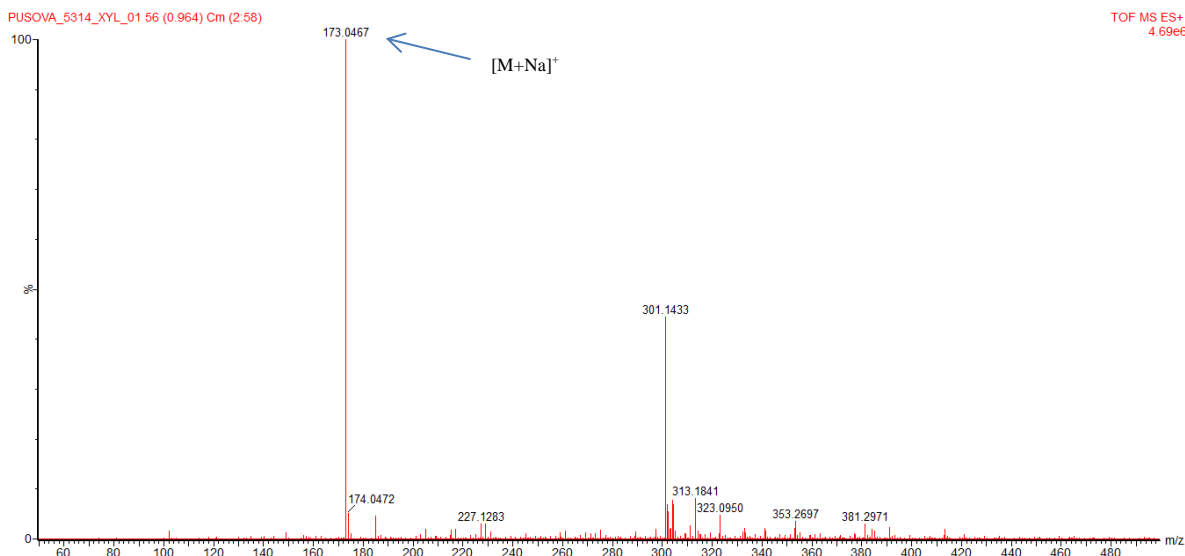
Ve snaze rozlišit od sebe jednotlivé monosacharidy, směřovaly prvotní experimenty k získání informací o každém z nich. Ve spektrech by se dala očekávat přítomnost těchto iontů $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$ pro pozitivní mód a $[M-H]^-$ a $[2M-H]^-$ pro negativní mód. Protože u všech cukrů byl v pozitivním módu pozorován jen ion $[M+Na]^+$, byl zvolen pro další experimenty.

V pozitivním i v negativním módu byla spektra totožná pro každou skupinu cukrů a kyselin, majících stejnou molekulovou hmotnost. Dále se pracovalo v pozitivním režimu, protože ion $[M+Na]^+$ měl o řád vyšší intenzitu než ion $[M-H]^-$, jak je vidět na obrázku 2.



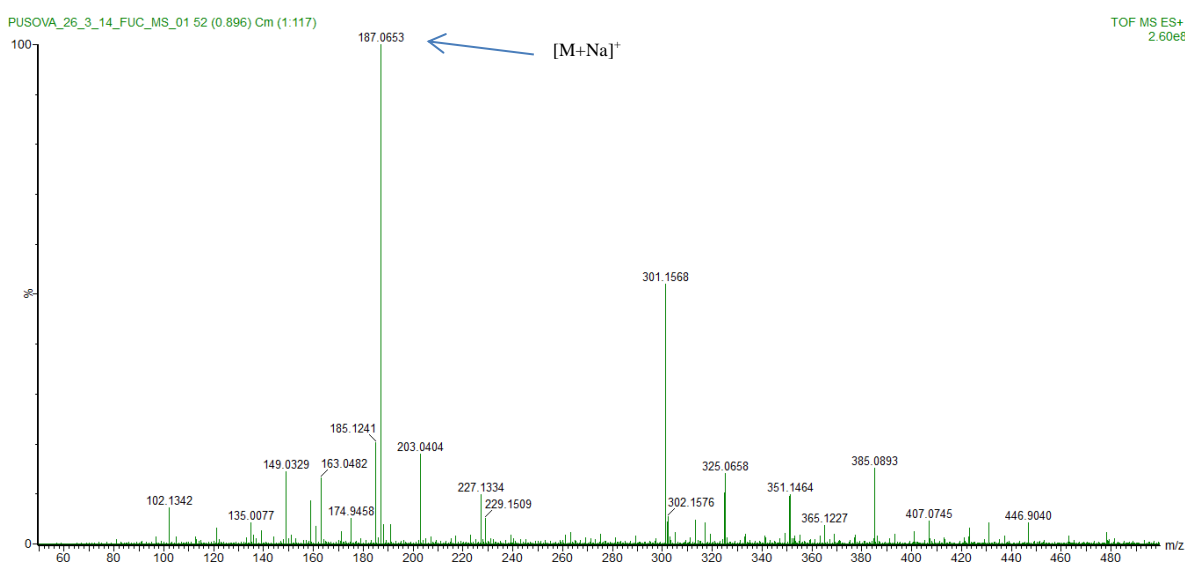
Obr. 2 – Spektrum xylosy ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ve směsi methanol : voda, 1 : 1, v/v) v negativním módu (nahore) a v pozitivním módu (dole)

Na obrázku 3 je spektrum xylosy. Jsou zde vidět píky 173 a 301. Při zamčení spektra na pík $[M+Na]^+$ byla chyba pro přiřazení píku 301 k iontu $[2M+H]^+$ 94 ppm, přesnost přístroje je řádově lepší, proto není toto přiřazení správné. K tomuto chybnému přiřazení by mohlo dojít na jiném přístroji s nižší přesností.

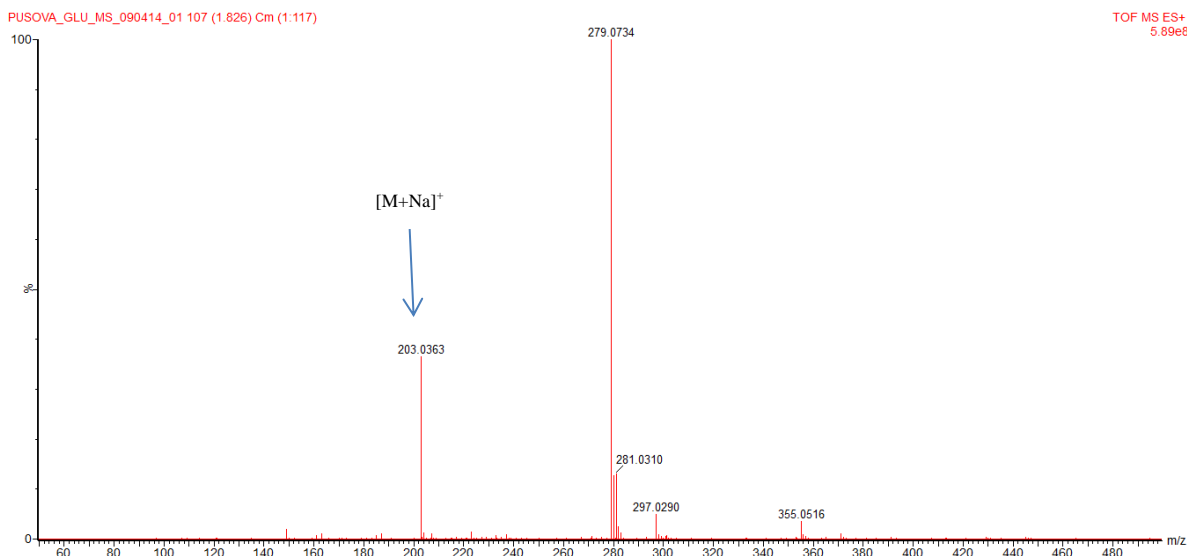


Obr. 3 – Spektrum xylosy ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ve směsi methanol : voda, 1 : 1, v/v)

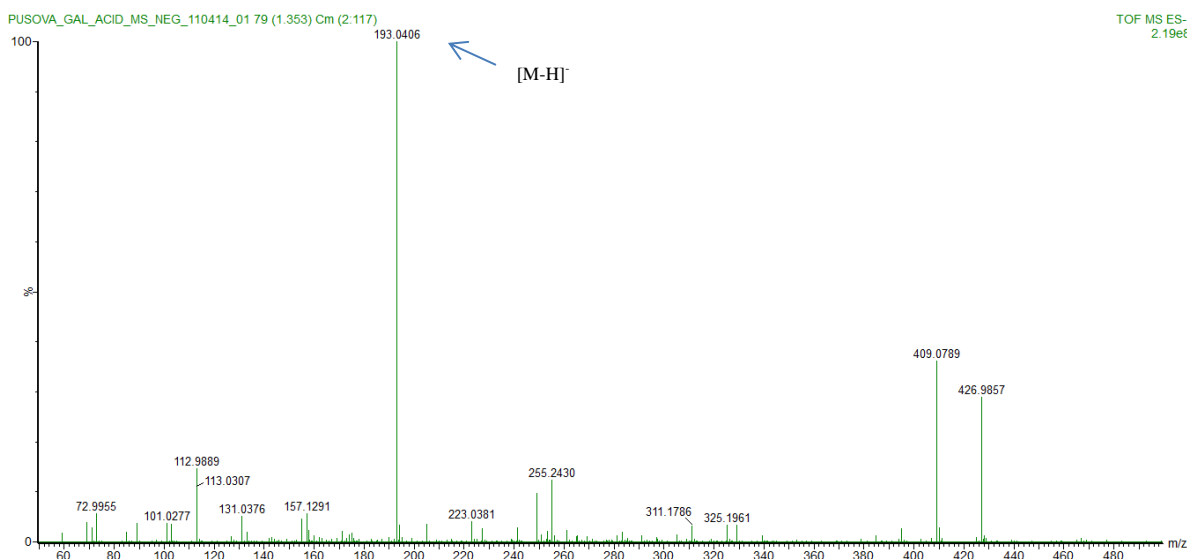
Na obrázcích 4 až 6 jsou ukázána spektra vždy jednoho zástupce ze skupiny cukrů majících stejnou molekulovou hmotnost. Spektrum fukosy (obr. 3) jako zástupce deoxyhexos (fukosa a rhamnosa), spektrum glukosy (obr. 4) jako zástupce hexos (glukosa, galaktosa a manna) a spektrum galakturonové kyseliny (obr. 5) jako zástupce alduronových kyselin (galakturonová a glukuronová kyselina). Spektrum xylosy jako zástupce pentos (xylosa a arabinosa) je na obr. 3. Spektra pro danou skupinu jsou stejná a látky patřící k téže skupině na jejich základě nelze odlišit.



Obr. 4 – Spektrum fukosy ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ve směsi methanol : voda, 1 : 1, v/v)

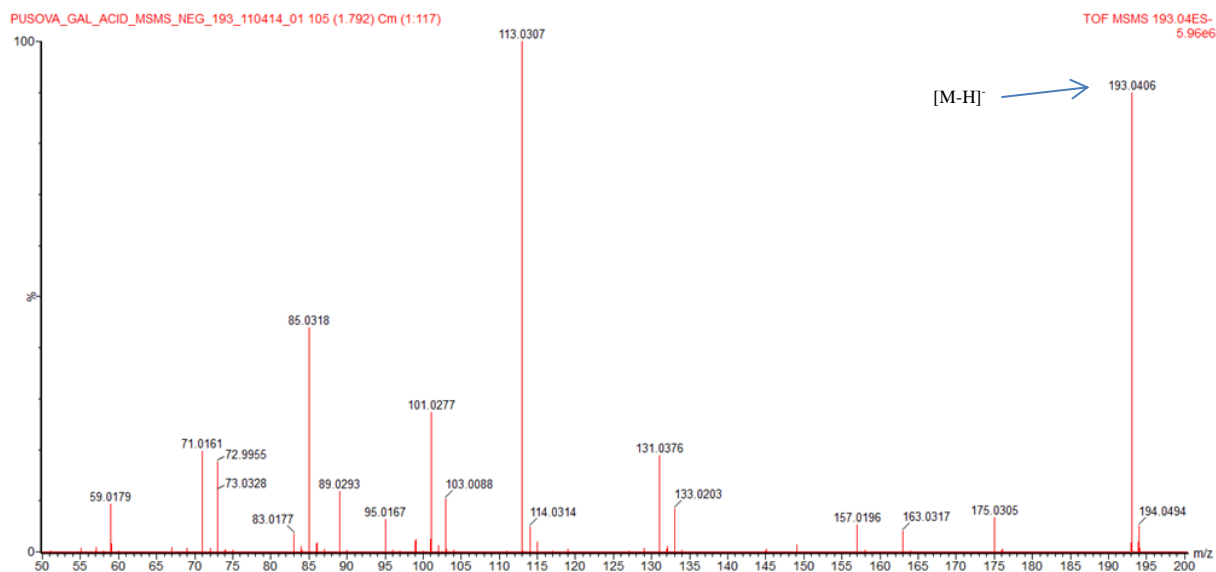


Obr. 5 – Spektrum glukosy ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ve směsi methanol : voda, 1 : 1, v/v)



Obr. 6 – Spektrum galakturonové kyseliny. ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ve směsi methanol : voda, 1 : 1, v/v)

Alduronové kyseliny byly měřeny jen v negativním módu a obě poskytly totožná hmotnostní i fragmentační spektra. Separace na iontové mobilitě nebyla pozorována, proto se s nimi dále v experimentu nepracovalo. Na obr. 7 je fragmentační spektrum galakturonové kyseliny, která poskytla píky při m/z 85, 101 a 113.

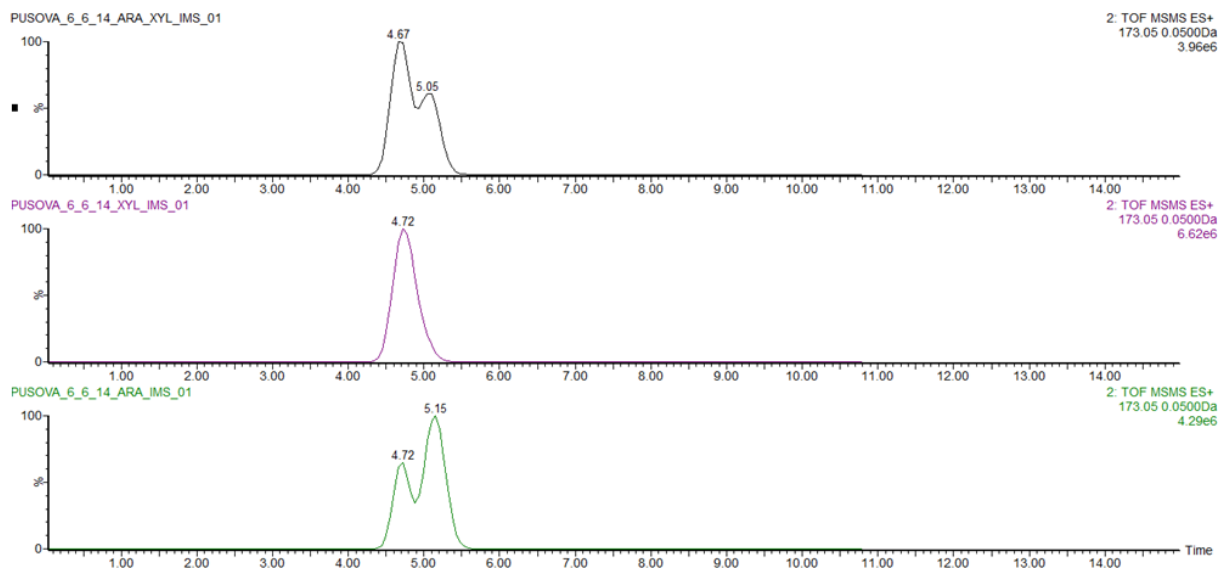


Obr. 7 – Fragmentační spektrum galakturonové kyseliny pro ion 193 ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ve směsi methanol : voda, 1 : 1, v/v)

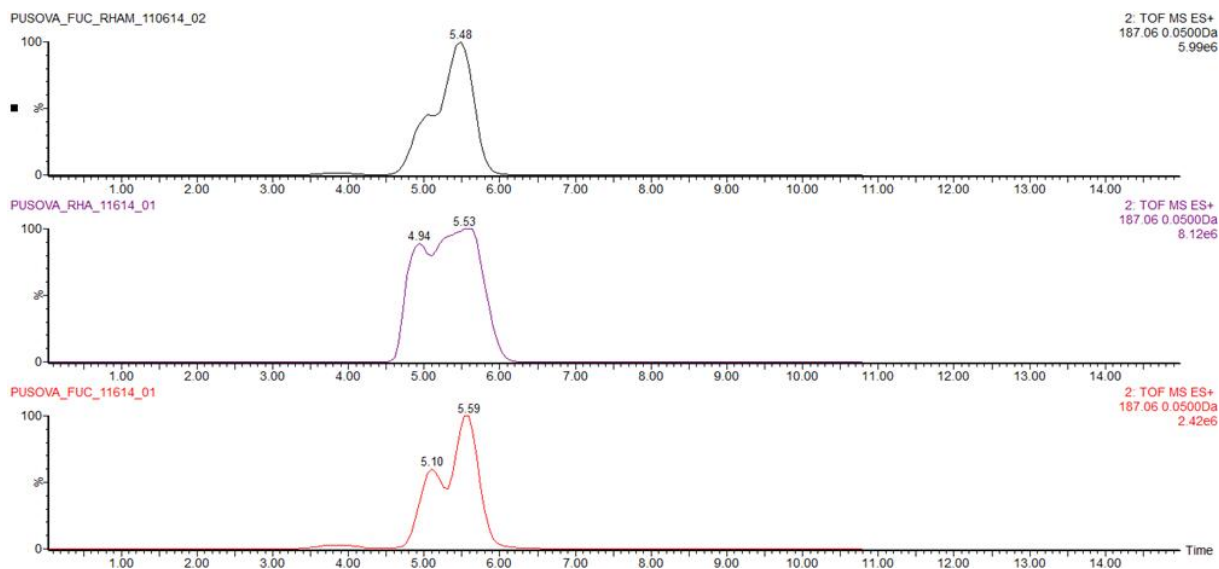
Dále byly sacharidy podrobeny fragmentaci, což vedlo ke zjištění, že ion $[M+Na]^+$ neposkytuje žádné fragmenty, pravděpodobně dojde pouze k odštěpení sodného iontu. Fragmentace neposkytuje potřebné informace pro odlišení studovaných izobarických sacharidů. Bylo by možné od sebe odlišit pouze sacharidy z různých skupin podle rozdílných hmotností.

4.2. Iontová pohyblivost

Změna přišla až s použitím iontové mobility. Byly měřeny samostatné sacharidy i směsi dvojic sacharidů v poměru 2 : 1, vždy v rámci jedné skupiny sacharidů se stejnou hmotností. Bylo zjištěno, že $[M+Na]^+$ ionty některých monosacharidů poskytují dva píky. Předpokládalo se, že by to mohly být různé konformace aduktů se sodným iontem nebo α a β anomery, a jejich separaci se experiment dále zabýval. Z obrázku 8 je vidět, že je možné v neznámém vzorku sledovat technikou IMS-MS xylosu i arabinosu, ovšem problém nastane, pokud jsou přítomny oba cukry najednou. Ve směsi poskytují podobné dva píky jako arabinosa samotná. Fukosu a rhamnosu není možné odlišit ani samostatně ani ve směsi, přestože jsou vidět dva píky, jak ukazuje obrázek 9. Bylo nutné zapojit další separaci, aby byla možná identifikace jednotlivých píků.



Obr. 8 – Separace arabinosy a xylosy iontovou mobilitou, ion $[M+Na]^+$. Směs arabinosy a xylosy (obě $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) (nahore), xylosa (uprostřed) a arabinosa (dole). Obě $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ve směsi methanol : voda, 1 : 1, v/v)



Obr. 9 – Separace rhamnosy a fukosy iontovou mobilitou, ion $[M+Na]^+$. Směs fukosy a rhamnosy (obě $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) (nahore), rhamnosa (uprostřed) a fukosa (dole). Obě $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ve směsi methanol : voda, 1 : 1, v/v)

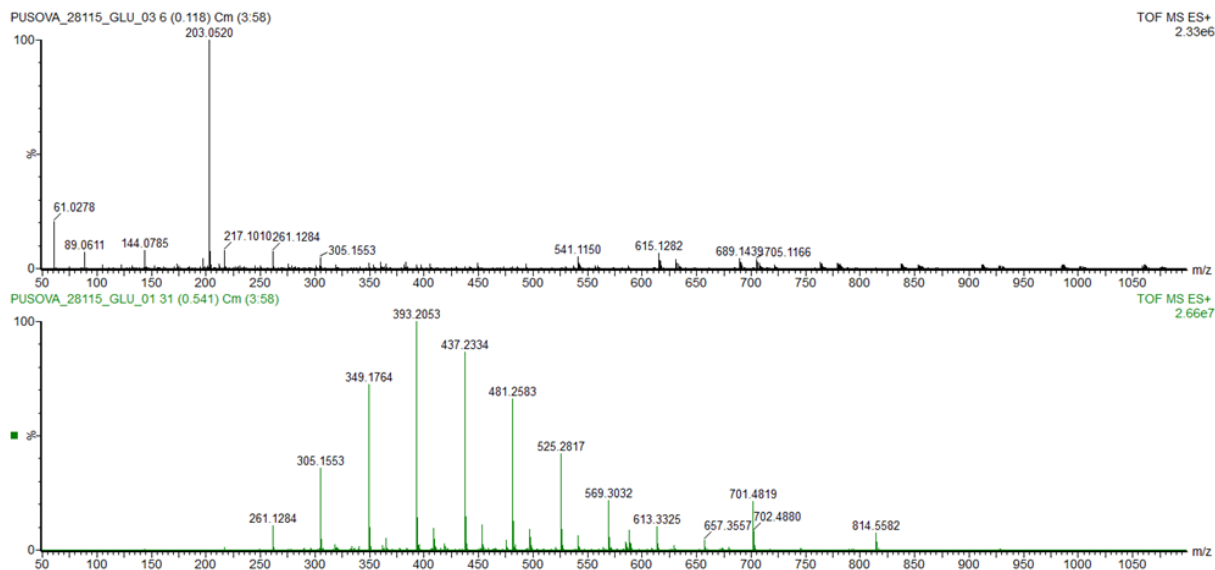
4.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s iontovou pohyblivostí a hmotnostní spektrometrií

Dalším krokem byla optimalizace metody pro spojení LC-IMS-MS, kdy jsou anomery separovány chromatograficky, a poté analyzovány iontovou mobilitou. Cílem bylo ověřit, zda se na mobilogramu např. arabinosy opravdu jedná o píky anomerů (viz obr. 8). Kdyby po separaci kapalinovou chromatografií každý pík poskytoval na mobilogramu dva píky, jednalo by se o rozdělení různých struktur aduktů se sodíkem.

Nejprve bylo nutné nalézt takovou koncentraci roztoků standardů cukrů, při které by byl ve spektru vidět ion $[M+Na]^+$ a zároveň nedošlo k překročení maximální kapacity kolony. Začínalo se na koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l a postupným zvyšováním se přišlo na koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l, která mohla být použita pro analýzu LC-MS, ale pro metodu LC-IMS-MS z důvodu nižší transmise sledovaných iontů byla dostačující až koncentrace $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Byl proveden pokus připravovat pracovní roztoky cukrů ze zásobních ředěním směsí o stejném složení jako používaná mobilní fáze v LC, tedy ethyl-acetát : methanol : voda v poměru 80 : 16 : 4, v/v/v, aby nedocházelo k ovlivňování složení mobilní fáze. Ovšem při koncentraci pracovního roztoku $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l již došlo k oddělení nemísitelných fází, proto byly zásobní roztoky ředěny jen methanolem.

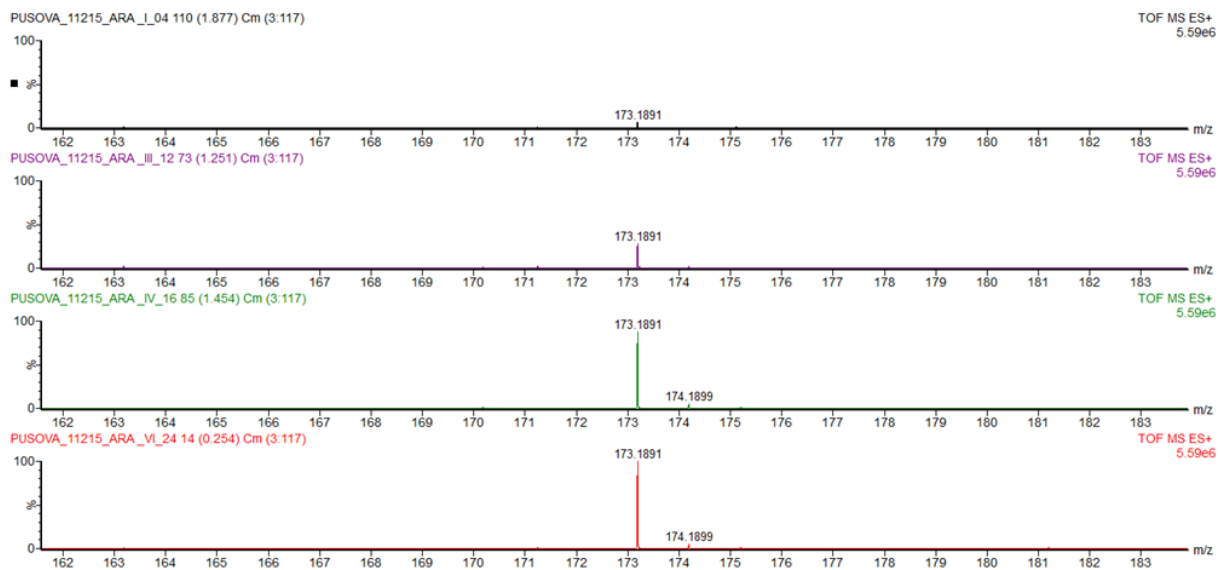
Zajímavá spektra byla získána, když se před analýzou vzorky filtrovaly přes mikrofiltr. Spektrum glukosy, filtrované přes nylonový filtr je na obrázku 10. Profil spektra by mohl být způsoben kontaminací filtru např. polyethylenglykolovými nečistotami. Při použití teflonového, nylonového i polypropylenového filtru byl vidět podobný profil spektra, pouze s jinými diferencemi a jiným umístěním ve spektru. Nižší signál vzorku cukru po filtraci by mohl být způsoben například iontovou supresí, nebo mohly být cukry špatně rozpuštěné a byly mechanicky zadrženy na filtru. Pro další experimenty nebyly vzorky filtrovány, ale byla připojena fritka před kolonu.



Obr. 10 – Ukázka spektra nefiltrovaného vzorku glukosy ($8 \cdot 10^{-5}$ mol/l v methanolu) (nahore) a stejného vzorku filtrovaného přes nylonový filtr (dole), kombinovaná infuze do hmotnostního spektrometru

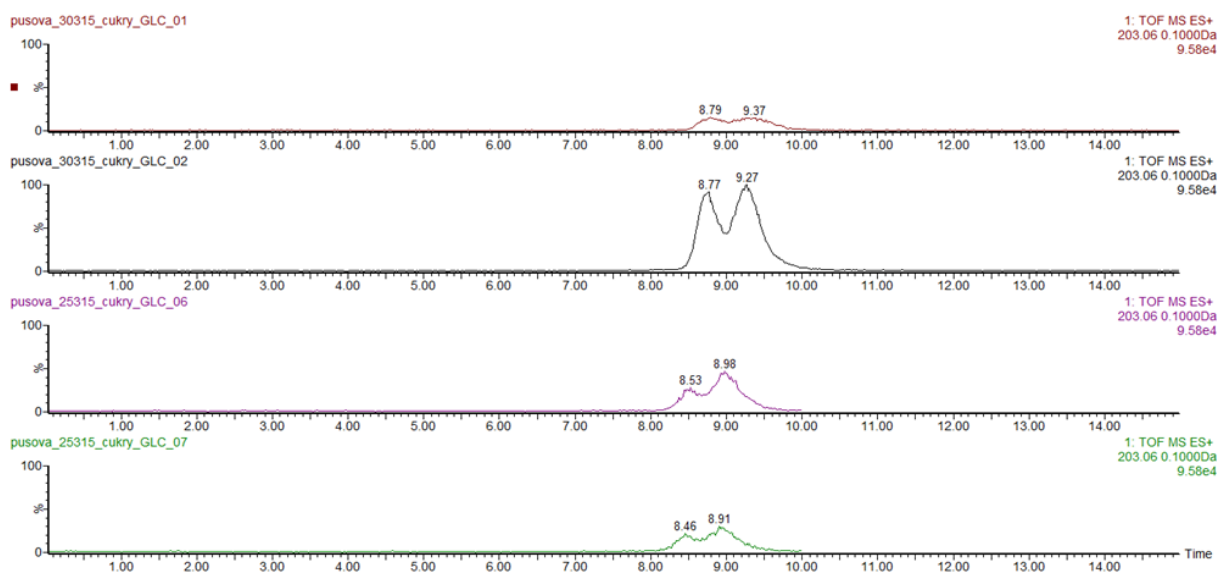
Nejintenzivnější pík ve spektrech byl ion $[M+Na]^+$. Jeho intenzita byla podpořena přidávkem Na^+ iontů. Přidávaly se různé koncentrace alternativně do mobilní fáze, do roztoku vzorku atd. Zkoumal se také vliv použití dvou různých zdrojů Na^+ iontů, CH_3COONa a $NaHCO_3$. Ukázalo se, že nezáleží na tom, který zdroj iontů se použije. Na intenzitu píků to nemělo žádný vliv.

Dále byl zkoumán vliv složení mobilní fáze na intenzitu píků, jelikož ethyl-acetát není nejvhodnější pro ionizaci sacharidů elektrosprejem. Byl připraven roztok cukru o koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, který byl pokaždé rozpuštěn v jiné mobilní fázi. V původním složení mobilní fáze ethyl-acetát : methanol : voda v poměru 80 : 16 : 4, v/v/v, dále 76 : 16 : 8, 72 : 16 : 12, 64 : 32 : 4, 48 : 48 : 4, 56 : 32 : 12 a 50 : 25 : 25. Pro testování byla použita přímá infuze do hmotnostního spektrometru. S přibývajícím obsahem methanolu a vody se zvyšovala intenzita píku $[M+Na]^+$ (viz obrázek 11), ovšem jen do té doby, dokud nedošlo k oddělení nemísitelných fází. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití poměru 56 : 32 : 12, v/v/v.



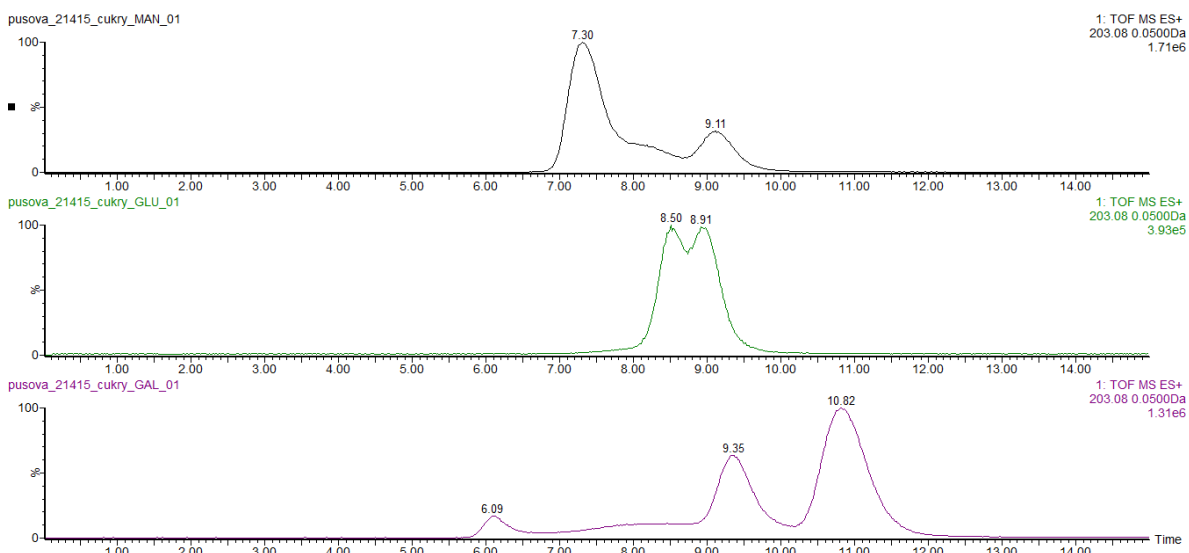
Obr. 11 – Vliv složení mobilní fáze na intenzitu $[M+Na]^+$ pro xylosu ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l v mobilní fázi o různých poměrech). Přímá infuze do hmotnostního spektrometru. Poměr ethyl-acetát : methanol : voda, shora 80:16:4, 72:16:12, 64:32:4 a 56:32:12

Následující analýzy byly poté prováděny na LC-MS s přimícháváním methanolu s vodou v poměru 66 : 34, v/v za kolonou. Testovány byly průtoky 0,1 ml/min, 0,2 ml/min a 0,3 ml/min. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při průtoku 0,1 ml/min, jak je vidět na obrázku 12. Intenzita iontu $[M+Na]^+$ se zlepšila 6,5x.



Obr. 12 – Chromatogramy vzorku glukosy ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v methanolu) pro ion $[M+Na]^+$ (m/z 203,06) s různými průtoky směsi methanolu s vodou přidávané za kolonou. Shora: bez přídavku směsi, průtok 0,1 ml/min, 0,2 ml/min a 0,3 ml/min

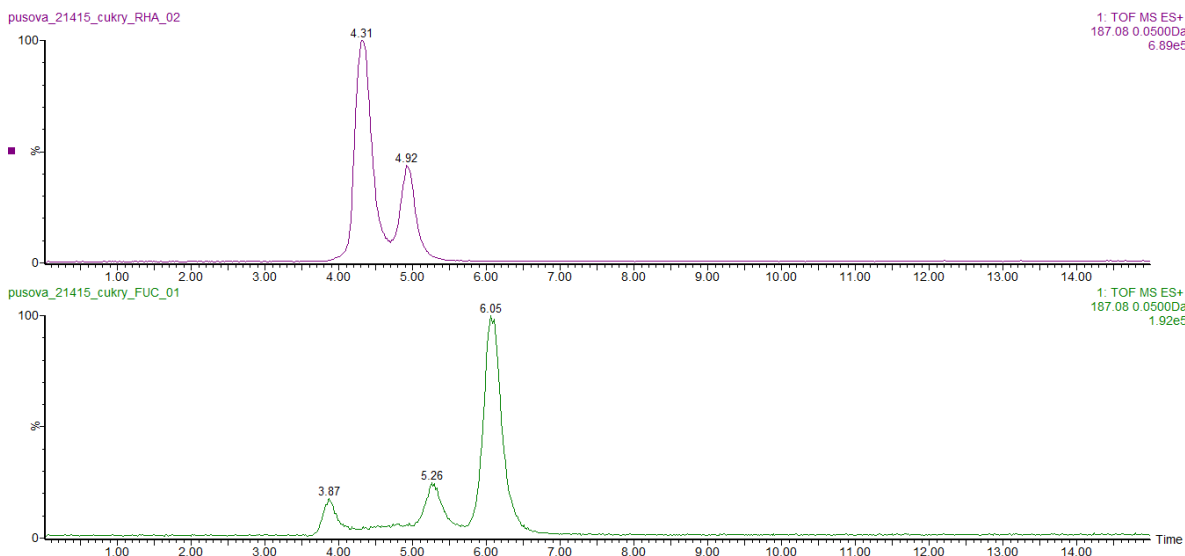
Na obrázku 13 jsou chromatogramy iontu $[M+Na]^+$ pro tři hexosy. Na každém chromatogramu je vidět přítomnost dvou píků. Kratší retenční čas má α anomer a delší retenční čas β anomer. U galaktosy je vidět ještě třetí pík v 6. minutě, který by mohl představovat furanosový cyklus.¹⁵



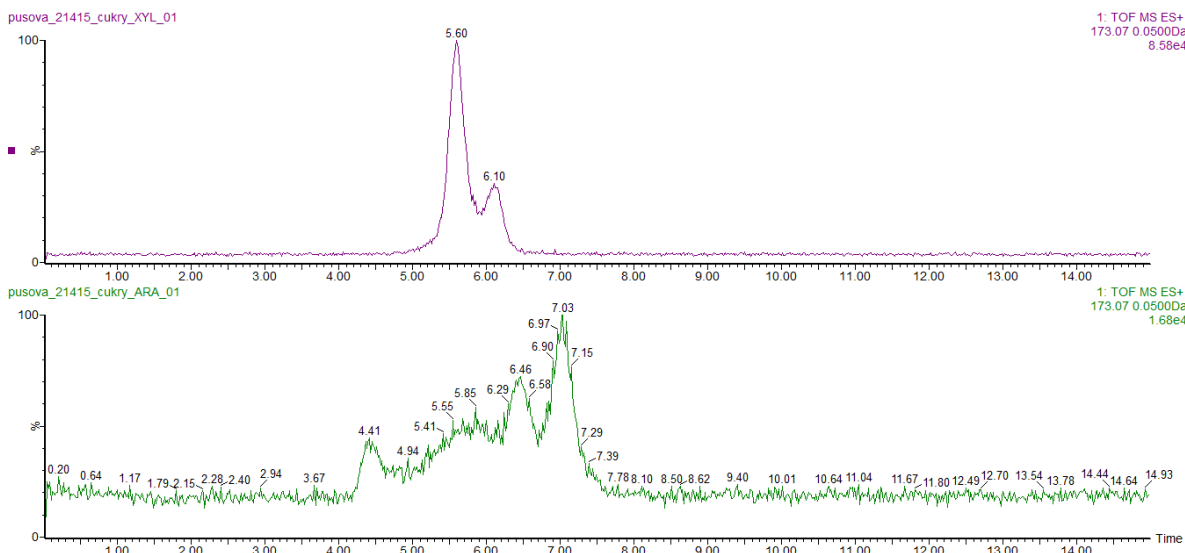
Obr. 13 – LC-MS analýza s přidáváním methanolu s vodou za kolonou. Chromatogram pro mannosu (nahore), glukosu (uprostřed) a galaktosu (dole).

Vše $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v methanolu; kolona Nucleodex β -OH, 200 x 4 mm; teplota kolony 25 °C; mobilní fáze ethyl-acetát : methanol : voda (80 : 16 : 4, v/v/v) průtok 1 ml/min; pomocná směs methanol : voda (66 : 34, v/v) průtok 0,1 ml/min; nástřik vzorku 5 μ l

Na obrázku 14 jsou chromatogramy iontu $[M+Na]^+$ pro dvě deoxyhexosy. Stejně jako u hexos, i zde odpovídá pík s kratším retenčním časem α anomeru a delším retenčním časem β anomeru. Fukosa má ještě třetí pík před 4. minutou, který by opět mohl představovat furanosový cyklus.



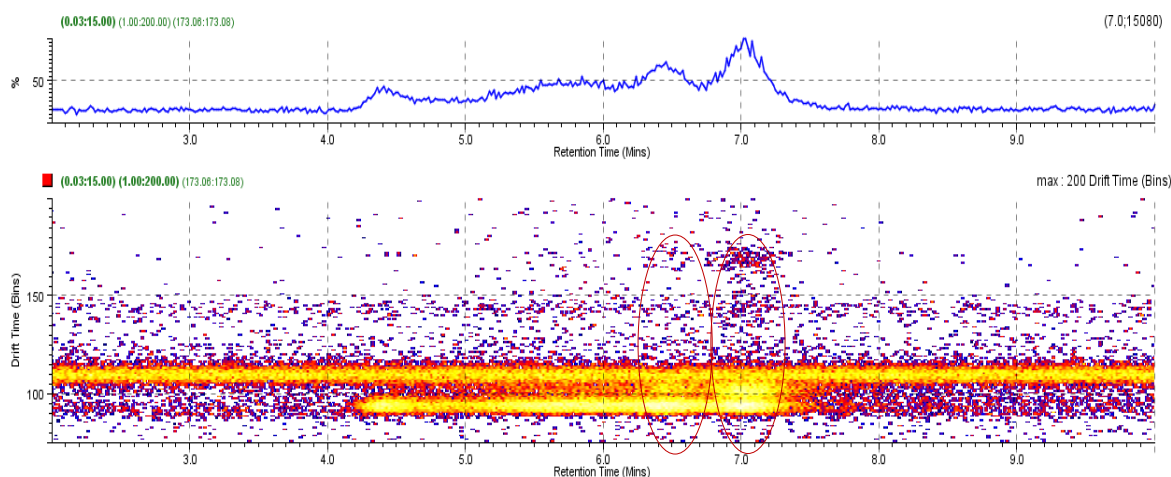
Obr. 14 – LC-MS analýza s přidáváním methanolu s vodou za kolonou. Chromatogram pro rhamnosu (nahore) a fukosu (dole).
 Vše $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v methanolu; kolona Nucleodex β -OH, 200 x 4 mm; teplota kolony 25 °C; mobilní fáze ethyl-acetát : methanol : voda (80 : 16 : 4, v/v/v) průtok 1 ml/min; pomocná směs methanol : voda (66 : 34, v/v) průtok 0,1 ml/min; nástřik vzorku 5 μ l



Obr. 15 – LC-MS analýza s přidáváním methanolu s vodou za kolonou. Chromatogram pro xylosu (nahore) a arabinosu (dole). Vše $1 \cdot 10^{-3}$ M v methanolu.
 Vše $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v methanolu; kolona Nucleodex β -OH, 200 x 4 mm; teplota kolony 25 °C; mobilní fáze ethyl-acetát : methanol : voda (80 : 16 : 4, v/v/v) průtok 1 ml/min; pomocná směs methanol : voda (66 : 34, v/v) průtok 0,1 ml/min; nástřik vzorku 5 μ l

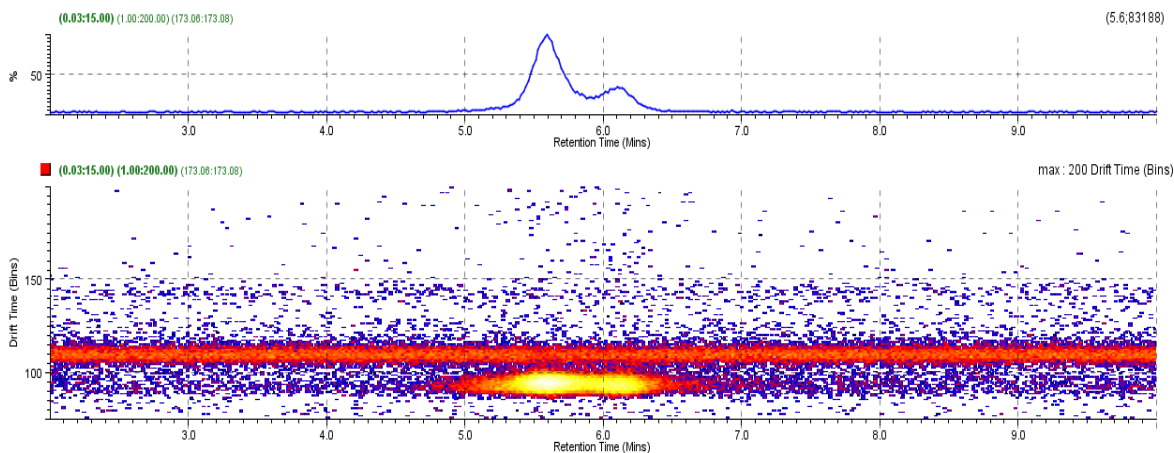
Obrázek 15 představuje chromatogramy iontu $[M+Na]^+$ pro dvě pentosy. Pík s kratším retenčním časem je α anomer a s delším retenčním časem β anomer. Chromatogram pro arabinosu byl pravděpodobně ovlivněn nepředvídanou interferencí, nebo by se mohlo jednat o separaci více forem sacharidu, například α -D-pyranosy, β -D-pyranosy, α -L-pyranosy, β -L-pyranosy, popřípadě furanosové formy.

Na obrázcích 16-22 jsou ukázány mobilitní záznamy z LC-IMS-MS analýzy pro každý monosacharid. Na každém obrázku je chromatogram (nahore) a 2D graf, kde na ose x je retenční čas a na ose y je driftový čas (dole). Vše je vztaženo na ion $[M+Na]^+$ každého sacharidu.



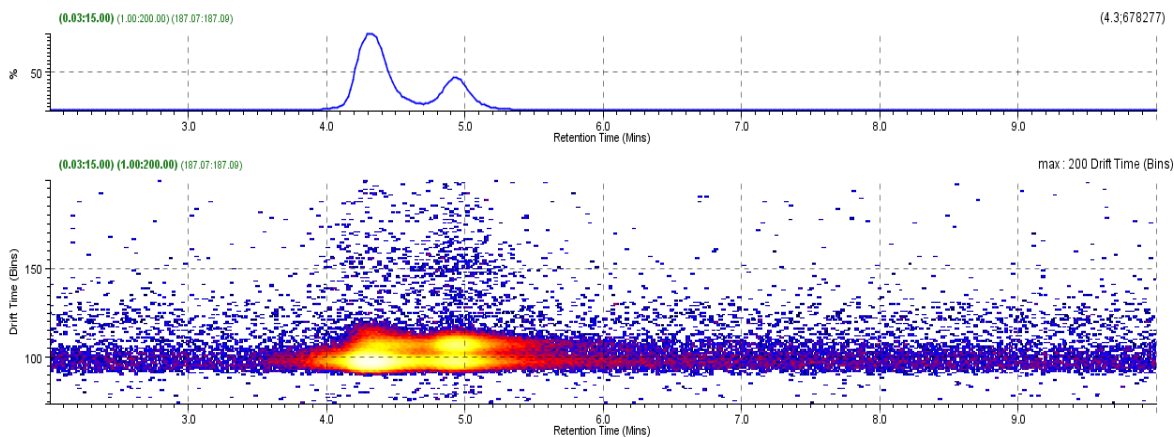
Obr. 16 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy arabinosy

Na obrázku 16 jsou data pro arabinosu. V 2D grafu jsou červeně označeny oblasti, kde je možné vidět separaci ve směru osy y. Jedná se o různé struktury aduktů se sodíkem pro anomery α a β .



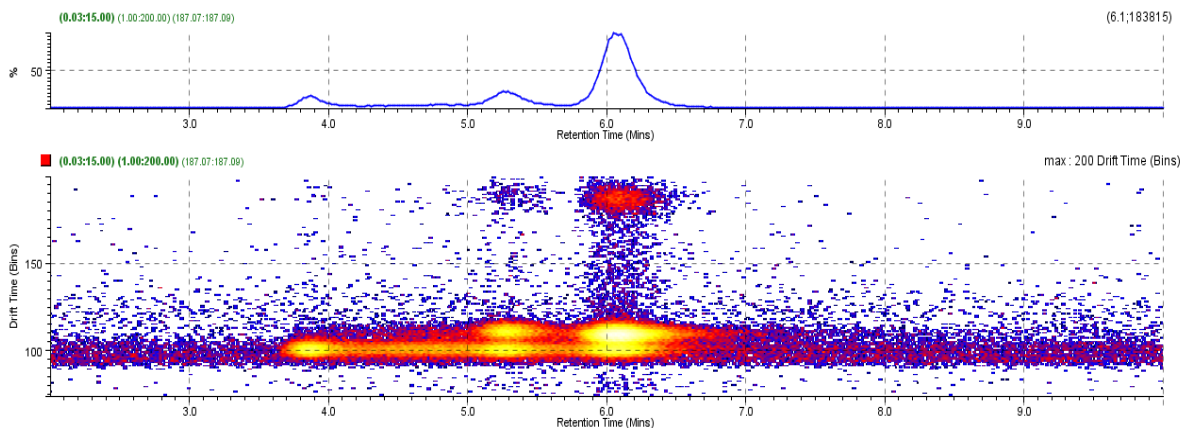
Obr. 17 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy xylosy.

Ve 2D grafu xylosy (Obr. 17) není vidět separace různých struktur aduktů sacharidu se sodíkem. U rhamnosy je možné tuto separaci pozorovat (Obr. 18).



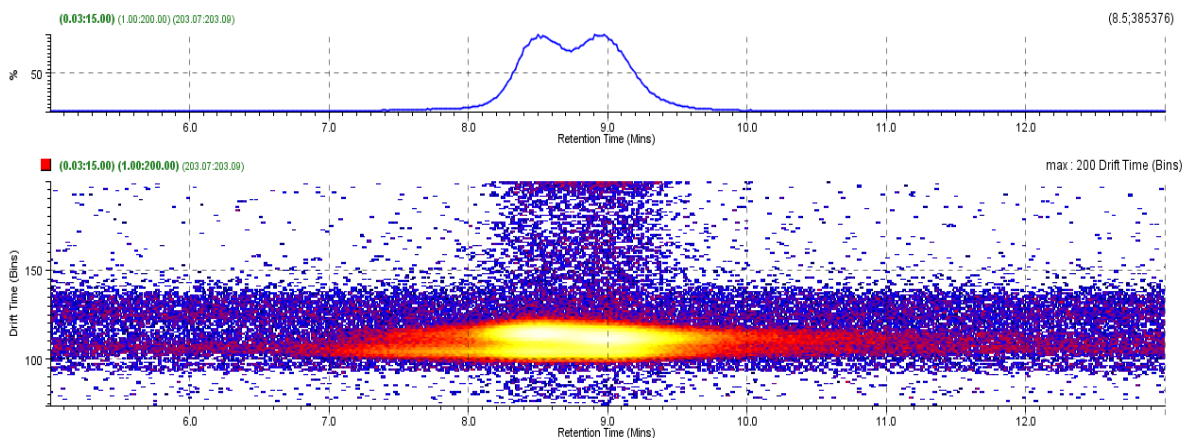
Obr. 18 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy rhamnosy

Fukosa poskytuje ještě třetí pík navíc, jak již bylo zmíněno, jedná se pravděpodobně o furanosový cyklus, který neposkytuje žádné další separace. Oba pyranosové anomery poskytují separaci aduktů (Obr. 19).

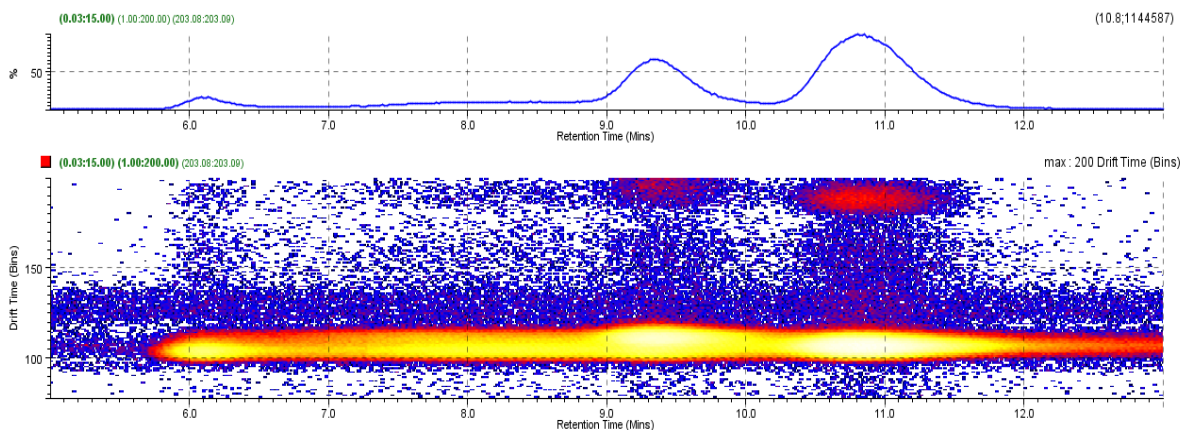


Obr. 19 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy fukosy

Glukosové anomery nejsou dobře separovány, nelze proto s jistotou říct, zda dochází k separaci různých struktur aduktů či nikoliv (Obr. 20)

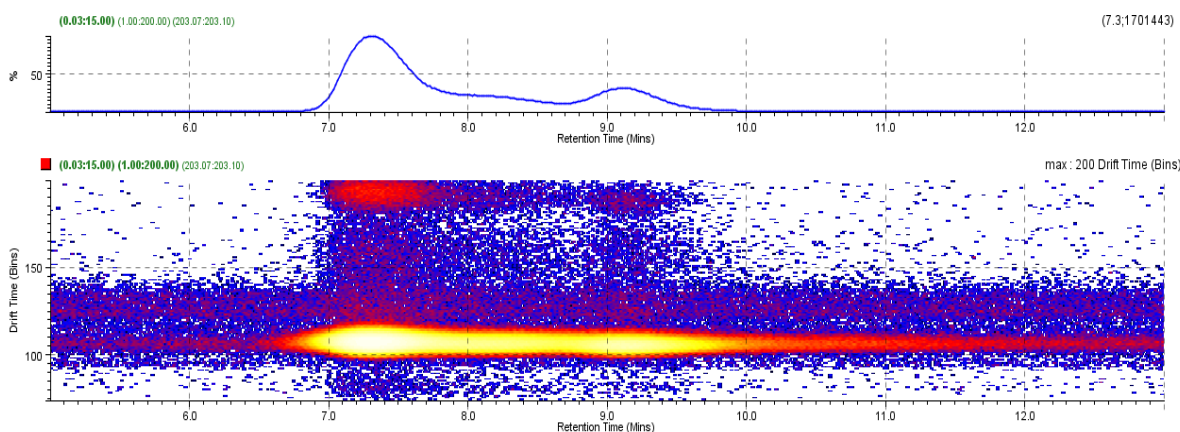


Obr. 20 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy glukosy



Obr. 21 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy galaktosy

Ve 2D grafu galaktosy lze pozorovat tři píky, jako tomu bylo u fukosy, avšak není zde žádná separace aduktů (Obr. 21). Ani u mannosy není pozorována separace různých struktur aduktů sacharidu se sodíkem (Obr. 22).



Obr. 22 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy mannosy

Arabinosa, fukosa a rhamnosa poskytovaly dva píky při mobilitní separaci, jak ve spojení s kapalinovou chromatografií, tak bez ní. Ke správné interpretaci těchto píků samotná mobilita nestačí, je nutné použít chromatografickou separaci, která oddělí anomery a poté iontová mobilita potvrdí nebo vyvrátí existenci různých struktur aduktů sacharidu se sodíkem. Separace aduktů iontovou mobilitou nebyla pozorována, po chromatografické separaci je jejich driftový čas stejný. U galaktosy, glukosy, mannosy a xylosy byl pozorován jen jeden pík na mobilogramu. Nemusí to znamenat, že tyto sacharidy neposkytují různé struktury aduktů, struktury se jen nemusí dobře separovat.

5. ZÁVĚR

Analýza sacharidů představuje poměrně komplikovaný problém. Tato skupina látek pokrývá široký rozsah molekulových hmotností (monosacharidy až polysacharidy), vykazuje velkou variabilitu konfigurací, vzájemných vazeb monosacharidových jednotek a větvení polysacharidových řetězců. Analýza je prováděna z nejrůznějších důvodů např. studium biologických systému, má také význam při odhalování pančování potravin a při forenzních aplikacích. Je možné například odlišit různé přírodní pryskyřice, což lze využít při ověřování pravosti uměleckých děl. Analyzováno bylo sedm monosacharidů a dvě alduronové kyseliny, které mohou pryskyřice charakterizovat.

Ionizace poskytovala ion $[M+Na]^+$ pro sacharidy v pozitivním módu a $[M-H]^-$ ion v negativním módu pro sacharidy i kyseliny. Pro sacharidy je ionizace efektivnější v pozitivním módu, pro kyseliny v negativním. Ve skupině sledovaných látek jsou látky izobarické, které na základě hmotnostních spekter nebylo možné odlišit. Testováno bylo uplatnění iontové mobility. Žádná separace nebyla pozorována u kyseliny, u izobarických sacharidů byly v některých případech pozorovány dva mobilitní píky, ovšem nejen pro jejich směsi, ale i pro jednotlivé látky. Pro rozhodnutí, zda se jedná o separaci anomerů nebo různých struktur aduktů se sodíkem byla vyvinuta nová metoda. Ta je založena na spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie sloužící k separaci anomerů a následné analýze jednotlivých anomerů spojením iontové mobility s hmotnostní spektrometrií. Ukázalo se, že pro on-line spojení LC-IMS-MS je důležitá modifikace mobilní fáze za kolonou. Hlavní složka mobilní fáze ethyl-acetát není vhodná pro ionizaci elektrosprejem. Efektivitu ionizace se podařilo vyřešit přimísením směsi methanol : voda do mobilní fáze za kolonou. Vyvinutá metoda poskytovala požadovanou separaci. Prokázala přítomnost α a β anomerů (chromatografickou separací), které u některých sacharidů poskytovaly nejméně dvě možné struktury aduktů se sodíkem (mobilitní separace). Navržená metoda má obecnější charakter a může být využita při analýze dalších sacharidů.

6. LITERATURA

1. Černý M. a kol.: *Sacharidy*. Česká společnost chemická, Praha 2010.
2. Chang Ch.-F.: *Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. InTech, Croatia 2010.
3. Davídek J.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Nakl. techn. lit. 1977.
4. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin*. Osis, 2009.
5. Nollet L. M. L.: *Handbook of food analysis. Vol. 1, Physical characterization and nutrient analysis*. CRC Press, London 2004.
6. Teslová P., Kalina J., Urban O.: Chem. Listy **104**, 867-870 (2010)
7. Tkáč J., Švitel J., Šturdík E.: Chem. Listy **93**, 563-569, (1999)
8. Synytsya A. a kol.: Chem. Listy **104**, 684-691, (2010)
9. Rassi E. Z.: *Carbohydrate analysis by modern chromatography and electrophoresis*. Journal of chromatography library 66, 2002.
10. Blakeney A. B. a kol.: Carbohydr. Res. **113**, 291-299 (1983)
11. Brunton N. P. a kol.: Food Chem. **104**, 398-402 (2007)
12. Wrolstad R. E.: *Food Carbohydrate Chemistry*, Wiley-Blackwell 2012.
13. Legarová V., Kouřimská L.: Chem. Listy **105**, 869-873 (2011)
14. Kořínková A. a kol.: Chem. Listy **108**, 667-672 (2014)
15. Schumacher D., Kroh W. L.: Food Chem. **54**, 353-356 (1995)
16. Oshima R. a kol.: J. Chromatogr. **192**, 452-456 (1980)
17. Hardy M.R., Townsend R.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 3289-3293 (1988)
18. Lopes J. F., Gaspar E. M. S. M.: J. Chromatogr. A **1188**, 34-42 (2008)
19. Li H. a kol.: Biotechnol. Lett. **35**, 1405-1409 (2013)
20. Zhang P. a kol.: J. Chromatogr. B **878**, 1135-1144 (2010)
21. Silva A. S. a kol.: Chromatographia **76**, 1117-1124 (2013)
22. Kumar C. S. Ch. a kol.: Adv. Anal. Chem. **2**, 32-36 (2012)
23. White Ch. A. a kol.: Carbohydrate Research **119**, 241-247 (1983)
24. Karlsson G. a kol.: J. Chromatogr., A **1092**, 246-249 (2005)
25. Lafosse M., Herbreteau B., Morin-Allory L.: J. Chromatogr. A **720**, 61-73 (1996)
26. Lafosse M. a kol.: J. Chromatogr. **505**, 191-197 (1990)
27. Salvador A. a kol.: J. Chromatogr., A **785**, 195-204 (1997)

28. Lefler J. L., Chen R.: LCGC North Am. 42-43 (2008)
29. Žídková J., Chmelík J.: Chem. Listy **94**, 1093-1103 (2000)
30. Kailemia M. J., Ruhaak L. R., Lebrilla C. B., Amster I. J.: Anal. Chem. **86**, 196-212 (2014)
31. Mauri P. a kol.: Rapid Commun. Mass Spectrom. **16**, 743-748 (2002)
32. Fabrik I., Cmelik R., Bobalova J.: Int. J. Mass Spectrom. **309**, 88-96 (2012)
33. Harvey D. J.: Mass Spectrom. Rev. **18**, 349-451 (1999)
34. Su Ch.-L., Tseng W.-L.: Anal. Chem. **79**, 1626-1633 (2007)
35. Lattová E., Perreault H.: J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. **793**, 167-179 (2003), Lattová E. a kol.: Rapid Commun. Mass Spectrom. **23**, 2983-2995 (2009)
36. Liang Ch.-W. a kol.: Anal. Chem. **84**, 3493-3499 (2012)
37. Liu J., Wang H., Cooks R. G., Ouyang Z.: Anal. Chem. **83**, 7608-7613 (2011)
38. Čížková H. a kol.: Chem. Listy **106**, 903-910 (2012)
39. Accum F.: A Treatise on Adulterations of Food, and Culinary Poisons: Exhibiting the Fraudulent Sophistications of Bread, Beer, Wine, Spiritous Liquors, Tea, Coffee, Cream, Confectionery, Vinegar, Mustard, Pepper, Cheese, Olive Oil, Pickles, and Other Articles Employed in Domestic Economy and Methods of detecting them. AB'M Small, Philadelphia 1820.
40. Trčilová A. a kol.: Chem. Listy **99**, 821-824 (2005)
41. Paradkar M. M. a kol.: J. Sci. Food Agric. **82**, 497-504 (2002)
42. Rambla F. J. a kol.: Anal. Chim. Acta **344**, 41-53 (1997)
43. Žídková J., Chmelík J.: J. Mass Spectrom. **36**, 417-421 (2001)
44. Garcia L. M. Z. a kol.: J. Chromatogr. Sci. **47**, 825-832 (2009)
45. Hayakawa K. a kol.: Biomed. Chromatogr. **14**, 72-76 (2000)
46. Colburn H. A. a kol.: Anal. Chem **82**, 6040-6047 (2010)
47. Wunschel D. S. a kol.: Talanta **85**, 2352-2360 (2011)
48. Sarazin C. a kol.: Talanta **99**, 202-206 (2012)
49. Sarazin C. a kol.: Talanta **103**, 301-305 (2013)
50. Soga T., Imaizumi M.: Electrophoresis **22**, 3418-3425 (2001)
51. Bortolotti F. a kol.: Clin. Chim. Acta **416**, 1-4 (2013)
52. Arndt T. a kol.: Forensic Science International **175**, 27-30 (2008)
53. Pagel K., Harvey D. J.: Anal. Chem. **85**, 5138-5145 (2013)

54. Li H. a kol.: Anal. Chem. **84**, 3231-3239 (2012)
55. Gabryelski W., Froese K. L.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. **14**, 265-277 (2003)
56. Clowers B. H. a kol.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. **16**, 660-669 (2005)
57. Dwivedi P. a kol.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. **18**, 1163-1175 (2007)
58. Fasciotti M. a kol.: J. Mass Spectrom. 47(12), 1643-1647 (2012)
59. Zhu M. a kol.: Anal. Bioanal. Chem **394**, 1853-1867 (2009)
60. Vakhrushev S. Y. a kol.: Anal. Chem. **80**, 2506-2513 (2008)
61. Huang Y., Dodds E. D.: Anal. Chem. **85**, 9728-9735 (2013)
62. Fenn L. S., McLean J. A.: Chem. Commun. **43**, 5505-5507 (2008)
63. Dwivedi P. a kol.: Anal. Chem. **78**, 8200-8206 (2006)
64. Hermanová M., Iordache A. M., Slovákova K., Havlíček V., Pelantová H., Lemr K.: J. Mass Spectrom. (2015)
65. Harvey D. J. a kol.: Electrophoresis **34(16)**, 2368-2378 (2013)
66. Harvey D. J. a kol.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. **22(3)**, 568-581 (2011)
67. Isailovic D. a kol.: J. Proteome. Res. **11(2)**, 576-585 (2012)
68. Seo Y., Andaya A., Leary J. A.: Anal. Chem. 84(5), 2416-2423 (2012)
69. Kanu A. B. a kol.: J. Mass. Spectrom. **43**, 1-22 (2008)

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- AP – atmosférický tlak
ATP – adenosintrifosfát
CDG – vrozené poruchy glykosilace
CDT – karbohydrát deficitní transferin
CE – kapilární elektroforéza
CEC – kapilární elektrochromatografie
CID – kolizí indukovaná disociace
CIMS – chirální spektrometrie iontové mobility
CZE – kapilární zónová elektroforéza
DNA – deoxyribonukleová kyselina
DT – driftový čas
ECD – disociace záchytem elektronu
ELSD – detektor rozptylu světla
ESI – elektrosprejová ionizace
FAB – ionizace urychlenými částicemi
FA-IMS – iontová mobilita s využitím asymetrické vlny o vysoké intenzitě elektrického pole
FBA – ferrocenboritá kyselina
FFF – separace tokem v silovém poli
FID – plamenoionizační detektor
GC – plynová chromatografie
HAT – tyraminem modifikovaná kyselina hyaluronová
HILIC – hydrofilní interakční chromatografie
HPAEC – iontově výměnná chromatografie
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC – iontová chromatografie
IMS – spektrometrie iontové pohyblivosti
INA – imunonefelometrická metoda
IR – infračervená
IRMS – hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů

LC – kapalinová chromatografie
LOD – limit detekce
LSD – detektor rozptylu světla
MALDI – laserová ionizace/desorpce za účasti matrice
MIR – střední infračervená oblast
MS – hmotnostní spektrometrie
NAD – nikotinamidadeninukleotid
NIR – blízká infračervená oblast
NMR – nukleární magnetická rezonance
ODS – oktadecylsilanizovaná kapilára
PAD – pulzní amperometrický detektor
PBA – 4-[2',6'-diisopropylfenoxy)methyl]fenylboritá kyselina
PMP – 1-fenyl-3-methylpyrazol-5-on
PPD – polarizovaný fotometrický detektor
PPMP – 1-(4-isopropyl) fenyl-3-methylpyrazol-5-on
Q-TOF – kvadrupólový analyzátor s průletovým detektorem
RI – refraktometrický detektor
RNA – ribonukleová kyselina
RP – reverzní fáze
SALDI – povrchově asistovaná laserová desorpce/ionizace
SEC – gelová chromatografie
SFC – superkritická fluidní chromatografie
SNIF – místně specifická frakcionace přirozených izotopů
TLC – tenkovrstevná chromatografie
TMS – tetramethylsilan
TOF – průletový detektor
TW – putující vlna
UV – ultrafialová
VIS – viditelné záření

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem

Obr. 2 – Spektrum xylosy v negativním módu (nahore) a v pozitivním módu (dole)

Obr. 3 – Spektrum xylosy

Obr. 4 – Spektrum fukosy

Obr. 5 – Spektrum glukosy

Obr. 6 – Spektrum galakturonové kyseliny

Obr. 7 – Fragmentační spektrum galakturonové kyseliny pro ion 193

Obr. 8 – Separace arabinosy a xylosy iontovou mobilitou, ion $[M+Na]^+$. Směs arabinosy a xylosy (nahore), xylosa (uprostřed) a arabinosa (dole)

Obr. 9 – Separace rhamnosy a fukosy iontovou mobilitou, ion $[M+Na]^+$. Směs fukosy a rhamnosy (nahore), rhamnosa (uprostřed) a fukosa (dole)

Obr. 10 – Ukázka spektra nefiltrovaného vzorku glukosy (nahore) a stejného vzorku filtovaného přes nylonový filtr (dole)

Obr. 11 – Vliv složení mobilní fáze na intenzitu píku $[M+Na]^+$ pro xylosu. Přímá infuze do MS. Poměr ethy-lacetát : methanol : voda, shora 80:16:4, 72:16:12, 64:32:4 a 56:32:12

Obr. 12 – Chromatogramy vzorku glukosy pro ion $[M+Na]^+$, s různými průtoky směsi methanolu s vodou přidávaného za kolonou. Shora: bez přidavku směsi, průtok 0,1 ml/min, 0,2 ml/min a 0,3 ml/min

Obr. 13 – LC-MS analýza s přidáváním methanolu s vodou za kolonou. Chromatogram pro mannosu (nahore), glukosu (uprostřed) a galaktosu (dole)

Obr. 14 – LC-MS analýza s přidáváním methanolu s vodou za kolonou. Chromatogram pro rhamnosu (nahore) a fukosu (dole)

Obr. 15 – LC-MS analýza s přidáváním methanolu s vodou za kolonou. Chromatogram pro xylosu (nahore) a arabinosu (dole)

Obr. 16 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy arabinosy

Obr. 17 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy xylosy

Obr. 18 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy rhamnosy

Obr. 19 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy fukosy

Obr. 20 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy glukosy

Obr. 21 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy galaktosy

Obr. 22 – Mobilitní záznam z LC-IMS-MS analýzy mannosy

9. SEZNAM TABULEK

Tab. I: Struktury, názvy (zkratky názvů) a monoizotopové hmotnosti sacharidů a kyselin

Tab. II: Parametry analýzy pro přímou infuzi do MS

Tab. III: Parametry analýzy pro přímou infuzi do IMS-MS

Tab. IV: Parametry analýzy pro LC- MS a LC-IMS-MS