

IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE MONOSACÁRIDOS Y DISACÁRIDOS DIASTEROMÉRICOS NO DERIVATIZADOS POR ESI-IT-MS/MS

IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF UNDERIVATIZED DIASTEROMERIC MONO-AND DISACCHARIDES BY ESI-IT-MS/MS

Guillermo L. MONTOYA P.^{1*}, Alejandra RENDÓN M.¹, Gabriel J. ARANGO A.¹

Recibido: Julio 23 de 2009 Aceptado: Diciembre 03 de 2009

RESUMEN

Los azúcares son importantes moléculas que desempeñan funciones trascendentales de señalización celular en los organismos superiores. Su complejidad estructural, representada por sus isómeros, anómeros y diasterómeros, amerita la implementación de metodologías modernas, rápidas y sensibles para su identificación y diferenciación. La espectrometría de masas y su analizador de trampa de iones brinda nuevas alternativas de análisis que favorecen el control de las energías de fragmentación de los analitos. A pesar de que la diferenciación de estereoisómeros no ha sido el campo de aplicación principal de la espectrometría de masas, se ha implementado una metodología para diferenciar los monosacáridos β -D-galactosa y β -D-glucosa y los disacáridos β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (lactosa), α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (maltosa) y β -D-fructofuranosil-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-glucopiranosido (sacarosa) a través de sus aductos con amonio y litio por ESI-IT-MS/MS en infusión directa. Se emplean diferentes energías de fragmentación para asegurar la existencia de iones marcadores de la estereoquímica de los analitos. Se evidencia que controlar las energías de colisiones en el análisis estructural de moléculas provee una poderosa y moderna herramienta analítica para los laboratorios de análisis.

Palabras clave: electrospray, analizador de trampa de iones, monosacáridos, disacáridos, diasterómeros, espectrometría de masas en tándem.

ABSTRACT

Sugars are important molecules with remarkable cell signals pathway functions in higher organisms. The structural complexity of sugar represented by its isomeric, anomeric and diasteromeric configurations deserve the implementation of modern, rapid and sensitive methodologies for its identification and differentiation. Mass spectrometry and its analyzer of ion trap provide new alternative techniques that encourage the control of the fragmentation energies supplied to molecules. Since stereoisomer differentiation is consider outside the mass spectrometry domain, a methodology has been applied in order to differentiate β -D-galactose, β -D-glucose and the disaccharides β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (lactose), α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (maltose) y β -D-fructofuranosyl-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-glucopyranoside (sacarose) trough its ammonium and lithium adducts by infusion on ESI-IT-MS/MS mass spectrometer. Different fragmentation energies have been used to ensure the ion marker occurrence in the analyte stereochemistry. It is evident that the collision energies control in structural analysis of molecules provides a powerful and modern analytical tool to be applied in control laboratories.

Keywords: electrospray, ion trap analyzer, monosaccharides, disaccharides, diastereomers, tandem mass spectrometry.

1 Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas. Sede de Investigación Universitaria. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: gmontoya@farmacia.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

Desde comienzos de la década de 1980 se ha venido reconociendo el papel preponderante que juegan los azúcares en la naturaleza y en general en los sistemas biológicos. Éstos dejaron de ser simples moléculas del metabolismo primario y comenzaron a ejercer grandes papeles con el resurgir de la proteómica e inmunología debido esencialmente a un gran número de eventos celulares como señalización, reconocimiento de epítopes, e incluso la identificación de células, procesos mediados por secuencias de azúcares (1). Los químicos analíticos, por su parte, que habían abandonado su estudio, implementaron métodos modernos de análisis que permitieran su elucidación estructural sin emplear altas cantidades o procedimientos de derivatización obligatorios por técnicas convencionales. Las características químicas de los azúcares, por lo tanto, se han convertido en formidables retos analíticos que pueden ser abordados por la espectrometría de masas (mass spectrometry -MS) en asociación con las nuevas fuentes de iones como electrospray (ESI), y analizadores como la trampa de iones (ion trap -IT). Esta afirmación se basa en la principal particularidad de estos equipos, que generan iones por medio de energías de colisiones programables, favoreciendo su producción y abundancia, y que, esencialmente, pueden ser empleados como marcadores estructurales (2-5).

El uso de la trampa de iones beneficia enormemente los procesos de elucidación estructural debido a su alta selectividad (más que otros analizadores en tándem) en la fragmentación de un ión precursor, característica que le permite ser extremadamente versátil en la elucidación estructural. Es necesario considerar que estas particularidades en la producción de iones generan espectros mucho más limpios en comparación con otros analizadores, y los pasos de aislamiento y fragmentación adicional incrementarán cada vez más la especificidad y facilitarán por lo tanto, la elucidación estructural de moléculas (6). Las energías de fragmentación (en voltios) de la trampa de iones presentan un rango por defecto del 30 al 200%, sin embargo los equipos presentan por configuración un valor de 1V porque valores tan bajos como 30% (0.3 V) generalmente no son suficientes para fragmentar los iones precursores, y 200% (2 V) es un valor que, por el contrario, genera demasiadas fragmentaciones y dificulta los análisis en muchas estructuras. Por su parte, la fuente de ionización de electrospray es una interfaz cuya generación de iones se realiza a presión atmosférica, y la ionización depende en gran medida de que los analitos sean especies ya ionizadas en solución. Sin embargo, el uso de aditivos como ácido fórmico puede favorecer la ionización, incluso en compuestos típicamente neutros como los azúcares.

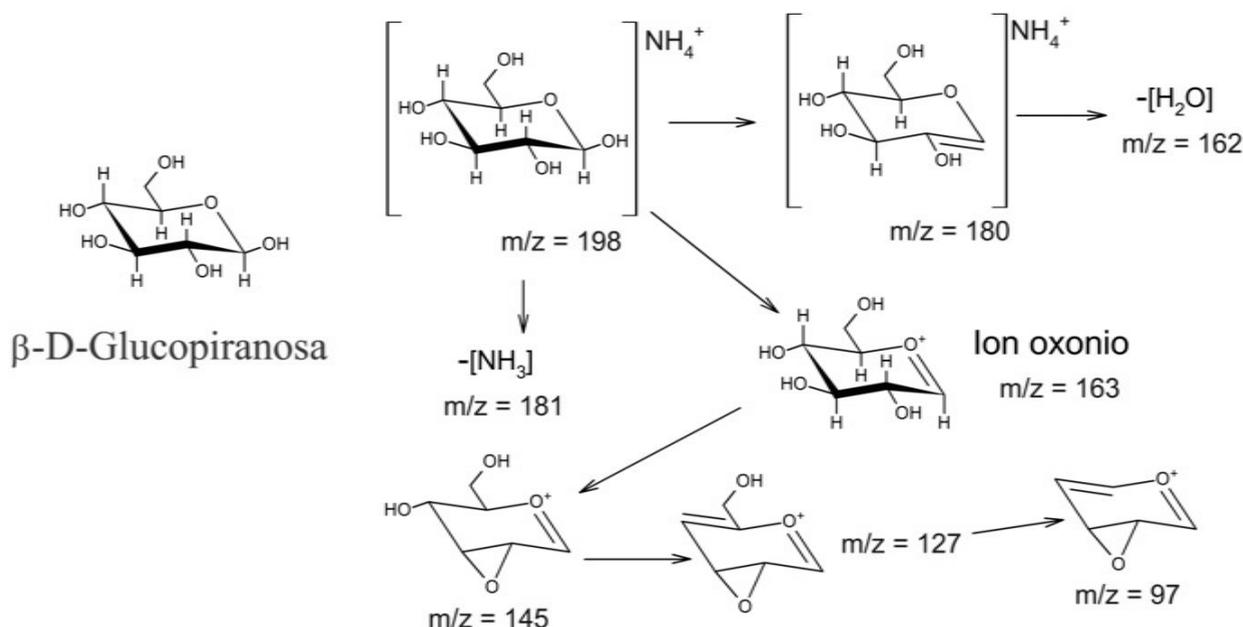


Figura 1. Mecanismo de fragmentación de monosacáridos de la especie protonada y de su aducto con amonio.

Las condiciones de análisis para monosacáridos han sido particularmente bien estudiadas, y muchos reportes desde hace 20 años permiten concluir que, aunque se pueden obtener aductos con metales, la mejor información estructural y estereoquímica que es posible conseguir de un espectro de masas es a través de su aducto con amonio (7, 8). Estudios de marcación con isótopos permitieron conocer la secuencia de deshidrataciones (que comienza en el carbono anomérico) y proponer mecanismos de fragmentación que pueden ser asociados con las reacciones de descomposición que ocurren en los monosacáridos (8, 9) presentados en la figura 1.

Los disacáridos, por su parte, pueden experimentar coordinación con cationes metálicos a través de sus átomos de oxígeno, favoreciendo de manera simultánea la desestabilización del enlace glicosídico. Este aducto exhibe tres reacciones de descomposición debido al incremento de las energías de colisiones.

La primera de ellas muestra cómo es posible que se disocie el catión del disacárido dejándolo sin carga (debido a que es neutro) e impidiendo su observación en el espectro. En segunda instancia es fácil de observar el rompimiento del enlace glicosídico reteniendo la carga en uno de los dos monómeros, y finalmente, incrementando aun más las energías de colisión, será posible observar las fragmentaciones del anillo piránico indicados en la figura 2. Las reacciones de fragmentación de azúcares pueden

ser controladas si se emplean analizadores MS-MS, con los cuales la disociación inducida por colisiones (CID) se modulará de acuerdo con el tipo de información que necesitemos obtener (11). El objetivo de este trabajo es reconocer las fragmentaciones que experimentan los monosacáridos β -D-galactosa y β -D-glucosa, y los disacáridos lactosa, maltosa y sacarosa en ESI-IT-MS/MS por infusión directa, de acuerdo a la figura 3. Este reconocimiento se efectúa optimizando las energías de colisiones para obtener iones que pueden ser aprovechados como marcadores estructurales a través de aductos de amonio y litio para la diferenciación de diastéromeros no derivatizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Espectrometría de masas en tándem

Para los experimentos de infusión directa fue empleado un espectrómetro de masas (Agilent serie 6300) con analizador de trampa de iones y una fuente de ionización por electrospray a una presión de nebulización de 15 psi y un flujo de gas de secado de 5 L/min. La infusión se realizó con bomba de jeringa a un flujo de 600 μ L/h. Los espectros de masas fueron obtenidos en un rango de 50-400 uma. Las mejores condiciones de ionización se obtuvieron por una rampa de energías de fragmentación para cada uno de los compuestos. Las amplitudes de fragmentación fueron variadas desde 0,5 a 2,5 V

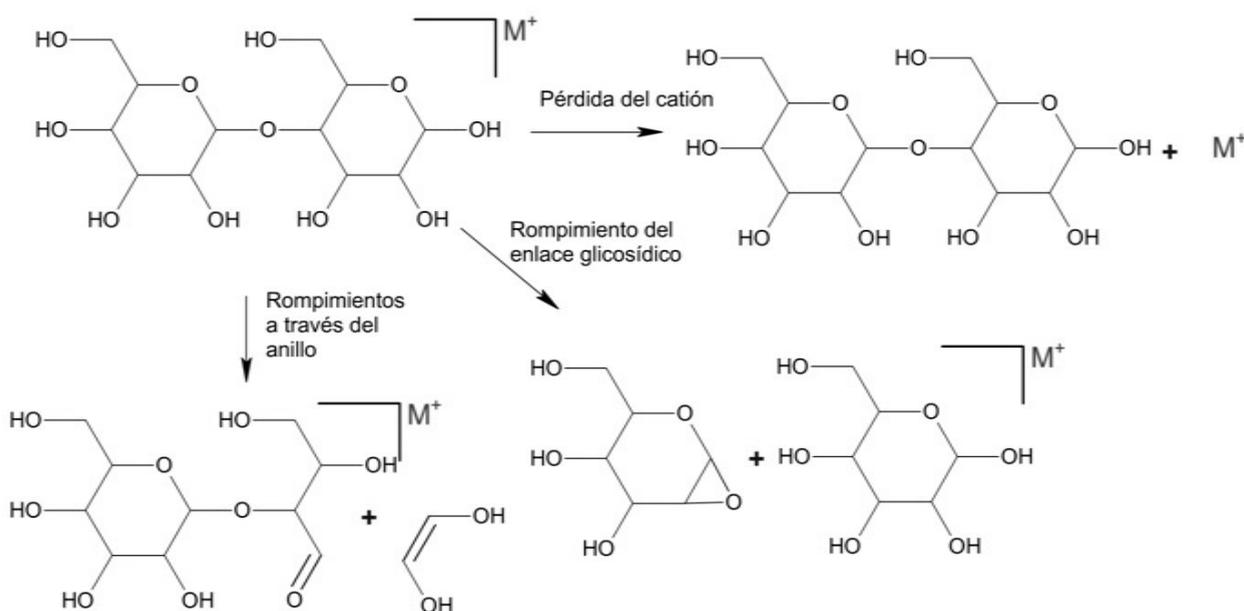
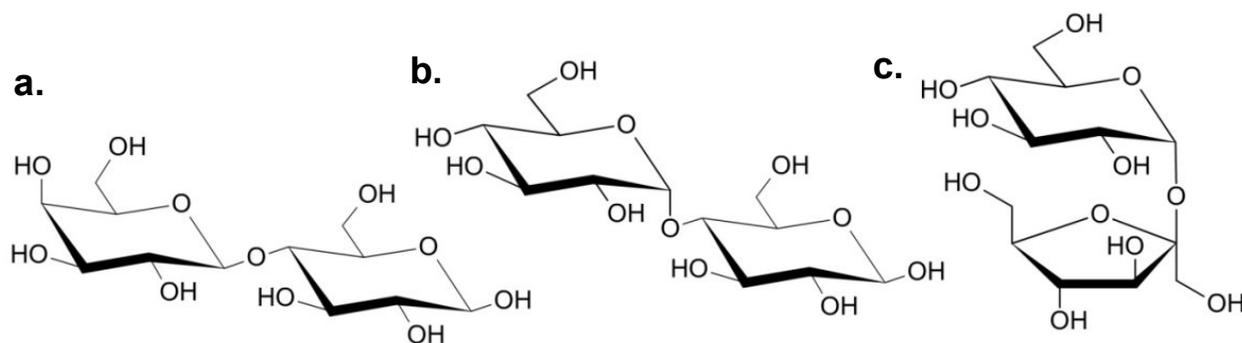


Figura 2. Mecanismos de fragmentación de disacáridos (10).



- a. β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (lactosa) MW = 342.29
 b. α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido (maltosa) MW = 342.29
 c. β -D-fructofuranosil-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-glucopiranosido (sacarosa) MW = 342.29

Figura 3. Disacáridos analizados y su nomenclatura IUPAC.

con el fin de incrementar las energías de colisiones e inducir mayores reacciones de degradación de los analitos, y así obtener diferente información estructural. Los compuestos puros fueron preparados en metanol grado cromatográfico (50%) en una concentración de 10 μ g/mL, con diferentes aditivos para obtener los aductos. Se adicionó acetato de amonio a una concentración de 5mM. El acetato de sodio, el cloruro de potasio y el cloruro de litio fueron preparados a una concentración final de 1×10^{-6} M. Fue adicionado ácido fórmico a una concentración final de 0.1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde la incursión de las interfaces a presión atmosférica, que resolvieron de manera rotunda los inconvenientes del acople LC-MS adicional a los analizadores en tándem que permitieron el control de las energías de fragmentación para manipular las reacciones de descomposición de los analitos (12), la espectrometría de masas se ha convertido en una herramienta que puede ser empleada para diferenciar estereoisómeros (13-15), un campo que había estado por fuera de su dominio. Las reacciones de fragmentación de las especies protonadas de monosacáridos presentan unas reacciones de deshidratación para la formación de iones de gran abundancia (e.j. para la formación del ión oxonio, figura 4b-d), los cuales retienen la configuración estereoquímica (en carbonos diferentes al carbono anomérico) del ión precursor. La disociación inducida por colisiones de este ión (o incluso del ión molecular) produce iones cuyos patrones de abundancia son únicos en cada

estereoisómero. Esta información, por lo tanto, se convierte en la base de un método para identificar o diferenciar analitos que difieren en la configuración espacial (7).

Los espectros de masas con aductos de amonio, de acuerdo a las figuras 4 y 6 proporcionaron patrones de fragmentación en los cuales se obtuvieron iones debidos a las primeras dos deshidrataciones, que fueron empleados como iones marcadores tanto en monosacáridos como en disacáridos. La mayoría de los disacáridos se caracterizaron especialmente por presentar dentro de los iones generados, la especie protonada del analito $[M + H]^+$, la cual, también después de su aislamiento y posterior fragmentación, mostró un patrón de fragmentación, similar al del aducto de amonio (datos no mostrados). Tanto los monosacáridos como los disacáridos evidenciaron que los aductos de cationes metálicos, como sodio y potasio, generan mecanismos de degradación que no permiten obtener iones marcadores evidenciados en las figuras 4a-c. Sin embargo el potasio, debido probablemente a su tamaño, mostró aductos poco estables, los cuales no permitieron ver abundancias de iones en los espectros de MS^2 , probablemente por seguir un mecanismo de reacción de pérdida del catión como se indica en la figura 2 (11).

Diferencias entre glucosa y galactosa

Los iones aducto de ambos monosacáridos $[M + NH_4]^+$ a una m/z 198 fueron aislados y fragmentados para producir el ión $[M + NH_4 - H_2O]$ a una m/z 180 y el ión $[M + NH_4 - H_2O - NH_3]$ a

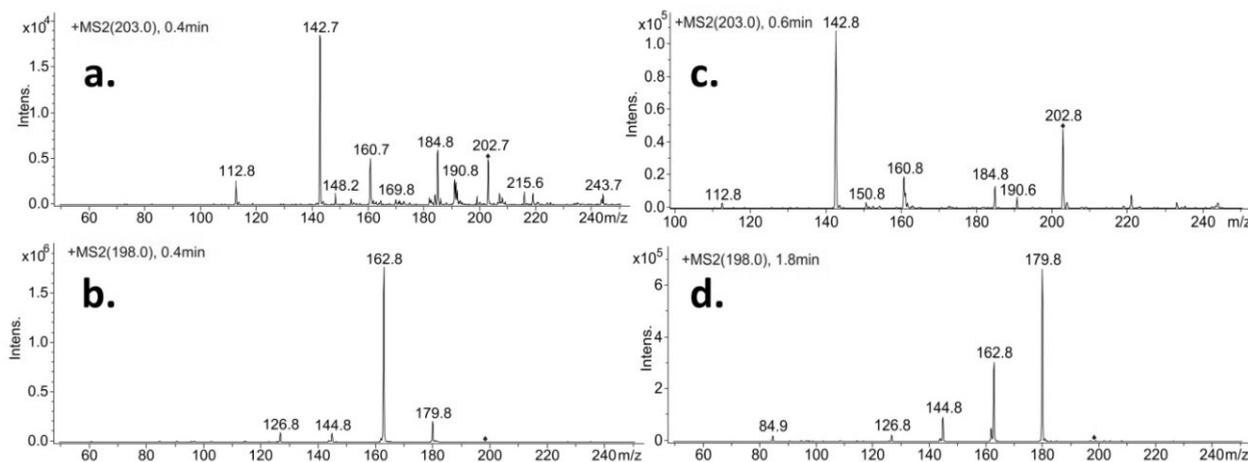


Figura 4. Espectros MS² de aductos de amonio y sodio de galactosa y glucosa. (a) y (b) Espectros de galactosa MS² de los iones [M + Na]⁺ y [M + NH₄⁺]⁺ respectivamente. (c) y (d) Espectros de glucosa MS² de los iones [M + Na]⁺ y [M + NH₄⁺]⁺, respectivamente.

una m/z 163 representativo del ión oxonio principalmente (figuras 1 y 4b-d) (16). Estas deshidrataciones, sin lugar a dudas, presentaron las mayores abundancias. Debido a las diferencias de abundancias en su producción, evidenciadas en los espectros de MS², fueron designados como marcadores de la estereoquímica de los mismos. Para corroborar que las abundancias de estos iones no eran un efecto aleatorio de reacciones sino que, por el contrario, se debían a un mecanismo de reacción prevalente en ambas moléculas, se decidió someter las abundancias de estos iones a diferentes energías de fragmentación para ver su comportamiento y consistencia en los espectros. La relación de abundancias de los iones 180/163 refleja fielmente que, por más energía que apliquemos al sistema, permanecerá inalterable tanto en glucosa como en galactosa y, por lo tanto, es característica de cada estereoisómero, tal como se evidencia en la figura 5.

Diferencias entre lactosa, maltosa y sacarosa

Como los aductos de sodio que generaban altas abundancias no presentaron iones característicos que pudieran ser empleados como marcadores de configuración, se procedió a obtener los aductos de amonio de la misma manera que se hizo con las especies monoméricas. Estos aductos, a unas amplitudes de fragmentación entre 0,5-1,0 V (figuras 6a, b y c), mostraron dos deshidrataciones que aparentemente permitirían ser usados para su diferenciación. Sin embargo, cuando se incrementaron las amplitudes de fragmentación entre 1,5-2,0

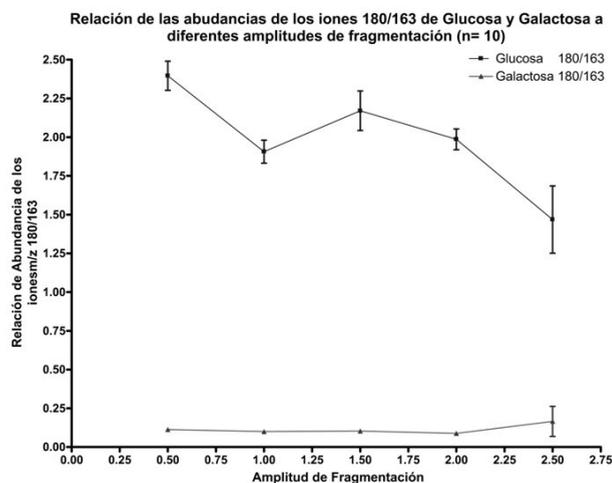


Figura 5. Relación de las abundancias de iones m/z 180 y 163 de glucosa y galactosa.

V, no hubo una buena conservación de las relaciones de abundancia de estos iones. Tanto la lactosa como la sacarosa producen la especie protonada [M + H]⁺ a una m/z de 343, la cual no fue obtenida en la maltosa incluso empleando altas energías de colisiones como se aprecia en las figuras 6d, e y f. No obstante, el incremento de la abundancia de la especie protonada de la lactosa a dos diferentes amplitudes de fragmentación evidenciado en la figura 6d, condujo a plantear una estrategia alterna que nos brindara información estructural. Teniendo en cuenta que estos disacáridos se coordinaban bien con el potasio, pero las posteriores fragmentaciones, debido a su tamaño atómico impedían

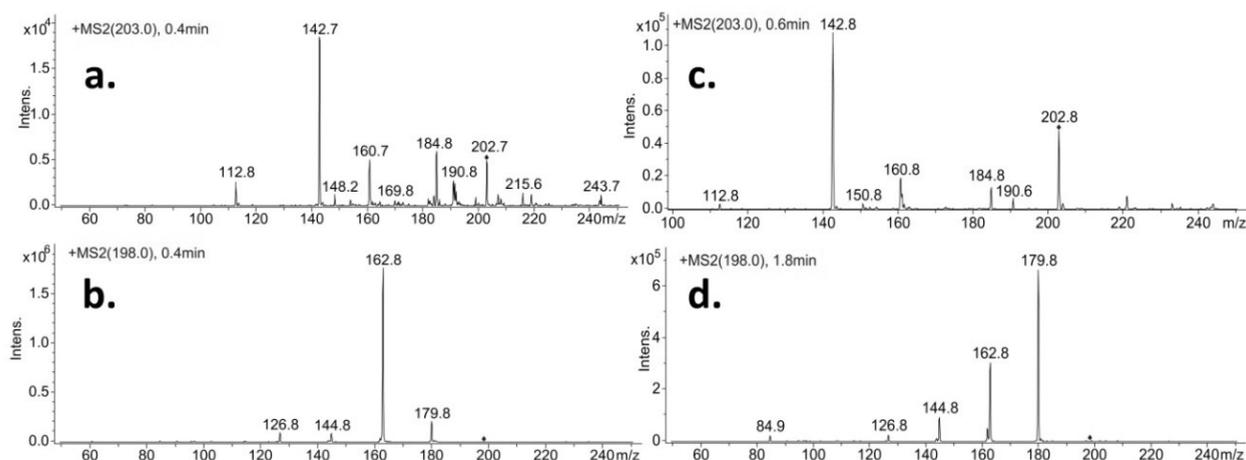


Figura 6. Espectros MS² de aductos de amonio de (a) lactosa, (b) maltosa y (c) sacarosa, obtenidos a una amplitud de fragmentación de 1V. Espectros MS² aductos de amonio de (d) lactosa, (e) maltosa, y (f) sacarosa, obtenidos a una amplitud de fragmentación de 2V.

su posterior coordinación con iones producto, y que la coordinación con sodio era muy eficiente, pero no generaba reacciones de degradación características de cada disacárido, se propuso emplear un ión metálico que se asemejara a la especie protonada en cuanto a su tamaño atómico. El litio fue el catión metálico que brindó la mejor información estructural, generando fácilmente aductos con los disacáridos.

A pesar de que existen amplias diferencias entre las estructuras de los azúcares empleados como se indica en la figura 3, sólo los espectros de masas de especies protonadas y aductos de amonio mostraron mecanismos de fragmentación similar. Sin embargo, como los azúcares son hemiacetales cíclicos, y por lo tanto el carbono más reactivo de un monosacárido es el anomérico, la primera deshidratación ocurre sobre este carbono generándose preferencialmente el ión oxonio indicado en la figura 1 (16). Es claro que la configuración de este carbono influirá sobre el mecanismo y la abundancia de los iones asociados a las primeras pérdidas de agua (17). Pese a este fenómeno, la molécula estructuralmente más diferente de estos disacáridos, la sacarosa, el espectro de MS² de aducto con litio mostró un patrón de fragmentación único al no presentar los iones m/z 331 y 289, que fueron los iones de mucha abundancia en lactosa y maltosa como se observa en la figura 7c. Este evento es fácilmente explicable porque la sacarosa es un

disacárido donde no hay un grupo hemiacetal libre y, por lo tanto, los iones más abundantes se deben al rompimiento del enlace glicosídico y su primera deshidratación (iones a una m/z de 169 y 187) presentes en la figura 7.

Es claro que en estas especies una reacción muy favorecida fue el rompimiento del enlace glicosídico, formándose generalmente la especie protonada de uno de los monosacáridos. A pesar de que no existe claridad sobre cuál de los dos monómeros que conforman el disacárido es el que se observa en el espectro de masas mostrado en la figura 7, esta reacción fue siempre la misma, generando abundancias semejantes a diferentes amplitudes de fragmentación como se indica en la figura 8. Este hecho nos brinda una nueva alternativa de diferenciación de estos diastereómeros. Tal como fue observado en las especies monoméricas, tanto la glucosa como la galactosa tienen reacciones de fragmentación preferenciales sobre el ión oxonio (m/z 163) y la especie $[M + NH_4 - H_2O]$ (m/z 180), igualmente en la fragmentación de los disacáridos se puede observar un monómero favorecido en el aducto con litio $[M + Li]^+$ a una m/z 187 y una deshidratación $[M + Li - H_2O]^+$ a una m/z 169, que presentan diferentes abundancias de acuerdo a la estereoquímica del monosacárido. Las relaciones de abundancias de estos iones lo mismo que en las especies monoméricas, fueron analizadas a diferentes amplitudes de fragmentación para

observar cuál era su comportamiento. En la figura 8 puede evidenciarse que, a pesar de emplear diferentes energías de colisión, las relaciones de abundancia de estos iones permiten siempre su utilización como marcadores estructurales. Los mecanismos de reacción de las diferentes confi-

guraciones espaciales que presentan los azúcares, hacen factible su diferenciación en los espectros de masas, demostrándose que la implementación de diversas energías de fragmentación no es un obstáculo para su aplicación en otros analizadores tandem.

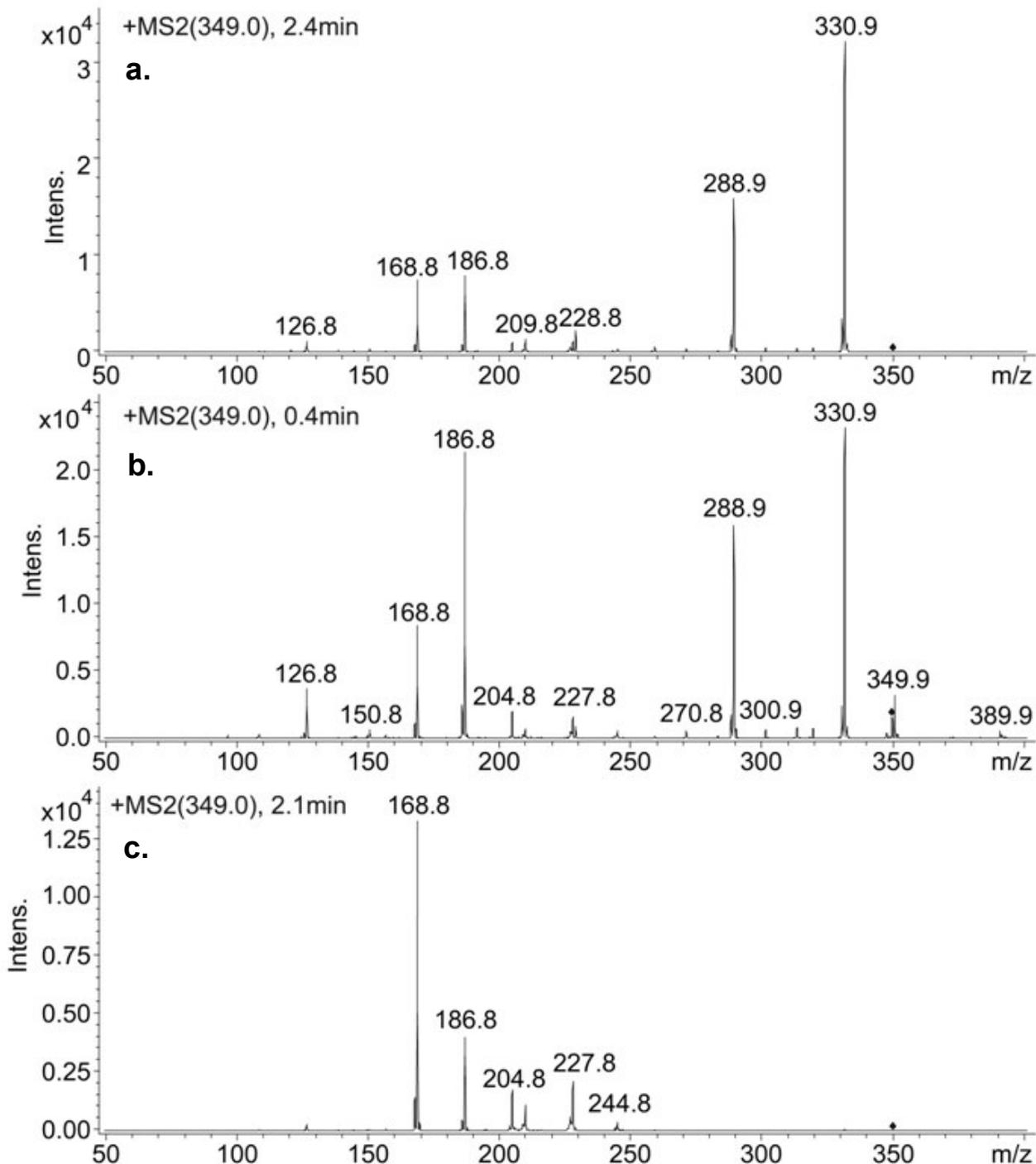


Figura 7. Espectros MS² de aductos de litio de (a) lactosa, (b) maltosa, y (c) sacarosa, obtenidos a una amplitud de fragmentación de 1V.

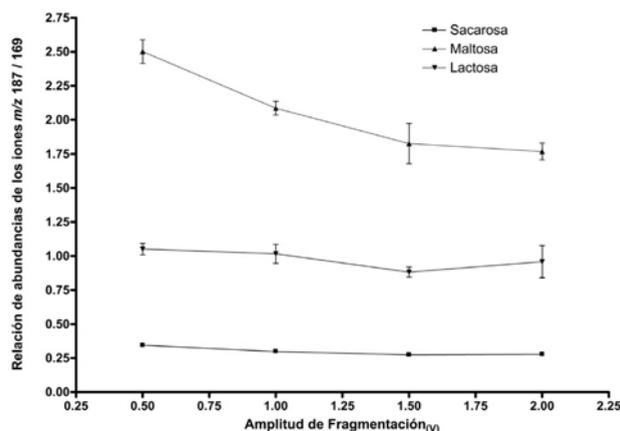


Figura 8. Relación de las abundancias de iones m/z 187 y 169 de lactosa, maltosa y sacarosa.

CONCLUSIONES

El uso de ESI-IT-MS en aductos con amonio y litio de monosacáridos y disacáridos respectivamente, permite la caracterización y diferenciación de diastereoisómeros de azúcares sin necesidad de recurrir a procesos de derivatización. Se evidenció que existen reacciones de descomposición de azúcares que prevalecen con respecto a otros posibles mecanismos de fragmentación en espectros de masas en tándem y pueden ser empleados para identificar algunos hechos estructurales. También fue posible evidenciar que una misma molécula coordinada con diversos cationes, experimenta diferentes mecanismos de fragmentación. Los metales alcalinos, como el sodio y el potasio, a pesar de generar aductos con los azúcares (a través de sus oxígenos), no evidenciaron gran información que permitiera la diferenciación entre diastereoisómeros. No obstante, si el tamaño de catión metálico disminuye, su coordinación con los disacáridos puede realizarse más efectivamente y, de la misma manera, inducir mayores fragmentaciones concediendo mayor información estructural. Es necesario aclarar que esto es posible gracias al tamaño molecular de los disacáridos; es probable que para oligosacáridos (azúcares de mayor peso molecular), la coordinación con litio implique la adición de dos o más átomos de litio, lo que conlleve probablemente otro tipo de reacciones, mientras que otros metales alcalinos de mayor tamaño puedan coordinarse y regalar otro tipo de información. Se evidenció que controlar las energías de colisiones en el análisis estructural de moléculas provee una poderosa y moderna herramienta analítica para ser implementada en los laboratorios de análisis.

AGRADECIMIENTOS

El autor principal expresa su agradecimiento a COLCIENCIAS y al posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad de Antioquia por la adjudicación de una beca pre-doctoral y por el apoyo académico brindado. De igual manera extendemos nuestro agradecimiento al proyecto Sostenibilidad GISB 2009-2010 (COD E01467) por el apoyo económico para la publicación de este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bucior I, Scheuring S, Andreas E, Burger MM. Carbohydrate-carbohydrate interaction provides adhesion force and specificity for cellular recognition. *JCB*. 2004; 165 (4): 529 - 537.
- Bermúdez LE. La espectrometría de masas en imágenes. Barcelona: ACK; 1993.
- Ardrey RE. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction. The Atrium (Eng): John Wiley & Sons; 2003.
- Lee MS. Integrated Strategies for Drug Discovery Using Mass Spectrometry. New Jersey: John Wiley & Sons; 2005.
- McMaster MC. LC/MS A Practical User's Guide. New Jersey: John Wiley & Sons; 2005.
- Michael Z, Kolbjorn Z, Anders B. Confirming the Presence of Drugs of Abuse in Samples Using an LC/Ion Trap Mass Spectrometer and a Nearly 400 Drugs Compound Library Containing MS2 and MS3 Spectra. [Sitio en Internet]. Disponible en: http://www.chem.agilent.com/en-US/Search/Library/_layouts/Agilent/PublicationSummary.aspx?whid=48201&liid=1518. Consultado: 17 de noviembre 2009.
- Xingyu Z, Toshinori S, The distinction of underivatized monosaccharides using electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp*. 2007; 21 (2): 191-198.
- Madhusudanan KP. Tandem mass spectra of ammonium adducts of monosaccharides: differentiation of diastereoisomers. *J Mass Spectrom*. 2006; 41 (8): 1096-1104.
- Roger G, Ved P, Jeffrey L C W, Unimolecular and collision-induced dissociation reactions of peracetylated methyl glucopyranoside. *Org Mass Spectrom*. 1990; 25 (2): 101-108.
- Cancilla MT, Wong AW, Voss LR, Lebrilla CB. Fragmentation Reactions in the Mass Spectrometry Analysis of Neutral Oligosaccharides. *Anal Chem*. 1999; 71 (15): 3206-3218.
- Zaia J. Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews*. 2004; 23 (3): 161-227
- Broberg A. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry for analysis of oligosaccharides derivatized by reductive amination and N,N-dimethylation. *Carbohydr Res*. 2007; 342 (11): 1462-1469.
- Song F, Liu Z, Liu S, Cai Z, Differentiation and identification of ginsenoside isomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2005; 531 (1): 69-77.
- Matamoros Fernández LE, Obel N, Scheller HV, Roepstorff P. Differentiation of isomeric oligosaccharide structures by ESI tandem MS and GC-MS. *Carbohydr Res*. 2004; 339 (3): 655-664.
- Ohashi Y, Kubota M, Hatase H, Nakamura M, Hirano T, Niwa H, *et al*. Distinction of Sialyl Anomers on ESI- and FAB-MS/MS: Stereo-Specific Fragmentations. *J Am Soc Mass Spectr*. 2009; 20 (3): 394-397.
- Chagit D, Yana S. Anomeric distinction and oxonium ion formation in acetylated glycosides. *J Mass Spectrom*. 2005; 40 (6): 765-771.
- Mulroney B, Traeger J, Stone B. Determination of both linkage position and anomeric configuration in underivatized glucopyranosyl disaccharides by electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 1995; 30 (9): 1277-1283.