

**1. KONFERENCE
ČESKÉ SPOLEČNOSTI
PRO HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII**

Hradec Králové, 19. - 21. října 2011
SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

Sborník příspěvků z 1. konference
České společnosti
pro hmotnostní spektrometrii

Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii

Praha 2011

**Sborník příspěvků z 1. konference České společnosti
pro hmotnostní spektrometrii**

Autoři

Kolektiv autorů

Vydáno

Říjen 2011, 1. vydání

Vydavatel

Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého

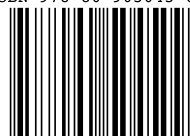
17. listopadu 1192/12

771 46 Olomouc

www.czechms.org

ISBN 978-80-905045-0-9

ISBN 978-80-905045-0-9



9 788090 504509



Sponzoři konference

*Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii
děkuje následujícím partnerům za významnou podporu*



*Shimadzu Handels GmbH, organizační složka
Generální sponzor 1. konference ČSHS*



*Bruker s.r.o.
Sponzor 1. konference ČSHS*

Zakládající sponzoři ČSHS a konferenční vystavovatelé



AB Sciex s.r.o.



Bruker s.r.o.



HPST s.r.o.



*Shimadzu Handels GmbH,
organizační složka*



Thermo Fisher Scientific (Praha) s.r.o.



Waters

Akademičtí partneři



*Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Palackého
Sídlo ČSHS*



*Fakulta vojenského zdravotnictví,
Univerzita obrany
Spolupřadatel 1. konference ČSHS*

Další partneři



Quinta-Analytica s.r.o.



*Regionální centrum pokročilých
technologií a materiálů*

*Kolektiv autorů publikace
Anal. Chem. 2011, 83, 5661–5665
věnoval ČSHS odměnu za vítězství
v Hanušově-Sedmerově ceně*

1. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii

Datum konání

19. - 21. října 2011

Místo konání

*Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany
Třebešská 1575, Hradec Králové, Česká republika*

Pořadatel

*Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii, Česká republika
Univerzita Obrany, Česká republika*

Ve spolupráci s

Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika

Univerzita Karlova v Praze, Česká republika

Masarykova Univerzita v Brně, Česká republika

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Česká republika

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Česká republika

Výbor ČSHS

Předseda: Jana Roithová

Místopředseda: Karel Lemr

*Členové: Petr Halada, Jan Havliš, Lenka Hernychová, Petr Novák, Patrik Španěl
a Michael Volný*

Program středa 19. října 2011

- 12:30 - 19:00 Registrace
- 13:00 - 14:00 Technická řešení a aplikace (firma Thermo Fisher Scientific)
- 16:30 - 16:40 Představení České společnosti pro hmotnostní spektrometrii
(*J. Roithová, K. Lemr*)
- 16:40 - 17:30 Günter Allmaier (*Technische Universität Wien*)
*PL-1 From disposable polymer-based MALDI MS targets to ultra high
molecular mass detection and true high (20 keV) energy CID
of biomolecules*
- 17:30 - 19:00 I. Hmotnostní spektrometrie v iontové chemii**
(*Předsedající: Zdeněk Herman*)
- 17:30 - 18:00 Detlef Schröder
WeO-001 Ion chemistry: a journey from the universe to human blood
- 18:00 - 18:20 Juraĳ Glosík
*WeO-002 Recombination of para- and ortho- H_3^+ with electrons
at 77-200 K; state selective study*
- 18:20 - 18:40 Lucie Jašíková
*WeO-003 Využití infračervené multifotonové disociační spektroskopie
při sledování aromatické C-H aktivace*
- 18:40 - 19:00 Kristýna Sovová
*WeO-004 Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty,
SIFT-MS*
- 19:00 - 24:00 Párty na uvítanou

Program čtvrtek 20. října 2011**09:00 - 10:30 II. Hmotnostní spektrometrie v biologii**
(Předsedající: Jan Preisler)

- 09:00 - 09:30 František Foret
ThO-005 Miniaturizace v bioanalýze
- 09:30 - 09:50 Jana Janečková
ThO-006 Využití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF pro identifikaci bakterií a kvasinek v klinické mikrobiologii
- 09:50 - 10:10 Petr Man
ThO-007 H/D exchange in real life: How to move from textbook examples to truly tough guys
- 10:10 - 10:30 Jana Jaklová Dyrtrtová
ThO-008 The Yb(III) stabilization of artificial membranes from lecithin probed by ESI-MS

10:30 - 10:50 Přestávka na kávu a čaj

10:50 - 12:20 III. Hmotnostní spektrometrie v organické analýze
(Předsedající: Vladimír Havlíček)

- 10:50 - 11:20 Josef Cvačka
ThO-009 Využití reakcí acetonitrilu v APCI zdroji pro určování poloh dvojných vazeb v lipidech
- 11:20 - 11:40 Erwin Rosenberg
ThO-010 Elemental Speciation by ESI-and APCI-MS
- 11:40 - 12:00 Lucie Hartmanová
ThO-011 Development and applications of desorption nanoelectrospray
- 12:00 - 12:20 Martin Strohalm
ThO-012 Altered spatial distribution of Gb3Cer in Fabry disease mouse studied by mass spectrometry imaging
- 12:30 - 13:30 Technická řešení a aplikace (firma Shimadzu)

13:30 - 14:20 Oběd

14:20 - 15:50 IV. Hmotnostní spektrometrie v potravinářství, průmyslu a ochraně prostředí

(Předsedající: Karel Lemr a Jana Hajšlová)

14:20 - 14:50 Jana Hajšlová

ThO-013 Mass spectrometry based metabolomic fingerprinting/profiling in food classification

14:50 - 15:10 Petr Bednář

ThO-014 Analysis of anthocyanin dyes by mass spectrometry and hyphenated techniques

15:10 - 15:30 Miroslav Lísa

ThO-015 HPLC/MS a GC/FID charakterizace triacylglycerolového složení rostlinných olejů a živočišných tuků

15:30 - 15:50 Tomáš Tomšej

ThO-016 Vliv bleedingu kolony na správnost stanovení stopových hladin polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů/furanů technikou vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie

15:50 - 16:10 Přestávka na kávu a čaj

16:10 - 17:40 Schůze ČSHS

18:00 - 24:00 Večeře a sekce plakátových sdělení

Účastníci konference jsou během večera hosty generalního sponzora, firmy Shimadzu

Program pátek 21. října 2011

- 09:00 - 10:30 V. Hmotnostní spektrometrie v klinické a farmaceutické analýze**
(*Předsedající: Miroslav Ryska*)
- 09:00 - 09:30 Lucie Nováková
FrO-017 Problematika matricových efektů v kvantitativní LC-MS analýze
- 09:30 - 09:50 Jan Preisler
FrO-018 Nové techniky zavádění vzorku do indukčně vázaného plazmatu s využitím laserů
- 09:50 - 10:10 Hana Janečková
FrO-019 Targeted metabolomics for diagnosing inherited metabolic diseases
- 10:10 - 10:30 Ladislav Kuchař
FrO-020 Tandemová hmotnostní spektrometrie sfingolipidů s aplikací v diagnostice sfingolipidos: nové biomarkery v moči
- 10:30 - 10:50 Přestávka na kávu a čaj
- 10:50 - 11:50 Technická řešení a aplikace (firma Bruker)
- 11:50 - 12:00 Přestávka
- 12:00 - 12:50 František Tureček (*University of Washington*)
PL-2 Peptide Cation Radicals by Electron-Ion Recombination
- 12:50 - 13:00 Závěr konference
- 13:00 Oběd

PL-1: From disposable polymer-based MALDI MS targets to ultra high molecular mass detection and true high (20 keV) energy CID of biomolecules

Wolfgang Winkler ¹, Stefan Bugovsky ¹, Ernst Pittenauer ¹, Martina Marchetti-Deschmann ¹,
Guenter Allmaier ¹ *

1. Vienna University of Technology

In the recent years the so-called “soft” desorption/ ionization techniques MALDI (vacuum and intermediate as well as atmospheric pressure) and ESI have become the work horses of modern bioanalysis. Particular MALDI mass spectrometry is expanding its application range from mid-sized proteins to on one hand small molecules as well as to ultrahigh molecular mass compounds. Significant advances, mainly in an empirical fashion, in MALDI sample preparation have been obtained allowing the analysis of more and more compound classes or objects of interest as microorganisms (e.g. intact spores by MALDI-based intact cell/spore mass spectrometry [1]). The growing interest in MALDI-based molecular imaging mass spectrometry of tissues and surfaces in general puts even more pressure to develop and optimize MALDI sample preparation (e.g. the development of new disposable and cheap high-quality sample targets based on DLC (diamond-like carbon) [2] or polymeric [3] materials or the kind of MALDI matrix deposition). On the other “end” of the MALDI mass spectrometer improved detector systems help to extend the theoretical unlimited m/z range of a linear time-of-flight analyzer in reality beyond 1 million Da. This can be done either by so-called cryogenic detector, which is a calorimetric detector operating at low temperatures or by detectors based on secondary ion emission in combination with sputter ion reacceleration. MALDI ion sources have been combined more and more with various forms of tandem and multistage analyzers allowing from very low energy (1 – 3 eV) collision induced dissociation (CID) up to “true” high energy CID (20 keV) experiments. Particular instruments that allow performing high energy CID are helpful in structural analysis of unknown or at least partly unknown compounds as e.g. modified peptides, different classes of lipids or oligosaccharides attached to aglycones. Characteristic features for low-energy CID spectra of biomolecules are fragmentations related to carbon-heteroatom cleavages. For “true” high- energy CID spectra additional carbon-carbon cleavages, requiring typically higher collision energies, are observed.

* Korespondence: guenter.allmaier@tuwien.ac.at

LITERATURA:

1. Dong H. et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1373-1383 (2009).
2. Winkler W. et al.: *J. Mass Spectrom.* 45, 566-569 (2010).
3. Bugovsky S. et al.: *Anal. Chem.* (přijato 2011).

PL-2: Peptide cation radicals by electron-ion recombination

František Tureček ^{1*}, Thomas W. Chung ¹, Christopher L. Moss ¹

1. University of Washington

Electron-ion recombination triggers extensive dissociations of peptide ions that provide valuable sequence information. The main dissociations are cleavage of backbone N---C-alpha bonds and side-chain losses. Our main interest in this area has been in elucidating the energetics and mechanisms of peptide electron-based dissociations that are observed in electron capture dissociation (ECD) and electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry [1]. Experimental methods included modifying the peptide with spin-trapping and fixed-charge groups [2], charge-reversal [3], ion mobility, and IRMPD using a free electron laser. Computational analysis involved conformational search, cation-radical structures, transition states, RRKM kinetics, and quantum Ehrenfest dynamics. Another area of interest concerns dissociations of primary ETD fragments with the goal of extracting additional sequence information. For example, primary z ions from arginine-containing peptides undergo backbone dissociations that depend on the nature of the amino acid residues in the peptide. Residues that engage in radical hydrogen transfers can promote or block backbone dissociations, depending on the nature of the residue. Radical-trapping residues such as cysteine and methionine effectively quench backbone dissociations. The energetics and kinetics of backbone dissociations will be discussed. In addition, newest results of quantum Ehrenfest dynamics will be presented to document the role of excited electronic states in peptide cation-radical dissociations.

* Korespondence: tucecek@chem.washington.edu

LITERATURA:

1. Syrstad E. A. and Tureček F. J.: *Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 208-224 (2005).
2. Chung T. W. et al.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 13-30 (2011).
3. Tureček F. et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16472-16487 (2009).

WeO-001: Ion chemistry: a journey from the universe to human bloodDetlef Schröder^{1*}*1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.*

Mass spectrometry provides numerous tools for chemical analysis and is nowadays the most dynamically growing analytical technique worldwide [1]. The Olympic Games, for example, are today not only the biggest celebration of sports, but also a major field of applied mass spectrometry [2]. Mass spectrometry is after all based on ion chemistry, an exotic field of research, which is extremely important for the technique itself, but often believed to have little or no relevance for "real" chemistry (e.g. synthesis) or even our daily life.

As announced in the title, after a brief introduction into mass spectrometry (MS), the lecture will provide an overview of the principles of ion chemistry and then show its impact on phenomena in nature. This journey will start in the outer universe, approach earth from the higher atmosphere, tackle aspects of cloud formation as well as ion solvation and end with examples concerning the speciation of metals in environmental samples or the fate of chemicals in human blood. Along this journey, several of the most modern mass spectrometric techniques will be presented, but also the foundations of mass spectrometry will be given appropriate credit [3]. One of the most powerful linkages in this respect is provided by electrospray ionization which can permit a direct monitoring of chemical reactions occurring in the condensed phase by mass spectrometric means.

* Korespondence: schroeder@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Yates J. R.: Nature Methods 8, 633 (2011).
2. Hemmersbach P.: J. Mass Spectrom. 43, 839 (2008).
3. Herman Z.: Fifty years in ion chemistry, GRC, Galveston, TX, USA, (2009).

WeO-002: Recombination of para- and ortho-H₃⁺ with electrons at 77-200 K; state selective study

Juraj Glosík^{1*}

1. Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Prague, Czech Republic

Utilizing different ratios of para-H₂ to ortho-H₂ in used normal and para enriched hydrogen gas, we changed the relative population of para-H₃⁺ and ortho-H₃⁺ states in H₃⁺ dominated plasma in He/Ar/H₂ gas mixture. Near infrared cavity ring down laser absorption spectroscopy was used to probe the number densities of the lowest rotational states of the vibrational ground state of H₃⁺. From the plasma decays at different populations of para-H₃⁺ and ortho-H₃⁺ we obtained binary and ternary recombination rate coefficients of para-H₃⁺ and ortho-H₃⁺ and their dependencies on temperature (77-200 K). It is first time that the recombination rate coefficients of H₃⁺ ions with different nuclear spin state were successfully measured.

Discussed will be the experimental arrangement, obtained values of the recombination rate coefficients and their comparison with values calculated for plasma in thermodynamic equilibrium and also for plasma containing pure para-H₃⁺ and pure ortho-H₃⁺.

* Korespondence: juraj.glosik@mff.cuni.cz

WeO-003: Využití infračervené multifotonové disociační spektroskopie při sledování aromatické C-H aktivace

Lucie Jašíková^{1*}, Jana Roithová¹

1. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra organické a jaderné chemie

Aktivace C-H vazeb patří mezi důležité obory organické chemie. V posledních letech je kladen důraz na studium katalyzátorů této reakce. Jako jedny z potencionálně vhodných katalyzátorů jsou zkoumány oxidy kovů. V naší práci jsme se zaměřili na studium aromatické C-H aktivace fenantrolinu pomocí CuO^+ v plynné fázi. Už dříve bylo zjištěno, že komplex $[(\text{fenantrolin})\text{CuO}]^+$ je schopný aktivovat propan a vyšší uhlovodíky [1]. Ačkoliv byla navržena struktura oxidovaného ligandu na základě termodynamické stability různých isomerů, přímá experimentální charakterizace tohoto komplexu doposud nebyla známa. Pomocí infračervené multifotonové disociační spektroskopie jsme byli schopni spektroskopicky charakterizovat komplex mezi CuO^+ a fenantrolinem, který dokazuje, že dochází k aktivaci aromatické C-H vazby. Celou studii jsme poté doplnili teoretickými výpočty.

* Korespondence: lucie.duchackova@centrum.cz

LITERATURA:

1. Schröder D. et al.: J. Phys. Chem. B 108, 14407 (2004).

WeO-004: Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty, SIFT-MS

Kristýna Sovová^{1*}, Violetta Shestivska¹, Kseniya Dryahina¹, Patrik Španěl¹

1. Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i.

Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty, SIFT-MS je poměrně nová analytická technika. Umožňuje absolutní stanovení stopových koncentrací plynů a těkavých organických látek ve vzduchu. Je možné ji zařadit do metod tzv. „ambient mass spectrometry“ ne však pro analýzu povrchů, ale pro analýzu plynů.

SIFT-MS kombinuje techniku rychlé proudové trubice, chemické ionizace a hmotnostního spektrometru. Využívá reakcí tří prekurzorů, H_3O^+ , NO^+ a O_2^{+} iontů, které s molekulami vzorku reagují během přesně definovaného času, což je důležité vzhledem ke kvantifikaci. Koncentrace stopových molekul plynu lze kvantifikovat v reálném čase z poměru intenzit a známých rychlostních konstant a fyzikálních parametrů. Limit detekce je typicky 1 ppb pro 1 s analýzu.

Primárně byla tato technika vyvinuta pro analýzu stopových plynů v lidském dechu. Na tomto principu vznikly studie týkající se fyziologie zdravé populace a onemocnění např. cystickou fibrózou nebo idiopatické střevní choroby. Mezi další aplikace patří oblast potravinářství, detekce zplodin z výbušnin nebo environmentální výzkum.

* Korespondence: sovoval@natur.cuni.cz

LITERATURA:

1. Smith D. and Španěl P.: Mass Spectrom. Rev. 30, 236-267 (2011).
2. Sovová K. et al.: Analyst 135, 1106-1114 (2010).
3. Sovová K., Dryahina K. and Španěl P.: Int. J. Mass Spectrom. 300, 31–38 (2011).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce vznikla na základě finanční podpory grantové agentury akademie věd (AVČR), (projekt číslo 202/09/0800 and 203/09/0256) and grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 32010).

ThO-005: Miniaturizace v bioanalýzeFrantišek Foret ¹ **1. Ústav analytické chemie AVČR, v.v.i.*

Miniaturizace analytické instrumentace je často zmiňována jako jedna z podmínek pro zvýšení rychlosti, snížení spotřeby chemikálií a tím i ceny chemických analýz. Zvláště v případě separačních metod je tento předpoklad většinou pravdivý a zmenšování rozměrů separačních kolon skutečně vede k rychlejším a levnějším analýzám. V případě, že se rozměry kanálků, kterými protékají analyzované kapaliny, zmenší na mikroskopickou úroveň, začínají se uplatňovat jevy, které jsou v makroměřítku nepodstatné, ale v mikroměřítku mohou být dominantní. Tyto jevy mohou působit experimentální problémy (např. adsorpce analyzovaných látek), ale mohou být i prakticky užitečné. Mikrofluidická zařízení, která jsou dnes nejčastěji vyráběna technologiemi běžnými v mikroelektronice, umožňují manipulaci a detekci nanolitrových až femtolitrových množství vzorků (např. jednotlivé buňky) a mohou integrovat řadu jednotkových operací na čipu o ploše několika čtverečních centimetrů. V tomto přehledu se zaměřím na technologii přípravy a ukázky praktických aplikací mikrofluidických prvků pro bioanalýzu a jejich spojení s hmotnostní spektrometrií s důrazem na výzkum prováděný v Brně.

* Korespondence: foret@iach.cz

ThO-006: Využití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF pro identifikaci bakterií a kvasinek v klinické mikrobiologii

Jana Janečková^{1*}

1. Litomyšlská nemocnice, a.s.

Aplikace principu hmotnostní spektrometrie do oboru klinické mikrobiologie je pro diagnostiku infekčních onemocnění mimořádným přínosem. Preciznost identifikace bakterií a kvasinek umožňuje nyní změnu ve všech procesech, které na identifikace navazují. Společně s analýzou antibiogramů a detekcí bakteriálních betalaktamáz a jiných enzymů lze nyní zkvalitnit antibiotickou terapii. Prezentace poukazuje na změny, které laboratoř klinické mikrobiologie spolu s ATB střediskem v souvislosti s používáním MALDI TOF zaznamenala.

* Korespondence: jana.janeckova@litnem.cz

ThO-007: H/D exchange in real life: how to move from textbook examples to truly tough guys

Petr Man ^{1,2*}, Martial Rey ^{3,4}, Eric Forest ⁵, Daniel Kavan ¹, Petr Halada ¹, Lenka Řežábková ², Daniel Rozbeský ², Martin Strohmalm ¹, Vincent Forge ³, Petr Novák ^{1,2}

1. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

2. Přírodovědecká fakulta UK

3. CEA, Grenoble

4. University of Calgary

5. IBS, Grenoble

Hydrogen/Deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HXMS) is already well established technique. It is used to study protein conformation, flexibility or interactions with various ligands. HXMS is often presented as a "rescue" approach in cases where traditional structural high-resolution techniques (NMR, X-ray crystallography) meet their limits. However, majority of the published HXMS papers deals with rather small, soluble and unmodified proteins. On the other hand, glycosylated proteins, proteins with disulfide bonds, membrane or amphitropic proteins are targeted at much lower frequency. In this paper we will discuss the problems arising from analysis of such "real" proteins and strategies how to deal with them.

* Korespondence: pman@biomed.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Financial support: 207/10/1034, 207/10/1040, AV0Z50200510, LC7017, LC545

ThO-008: The Yb(III) stabilization of artificial membranes from lecithin probed by ESI-MS

Jana Jaklová Dyrtrtová¹*, Detlef Schröder¹

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Artificial membranes are used in laboratory studies and simulations under controlled conditions of many processes apply biological membranes. The simplest membranes are made from lecithin (L) as an adsorbed monolayer on the interface of two immiscible phases stabilized with multi-charged cations [1]. Several electrochemical studies [1,2] utilize these membranes to simulate the transport of charged particles across membranes. The stabilization effect of ytterbium on artificial lecithin membranes was observed in acidic media [2]. However, the exact structures of the L-Yb clusters were not satisfactorily determined using electrochemical methods. ESI-MS appears as a complementary technique to study these particular clusters.

The experiments were performed in neutral and acidic ($\text{HCl } 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) media in both (positive and negative) modes. In positive mode under neutral as well as acidic conditions, highly coordinated L-Yb complexes and lecithin adducts with H^+ were found. In negative mode, the neutral solution led to the lecithin adduct with Cl^- , whereas in acidic media in addition to abundant L- Cl^- adducts, clusters of the type $[\text{YbCl}_4(\text{L})_{1,2}]^-$ were observed, which were also proposed in electrochemical studies.

* Korespondence: dytrtova@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Janchenová H. et al.: J. Electroanal. Chem. 604, 109 (2007).
2. Jaklová Dyrtrtová J. et al.: Czech Coll. Chem. Comm. (přijato 2011).

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by the European Research Council (AdG HORIZOMS).

ThO-009: Využití reakcí acetonitrilu v APCI zdroji pro určování poloh dvojných vazeb v lipidech

Josef Cvačka^{1*}, Vladimír Vrkoslav¹

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Přítomnost dvojných vazeb, jejich počet, poloha a geometrie výrazně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti a biologickou aktivitu lipidů. Určování poloh dvojných vazeb v alifatických řetězcích nenasyčených sloučenin je klasickým problémem, který lze řešit pomocí MS. Hmotnostní spektra většinou neposkytují přímou informaci o polohách dvojných vazeb a proto je nutné analyty vhodně derivatizovat. Nespornou výhodou mají reakce, které lze provádět přímo ve spektrometru. Zajímavé možnosti v tomto směru nabízí chemie acetonitrilu. Pro GC/CI-MS analýzu lipidických látek byla popsána metoda využívající ionty $C_3H_4N^+$ [1]. Zřejmou limitací této metody je její omezení na GC a tedy i na dostatečně těkavé analyty. V případě netěkavých lipidů je nutné provést hydrolyzu, čímž se ztrácí důležitá část informace o jejich struktuře. Řešením je nalezení reakcí, které by probíhaly v APCI a byly tak vhodné pro HPLC/MS. Proto byly studovány reakce mezi nenasyčenými lipidy a reaktivními částicemi acetonitrilu v APCI zdroji. [2,3] Nenasyčené voskové estery, stejně tak jako methylestery mastných kyselin a triacylglyceroly poskytovaly adukty $[M+C_3H_5N]^+$. Jejich CID fragmentace vedla ke dvěma hlavním produktům, které odpovídaly fragmentacím C-C vazby sousedící s původní dvojnou vazbou. V případě polynenasycených látek docházelo ke štěpení před první a za poslední dvojnou vazbou, v menší míře i mezi dvojnými vazbami. Mechanismus tvorby $[M+C_3H_5N]^+$ je nejasný. Předpokládáme vznik kovalentní vazby reakcí hypotetické částice s dvojnou vazbou lipidu. Tvorba stopových množství $C_3H_5N^+$ (m/z 55) byla potvrzena, dominantní signál však poskytoval ion $C_3H_6N^+$ (m/z 56). Pro praktické aplikace byly optimalizovány metody HPLC/MS², které byly využity pro charakterizaci směsí lipidů v přírodních materiálech.

* Korespondence: cvacka@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Moneti G. et al.: J. Mass Spectrom. 32, 1371-1373 (1997).
2. Vrkoslav V. et al.: Anal. Chem. 83, 2978-2986 (2011).
3. Vrkoslav V. et al.: Proc. 59th ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Top., Denver, USA (2011).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce byla finančně podpořena grantem GAČR 203/09/0139 a výzkumným záměrem Z40550506.

ThO-010: Elemental speciation by ESI-and APCI-MS

Eva Fernandez-Diez ¹, Robert Jirasko ², Veselin Kmetov ³, George A. Zachariadis ⁴,
Erwin Rosenberg ^{1*}

1. Vienna University of Technology, Institute of Chemical Technologies and Analytics, A-1060 Vienna

2. University of Pardubice, Department of Analytical Chemistry, CZ-532 10 Pardubice

3. University of Plovdiv "Paisii Hilendarski", BG-4000 Plovdiv

4. Aristotle University, Laboratory of Analytical Chemistry, GR-54124 Thessaloniki

Elemental speciation bridges the gap between organic and inorganic analysis, and deals with the qualitative and quantitative determination of metal-organic compounds and complexes [1]. While the initial motivation to measure trace element species came from their toxicological relevance and environmental impact, speciation analysis has more recently focused on the study of physiologically relevant elemental species and the interaction of organometallic compounds with biomolecules.

The techniques commonly applied for this task are hyphenated techniques with optical and mass spectrometric detection. Due to the polar or ionic nature of many elemental species, liquid chromatographic separation or sample introduction and ESI- or APCI-MS detection has become the workhorse technique in this field [2].

The versatility and the particular opportunities that are offered for speciation by LC-MS with various interfaces and (high and low resolution) instruments will be illustrated by a number of examples from different fields. They will cover both analytes of environmental relevance (e.g. organotin compounds), as well as physiologically relevant analytes such as organogermanium [3] and organoselenium compounds, and therapeutic agents among which gadolinium compounds have recently attracted much attention. For all these applications soft ionisation-mass spectrometric techniques reveal their great potential for speciation analysis in that they provide structural information of stable molecular or ionic and even of more labile (complex) species – two features that neither elemental MS (ICP-MS) as powerful detection technique, nor gas chromatography as the most versatile separation technique can offer.

* Korespondence: erosen@mail.zserv.tuwien.ac.at

LITERATURA:

1. Templeton D.M. et al.: Appl. Chem. 72, 1453–1470 (2000).
2. Rosenberg E. J.: Chromatogr. A. 1000, 841-889 (2003).
3. Jirásko R. et al.: Intern. J. Mass Spectrom. 280, 198-203 (2009).

ThO-011: Development and applications of desorption nanoelectrospray

Lucie Hartmanová^{1*}, Václav Ranc¹, Martin Švidrnoch¹, Barbora Papoušková¹,
Petr Bednář¹, Vladimír Havlíček¹, Karel Lemr¹

1. Dept. Anal. Chem., Faculty of Science, Palacky University, Czech Republic

Desorption electrospray (DESI) is well known ambient ionization technique described in 2004 [1]. Desorption nanoelectrospray (nanoDESI) is a newer modification of DESI [2]. They represent a rapidly developing powerful tool for direct analysis of samples from surfaces. Both techniques work without or with minimal sample preparation. NanoDESI uses a narrower spray capillary (1-2 μm) without assistance of a nebulizing gas which is considered to be essential in the case of DESI.

The experiments were performed using an LCQ ion trap and an LCQ DUO ion trap (Thermo Finnigan, San Jose, USA) equipped with a home-made desorption nanoelectrospray ion source. Three set-ups have been developed during five years.

The applicability of nanoDESI has been proved by identification of drugs in dried drops of urine or plasma, by profiling of anthocyanins in wine [3] or by discrimination of enantiomers of drugs in pharmaceutical formulation or blood (using Cooks' kinetic method) [2]. Nevertheless, similar to DESI there are still many unanswered questions concerning the ionization process.

* Korespondence: lucie.hartmanova@seznam.cz

LITERATURA:

1. Takáts Z. et al.: Science 306, 471 (2004).
2. Ranc V. et al.: Chem. Listy 101, 524 (2007).
3. Hartmanova L. et al.: J. Chromatogr. A 1217, 4223 (2010).

PODĚKOVÁNÍ:

Financial support: the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM6198959216 and ME10013) and Palacky University (PRF_2011_025).

ThO-012: Altered spatial distribution of Gb3Cer in Fabry disease mouse studied by mass spectrometry imaging

Martin Strohalm^{1*}, Michael Volný¹, Helena Faltýsková¹, Helena Hůlková², Ladislav Kuchař², Petr Novák¹, Vladimír Havlíček¹

1. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

2. Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN

Fabry disease is a rare X-linked inherited lysosomal storage disease caused by the lack of or faulty enzyme α -galactosidase A. Mutation in the gene GLA, encoding this enzyme, results in insufficient breakdown of glycolipids known as globotriaosylceramides (Gb3Cer), which start to accumulate within blood vessels, kidneys, eyes, nervous or cardiovascular system. Symptoms are typically first experienced in early childhood, covering full body or localized pain, various kidney or cardiac complications, dermatological problems or cloudiness of the cornea.

In the presented work the accumulation of Gb3Cer in a mouse kidney was studied by mass spectrometry imaging (MSI) technique using a GLA gene knock-out (Fabry disease model) and a wild-type mouse. Accurate masses and spatial distribution of the Gb3Cer were acquired on a MALDI FTICR mass spectrometer equipped with a 200Hz UV SmartBeam laser. An average mass spectrum was reconstructed for the whole area of tissue slice and further analyzed using open source software mMass. Individual isoforms of Gb3Cer were successfully identified within LIPID MAPS database by accurate masses, and corresponding images showing their spatial distribution were generated.

In general, results originated from MSI experiment were in good correlation with classical histological staining. Although the spatial resolution of MSI was significantly lower compared to the histological images, it enabled visualization of the individual isoforms of Gb3Cer and revealed additional information about Gb3Cer distribution in kidney. Direct comparison of the images from knock-out and wild-type mouse clearly shows significantly altered distribution of Gb3Cer in the diseased mouse.

* Korespondence: strohalm@biomed.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

We gratefully acknowledge support of this work by a research project of the Ministry of Education, Youth and Sports (MSM 0021620806, LC 07017).

ThO-013: Mass spectrometry based metabolomic fingerprinting/ profiling in food classification

Jana Hajšlová ¹*, Tomáš Čajka ¹, Lukáš Václavík ¹, Kateřina Riddelová ¹

1. Institute of Chemical Technology, Department of Food Chemistry and Analysis, Prague, CZ

At the time of its emergence, metabolomics was mainly viewed as an advanced, specialised tool of analytical biochemistry enabling innovative research on plants and other organisms. Recently, this “omics” strategy centered around detection of the broadest possible range of small molecules (<1,500 Da) in complex biological matrices using a single or small number of analyses has also emerged as a field of interest in food. Metabolomics may be used either for “fingerprinting” of samples to perform comparative analyses aimed at detection of differences or for “profiling” in which individual, differential sample components (including secondary components originating during food processing) are identified for further analyses. In addition to food quality assessment or safety control, authentication is also a challenging application area. A lot of scientific effort has been spent to develop rapid, reliable, and cost effective analytical approaches applicable for the authentication of various food commodities. Besides of spectroscopic techniques employing nuclear magnetic resonance (NMR), Raman, or infrared spectra, a wide range of methods employing gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), and/or high-performance liquid chromatography (HPLC) hyphenated to MS with atmospheric pressure ionisation (API) have been implemented for this purpose. Some procedures, such as matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry (MALDI), direct head-space mass spectrometry (HS-MS), and/or direct infusion MS allow reduction of analysis time thanks to elimination of chromatographic separation step. Over the few recent years, a large number of novel ambient desorption ionisation techniques, have become available providing further improvements. Their main advantages compared to conventional ones, involve (i) easy method development and optimisation, (ii) significantly reduced workload and, consequently increased laboratory throughput. The most challenging techniques in this field are DART–Direct Analysis in Real Time ionisation and ASAP–Atmospheric Solids Analysis Probe. In this presentation, giving wines as an illustrative example, the potential of ambient mass spectrometry (DART–MS, ASAP–MS) to distinguish wines according to their variety will be demonstrated. This approach will be compared with “gold standards” for metabolomic fingerprinting/profiling representing by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry (SPME–GC–MS) and ultra-high performance liquid chromatography–mass spectrometry (UHPLC–MS).

* Korespondence: jana.hajslova@vscht.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Acknowledgement: The financial support by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6046137305) is gratefully acknowledged.

ThO-014: Analysis of anthocyanin dyes by mass spectrometry and hyphenated techniques

Petr Bednář^{1*}, Karel Lemr¹, Barbora Papoušková¹, Renáta Myjavcová¹, Petr Barták², Petr Marhol³, Vladimír Křen³, Jitka Ulrichová⁴, Jan Stávek⁵, Josef Balík⁵

1. RCPTM, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

2. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

3. Laboratory of Biotransformation, Institute of Microbiology, Prague

4. Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký Univ. Olomouc

5. Dept. of Post-Harv. Technol. of Horticultural Products, Faculty of Horticulture Lednice, MZLU Brno

Anthocyanins represent a large group of secondary metabolites playing an important role during plant life. Due to high content in fruits they are daily constituents of food. Methods allowing their reliable control are thus necessary for food industry, medicine and many other fields. This communication is devoted to analysis of anthocyanins using MS, LC/MS and CE/MS. Combination of sample extraction, purification of extract using SPE and analysis by LC/MS represents a “gold standard method“ in anthocyanin control. However, results confirm necessity of careful optimization of extraction and purification step. Besides optimization of extraction yield, attention should be paid to occurrence of unwanted side reactions. During the contact of anthocyanins with acetone 5-methylpyranoanthocyanins are formed, for instance [1]. Combination of tandem mass spectra, exact mass measurement and retention data is crucial for unambiguous identification. For instance, (3,4-dihydroxyphenyl)-pyranomalvidin-3-glucoside was identified during our study of rosé wine ageing. However, some derivatives of petunidine and peonidine with identical or very close m/z value and fragmentation pathway had to be considered. A correct structural identification can hardly be done when retention data and exact mass measurement capability are not available. Besides, CE/MS, MALDI and nanoDESI [2] methods were used for fast control of anthocyanins during red wine preparation and ageing. All methods allow a high throughput screening and results agree with those obtained by LC/MS. Nevertheless, a lower selectivity of desorption techniques and sensitivity of CE/MS makes LC/MS yet unsubstitutable for detailed analysis. Capability of the above mentioned methods will be demonstrated on anthocyanin profiling for wine cultivar classification purposes [3].

* Korespondence: bednar.petr@seznam.cz

LITERATURA:

1. Myjavcová R. et al.: J. Chromatogr. A 1217, 7932 (2010).
2. Hartmanová L. et al.: J. Chromatogr. A 1217, 4223 (2010).
3. Papoušková B. et al.: J. Chromatogr. A (v tisku 2011).

PODĚKOVÁNÍ:

Projects: GAČR P206/10/0625; MPO FT-TA3/024; Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0017 MŠMT).

ThO-015: HPLC/MS a GC/FID charakterizace triacylglycerolového složení rostlinných olejů a živočišných tuků

Miroslav Lísa^{1*}, Hana Dvořáková¹, Kateřina Netušilová¹, Lukáš Franěk¹,
Michal Holčápek¹

1. Univerzita Pardubice

Rostlinné oleje a živočišné tuky jsou významnou komoditou využívanou v různých odvětvích průmyslu. Jsou tvořeny převážně triacylglyceroly (TG) s celkovým obsahem až 90%, které mají řadu důležitých funkcí v lidském organismu (zdroj energie, esenciálních mastných kyselin (FA), lipofilních vitaminů, atd.). Oleje a tuky obsahují desítky až stovky TG, které se navzájem liší délkou a polohou (regioizomery) acylových řetězců navázaných na glycerolovém skeletu a počtem, polohou a cis-/trans- konfigurací dvojných vazeb (DB). Rychlá charakterizace vzorků byla provedena na základě profilu FA pomocí GC/FID po reesterifikaci TG pomocí methanolátu sodného na methylestery FA. Intaktní molekuly TG byly analyzovány pomocí HPLC/MS s využitím různých chromatografických systémů, které byly postupně optimalizovány za účelem dosažení maximálního počtu separovaných a identifikovaných TG. Analýza pomocí nevodných systémů v obrácených fázích umožňuje separaci TG na základě délek alifatických řetězců, poloh a počtu DB, ale také cis-/trans-izomerie. Argentační chromatografie (Ag-HPLC) naopak umožňuje separaci TG na základě počtu, poloh a cis-/trans- izomerie DB. Pomocí zoptimalizované Ag-HPLC byly dále separovány regioizomery TG obsahujících DB. Analýza pomocí chirálních kolon v systému s normálními fázemi poskytuje separaci regioizomerů a optických izomerů TG. Jednotlivé TG byly identifikovány pomocí APCI-MS. Na základě rozdílů v intenzitách charakteristických fragmentových iontů vzniklých ztrátou FA z glycerolového skeletu byly určeny polohy navázaných FA, jejichž znalost je důležitá z hlediska nutričních vlastností. Byla vyvinuta kvantitativní analýza složitých směsí TG pomocí odezvodových faktorů získaných z kalibračních závislostí jednoduchých TG. Získané výsledky byly zpracovány pomocí statistického programu a dále použity pro odhalování falšování drahých rostlinných olejů.

* Korespondence: miroslav.lisa@upce.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce byla podporována grantovým projektem MSM0021627502 sponzorovaným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a projektem 203/09/P249 sponzorovaným Grantovou agenturou České republiky.

ThO-016: Vliv bleedingu kolony na správnost stanovení stopových hladin polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů/furanů technikou vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie

Tomáš Tomšej ¹*, Milan Lojkásek ², Václav Dombek ¹

1. VŠB-TU Ostrava, Institut čistých technologií, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava-Poruba
2. Zdravotní ústav Ostrava, NRL pro analýzu POP, Partyzánské náměstí 7, 702 00 Ostrava

Stanovení polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů/furanů (PCDD/F) technikou kapilární plynové chromatografie/vysokorozlišující sektorové hmotové spektrometrie (HRGC/HRMS) je založeno na snímání dvou charakteristických iontů pro každý cílový analyt. Poměr intenzit těchto dvou iontů musí být v intervalu (teoretický poměr $\pm 15-20\%$), dle použité metody [1,2]. Sloučeniny, jejichž poměr intenzit je mimo tento interval, nemohou být považovány za cílové analyty.

Poměr intenzit iontů, snímaných technikou HRMS, může být negativně ovlivněn řadou faktorů: nevhodnými pracovními parametry přístroje (např. interferencí izobarických sloučenin v důsledku nízkého rozlišení, diskriminací vyšších hmot způsobenou kontaminací iontového zdroje), matricovými efekty (tj. nedostatečným dočištěním obtížných maticí) a v poslední době i bleedingem kapilárních kolon, který je důsledkem snížení kvality některých dříve špičkových značek. Všechny zmíněné faktory negativně ovlivňují kvantifikaci.

Byl sledován vliv bleedingu kolony na správnost stanovení stopových hladin PCDD/F. Výsledkem intenzivního bleedingu arylen-siloxanové kolony DB-5ms byly náhodné fluktuace poměrů intenzit snímaných iontů, zcela znemožňující správnou kvantifikaci cílových analytů. Tento efekt byl pozorován v reálných vzorcích i na kalibračních standardech. Vliv bleedingu byl koncentračně závislý a negativně ovlivňoval poměry intenzit a následně správnost kvantifikace na hladinách 26-655 fg cílového analytu v nástřiku, zatímco na vyšších koncentračních hladinách poměry intenzit ani správnost kvantifikace ovlivněny nebyly. Jelikož bleeding kolony nemůže být na vysokorozlišujícím sektorovém hmotnostním spektrometru odhalen přímo, lze k jeho nepřímé detekci doporučit analýzu velmi zředěných kalibračních standardů.

* Korespondence: tomas.tomsej@vsb.cz

LITERATURA:

1. EPA Method 1613, Revision A, U.S. Environmental Protection Agency (1994).
2. EN 1948, Evropský výbor pro normalizaci (2006).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato studie byla realizována v rámci projektu ICT CZ.1.05/2.1.00/03.0082, financovaného Evropskou unií a z prostředků státního rozpočtu prostřednictvím Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

FrO-017: Problematika matricových efektů v kvantitativní LC-MS analýze

Lucie Nováková^{1*}

1. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové

Hlavní komplikací kvantitativní LC-MS analýzy látek ve složitých matricích je výskyt matricových efektů, zejména pokud je využívána ionizace ESI. Matrice, která je během kroku úpravy vzorku extrahována s analyty, může dále ovlivnit odpověď hmotnostního spektrometru ve smyslu potlačení nebo zesílení signálu. To v důsledku vede k nízké analytické přesnosti, správnosti a linearitě metody. Přítomnost matricových efektů závisí na chemických vlastnostech analytu, typu ionizační techniky, na typu hmotnostního spektrometru, na způsobu úpravy vzorku a na typu matrice. K jejich určení lze využít v podstatě tři přístupů: metody post-kolonové infúze analytu, metody post-extrakčního přidavku či porovnání směrníc kalibračních křivek. Eliminace či redukce matricových efektů může spočívat jak ve zvýšení efektivity kroku separace, zvýšení selektivity hmotnostně spektrometrické detekce či izolace analytu během kroku úpravy vzorku, dále ve vhodné zvoleném přístupu kalibrace nebo ve využití specifických přístupů (např. technika echo-píku) [1][2].

Využití metody vnitřního standardu s izotopicky značenými analogy pro každý analyt při kvantifikaci je považováno za nejvhodnější přístup pro kompenzaci jak matricových efektů, tak variability chromatografické či hmotnostně spektrometrické metody. Bylo však popsáno několik případů, kdy malý posun retenčního času deuteriem značeného vnitřního standardu způsobil změnu poměru ploch píků vnitřního standardu a analytu díky odlišným matricovým efektům např. mezi různými šaržemi blankové plazmy. Ze studií vyplývá, že vhodnějšími izotopicky značenými vnitřními standardy jsou ¹³C-, ¹⁵N- nebo ¹⁷O- značené analogy ve srovnání s ²H značenými [1]. I při použití izotopicky značených vnitřních standardů je tedy nutné kvantifikovat matricové efekty pro různé šarže biologických materiálů a vyhodnotit jejich vliv na přesnost a správnost metody. Jejich hodnocení by se mělo stát součástí validace metody, jak je doporučováno nově vydanou směrnicí EMEA [3].

* Korespondence: nol@email.cz

LITERATURA:

1. Truffelli H. et al.: Mass Spectrom. Rev. 30, 491-509 (2011).
2. Gosetti F. et al.: J. Chromatogr. A 1217, 3929-3937 (2010).
3. Comitee for medicinal products for human use, Guideline on validation of bioanalytical methods, EMEA, London, UK (2010).

PODĚKOVÁNÍ:

Poděkování patří podpoře grantového projektu GA AV KJB 601100901.

FrO-018: Nové techniky zavádění vzorku do indukčně vázaného plazmatu s využitím laserů

Jan Preisler^{1,2,*}, Pavla Foltynová^{1,2}, Ondřej Peš^{1,2}, Tomáš Vaculovič^{1,2}, Viktor Kanický^{1,2}

1. Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita

2. CEITEC, Masarykova univerzita

V příspěvku budou prezentovány dvě původní techniky stopové elementární analýzy vzorků o submikrolitrových objemech, laserová desorpce za účasti substrátu (substrate-assisted laser desorption, SALD) a termální odpařování laserovou diodou (laser diode thermal vaporization, LDTV) kombinované s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu (ICP MS).

Vzorky pro SALD ICP MS jsou naneseny na destičku z absorbujiícího substrátu, např. polyetylenetereftalát glykolu, vysušeny, odpařeny pulzním UV laserem v komerční ablační cele a analyzovány kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem ICP. Meze detekce Cr, Cu, Co, Fe, Ni, Sn a Zn jsou v rozmezí ~10 – 100 fg. Příklady aplikací zahrnují stanovení mědi v rakovinových buňkách U937 ošetřených disulfiramem a ve váčcích termita. Nízké meze detekce dovolují off-line spřažení SALD ICP MS s mikrokolonovými separačními technikami a jejich využití pro speciální analýzu. Off-line spojení kapilární elektroforézy a SALD ICP MS je demonstrováno na speciaci Cr(III) a Cr(VI).

V případě LDTV je vzorek desorbován ze substrátu, např. papíru obsahujícího vhodný absorbant, pomocí kontinuálního diodového laseru. Vlivem laserového paprsku dochází k pyrolýze a/nebo hoření substrátu a tvorbě aerosolu. Technika nevyžaduje nákladný pulzní UV laser a je slibnou alternativou běžným zmlžovačů. Meze detekce jsou v rozmezí pg, reprodukovatelnost je pod 10%. Technika byla využita pro stanovení olova v krvi a cínu v konzervovaných potravinách.

SALD a LDTV ICP MS jsou vhodné pro kvantitativní prvkovou analýzu vzorků o malém objemu (typicky 100 – 500 nl) a představují alternativu nebulizérům. Potenciální výhody jsou také snadné archivování a přeprava vzorků, možnost přípravy multiprvkových kalibračních setů a krátký čas analýzy díky minimálním paměťovým jevům. Biologické vzorky jako metaloproteiny a komplexy kovů je navíc možné analyzovat ve více detekčních modech: SALD ICP MS, MALDI MS nebo fluorescence a získat tak komplexní informaci o daném vzorku.

* Korespondence: preisler@chemi.muni.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Děkujeme za finanční podporu GAČR 203/09/1025, CEITEC - CZ.1.05/1.1.00/02.0068 a MŠMT ČR MSM0021622411, MSM0021622412 a MSM0021622415.

FrO-019: Targeted metabolomics for diagnosing inherited metabolic diseases

Hana Janečková ^{1*}, Petr Wojtowicz ¹, Karel Hron ², Eva Hlídková ¹, David Friedecký ¹,
Tomáš Adam ¹

1. LDMP, UP a FN Olomouc

2. PřF UP Olomouc

Background: Metabolomics has become an important tool in clinical research and diagnosis of human diseases. In this work we focused on the diagnosis of inherited metabolic disorders (IMDs) in plasma samples using a targeted metabolomic approach.

Methods: The plasma samples were analyzed with the flow injection analysis method coupled with tandem mass spectrometry (QTRAP 5500, AB SCIEX, USA) and using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (LECO Pegasus 4D). Data were merged and analyzed by principal component analysis (PCA).

Results: We analyzed 50 control samples and 34 samples with defects in amino acid metabolism (phenylketonuria, maple syrup urine disease, tyrosinemia I, argininemia, homocystinuria, carbamoyl phosphate synthetase deficiency, ornithine transcarbamylase deficiency, nonketotic hyperglycinemia), organic acidurias (methylmalonic aciduria, propionic aciduria, glutaric aciduria I, 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, isovaleric aciduria), and mitochondrial defects (medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency, carnitine palmitoyltransferase II deficiency). The controls were distinguished from the patient samples by PCA and hierarchical clustering. Approximately 80 % of patients were clearly detected by absolute metabolite concentrations, the sum of variance for first two principle components was in the range of 44–55%. Other patient samples were assigned due to the characteristic ratio of metabolites (the sum of variance for first two principle components 77 and 83%).

Conclusion: This study has revealed that targeted metabolomic tools with automated and unsupervised processing can be applied for the diagnosis of various IMDs.

* Korespondence: janeckovah@gmail.com

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by grants MSM6198959205, MSM6198959214, and LF UP 2011-011. The infrastructural part of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational programme Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

FrO-020: Tandemová hmotnostní spektrometrie sfingolipidů s aplikací v diagnostice sfingolipidos: nové biomarkery v moči

Ladislav Kuchař^{1*}

1. Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN

Sfingolipidy jsou důležité biologicky aktivní molekuly, které jsou hojně přítomny v buňkách a tkáních. Jejich odbourávání probíhá v kyselém prostředí lysosomu za účasti příslušných hydrolas. Sfingolipidosy patří ke skupině lysosomálních stádavých onemocnění, které jsou charakterizovány intralysosomální akumulací neodbouraných sfingolipidů. Tento proces je způsoben mutacemi v genech příslušných hydrolas nebo příslušných proteinových aktivátorů. Proteinové aktivátory, saposiny (Sap) A, B, C a D jsou tvořeny ze společného prekursoru prosaposinu a jsou nezbytné při odbourávání sfingolipidů s oligosacharidem do počtu 4 cukerných jednotek. Defekty aktivátorů mají obdobný fenotyp jaký je patrný u poruch enzymových proteinů odpovídajících hydroláz. Studovali jsme biochemický obraz některých sfingolipidóz především Fabryho choroby (X-vázaný deficit α -galaktosidasy A, stádání Gb3Cer), metachromatické leukodystrofie (deficit arylsulfatasy A, stádání sulfatidu), deficitu Sap-B (stádání Gb3Cer a sulfatidu) a deficitu prosaposinu (komplexní sfingolipidos, stádání hydrofobních glykosfingolipidů s kratším cukerným řetězcem a ceramidu).

Sfingolipidózy jsou charakterizovány zvýšenou koncentrací sfingolipidů v buňkách a tkáních. U onemocnění postihujících ledviny dochází ke zvýšené exkreci těchto lipidů moči. Vyvinuli jsme metodu analýzy sfingolipidů využívající přímý nástřik vzorku do mobilní fáze s následnou analýzou tandemovým hmotnostním spektrometrem (AB/MDS SCIEX API 3200) pracujícím v režimu monitorování více reakcí. Hlavní důraz byl kladen na analýzu sfingolipidů v moči a to zejména u deficitů Sap-B a prosaposinu [1].

Při analýze spekter sfingolipidů v moči jsme objevili charakteristický posun k molekulárním typům s delší mastnou kyselinou v ceramidové části lipidu u sfingolipidos se stádáním Gb3Cer a sulfatidu. Tento poznatek byl následně využit při návrhu nového screeningového postupu, který využívá analýzy sulfatidů v moči ve formě suché kapky na DEAE membráně.

* Korespondence: lada.kuchar@seznam.cz

LITERATURA:

1. Kuchar L. et al.: Am. J. Med. Genet. A 149A(4), 613-621 (2009).

PODĚKOVÁNÍ:

Chtěl bych poděkovat zejména za finanční podporu z grantu GAUK 19509, Grantu 260501 z Univerzity Karlovy v Praze a výzkumného záměru VZ MSM 0021620806.

ThP-001: Použití hmotnostní spektrometri a infračervené multifotonové disociační spektroskopie při studiu chemických reakcí

Jana Roithová^{1*}

1. Přírodovědecká fakulta, Universita Karlova v Praze

Při navrhování mechanismů chemických reakcí často postulujeme existenci intermediátů, které lze ale jenom obtížně experimentálně dokázat. Pokud se jedná o reaktivní částice, jejich doba života je krátká a koncentrace v roztoku zanedbatelná. Pomocí ionizace elektrosprejem je možné nabitě reaktivní částice přenést do plynné fáze a studovat pomocí metod hmotnostní spektrometrie [1]. Toto spojení má dvě velké výhody. Za prvé jsou reaktivní částice v plynné fázi izolované, tzn., nedochází k interakci s jinými reakčními partnery, což vede k prodloužení doby jejich života. Za druhé je hmotnostní spektrometrie velmi citlivá metoda a umožňuje sofistikované experimenty i s ionty, které generujeme ve velmi malém množství vedle dominantních iontů. V poslední době se rozvíjí použití akční spektroskopie v hmotnostní spektrometrii, která nám umožňuje získat vibrační nebo elektronická spektra izolovaných iontů [2]. Akční spektroskopie tedy představuje další nástroj pro detailní strukturní analýzu iontů. Poster představí metodu výzkumu iontových reakčních intermediátů a několik nejnovějších výsledků z naší laboratoře [3].

* Korespondence: roithova@natur.cuni.cz

LITERATURA:

1. Chen P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 2832 (2003).
2. MacAleese L., Maitre P.: *Mass Spectrom. Rev.*, 26, 583 (2007).
3. Roithová J.: *Chem. Soc. Rev.* DOI: 10.1039/C1CS15133A.

ThP-002: Studium termodynamických aspektů retenčního chování blokových kopolymerů v HPLC s využitím spojení HPLC/MS

Lenka Česlová^{1*}, Pavel Jandera¹, Petr Česla¹

1. Univerzita Pardubice, FCHT, KALCH

Vysokoučinnou kapalinovou chromatografií v systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC) bylo studováno retenční chování blokových kopolymerů oxyethylenu (EO) a oxypropylenu (PO) s využitím termodynamických parametrů retence - entalpie a entropie. Retence EO/PO blokových kopolymerů závisí především na distribuci jednotlivých opakujících se monomerních jednotek, přičemž sekvence jednotlivých bloků nehraje významnou roli. V RP-HPLC je retence výrazně ovlivněna změnou entropie (změna konformace), vliv opakujících se PO jednotek na separaci byl vyšší než vliv EO jednotek.

Dvojí mód distribuce molekulových hmotností podle počtu EO a PO jednotek komplikoval separaci a možnost přiřazení chromatografických píků k jednotlivým oligomerům komplexních kopolymerů. Spojením HPLC s hmotnostní spektrometrií s chemickou ionizací za atmosférického tlaku v režimu snímání kladných iontů mohou být oligomery odpovídající jednotlivým chromatografickým píkům jednoznačně identifikovány i když je jejich chromatografické rozlišení nedostatečné. Po předchozí chromatografické separaci podle jednoho distribučního módu byly rekonstruovány chromatogramy pro jednotlivé oligomery s odlišnou distribucí druhého typu oligomerních jednotek. Z jednoho chromatografického experimentu tak byly vyhodnoceny retenční časy pro oba distribuční módy.

* Korespondence: lenka.ceslova@upce.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky, projekt č. 203/07/0641.

ThP-003: Anion chemistry: a possible route to large hydrocarbons

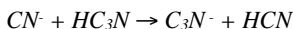
Jan Zabka^{1*}, Miroslav Polasek¹, Claire Romanzin², Christian Alcaraz²

1. J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry of the ASCR, v. v. i.

2. Laboratoire de Chimie Physique, Centre Universitaire Paris Sud – Bât. 350, 91405 Orsay cedex, France

Among the numerous negative ions observed in Titan's upper atmosphere [1], CN⁻ is believed to play a key role in the formation of larger species. In this context, the reaction of CN⁻ with cyanoacetylene (HC₃N) whose concentration is not negligible in Titan's upper atmosphere, is of particular interest.

The kinetic of this reaction has recently been experimentally investigated by Carles et al. [2] and C₃N⁻ could be identified as the main reaction product following:



In the present work, new experiments dedicated to the reaction of CN⁻ with HC₃N have been carried out in conditions favouring multiple collisions between the anion and the neutral partner.

Synthesis of the HC₃N molecule was performed following [3]. Purity of the resulting product was found to be 99 % according to mass spectrometry analysis performed on a ZAB2-SEQ tandem mass spectrometer using the standard ion source EI. CN⁻ was formed by means of a APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) source from acetonitrile (CH₃CN). The reaction itself was studied using a Waters Quattro Premier™ tandem quadrupole mass spectrometer operating in negative ion mode.

Different reactive regimes were explored by varying the pressure of the neutral reactant HC₃N in the reaction cell. In the single collision regime, our results confirm the formation of C₃N⁻ via an efficient proton transfer mechanism. However, as the number of collisions increase, a series of complex molecules of variable length is observed. These results and their analysis in terms of chemical mechanisms will be presented. The proposed mechanism may be of interest to describe the growth of negatively charged hydrocarbons in Titan's ionosphere.

* Korespondence: jan.zabka@jh-inst.cas.cz

LITERATURA:

1. Vuitton V. et al.: Planetary and Space Science 57 (13), 1558-1572 (2009).
2. Carles S. et al.: Icarus 211 (1), 901-905 (2011).
3. Miller F.A. and Mellon D.H.: Spectrochim. Acta Part A - Mol. Spectrosc. 23A, 1415-1423 (1967).

ThP-004: Direct coupling of droplet microfluidics with TOF-MS: developing a new tool for on-line single cell analysis

Michael Volný^{1,2*}, Joelle Rolfs¹, Bejan Hakimi¹, Dingsheng Liu¹, Daniel Chiu¹, František Tureček¹

1. University of Washington

2. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i.

Droplet microfluidics has attracted much attention in recent years because droplet generation in microfluidic devices has found applications in a wide range of areas, such as the analysis of target samples that rely on compartmentalization, separation of components encapsulated in droplets, and the synthesis, mixing, and/or crystallization within droplets. Two main methods are available to generate a continuous stream of aqueous droplets in an immiscible fluid in a steady-state fashion: geometric breakup at a T-junction and hydrodynamic flow focusing.

A commercially available ESI-TOF mass spectrometer (LCT Premier, Waters) was thoroughly modified to accommodate the microfluidics interface. The original ion source assembly was removed (up to the first rf focusing element of the ion optics) and replaced by a new chamber that contains an open ion funnel of our own design. It is made of 25 stainless steel plates (with no jet disrupter) separated by 100 Mohm resistors and operates in a 0.5-1 Torr pressure range. A DC voltage gradient and an RF voltage is applied on the ion funnel plates to focus and guide ions toward a 2-mm aperture that separates the ion funnel from the the original LCT ion transfer optics ("ion tunnel"). Transport between the ambient environment and the ion funnel is provided by a heated stainless-steel capillary, which is glass-lined on the inside to prevent ion discharge. APCI ionization by a corona discharge is possible either in front of the inlet or after the inlet capillary inside the ion funnel.

Different techniques, such as air flow focusing or electrostatic induction, are currently being tested to introduce droplets into the inlet of the modified mass spectrometer. The goal of the project is to achieve encapsulation of a single vesicle/cell in a droplet, bring it from the microfluidics channel into the mass spectrometer, and record a mass spectrum of the droplet content at the lowest limit of detection possible.

* Korespondence: volny@uw.edu

PODĚKOVÁNÍ:

We gratefully acknowledge support of this work by the U.S. National Institute of Health (5R01 GM094905-02). The work on the ion inlet transport efficiency was also supported by the Czech Science Foundation (Project P206/10/P018) M.V.'s was supported by a MC-IRG fellowship within the seventh European Community Framework Program.

ThP-005: Fully automated surface analysis with the TriVersa NanoMate®

Andreas Wiesner ^{1*}

1. Advion BioSciences Ltd., United Kingdom

Since many years, the TriVersa NanoMate® is well established as a robotic platform for delivering samples to mass spectrometers via a chip-based nano-electrospray emitter. It enables the online-coupling to HPLC systems as well as parallel fraction collection and direct infusion from titre plates at low flow rates.

More recently, the TriVersa NanoMate was further developed for the automated analysis of surfaces by direct solvent application and immediate infusion of resulting extracts. Originated from collaboration with Oak Ridge National Laboratory, the Liquid Extraction Surface Analysis (LESA®) capability is now readily integrated as an optional component of the TriVersa NanoMate.

Since the first publication on this subject [1], where proof-of-principle studies confirmed the usefulness of this technology for dried blood spots, tissue sections as well as MALDI-targets, the LESA-approach was successfully used for a wide range of application areas, including:

- Analysis of lipids and proteins or peptides from TLC-plates.
- Direct analysis of tissue sections for drug distribution studies and lipid profiling.
- Pesticide and toxic compounds analysis from food surfaces.
- Direct analysis of haemoglobin variants from dried blood spots [2].
- Comparative lipid profiling directly from atherosclerotic plaques [3].

The technological background of LESA and recently published results achieved with this approach will become reviewed.

* Korespondence: awiesner@advion.com

LITERATURA:

1. Kertesz V. and Van Berkel G.J.: J. Mass Spectrom. 45(3), 252-60 (2010).
2. Edwards RL et al. : Anal Chem 15, 83(6), 2265-70 (2011).
3. Stegemann C. et al.: Circ. Cardiovasc. Genet. 4, 232-42 (2011).

ThP-006: The development of method for estimation of protein digest concentration prior MS analysis in proteomics

Jiří Dresler^{1*}, Michaela Nováková¹, Libor Píša¹, Martin Hubálek²

1. Ústřední vojenský zdravotní ústav

2. Ústav Molekulární Patologie, UoD, Hradec Králové

The MS/MS proteomic identification as well as quantitation is mostly based on enzymatic digestion involving many loss-making steps and therefore, the concentration at the protein level does not correspond to the peptide content. In this work, the methods suitable for analysis of digested peptides were tested on individual protein digests as well as on the digests of protein mixtures.

Four previously published methods included Bicinchonic acid assay (BCA, Smith P. K., 1985), modified BCA assay employing sodium hydroxide hydrolysis before addition of BCA reagents (hydrolytic BCA, Krishan N Kapoor 2009), NanoOrange assay (Laurie J. Jones, 2003) and UV detection at 280 nm using NanoDrop micro-sample technology. All methods were tested on individual proteins, their mixtures and also on more complex mixtures originating from different taxonomical kingdoms. All methods were applied at the protein level as well as on their complete digests and were quantified by all four methods. At the protein level, all methods kept high linearity and reproducibility with the exception of samples containing hemoglobine. The digested proteins showed more variability. At the peptide level, the lowest linearity expressed as coefficient of determination (R²) was observed in hydrolytic BCA method and this assay generally showed the lower reproducibility. The BCA as well as UV 280 nm curves showed satisfactory R². However, they differ in absorbance values (lowest coherence with BSA standard was in BCA assay). In addition, UV assay is accompanied by the risk of several interfering substances. The highest R² was observed in NanoOrange assay and the linear curve of absorbances demonstrated the best coherence compared to BSA standard. Interestingly, these results were observed also in less complex mixture, that usually fail in spectral quantification methods. Moreover, this simple methods, has the high linear range (25 – 500 mg/ml) and is characterized with no significant interferences.

* Korespondence: jiri.dresler@gmail.com

LITERATURA:

1. Smith P.K. et al, Anal. Biochem., 150, 76-85 (1985).
2. Kapoor K.N. et al, Anal. Biochem., 393, 138–140 (2009).
3. Jones J.L. et al., BioTechniques, 34, 850-861 (2003).

PODĚKOVÁNÍ:

This work was financially supported by Ministry of Defence of Czech Republic - OVUOFVZ200901 - BIODEFENCE and OVUVZU2010001 - SPEKTROMETRIE

ThP-007: Application of high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for identification of vitamin E isomers in hop

Karolína Benešová^{1*}, Helena Pluháčková², Sylvie Běláková¹, Renata Mikulíková¹,
Jaroslava Ehrenbergerová², Zdeněk Svoboda¹

1. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.

2. Mendelova univerzita v Brně

Vitamin E is one of the most important nature antioxidants. It is synthesized by the all higher plants and protects their cells against oxidative stress. In the human organisms it helps to slow down the ageing process and it is demonstrably effective against chronic conditions such as heart diseases, cancer, Alzheimer's disease or Parkinson's disease. Vitamin E deficiency can cause neurological problems due to poor nerve conduction and can also cause anemia, due to oxidative damage to red blood cells. Vitamin E occurs in eight different forms, four tocopherols (α , β , γ , δ) and four tocotrienols (α , β , γ , δ), both are biologically active. All isomers feature a chromanol ring, with a hydroxyl group that can donate a hydrogen atom to reduce free radicals and a hydrophobic side chain which allows for penetration into biological membranes. Number of methyl groups on the chromanol ring determines particular tocopherol. Tocotrienols differ from the analogous tocopherols by the presence of three double bonds in the hydrophobic side chain. Vitamin E is a fat-soluble, thermolabile and photosensitive substance. In this study, we focus on the potential use of hop as a nontraditional source of vitamin E. The aim of our work was optimization of vitamin E extraction from hop samples and separation and identification of their isomers employing high-performance liquid chromatography with mass-spectrometric detection.

* Korespondence: karkulkab@seznam.cz

LITERATURA:

1. Zingg J.M.: Mol. Aspects Med., 28 (5-6), 400-422 (2007).
2. Abidi S.L.: J. Chromat. A, 881 (1-2) 197-216 (2000).
3. Proestos C. and Komaitis M.: Beer in Health and Disease Prevention, 45, 467-474 (2009).

PODĚKOVÁNÍ:

Results were achieved in the framework of the Research Plan of the MEYS 6019369701 and Research Center IM0570.

ThP-008: ESI-MS investigation of the complexation behavior of macrocyclic thiacycrown ethers and bivalent transition metals

Alexandra Tsybizova^{1*}, Detlef Schröder¹

1. Institute of Organic Chemistry and Biochemistry

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was used to study the complexation behavior of three newly synthesized¹ thia-macrocycles (1-3) with different 3d metal chlorides (i.e. CuCl₂, CoCl₂, NiCl₂, and ZnCl₂). The study demonstrates that the thiacycrown ethers preferentially bind traces of copper even in the excess of other metal ions. The binding process is accompanied by the reduction from Cu^{II} to Cu^I and the formation of [(thiacycrown)Cu]⁺ species. By use of 18-crown-6 as a reference the absolute association constants are evaluated.

* Korespondence: tsybizova@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Holý P. et al.: Synthesis 24, 4169-4176 (2010).

ThP-009: Determinace druhů termitů rodu *Anoplotermes* pomocí MALDI-TOF na základě složení jejich kutikulárních uhlovodíků

Vladimír Vrkoslav¹, Josef Cvačka¹, Thomas Bourguignon², Pavel Jiroš¹, Jan Šobotník¹, Robert Hanus^{1*}

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

2. Université Libre de Bruxelles, Avenue F.D. Roosevelt 50, B-1050 Brussels, Belgique

Termiti (*Isoptera*, *všekaži*) jsou zásadním ekologickým elementem tropických a subtropických ekosystémů – jejich schopnost metabolizovat celulózu z nich činí klíčové aktéry při degradaci rostlinného materiálu, nezastupitelné pro zajištění koloběhu živin. Díky této úloze jsou též nazýváni „ekosystémoví inženýři“. Potravní specializace termitů a jejich obrovský výskyt, převyšující hmotností celé lidstvo, s sebou přináší i další důležité důsledky jejich činnosti, tj. produkce vysokého množství methanu a nezanedbatelné škody, které působí na plodinách, dřevěných materiálech a stavebách.

Jednou z velmi málo poznanych skupin jsou podzemní hlínožraví termiti rodu *Anoplotermes*, kteří se specializují na degradaci rostlinných materiálů v půdě. Jejich rozlišení do druhů dle tradičních parametrů, jako je například anatomie, je nesmírně obtížné a lze důvodně předpokládat, že rod v sobě zahrnuje mnoho nepopsaných druhů. Proto jsme vypracovali jednoduchou metodu jejich rozpoznávání s pomocí analýzy uhlovodíků, obsažených na jejich tělním povrchu. Termiti využívají rozdílu ve složení kutikulárních lipidů ke vzájemnému rozlišování a my jsme v našem přístupu tohoto fenoménu využili. Jednoduchou a rychlou metodou pro analýzu uhlovodíků je MALDI-TOF [1]. Kutikuly termitích dělníků byly opláchnuty chloroformem. Ze získaných oplachů byla separována frakce uhlovodíků. Získaná směs byla analyzována metodou MALDI-TOF a data byla statisticky zpracována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Složení kutikulárních uhlovodíků termitů rodu *Anoplotermes* je rozmanité. U některých druhů převažuje jeden nebo dva uhlovodíky, u jiných byla pozorována komplexní směs. Nejvíce jsou ve směsích zastoupeny uhlovodíky v rozmezí 27 až 47 uhlíků s lichým počtem uhlíků a s 0 až 5 dvojnými vazbami. Použitím PCA byly od sebe jednotlivé druhy spolehlivě odděleny.

* Korespondence: roberths@centrum.cz

LITERATURA:

1. Cvačka J. et al.: J. Chem. Ecol. 32, 409-434 (2006).

PODĚKOVÁNÍ:

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentury České republiky (projektům 203/09/0139 a P506/10/1570) a Akademii věd České republiky (AV0Z40550506).

ThP-010: Optimalizace lipidomické analýzy pomocí off-line dvoudimenzionální HILIC x RP HPLC/MS

Eva Cífková^{1*}, Miroslav Lísa¹, Michal Holčápek¹

1. Univerzita Pardubice, Studentská 573, Pardubice, 53210

Lipidy jsou důležitou složkou všech biologických tkání a mají jedinečnou roli v mnoha biochemických procesech v lidském organismu. Porucha metabolismu lipidů může vést k mnoha závažným onemocněním, např. obezita, ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění, rakovina, atd. Základem k pochopení jejich chování v organismu je jejich detailní charakterizace. Z tohoto důvodu byla optimalizována lipidomická analýza pomocí off-line dvoudimenzionální vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systémech s hydrofilními interakcemi (HILIC) a obrácených fázích (RP) ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Připravený extrakt lipidů byl frakcionován pomocí HILIC na jednotlivé třídy lipidů v první dimenzi. Chromatografické podmínky byly pečlivě optimalizovány k dosažení separace co největšího počtu tříd lipidů. Byl testován vliv typu kolony, složení mobilní fáze, pH, aditiv, separační teploty a strmost gradientu. Optimalizovaná HILIC metoda umožňuje frakcionaci 18 tříd lipidů v jedné analýze. Získané frakce byly sesbírány a separovány pomocí RP-HPLC metody v druhé dimenzi. Daná třída lipidů byla separována na jednotlivé lipidy podle délky uhlíkového řetězce a počtu dvojných vazeb. Při optimalizaci podmínek byly testovány různé kolony C₁₈, složení mobilní fáze, separační teploty a strmost gradientu. Lipidy byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie, na základě charakteristických fragmentových iontů funkčních skupin a mastných kyselin. Pro identifikaci nepolárních lipidů byla použita chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a pro polární lipidy ionizace elektrosprejem (ESI). Off-line spojení HILIC a RP-HPLC chromatografie s hmotnostní spektrometrií umožňuje kompletní lipidomickou analýzu rostlinných a živočišných tkání.

* Korespondence: eva.canova@upce.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce byla podporována grantovými projekty MSM0021627502 (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy) a 203/09/0139 (Grantová agentura České republiky).

ThP-011: Charakterizace triacylglycerolů ve vzorku *Vernix caseosa*

Kateřina Netušilová^{1*}, Miroslav Lísa¹, Michal Holčápek¹

1. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie,
Studentská 573, 532

Vernix caseosa, nebo-li novorozenecký mázek, je bílý mastný biofilm, který pokrývá pokožku novorozence. Mázek je vylučován zárodečnými mazovými žlázkami v děloze okolo 20. týdnu těhotenství. Hlavními funkcemi mázku jsou ochrana dětské pokožky před stálým působením plodové vody, termoregulace, dále působí jako antiinfekční ochrana a antioxidant. Skládá se především z vody, lipidů, proteinů, nekrotických buněk a lanuga (fetální chloupky). Lipidová složka se skládá z triacylglycerolů, fosfolipidů, ceramidů, voskových esterů, cholesterol esterů a dalších tříd lipidů.

Cílem této práce je podrobná charakterizace složení triacylglycerolů (TG) ve vzorku *Vernix caseosa*, který obsahuje velké množství neobvyklých mastných kyselin (FA) s větvenými řetězci, cis-/trans- izomerií, poloh dvojných vazeb atd. Pro správnou identifikaci neobvyklých TG je nutné získat, co nejvíce informací pomocí různých analytických metod. Prvním krokem proto bylo stanovení celkového profilu FA pomocí analýzy methylesterů mastných kyselin (FAME) na plynovém chromatografu s plamenově-ionizační detekcí (GC/FID) a s hmotnostní detekcí (GC/MS). FAME byly připraveny reesterifikací vzorku s methanolátem sodným. Dalším krokem byla analýza TG vysokoučinnou kapalinovou chromatografií v nevodných systémech s obrácenými fázemi (NARP-HPLC/MS). Pro velké množství TG byla provedena frakcionace při analýze NARP-HPLC/MS. Tyto jednotlivé frakce byly reesterifikovány a změřeny na GC/FID. Výsledky z GC/FID byly korelovány z hmotnostními spektry se snahou o identifikovat co největší množství TG. Pro získání dalších informací o TG bude využito argentáční HPLC/MS.

* Korespondence: katerina.netusilova@upce.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce byla podporována grantovým projektem MSM0021627502 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy a projektem č. 203/09/0139 Grantové agentury České republiky.

ThP-012: Analýza rostlinných mono- a digalactosyldiacylglycerolů

Marie Zábranská^{1,2*}, Vladimír Vrkoslav¹, Josef Cvačka¹

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

2. Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Monogalactosyldiacylglyceroly (MGDG) a digalactosyldiacylglyceroly (DGDG) utváří strukturu biologických membrán fotosyntetizujících organismů [1]. Tyto lipidy jsou složeny z galaktosy, glycerolu a dvou mastných kyselin, vázaných v poloze *sn-1* a *sn-2* na glycerolu [2]. Jednotlivé MGDG a DGDG se vyskytují v neoxidované i oxidované formě, liší se přítomností různých mastných kyselin a utváří tak komplexní směsi [3].

V této práci byly optimalizovány podmínky separace těchto lipidů v systému reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie a detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Oxidované i neoxidované MGDG a DGDG byly detekovány v kladném módu elektrosprejové ionizace (ESI) jako sodné adukty $[M+Na]^+$. Tyto adukty byly fragmentovány kolizně indukovanou disociací (CID) v dependentním skenu. Experimenty byly měřeny na hmotnostním spektrometru s nízkým rozlišením (LR-ESI-MS) a vysokým rozlišením (HR-ESI-MS). Fragmentační spektra oxidovaných i neoxidovaných MGDG a DGDG obsahovala fragmenty odpovídající neutrálním ztrátám mastných kyselin z polohy *sn-1* a *sn-2* na glycerolu. Porovnáním fragmentačních spekter získaných v LR-ESI-MS a HR-ESI-MS, bylo však zjištěno, že bez znalosti přesné hodnoty m/z může dojít k chybné interpretaci vázaných mastných kyselin. K nesprávné interpretaci mastných kyselin docházelo v případě oxidovaných MGDG a DGDG. Fragment, odpovídající ztrátě oxidované mastné kyseliny, je v LR-ESI-MS identifikován jako ztráta neoxidované mastné kyseliny s jedním uhlíkem navíc a bez jedné dvojně vazby, protože rozdíl v hodnotě m/z prekurzorů je v tomto případě pouze 36 mDa. Pro separace MGDG a DGDG se běžně používá pouze LR-ESI-MS, v této práci byla demonstrována potřeba využití HR-ESI-MS pro správné interpretace hmotnostních spekter těchto lipidů.

* Korespondence: marie.zabranska@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Hölzl G. et al.: Prog. Lipid Res. 46(5), 225-243 (2007).
2. Maréchal E. et al.: Physiol. Plantarum 100, 65-77 (1997).
3. Mosblech A. et al.: Plant Physiol. Bioch. 47(6), 511-517 (2009).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce je financována z grantu GA ČR 203/09/0139 a výzkumných záměrů Z4 055 0506, MSM 0021620857, RP 14/63, SVV 261 204.

ThP-013: Simultaneous determination of ochratoxin a and aflatoxins in beer by liquid chromatography/mass spectrometry

Sylvie Běláková^{1*}, Karolína Benešová¹, Renáta Mikulíková¹, Zdeněk Svoboda¹

1. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.

Mycotoxins, products of secondary metabolism of filamentous micromycetes, belong to the most serious contaminants of natural origin. These highly dangerous chemical substances are known for their toxic effects. Mycotoxins are often classified according to their main producers, fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium*.

Aflatoxins (extremely high toxicity) produced by some *Aspergillus* species and ochratoxins produced by *Penicillium* species belong to the most significant groups of mycotoxins; Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 occur naturally in foods, Ochratoxin A (OTA) is the most common representative of the ochratoxin group. Their main toxic effects include nephrotoxicity, immunotoxicity, mutagenicity, carcinogenicity, teratogenicity, and neurotoxicity. Aflatoxin B1 is the most potent and proved natural carcinogen. These effects were confirmed experimentally in animals and can be thus assumed in humans as well [1].

The occurrence of these mycotoxins in agricultural products, feeds and foods of plant origin is due to unfavorable temperatures and humidity at harvest, transport, storage and further processing. During these production phases, fungal contamination can be diminished using the appropriate drying or storage processes. Mycotoxins are heat-resistant [2] and neither freezing can eliminate them from food. Therefore, prevention is of utmost importance. The presence of mycotoxins in beer depends on contamination of brewing materials, i.e. malting barley and malt. In 1996 transmission of OTA and other mycotoxins into beer during brewing was studied [3].

The present study focused on optimization of extraction and development and validation of the LC/MS method for simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, and ochratoxin A in beer samples. This simple and fast method is suitable for routine checking of the brewing materials, intermediates and a final product in the whole technological process of the beer production.

* Korespondence: sylvam@seznam.cz

LITERATURA:

1. Pfohl-Leszkwicz A. and Manderville R.A.: *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 61-69 (2007).
2. Bullerman L.B. and Bianchini A.: *Int. J. Food Microbiol.* 119, 140-146 (2007).
3. Scott P.M.: *J. AOAC Int.* 79, 875-882 (1996).

PODĚKOVÁNÍ:

Results were achieved in the framework of the Research Plan of the MEYS 6019369701.

ThP-014: Studium vybraných kondenzovaných anthokyanidinových barviv pomocí tandemové MS

Ondřej Kurka^{1*}, Renáta Myjavcová¹, Petr Bednář¹

1. RCPTM, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Anthokyaniny tvoří významnou skupinu rostlinných barviv. Je jim připisována řada pozitivních vlivů na lidský organismus (prevence rakoviny, srdečních onemocnění, cukrovky atd.) [1]. Tyto sloučeniny podléhají v roztocích různým chemickým přeměnám vedoucím ke strukturně složitějším barvivům. Tento fakt je velmi významný pro potravinářství a medicínu, proto jsou tyto látky v současnosti intenzivně studovány.

Cílem této práce bylo studovat s využitím systému UPLC/MS (Acquity UPLC/Q-TOF Premier, Waters) produkty reakce pelargonidinu s acetonem a pelargonidinu s epikatechinem v přítomnosti acetaldehydu jako můstkujícího činidla. Takto byly získány produkty, jimž byla na základě analogie se sloučeninami popisovanými v literatuře [2,3] přiřazena struktura odpovídající 5-methylpyranopelargonidinu a 8-(1-epikatechin-8-ylethyl)-pelargonidinu (sloučenina s acetaldehydovým můstkem). V případě 5-methylpyranopelargonidinu byly situace komplikována výskytem dvou izomerů o shodné hmotě ve směsi. Pro další studium majoritně se vyskytujícího produktu byla směs těchto izomerů úspěšně frakcionována na semipreparativní koloně. U obou sledovaných produktů byla určena přesná a správná hmota a detailně studována fragmentace pomocí tandemové MS (Q-TOF Premier a Finnigan LCQ Classic, Thermo Electron Corporation). V tomto sdělení budou detailně diskutovány fragmentační pochody ke kterým dochází po kolizí indukované disociaci získaných barviv v kolizní cele.

V případě 5-methylpyranopelargonidinu je pozorována charakteristická ztráta methylového radikálu ($\Delta m/z$ 15) z pyranového kruhu. Dále byly pozorovány také ztráty molekul oxidu uhelnatého a vody ($\Delta m/z$ 28 resp. 18) charakteristické pro polyfenoly. V případě 8-(1-epikatechin-8-ylethyl)-pelargonidinu byly pozorovány ztráty epikatechinu ($\Delta m/z$ 290), 8-vinylepikatechinu ($\Delta m/z$ 316) a produkt retro-Diels-Alderova štěpení ($\Delta m/z$ 152).

* Korespondence: ondrejkurka@seznam.cz

LITERATURA:

1. Konczak I. et al.: J. Biomed. Biotechnol. 2004 (5), 239-240 (2004).
2. Myjavcova R. et al.: J. Chromatogr. A 1217, 7932-7941 (2010).
3. Rivas-Gonzalo J. C. et al.: J. Agric. Food Chem. 43, 1444-1449 (1995).

PODĚKOVÁNÍ:

Autoři děkují Grantové agentuře ČR (projekt P206/10/0625) a Operačnímu programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost – Evropskému sociálnímu fondu (projekt CZ.1.07/2.3.00/20.0017 MŠMT).

ThP-015: Probing protein tertiary structure via mass spectrometry

Daniel Rozbeský^{1,2*}, Petr Pompach^{1,2}, Petr Man^{1,2}, Karel Bezouška^{1,2}, Petr Novák^{1,2}

1. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague

2. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Chemical cross-linking and Hydrogen/Deuterium exchange combined with mass spectrometry are powerful tools for elucidating protein conformation in solution. We applied both methods to study structural details of an important activating lymphocyte receptor NKR-P1A and to distinguish between structural characteristics in crystal and physiological conditions. The determination of crystal structure of NKR-P1A evokes questions about the unique flap region containing residues Pro161-Asp187 which is in crystal directed towards symmetrically related molecule. Chemical cross-linking and H/D exchange combined with high resolution mass spectrometry have been employed to investigate the flexibility and conformation of the flap region.

In order to study the flexibility and conformation of the flap region in the NKR-P1A protein, we have prepared recombinant NKR-P1A protein and its mutant NKR-P1A-NF in which the flap region containing residues Pro161-Asp187 was deleted and replaced by two alanines. While the main structure of NKR-P1A obtained by mass spectrometry techniques was consistent with the previously known crystal data, a difference was found in the flap region. In the crystal structure the flap region extends from the compact core region. On the contrary, analysis of the peptic fragments showed decreased local H/D exchange in the NKR-P1A protein in region containing residues 115-131, 138-143 and 190-206 in comparison with NKR-P1A-NF. This indicates a reorganization of the flap region and its association with the compact core region. The mass spectrometry results were further confirmed by the NMR structural analysis.

* Korespondence: rozbesky@gmail.com

PODĚKOVÁNÍ:

This study was supported by grants from the Grant Agency of the Czech Republic (P207/10/1040), the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 21620808, 1M0505, LC7017 and LC545), the Academy of Sciences of the Czech Republic (Institutional Research Concept AV0Z50200510 and AV0Z50520701) and from the Grant Agency of Charles University (403211).

ThP-016: Oxidace během NALDI MS jako nástroj pro určování polohy dvojně vazby

Kateřina Pavlášková^{1*}, Marcela Strnadová¹, Martin Strohal¹, Vladimír Havlíček^{1,2}, Miroslav Šulc¹, Michael Volný¹

*1. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.
2. Přírodovědecká fakulta UPa, Olomouc*

Technika NALDI MS (Nanostructure-Assisted Laser Desorption/Ionization) umožňuje šetrou ionizaci biologických molekul a na rozdíl od běžnější techniky MALDI MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) umožňuje detekovat především malé molekuly (<1000 Da), např. fosfolipidy. Představená metoda přináší zásadní změnu v MS přístupu k identifikaci polohy dvojně vazby v molekulách lipidů, která byla dodnes možná až po předchozí úpravě vzorku derivatizací nebo po provedení MSⁿ experimentu. Naše řešení přináší možnost elegantního a rychlého určení polohy dvojně vazby na běžném TOF analyzátoru na základě specifické oxidace katalyzované nanopovrchem NALDI terčíku (Bruker Daltonics), která vede k výskytu charakteristických fragmentů v hmotnostním spektru.

Na příkladu několika fosfolipidů s různě nenasyčenými mastnými kyselinami jsme prokázali časovou závislost katalýzy na nanopovrchu i strukturní specifitu fragmentů. V kontrolních MALDI-TOF experimentech nebylo podobné chování pozorováno, což dokazuje, že k oxidaci dochází výhradně na nanopovrchu terčíku, nikoliv v průběhu MS experimentu. Objasnění samovolné oxidace a fragmentace na nanopovrchu může kromě přímého určování polohy dvojně vazby mastných kyselin přispět k vysvětlení komplikovaných spekter, která vznikají při analýze směsi neznámých látek pomocí NALDI MS.

* Korespondence: pavlaskoval@gmail.com

PODĚKOVÁNÍ:

Grantové agentuře MŠMT (LC545) a institucionálnímu záměru AV ČR v.v.i. (AVOZ50200510).

ThP-017: Production and analysis of human recombinant SHBG

Zuzana Vackova ^{1*}, Lucie Balonova ², Vojtech Vejvoda ¹, Marek Ingr ³, Martina Safarova ¹, Lenka Hernychova ², Martin Buncek ¹

1. Generi Biotech s.r.o., Hradec Kralove, Czech Republic

2. Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové

3. Ascoprot Biotech s.r.o., Zlín, Czech Republic

Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) is a steroid binding glycoprotein which is involved in the regulation of steroid hormone responses. Plasma levels of SHBG reflect various pathological states of organism; therefore it is widely used as a diagnostic marker. The aim of our study was to prepare recombinant human SHBG (rhSHBG) whose structure and activity would correspond with a native protein. Such recombinant protein could be used as a standard in immunoanalytical diagnostic methods. Chinese Hamster Ovary cells have been selected as a host line for rhSHBG production. The cells were transfected with an expression plasmid carrying the coding sequence of SHBG and enabling the production of rhSHBG into the production medium. For rhSHBG production the cells were seeded into a roller bottle and cultivated in production medium enriched with sugars. rhSHBG was isolated from the production medium using Ni-affinity chromatography and consequential gel chromatography. Collected fractions were then separated using SDS-PAGE and selected bands were excised, digested with trypsin, and analyzed using MALDI-TOF/TOF mass analyzer. For detection of post-translational modification the isolated protein was separated using 2DE and glycosylation was detected using ProQ Emerald stain. The 1DE separation showed two candidate bands differing slightly in molecular weight that corresponded with the expected rhSHBG. Subsequent MS analysis confirmed the presence of SHBG in both of these bands. These results suggest that SHBG is produced in two forms which might result either from variations in post-translational modifications or from distinct cleavage of the native and artificial signal peptides leading to different molecule length. The analysis of glycosylation using 2DE revealed overall 16 isoforms of the protein differing in both molecular weight and pI. For further sequence analysis Edman degradation reaction and a detail analysis of all 16 isoforms using glycomics approach will be used.

* Korespondence: zuzana.vackova@generi-biotech.com

PODĚKOVÁNÍ:

The work was supported by the regional government of Hradec Kralove region by means of Innovation voucher 2010.

ThP-018: Analýza lipidů novorozeneckého mázku hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF

Radka Míková^{1,2*}, Vladimír Vrkoslav¹, Antonín Doležal³, Richard Plavka³,
Josef Cvačka¹

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

2. Katedra analytické chemie PŘF UK v Praze

3. Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN

Mázeček (*vernix caseosa*) je bílá až nažloutlá látka, která se svou strukturou podobá tavenému sýru. Začíná se tvořit ve třetím trimestru těhotenství a pokrývá tělo novorozence přibližně do jednoho až dvou týdnů po narození. Vytváří mechanickou i chemickou bariéru, která chrání plod před macerací v plodové vodě a novorozence v suchém prostředí před infekcí. Udržuje optimální vlhkost pokožky, působí antibakteriálně a napomáhá dokončení vývoje kůže. Vernix je tvořen hlavně proteiny a lipidy. 80 % jeho hmotnosti je voda [1].

Tato práce se zabývá lipidy mázku a jejich měřením na MALDI-TOF MS [2]. Byly zjišťovány rozdíly v lipidech vernixu s ohledem na pohlaví dítěte. Lipidové třídy byly separovány na silikagelových TLC deskách s mobilní fází hexan/diethylether 93:7 (V/V). Signifikantní rozdíly byly nalezeny ve frakci voskových esterů a cholesterylesterů. Tato byla izolována a obě skupiny lipidů byly odděleny na TLC deskách s florisilem za použití mobilní fáze hexan/diethylether 90:10 (V/V). Obě frakce byly izolovány a měřeny metodou MALDI-TOF MS. Výsledná data byla analyzována statistickou metodou PCA.

* Korespondence: radka.mikova@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Singh Gurcharan et al.: *Ind. J. Dermatol.* 53, 54-60 (2008).
2. Vrkoslav V. et al.: *J. Mass Spectrom.* 44, 101-110 (2009).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce je financována z grantu GA ČR 203/09/0139 a výzkumných záměrů Z4 055 0506, MSM 0021620857, RP 14/63, SVV 261 204.

ThP-019: Improved method for arginine and acidic amino acid residues covalent labeling with MALDI-TOF mass spectrometry detection

Petra Junková^{1*}, Martina Vermachová¹, Radovan Hynek¹

1. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Covalent labeling provides structural information for protein or protein-ligand complexes through different reactivity of amino acid residues. Covalent labels used in this approach must be highly specific for individual amino acid, but they must be reactive and stable in protein native conditions also. Especially, labeling of arginine and carboxylic acid residues is complicated because of the pH in which both reactions take place and stability of the labels. Nevertheless, these residues occur mainly on protein surface and could be involved in protein-protein or protein-ligand interaction, which makes them interesting to probe.

In this work we were engaged in a method for covalent labeling of arginine residues by p-hydroxyphenylglyoxal and carboxylic acid residues by glycine methyl ester on model protein (cytochrome C) with the detection by MALDI-TOF mass spectrometry. We found out, that the presence of both labeling reagent inhibit measuring mass spectra in high-quality. Therefore, we integrated a new separation step based on centrifugation and gel chromatography methods to separate labeling reagent from modified protein solution.

Designed method was successfully applied on other proteins such as Mason-Pfizer monkey virus matrix protein and oleosins, proteins constituting lipoprotein particles in plant seeds. Information about reactivity of arginine, aspartate and glutamate residues can help us to describe the conformation state and interaction sites of these proteins in complexes with phospholipids.

* Korespondence: junkovap@vscht.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Financial support from specific university research (MSMT no. 21/2011), Grant No. 6046137305 from the Czech Ministry of Education is gratefully acknowledged.

ThP-020: Structural assembly of β -N-acetylhexosaminidase complex

Zdeněk Kukačka^{1,2*}, Petr Pompach^{1,2}, Petr Man^{1,2}, Karel Bezouška^{1,2}, Petr Novák^{1,2}

1. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic

2. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague

β -N-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) belongs to exoglycosidase and is one of the most abundant enzymes found in organism from bacteria to human. The fungal β -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* is composed of propeptide and catalytical domain. The propeptide is a 10kDa large peptide noncovalently associated with the catalytical domain of the enzyme. Propeptide is essential for the enzyme activity. Although the structure of the catalytical domain was revealed by homology modeling, the structure of the propeptide has not been solved. In this study we uncover the position where the propeptide is associated with the catalytical domain.

β -N-acetylhexosaminidase was purified from the medium of the producing organism. For EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) experiment the enzyme was transferred by gel filtration to 50mM Pyridine pH 5.5, 150mM NaCl and for DSG (disuccinimidyl glutarate) experiment to 50mM Triethylamine carbonate pH 7.5. After the cross-linking reaction was over, the products of enzyme were separated by SDS electrophoresis. In gel digestion was performed and the resulting peptides were analyzed by LC-ESI FT MS (Agilent 1200, APEX-Ultra).

Combining chemical cross-linking and high resolution mass spectrometry we revealed that the structural changes of the catalytical domain depend on the presence/absence of the propeptide molecule. These results nicely correlated with the previously described homology model of the catalytical domain. Several cross-linked peptides between the propeptide and catalytical domain disclosed the position of the propeptide within the enzyme.

* Korespondence: kukacka@biomed.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by grants P207/10/1040 and P207/10/1934 of the Czech Science Foundation.

ThP-021: *In vitro* and *in vivo* studies of praziquantel and its metabolites using UHPLC/MS/MS

Veronika Jedličková^{1*}, Robert Jirásko¹, Michal Holčapek¹, Ivan Vokřál², Lenka Skálová²

1. University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical chemistry

2. Charles University in Hradec Králové, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemical Sciences

Praziquantel (PZQ) is a broad-spectrum anthelmintic drug used in cases of trematodes, cestodes and schistosomal infection. It is metabolized mainly in liver, where hydroxylated metabolites and glucuronide conjugates are typically formed. The excretion of these metabolic products is ensured by renal system. In our work, PZQ was incubated with rat hepatocytes and microsomes. Subsequently, the solid-phase extraction of microsomal and hepatocyte incubation mixtures was performed. Moreover, rat urine samples were obtained from *in vivo* experiments after PZQ oral administration. The comparison of incubation samples with placebo experiments simplified the identification of metabolites. Studied samples were analyzed using optimized UHPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry method that provided information about PZQ microsomal and hepatic biotransformation pathways. Structures of particular phase I and II metabolites were suggested based on the high mass accuracy measurements in full scan and tandem mass spectrometry modes using QqTOF analyzer. The additional measurements of MSⁿ using ion trap analyzer were performed for the verification of fragmentation paths.

* Korespondence: veronika.jedlickova@upce.cz

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by MSM0021627502 (Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic) and P502/10/0217 (Czech Science Foundation).

ThP-022: ESI-MS, IMS and CID studies of substituted iodocarborane anions

Marek Bot^{1*}, Detlef Schröder¹

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v. v. i.

A series of substituted 1-carba-12-iodo-*closo*-dodecaborate anions were studied by means of ESI-MS and ion mobility spectroscopy. Several non-linear dependencies of the arrival time distributions on the ion mass were found. Collision-induced dissociation experiments gave valuable information about substituent effects on the strength of B-I bonds. In these experiments iodine can be lost either as atomic I or iodide anion I⁻.

* Korespondence: bot@uochb.cas.cz

ThP-023: Development of UHPLC-MS/MS method for the determination of pravastatin and pravastatin lactone in rat plasma and urine

Hana Vlčková^{1*}, Martina Rabatinová², Alena Mikšová², Gabriela Kolouchová³,
Stanislav Mičuda³, Petr Solich², Lucie Nováková²

1. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

2. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

3. Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové

Pravastatin belongs into a group of hypolipidemic drugs named statins. It is an inhibitor of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase and significantly reduces the level of total cholesterol, low-density cholesterol and plasma triglycerides.

The aim of this work was to develop and validate UHPLC-MS/MS method and convenient sample preparation procedure for the determination of pravastatin and pravastatin lactone in rat plasma and urine. A combination of protein precipitation (PP) and microextraction by packed sorbent (MEPS) was chosen as the suitable sample preparation technique. PP allowed for the removing the protein from plasma samples and MEPS for the elimination of other contaminants. Validated method was applied to the rat plasma and urine samples. The results were employed to construct the pharmacokinetic plots of pravastatin.

The optimal conditions of UHPLC-MS/MS method for the determination of pravastatin and pravastatin lactone were found. The analytical column Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1x50 mm), mobile phase mixture of ACN and 1 mM ammonium acetate pH 4.0 at flow rate 0.2 ml/min and gradient elution were used. Electrospray ionisation (ESI) in polarity switching mode was employed. Quantification of all analytes was performed using two SRM (selected reaction monitoring) transitions. For MEPS procedure C8 sorbent was used. The mixture of acetonitrile and 0.01M ammonium acetate pH 4.5 was selected as the convenient elution solvent. Developed method was validated in terms of: linearity (>0.9990), accuracy (92.40- 109.28 %), precision (0.77- 7.26 %) and matrix effect (<20%).

Fast and simple UHPLC-MS/MS and protein precipitation together with MEPS method for the determination of pravastatin and pravastatin lactone in rat plasma and urine was validated and applied to the rat plasma and urine samples.

* Korespondence: vlckova21@seznam.cz

PODĚKOVÁNÍ:

The authors gratefully acknowledge financial support of the SVV/2011/263002.

ThP-024: Derivatization in GC/MS analysis of wine II: determination of pyruvic acid

Petra Nováková¹, Petr Barták^{1*}, Petr Bednář², Barbora Papoušková², Jan Stávek³,
Josef Balík³, Karel Lemr²

1. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

2. RCPTM, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

3. Dept. of Post-Harv. Technol. of Horticultural Products, Faculty of Horticulture Lednice, MZLU Brno

Determination of pyruvic acid is often task in different scientific fields. Unfortunately, specific properties of pyruvic acid (or respective anion) cause number of difficulties in common analytical methods from low response of some types of detectors to nonlinear calibration dependences for instance. The aim of this communication is to described simple two-step derivatization procedure suitable for gas chromatographic determination of pyruvic acid. Pyruvic acid was converted with o-phenylenediamine into the form of 2-hydroxy-3-methylquinoxaline and hydroxyl group was subsequently silylated under formation of 2-trimethylsilyloxy-3-methylquinoxaline [1-3]. 0.5 ml of wine was mixed with 8 ml of 0.012 M solution of o-phenylenediamine in 3 M hydrochloric acid, shaken for 2 minutes and incubated for 20 minutes at 80 deg. C. After cooling to room temperature, the mixture was extracted two times with 1 ml of dichloromethane and combined extract was evaporated to dryness. Residue was dissolved in pyridine (0.06 ml) and derivatized with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, 0.06 ml) for 30 minutes at 80 deg. C. Sample was cooled, filled in 1 ml with hexane and analyzed by GC/MS. Standard addition method was used for quantitative determination. The method was applied for the determination of pyruvic acid in the study aimed at investigation of the influence of pyruvic acid addition on the formation of condensed anthocyanin dyes in red wines as well as for the determination of the natural content of pyruvic acid in wines. Natural concentration of pyruvic acid in the wine used for the above mentioned anthocyanin study was 195 mg/l.

* Korespondence: petr.bartak@seznam.cz

LITERATURA:

1. Pailla K. et al.: Clin. Chem. 46, 848-853 (2000).
2. Rocchiccioli F. et al.: Biomed. Environ. Mass Spectrom. 8, 160-164 (1981).
3. Langenbeck U. et al.: J. Chromatogr. B 143, 39-50 (1977).

PODĚKOVÁNÍ:

The work was supported by the projects: GAČR P206/10/0625, Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (project CZ.1.07/2.3.00/20.0017 of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and student grant of Palacky University No. PrF_2011_025.

ThP-025: Derivatization in GC/MS analysis of wine I: determination of aldehydes

Petra Nováková ^{1*}, Petr Barták ¹, Petr Bednář ², Barbora Papoušková ², Jan Stávek ³,
Josef Balík ³, Karel Lemr ²

1. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

2. RCPTM, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

3. Dept. of Post-Harv. Technol. of Horticultural Products, Faculty of Horticulture Lednice, MZLU Brno

Derivatization techniques are quite popular in gas chromatography due to their capabilities to affect retention behavior, improve detection limits, block reactive centers and improve the peak shape. Although the researchers in gas chromatography usually attempt to increase volatility of target compounds by insertion of derivatization step into the analytical protocol, entirely opposite requirement has to be fulfilled when extremely volatile compounds come into account and increased retention is required for separation of target compound from solvent and other volatile components of the sample. This is the case of acetaldehyde in wine and other alcoholic beverages. The aim of this communication is to describe simple procedure based on conversion of acetaldehyde and other low molecular weight aldehydes into the form of 2-alkylthiazolidines by means of cysteamine [1-3]. 0.5 ml of wine was mixed with 2 ml of 0.25 M solution of cysteamine (pH 8), shaken for 5 minutes and left for 1 hour at laboratory temperature. Samples were extracted with 2 ml of dichloromethane, concentrated to 1 ml under the gently stream of nitrogen and analyzed by GC/MS. Standard addition method was used for quantitative determination. The method was applied for the determination of acetaldehyde in the study aimed at investigation of the influence of acetaldehyde addition on the formation of condensed anthocyanin dyes in red wines as well as for the determination of the natural content of acetaldehyde and other low molecular weight aldehydes in wines. Natural concentration of acetaldehyde in the wine used for the above mentioned anthocyanin study was 92.1 mg/l.

* Korespondence: petnovako@seznam.cz

LITERATURA:

1. Miyake T. and Shibamoto T.: J. Agric. Food Chem. 41, 1968-1970 (1993).
2. Yasuhara A. and Shibamoto T.: J. Chromatogr. A 672, 261-266 (1994).
3. Kataoka H. et al.: J. Chromatogr. A 709, 303-311 (1995).

PODĚKOVÁNÍ:

The work was supported by the projects: GAČR P206/10/0625, Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (project CZ.1.07/2.3.00/20.0017 of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and student grant of Palacky University No. PrF_2011_025.

ThP-026: Studium komplexů ruthenia(II) a nenasycených uhlovodíků

Eva Hanikýřová^{1*}, Jana Roithová¹

1. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Přechodné kovy katalyzující tvorbu C-C vazeb značně přispívají do organické syntézy. Použití rutheniových komplexů v reakcích tohoto typu je stále významnější vzhledem k jejich známým schopnostem v katalytických tvorbách C-C vazeb přes ruthenacykly jako meziprodukty.

V naší studii cykloadičních reakcí katalyzovaných komplexy ruthenia jsme se zaměřili na studium interakce mezi rutheniem(II) a alkeny nebo dieny pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací. Tato měkká ionizační technika umožňuje zkoumat komplexy ruthenia v ionizovaném stavu a dovoluje vzniklé ionty analyzovat pomocí MS/MS metody. Ze závislosti fragmentace komplexů na kolizní energii jsme určili vazebné energie ruthenia k různým alkenům. Náš experimentální výzkum je doplněn o kvantově chemické výpočty s použitím teorie funkcionalu hustoty.

* Korespondence: eva.hanikyrova@volny.cz

LITERATURA:

1. Murahashi S.: Ruthenium in Organic Synthesis, Wiley-VCH (2004).
2. Lautens M. et al.: Chem. Rev. 96, 49 (1996).
3. Ojima I. et al.: Chem. Rev. 96, 635 (1996).

ThP-027: Techniky nanášení matrice pro vysokorychlostní zobrazovací MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii

Antonín Bednařík ^{1*}, Lukáš Ertl ¹, Iva Rážová ¹, Iva Tomalová ¹, Eugene Moskovets ²,
Jan Preisler ¹

1. Ústav Chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Česká republika

2. MassTech, Inc. 6992 Columbia Gateway Drive, Suite #160, Columbia, MD 21046, USA

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry Imaging – MSI), technika umožňující zobrazení prostorového rozložení analytů, prochází v posledních letech nebývalým rozvojem. Jedním z klíčových kroků úspěšného MSI experimentu je příprava vzorku, včetně kvalitního nanášení matrice. Předkládáme zde porovnání několika způsobů nanášení matrice pro MALDI-MSI. MALDI matrice s angiotensinem I značeným rhodaminem B byla nanášena na MALDI destičku pomocí tří různých technik - spincoatingu, electrospreje a piezoelektrického nanodispenseru. Homogenita nanášené vrstvy byla zkoumána pod mikroskopem, buď sledováním prostého optického obrazu nebo v případě piezodepozice sledováním fluorescence nanášených spotů po jejich ozáření laserem o vlnové délce 532 nm. Optický obraz vzorku byl porovnán s mapou rozložení peptidu získanou hmotnostní spektrometrií. K měření peptidových map byl použit nekomerční vysoce výkonný axiální time-of-flight (TOF) hmotnostní spektrometr s 2 kHz 355 Nd:YAG laserem. Doba, kterou axiální MALDI-TOF spektrometr potřebuje k nahrání celého spektra je pouze okolo 100 μ s, a proto je schopen plně využít výhody laseru s vysokou frekvencí, což vede k podstatnému snížení doby potřebné pro analýzu.

* Korespondence: silverseal@seznam.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (P206/10/J012), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSM0021622415) a projektu "CEITEC - Středoevropský technologický institut (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje.

ThP-028: Proteomická analýza houbových spor druhu *Aspergillus fumigatus*

Miroslav Šulc^{1,2*}, Tomáš Ječmen^{1,2}, Petr Halada¹, Kateřina Pavlásková¹, Petr Novák^{1,2},
Jean-Philippe Bouchara³, Vladimír Havlíček^{1,4}

1. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

2. Univerzita Karlova Praha

3. University of Angers, Francie

4. Univerzita Palackého Olomouc

Vláknité vřeckovýtrusné houby rodu *Aspergillus* tvoří z makroskopického hlediska černé, hnědé, zelené, žluté a dokonce i bílé kolonie v závislosti na druhu, genetickém polymorfismu kmene a podmínkách jeho kultivace. Z mikroskopického hlediska tvoří kolonie struktury hyf (vlákna) a konidií (spory tvořené nepohlavním způsobem). Spory jsou adaptovaná forma sloužící k rozmnožování, rozšiřování a přežití, a jsou hlavním vstupním vektorem do organismu hostitele. Klinicky významné druhy rodu *Aspergillus* osidlují nejčastěji dýchací soustavu hostitele, ale dokáží kolonizovat i povrch pokožky. Způsobují alergické reakce nebo infekční onemocnění, tzv. aspergilózu, přičemž u osob se sníženou imunitou může po diseminované infekci nastat i smrt.

Barva kolonií (spor) přímo či nepřímou souvisí s jejich proteomickým profilem (např. enzymy biosyntetické dráhy melaninu). Podobně, s expresí virulentních faktorů/proteinů (např. hydrofobin, hemolysin) má spojitost invazivita spor kmenů rodu *Aspergillus*. Předkládaná práce se zabývá srovnáním tří metodických přístupů pro studium proteomických profilů čtyř kmenů *A. fumigatus* s rozdílným makroskopickým vzhledem i potenciální virulencí: (i) IDE&MS/MS, (ii) on-line LC-MS/MS [FT-ICR], nebo (iii) off-line LC-MS/MS [MALDI-TOF/TOF]. Dva referenční kmeny CCF3227 (izolát z laboratorního vzduchu, 2000, ČR) a IHEM18963 (klinický izolát plicní biopsie, 1993, Francie), které produkují zelené spory, exprimují podle našich výsledků např. hydrofobiny jako virulentní faktory. Dalším analyzovaným kmenem byl IHEM15998 (sputum pacienta s cystickou fibrózou, 1999, Francie) s nahnědlými spory, bez produkce hydrofobinů, a s částečně defektní biosyntézou melaninu. Posledním kmenem byl IHEM9860 (půdní izolát, 1975, Indie) s bílými spory, také bez produkce hydrofobinů a s absencí enzymů počátku biosyntézy melaninu.

* Korespondence: msulc@biomed.cas.cz

PODEKOVÁNÍ:

MŠMT (LC07017) a (AV0Z50200510).

ThP-029: Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry in human metabolomics

Petr Wojtowicz^{1,2*}, Jitka Zrostlíková³, Veronika Šťastná^{1,4}, Eva Dostálová^{1,4},
Tomáš Adam¹

1. Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, University Hospital Olomouc

2. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

3. LECO Application Laboratory Praha

4. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) is often used method for metabolomic studies to analyze wide range of compounds (organic acids, amino acids, sugars, etc.). But scanning GC/MS techniques can struggle with the high number of components present and the occurring co-elutions. Recently, comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOF) has become an emerging technique in this field. In human metabolomics there are a lot of matrices to be studied: e.g. plasma, urine, saliva, or cultured cells. Each of them can play an important role in the diagnostic processes of several illnesses.

As a part of GC analyses some derivatization procedure of polar compounds is required. Although silylation is mostly used approach, it has certain limitations, for example it forms more products from a single analyte. Moreover, their amount is changing with time. Others common are e.g. indirect alkylation via chloroformates or acylation. The comprehensive GC×GC-TOF analysis of biological materials (urine, plasma and cultured skin fibroblasts) in relation to diagnosing of metabolic disorders (organic acidurias, purine de novo synthesis disorders) is demonstrated in this contribution.

Analyses were performed on GC×GC (Agilent 7890 with LECO thermal modulator) coupled with HT TOF MS (LECO Corporation). The nonpolar/polar (BPX5, 30 m × 0.25 mm & BPX-50, 2.0 m × 0.1 mm, both Supelco) column arrangement was chosen. Other instrumental conditions differ in accordance with studied biological material and used derivatization approach. An automated data processing was performed by the ChromaTOF software (LECO) using “reference” tool.

GC×GC-TOF is a valuable tool in metabolomic analysis of many matrices and enables diagnosing metabolic disorders. The great benefit is data processing that can be fully automated, what strongly simplify operator’s effort and increases the sample throughput.

* Korespondence: petr.wojtowicz@gmail.com

PODĚKOVÁNÍ:

Infrastructural part of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational programme Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

ThP-030: Flow injection analysis coupled with tandem mass spectrometry for determination of tyrosine kinase inhibitors in human plasma

Kateřina Mičová ¹*, David Friedecký ¹, Edgar Faber ², Tomáš Adam ¹

*1. Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, University Hospital and Palacký Uni. in Olomouc
2. Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký Uni. in Olomouc, I.P*

Background: Therapeutic drug monitoring is useful in the management of suboptimal responders for the treatment of patients with several malignant diseases. The aim of this study was to develop and validate a flow injection analysis / tandem mass spectrometry method for the determination of tyrosine kinase inhibitors in plasma from patients with chronic myeloid leukemia and breast cancer.

Methods: The plasma for analysis was deproteinated by methanol and the centrifuged supernatant was directly injected. Analyses were performed in methanol with the addition of formic acid at a flow rate of 0.30/0.03 mL/min. Multiple reaction monitoring and MRM3 modes on a hybrid triple quadrupole - linear ion trap mass spectrometer (5500 QTRAP) were used for the detection and quantification of imatinib, nilotinib, lapatinib, and dasatinib.

Results: We developed a fast method with a total analysis time of 55 s. The method was successfully validated and applied to the plasma patients' samples. The limits of quantification were less than 5.5 and 1.0 ng/ml for analytes measured in MRM and MRM3 modes, respectively. Imprecisions were lower than 6.9% and the accuracy of the quality control samples ranged between 99.0 and 107.9%. In order to obtain maximum sample throughput we optimized multiple flow injection analysis which enables measuring of 32 samples during 13 minutes. High speed of the method is caused by no delay between analyses.

Conclusions: Flow injection analysis coupled with tandem mass spectrometry allows high-throughput therapeutic drug monitoring of tyrosine kinase inhibitors in plasma. In order to overcome the low sensitivity of dasatinib, MRM3 mode was successfully utilized. The method offers low-cost analyses as a result of its speed and the exclusion of a separation step and can be advantageously applicable in routine clinical practice.

* Korespondence: katerinamicova@gmail.com

PODĚKOVÁNÍ:

This study was supported by grants IGA MZCR NS9949-3 and NT12218 (Ministry of Health of the Czech Republic), MSM 6198959205, LF UP 2011_011 and LF UP 2011-006 (Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic). The infrastructural part of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational programme Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

ThP-031: On-target enrichment of phosphorylated peptides for MALDI mass spectrometry analysis

Lukáš Krásný^{1,2*}, Michael Volný¹, Petr Pompach¹, Marcela Strnadová¹,
Martin Strohalm¹, Petr Novák¹, Vladimír Havlíček¹

1. Institute of Microbiology, Academy of Science CR

2. Institute of chemical technology, Prague

Despite many years of research in the field of phosphopeptide enrichment, no ultimate technique has been developed and new methods are still being introduced. The so-called affinity techniques are based on the phosphate interaction with the solid substrates and more recently, methods focused on the direct enrichment on the MALDI surface prior to the mass spectrometry analysis are in the foreground [1,2]. Their main advantage is a small sample volume consumption and possibility of automation. The principal problem is the preparation of the modified MALDI surface. In this work we present a new method for modification of MALDI plates by electrospray-based deposition of different metal-oxides. This makes it possible to prepare the spots with a large active surface, but stable enough to undergo several steps of washing, which are needed for the enrichment procedure. We present the description of the surface preparation technology together with proof of principle experiments that were performed on the tryptic digest of casein and phosphorylated trehalase.

* Korespondence: luckyredswift@seznam.cz

LITERATURA:

1. Han G. et al: Analyst 133, 1128-1138 (2008).
2. Qiao L. et al: J. Proteome Res. 6, 4763-4769 (2007).

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LC7017 and LC545) and by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Institutional Research Concept AV0Z50200510).

ThP-032: A novel approach enabling better characterization of membrane proteins composition

Vojtěch Jurga ^{1*}, Lucie Maršálová ¹, Peter Koník ², Radovan Hynek ¹

1. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

2. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

The plasma membrane is an organized system that plays a structural role and functions as a communication interface with the extracellular environment for the exchange of information and substances. Integral membrane proteins (IMP) control many primary cellular functions such as metabolite and ion transport, endocytosis, and cell differentiation and proliferation. Therefore, regardless of samples' origin, a better understanding of the plasma membrane proteome would greatly improve our insight into miscellaneous biochemical processes. However, the often extremely hydrophobic nature of IMPs obstructs their analysis by classic proteomic methods so we developed new approach towards identification and quantification of membrane proteins in complex mixtures. Prior to digestion and mass-spectrometric analysis of peptides, samples are fractionated by reversed-phase chromatography on C4 resin, thus lowering their complexity and reducing hydrophilic contamination.

Using described technique together with LC/Q-TOF analysis, we were able to identify more than 100 proteins from the membrane fraction of *Arabidopsis thaliana* cell culture and, using computational methods, to predict their transmembrane regions.

To prove wider applicability of said method, we isolated the membrane portions of differentiated polarized Caco-2 human intestinal epithelial cells monolayer. The cells grew either with or without the presence of ethanol, thus simulating conditions also in the proximal part of the intestine of alcoholics. We were able to identify several proteins specific for the apical or basal lateral membrane; also, we detected several proteins, the expression levels of which change due to the presence of ethanol in culture media.

* Korespondence: jurgav@vscht.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Financial support from grant no. 203/09/0036 from Grant Agency of the Czech Republic, specific university research (MSMT no. 21/2011) and grant no. 6046137305 from the Czech Ministry of Education is gratefully acknowledged.

ThP-033: Hledání interakce cytochromu P-450 2B4 S cytochromem b₅ v membránové oblasti metodami fotoafinitního značení a hmotnostní spektrometrie

Tomáš Ječmen^{1,2,*}, Monika Koberová², Petr Novák^{1,2}, Karel Berka³, Vladimír Havlíček^{1,3}, Miroslav Šulc^{1,2}

1. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

2. Univerzita Karlova v Praze

3. Univerzita Palackého v Olomouci

Savčí cytochromy P-450 (P450) jsou membránové proteiny, které se v organismu podílejí na detoxikaci cizorodých látek, metabolismu léčiv a bohužel i aktivaci některých karcinogenů. Jejich aktivita může být pozměněna interakcí s redoxním partnerem cytochromem b₅ (cyt b₅). Detailní mechanismus a míra ovlivnění nejsou dosud objasněny a pravděpodobně se odvíjí od prostorového uspořádání obou cytochromů. Proto znalost jejich terciární struktury a vzájemné orientace může přispět k objasnění tohoto strukturního mechanismu a tedy i účinku P450. Struktura cytosolárních domén těchto membránových proteinů je intenzivně studována řadou metod. Pro biofyzikální limitace však není většina z nich vhodná pro určování třídimenzionální struktury či vzájemné interakce hydrofobních domén zanořených v lipidové membráně. Tuto experimentálně obtížně dostupnou oblast se snažíme studovat metodou fotoafinitního značení ve spojení s identifikací označených aminokyselin pomocí hmotnostní spektrometrie.

Rekombinantní expresí v limitním médiu se nám do membránové části sekvence cyt b₅ (pozice 96, 126 a 131) podařilo začlenit na místo methioninu jeho analog - fotomethionin. Od postranního řetězce fotomethioninu cyt b₅ se vlivem UV záření odštěpuje inkorporovaný diazirin za vzniku reaktivního radikálu, který se váže na molekuly v blízkém okolí (např. interagující hydrofobní část P450 2B4). Metodou fotoafinitního značení jsme vytvořili kovalentní komplex P450 2B4:cyt b₅ patrný na 1D elektroforéze. Po jeho proteolýze byly provedeny LC-MS experiment s vysokým rozlišením a LC-MS/MS experiment pro určení zesíťných peptidů, resp. aminokyselinových zbytků. Na základě výsledků bude provedena validace vytvořeného *in silico* modelu obou interagujících proteinů v membráně.

* Korespondence: tomas.jecmen@centrum.cz

PODĚKOVÁNÍ:

MŠMT (LC07017) a (AV0Z50200510).

ThP-034: Proteomic characterization of membrane microdomains of human natural killer cells

Alan Kádek ^{1*}, Petr Man ^{1,2}, Petr Pompach ², Petr Novák ^{1,2}, Karel Bezouška ^{1,2}

1. Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

2. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic

Natural killer (NK) cells are one of the important components of innate immune system, in which they fight against tumors, virally infected or otherwise malformed cells. Their plasma membrane contains regions of specific lipid composition and greater thickness compared to the surrounding membrane. Some immunologically relevant membrane proteins are known to be preferentially accommodated in these membrane microdomains, which are therefore supposed to play a role during cellular polarization and signalization processes.

In this work we isolated membrane microdomains from human NK92MI cell line by TritonX-100 or Brij98 detergent solubilization. Extracts were separated into very light membrane, medium light membrane and heavy fractions using centrifugation in a sucrose density gradient. Protein composition of individual fractions was then analyzed employing a bottom-up proteomic approach by LC-MALDI-TOF/TOF. Protein lists generated in these analyses will contribute to the knowledge about interactions of NK cells with their environment and other cells and should find their use when considering potential candidate proteins for functional studies.

* Korespondence: kadek@biomed.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

This work was financially supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (KJB500200612), institutional research project of the Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic (AV0Z50200510) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (1M0505, LC7017, LC545).

ThP-035: Is it possible to determine the frost resistance of barley using proteomics?

Iva Hlaváčková^{1*}, Sylva Zelenková², Anna Janská²

1. Vysoká škola chemicko-technologická

2. Charles University

Barley (*Hordeum vulgare*) is one of the most important crop plants in the Czech Republic, whose yields are significantly reduced due to unfavourable climatic conditions, mostly by the effect of low temperatures. Winter cultivars of barley differ in resistance to frost, probably thanks to accumulation of some proteins involved in cold-acclimation during autumn. Knowledge of proteins responsible for enhanced frost tolerance might be useful for breeding new resistant cultivars.

We exposed three differently resistant barley cultivars (Atlas, Igrí and Luxor) to various periods of low temperatures. Proteins from leaves were extracted with trichloroacetic acid and SDS/phenol and they were separated using 2D-electrophoresis. Resulting protein maps were evaluated with image analysis and as a result significant differences in protein abundance were found at 10-15 % proteins out of total count on each gel. Most of them were more abundant after low temperatures treatment. Differently accumulated proteins were identified by Peptide mass fingerprinting method using MALDI-TOF mass spectrometry.

Functional analysis of identified proteins revealed accumulation mainly of proteins involved in carbohydrate metabolic processes, oxidation and reduction processes and photosynthesis. The highest increase in abundance was found at stress protein “NBS-LRR resistance-like protein RGC144” and SR-rich pre-mRNA splicing activator. Data obtained from these experiments indicate that response of barley to low temperature depends on the cultivar.

* Korespondence: ivahlavackova@gmail.com

PODĚKOVÁNÍ:

This research was supported by project NAZV QH 81287.

ThP-036: Růst vyšších uhlovodíků v atmosféře Titanu C₉H_x2+ + CD₄Jana Vachelová^{1*}, Jana Roithová¹*1. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta*

Dikationty a vícenásobně nabitě ionty jsou zkoumány z hlediska fyzikálních i chemických procesů zejména v prostředí s extrémně nízkými teplotami a tlakem. Za těchto podmínek není tvorba vyšších uhlovodíků zatím vysvětlena. Cílem studie bylo porovnání reaktivity dikationtů generovaných ze tří aromatických prekurzorů (inden, methylfenylacetylen, fenylpropadien). Hlavní metodou byla hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací. Analýzou bylo zjištěno, že neutrální prekurzory poskytují tři typy dikationtů, které byly podrobeny reakci s methanem. Při studii byly sledovány relativní výtěžky iontů vzniklých růstovou reakcí, přenosem hydridu, elektronu a protonu a dále také separací náboje. Vzhledem k vysoce energetickým podmínkám při vzniku dikationtů se očekávalo, že neohledě na strukturu neutrálního prekurzoru se bude vždy tvořit směs různých dikationtů, které budou vykazovat v průměru velmi podobnou reaktivitu. Nicméně studie ukazuje, že generované dikationty si zachovávají určitou identitu v závislosti na neutrálním prekurzoru.

* Korespondence: vachelova.jana@seznam.cz

ThP-037: Cell surface glycoproteome of human neuronal precursors

Jiřina Tylečková^{1*}, Damaris Bausch-Fluck², Rita Hrabáková¹, Kateřina Mairychová¹,
Silvia Maršala³, Martin Maršala³, Hana Kovářová¹, Bernd Wollscheid²

1. Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i., Libečhov, Czech Republic

2. Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zurich, Switzerland

3. Anesthesiology Research Laboratory, UCSD San Diego, USA

Neural progenitor cells (NPCs) are currently extensively tested for their potential in cell-based therapies of neurodegenerative diseases and for the treatment of spinal cord injuries. However, the cellular phenotyping and the isolation of defined populations of NPCs suitable for therapeutic applications remains a challenge due to our limited knowledge of specific cell surface molecules.

In this study, we applied the Cell Surface Capturing (CSC) technology [1] in combination with label-free quantitative proteomic workflows to create surfaceome maps of human embryonic stem cells (HUES-7) – derived NPCs, HUES-7 – derived NPCs during neural differentiation and mature postmitotic hNT neurons. The analysis revealed 680 N-glycoproteins on the cell surface which could be relatively quantified between the three selected cell populations. Apart from 53 CD annotated proteins, we identified 627 non-CD annotated proteins. In addition, 1774 N-glycosylation sites were identified, many of them previously unannotated for NPCs. The comparison of the established surfaceome maps revealed changes in expression of already known cell surface markers like CD133 and CD56 between neuronal precursors and postmitotic neurons, which shows the complementary nature of this relative quantitative approach. Apart from the rediscovery of previously tested molecules we identified a set of unknown and/or untested cell surface markers of neuronal differentiation. Classes of upregulated proteins on NPCs include cell adhesion proteins like cadherins and protocadherins as well as proteins involved in developmental processes like glypicans. Upregulated proteins on mature neurons comprise certain ion channels or different types of neuronal adhesion molecules. The emergence of a relative quantitative NPC surfaceome barcode provides a basis for their in-depth characterisation and upon separation, for the functional analysis of distinct NPC subsets.

* Korespondence: tyleckova@iapg.cas.cz

LITERATURA:

1. Wollscheid B. et al.: *Nature Biotechnology* 27, 378-386 (2009).

PODĚKOVÁNÍ:

We acknowledge support from the Czech Ministry of School and Education ME 10044; Institutional Research Concept AV0Z50450515 (IAPG) and European Science Foundation FFG programme #2957.

ThP-038: Optimization of selective enrichment of phosphopeptides from the mixture

Aleš Tichý^{1,2*}, Barbora Šalovská^{1,2}, Pavel Řehulka³, Ivo Fabrik³, Jiřina Vávrová¹,
Jiří Stulík³, Lenka Hernychová³

1. *Katedra radiobiologie, Univerzita Obrany, Hradec Králové*
 2. *Ústav lékařské biochemie, Univerzita Karlova, Hradec Králové*
 3. *Ústav molekulární patologie, Univerzita Obrany, Hradec Králové*
-

Mass spectrometry has become a powerful tool for characterization of phosphoproteins, however, there is a general need to significantly enrich the phosphopeptide content to compensate their low abundance, insufficient ionization, and non-phosphorylated peptides suppression effects.

The aim was to compare efficiency of selective enrichment of phosphopeptides as essential pre-purification using metal oxide affinity chromatography on titanium oxide (TiO₂) in microtubes and in “house-made” tips and further to compare commercial tips NuTip (TiO₂/ZrO₂ 1:1) a TopTip (TiO₂, TiO₂/ZrO₂ 1:1 a ZrO₂ - Glygen) and to evaluate their application in analysis of complex biological samples. Selectivity towards phosphopeptides was tested on a mixture of bovine proteins α/β -casein (90/10 %), fetuin, myoglobin, and serum albumin in ratio 1:1:5:5 and 1:1:50:50, respectively. The obtained eluates were analyzed by tandem mass spectrometry (MALDI- TOF/TOF) on ABI 4800 in positive reflectron mode.

The commercial NuTips have shown the highest selectivity towards phosphopeptides. Enrichment in microtubes (according to partially modified protocol of Larsen et al., 2005) and “house-made” TiO₂ tips outperformed the least effective TopTips. Phosphopeptide enrichment with NuTips will be used in the further study of phosphoproteome of human leukaemic cell after exposure to ionizing radiation.

* Korespondence: tichy@pmfhk.cz

LITERATURA:

1. Larsen MR et al.: J. Mol. Cell. Proteomics 4(7), 873-886 (2005).

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by Ministry of Defence of Czech Republic (project MO0FVZ0000501).

ThP-039: Surface mapping of plant oil bodies

Martina Vermachová ^{1*}, Petra Junková ¹, Jiří Šantrůček ¹, Zita Purkrťová ¹, Pascale Jolivet ², Thierry Chardot ², Milan Kodíček ¹

1. VŠCHT Praha

2. INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles, France

Oil bodies are plant lipoprotein particles that act as energy and carbon reserves for seed germination. To examine their structure arrangement within oil bodies, we chose surface mapping – a method based on the chemical modifications of particular amino acids subsequently identified by MS. It enables recognition of protein parts localized directly on the surface of oil bodies.

Oil bodies isolated from seeds of *Arabidopsis thaliana* were treated with the reagent specific for certain amino acid; proteins were separated by SDS-PAGE and in-gel digested by trypsin or chymotrypsin. Modifications of particular residues were identified as mass shifts within MS spectra obtained using MALDI-TOF MS or LC-MS/MS.

Firstly, we accomplished the modification of lysine, which is well established and the reaction conditions are easy to find. It enabled us, for the first time, to compare the arrangement of individual oil bodies proteins, namely caleosin and oleosins. Encouraged with this result, we focused on the modification of other amino acids, especially tyrosine, arginine, and aspartate and glutamate. However, to achieve as good results as for lysines, it was necessary to find a different way of removing the excessive reagent after the reaction; for this purpose we used a technique based on centrifugation and the fact that the proteins are “immobilized” in the oil, which floats on the supernatant.

Thanks to this approach, several modifications were identified reliably. The results completed the earlier data and let us to suggest a model of individual protein arrangement in and on the surface of oil bodies. The differences between the protein structures, which are in contrast with their high homology, may explain the complexity of oil bodies' protein coat.

* Korespondence: martina.vermachova@vscht.cz

LITERATURA:

1. Vermachova M. et al.: Proteomics 11(16), 3430-3434 (2011).
2. Santrucek J. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 323(4), 1151-1156 (2004).

PODĚKOVÁNÍ:

Financial support from the Specific University Research (MSMT No. 21/2011) and from Czech Ministry of Education (No. 6046137305 and LC06034) is kindly acknowledged.

ThP-040: Investigation of palladium chloride - triphenylphosphine system in acetonitrile solution by ESI-MS: utilization of charge-tagged phosphine ligand

Vojtěch Šádek^{1*}, Detlef Schröder¹

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Palladium chloride is a common precursor for many palladium-based catalysts. Organic mechanisms assume the metal-containing species to be in mononuclear form even when it is well known, that palladium has strong tendency to form oligonuclear clusters. In the previous work were detected clusters of $\text{Pd}_n\text{Cl}_2n-1(\text{MeCN})_x^+$ ($n=2-5$, $x=2-4$) and $\text{Pd}_n\text{Cl}_2n+1^-$ ($n=1-11$) in solution of PdCl_2 in acetonitrile by ESI-MS and conductometry¹ and Agrawal D. *et al.* showed², that oligonuclear palladium-containing intermediates of Suzuki–Miyaura Cross-Coupling have also high catalytic activity.

Basics of behavior of palladium-containing species in solution is now investigated by speciation of more complex solutions of PdCl_2 with phosphine ligand in acetonitrile. Addition of triphenylphosphine triggers exchange of solvent molecules to form $\text{Pd}_n\text{Cl}_2n-1(\text{PPh}_3)_x^+$ ($n=1-5$, $x=2-4$) and $\text{Pd}_n\text{Cl}_2n+1(\text{PPh}_3)^-$ ($n=1-9$ in measured mass range).

Charge-tagged phosphine ligand (with one sulfonated aryl group) was used to investigate the formation of palladium-containing complexes in acetonitrile solution. This simple experiment allowed detecting also formally neutral complexes via mass spectrometric means. Results showed again large degree of formation of multinuclear clusters, which means, that clusters are formed not only from dissociated molecules but also from neutral species. Further knowledge of the character of the solution was gained by experiments with variation of ratio of regular and sulfonated triphenylphosphine.

* Korespondence: sadek@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Šádek V. *et al.*: *Int. J. Mass Spec.* 304(1), 9-14 (2011).
2. Agrawal D. *et al.*: *Organometallics* 30(13), 3579–3587 (2011).

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z40550506) and the European Research Council (AdG HORIZOMS).

ThP-041: Analýza kyseliny polyakrylovej pomocou nanoDESI a HPLC/MS

Kristína Slováková^{1*}, Lucie Hartmanová¹, Vladimír Havlíček², Karel Lemr¹

1. Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

2. Ústav mikrobiologie, Akadémia vied Českej republiky

Kyselina polyakrylová (PAA) tvorí v dnešnej dobe jeden z potenciálnych enviromentálnych problémov. Jej časté priemyselné použitie si žiada vyvinúť analytickú metódu, ktorá bude rýchla, reprodukovateľná a cenovo dostupná.

K ionizácií PAA bol použitý desorpčný nioelektrosprej (nanoDESI) [1,2] a elektrosprej (ESI), zmes oligomérov bola separovaná vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) a detekovaná hmotnostnou pektrometriou (MS). Bola použitá iontová pasť LCQ DUO a pre spojenie HPLC/MS iontová pasť LCQ classic (oboje Thermo Finnigan, San Jose, USA). K chromatografickej separácii bol použitý kvapalinový chromatograf Agilent 1100 Series a chromatografická kolóna Phenomenex (Gemini 5 μm C18 110 A), ako mobilná fáza bola použitá zmes acetonitrilu a vody v pomere 30:70.

Oba použité iontové zdroje za vhodných podmienok (voľba sprejovacej kvapaliny respektíve použitého rozpúšťadla) umožňujú dosiahnuť efektívnu ionizáciu vzorky PAA v pozitívnom aj negatívnom móde. Výsledky priamej analýzy ukazujú na prítomnosť viacerých oligomérnych sérií, ktoré sa líšia koncovou skupinou. HPLC/MS experiment umožnil vzorku separovať na 2 frakcie, z nich u jednej bola ako koncová skupina zistená laktám kyseliny 4-methyl-4-hydroxypentanovej (identita bola potvrdená pomocou fragmentácie a merania presnej a správnej hmotnosti). U druhej frakcie, ktorá je vo vzorke v menšom zastúpení, sa na identifikácii koncovkej skupiny pracuje.

Dosiahnuté výsledky sú východiskom pre vývoj HPLC/MS metódy, ktorá umožní analýzu priemyselných vzoriek a vzoriek životného prostredia.

* Korespondence: slovakova.kristina@gmail.com

LITERATURA:

1. Ranc V. et al.: Chem. Listy 101, 524 (2007).
2. Ranc V. et al.: Eur. J. Mass Spectrom. 14, 411 (2008).

POĎĚKOVÁNÍ:

Ďakujeme za podporu: Ministerstvu školstva, mládeže a telovýchovy Českej republiky (MSM6198959216 a ME10013) a Univerzite Palackého v Olomouci (PRF_2011_025).

ThP-042: Dendritic cells protein phosphorylation response in early stages of infection by fully virulent *Francisella tularensis* FSC200 and its attenuated DsbA mutant strain

Ivo Fabrik ¹*, Anetta Härtlová ², Marek Link ¹, Adéla Strašková ², Pavel Řehulka ¹, Jiří Stulík ¹

1. Institute of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence

2. Centre of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence

Preferential hosts for a highly infectious intracellular pathogen *Francisella tularensis* are professional phagocytes. From them, macrophages present the most widely used experimental model in host-pathogen interaction studies. However dendritic cells (DC), another professional phagocytes, are also susceptible to *Francisella* infection [1]. Compared to macrophages, DCs are more efficient in the antigen presenting and in the priming of adaptive immune response machinery. Thus, an outcome of DC-*Francisella* interaction could affect immune response on a whole organism level. Unfortunately, very little is known about molecular processes triggered upon DC-*Francisella* encounter. Therefore, to uncover host signaling events involved in the early stages of interaction, we have decided to compare protein phosphorylation profiles of DCs infected either by virulent *Francisella tularensis* FSC 200 or by its attenuated strain with a deletion of gene encoding disulphide oxidoreductase (DsbA). As model host cells, DC derived from bone marrow progenitors were chosen. Multiplicity of the infection was 100. Time interval for DC-*Francisella* interaction was set on 5 minutes which was shown as optimal for an observation of early cellular responses. After cell lysis and digestion, phosphopeptides were enriched using TiO₂ microbeads. Following sample separation was carried out by a reverse-phased nanoLC system with off-line connected MALDI-TOF/TOF mass spectrometer for protein identification. Phosphopeptides were distinguished by the neutral loss of 98 u in MS/MS analysis. Moreover, also dephosphorylated peptides resulting from the alkaline phosphatase treatment were fragmented to increase reliability of the phosphopeptide assignment. Identified phosphoproteins were finally subjected to Gene Ontology annotation and categorized according their biological function.

* Korespondence: fabrik@pmfhk.cz

LITERATURA:

1. Bar-Haim E. et al.: PLOS Pathogens 4, 1-15 (2008).

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by Project NR 9747 from Ministry of Health of Czech Republic and by specific research project from Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic.

ThP-043: Zobrazování kutikulárních lipidů octomilky obecné prostřednictvím LDI/MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Filip Kaftan^{1,2*}, Vladimír Vrkoslav¹, Josef Cvačka¹, Aleš Svatoš³

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Vědecko-servisní tým MS, Česká republika
 2. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Česká republika
 3. Max Planck Institut für chemische Ökologie, Skupina hmotnostní spektrometrie, Německo
-

Pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie byla studována a zobrazena prostorová distribuce kutikulárních lipidů na celém povrchu těla much octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*).

Za účelem studia morfologie povrchu much a stejně tak charakteru nanesené matrice na vzorcích (v případě MALDI-TOF experimentů) byla použita rastrovací elektronová mikroskopie.

Poměrné zastoupení kutikulárních lipidů na jednotlivých částech těla much bylo pomocí zobrazovací hmotnostní spektrometrie sledováno například u triacylglycerolů, ale i dalších lipidů. Kromě toho byla pozornost věnována přenosu samčího anti-atraktantu a zároveň agregačního faktoru (Z)-oktadec-11-enyl acetátu, který je fyziologicky lokalizován na špičce samčího abdomenu a který samec po úspěšné kopulaci, jako biologicky aktivní látku, nanáší na samičí abdomen.

Jednotlivé experimenty byly provedeny jak v režimu LDI-TOF, tak MALDI-TOF s využitím hmotnostního spektrometru MALDI micro MX (Waters, USA). V případě MALDI-TOF byla jako matrice použita lithná sůl kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové [1], která byla na vzorky sprejována pomocí rozprašovací pistole [2]. Pro úspěšné MALDI zobrazování 3-D biologického objektu byla navržena speciální kovová MALDI deska s profilovanými jamkami zajišťující správnou výškovou fixaci a prostorovou orientaci samců i samic octomilky na desce.

* Korespondence: filip.kaftan@gmail.com

LITERATURA:

1. Cvačka J. et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 17(19), 2203-2207 (2003).
2. Vrkoslav V. et al.: J. Am. Soc. Mass 21(2), 220-231 (2010).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru Z4 055 0506, projektu SVV 2011-263204 a grantů GA ČR č. P206/10/P018 a 203/09/0139.

ThP-044: Defining heterogeneity of clustered O-glycans from the hinge region of human IgA1 by use MALDI-TOF/TOF mass spectrometry

Vojtěch Franc^{1,2*}, Pavel Řehulka³, Marek Šebela^{1,2}, Jan Novák⁴

1. Palacký University in Olomouc

2. Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research

3. Institute of Molecular Pathology, University of Defence, Hradec Králové

4. University of Alabama at Birmingham

A variety of proteins is posttranslationally modified with clustered sites of O-glycosylation. The protein with clustered O-glycans isolated from a single source represents a population of variably O-glycosylated isoforms that usually show a distinct distribution of microheterogeneity in terms of number of chains, the sites of attachment and O-glycan composition at given amino acid. Characterizing these clustered sites and understanding how the distribution changes under different biological conditions or disease states is an analytical challenge. Aberrantly glycosylated immunoglobulin alpha 1 (IgA1), with galactose (Gal)-deficient hinge region (HR) O-glycans, plays a key role in the pathogenesis of the disease IgA nephropathy (IgAN) [1]. Identification and determination of glycan composition in the HR is therefore an important task for better understanding of the disease mechanism and for potential diagnostic purposes. A recombinant polymeric immunoglobulin alpha 1 (pIgA1) showing galactose deficiency in O-glycans from HR was used to mimic the authentic protein produced by patients with IgAN. The performed research focused on the optimization of sample preparation for enzymatic digestion and mass spectrometric analysis, where a proper cysteine alkylation in combination with SDS-PAGE protein separation and reversed-phase liquid chromatography peptide separation played a key role for the successful mass spectrometry analysis of studied O-glycopeptides. Results obtained from MALDI-TOF and TOF/TOF mass spectrometry were in a good agreement with data from previous FT-ICR mass spectrometry measurements [2]. The MALDI-TOF MS profile of O-glycopeptides showed the distribution of various glycoforms present in the pIgA1 sample and the corresponding MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry analysis confirmed the modification sites. The results also helped to identify the sites with the possible preferential galactose deficiency in O-glycosylation.

* Correspondence: franc.v@centrum.cz

LITERATURA:

1. Renfrow M.B. et al.: J. Biol. Chem 280, 19136-19145 (2005).
2. Takahashi K. et al.: Mol. Cell Proteomics 9, 2545-2557 (2010).

PODĚKOVÁNÍ:

The financial support of grant no. MSM6198959216 from the Ministry of Education, Youth and Sports and institutional research plan no. MO0FVZ0000501 from the University of Defence are gratefully acknowledged.

Adam Tomáš	FrO-019	Fabrik Ivo	ThP-038
Adam Tomáš	ThP-029	Fabrik Ivo	ThP-042
Adam Tomáš	ThP-030	Faltýsková Helena.....	ThO-012
Alcaraz Christian	ThP-003	Fernandez-Diez Eva	ThO-010
Allmaier Guenter	PL-1	Foltynová Pavla	FrO-018
Balík Josef.....	ThO-014	Forest Eric	ThO-007
Balík Josef	ThP-024	Foret František	ThO-005
Balík Josef	ThP-025	Forge Vincent.....	ThO-007
Balonova Lucie.....	ThP-017	Franc Vojtěch	ThP-044
Barták Petr	ThO-014	Franěk Lukáš.....	ThO-015
Barták Petr	ThP-024	Friedecký David	FrO-019
Barták Petr.....	ThP-025	Friedecký David	ThP-030
Bausch-Fluck Damaris.....	ThP-037	Glosík Juraj	WeO-002
Bednář Petr	ThO-011	Hajšlová Jana	ThO-013
Bednář Petr	ThO-014	Hakimi Bejan	ThP-004
Bednář Petr	ThP-014	Halada Petr.....	ThO-007
Bednář Petr	ThP-024	Halada Petr	ThP-028
Bednář Petr	ThP-025	Hanikýřová Eva	ThP-026
Bednářik Antonín	ThP-027	Hanus Robert	ThP-009
Běláková Sylvie.....	ThP-007	Härtlová Anetta.....	ThP-042
Běláková Sylvie.....	ThP-013	Hartmanová Lucie.....	ThO-011
Benešová Karolína	ThP-007	Hartmanová Lucie	ThP-041
Benešová Karolína	ThP-013	Havlíček Vladimír.....	ThO-011
Berka Karel	ThP-033	Havlíček Vladimír.....	ThO-012
Bezouška Karel	ThP-015	Havlíček Vladimír	ThP-016
Bezouška Karel	ThP-020	Havlíček Vladimír	ThP-028
Bezouška Karel	ThP-034	Havlíček Vladimír	ThP-031
Bot Marek.....	ThP-022	Havlíček Vladimír	ThP-033
Bouchara Jean-Philippe	ThP-028	Havlíček Vladimír	ThP-041
Bourguignon Thomas	ThP-009	Hernychova Lenka	ThP-017
Bugovsky Stefan	PL-1	Hernychová Lenka	ThP-038
Bunceck Martin	ThP-017	Hlaváčková Iva	ThP-035
Cífková Eva	ThP-010	Hlídková Eva	FrO-019
Cvačka Josef	ThO-009	Holčapek Michal	ThO-015
Cvačka Josef.....	ThP-009	Holčapek Michal	ThP-010
Cvačka Josef.....	ThP-012	Holčapek Michal	ThP-011
Cvačka Josef.....	ThP-018	Holčapek Michal	ThP-021
Cvačka Josef.....	ThP-043	Hrabáková Rita	ThP-037
Čajka Tomáš.....	ThO-013	Hron Karel	FrO-019
Česla Petr.....	ThP-002	Hubálek Martin	ThP-006
Česlová Lenka	ThP-002	Hůlková Helena	ThO-012
Doležal Antonín	ThP-018	Hynek Radovan	ThP-019
Dombek Václav	ThO-016	Hynek Radovan	ThP-032
Dostálová Eva	ThP-029	Chardot Thierry	ThP-039
Dresler Jiří	ThP-006	Chiu Daniel	ThP-004
Dryahina Kseniya.....	WeO-004	Chung Thomas W.	PL-2
Dvořáková Hana	ThO-015	Ingr Marek	ThP-017
Ehrenbergerová Jaroslava.....	ThP-007	Jaklová Dytřtová Jana	ThO-008
Ertl Lukáš.....	ThP-027	Jandera Pavel	ThP-002
Faber Edgar	ThP-030	Janečková Hana	FrO-019

Janečková Jana	ThO-006	Mičová Kateřina	ThP-030
Janská Anna	ThP-035	Mičuda Stanislav	ThP-023
Jašíková Lucie	WeO-003	Míková Radka	ThP-018
Ječmen Tomáš	ThP-028	Mikšová Alena	ThP-023
Ječmen Tomáš	ThP-033	Mikulíková Renata	ThP-007
Jedličková Veronika	ThP-021	Mikulíková Renáta	ThP-013
Jirasko Robert	ThO-010	Moskovets Eugene	ThP-027
Jirásko Robert	ThP-021	Moss Christopher L.	PL-2
Jiroš Pavel	ThP-009	Myjavcová Renáta	ThO-014
Jolivet Pascale	ThP-039	Myjavcová Renáta	ThP-014
Junková Petra	ThP-019	Netušilová Kateřina	ThO-015
Junková Petra	ThP-039	Netušilová Kateřina	ThP-011
Jurga Vojtěch	ThP-032	Novák Jan	ThP-044
Kádek Alan	ThP-034	Novák Petr	ThO-007
Kaftan Filip	ThP-043	Novák Petr	ThO-012
Kanický Viktor	FrO-018	Novák Petr	ThP-015
Kavan Daniel	ThO-007	Novák Petr	ThP-020
Kmetov Veselin	ThO-010	Novák Petr	ThP-028
Koberová Monika	ThP-033	Novák Petr	ThP-031
Kodíček Milan	ThP-039	Novák Petr	ThP-033
Kolouchová Gabriela	ThP-023	Novák Petr	ThP-034
Koník Peter	ThP-032	Nováková Lucie	FrO-017
Kovářová Hana	ThP-037	Nováková Lucie	ThP-023
Krásný Lukáš	ThP-031	Nováková Michaela	ThP-006
Křen Vladimír	ThO-014	Nováková Petra	ThP-024
Kučař Ladislav	ThO-012	Nováková Petra	ThP-025
Kučař Ladislav	FrO-020	Papoušková Barbora	ThO-011
Kukačka Zdeněk	ThP-020	Papoušková Barbora	ThO-014
Kurka Ondřej	ThP-014	Papoušková Barbora	ThP-024
Lemr Karel	ThO-011	Papoušková Barbora	ThP-025
Lemr Karel	ThO-014	Pavlásková Kateřina	ThP-016
Lemr Karel	ThP-024	Pavlásková Kateřina	ThP-028
Lemr Karel	ThP-025	Peš Ondřej	FrO-018
Lemr Karel	ThP-041	Přša Libor	ThP-006
Link Marek	ThP-042	Pittenauer Ernst	PL-1
Lísa Miroslav	ThO-015	Plavka Richard	ThP-018
Lísa Miroslav	ThP-010	Pluháčková Helena	ThP-007
Lísa Miroslav	ThP-011	Polasek Miroslav	ThP-003
Liu Dingsheng	ThP-004	Pompach Petr	ThP-015
Lojkásek Milan	ThO-016	Pompach Petr	ThP-020
Mairychová Kateřina	ThP-037	Pompach Petr	ThP-031
Man Petr	ThO-007	Pompach Petr	ThP-034
Man Petr	ThP-015	Preisler Jan	FrO-018
Man Petr	ThP-020	Preisler Jan	ThP-027
Man Petr	ThP-034	Purkrťová Zita	ThP-039
Marhol Petr	ThO-014	Rabatinová Martina	ThP-023
Marchetti-Deschmann Martina	PL-1	Ranc Václav	ThO-011
Maršala Martin	ThP-037	Rážová Iva	ThP-027
Maršala Silvia	ThP-037	Rey Martial	ThO-007
Maršalová Lucie	ThP-032	Riddelová Kateřina	ThO-013

Roithová Jana	WeO-003	Tichý Aleš	ThP-038
Roithová Jana	ThP-001	Tomalová Iva	ThP-027
Roithová Jana	ThP-026	Tomšej Tomáš	ThO-016
Roithová Jana	ThP-036	Tsybizova Alexandra	ThP-008
Rolfs Joelle	ThP-004	Tureček František	PL-2
Romanzin Claire	ThP-003	Tureček František	ThP-004
Rosenberg Erwin	ThO-010	Tylečková Jiřina	ThP-037
Rozbeský Daniel	ThO-007	Ulrichová Jitka	ThO-014
Rozbeský Daniel	ThP-015	Vackova Zuzana	ThP-017
Řehulka Pavel	ThP-038	Václavík Lukáš	ThO-013
Řehulka Pavel	ThP-042	Vaculovič Tomáš	FrO-018
Řehulka Pavel	ThP-044	Vachelová Jana	ThP-036
Řezábková Lenka	ThO-007	Vávrová Jiřina	ThP-038
Safarova Martina	ThP-017	Vejvoda Vojtech	ThP-017
Shestivska Violetta	WeO-004	Vermachová Martina	ThP-019
Schröder Detlef	WeO-001	Vermachová Martina	ThP-039
Schröder Detlef	ThO-008	Vlčková Hana	ThP-023
Schröder Detlef	ThP-008	Vokřál Ivan	ThP-021
Schröder Detlef	ThP-022	Volný Michael	ThO-012
Schröder Detlef	ThP-040	Volný Michael	ThP-004
Skálová Lenka	ThP-021	Volný Michael	ThP-016
Slováková Kristína	ThP-041	Volný Michael	ThP-031
Solich Petr	ThP-023	Vrkoslav Vladimír	ThO-009
Sovová Kristýna	WeO-004	Vrkoslav Vladimír	ThP-009
Stávek Jan	ThO-014	Vrkoslav Vladimír	ThP-012
Stávek Jan	ThP-024	Vrkoslav Vladimír	ThP-018
Stávek Jan	ThP-025	Vrkoslav Vladimír	ThP-043
Strašková Adéla	ThP-042	Wiesner Andreas	ThP-005
Strnadová Marcela	ThP-016	Winkler Wolfgang	PL-1
Strnadová Marcela	ThP-031	Wojtowicz Petr	FrO-019
Strohalm Martin	ThO-007	Wojtowicz Petr	ThP-029
Strohalm Martin	ThO-012	Wollscheid Bernd	ThP-037
Strohalm Martin	ThP-016	Zabka Jan	ThP-003
Strohalm Martin	ThP-031	Zábranská Marie	ThP-012
Stulík Jiří	ThP-038	Zachariadis George A.	ThO-010
Stulík Jiří	ThP-042	Zelenková Sylva	ThP-035
Svatoš Aleš	ThP-043	Zrostlíková Jitka	ThP-029
Svoboda Zdeněk	ThP-007		
Svoboda Zdeněk	ThP-013		
Šádek Vojtěch	ThP-040		
Šalovská Barbora	ThP-038		
Šantrůček Jiří	ThP-039		
Šebela Marek	ThP-044		
Šobotník Jan	ThP-009		
Španěl Patrik	WeO-004		
Šťastná Veronika	ThP-029		
Šulc Miroslav	ThP-016		
Šulc Miroslav	ThP-028		
Šulc Miroslav	ThP-033		
Švidrnoch Martin	ThO-011		

A grid of 20 columns and 30 rows of small dots, intended for taking notes.

A grid of 20 columns and 30 rows of small dots, intended for taking notes.

A grid of 20 columns and 30 rows of small dots, intended for taking notes.

www.shimadzu.eu
shimadzu@shimadzu.eu

Shimadzu Europa GmbH
Albert-Hahn-Str. 6-10
47269 Duisburg, Germany

Phone +49 - 203 - 7687-0
Fax +49 - 203 - 766625

ms-rls.com

**MSⁿ capability
High mass accuracy
Fastest analysis**



Discovery channel

The outstanding LCMS-IT-TOF is the perfect tool for the identification and characterization of unknown molecules, e.g. in biomarker discovery, proteomics or impurity analysis.

- MSⁿ capability
- High mass accuracy and high resolution
- Fastest analysis
- Additional software packages

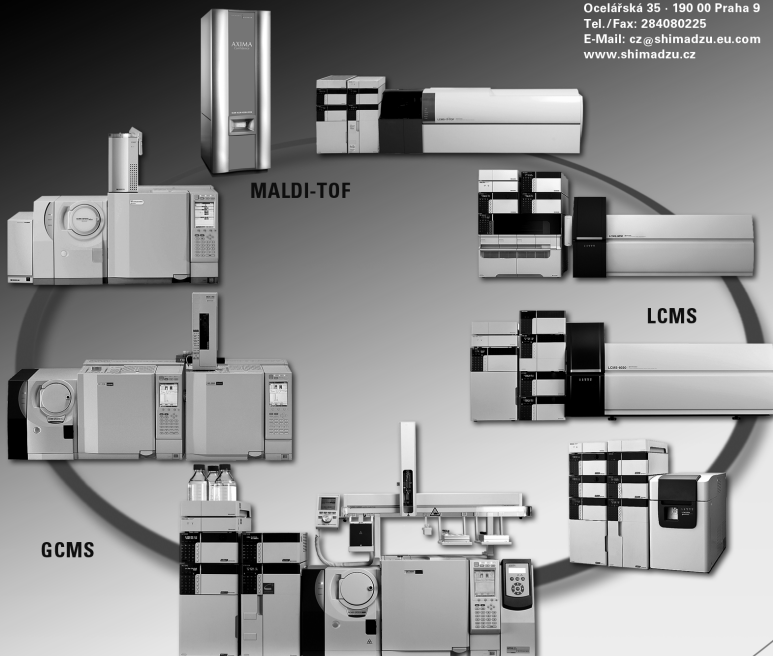
Hybrid mass analyzer combining ion trap and TOF: the LCMS-IT-TOF

www.shimadzu.eu

 **SHIMADZU**
Solutions for Science
since 1875



SHIMADZU Handels GmbH
organizační složka
Tradice a jistota
Ocelářská 35 · 190 00 Praha 9
Tel./Fax: 284080225
E-Mail: cz@shimadzu.eu.com
www.shimadzu.cz



Shimadzu Mass Spectrometry

Nabídka další instrumentace: UV-VIS, FTIR, AAS, ICP, EDX, TOC-TOC/CN



Committed to Your Success

Advanced Mass Spectrometry Solutions



- Ion Trap: amaZon series
- ESI-(Q)-TOF: microTOF series
- UHR-TOF: maXis
- MALDI-TOF(/TOF): flex series
- FTMS: solariX series

Contact us for more details and a system demonstration! www.bruker.com/ms

For research use only.
Not for use in diagnostic procedures.

Proteomics

- Top-down and Bottom-up Strategies
- Flexible Quantitation
- Detailed Intact Protein and PTM Analysis

Biomarker Analysis

- Full MALDI Imaging Solution
- Profiling via LC-MALDI and LC/ESI-MS
- MALDI Biotyper Bacterial ID

Small Molecules/Metabolites

- Fastest Parallel Multitarget Screening
- Forensic Toxicology
- Pesticide and Food Analysis

Target Screening

- LC/MS Based Metabolic Profiling
- Complementary NMR Workflows
- Empirical Formula Determination
- Full Open Access Capability

Innovation with Integrity

Mass Spectrometry

You are ready

Building on industry-leading capabilities, our new line of **mass spectrometers** identify, quantitate and confirm compounds in the most demanding samples. Whether unraveling protein structures, developing new drugs, or analyzing trace pesticides, we help move your science and productivity forward with industry-leading technology and expertise. And as you drive discovery and face new unknowns, our advanced systems and software provide unprecedented confidence in the final result. Whatever challenges arise in the future, you'll be ready.

for the toughest challenges in mass spectrometry

• see our **new line up** at www.thermoscientific.com/ready



© 2011 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

Czech Republic contact: Thermo Fisher Scientific, +420-274820377, analyze.cz@thermofisher.com



Orbitrap™ Elite Hybrid LC-MS
Gold standard for accurate mass and now to 240,000 resolution



Q Exactive Benchtop Orbitrap
High resolution, accurate mass and simultaneous qual/quant



Velos Pro Ion Trap
Fastest, most sensitive ion trap with HCD fragmentation



TSO Quantum XLS Ultra GC-MS/MS
High sensitivity and selectivity in GC and LC triple quadrupole MS