

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra analytické chemie



HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE DERIVATIZOVANÝCH CUKRŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Monika Tomanová

Studijní program:

Chemie

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2015

Souhrn

Předložená diplomová práce se zabývá studiem derivatizovaných cukrů pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI) a laserovou desorpcí ionizací za přítomnosti matrice (MALDI). Práce je rozdělena do několika kapitol. Teoretická část popisuje principy ionizačních technik a hmotnostních analyzátorů publikovaných v literatuře pro analýzu derivatizovaných cukrů. Dále jsou v této kapitole uvedeny jednotlivé derivatizační postupy používané pro cukry, založené především na dvou hlavních mechanismech, a to na reakci s karbonylovou skupinou nebo hydroxylovou skupinou cukru.

Praktická část diplomové práce je popsána ve dvou hlavních kapitolách, a to v Experimentální části a v kapitole Výsledky a diskuse. Experimentální část je věnována přípravě vzorků, experimentálním podmínkám syntézy, instrumentaci a podmínkám měření. Kapitola Výsledky a diskuse je rozdělena do třech hlavních podkapitol. První podkapitola se zabývá optimalizací kvarternarizace cukrů komerčně dostupným činidlem glycidyltrimethylamonium chloridem a analýze tímto činidlem derivatizovaných cukrů pomocí hmotnostní spektrometrie s ESI a MALDI.

Druhá podkapitola se zabývá návrhem nového kvarternarizačního činidla na základě úvah o analytické všestrannější využitelnosti takového činidla a na základě podobnosti s komerčním činidlem. Byla syntetizována dvě činidla: (4-bromo-benzyl)-glycidyl-dimethyl-amonium jodid (BBGDMA) a benzyl-glycidyl-dimethyl-amonium jodid (BGDMA). Pro navržené struktury byl nalezen syntetický postup a činidlo bylo po určité modifikaci publikovaného postupu připraveno.

Třetí část experimentální testuje kvarternarizované cukry dvěma novými činidly a popisuje výsledky měření těchto derivatizovaných cukrů pomocí ESI a MALDI.

Klíčová slova: analýza, cukry, derivatizace, kvarternarizace, hmotnostní spektrometrie.

Summary

This thesis is focused on the study of derivatized sugars by mass spectrometry with electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI). It is divided into several chapters. The theoretical part describes principles of ionization techniques and mass analyzers which are published in literature about derivatized sugars analysis. Derivatization procedures for saccharides based on two main mechanisms, reaction with carbonyl group or hydroxyle group of sugar, are also described in the this chapter.

Practical part is divided into two main chapters, Experimental section and Results and Discussion. Experimental part describes sample preparation, experimental conditions of the synthesis, instrumentation and measurement conditions. Section Results and Discussion is divided into three main chapters. First chapter is focused on optimization of quaternization of sugars by commercial available reagent glycidyltrimethylammonium chloride, and also on an analysis by ESI and MALDI of sugars derivatized by this reagent.

Second subchapter deals with design of the new quaternization reagent under consideration of analytical versatile usability of such agents, and on the basis of similarity to the commercial agent. Two new reagents were synthesized: (4-bromobenzyl)-glycidyltrimethylammonium iodide (BBGDMA) and benzylglycidyltrimethylammonium iodide (BGDMA). A synthetic approach was found for the designed structures, and reagents were prepared with some modifications in the procedure.

The last part describes experimental testing of two new reagents and describes results of measurement derivatized sugars by ESI and MALDI.

Key words: analysis, sugars, derivatization, quaternization, mass spectrometry.

Prohlášení

Já, Monika Tomanová, prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem doc. RNDr. Petra Bednáře, Ph.D. Veškerou použitou literaturu, kterou jsem v práci využila, jsem uvedla v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 24. 4. 2015

.....

Monika Tomanová

Poděkování

Mé poděkování patří panu doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a odborné vedení diplomové práce. Janu Košařovi a doc. RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D. za pomoc při syntéze. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za podporu a celé katedře analytické chemie za poskytnutí přístrojů a chemikálií.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Cíle diplomové práce	8
3. Teoretická část.....	9
3.1. Cukry – struktura a rozdělení.....	9
3.2. Úvod k analýze cukrů.....	9
3.3. Hmotnostní spektrometrie	10
3.3.1. Princip techniky hmotnostní spektrometrie.....	10
3.3.2. Iontové zdroje.....	11
3.3.3. Hmotnostní analyzátoři	16
3.4. Derivatizace sacharidů	18
3.4.1. Derivatizační postupy pro ESI analýzu	25
3.4.2. Derivatizační postupy pro MALDI-MS	32
4. Experimentální část	41
4.1. Chemikálie.....	41
4.2. Příprava vzorků.....	41
4.3. Experimentální podmínky syntézy a charakterizace činidel.....	42
4.4. Instrumentace	44
4.4.1. Použité přístroje.....	44
4.4.2. Základní parametry metod	44
5. Výsledky a diskuse	46
5.1. Testování derivatizace činidlem GTMA.....	46
5.1.1. Měření hmotnostních spekter pomocí ionizace elektrosprejem.....	46
5.1.2. Měření hmotnostních spekter pomocí MALDI.....	54
5.2. Návrh a syntéza derivatizačního činidla.....	59
5.3. Testování nových derivatizačních činidel hmotnostní spektrometrií.....	62
5.3.1. Ionizace elektrosprejem.....	62
5.3.2. MALDI.....	69
6. Závěr.....	78
7. Použitá literatura	80
8. Použité zkratky.....	83

1. Úvod

Cukry jsou obecné označení pro sacharidy, organické sloučeniny vyskytující se ve všech živých organismech. Slouží jako zdroj energie, jsou to stavební jednotky a biologicky aktivní látky. Biologicky aktivní jsou buď samotné molekuly cukrů, nebo jejich konjugáty s jinými molekulami. Modifikované sacharidy jsou součástí buněčných stěn, jiné se vyskytují jako stavební složky nukleových kyselin. Zelené rostliny sacharidy syntetizují v procesu zvaném fotosyntéza a předpokládá se, že více než 50% sušiny veškeré biomasy na Zemi připadá na polymery glukózy.¹

Cukry je třeba analyzovat z mnoha důvodů, které můžeme shrnout do dvou hlavních směrů. Prvním je analýza obsahu cukrů v potravinách, krmivech a léčivech (kvantitativní analýza) a druhým je analýza složitějších samotných cukrů a jejich derivátů (strukturní analýza). Zde má velký význam studium glykoproteinů, proteoglykanů a glykolipidů.² Sacharidy existují v řadě isomerních forem a jsou to sloučeniny opticky aktivní. Monosacharidy se mohou vyskytovat v různých strukturních podobách a oligosacharidy jsou zase různě rozvětvené molekuly.³

Přibližně 50% proteinů produkovaných v eukaryotických buňkách je posttranslačně glykosylovaných. Glykosylace je navázání cukrů na jinou molekulu, především bílkovinu. Tyto glykoproteiny zahrnují několik důležitých tříd makromolekul, jako jsou enzymy, hormony, imunoglobuliny, transportní proteiny a další. Znalost struktury cukru v těchto makromolekulách je důležitá, protože glykany ovlivňují mnoho biologických vlastností. Jedná se o rozpustnost, farmakokinetické vlastnosti, rozpoznání receptory, antigenicita apod.⁴ Studium samotných sacharidů nebo jejich konjugátů tedy může pomoci porozumět tomu, jakou roli hraje určitý cukr při některých patologických stavech jako je rakovina, ateroskleróza nebo například revmatoidní artritida.³

2. Cíle diplomové práce

Cíle lze shrnout do následujících bodů:

1. testování možností derivatizace cukrů komerčně dostupnými derivatizačními činidly umožňujícími zlepšení citlivosti a selektivity při jejich analýze (využití činidel nesoucích permanentní náboj v molekule, např. kvarterních amoniových solí)
2. návrh struktury optimálního derivatizačního činidla pro analýzu cukrů založených na současném vnesení kvarterní amoniové skupiny, vhodného chromoforu a (volitelně) značky poskytující charakteristický izotopický profil do molekuly cukru
3. syntéza činidel s navrženou strukturou
4. testování použitelnosti cíleně syntetizovaných činidel pro analýzu vybraných cukrů hmotnostní spektrometrií (s ESI a MALDI ionizací)

3. Teoretická část

3.1. Cukry – struktura a rozdělení

Z chemické podstaty jsou sacharidy polyhydroxyaldehydy (aldosy) a polyhydroxyketony (ketosy) obsahující minimálně tři alifaticky vázané uhlíkaté atomy.⁵ Existují ve dvou strukturních formách (lineární a cyklické) mezi nimiž se ustavuje chemická rovnováha. Cyklická forma sacharidu je umožněna skrze vznik hemiacetalu s jednou z přítomných hydroxyskupin za vzniku pětičlenného (furanosového) nebo šestičlenného (pyranosového) kruhu. Podle polohy hydroxylové skupiny na anomerním uhlíku rozlišujeme dva typy anomerů (α - a β -anomer), anomery jsou zvláštním typem epimerů. Jednotlivé anomery mohou přecházet jeden v druhý v procesu zvaném mutarotace⁶ (změna optické otáčivosti redukujícího sacharidu ve vodném prostředí).

Mezi sacharidy řadíme rovněž struktury, které jsou od základních typů sacharidů odvozené. Jedná se o aldonové kyseliny vzniklé oxidací aldehydické skupiny, aldurové kyseliny, vzniklé oxidací koncové hydroxylové skupiny a aldarové kyseliny, které mají oxidované oba konce řetězce. Naopak redukcí aldehydické skupiny vznikají cukerné alkoholy, tzv. alditoly, z nichž běžně známá je látka sorbitol, která se využívá jako náhradní sladidlo.⁷

Sacharidy můžeme rozdělit na jednoduché (monosacharidy) a složené, které dělíme na oligosacharidy a polysacharidy. Mezi monosacharidy řadíme aldosity i ketosity, obsahují pouze jednu cukernou jednotku a mají 3-9 uhlíků, označujeme je triosy, tetrosy, pentosy atd. Sacharidy obsahující dvě až deset jednotek označujeme jako oligosacharidy. Struktury obsahující více než deset monomerních jednotek označujeme jako polysacharidy, toto rozdělení však není striktní.

3.2. Úvod k analýze cukrů

Jak bylo zmíněno v úvodu diplomové práce, analýza sacharidů je nezbytná pro potravinářský a hospodářský průmysl. Významné zastoupení má v medicíně a farmaceutickém průmyslu při studiu biochemických a biologických pochodů, kterých se cukry účastní.

Pokrok v pochopení procesů související se syntézou a přeměnou cukrů odehrávajících se v živých organismech, byl v minulosti pomalý zejména pro nedostatek vhodných analytických nástrojů pro jejich identifikaci. Na rozdíl od proteinů a nukleových kyselin cukry neobsahují v molekule chromofor nebo fluorofor, což analýzu běžnými technikami znesnadňuje.³

Určení kompletní struktury oligosacharidů je mimořádně složitý problém, který zahrnuje rozpoznání sekvence jednotlivých monosacharidů a způsob jejich větvení, ale také isomerní pozici a anomerní konfiguraci každého jednotlivého monosacharidu v jeho glykosidické vazbě a navíc určení, zda se vyskytují ve furanosové nebo pyranosové formě.⁸

Ačkoli je na trhu spousta pokročilých analytických přístrojů pro identifikaci sacharidů, jejich analýza stále není rutinní záležitost. Hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonance jsou dnes spolu s chromatografií a elektroforézou základními nástroji pro analýzu cukrů. Pro řadu aplikací je, zejména z důvodů zlepšení odezvy, nezbytné cukry určitým způsobem derivatizovat. Samotné, tzv. nativní, tj. ničím nederivatizované cukry mohou být analyzovány spektroskopicky při 195 nm, amperometricky nebo refraktometricky. Tyto metody nejsou příliš citlivé.

Derivatizace molekuly cukru činidlem absorbujícím UV záření nebo fluorescenční záření umožní sacharidy detekovat citlivými metodami ve spojení se separačními technikami jako je HPLC, kapilární elektroforéza nebo gelová elektroforéza (PAGE). Hmotnostní spektrometrie ať už jako samostatná technika nebo ve spojení se separační technikou je silný nástroj pro analýzu cukrů, protože dovolí analyzovat i nativní cukry. Derivatizace cukrů může ovšem nabídnout i pro oblast hmotnostní spektrometrie několik výhod a to především ve zvýšení citlivosti a odezvy jejich analýzy, poskytnutí charakteristických signálů a případně charakteristické chování v kolizních spektrech.³

3.3. Hmotnostní spektrometrie

3.3.1. Princip techniky hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je v současnosti nejcitlivější metoda molekulové analýzy, která poskytuje informaci o relativní molekulové hmotnosti M_r a struktuře analytu. Princip této techniky spočívá v produkci iontů, které jsou následně separovány na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Výsledkem této analýzy je hmotnostní spektrum, což je graf závislosti intenzity generovaných iontů na m/z . Hmotnostní spektrometr obsahuje několik základních částí: místo pro zavádění vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a zařízení pro zpracování signálu. Existuje mnoho ionizačních technik, které můžeme rozdělit do čtyř skupin, a to elektronová ionizace, chemická ionizace, desorpční ionizace a rozprašovací techniky. Vzniklé ionty jsou následně analyzovány podle jejich poměru hmotnosti a náboje v zařízení zvaném hmotnostní analyzátor. Analyzátoři dělíme podle jejich principu na magnetické

sektorové analyzátory, kvadrupólový hmotnostní filtr (Q), iontová past (IT), analyzátor doby letu (TOF), Orbitrap a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR).²

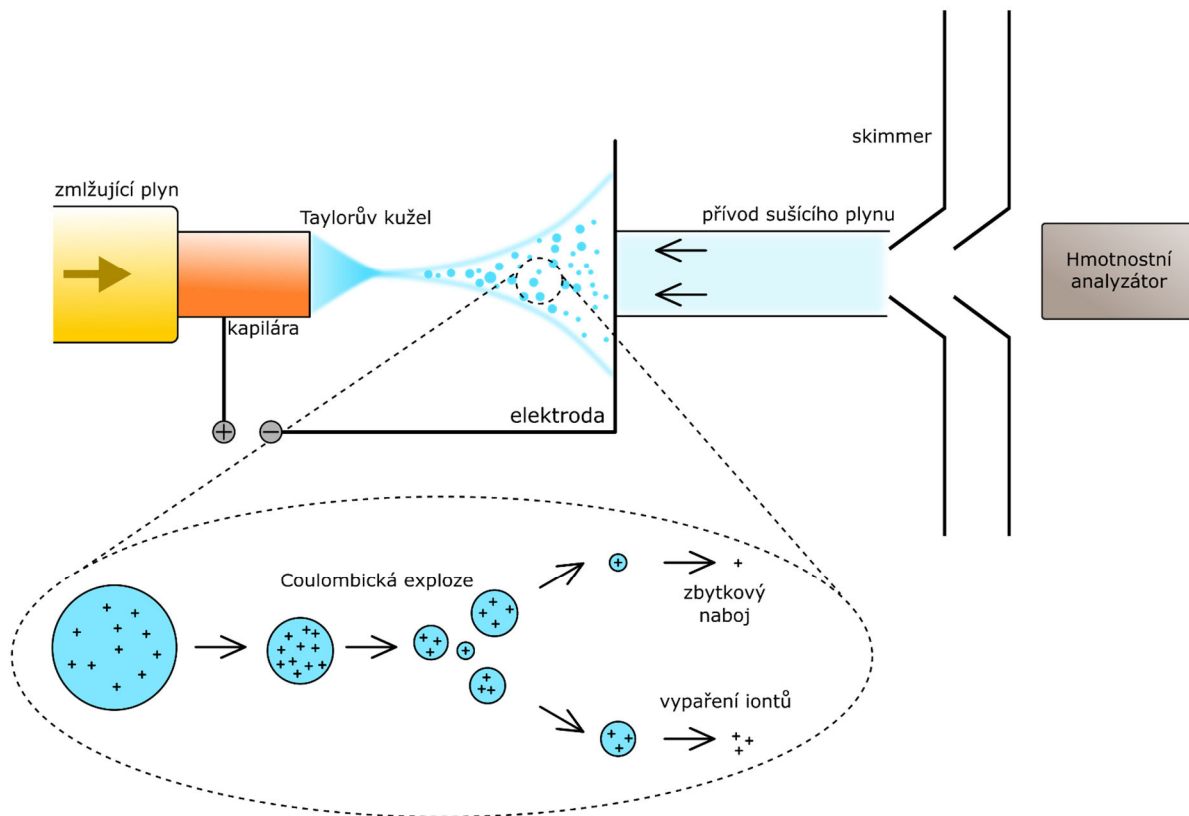
Tato diplomová práce je zaměřena na hmotnostní analýzu monosacharidů a polysacharidů. Sacharidy jsou polární, termálně stabilní a relativně netěkavé látky. Hmotnostní spektrometrie je pro tento typ látek vhodná technika. Klíčová je však vhodná volba úpravy vzorku, způsob jeho předseparace, typ iontového zdroje a rozsah hmotnostního analyzátoru. Pro identifikaci monosacharidů nebo velmi malých oligosacharidů se stále výhodně používá GC/MS metoda, ale pro tuto analýzu je nutno sacharidy upravit na těkavé deriváty⁹ methylovací, acetylovací nebo trimethylsilylovací. Identifikace monosacharidů je pak založena na porovnání retenčních časů a fragmentačního mechanismu s referenčními vzorky. Oligosacharidy a polysacharidy byly metodou GC/MS analyzovány po předběžné hydrolýze. Pro analýzu sacharidů s větší molekulovou hmotností bez hydrolýzy byla použita celá řada postupů. Jako první byla použita ionizační technika FAB (Fast Atom Bombardment-ionizace rychlými elektrony). Následovalo využití ionizace elektrosprejem (ESI) a desorpce ionizace za použití matrice (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization).^{4,10}

FAB technika poskytuje obvykle slabý signál. Rovněž citlivost ESI není pro většinu aplikací založených na nederivatizovaných cukrech příliš dobrá. Oproti tomu fosforylované nebo sulfátované cukry jsou dobře ionizované v záporném módu ESI. MALDI technika je pro analýzu cukrů výhodná, protože dovoluje analyzovat jak nativní tak derivatizované cukry, navíc je při analýze nativních cukrů, oproti ESI efektivnější.⁸ Citlivost těchto analýz závisí na použité matrici. Derivatizace se v MALDI používá především pro zvýšení detekčních limitů.¹¹ Více bude o derivatizačních postupech pojednáno v následující kapitole.

3.3.2. Iontové zdroje

Ionizace elektrosprejem (ESI)

Elektrosprej je měkká ionizační technika vhodná pro analýzu středně polárních látek až látek iontových. Je to nejšetrnější ionizační technika a je vhodná, spolu s MALDI, o které bude pojednáno níže, pro analýzu (bio)polymerů. Často se používá pro spojení se separací v kapalně fázi (HPLC a CE). Při tomto způsobu ionizace může docházet ke vzniku vícenásobně nabitých iontů, což může být užitečné při řešení struktury biomakromolekul.



Obrázek 1: Schéma uspořádání experimentu ionizace elektrosprejem (ESI).

ESI je technika, která umožňuje převedení iontů z roztoku do plynné fáze. Mechanismus této ionizace se vyznačuje několika procesy. Produkci nabitých kapiček elektrolytu, tedy rozpuštěného vzorku, dále zmenšování těchto kapiček v důsledku odpařování rozpouštědla. Při odpařování rozpouštědla dochází ke zvýšení hustoty povrchového náboje, pokud tato hodnota překročí kritickou hodnotu (tzv. Rayleighův limit), dochází k tzv. Coulombické explozi. Opakovaný rozpad kapiček vede k velmi malým, vysoce nabitým kapičkám, ze kterých se nakonec uvolní samotné ionty. Princip uvolňování iontů se popisuje dvěma způsoby. První je vypaření rozpouštědla z malé kapičky nesoucí jediný ion, tzv. model zbytkového náboje (*Charge residue*) a druhý model, tzv. model iontového vypařování (*Ion evaporation*) předpokládá vytržení iontu z kapičky při zmenšování jejího poloměru pod kritickou hodnotu.

V principu se tedy jedná o rozprašování kapalného vzorku na konci kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí, obvykle 3-5 kV. Napětí je vloženo mezi kapiláru a protější elektrodu. Proud kapaliny se na konci kapiláry prodlužuje a na jejím konci se tvoří poměrně ostrý konec, zvaný Taylorův kužel, což je v podstatě začátek ionizačního procesu. Rozprašování může být

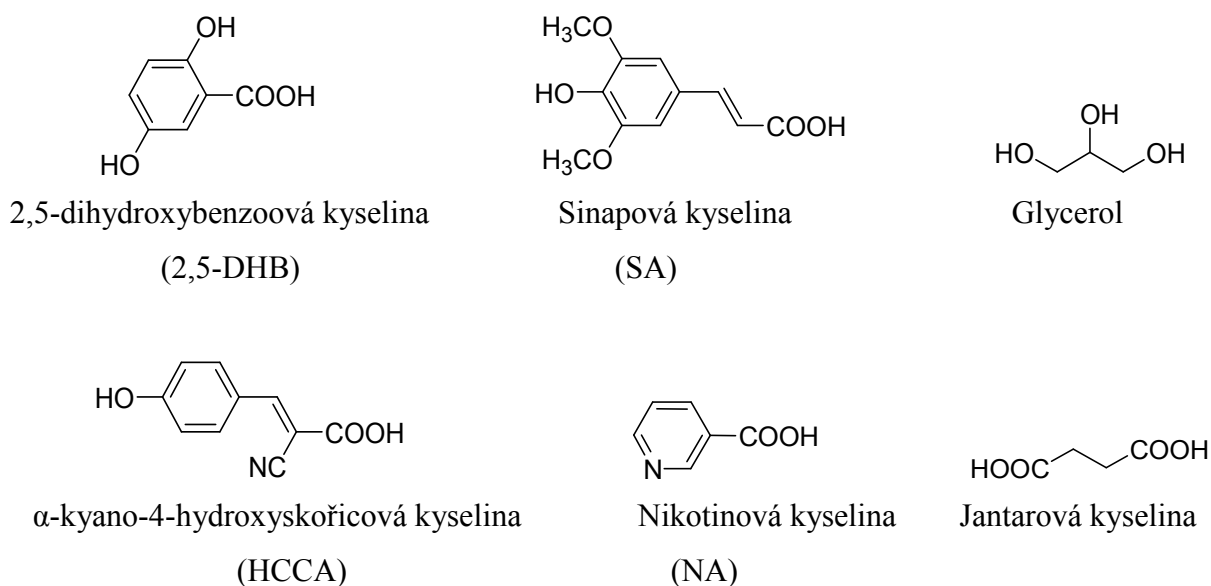
podporováno pomocným plynem či kapalinou. Vzniklé ionty jsou vedeny iontovou optikou do hmotnostního analyzátoru.^{2,10}

Existují modifikace této techniky. Pro velmi malé průtoky vzorků (nl/min) byl vyvinut tzv. nanoelektrosprej – sprejování z tenké kapiláry bez zmlžovacího plynu. Další modifikací je desorpční elektrosprej (DESI), který se od klasického elektrospreje liší tím, že je rozprašováno pouze rozpouštědlo na vzorek umístěný ve vhodném úhlu ke sprejovací kapiláře. Výhodou tohoto uspořádání je, že lze analyzovat vzorek bez jakékoli úpravy a používá se dobře v monitorování výbušnin a drog na běžných typech povrchů jako jsou papír, plasty, vlákna, kovy.¹²

Matricí asistovaná desorpce/ionizace laserem (MALDI)

MALDI je měkká ionizační technika vhodná pro desorpci netěkavých a „křehkých“ (bio)molekul. Analyt je smíchán s matricí a převeden na ionty za pomoci laserového záření většinou v oblasti ultrafialové oblasti spektra. Vlnová délka se liší podle použitého laseru. Standardně se v MALDI používají UV-lasery o vlnové délce 337 nm (dusíkové lasery) nebo 355 nm (Nd:YAG solid state lasery). Méně časté je použití infračervených laserů.

Princip metody je založen na absorpci záření laseru matricí, matrice předá získanou energii molekule analytu a analyt je desorbován, ionizován a transportován do hmotnostního analyzátoru. Samotná analýza je provedena tak, že se vzorek nanese na tzv. „maldi-plate“, což je nerezová destička, ve které jsou vyznačeny spoty, na které se vzorek nanáší. Je používáno několik technik přípravy vzorku a jeho nanášení. Vzorek se buď rozpustí ve vhodném rozpouštědle a smíchá se s matricí před nanesením na destičku nebo se matrice nanáší na již přítomný vzorek na destičce. Analyzovat se dají i pevné vzorky. Ty se vhodným způsobem uchyť na MALDI destičce a následně pokryjí matricí (obvykle nasprejováním nebo nasublimováním). Existuje velká škála používaných matric, příklady jsou uvedeny na obrázku 2. Matrice obsahující aromatické jádro absorbují energii záření laseru většinou v UV oblasti spektra. Glycerol a jantarová kyselina absorbují v infračervené oblasti.



Obrázek 2: Struktury matric běžně používaných v MALDI.

Stejně jako elektrosprej je i MALDI měkká ionizační technika. Na rozdíl od ESI vznikají obvykle jen jednoduše nabité molekuly. Standardní MALDI je prováděno za vysokého vakua ($< 1\text{ Pa}$), existují však i technická řešení pro laserovou desorpci ionizaci za atmosférického tlaku, které však vykazují nižší citlivost z důvodu ztrát analytu při jeho převádění do analyzátoru (srážkami s molekulami přítomných plynů).

MALDI je dnes nepostradatelná technika pro analýzu biomolekul (rutinně zejména v proteomice), ale také při analýze syntetických polymerů, v potravinářství, při výzkumu léčiv apod. Zásadní výhodou je, že umožňuje přímou analýzu povrchů různých materiálů – vzorek není třeba převádět do roztoku.⁴

Kvantitativní i kvalitativní MALDI analýza oligosacharidů v různých typech glykoproteinů stále zůstává výzvou. Klíčová je zde optimalizace postupu úpravy vzorku. Derivatizace cukrů v MALDI technice umožňuje zvýšení citlivosti analýzy a zjednodušení interpretace fragmentace¹³ nebo spíše určení spojení jednotlivých monomerů v oligomerech. Například perbenzoylované sialo-oligosacharidy jsou stabilní deriváty, které poskytují intenzivní signály během MALDI experimentu. Navíc koncové $\alpha(2 \rightarrow 3)$ nebo $\alpha(2 \rightarrow 6)$ galaktózové jednotky oligosacharidů (Neu5NAc) prochází charakteristickými strukturálními změnami během perbenzoylace, tedy umožní snadnější identifikaci spojení jednotlivých jednotek.¹⁴

MALDI se dá využít jako samostatná technika, ale lze ji rovněž spojit i se separační technikou, a to v off-line spojení, kdy jsou po semipreparativní chromatografické separaci vzorku sbírány jednotlivé frakce, které jsou nanášeny na MALDI destičku.

Matricí asistovaná desorpce/ionizace laserem s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF-MS)

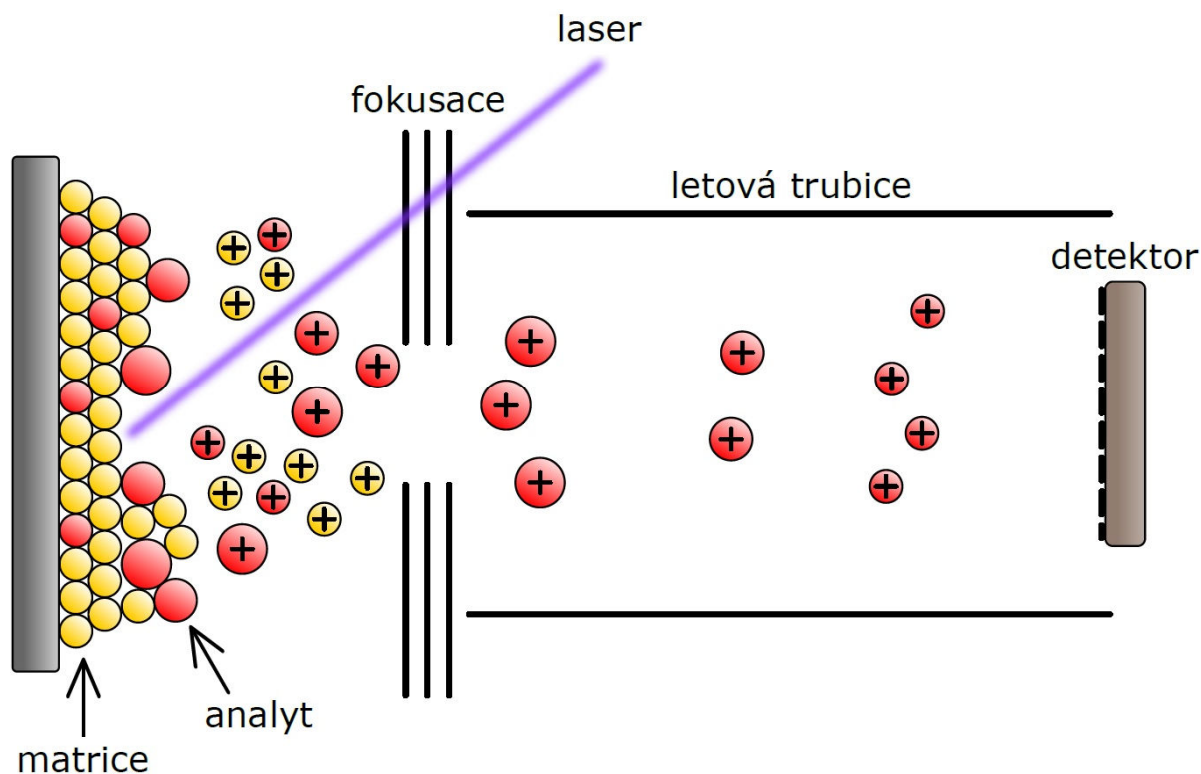
Ionty produkované matricí asistovanou laserovou desorpčí/ionizací mohou být analyzovány za použití rozdílných typů hmotnostních analyzátorů od kvadrupólového analyzátoru, iontové pasti, po iontovou cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací (ICR-FT-MS). Nicméně zdaleka nejpoužívanější analyzátor ve spojení s MALDI je tzv. analyzátor doby letu TOF-MS (time-of-flight mass spectrometer). Zdaleka nejběžnějším typem TOF analyzátoru je axiální TOF hmotnostní analyzátor. Princip TOF lze popsat následovně. Desorbované ionty jsou urychleny silným elektrickým polem, získávají stejnou kinetickou energii a prolétají letovou trubicí. Ionty se stejnou kinetickou energií E_k a různou hmotností m (m/z hodnotou) budou mít odlišné rychlosti v , viz rovnice (z je náboj iontu a e je elementární náboj).

$$v = \sqrt{\frac{2E_k}{m}} = \sqrt{\frac{2zeU}{m}}$$

Měří se čas t , za který ionty doletí na detektor. Poměr hmotnosti ku náboji je dán vztahem:

$$\frac{m}{z} = 2eU \left(\frac{t}{L}\right)^2$$

Ionty stejných hmotností mohou dorazit na detektor v rozdílných časech, což ve svém důsledku vede ke zhoršení rozlišení. Toto zhoršení rozlišení způsobuje nejednotná distribuce kinetické energie při ionizaci a také nerovnoměrnost povrchu vzorku na MALDI desce. Moderní hmotnostní spektrometry kompenzují tuto rozdílnou distribuci tzv. opožděnou extrakcí iontů. V tomto operačním módu je elektrické pole mezi vzorkem a první elektrodou drženo na nule nebo velmi nízké hodnotě. Po velmi krátké době je toto pole zapnuto a ionty jsou extrahovány do letové trubice. Původně pomalé ionty dohoní rychlejší ionty stejné hmotnosti. Tato fokusace je ovšem omezená do určité molekulové hmotnosti analytu (nad hodnotu okolo 30 kDa se schopnost fokusace ztrácí).



Obrázek 3: Znáznornění procesu ionizace a analýzy iontů při MALDI-TOF experimentu.

TOF-MS s reflektorem (rTOF)

Analyzátor doby letu s reflektorem je další provedení, jak kompenzovat rozdílnou počáteční distribuci kinetických energií iontů. Reflektrom byl navržen Mamyrinem a jeho spolupracovníky.¹⁵ Je to v podstatě série kruhových elektrod, které tvoří homogenní elektrické pole. Ionty, které mají sice stejnou hmotnost, ale vyšší kinetickou energii, proniknou hlouběji do reflektromu než ionty s nižší kinetickou energií, tím se opozdí o určitou dobu a dojde k fokusaci iontů o stejné hmotnosti.^{4,8}

3.3.3. Hmotnostní analyzátory

V následující podkapitole jsou popsány hmotnostní analyzátory, které byly použity při derivatizačních postupech v teoretické části diplomové práce.

Trojítý kvadrupól (QqQ)

Kvadrupól je jedním z mnoha typů hmotnostních analyzátorů. Je to v podstatě hmotnostní filtr, který se skládá ze čtyř hyperbolických nebo kruhových tyčí. Na protilehlé tyče je vloženo kladné nebo záporné stejnosměrné napětí U a všechny tyče jsou superponovány vysokofrekvenčním napětím $V_0 \cos \omega t$. Ionty jsou akcelerovány do kvadrupólu napětím, obvykle

10-20 V a mezi tyčemi kvadrupólu začnou oscilovat. V daný časový okamžik je oscilace stabilní jen pro ionty s určitou hodnotou m/z , ostatní ionty do detektoru neprojdou. Postupně jsou proměřovány všechny ionty podle m/z . Tyto hodnoty se nastavují postupnou změnou parametrů A , který souvisí se stejnosměrným napětím a Q , který souvisí vysokofrekvenčním napětím, při jejich konstantním poměru ($A/Q = \text{konstantní}$). Jak tyto parametry se střídavým a stejnosměrným napětím souvisí, lze vyčíst z následujících dvou vztahů (r_0 značí poloměr pole kvadrupólu):

$$A = \frac{8eU}{mr_0^2\omega^2} \quad Q = \frac{4eV_0}{mr_0^2\omega^2}$$

V moderních zařízeních se kvadrupólový analyzátor spojuje do série tří kvadrupólových analyzátorů za sebou, tzv. trojitý kvadrupól (QqQ). Další možné spojení je spojení kvadrupólu s iontovou pastí nebo magnetického či elektrického sektorového analyzátoru v kombinaci se dvěma kvadrupóly (qQ) nebo spojení kvadrupólu s analyzátozem doby letu (Q-TOF). Tato uspořádání se používají v experimentech tzv. tandemové hmotnostní spektrometrii MS/MS (MS^2). Experimenty jsou prováděny tak, že se v prvním analyzátoru vybere prekurzorový ion, ve druhém analyzátoru je tento ion určitým způsobem fragmentován a poslední části jsou produktové ionty analyzovány. Toto provedení může být i složitější v tzv. MS/MS/MS experimentech i vyšších počtech hmotnostních analyzátorů a nebo s využitím tandemu v čase (iontová past). Tyto experimenty označujeme MS^n .²

Iontová past – IT

Třídídimenzionální (sférická) iontová past je analyzátor tvořený cylindrickou kruhovou elektrodou a dvěma koncovými elektrodami. Ionty jsou krátkým pulsem přivedeny do středové oblasti vstupním otvorem a jsou po určitou dobu uvnitř pasti zadržovány. Ionty jsou skenovány, vypuzeny z pasti podle m/z hodnot změnou charakteru elektrického pole.² Druhý typ iontové pasti je tzv. 2D neboli lineární iontová past. Jedná se prakticky o kvadrupól, na jehož koncích jsou umístěny elektrody pro zadržení iontů uvnitř pasti. Výhodou tohoto uspořádání je, že tato iontová past má větší kapacitu oproti sférické pasti a nedochází tak snadno k jejímu přeplnění.¹⁰

Analyzátor doby letu – TOF

Analyzátor doby letu je vysoce rozlišovací analyzátor a typicky se používá ve spojení s MALDI ionizační technikou, proto bylo o něm více pojednáno v kapitole věnující se této technice.

FTICR (Fourierova transformace iontová cyklotronová rezonance)

FTICR je typ hmotnostního analyzátoru s největším rozlišením mezi všemi analyzátory. Analýzy jsou prováděny v krychlovité cele umístěné v silném magnetickém poli o indukci B . Ion o určité hmotnosti m s rychlostí v a nábojem z , se v silném magnetickém poli pohybuje po cykloidální trajektorii o poloměru r s příslušnou frekvencí ω_c , která je inverzně úměrná k hodnotě m/z . Radiofrekvenčním pulsem je ion excitován, poloměr jeho trajektorie se zvýší a ionty odpovídající jedné m/z hodnotě se začnou pohybovat ve fázi. Pohyb iontů generuje indukovaný proud, který je zaznamenáván. Získaný interferogram je Fourierovou transformací převeden na klasické spektrum. Pro FTICR platí následující vztah²:

$$\omega_c = 2\pi f = \frac{v}{r} = \frac{Bez}{m}$$

3.4. Derivatizace sacharidů

Derivatizaci sacharidů můžeme provést obecně několika způsoby. Využívají se funkční skupiny sacharidů, tedy karbonylové a hydroxylové skupiny. Derivatizace také může spočívat ve tvorbě aduktů s vhodnými činidly či ionty, například sodnými, draselnými či amonnými. Mezi derivatizační postupy využívající karbonylovou skupinu sacharidů řadíme reduktivní aminaci, tvorbu oximů, hydrazonů a Schiffových bází. Obecné reakce probíhající na hydroxylových skupinách jsou permethylace, peracetylace aj. Dále se dají využít i speciálnější postupy, například reakce s fenyloboronovými kyselinami či reakce se silanolovými derivačními činidly.

Derivatizační postupy pro tak polární vzorky jako jsou sacharidy, byly nezbytné pro techniku ionizace elektronem (EI). Pro analýzu měkkými ionizačními technikami, jako je ESI a MALDI již nejsou tak důležité. Několika stupňový derivatizační proces, který se používá pro EI, může zničit pracně připravený vzorek, hlavně pokud je ho málo. Také je riziko, že alkalická methylační reakce jako derivatizační postup, bude hydrolyzovat alkalicky labilní, strukturně neznámý vzorek. Je ovšem pravda, že pokud se zavede do struktury cukru méně polární struktura, analyt se stane více rozpustný v těkavějších rozpouštědlech, což může poskytnout zvýšení v citlivosti detekce.¹⁰ Další studie také ukazují, že zavedeme-li do molekuly sacharidu náboj, klesají limity detekce pro MS analýzu.³

Obecné principy

a) Reakce na karbonylové skupině

Tvorba Schiffových bází a reaktivní aminace

Reakcí mezi karbonylovou skupinou sacharidu s aromatickými nebo alifatickými aminy vznikají Schiffovy báze. Tento způsob derivatizace je hojně používán, i když deriváty nejsou příliš stabilní. Výhodou je, že tyto reakce probíhají poměrně rychle a lze je provést například i na nerezové destičce určené pro MALDI analýzu přimícháním vzorku ke směsi matrice a činidla.¹⁶ Tvorba Schiffových bází je vlastně mezistupeň reaktivní aminace. Pokud do reakce přidáme redukční činidlo, vznikne sekundární amin. Obecný princip této reakce je znázorněn ve schématu 1.

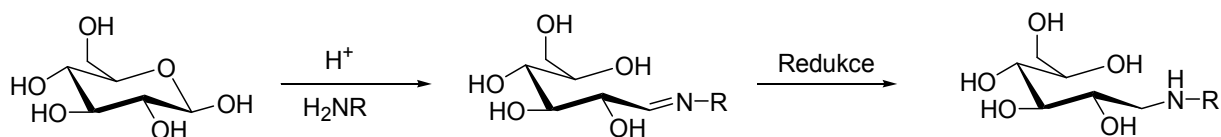


Schéma 1

K reaktivní aminaci se dá využít široká škála aminů, reakce probíhá většinou v dimethylsulfoxidu (DMSO) v přítomnosti octové kyseliny (AcOH), protože v kyselém prostředí dochází k otevření poloacetalové formy sacharidu. Jako redukční činidla se používají kyanoborohydrid ($NaCNBH_3$), dimethylaminoboran, $NaBH(OAc)_3$ a pyridin-boran.³

Příprava kvartérních aminů z oximů

Jedná se o reakci aldehydické skupiny se substituovaným hydroxylaminem za tvorby oximu, následovaná redukcí a následnou permethylací. Během permethylace dojde k eliminaci benzylové skupiny nebo *p*-nitrobenzylové skupiny a k tvorbě kvartérního aminu.³

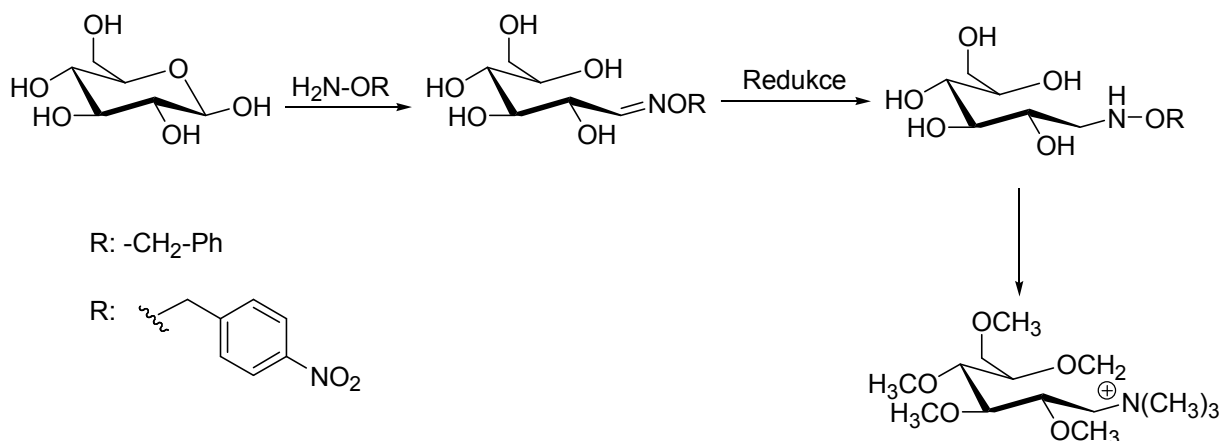


Schéma 2

Tvorba hydrazonů (acylhydrazonů) z hydrazinů (hydrazidů)

Hydraziny reagují s aldehydickou skupinou za tvorby hydrazonů. Pro zvýšení detekce v MS se pro derivatizaci používá fenylylhydrazin. Blíže bude o podmínkách této reakce pojednáno v dalším textu. Obecná reakce je zobrazena ve schématu 3. Reakce hydrazinu (N_2H_4) s aldehydem nemá pro analytické účely velkou výhodu, ale vzniklý hydrazon může reagovat s fluorescaminem za tvorby fluorescenčního produktu. Tvorbou hydrazonů můžeme do molekuly zavést permanentní náboj. Jeho přítomnost umožňuje citlivou detekci v ESI a MALDI. Nejběžnější je použití hydrazidů jako jsou Girardovo činidlo T nebo P.

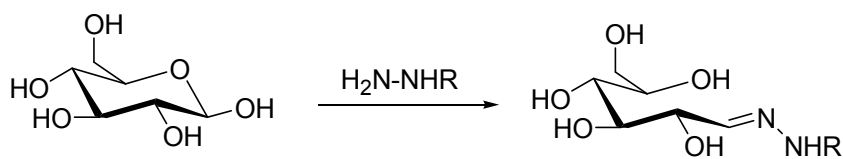


Schéma 3

b) Reakce na hydroxylových skupinách

Obecně se používají různé techniky, ať už tvorba etherů nebo esterů, tvorba oximů, trimethylsilyl derivátů apod. Tento způsob derivatizace se nejčastěji používá v GC/MS analýzách.

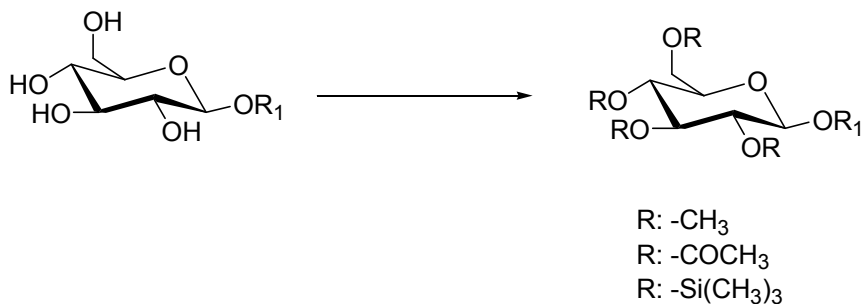


Schéma 4

Permethylace

Nejvíce používaná technika pro snížení polaritu a vzrůst stability pro analytické techniky GC/MS a FAB-MS. Dnes se také používá v novějších technikách jako je MALDI a ESI pro zvýšení citlivosti a poskytnutí informací o struktuře cukru z fragmentačních mechanismů. Permethylace je běžná metoda i v MS analýze glykanů. Jedna z hlavních výhod methylace nad jinými alkylačními nebo acylačními technikami je to, že methyl je relativně malý a hydroxylových skupin je ve struktuře mnoho, takže (oproti větším alkylům a arylům) příliš nevrůst jejich molekulová hmotnost. Kvantitativní provedení těchto reakcí je ze všech derivatizací na hydroxylových skupinách nejsložitější a tato derivatizace obvykle vyžaduje nejméně jeden čistící krok. Jako methylační činidlo se nejčastěji používá methyljodid, reakce

často probíhají v DMSO a do směsi se přidává silná báze jako je hydrid sodný, hydroxid sodný apod. Výhodná je tato technika například pro derivatizaci sulfátovaných struktur při MALDI analýzách. Nejprve se cukr podrobí methylační reakci, pak se odstraní sulfátová skupina a hydrolyzovaná hydroxyskupina se methyluje deuterovaným methyl jodidem, počet sulfátových skupin pak může být zjištěn z posunů molekulových hmotností, které vznikly díky izotopické značce.³

Peracethylace

Peracethylace je méně používaná než permethylace, také z důvodu většího nárůstu molekulové hmotnosti. K derivatizaci se používá acetanhydrid s pyridinem nebo octanem sodným jako katalyzátorem. Výhodou použití systému acetanhydrid/pyridin je, že se jedná o těkavé látky, které mohou být snadno před analýzou odpařeny. Tato derivatizace se využívá především v GC/MS.

Trimethylsilyl deriváty

Největší použití mají v GC/MS. Reakce probíhá v pyridinu s hexamethyldisilazanem (HMDS) katalyzovaná trimethylchlorosilanem. Tato technika se však v metodách jako je MALDI apod. příliš nepoužívá. Cukr může být převeden na TMS deriváty také modifikovaným způsobem, a to nejprve reakcí cukrů s hydroxylaminem a následně hexamethyldisilazanem,³ viz schéma 5. Kombinace tvorby alkyloximů, následné převedení na kvartérní amoniovou sůl a permethylace, jako jeden z derivatizačních postupů vhodných pro ESI, MALDI byl diskutován výše.

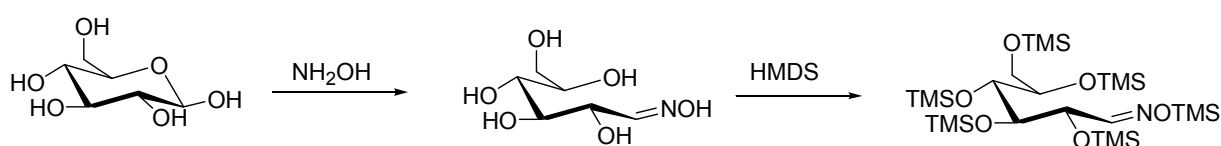
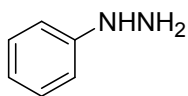


Schéma 5

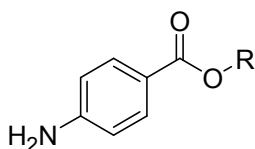
Tabulka 1.: Podmínky derivatizačních postupů uvedených v teoretické části diplomové práce.

Činidlo	Reakční podmínky	Použité cukry	Metoda
Fenylhydrazin (PHN)	Voda/methanol 70-80°C, 1hodina. Vodný roztok cukru, methanolický roztok činidla na MALDI plate; pokojová teplota, 40 minut.	Glukóza, manóza, <i>N</i> -acetyl-galaktosamin, <i>N</i> -acetyl-glukosamin, <i>N</i> -acetyl-mannosamin, β -laktóza, 2'-fucosyl-laktosa, sialyllactosa <i>N</i> -glykany oddělené z ovalbuminu.	HPLC-ESI-MS ESI-QqQ-MS MALDI-TOF
Ethyl ester 4-aminobenzoové kyseliny (ABEE)	Kyselina octová/DMSO 90°C, 10 hodin.	<i>N</i> -glykany uvolněné z glykoproteinů [(GlcNAc) ₂ (Man) _{5,6,9}	ESI-IT-MS HPLC-UV ESI-Q-TOF
Methyl ester 4-aminobenzoové kyseliny (ABME)	DMSO (bezvodý), kyselina octová, kyanoborohydrid 65°C 2 hodiny.	(GlcNAc) _{4,6} (Man) ₃ (GlcNAc) ₄₋₈ (Man) ₃ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₄ (Man) ₃ (Fuc) ₁]	
Butyl ester 4-aminobenzoové kyseliny (ABBE)		maltoheptaosa, lacto- <i>N</i> -fucopentaosa, lacto- <i>N</i> -tetraosa, lacto-difucotetraosa, lacto- <i>N</i> -difucohecaosa, laminarihecaosa, isomaltohecaosa.	
BACH	Acetonitril/methanol/voda 90°C, 1 hodina.	Xylóza, ribóza, arabinóza, fukóza, glukóza a, fruktóza, manóza, laktóza, maltóza, <i>N</i> -acetylglucosamin, sialová kyselina.	ESI-IT-MS MALDI-TOF-MS
Fenylboronové kyseliny	Roztoky fenylboronové kyseliny ve vodě s NH ₄ OH nebo voda/acetonitril; cukry ve vodě.	Glukóza, fruktóza, galaktóza, <i>N</i> -acetyl-glukosamin, maltóza, celobióza, maltoheptaosa, lidské sérum.	DESI-IT-MS
1-aryl-3-methyl-5-pyrazolon (AMP)	Acetonitril, voda 60 °C, 4 hodiny.	Glukóza, galaktóza, xylóza, manóza, rhamnosa, glukuronová kyselina, arabinóza, fukóza,	ESI-IT-MS HPLC-MS MALDI-TOF
PMP	Methanol, amoniak	glukosamin, galaktosamin,	
PMPMP	70°C, 70 minut.	<i>N</i> -acetyl-galaktosamin,	
NMP	Methanol, NaOH	galakturonová kyselina,	
PPMP	70°C, 2 hodiny.	glukuronová kyselina, arabinóza.	
Girardovo činidlo P (GP)	Methanol/octová kyselina 70°C, 3 hodiny.	B-cyklodextrin, ovalbumin, ribonukleáza B, porcín IgG, bovin IgG.	ESI-IT-MS HPLC-MS
3-aminochinolin (3-AQ)	DMSO (bezvodý), kyselina octová, kyanoborohydrid 65°C 2 hodiny.	<i>N</i> -glykany uvolněné z glykoproteinů [(GlcNAc) ₂ (Man) _{5,6,9} (GlcNAc) _{4,6} (Man) ₃ (GlcNAc) ₄₋₈ (Man) ₃ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₄ (Man) ₃ (Fuc) ₁].	ESI-Q-FOT
2-aminoakridon (2-AMAC)	DMSO (bezvodý), kyselina octová, kyanoborohydrid 65°C 2 hodiny.	<i>N</i> -glykany uvolněné z glykoproteinů. [(GlcNAc) ₂ (Man) _{5,6,9} (GlcNAc) _{4,6} (Man) ₃ (GlcNAc) ₄₋₈ (Man) ₃ (Gal) ₂ (GlcNAc) ₄ (Man) ₃ (Fuc) ₁].	ESI-Q-FOT
4-amino-<i>N</i>-(2-diet hylaminoethyl)benzamid (DEAEAB)	DMSO (bezvodý), kyselina octová, kyanoborohydrid 65°C 2 hodiny.	<i>N</i> -glykany uvolněné z glykoproteinů [(GlcNAc) ₂ (Man) _{5,6,9} (GlcNAc) _{4,6} (Man) ₃ (GlcNAc) ₄₋₈ (Man) ₃].	ESI-Q-FOT MALDI-TOF RP-HPLC

	Methanol, kyanoborohydrid, kyselina octová, cukr ve vodě, 80°C, 1 hodina.	(Gal) ₂ (GlcNAc) ₄ (Man) ₃ (Fuc) ₁]. Man ₈ GlcNAc ₂ Glykoprotein ribonukleasa B, transferin (substráty pro enzymatické štěpení), peptid- <i>N</i> -glykosidasa F, maltohexaosa.	
2-aminopyridin (2-AP)	DMSO (bezvodý), kyselina octová, kyanoborohydrid 65°C 2 hodiny. Kyselina chlorovodíková, 100°C, 13 minut Kyanoborohydrid 90°C, 15 hodin. Octová kyselina 90°C, 60 min dimethylaminoboran (voda/octová kyselina) 80°C, 60 min.	Galactosa, glukóza, manosa, glukosamin, fucosa, lactosa, fucosyllaktosa, sialyllaktosa, oligosacharidové standardy (M3N2, NGA3, NGA4).	ESI-G-TOF ESI-MS-MS HPLC-MS MALDI-TOF
2-aminobenzamid (BA)	DMSO (bezvodý), kyselina octová, kyanoborohydrid 65°C 2 hodiny. DMSO/octová kyselina, NaCNBH ₃ , pokojová teplota, 3 hodiny.	Standardy glykanů, exoglykosidázy, β -galaktosyltransferázy, PNGasa F, ovalbumin, lidské sérum α 1-kyselý glykoprotein, lidské sérum IgG.	ESI-Q-TOF HPLC, PAGE MALDI-TOF
Girardovo činidlo T (GT)	Methanol/octová kyselina, 75°C, 3-4 hodiny. 1% octová kyselina/metanol, 25°C, 4 hodiny.	<i>N</i> - a <i>O</i> - spojené oligosacharidy. Lidský imunoglobulin G(IgG), ovalbumin, maltoheptaosa, maltohexaosa, maltopentaosa, maltotetraosa, maltotriosa.	MALDI, ESI-magnetický analyzátor MALDI-TOF
Benzylamin + dimethylce	Methanol/octová kyselina, roztok sacharidu ve směsi voda/methanol 80°C, 45 minut.	Maltoheptaosa, maltohexaosa, maltopentaosa, maltotetraosa, maltotriosa, lidské mléčné oligosacharidy.	MALDI-TOF-MS
Anilín (An), <i>N,N</i>-dimethylanilín (DMA)	DHB (voda/ACN) + An nebo DMA, reakce na MALDI plate.	Ovalbumin, maltohexaosa, maltopentaosa.	MALDI-TOF-MS
Ethidium bromid (EB)	10% (V/V) DMSO v ACN.	<i>N</i> -glykany z ovalbuminu.	MALDI-TOF-MS
1,2-diaminy	Jód, octová kyselina, pokojová teplota, 6-12 hodin.	Xylóza, ribóza, rhammosa, arabinóza, fukóza, glukosa, manóza, galaktóza, <i>N</i> -acetyl-d-glukosamin, glukuronová kyselina	MALDI-TOF-MS
Methyl jodid (MeI)	DMSO, NaOH (NaH) Pokojová teplota, několik hodin.	Dextran, glucomannan, β -1,3-glukan, pullan, arabinoxylan, xylan, arabinogalaktan.	MALDI-TOF-MS
9-aminofluoren (9AmFL)	Voda, NaHCO ₃ , methanol, octová kyselina, NaCNBH ₃ , 80°C 2 hodiny.	Lineární a větvené oligosacharidy.	MALDI-FTICR

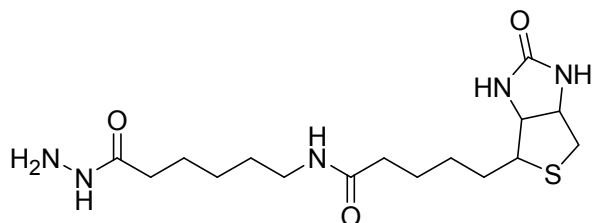


Fenyhydrazin (PHN)

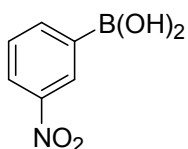


Alkylester 4-aminobenzoové kyseliny

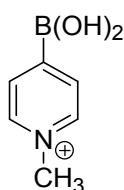
R: -CH₃ ABME
 -C₂H₅ ABEE
 -C₄H₉ ABBE



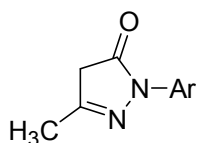
Hydrazid biotinaminokapronové kyseliny (BACH)



4-Nitrofenylboronová kyselina

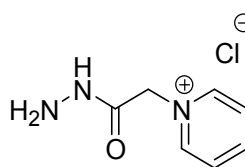


N-methyl-4-pyridinboronová kyselina

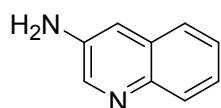


1-Aryl-3-methyl-5-pyrazol (AMP)

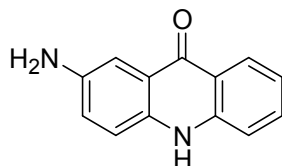
Ar = fenyl (PMP)
 Ar = 4-metoxyfenyl (PMPMP)
 Ar = 2-naftyl (NMP)
 Ar = 4-isopropyfenyl



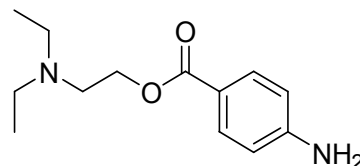
Girardovo činidlo P (GP)



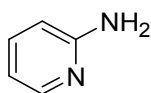
3-Aminochinolin (3-AQ)



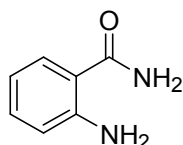
2-Aminoakridon (2-AMAC)



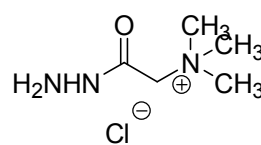
4-Amino-N-(2-diethylaminoethyl)benzamid (DEAEAB)



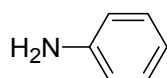
2-Aminopyridin (2-AP)



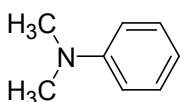
2-Aminobenzamid (BA)



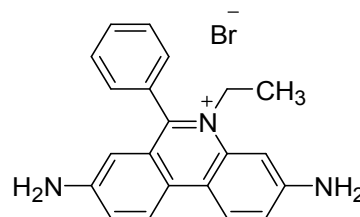
Girardovo činidlo T (GT)



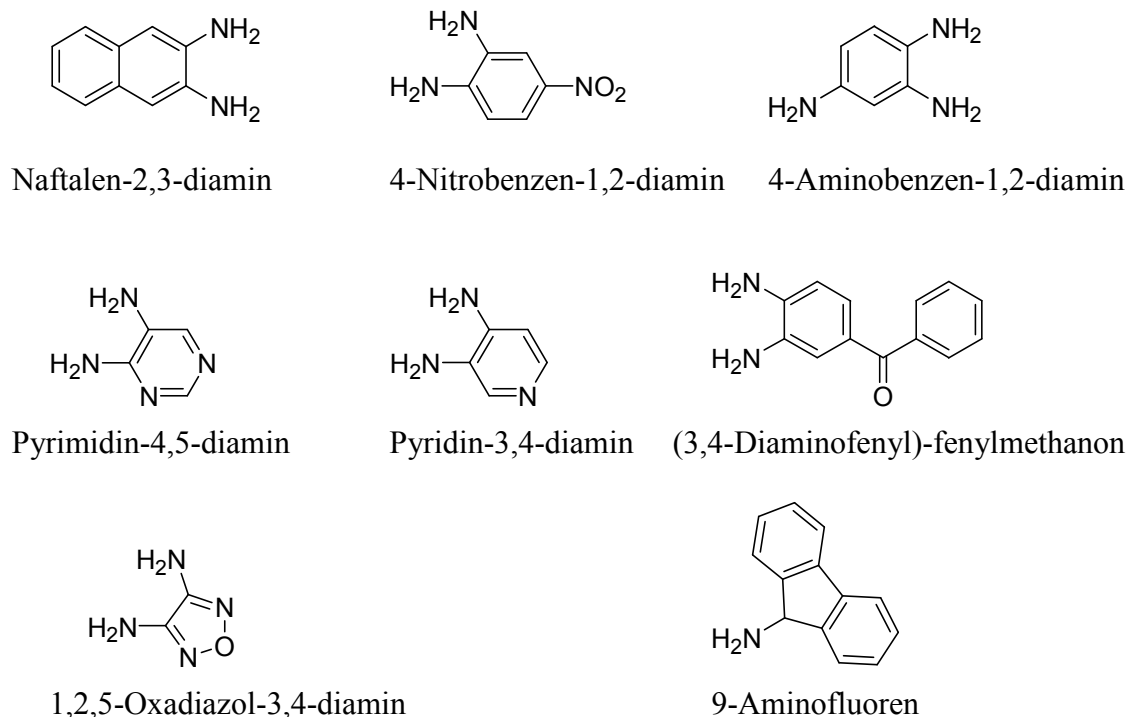
Anilin (An)



N,N-dimethylamin (DMA)



Ethidium bromid (EB)



Obrázek 4: Struktury činidel použitých k derivatizaci.

3.4.1. Derivatizační postupy pro ESI analýzu

3.4.1.1. Derivatizace na karbonylové skupině

První techniku, kterou v této kapitole uvedu je derivatizační reakce založena na značení sacharidů fenylyhydrazinem (PHN). Jedná se o jednu z nejjednodušších a nejstarších derivatizačních procedur, které se pro analýzy cukrů používají.¹⁷ Lattová a kolektiv ve své práci popisují derivatizační činidlo fenylyhydrazin pro MS analýzu s ESI ionizací i MALDI. Toto derivatizační činidlo použili pro jeho jednoduchost a také proto, že se do reakce nepřidávají žádné soli.¹⁸ Jak ukazuje schéma 6, jedná se o reakci karbonylové skupiny s fenylyhydrazinem za vzniku hydrazonu. Tato derivatizace zvyšuje citlivost UV i MS detekce. Dobrých výsledků bylo dosaženo při použití HPLC/ESI-MS, přímým zaváděním roztoku vzorku do ESI-MS a MALDI-TOF. Experimenty byly prováděny s komerčně získanými malými sacharidy (D-glukóza, D-manóza, β -laktóza), většími standardními *N*-glykany a *N*-glykany oddělenými z ovalbuminu (protein z vaječného bílku). Derivatizační postup je vhodný pro analýzu *N*-glykanů, neboť nezničí glykosidickou a acetylovou vazbu.

Derivatizace je poměrně jednoduchá. Zahrnuje rozpuštění cukru v destilované vodě, přidání fenylyhydrazinu (pro velké molekuly oligosacharidů methanolického roztoku fenylyhydrazinu) a zahřívání reakční směsi na 70-80°C po dobu jedné hodiny. Po ochlazení se extrahuje nezreagovaný fenylyhydrazin ethylacetátem. ESI-MS experiment byl prováděn na

Quattro-LC (Micromass) vybavený Z-sprejem a trojitým kvadrupólem. Analýzy byly prováděny buď přímým nástřikem nebo ve spojení s HPLC/ESI-MS. Všechny deriváty malých sacharidů poskytovaly charakteristické signály $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ a $[M-H]^-$. V tandemových ESI-MS/MS spektrech po izolaci $[M+H]^+$ iontů byly pozorovány ztráty monosacharidových jednotek. Detekční limit pro derivatizovanou laktózu byl 20 pmol a pro nederivatizovanou 300 pmol (byla testována ekvimolární směs PHN-laktózy a laktózy o koncentraci 10^{-4} mol·l⁻¹; detekční limit byl definován jako množství materiálu potřebného k produkci $[M+H]^+$ iontů s poměrem signál/šum 4:1).

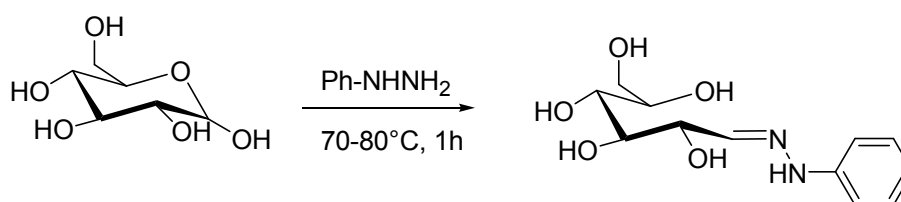
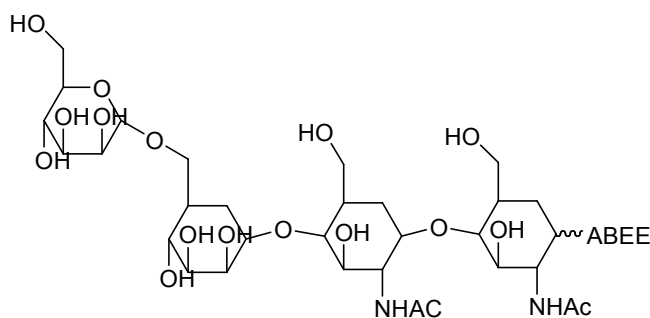


Schéma 6

Další derivatizační postup založený na tvorbě hydrazonů, je reakce polysacharidů s ethylesterem *p*-aminobenzoové kyseliny (ABEE). Autoři¹⁹ použili jako analyzátor iontovou past. Tento přístup je založen na reakci činidla a uzavřené formy glukosaminu a detekci ESI-MS v negativním módu. Autoři se zabývali studiem struktury oligosacharidů (maltoheptaosa, lacto-*N*-fucopentaosa, lacto-*N*-tetraosa, lacto-difucotetraosa, lacto-*N*-difucohecaosa, laminarihecaosa, isomaltohecaosa) a to především jejich sekvencí a způsobem větvení. Pro lineární ABEE-značené oligosacharidy platí, že fragmentace prvního spojení mezi monosacharidovými jednotkami je stejná jako pro ABEE-derivatizované disacharidy. Fragmentační rozpady mezi dalšími jednotkami odpovídali fragmentaci nederivatizovaných oligosacharidů. Pro větvené oligosacharidy byla situace komplikovanější. Nicméně byly nalezeny specifické fragmenty společné oběma typům oligosacharidů. Vazby odpovídající rozvětveným oligosacharidům zde byly jednoznačně potvrzeny. Derivatizační postup spočíval v rozpuštění oligosacharidů v roztoku ABEE (octová kyselina/DMSO) a roztok byl inkubován při 90°C po dobu 10 hodin. Vzorky byly izolovány přečištěním na kolonce a lyofilizací. Navržená podoba derivatizovaného oligosacharidu je ukázána na obrázku 5.



Obrázek 5: Autory navržená struktura derivatizovaného oligosacharidu.

Následující derivatizační postup je vhodný jak pro analýzu malých sacharidů, tak i pro analýzu komplexů sacharidů a oligosacharidů uvolněných z ovalbuminu. Jedná se o přeměnu všech cukrů na biotinové deriváty pomocí inkubace cukru s hydrazidem biotinaminokapronové kyseliny (BACH). Reakce je ukázána ve schématu 7. Tyto deriváty mohou být použity ve strukturní analýze oligosacharidů. Experimenty byly prováděny na MALDI-TOF-MS a na ESI-IT-MS. Derivatizace byla provedena jednoduše rozpuštěním činidla BACH v 30 % acetonitrilu a tento roztok byl smíchán s příslušným cukrem, ke směsi byl dále přidán roztok MeOH/voda (95:5) a proběhla inkubace po dobu jedné hodiny při 90°C. Vzniklé konjugáty byly před měřením přečištěny na C18 kolonce. Měření bylo potom prováděno hmotnostní spektrometrií s ESI a využitím čipové technologie (HPLC-Chip/MS; HPLC čip obsahoval kolonku s rozměry 0,075×43 mm, naplněnou porézním grafitizovaným uhlíkem). V ESI byly při kladné ionizaci pozorovány ionty $[M+H]^+$ malých sacharidů. Pro analýzu sacharidů obsahujících sialovou kyselinu byla použita ionizace negativními potenciály a dominantními ionty byly $[M-H]^-$. Derivatizací byla citlivost zlepšena až třikrát oproti analýze nederivatizovaných cukrů a bylo možné získat informaci o glykosylaci specifických glykoproteinů s malými nároky na čištění vzorku. Autoři nakonec provedli i experimenty LC/MS.²⁰

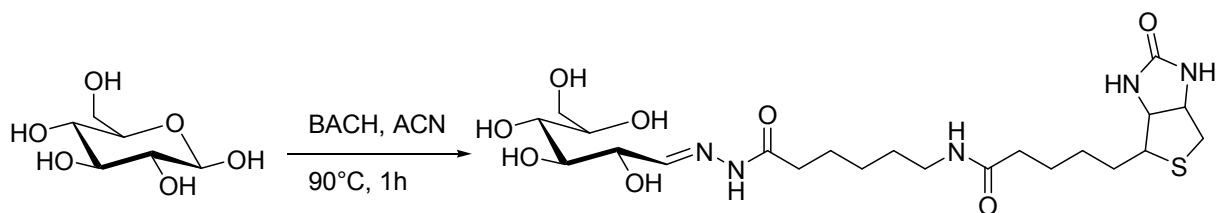


Schéma 7

Následující derivatizační postup byl proveden s izotopicky značeným i neznačeným činidlem – Girardovo činidlo P na analyzátoru s lineární iontovou pastí. Autoři²¹ vychází z publikovaných prací, kdy byla použita činidla jako Girardovo činidlo T, karboxymethyl-tripropylamonium hydrazid a glycidyltrimethylamonium chlorid pro derivatizaci cukrů a Girardovo činidlo P pro derivatizaci proteinů.

Autoři toto činidlo použili pro kvantitativní analýzu rozdílů v expresi *N*-glykanů různých biologických vzorků pro výzkum glykanových biomarkerů různých onemocnění. Tato derivatizační metoda umožňuje zavedení kationtové skupiny do molekuly cukrů. Ve své práci publikují derivatizační metodu pro modifikaci glykanů izotopicky neznačeným a značeným činidlem. Značené činidlo obsahuje pět atomů deuteria (označíme jako *d*₅-GP) a neznačené žádné deuterium neobsahovalo (*d*₀-GP). Cukr derivatizovaný *d*₅-GP činidlem je zobrazen ve schématu 8. GP-derivatizované cukry dávají jednodušší spektra, které nejsou komplikované aduktovými ionty, což dovoluje rychlé a citlivé kvantitativní srovnání mezi rozdílnými typy glykanů. Ionty glykanů derivatizovaných *d*₀-GP a *d*₅-GP činidlem vykazovaly ionty [M]⁺ a [M]⁺ + 5 Da. Analýza byla provedena na LC/MS s využitím hmotnostního spektrometru LTQ XL.

Při reakci mezi karbonylovou skupinou cukru a činidlem dochází k tvorbě hydrazonu, přesněji acyl hydrazonu, viz schéma 8. Derivatizace *N*-glykanů byla provedena rozpuštěním glykoproteinů ve směsi methanol/octová kyselina, přidáním činidla GP a zahříváním na 70°C po dobu tří hodin.

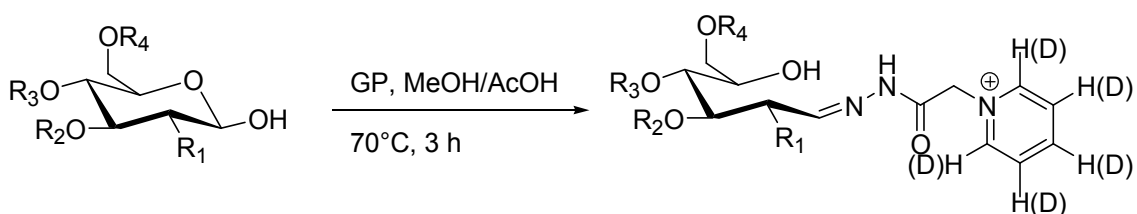


Schéma 8

Derivatizační činidlo, které bylo použito pro analýzu sacharidů ve spojení s ESI a lineární iontovou pastí jako analyzátozem (LTQ XL, Thermo Scientific), je 1-(4-isopropyl)fenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PPMP). Experimenty byly prováděny buď přímým nástřikem, nebo ve spojení s HPLC. Autoři²² pracovali se třinácti monosacharidy a činidlo PPMP bylo připraveno laboratorně. Derivatizační postup byl následující. K methanolickému roztoku PPMP byl přidán vodný roztok monosacharidu a amoniaku. Reakční směs byla 70 minut termostatována na 80°C. Po proběhnutí reakce byla směs odpařena do sucha proudem dusíku, k suchému odparku byl přidán 1 ml vody a byla provedena extrakce dichlormethanem pro odstranění nezreagovaného činidla. Vodná vrstva byla analyzována.

Všechny PPMP-značené monosacharidy poskytovaly charakteristické fragmenty pro redukující cukry. Tyto fragmenty jsou diagnostické pro identifikaci monosacharidů vedle dalších molekul, které obsahují aldehydickou skupinu a rovněž reagují s PPMP činidlem. Pozorované fragmenty můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou ionty vznikající po ztrátě jedné až tří molekul vody nebo po deaminaci. Tyto procesy jsou typické pro hexosaminy (GlcN, GalN). Druhá skupina fragmentů odpovídá intenzivním iontům odpovídajícím charakteristickému štěpení vazby uhlík-uhlík v kostře sacharidů.

Honda a kol.²³ ve své práci použili nejprve 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazol (PMP). Derivatizace je prováděna za slabě bazických podmínek a je kvantitativní. V další práci²⁴ jsou popisována strukturně podobná derivatizační činidla použitá pro HPLC/ESI-MS/MS analýzu. Hmotnostní spektrometr byl vybaven iontovou pastí. Tato metoda byla neustále zlepšována použitím derivátů jako 1-(4-methoxy-fenyl)-3-methyl-5-pyrazol (PMPMP), 4-(3-methyl-5-oxo-2-pyrazolin-1-yl)benzoová kyselina (PMPA) a 1-(2-naftyl)3-methyl-5-pyrazol (NMP). Studie poskytuje srovnání analytických parametrů při derivatizaci monosacharidů řadou 1-aryl-3-methyl-5-pyrazolů. Derivatizované cukry byly analyzovány LC s UV a ESI-MS/MS detekcí. Za použití derivatizace PMP byly od sebe na reverzní fázi dokonale odseparovány glukóza a galaktóza, zatímco derivatizací NMP je možno od sebe oddělit arabinózu a xylózu. Mechanismus reakce se všemi činidly, tedy PMP, PPMP, PMPMP, PMA, NMP je ukázán ve schématu 9.

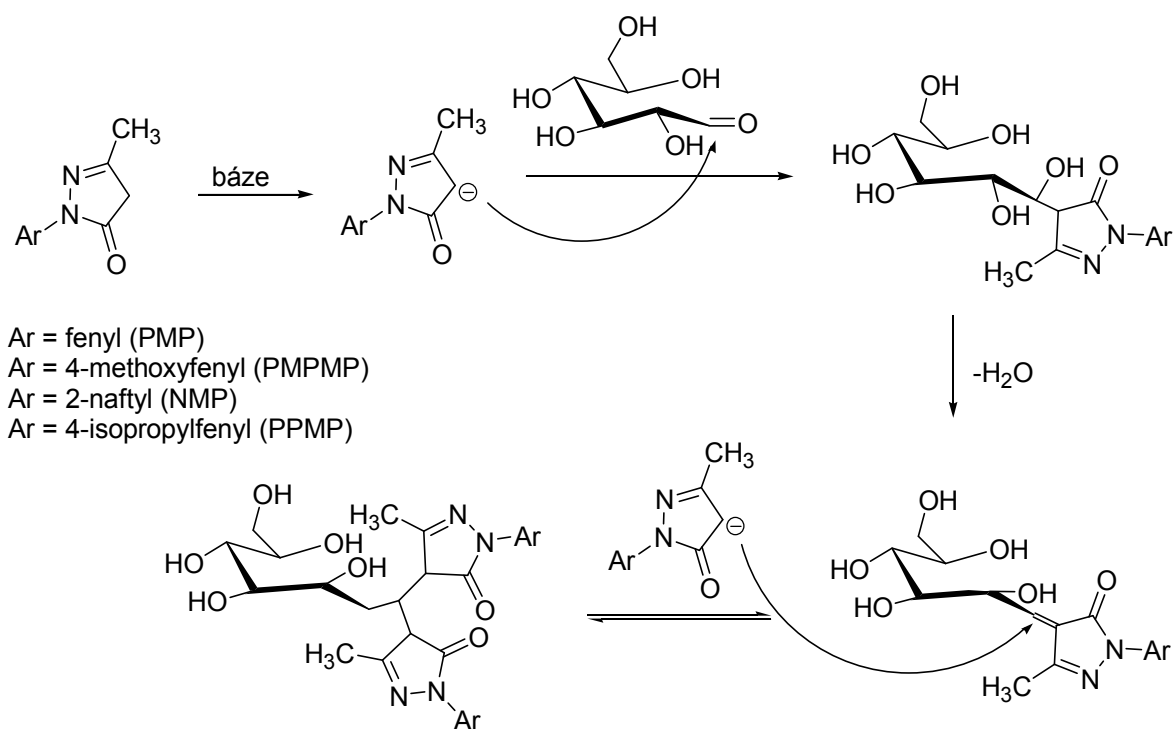


Schéma 9

Na tuto práci navázala skupina autorů²⁵, kteří charakterizovali cukry pomocí dvou derivatizačních činidel (2-aminopyridin (2-AP) a PMP). Autoři v této práci použili trochu odlišný derivatizační postup pro reakci s PMP. Roztoky cukrů vysušili, přidali roztok NaOH a PMP v methanolu, směs zahřivali na 70°C po dobu 2 hodin. Směs následně neutralizovali kyselinou chlorovodíkovou a provedli extrakci pro odstranění organické fáze přidáním 0,5 ml vody a 1 ml chloroformu (extrakci třikrát opakovali). Derivatizaci činidlem 2-AP provedli přidáním činidla v octové kyselině k jednotlivým cukrům a směs zahřivali na 90°C po dobu 60 minut, dále přidali redukční činidlo – dimethylaminoboran (ve vodě a octové kyselině) a směs zahřivali na 80°C 60 minut.

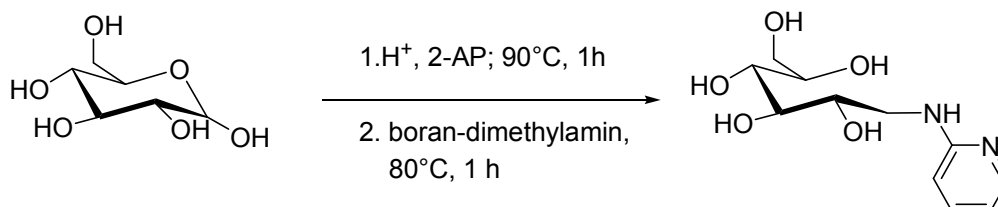


Schéma 10

Výsledky ESI měření ukázaly, že všechny typy malých cukrů mohou být značeny PMP za tvorby relativně stabilních bis-PMP derivátů. Ve spektru derivatizované laktózy byla pozorována ztráta galaktózy a jedné PMP skupiny. PMP-sloučeniny měly při MS analýze citlivost stokrát vyšší než nederivatizované cukry a desetkrát vyšší než 2-AP-deriváty. PMP deriváty jsou také lépe separovatelné na HPLC než 2-AP deriváty. Derivatizace činidlem PMP byla tedy vybrána pro studium větších oligosacharidů. Princip této techniky je redukční aminace a bude o něm více pojednáno v kapitole „Derivatizační postupy pro MALDI-MS“.

Harvey²⁶ publikoval v roce 2000 práci o derivatizaci *N*-glykanů na aldehydické skupině redukujícího konce sacharidů velkým počtem derivatizačních činidel s aminoskupinou. Přípravy derivátu byly založeny na redukční aminaci nebo tvorby Schiffových bází z 2-aminobenzamidu (BA), 2-aminopyridinu (2-AP), 3-aminochinolinu (3-AQ), 2-aminoakridonu (2-AMAC), 4-amino-*N*-(2-diethylaminoethyl)benzamidu, methyl (ABME), ethyl (ABEE) a butyl esteru 4-aminobenzoové kyseliny (ABBE).

Derivatizační postup zahrnoval rozpuštění vysušeného glykanu v bezvodém DMSO, přidání octové kyseliny a nadbytku aminu. Následovalo přidání redukčního činidla kyanoborohydridu na finální koncentraci 1 mol·l⁻¹ tohoto činidla v reakční směsi. Směs byla zahřívána na 65°C dvě hodiny. Schiffovy báze byly připraveny stejně, pouze se do směsi nepřidalo redukční činidlo. Oba postupy byly porovnány. Připravené Schiffovy báze byly málo

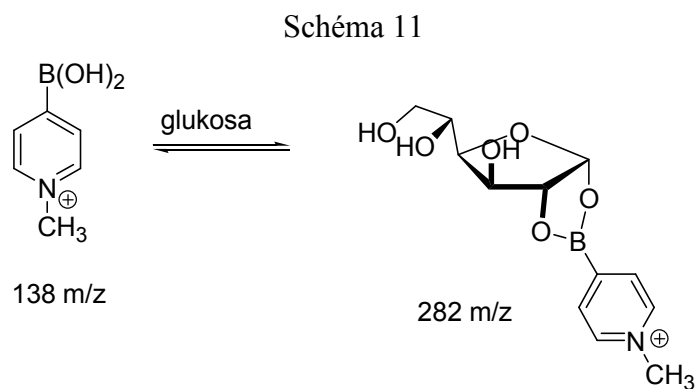
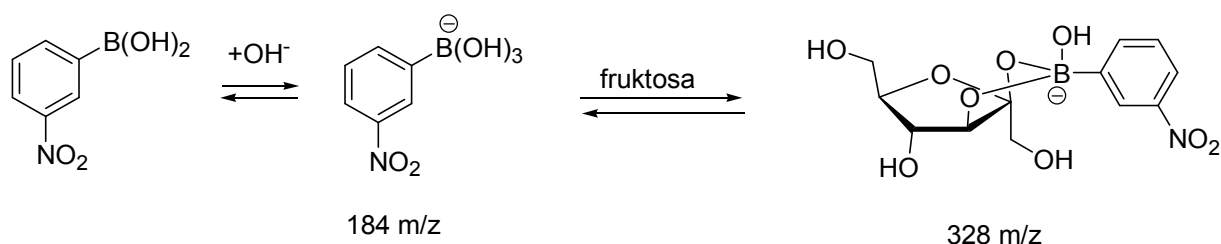
stabilní a výtěžky reakcí byly nízké. Jejich MS/MS spektra $[M+Na]^+$ iontů byly podobné spektrům derivátů připravených reduktivní aminací.

Tato studie ukázala, že derivatizační činidlo má velmi malý vliv na fragmentační mechanismus. Pro všechny deriváty byly kromě derivátů DEAEAB dominantní ionty $[M+Na]^+$. Autoři dále zjistili, že vysoké napětí na kapiláře, které použili pro maximalizaci výtěžku $[M+Na]^+$ iontů vedlo k částečné fragmentaci, což komplikovalo MS spektra.

3.4.1.2. Derivatizace na hydroxylových skupinách

Metoda umožňující derivatizaci na hydroxylových skupinách je derivatizace fenyloboronovou kyselinou. Ta byla použita pro analýzu glukózy, fruktózy, galaktózy, *N*-acetyl-glukosaminu, maltózy, celobiózy, maltoheptaosy a lidského séra. Derivatizované cukry byly analyzovány z teflonového povrchu s využitím DESI a iontové pasti. Experiment byl proveden tak, že elektrosprej ESSI (elektrosonic spray ionization) generoval nabitě mikrokapičky obsahující fenyloboronovou kyselinu a vzorek roztoku cukru byl přiváděn kapilárou na DESI povrch. Ionty byly analyzovány na přístroji LCQ DECA nebo LCQ DECA MAX (Thermo Finnigan).

Autoři také porovnávali reaktivitu fenyloboronové kyseliny s kyselinou 3-nitrofenylboronovou. 3-Nitrofenylboronová kyselina je mnohem reaktivnější, což lze vidět z porovnání výšky signálů hlavních píků 328 *m/z* vs. 282 *m/z* (16:1). Za tuto reaktivitu je zodpovědná elektrony odpuzující nitro skupina (EWG: „electron withdrawing group”). Další pokusy byly provedeny s jodidem *N*-methyl-4-pyridinboronové kyseliny (Schéma 12). Byla porovnána intenzita signálů mezi tímto derivatizačním činidlem a Girardovým činidlem T jako zástupcem kladně nabitého derivatizačního činidla. Intenzita píku 282 *m/z* odpovídající glukóze derivatizované jodidem *N*-methyl-4-pyridinboronové kyseliny byla přibližně 12 krát vyšší než intenzita iontu z DESI Girardova činidla T. Výsledek zřejmě ukazuje na to, že tvorba esteru boronové kyseliny je snazší než tvorba hydrazonů za podmínek DESI experimentu. Při porovnání reaktivity v DESI experimentu za použití fenyloboronové kyseliny s EWG deriváty byla citlivost vyšší s použitím jodidu *N*-methyl-4-pyridinboronové kyseliny. Tato technika poskytla vysokou citlivost, rychlou analýzu, toleranci vůči solím ve vzorku. Vyvinutá metoda je potenciálně vhodná pro analýzu komplexních biologických vzorků.²⁷



3.4.2. Derivatizační postupy pro MALDI-MS

3.4.2.1. Derivatizace na karbonylové skupině

Derivatizace na karbonylové skupině pro redukující cukry jsou výhodně prováděny opět reduktivní aminací s aromatickými aminy. Tato technika je běžně používána pro zavedení chromoforu respektive fluoroforu na podporu detekce. Mnoho laboratoří zabývajících se MALDI technikou využívá tento způsob derivatizace především pro zavedení náboje do molekuly nebo místa s vysokou protonovou afinitou pro zlepšení detekce. Činidel pro tento typ analýz bylo publikováno mnoho, jsou to například 2-aminopyridin (2-AP), trimethyl-(p-aminofenyl)-ammonium chlorid (TMAPA) nebo 2-aminoakridon (2-AMAC). Z principu derivatizace se jedná o sloučeniny obsahující aminoskupinu.¹³

Deriváty obsahující skupinu s vysokou protonovou afinitou mohou být ty, které jsou připraveny reakcí cukru s 4-amino-*N*-(2-diethylaminoethyl)benzamidem (DEAEAB). Tato derivatizační technika byla použita pro analýzu oligosacharidů s MALDI i ESI ionizací.²⁸ Derivatizace pro MALDI experiment byla provedena následujícím postupem: DEAEAB hydrochlorid byl rozpuštěn v methanolu a vzniklý roztok byl přidán ke kyanoborohydridu. Do tohoto roztoku byla přidána octová kyselina. Alikvotní podíl tohoto roztoku byl přidán k roztoku oligosacharidu (1 nmol) ve vodě. Reakční směs byla jednu hodinu zahřívána na 80°C.

Pro analýzu byly derivatizované a (pro porovnání i) nederivatizované oligosacharidy rozpuštěny ve vodě a na MALDI destičku byl dávkován 1 μ l vzorku smíchaný s maticí (α -kyano-4-hydroxy skořicovou kyselinou). MALDI měření bylo provedeno s využitím dusíkového laseru (337 nm). Obecné schéma tohoto postupu je ukázáno ve schématu 13. Ve spektru nederivatizovaných cukrů byl pozorován signál odpovídajících sodných aduktů $[M+Na]^+$. Při nižších koncentracích se tento ion ztrácel v pozadí. DEAEAB-derivatizovaná maltoheptaosa poskytovala výrazně lepší limit detekce. S postupem zahrnujícím derivatizaci byl dosažen limit detekce 10 fmol. Jeho citlivost je tisíckrát větší v porovnání s analýzou nederivatizovaného cukru.²⁹

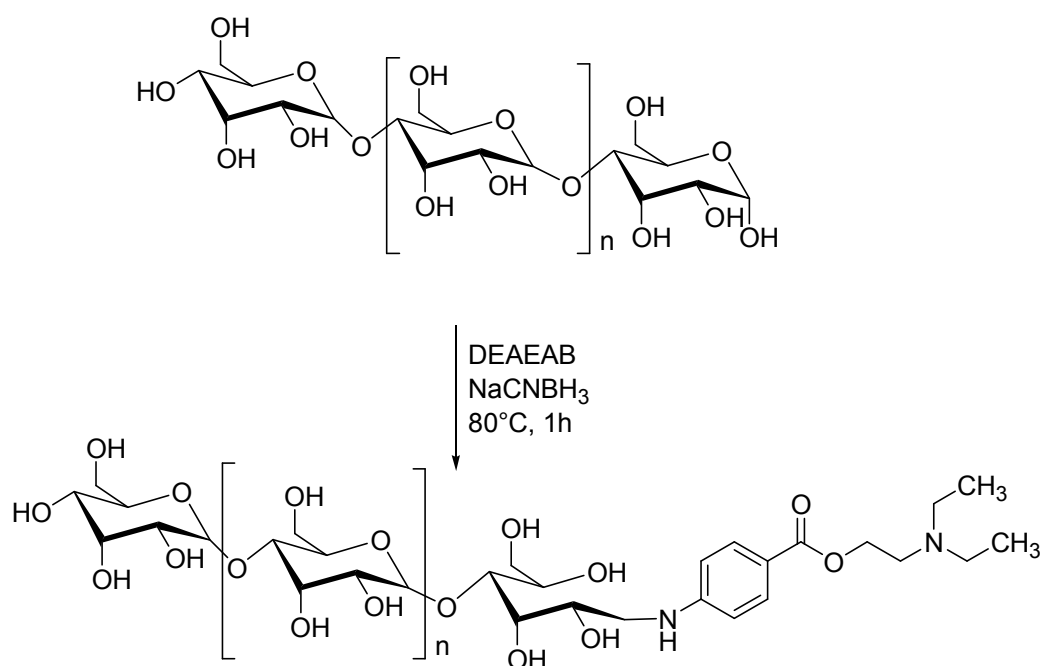
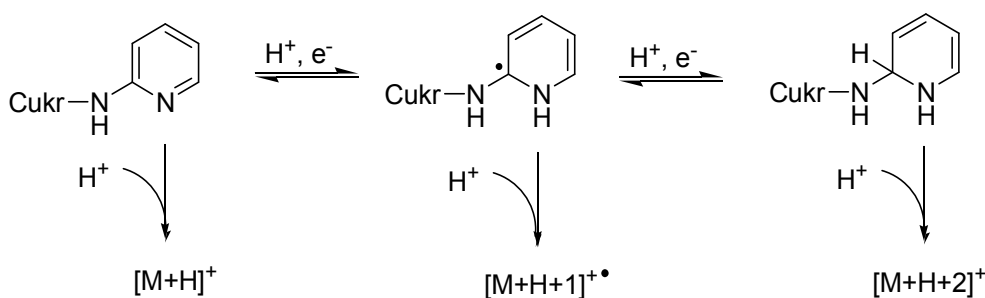


Schéma 13

Z této práce vycházeli Wenjun Mo a kolektiv.³⁰ Ve své studii popisují derivatizaci oligosacharidů získaných enzymatickým štěpením *N*-glykanů z glykoproteinů pro strukturní analýzu. DEAEAB deriváty se osvědčily pro svou jednoduchou přípravu, vysokou reprodukovatelnost a charakteristickou fragmentaci. Tato technika by mohla být aplikována pro selektivní detekci a strukturní analýzu neznámých glykanů získaných z glykoproteinů či glykopeptidů.

Ve všech případech, kdy bylo toto činidlo použito, byla citlivost zvýšena až tisíckrát oproti analýzám nederivatizovaných sacharidů. Výhodou je rovněž dobré rozlišení derivatizovaných cukrů na HPLC s reverzními fázemi.

Dalším derivatizačním činidlem je 2-aminopyridin. 2-AP deriváty byly poprvé využity pro derivatizaci *N*-glykanů už v roce 1981.³¹ Reakce byla původně využita pro HPLC separaci na reverzních fázích nebo pro gelovou permeační chromatografií s UV a fluorescenční detekcí. Optimalizovaný postup je následující. Smíchá se roztok 2-AP, koncentrovaná kyselina chlorovodíková a příslušný cukr a reakční směs je 13 minut zahřívána na 100°C. Poté se přidá redukční činidlo kyanoborohydrid a reakční směs je dále zahřívána 15 hodin při 90°C.³² Modifikovaný reakční postup použili Shen a Perreault²⁵ pro derivatizaci sacharidů 2-AP činidlem pro porovnání s PMP činidlem, viz předchozí text. Toto činidlo bylo použito v další práci také pro MALDI-TOF analýzu oligosacharidů. Autoři navazují na svou předchozí práci, ve které narazili na problém při použití 2,5-DHB jako matrice. Vedle iontu typu $[M+H]^+$ pozorovali také ionty $[M+H+2]^+$. Ionty $[M+H+2]^+$ jsou produktem redukce 2-AP v plynné fázi pomocí UV-laseru vlivem matrice. Autoři v této práci navrhli mechanismus, kterým by tento typ iontu mohl vzniknout³³, viz schéma 14.



2-aminobenzamid (BA) je další činidlo, hojně používané pro derivatizace cukrů³⁴. Lattová a kolektiv¹⁷ toto činidlo vyzkoušela ve své práci spolu s dalšími činidly, a to s 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonem (PMP) a fenylhydrazonem. Ionizace a fragmentace derivatizovaných cukrů zde byly porovnávány za stejných podmínek MS analýzy. Signály ve spektru závisely na typu sacharidu a činidlo. Například epilaktosa poskytovala největší signál s PMP derivatizačním činidlem, laktóza a fukosyl-laktóza produkovala srovnatelné signály se všemi třemi činidly. Pokusy byly prováděny jak s redukovanými BA a PMP deriváty, tak s neredukovanými a ukázalo se, že redukované BA a PMP deriváty jsou stabilnější.³⁵

Lattová¹⁸ a kolektiv popisuje derivatizační činidlo fenylhydrazin (PHN) pro MS analýzu ESI i MALDI-TOF-MS, viz kapitola „Derivatizační postupy pro ESI“. Derivatizační postup pro MALDI je trochu odlišný. Vodný roztok *N*-glykanů, DHB a 5 % methanolického roztoku fenylhydrazinu byly smíchány a směs byla nanesena na MALDI destičku a po dobu 40 minut

byla ponechána při pokojové teplotě. Za těchto podmínek proběhla reakce činidla s cukrem a je tedy možné provádět derivatizaci přímo na MALDI destičce. Matrice s činidlem nereagovala. Za podmínek této analýzy deriváty poskytovaly signály $[M+Na]^+$ $[M+K]^+$. Ukázalo se, že je tato technika vhodná hlavně pro kvalitativní analýzu a že derivatizace přímo na destičce poskytuje stejné výsledky jako derivatizace v roztoku.

Derivatizaci Girardovým činidlem T (GT) publikovali v roce 1996 Naven a Harvey³⁶ jako metodu úpravy vzorku oligosacharidů pro analýzu pomocí MALDI a ESI. Publikovali derivatizační postup, který nevyžaduje zvláštní čistící krok pro MS analýzu, a udávají desetinásobné zvýšení citlivosti detekce oproti nativním cukrům. Derivatizační postup zahrnoval rozpuštění GT v methanolu s octovou kyselinou a aplikaci tohoto činidla na suchý vzorek oligosacharidu. Reakce probíhala při 75°C 3 hodiny. Rozpouštědlo bylo odpařeno vakuem a zbytek byl rozpuštěn v methanolu. GT tvoří s karbonylovou skupinou sacharidu hydrazon, přesněji acyl hydrazon viz schéma 15. Při této derivatizaci dochází k zavedení kvartérní amoniové soli do struktury sacharidu pro zlepšení citlivosti MS detekce. Za těchto podmínek vznikají $[M]^+$ ionty.

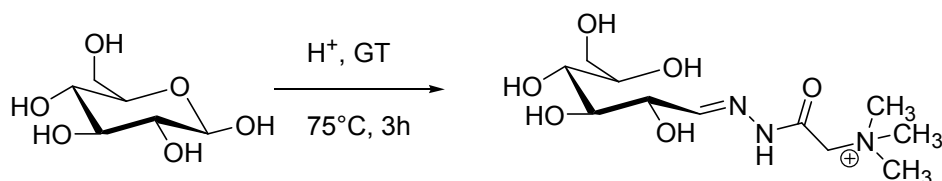


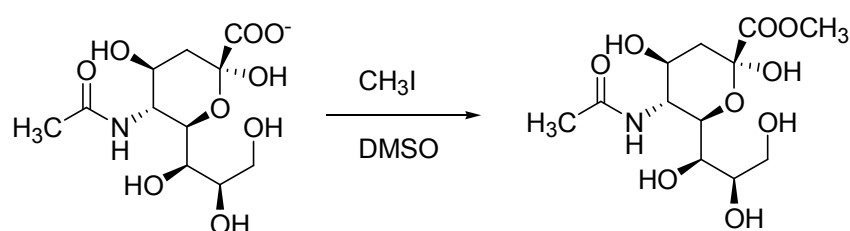
Schéma 15

Toto činidlo bylo také použito pro kvantitativní analýzu neutrálních a sialylovaných *N*-glykanů³⁷. Derivatizované vzorky byly analyzovány MALDI-TOF-MS i NP-HPLC. Výsledky získané měřením oběma technikami si odpovídaly. Navíc postup s využitím MALDI ukazoval lepší rozlišení a selektivitu. Autoři³⁷ této práce převzali dříve publikovaný postup³⁶ a upravily jej. 10 μ l roztoku *N*-glykanu bylo smícháno se 100 μ l roztoku GT (5 nmol/ μ l v 10% octové kyselině v methanolu a roztok zahřívali při 75°C 4 hodiny). Kvantifikace neutrálních analytů derivatizovaných GT poskytoval reprodukovatelné, vysoce citlivé a spolehlivé výsledky. Problém byl při analýze sialylovaných cukrů, ty totiž ve své struktuře obsahují záporný náboj, takže kladný náboj činidla by tento náboj kompenzoval. Navrhují použít enzym sialidázu pro odštěpení sialové kyseliny.

V další publikaci autoři dále řeší podmínky pro stanovení sialylovaných cukrů.³⁸ Uvádí, že sialylované cukry musí být před derivatizačním procesem neutralizovány. Sialylované cukry totiž ve své struktuře obsahují záporný náboj, takže kladný náboj činidla by tento náboj

kompensoval. Jako možné řešení navrhuji permethylaci (tvorbu esterů s karboxylovými skupinami sialové kyseliny – viz schéma 16). Navrhuji použití mírnějších podmínek pro methylační reakci. Původní methylační postup způsoboval částečnou hydrolyzu residuí sialové kyseliny způsobenou oxidativní degradací během methylační reakce. Toyoda³⁹ a jeho spolupracovníci publikovali methylační proces, během kterého použili pro derivatizaci 50% roztok methyljodidu v DMSO. Reakce probíhala 2 hodiny za pokojové teploty. Tento postup však nemodifikoval sialylglykany zcela. Použili tedy 60% roztok a delší reakční čas. Za těchto podmínek došlo ke kompletní esterifikaci karboxylové skupiny sialové kyseliny.

Autoři³⁷ tedy použili mírnější podmínky jak pro derivatizaci, tak pro permethylaci. Pro derivatizaci použili následující postup: suché methyl-esterifikované *N*-glykany byly rozpuštěny v 10 μ l GT roztoku (1 mg/ml v 1% octové kyselině v methanolu) a roztok byl inkubován čtyři hodiny při pokojové teplotě, aby se předešlo hydrolyze esterů a sialových kyselin. Mírnější podmínky při methylační reakci spočívali v reakci v suchém DMSO (10 μ l) s 10 μ l methyljodidu přes noc za pokojové teploty a permethylaci provedli až po derivatizaci GT. Takto provedená úprava vzorků pro kvantifikace neutrálních *N*-glykanů poskytovala vysoce citlivé, reprodukovatelné a spolehlivé výsledky.



Kyselina *N*-acetylneuraminová (kyselina sialová-NANA)

Schéma 16

Zajímavá je derivatizace použitá pro analýzu oligosacharidů v mateřském mléce. Oligosacharidy byly derivatizovány benzylaminem a vzniklý sekundární amin byl dále *N,N*-dimethylován methyl jodidem na kvartérní amoniovou sůl. Princip této reakce je ukázán ve schématu 17.

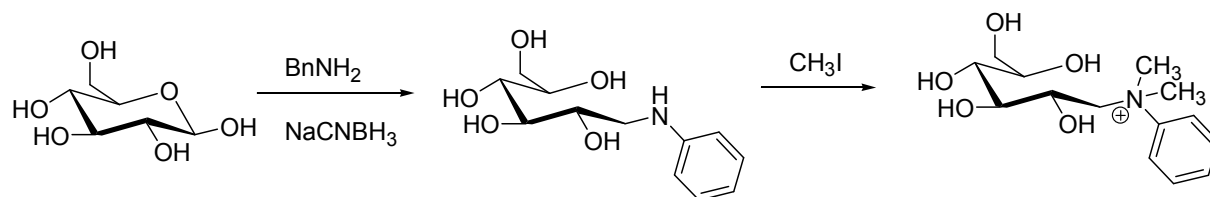


Schéma 17

Reakce byla provedena tak, že 4 μl reakční směsi obsahující 10 mg kyanoborohydridu, 100 μl methanolu, 12 μl octové kyseliny a 3 μl benzylaminu byly přidány do roztoku oligosacharidu (10 nmol, 10 μl vody) a následně bylo přidáno ještě 6 μl methanolu. Výsledná směs byla zahřívána při 80°C po dobu 45 minut. Po ochlazení byl vzorek čištěn na SPE kolonce, analyt byl eluován 20% acetonitrilem ve vodě a vysušen přes noc na vakuové centrifuze. Následně byl vysušený analyt rozpuštěn v ethanolu a ke vzorku byla přidána anexová pryskyřice. Pryskyřice byla promyta vodným roztokem uhličitanu sodného (1 M), vodou a ethanolem. Následně byl přidán methyljodid (5 μl) a směs byla zahřívána 20 minut na 60°C. Alikvotní podíl (1 μl) byl po vysušení analyzován MALDI technikou.

Autoři tyto deriváty testovali na maltoheptaose a třech různých oligosacharidech lidského mléka. Detekční limit této analýzy byl stanoven na 50 fmol, což odpovídá desetinásobku oproti nederivatizovaným sacharidům. Uvedli také dvakrát a pětkrát vyšší detekční limit oproti cukrům derivatizovaným pro srovnání 2-aminopyridinem a Girardovým činidlem T.⁴⁰

Mezi další způsob derivatizace na karbonylové skupině sacharidů patří reakce založené na vzniku Schiffových bází. Ačkoli tyto derivatizační produkty nejsou příliš stálé, jsou za určitých podmínek pro tyto účely používány.³

Příkladem tohoto způsobu derivatizace může být MALDI analýza sacharidů při použití matrice 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny v kombinaci s anilínem (An) nebo *N,N*-dimethylaminanilinem (DMA). Anilín tvoří Schiffovu bázi s karbonylovou skupinou přímo na MALDI destičce. Tato technika byla představena jako vhodný nástroj pro automatizovanou identifikaci a kvantitativní analýzu komplexních vzorků, nicméně tvorba anilínových Schiffových bází vykazovala nižší intenzitu iontů odpovídajících derivatizovaným cukrům oproti iontům přirozených glykanů.¹⁶ Autoři Lin a kolektiv⁴¹ uvádí, že došlo zřejmě k nekompletní tvorbě Schiffovy báze, které navíc mohly být hydrolyzovány v průběhu analýzy. Jejich publikace navazuje na starší práci, která popisuje převedení sacharidu na naftoimidazolové deriváty.⁴² Ve své práci navrhuje alternativní postup, a to syntézu aldo-imidazolových derivátů.

Princip této reakce zahrnuje reakci aldóz s diaminy za vzniku aldo-imidazolů.⁴¹ Vznik naftoimidazolového derivátu lze vidět ve schématu 18.

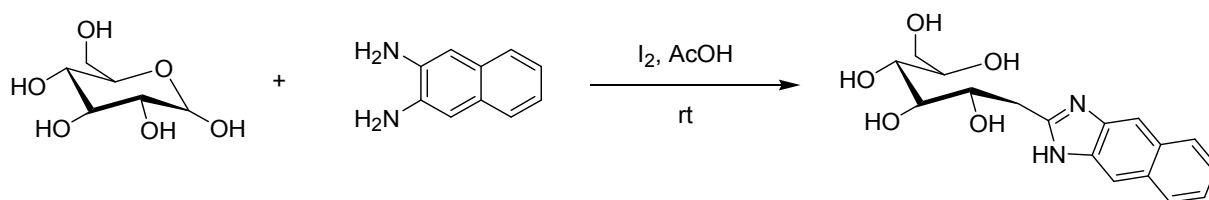


Schéma 18

Mechanismus této reakce je založen na oxidativní kondenzaci, která nastává rychle v přítomnosti KI nebo K₂CO₃ v prostředí kyseliny octové. V prvním kroku dochází k tvorbě Schiffovy báze, druhá aminoskupina atakuje dvojnou vazbu a dojde k uzavření kruhu. Jód oxiduje vazbu za vzniku indazolového kruhu. Reakce byla testována pro mono- a oligosacharidy. Byla vyzkoušena široká škála různých 1,2-diaminů (4-nitrobenzen-1,2-diamin; 4-aminobenzen-1,2-diamin; pyrimidin-4,5-diamin; pyridin-3,4-diamin; (3,4-diaminofenyl)-fenyl-methanon a 1,2,5-oxadiazol-3,4-diamin, který vykazoval nejlepší signál. Výsledkem je vyšší citlivost detekce u derivatizovaného cukru.

Další činidlo, které bylo použito k derivatizaci cukrů, a které využívá stejný reakční mechanismus, tedy tvorbu Schiffovy báze, je ethidium bromid (EB). Jedná se o polycyklický aromatický uhlovodík, obsahující permanentní náboj. Při reakčním procesu nastala téměř kompletní derivatizace celého vzorku s jeho minimální ztrátou.

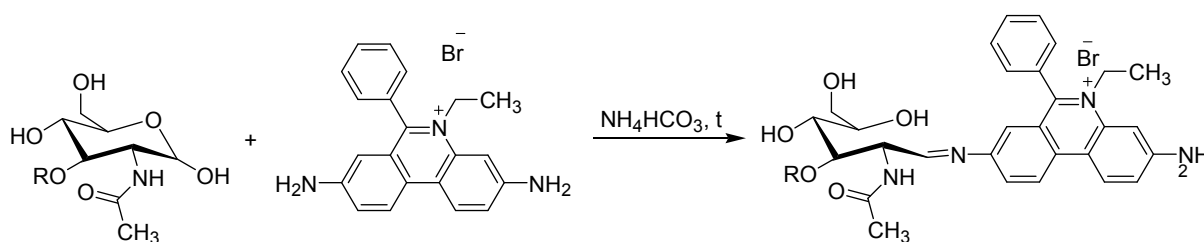
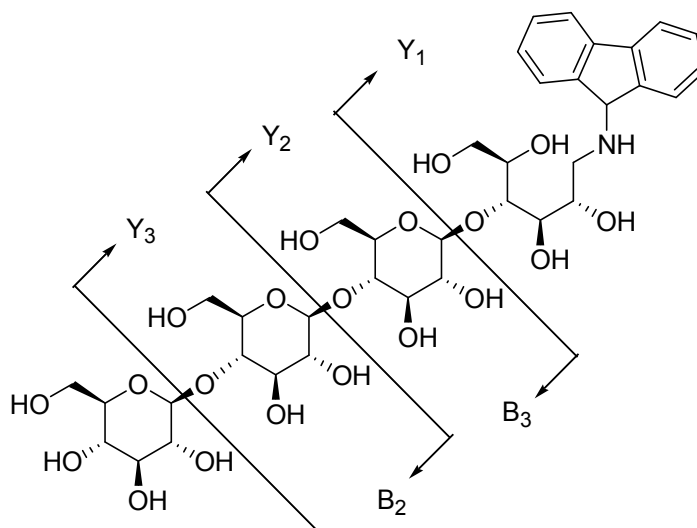


Schéma 19

Pro reakce byl jako katalyzátor použit hydrogenuhličitan amonný v methanolu. Reakce je znázorněna ve schématu 19. Jako vzorek byly použity glykany a byly srovnávány signály derivatizovaných glykanů pomocí ethidium bromidu s glykany modifikovanými permethylací nebo reduktivní aminací s využitím činidla 2-aminobenzamidu. Signál glykanu derivatizovaného ethidium bromidem vykazoval šestkrát vyšší relativní intenzitu oproti derivatizaci s 2-aminopyridinem a třikrát lepší signál oproti permetylovanému glykanu.⁴³

Poslední derivatizační postup této podkapitoly využívá 9-aminofluoren (9AmFL) pro charakterizaci oligosacharidů. Tato značka má vysoký molární absorpční koeficient, je chemicky stabilní a snadno použitelná pro derivatizaci reductivní aminací. Je výborně detekovatelný UV detekcí. Autoři zkoumali mnoho lineárních i větvených oligosacharidů derivatizovaných 9AmFL a čištěných chromatografií na grafitizovaném uhlíku. Analýzy byly provedeny na MALDI-FTICR. Derivatizace probíhaly s vysokými výtěžky. Derivatizací byla stokrát zvýšena absorbance při vlnové délce 206 nm oproti nederivatizovaným alditolům. Nejmenší detekovatelné množství UV-detektorem bylo 5 pmol.

Derivatizační procedura začínala rozpuštěním činidla ve vodě a působením hydrogenuhličitanu draselného pro jeho převedení na volnou bázi. Po 10 minutách byla za pokojové teploty suspenze odpařena ve vakuu a odparek byl rozpuštěn v methanolu. Do roztoku byla přidána octová kyselina a NaCNBH₃ a tento roztok byl okamžitě přidán k roztoku oligosacharidu ve vodě. Směs byla zahřívána na dvě hodiny 80°C. Následovalo odstranění zbytku redukčního činidla, promývání směsí voda/octová kyselina a čištění vzorku na grafitizovaném uhlíku. Jako matrice byla použita 2,5-DHB. Derivatizovaný oligosacharid a Y- a B- fragmenty jsou znázorněny na obrázku 6. CID spektra zkoumaných derivatizovaných lineárních oligosacharidů dovolily kompletní sekvenční analýzu. Autoři uvádí, že 9AmGL značené cukry mohou být použity rovněž pro LC/MS analýzu.⁴⁵



Obrázek 6: Derivatizovaný oligosacharid s naznačenými Y- a B- fragmenty.

3.4.2.2. Derivatizace na hydroxylových skupinách

Permethylační derivatizace jsou běžný nástroj pro hmotnostní spektrometrii glykanů. Zlepšuje citlivost a stabilitu sacharidů, glukuronových kyselin i sialovaných cukrů přeměnou na methylestery. Tento postup zahrnuje metylaci všech hydroxylových skupin v molekule. Permethylace je také užitečná v „hloubkové analýze“ glykanů, protože poskytne informaci o vazbách a větvení.

Autoři zvolili pro derivatizaci následující postup: rozpuštění cukru v DMSO, přidavek NaOH nebo NaH za pokojové teploty, a dále nadbytek MeI. Vzniklý roztok byl uchováván několik hodin při pokojové teplotě. Po proběhnutí reakce byl vzorek zředěn vodným roztokem octové kyseliny a extrahován chloroformem. Chloroformová fáze byla odpařena a uchovávána při -20°C před analýzou. Tímto postupem byl derivatizován dextran, glucomannan, β -1,3-glukan, pullan, arabinoxylan, xylan, arabinogalaktan a alginová kyselina. Permethylovaný glukomannan byl pozorován ve spektru jako sodný adukt. Jednotlivé sousední píky měly mezi sebou rozdíl 204,1 Da (tři methylované hexosové jednotky + 31,0 $-\text{OCH}_3$). Obecně permethylace zlepšila MS citlivost, hmotnostní rozsah a intenzitu signálů v porovnání s nativními sacharidy. Nicméně permethylace zahrnuje komplikovanou přípravu vzorků a nezbytné čištění vzorků extrakcí. Navíc čistit látku neobsahující chromofor je komplikované pro malá množství vzorků.⁴⁴

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie

Deionizovaná voda z dvoustupňové deionizační stanice Merck-Millipore Direct (Merck-Millipore S.A.S, Molsheim, Francie). Dále byly použity následující chemikálie: methanol (gradient grade, pro HPLC, CHROMANORM, Francie), D-glukóza (p.a., Lachema, Brno, ČR), Sacharóza (p.a., Lachema, Brno, ČR), škrob (p.a. Lachema, Brno, ČR), glycidyltrimethylammonium chlorid (technical, 90% Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), NaOH (p.a., Lachema, Brno, ČR), 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (matrix substance for MALDI-MS, 99%, HPLC, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Benzyl-glycidyl-dimethyl-amonium jodid (BGDMA) a (4-bromo-benzyl)-glycidyl-dimethyl-amonium jodid (BBGDMA) byly připraveny v naší laboratoři.

4.2. Příprava vzorků

Obecný postup pro derivatizaci činidly GMTA, BBGDMA, BGDMA

Pro derivatizaci cukrů byl použit postup, který navrhli autoři Gouw a kolektiv.⁴⁶ 9 mg cukru bylo naváženo v suchém stavu do vialky a k cukru bylo přidáno 100 μ l deionizované vody, 7 μ l GTMA a nakonec 50 μ l 1 M roztoku NaOH. Pro derivatizaci činidly BGDMA a BBGDMA byl použit modifikovaný postup. Modifikace spočívala v tom, že činidlo bylo rozpuštěno ve 100 μ l methanolu a bylo přímo přidáno k naváženému cukru, poté byl přidán 1 M roztok NaOH (50 μ l). Stejným způsobem byly připraveny i odpovídající nederivatizované vzorky cukrů (reakční směs byla připravena stejně, jen nebylo přidáno derivatizační činidlo). Blanky činidel byly připraveny stejným způsobem, ale bez přidání cukru. Směs byla zahřívána ve vodní lázni při 55°C po dobu dvou hodin nebo alternativně přes noc při pokojové teplotě. Pro ESI analýzu byl vzorek zředěn vodou na 100 mg/l. Pro MALDI měření byly vyzkoušeny různé koncentrace derivatizovaných cukrů a blanků činidla (GTMA: 100 mg/ml a 10 mg/ml; BGDMA a BBGDMA 100 mg/l).

Tabulka 2: Typ, množství činidla a rozpouštědlo pro derivatizaci.

Činidlo	Objem činidla, respektive hmotnost	Rozpouštědlo
GTMA	7 μ l	Voda
BBGDMA	22 mg	Methanol
BGDMA	19 mg	Methanol

Pro MALDI analýzu byl vzorek smíchán s matricí, 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinou (10 mg/ml v MeOH) v poměru 1:1 a na MALDI destičku byl dávkován 1 μ l vzorku.

4.3. Experimentální podmínky syntézy a charakterizace činidel

Benzyl-glycidylmethyl amin

Reagenty *N*-methylbenzylamin (8,6 ml; 0,066 mol) a epichlorhydrin (6,26 ml; 0,08 mol) byly postupně přidány do 59 ml propanolu (*n*-PrOH), pod argonovou atmosférou. Směs byla zahřívána 6 hodin na 80°C. Po odpaření propanolu za sníženého tlaku, byl přidán *t*-BuOH (59 ml) a za míchání byl přidán vodný roztok KOH (4,82 g; 0,086 mol; 13,0 M). Směs byla zahřívána na 80°C po dobu 90 minut. Vyloučený KCl byl po ochlazení odfiltrován a filtrát byl odpařen na vakuové odparce. Pro izolaci produktu byla provedena vakuová destilace v rozmezí teplot 87-94°C při tlaku 1,4 Torr.

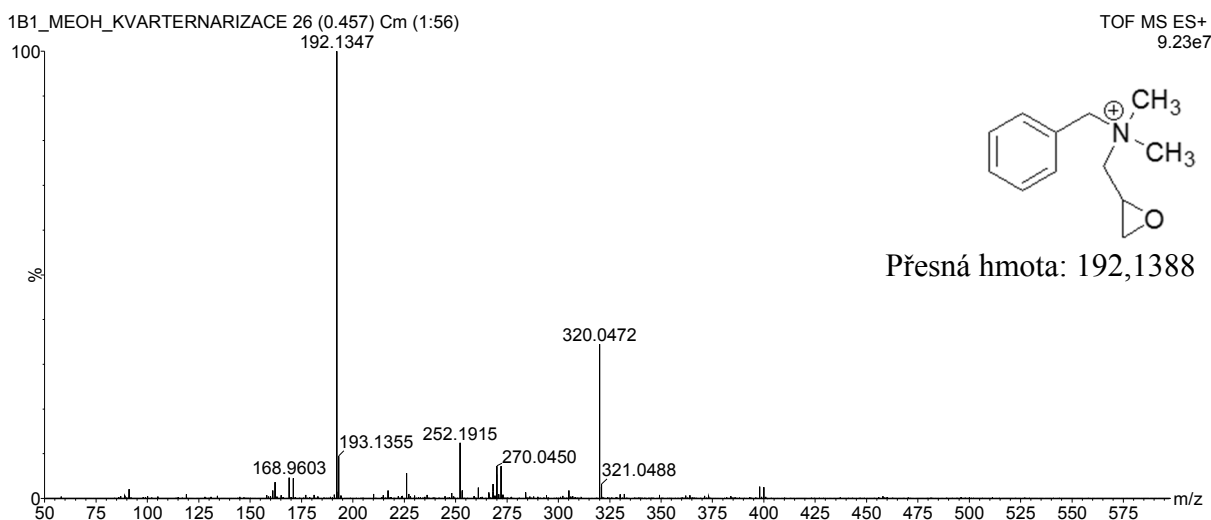
Čistota dle LC-MS: 91%

Benzyl-glycidylmethyl amin: $[M+H]^+ = 178,03$.

Benzyl-glycidylmethyl-amonium jodid

Produkt po destilaci (1,17 g; 6,63 mmol) byl rozpuštěn v 1 ml bezvodého ACN v ledové lázni. Za stálého míchání byl po kapkách po dobu 20 minut přidáván methyljodid (0,577 ml; 1,32 mol) pod inertní atmosférou a následně byla směs míchána přes noc za pokojové teploty. Izolace byla provedena rozpuštěním produktu ve vodě, následovala extrakce toluenem, případně ethylacetátem a vodná fáze byla lyofilizována. Látka byla charakterizována hmotnostní spektrometrií.

Benzyl-glycidylmethyl-amonium jodid: $[M]^+ = 192,1347$.



Obrázek 7: MS spektrem připraveného činidla benzyl-glycidylmethyl-amonium jodidu.

(4-Bromo-benzyl)-glycidylmethyl amin

(4-Bromo-benzyl)-methyl amin (1g; 5 mmol) byl přidán do 5 ml *n*-PrOH, následně byl přidán epichlorhydrin (0,47 ml; 6 mmol) pod inertní atmosférou, po uzavření v tzv. pressure tube byla směs zahřívána na 80°C po dobu šesti hodin. Po odpaření propanolu za sníženého tlaku byl přidán *t*-BuOH (5 ml) a za míchání byl dále přidán vodný roztok KOH (0,34 g; 6,07mmol; 12,15 M). Směs byla zahřívána na 80°C po dobu 90 minut. Po odfiltrování vyloučeného KCl byl filtrát odpařen na vakuové odparce. Pro izolaci produktu byla provedena vakuová destilace při tlaku 1,5 Torr a teplotě vodní lázně 160°C. Destilace byla provedena s límcovou baňkou.

Čistota dle LC-MS: 67 %

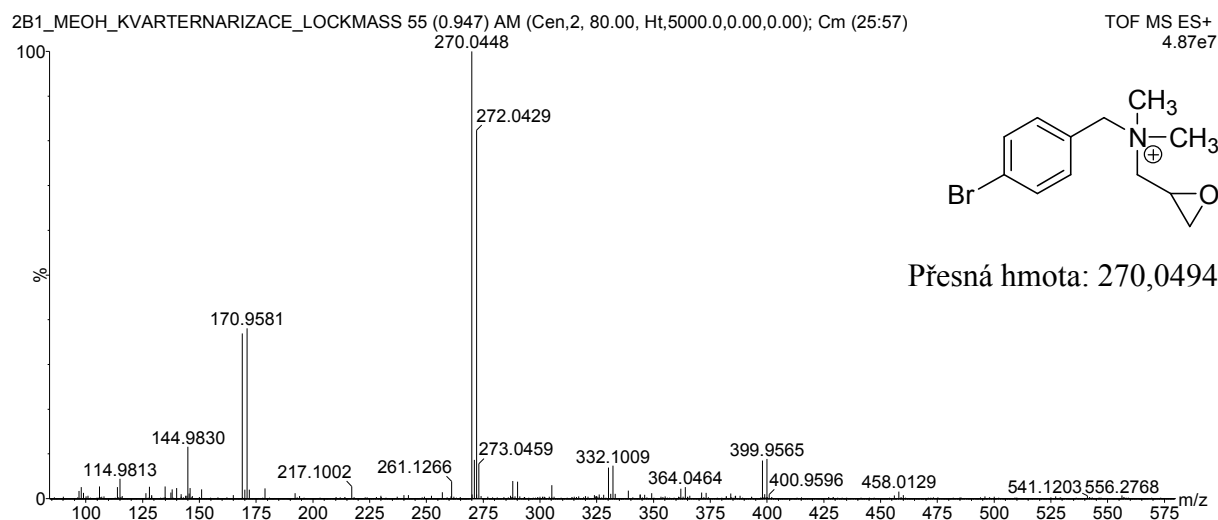
(4-Bromo-benzyl)-methyl amin: $[M+H]^+ = 255,83$.

(4-Bromo-benzyl)-glycidyl dimethyl-amonium jodid

Produkt (4-bromo-benzyl)-methyl amin po reakci bez destilace i po reakci s destilací (tento produkt obsahoval více vedlejších produktů) byl rozpuštěn v 0,75 ml ACN v ledové lázni. Následně byl po kapkách za stálého míchání a chlazení (ledová lázeň) přidán methyljodid (0,92 ml; 14,0 mmol) pod atmosférou argonu. Reakce dále probíhala přes noc při pokojové teplotě. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a produkt byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie.

Čistota dle LC-MS: 53 %

Charakterizace: ESI $[M]^+$ m/z 192,1347.



Obrázek 8: MS spektrem připraveného činidla (4-bromo-benzyl)-glycidylmethyl-amonium jodidu.

4.4. Instrumentace

4.4.1. Použité přístroje

Synapt G2-S HDMS (Waters, USA)

Synapt G2-S HDMS je hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením (40 000 FWHM) vybavený iontovým zdrojem ESI a MALDI a iontovou optikou T-Wave. Q-TOF hmotnostní analyzátor se skládá z kvadrupólového analyzátoru, analyzátoru doby letu (TOF) s ortogonálním uspořádáním. V prostoru analyzátoru je integrovaná mobilní cela (T-Wave IMS) umožňující separaci iontů podle jejich kolizních průřezů (iontově mobilní separace).

Q-TOF Premier (Waters, USA)

Q-TOF Premier je hybridní hmotnostní spektrometr skládající se z kvadrupólu, T-Wave kolizní cely a analyzátoru doby letu s ortogonálním uspořádáním. Přístroj byl vybaven iontovým zdrojem ESI (Z-Spray geometrie).

4.4.2. Základní parametry metod

A) Synapt G2-S HDMS (Waters, USA)

Experimenty s činidlem GTMA

Iontový zdroj – elektrosprej, napětí na sprejovací kapiláře + 3 kV; teplota iontového zdroje 100°C, napětí na Sampling cone 30 V; desolvační teplota 450°C, Cone Gas Flow (L/Hr): 50,0; Desolvation Gas Flow (L/Hr): 600,0. LM Resolution: 15,0; HM Resolution: 15,0. Kolizní energie 30 eV pro fragmentační experimenty. Rozsah hmot 50 – 2000 Da, doba skenu 1 s (interscan delay 0,015 s), doba analýzy 2 min., formát dat: Continuum, Resolution Mode.

Iontový zdroj – MALDI, polarita: +; rychlost laseru (PlateSpeed) 20; frekvence laseru (LaserFiringRate) 1000 Hz; energie laseru 400 μ J; Pattern Filename Spiral_96.ptn; chladicí plyn (Cooling Gas Flow) 10 l/hod. Kolizní energie – trap 4 eV, kolizní energie – transfer 2 eV; LM Resolution 10,0; HM Resolution 15,0. Rozsah hmot 50 – 2000 Da. Doba skenu 1 s a doba analýzy 4 min. (Fixed Time), formát dat Continuum, Sensitivity Mode.

Experimenty s činidly BGDMA a BBGDMA

Iontový zdroj – elektrosprej (Z-spray), napětí na sprejovací kapiláře + 2,5 kV; teplota iontového zdroje 100°C, napětí na Sampling cone 40 V; desolvační teplota 400°C, Cone Gas Flow (L/Hr): 10,0; Desolvation Gas Flow (L/Hr): 500,0. LM Resolution: 15,0; HM Resolution:

15,0. Kolizní energie: 30 eV pro fragmentační experimenty. Rozsah hmot 50 – 1200 Da, doba skenu 1 s (interscan 0,015 s), doba analýzy 1 min., formát dat Continuum, High Resolution Mode.

Iontový zdroj – MALDI, polarita: +; rychlost laseru (PlateSpeed) 25; frekvence laseru (LaserFiringRate) 1000 Hz; energie laseru 400 μ J; Pattern Filename Spiral_96.ptn; chladicí plyn (Cooling Gas Flow) 10 l/hod. Kolizní energie – trap 4 eV, kolizní energie – transfer 2 eV; LM Resolution 15,0; HM Resolution 15,0. Rozsah hmot 50 – 2000 Da. Doba skenu 1 s a doba analýzy 2 min. (Fixed Time), formát dat Continuum, Sensitivity Mode.

B) Q-Tof Premier

Iontový zdroj – elektrosprej (ZSpray), napětí na sprejovací kapiláře + 2,5 kV; teplota iontového zdroje 100°C, napětí na Sampling cone 40 V; desolvační teplota 250°C, Cone Gas Flow (L/Hr): 20,0; Desolvation Gas Flow (L/Hr): 250,0. LM Resolution: 15,0; HM Resolution: 15,0. Kolizní energie: 30 eV. Rozsah hmot 50 – 2000 Da, doba skenu 1 s (interscan delay 0,10 s), doba analýzy 2 min., formát dat: Continuum, V Mode.

Kalibrace byla pro ESI měření prováděna s využitím mravenčanu sodného a pro MALDI s využitím červeného fosforu. Pro měření přesné hmoty byla použita lock mass korekce. Pro ESI experimenty byl pro lock mass použit roztok leucin-enkefalinu a pro MALDI červený fosfor.

5. Výsledky a diskuse

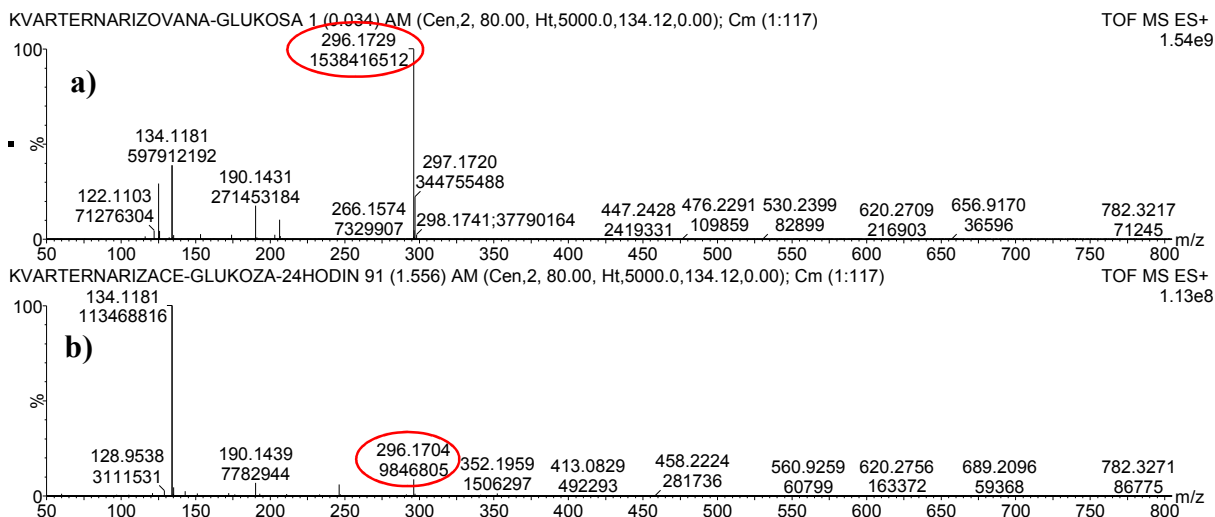
Kvarternarizace je zavedení kvarterní amoniové jednotky do struktury analytu. Analyt tím získá permanentní náboj, čímž se zlepší citlivost detekce v hmotnostní spektrometrii. Jako první pro derivatizaci cukrů bylo testováno komerčně dostupné činidlo glycidyltrimethylamonium chlorid (GTMA). Výhoda GTMA spočívá v tom, že činidlo reaguje s volnou hydroxylovou skupinou a je tedy vhodné jak pro redukující, tak pro neredukující cukry. GTMA je určeno pro lepší detekci cukrů pouze pro analýzy hmotnostní spektrometrií. Další část práce se zabývá syntézou a testováním dvou nových činidel nesoucích kromě kvarterní amoniové skupiny v molekule i chromofor. Mohou být tedy potenciálně využity pro UV detekci při chromatografické detekci, případně pro LDI analýzy bez přítomnosti matrice. Jedno z navržených činidel obsahuje v molekule atom bromu, který má charakteristický izotopický profil potenciálně usnadňující identifikaci derivatizovaných analytů ve vzorcích.

V následujícím textu budou diskutované signály pro přehlednost zvýrazněny barevným zakroužkováním. Červená barva odpovídá hledaným iontům analytu, případně fragmentům z nich odvozených, modrá barva značí sodné adukty nederivatizovaných analytů, zelenou barvou jsou značeny ionty související s činidlem, žlutá barva značí ionty matrice.

5.1. Testování derivatizace činidlem GTMA

5.1.1. Měření hmotnostních spekter pomocí ionizace elektrosprejem

V první fázi experimentu prováděném pomocí ionizace elektrosprejem se testovaly podmínky derivatizace s činidlem GTMA. Reakce probíhala ve vodě a experimenty byly provedeny se vzorkem zředěným ve vodě na koncentraci 100 mg/l. Jak již bylo zmíněno v experimentální části, derivatizační proces probíhá buď po dobu dvou hodin na vodní lázni při 55°C nebo přes noc při pokojové teplotě. Nejprve se tedy testovalo, který ze dvou postupů bude pro derivatizaci výhodnější. Oba přístupy poskytovaly dobrý výtěžek iontů derivatizovaných cukrů a ve spektru byl pozorován pík kvarternarizované glukózy. Jak lze vidět z následujícího spektra, ion analytu s m/z 296 má v případě, kdy byla derivatizace provedena během dvou hodin intenzitu ($1,44 \cdot 10^9$) lepší téměř o dva řády proti druhému způsobu derivatizace ($9,86 \cdot 10^6$). Ve spektru sacharózy byla opět lepší intenzita pro kvarternarizovaný ion analytu s m/z 458 ($3,60 \cdot 10^7$ pro dvouhodinovou derivatizaci a pro druhý způsob $3,12 \cdot 10^7$). U škrobu byla sice situace u dominantního iontu opačná, nicméně spektrum je komplikovanější, proto nelze vyvodit v tomto případě jednoznačný závěr.



Obrázek 9: Kvarternarizovaná glukóza po derivatizaci **a)** 2 hodiny, 55°C **b)** 24 hodin, pokojová teplota.

Tabulka 3: Hodnoty m/z a intenzity analytu pro derivatizační postupy.

Analyt	2 hodiny, 55°C		24 hodin, 25°C	
	m/z iontu	Intenzita	m/z iontu	Intenzita
Glukóza	296,1729	1538526512	296,1882	9846805
Sacharóza	296,1882	1000417792	296,1882	1117331456
	458,2455	35986216	458,2455	31249522
Škrob	296,1882	15239900	296,1882	19432310
	458,2455	210014330	458,2455	27930840

Pro studium derivatizačního procesu byl vybrán jako modelový cukr glukóza. Glukóza má molekulovou hmotnost $M_r = 180,0634$. Pokud bude tato molekula kvarternarizována činidlem GMTA měla by mít výsledná struktura molekulovou hmotnost 296,1709. Ve všech spektrech se objevuje hydrolyzované činidlo GMTA, viz schéma 20, které má přesnou molekulovou hmotnost 134,1181. Pro zpřesnění molekulové hmoty zkoumaného analytu je možno provést interní korekci a spektrum „zamknout“ na tuto hodnotu. Tento postup byl použit u spekter naměřených bez referenčního spektra pro lock mass. Struktura derivatizované glukózy s naměřenou hodnotou m/z 269,1807 $[M]^+$ je zobrazena ve schématu 20 (odchylna $\delta = 36,4$ ppm od teoretické hodnoty). GMTA se naváže na některou hydroxylovou skupinu v cukru a může docházet ke vzniku struktur izomerních k zobrazené struktuře. V rámci experimentů nebylo studováno, na kterou hydroxylovou skupinu se činidlo naváže přednostně. Ve spektru je při přiblížení také patrna hodnota m/z 203,0581 odpovídající sodnému aduktu glukózy $[Glukóza+Na]^+$. Ve spektru byl pozorován jen sodný adukt, protonovaná molekula

glukózy ani adukt s draslíkem pozorován nebyl. Důvodem je skutečnost, že se do reakce přidává 1 M roztok NaOH. Intenzita iontu $[M]^+$ ($1,54 \cdot 10^9$) je oproti intenzitě iontu $[Glukóza+Na]^+$ ($3,64 \cdot 10^7$) přibližně 42 krát vyšší. Ve fragmentačním spektru lze vidět, že se analyt rozpadá na fragment s m/z 134. Tento rozpad odpovídá ztrátě 162 hmotnostních jednotek, což odpovídá dehydratované molekule glukózy.

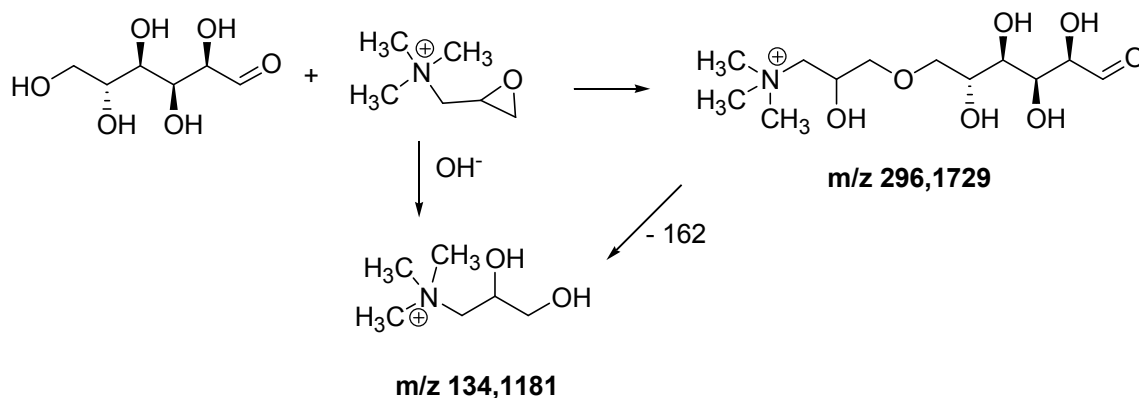
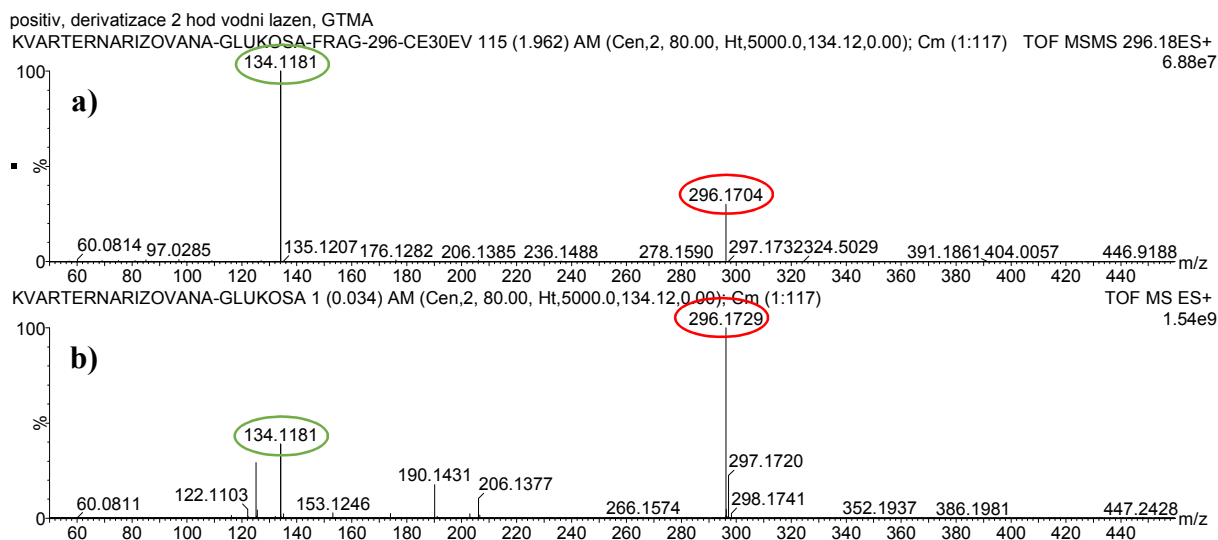


Schéma 20



Obrázek 10: **a)** Fragmentační spektrum (MS/MS) kvarternarizované glukózy s m/z 296 **b)** MS spektrum.

Sacharóza byl další studovaný cukr. Ve spektrech derivatizované sacharózy byl pozorován jak ion odpovídající kvarternarizovanému disacharidu, tak i ion odpovídající kvarternarizované glukóze. Ten vzniká pravděpodobně fragmentací derivatizované sacharózy v iontovém zdroji. Návrh kvarternarizované sacharózy je ukázán ve schématu 21. Ve spektru je patrná také sodiovaná molekula sacharózy s hodnotou m/z 365,1060. Tento ion má přibližně dvakrát vyšší intenzitu než m/z 458,2236. Ion dominantní ve spektru s m/z 296,1718 má přibližně 14 krát vyšší intenzitu oproti sodnému aduktu sacharózy.

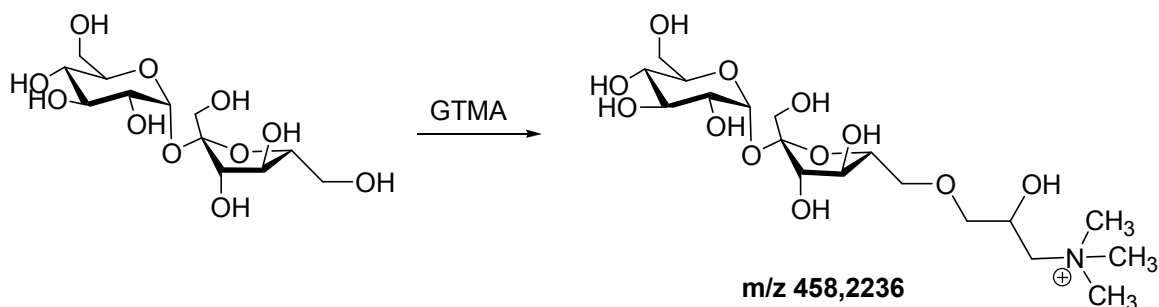
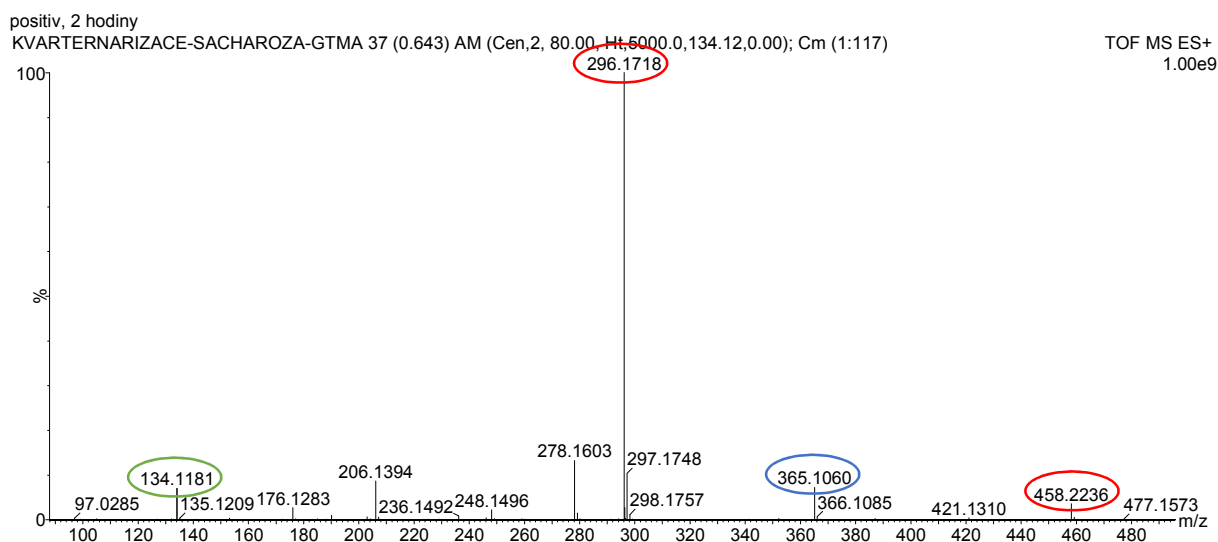


Schéma 21

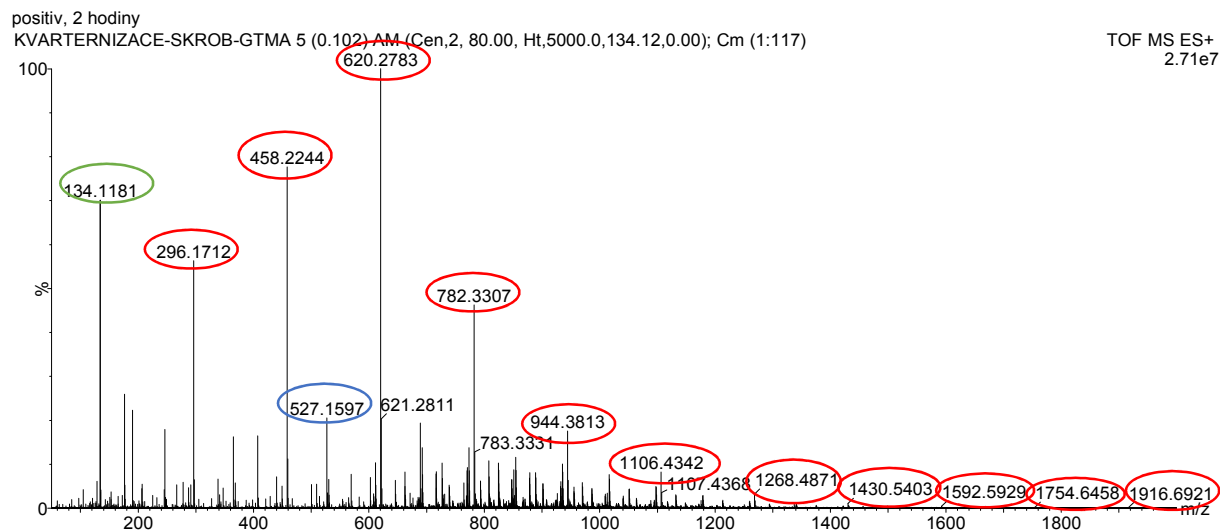


Obrázek 11: MS spektrum kvarternarizované sacharózy.

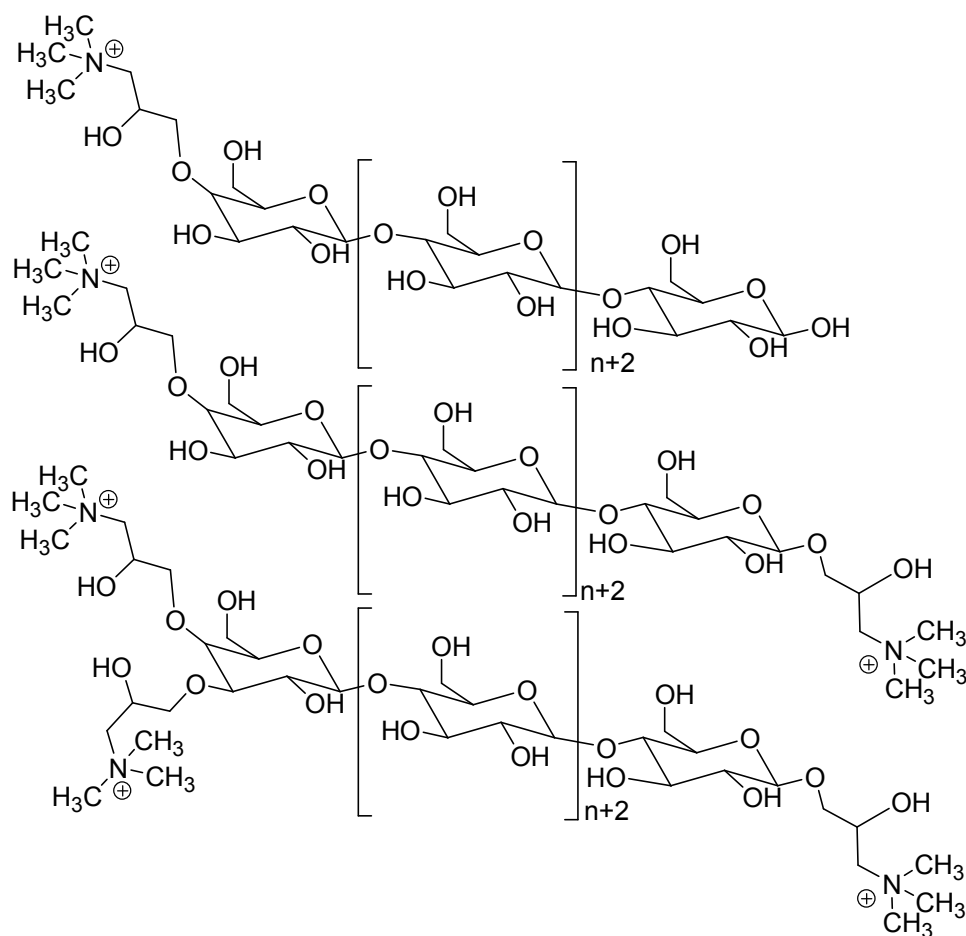
Pro testování derivatizace polysacharidů byl vybrán škrob. Většina škrobů je směsí amylosy a amylopektinu vyskytujících se v hmotnostním poměru 1:3. Amylosa obsahuje 1000-2000 glukózových jednotek, amylopektin až sto tisíc. Molekulová hmotnost amylosy je v rozmezí 180-1000 kDa a amylopektinu 10-200 MDa.⁵ V naměřeném hmotnostním spektru byly pozorovány píky odpovídající hydrolytickým produktům škrobu o různém počtu monomerních jednotek. K rozkladu dochází pravděpodobně částečně hydrolyzou při derivatizačním postupu, ale také fragmentací v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru.

Pík se 100% intenzitou ve spektru byla kvarternarizovaná molekula skládající se ze tří monomerních jednotek s hodnotou m/z 620,2783 a intenzitou $2,71 \cdot 10^7$. Odpovídající nederivatizovaný oligomer s m/z 527,1597 měl intenzitu $5,56 \cdot 10^6$, tedy přibližně pětkrát menší. Kvarternarizovaná oligomerní jednotka s jedenácti monomery m/z 1916,6921 měla intenzitu 29122, odpovídající sodný adukt měl intenzitu 32976. Ve spektru byly dále pozorovány struktury se dvěma nebo třemi navázanými GTMA-molekulami. Patrně největší oligomer se třemi molekulami GTMA obsahuje 15 monomerů a největší oligomer se dvěma molekulami má dvanáct oligomerních jednotek. Návrh struktur všech tří typů nalezených analytů je ukázán

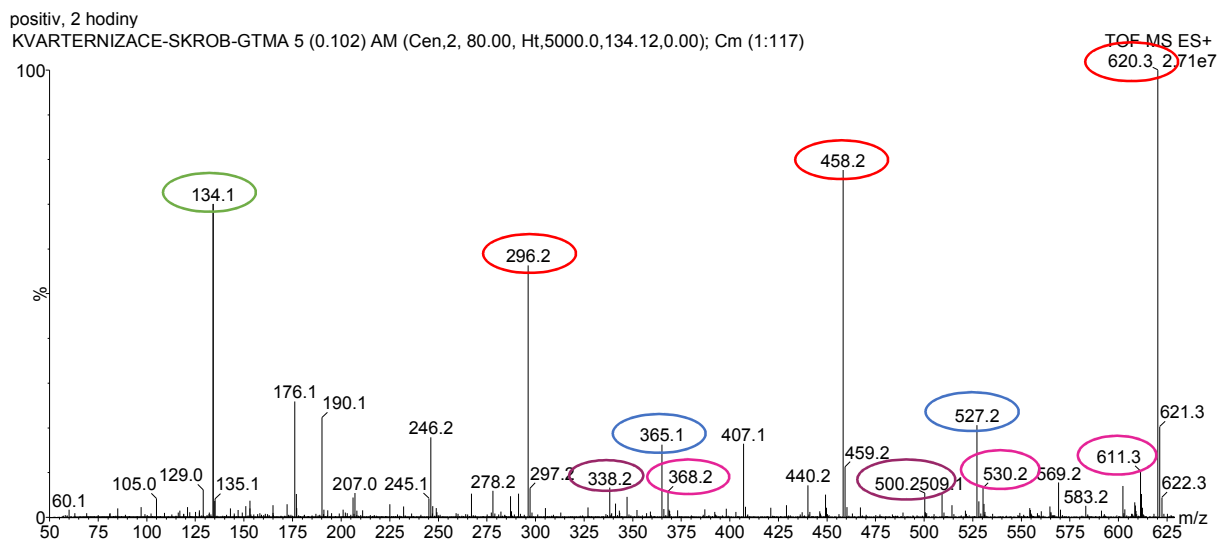
na obrázku 13 a jednotlivé hodnoty molekulových hmotností a hodnot m/z jsou v tabulce 4. Jednotlivé $[M]^+$ ionty byly pro potvrzení, že se jedná o oligomer složený z glukózových jednotek podrobeny fragmentaci a skutečně je pozorována řada ztrát dehydratovaných glukóz a dále každé hodnotě ještě odpovídá pík menší intenzity se ztrátou 18, tedy vody.



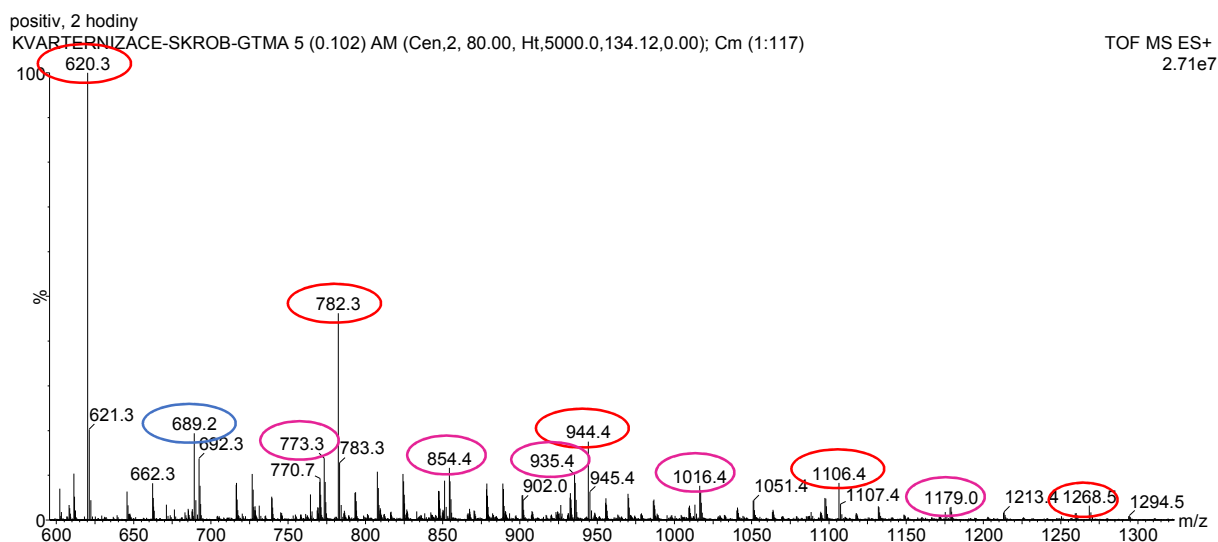
Obrázek 12: Celé MS spektrum kvarternarizovaného škrobu.



Obrázek 13: Návrh struktury derivatizovaného škrobu s jednou molekulou GMTA, dvěma a třemi, v uvedeném pořadí.

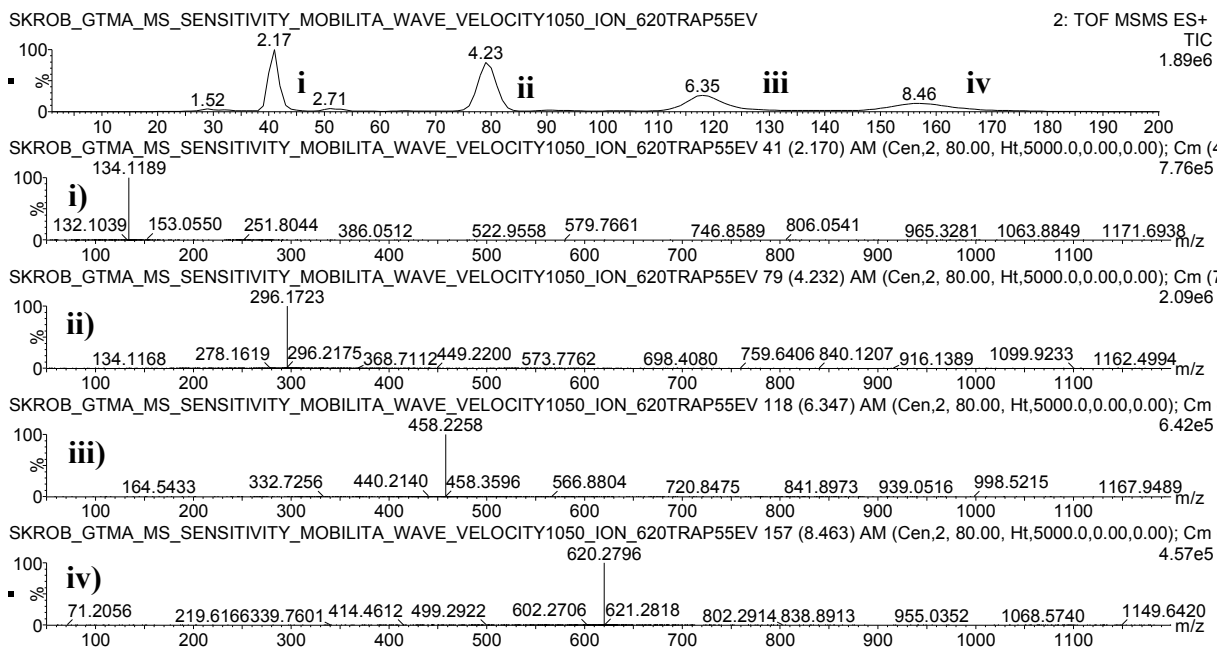


Obrázek 14: Spektrum škrobu v přibližné oblasti - 1. část.



Obrázek 15: Spektrum škrobu v přibližné oblasti - 2. část.

Na obrázku 16 je ukázána mobilitní separace iontu m/z 620 a jeho fragmentů při MS/MS experimentu. Podařilo se oddělit ion m/z 620 a jeho fragmenty po ztrátě jedné glukózy m/z 458, po ztrátě dvou molekul glukózy m/z 296 a ion m/z 134, vzniklý ztrátou glukózy z iontu s m/z 296. Na obrázku je ukázána tato mobilitní separace a pod ní jsou hmotnostní spektra průměrovaná přes jednotlivé mobilitní píky.



Obrázek 16: Mobilitní separace fragmentovaného iontu m/z 620 a příslušná hmotnostní spektra separovaných fragmentů **i-iv**.

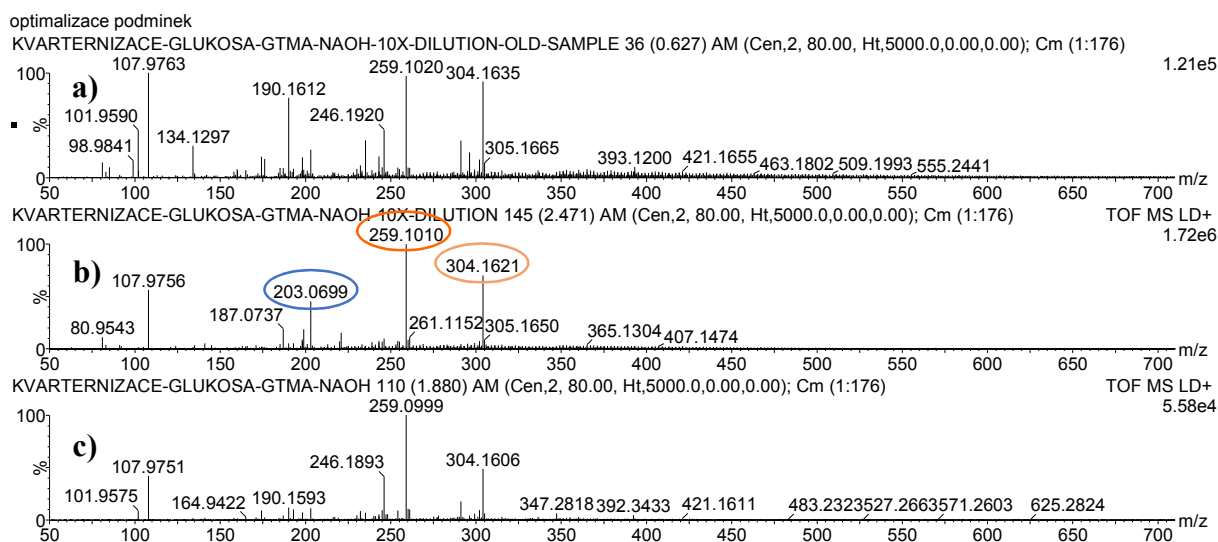
Tabulka 4: Vypočítané hodnoty molekulových hmotností oligomerních jednotek a nalezené hodnoty m/z ve spektru.

Počet jednotek (n+2)	[M+Na] ⁺	[M] ⁺	M _r 2 x GTMA	[M] ²⁺	M _r 3 x GTMA	[M] ³⁺
	m/z	m/z		m/z		m/z
3	527,1588 527,1597	620,2766 620,2783	736,3841	368,19205 368,1920	852,4917	284,1639 284,1633
4	689,2116 689,2124	782,3294 782,3307	898,4369	449,21845 449,2188	1014,5445	338,1815 338,1810
5	851,2645 851,2649	944,3822 944,3813	1060,4898	530,2449 530,2458	1176,5973	392,1991 392,1990
6	1013,3173 1013,3170	1106,4350 1106,4342	1222,5426	611,2713 611,2727	1338,6501	446,2167 446,2171
7	1175,3701 1175,3699	1268,4879 1268,4871	1384,5954	692,2977 692,2991	1500,7029	500,2343 500,2357
8	1337,4229 1337,4225	1430,5407 1430,5403	1546,6482	773,3241 773,3249	1662,7558	554,2519 554,2535
9	1499,4757 1499,4769	1592,5935 1592,5929	1708,7011	854,35055 854,3509	1824,8086	608,27 608,2708
10	1661,5286 1661,5310	1754,6463 1754,6458	1870,7539	935,37695 935,3765	1986,8614	662,2871 662,2885
11	1823,5814 1823,5793	1916,6992 1916,6921	2032,8067	1016,40335 1016,4031	2148,9142	716,6380 716,6401
12	1985,6342 1985,6296	2078,7520	2194,8595	1097,430 1097,4293	2310,9671	770,3223 770,3235
13	-	-	2356,9123	1178,45615	2473,0199	824,340 824,3409
14	-	-	2518,9652	1259,4826	2635,0727	878,3575 878,3580
15	-	-	-	-	2797,1255	932,3752 932,3749

Legenda: V příslušném okně je černou barvou vyznačena teoretická hodnota ([M+Na]⁺, [M]²⁺, [M]³⁺) a barevně zvýrazněna nalezená hodnota m/z (modrá barva: sodné adukty nederivatizovaných oligomerních jednotek; červená: derivatizované jednotky; růžová: oligomerní jednotky se dvěma činidly a fialová: oligomerní jednotky se třemi molekulami činidla).

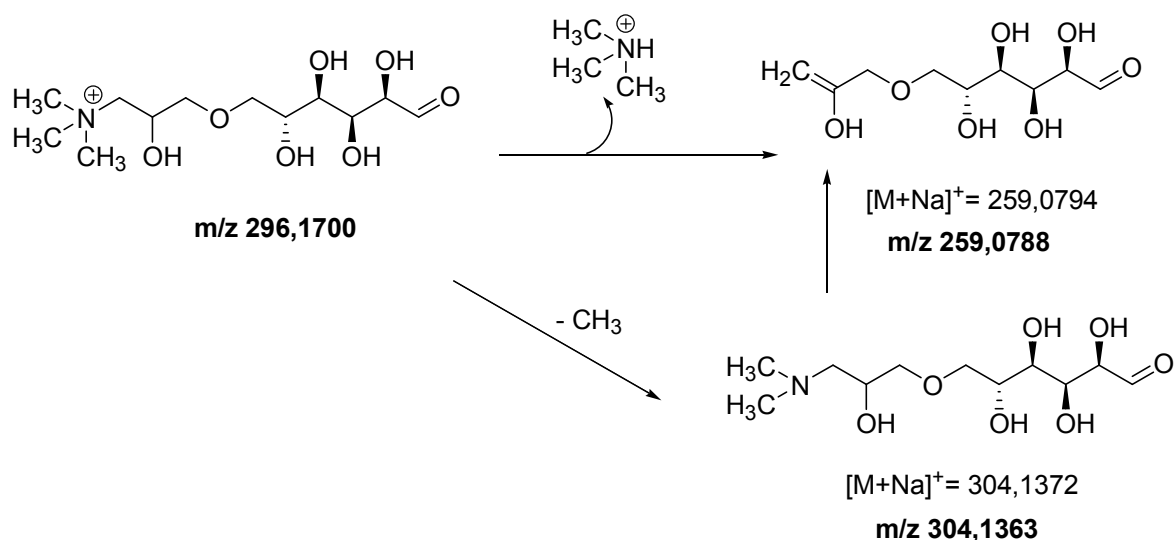
5.1.2. Měření hmotnostních spekter pomocí MALDI

V další fázi experimentu byly vzorky připravované stejným způsobem měřeny pomocí MALDI techniky. Nejprve byl zkušebně, pro optimalizaci podmínek na MALDI-plate odpipetován 1 μ l koncentrovaného vzorku derivatizované glukózy (100 mg/ml) předem smíchaného s matricí v poměru 1:1 a desetkrát zředěný vzorek také (10 mg/ml) smíchaný stejným způsobem s matricí. Odezva byla přibližně třicetkrát vyšší, pokud byl vzorek analytu 10 krát zředěn, tedy na koncentraci 10 mg/ml. Jak lze vidět na obrázku 17, hodnota m/z 296 není dominantní ve spektru. Bylo podezření, že došlo k pochybení při přípravě vzorku, proto byly stejným způsobem proměřeny stejné vzorky, které byly měřeny elektrosprejem v prvním experimentu. Profil dat, se ukázal být podobný. Odlišný ionizační proces v MALDI neposkytuje tedy za použitých podmínek dobrý signál derivatizované glukózy.



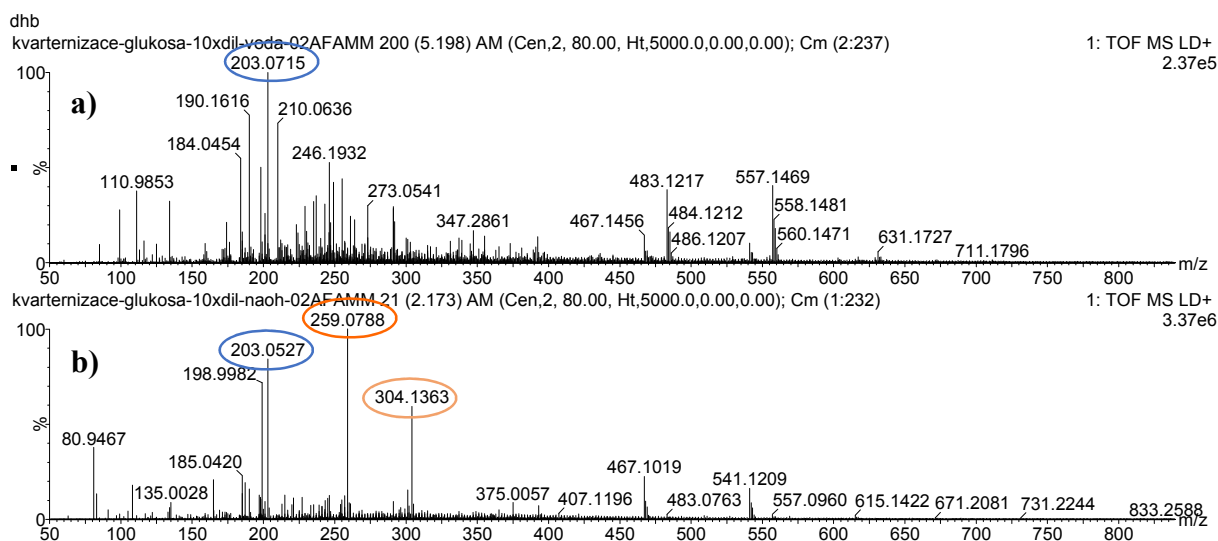
Obrázek 17: Optimalizace podmínek pro MALDI experiment. **a)** 10 x zředěný starší vzorek, **b)** 10 x zředěný nově připravený vzorek a za **c)** koncentrovaný nový vzorek.

Ve spektru glukózy derivatizované GTMA, viz obrázek 17 **b)** je vidět, že ve spektru není dominantní ion m/z 296. Dominantní je zde ion s m/z 259,1010. Ion s m/z 296 odpovídající derivatizované glukóze je minoritní. Ve schématu 22 je navržen mechanismus vzniku dominantního iontu s m/z 259. Možným vysvětlením je odštěpení kvarterní skupiny a vzniku sodiovaného fragmentu. Podobně je ve schématu vysvětlen i vznik iontu m/z 304.



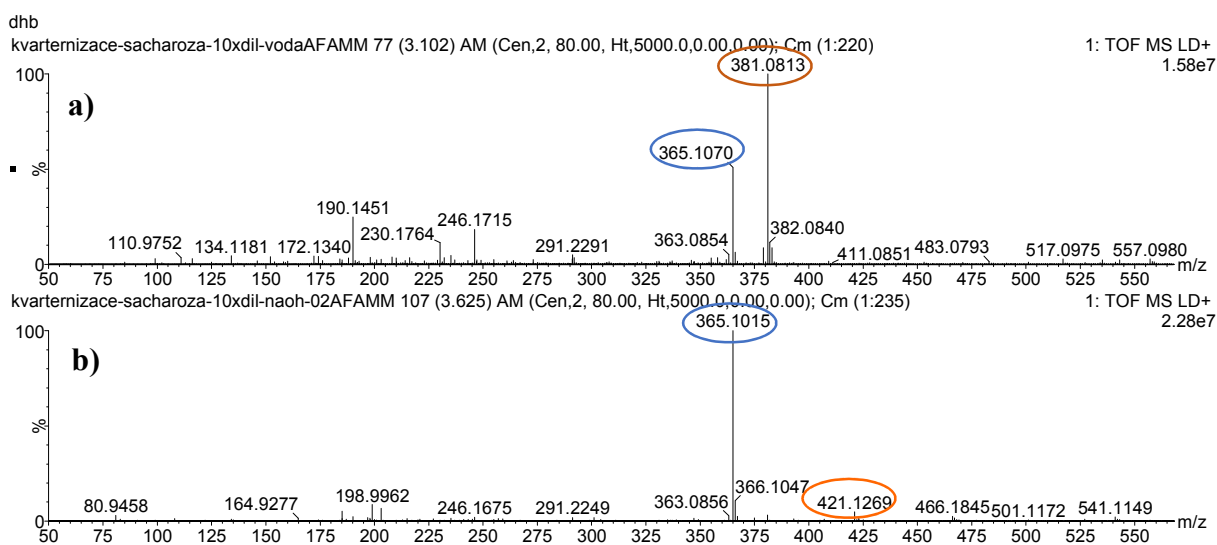
Následně bylo optimalizováno reakční prostředí. V postupu pro přípravu vzorku je uvedeno, že se do reakční směsi přidává 1 mol.l⁻¹ roztok hydroxidu sodného. Bylo vyzkoušeno, zda derivatizace probíhá i bez přidaného hydroxidu, respektive s přidáním stejného objemu vody. Další možnost bylo využití kyselého prostředí. Byla použita 1 mol.l⁻¹ kyselina mravenčí. Modifikace derivatizačního postupu, kde se nepoužívá roztok hydroxidu sodného, vedou ke zhoršení výtěžku signálu derivatizované glukózy.

V následujícím spektru je porovnána analýza kvarternarizované glukózy připravené s přidavkem hydroxidu a bez něj (místo hydroxidu je přidána do reakční směsi voda). V prvním spektru není pozorován ani ion m/z 259 ani 296. Je zde vidět pouze sodný adukt glukózy. Ten je také pozorován v analýze směsi obsahující hydroxid. Pokud bychom porovnali intenzitu sodného aduktu glukózy v obou spektrech, tak ve spektru s hydroxidem, je o řád vyšší, což koresponduje s tím, že do reakční směsi jsou přidány sodné ionty.



Obrázek 18: a) Spektrum glukózy po derivatizaci bez přidání hydroxidu, b) s hydroxidem.

Ve spektru sacharózy za podmínek derivatizace s hydroxidem, byl dominantní sodný adukt m/z 365,1070. Ve spektru je ion m/z 421,1269, který strukturně odpovídá iontu m/z 259 u glukózy (rozdíl 421 a 259 je 162, tedy dehydratovaná glukóza) a mechanismus jeho vzniku je ukázán ve schématu 23. Nalezneme zde i kvarternarizovaný ion sacharózy m/z 458,2174, ale jeho intenzita je více než 300 krát nižší než intenzita sodného aduktu. První spektrum v obrázku 19 je spektrum směsi neobsahující hydroxid a je zde vidět dominantní ion m/z 381,0813. Zde jde o adukt s draslíkem $[M+K]^+$, označený hnědou barvou. Sodný adukt je ve spektru rovněž přítomen.



Obrázek 19: **a)** Spektrum sacharózy po derivatizaci bez přidání hydroxidu, **b)** s hydroxidem.

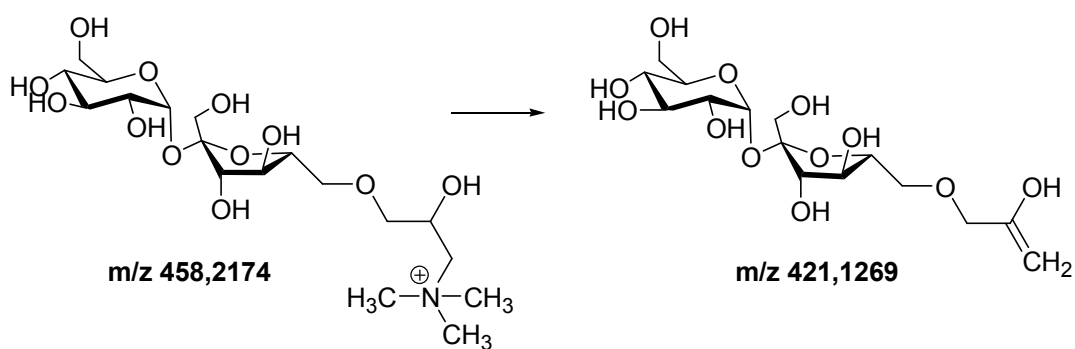


Schéma 23

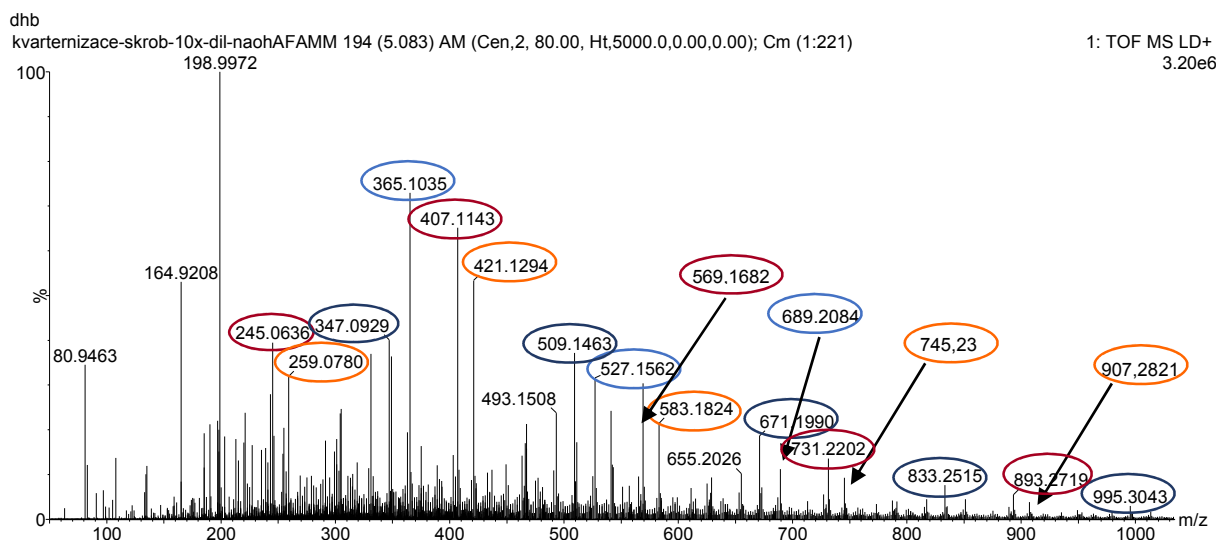
Při měření kvarternarizovaného škrobu byly ve spektru nalezeny čtyři hlavní typy iontů. Jsou zde pozorovány ionty sodných aduktů oligomerů a jejich dehydratovaných forem. Stejně jako u glukózy a sacharózy jsou zde pozorovány ionty m/z 259, 421 a dále 583, 745 a 907. Série oligomerních iontů končí signálem s m/z 1717, který má již malou intenzitu. Byla zde nalezena i řada iontů s m/z 245, 407, 569, 731 až do 1541. Schéma vzniku těchto iontů je ukázáno níže.

Ve spektru má z píků analytu největší intenzitu adukt dimeru dvou glukóz se sodíkem m/z 365,1035 a dále ion m/z 407,1143 s intenzitou jen o 10% nižší.

Ve spektru, kdy byla reakce prováděna pouze s vodou, je nalezena řada sodných aduktů a těchto aduktů po ztrátě molekuly vody, jejich intenzita je však nižší, ion m/z 365 má intenzitu přibližně 18 krát nižší.

Pokud bychom porovnali obě ionizační techniky, tak v elektrospreji, podle očekávání vznikaly i více nabitě ionty. Tyto ionty v MALDI nebyly pozorovány.

V MALDI se na vzorek působí laserem, který může způsobovat štěpení derivatizované molekuly v iontovém zdroji a ztrátu kvartérní amoniové skupiny. Ionty s navázaným GTMA jsou ve spektru pozorovány, ale mají velmi nízkou intenzitu, na místo toho jsou zde zastoupeny především ionty vznikající po ztrátě 60 hmotnostních jednotek z GTMA-derivatizovaného cukru odpovídající ztrátě trimethylamoniového kationtu nebo ionty po ztrátě 74 hmotnostních jednotek odpovídající následnému odštěpení CH_2 skupiny. Derivatizace s využitím GTMA pro MALDI není tedy na rozdíl od elektrospreje dobře použitelná.



Obrázek 20: Hmotnostní spektrum škrobu naměřeno MALDI technikou.

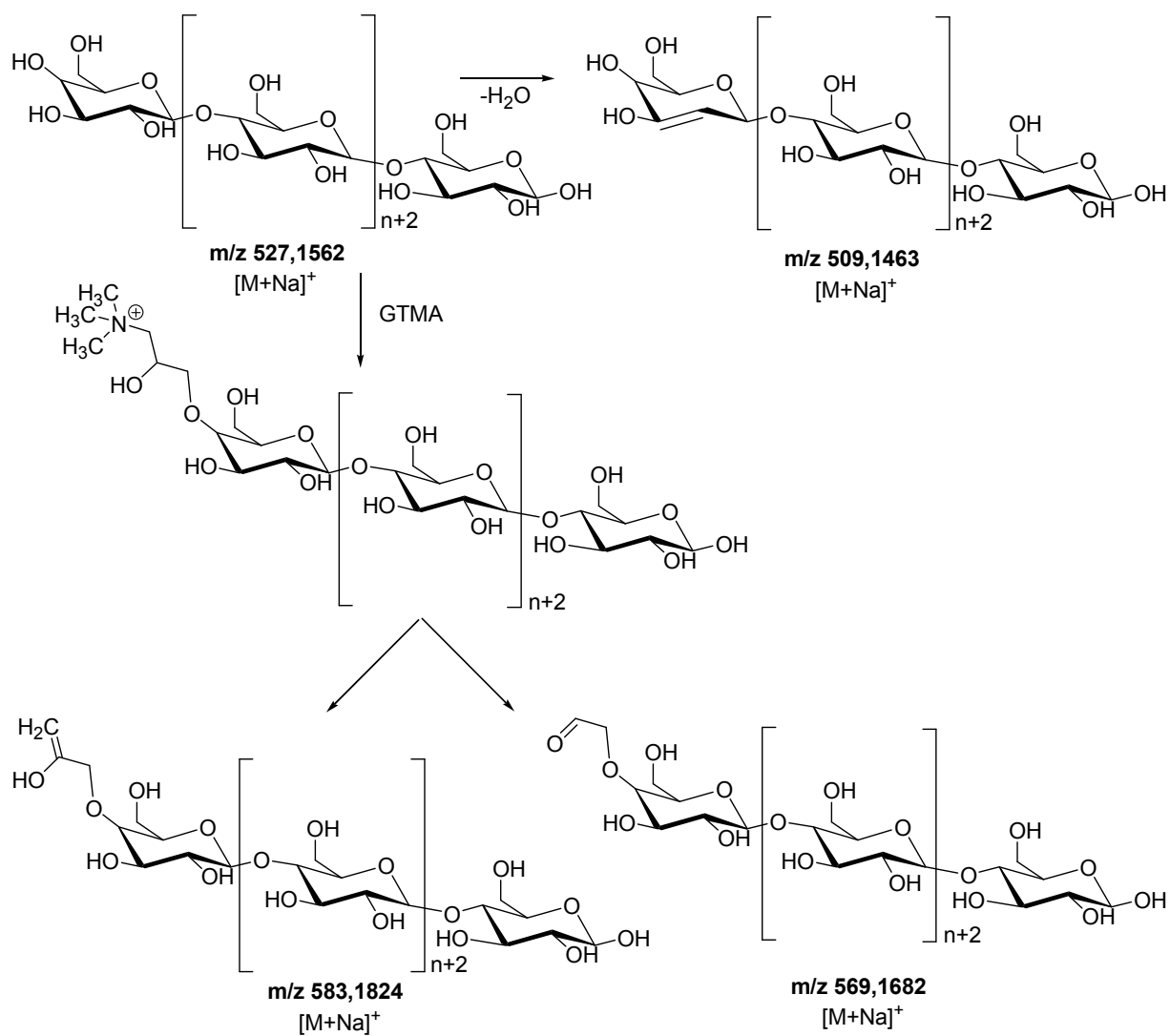


Schéma 24

5.2. Návrh a syntéza derivatizačního činidla

Zavedení kvartérní amoniové soli do molekuly analytu má své nesporné výhody pro elektrosprej, kde zlepšuje analytický signál. U MALDI, ačkoli je výtěžek výrazně slabší, jsou signály kvarternarizovaných cukrů také pozorovány. Obě techniky mohou být tedy použity pro studium dalších derivatizačních postupů.

Pro další experimenty byly navrženy struktury vhodnějších derivatizačních činidel vycházejících z následující úvahy. Jestliže podstupujeme derivatizační proces zlepšující odezvu detektoru, který přináší do experimentu práci navíc, proč neprovést derivatizaci s činidlem přinášejícím ještě další výhody, tedy s činidlem analyticky všestrannějším.

Všestrannější derivatizační činidlo by pro studovanou aplikaci na cukry mělo obsahovat čtyři důležité části: kvartérní amoniovou sůl, chromofor (např. benzenové jádro), značku s charakteristickým izotopickým profilem (např. atom bromu) a samozřejmě strukturní jednotku, která umožní navázání činidla na analyzovaný cukr. Zároveň by aromatické jádro mohlo plnit podobnou funkci jako matrice pro MALDI experimenty (absorpci energie laseru pro desorpci a ionizaci bez potřeby použití matrice).

Při návrhu této struktury se vycházelo z podobnosti s komerčně dostupným činidlem GTMA. Toto činidlo, jak již bylo ukázáno výše, obsahuje trimethylamoniovou jednotku a labilní oxiranový kruh, který se poměrně snadno otevírá účinkem nukleofilního činidla, takže se naváže na hydroxylovou skupinu sacharidu. Bylo tedy uvažováno o možné struktuře skládající se ze tří stavebních kamenů, jak je ukázáno ve schématu 25.

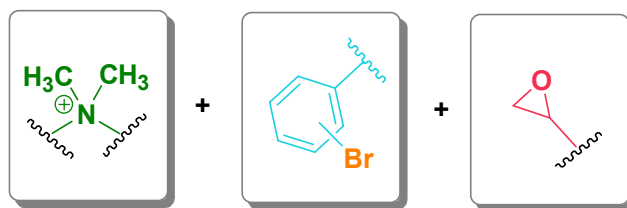


Schéma 25

Při studiu látky podobného charakteru v literatuře byla nalezena syntéza benzyl-glycidyl-dimethyl-amonium jodidu. Příslušný brom derivát publikován nebyl, proto se k syntéze vybrala výchozí látka s bromem v para poloze benzenového kruhu.

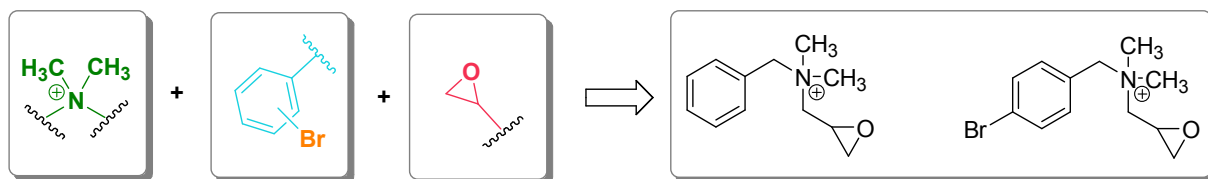


Schéma 26

Syntéza derivatizačních činidel benzyl-glycidylmethyl-amonium jodidu (BGDMA) a (4-bromo-benzyl)-glycidylmethyl-amonium jodidu (BBGDMA) začala optimalizací reakčních kroků na levnějším derivátu neobsahujícím brom. Příprava činidla benzyl-glycidylmethyl-amonium jodidu (BGDMA) vycházela z *N*-benzylmethylaminu a epichlorhydrinu. Vzniklý benzyl-glycidyl-methyl amin dále reagoval s methyljodidem.

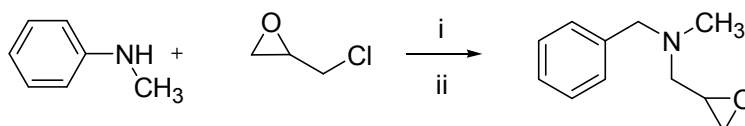


Schéma 27

Podmínky reakce:

1. i: destilovaná voda, 0°C, 16 h.; ii: NaOH, H₂O, 0°C, 20 minut.
2. i: MeOH, 6 h., 57-60 °C; ii: *t*-BuOH, KOH, H₂O, 75°C, 90 min.
3. i: *n*-PrOH, 80°C, 6h.; ii: *t*-BuOH, KOH, H₂O, 75°C, 90 min.

Syntéza prvního kroku byla provedena tak, že ke směsi *N*-benzylmethylaminu a destilované vody byl po kapkách přidán epichlorhydrin za stálého míchání v ledové lázni přes noc. Následující den byla směs opět ochlazena a byl k ní přidán roztok hydroxidu. Produkt byl míchán ještě 20 minut a následně byl přelit do dělicí nálevky s destilovanou vodou a vodná vrstva byla extrahována diethyletherem. Etherové podíly a organická vrstva byly vysušeny bezvodým síranem sodným a směs byla koncentrována za sníženého tlaku.⁴⁷ Následně byla provedena LC-MS analýza. Tato analýza nebyla uspokojivá, nebyl patrný pík čistého produktu, ve spektru byl produkt sice pozorován, ale rovněž bylo pozorováno značné množství hydrolyzovaného produktu.

Pro přípravu benzyl-glycidylmethyl aminu byl tedy zvolen jiný postup.⁴⁸ Autoři uvádí reakci v methanolu při 80°C, bližší detaily uvedeny nejsou. Nejprve byla tedy vyzkoušena reakce epichlorhydrinu a *N*-benzylmethylaminu v methanolu pod refluxem (60°C) v atmosféře argonu. Po šesti hodinách byl methanol odpařen, byl přidán *t*-BuOH a za míchání roztok hydroxidu draselného ve vodě. Směs byla zahřívána na 75 °C po dobu 90 minut. Vyloučený KCl byl odfiltrován a filtrát byl odpařen. Aby se dosáhlo vyšší teploty, tedy uvedených 80°C, byla reakce realizována v *n*-propanolu. Reakce byla provedena v inertní atmosféře v tzv. pressure tube. Následovala opět reakce s hydroxidem draselným v *t*-BuOH a po reakci bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce. Tento postup se podle LC-MS analýzy osvědčil, proto byla reakce provedena ve větším množství v trojhrdlé baňce. Pro izolaci

produktu byla zvolena vakuová destilace. Produkt se destiloval v rozmezí teplot 87-94°C při tlaku 1,4 Torr. Produkt byl získán čistý, v píku nebyl pozorován hydrolyzovaný produkt.

Aby bylo dostatek produktu pro optimalizaci následujícího, tedy methylačního kroku, bylo produktu připraveno více. Byl tedy opakován postup, ale ještě s většími navážkami. Neukázalo se to jako efektivní způsob, protože s množstvím výchozí látky 8,6 ml byl výtěžek po vakuové destilaci 25% a při objemu 23 ml byl výtěžek pouhých 13%.

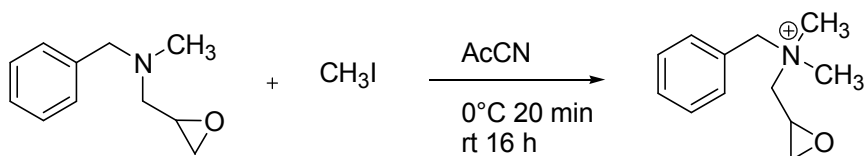


Schéma 28

Methylační krok byl proveden tak, že produkt po vakuové destilaci byl rozpuštěn v acetonitrilu v ledové lázni. Za stálého míchání byl po kapkách přidáván methyljodid. Reakce probíhala opět v argonové atmosféře. Po přidání celého objemu methylačního činidla byla baňka vyjmuta z ledové lázně a míchána přes noc při pokojové teplotě.⁴⁷ Jelikož látka je permanentní ion, v LC-MS analýze byla pozorována v retenčním čase blízkém mrtvému času. O tom, zda reakce proběhla, bylo patrné z TLC analýzy na silikagelové destičce. Jako mobilní fáze byl zvolen čistý methanol s třemi kapkami octové kyseliny. Problém nastal při izolaci. Reakční produkt se měl vysrážet z bezvodého etheru. K vysrážení nedošlo patrně z důvodu, že nebyla použita dostatečně suchá rozpouštědla. Proudem dusíku byl ether odpařen, vysušen bezvodým síranem sodným a roztok byl rozpuštěn v acetonitrilu sušeném molekulovým sítem. K vysrážení s etherem opět nedošlo. Proto byla všechna rozpouštědla odpařena a produkt byl rozpuštěn v destilované vodě. Nepolární nečistota byla vytřepána do toluenu. Vodná fáze byla zmrazena a vložena do lyofilizátoru. Látka se objevovala při LC-MS analýze v nástřikovém píku. Ověření její identity bylo provedeno tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Pro zlepšení tohoto postupu byla dále provedena reakce v bezvodém DMF. Produkt po vakuové destilaci byl rozpuštěn v bezvodém DMF pod inertní atmosférou a přes septum byl nadávkován methyljodid. TLC analýza proběhla stejně jako v předchozím případě. Do reakční směsi byl přidán bezvodý diethylether, ale k vysrážení opět nedošlo. Produkt byl tedy po odpaření všech rozpouštědel opět rozpuštěn ve vodě a nepolární nečistota byla extrahována do ethylacetátu. Výtěžek této reakce byl 63%. Identita byla opět potvrzena hmotnostní spektrometrií. Takto optimalizovaný postup byl aplikován pro přípravu druhého derivatizačního činidla.

Příprava (4-bromo-benzyl)-glycidyl-dimethyl-amonium jodidu (BBGDMA)

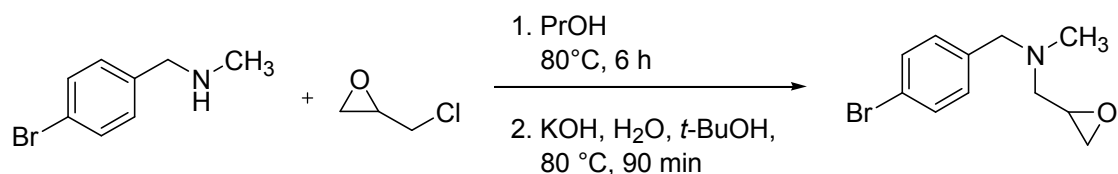


Schéma 29

Pro syntézu (4-bromo-benzyl)-glycidyl-dimethyl-amonium jodidu (BBGDMA) byl zvolen stejný postup jako v předchozím případě. Reakční podmínky jsou uvedeny ve schématu 29. Reakce byla provedena dvakrát. V prvním případě se vycházelo z jednoho gramu výchozí látky. Reakce proběhla, ale v LC-MS analýze byly pozorovány vedlejší produkty. Z této analýzy bylo usouzeno, že se bromo-derivát nechová příliš odlišně a reakce byla zopakována, ovšem s navázkou 3 gramy výchozí látky. LC-MS analýza však ukázala, že při větší navážce vedlejších produktů vzniká mnohem více. Surový produkt byl tedy izolován vakuovou destilací s límcovou baňkou při teplotě vodní lázně 160°C a tlaku 1,5 Torr. Produkt se nepodařilo izolovat čistý. Pro první, čistější produkt vakuová destilace nebyla provedena. Oba produkty byly identifikovány hmotnostní spektrometrií. Reakce dále optimalizována nebyla, a to jednak z časového důvodu a také proto, že pro plánované pilotní experimenty s derivatizací cukrů dosažená čistota postačovala.

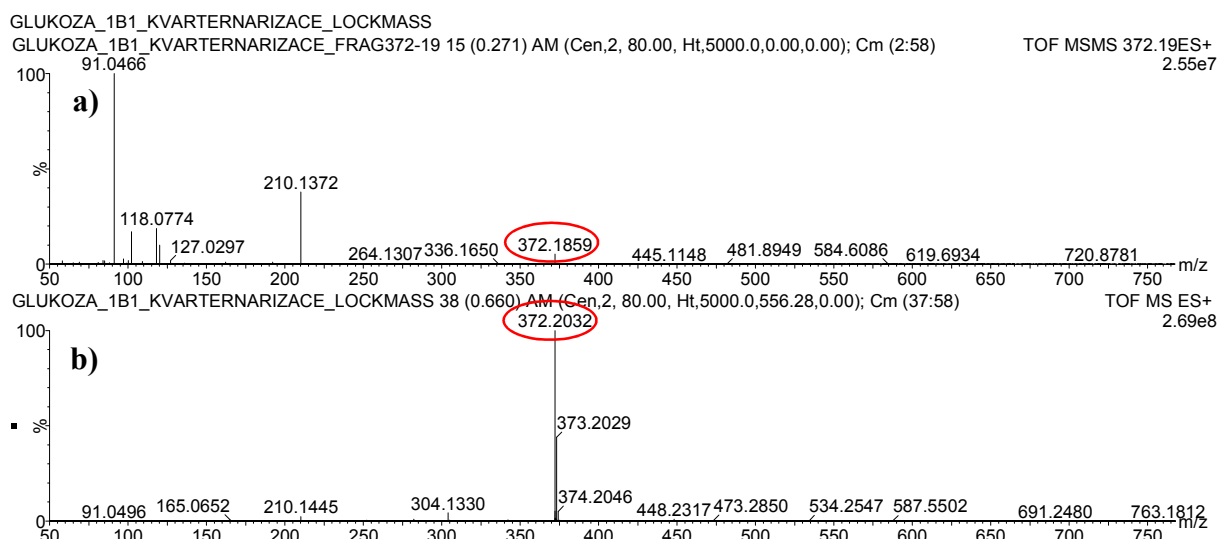
5.3. Testování nových derivatizačních činidel hmotnostní spektrometrií

5.3.1. Ionizace elektrosprejem

Připravená činidla, byla pro ověření jejich struktury testována hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem a jejich spektra jsou zařazena v experimentální části diplomové práce. Během těchto experimentů byla provedena také derivatizace glukózy pomocí těchto činidel. Derivatizační proces byl proveden tak, že k naváženému cukru bylo přidáno činidlo rozpuštěné v methanolu, následně byl přidán roztok hydroxidu a směs byla reagována během dvou hodin při 55°C.

Jako první byla studována derivatizace glukózy. Při derivatizaci glukózy činidlem BGDMA byl ve spektru pozorován signál m/z 372,2032, který odpovídá kvarternarizované glukóze (odchylka $\delta = 2,59$ ppm od teoretické hodnoty 372,2022). Bylo také naměřeno fragmentační spektrum, které odpovídá očekávaným fragmentačním pochodům. Obě spektra jsou ukázána v obrázku 21 a struktura derivatizované glukózy a fragmentační mechanismus ve

schématu 30. Pík analytu má ve spektru intenzitu $2,69 \cdot 10^8$, ve spektru lze nalézt i sodný adukt glukózy, který má intenzitu $2,08 \cdot 10^5$, tedy přibližně 1300 krát menší.



Obrázek 21. a) MSMS a b) MS spektrum glukózy kvarternarizované BGDMA.

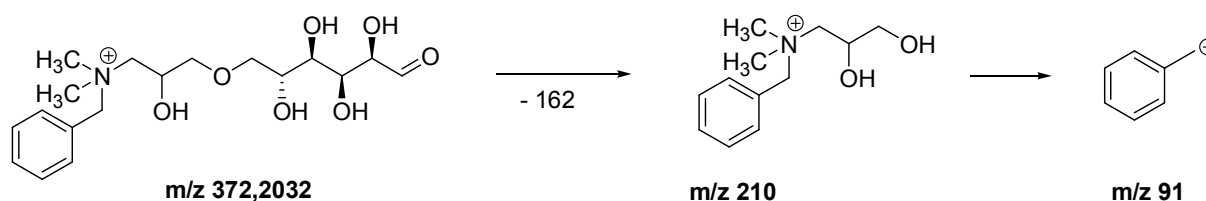
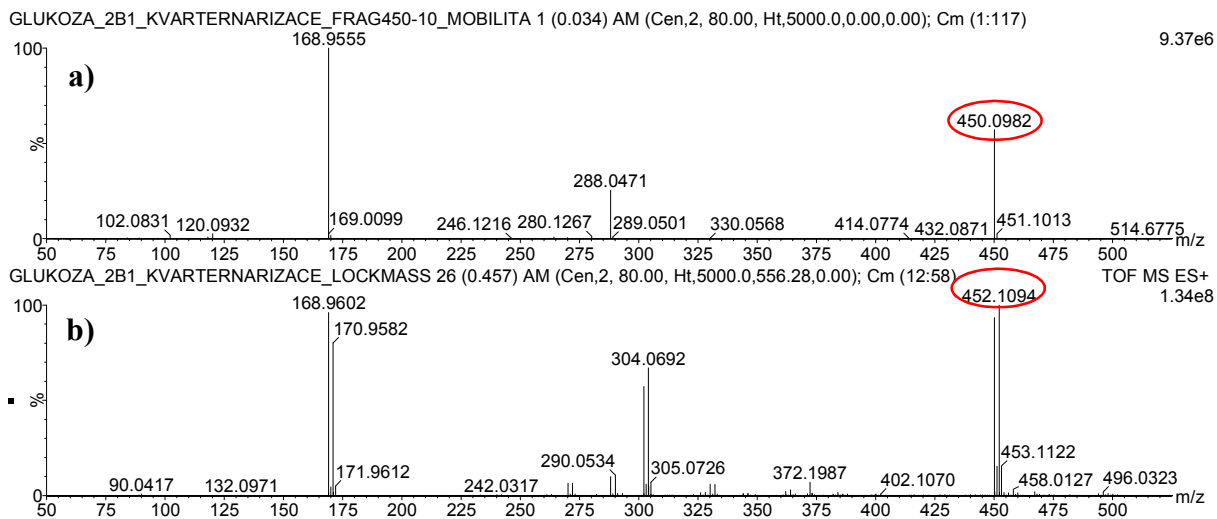


Schéma 30

Spektrum glukózy kvarternarizované činidlem BBGDMA, tedy činidlem obsahujícím v molekule atom bromu jako analytickou značku je ukázáno spolu s fragmentačním spektrem na obrázku 22. Ve spektru jsou dominantní 3 hlavní píky, jedná se o pík analytu s přesnou hmotnotu 450,1127 a naměřenou m/z 450,1107 (odchylka $\delta = 4,44$ ppm od teoretické hodnoty 450,1127), dále pík odpovídající produktu reakce oxiranového kruhu s methanolem s m/z 302,0711 (izotopický pík m/z 304,0692) a fragmenty s m/z 168 a 170, všechny píky vykazují charakteristický profil daný molekulou bromu v činidle a struktury těchto látek jsou ve schématu 31. Ion analytu s m/z 450 má oproti sodnému aduktu glukózy intenzitu přibližně 630 krát vyšší. Fragmentační spektrum bylo měřeno také se zapnutou mobilní celou, kdy se podařilo na základě rozdílů v účinných průřezích oddělit pík rodičovského iontu od dvou hlavních fragmentů ve spektru (viz obrázek 23).



Obrázek 22: **a)** MSMS a **b)** MS spektrum glukózy kvarternarizované BBGDMA.

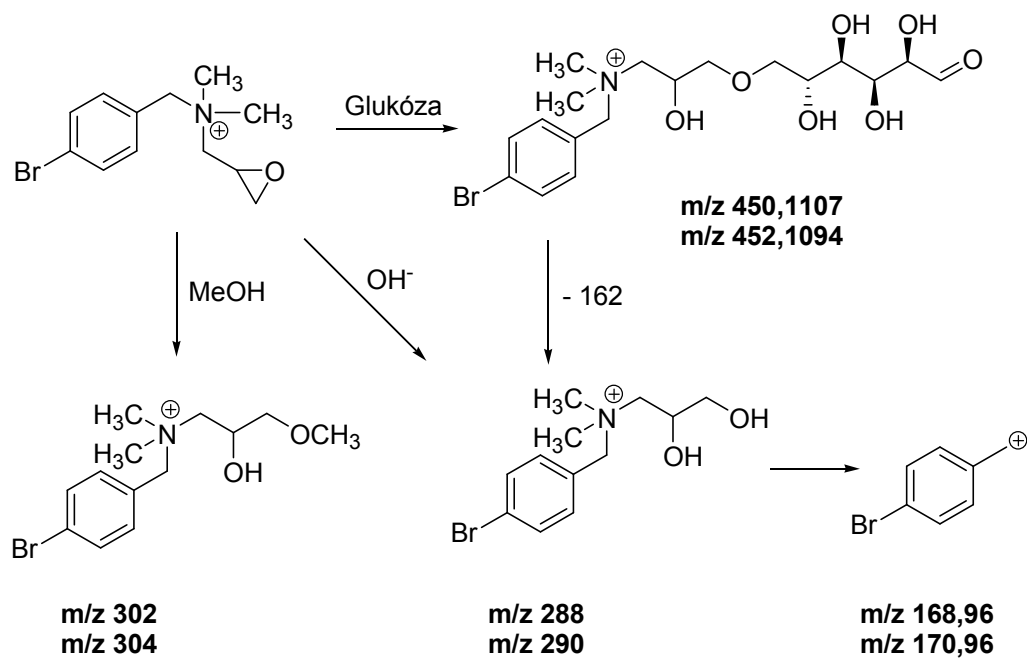
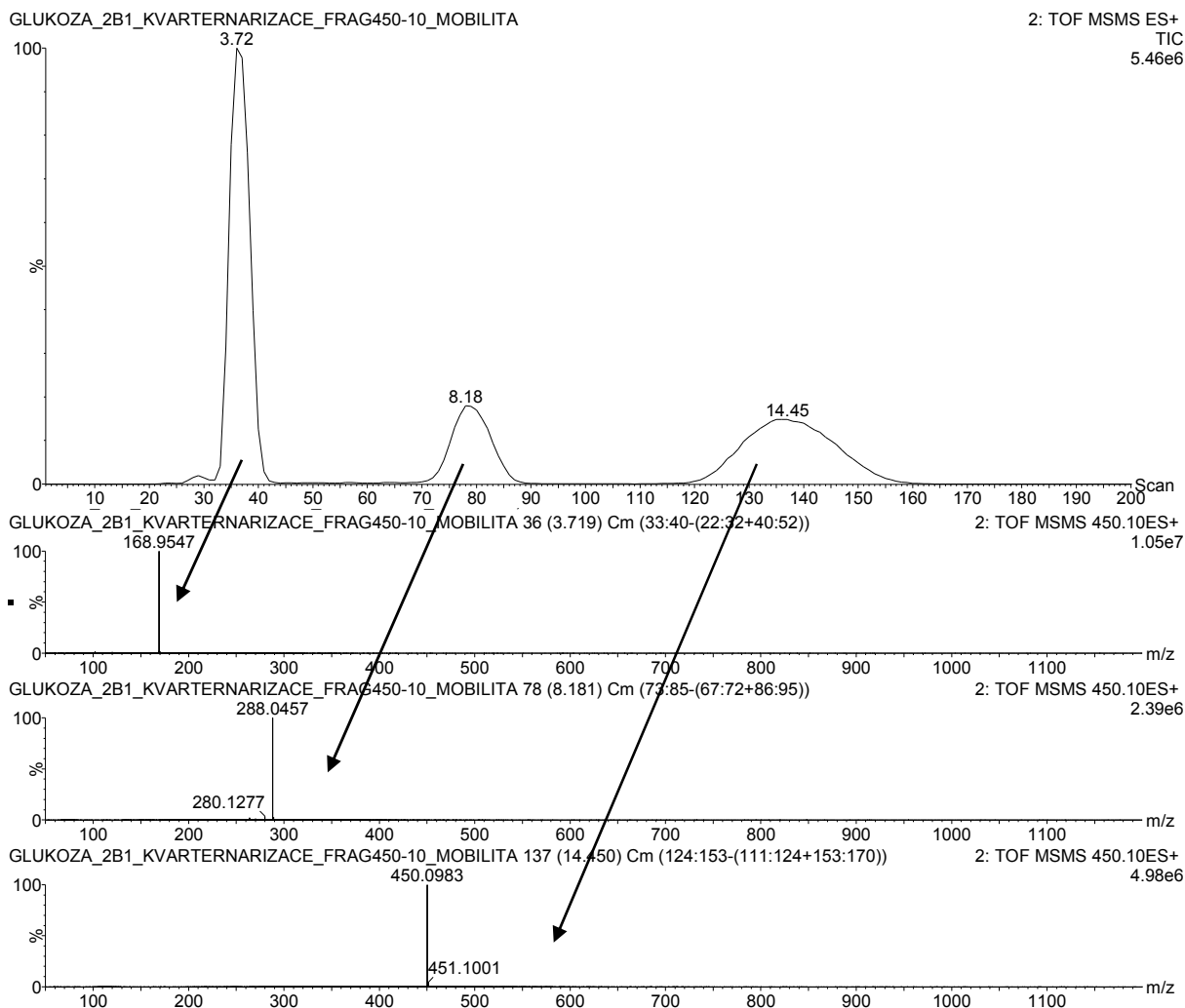
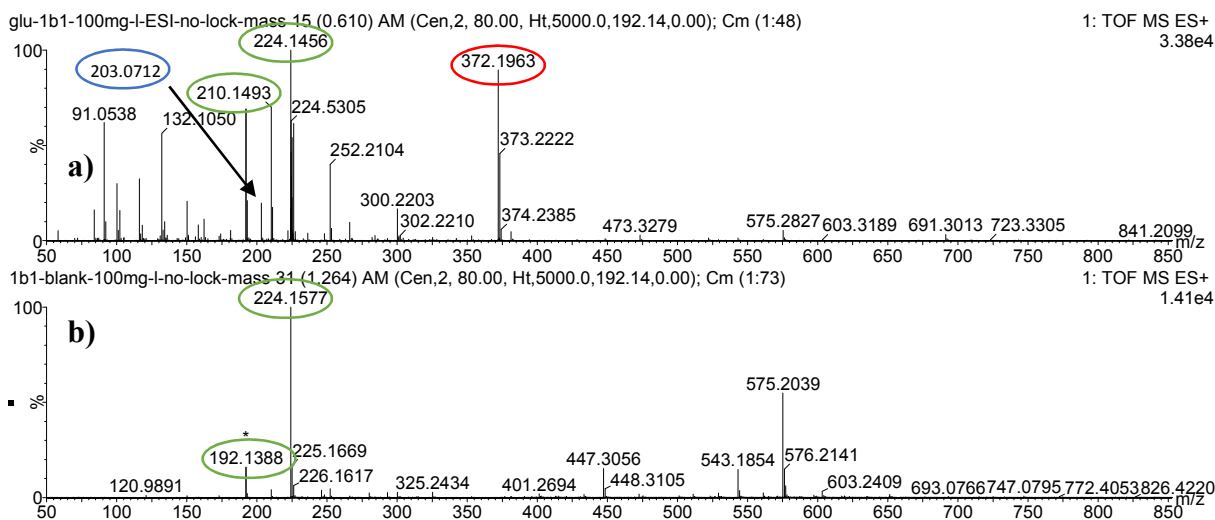


Schéma 31



Obrázek 23: Mobilitní spektrum fragmentované glukózy kvarternarizované BBGDMA a odpovídající spektra separovaných píků.

Glukóza, sacharóza i škrob byly analyzovány pomocí ionizace elektrosprejem znovu o tři měsíce později na přístroji Q-TOF Premier. Na obrázku 24 je spektrum kvarternarizované glukózy činidlem BGDMA a blanku tohoto činidla. V tomto obrázku jsou v zeleném kroužku vyznačeny ionty, které souvisí s činidlem, a jejich vznik je naznačen ve schématu 32. Naměřená hodnota iontu analytu je m/z 372,1963 (odchylka $\delta = 15,9$ ppm od teoretické hodnoty). Tento ion vykazoval téměř pětkrát vyšší intenzitu oproti sodnému aduktu glukózy m/z 203,0712. Kvarternarizovaná glukóza činidlem BBGDMA vykazovala opět charakteristický izotopový profil a naměřená hodnota je m/z 450,1141 (odchylka $\delta = 3,11$ ppm od teoretické hodnoty) a intenzita tohoto iontu oproti sodnému aduktu glukózy m/z 203,0601 byla téměř dvakrát vyšší.



Obrázek 24: a) spektrum glukózy kvartemarnizované činidlem BGDMA, b) blank činidla BGDMA.

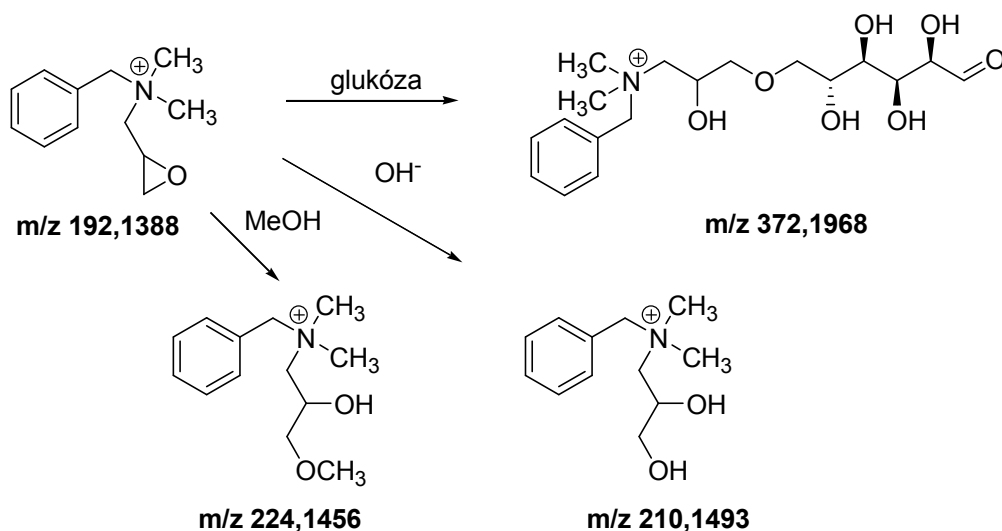
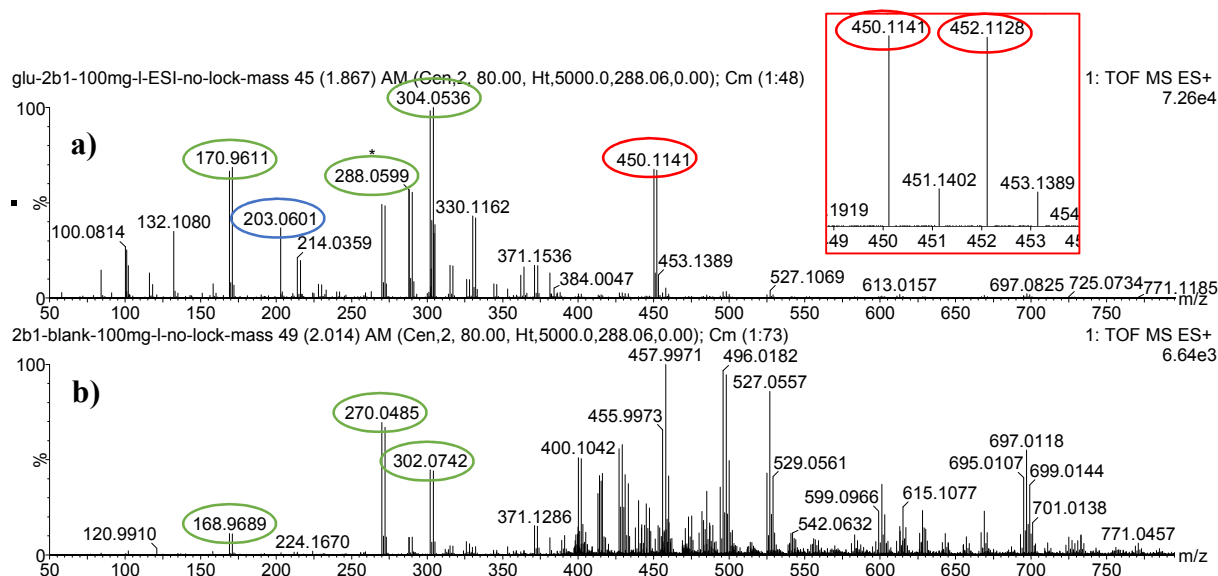


Schéma 32

Ze spekter blanků činidel měřených během experimentů na Q-TOF Premier lze vypožorovat, že činidla, během tří měsíců, od první analýzy na Synapt G2-S, prošla určitou změnou. Jejich blanky jsou více komplikované. Blanky činidel z Q-TOF Premier jsou v obrázcích 24 (b) a 25 (b) a blanky činidel z přístroje Synapt G2-S jsou pro srovnání na obrázku 26. V původním blanku činidla BGDMA pozorujeme především ionty m/z 210 a 192. V blanku měřeném později pozorujeme také ionty m/z 224 a 575. Identitu obou těchto iontů se nepodařilo zjistit. V původním blanku činidla BBGDMA lze vidět hlavně methanolem hydrolyzované činidlo s m/z 302, dále ion činidla m/z 270 a fragmentový ion m/z 169. V blanku činidla BBGDMA měřeného po třech měsících pozorujeme tyto tři hlavní ionty také, ale dále

různé dimery nebo jiné struktury obsahující podle izotopických profilů dva bromy v molekule. Detailní struktura těchto dimerů však nebyla zjištěna.

Patrně dochází k částečnému rozkladu činidla. K rozdílu však částečně přispívá i fakt, že každé měření bylo prováděno na jiném hmotnostním spektrometru. Nicméně i přes tyto změny, činidla reagují s analytem v dobrém výtěžku a poskytují očekávané signály.



Obrázek 25: **a)** Spektrum glukózy kvarternarizované činidlem BBGDMA (vložený obrázek: zoom v oblasti analytu s m/z 450,1141 a izotopický pík m/z 452,1128); **b)** blank činidla BBGDMA.

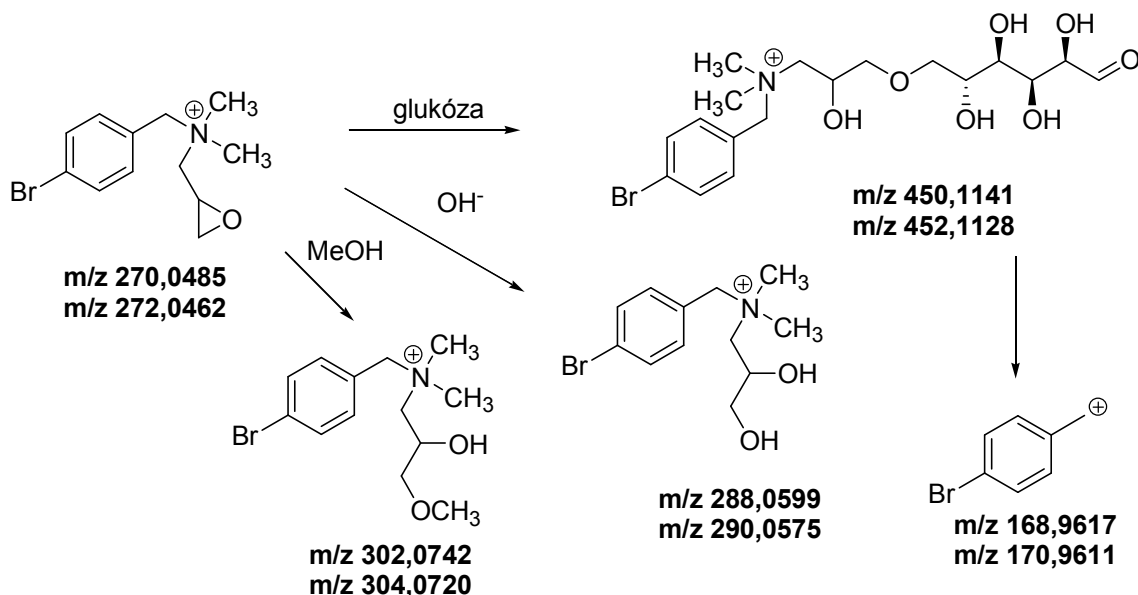
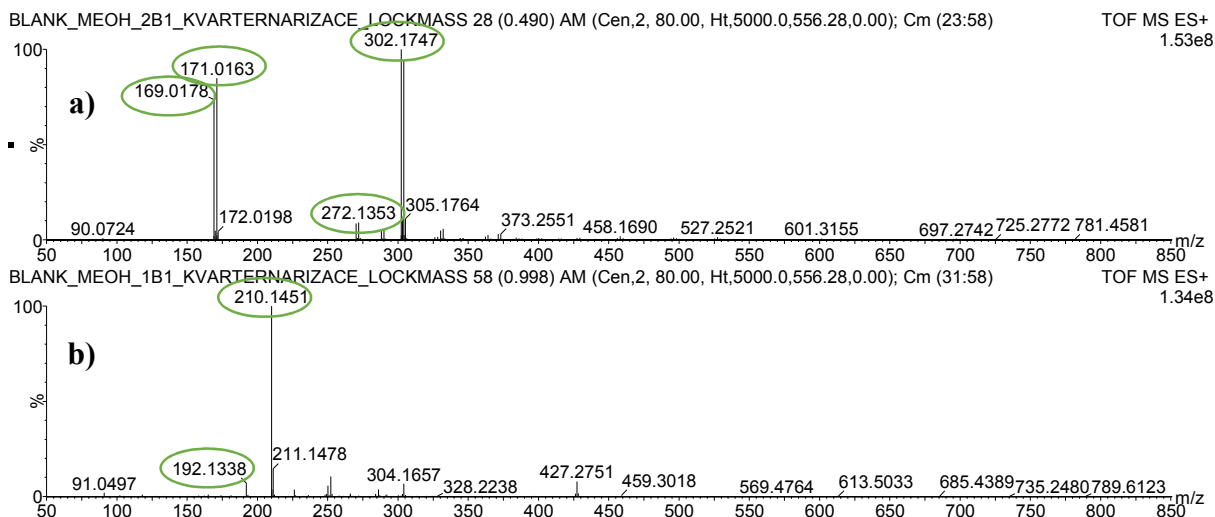
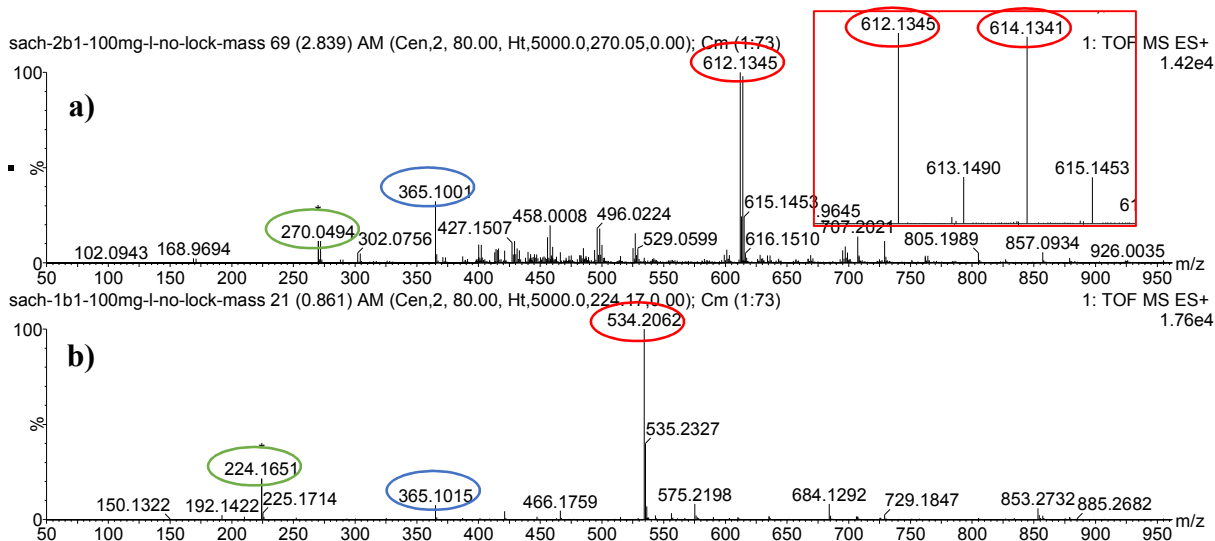


Schéma 33



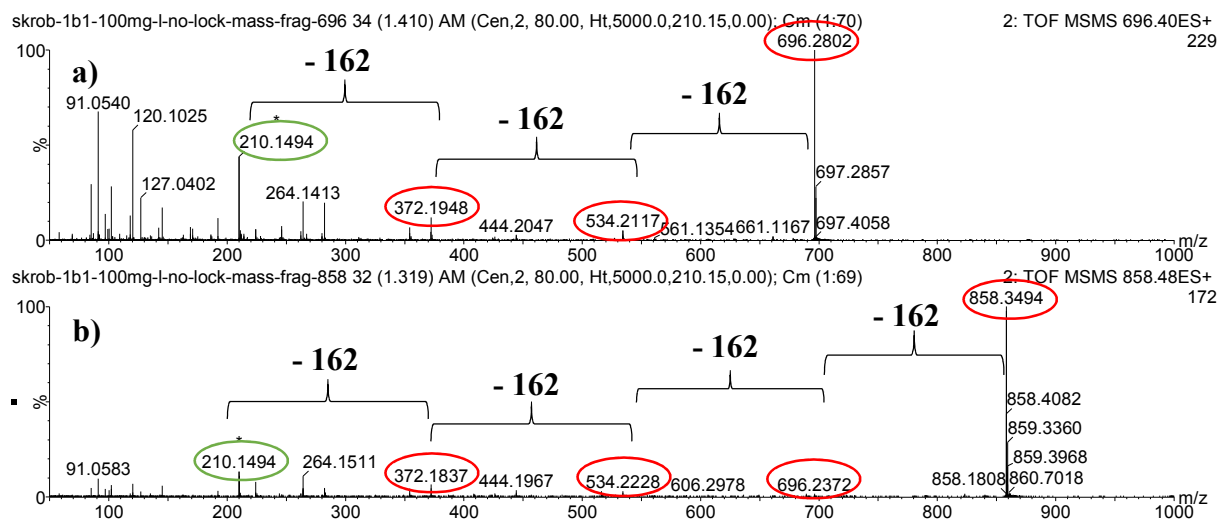
Obrázek 26: Spektra blanků činidel měřených bezprostředně po přípravě těchto činidel na přístroji SYNAPT G2-S a) BBDGMA, b) BGDMA.

Spektra sacharózy kvarternarizované oběma činidly jsou ukázána na obrázku 27. V obou spektrech jsou kvarternarizované ionty dominantní. Ion s hodnotou m/z 534,2062 (odchylka $\delta = 91,5$ ppm od teoretické hodnoty 534,2551) má přibližně 14 krát vyšší intenzitu než sodný adukt sacharózy, ion m/z 612,1345 (odchylka $\delta = 50,8$ ppm od teoretické hodnoty 612,1656) má intenzitu třikrát vyšší.



Obrázek 27: a) Sacharóza kvarternarizovaná BBDGMA, b) sacharóza kvarternarizovaná BGDMA.

Ve spektru škrobu derivatizovaném činidlem BGDMA byly nalezeny ionty odpovídající až 8 monomerním jednotkám (m/z 372,2279; 534,3975; 696,3858; 858,4241; 1020,4740; 1182,5465; 1344,5309; 1506,6632) u druhého činidla pak 6 jednotkám (450,1036; 612,1502; 774,1967; 936,2479; 1098,2936; 1260,3467).



Obrázek 28: MSMS spektrum **a**) iontu m/z 696,2802 **b**) 858,3494, tedy iontů trimeru a tetrameru kvarternarizovaných BGDMA.

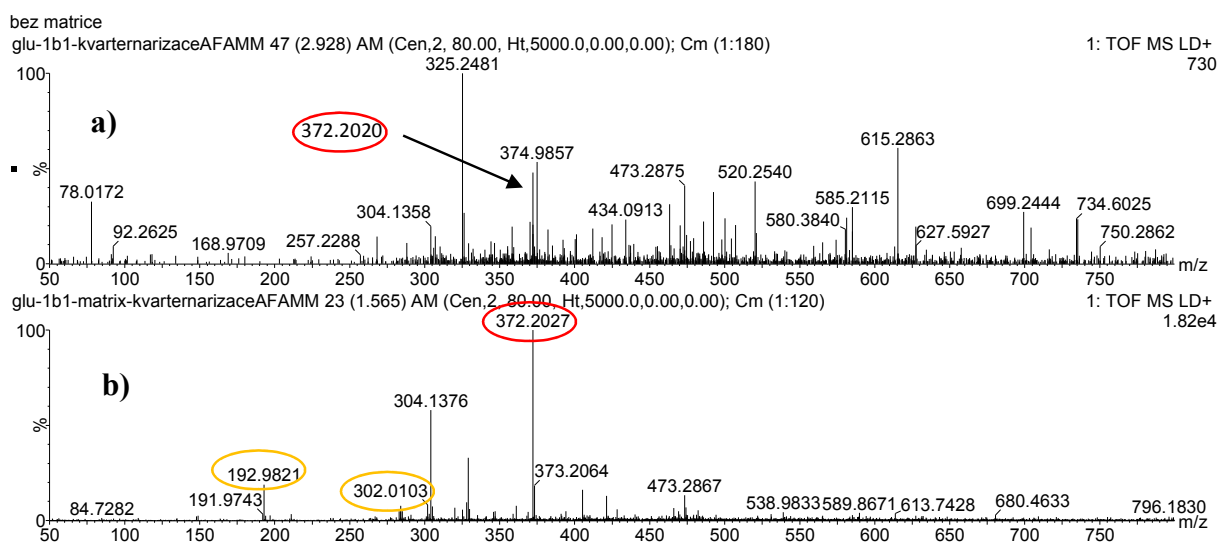
Tyto výsledky ukazují, že obě činidla umožňují derivatizaci cukrů a jejich analýzu hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrospřejem.

5.3.2. MALDI

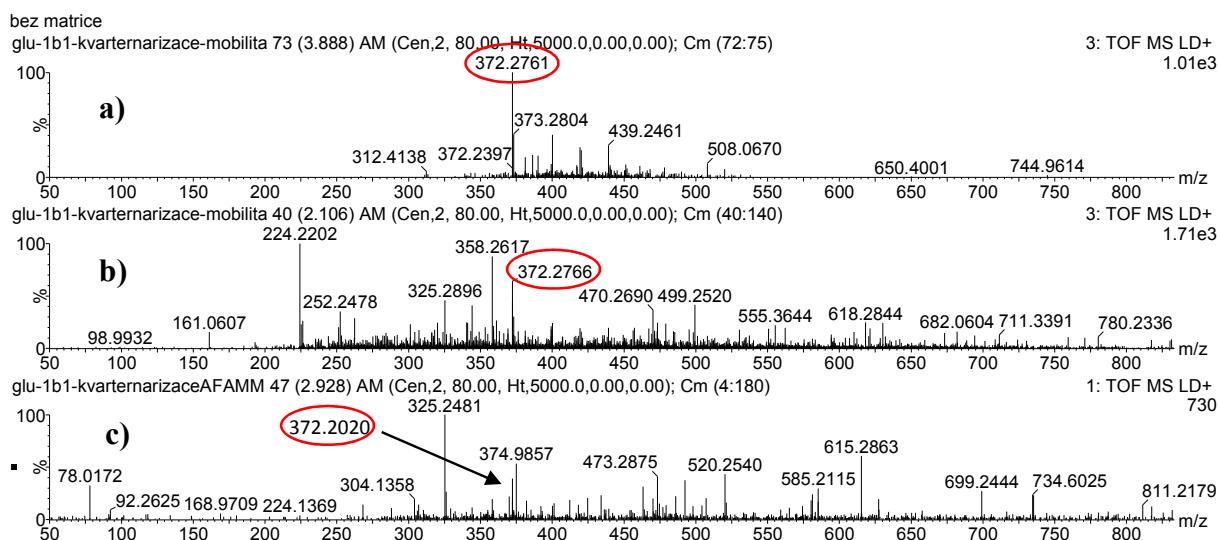
Připravená derivatizační činidla byla použita pro derivatizaci analytů MALDI technikou. Vzorky byly připraveny standardním postupem (*popsaným v Experimentální části v podkapitole Příprava vzorků – Obecný postup pro derivatizaci činidly GTMA, BBGDMA, BGDMA*) a zředěny na koncentraci 100 mg/l. Byly testovány dva typy vzorku a to bez matrice a s matricí (smícháním vzorku a matrice v poměru 1:1). Takto připravené analyty byly pipetovány na MALDI destičku a analyzovány.

Experimenty byly provedeny s glukózou, sacharózou a škrobem. Všechny tři cukry byly kvarternarizovány oběma připravenými činidly a analyzovány jak s matricí, tak bez matrice. Na obrázku 29 jsou spektra glukózy kvarternarizované činidlem BGDMA, v prvním spektru je analýza bez matrice a ve druhém s matricí. V obou případech nalezneme ion s m/z 372,2, který má ve spektru bez matrice přibližně 18x větší intenzitu, než sodný adukt molekuly glukózy. Ve spektru s matricí je signál vyšší oproti sodnému aduktu dokonce 315x.

Pokud porovnáme intenzitu iontu m/z 372,2 v obou spektrech (bez matrice má intenzitu 420 a s matricí 18179), tak vidíme, že ve spektru s matricí je intenzita iontu přibližně 43 krát vyšší, nicméně i bez matrice je tento ion ve spektru patrný. Z toho je patrné, že pokud by to experiment vyžadoval a vzorek obsahoval vyšší koncentrace cukrů, je možno nanášení matrice z analytického postupu vynechat. Při použití hmotnostního spektrometru Synapt G2-S je možno od iontu kvarternarizovaného cukru odfiltrovat balastní signály matrice a derivatizačního činidla s využitím iontové mobilitní separace. Tyto experimenty jsou ukázány na obrázku 30, ve kterém je pro porovnání naměřené MS spektrum, spektrum z mobilitního skenu spektrum vytažené hmoty m/z 372,2.

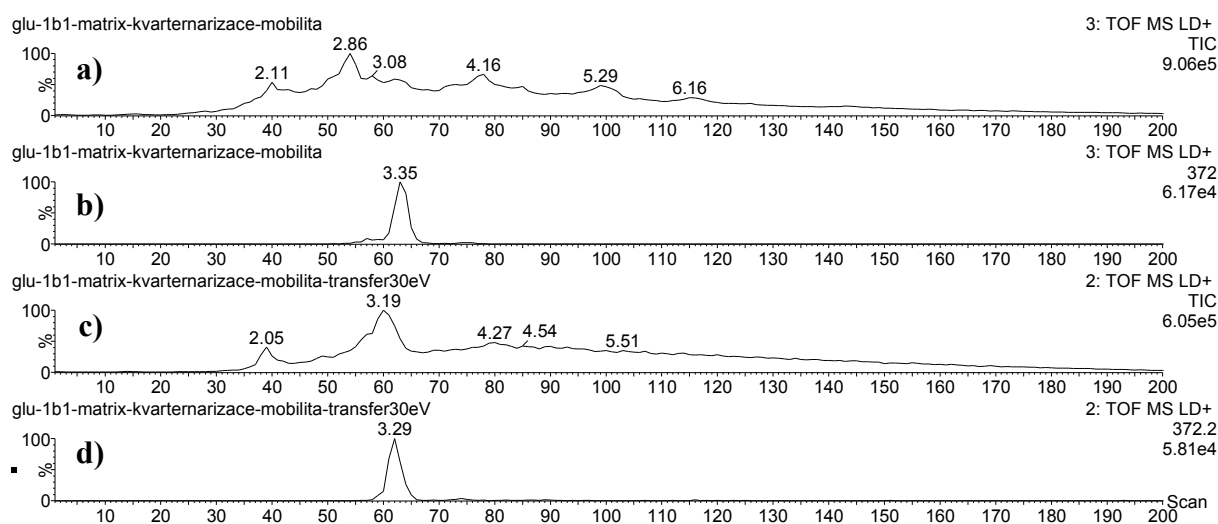


Obrázek 29: Spektra glukózy kvarternarizované činidlem BGDMA a analyzované **a)** bez matrice a **b)** s matricí.

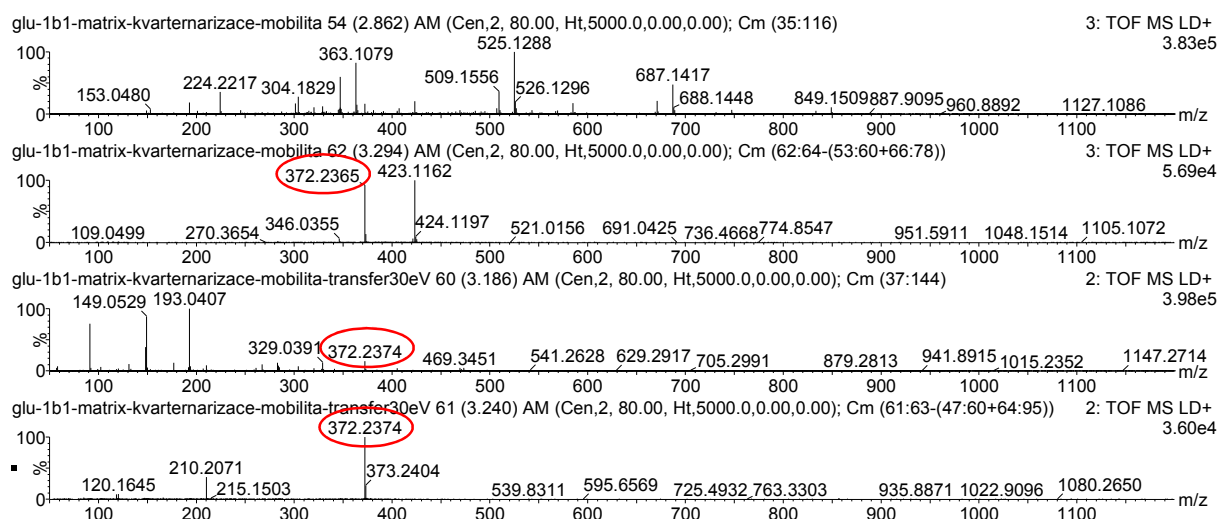


Obrázek 30: Porovnání iontu m/z 372,2 **a)** vyextrahovaného z mobilitního spektra **b)** v celkovém mobilitním skenu a **c)** v MS spektru.

Na obrázku 31 je ukázána mobilitní separace všech iontů přítomných v MS spektru, při analýze glukózy derivatizované činidlem BGDMA s matricí a mobilitní separace všech iontů s nastavenou kolizní energií 30 eV v transferové kolizní cele. Pod těmito spektry je vždy rekonstruován hledaný ion analytu s m/z 372,2. Na obrázku 32 jsou pak zobrazena příslušná hmotnostní spektra průměrovaná přes celý mobilitní rozsah (a, c) a přes mobilitní píky rekonstruované pro m/z 372,2 (b, d).



Obrázek 31: a) Mobilitní záznam kvarternarizované glukózy činidlem BGDMA, c) mobilitní záznam téhož analytu s nastavenou kolizní energií b) a d) mobilitní záznam rekonstruovaný pro m/z 372 při různých nastaveních kolizní energie na transferové kolizní cele.



Obrázek 32: Hmotnostní spektra průměrovaná z mobilitních spekter ve stejném pořadí jako na obrázku 31.

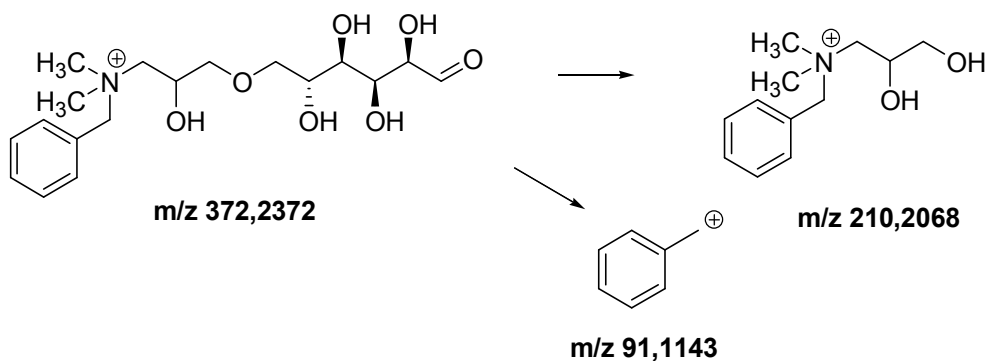
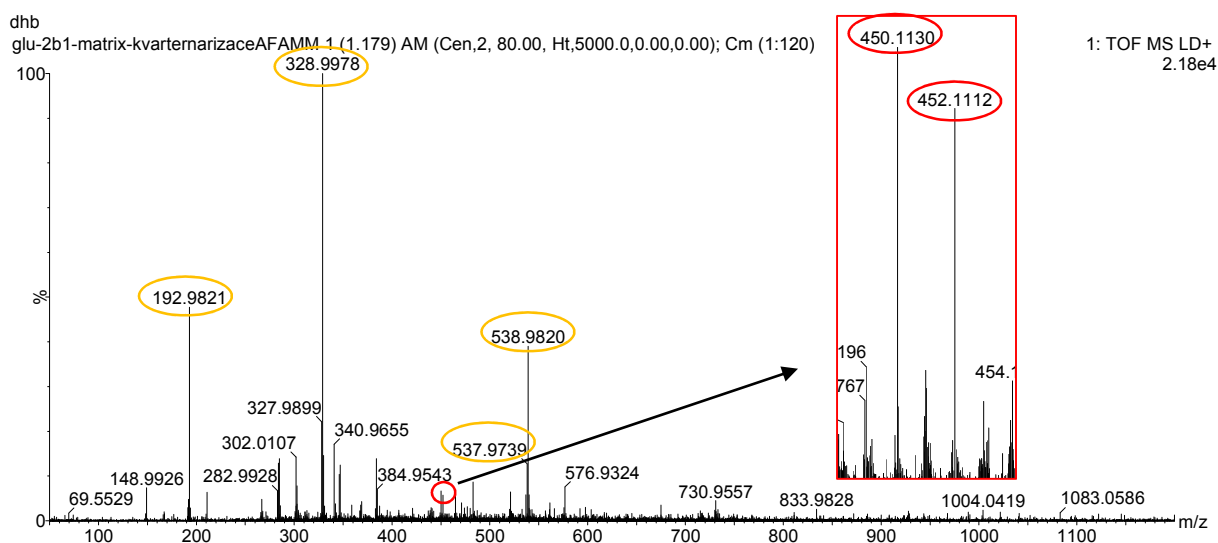


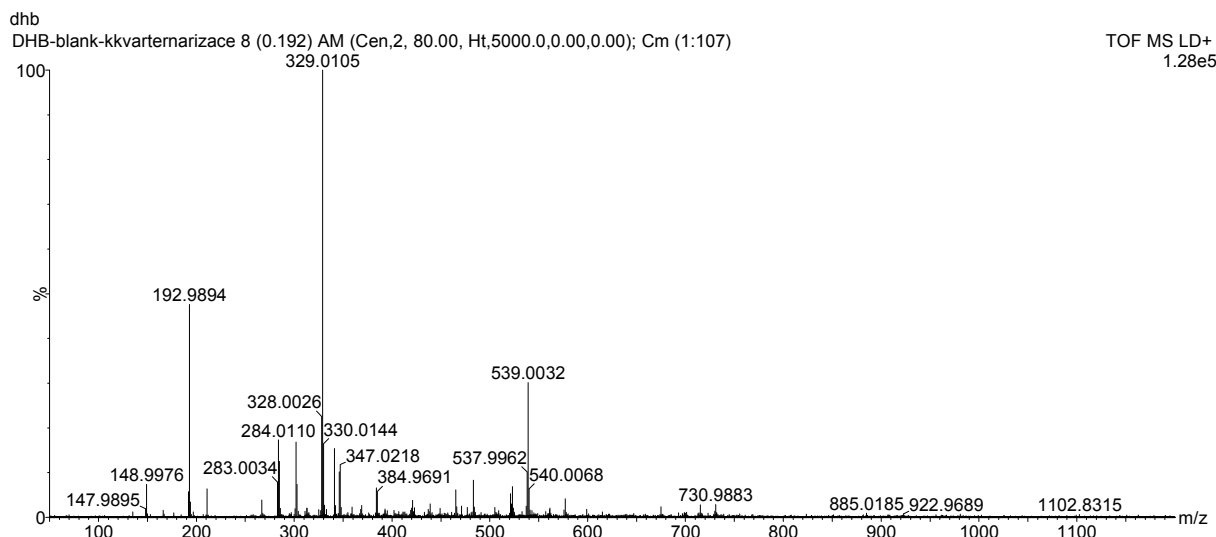
Schéma 34

V mobilním spektru s vyšší kolizní energií vloženou na transferovou kolizní celu jsou díky odfiltrování balastních signálů přítomny jak ion rodičovský s m/z 372,2374, tak charakteristický fragment s m/z 210,2071 odpovídající odštěpení dehydratované glukózy.

Glukóza byla rovněž kvarternarizovaná činidlem s bromem BBGDMA. Ion analytu m/z 450 a příslušný izotop 452 ve spektru vzorku analyzovaném bez matrice byl nalezen, nicméně je jeho intenzita velmi malá. Spektrum stejného vzorku, ale s matricí je ukázáno na obrázku 33. Na první pohled jsou ve spektru patrný jen ionty matrice, a to zejména ionty m/z 193, 329 a 539. Spektrum matrice v methanolu, bez analytu a bez činidla, je ukázáno na obrázku 34, ostatní signály ve spektru jsou balastní ionty. Ionty analytu jsou v obrázku přiblíženy a mají intenzitu 1520. Přesná molekulová hmotnost glukózy derivatizované BBGDMA je 450,1127, nalezená pak 450,1130 (odchylka $\delta = 0,67$ ppm od teoretické hodnoty). Tyto ionty mají přibližně 40 krát vyšší intenzitu oproti sodnému aduktu glukózy. Fragmentační spektrum iontu s m/z 450,1 je ukázáno na obrázku 35. V něm jsou patrné typické fragmenty s m/z 168 a 170 podobně jako u ionizace elektrosprejem a jsou zobrazeny ve schématu 35.



Obrázek 33: Hmotnostní spektrum glukózy kvarternarizované BBGDMA.



Obrázek 34: Hmotnostní spektrum matrice – 2,5-dihydroxybenzoová kyselina.

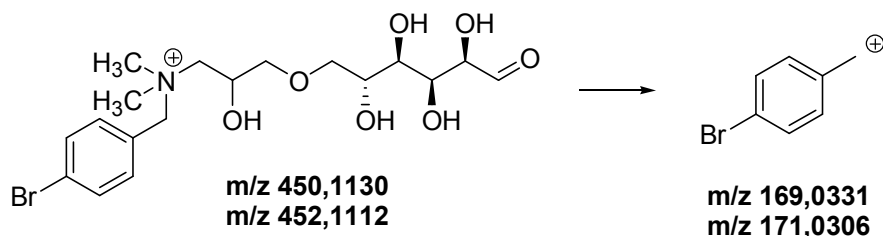
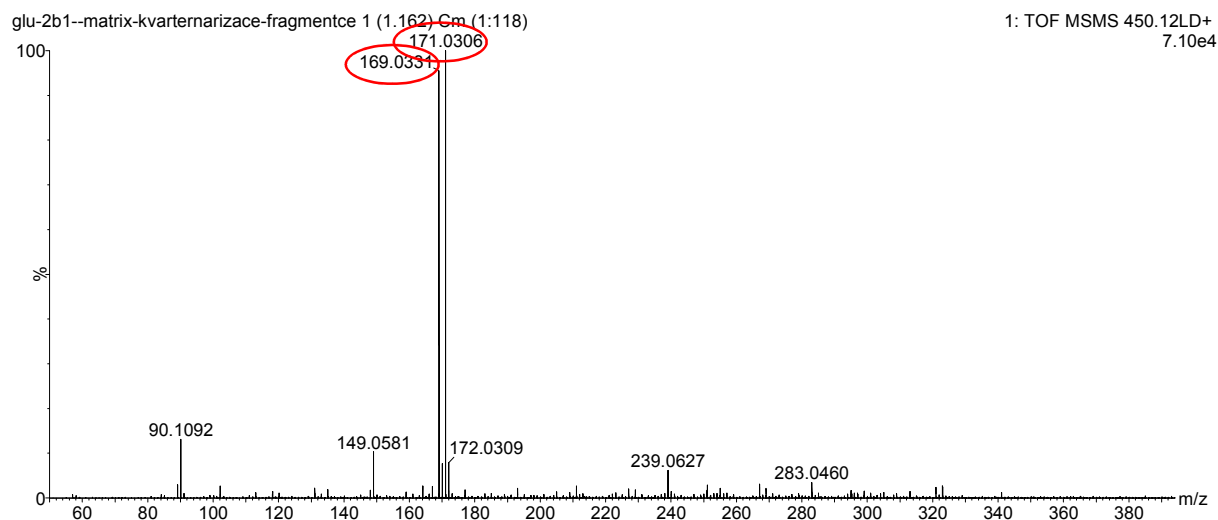


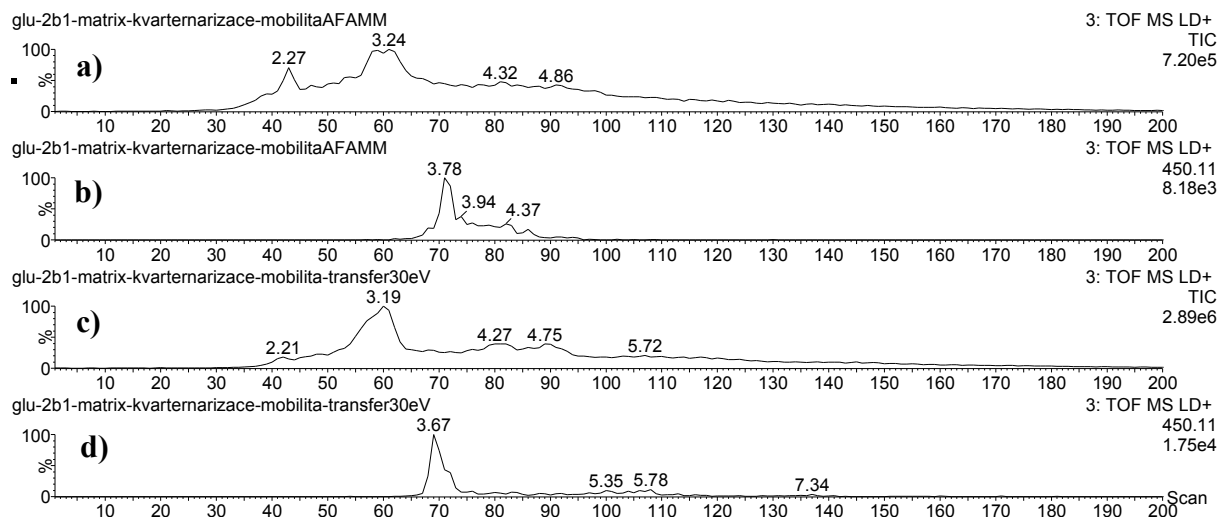
Schéma 35



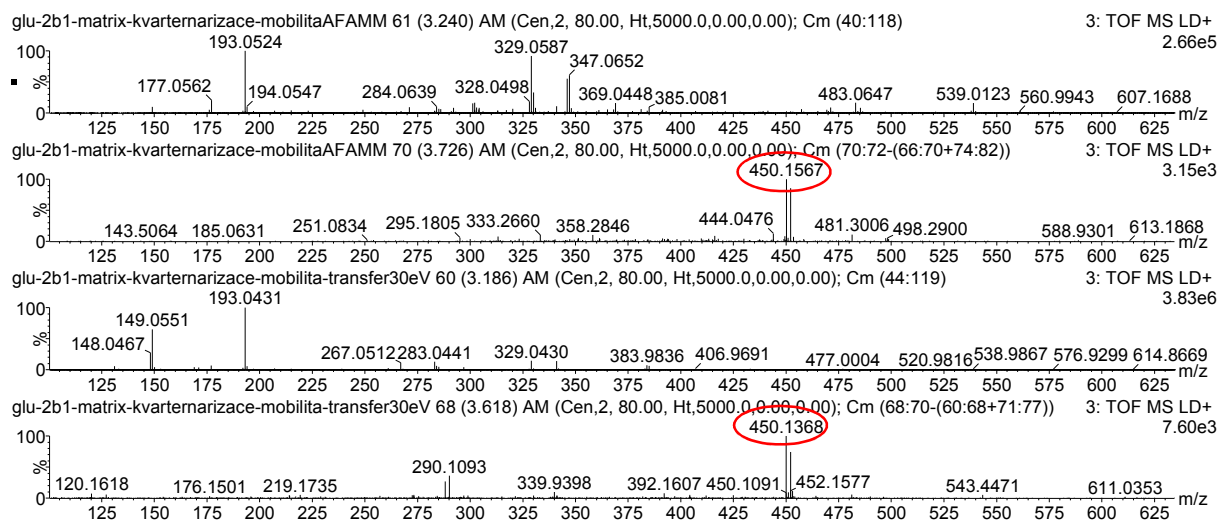
Obrázek 35: Fragmentační spektrum (MS/MS) iontu s m/z 450,11.

Pro tento derivát byla naměřena spektra s iontově mobilitní separací s malou a zvýšenou kolizní energií v transferové kolizní cele. I v tomto případě nabízí mobilitní separace efektivní filtraci balastních signálů. Mobilitní záznamy celkového iontového proudu a záznamy rekonstruované pro rodičovský ion s m/z 450,11 jsou na obrázku 36 a hmotnostní spektra

průměrovaná přes celý mobilitní záznam s malou **a**) a vyšší kolizní energií **c**) jsou uvedeny na obrázku 37. Spektra průměrovaná přes mobilitní pík rodičovského iontu s malou **b**) a vyšší kolizní energií **d**) obsahují pouze rodičovský ion s m/z 450,1567 a fragment po odštěpení dehydratované glukózy (m/z 210,1093) s charakteristickým izotopovým profilem odpovídajícím přítomnosti jednoho atomu bromu.

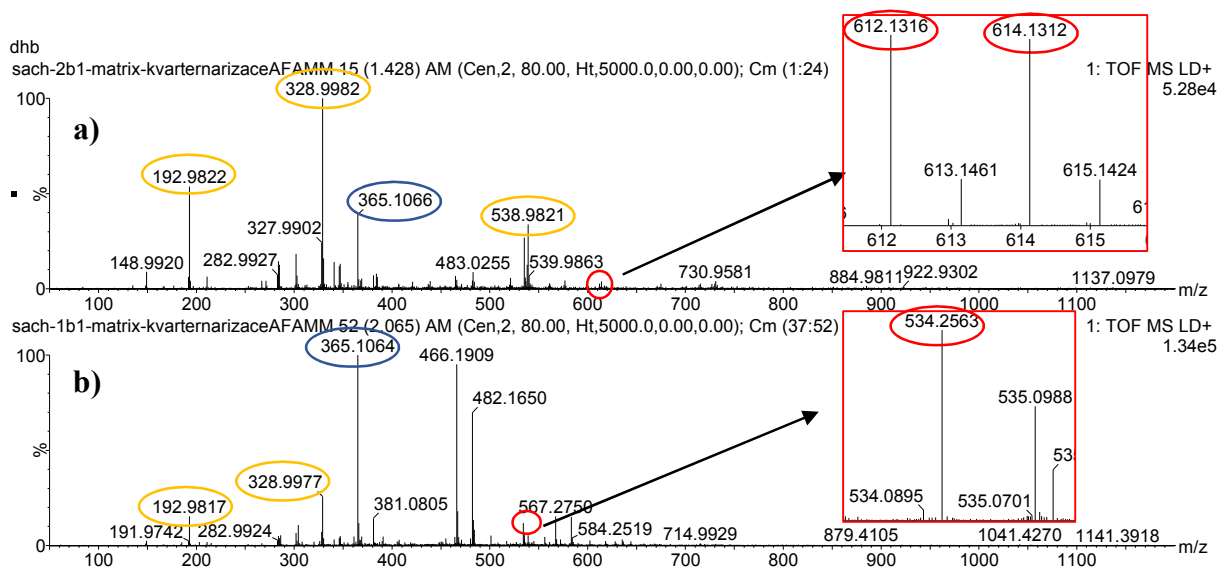


Obrázek 36: **a**) Mobilitní spektrum glukózy kvarternarizované činidlem BBGDMA; **b**) m/z 450,11 ze spektra **a**); **c**) mobilitní spektrum téhož analytu s nastavenou kolizní energií 30 eV na transferu, **d**) m/z 450,11 vyextrahovaná ze spektra **c**).



Obrázek 37: Hmotnostní spektra získaná z mobilitních spekter z obrázku 36 a zobrazena ve stejném pořadí.

Sacharóza byla analyzovaná také po derivatizaci oběma činidly. Byla zde pozorována trochu odlišná situace oproti kvarternarizované glukóze a to v tom, že dominantní ionty ve spektrech, které přísluší analytu, jsou sodné adukty molekuly sacharózy s m/z 365,11, což je podobná situace jako při kvarternarizaci GTMA a analýze MALDI. Byl nalezen rovněž ion odpovídající sacharóze derivatizované činidlem BGDMA, který má teoretickou hodnotu m/z 534,2551 a nalezenou m/z 534,2563 (odchylka $\delta = 2,25$ ppm). Sacharóza derivatizovaná činidlem BBGDMA má teoretickou hodnotu m/z 612,1656 a nalezenou m/z 612,1666 (odchylka $\delta = 2,63$ ppm a charakteristický izotopický profil, viz následující obrázek 38.



Obrázek 38: Spektrum sacharózy kvarternarizované a) BBGDMA b) BGDMA a analyzované s maticí.

Ve spektru sacharóza-BGDMA byl nalezen kromě sodného aduktu sacharózy m/z 365,1064 a hledaného iontu analytu také ion s m/z 466,1911. Byla navržena struktura tohoto iontu. Jde pravděpodobně o fragment vzniklý ztrátou jedné methylové skupiny a tří molekul vody (ztráta 68 jednotek) a taková struktura by měla mít molekulovou hmotnost 466,2077. Nalezená hodnota je m/z 466,1911 (odchylka $\delta = 35,6$ ppm od teoretické hodnoty). Ve spektru byly rovněž nalezeny ionty odpovídající ztrátě methylu a dvou molekul vody a methylu a jedné molekuly vody, avšak měly nižší intenzitu. Ztráta molekuly glukózy byla ve spektru také pozorována a hodnota m/z fragmentu je 372,2033 (m/z hodnota shodná s derivatizovanou glukózou). Ve spektru sacharózy derivatizované činidlem BBGDMA lze vidět sodný adukt sacharózy a kvarternarizovaný analyt s charakteristickým izotopickým profilem. Ztráta 68 jednotek jako u glukózy kvarternarizované činidlem BGDMA byl nalezen, ale ve velmi nízké intenzitě, stejně tak i ion odpovídající ztrátě glukózy. Ve fragmentačním spektru glukózy derivatizované činidlem BBGDMA byl nalezen charakteristický fragmentový

ion s m/z 169 (a izotopický pík m/z 171). Tento mechanismus fragmentace je shodný s tím, který byl pozorován při analýzách elektrospřejem.

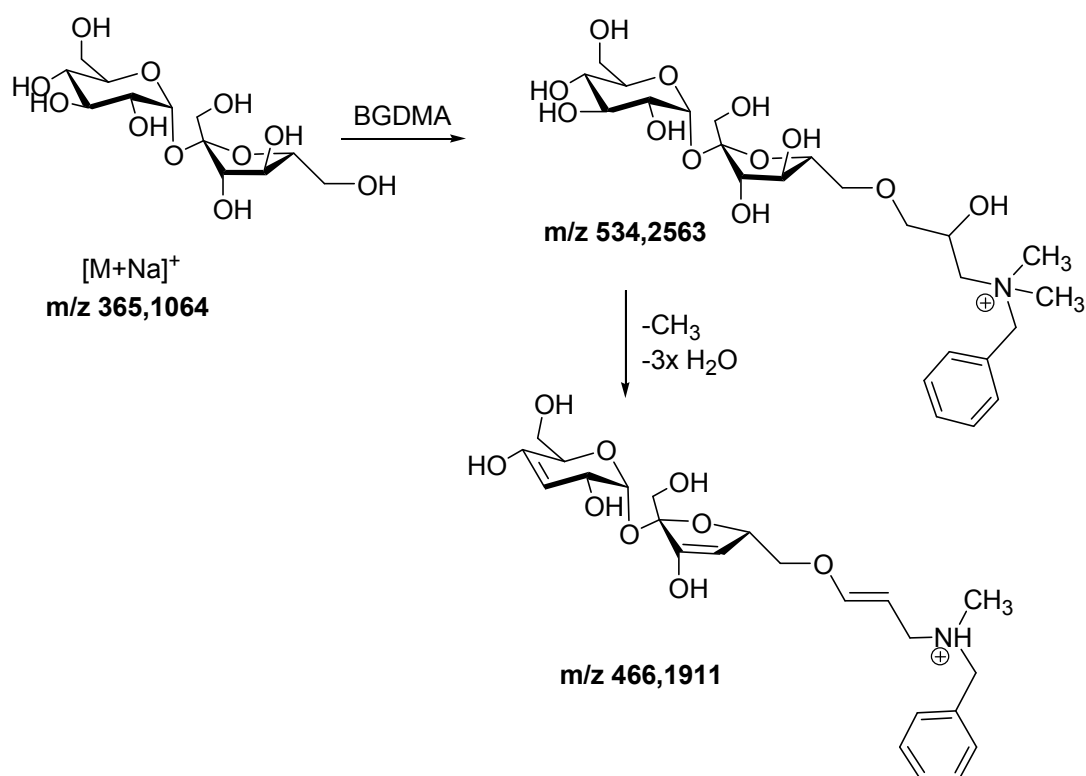
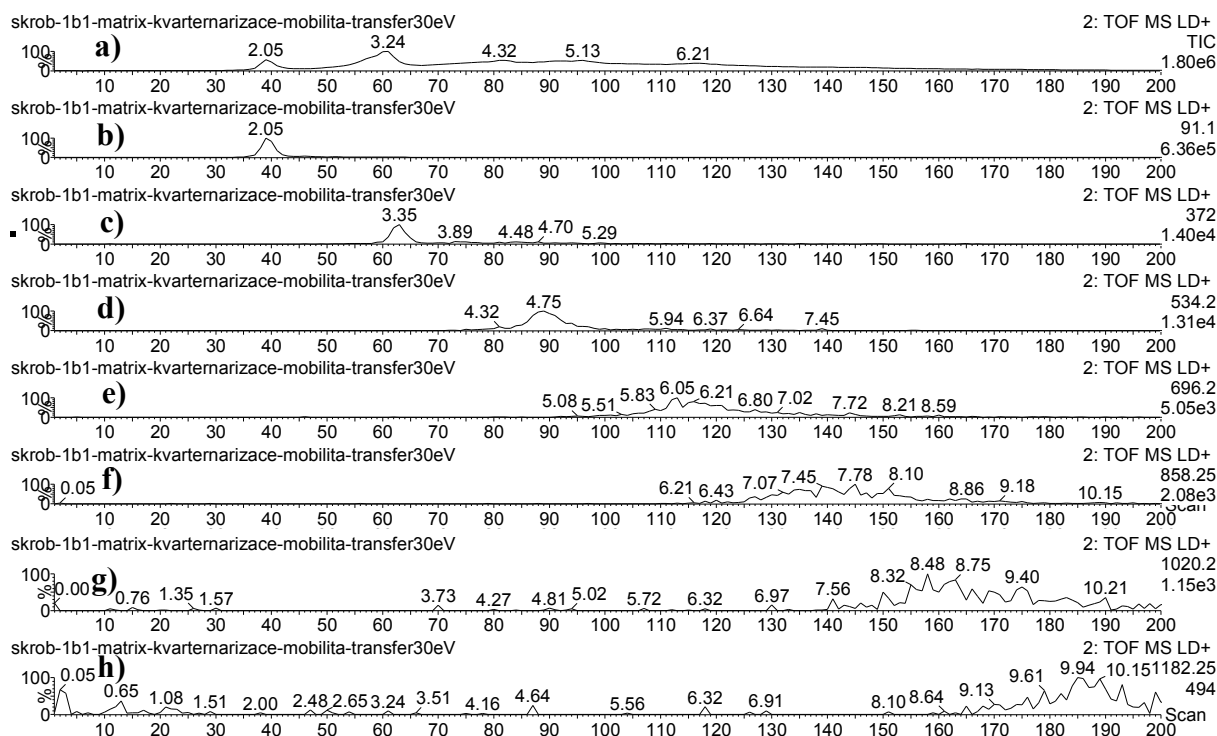
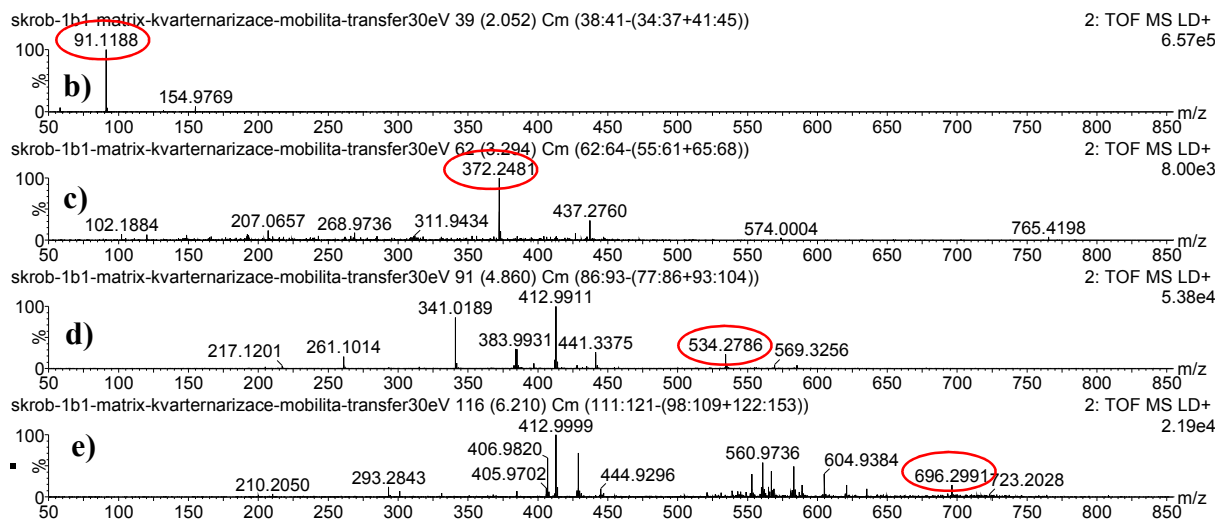


Schéma 36

Hmotnostní spektrum škrobu bylo výrazně komplikované maticí a adukty se sodíkem. Ionty analytu od jedné až po šest monomerních jednotek byly lépe viděny ve spektru z mobilního skenu s nastavenou kolizní energií 30 eV na transferové kolizní cele. Příslušné ionty a jejich intenzity (uvedené v závorce) jsou: m/z 372, 2 (7995), m/z 534,2 (12149), m/z 696,2 (7298), m/z 858,2 (3192), m/z 1020 (1433), m/z 1182 (529). Na obrázku 39 je ukázána mobilní separace všech těchto iontů a pro ilustraci jsou na obrázku 40 ukázána hmotnostní spektra příslušící iontům s m/z 91, 372, 534 a 696. Mobilní separace s nastavenou kolizní energií na transferu byla měřena i pro škrob kvarternarizovaný BBGDMA a vykazovala podobný průběh jako škrob-BGDMA.



Obrázek 39: Mobilitní separace s nastavenou kolizní energií 30 eV kvarternarizované glukózy činidlem BDGMA: **a)** celý sken, **b)** fragment m/z 91, **c)** ion m/z 372,2, **d)** ion m/z 534,2 **e)** ion m/z 696,2 **f)** ion m/z 858, **g)** ion m/z 1020, **h)** ion m/z 1182.



Obrázek 40: Hmotnostní spektra vyextrahovaných mobilitních píků z experimentu popisovaném na předchozím obrázku 39 od **b)** po **e)**.

Uvedené postupy lze tedy použít i pro analýzu škrobu a potenciálně dalších oligo- a polysacharidů. Možnost mobilitní filtrace balastních iontů je pro použitý postup velkou výhodou.

6. Závěr

Byly prostudovány možnosti derivatizace cukrů pro zlepšení jejich analýzy hmotnostní spektrometrií. Ukázalo se, že velmi výhodné je zavedení permanentního náboje do struktury cukrů. Bylo vybráno činidlo obsahující kvarterní amoniovou sůl a obsahující ve své struktuře oxiranový kruh, který se může působením nukleofilního činidla otevřít a navázat na hydroxylovou skupinu cukrů. Byl vyzkoušen dříve publikovaný postup derivatizace glukózy činidlem GTMA. V této diplomové práci byl postup testován také na dalších cukrech – na sacharóze a škrobu. Tento derivatizační postup byl využit pro hmotnostně spektrometrickou analýzu glukózy, sacharózy a škrobu s ionizací elektrosprejem a maticí asistovanou laserovou desorpcí/ionizací.

Glukóza kvarternarizovaná činidlem GTMA poskytla 42 krát vyšší odezvu než sodný adukt glukózy, což znamená že derivatizace přináší řádové zlepšení odezvy oproti analýze nederivatizovaných monosacharidů (běžně prováděné právě s využitím kationizace). Sacharóza při kvarternarizačním postupu nebo při samotném experimentu ztratila jednu molekulu glukózy. Ion po této ztrátě byl dominantní ve spektru a měl 14 krát vyšší intenzitu než sodný adukt sacharózy. Tento adukt měl přibližně o polovinu vyšší intenzitu než samotná kvarternarizovaná sacharóza. Ve spektru škrobu měl největší intenzitu kvarternarizovaný trimer glukózy, tato intenzita byla pětkrát vyšší než intenzita odpovídajícího sodného aduktu trimeru.

Při MALDI experimentech byly rovněž testovány možnosti GTMA derivatizace všech tří cukrů. Kvarternarizované cukry jsou při MALDI experimentu ve významném rozsahu fragmentovány (pravděpodobně v iontovém zdroji). Ve spektru kvarternarizované glukózy byl dominantní degradační produkt, avšak s intenzitou jen o 15% vyšší oproti sodnému aduktu. Ve spektru sacharózy byl dominantní sodný adukt tohoto cukru, s intenzitou 300 krát vyšší než kvarternarizovaná glukóza a dvacetkrát vyšší než degradační produkt. Ve spektru škrobu byl nalezen až dekamer glukózových jednotek a tato spektra byla oproti spektrům získaných z elektrospreje jednodušší na interpretaci.

V další práci byla realizovaná myšlenka přípravy analyticky všestrannějšího činidla nesoucího v molekule permanentní náboj, chromofor, reaktivní skupinu a (volitelně) izotopickou značku. Část práce se věnuje i jeho syntéze. Syntéza oxiranového kruhu není snadná, kruh je náchylný k hydrolýze. Především z časových důvodů nebyla syntéza dokonale optimalizovaná, především tedy izolační postup. Výhodným izolačním postupem se ukázala být vakuová destilace. U syntézy činidla s bromem, jehož výchozí látka byla dražší, a tedy jí bylo méně, musela být destilace provedena s límcovou baňkou. U tohoto uspořádání se nedá

přesně korigovat teplota, při které produkt destiluje. Tento způsob destilace poskytl směs produktů. Druhý krok probíhal dobře, ovšem izolace byla složitější. Iontová sloučenina, jakou činidlo je, se nedá dobře separovat na silikagelu, navíc by se hydrolyzoval oxiranový kruh. I přes tyto nedostatky, mohla být připravená činidla použita pro pilotní testování jejich schopnosti derivatizovat cukry. Experimenty prováděné po třech měsících od dokončení syntézy ukázaly určité změny v činidlech, které by se po optimalizaci syntézy pravděpodobně eliminovaly.

Glukóza, sacharóza i škrob byly kvarternarizovány oběma připravenými činidly: (4-bromo-benzyl)-glycidyl-dimethyl-amonium jodid (BBGDMA) a benzyl-glycidyl-dimethyl-amonium jodid (BGDMA) a analyzovány elektrosprejem i MALDI. Kvarternarizovaná glukóza byla analyzována elektrosprejem na přístroji Synapt G2-S bezprostředně po dokončení syntézy. Naměřené spektrum glukózy kvarternarizované BGDMA ukázalo, že hledaný analyt měl dokonce 1300x vyšší odezvu než sodný adukt glukózy. Kvarternarizovaný BBGDMA měl při analogickém srovnání odezvu 630x vyšší.

Při MALDI experimentech se ukázalo, že glukóza kvarternarizovaná BGDMA měla 18 krát lepší odezvu oproti sodnému aduktu i bez přidání matrice. Tento výsledek je nadějný pro potenciální vývoj metod pro analýzu cukrů bez matrice. Při použití matrice v analogickém experimentu byla intenzita dokonce 315 krát vyšší. Odpovídající analýza s činidlem BGDMA poskytovala 40x vyšší intenzitu oproti sodnému aduktu.

Z naměřených experimentů se ukázalo, že deriváty připravené v naší laboratoři mají lepší odezvu analytů oproti komerčnímu činidlu GTMA. Činidlo obsahující v molekule brom by mohlo být vzhledem k charakteristickému izotopovému profilu bromu dobrým identifikačním nástrojem, zejména pro analýzu neznámých vzorků. Navržená a testovaná činidla by se mohla stát vhodným nástrojem pro citlivou analýzu cukrů hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem a (MA)LDI.

7. Použitá literatura

1. McMurry, J. *Organic Chemistry*; Brooks/Cole: California, 2000.
2. Niessen, W. M. A. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*; Marcel Dekker: New York, 1999.
3. Harvey, D. J. *J. Chromatogr. B.* **2011**, 879, 1196-1225.
4. Hillenkamp, F.; Peter-Katalinic, J. *MALDI MS, A Practical Guide to Instrumentation, Methods, and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2014.
5. Velíšek, J. *Chemie potravin*; OSSIS, Praha, 2009
6. Nelson, J. M.; Beegle, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1919**, 4, 559-575.
7. Červinka, O.; Dědek, V.; Ferles, M. *Organická chemie*, SNTL: Praha, 1980.
8. Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry, Principles and Applications*; John Wiley and Sons: Chicester, 2007.
9. Ruiz-Matute, A. I.; Hernánder-Hernández, O.; Rodríguez-Sánchez, S.; Sanz, M. L.; Martínez-Castro, I. *J. Chromatogr. B.* **2011**, 879, 1126-1136.
10. Cole, R. B. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamental, Instrumentation and Applications*; John Wiley and Sons: New York, 1997.
11. Harvey, D. J. *Mass Spectrom. Rev.* **1999**, 6, 349-450.
12. Woseman, J. M; laughlin, B. C. *Desorption Electrospray Ionization (DESI) Mass Spectrometry: A brief introduction and overview*; Prosolia, Indianapolis.
13. Harvey, D. J. *Inter. J. Mass Spectrom.* **2003**, 226, 1-35.
14. Chen, P.; Werner-Zwanzinger, U; Wiesler, D.; Pagel, M.; Novotný, M. V. *Anal. Chem.* **1999**, 21, 4969-4973.
15. Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A. *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* **1973**, 64, 82-89.
16. Sergei I. S.; Rak-Banville, J. M.; Perreault, H. *J. Am Soc Mass Spectrom.* **2008**, 19, 1138-1146.
17. Lattova, E; Perreault, H. *Mass Spectrom. Rev.* **2013**, 32, 366–385.
18. Lattova, E.; Perreault, H. *J. Chromatogr. B.* **2003**, 793, 167-169.
19. Cheng, H. L.; Her, G. R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, 13, 1322–1330.
20. Kapková, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, 23, 2774-278.
21. Wang, Ch.; Wu, Z.; Yuan, J.; Wang, B.; Zhang, P.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Huang, L. *J. Proteome Res.* **2014**, 13, 372–384.

22. Ping Zhang, P.; Wang, Z.; Xie, M.; Nie, W.; Huan, L. *J. Chromatogr. B.* **2010**, 878, 1135–1144.
23. Honda, S.; Akao, E.; Suzuki, S.; Okuda, M.; Kakehi K.; Nakamura, J. *Anal. Biochem.* **1989**, 51, 357.
24. Sun, Z.; Song, C.; Xia, L.; Wang, X.; Suo, Y.; You, J. *Chromatographia* **2010**, 71, 789-797.
25. Shen, X. Perreault, H. *J. Chromatogr., A.* **1995**, 811, 47-59.
26. Harvey, D. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, 11, 900–915.
27. Zhang, Y.; Chen, H. *Inter. J. Mass Spectrom.* **2010**, 289, 98-107
28. Takao, Y. T.; Murata, H.; Shimonishi, Y. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4028-4031.
29. Takao, T.; Tambara, Y.; Nakamura, A.; Yoshino, K.; Fukuda, H.; Fukuda, M.; Shimonishi, Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, 6, 637-640.
30. Mo, W.; Takao, T.; Sakamoto, H.; Shimonishi, Y. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4520-4526.
31. Hase, S.; Ikenaka, T.; Matsushima, Y. *J. Biochem (Tokyo)*. **1981**, 90, 407-414.
32. Itoh Y, Ohashi Y, Shibue T, Hayashi A, Maki S, Hirano T, Niwa H. *J. Mass Spectrom. Soc Jpn.* **2002**, 50-52.
33. Sekiya, S.; Yamaguchi, Y.; Kato, K.; Tanaka, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 23, 3607-3611.
34. Bigge, J. C.; Patel, T. P.; Bruce, J. A.; Goulding, P. N.; Charles, S. M.; Parekh, R. B. *Anal. Biochem.* **1995**, 2, 229-238.
35. Lattova, E.; Snovida, S.; Perreault, H.; *Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, 16, 683-696
36. Naven, T. J. P.; Harvey, D. J.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, 10, 829-834.
37. Gil, G. C.; Kim, Y. G.; Kim, B.G. *Anal Biochem.* **2008**, 1, 45-59.
38. Jang, K-S.; Kim, Y-G.; Gil, G-Ch.; Park, S-H.; Kim, B-G. *Anal. Biochem.* **2009**. 386, 228–236.
39. Toyoda, M.; Ito, H.; Matsuno, Y., K., Narimatsu, H.; Kameyama, A., *Anal. Chem.* **2008**, 80, 5211–5218.
40. Broberg, S.; Broberg, A.; Duus, J. R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**. 14, 1801-1805.
41. Lin, Ch.; Hung, W. T.; Kuo, Ch. Y.; Liao CH. Y.; Liu Y. Ch.; Yang W. B. *Molecules* **2010**, 15, 1340-1353.
42. Lin, Ch.; Hung, W. T.; Chen, Ch. H.; Fang, J. M.; Yang W. B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, 24, 85-94.

43. Tong, W. Han, H.; Song, Z.; Ma, Ch.; Pan, Y.; Zhang, Y.; Qin, W.; Qian, X. *Analytical Methods*, **2012**, 4, 3531-3535.
44. Hung, W-T.; Wang, S-H.; Chen, Y-T.; Yu, H-M.; Chen, Ch-H. *Molecules* **2012**, 17, 4947- 951.
45. Franz, A. H.; Molinski, T. F.; Lebrilla, C. B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, 12, 1254-1261,
46. Joost W. Gouw, J. W.; Burgers, P. C.; Trikoupis, M. A.; Terlouw, J. K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, 10, 905-912.
47. McGregor, D, N. U.S. Patent 3,336,196, 1964.
48. Platzek, J.; Weinmann, H-J,; Schirmer, H.; Martin, J. L.; Harto, J. R.; Roefke, B. U.S. Patent 265236, 2004.

8. Použité zkratky

2-AMAC	2-aminoakridon
2-AP	2-aminopyridin
3-AQ	3-aminochinolin
2,5-DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
9AmFL	9-aminofluoren
ABBE	butylester 4-aminobenzoové kyseliny
ABEE	ethylester 4-aminobenzoové kyseliny
ABME	methylester 4-aminobenzoové kyseliny
ACN	acetonitril
AcOH	kyselina octová
An	anilín
BA	2-aminobenzamid
BACH	hydrazid biotinaminokapronové kyseliny
BBGDMA	(4-bromo-benzyl)-glycidyl dimethyl-amonium jodid
BGDMA	benzyl-glycidyl dimethyl-amonium jodid
CE	kapilární elektroforéza
CID	kolizí indukovaná disociace („collision induced dissociation“)
DEAEAB	4-amino- <i>N</i> -(2-diethylaminoethyl)benzamid
DESI	desorpční elektrosprej
DMA	<i>N,N</i> -dimethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
EB	Ethidium bromid
ESI	ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“)
ESSI	„elektrosonic spray ionization“
EWG	elektrony odpuzující nitro skupina („electron withdrawing group“)
FAB	ionizace rychlými elektrony („Fast Atom Bombardment“)
FWHM	šířka v polovině výšky („Full-Width Half-Maximum“)
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC/MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
GP	Girardovo činidlo P
GT	Girardovo činidlo T
GTMA	glycidyltrimethylamonium chlorid

HCCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LDI	laserová desorpce ionizace
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (matrix-assisted laser desorption/ionization“)
MeOH	methanol
NA	nikotinová kyselina
NANA	kyselina <i>N</i> -acetylneuraminová (kyselina sialová)
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normálních fázích
NMP	1-(2-naftyl)- 3-methyl-5-pyrazol
<i>n</i> -PrOH	propanol
PAGE	gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PHN	fenylhydrazin
PMP	1-fenyl-3-methyl-5-pyrazol
PMPMP	1-(4-methoxyfenyl)- 3-methyl-5-pyrazol
PPMP	1-(4-isopropylfenyl)-3-methyl-5-pyrazol
QqQ	trojitý kvadrupól
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
SA	Sinapová kyselina
<i>t</i> -BuOH	terciární butanol
TMAPA	trimethyl-(<i>p</i> -aminofenyl)-ammonium chlorid
TOF	analyzátor doby letu („time of flight“)