

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Určování poloh dvojných vazeb u vyšších uhlovodíků

**Determination of double bond positions in higher
hydrocarbons**

Diplomová práce
studijního oboru Analytická chemie

Praha 2010

Jana Jersáková

Abstrakt:

Uhlovodíky, včetně alkenů jsou vedle voskových esterů, alkoholů, ketonů a kyselin jednou z hlavních sloučenin hmyzí kutikuly. Jejich praktický význam spočívá především v ochraně hmyzího těla před vysoušením, vodou a UV zářením. U vybraných druhů hmyzu plní funkci chemické komunikace a druhového rozpoznávání. Profil uhlovodíků může rovněž v některých případech sloužit jako tzv. otisk prstu definující specifitu druhu. Proto hraje poloha dvojně vazby alkenů obsažených ve svrchní části hmyzího těla důležitou roli. Tato práce popisuje využití katalytické hydroxylace oxidem osmičelým vázaným na polymerním nosiči, jako derivatizační metodu k určení polohy dvojně vazby. Byly optimalizovány reakční podmínky derivatizace na standardu obsahujícím jednu dvojnou vazbu a vzniklý derivát byl podroben fragmentačním experimentům. Optimální podmínky derivatizace a fragmentací nenasycených uhlovodíků byly aplikovány na reálných vzorcích ze švába amerického *Periplaneta americana* a masařky *Neobellieria bullata*.

Abstract:

Hydrocarbons including alkenes are in addition to wax esters, alcohols, ketones and acids one of the main compounds of insect cuticle. Hydrocarbons protect insect body against dry, water and UV radiation. In some species they play an important role in mutual communicative and recognition. Hydrocarbons profile can in some cases serve as fingerprint defining species specificity. Therefore, the position of double bonds in cuticular hydrocarbons is important. This work describes utilization of catalytic hydroxylation with polymer-supported osmium tetroxide as a derivatization technique to determine double bond position. Reaction conditions of hydroxylation and mass spectrometric fragmentation of derivatized alkenes were optimized for standard containing one double bond. These conditions were applied to real samples from the american cockroach *Periplaneta americana* and blowfly *Neobellieria bullata*.

Klíčová slova:

Derivatizace dvojně vazby, hmotnostní spektrometrie, ionizace elektrosprejem, kutikulární uhlovodíky, masařka, oxid osmičelý, šváb americký.

Key Words:

Double bond derivatization, mass spectrometry, electrospray ionization, cuticular hydrocarbons, flesh fly, osmium tetroxide, american cockroach.

Tato práce byla podporována následujícími finančními zdroji:

Výzkumný záměr MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857)

Grant GA ČR č. 203/09/0139

Výzkumný záměr Z4 055 0506

Touto cestou chci poděkovat především svému školiteli (konzultantu) RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za poskytnutí příležitosti vypracování své diplomové práce v rámci skupiny Hmotnostní spektrometrie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, dále za odborné vedení při experimentální činnosti, cenné rady a připomínky.

Velký dík patří týmu zaměstnanců a Ph.D. studentů spolupracujícím v rámci skupiny Hmotnostní spektrometrie, dále Jiřímu Hlinkovi, za praktické rady a ochotu pomoci.

Také děkuji školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. za vedení při psaní diplomové práce, podporu a rady.

Na závěr chci poděkovat svému manželovi Jakubovi za nezištnou a nemalou podporu mého magisterského studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele (konzultanta) RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D a školitele Prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze (a pracoviště školitele (konzultanta) RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D.) je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity (a pracoviště školitele (konzultanta) RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D.).

V Praze dne 28. 4. 2010

Obsah:

1. Úvod	10
Cíle diplomové práce:.....	12
2. Teoretická část	13
2.1. Kutikulární uhlovodíky.....	13
2.2. Derivatizace dvojné vazby	14
2.3. Adice dimethyldisulfidu.....	14
2.4. Adice kyslíku/epoxidace alkenů	15
2.5. Alkoxymerkurace/demerkurace alkenů	15
2.6. Diels-Alderova reakce.....	16
2.7. Hydroborace.....	16
2.8. Ozonolýza	17
2.9. Hydroxylace alkenů oxidem osmičelým	18
2.9.1. Katalytická hydroxylace alkenů oxidem osmičelým	18
2.9.2. Katalytická hydroxylace alkenů oxidem osmičelým vázaným na polymerním nosiči ...	19
2.10. Hmotnostní spektrometrie.....	20
3. Experimentální část.....	22
3.1. Použité chemikálie	22
3.2. Použitý materiál	23
3.3. Studovaný hmyz	23
3.4. Přístroje a zařízení	23
3.4.1. Hmotnostní spektrometr LCQ Fleet	23
3.4.2. Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí	23
3.4.3. MALDI/TOF	24
3.4.4. Ostatní používané přístroje	24
3.5. Pracovní postupy.....	24
3.5.1. Extrakce kutikulárních uhlovodíků ze švába amerického <i>Periplaneta americana</i>	24
3.5.2. Extrakce kutikulárních uhlovodíků z masačky <i>Neobellieria bullata</i>	25
3.5.3. Preparativní tenkovrstvá chromatografie	25
3.5.4. Hydroxylace katalyzovaná oxidem osmičelým na poly-4-vinylpyridinu.....	26
3.5.5. Hmotnostní spektrometrie.....	26
3.5.6. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	27

3.5.7. MALDI/TOF	27
4. Výsledky a diskuse	28
4.1. Hydroxylace standardu <i>cis</i> -9-trikosenu	28
4.1.1 Shrnutí reakčních podmínek hydroxylace standardu <i>cis</i> -9-trikosenu katalyzované oxidem osmičelým na poly-4-vinylpyridinu	34
4.2. Fragmentace produktu hydroxylace standardu <i>cis</i> -9-trikosenu	35
4.2.1. Ionizace elektrosprejem	35
4.2.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku	41
4.2.3 Shrnutí dosažených výsledků při fragmentačních experimentech	41
4.3. Izolace nenasycených uhlovodíků ze švába amerického	42
4.4. Hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu	45
4.5. Hmotnostní spektrometrie produktu hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu	46
4.6. Izolace nenasycených uhlovodíků z masařky	48
4.7. Hydroxylace nenasycených uhlovodíků izolovaných z masařky	49
5. Závěr	52
6. Literatura	54

Seznam zkratek:

ABS	akrylonitril-butadien-polystyren
API	ionizace za atmosférického tlaku
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
BMS	boran-methylsulfid
CID	kolizemi indukovaná disociace
DMDS	dimethyldisulfid
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
LiDHB	lithná sůl kyseliny dihydroxybenzoové
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
MS ⁿ	několikanásobná hmotnostní spektrometrie
MTAD	4-methyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti ku náboji
NaDHB	sodná sůl kyseliny dihydroxybenzoové
NMO	4-methylmorfolin- <i>N</i> -oxid
PEG	směs oligomerů poly(etylglykolu)
PEM	fenoxyetoxymetyl-polystyren
PB	proud částic
SMB	malonyloxyborohydrid sodný
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOF	průletový analyzátor

1. Úvod

Uhlovodíky, včetně alkenů jsou vedle voskových esterů, alkoholů, ketonů a kyselin jednou z hlavních sloučenin hmyzí kutikuly [1-3]. Jejich praktický význam spočívá především v ochraně hmyzího těla před vysoušením, vodou a UV zářením. U vybraných druhů hmyzu plní funkci chemické komunikace a druhového rozpoznávání [4]. Profil uhlovodíků může rovněž v některých případech sloužit jako tzv. otisk prstu definující specifitu druhu [5-11]. Proto hraje poloha dvojných vazeb alkenů obsažených ve svrchní části hmyzího těla důležitou roli. Byly popsány analytické metody pro určení molekulové hmotnosti a typu uhlovodíku. Avšak určit polohy dvojných vazeb znamená další výzvu pro analytické chemiky. Problémem je množství, v jakém jsou izolovány uhlovodíky z těl hmyzu a délka uhlovodíkového řetězce. Další překážkou je podobnost hmotnostních spekter alkenů a možnost migrace dvojných vazeb při ionizaci. Řešením se jeví derivatizace dvojných vazeb a následná hmotnostně spektrometrická analýza vzniklých aduktů. K derivatizaci dvojných vazeb bylo popsáno několik běžných či méně známých metod. Jedná se například o ozonolýzu [36-48], Diels-Alderovu reakci [30, 31], adici dimetyldisulfidu [10,12-22] a hydroxylaci katalyzovanou oxidem osmičelým [38,41-59]. Volba metody závisí na charakteru analýzy či užitého alkenů. Reakce s oxidem osmičelým je efektivní a hojně využívána. Avšak kvůli vysoké toxicitě, těkavosti a ceně oxidu osmičelého se tato reakce nedočkala využití v širším průmyslovém rozsahu [14, 38].

V případě analýzy derivatizovaných uhlovodíků metodou GC/MS se hydroxyderiváty dále přeměňují na methylethery nebo silylethery, které mají lepší chromatografické vlastnosti. Limitem metody je však velikost molekul (těkavost) těchto derivátů. Deriváty vyšších uhlovodíků již nelze analyzovat plynovou chromatografií a nelze proto ani touto metodou určit polohy dvojných vazeb. V této práci je proto hledán alternativní postup, kdy jsou vzniklé hydroxyderiváty analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací za atmosférického tlaku (elektrosprej nebo APCI). Tyto MS techniky lze snadno kombinovat s HPLC, která nemá omezení související s velikostí analytů jako metoda GC. Tato diplomová práce se zabývá využitím hydroxylace dvojných vazeb katalyzované oxidem osmičelým vázaným na polymerním nosiči a následnou

hmotnostně spektrometrickou identifikaci polohy dvojně vazby vzniklých derivátů pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací za atmosférického tlaku.

Cíle diplomové práce:

Cíle diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- Vybrat vhodnou derivatizační reakci dvojně vazby
- Vyzkoušet vybranou reakci na standardu alkenů *cis-9-trikosenu*
- Podrobit vzniklý derivát MS a MS/MS analýze s využitím ESI a APCI
- Izolovat kutikulární uhlovodíky ze švába amerického *Periplaneta americana* a masačky *Neobellieria bullata*
- Optimalizované podmínky reakce a MS/MS experimentů ověřit na uhlovodících ze švába amerického *Periplaneta americana*
- Ověřený postup aplikovat na kutikulárních uhlovodících masačky *Neobellieria bullata* a určit polohy dvojných vazeb

2. Teoretická část

2.1. Kutikulární uhlovodíky

Velký rozvoj studia chemické komunikace hmyzu přispěl ke vzniku nového vědního oboru – chemické ekologie. Jedná se o multidisciplinární obor zabývající se studiem chemicko-biologických vztahů v ekosystémech.

Vzájemné interakce většiny živočichů i rostlin jsou do značné míry ovlivňovány nebo řízeny stopovým množstvím specifických organických sloučenin. V chemické komunikaci jsou využívány dva typy látek: produkty exokrinních žláz (feromony) a kutikulární uhlovodíky. V případě feromonů, čichové a chuťové vjemy hrají v životě hmyzu důležitou roli. Hmyzí jedinci se jimi řídí ve všech fázích svého života např. při vyhledávání potravy, vhodného partnera, místa pro kladení vajíček a vývoji další generace [1-3].

Kutikulární lipidy jsou z velké části tvořeny kutikulárními uhlovodíky, které slouží především jako ochrana hmyzího těla. Zamezují vysychání, mechanickému poškození povrchu hmyzu, působí jako bariéra proti vniknutí bakterií a konečně, u sociálního hmyzu plní funkcí dorozumivací. Směs kutikulárních uhlovodíků může obsahovat více než 100 různých uhlovodíků, jejichž délka řetězce se pohybuje kolem 23-60 uhlíkových atomů, s obsahem 0 - n dvojných vazeb [4]. Jde obvykle o směs n -alkanů, větvených mono-, di- a trimethylalkanů, alkenů a jiných [5-7]. Přesnější profil uhlovodíků tvořících kutikulu závisí na povaze daného druhu [8], na místě jeho výskytu, pohlaví, věku a sociálním statutu [9]. Sledování zastoupení uhlovodíků v závislosti na jednotlivých faktorech je předmětem bohatého výzkumu týkajícího se ekologie konkrétních živočichů. Na základě experimentů bylo např. zjištěno, že kutikulární uhlovodíky jednoho druhu vyvolaly agresivní chování u jiného druhu, či druhu stejného patřícího do jiného hnízda [10]. Dalším jevem jsou rozdíly v konkrétních uhlovodících mezi jedinci stejných druhů, vyskytujících se v různých geografických oblastech. Bylo publikováno, že počet uhlíků v řetězci, struktura, počet a poloha dvojných vazeb vystupuje jako tzv. otisk prstu jednotlivých druhů [11]. Proto je vedle studia ekologie živočichů také velmi důležitý vývoj analytických metod, které pomohou

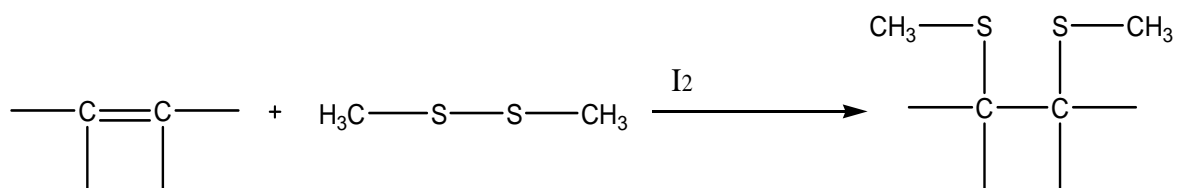
upřesnit profil uhlovodíků [8]. Jedná se především o hmotnostně spektrometrické metody.

2.2. Derivatizace dvojně vazby

Přímé určení pozice dvojně vazby u vyšších uhlovodíků na základě MS spekter není možné. Dochází k migraci dvojně vazby a různým fragmentačním mechanismům, kdy ze vzniklých fragmentů nelze zpětně určit polohu vazby. Byly publikovány vhodné metody pro určení polohy dvojně vazby, nejčastěji se jedná o adici dimethyldisulfidu, adici kyslíku, alkoxymerkuraci/demerkuraci, Diels-Alderovu reakci a další. Po derivatizaci následuje v uváděné literatuře GC/MS analýza vzniklých aduktů a určení pozice dvojně vazby na základě fragmentačních spekter. Hmotnostní spektrometrie s ionizací za atmosférického tlaku pro analýzu hydroxyderivátů uhlovodíků dosud nebyla použita.

2.3. Adice dimethyldisulfidu

Jedná se o adici dimethyldisulfidu (DMDS) na alken katalyzovanou jódem (**Obr. 1**). Metoda se nejčastěji užívá pro určení pozice dvojných vazeb u alkenů [10, 12-16], acetátů [17-20] a mastných kyselin [21, 22].



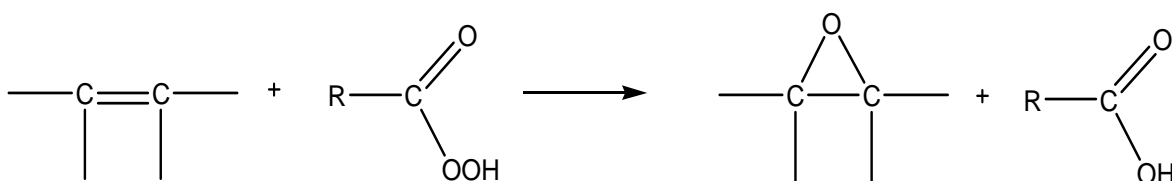
Obr. 1: Adice dimethyldisulfidu katalyzovaná jódem.

Poloha dvojně vazby se u vzniklých derivátů určí pomocí GC/MS z charakteristických fragmentů, které vznikly štěpením sousední vazby od vazby uhlík-síra, tedy v místě

původní dvojně vazby. Technika je vhodná k analýze neznámých sloučenin v komplexních směsích [22] a překážkou není ani nanogramové množství analytu [21].

2.4. Adice kyslíku/epoxidace alkenů

Alkeny mohou být epoxidovány různými činidly. Prilezhaevova reakce využívá peroxokyseliny za vzniku epoxidu a příslušné karboxylové kyseliny (**Obr. 2**). Běžně se k reakcím využívá stabilní a komerčně dostupná kyselina m-chlorperoxybenzoová [23-25].

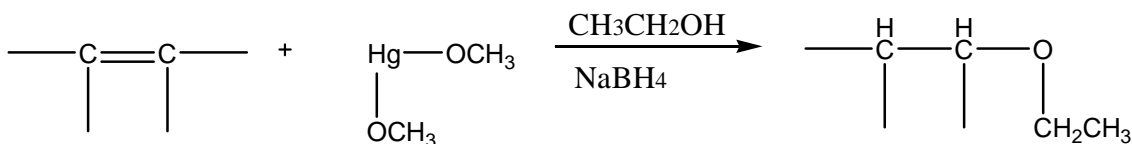


Obr. 2: Epoxidace alkenů peroxokyselinou.

K epoxidaci se dále využívají činidla jako kyslík, peroxid vodíku, octan kobaltnatý na polymerním nosiči [23] nebo 3,3-dimethyldioxiran [23, 26].

2.5. Alkoxymerkurace/demerkurace alkenů

Alkeny reagují s vodou za přítomnosti octanu rtuťnatého. Reakcí hydroxymerkuracečního produktu s borohydridem sodným dochází ke štěpení vazby C-Hg za vzniku alkoholu. Alternativou je reakce alkenů s alkoholem v přítomnosti octanu rtuťnatého, kdy redukcí borohydridem sodným vzniká příslušný éter (**Obr. 3**) [27].

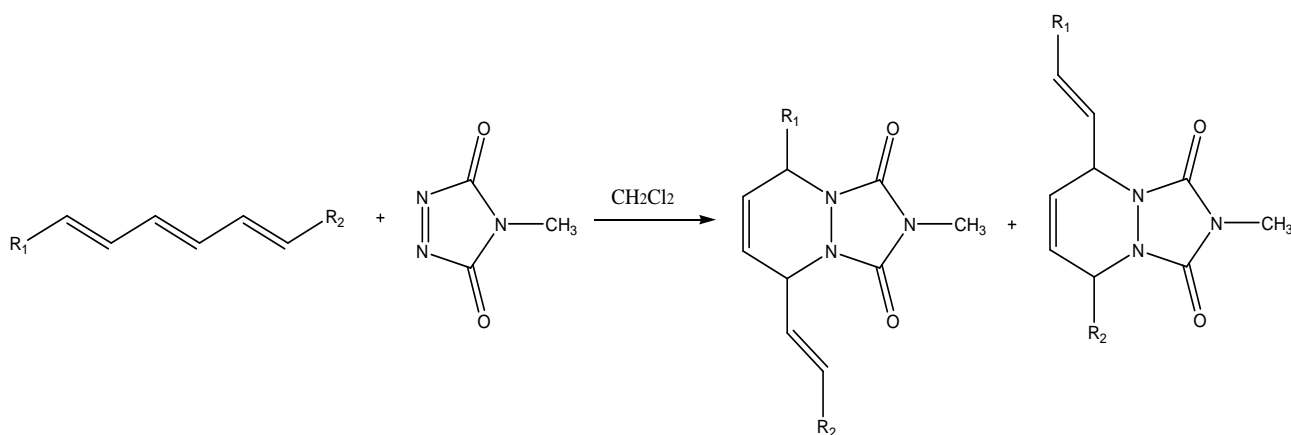


Obr. 3: Alkoxymerkurace/demerkurace alkenů.

Fragmentací vzniklých derivátů pomocí hmotnostního spektrometru v místě étericky vázaného kyslíku dochází k tvorbě intenzivních alkylových fragmentů, které jsou charakteristické [28, 29].

2.6. Diels-Alderova reakce

Diels-Alderova reakce zahrnuje cyklizační adici konjugovaného dienu s dvojnou vazbou dienofilu [23]. Při využití uvedené reakce pro derivatizaci dvojně vazby k identifikaci feromonů a následné GC/MS analýze vzniklých cykloaduktů bylo popsáno využití 4-methyl-1,2,4-triazolin-3,5-dionu (MTAD) jako dienofilu (**Obr. 4**) [30, 31].

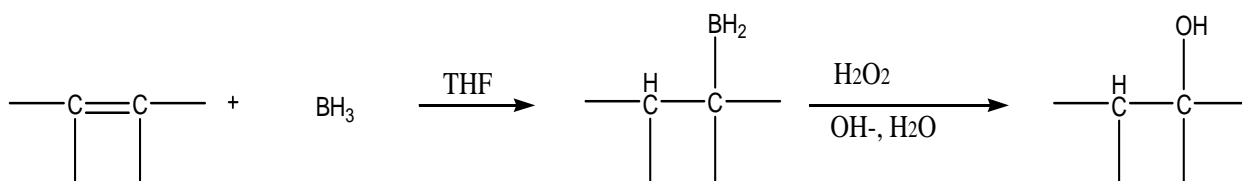


Obr. 4: Cyklizační adice dienu a MTAD jako dienofilu.

2.7. Hydroborace

Hydroborace je elektrofilní adice boranu na alken za vzniku alkylboranu. Kvůli vysoké reaktivitě boranu se do reakční směsi přidává roztok tetrahydrofuranu (THF) za vzniku stabilního BH₃ - THF komplexu [27, 32], methyl-sulfid za vzniku BMS komplexu (boran–methylsulfid) [33], či se borohydrid sodný nechá reagovat s kyselinou malonovou v prostředí THF za vzniku malonyloxyborohydridu sodného (SMB) [34]. Využití hydroborace spočívá ve dvou reakčních krocích. Prvním krokem je adice boranu

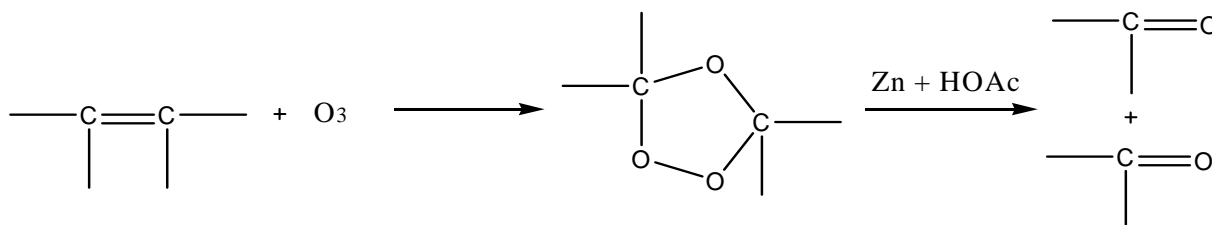
na alken a druhý krok zahrnuje oxidaci vzniklého alkylboranu vodným roztokem peroxidu vodíku (**Obr. 5**) [27].



Obr. 5: Hydroborace alkenů a následná oxidace.

2.8. Ozonolýza

Reakcí sloučenin obsahujících dvojnou vazbu s ozónem za nízké teploty vznikají ozonidy [35]. Produkty ozonolýzy se dají izolovat, avšak některé z nich jsou explozivní. Proto se ozonidy nejčastěji rozkládají za vzniku aldehydů [36], ketonů nebo obou zároveň. K rozkladu se nejčastěji užívá zinek a kyselina octová nebo katalytická hydrogenace (**Obr. 6**). U sloučenin obsahujících více než jednu dvojnou vazbu dochází ke štěpení všech vazeb [37].

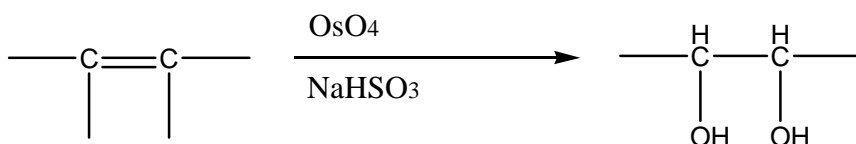


Obr. 6: Ozonolýza alkenů a následný rozklad vzniklého ozonidu.

K určení polohy dvojné vazby u nenasycených lipidů byla vyvinutá nová technika využívající fragmentaci ozonidů vytvořených přímo v elektrospreji hmotnostního spektrometru. Metoda je úspěšná při analýze jednotlivých lipidů, u komplexnějších směsí je obtížná interpretace spekter [38- 40].

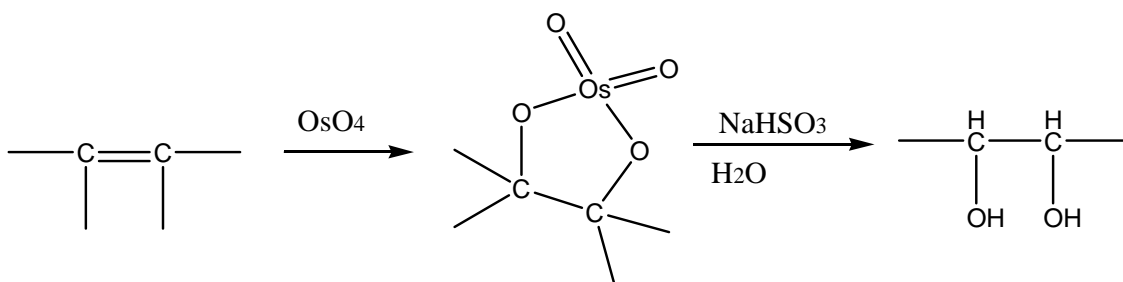
2.9. Hydroxylace alkenů oxidem osmičelým

Hydroxylace alkenů je adiční reakce hydroxylové -OH skupiny na oba uhlíky původní dvojné vazby. Reakce je uskutečněna pomocí oxidu osmičelého a produkty hydroxylace jsou dioly (glykoly) (**Obr. 7**).



Obr. 7: Hydroxylace alkenů oxidem osmičelým.

Reakce probíhá ve dvou krocích, meziproduktem prvního reakčního kroku hydroxylace je cyklický ester, k jehož štěpení dochází v dalším reakčním kroku pomocí hydrogensířičatanu sodného (**Obr. 8**) [27].



Obr. 8: Hydroxylace alkenů oxidem osmičelým.

2.9.1. Katalytická hydroxylace alkenů oxidem osmičelým

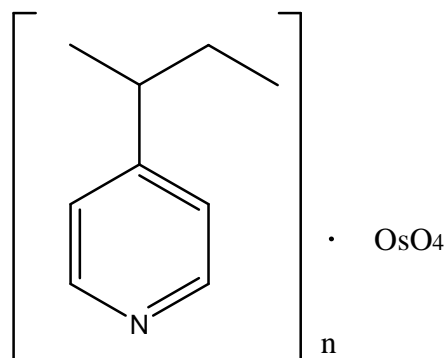
Oxid osmičelý je jedna z nejspolehlivějších chemikálií používaná k hydroxylaci alkenů. Redukce oxidu osmičelého nenasycenými látkami je dlouho známá. Její studium prošlo vývojem, kdy byla objevena možnost katalytického využití oxidu osmičelého v přítomnosti sekundárního oxidantu jako např.: chlorečnanu draselného

[38], peroxidu vodíku [41-45], 1,1-dimethylethyl hydroperoxidu [46, 49], N-metylmorfolin N-oxidu (NMO) [48-50] nebo molekulárního kyslíku [51]. Přestože stechiometrické využití oxidace alkenů oxidem osmičelým poskytuje lepší výtěžky produktů, je z hlediska jeho ceny a toxicity výhodnější katalytické využití [14, 38]. Při katalytickém využití dochází k hydrolyze meziprojektu prvního reakčního kroku hydroxylace sekundárními oxidanty a tím je oxidačně regenerován oxid osmičelý, který může být následně opět redukován substrátem. Reakce je ukončena při spotřebování sekundárního oxidantu [38, 52].

2.9.2. Katalytická hydroxylace alkenů oxidem osmičelým vázaným na polymerním nosiči

Katalytická hydroxylace nedosáhla širšího průmyslového uplatnění. Pádnymi důvody jsou vysoká cena oxidu osmičelého, jeho těkavost a hlavně toxicita. Ani aplikace sekundárního oxidantu dostatečně neřeší problém zacházení s velmi toxickým oxidem osmičelým.

Bezpečný, rychlý a čistý způsob hydroxylace byl nalezen při využití oxidu osmičelého vázaného na polymerním nosiči [53]. Katalyzátor kotvený na polymerním nosiči poskytuje výhodu jednoduché práce, nevyžadující rozklad zbytkového množství oxidu osmičelého v reakční směsi. Pro tento účel bylo vyvinuto několik druhů polymerů. Jeden z prvních používaných polymerů byl zesíťovaný poly-4-vinylpyridin (na **Obr. 9** je zobrazen katalyzátor oxid osmičelý vázaný na poly-4-vinylpyridinu) [54, 55]. Mezi další publikované se řadí polymery na bázi polysulfonu [57], polystyrenu, poly(akrylonitril-co-butadien-co-styrenu) [57], fenoxymethyl-polystyrenu (PEM) [59] a akrylonitril-butadien-polystyrenu (ABS) [59].



Obr. 9: Oxid osmičelý vázaný na poly-4-vinylpyridinu.

2.10. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika používaná převážně pro identifikaci a objasnění molekulové struktury neznámých sloučenin. S výhodou ji lze také využít pro kvantifikaci a to i při stopové analýze. Podstatou je experimentální měření hmotnostní iontů v plynné fázi produkovaných z molekul analytu.

Hmotnostní spektrometr se skládá ze vstupu, iontového zdroje, analyzátoru, detektoru a vakuového systému. Vzorek se zavádí do vstupu spektrometru. V iontovém zdroji vznikají ionty z molekul. Následně dochází v analyzátoru k dělení jednotlivých iontů podle poměru hmotnosti k náboji m/z .

Existuje několik druhů ionizačních technik, ty se dělí podle energie na tvrdé a měkké nebo podle tlaku v iontovém zdroji na techniky za sníženého tlaku a za atmosférického tlaku. Tvrdé ionizační techniky se vyznačují vysokou energetickou ionizací a dochází k rozpadu molekul na fragmenty, jde zejména o elektronovou ionizaci EI. Měkké ionizační techniky jsou málo energetické a převážně dochází ke vzniku aduktů, fragmentace je potlačena. Jedná se o ionizaci elektrosprejem ESI, chemickou ionizaci za atmosférického tlaku APCI, fotoionizaci za atmosférického tlaku APPI a desorpci laserem za účasti matrice MALDI. Ionizace může probíhat za sníženého (EI, MALDI) či atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI, MALDI) [60].

K měkkým technikám pracujícím za atmosférického tlaku patří ionizace elektrosprejem. Jedná se o nejvíce užívaný iontový zdroj realizující spojení

kapalinových separačních technik s hmotnostní spektrometrií. Podstatou elektrospreje je převod analytu z kapalné fáze do fáze plynné při současné ionizaci přítomných molekul. Toho je dosaženo vložением vysokých kladných nebo záporných potenciálů na sprejovací kapiláru a následnou desolvací nabitých kapiček. Vložением vysokého napětí na sprejovací kapiláru dochází k vytvoření Taylorova kužele, ze kterého se uvolňují vysoce nabitě kapky postupující do analyzátoru. Působením zvýšené teploty a průtoku zamlžovacího a desolvatačního plynu se kapky velikostně redukují, až dojde k dosažení Rayleighova limitu stability a následné Coulombické explozi. Nakonec dochází ke kompletní desolvaci nebo nábojové desorpci iontů z povrchu kapek [61].

Další částí hmotnostního spektrometru je analyzátor. Jedná se o zařízení, kde díky elektromagnetickému poli dochází k dělení iontů v plynné fázi podle jejich poměru hmotnosti k náboji m/z . Analyzátoři se dělí na skenující (sektorový analyzátor, kvadrupólový analyzátor), zadržující ionty (iontová past, orbitrap, iontová cyklotronová rezonance) a průletové (TOF). Při experimentech byla používána kvadrupólová iontová past. Kladně či záporně nabitě ionty vstupují do iontové pasti, kde jsou udržovány pomocí tří elektrod (prstencová, dvě koncové elektrody). Na středovou prstencovou elektrodu je vkládáno střídavé radiofrekvenční napětí, což umožňuje naplnění pasti ionty. U iontové pasti lze s výhodou použít několikanásobnou fragmentaci iontů (MS^n) o dané hodnotě poměru m/z s využitím kolizně indukované disociace (CID). Kolizně indukovaná disociace je jev, kdy jsou vybrané ionty v pasti urychleny radiofrekvenčním napětím a srážkami s molekulami kolizního plynu (helium) se fragmentují. Přesný pohyb iontů tedy závisí na aplikovaném napětí a jejich individuální poměru m/z . S rostoucí amplitudou radiofrekvenčního napětí se ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti směrem k detektoru [60, 62].

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

- 2-methylprop-2-ol – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- 4-methylmorfolin-*N*-oxid – 97%, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Aceton – p.a., Penta (Chrudim, ČR)
- Acetonitril – Chromasolv[®] pro HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- *cis*-9-trikosen – 97%, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Diethylether - Penta (Praha, ČR)
- Hexan – SupraSolv[®] pro plynovou chromatografii, Merck (Darmstadt, Německo)
- Chloroform – p.a. stabilizovaný 1% ethanolu, Penta (Chrudim, ČR)
- Kyselina sírová – 96%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- LiDHB (lithná sůl kyseliny dihydroxybenzoové) - připravena v laboratoři UOCHB podle návodu [63]
- Methanol – HPLC super gradient, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- NaDHB (sodná sůl kyseliny dihydroxybenzoové) - připravena v laboratoři UOCHB podle návodu [63]
- Octan amonný – >99%, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- Octan sodný – p.a., Lachema (Brno, ČR)
- Oxid osmičelý na poly(4-vinylpyridinu) – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Poly(ethyleglykol) – ke kalibraci - Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Uhličitan lithný - p.a., Lachema (Brno, ČR)

3.2. Použitý materiál

- Silikagel pro filtraci – velikost částic: 30-60 μm , aktivace 25 hodin při 120 °C, deaktivace 12 % vody, Merck (Darmstadt, Německo)
- Silikagel pro TLC – Silikagel 60G, Merck (Darmstadt, Německo)
- Extrahovaná vata – Soxhletova extrakce 10 hodin směsí chloroform:metanol (1:1, v/v)
- Vyžíhaný síran hořečnatý – 12 hodin při 140 °C

3.3. Studovaný hmyz

- Šváb americký - *Periplaneta americana*
- Masařka – *Neobellieria bullata*

3.4. Přístroje a zařízení

3.4.1. Hmotnostní spektrometr LCQ Fleet

K detekci a fragmentaci hydroxyderivátů byl používán hmotnostní spektrometr LCQ Fleet s elektrosprejem a 3D iontovou pastí (Thermo Fischer Scientific, USA). Jako vyhodnocovací program byl užíván Xcalibur, verze 2.0.7 (Thermo Fischer Scientific, USA). Vzorek byl vpravován přímým vstupem do iontového zdroje. Jako iontové zdroje byly používány elektrosprej (ESI) a zdroj pro chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). K detekci a fragmentačním experimentům byla užívána 3D iontová past.

3.4.2. Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí

K ověření přítomnosti izolovaných kutikulárních nenasycených uhlovodíků a hydroxyderivátů byl používán plynový chromatograf Agilent 6890N s hmotnostním

detektorem 5975B s iontovým zdrojem elektronovou ionizací (EI) a kvadrupólovým analyzátozem (Agilent Technologies, USA). Byl nastřikován 1 µl vzorku. Používaná kolona byla Zebron ZB-5-HT (Phenomenex, USA) o délce 30 m, vnitřním průměru 250 µm a tloušťce filmu 0,25 µm. Jako vyhodnocovací software byl používán Data Analysis (Agilent Technologies, USA).

3.4.3. MALDI/TOF

K ověřování produktů hydroxylace byl používán přístroj Reflex IV (Bruker Daltonics, Ltd., Bremen, Germany). Jedná se o MALDI-TOF přístroj vybavený dusíkovým UV laserem (337,1 nm). Data byla vyhodnocena programem FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics). Spektra byla průměrována z 600 laserových pulzů.

3.4.4. Ostatní používané přístroje

- analytické váhy - Mettler-Toledo AB204-S (Greifensee, Švýcarsko)
- elektronický kontaktní teploměr - IKA-WERKE, ETS- D4 (Staufen, Německo)
- magnetická míchačka - IKA-WERKE, D- 79219 (Staufen, Německo)
- vakuová odparka - PC 2001 Vario, Vacuumbrand (Wertheim, Německo)

3.5. Pracovní postupy

3.5.1. *Extrakce kutikulárních uhlovodíků ze švába amerického Periplaneta americana*

Švábi *Periplaneta americana* (70 kusů) byli na 48 hodin zmrazeni (- 25°C) a následně extrahováni. Extrakce celých, neporušených těl hmyzu probíhala v Erlenmeyerově baňce se čtyřmi přidavky chloroformu po 50 ml. Extrakt byl filtrován přes kolonku naplněnou extrahovanou vatou. Následně bylo provedeno vysušení

extraktu bezvodým síranem hořečnatým a filtrace přes kolonku naplněnou extrahovanou vatou. Přefiltrovaný extrakt byl na vakuové odparce odpařen téměř do sucha a doplněn malým množstvím hexanu. Izolovaný vzorek v hexanu byl filtrován přes kolonku naplněnou extrahovanou vatou a silikagelem. Velký podíl polárních částí vzorku se zachytil na silikagelu. Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a zvážen.

3.5.2. Extrakce kutikulárních uhlovodíků z masařky *Neobellieria bullata*

Extrakce kutikulárních uhlovodíků z masařky *N. bullata* probíhala stejným způsobem jako extrakce kutikulárních lipidů ze švába *P. americana* v kapitole 3.5.1. Množství použitého chloroformu asi na 200 kusů masařek bylo 3 x 20 ml.

3.5.3. Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Pro preparativní tekovrstvou chromatografií byly používány skleněné destičky o velikosti 36 x 76 mm se silikagelem a 12% sádry. Před použitím byly destičky předmývány hexanem (v případě izolace kutikulárních uhlovodíků) nebo chloroformem (v případě izolace produktů hydroxylace). Jako mobilní fáze byl využit hexan (v případě izolace kutikulárních uhlovodíků) a chloroform (v případě izolace produktů hydroxylace). Vizualizace byla prováděna destruktivním způsobem (postřikem 1% kyselinou sírovou v ethanolu a následným spálením) a nedestruktivním způsobem (postřikem Rhodaminem G6 (0,05% v methanolu) a následnou vizualizací pod UV lampou při 360 nm). Kutikulární uhlovodíky byly získány seškrábnutím příslušné zóny z TLC destičky do skleněné kolonky naplněné extrahovanou vatou a silikagelem a promytím etherem. Dále byly odpařeny do konstantní hmotnosti v proudu dusíku a zváženy. Rozdělení kutikulárních uhlovodíku na nasycené a nenasycené bylo provedeno za použití TLC skleněných destiček se silikagelem a 20 % dusičnanem stříbrným. Izolace z uhlovodíků ze stříbrných TLC destiček probíhala stejným způsobem jako u silikagelových desek.

3.5.4. *Hydroxylace katalyzovaná oxidem osmičelým na poly-4-vinylpyridinu*

Při hydroxylaci bylo na 10 mmol alkenů aplikováno 0,1 g katalyzátoru oxidu osmičelého vázaného na polymerním nosiči a 1 mmol sekundárního oxidantu NMO podle článku [65]. Chemikálie byly vpraveny do skleněné vialky a bylo přidáno 1000 μl 2-methylprop-2-olu. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 75 °C. Po 6 a 24 hodinách trvání reakce byla provedena destruktivní TLC (mobilní fáze chloroform) k vizuálnímu zjištění průběhu reakce. Po ukončení reakce byla směs filtrována od katalyzátoru přes skleněnou kolonku naplněnou extrahovanou vatou. Dále byla směs odpařena do sucha v proudu dusíku a doplněna 500 μl chloroformu. Pomocí TLC byla izolována zóna vzniklého hydroxyderivátu, vysušený produkt reakce byl zvážen a doplněn chloroformem.

3.5.5. *Hmotnostní spektrometrie*

3.5.5.1. *Ionizace elektrosprejem*

Při měření na přístroji LCQ Fleet za použití elektrospreje (ESI) jako ionizační techniky byl vzorek kontinuálně zaváděn přímým vstupem ze stříkačky o objemu 500 μl a průtoku 4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota vstupní (ESI) kapiláry byla 275°C. Napětí na sprejovací kapiláře bylo 4,5 kV. Data byla sbírána nepřetržitě. Spektra byla měřena jak v kladném, tak v záporném módu. Fragmentační spektra byla proměřována v rozmezí kolizních energií 20-35%.

Byla měřena fragmentační spektra aduktů vzorků s K^+ , NH_4^+ a Li^+ solemi. Byly připraveny vodné roztoky solí o koncentraci 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, které zaujímaly 10% vzorku (v/v).

3.5.5.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Při měření na přístroji LCQ Fleet za použití ionizační techniky chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) byla teplota odpařovače 425°C. Složení mobilní fáze bylo 90% methanolu a 10% vody (v/v), průtok byl 700 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a objem dávkovací smyčky byl 10 μl . Spektra byla měřena jak v kladném, tak v záporném módu. Data byla sbírána nepřetržitě.

Byla měřena spektra aduktů vzorku se solemi stejně jako v kap. 3.5.5.1.

3.5.6. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

K ověření přítomnosti izolovaných nenasycených kutikulárních uhlovodíků bylo používáno plynové chromatografie s hmotnostní detekcí GC/MS. Byl nastříkovan 1 μl vzorku za použití dělicího poměru 1:100. Teplota inletu byla 250°C. Mobilní fází bylo helium o průtoku 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Počáteční teplota pece s kolonou byla 40°C a to po dobu 4 minut. Poté byla teplota navyšována na teplotu 200°C rychlostí 8°C·min⁻¹. Následně bylo rychlostí 15°C·min⁻¹ dosaženo teploty 320°C. Celkový čas analýzy byl 35 minut.

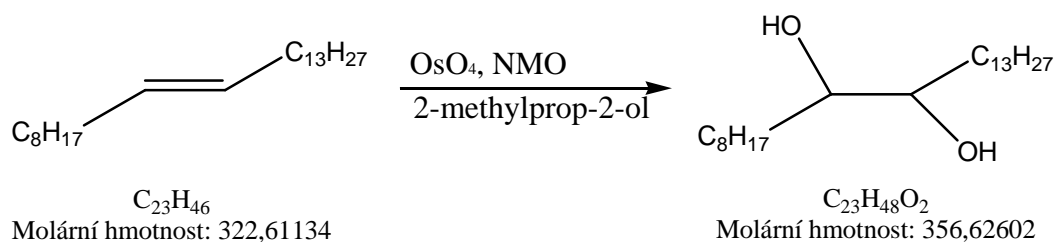
3.5.7. MALDI/TOF

Při měření MALDI/TOF byly jako matrice používány lithná a sodná sůl kyseliny dihydroxybenzoové (LiDHB, NaDHB). LiDHB byla rozpuštěna v acetonu:chloroformu v poměru 2:1 (nejprve byl dán přídavek acetonu), koncentrace LiDHB byla 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po rozpuštění matrice byl 1 μl matrice nanesen na MALDI desku. Po odpaření rozpouštědla z matrice nanesené na desce, byl na matrici nanesen vzorek o objemu 1 μl . NaDHB byla rozpuštěna v acetonu, koncentrace činila 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Poté byl smíchán 1 μl matrice NaDHB a 1 μl vzorku a po vysrážení matrice ve vzorku byl produkt nanesen na MALDI desku. Přístroj byl kalibrován použitím směsi oligomerů poly(ethylenglykolu) PEGu (o průměrných molárních hmotnostech 200, 300, 600 a 1000 Da) v acetonu, které byly detekovány jako sodné adukty.

4. Výsledky a diskuse

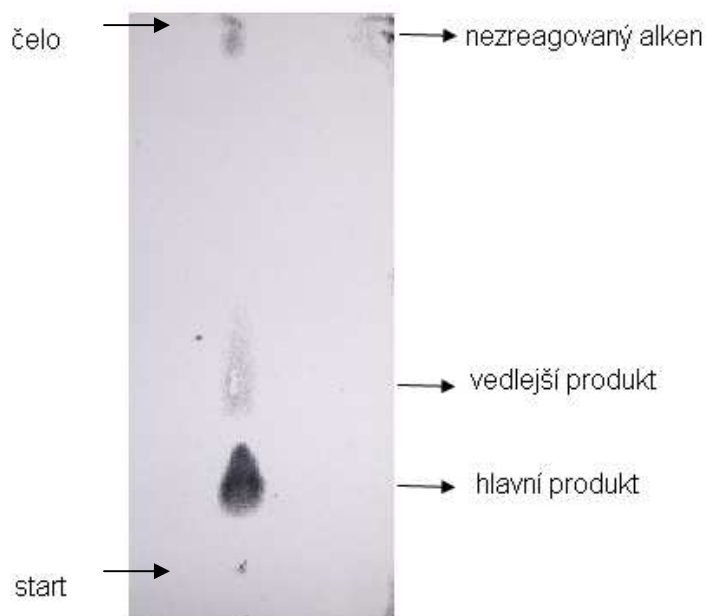
4.1. Hydroxylace standardu *cis*-9-trikosenu

Byla prováděna hydroxylace katalyzovaná oxidem osmičelým vázaným na poly-4-vinylpyridinu. Struktura očekávaného produktu je znázorněna na reakčním schématu (**Obr. 10**).



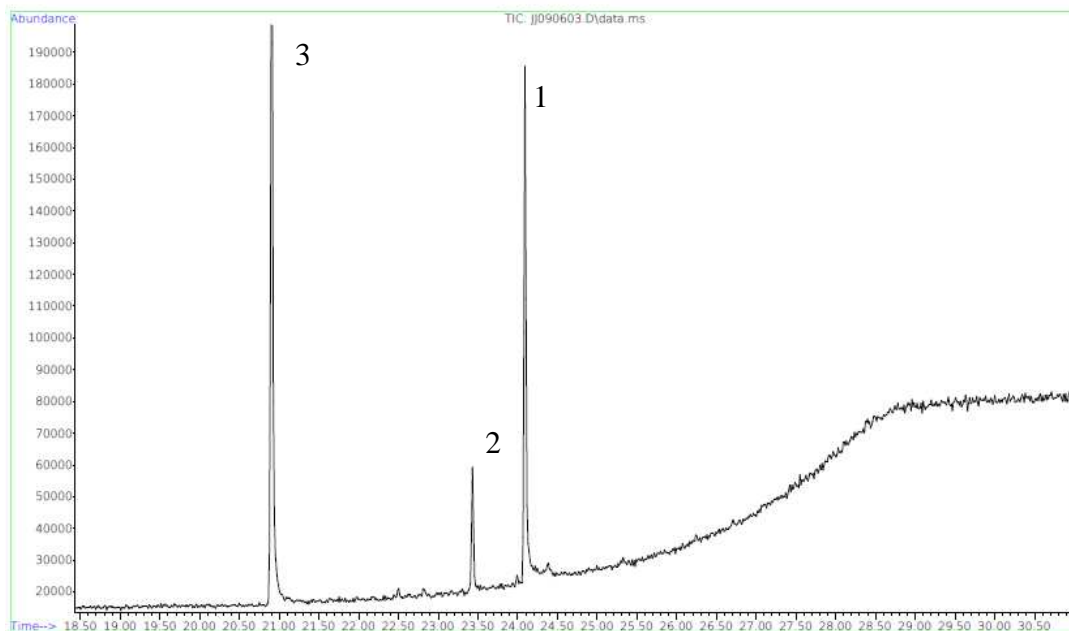
*Obr. 10: Reakční schéma hydroxylace *cis*-9-trikosenu oxidem osmičelým vázaným na poly-4-vinylpyridinu.*

Během reakce docházelo ke vzniku dvou produktů (**Obr. 11**). Reakční směs byla po ukončení reakce podrobena GC/MS analýze. Na základě interpretace GC/MS spekter byl identifikován hlavní produkt reakce 9,10-dihydroxytrikosen s retenčním časem 24,1 min. Pro potvrzení byly z reakční směsi pomocí TLC izolovány jednotlivé zóny a následně analyzovány na GC/MS. Porovnáním spekter naměřených před a po rozdělení byly píkům jednoznačně přiřazeny retenční časy patřící hlavnímu produktu reakce 9,10-dihydroxytrikosenu (1), vedlejšímu produktu reakce (2) a nezreagovanému *cis*-9-trikosenu (3) (**Obr. 12**).



Obr. 11: TLC reakční směsi hydroxylace *cis*-9-trikosenu. V reakčním prostředí 2-methylprop-2-olu. Mobilní fáze – chloroform. Vizualizace – 1% kyselina sírová v ethanolu.

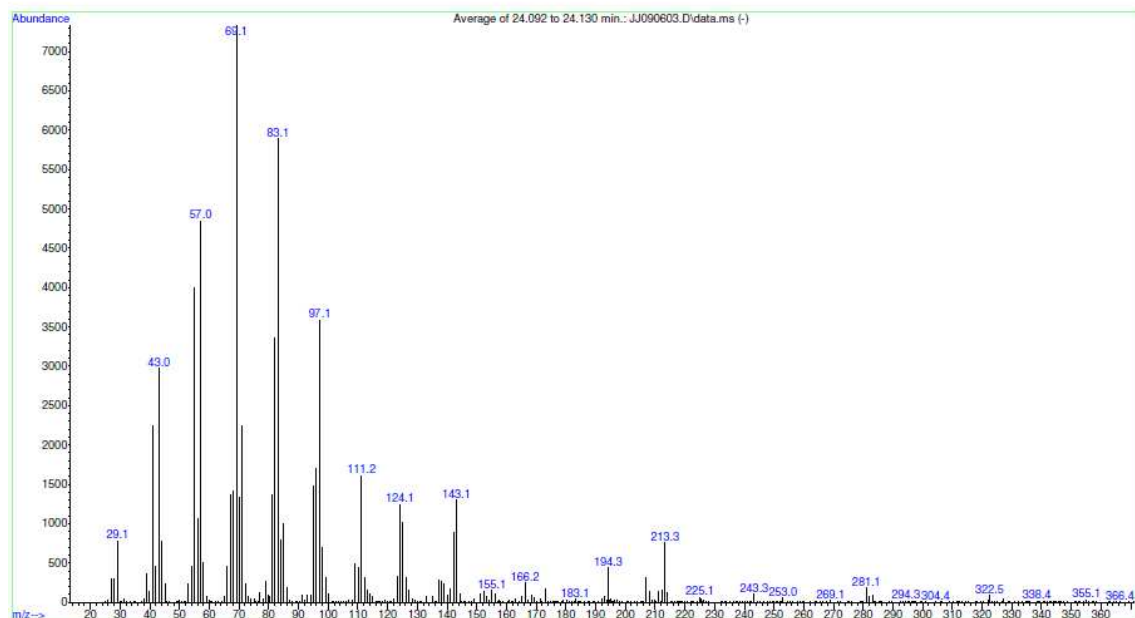
```
File       :F:\DATA_GC\0603\JJ090603.D
Operator   : JJ
Acquired   : 3 Jun 2009 13:58   using AcqMethod DIOL_JANA.M
Instrument  : 6890N + 5975B
Sample Name: Diol1
Misc Info  :
Vial Number: 1
```



Obr. 12: Chromatogram reakční směsi hydroxylace *cis*-9-trikosenu katalyzované oxidem osmičelým vázaným na poly-4-vinylpyridinu.

Elektronové spektrum hlavního produktu 9,10-dihydroxytrikosenu vykazuje charakteristické štěpení v místě původní dvojné vazby a štěpení typické pro uhlovodíkové řetězce – postupné ztráty alkylů. Odštěpením radikálu v místě původní dvojné vazby vznikají ionty m/z 143,1 ($C_9H_{19}O^+$) a m/z 213,3 ($C_{14}H_{29}O^+$). Odštěpením neutrálního alkoholu v místě původní dvojné vazby a následnou eliminaci vody vznikají ionty m/z 124,1 ($C_9H_{16}^{\bullet+}$) a m/z 194,3 ($C_{14}H_{26}^{\bullet+}$) (**Obr. 13**). Molekulární ion 9,10-dihydroxytrikosenu nebyl ve spektru přítomen.

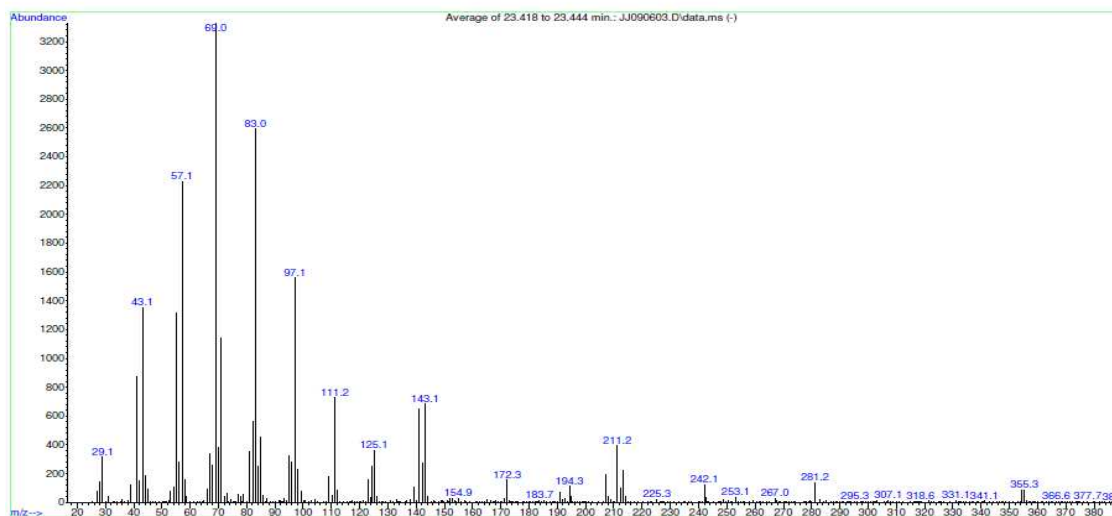
```
File       :D:\Data_OLD_V_do07_2009\JJ090603.D
Operator   : JJ
Acquired   : 3 Jun 2009 13:58      using AcqMethod DIOL_JANA.M
Instrument  : 6890N + 5975B
Sample Name: Diol1
Misc Info  :
Vial Number: 1
```



Obr. 13: Hmotnostní spektrum hlavního produktu hydroxylace 9,10-dihydroxytrikosenu.

Druhý reakční produkt vyizolovaný z reakční směsi měl při GC/MS analýze retenční čas 23,4 min (2) (**Obr. 12**). Tento produkt nebyl na základě hmotnostního spektra identifikován (**Obr. 14**).

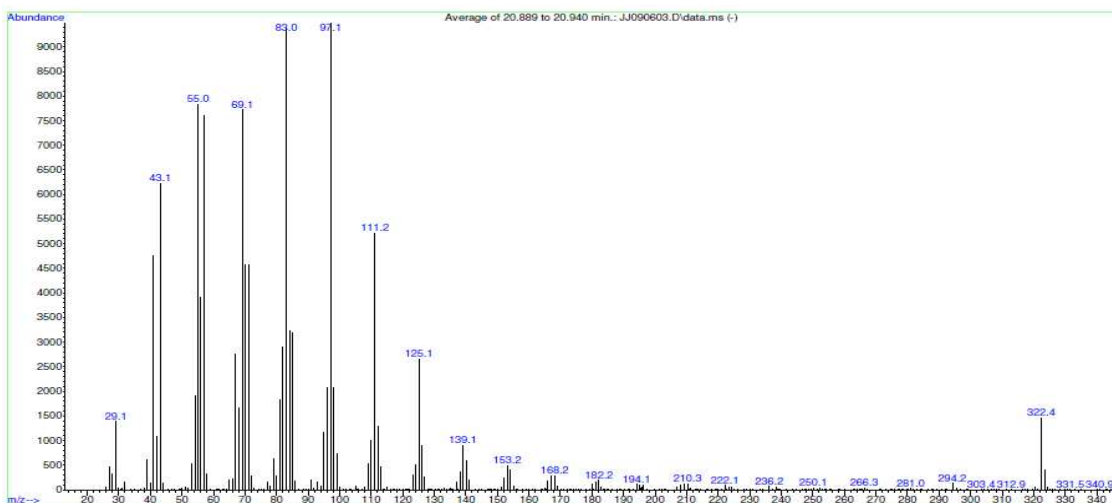
File :D:\Data_OLD_V_do07_2009\JJ090603.D
 Operator : JJ
 Acquired : 3 Jun 2009 13:58 using AcqMethod DIOL_JANA.M
 Instrument : 6890N + 5975B
 Sample Name: Diol1
 Misc Info :
 Vial Number: 1



Obr. 14: Hmotnostní spektrum vedlejšího produktu hydroxylace.

V retenčním čase 20,9 min. se eluoval nezreagovaný *cis*-9-trikosen (3) (Obr. 12). V hmotnostním spektru (Obr. 15) byl patrný molekulový pík *cis*-9-trikosenu (M^+ , m/z 322,5). Fragmenty vznikající ve zdroji pro elektronovou ionizaci jsou vysvětlitelné ztrátami alkylů.

File :D:\Data_OLD_V_do07_2009\JJ090603.D
 Operator : JJ
 Acquired : 3 Jun 2009 13:58 using AcqMethod DIOL_JANA.M
 Instrument : 6890N + 5975B
 Sample Name: Diol1
 Misc Info :
 Vial Number: 1

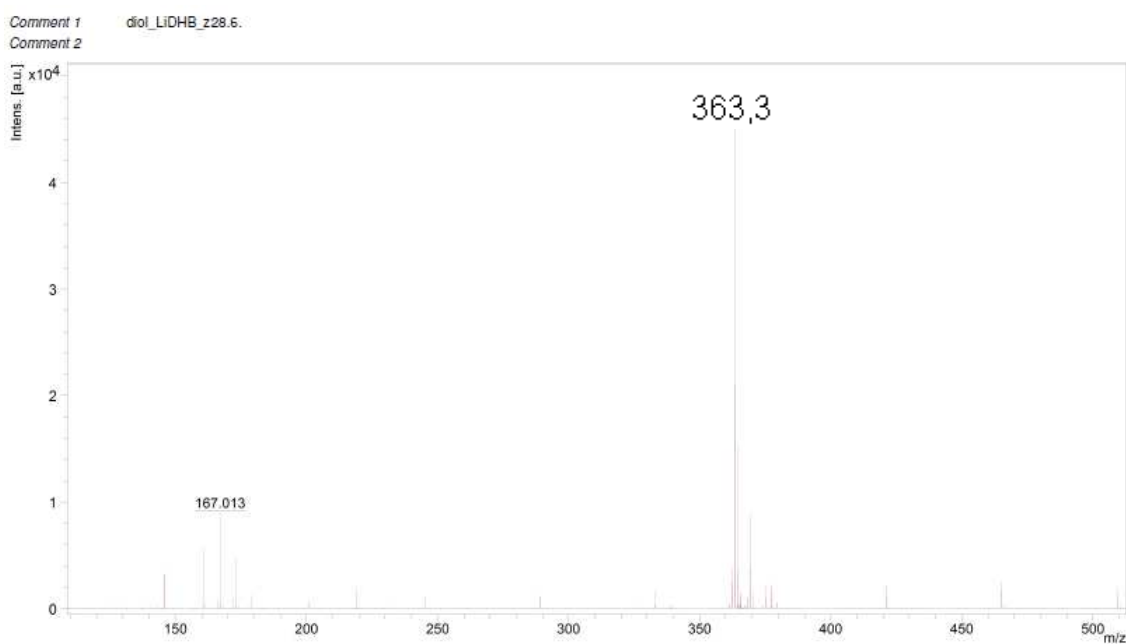


Obr. 15: Hmotnostní spektrum nezreagovaného *cis*-9-trikosenu.

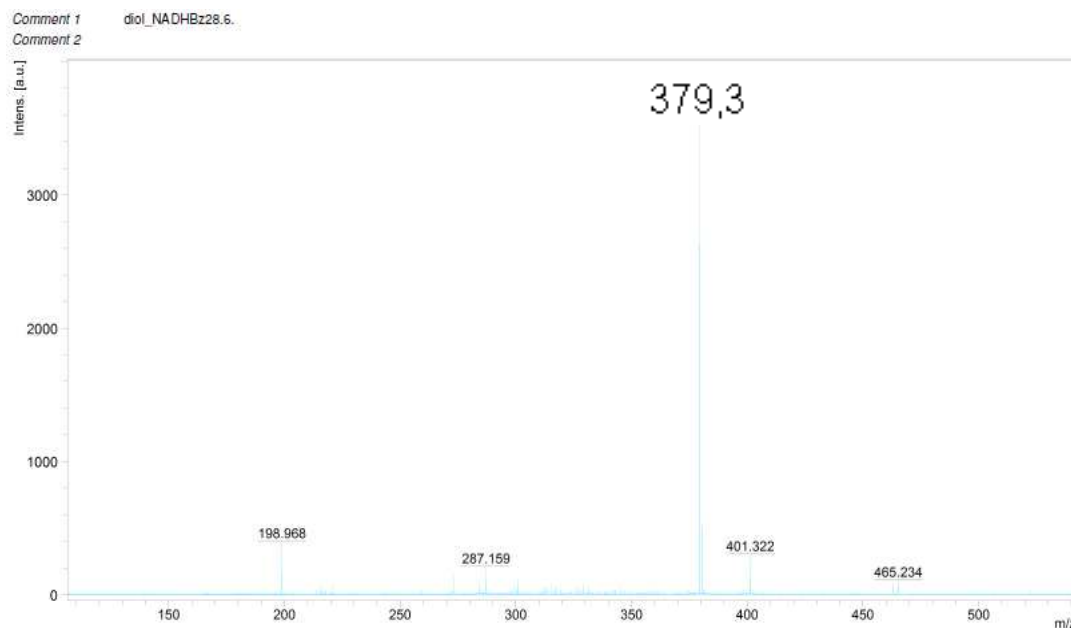
I přes zachování stechiometrického poměru reaktantů [64] kvantitativně převažuje nezreagovaný *cis*-9-trikosen. Z tohoto důvodu byl proveden experiment, kdy byla reakční směs ponechána reagovat déle než jeden týden, přičemž množství nezreagovaného uhlovodíku bylo sledováno metodou TLC. Ani po dvou měsících se množství nezreagovaného uhlovodíku výrazně nezměnilo.

Retence složek reakční směsi na koloně plynového chromatografu je opačná než na TLC silikagelové desce. Důvodem je rozdílnost polaritý stacionární fáze v GC polysiloxanové koloně, která je relativně nepolární v porovnání s polárním silikagelem.

Byla naměřena MALDI spektra hlavního produktu reakce 9,10-dihydroxytrikosenu při použití matric LiDHB a NaDHB. Molekulové adukty 9,10-dihydroxytrikosenu byly zřetelné v obou případech použitých matric. V případě matrice LiDHB docházelo ke vzniku lithného aduktu s diolem $[M+Li]^+$ o m/z 363,3 (**Obr. 16**). S matricí NaDHB docházelo ke vzniku sodného aduktu s diolem $[M+Na]^+$ o m/z 379,3 (**Obr. 17**).



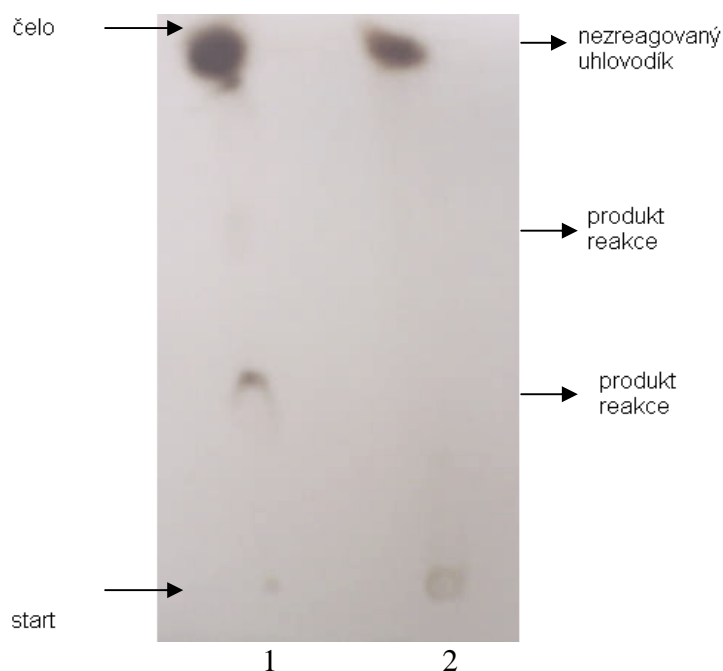
Obr. 16: MALDI spektrum produktu reakce 9,10-dihydroxytrikosenu. Použitá matrice - ⁷LiDHB.



Obr. 17: MALDI spektrum produktu reakce 9,10-dihydroxytrikosenu. Použitá matrice - NaDHB.

Dále byl zkoušen vliv prostředí reakce na výtěžek produktu. Reakce byly prováděny v čistém 2-methylprop-2-olu, v systému 80% 2-methylprop-2-olu a 20% vody (v/v) a v systému aceton/voda/acetonitril (1/1/1; v/v/v). Při použití čistého 2-methylprop-2-olu a systému 80% 2-methylprop-2-olu a 20% vody (v/v) byl reakční výtěžek stejný. Z praktických důvodů byl dále používán čistý 2-methylprop-2-ol, protože v případě systému obsahujícího vodu, bylo třeba reakční směs zpracovávat oddělením fází a následných sušením. V systému aceton/voda/acetonitril reakce neproběhla vůbec (Obr. 18).

Dalšími sledovanými parametry byly doba a teplota reakce. Při teplotě 21°C byla nutná minimální doba reakce 1 týden. Zahřáním na 75°C se doba reakce zkrátila na 24 hodin. Rovněž z praktických důvodů byla reakce dále prováděna při teplotě 21°C po dobu jednoho týdne.



Obr. 18: TLC reakční směsi hydroxylace *cis-9-trikosenu*. V pozici jedna: prostředí 2-methylprop-2-olu, v pozici dvě: prostředí v systému aceton/voda/acetonitril (1/1/1). Mobilní fáze – chloroform. Vizualizace – 1% kyselina sírová v ethanolu.

4.1.1 Shrnutí reakčních podmínek hydroxylace standardu *cis-9-trikosenu* katalyzované oxidem osmičelým na poly-4-vinylpyridinu

Byly sledovány podmínky reakce a to: volba rozpouštědla, teplota a reakční čas. Dále byly diskutovány EI spektra složek reakční směsi a hledané optimální matrice při MALDI experimentech. Jako rozpouštědlo se osvědčil 2-methylprop-2-ol a systém 80% 2-methylprop-2-olu a 20% vody (v/v). Dále byl využíván samotný 2-methylprop-2-ol. Srovnatelné výsledky byly dosaženy při dodržení reakční teploty 75°C po dobu 24 hodin jako při 21°C po dobu jednoho týdne. U následujících experimentů byla hydroxylace prováděna při 21°C po dobu jednoho týdne. Při měření MALDI, byl vzorek dobře ionizován jak v lithné LiDHB, tak v sodné NaDHB matrici. Uvedené reakční podmínky byly následně aplikovány na reálných vzorcích nenasycených uhlovodíků izolovaných ze švába amerického *P. americana* a masačky *N. bulata*.

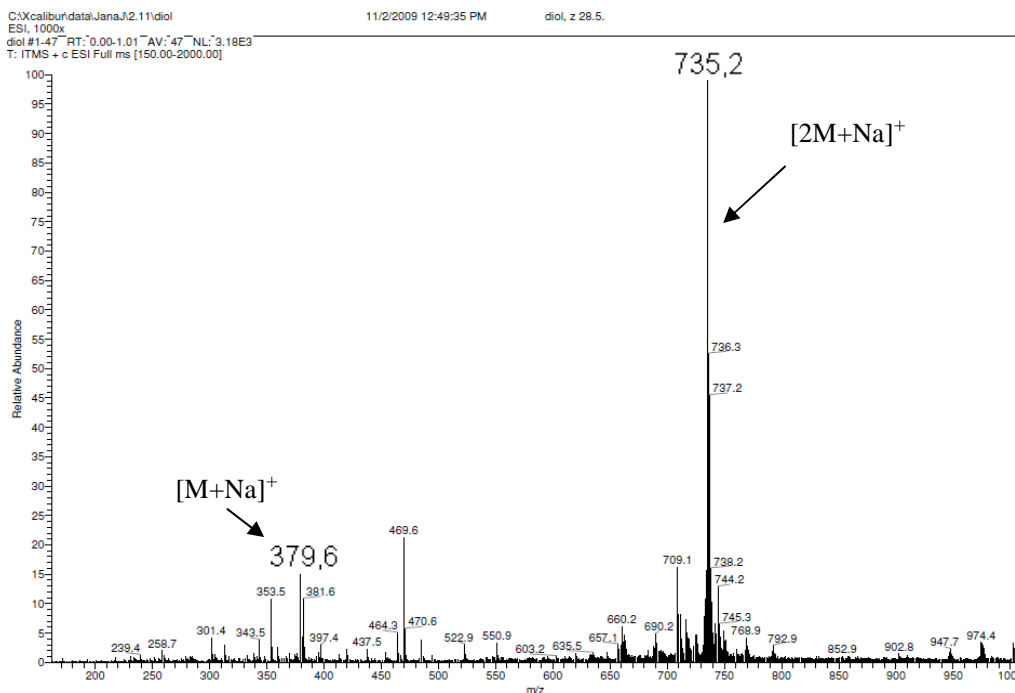
4.2. Fragmentace produktu hydroxylace standardu *cis*-9-trikosenu

Jako ionizační techniky byly použity elektrosprej a chemická ionizace za atmosférického tlaku, jak v kladném, tak v záporném módu. V kladném módu docházelo k vytváření aduktů se sodíkem $[M+Na]^+$ a použitím kationizačních činidel (K^+ , NH_4^+ a Li^+ soli) vznikaly příslušné adukty $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ a $[M+Li]^+$. V záporném módu vznikaly deprotonované molekuly $[M-H]^-$. K určení polohy dvojné vazby byly využívány MS^n experimenty. V ideálním případě měl být hydroxy derivát standardu *cis*-9-trikosenu fragmentován v místě původní dvojné vazby.

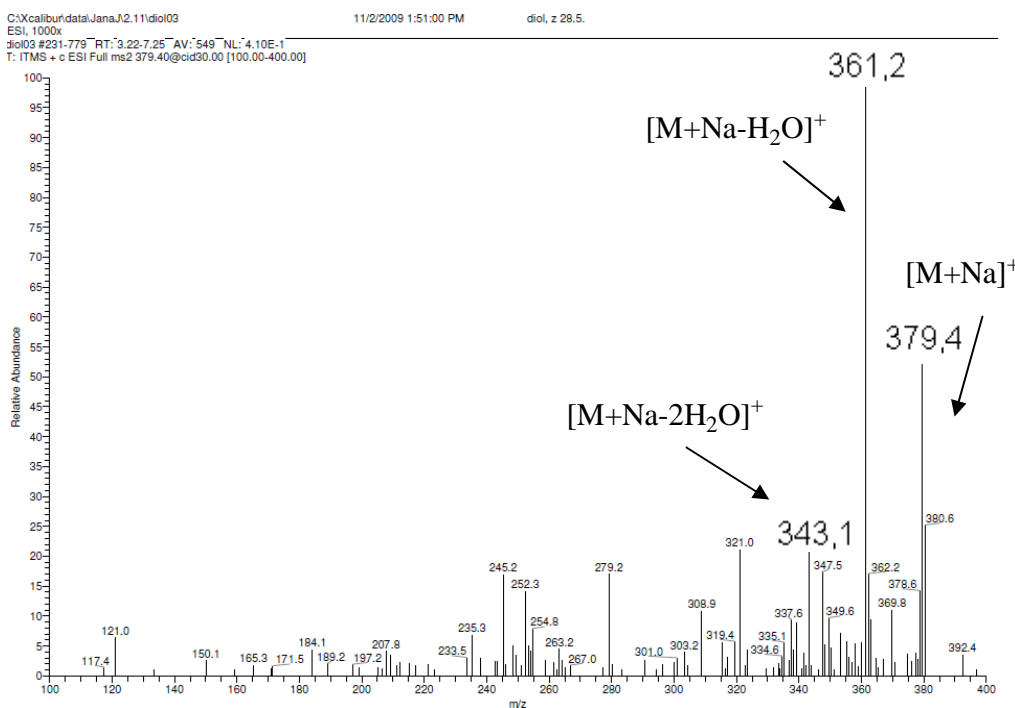
4.2.1. Ionizace elektrosprejem

Na obrázku (**Obr. 19**) je ESI spektrum produktu hydroxylace 9,10-dihydroxytrikosenu měřené v kladném módu. Dochází k tvorbě aduktů se sodíkem $[M+Na]^+$. Izolovanému diolu odpovídá hodnota m/z 379,6. Hodnota m/z 735,2 odpovídá dimeru $[2M+Na]^+$, který vzniká při ionizaci v elektrospreji. Při fragmentaci iontu m/z 379,6 $[M+Na]^+$ dochází primárně ke ztrátě vody $[M+Na-H_2O]^+$ m/z 361,2 a $[M+Na-2H_2O]^+$ m/z 343,1 při kolizních energiích od 30%. Fragmenty, které by odpovídaly štěpení v místě původní dvojné vazby buď nevznikají nebo jsou v šumu (**Obr. 20**). Měřením spektra hydroxyderivátu s přidávkem draselné soli docházelo ke vzniku aduktu $[M+K]^+$ o m/z 395,2 (**Obr. 21**). Ve spektru je přítomen dimer $[2M+Na]^+$ o m/z 734,8, který je způsoben kontaminací ze skla. Dimer aduktu s draselným iontem nebyl pozorován. Při fragmentaci iontu o m/z 395,2 docházelo ke ztrátě vody (m/z 377,1). Intenzivnější fragmenty nebyly popsány logickými ztrátami (**Obr. 22**). Přidávkem podílu amonné soli vznikaly adukty $[M+NH_4]^+$ o m/z 374,2 (**Obr. 23**). Ve spektru je přítomen dimer $[2M+Na]^+$ o m/z 734,8, který je způsoben kontaminací ze skla. Dimer aduktu s amonným iontem nebyl pozorován. Fragmentací iontu o m/z 374,2 byla primárně odštěpována voda $[M+NH_4-H_2O]^+$ o m/z 339,1 a $[M+NH_4-2H_2O]^+$ o m/z 320,8 (**Obr. 24**). Přidávkem lithné soli vznikaly adukty $[M+Li]^+$ o m/z 363,5 (**Obr. 25**). Fragmentací iontu o m/z 363,5 docházelo primárně ke ztrátě

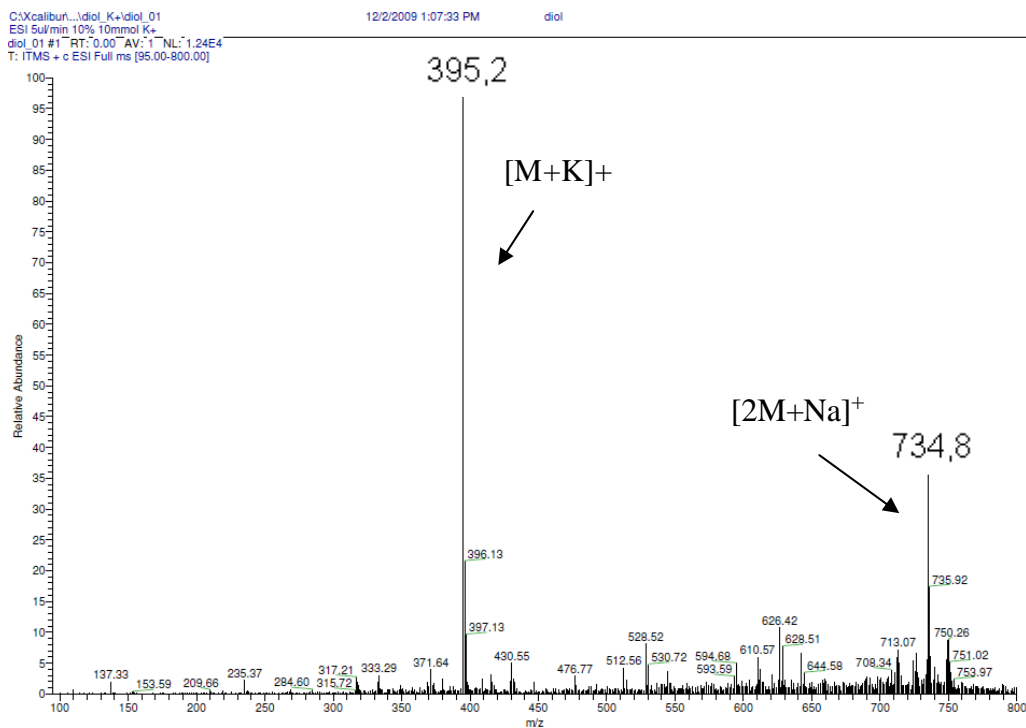
vody $[M+Li-H_2O]^+$ o m/z 345,4. Charakteristické fragmenty určující polohu dvojně vazby buď nevznikaly, nebo jejich intenzita byla nízká (**Obr. 26**).



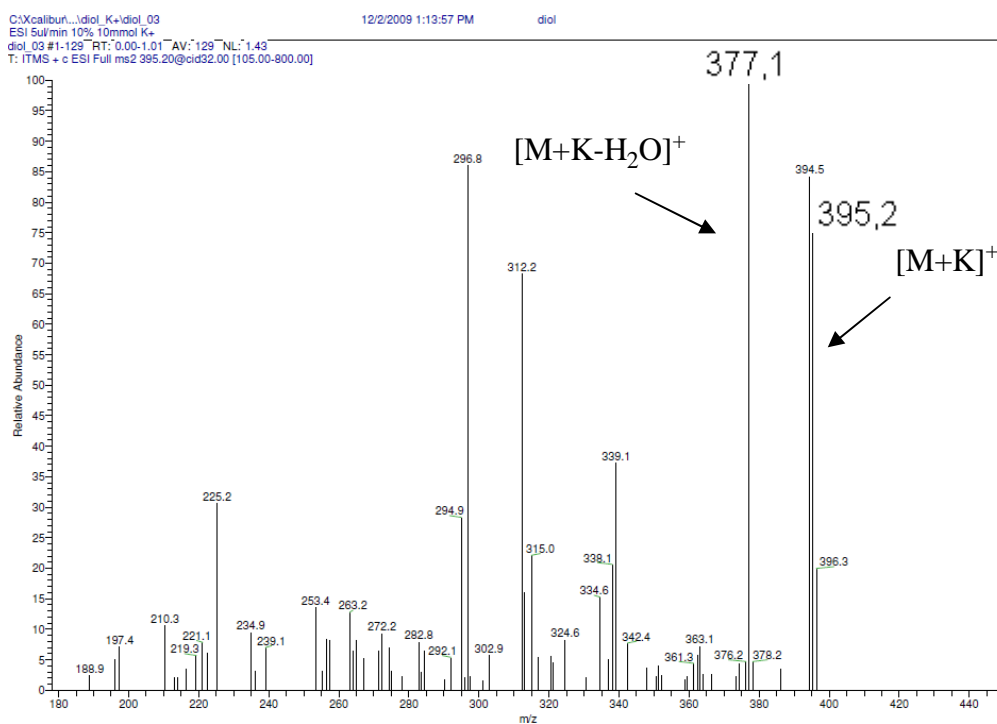
Obr. 19: Hmotnostní spektrum 9,10-dihydroxytrikosenu, koncentrace vzorku: 0,39 mg.ml⁻¹ v methanolu, přímým vstupem-průtok 5 μl.



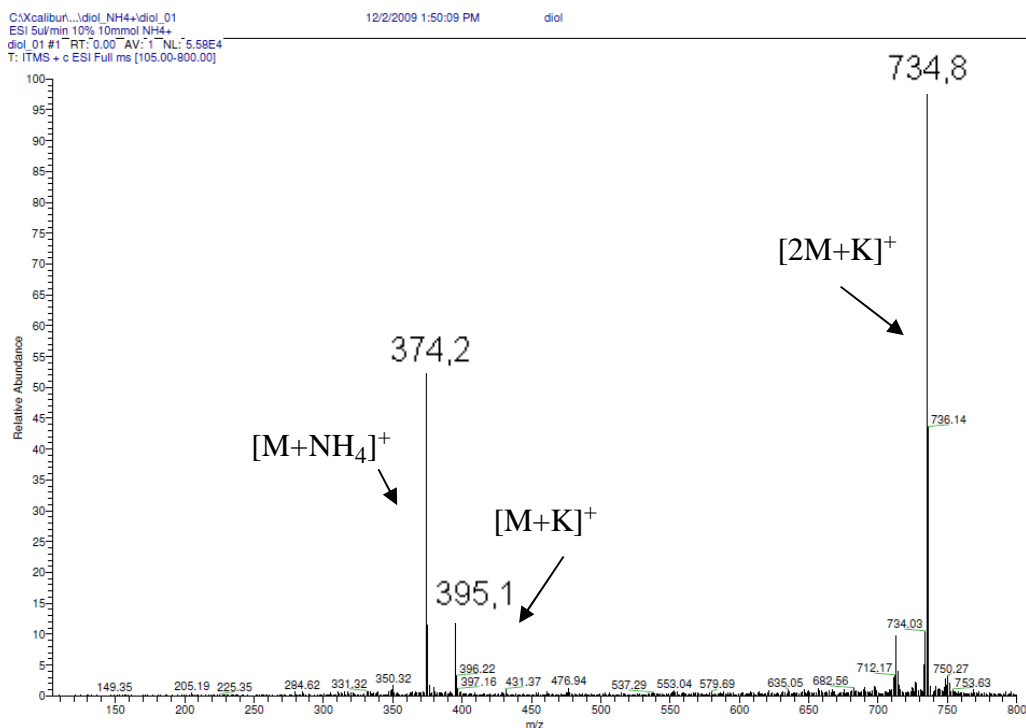
Obr. 20: Fragmentační spektrum sodného aduktu 9,10-dihydroxytrikosenu, koncentrace: 0,39 mg.ml⁻¹ v methanolu, přímým vstupem-průtok 5 μl, kolizní energie 30%.



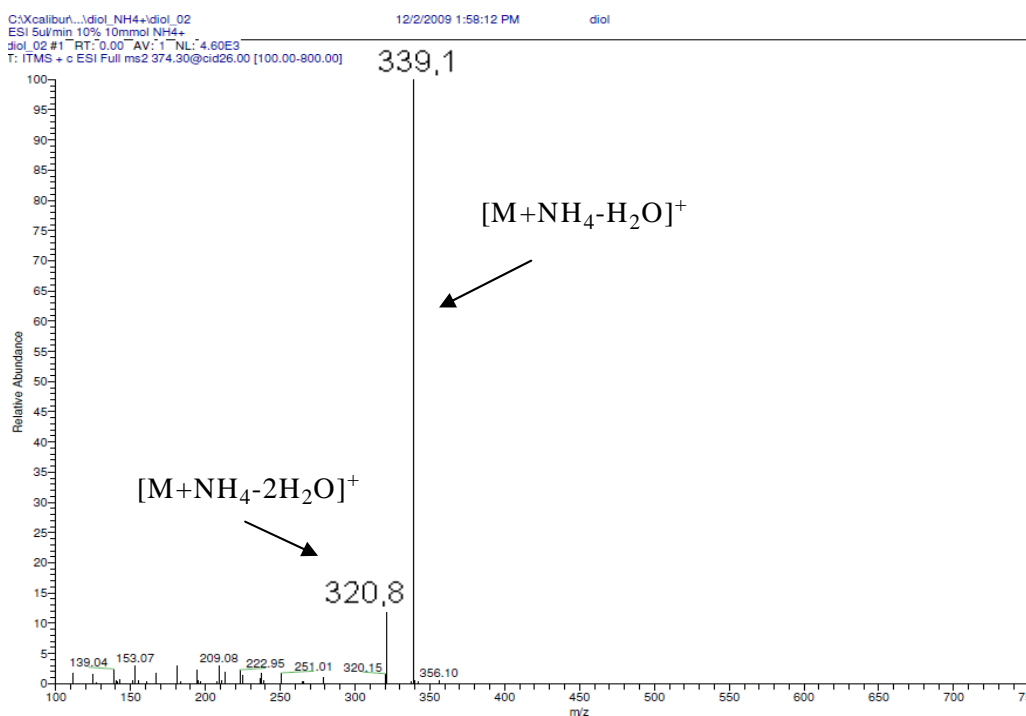
Obr. 21: Hmotnostní spektrum draselného aduktu 9,10-dihydroxytrikosenu s kationizačním činidlem, koncentrace: 0,39 mg.ml⁻¹ v methanolu, přímým vstupem-průtok 5μl,



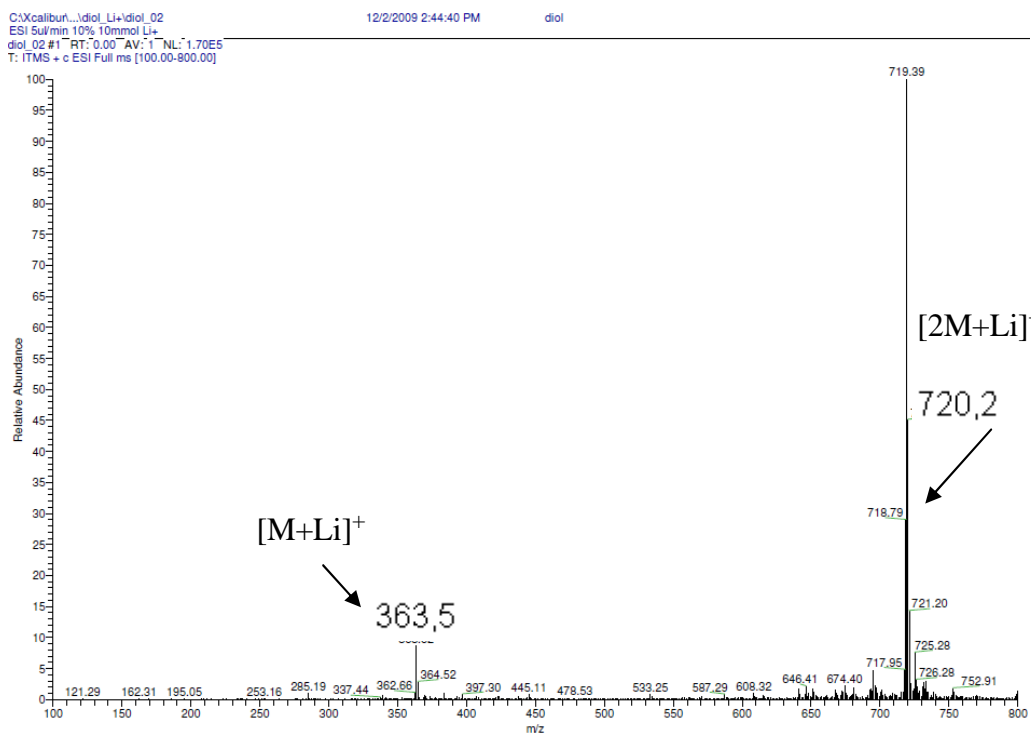
Obr. 22: Fragmentační spektrum draselného aduktu 9,10-dihydroxytrikosenu s kationizačním činidlem⁺, koncentrace: 0,39 mg.ml⁻¹ v methanolu, přímým vstupem-průtok 5μl, kolizní energie 32%.



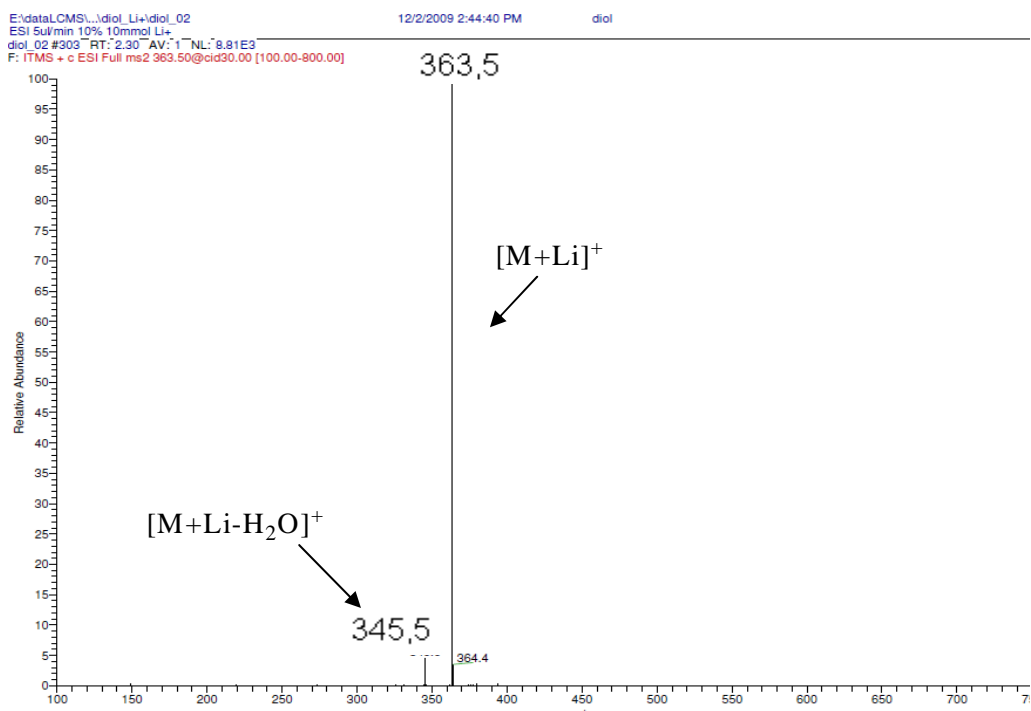
Obr. 23: Hmotnostní spektrum amonného aduktu 9,10-dihydroxytrikosenu s kationizačním činidlem, koncentrace: 0,39 mg.ml⁻¹ v methanolu, přímým vstupem-průtok 5μl.



Obr. 24: Fragmentační spektrum amonného aduktu 9,10-dihydroxytrikosenu s kationizačním činidlem, koncentrace: 0,39 mg.ml⁻¹ v methanolu, přímým vstupem-průtok 5μl, kolizní energie 26%.

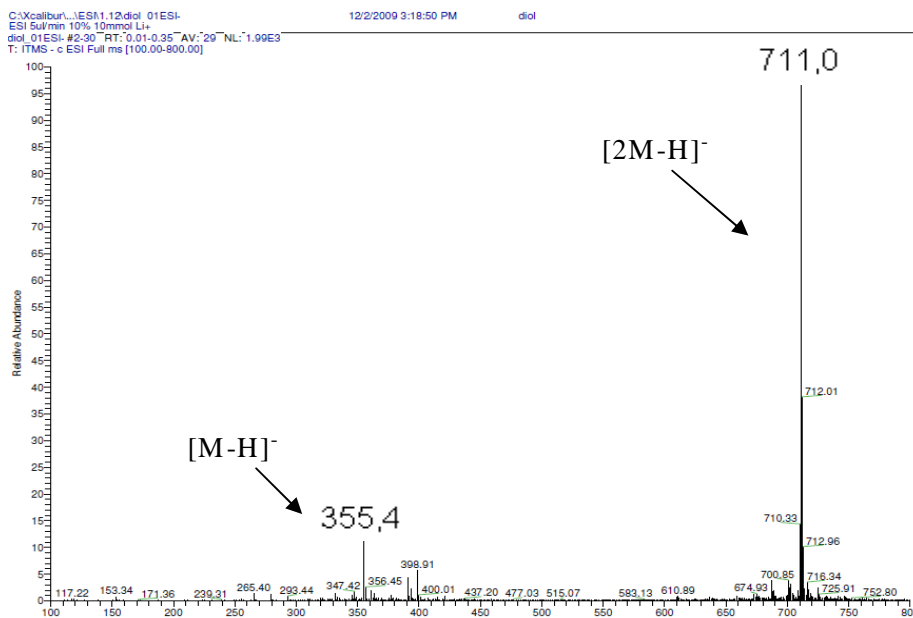


Obr. 25: Hmotnostní spektrum lithného aduktu 9,10-dihydroxytrikosenu s kationizačním činidlem, koncentrace: 0,39 mg.ml⁻¹ v methanolu, přímým vstupem-průtok 5μl.

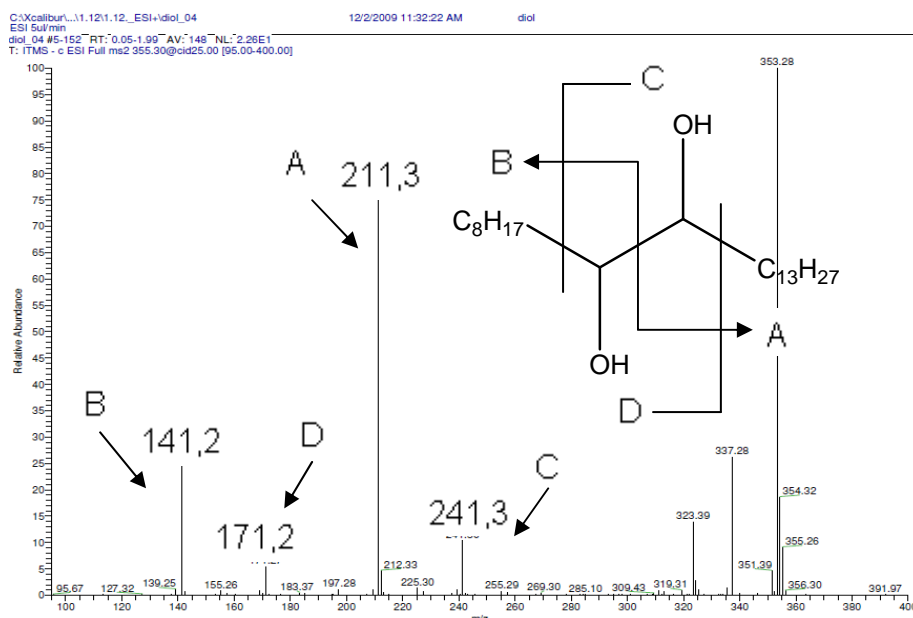


Obr. 26: Fragmentační spektrum lithného aduktu 9,10-dihydroxytrikosenu s kationizačním činidlem, koncentrace: 0,39 mg.ml⁻¹ v methanolu, přímým vstupem-průtok 5μl, kolizní energie-30%.

Spektrum hydroxyderivátu bylo proměřeno i v záporném módu za vzniku deprotonované molekuly $[M-H]^-$ o m/z 355,4. Ve spektru je dobře patrný i dimer vznikající v elektrospreji o m/z 711,0 (**Obr. 27**). Při fragmentaci iontu o m/z 355,4 vznikají štěpením v místě původní dvojně vazby intenzivní ionty o m/z 211,3 a o m/z 141,2 (**Obr. 28**). Další, méně intenzivní fragmenty o m/z 241,3 a m/z 171,2 vznikají štěpením sousední vazby od vazby v místě derivatizace.



Obr. 27: Hmotnostní spektrum 9,10-dihydroxytrikosenu v záporném módu, koncentrace: $0,39 \text{ mg.ml}^{-1}$ v methanolu, přímým vstupem-průtok $5 \mu\text{l}$.



Obr. 28: Fragmentační spektrum 9,10-dihydroxytrikosenu v záporném módu, koncentrace: $0,39 \text{ mg.ml}^{-1}$ v methanolu, přímým vstupem-průtok $5 \mu\text{l}$, kolizní energie 25%.

4.2.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Použitím chemické ionizace za atmosférického tlaku jako ionizační techniky nebylo úspěšné. 9,10-Dihydroxytrikosen nebyl ionizován v kladném módu ani v záporném módu. Neúspěšné bylo rovněž použití kationizačních činidel. Příslušné molekulární adukty nevznikaly a nebyly proto ani prováděny fragmentace.

4.2.3 Shrnutí dosažených výsledků při fragmentačních experimentech

Produkt hydroxylace *cis*-9-trikosenu (9,10-dihydroxytrikosen) byl podroben fragmentačním experimentům za pomoci ESI a APCI jako ionizačních technik. Měření bylo prováděno jak v kladném módu, tak v záporném módu. V kladném módu byla použita kationizační činidla.

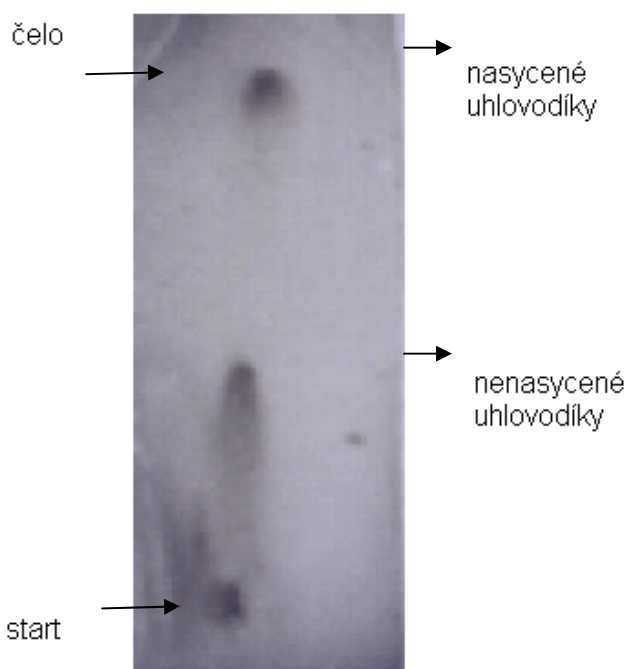
V kladném módu ESI techniky byly ve spektrech zřetelné ionty odpovídající svou hmotností produktu hydroxylace. Při jejich fragmentaci byly ve všech případech typické ztráty vody. Očekávané fragmenty, podle kterých by bylo možné zpětně ověřit polohu dvojně vazby, nebyly nalezeny. Stejných výsledků bylo dosaženo s použitím kationizačních činidel.

Použitím APCI techniky nebylo úspěšné ani v kladném, ani v záporném módu. Ve spektrech nebyly přítomny ionty aduktů 9,10-dihydroxytrikosenu a tudíž nebyly prováděny ani fragmentace.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo měřením v záporném módu ESI techniky. Fragmentací se deprotonovaná molekula štěpila v místě původní dvojně vazby a vazby sousední. Proto byla tato technika dále využívána při fragmentačních experimentech reálných vzorků nenasycených uhlovodíků izolovaných ze švába amerického *P. americana* a masařky *N. bullata*

4.3. Izolace nenasycených uhlovodíků ze švába amerického

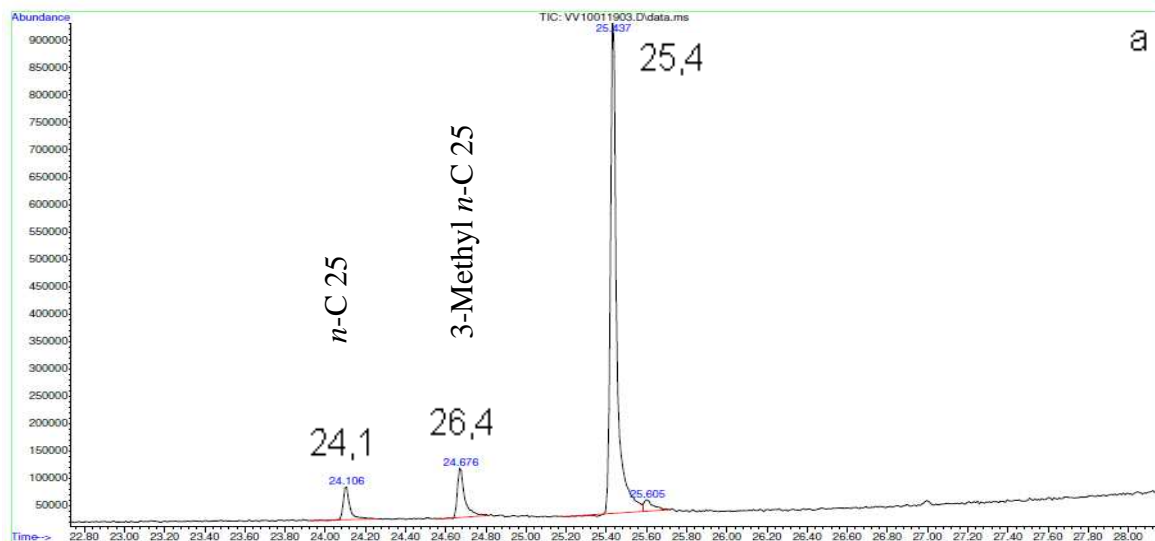
Extrakcí těl hmyzu bylo získáno 41,8 mg extraktu. Ze získaného extraktu bylo pomocí TLC izolováno 19,1 mg kutikulárních uhlovodíků. Dále bylo ze směsi kutikulárních uhlovodíků pomocí TLC desky se silikagelem a 20% dusičnanem stříbrným (**Obr. 29**) vyizolováno 7 mg nenasycených uhlovodíků a 6 mg nasycených uhlovodíků.



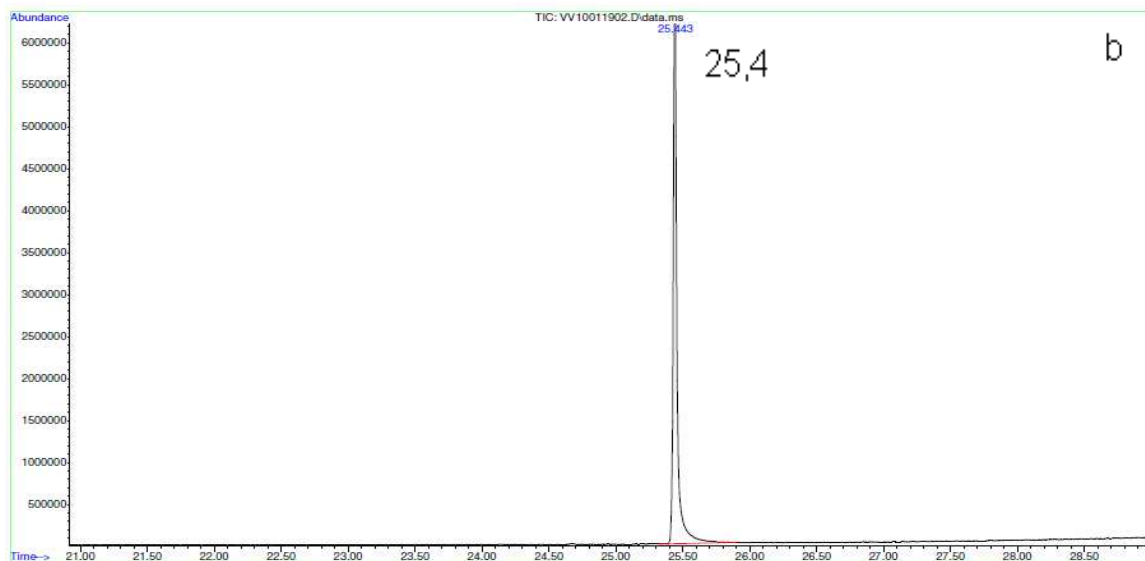
*Obr. 29: TLC směsi kutikulárních uhlovodíků izolovaných ze švába amerického *P. americana*. TLC deska se silikagelem a 20% dusičnanem stříbrným. Mobilní fáze – hexan. Vizualizace – 1% kyselina sírová v ethanolu.*

Byla naměřena GC/MS spektra kutikulárních uhlovodíků před a po rozdělení na nasycené a nenasycené (**Obr. 30a, b**). Nenasyceným uhlovodíků s retenčním časem 25,4 min odpovídala látka s relativní molární hmotností m/z 376,4 (**Obr. 31**). Porovnáním s literaturou [7] bylo zjištěno, že se jedná o (Z,Z)-6,9-heptakosadien. Retenční čas 24,1 min a EI spektrum odpovídá pentakosanu (*n*-C25) a retenční čas 26,4 min a EI spektrum odpovídá 3-methylpentakosanu (3-Me *n*-C25).

File :D:\Data\VV10011903.D
 Operator : Vrkoslav
 Acquired : 19 Jan 2010 18:20 using AcqMethod JJ_UHLOVODIKY.M
 Instrument : 6890N + 5975B
 Sample Name: Svab
 Misc Info : 10x hexan (GC/MS)
 Vial Number: 3

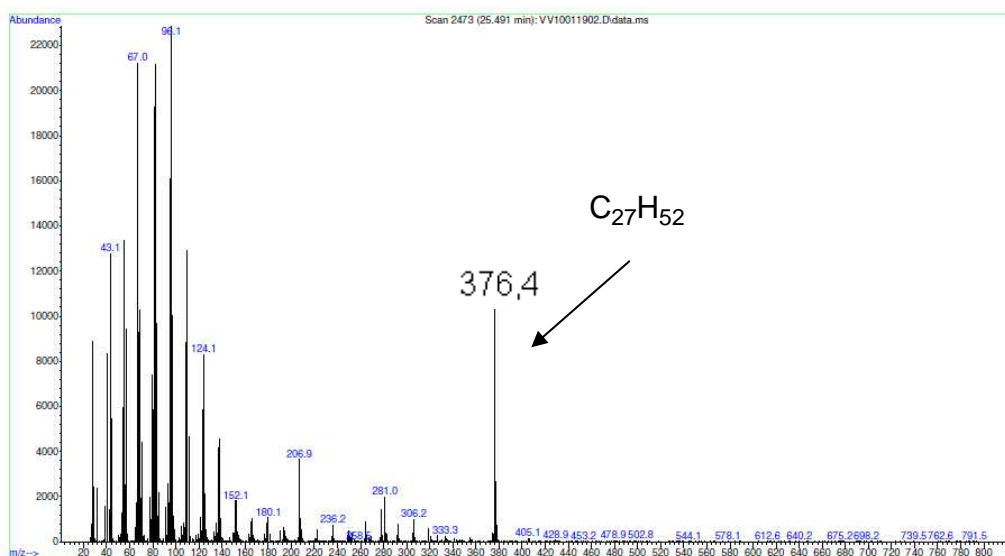


File :D:\Data\VV10011902.D
 Operator : Vrkoslav
 Acquired : 19 Jan 2010 17:34 using AcqMethod JJ_UHLOVODIKY.M
 Instrument : 6890N + 5975B
 Sample Name: Svab nenas
 Misc Info : 10x ChCl3
 Vial Number: 2



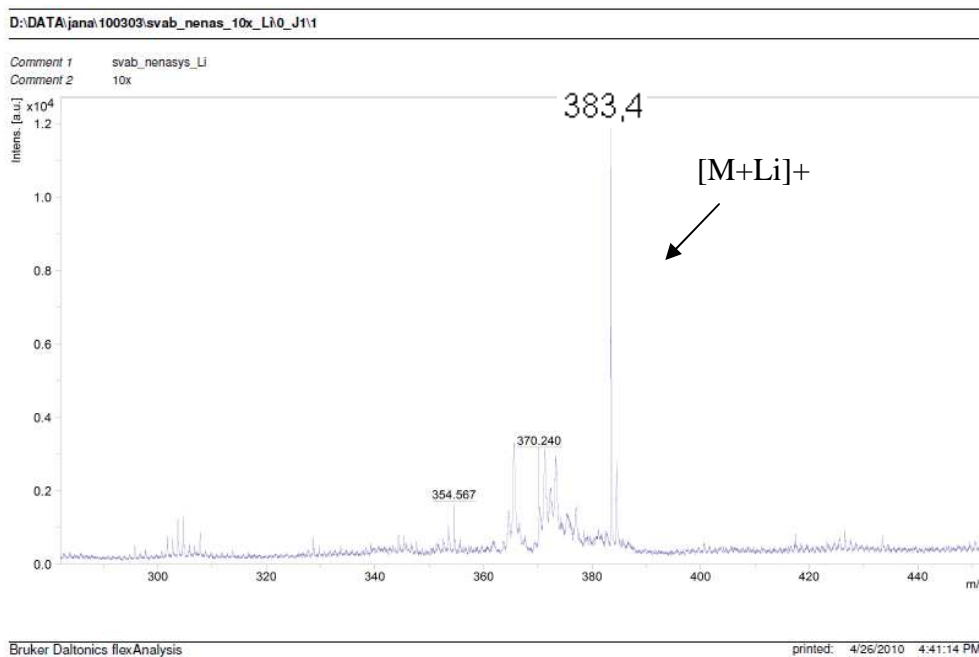
Obr. 30: a) GC chromatogram směsi kutikulárních uhlovodíků izolovaných ze švába amerického . b) GC chromatogram nenasycených uhlovodíků izolovaných ze směsi kutikulárních uhlovodíků ze švába amerického *P. americana*.

File :D:\Data\VV10011902.D
 Operator : Vrkošlav
 Acquired : 19 Jan 2010 17:34 using AcqMethod JJ_UHLOVODIKY.M
 Instrument : 6890N + 5975B
 Sample Name: Svab nenas
 Misc Info : 10x ChCl3
 Vial Number: 2



Obr. 31: Hmotnostní spektrum nenasyceného uhlovodíku izolované ze švába amerického

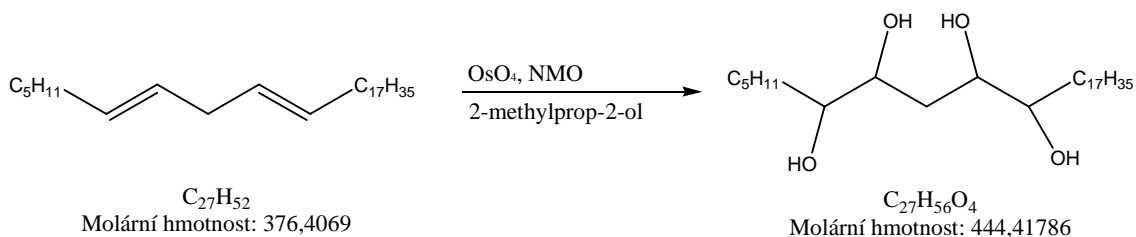
Rovněž bylo měřeno MALDI spektrum (Obr. 32). Ion s hmotností m/z 383,4 náleží lithnému aduktu nenasyceného dienu ((Z,Z)-6,9-heptakosadien).



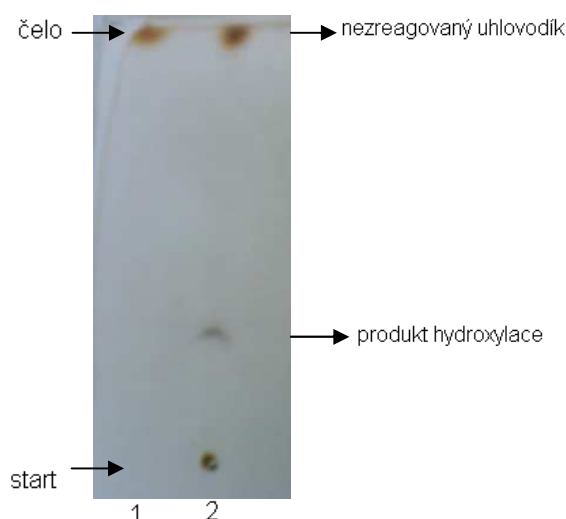
Obr. 32: MALDI-TOF spektrum nenasycených uhlovodíků švába amerického *P. americana*. Matrice: $^7\text{LiDHB}$.

4.4. Hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu

Reakce byla prováděna v systému 2-methylprop-2-olu po dobu jednoho týdne při teplotě 21°C. Očekávaná struktura a hmotnost produktu je znázorněna na schématu (Obr. 33). Po uplynutí jednoho týdne trvání reakce byl pomocí techniky TLC zaznamenán produkt reakce, ten byl z reakční směsi vyizolován (Obr. 34). Hmotnost produktu hydroxylace byla 0,4 mg. Produkt hydroxylace byl analyzován pomocí MALDI (Obr. 35), kdy byl identifikován adukt produktu hydroxylace s lithiem o m/z 417,3. Avšak podle molární hmotnosti se jeví, že produktem hydroxylace je dihydroxyderivát a to by znamenalo, že derivatizace proběhla pouze na jedné dvojně vazbě. Z hlediska vyšší polariry očekávaného hydroxyderivátu bylo možné, že se očekávaný produkt reakce nacházel na startu TLC desky. Proto byla vyzkoušena polární mobilní fáze, avšak neúspěšně. Také bylo naměřeno MALDI spektrum vzorku získaného izolací zóny ze startu, ale ve spektru nebyly přítomny adukty hydroxyderivátu (Z,Z)-6,9-heptakosadienu.



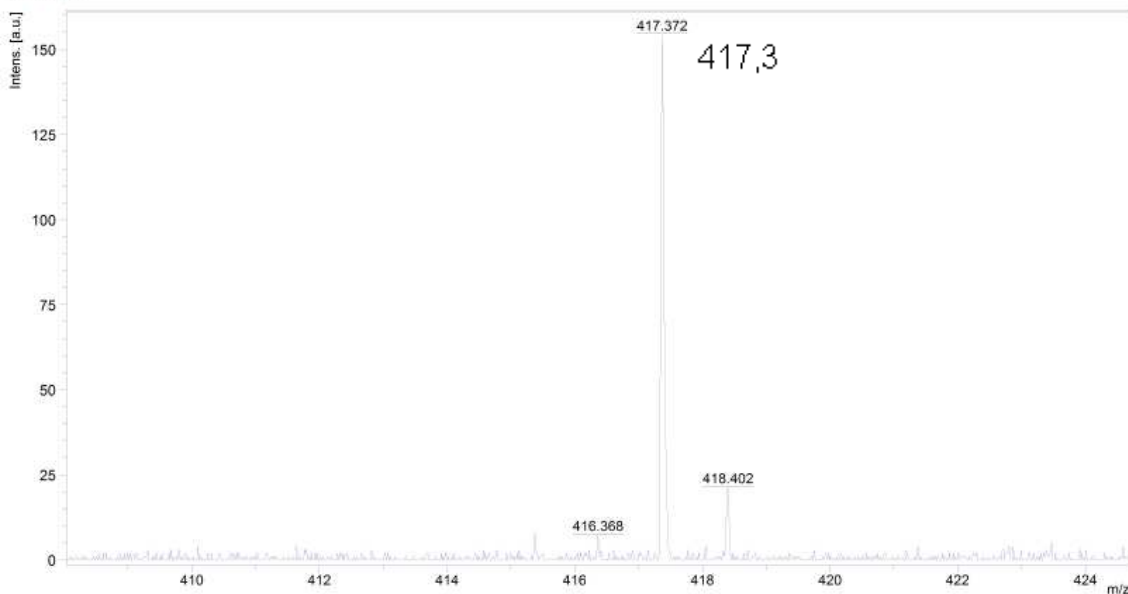
Obr. 33: Reakční schéma hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu.



Obr. 34: TLC reakční směsi hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu. V pozici: jedna výchozí uhlovodík, v pozici dvě: reakční směs. Mobilní fáze – chloroform. Vizualizace – 1% kyselina sírová v ethanolu.

Comment 1 Li_tzona svab

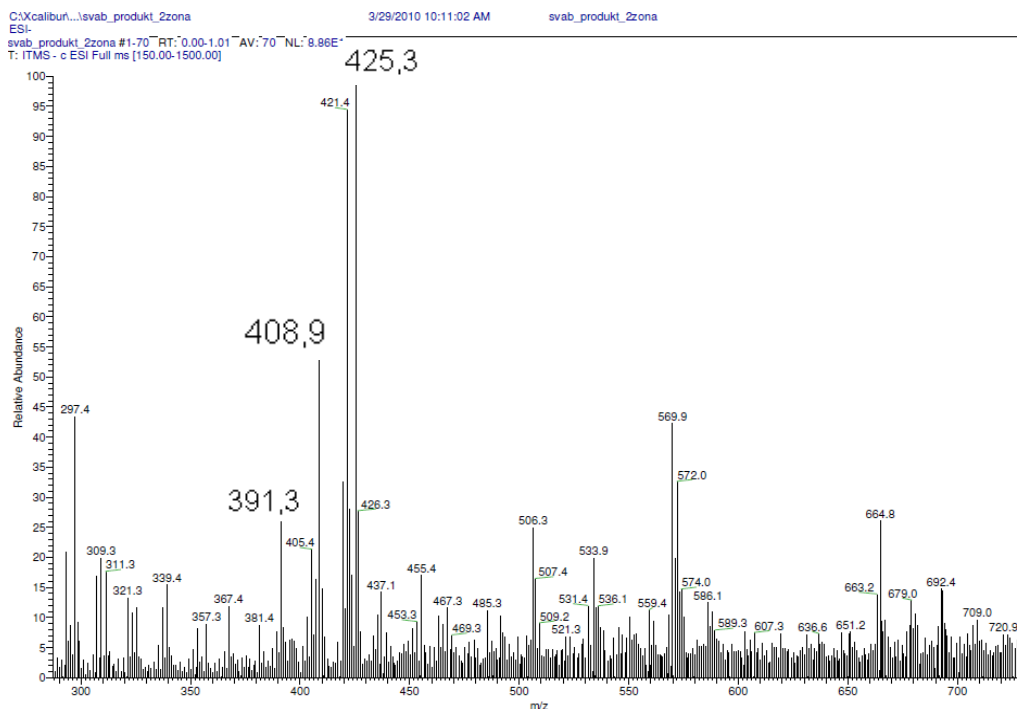
Comment 2



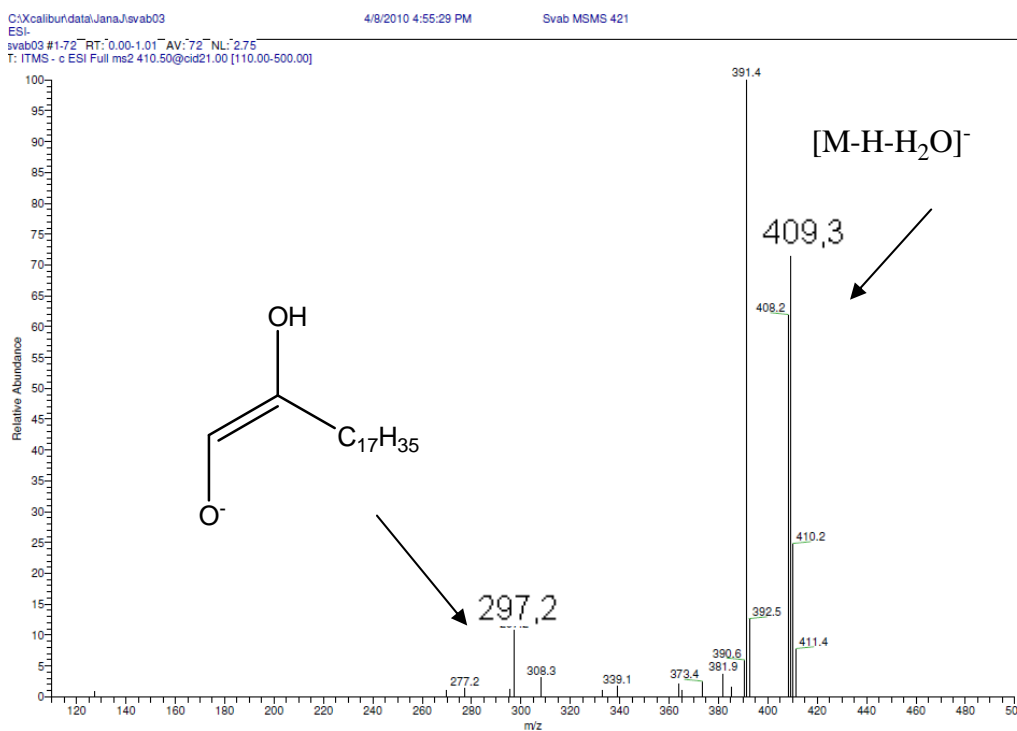
Obr. 35: MALDI spektrum vyizolovaného produktu hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu. Matrice: $^7\text{LiDHB}$.

4.5. Hmotnostní spektrometrie produktu hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu

Bylo měřeno ESI hmotnostní spektrum produktu hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu v záporném módu (Obr. 36). Byly identifikován ion o m/z 425,3 odpovídající struktuře, kdy jedna dvojná vazba (Z,Z)-6,9-heptakosadienu byla hydroxylována dvěma hydroxy skupinami a druhá dvojná vazby byla epoxidována. Ionu o m/z 408,9 odpovídá struktura hydroxy-epoxy derivátu (Z,Z)-6,9-heptakosadienu. Ion o m/z 391,3 byla identifikován jako epoxy derivát (Z,Z)-6,9-heptakosadienu. Byla provedena fragmentace iontu o m/z 425,3. Ve fragmentačním spektru byly patrné fragmenty se ztrátou vody $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ o m/z 409,4 a fragmenty vznikající štěpením vazby na uhlíku C_8 nesoucí dvě hydroxy skupiny o m/z 297,2 (Obr. 37). Na základě uvedených spekter lze předpokládat, že s velkou pravděpodobností došlo pouze k částečné hydroxylaci (Z,Z)-6,9-heptakosadienu za vzniku epoxy, hydroxy-epoxy a dihydroxy-epoxy derivátů. Produkt úplné hydroxylace (tetraol) nebyl idenifikován



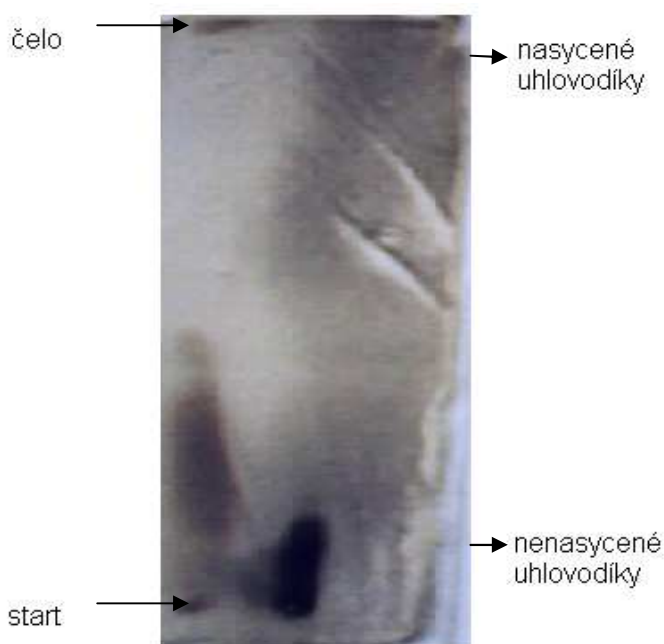
Obr. 36: Hmotnostní spektrum v záporném módu produktu hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu. Přímým vstupem-průtok 5 μ l.



Obr. 37: Fragmentační spektrum v záporném módu produktu hydroxylace (Z,Z)-6,9-heptakosadienu. Přímým vstupem-průtok 5 μ l. Kolizní energie-21%.

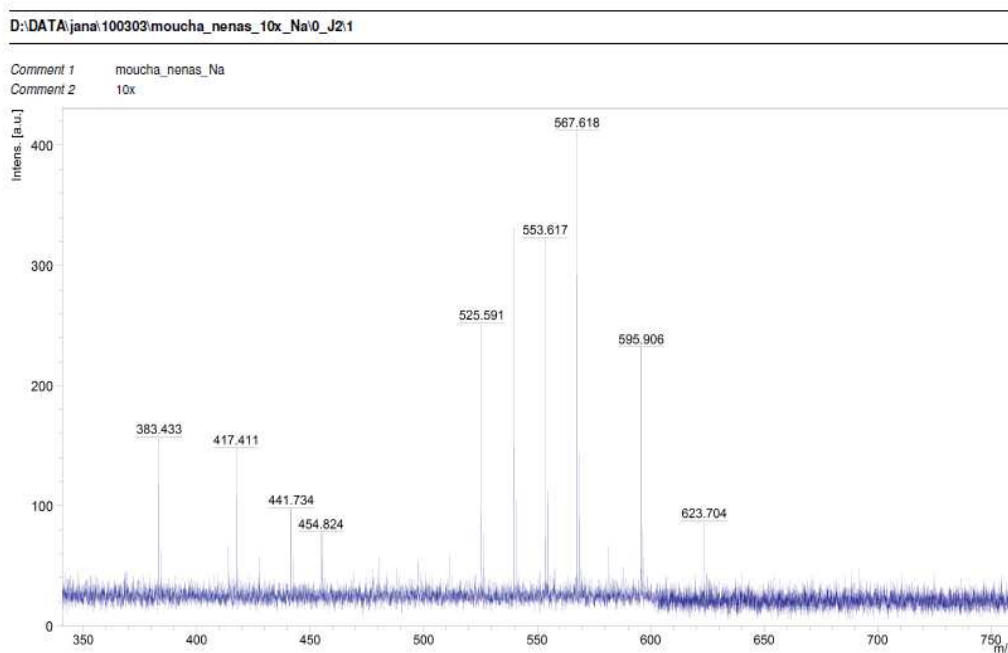
4.6. Izolace nenasycených uhlovodíků z masařky

Extrakcí těl hmyzu bylo získáno 43,2 mg extraktu. Ze získaného extraktu bylo pomocí TLC izolováno 18,3 mg kutikulárních uhlovodíků. Dále bylo ze směsi kutikulárních uhlovodíků pomocí TLC desky se silikagelem a 20% dusičnanem stříbrným (**Obr. 38**) vyizolováno 1,5 mg nenasycených uhlovodíků.



*Obr. 38: TLC směsi kutikulárních uhlovodíků izolovaných masařky *N. bullata*. TLC deska se silikagelem a 20% dusičnanem stříbrným. Mobilní fáze – hexan. Vizualizace – 1% kyselina sírová v ethanolu.*

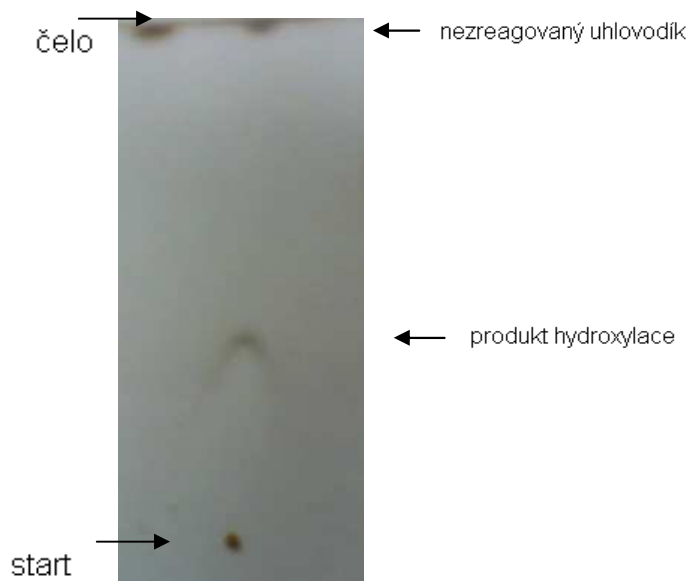
Bylo naměřeno MALDI spektrum frakce nenasycených uhlovodíků (**Obr. 39**). Srovnáním naměřených dat s literaturou [4] byly dva adukty přiřazeny konkrétním uhlovodíkům. Nejintenzivnější pík o m/z 567,6 $[M+Na]^+$ patří dienu $C_{39}H_{76}$ a adukt o m/z 595,9 $[M+Na]^+$ je dien $C_{41}H_{80}$.



Obr. 39: MALDI spektrum nenasycených uhlovodíků izolovaných z masařky *N. bullata*. Matrice: NaDHB.

4.7. Hydroxylace nenasycených uhlovodíků izolovaných z masařky

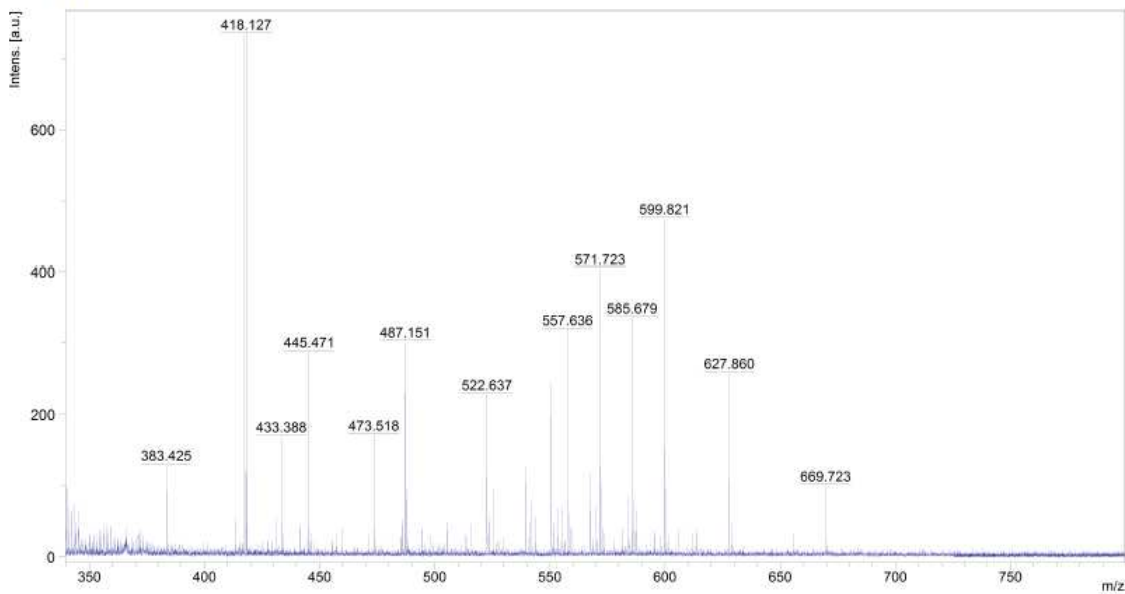
Hydroxylace nenasycených uhlovodíků izolovaných z masařky *N. bullata* probíhala za stejných podmínek jako hydroxylace nenasycených uhlovodíků ze švába amerického *P. americana* (viz. kapitola 4.3.). Po uplynutí jednoho týdne trvání reakce byl pomocí techniky TLC prokázán produkt hydroxylace a ten byl vyizolován (Obr. 40). Hmotnost produktu hydroxylace byla 1,9 mg. Produkty hydroxylace byly analyzovány pomocí MALDI (Obr. 41). Z hlediska vyšší polaritě očekávaného hydroxyderivátu bylo možné, že se produkty nacházely i na startu TLC desky. Proto byla vyzkoušena polární mobilní fáze, avšak neúspěšně. Také byla naměřena MALDI spektra vzorků získaných izolací zón ze startu a čela. Byly porovnány MALDI spektra nenasycených uhlovodíků před hydroxylací (Obr. 39) a nenasycených uhlovodíků po hydroxylaci (Obr. 42) a na základně rozdílu spekter se dá usuzovat, které nenasycené uhlovodíky případně reagovaly během hydroxylace. Jedná se o uhlovodíky tvořící adukty o m/z 525 $[M+Na]^+$ a m/z 595 $[M+Na]^+$, které během hydroxylace zreagovaly, avšak produkty reakce nelze určit.



Obr. 40: TLC reakční směsi hydroxylace nenasycených uhlovodíků izolovaných z masařky *N. bullata*. V reakčním prostředí 2-methylprop-2-olu. Mobilní fáze – chloroform. Vizualizace – 1% kyselina sírová v ethanolu.

D:\DATA\jana\100322\li_moucha_celo\0_D6\1

Comment 1 Li_moucha_celo
Comment 2



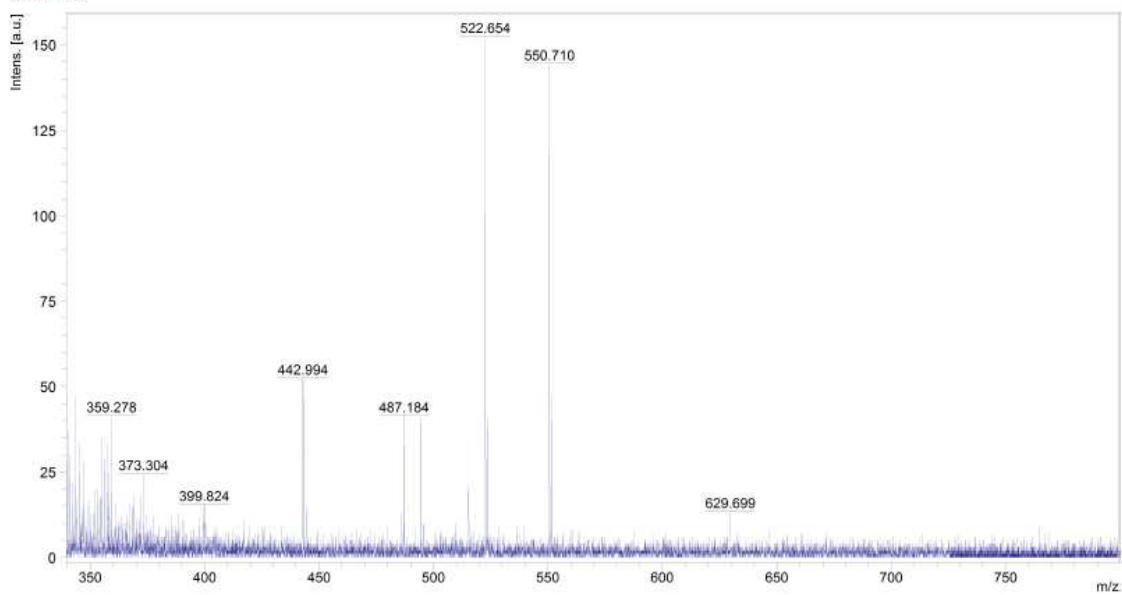
Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 4/25/2010 4:51:59 PM

Obr. 41: MALDI spektrum produktu hydroxylace nenasycených uhlovodíků z masařky *N. bullata*. Matrice-⁷LiDHB.

Comment 1 Li_produktmoucha

Comment 2



Bruker Daltonics flexAnalysis

printed: 4/26/2010 4:48:28 PM

Obr. 42: MALDI spektrum nenasycených uhlovodíků zbylých po hydroxylaci z masařky *N. bullata*. Matrice-⁷LiDHB.

Produkty hydroxylace nešlo konkrétně určit. Při měření ESI spekter nebyly detekovány ionty, které by svou hmotností odpovídaly hydroxyderivátům a případným logickým ztrátám.

5. Závěr

Byly nalezeny optimální podmínky hydroxylace oxidem osmičelým vázaným na poly-4-vinylpyridinu s využitím standardu *cis*-9-trikosenu. Byl zkoušen vliv systémů rozpouštědel na výtěžek reakce. Osvědčilo se rozpouštědlo 2-methylprop-2-ol a systém 80 % 2-methylprop-2-ol a 20 % vody (v/v). Následně bylo používáno rozpouštědlo 2-methylprop-2-ol, kdy nebyla potřeba oddělovat organickou a vodnou fázi a prodlužovat tak dobu zpracování reakční směsi. Reakční produkt hydroxylace byl detekován pomocí metody TLC po jednom týdnu trvání reakce při 21°C. Doba reakce byla zkrácena na 24 hodin zahřáním reakční směsi na 75°C. Při provádění dalších reakcí byly reakční směsi ponechány reagovat 1 týden při 21°C. Hydroxylací standardu byly získány dva reakční produkty, na základě GC/MS a MALDI měření byl identifikován hlavní a očekávaný produkt reakce 9,10-dihydroxytrikosen. Vedlejší produkt reakce nebyl určen. Nejlepších výsledků při fragmentačních experimentech bylo dosaženo měřením ESI spekter v záporném módu, ze vzniklých fragmentů bylo možno jednoduše ověřit polohu dvojně vazby. Zjištěné podmínky hydroxylace a fragmentací byly aplikovány na reálných vzorcích ze švába amerického *P. americana* a masačky *N. bullata*.

Extrakcí švába amerického *P. americana* byla získána směs kutikulárních uhlovodíků, která byla pomocí TLC rozdělena na nasycené a nenasycené uhlovodíky. Frakce nenasycených uhlovodíků byla na základě naměřených GC/MS a MALDI spekter a porovnáním s literaturou identifikována na (Z,Z)-6,9-heptakosadien. Hydroxylací tohoto uhlovodíku byl získán produkt, který byl ověřován na MALDI a dále byl podroben fragmentačním experimentům. Ion očekávané hmotnosti nebyl ve spektrech nalezen, byly však identifikovány ionty odpovídající svou hmotností epoxy, hydroxy-epoxy a dihydroxyepoxy derivátům (Z,Z)-6,9-heptakosadienu. Fragmentací hydroxyepoxy derivátu byly získány fragmenty odpovídající hmotnosti $[M-H-H_2O]^+$ a fragmentu štěpenému v sousední vazbě od dvojně vazby v poloze 9. Z těchto výsledků lze usuzovat, že hydroxylace proběhla jen zčásti.

Obdobným způsobem jako je výše popsáno, byla získána frakce nenasycených uhlovodíků z masačky *N. bullata*. MALDI spektrum frakce nenasycených uhlovodíků bylo porovnáno s literaturou a byly identifikovány dva píky na dien $C_{39}H_{76}$ a $C_{41}H_{80}$.

Hydroxylací frakce nenasycených uhlovodíků byl získán produkt a bylo naměřeno jeho MALDI spektrum. Porovnáním MALDI spekter nenasycených uhlovodíků před hydroxylací a nenasycených uhlovodíků po hydroxylaci se dá usuzovat, které nenasycené uhlovodíky případně reagovaly během hydroxylace. Jedná se o uhlovodíky poskytující adukty o m/z 525 $[M+Na]^+$ a m/z 595 $[M+Na]^+$, které během hydroxylace reagovaly. Produkty hydroxylace nešlo konkrétně určit. Při měření ESI spekter nebyly detekovány ionty, které by svou hmotností odpovídaly hydroxyderivátům a případným logickým ztrátám.

Hydroxylace oxidem osmičelým vázaným na poly-4-vinylpyridinu byla úspěšně provedena na standardu s jednou dvojnou vazbou. Při aplikaci na reálných vzorcích s delšími řetězci a vyšším počtem dvojných vazeb však nebylo dosaženo úplné hydroxylace. Pro tyto uhlovodíky je potřeba dále optimalizovat podmínky derivatizace a ověřit, zda poskytují fragmenty, na jejichž základě by bylo možné určit polohy dvojných vazeb.

6. Literatura

1. Hoskovec, M.: Chemická komunikace hmyzu pohledem organického chemika. *Chem. Listy* **94**, 897-904 (2000)
2. Valterová, I.; Urbanová, K.: Chemické signály čmeláků. *Chem. Listy* **91**, 846-857 (1997)
3. Tillman, J.A.; Seybold, J.S.; Jurenka, A.R.; Blomquist, J.G.: Insect pheromones – an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**:6, 481-514 (1999)
4. Vrkoslav, V.; Muck, A.; Cvačka, J.; Svatoš, A.: MALDI Imaging of Neutral Cuticular Lipids in Insects and Plants. *J. Am. Chem. Soc.* **21**, 220-231 (2010)
5. Howard, R.W.; Baker, J.E.: Cuticular Hydrocarbons and Wax Esters of the Ectoparasitoid *Habrobracon hebetor*: Ontogenetic, Reproductive, and Nutritional Effects. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **53**, 1-18 (2003)
6. Allan, R.A.; Capon, R.J.; Brown, W.V.; Elgari, M.A.: Mimicry of host cuticular hydrocarbons by salticid spider *Cosmophasis butaeniata* that preys on larvae of tree ants *Oecophylla smaragdina*. *J. Chem. Ecol.* **28**:4, 835-848 (2002)
7. Cvačka, J.; Jiroš, P.; Šobotník, J.; Hanus, R.; Svatoš, A.: Analysis of insect cuticular hydrocarbons using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Chem. Ecol.* **32**:2, 409-434 (2006)
8. Howard, R.W.; Blomquist, G.J.: *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 371-93 (2005)
9. Hot-Cuvillier, V.; Cobb, M.; Malosse, Ch.; Peeters, Ch.: Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J. Insect. Physiol.* **47**, 485-493 (2001)
10. Akino T.; Yamamura K.; Wakamura S.; Yamaoka R.: Direct behavioral evidence for hydrocarbons as nestmate recognition cues in *Formica japonica* (Hymenoptera: Formicidae). *Appl. Entomol. Zool.* **39**:3, 381-387 (2004)
11. Dapporto, L.; Palagi, E.; Turillazzi, S.: Cuticular hydrocarbons of *Polistes dominulus* as a biogeographic tool: A study of populations from the Tuscan Archipelago and surrounding areas. *J. Chem. Ecol.* **30**, 2139-2154 (2004)

12. Carlson, D.A.; Roan, Ch.S.; Yost, R.A.; Hector, J.: Dimethyl Disulfide Derivatives of Long Chain Alkenes, Alkadienes, and Alkatrienes for Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **61**, 1564-1571 (1989)
13. Jurenka, R.A.; Holland, D.; Krafors, E.S.: Hydrocarbon Profiles of Diapausing and Reproductive Adult Face Flies (*Musca autumnalis*). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **37**, 206-214 (1998)
14. Pepe, C.; Sayer, H.; Dagaut, J.: An Experimental and Theoretical Study of the Dimethyl Disulfide Derivative of 1,4-Hexadiene by Gas Chromatography/Mass Spectrometry and *Ab Initio* Calculations. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **12**, 565-576 (1998)
15. Urech, R.; Brown, G.W.; Moore, Ch. J.; Green, P.E.: Cuticular hydrocarbons of Buffalo Fly *Haematobia exigua*, and chemotaxonomic differentiation from horn fly, *H irritans*. *J. Chem. Ecol.* **31**:10, 2451-2461 (2005)
16. Mpuru, S.; Blomquist, G.J.; Schal, C.; Roux, M.; Kuenzli, M.; Dusticier, G.; Clément, J.; Bagnères, A.: Effect of age and sex on the production of internal and external hydrocarbons and pheromones in the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 139-155 (2001)
17. Jham, G.N.; Attygalle, A.B.; Meinwald, J.: Location of double bonds in diene and triene acetates by partial reduction followed by methylthiolation. *J. Chromatogr. A.* **1077**, 56-57 (2005)
18. Barlett, R.J.; Cossé, A.A.; Petroski, R.J.; Weaver, D.K.: Cuticular hydrocarbons and novel alkenediol diacetates from wheat stem sawfly (*Cephus cinctus*): natural oxidation to pheromone components. *J. Chem. Ecol.* **28**:2, 385-405 (2002)
19. Buser, H.R.; Arn, H.; Guerin, P.; Rauscher, S.: Determination of Double Bond Position in Mono-Unsaturated Acetates by Mass Spectrometry of Dimethyl Disulfide Adducts. *Anal. Chem.* **55**, 818-822 (1983)
20. Nichols, P.D.; Guckert, J.B.; White D.C.: Determination of monosaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulphide adducts. *Journal of Microbiological Methods.* **5**:1, 49-55 (1986)
21. Scribe, P.; Guezennes, J.; Dagaut, J.; Pepe, C.; Saliot, A.: Identification of the

- Position and the Stereochemistry of the Double Bond in Monounsaturated Fatty Acid Methyl Esters by Gas Chromatography/Mass Spectrometry of Dimethyl Disulfide Derivatives. *Anal. Chem.* **60**, 928-931 (1988)
22. Carballeira, N.M.; Cruz, C.: Dimethyl disulfid derivatization of ethyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate and ethyl (9E,12E)-9,12-octadecadienoate. *Chem. Phys. Lipids.* **84**, 81-85 (1996)
23. Laue, T.; Plagens, A.: *Named Organic Reactions*. 2nd edition, A Wiley-Interscience Publications, Great Britain, 2005.
24. Rontani, J.F.: Electron Ionization Mass Spectrometric Determination of Double Bond Position in Monounsaturated α , β - and β,γ -Isomeric Isoprenoid Acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 961-967 (1998)
25. Kühn, G.; Weidner, St.; Decker, R.; Holländer, A.: Derivatization of Double Bond Investigated by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **11**, 914-918 (1997)
26. López, J.F.; Grimalt J.O.: Phenyl and Cyclopentylimino Derivatization for Double Bond Location in Unsaturated C₃₇-C₄₀ Alkenones by GC-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1161-1172 (2004)
27. McMurry, J.: *Organic Chemistry*. 2. USA, Brooks/Cole 2000.
28. Blomquist, G.J.; Howard, R.W.; McDaniel, C.A.; Remaley, S.; Dwyer, L.A.; Nelson, D.S.: Application of methoxymercuration-demercuration followed mass spectrometry as a convenient microanalytical technique for double bond location in insect-derived alkenes. *J. Chem. Ecol.* **6**:1, 257- (1980)
29. Jones, G.R.; Oldham, N.J.: Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A.* **843**, 199-236 (1999)
30. Marques, F.A.; Millar, J.G.; McElfresh, J.S.: Efficient method to locate double bond positions in conjugated trienes. *J. Chromatogr. A.* **1048**:1, 59-65 (2004)
31. Eisner, T.; Aneshansley, D.J.; Eisner, M.; Attygalle, A.B.; Alsop, D.W.; Meinwald, J.: Spray mechanism of the most primitive bombardier beetle (*metrius contractus*). *J. Exp. Biol.* **203**, 1265-1275 (2000)
32. Caro, B.; Sénéchal-Tocquer, M.; Sénéchal, D.; Guen, F.N.: Hydroboration, followed by water addition of benzenoid alkenes. Formal dihydrogen addition. *J. Organomet. Chem.* **525**, 283-286 (1996)

33. Clinton, F.L.: Organic Synthesis using Borane – Methyl Sulfide. The Hydroboration – Oxidation of alkenes. *J. Org. Chem.* **39**:10, 1437-1438 (1974)
34. Shi-Wen Huang; Wei-Li Peng; Zi-Xing Shan; De-Jie Zhao: A new facile approach to highly selective hydroboration of alkenes with sodium malonyloxyborohydride. *New. J. Chem.* **25**, 869-871 (2001)
35. Beroza, M.; Bierl, B.A.: Rapid Determination of Olefin Position in Organic Compounds in Microgram Range by Ozonolysis and Gas Chromatography. *Anal. Chem.* **39**:10, 1131-1135 (1967)
36. Warthen, J.D.; Uebel, E.C.: Major Unsaturated Cuticular Hydrocarbons of the Field Crickets, *Gryllus pennsylvanicus* and *Nemobius fasciatus*. *Lipids.* **15**:8 (1980)
37. Smith, B.M.; March, J.: *March's Advanced Organic Chemistry*. 5th edition, A Wiley-Interscience Publication, New York 2001.
38. Thomas, M. C.; Mitchell, T. W.; Harman, D.G.; Deeley, J.M.; Murphy, R. C.; Blanksby, S. J.: Elucidation of Double Bond Position in Unsaturated Lipids by Ozone Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 5013-5022 (2007)
39. Mitchell, T.W; Pham, H.; Thomas M.C.; Blanksby, S.J.: Identification of double bond position in lipids: From GC to OzID. *J. Chromatogr.B.* **877**, 2722-2735 (2009)
40. Thomas, M.C.; Mitchell, T.W.; Blanksby, S.J.: Ozonolysis of Phospholipid Double Bonds during Electrospray Ionization: A New Tool for Structure Determination. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 58-59 (2006)
41. Schroeder, M.: Osmium tetraoxid cis hydroxylation of unsaturated substrates. *Chem. Rev.* **80**:2, 187-213 (1980)
42. Milas, N.A.; Sussman, S.: The Catalytic Hydroxylation of Unsaturated Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 2345 (1937)
43. Milas, N.A.; Sussman, S.: The Hydroxylation of the Double Bond. *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 1302 (1936)
44. Johansson, M.; Lindén, A.A; Bäckvall, J.: Osmium-catalyzed dihydroxylation of alkenes by H₂O₂ in room temperature ionic liquid co-catalyzed by VO(acac)₂ or MeReO₃. *J. Organomet. Chem.* **690**, 3614-3619 (2005)

45. Oakley, M.A.; Woodward, S.; Coupland, K.; Parker, D.; Temple-Heald, C.: Practical dihydroxylation and C-C cleavage of unsaturated fatty acids. *J. Mol. Catal. A.* **150**, 105-111 (1999)
46. Griffith, W.P.: Ruthenium and Osmium Oxo Complexes as Organic Oxidants. *Platinum Metals Rev.* **33**:4, 181-185 (1989)
47. Sharpless, K.B.; Akashi, K.: Osmium catalyzed hydroxylation of olefins by tert-butyl hydroperoxide under alkaline conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **98**: 7, 1986-1987 (1976)
48. Balagam, B.; Mitra, R.; Richardson, D.E.: Osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation by carbon dioxide-activated hydrogen peroxide and N-methylmorpholine. *Tetrahedron Lett.* **49**, 1071-1075 (2008)
49. Köckritz, A.; Bartoszek, M.; Döbler, C.; Beller, M.; Mägerlein, W.; Militzer, H.-C.: Development of protocols for the separation of Os catalysts from organic products in the catalytic dihydroxylation of olefins. *J. Mol. Catal. A.* **218**, 55-56 (2004)
50. Pescarmona, P.P.; Masters, A.F.; van der Waal, J.C.; Maschmeyer, T.: Osmium silsesquioxane as model compound and homogeneous catalyst for the dihydroxylation of alkenes. *J. Mol. Catal. A.* **220**, 37-42 (2004)
51. Döbler, Ch.; Mehlretter, G.M.; Sundermeier, U.; Beller, M.: Osmium-Catalyzed Dihydroxylation of Olefins Using Dioxygen or Air as the Terminal Oxidant. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 10289-10297 (2000)
52. Furniss, B.S.; Hannaford, A.J.; Smith, P.W.G; Tatchell, A.R.: *Vogel's textbook of practical organic chemistry*. 5th edition, The Bath Press, Great Britain 1989.
53. Pitts, M.R.: Safer, Faster and Cleaner Reactions Using Encapsulated Metal Catalysts and Microwave Heating. *Platinum Metals Rev.* **52**: 2, 64-70 (2008)
54. Cainelli, G.; Contento, M.; Manescalchi, F.; Plessi, L.: Catalytic Hydroxylation of Olefins by Polymer-Bound Osmium Tetroxide. *Synthesis.* **1**, 45-47 (1989)
55. Herrmann, W.A.; Kratzer, R.M.; Bliemel, J.; Friedrich, H.B.; Fischer, R.W.; Apperley, D.C.; Mink, J; Berkesi, O.: Polymer-bound osmium oxide catalysts. *J. Mol. Catal. A.* **120**, 197-205 (1997)
56. Reddy, S.M.; Srinivasulu, M.; Reddy, Y.V.; Narasimhulu, M.; Venkateswarlu, Y.: Catalytic asymmetric dihydroxylation of olefins using polysulfone-based novel

- microencapsulated osmium tetroxide. *Tetrahedron Lett.* **47**, 5285-5288 (2006)
57. Kobayashi, S.; Akiyama, R.: Renaissance of immobilized catalysts. New types of polymer-supported catalysts, 'microencapsulated catalysts', which enable environmentally benign and powerful high-throughput organic synthesis. *Chem. Commun.* **21**:4, 449-460 (2003)
58. Kobayashi, S.; Ishida, T.; Akiyama, R.: Catalytic Asymmetric Dihydroxylation Using Phenoxyethoxymethyl-polystyrene (PEM)-Based Novel Microencapsulated Osmium Tetroxide (PEM-MC OsO₄). *Org. Lett.* **3**:17, 2649-2652 (2001)
59. Kobayashi, S.; Endo, M.; Nagayama, S.: Catalytic Asymmetric Dihydroxylation of Olefins Using a Recoverable and Reusable Polymer-Supported Osmium Catalyst.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 11229-11230 (1999)
60. Watson, J.T.; Sparkman, O.D.: *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*. 4th edition, John Wiley & Sons, Ltd, England 2007
61. Gaskell, J.S.: Electrospray: Principles and Practice. *J. Mass Spectrom.* **32**, 677-588 (1997)
62. Louri, N. J.; Cooks, R. G.; Syka, E. P. J; Kelley, E. P.; Stafford, G. C.; Todd, J. F. J.: Instrumentation, Applications, and Energy Deposition in Quadrupole Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **59**:13 (1987)
63. Vrkoslav, V.; Míková, R.; Cvačka, J.: Characterization of natural wax esters by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **44**, 101-110 (2009)
64. Nagayama, S.; Endo, M.; Kobayashi, S.: Microencapsulated Osmium Tetroxide. A new Recoverable and Reusable Polymer-Supported Osmium Catalyst for Dihydroxylation of Olefins. *J. Org. Chem.* **63**:18, 6094-6095 (1998)