

50376  
1993  
53

50376  
1993  
53

n° ordre 1067

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

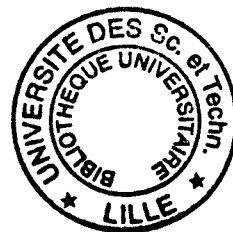
en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université des Sciences de Lille  
spécialité : Biochimie



par

Jérôme LEMOINE

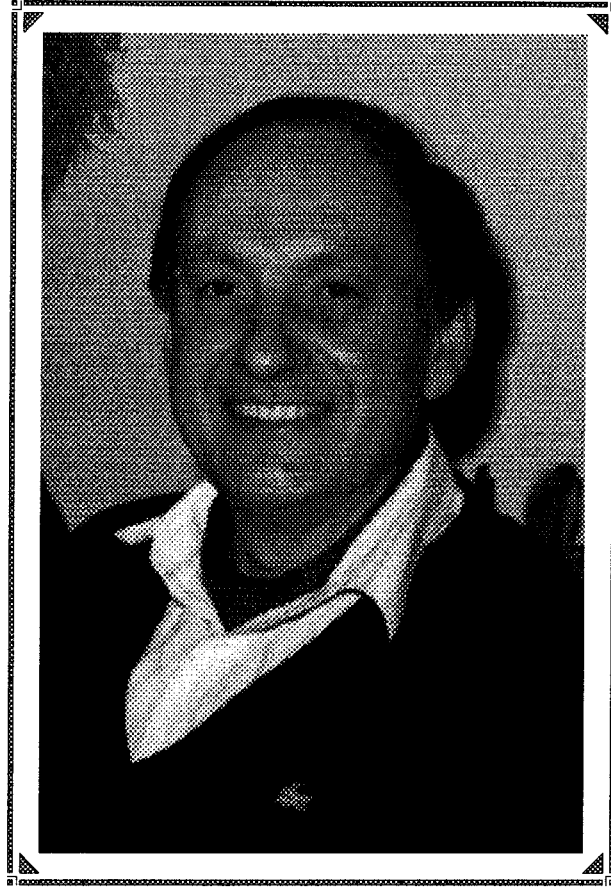


**Spectrométrie de masse en tandem  
d'oligosaccharides :  
dissociation activée par collision des ions  
[M+métal alcalin]<sup>+</sup>d'oligosaccharides perméthylés**

Soutenue le 12 Février 1993 devant la Commission d'Examen :

Président	<b>A. Verbert</b>	Professeur, Université des Sciences et Technologies de Lille
Rapporteurs	<b>A. Dell</b>	Professeur, Imperial College of Sciences of London
	<b>E. De Hoffmann</b>	Professeur Université Catholique de Louvain-la-Neuve
	<b>J.C. Promé</b>	Directeur de Recherche CNRS, Toulouse
Examineurs	<b>B. Domon</b>	Directeur de Recherche Ciba Geigy, Bâle
	<b>A. Van Dorsselaer</b>	Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg
	<b>J. Montreuil</b>	Professeur, Université des Sciences et Technologies de Lille

A mes parents,  
à Sébastien et Florence,  
à ma famille...



*A la mémoire de Monsieur le Professeur Bernard FOURNET...*

*Heureux sont ceux qui ont eu la chance de le connaître...*

Je tiens en premier lieu à remercier Monsieur le Professeur Jean Montreuil pour m'avoir accueilli il y a 4 ans dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. J'y associerai Monsieur le Professeur André Verbert, Directeur de ce Laboratoire, qui a bien voulu accepter la présidence de ce jury de Thèse.

Je voudrais également exprimer ma plus sincère gratitude aux Professeurs Anne Dell et Edmond De Hoffmann, ainsi qu'aux Docteurs Jean-Claude Promé, Bruno Domon et Alain Van Dorsselaer qui par leurs présence et extrême compétence ont bien voulu apporter leur caution scientifique à ce travail.

Que Monsieur le Professeur Keith R. Jennings et Docteur Dominique Despeyroux soient remerciés de leur précieuse collaboration.

Je voudrais de même souligner l'immense plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'équipe du Professeur De Hoffmann : merci à Raoul, Vincent et Alex.

Enfin, sachez que ce travail n'aurait probablement pas pu voir le jour sans Monsieur Yves Leroy et le Docteur Guy Ricart qui, aux côtés de Monsieur le Professeur Bernard Fournet, ont su me faire aimer la Spectrométrie de Masse non seulement sur le plan théorique mais aussi et surtout pour son aspect pratique et rigoureux.

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur Bernard FOURNET, dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte du C.N.R.S. n° 111 : relations structures-fonctions des constituants membranaires. Directeur : Monsieur le Professeur André Verbert).

---

## SOMMAIRE

---

	Page
INTRODUCTION	
CHAPITRE I	
<u>Généralités</u>	
ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES DE L'IONISATION FAB APPLIQUEE AUX STRUCTURES GLUCIDIQUES	
I- Principe de l'ionisation FAB	10
II- Etudes des oligosaccharides en mode d'ionisation FAB	12
II-1 <i>Les matrices et additifs</i>	12
II-2 <i>Analyse structurale d'oligosaccharides natifs</i>	13
II-2-1 Spectres de source	16
II-2-2 Spectres de décomposition métastable et de collision d'oligosaccharides natifs	18
- Précurseur $[M+H]^+$	18
- Précurseur $[M-H]^-$	20
- Précurseur $[M+Cat]^+$	22
II-3 <i>Analyse structurale d'oligosaccharides substitués</i>	24
II-3-1 <i>Amination réductive</i>	24
- par des chromophores	24
- par des dérivés lipidiques	28
- par la n-hexylamine	29
- par le triméthylparaminophényl ammonium	30
II-3-2 <i>Peracétylation et perméthylation</i>	31
- peracétylation	31
- perméthylation	34
II-4 <i>Analyse structurale d'oligosaccharides après dégradation chimique</i>	36
II-4-1 <i>Oxydation periodique</i>	36
II-4-2 <i>Oxydation chromique</i>	37
<hr/>	
CHAPITRE II	
<u>Travaux personnels</u>	
DISSOCIATION ACTIVEE PAR COLLISION DES IONS $[M+Cat]^+$ D'OLIGOSACCHARIDES PERMETHYLES	
I- Dissociation activée par collision (CAD)	42
I-1 <i>Principe</i>	42
I-2 <i>CAD à haute énergie</i>	45
I-3 <i>CAD à basse énergie</i>	47

<b>II- Application de la CAD aux ions <math>[M+Cat]^+</math> d'oligosaccharides perméthylés</b>	<b>48</b>
<i>II-1 Publication n°1</i>	<b>48</b>
<i>II-2 Publication n°2</i>	<b>62</b>
<i>II-3 Evaluation de l'affinité relative         cation-oligosaccharide perméthylé</i>	<b>77</b>
<i>II-4 Influence de la taille du cation</i>	<b>80</b>
<i>II-5 Publication n°3 (soumise)</i>	<b>84</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>106</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>108</b>

## ABREVIATIONS

**CAD** : dissociation activée par collision

**eV** : électron Volt

**FAB** : bombardement par atomes accélérés

**GLC-MS** : couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de  
masse

**keV** : kilo électron Volt

**MS** : spectrométrie de masse

**MS-MS** : spectrométrie de masse en tandem

**NBA** : alcool nitrobenzylique

**UMA** : unité de masse atomique

**Fuc** : fucose

**Gal** : galactose

**GalNAc** : N-acétylgalactosamine

**Glc** : glucose

**GlcNAc** : N-acétylglucosamine

**Man** : mannose

**NeuAc** : acide N-acétylneuraminique



## INTRODUCTION

C'est peut être dans le domaine de la Biochimie que la spectrométrie de masse a connu durant cette dernière décennie le plus formidable essor, tant sur le plan des avancées technologiques et, notamment en matière d'ionisation (Bombardement par atomes neutres accélérés ou Fast Atom Bombardment, Electrospray, Désorption Laser), que dans ses domaines d'applications (protéines, glycoconjugués...).

En effet, longtemps cantonnée dans des domaines que nous qualifierons de fondamentaux, elle constitue aujourd'hui un passage souvent obligé pour nombre de biochimistes, qu'ils soient confrontés aux protéines (détermination de la masse moléculaire, de la séquence en acides aminés, études des modifications post-traductionnelles), aux glycanes de glycoconjugués, qu'il s'agisse d'élucider les voies métaboliques de substances naturelles ou synthétiques.

En ce qui concerne l'établissement des structures glucidiques, la Résonance Magnétique Nucléaire et la Spectrométrie de Masse sont sans conteste des outils de choix pour accéder à la connaissance des points de branchement, des séquences, des anoméries de liaison et à la détermination des masses moléculaires. Ces deux techniques ne sont pas sans présenter quelques limites : la RMN requiert des quantités relativement importantes de matériel, quant à la spectrométrie de masse, elle n'offre pas de méthode absolue qui fournisse de façon simultanée les divers éléments structuraux cités précédemment.

C'est donc ce défi que nous avons partiellement tenté de relever.

Deux observations constituent le point de départ de nos travaux :

- La dérivatisation des sucres par peracétylation ou perméthylation décroît leur solubilité dans les matrices utilisées pour l'ionisation

FAB et, en conséquence, procure un gain notable de l'intensité de réponse par augmentation de leur activité de surface.

- L'addition de métaux alcalins à la matrice favorise la formation des ions pseudo-moléculaires  $[M+\text{Cation}]^+$ , beaucoup plus stables que leurs homologues protonés, ce qui se traduit également par un signal plus intense.

Nous avons donc entrepris de caractériser les ions fragments issus de Dissociation Activée par Collision (CAD) des ions précurseurs  $[M + \text{métal alcalin}]^+$  où M est un oligosaccharide perméthylé, ou un fragment.

Ce mémoire de Thèse se décomposera en deux parties. Dans un premier chapitre nous ferons le point sur les diverses méthodes et applications de l'ionisation FAB pour la caractérisation des structures glucidiques. Nous insisterons plus particulièrement sur les démarches pouvant fournir des informations quant aux points de branchement interglycosidiques. Dans un second chapitre, nous regrouperons nos résultats acquis sur la dissociation activée par collision (CAD) d'oligosaccharides perméthylés et cationisés.

Les oligosaccharides étudiés ont été isolés :

- d'urines de patients atteints de glycoprotéinoses, oligosaccharides qui correspondent à des N-glycannes.
- de lait de Femme.
- de mucines par  $\beta$ -élimination (O-glycannes).

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet :

**I- des publications suivantes :**

J. Lemoine, G. Ricart, G. Strecker, Y. Leroy and B. Fournet.  
*Collisional-activation tandem mass spectrometry of sodium adduct ions of methylated oligosaccharides: sequence analysis and discrimination between NeuAc2-3 and NeuAc2-6 linkages.*  
**Carbohydr. Res.** 221 (1991) 209-217.

J. Lemoine, D. Despeyroux, K.R. Jennings, R. Rosenberg, E. De Hoffmann and B. Fournet.  
*Collision-induced dissociation of alkali metal cationized and permethylated oligosaccharides: influence of the collision energy and of the nature of the collision gas for the assignment of the linkage position.*  
**J. Am. Soc. Mass Spectrom.** (1993) sous presse.

J Lemoine and B. Fournet.  
*Collision induced dissociation tandem mass spectrometry of  $[M+Na]^+$  ion of permethylated O-glycan-alditols.*  
**Anal. Biochem.** soumis pour avis à publication.

**II- des communications orales suivantes :**

**J. Lemoine**, "Collisional-activation tandem mass spectrometry of sodium adduct ions of permethylated oligosaccharides",  
**Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten and the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie**, Lille 26-27 Septembre, 1991.

**J. Lemoine**, "Influence of the collision energy and of the nature of the collision gas for the assignment of linkage position in CID of alkali metal cationised permethylated oligosaccharides",  
**International Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**, Washington, May 31 June 6, 1992.

**J. Lemoine**, "Influence of the collision energy and of the nature of the collision gas for the assignment of linkage position in CID of alkali metal cationised permethylated oligosaccharides",  
**International Symposium on Carbohydrates**, Paris, July 5-10, 1992

**J. Lemoine**, "Etudes des isoméries de liaison d'oligosaccharides perméthylés par spectrométrie de masse en tandem à partir de leurs adduits sodiques",  
**Congrès du Groupe Français des Glucides**, Lille, 2-4 Septembre 1992.

**III- des communications par affiches suivantes :**

**J. Lemoine**, G. Ricart, G. Strecker, Y. Leroy and B. Fournet.  
Dissociation induite par collision des ions  $[M+Na]^+$   
d'oligosaccharides perméthylés : détermination des séquences glycosidiques et discrimination des liaisons NeuAc 2-3 et NeuAc 2-6.

**Forum des Jeunes Chercheurs**, Tours, 3-6 Septembre, 1991.

**J. Lemoine**, D. Despeyroux, K.R. Jennings, R. Rosenberg, E. De Hoffmann and B. Fournet.

Etudes des isoméries de liaison d'oligosaccharides perméthylés par spectrométrie de masse en tandem à partir de leurs adduits sodiques.

**Forum des Jeunes Chercheurs**, Caen, 6-10 Juillet, 1992.

**J. Lemoine**, D. Despeyroux, **K.R. Jennings**, R. Rosenberg, E. De Hoffmann and B. Fournet, **International Conference on Biological Mass Spectrometry**, Kyoto, September 20-24, 1992.

CHAPITRE I  
GENERALITES

*Etude bibliographique de l'ionisation  
FAB appliquée aux structures glucidiques*

## I- Principe de l'ionisation FAB

L'année 1981 représente sans conteste une grande date dans le domaine de la spectrométrie de masse avec l'apparition d'une nouvelle méthode d'ionisation mise au point par **Barber et al. (1981)** appelée FAB (Fast Atom Bombardment) ou bombardement par atomes neutres accélérés. L'immense avancée tenait au fait qu'il était alors possible de générer à partir de substances polaires et de masse moléculaire élevée des ions pseudo-moléculaires de forte intensité.

Le principe de cette technique repose sur le bombardement de l'échantillon dissous dans une matrice visqueuse et de faible tension de vapeur par un jet atomique de xénon ou d'argon, d'énergie cinétique comprise entre 1 et 10 keV, selon le principe décrit ci-dessous :

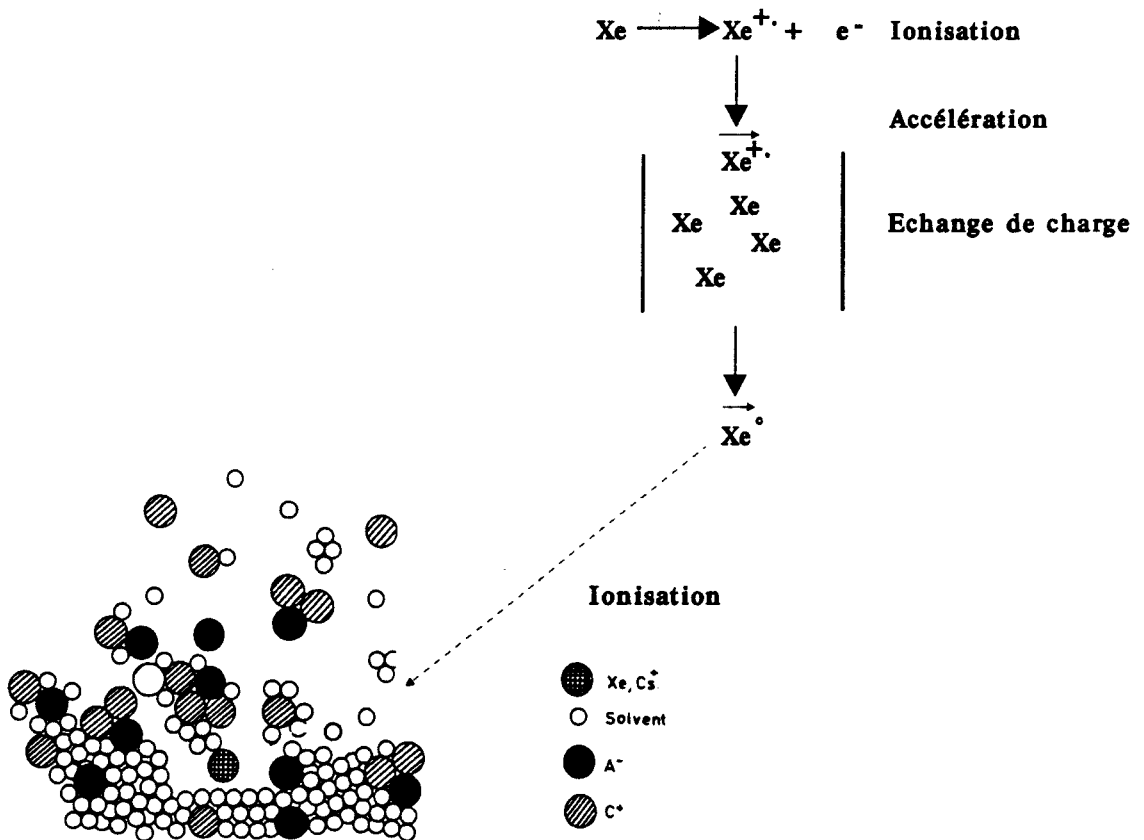


Figure 1 : Schéma du principe de l'ionisation FAB

D'emblée, cette technique offrait des résultats remarquables sur

des échantillons de nature glucidique, peptidique et nucléotidique (**Barber et al. 1981; Rinehart 1982**). Elle est aujourd'hui très largement utilisée pour la caractérisation de peptides, de glycoconjugués, qu'il s'agisse de déterminer des masses moléculaires ou de produire un flux d'ions pseudo-moléculaires intense et stable dans le temps, nécessaire à l'acquisition de spectres de collision ou de décomposition métastable par spectrométrie de masse en tandem.

L'ionisation des molécules s'effectue suivant deux phases successives (**De Pauw 1986; De Pauw et al. 1991**). Dans un premier temps, les atomes de xénon caractérisés par une énergie cinétique de 8 keV entrent en contact avec les molécules de matrice et d'échantillon ce qui engendre des chocs très énergétiques. Il y a alors formation de produits de radiation (radicaux, électrons ...) qui par collision avec d'autres molécules entraînent la formation d'adduits, donnent des fragmentations ou génèrent de nouveaux produits de radiation. Dans un second temps, à l'issue des chocs successifs, l'énergie cinétique des atomes de xénon décroît et est convertie en énergie vibrationnelle calorifique qui, corrélée à l'augmentation de pression et à l'onde de choc, provoque une projection d'amas de matrice et d'analytes dans l'espace (**Sunner et al. 1986**). C'est à ce niveau que se déroulent les phénomènes d'ionisation :

- Désorption de molécules neutres et formation des cations  $[M+H]^+$  par transfert de protons ou recombinaison de charges (**Sunner et al. 1988**).
- Désorption de cations ou anions préformés dans des amas molécules/ions qui se désolvatent (phénomène endothermique) et perdent ainsi l'énergie interne acquise lors des chocs successifs.
- Désorption de molécules neutres et formation d'espèces  $M^{\cdot+}$  et  $M^{\cdot-}$  par interaction avec les produits de radiation (**Balasanmugam et Miller 1988**).

## II- Etudes des oligosaccharides en mode d'ionisation FAB

### II-1 Les matrices et additifs

Le choix de la matrice est un des aspects fondamentaux qui conditionne la plus ou moins bonne qualité de réponse d'une substance en ionisation FAB. En effet, l'assurance d'un renouvellement perpétuel de l'échantillon à la surface de la matrice, et donc la production d'un signal intense et long, nécessite la parfaite solubilité de celui-ci dans cette matrice.

D'une manière générale, le glycérol est la matrice de choix pour les oligosaccharides natifs, alors que le thioglycérol (1-thio-propanediol), plus acide, ou l'alcool méτανitrobenzylique (NBA) fournissent d'excellents résultats avec les sucres substitués (Dell 1987).

D'autres molécules sont également proposées comme matrices : polyéthylèneglycol (Rinehart 1982; Hemling et al. 1984); triéthanolamine/tétraméthylurée en proportion équimolaire, matrice basique favorisant la déprotonation des sucres natifs (Garozzo et al. 1990); le mélange dithiothréitol/dithioérythritol ou "Magic Bullet" (Zhou et al. 1990); N-formyl 2 aminoéthanol (Tip et al. 1990).

En fait, le caractère acide ou basique de la matrice va également jouer un rôle prépondérant sur l'intensité de la réponse. Ainsi, dans le cas d'oligosaccharides polyanioniques, il est vivement conseillé d'acidifier la matrice (HCl ou TFA 1%) pour éviter la formation d'une pléiade d'ions pseudo-moléculaires de type  $[M-H]^-$ ,  $[M+Na-2H]^-$ ,  $[M+2Na-3H]^-$  ... Par contre, une structure monoanionique offrira un signal plus intense dans une matrice basique en raison de la formation d'une charge nette négative.

Les métaux alcalins peuvent être également d'un grand secours pour mettre en évidence les ions pseudo-moléculaires. A ce titre, Egge

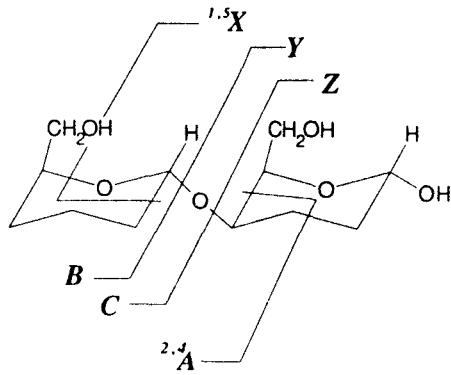


et al. (1984) recommandent l'addition à la matrice d'un ou deux  $\mu\text{l}$  d'une solution méthanolique à 0,1% d'acétate de sodium. Dans le cas de sucre natif, l'addition de chlorure d'ammonium au glycérol favorise la formation d'ions  $[\text{M}+\text{Cl}]^-$  (Promé et al. 1985).

### *II-2 Analyse structurale d'oligosaccharides natifs*

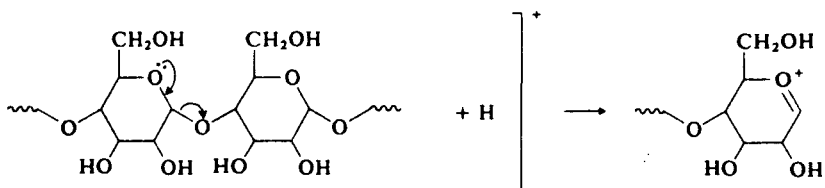
L'ionisation FAB a sans aucun doute apporté un nouveau souffle à l'étude structurale des oligosaccharides. C'est ainsi qu'une année après les premiers travaux de Barber et al. (1981) apparaissent les premières applications, concrétisées par les travaux de Forsberg et al. (1982) sur la révision structurale du polysaccharide à 6-O-méthylglucose (MGP) isolé de Mycobacterium smegmatis. A l'évidence, l'ionisation FAB démontrait sa supériorité sur l'ionisation par désorption de champs en révélant les ions moléculaires du MGP sous forme native à  $m/z$  3537  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , et  $m/z$  3513  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , définissant ainsi une masse moléculaire à 3514. De plus, il était possible selon les auteurs d'établir partiellement la séquence de ce polysaccharide en se fondant sur la présence de fragments issus de clivages de part et d'autre de l'oxygène de la liaison glycosidique.

Dans le but de faciliter les présentations qui vont suivre et notamment la compréhension des ions de ruptures observés sur les spectres de décomposition métastable ou de collision, il nous semble indispensable de récapituler les voies majeures de fragmentation pouvant intervenir lors de ces études. A cette fin, la nomenclature de Domon et Costello (1988) a été adoptée pour identifier les ions produits (Figure 2).



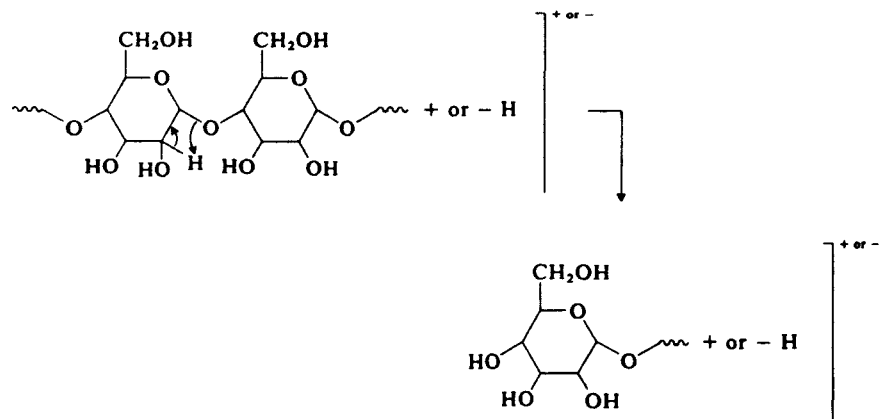
**Figure 2** : Nomenclature des fragmentations observées par CAD des structures oligosaccharidiques, selon *Domon et Costello (1988)*.

**Voie A**



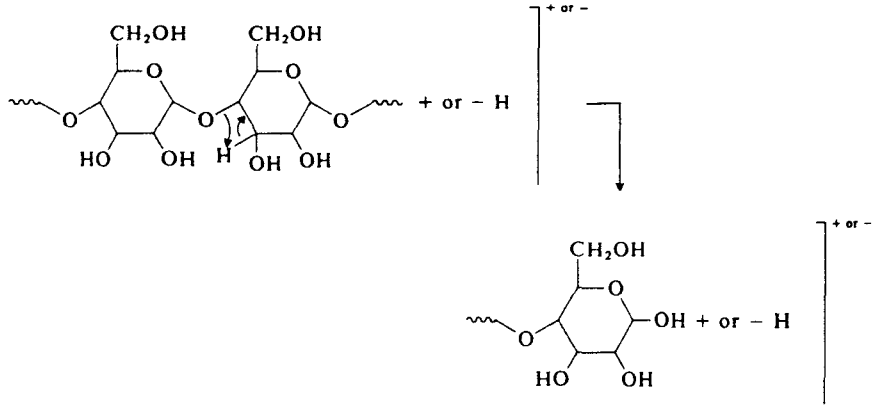
Clivage de la liaison glycosidique qui conduit à un ion oxonium avec rétention de la charge exclusivement localisée sur l'extrémité réductrice : ion de type A

**Voie B**



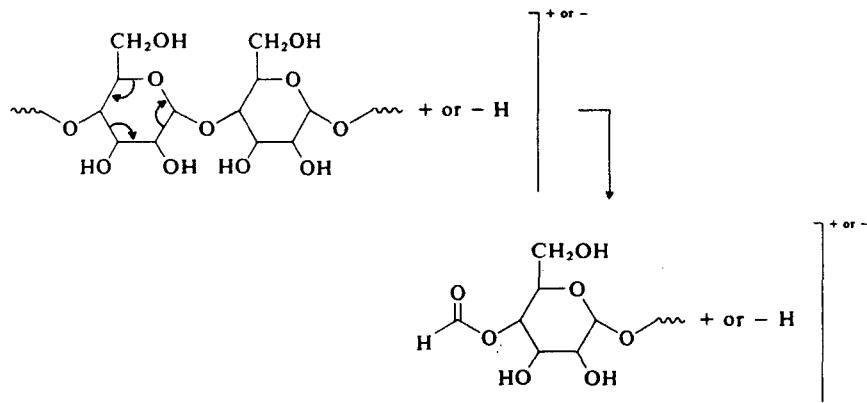
Clivage de la liaison glycosidique avec transfert d'hydrogène : ion de type Y.

**Voie C**



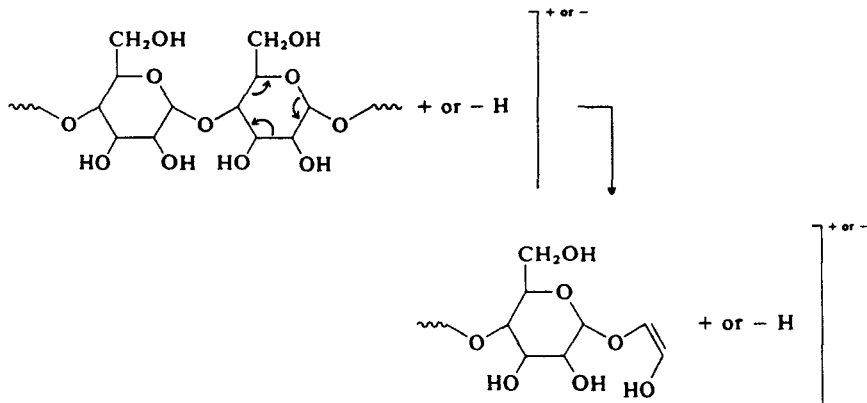
Clivage de la liaison glycosidique avec transfert d'hydrogène : ion de type C.

**Voie D**



Clivage du cycle glycosidique : ions de type  $1,5X$ ,  $1,3A$  et  $3,5A$ .

**Voie E**



Clivage du cycle glycosidique : ions de type  $0,2X$ ,  $0,4A$  et  $2,4A$ .

## II-2-1 Spectres de source

Les premières études d'oligosaccharides par spectrométrie de masse en mode d'ionisation FAB ont tout naturellement été conduites sur des structures natives (Dell et Ballou 1983c; Kamerling et al. 1983). La détermination des masses moléculaires est aisément déduite des ions pseudo-moléculaires  $[M-H]^-$  ou  $[M+Na]^+$  mais vouloir établir une séquence glycosidique est quelque peu hasardeux. Une simple comparaison des voies de fragmentation B et C montre en effet que celles-ci peuvent potentiellement générer des ions isomériques. De même, il n'est pas surprenant que des ions soient issus de clivages successifs, selon les voies A et B par exemple (Dell 1987).

Cependant la fragmentation devient évidente lorsque la charge est préférentiellement localisée au niveau d'un site tel que le groupement carboxyle des acides sialiques (Egge et Peter-Katalinic 1987). Dans ce cas, seuls des fragments de type C sont observés (Fig. 3).

En fait, Dell préconise l'utilisation des structures glucidiques natives pour la détermination des masses moléculaires, afin de visualiser la présence d'éventuels substituants O-acylés. Citons à titre d'exemple la mise en évidence de groupements O-acétyle (Dell et al. 1983d), O-glycéryle (Kuo et al. 1986), O-hydroxybutanoyle (Mc Neil et al. 1986), ou encore acylation avec des acides gras à longues chaînes (Qureshi et al. 1982).

Enfin, il faut souligner qu'il est également possible d'identifier de façon spécifique, à partir du spectre FAB d'oligosaccharides natifs en mode négatif, une substitution en 3 (Garozzo et al. 1992) sur la base de l'élimination d'un fragment neutre correspondant au résidu branché sur le carbone 3.

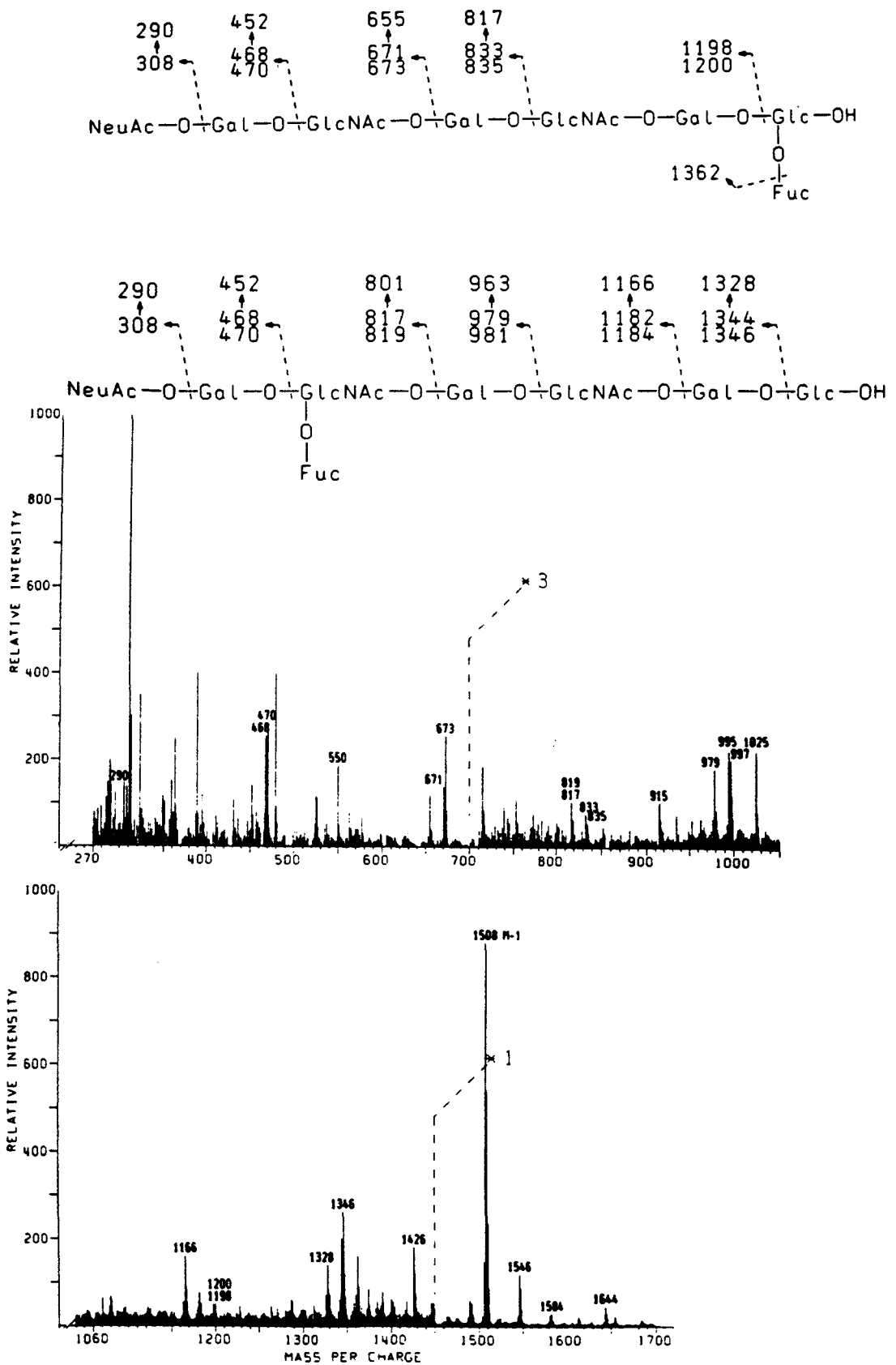


Figure 3 : Spectre obtenu en mode FAB négatif d'un mélange de 2 octasaccharides acides (Egge et Peter-Katalinic 1987).

II-2-2 Spectres de décomposition métastable et de collision  
d'oligosaccharides natifs

- Précurseur  $[M+H]^+$

Aussi surprenant que cela puisse paraître, la première application de la dissociation activée par collision en spectrométrie de masse en tandem d'oligosaccharides a été effectuée sur des précurseurs  $[M+H]^+$  (Carr et al. 1985) alors que la sensibilité sur les ions négatifs est supérieure. Utilisée pour accroître l'intensité des fragments de séquence, généralement faible pour les oligosaccharides neutres, cette méthode permet ici à partir d'une fragmentation simple et aisément interprétable de discriminer les structures de deux hexasaccharides de groupe sanguin A (Fig. 4). Les fragmentations majeures correspondent ici aux ions A oxonium, Y et C.

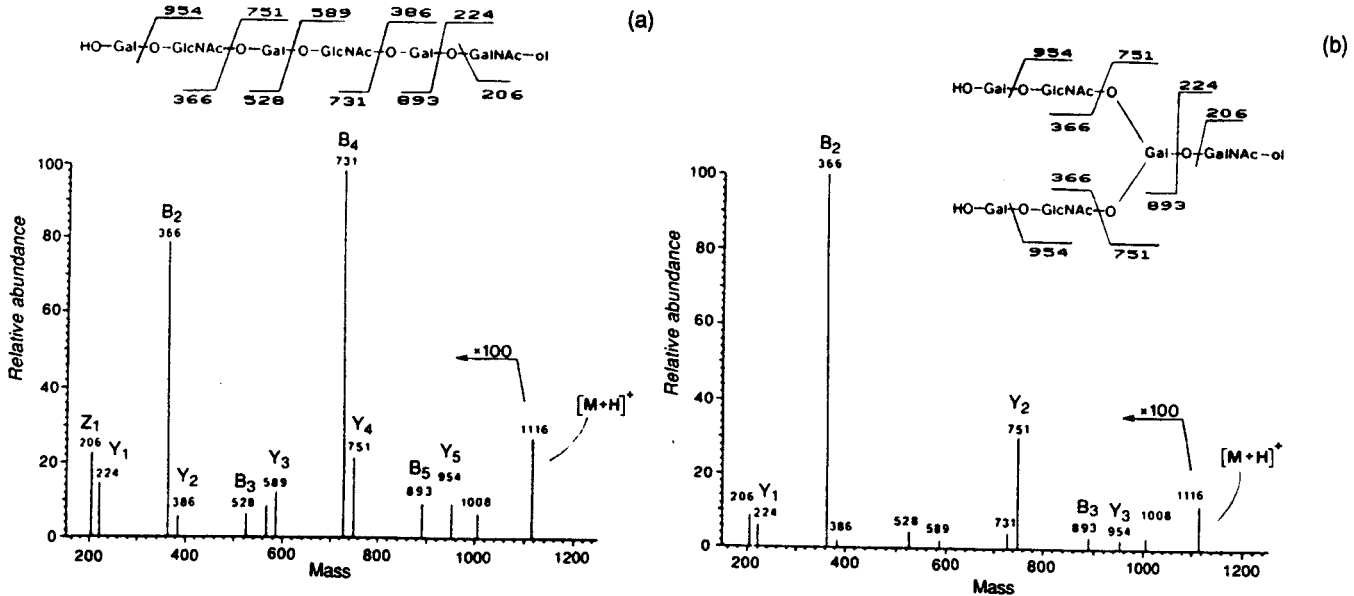
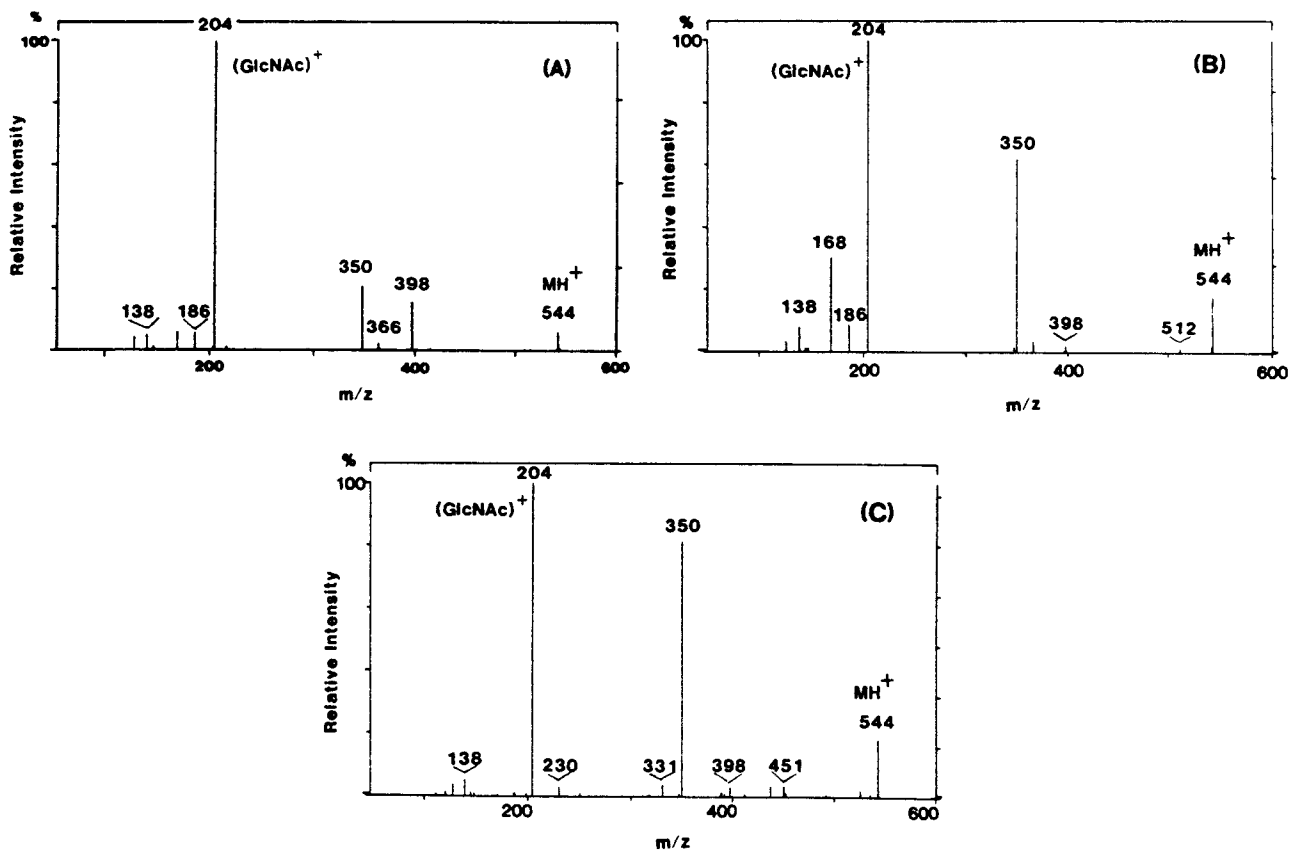


Figure 4 : Spectres CAD de l'ion précurseur  $[M+H]^+$  à  $m/z$  1116 correspondant à un hexasaccharide linéaire (A) et branché (B) (Carr et al. 1985).

L'étude des spectres de collision des ions  $[M+H]^+$  de 3 trisaccharides de structure  $\text{Fuca1-XGlcNAc}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{OME}$  ou  $X = 3, 4$  ou  $6$  met en évidence une possible discrimination entre ces 3 isomères (**Laine et al. 1988**). Celle-ci se fonde sur une comparaison des intensités relatives de l'ion précurseur à  $m/z$  544 et du fragment correspondant au clivage de la liaison glycosidique entre le Fuc et la GlcNAc (Fig. 5). La même étude est réalisée sur le spectre de collision du fragment B précurseur  $[\text{Fuca1-XGlcNAc}]^+$ . Ces comparaisons permettent d'en déduire un ordre relatif de stabilité des liaisons glycosidiques dans le sens  $1-6 > 1-4 > 1-3$ . Laine interprète ce résultat en postulant la stabilité de la liaison glycosidique d'autant plus grande que l'encombrement stérique autour de celle-ci est faible. Cette hypothèse est étayée par les résultats acquis en modélisation moléculaire sur le calcul des degrés de liberté de rotation de chacune des liaisons.

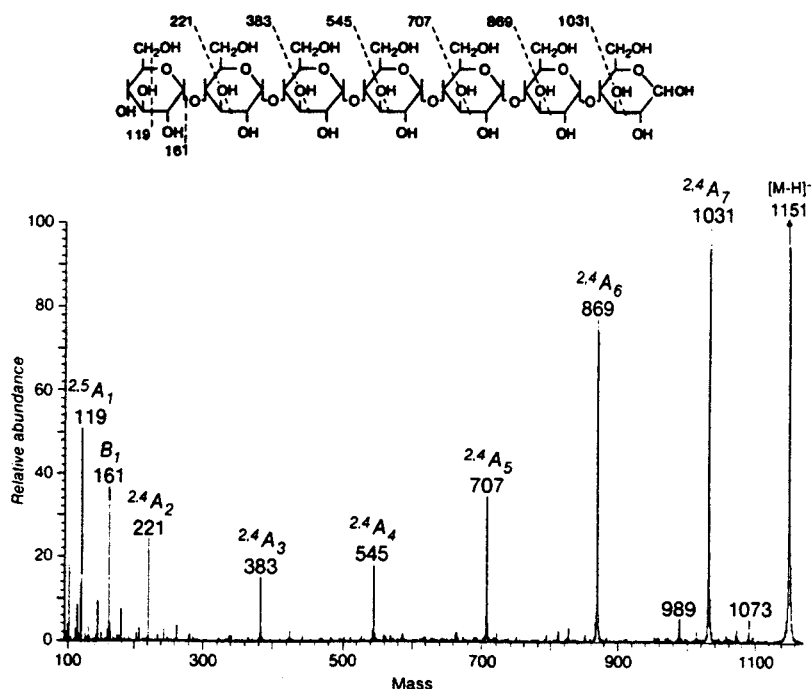


**Figure 5** : Spectres de CAD en mode FAB positif de l'ion précurseur  $[M+H]^+$  à  $m/z$  544 correspondant aux isomères F3 ( $X=3$ ), F4 ( $X=4$ ) et F6 ( $X=6$ ) (**Laine et al. 1988**).

Pour notre part, il semble toutefois difficile d'extrapoler ces conclusions à l'ensemble des liaisons glycosidiques de structures plus complexes.

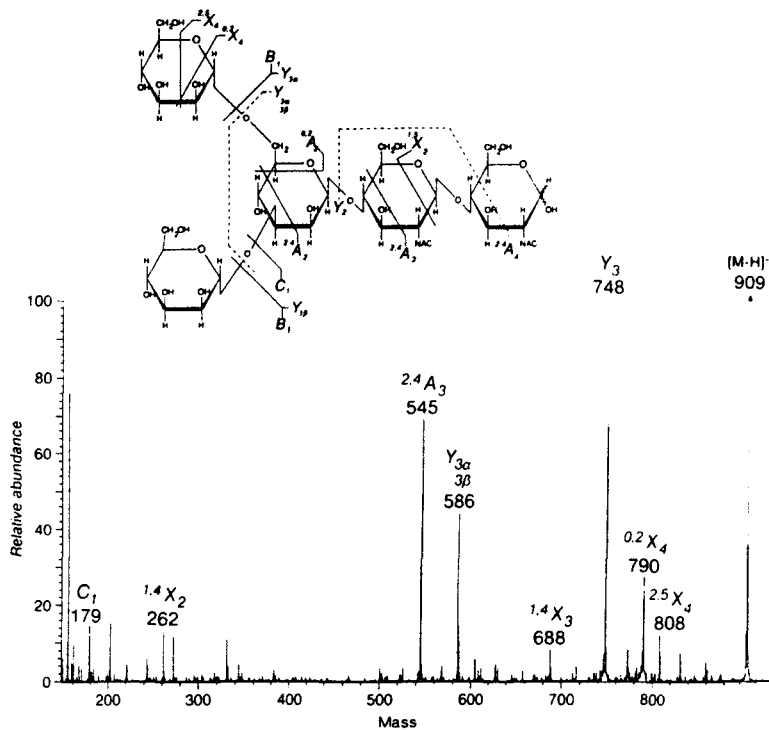
- Précurseurs  $[M-H]^-$

Les spectres de collision des ions  $[M-H]^-$  d'oligosaccharides natifs sont d'une manière générale plus complexes que ceux des précurseurs protonés, en particulier au niveau des ruptures intra-cycliques (Domon et Costello 1988). Ainsi le spectre de collision de l'ion  $[M-H]^-$  du maltoheptaose contient presque exclusivement des fragments de type  $2,4A$  (Fig. 6). Il est probable que ces ions soient issus du clivage du cycle glycosidique selon la voie E. Cette même voie justifie, de façon similaire, la présence d'ions  $0,2A$ ,  $2,4A$  et  $0,2X$  sur le spectre de collision de l'ion  $[M-H]^-$  du noyau pentasaccharidique des N-glycannes (Fig. 7). La présence simultanée sur ce spectre de fragments réducteurs ( $Y_{3\alpha}$ ,  $Y_{3\beta}$  et  $Y_{3\alpha\beta}$ ) et non-réducteurs pourrait s'expliquer par une déprotonation préférentielle au niveau du mannose disubstitué.



**Figure 6** : Spectre de CAD de l'ion précurseur  $[M-H]^-$  à  $m/z$  1151 correspondant au maltoheptaose, selon Gillece-Castro et Burlingame (1990).

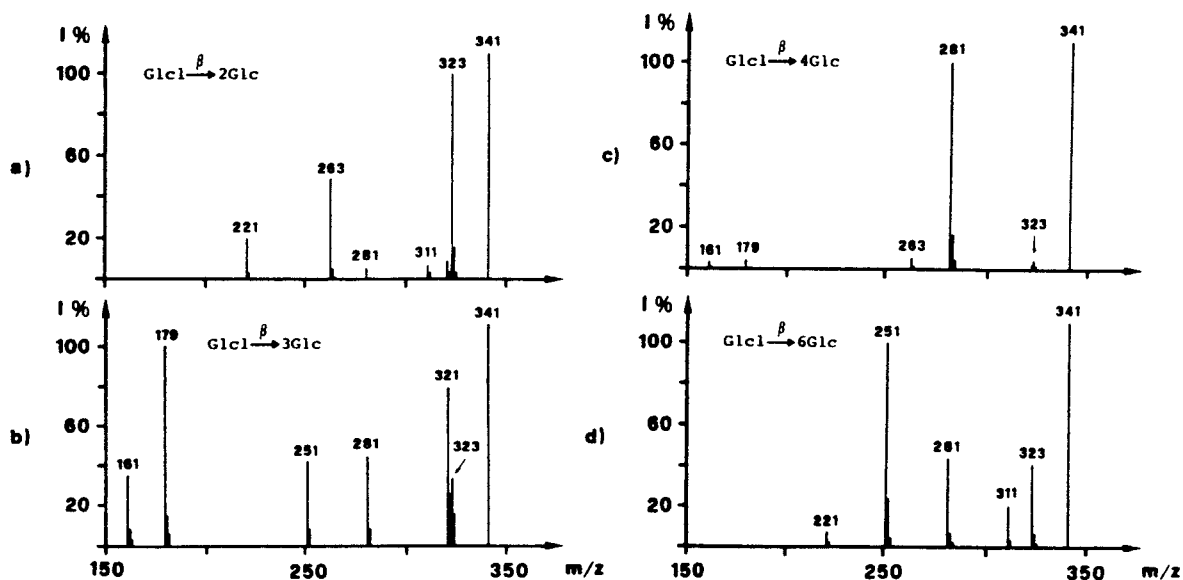




**Figure 7 :** Spectre de CAD de l'ion précurseur  $[M-H]^-$  à  $m/z$  909 correspondant au core pentasaccharidique des *N*-glycannes, selon Gillece-Castro et Burlingame (1990).

Divers travaux récents (Garozzo et al. 1990) ont démontré qu'il était possible d'accéder aux positions des liaisons de disaccharides, ou d'oligosaccharides plus lourds, à partir de l'étude des spectres de décomposition métastable ou de collision des ions  $[M-H]^-$ . Ces ions résulteraient d'une déprotonation sélective de l'hydroxyle anomérique en présence d'une matrice basique. La discrimination des liaisons 1-2, 1-3, 1-4, 1-6 est fondée sur la présence et/ou l'absence d'ions caractéristiques résultant de pertes de fragments neutres de 30, 60, 90 ou 120 uma à partir du monosaccharide réducteur (Fig. 8).

L'étude qui porte sur des disaccharides peut être extrapolée à des oligosaccharides de taille plus importante. Le spectre de décomposition métastable de l'ion pseudo-moléculaire fournit tout d'abord l'isomérisation de liaison du monosaccharide lié au sucre réducteur. Les autres liaisons sont ensuite déduites des spectres métastables des fragments C produits dans la source d'ionisation.



Diagnostic Peaks

linkage position	presence		absence		
	1-4	281	263	311	251
1-6	311		251	263	
1-3	281		251	311	
1-2	311	281	263	221	251

Figure 8 : Spectres de décomposition métastable des ions  $[M-H]^-$  à  $m/z$  341 du sophorose (A), laminaribiose (B), cellobiose (C) et gentiobiose (D), selon Garozzo et al. (1990).

Une étude similaire de Dallinga et Heerma (1991) leur permet d'avancer des hypothèses quant aux chemins réactionnels. La première étape correspondrait à une migration de charge de l'alcoolate anomérique sur l'hydroxyle en 5; puis des réarrangements de type rétro-aldol, ou impliquant une migration de la charge, interviendraient pour induire des éliminations qui seraient spécifiques de l'isomérisation de liaison.

- Précurseurs  $[M+Cation]^+$

L'utilisation d'ions moléculaires cationisés par des métaux alcalins ou alcalino-terreux en place de leurs homologues protonés ou déprotonés conduit souvent à des spectres plus informatifs ou tout au moins complémentaires. De nombreux exemples à travers la littérature,

récemment répertoriés par Teesch et Adams (1992) et qui concernent des composés tels que les peptides, les acides gras, les prostaglandines, illustrent ce fait. De la même manière, l'étude par collision d'oligosaccharides cationisés apparaît intéressante du point de vue analytique.

C'est ainsi que les spectres de collision des ions  $[M+Li]^+$  d'une série de disaccharides mettent en évidence une fragmentation caractéristique de l'isomérisation de liaison (Hofmeister et al. 1991). La cationisation préférentielle du lithium au niveau de la liaison glycosidique, en formant un complexe tétra ou pentacoordonné avec les oxygènes environnants, stabiliserait cette liaison et favoriserait les fragmentations du monosaccharide réducteur. La première étape est supposée correspondre à l'ouverture du cycle du monosaccharide réducteur pour former un aldéhyde hydroxylé acyclique, suivie de décompositions de type rétro-ène ou rétro-aldol, là encore spécifiques du point de branchement.

Les spectres de collision des ions  $[M+Na]^+$  (Orlando et al. 1990) de pentasaccharides ou de structures plus lourdes, tel le maltodécaose, ne semblent pas dénués d'intérêt en raison des ruptures intracycliques qui y sont présentées comme étant caractéristiques de l'isomérisation de liaison.

Cela est probablement exact. Néanmoins aucun exemple concret n'est discuté à travers cet article.

Par contre, les spectres et schémas de fragmentation des précurseurs  $[M+2Li-H]^+$  sont tout à fait explicites sur le plan des discriminations des liaisons (Zhou et al. 1990). Dans ce cas, le lithium remplaçant l'hydrogène d'un hydroxyle serait responsable des ruptures carbone-carbone dans le cycle réducteur, l'autre cation n'ayant pour rôle que de porter la charge (Fig. 9).

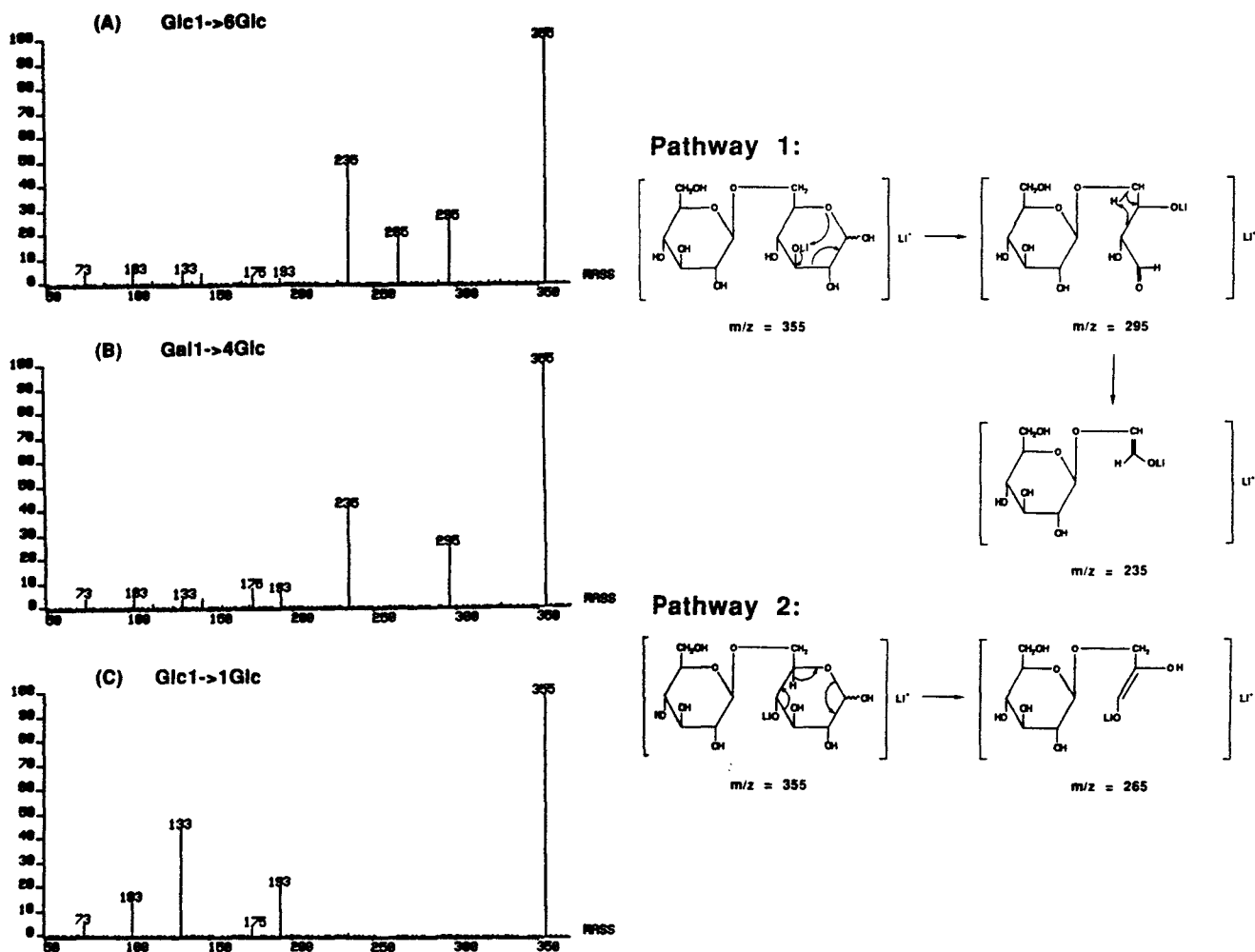


Figure 9 : Spectres de CAD des ions précurseurs  $[M+2Li-H]^+$  à m/z 355 correspondant au gentiobiose (A), lactose (B) et tréhalose (C) selon Zhou et al. (1990).

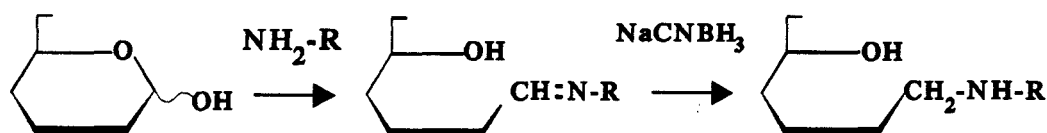
### II-3 Analyse structurale d'oligosaccharides substitués

#### II-3-1 Amination réductive de la fonction aldéyde

##### - Par des chromophores

L'un des problèmes majeurs rencontré lors de la purification de structures oligosaccharidiques libres ou libérés par voie chimique ou enzymatique de glycoconjugués, est leur quasi-transparence en absorption ultra-violette rendant impossible la détection de très faible quantité de matériel. Pour palier cet handicap, Hase et al. en 1981 et

1984 proposent une approche originale qui consiste à greffer sur la fonction aldéhydique un chromophore (aminopyridine) via une réaction de type amination réductive (Fig 10) : la condensation de l'amine sur l'aldéhyde conduit à la formation d'une base de Schiff, qui est ensuite réduite en présence de cyanoborohydrure de potassium. D'autres molécules ont été proposées comme candidates à ce type de réaction, en particulier la 7-amino-4-méthylcoumarine (Prakash et al. 1983) et le 7-amino 1-naphtol (Coles et al. 1985) pour la détection en fluorescence.



*Figure 10 : Principe de la substitution des oligosaccharides par une réaction de type amination réductive.*

En fait, il s'est très vite avéré que ce type de dérivé présentait également un avantage non négligeable pour les analyses en spectrométrie de masse dû à l'accroissement de sensibilité qu'ils procurent par comparaison avec les structures glucidiques natives (Wang et al. 1984). Ce fait est attribué, d'une part, à l'augmentation de l'activité de surface du produit en raison de l'apport d'hydrophobicité et, d'autre part, à la protonation sélective de l'amine secondaire présente sur le bras de couplage. Les spectres FAB obtenus sur ce type de composés mettent en évidence la présence d'ions pseudo-moléculaires  $[M+H]^+$  et  $[M+Na]^+$  ainsi que des fragments

proposés comme résultant de la perte d'anhydrohexose en position terminale non-réductrice.

Mais c'est au groupe de Burlingame que l'on doit l'extraordinaire développement de cette technique (Poulter et Burlingame 1990). Le greffage de n-alkyl ester de l'acide para-aminobenzoïque sur les oligosaccharides s'inscrit dans le protocole même de purification de structures obtenues en très faible quantité par HPLC, isolées par exemple à partir de 1 nmole du récepteur à l'acétylcholine de Torpedo californica (Poulter et al. 1989) ou 2 nmoles de la glycoprotéine acide  $\alpha 1$  humaine (Poulter et al. 1991).

Une étude de l'intensité de réponse en mode d'ionisation FAB positive de dérivés n-alkylés de la structure  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}$  montre que le rapport signal sur bruit de fond croît avec la taille de l'alkyl (Poulter et al. 1991). Cet effet est d'autant plus prononcé que la concentration de l'échantillon est faible, et ceci se vérifie en mode négatif. Néanmoins, en raison du faible rendement de couplage des oligosaccharides très hydrophiles (masse importante ou présence de charge) avec les alkyl esters de plus grande taille, les auteurs concluent que l'octyl ester est un bon compromis entre réponse et rendement de couplage.

Les seuils de sensibilité sont de 4 pmoles pour la détection de l'ion  $[\text{M-H}]^-$ , alors que 40 pmoles sont nécessaires pour l'obtention d'une fragmentation interprétable. En considérant les pertes dues au couplage et à la purification par HPLC, 200 pmoles de matériel de départ sont requis pour visualiser un ion pseudo-moléculaire (Webb et al. 1988).

Le comportement de ce type de dérivés vis-à-vis de l'ionisation FAB varie suivant que l'on examine les spectres en mode positif ou négatif. En mode positif (Fig. 11), les ions pseudo-moléculaires sont de type  $[\text{M+H}]^+$  et  $[\text{M+Na}]^+$ , les fragmentations, peu intenses, conduisent à la formation d'ions Y, de par la protonation sélective de l'amine du

bras de couplage. Par contre, en mode négatif (Fig. 12), il est observé d'intenses ruptures à l'origine de fragments de type Y et A. En conséquence les spectres obtenus en mode négatif sont plus informatifs (Hernandez *et al.* 1989; John et Gibson 1990).

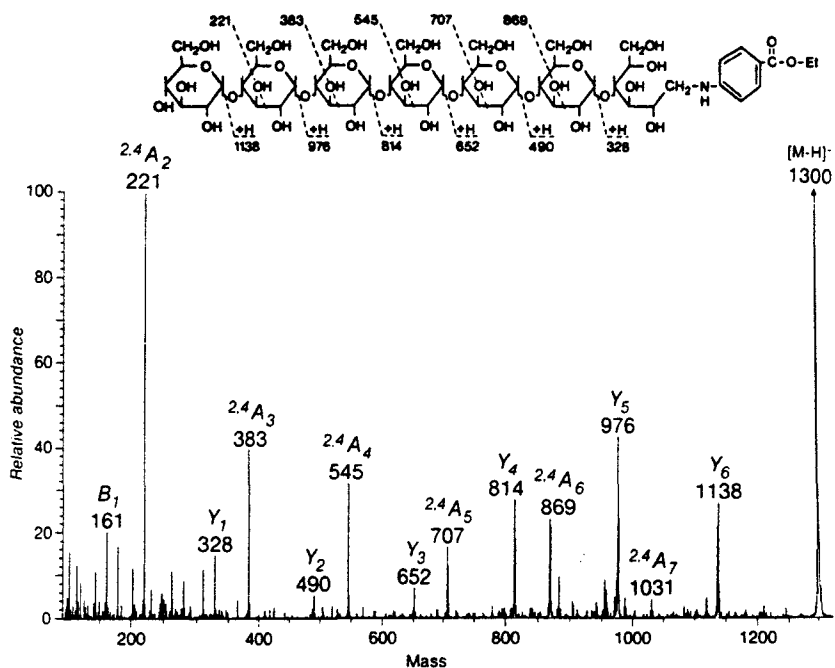


Figure 11 : Spectre de CAD de l'ion  $[M+H]^+$  à  $m/z$  1300 correspondant au maltoheptaose-ABBE selon Gillice-Castro et Burlingame (1990).

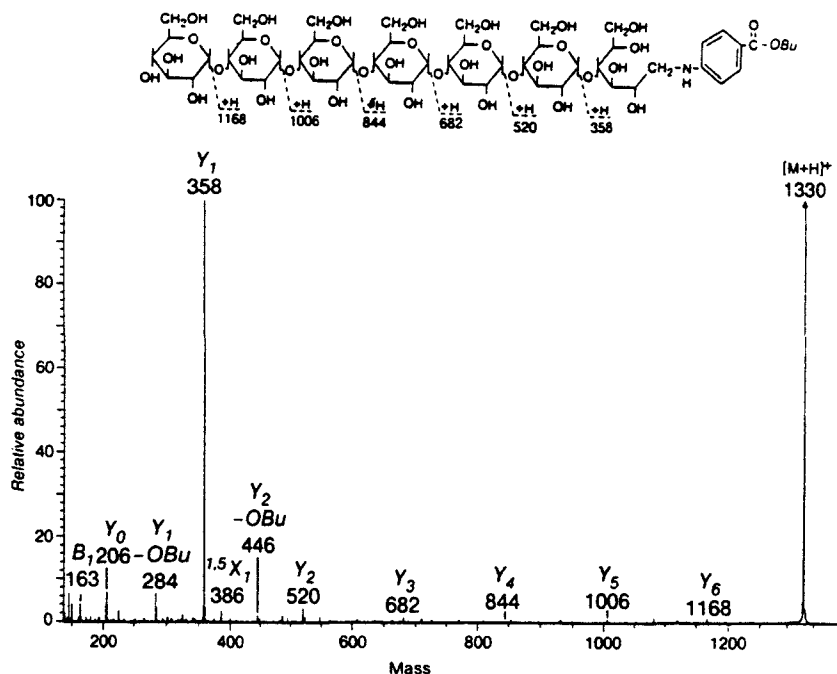


Figure 12 : Spectre de CAD de l'ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  1330 correspondant au maltoheptaose-ABEE, selon Gillice-Castro et Burlingame (1990).

- Par des dérivés lipidiques

Les dérivés lipidiques de type phosphatidyléthanolamine dipalmitate (PPEADP) greffés également par amination réductive (Lawson et al. 1990; Chai et al. 1991) entrent dans une toute autre optique puisqu'à l'origine destinés à des études d'interaction avec des anticorps ou des protéines. Cependant, ces auteurs ont également démontré tout l'attrait de ce type de dérivé pour des analyses en ionisation FAB négative et de spectrométrie de masse en tandem. Les seuils de sensibilité ici encore relativement bas (100 fmoles pour le maltopentaose PPEADP avec un rapport signal sur bruit de fond de 12:1) sont attribués à la fois à l'hydrophobicité du dérivé lipidique et à la charge permanente apportée par le groupement phosphate.

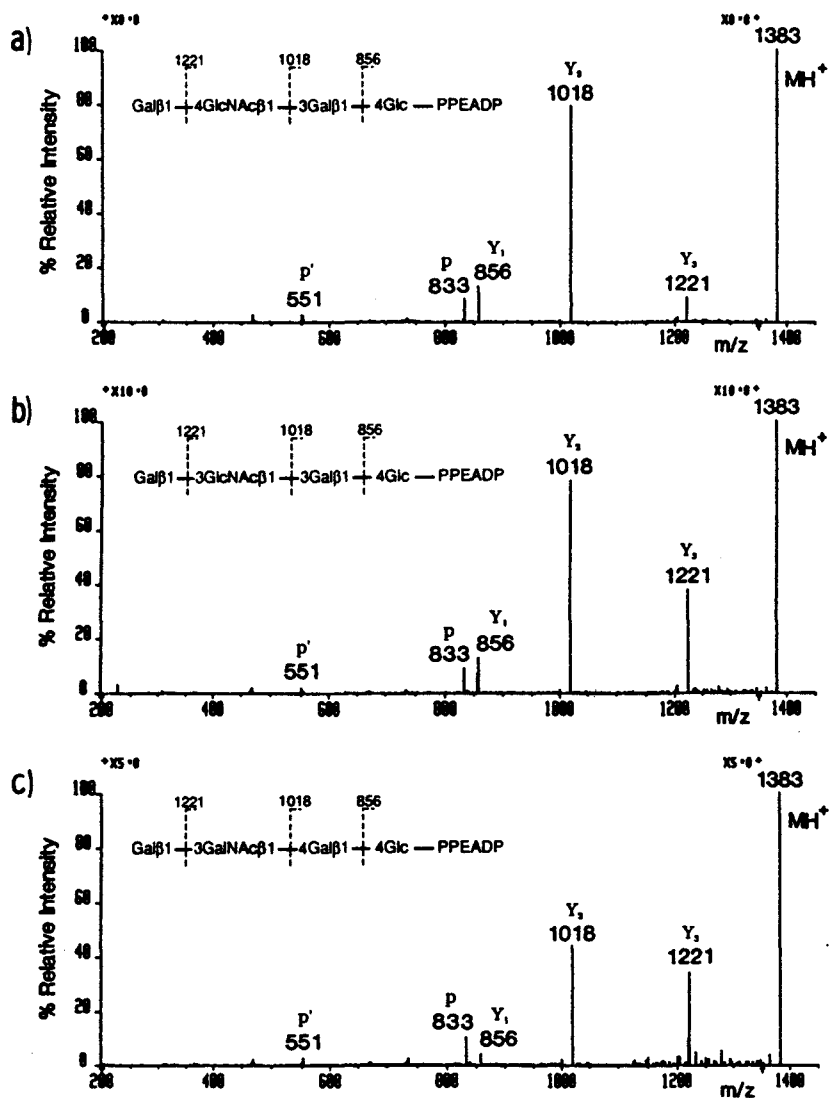
D'excellents rapports signal sur bruit de fond sont relevés non seulement pour l'ion  $[M-H]^-$  mais aussi pour les fragments réducteurs de type  $^{1,5}X$ , Y et Z. Les auteurs annoncent un seuil de sensibilité similaire en mode positif avec cependant un rapport signal sur bruit de fond supérieur.

L'examen des spectres de décomposition métastable de ces dérivés (Fig. 13) à partir des précurseurs  $[M+H]^+$  montrent la présence de fragments de type Y et des ions issus de clivage au niveau de la liaison phosphodiester avec le diacylglycérol ( $m/z$  833 et 551). Le spectre de collision de ce même précurseur diffère uniquement par l'apparition de fragmentations secondaires à partir de l'ion à  $m/z$  833.

L'étude des décompositions métastables du précurseur  $[M-H]^-$  met en avant une plus grande complexité des spectres en raison, d'une part, des ruptures de type Z et  $^{1,5}X$  et, d'autre part, des clivages de la liaison ester entre l'acyle et le glycérol. Selon les auteurs, l'un des intérêts de ce type de dérivés est de pouvoir discriminer les liaisons 1-3, 1-4 et 1-6 sur la base des intensités relatives des fragments Y (Fig. 13). L'ordre de stabilité relative dans le sens  $1-6 > 1-4 > 1-3$  conforte



les conclusions de Laine et al. (1988).



**Figure 13 :** Spectres de décomposition métastable de l'ion précurseur  $[M+H]^+$  à  $m/z$  1383 du lacto-N-néotétraose (A), lacto-N-tétraose (B) et de l'asialo-GM<sub>1</sub> (C), selon Chai et al. (1991).

- Par la n-hexylamine

L'avènement de la chromatographie d'échange d'anions à haut pH associée à la détection par ampérométrie pulsée (Hardy et Townsend 1988) occulte aujourd'hui le recours au greffage de chromophore sur les oligosaccharides pour leur détection après séparation par HPLC. Néanmoins, la recherche perpétuelle de seuils de détection sans cesse

plus bas en spectrométrie de masse conduit Hogeland et al. (1992) à greffer une n-hexylamine sur des substrats glucidiques. Ce type de composé présente un certain nombre d'avantages : disponibilité commerciale, solubilité parfaite dans la phase eau/alcool du milieu réactionnel même pour les homologues supérieurs de type n-heptyl ou n-décyl, seuils de détection équivalents à ceux offerts par les esters de l'acide para-aminobenzoïque.

En mode positif, ces dérivés substitués par peracétylation donnent des ions pseudo-moléculaires  $[M+H]^+$  et, de façon surprenante, des fragments de type B non-réducteurs.

Quant à la perméthylation, elle est beaucoup plus attrayante en raison de la double alkylation de l'amine secondaire qui conduit à un ammonium quaternaire et donc à une charge nette positive. Ceci se traduit par un ion pseudomoléculaire  $M^+$  intense, avec un seuil de détection de 5 pmoles, et un spectre dominé par des fragments de type Y et  $1,5X$ .

L'intérêt de la formation d'un ammonium quaternaire a également été mis à profit par Baldwin et al. (1990) pour caractériser les oligosaccharides à hexosamine de protéines d'ancrages.

#### - Par le triméthylpara-aminophénylammonium

Le concept d'augmentation de sensibilité par la présence d'une charge nette permanente est également appliqué par Dell et al. (1988a) avec le greffage du triméthylpara-aminophénylammonium. La présence de cet ammonium quaternaire, corrélée à la peracétylation ou à la perméthylation, offre comme il pouvait être espéré une très grande sensibilité sur l'ion  $M^+$ . Les ions de fragmentation des structures perméthylées, en dépit de leur moindre intensité en regard de celle des dérivés peracétylés, permettent une interprétation évidente sur la base

de ruptures de type A (ion oxonium) au niveau des résidus de N-acétylhexosamine.

### II-3-2 Peracétylation et perméthylation

Comme le prouve une bibliographie relativement dense, la plus grande part des études structurales d'oligosaccharides en mode d'ionisation FAB sont effectuées sur des substrats substitués, soit par peracétylation, soit par perméthylation de l'ensemble des hydroxyles libres. Divers avantages justifient cette démarche (Dell 1987; 1990a) :

- amélioration de la sensibilité
- extension de la gamme de masse analysable
- interprétation plus aisée et sans ambiguïté des spectres
- confirmation de structures particulières comme les polysaccharides cycliques (Dell et al. 1983b, 1984)

#### - Peracétylation

La peracétylation est une excellente méthode de substitution des oligosaccharides qu'ils soient purs ou contaminés par des peptides, voire des sels. Le mélange acide trifluoroacétique/acide acétique (2:1; v:v) assure une substitution complète des hydroxyles libres. Après évaporation des réactifs sous courant d'azote, le résidu est repris par du chloroforme et cette phase est lavée par 2 ou 3 additions d'eau éliminant ainsi les contaminants éventuels. Après séchage, l'échantillon est repris dans du méthanol. La cinétique rapide de cette réaction autorise donc l'acquisition de spectres dans un délai de 30 min.

De part l'incrément de masse relativement important ( $N \times 42$ ), cette procédure est plus particulièrement recommandée pour des masses moléculaires ne dépassant pas 2000 à 2500 uma. Toutefois, elle constitue

la technique de choix pour la caractérisation de substituants O-acylés labiles en milieu basique (**Dell et Tiller 1986**). Dans le cas d'oligosaccharides naturellement acétylés, une alternative consiste à remplacer l'acide acétique par de l'acide [<sup>2</sup>H] acétique, voire de l'acide propionique. Du point de vue de l'interprétation des spectres, il faut souligner une prédominance des ruptures de type B (ion oxonium), en particulier au niveau des résidus de N-acétylhexosamine. Celle-ci est cependant moins exclusive que dans le cas des dérivés perméthylés.

Si le thioglycérol est la matrice la plus communément employée, le NBA n'est pas à négliger en raison de sa moindre sensibilité aux contaminations salines (**Dell et al. 1990b**). Par ailleurs, il est bien établi que ce NBA favorise la production des fragments de haute masse, d'un intérêt certain pour, par exemple, discriminer les branches 1-3 et 1-6 des structures oligomannosidiques (**Reason et al. 1991**).

Une technique présentant également un certain attrait consiste à cliver de manière sélective la liaison  $\alpha$ -1,6 par acétolyse (acide acétique/ anhydride acétique/acide sulfurique concentré 10:10:1; v:v:v; 90 min à 40°C) (**Rosenfeld et Ballou 1974**). Les spectres de masse réalisés avant et après acétolyse révèlent alors les positions des différentes liaisons 1-6 et par différence les points de branchement en 1-3 (**Tsai et al. 1986**).

Il est également possible par collision à basse et à haute énergie d'accéder à la composition, à l'anomérisation et à l'isomérisation de position de disaccharides octaacétates et/ou 1-O-méthyl heptaacétates à partir de la comparaison de la distance euclidienne entre un spectre de référence et un spectre de structure inconnue. Cette distance euclidienne évaluée en fait le degré de similarité entre ces deux spectres (**Müller et al. 1989; Richter et al. 1990; Domon et al. 1990**).

Parallèlement, ces auteurs démontrent que les ions  $[M+H]^+$  de tétra- et de pentasaccharides peracétylés fournissent des spectres de

collision (Fig. 14) desquels peuvent être déduits, non seulement les séquences, mais aussi les positions relatives des liaisons 1-3 et 1-4 (Domon et al. 1990). Ce dernier résultat repose sur l'élimination spécifique du substituant en 3 suivant le schéma de la figure 15, processus commun aux structures perméthylées (Hanfland et al. 1984; Egge et Peter-Katalinic 1984).

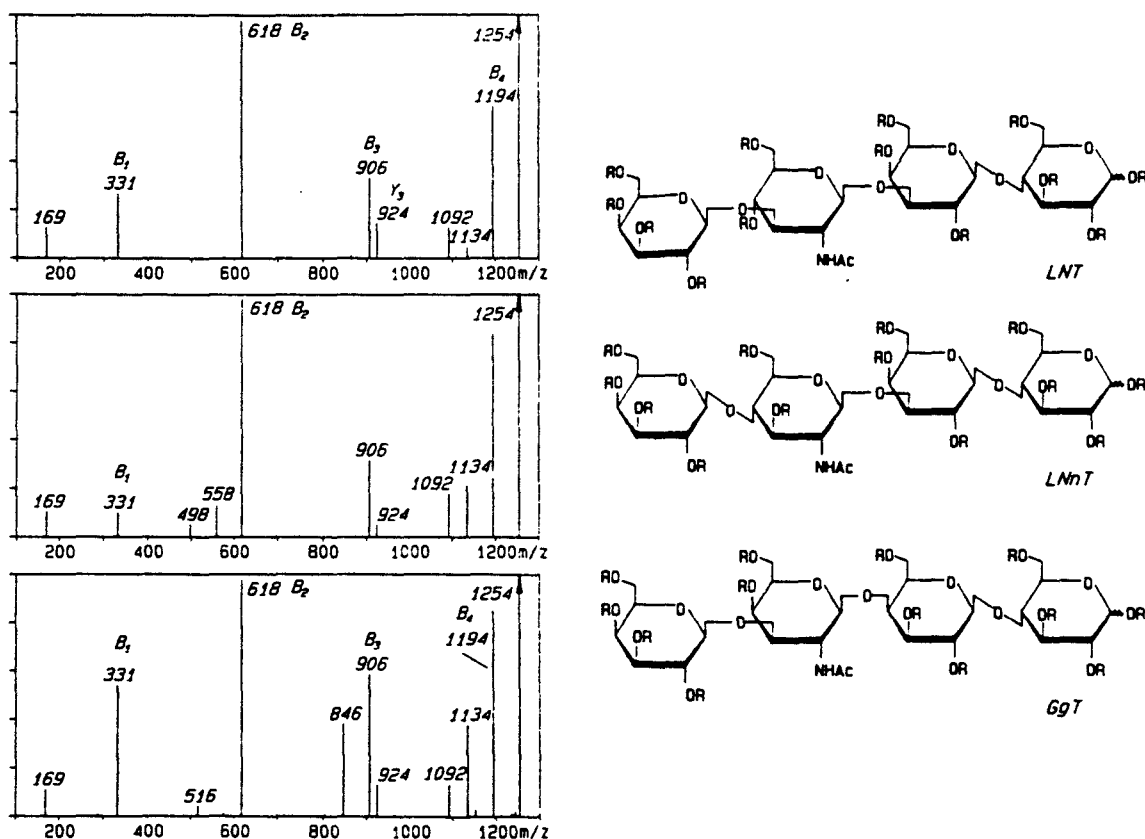


Figure 14 : Spectres de CAD de l'ion précurseur  $[M+H]^+$  à  $m/z$  1254 correspondant au lacto-N-tétraose (A), lacto-N-néotétraose (B) et à l'asialo-GM<sub>1</sub> (C), selon Domon et al. (1990).

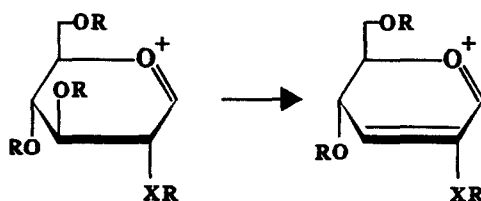


Figure 15 : Schéma de fragmentation d'ion B substitué sur le carbone 3 (R = acétyl ou glycosyl, X = O ou NH).

### - Perméthylation

L'incrément de masse dans le cas de la perméthylation ( $N \times 14$ ) est de loin inférieur à celui qu'entraîne la peracétylation. Aussi, bien que souvent considérée comme fastidieuse, cette technique constitue le plus souvent l'unique recours pour l'étude structurale des échantillons glucidiques de masse supérieure à 2500 uma. En outre, elle ne représente pas une étape supplémentaire dans la mesure où elle est indispensable à la caractérisation des points de branchement à partir des analyses par couplage CPG-MS des dérivés monosaccharidiques partiellement acétylés et méthylés (Kotchekov et Chizhov 1966; Stellner et al. 1973; Fournet et al. 1981).

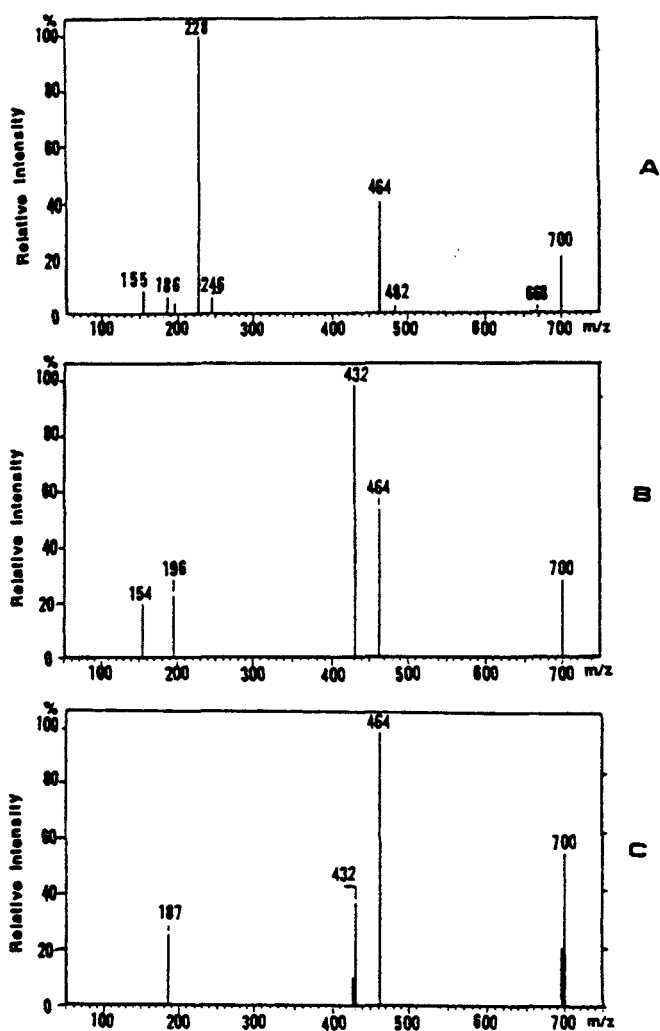
Au protocole expérimental développé par Hakomori (1964) est aujourd'hui préféré celui de Ciucanu et Kerek (1984). De mise en oeuvre plus aisée, il utilise l'hydroxyde de sodium-diméthylsulfoxyde comme base. Cette dernière méthode ne peut en revanche s'appliquer aux oligosaccharides à acides uroniques car elle provoque des  $\beta$ -éliminations. Ceci nécessite donc le recours à des bases nucléophiles détruites après addition du réactif d'alkylation ( $ICH_3$ ), comme le méthylsulfinyl carbanion de potassium (Darvill et al. 1978) ou de lithium (Blakeney et Stone 1985; Paz Parente et al. 1985).

La fragmentation des dérivés perméthylés ne diffère pas fondamentalement de celle des sucres peracétylés bien qu'ayant tendance à former de manière plus exclusive des ions B oxonium au niveau des résidus de N-acétylhexosamine. En effet, l'alkylation de l'azote du groupement acétamido en fait un site de protonation privilégié. Cette sélectivité dans les ruptures fait que parfois les informations de séquence apparaissent fragmentaires.

En contre partie, l'élimination spécifique du substituant en 3 est exacerbée, donc de grande valeur analytique; un signal à 32 uma (perte de méthanol) en dessous du fragment B oxonium indique une

substitution en 4 ou en 6. Un ion à  $m/z$  228 est caractéristique d'une N-acétylhexosamine substituée en 3.

D'une manière similaire aux oligosaccharides natifs, Laine et al. (1991) mettent en avant une possible discrimination des liaisons 1-3, 1-4 et 1-6 à partir des spectres de collision des ions  $[M+H]^+$  de dérivés perméthylés (Fig. 16). Le rapport **intensités des fragments/intensité du précurseur** donne un ordre de stabilité 1-6>1-4>1-3 qui traduit l'extrême rigidité de la liaison 1-3 et l'importante flexibilité de la liaison 1-6, plus apte à dissiper l'énergie interne acquise lors de la collision.



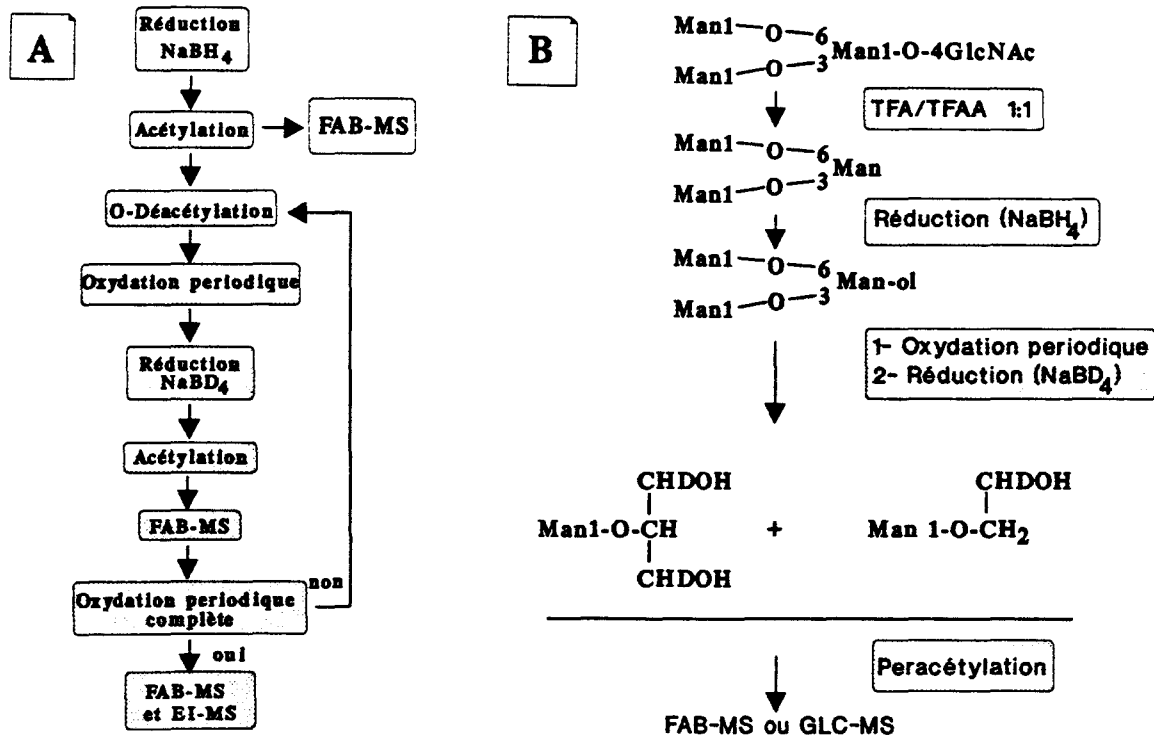
**Figure 16** : Spectres de CAD de l'ion  $[M+H]^+$  à  $m/z$  700 correspondant aux oligosaccharides perméthylés  $Gall-XGlcNAc1-3Gall-OCH_3$  ou  $X=3$  (A),  $X=4$  (B) et  $X=6$  (C) selon Laine et al. 1991.

**II-4 Analyse structurale d'oligosaccharides après dégradation chimique**

Dans le but d'enrichir les renseignements accessibles à partir d'un spectre de masse, deux procédures ont été proposées, l'une faisant appel à l'oxydation periodique pour identifier les isoméries de position, la seconde à l'oxydation chromique pour préciser les anoméries de liaisons.

**II-4-2 Oxydation periodique**

L'oxydation periodique (Goldstein et al. 1965) coupe les liaisons carbone-carbone entre diols vicinaux et peut par conséquent être mise à profit pour déterminer les différentes isoméries de position entre les monosaccharides constitutifs d'une structure complexe (Angel et al. 1987; Angel et Nilsson 1990). La stratégie originale mise au point par l'équipe de Nilsson est détaillée dans la figure 17 :



**Figure 17 :** Schéma opératoire pour l'analyse des isoméries de position d'oligosaccharides traités par l'oxydation periodique avec (B) ou sans l'étape de trifluoroacétylyse (A).



En mode positif, l'ionisation FAB conduit là encore principalement aux ions B oxonium et dans une moindre mesure à des fragments Z. Les incréments de masse à ajouter à un fragment  $B_x$  donné pour connaître la substitution du monosaccharide suivant sont :  $B_x+208$  (fragment  $B_{x+1}$ ) pour les positions 2 et 4, la première se distinguant de la seconde par la perte de méthanol (-32),  $B_x+204$  pour une liaison en 3 et  $B_x+164$  pour une liaison en 6. La substitution de l'hexose en position terminale réductrice est déduite de la différence de masse entre l'ion pseudomoléculaire et le fragment de masse le plus élevé : 121 uma caractérise une liaison en 2, 208 uma en 3, 164 uma en 4 et 120 uma en 6.

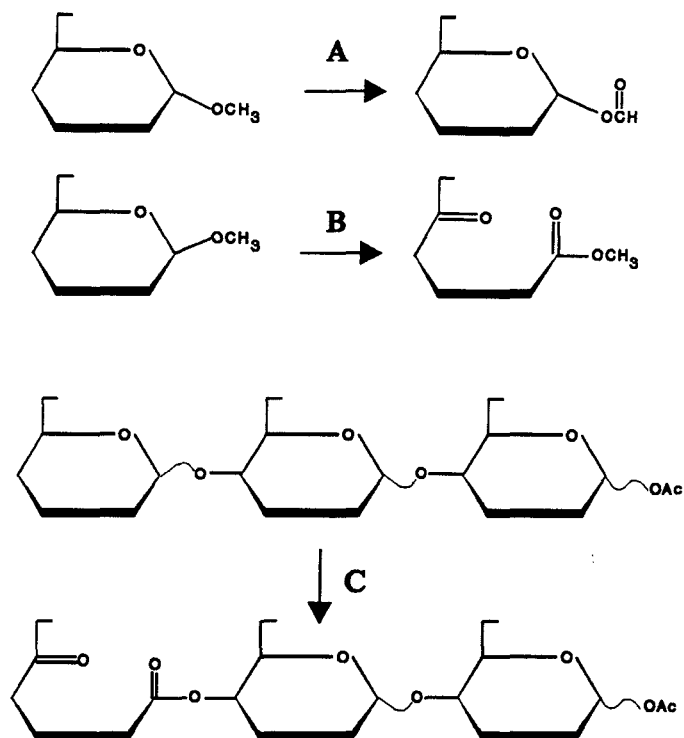
Enfin, la discrimination des branches en 3 et 6 après élimination du résidu di-N-acétylchitobiose par trifluoroacétolyse (Angel et al. 1991; Lipniunas et al. 1992) repose sur l'obtention d'un substituant éthylène glycol pour la branche en 6 et glycérol pour la branche en 3 (Fig. 17B).

Bien qu'apparaissant extrêmement puissante, nous pourrions reprocher à cette démarche un nombre d'étapes relativement important, multipliant de ce fait les pertes de matériel, d'autant plus que l'oxydation périodique n'est pas toujours quantitative. A ce propos les quantités de départ utilisées sont loin d'être négligeables (50 $\mu$ g à 2 mg).

#### II-4-2 Oxydation chromique

En 1970 Angyal et James démontrent que le trioxyde de chrome en présence d'acide acétique oxyde de manière sélective les anoméries  $\alpha$  et  $\beta$  de méthylglycopyranosides peracétylés : l'oxydation de l'anomérie  $\alpha$

conduit à un formyl-glycoside, tandis que l'anomérie  $\beta$ , elle entraîne la formation de céto-méthylester (Fig. 18). Ces mêmes auteurs signalent que les liaisons  $\alpha$  de monosaccharides sous forme pyraniques dans des oligosaccharides sont très peu affectées par l'oxydation chromique.



**Figure 18 :** Action de l'oxyde de chrome sur les anoméries alpha (A) et béta (B) de méthylglycosides et d'oligosaccharides (C) peracétylés, selon Angyal et James (1970).

En corrélant la sélectivité de cette réaction à l'augmentation de l'activité de surface des dérivés peracétylés, Khoo et Dell (1990) ont adapté cette méthode à la spectrométrie de masse afin de discerner à partir du spectre FAB les anoméries coexistantes dans un oligosaccharide. Le spectre de masse du maltotriose : Glc( $\alpha$ 1-4)Glc( $\alpha$ 1-4)Glc oxydé, par rapport à son homologue non-oxydé, fait apparaître une différence de 31 uma pour l'ion moléculaire correspondant à l'oxydation partielle de l'hydroxyle anomérique. Les

liaisons oxydées peuvent être repérées par des fragmentations de type B incrémentées de 14 uma par rapport à une fragmentation similaire sur un site non-oxydé. Ainsi, une différence de  $N \times 14$  uma entre les ions moléculaires avant et après oxydation traduit N liaisons  $\beta$  oxydées.

Une exception à cette sélectivité de l'oxydation de l'anomérie  $\beta$  doit cependant être soulignée avec la mise en évidence sur le spectre de masse de l'isomaltotriose : Glc( $\alpha$ 1-6)Glc( $\alpha$ 1-6)Glc d'une oxydation partielle de la liaison  $\alpha$ -1,6 se traduisant par un déplacement de masse de 28 uma.

Enfin, une méthanolyse douce à température ambiante (solution méthanolique 0,6M en HCl) peut palier une éventuelle faible intensité des fragments B en clivant préférentiellement les liaisons esters formées au niveau des anoméries  $\beta$  oxydées.

CHAPITRE II  
TRAVAUX PERSONNELS

*Dissociation activée par collision des ions  
[M+Na]<sup>+</sup> d'oligosaccharides perméthylés*

Comme il a pu être entrevu à travers quelques exemples précédemment évoqués, la dissociation activée par collision ou CAD (Collision Activated Dissociation) permet d'augmenter l'intensité des ions de fragmentation qui éventuellement pourraient être peu intenses, voir inexistants, sur le spectre de source ou de décomposition métastable. C'est précisément le cas lorsque des oligosaccharides sous forme perméthylée sont ionisés par FAB dans une matrice de thioglycérol dont la concentration en ion  $\text{Na}^+$  est supérieure à 0,05 M.

Or la conjonction de ces deux facteurs, perméthylation et cationisation, accroît notablement le signal de l'ion moléculaire. Par ailleurs, nul ne peut considérer la perméthylation comme une étape supplémentaire, dans la mesure où en plus de l'avantage analytique de ces dérivés dans l'interprétation des spectres de masses, celle-ci est nécessaire aux études des points de branchement des monosaccharides par analyse des éthers méthyliques en couplage GLC-MS.

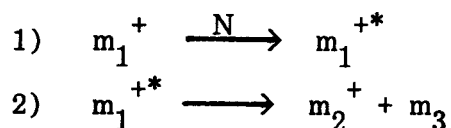
Aussi, si l'expérimentateur dispose d'une structure perméthylée, pourquoi ne pas acquérir, en parallèle du spectre FAB ou du spectre CAD de l'ion précurseur  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , un spectre à partir de l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  qui, nous tenterons de le montrer, n'est pas dénué d'intérêt.

Avant toute chose, il semble souhaitable de rappeler le principe et les aspects essentiels qui concernent la dissociation activée par collision (Kim 1991; Mc Luckey 1992).

## I- Dissociation activée par collision (CAD)

### I-1 Principe

D'un point de vue général, le processus de CAD se décompose en 2 étapes :



L'étape n°1 correspond à la collision entre l'ion précurseur  $m_1^+$  et la molécule de gaz neutre N au cours de laquelle une fraction de l'énergie translationnelle de l'ion est convertie en énergie interne, cet ion se trouvant alors dans un état excité  $m_1^{+*}$  (Haddon et McLafferty 1968; Yamaoka et al. 1969; Mc Lafferty et al. 1973). C'est une étape très rapide ( $10^{-13}$  à  $10^{-15}$  s).

L'étape n°2 constitue la décomposition unimoléculaire de l'ion ainsi activé.

Sur le plan énergétique, le diagramme de la figure 19 illustre de façon simplifiée les relations entre l'énergie du système et la coordonnée de la réaction dans une étape de dissociation activée par collision.

L'énergie interne moyenne de l'ion désorbé par ionisation FAB est représentée par  $E_{init}$ . Lors de la collision une fraction de l'énergie de translation est convertie en énergie interne et cette perte non-élastique d'énergie cinétique est représentée par Q. La différence entre  $E_0$ , énergie d'activation pour que la rupture ait lieu, et Q correspond à  $E^*$  représentant l'excès d'énergie ou déplacement cinétique (kinetic shift) nécessaire à la formation et à la détection des ions. Celui-ci est dépendant des conditions instrumentales. Après rupture, une fraction

de la somme  $E^* + E_0^r$  (énergie d'activation inverse) est convertie en énergie translationnelle.

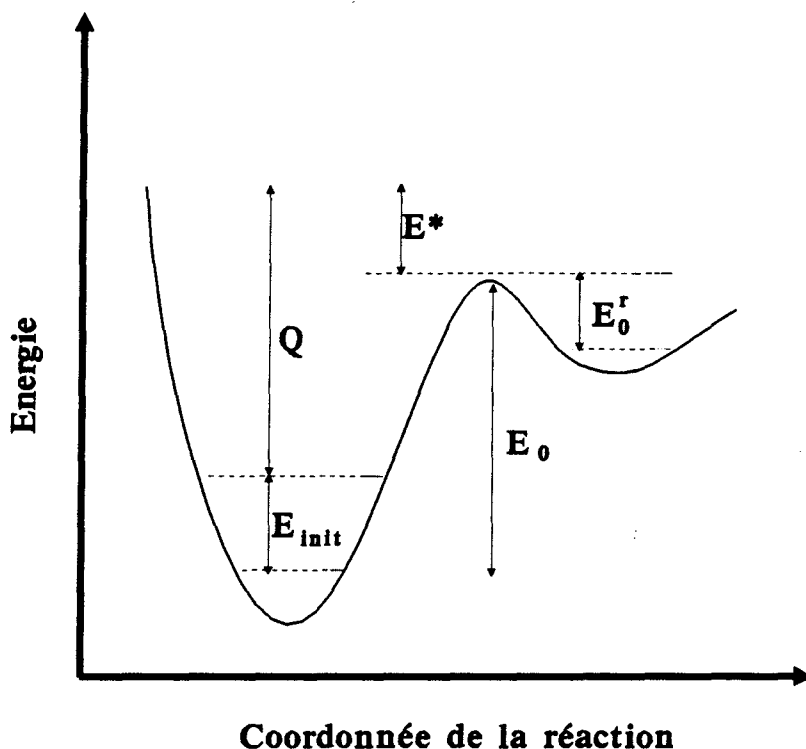


Figure 19 : Transferts d'énergie associés au processus de dissociation activée par collision.

Le rendement de collision dépend alors de la probabilité de décomposition unimoléculaire de l'ion précurseur après collision selon la théorie du quasi-équilibre (Rosenstock et al. 1952; Todd et al. 1983a; Levsen 1978). Cette théorie postule que les décompositions unimoléculaires sont dépendantes de la distribution statistique de l'énergie interne de l'ion parmi tous les degrés de liberté (modes de vibration). En d'autres termes, un mode de vibration ne pourra se rompre que s'il a acquis suffisamment d'énergie. Sachant qu'un ion à N

atomes possède  $3N-6$  modes de vibration, il est aisément concevable que le rendement de collision décroît de façon inversement proportionnelle avec la masse de l'ion.

Ainsi, dans une collision entre un ion possédant une certaine énergie cinétique et une molécule de gaz cible, la conservation de l'énergie et de la quantité de mouvement implique qu'une très faible fraction de l'énergie translationnelle est convertie en énergie interne ( $E_{com}$ ). Cette fraction d'énergie est donnée par l'équation suivante:

$$(1) \quad E_{com} = E_{lab} \cdot m_t \left( \frac{1}{m_i + m_t} \right)$$

- $E_{lab}$  est l'énergie cinétique de l'ion dans la référence du Laboratoire
- $m_t$  est la masse du gaz cible
- $m_i$  est la masse de l'ion

Il en découle par conséquent qu'une augmentation de l'énergie cinétique de l'ion ou de la masse du gaz accroît l'énergie disponible à la conversion. Au contraire, cette énergie décroît en fonction de  $1/m_i$ .

Afin d'améliorer le rendement de dissociation ou l'intensité des fragments qui résultent de clivages nécessitant une haute énergie d'activation, il est possible de multiplier le nombre de chocs ion-molécule de gaz en augmentant la pression du gaz dans la cellule de collision (Holmes 1985).



I-2 CAD à haute énergie

(Todd et Mc Lafferty 1983b; Hayes et Gross 1990)

La configuration instrumentale la plus favorable aux études de CAD à haute énergie ( $E_c > 1\text{keV}$ ) est celle qui offre la meilleure résolution à la fois des ions précurseurs et des ions produits, à savoir EBEB ou BEEB (Fig. 20). Dans la pratique, l'ion précurseur est sélectionné dans le premier analyseur électro-magnétique du spectromètre en appliquant des valeurs adéquates de  $E_1$  et  $B_1$ , puis dissocié dans une cellule de collision. Les fragments sont alors analysés dans le second analyseur électro-magnétique de l'appareil par balayage simultané de  $E_2$  et  $B_2$  (Boyd 1987).

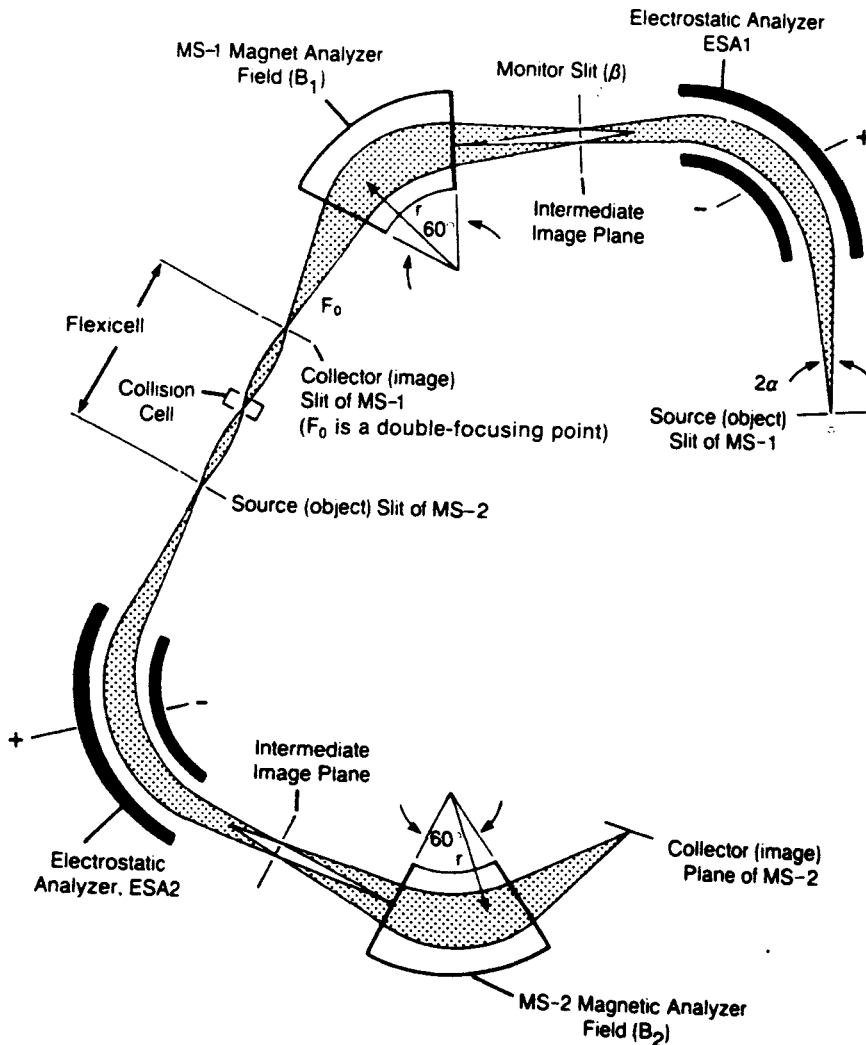


Figure 20 : Diagramme du spectromètre de masse Kratos Concept II HH.

Aux énergies de translation  $>1\text{keV}$  et avec des gaz cibles de petite taille, tel l'hélium, l'excitation de l'ion précurseur se fait selon **Yamaoka et al. (1969)**, principalement par transition électronique verticale (principe de Franck-Condon). L'énergie acquise est ensuite redistribuée sous forme d'énergie vibrationnelle. Il en résulte une rupture des liaisons. Un support à cette hypothèse est apporté par la similitude entre les intensités relatives des fragments obtenus en impact électronique à  $70\text{eV}$  et ceux produits par CAD à  $8\text{-}10\text{keV}$  d'énergie de collision (**Mc Lafferty et al. 1973; Levsen 1974**).

Il faut considérer qu'en régime de collision à haute énergie une faible fraction de l'énergie disponible est effectivement convertie en énergie interne, soit environ 1 à 3 eV (**Kim et Mc Lafferty 1978; Kenttämää et Cooks 1985; Wysocki et al. 1987**).

Comme l'attestent la plupart des travaux, l'hélium est le gaz cible le plus communément employé dans les études de CAD à haute énergie. En effet, celui-ci minimise les réactions compétitives de la dissociation à savoir la neutralisation de l'ion précurseur et la déviation des ions produits au delà de l'angle permis pour la focalisation des ions dans le second secteur du spectromètre (**Hemberger et al. 1981; Laramee et al. 1981**). Cependant **Gross et al. (1986)** ont montré qu'en raison de la faible efficacité de l'hélium au transfert d'énergie interne, l'utilisation de gaz plus lourds comme l'argon ou le xénon permet d'augmenter considérablement le rendement de collision (Tableau 1). L'effet est d'autant plus prononcé que la masse de l'ion est importante.

Compound	He (%)	Xe (%)
PEG 31 $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 1405$	8.8	12.6
Substance P free acid $[\text{M} + \text{H}]^+ = 1349$	4.9	7.4
PEG 45 $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 2021$	2.8	42.0

**Tableau 1** : Rendement de dissociation en fonction du gaz de collision, selon **Gross et al. (1986)**.

**I-3 CAD à basse énergie  
(Dawson et Douglas 1983)**

Les études de collision à basse énergie ( $1 < \text{keV}$ ) sont le plus souvent menées sur des appareils de type quadripolaire ( $Q_1qQ_2$ ) ou hybrides (EBqQ) (Yost et Boyd 1990). L'ion précurseur est sélectionné soit par un quadripole, soit par un analyseur à double focalisation (EB), puis dissocié par collision avec un gaz dans un quadripole auquel est appliqué un champ de radiofréquence. Les fragments sont analysés alors dans un troisième quadripole. Dans cette configuration, les rendements de collision sont extrêmement élevés, d'une part en raison des fortes propriétés de focalisation du champ de radiofréquence et, d'autre part, à cause de la longueur de la chambre de collision qui permet des collisions multiples.

Le temps d'interaction entre un ion de masse 200 à une énergie de translation de 30eV est d'environ  $10^{-13}$  s, donc de l'ordre de la période de vibration des liaisons. C'est pourquoi le mode d'excitation de l'ion lors de la collision à basse énergie est de nature vibrationnelle (Schwartz et al. 1952; Douglas 1982).

## II- Application de la CAD aux ions $[M+Cat]^+$ d'oligosaccharides perméthylés.

### *II-1 Publication n°1*

De manière surprenante si l'on se place d'un point de vue sensibilité, nous n'avons pas pu trouver à travers la littérature le moindre travail qui fasse référence à l'utilisation de précurseurs  $[M+Cat]^+$  d'oligosaccharides perméthylés pour l'obtention de spectres CAD.

Cette première publication restitue les résultats préliminaires que nous avons acquis par le biais de cette méthode et met plus particulièrement l'accent sur la possibilité d'établir les séquences glycosidiques ainsi que les positions de certaines liaisons glycosidiques, telles que les liaisons 1- $\rightarrow$ 3, 1- $\rightarrow$ 4 et NeuAc2- $\rightarrow$ 3 ou NeuAc2- $\rightarrow$ 6.

*Carbohydrate Research*, 221 (1991) 209-217  
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

## Collisional-activation tandem mass spectrometry of sodium adduct ions of methylated oligosaccharides: sequence analysis and discrimination between $\alpha$ -NeuAc-(2 $\rightarrow$ 3) and $\alpha$ -NeuAc-(2 $\rightarrow$ 6) linkages

Jérôme Lemoine, Gérard Strecker, Yves Leroy, Bernard Fournet\*

*Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. No. 111), 59655 Villeneuve d'Ascq (France)*

and Guy Ricart

*Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq (France)*

(Received May 4th, 1991; accepted for publication July 17th, 1991)

### ABSTRACT

Collision-activated dissociation (c.a.d.) of sodium adducts of molecular ion species have been carried out on methylated  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (1),  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (2),  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (3),  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (4), and  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcpNAc (5). The numerous daughter ions reflect the sequences, clearly differentiate (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 4) linkages, and discriminate between  $\alpha$ -NeuAc-(2 $\rightarrow$ 3) and  $\alpha$ -NeuAc-(2 $\rightarrow$ 6) linkages.

### INTRODUCTION

Although determination of the amino acid sequences of proteins is relatively easy to achieve by the Edman procedure and, more recently, by tandem mass spectrometry (m.s.-m.s.), determination of the structure of complex oligosaccharides remains a challenge. N.m.r. and mass spectrometry are the most common and convenient techniques for the determination of the anomeric configuration of the sugar moieties, the position of the linkages and the sequences and branching patterns. With the latter technique, the results are based on methylation analysis by g.l.c.-m.s.<sup>1</sup>, f.a.b.-m.s.<sup>2,3</sup>, and, more recently, m.s.-m.s.<sup>4,6</sup>. F.a.b.-m.s.-m.s. can be helpful not only for the sequence determination of oligosaccharides but also for linkage analysis of the deprotonated molecular ions of disaccharides<sup>7</sup> and of the alkali metal adducts of the molecular

\* To whom correspondence should be addressed.

ions of larger structures<sup>8-9</sup>. For instance, carbon-carbon ring cleavages of  $(M + 2Li-H)^+$  or  $(M + Na)^+$  ions are more extensive than for  $(M + H)^+$  ions and consequently yield more information on structure<sup>10,11</sup>.

Methylation also results in increased sensitivity in f.a.b.-m.s. and l.s.i.-m.s. by enhancing the hydrophobicity and surface activity. Moreover, methylated derivatives undergo specific fragmentations from the non-reducing termini at HexNAc linkages<sup>12</sup>. Likewise, acetylated derivatives give c.a.d.-mass spectra from  $(M + H)^+$  ions which allow (1→3) and (1→4) linkages to be differentiated<sup>13</sup>.

Since parent signals may be enhanced greatly by adding an alkali salt to the matrix, we have investigated the c.a.d.-mass spectra of several cationised and methylated oligosaccharides.

#### EXPERIMENTAL

A high-resolution Kratos Concept II HH ( $E_1, B_1, E_2, B_2$ ) tandem mass spectrometer was used at an accelerating voltage of 8 kV. The f.a.b. gun was operated at 7 kV with xenon. Each positive-ion mass spectrum was the sum of ten scans. Precursor ions were fragmented at a collision energy of 6 kV with He at a pressure sufficient to reduce the parent signal by 75%. Daughter ions were analysed by linked scanning at a constant B/E ratio, using a DS90 (DG DG/30) data system. A 1:1000 resolution was selected in both MS1 and MS2.

$\beta$ -D-Galp-(1→4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp (1),  $\beta$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp (2),  $\alpha$ -D-NeuAc-(2→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp (3), and  $\alpha$ -D-NeuAc-(2→6)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp (4) were isolated from human milk<sup>15</sup>, and  $\alpha$ -D-NeuAc-(2→6)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→2)- $\alpha$ -D-Manp-(1→3)- $\beta$ -D-Manp-(1→4)-D-GlcpNAc (5) was prepared from the urine of patients suffering from sialosidosis<sup>16</sup>.

The oligosaccharides were methylated according to Ciucanu and Kerek<sup>14</sup>, and a solution of each product (5  $\mu$ g) in methanol was dried on the probe tip and then mixed with NaI-saturated thioglycerol (2  $\mu$ L).

#### RESULTS AND DISCUSSION

Only cationised fragments were present in the c.a.d.-mass spectra of the  $(M + Na)^+$  ions of the methylated 1-5. This finding contrasts with the results<sup>11</sup> for natriated native oligosaccharides, the c.a.d.-mass spectra of which still contain oxonium-type fragments. These observations suggest that the alkali metal strongly interacts with the polar functional groups to give a stable adduct. For instance, the  $^{1,5}X_i$ ,  $Y_i$ ,  $B_i$ , and  $C_i$  ions may reflect local decomposition induced by the interaction of  $Na^+$  and the heterocyclic and glycosidic oxygens or the acetamido group of GlcNAc. However, "charge-remote fragmentation" (*i.e.*, cleavage of a glycosidic bond other than at the site of  $Na^+$  attachment) is a more likely explanation for the  $Z_i$  cleavage.

C.A.D.-M.S. OF CATIONISED METHYLATED OLIGOSACCHARIDES

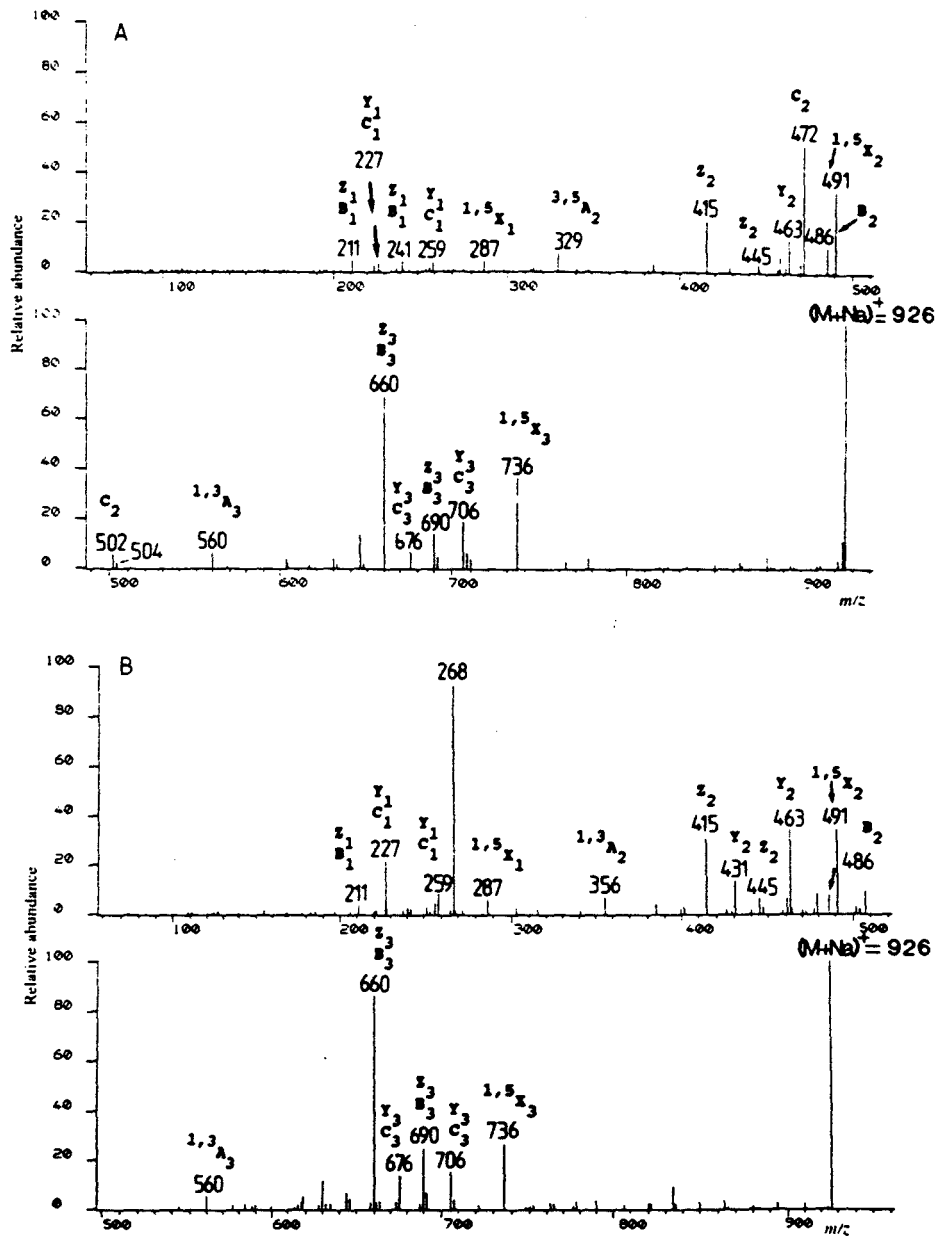


Fig. 1. C.a.d.-mass spectra (6 kV) of the  $(M + Na)^+$  ion of A, methylated  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (1); and B, methylated  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (2).

The major ions that reflect the sequences of 1-5 are listed in Table I according to the nomenclature of Domon and Costello<sup>5</sup>. Double designations are used for the ions produced by isomeric fragmentations from the reducing and non-reducing ends of the oligosaccharides. *e.g.*, the ion at  $m/z$  211 (Fig. 1A) is attributed to both  $Z_1$  and  $B_1$  cleavages. This double designation is necessary because c.a.d.-m.s. of Hex-Hex-Hex-NAc sequences produces  $Z_1$  and  $B_1$  ions with a mass shift of 41 (difference in mass between Hex and HexNAc).

Fig. 1 gives the  $(M + Na)^+$  c.a.d.-mass spectra of the methylated isomeric tetrasaccharides 1 and 2. Their sequences may be deduced, for instance, from the  $^{15}X_i$

TABLE I

Major ions obtained on f.a.b.-m.s.-m.s. of  $(M + Na)^+$  ions from the methylated oligosaccharides 1-5

	1	2	3	4	5
Mol. wt. of $(M + Na)^+$	926	926	1287	1287	1532
Daughter ions					
$B_i + Na - H$	241				
or $+H$	486 690	486 690	604	604	
$B_i + Na + H - CH_3OH$	211 660	211 660	572 1021	572 1021	572 817 1225
$C_i + Na + H - CH_3OH$	227 472 676	227 676	833	588 833	588 1037 833 1241
$C_i + Na - H$	259	259	618	618	618
or $+H$	502 706	706	1067	1067	1271
$^{15}X_i + Na$	287 491 736	287 491 736	491 736	491 736	532 736 981
$Y_i + Na + H$	259	259	463	463	
or $-H$	463 706	463 706	910	910	708
$Y_i + Na + H - CH_3OH$	227 676	227 431 676			921
$Z_i + Na - H$	241 445 690	445 690	690	690	
$Z_i + Na - OCH_3$	211 415 660	211 415 660	415 660 864	415 660	660 905



## C.A.D.-M.S. OF CATIONISED METHYLATED OLIGOSACCHARIDES

series of ions ( $m/z$  287, 491, and 736) that correspond to the reducing-end sequence HexNAc-Hex-Hex, and from the B<sub>1</sub> series of ions ( $m/z$  241 or 211, 486, and 690) that correspond to Hex-HexNAc-Hex.

Methylated isomers **1** and **2** can be discriminated by comparison of the C<sub>2</sub> fragments. For **1** (Fig. 1A), the daughter ion at  $m/z$  472 corresponds to the elimination of methanol from a 4-substituted HexNAc and, for **2** (Fig. 1B), the fragment at  $m/z$  268 is due to the elimination of Hex (loss of 236 m.u. from the C<sub>2</sub> ion at  $m/z$  504) characteristic of a 3-substituted HexNAc. Similar results have been reported<sup>2</sup> for classical f.a.b.-m.s. of methylated oligosaccharides. However, in contrast to f.a.b.-mass spectra, where ions from both cleavage of linkages and loss of methanol are present, the present results indicate that the C<sub>2</sub> ion at  $m/z$  504 is either weak or absent. This result may be explained by a decomposition of this C<sub>2</sub> ion simultaneously after its formation in the collision cell by loss of a neutral fragment (Hex or MeOH).

Other specific fragmentations were observed. Thus, for **2**, the <sup>1,3</sup>A<sub>2</sub> ion at  $m/z$  356 and the <sup>1,3</sup>A<sub>3</sub> ion at  $m/z$  560 are attributed to the sequences Hex-(1→3)-HexNAc and Hex-(1→3)-HexNAc-(1→3)-Hex, respectively. For **1**, the Hex-(1→4)-HexNAc sequence produces an <sup>3,5</sup>A<sub>2</sub> ion at  $m/z$  329 and the expected <sup>1,3</sup>A<sub>3</sub> fragment is also present.

The specific elimination of the 3-linked substituent also occurs with **3** (Fig. 3A): loss of the 3-linked sequence NeuAc-Hex from the HexNAc produces the ion at  $m/z$  268.

The results also allow the α-NeuAc-(2→3) linkage in **3** (Figs. 2A and 3A) and the α-NeuAc-(2→6) linkage in **4** (Figs. 2B and 3B) to be discriminated on the basis of their (M + Na)<sup>+</sup> c.a.d.-mass spectra. Except for an intense <sup>1,5</sup>X<sub>3</sub> ion at  $m/z$  736, ions containing the non-reducing end of the molecule preponderate for the α-(2→6) linkage (C<sub>1</sub> ions at  $m/z$  588, 618, 833, 1061; B<sub>4</sub> ion at  $m/z$  1021). In contrast, reducing-end fragments preponderate for the α-(2→3) linkage (Z<sub>1</sub> at  $m/z$  660, 690, and 864; Y<sub>1</sub> fragments at  $m/z$  463 and 910).

These observations suggest that the α-NeuAc-(2→6)-Hex sequence further stabilises the sodium adduct and induces a charge-remote fragmentation. This process, which has been described also for lithiated fatty acids<sup>17</sup>, may reflect enhanced chelation caused by folding of the NeuAc-Hex moiety. In contrast, α-(2→3) linkages do not enhance the chelation and, in fact, the alkali metal interacts at the α-(2→3) linkage and promotes the formation of the C<sub>1</sub> ion at  $m/z$  356.

The same fragmentation pattern was seen in the c.a.d.-mass spectra of methylated **5** (Fig. 4), where the NeuAc residue is α-(2→6)-linked to Hex (C<sub>1</sub> daughter ions at  $m/z$  588, 618, 833, 1037, 1241, and 1271; lack of a C<sub>1</sub> ion at  $m/z$  356, and no intense Z<sub>1</sub> cleavage ions at  $m/z$  1109 and 1141). The sequence of the hexasaccharide **5** is deduced from C<sub>1</sub> ions ( $m/z$  588, 833, 1037, and 1241), which correspond to the sequence NeuAc-Hex-HexNAc-Hex-Hex, and the <sup>1,5</sup>X<sub>1</sub> ions ( $m/z$  532, 736, and 981), which correspond to the reducing-end sequence HexNAc-Hex-Hex-HexNAc.

Thus, c.a.d.-mass spectrometry of sodium adducts of methylated oligosaccharides is an alternative to that of (M + H)<sup>+</sup> ions when additional sensitivity is necessary. The fragmentation mechanisms proposed are hypothetical at present and clarification

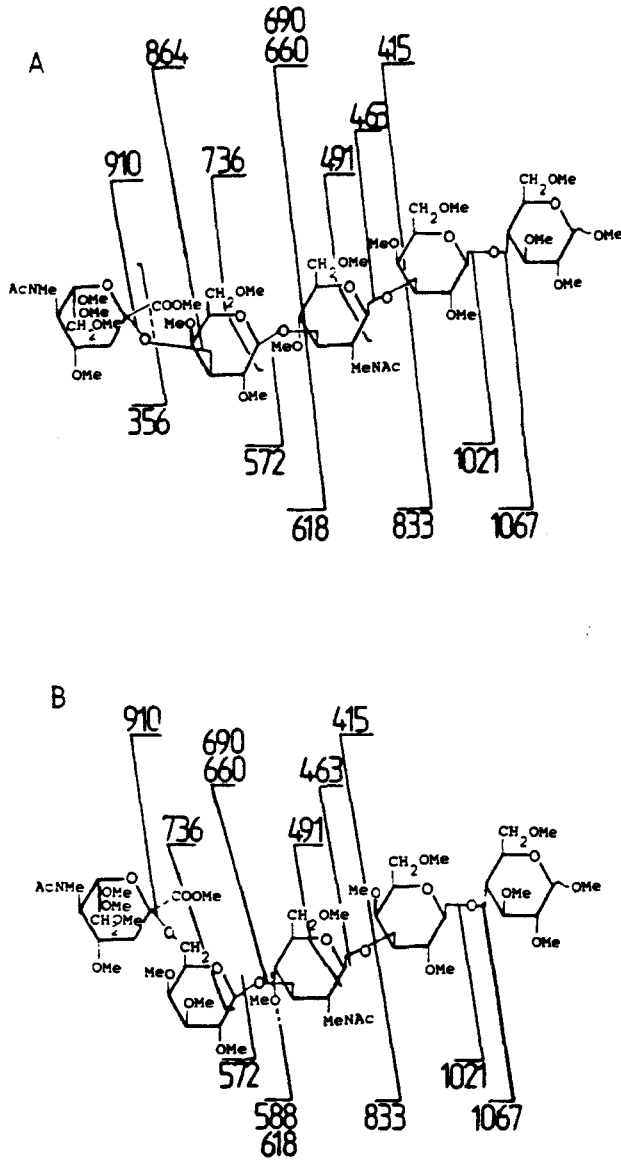


Fig. 2. Fragmentation pattern of methylated  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (3) (A) and methylated  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (4) (B) obtained by c.a.d.-m.s. (6 kV) of the (M + Na)<sup>+</sup> ions.

C.A.D.-M.S. OF CATIONISED METHYLATED OLIGOSACCHARIDES

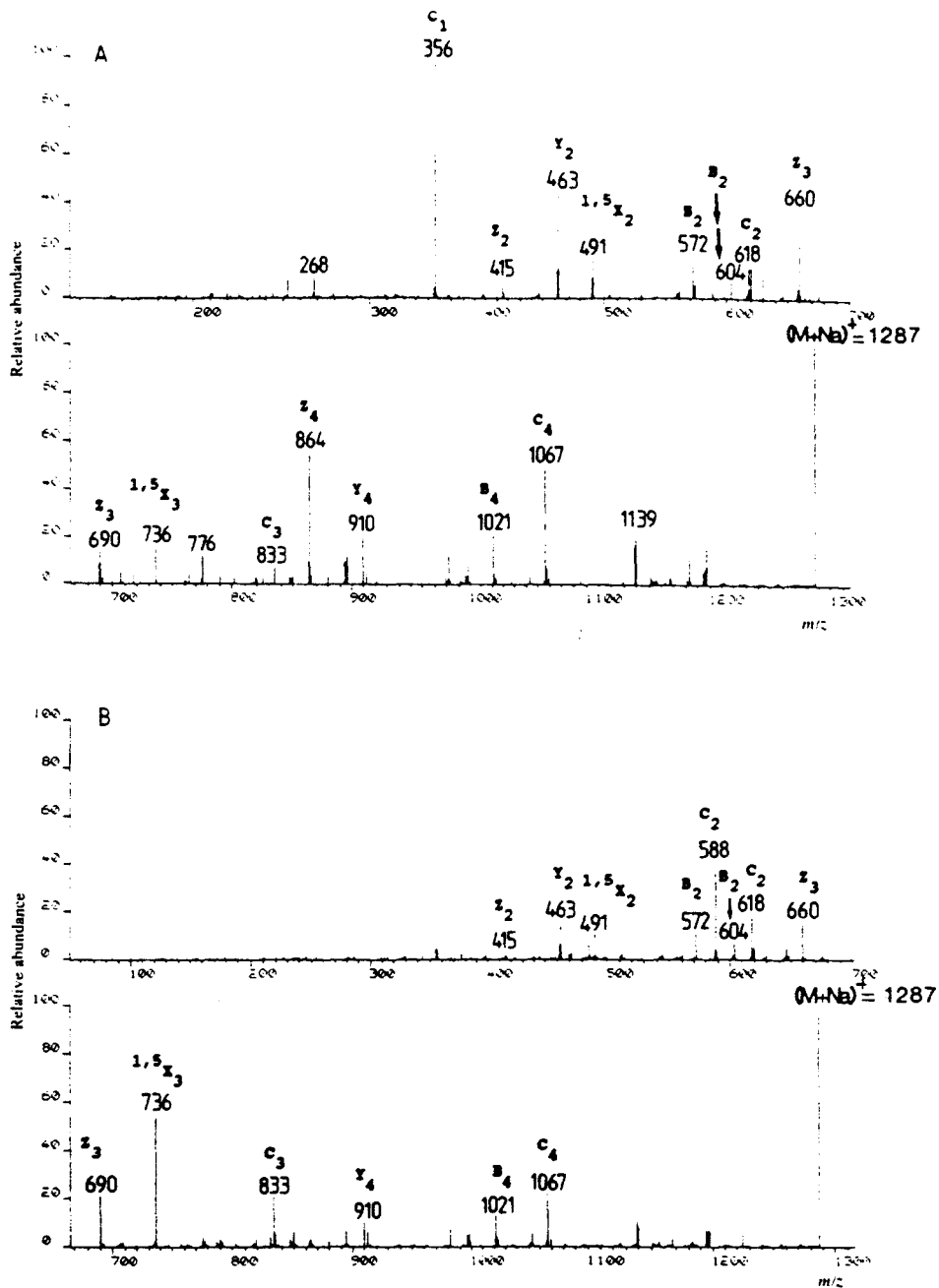


Fig. 3. C.a.d.-mass spectra (6 kV) of the  $(M + Na)^+$  ion of A, methylated  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (3); and B, methylated  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (4).

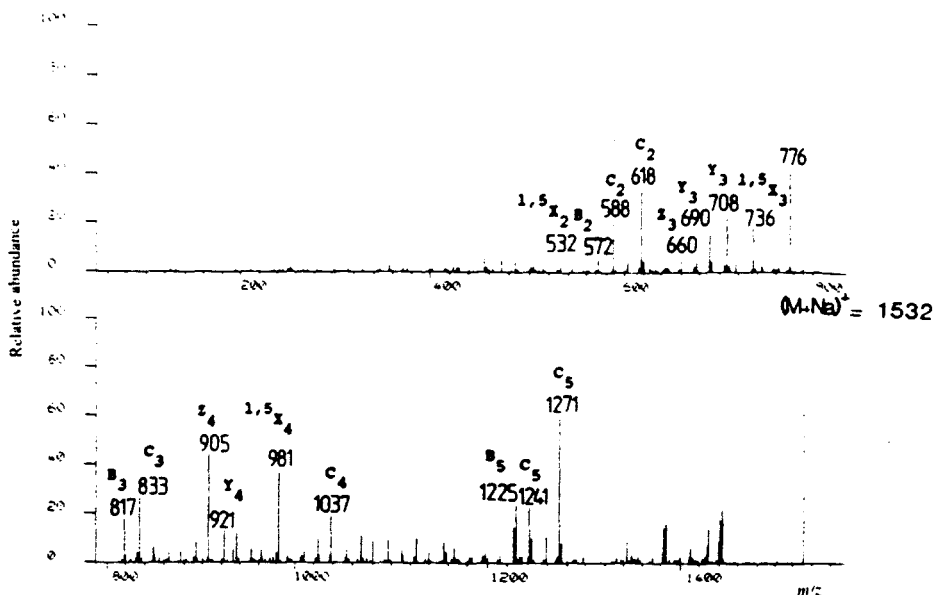
J. LEMOINE *et al.*

Fig. 4. C.a.d.-mass spectra (6 kV) of the  $(M + Na)^+$  ion of methylated  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcpNAc (5).

will require further studies in order to determine the scope and limitations for the sequencing of oligosaccharides.

#### ACKNOWLEDGMENTS

These investigations were supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche No. 111; Directeur Professeur A. Verbert) and by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.

#### REFERENCES

- 1 B. Lindberg and J. Lönngrén, *Methods Enzymol.*, 50 (1978) 3-33.
- 2 H. Egge and J. Peter-Katalinic, *Mass Spectrom. Rev.*, 6 (1987) 331-393.
- 3 A. Dell and G. W. Taylor, *Mass Spectrom. Rev.*, 3 (1984) 357-394.
- 4 S. A. Carr, V. N. Reinhold, B. N. Green, and J. R. Hoss, *Biomed. Mass Spectrom.*, 12 (1985) 288-295.
- 5 B. Domon and C. E. Costello, *Glycoconj. J.*, 5 (1988) 397-409.
- 6 B. L. Gillece-Castro and A. L. Burlingame, *Proc. Conf. Mass Spectrom. Allied Topics, 35th. Miami Beach, 1989*, pp. 1190-1191.
- 7 D. Garozzo, M. Giuffrida, G. Impallomeni, A. Ballistreri, and G. Montaudo, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 279-286.
- 8 B. Domon, D. R. Müller, and W. J. Richter, *Org. Mass Spectrom.*, 24 (1989) 357-359.
- 9 D. R. Müller, B. Domon, and W. J. Richter, *Adv. Mass Spectrom.*, 11B (1989) 1309-1325.
- 10 Z. Zhou, S. Ogden, and J. A. Leary, *J. Org. Chem.*, 55 (1990) 5444-5446.
- 11 R. Orlando, C. A. Bush, and C. Fenselau, *Biomed. Mass Spectrom.*, 19 (1990) 747-754.
- 12 A. Dell, *Methods Enzymol.*, 193 (1990) 647-660.

C.A.D.-M.S. OF CATIONISED METHYLATED OLIGOSACCHARIDES

- 13 B. Domon, D. R. Müller, and W. J. Richter. *Biomed. Mass Spectrom.*, 19 (1990) 390-392.
- 14 I. Ciucanu and F. Kerek. *Carbohydr. Res.*, 131 (1984) 209-217.
- 15 A. Kobata, K. Yamashita, and Y. Tachibana. *Methods Enzymol.*, 50 (1978) 216-220.
- 16 G. Strecker, T. Hondi-Assah, B. Fournet, G. Spik, J. Montreuil, P. Maroteaux, P. Durand, and J. P. Farnaux. *Biochim. Biophys. Acta*, 444 (1976) 349-358.
- 17 J. Adams and M. L. Gross. *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 6915-6921.

A la vue de l'ensemble de ces spectres de collision, une certaine complexité se dégage des fragmentations, en particulier pour les liaisons glycosidiques, puisque 16 types d'ions sont à ce niveau potentiellement observables. Aussi avons nous tenté d'éclaircir la structure de ces fragments et de proposer des mécanismes de rupture pouvant aboutir à leur formation, sur la base d'une comparaison des spectres de CAD de l'oligosaccharide  $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$  perméthylé (Fig. 21a) et perdeutérométhylé (Fig. 21b).

Nous pouvons tout d'abord remarquer une série de pics en deça de l'ion moléculaire ( $m/z$  : 722). Ces pics peuvent être attribués :

- pour l'ion à  $m/z$  690 à une perte de  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $m/z$  720 : -  $\text{CD}_3\text{OH}$ )
- $m/z$  676 : à une perte de  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  ( $m/z$  703 : -  $\text{C}_2\text{D}_6\text{O}$ )
- $m/z$  660 : à une perte de  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$  ( $m/z$  687 : -  $\text{C}_2\text{D}_6\text{O}_2$ )
- $m/z$  646 : à une perte de  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$  ( $m/z$  673 : -  $\text{C}_3\text{H}_2\text{D}_6\text{O}_2$ )
- $m/z$  619 : à une perte de  $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$  ( $m/z$  646 : -  $\text{C}_4\text{H}_3\text{D}_6\text{O}_2\text{N}$ )

Il est ensuite raisonnable d'extrapoler ces diverses éliminations aux clivages C-O de la liaison glycosidique. Dans le cas de simple rupture Y et C (sans formation d'époxyde ou de lactone), l'hydrogène transféré ne provient pas des substituants alkylés, mais de carbones appartenant au cycle glycosidique : la différence entre les ions Y à  $m/z$  463 (spectre 21a) et  $m/z$  484 (spectre 21b) est en effet de 21, soit  $3 \times 7$ , différence de masse entre 7 groupements  $\text{CH}_3$  et  $\text{CD}_3$ .

Nous avons rassemblé dans la figure 22 nos propositions quant aux mécanismes de dissociation des liaisons glycosidiques. Il nous semble difficile , eu égard aux nombreux types de fragments observés, d'envisager un processus où le cation induise la dissociation, par exemple par effet inducteur. Par contre, une fragmentation distante de la charge semble beaucoup plus probante puisqu'en fonction du site de cationisation, chacune des voies peut potentiellement engendrer deux

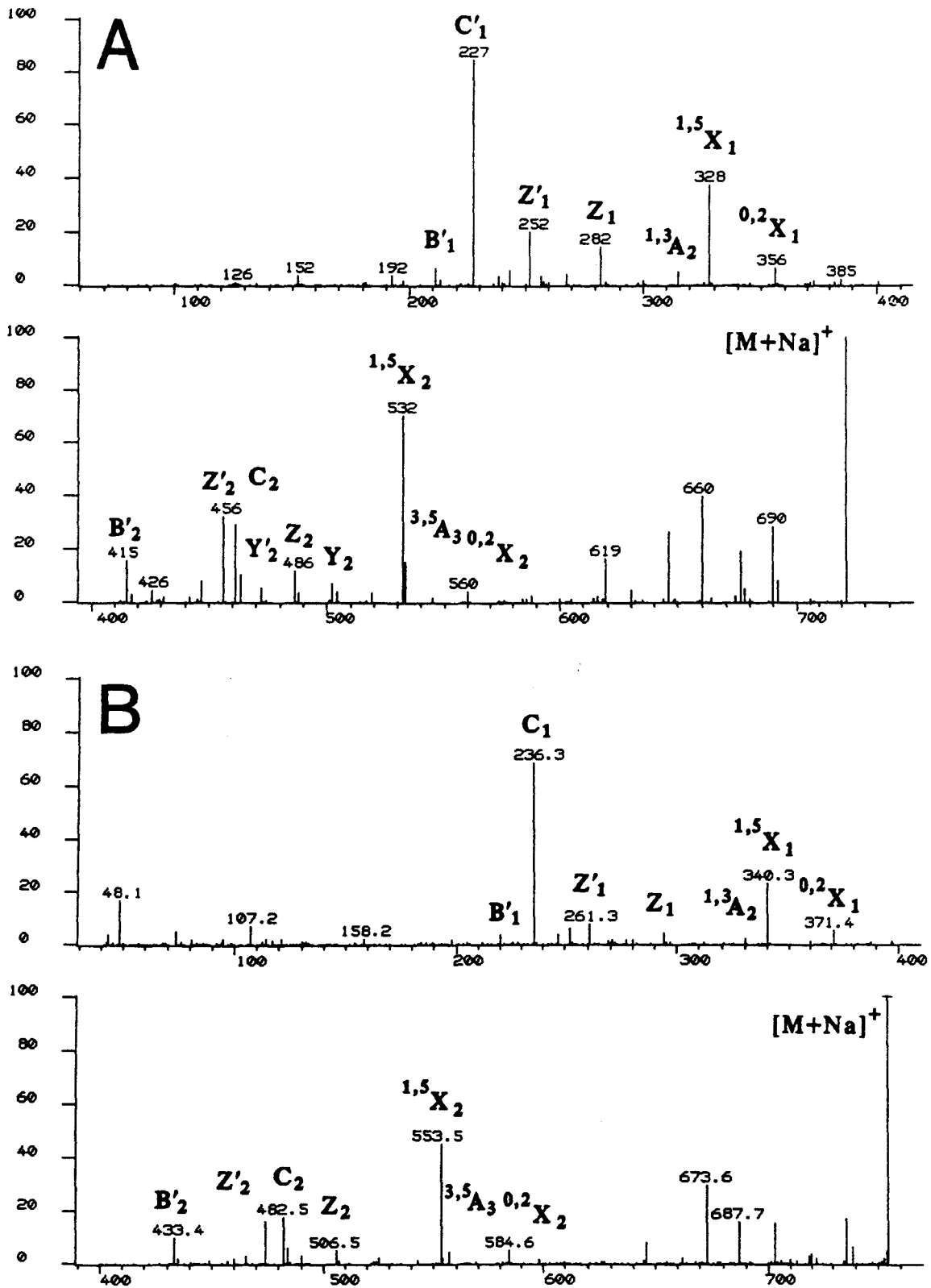


Figure 21 : Spectres de CAD des ions précurseurs  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  722 et  $m/z$  755 de l'oligosaccharide Man(1-3)Man(B1-4)GlcNAc perméthylé (A) et perdeutérométhylé (B).

ions différents, l'un portant l'extrémité réductrice, l'autre l'extrémité terminale non-réductrice.

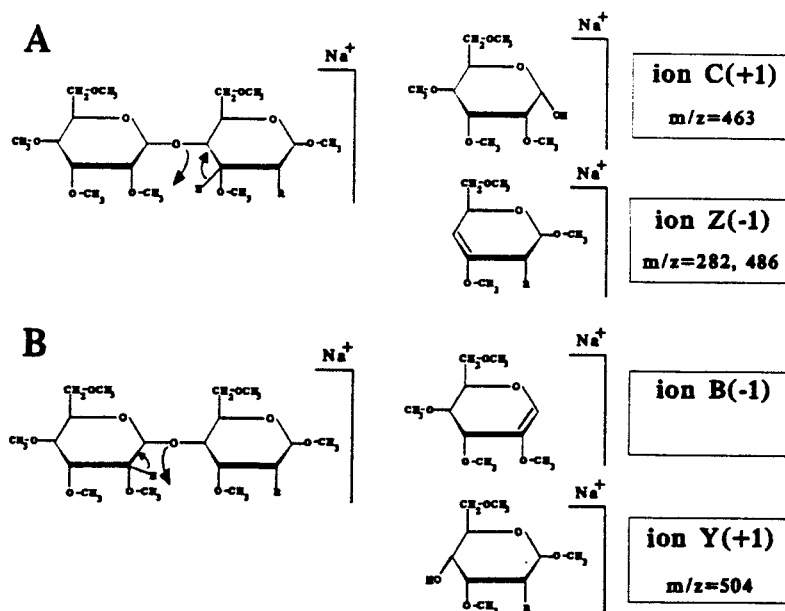
Les voies A et B résultent du transfert d'un proton en  $\alpha$  de la liaison C-O rompue sur l'oxygène de la liaison glycosidique, conduisant à un hexose et un anhydrohexose insaturé.

Les voies C et D aboutissent à la formation d'époxyde, par élimination d'un groupement méthoxyle, et d'anhydrohexose, à partir de l'élimination d'un proton en  $\alpha$  de la liaison C-O clivée.

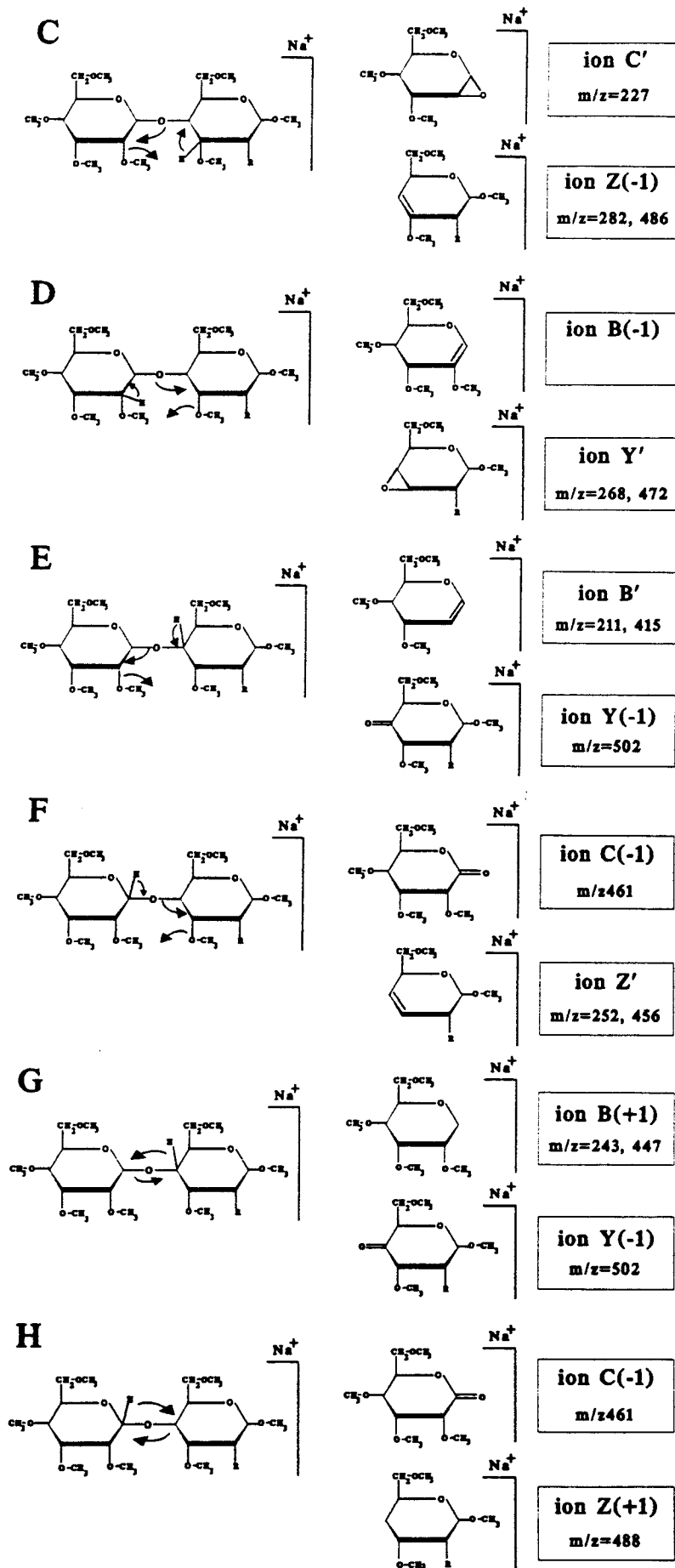
Pour les voies E et F, l'élimination de groupement méthoxyle en  $\alpha$  de la liaison C-O rompue entraîne la formation de cétone et de lactone.

Enfin, concernant les voies G et H, le transfert d'un atome d'hydrogène sur le carbone anomérique ou sur le carbone du point de branchement conduit à la formation de lactone, de cétone, ainsi que d'anhydrosucre insaturé.

Par convention, les transferts de protons ou d'hydrogène sont indiqués entre parenthèses (+1) alors que les éliminations de protons sont précisées par l'annotation (-1). Ces deux distinctions ne sont cependant pas faites pour les spectres présentés dans ce mémoire dans un souci de simplification de nomenclature.







**Figure 22** : Propositions de mécanismes de dissociation des liaisons glycosidiques par CAD des ions  $[M+Na]^+$  d'oligosaccharides perméthylés.

*II-2 Publication n°2*

Le potentiel analytique de cette méthode ayant été entrevu à travers certains ions issus de ruptures dans le cycle glycosidique, nous avons tenté d'en élargir l'application à l'ensemble des isoméries de liaison pouvant coexister dans un oligosaccharide.

D'autre part, sachant que les ions présents sur les spectres CAD sont tous cationisés, il est légitime de penser, comme nous l'avons évoqué précédemment, que la charge n'intervient pas directement dans les mécanismes de rupture et donc que l'abondance de tels ions doit être influencée par l'énergie de collision.

Les résultats présentés ci-après dans la publication n°2 illustrent ces deux points.

# Collision-Induced Dissociation of Alkali Metal Cationized and Permethylated Oligosaccharides: Influence of the Collision Energy and of the Collision Gas for the Assignment of Linkage Position

Jérôme Lemoine and Bernard Fournet

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

Dominique Despeyroux and Keith R. Jennings

Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry, England

Raoul Rosenberg and Edmond de Hoffman

Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Université Catholique, Louvain La Neuve, Belgium

---

Tandem mass spectrometry has been used to study the collision-induced decomposition of  $[M + Na]^+$  ions of permethylated oligosaccharides. It is shown that many linkage positions in one compound may be determined by the presence or absence, in a single spectrum, of specific fragment ions that arise from the cleavage of two ring bonds and that the yield of such ions depends strongly on the collision energy and nature of the collision gas. In contrast to the behavior of monolithiated native oligosaccharides, the collision-induced decomposition of the sodiated and permethylated oligosaccharide samples at low energy leads to preferential cleavage of glycosidic linkages. At high collision energies, the fragment ions formed by cleavage of more than one bond are greatly enhanced, especially when helium is replaced by argon as the collision gas. Furthermore, argon is the more efficient collision gas in inducing fragmentation of the precursor ions. As an example of the application of this method, the discrimination between the 1  $\rightarrow$  3 and 1  $\rightarrow$  6-linked mannose residues in the common core of *N*-glycans is described. (*J Am Soc Mass Spectrom* 1993, 4, 000-000)

---

A decisive advance was made for the structural elucidation of oligosaccharides with the simultaneous developments of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) interfacing [1] and Hakomori's methylation procedure [2]. Indeed, the combination of these two techniques enabled the identification of linkage positions by electron ionization mass spectrometry (EIMS) of partially methylated and acetylated alditols [3]. At the same time, the fragmentation schemes for derivatized oligosaccharides were intensively studied by Biemann et al. [4] and by Chizhov and Kochetkov [5, 6]; this

work has been extensively reviewed by Lonngren and Svensson [7]. Numerous recent studies have also demonstrated the interest in the use of fast-atom bombardment (FAB) [8] or liquid secondary ionization mass spectrometry (LSIMS) [9] ionization combined or not with tandem mass spectrometry (MS/MS) in the determination of the sequences and branching patterns of native or derivatized oligosaccharides [10-17]. Furthermore, several different types of precursor ions such as  $[M + H]^+$  [18-24],  $[M - H]^-$  [25],  $[M + Li]^+$  [19, 26], and  $[M + 2Li - H]^+$  [27], as well as major fragment ions occurring in the FAB source [18, 25], have been used to demonstrate that FAB-collision-induced dissociation (CID) MS/MS may also be used to discriminate between linkage positions in oligosaccharides. Most of the latter results were obtained from

---

Address reprint requests to Bernard Fournet, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

MS/MS experiments on disaccharides or oligosaccharides containing up to four glucose residues. The proposed mechanism for the production of the ions giving rise to the diagnostic peaks involves the breaking of two ring bonds and requires the opening of the reducing linkage as the first step. Retro-aldol or retro-ene isomerizations then promote the loss of neutral fragments containing two, three, or four carbon atoms from the reducing sugar, depending on the linkage. In infrared laser desorption mass spectrometry, the same mechanism is thought to be responsible for the observed fragmentation of saccharides by the thermal opening of the reducing sugar during the irradiating pulses [28].

If the  $[M + H]^+$  ions of oligosaccharides, especially those of higher relative molecular mass ( $M_r$ ), are enhanced by derivatization, the CID of such ions leads mainly to fragmentation at the glycosidic bond without significant cleavage of two ring bonds [10, 13]; however, information on the linkage positions may be obtained by CID of peracetylated disaccharides and pentasaccharides [23, 24] or permethylated trisaccharides [18-20], and the well-described specific elimination of the three-linked substituent ( $OCH_3$  or sugar) on *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) is also of great interest [11, 19, 23]. The spectra obtained by CID of cationized and permethylated oligosaccharides also furnishes useful information from which it is possible to identify with certainty the 2 → 3 and 2 → 6 linked Neu5Ac and, in addition, the 1 → 3- and 1 → 4-linked hexose with an *N*-acetylhexosamine [29]. The differences in the mass spectra given by the 2 → 3 and 2 → 6 sialyl linkages were attributed mainly to the ability of the 2 → 6 branch to chelate the cation, thereby leading preferentially to the production of nonreducing end-product ions. The work of Laine et al. [18, 20] on the differentiation of linkage isomers is also based on likelihood of cleavage of more hindered bonds. Discrimination between the 1 → 3 and 1 → 4 linkages was based on the specific elimination of the substituent linked on the carbon 3 atom, as mentioned previously, together with the fragments arising from the breaking of the two ring bonds.

The aim of the present work was to determine the optimum conditions for the production of these specific fragments. The influence of changing the collision energy from low energies (< 100 eV) to high energies (4 keV) was investigated. At high energies, the influence of the nature of the collision gas on the CID of  $[M + Na]^+$  ions was investigated. Most reports of the CID of ions derived from oligosaccharides and peptides indicate that helium has been used as the collision gas, but recent studies indicate that significant differences may be observed in the spectra arising from the CID of  $(M + H)^+$  peptides if helium is replaced by a heavier collision gas, such as argon or xenon [30-34]. The heavier collision gas promotes the formation of ions that require multiple bond cleavage for their formation.

Once the optimum conditions were established, the method was used to discriminate between the 1 → 3 and 1 → 6 branches in oligosaccharides having the common core structure of *N*-glycans.

## Experimental

### Materials

All oligosaccharides used in the present work were purified in the laboratory from biological fluids and characterized by NMR spectroscopy. The Gal $\beta$ 1-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man $\beta$ 1-4GlcNAc (sample 1) and the biantennary Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3[GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-6]Man $\beta$ 1-4GlcNAc (sample 2) were purified from the urine of patient who had GM1 gangliosidosis. The Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man $\beta$ 1-4GlcNAc (sample 3) and the Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3Man $\beta$ 1-4GlcNAc (sample 4) were isolated from the urine of patient who had Morquio disease. The NeuAc $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc (sample 5) was purified from human milk.

For each run, 5  $\mu$ g of the permethylated oligosaccharide sample was placed on the probe tip, allowed to dry, and then mixed with 2  $\mu$ L of a 1:1 mixture of thioglycerol/glycerol saturated with NaI.

### Tandem Mass Spectrometry

The low-energy CID experiments were carried out on a Finnigan-MAT (San Jose, CA) TSQ 70 instrument. An Ion Tech FAB gun gave a primary beam of xenon at 8 keV and 0.4 mA. The CID of the  $[M + Na]^+$  precursor ion was performed with xenon at 0.8 mtorr (uncorrected gauge reading) in the rf-only collision cell.

High-energy CID spectra were obtained in Warwick and Lille on Identical Kratos Concept II HH four-sector tandem mass spectrometers of EBEB geometry (Manchester, England). Ions were produced by using an Ion Tech FAB source with 8-keV xenon atoms and then accelerated with a voltage of 8 kV. The  $^{12}C$  ion in the isotope cluster of the  $[M + Na]^+$  was selected by MS-I and was subjected to CID into the collision cell floating at 4 kV above ground potential. Either helium or argon was used as collision gas, the precursor ion beam being attenuated by 80% in each case. When switching from one collision gas to the other, care was taken to eliminate cross-contamination of the collision gas by successively evacuating the gas inlet line and flushing it out with the new collision gas. The CID mass spectra were acquired by means of a linked scan of the electric and magnetic field strengths,  $E_2$  and  $B_2$ , respectively, of MS-II under the control of the DS90 data system. Each mass spectrum is the average of 10 scans. The relatively large amount of sample used in each case, together with the cooling of the probe [35], ensured that the intensity of the precursor ion beam remained constant.

## Results and Discussion

Abundant oxonium fragment ions are observed in the normal FAB spectrum [10-12] as products of metastable transitions and as products of the CID of  $[M + H]^+$  ions of derivatized oligosaccharides. Although such ions are very useful for determining sequencing and branching patterns, no further information on different linkage positions can be obtained except for the 1 → 3, 1 → 4 [18-20, 23], and 1 → 6 [18-20] linking of *N*-acetylhexosamines.

In contrast, very different behavior is observed for  $[M + Na]^+$  ions of permethylated oligosaccharides. No significant metastable decompositions of these ions are observed, suggesting the stability of such adduct ions compared with the  $[M + H]^+$  counterpart, as mentioned previously by several authors [17, 19, 20]. Thus, although the  $[M + H]^+$  ions are absent, the FAB mass spectra obtained with 0.05 M NaI in the matrix still contain intense peaks attributable to oxonium ion fragments, whereas these peaks are absent when the concentration of NaI is 1 M or greater. The spectra produced by the CID of  $[M + Na]^+$  ions, however, contain many peaks arising from cationized product ions. We show more particularly that the relative yields of some specific ions originated from multiple bond cleavages are strongly dependent on the collision energy and target gas.

For the designation of these product ions, the nomenclature proposed by Domon and Costello [36] has been adopted. To clarify the fragmentation schemes, only the two bond ring cleavages will be indicated. The  $B'$ ,  $C'$ ,  $Y'$ , and  $Z'$  fragments correspond to  $B$ ,  $C$ ,  $Y$ , and  $Z$  fragments, with elimination of a methoxyl group.

### Influence of Collision Energy

The mass spectrum given by the CID of the  $[M + Na]^+$  ion of permethylated oligosaccharide 1 at a collision energy of 20 eV in a triple quadrupole mass spectrometer is shown in Figure 1a. The main features of the spectrum are peaks due to  $Y$  ( $m/z$  504, 708, 953) and  $C$  ( $m/z$  259, 463, 708, 912) ions that arise from fragmentation of the glycosidic bonds. The only two peaks that arise from ions formed by the cleavage of two ring bonds are those at  $m/z$  329 and 533 due to the  $^{3,5}A_2$  and  $^{3,5}A_3$  fragments respectively. These observations are in striking contrast to those reported for the low-energy CID of cationized native oligosaccharides, the spectra of which contain intense peaks due to product ions that arise from cleavages of the sugar ring [26, 27].

On the other hand, many peaks due to fragmentation of the sugar ring are observed in the spectrum given by high-energy (4 keV) CID of the same oligosaccharide with argon as the collision gas (Figure 1b, Scheme I). The  $^{1,5}X_i$  series of ions ( $m/z$  328, 532, 736, 981, 1185) is particularly useful for the determination of the

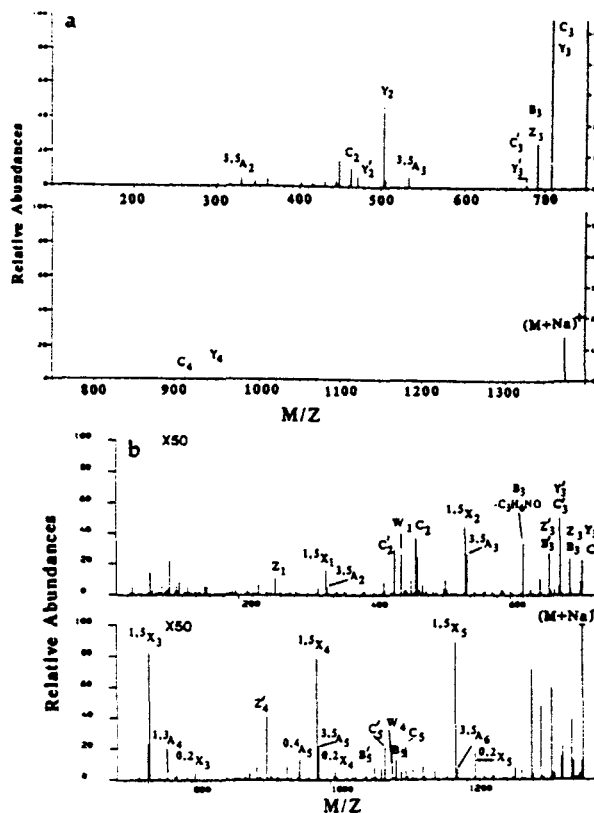
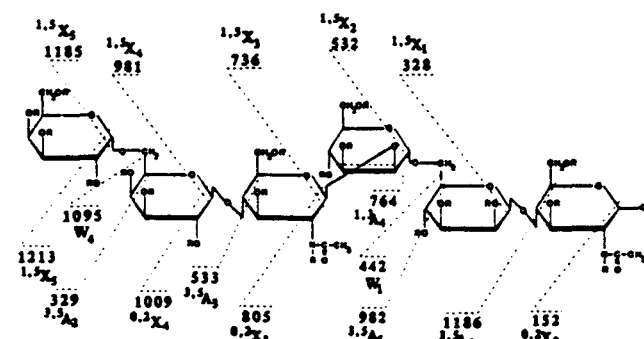


Figure 1. CID spectra of the  $(M + Na)^+$  ion of permethylated Gal  $\beta$ 1-6Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-2Man  $\alpha$ 1-6Man  $\beta$ 1-4GlcNAc (sample 1) obtained at low collision energy (20 eV) (a) and high collision energy (4 keV) (b) with argon as the collision gas.

sequencing and branching patterns, whereas the  $^{0,2}X_i$ ,  $^{3,5}A_i$ ,  $^{0,4}A_i$ , and  $^{1,3}A_i$  product ions are of considerable interest in helping to identify the position of linkage (see later). Moreover, two ions at  $m/z$  442 and 1095 are observed, which indicates a cleavage between the carbon atoms 5 and 6 of a six-substituted sugar, with the elimination of a methoxyl group. Therefore, by analogy with the nomenclature of Domon and Costello [36], and also to avoid any confusion with the E oxonium type ion described by Chizhov and Kotchekov [5, 6] in EIMS of substituted carbohydrates, we propose to designate this cleavage as  $W_i$ .



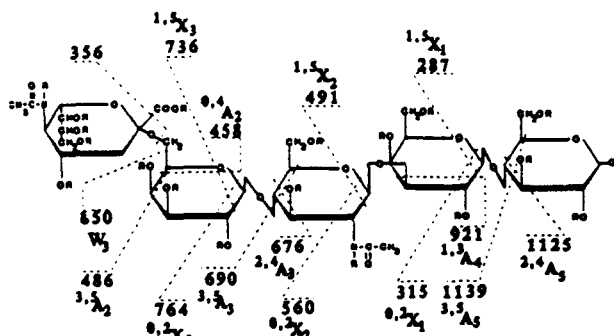
Scheme I. Fragmentation pattern of permethylated sample 1 obtained by CID of  $(M + Na)^+$  ion; R =  $CH_3$ .

*Influence of the Nature of the Collision Gas*

Many studies [30, 31, 33, 34] have shown that the use of a collision cell floated at 4 kV above earth potential, resulting in a collision energy of 4 keV, is a good compromise in giving a sufficient yield of product ions and efficient collection of low-mass ions without significant loss of transmission between MS-I and MS-II.

Under these conditions, even for precursor ions of  $M_r < 1000$ , there is a marked change in the relative abundances of fragment ions on switching from helium to argon as collision gas. The most significant changes are a decrease or total lack of Y fragments and a considerable increase in the abundance of ions arising from multiple bond cleavages. For example, in the spectrum given by CID of the  $[M + Na]^+$  of permethylated sample 5 (Figure 2a, Scheme II) with helium as the collision gas, the predominant fragment ion is the  $Y_2$  fragment ion at  $m/z$  463. When helium is replaced by argon (Figure 2b), the relative abundance of this ion falls considerably. The peaks due to the  $^{3,5}A_1$  fragment at  $m/z$  486,  $^{0,4}A_2$  at  $m/z$  458, and  $W_3$  at  $m/z$  850, present in the spectrum given by argon and specific for a 2 → 6-linked NeuNAc compound, are weak or absent in the spectrum obtained using helium as the collision gas.

Similarly, the abundances of the product ions relative to that of the precursor ion are much greater when helium is replaced by argon as collision gas (compare



Scheme II. Fragmentation pattern of permethylated sample 5 obtained by CID of  $(M + Na)^+$  ion; R =  $CH_3$ .

the relative multiplication factors). These observations support the conclusions recently reported by Bordas-Nagy et al. [33, 34] for peptides of  $M_r > 1500$ : The use of argon rather than helium results in more efficient fragmentation of the precursor ion and also leads to an enhancement of fragmentations that require cleavage of more than one bond, indicating the deposition of increased amounts of internal energy.

The strong influence of the collision energy and the nature of the collision gas on the yields of ions that result from the cleavages of two ring bonds indicate the importance of the amount of internal energy deposited in the precursor ion during the collision in leading to the formation of these ions.

First, a comparison at low energy of the fragmentation of natriated permethylated oligosaccharide with the underivatized monolithiated adduct [26] shows that the reaction mechanism consisting of a ring opening followed by either retro-ene or retro-aldol reactions does not occur, as predicted, after methylation. Indeed, in the present work, this reaction is prevented by methylglycosylation of the reducing sugar. A similar effect of methylation was observed by Laine et al. [18, 20]. Consequently, the two observed two ring bond cleavages, the  $^{3,5}A_2$  and  $^{3,5}A_3$  fragments, cannot be accounted for by this mechanism.

Second, the striking difference between the mass spectra produced at low and high collision energies indicates that two distinct fragmentation processes occur: The cleavage of the glycosidic linkages is favored at low collision energy, whereas the cleavage of two ring bonds is predominant at high collision energy, requiring the deposition of higher amounts of internal energy than is available in triple-quadrupole mass spectrometers.

Third, the presence in the spectra of both reducing and nonreducing end-product ions supports the involvement of different fragmentation mechanisms, because the fragmentation pathways described for monolithiated native oligosaccharides lead only to nonreducing product ions [26].

In light of this, if one considers the strong stability of the sodium adduct, it is not inconceivable that A-, W-, and X-type fragments are formed in a charge-

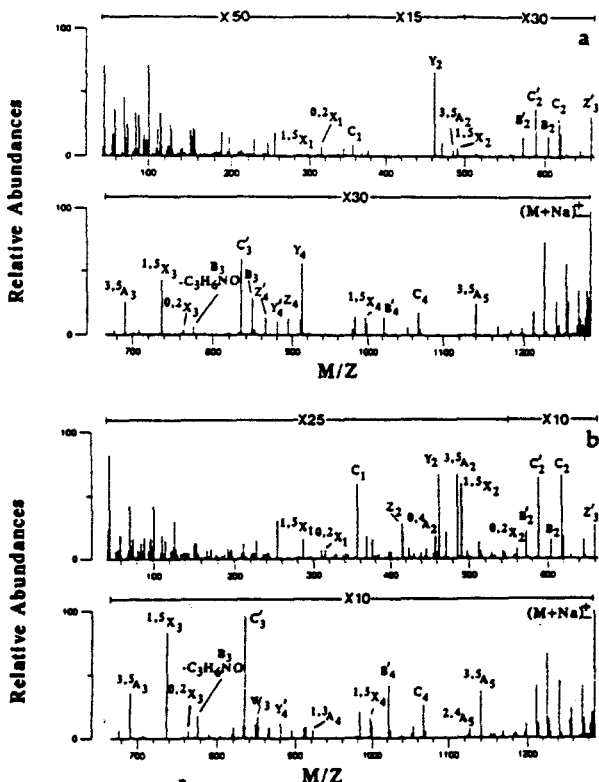


Figure 2. CID spectra of the  $(M + Na)^+$  ion of permethylated NeuAc $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc (sample 5) obtained with 4 keV collision energy using helium (a) and argon (b) as the collision gas.

remote fragmentation process [37]. In this case, each CID spectrum may represent the sum of a set of charge-remote fragmentation reactions due to potential cationizations at the different glycosidic linkages. This interpretation is supported by the fact that all product ions are cationized, and it is well known that charge-remote fragmentation occurs more readily under high-energy CID conditions.

To explain the observation of peaks arising from both  $^{1,5}X_i$  and  $^{0,2}X_i$  types of ions, and from both reducing and nonreducing end cleavages in the CID spectra described previously, we propose two decomposition pathways that involve the six-membered ring of the sugar cycle (Scheme III). Decompositions that follow path A should lead to the formation of  $^{3,5}A_i$  fragments common to both 1 → 4 and 1 → 6 linkages and  $^{1,3}A_i$  ions common to both 1 → 3 and 1 → 2 linkages. Similarly, decompositions that follow path B should lead to the formation of the  $^{0,4}A_i$  fragment for the 1 → 6 linkage and  $^{2,4}A_i$  fragments for both the 1 → 3 and 1 → 4 linkages. Support for these postulates is presented below.

The previous observations make it clear that high-energy CID coupled with the use of a heavy collision gas, such as argon or xenon, is a promising method for the determination of linkages in sodiated and permethylated oligosaccharides. One interesting point to underline is that the permethylation induces a shift of mass, allowing the  $^{0,4}A_i$  ion to be distinguished from the  $^{1,2}A_i$  and  $^{2,4}A_i$  ions, whereas, without derivatization, all of these ions would have the same mass.

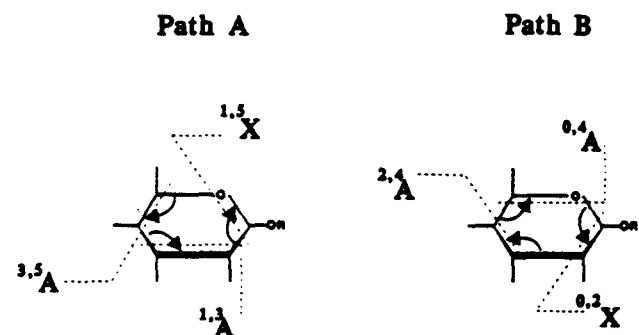
Decomposition pathways, as depicted by Scheme III, are also proposed by Poulter and Burlingame [14] to explain the formation of  $^{2,4}A_i$  and  $^{1,5}X_i$  ions but cannot account for the observation of  $^{2,5}X_i$ ,  $^{1,4}X_i$ , and  $^{2,5}A_i$  product ions in the CID spectra of  $[M - H]^-$  ions of oligosaccharides or glycolipids.

### Linkage Discrimination

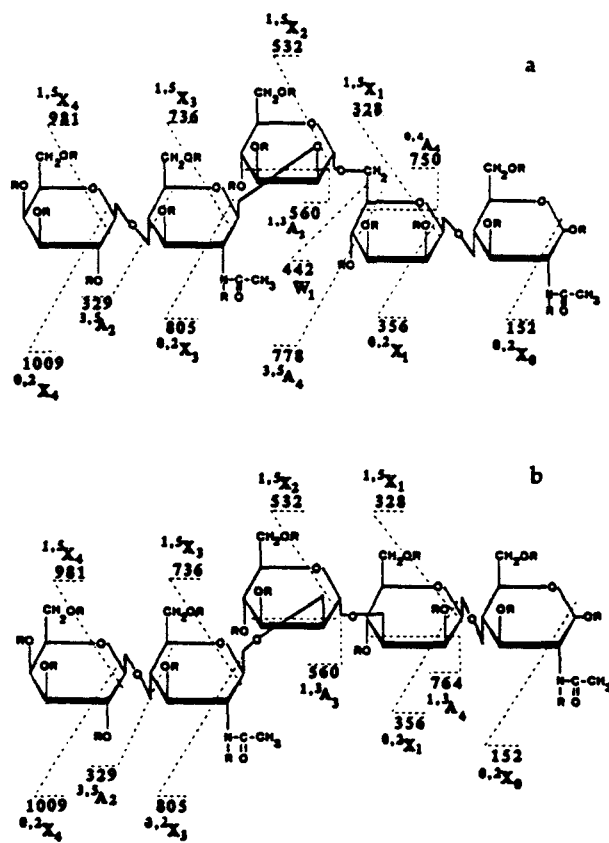
Many authors have demonstrate the capability of the FAB MS/MS technique to distinguish between some linkage positions, in oligosaccharides [18-29]. The CID at 4-keV collision energy with argon as the collision

gas appears to be a powerful method to obtain more information. For example, the isomeric bonds 1 → 6 (Scheme IVa, Figure 3a) and 1 → 3 (Scheme IVb, Figure 3b) that link the two mannose residues and which correspond to the branching arms of the common core of  $N =$  glycans, are clearly distinguished. The  $^{0,4}A_4$ ,  $^{3,5}A_4$ , and  $W_1$  ions at  $m/z$  750, 778, and 442, respectively, characterize the 1 → 6 linkage, whereas the low-abundance fragment  $^{1,3}A_4$  at  $m/z$  764 is specific for a 1 → 3 linkage when correlated with the observation of the peak at  $m/z$  356 arising from the  $^{0,2}X_i$  fragment. Furthermore, if the  $^{1,3}A_i$  cleavage is common to both 1 → 2 and 1 → 3 linkages, then the 1 → 2 linkage may be identified by the absence of  $^{0,2}X_i$  ion. This ion is observed for all other types of linkages [e.g., with ions at  $m/z$  152 ( $^{0,2}X_0$ ) and  $m/z$  805 ( $^{0,2}X_2$ ) for a 1 → 4 linkage, an ion at  $m/z$  356 ( $^{0,2}X_1$ ) for a 1 → 3 linkage, and at lower abundance with  $m/z$  356 ( $^{0,2}X_1$ ) for a 1 → 6 linkage]. The 1 → 4 linkage may also be characterized by the potential presence of peaks due to the  $^{3,5}A_i$ ,  $^{2,4}A_i$ , and  $^{0,2}X_i$  fragments in the spectrum.

An example of an application of the capability to distinguish between the two branching bonds is provided by the determination of the structures of the biantennary glycans. This is illustrated by the identification in sample 2 of the antennae that carry the galactose residue in the nonreducing terminal position (Figure 4, Scheme V). The occurrence of a  $^{1,3}A_4$  ion at



Scheme III. Proposed decomposition pathways leading to the observed ions arising from multiple bond cleavages;  $R = CH_3$ .



Scheme IV. Fragmentation patterns of permethylated sample 3 (a) and sample 4 (b) obtained by CID of  $(M + Na)^+$  ion;  $R = CH_3$ .

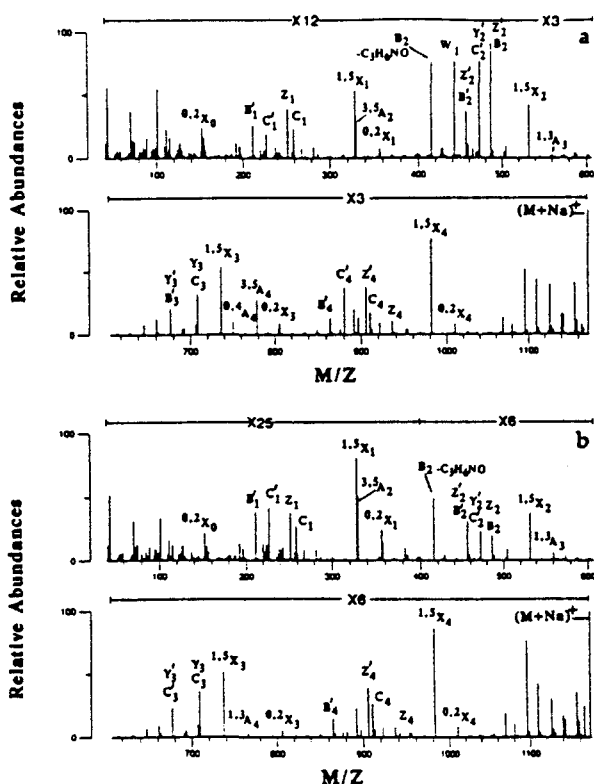


Figure 3. CID spectra of the  $(M + Na)^+$  ion of permethylated Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man $\beta$ 1-4GlcNAc (sample 3) (a) and Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3Man $\beta$ 1-4GlcNAc (sample 4) (b) obtained with 4 keV collision energy with argon as the collision gas.

$m/z$  764 and the  $^{3,5}A_4$ ,  $^{0,4}A_4$ , and  $W_1$  ions at  $m/z$  574, 546, and 1095, respectively, are consistent with a galactose linked on the 1  $\rightarrow$  3 branch.

The spectra given by the CID of  $[M + Na]^+$  ions of samples 1 and 5 also contain many diagnostic peaks that allow one to assign different linkage positions. These peaks are summarized in Tables 1 and 2, respectively.

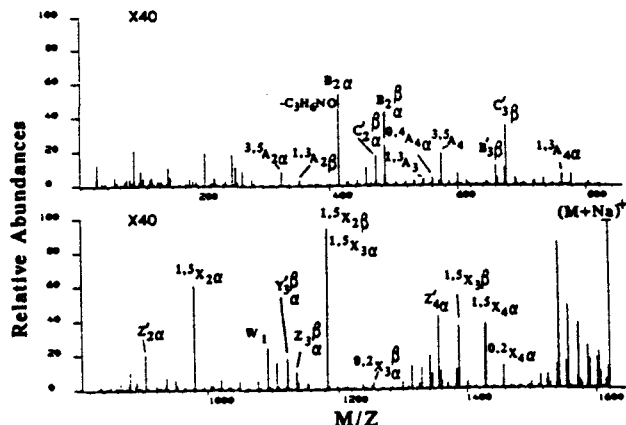
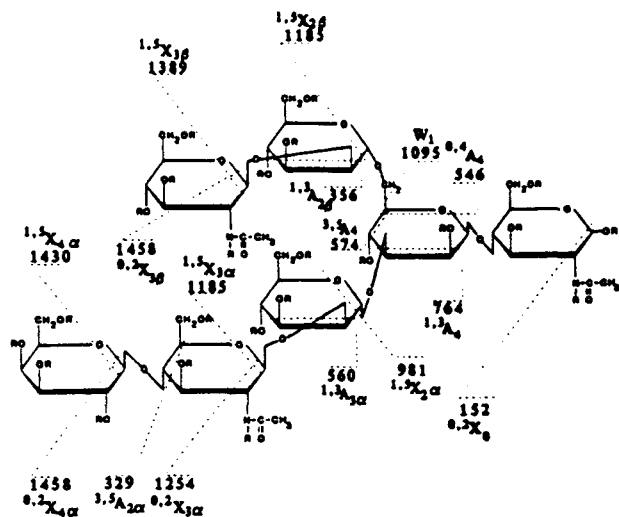


Figure 4. CID spectrum of  $(M + Na)^+$  ion of permethylated Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3[GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-6]Man $\beta$ 1-4GlcNAc (sample 2) obtained with 4 keV collision energy with argon as the collision gas.



Scheme V. Fragmentation pattern of permethylated sample 2 obtained by CID of  $(M + Na)^+$  ion; R = CH<sub>3</sub>.

The previous observations clearly indicate that each type of linkage may be identified by the presence or absence, or both, of various diagnostic peaks that may arise from the cleavage of two ring bonds present in the glycosidic cycle. The diagnostic fragments are summarized in Table 3.

Conclusion

The results presented here demonstrate that the permethylation and cationization of oligosaccharide samples are advantageous not only on the grounds of sensitivity, but also in providing a powerful method of identifying many linkage positions from a single CID spectrum. These identifications are based on the presence or absence, or both, of diagnostic peaks, indicating the formation of ions that arise from the cleavage of two ring bonds within the glycosidic ring. The production of such fragments is probably favored by the strong stability of the cation adduct, and their yield is closely related to the internal energy deposited into the precursor ion during collision. They are essentially absent from CID spectra produced under low-energy conditions (< 100 eV). For CID spectra produced under high-energy conditions (4 keV), their production is greatly enhanced if argon rather than helium is used as collision gas; however, because in some cases these

Table 1. Diagnostic peaks given by CID mass spectrometry of the  $[M + Na]^+$  ion of permethylated sample 1 (collision energy 4 keV, argon as the collision gas)

Sample 1	Fragment					
	$^{0,2}X_i$	$W_i$	$^{0,4}A_i$	$^{1,3}A_i$	$^{2,4}A_i$	$^{3,5}A_i$
Gal1 $\rightarrow$ 6Gal	1009	1095				329
Gal1 $\rightarrow$ 4GlcNAc	805					533
GlcNAc1 $\rightarrow$ 2Man				764		
Man1 $\rightarrow$ 6Man		442	954			982
Man1 $\rightarrow$ 4GlcNAc	152					1172 1186



Table 2. Diagnostic peaks given by CID mass spectrometry of the  $[M + Na]^+$  ion of permethylated sample 5 (collision energy 4 keV, argon as the collision gas)

Sample 5	Fragment					
	$^{0,2}X_i$	$W_i$	$^{0,4}A_i$	$^{1,3}A_i$	$^{2,4}A_i$	$^{3,5}A_i$
NeuAc2 → 6Gal	764	850	458			486
Gal1 → 4GlcNAc	560				676	690
GlcNAc1 → 3Gal	315			921		
Gal1 → 4Glc					1125	1139

Table 3. Potential diagnostic peaks for each position linkage given by CID mass spectrometry of the  $[M + Na]^+$  ion of permethylated oligosaccharides

Linkage Position	Fragment					
	$^{0,2}X_i$	$W_i$	$^{0,4}A_i$	$^{1,3}A_i$	$^{2,4}A_i$	$^{3,5}A_i$
1 → 2	-	-	-	+	-	-
1 → 3	+	-	-	+	+	-
1 → 4	+	-	-	-	+	+
1 → 6	+	+	+	-	-	+

specific fragmentations are near the limit of detection, one might expect that the new methods of dissociation such as surface-induced dissociation or photodissociation will improve their yield.

## Acknowledgments

This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité mixte de Recherche No. 111, Professeur A. Verbert, Directeur), of the Université des Sciences et Technologies de Lille. The authors thank Doctor Gérard Strecker for providing the oligosaccharide samples, and Yves Leroy and Guy Ricart for frequent help.

## References

- Ryhage, R. *Anal. Chem.* 1964, 36, 759-764.
- Hakomori, S. I. *J. Biochem.* 1964, 55, 205-208.
- Hellerqvist, C. G.; Lindberg, B.; Svensson, S.; Holme, T.; Lindberg, A. A. *Carbohydr. Res.* 1968, 8, 43-55.
- Biemann, K.; DeJongh, D. C.; Schnoes, H. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 1763-1771.
- Chizhov, O. S.; Kochetkov, N. K. *Adv. Carbohydr. Chem.* 1966, 21, 29.
- Chizhov, O. S.; Kotchekov, N. K. *Methods Carbohydr. Chem.* 1972, 6, 540.
- Lonngren, J.; Svensson, S. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1974, 29, 42.
- Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981, 325.
- Aberth, W.; Straub, K. M.; Walls, F. C.; Burlingame, A. L. *Anal. Chem.* 1982, 54, 2029-2034.
- Dell, A. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1987, 45, 19-72.
- EGge, H.; Peter-Katalinic, J. *Mass Spectrom. Rev.* 1987, 6, 331-393.
- Hounsell, E. F.; Madigan, M. J.; Lawson, A. M. *Biochem. J.* 1984, 219, 947-952.
- Dell, A. *Methods Enzymol.* 1990, 193, 647.
- Poulter, L.; Burlingame, A. L. *Methods Enzymol.* 1990, 193, 661.
- Carr, S. A.; Reinhold, V. N.; Green, B. N.; Hass, J. R. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1985, 12, 288-295.
- Gillece-Castro, B.; Burlingame, A. L. *Methods Enzymol.* 1990, 193, 689.
- Orlando, R.; Bush, C. A.; Fenselau, C. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1990, 19, 747-754.
- Laine, R. A.; Pamidimukkala, K. M.; French, A. D.; Hall, R. W.; Abbas, S. A.; Jain, R. K.; Matta, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 6931-6939.
- Laine, R. A.; Yoon, E.; Mahier, T. J.; Abbas, S.; De Lappe, B.; Jain, R.; Matta, K. *Biol. Mass Spectrom.* 1991, 20, 505-514.
- Laine, R. A. *Methods Enzymol.* 1989, 179, 157.
- Domon, B.; Müller, D. R.; Richter, W. J. *Org. Mass Spectrom.* 1989, 24, 357-359.
- Müller, D. R.; Domon, B.; Richter, W. J. *Adv. Mass Spectrom.* 1989, 11, 1309.
- Domon, B.; Müller, D. R.; Richter, W. J. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1990, 19, 390-392.
- Richter, W. J.; Müller, D. R.; Domon, B. *Methods Enzymol.* 1990, 193, 607.
- Garozzo, D.; Giuffrida, M.; Impallomeni, G.; Ballistreri, A.; Montaudo, G. *Anal. Chem.* 1990, 62, 279-286.
- Hofmeister, G. E.; Zhou, Z.; Leary, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 5964-5970.
- Zhou, Z.; Ogden, S.; Leary, J. A. *J. Org. Chem.* 1990, 55, 5444-5446.
- Spengler, B.; Dolce, J. W.; Cotter, R. J. *Anal. Chem.* 1990, 62, 1731-1737.
- Lemoine, J.; Strecker, G.; Leroy, Y.; Ricart, G.; Fournet, B. *Carbohydr. Res.* 1991, 221, 209-217.
- Carr, S. A.; Green, B. N.; Hemling, M. E.; Roberts, G. D.; Anderegg, R. J.; Vickers, R. *Proceedings of the 35th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Denver, CO, 1987; p. 830.
- Martin, S. A.; Johnson, R. S.; Costello, C. E.; Biemann, K. In *The Analysis of Peptides and Proteins by Mass Spectrometry*; McNeal, C. J., Ed.; Wiley: New York, 1988; p. 135.
- Martin, S. A. *Proceedings of the 37th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*; Miami, FL, 1989; p. 858.
- Bordas-Nagy, J.; Despeyroux, D.; Jennings, K. R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1992, 3, 502-514.
- Bordas-Nagy, J.; Despeyroux, D.; Jennings, K. R.; Gaskell, S. J. *Org. Mass Spectrom.* 1992, 27, 406-415.
- Falick, A. M.; Walls, E. C.; Laine, R. A. *Anal. Biochem.* 1986, 159, 132-137.
- Domon, B.; Costello, C. E. *Glycoconjugate J.* 1988, 5, 397-409.
- Adams, J. *Mass Spectrom. Rev.* 1990, 9, 141-186.

Comme nous avons pu le mettre en évidence, il existe un contraste saisissant entre les spectres CAD des précurseurs  $[M+Na]^+$  d'oligosaccharides perméthylés suivant qu'ils sont obtenus à basse ou haute énergie de collision. A basse énergie, prédominent les ruptures de la liaison glycosidique, alors qu'à haute énergie ces mêmes clivages côtoient des ions qui proviennent de décompositions intra-cycliques. Ces dernières sont de même très favorisées lorsqu'en place de l'hélium, de l'argon est utilisé comme gaz de collision.

Il apparaît par conséquent que la quantité d'énergie interne déposée au cours de la collision à basse énergie est notoirement insuffisante pour engendrer la formation des ions issus de multiples clivages C-C. Sachant que la quantité maximale d'énergie cinétique potentiellement convertible en énergie interne est donnée par l'équation 1 (p. 44), nous pouvons estimer  $E_{com}$  ( $E_{\text{center of mass}}$ ) à :

- 2,3 eV dans le cas d'une collision à 20 eV, pour un ion de masse 1000, en utilisant comme gaz le xénon.
- 16 eV dans le cas d'une collision à 4 keV, pour un ion de masse 1000, avec de l'hélium comme gaz cible.

Nous avons dans ce résultat un indice tendant à prouver que ce type de ruptures intra-cycliques pourrait effectivement être formé selon un processus de fragmentation d'ion à charge piégée (CRF pour Charge Remote Fragmention). En effet, **Adams et Gross (1986)** estiment à 1,3-1,9 eV l'énergie minimale qui doit être déposée dans des ions complexes alcool gras-métal alcalin pour observer ce mécanisme de CRF. Cependant des études réalisées ultérieurement par **Wysocki et al. (1988)** montrent à la fois que cette énergie minimale varie avec la nature du groupement portant la charge et que ce seuil minimal se situerait plutôt aux alentours de 10 eV. Enfin, dans sa revue générale sur la CRF

associée aux chaînes aliphatiques ou aux peptides, **Adams (1990)** conclut pour un seuil en fait de l'ordre de 16 eV.

En ce qui nous concerne, le fait que nous puissions encore observer ces ruptures intra-cycliques à une énergie de collision de 2 keV, soit  $E_{com} = 8$  eV indiquerait un seuil entre 5,8 et 8 eV.

N'ayant pu néanmoins acquérir de spectres CAD de qualité satisfaisante en dessous de 2 keV d'énergie de collision, rien ne prouve que ces ions ne puissent pas être observés pour des valeurs de  $E_{com}$  inférieures à 8 eV. Dans l'affirmative, cela suggèrerait que la différence entre les phénomènes d'excitation à haute et basse énergie de collision prendrait part aux disparités entre ces deux modes de dissociation et que le critère énergétique ne serait pas seul en cause.

Toutefois, l'influence de la nature du gaz de collision démontre que les ions issus de clivages intra-cycliques requièrent effectivement de haute énergie d'activation puisqu'ils voient leur abondance fortement augmenter en passant de l'hélium ( $E_{com} = 16$  eV) à l'argon ( $E_{com} = 153$  eV) comme gaz de collision.

A ce titre, il a été démontré que pour des ions de masse  $< 300$  uma, l'hélium augmente, plus que l'argon ou le xénon, non seulement le rendement de dissociation, mais également la formation des fragments qui requièrent une haute énergie d'activation (**Ouverkerk et al. 1984**). Ces conclusions résultent du fait que l'hélium présente une section efficace supérieure pour l'excitation électronique, processus dominant à haute énergie de collision (**Kim et McLafferty 1978**).

Nos résultats sont en totale contradiction avec de telles observations et démontrent, au contraire, que pour les ions de masse importante, l'excitation électronique n'est pas le processus dominant pour la conversion d'énergie translationnelle en énergie interne.

D'ailleurs, divers auteurs (**Bordas-Nagy et al. 1992ab**; **Carr et al.**

1987; Curtis et al. 1988; Martin et al. 1989) aboutissent aux mêmes conclusions après analyse des spectres CAD de peptides de masse moléculaire >1000 uma. Ils observent ainsi une augmentation des rendements de collision et des intensités relatives des ions de rupture des chaînes latérales (fragments d, v et w).

Il est donc souhaitable de remplacer l'hélium par des gaz plus lourds dans les études de collision à haute énergie puisque :

- même si le phénomène de "scattering" est plus intense avec l'argon, celui-ci est très largement compensé par un meilleur rendement de collision,
- les ions provenant de clivages multiples sont favorisés.

**Pouvons nous conclure, à la vue de ces résultats, que certains ions sont formés selon un mécanisme de CRF ?**

De façon formelle non. Pourtant, les spectres de collision d'ions préfragmentés dans la source d'ionisation FAB conforte cette hypothèse, même si les mécanismes de dissociation y sont, par ailleurs, sensiblement différents de ceux ayant lieu en CAD.

Les spectres de la figure 23 correspondent à la CAD de l'ion précurseur  $^{1,5}X_2$  à m/z 491 produit à partir de l'isomère A Gal( $\beta$ 1-4)GlcNac( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc (Fig. 23A) et de l'isomère B Gal( $\beta$ 1-3)GlcNac( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc (Fig. 23B).

En ce qui concerne le spectre A, la présence des fragments  $C_1$  à m/z 273 et  $^{2,4}A_2$  à m/z 329 laisse penser que, dans ce cas, le cation se trouve préférentiellement localisé au niveau de la liaison GlcNac( $\beta$ 1-3)Gal et donc du site de rupture initial. Cette localisation n'est cependant pas exclusive comme le prouvent les ions Z' à m/z 211, Y' à 227, Z et Y respectivement à m/z 241 et 259, démontrant pour leur

part que la rupture  $^{1,5}X$  sur l'oligosaccharide peut avoir lieu à distance du site portant la charge.

Quant à l'examen du spectre B, il met en avant l'influence de l'isomérisation de liaison, et a fortiori la conformation spatiale de l'oligosaccharide, sur le site de fixation du cation. En effet, nous ne retrouvons pas comme précédemment les fragments  $C_1$  à  $m/z$  273 et  $^{2,4}A$  à  $m/z$  329, bien que la structure primaire de l'ion précurseur  $^{1,5}X_2$  soit similaire. Les fragments majoritaires sont ici principalement attribués au Glc en position terminale réductrice et démontrent en conséquence une rupture, à l'origine, là aussi éloignée du cation.

Un autre exemple traite de l'étude par CAD de l'ion  $^{1,5}X_4$  à  $m/z$  981 des oligosaccharides Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-2)Man( $\alpha$ 1-3)Man( $\beta$ 1-4)-GlcNAc (Fig. 24) et Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-2)Man( $\alpha$ 1-6)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (Fig. 25).

Nous pouvons tout d'abord déduire du spectre C une cationisation partielle au niveau du résidu de N-acétylhexosamine en position terminale réductrice (ion  $Y_1$  à  $m/z$  300), ce qui n'est pas le cas pour l'isomère D. Pour ce dernier, la présence majoritaire des fragments Y à  $m/z$  504 et 708 suggère une cationisation favorisée au niveau du motif GlcNAc-Man-Man alors que la coexistence des ions Y à  $m/z$  300, 504, 708 et des ions C à  $m/z$  518 et 722 permet d'envisager une fixation du métal alcalin sur l'isomère C d'avantage statistique.

Il se dégage de ces divers spectres que les ruptures n'interviennent pas exclusivement au site de cationisation et qu'elles y sont même défavorisées. Tout laisse alors croire que le cation stabiliserait, au moins en partie, la liaison glycosidique.

Il faut en tout cas concevoir les spectres de collision des ions  $[M+Cat]^+$  d'oligosaccharide perméthylé comme le reflet d'un ensemble de sites potentiels de fixation de la charge, ici portée par le métal alcalin.

Les fragments générés pendant le processus de CAD résulteraient alors en partie de mécanisme de type CRF.

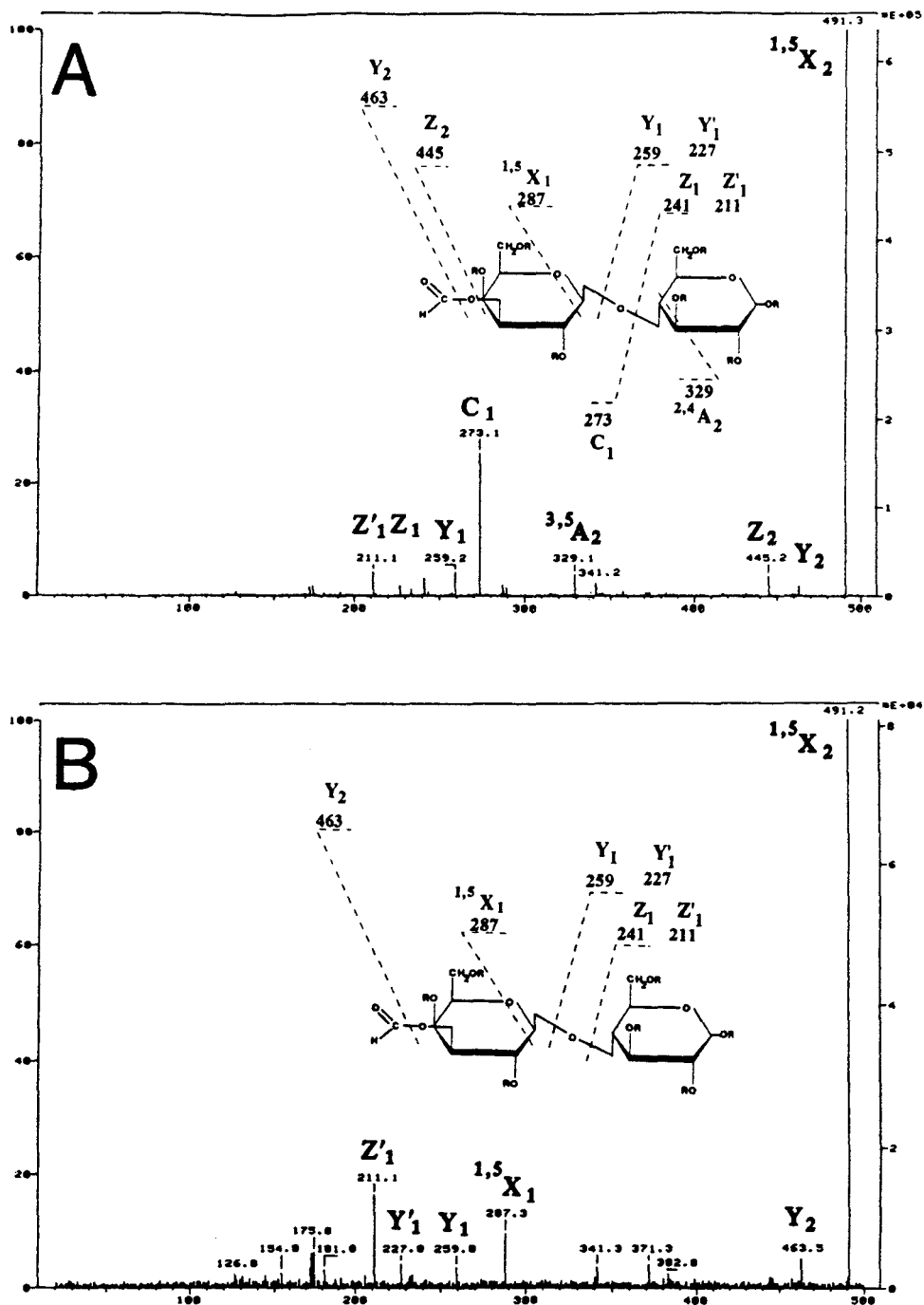


Figure 23 : Spectres de CAD de l'ion précurseur  $[^{1,5}X_2+Na]^+$  à  $m/z$  491 des isomères A et B perméthylés.

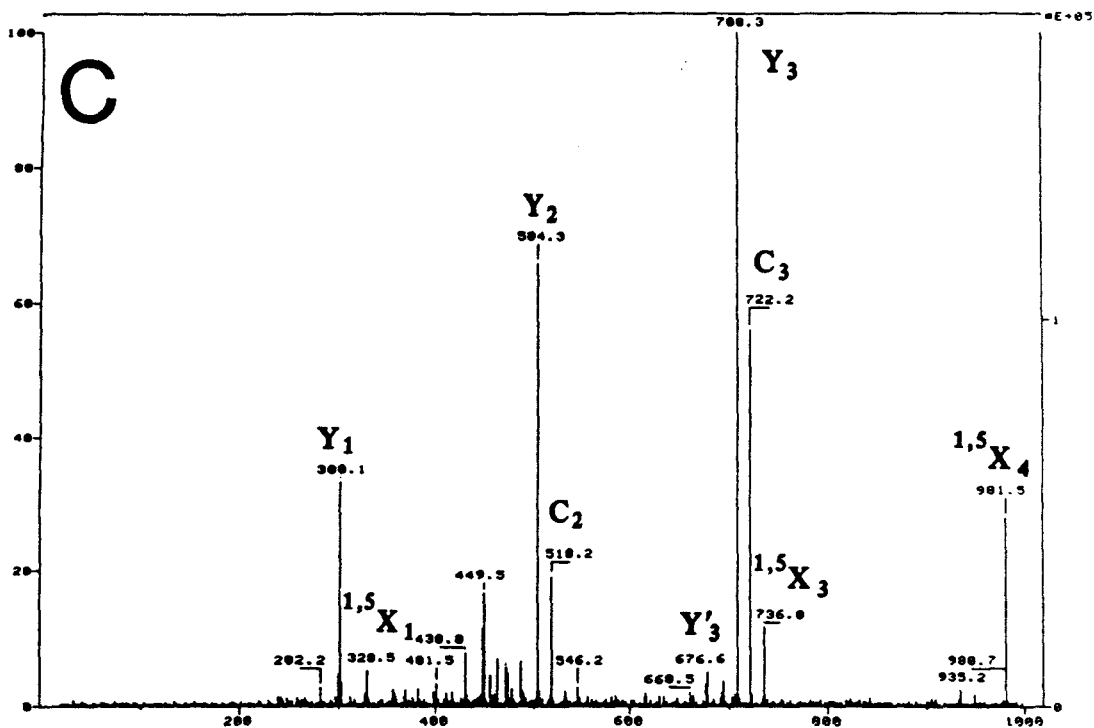
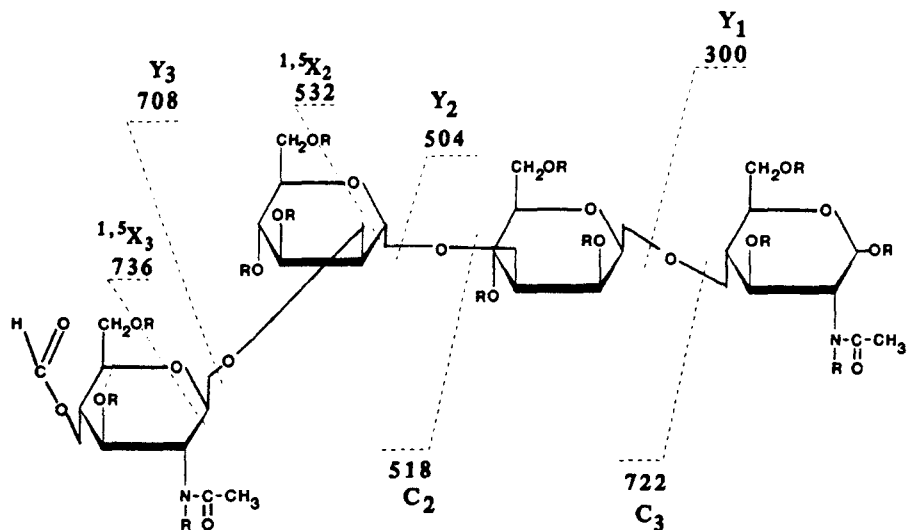


Figure 24 : Spectre de CAD de l'ion précurseur  $[^{1,5}X_4+Na]^+$  à  $m/z$  981 de l'isomère C perméthylé.

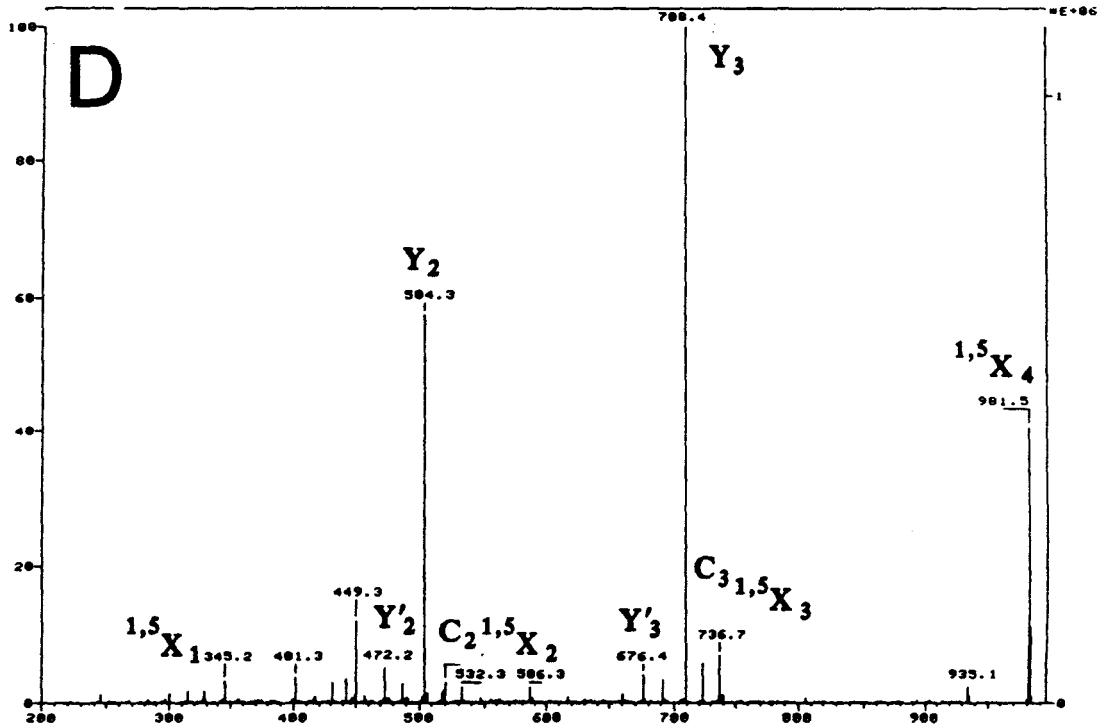
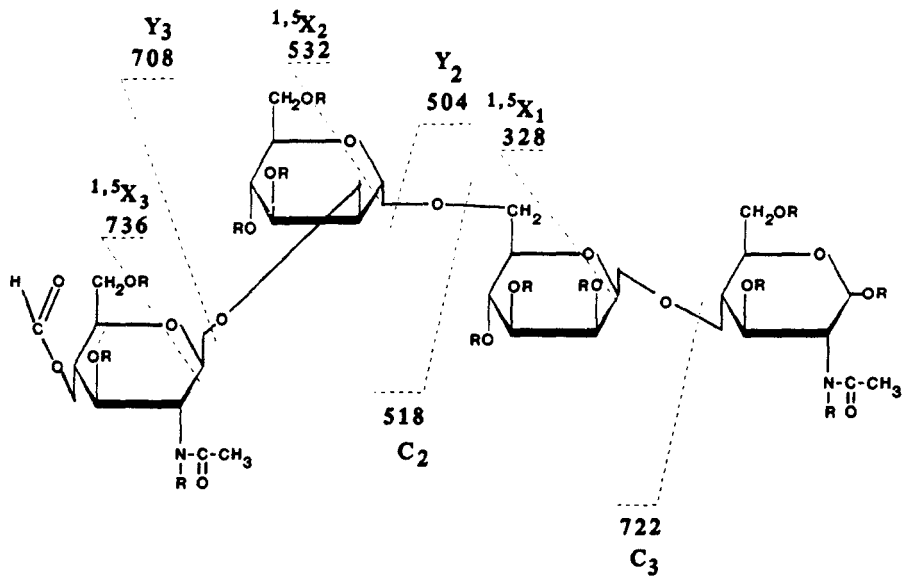
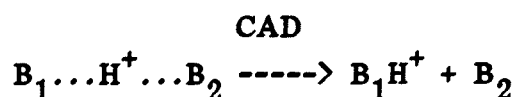


Figure 25 : Spectre de CAD de l'ion précurseur  $[^{1,5}X_4+Na]^+$  à  $m/z$  981 de l'isomère D perméthylé.



*II-3 Evaluation de l'affinité relative cation-oligosaccharide perméthylé.*

La sélectivité des oligosaccharides perméthylés vis-à-vis de la complexation par des métaux alcalins en phase vapeur a été évaluée par la méthode cinétique (Cooks et Kruger 1977, McLuckey et al. 1981). Cette méthode consiste par exemple à dissocier par collision des dimères protonés suivant la réaction :



A partir du spectre de collision, il est alors possible de déduire une affinité protonique relative de  $\text{B}_1$ , dans cet exemple, supérieure à  $\text{B}_2$ .

C'est cette technique qui a permis d'évaluer les affinités protoniques relatives de désoxynucléotides (Greco et al. 1990) et d'acides aminés (Bojesen 1987) ainsi que les affinités relatives de cations alcalins vis-à-vis des éthers couronnes (Liou et Brodbelt 1992; Maleknia et Brodbelt 1992). Un point fondamental est que cette méthode permet de faire abstraction de tout effet de solvant, effet d'une extrême influence sur l'affinité et la stabilité des complexes métal alcalin-éther couronne, comme ont pu le démontrer certains auteurs par modélisation moléculaire (Wipff et al. 1982; Mazor et al. 1990).

Pour notre part, des études par CAD ont été effectuées sur des complexes oligosaccharide perméthylé-dimère de métaux alcalins afin établir une échelle qualitative d'affinité.

Quatre oligosaccharides isomères 2 à 2 nous ont servis de modèle d'étude : Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc (isomère A)

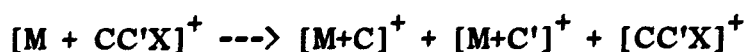
Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc (isomère B)

Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-2)Man( $\alpha$ 1-3)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (isomère C)

Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-2)Man( $\alpha$ 1-6)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc (isomère D)

- Méthode

Environ 10 nmoles d'oligosaccharide perméthylé sont mélangés à 1µl de thioglycérol contenant 0.5 moles/l de chacun des halogénures alcalins à étudier. Par ionisation FAB, il est possible de générer des complexes  $[M + CC'X]^+$  où M est un oligosaccharide, C et C' deux métaux alcalins différents et X un halogénure. Ces ions complexes sont alors soumis à une collision à basse énergie (5 eV) dans un appareil de type quadripolaire, et se dissocient suivant la réaction suivante :



Les intensités relatives de  $[M+C]^+$  et  $[M+C']^+$  pour chacun des isomères et des cations étudiés sont regroupées dans le tableau 2 ci-dessous :

**Tableau 2** : Sélectivité des oligosaccharides perméthylés pour la complexation des métaux alcalins.

	Isomère A	Isomère B
	$[M + C]^+ : [M + C']^+$	$[M + C]^+ : [M + C']^+$
Li Na	100 : 6,6	100 : 6,1
Li K	100 : 2,8	100 : 2,3
Na K	100 : 6,2	100 : 16,0
K Rb	100 : 15,2	100 : 37,5

	Isomère C	Isomère D
	$[M + C]^+ : [M + C']^+$	$[M + C]^+ : [M + C']^+$
Li Na	100 : 8,6	100 : 19,8
Li K	100 : 10,1	100 : 7,9
Na K	100 : 19,1	100 : 15,3
K Rb	100 : 52,5	100 : 25,0

### - Résultats

En premier lieu apparait une affinité relative du cation d'autant plus grande que sa taille est faible, soit un ordre de stabilité dans le sens  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+$ .

Une étude en modélisation moléculaire sur un disaccharide (Hofmeister et al. 1991) a démontré que le lithium se complexerait au niveau de la liaison glycosidique. La conformation la plus stable du point de vue énergétique est celle qui permet, via la torsion de liaisons C-OH et C-C, une tétra- ou pentacoordination du cation par des oxygènes. Nous pouvons donc concevoir qu'en raison de l'encombrement stérique la stabilisation des cations de plus faible taille est favorisée et qu'à ce niveau celle-ci peut être fortement discriminatoire. C'est précisément ce que nous pouvons observer dans le cas des isomères A et B pour les complexes Li-Na et Li-K. A ce propos, l'expression des affinités relatives dans le cas de ces mêmes dimères, en l'occurrence parfaitement identiques, traduit l'absence d'influence du changement d'isomérisation sur la fixation du  $\text{Li}^+$ . Tel n'est pas le cas des isomères C et D : la sélectivité moindre de l'isomère D vis-à-vis du  $\text{Li}^+$  peut résulter de l'encombrement stérique plus faible offert par la liaison 1-6 et donc une "encapsulation" du  $\text{Na}^+$  d'avantage facilitée par comparaison avec les autres types de liaison.

Les cations de plus grande taille ( $\text{K}^+$  et  $\text{Rb}^+$ ) auraient tendance à se chélater sur des oxygènes d'avantage périphériques ce qui rend compte des différences d'affinité relative entre structures isomériques. La plus grande sélectivité des structures A et D pour le  $\text{K}^+$  dans le complexe K-Rb, par rapport à leurs isomères respectifs B et C, peut s'expliquer par une plus grande flexibilité de la conformation spatiale facilitant la chélation du cation par un nombre de points de contact oxygène-cation maximum. Dans le cas des éthers couronnes, ce concept de point de contact maximum souligne l'importance de la flexibilité

structurale pour optimiser les interactions avec les cations. Une certaine rigidité entrainerait donc dans le cas des oligosaccharides une sélectivité moindre. Notre hypothèse est par ailleurs conforme aux travaux de **Laine et al.** (1988; 1991) qui, à partir de la mécanique moléculaire, concluent à un ordre relatif des degrés de liberté de rotation des liaisons glycosidiques dans le sens 1-6>1-4>1-3.

#### *II-4 Influence de la taille du cation*

L'influence de la taille du cation sur le processus de la dissociation activée par collision et donc l'aspect du spectre a été évaluée à basse (20 eV) (Fig. 26) et à haute énergie de collision (4 keV) (Fig. 27) à partir des précurseurs  $[M+Li]^+$  et  $[M+K]^+$  de l'isomère D précédent.

Il apparaît tout d'abord qu'à basse énergie de collision, le rendement de dissociation est supérieur avec le lithium. Une question se pose alors : la plus faible intensité de fragmentation sur les spectres CAD du précurseur  $[M+K]^+$  est-elle due comme le présume **Laine et al.** (1991) à une plus forte stabilité des interactions oligosaccharides- $K^+$  ? Probablement pas puisque nous avons précédemment montré que le lithium présentait une affinité relative supérieure à celle du  $K^+$ . Il s'agit en réalité d'une simple réaction compétitive entre la dissociation de l'oligosaccharide et la formation de l'ion métal. Cette dernière est d'autant plus favorisée que la taille du cation augmente en raison d'une diminution de son enthalpie de libération (**Dzidic et Kebarle 1970**). L'équilibre est alors déplacé dans le sens :



C'est d'ailleurs ce qui peut être observé sur les spectres de CAD

de peptides cationisés (Teesch et Adams 1991). En outre, nous pouvons supposer qu'une interaction cation-liaison glycosidique sera plus stabilisante qu'une coordination cation-oxygènes périphériques.

A haute énergie, cette hypothèse de coordination au niveau des oxygènes périphériques supporte également le contraste entre les abondances relatives des fragments dans la gamme de masse 100-400 sur les spectres  $[M+K]^+$  et  $[M+Li]^+$ . Les intensités des ions y apparaissent à l'évidence beaucoup plus importantes dans le cas du lithium. Ainsi, le  $K^+$  complexé au niveau de motifs di- ou trisaccharidiques empêcherait la formation de fragments correspondant aux monosaccharides en position terminale réductrice ou non-réductrice. De même, ce cation ne pourrait être suffisamment stabilisé si ces fragmentations avaient lieu. Par contre, une stabilisation du  $Li^+$  au niveau de la liaison glycosidique offre l'opportunité de telles ruptures.

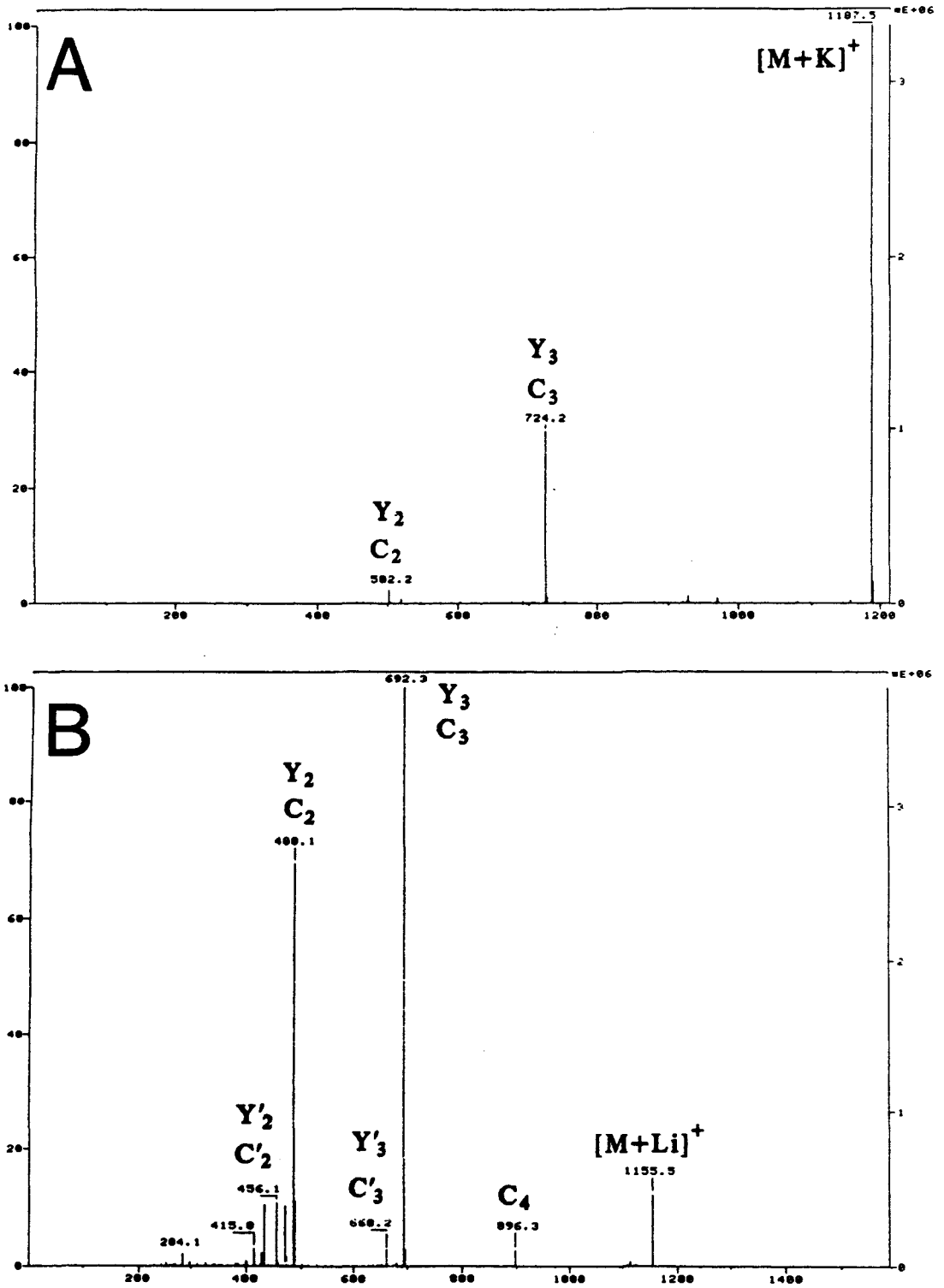


Figure 26 : Spectres de CAD des ions précurseurs  $[M+K]^+$  (A) et  $[M+Li]^+$  (B) de l'isomère D perméthylé obtenus à 20 eV d'énergie de collision.

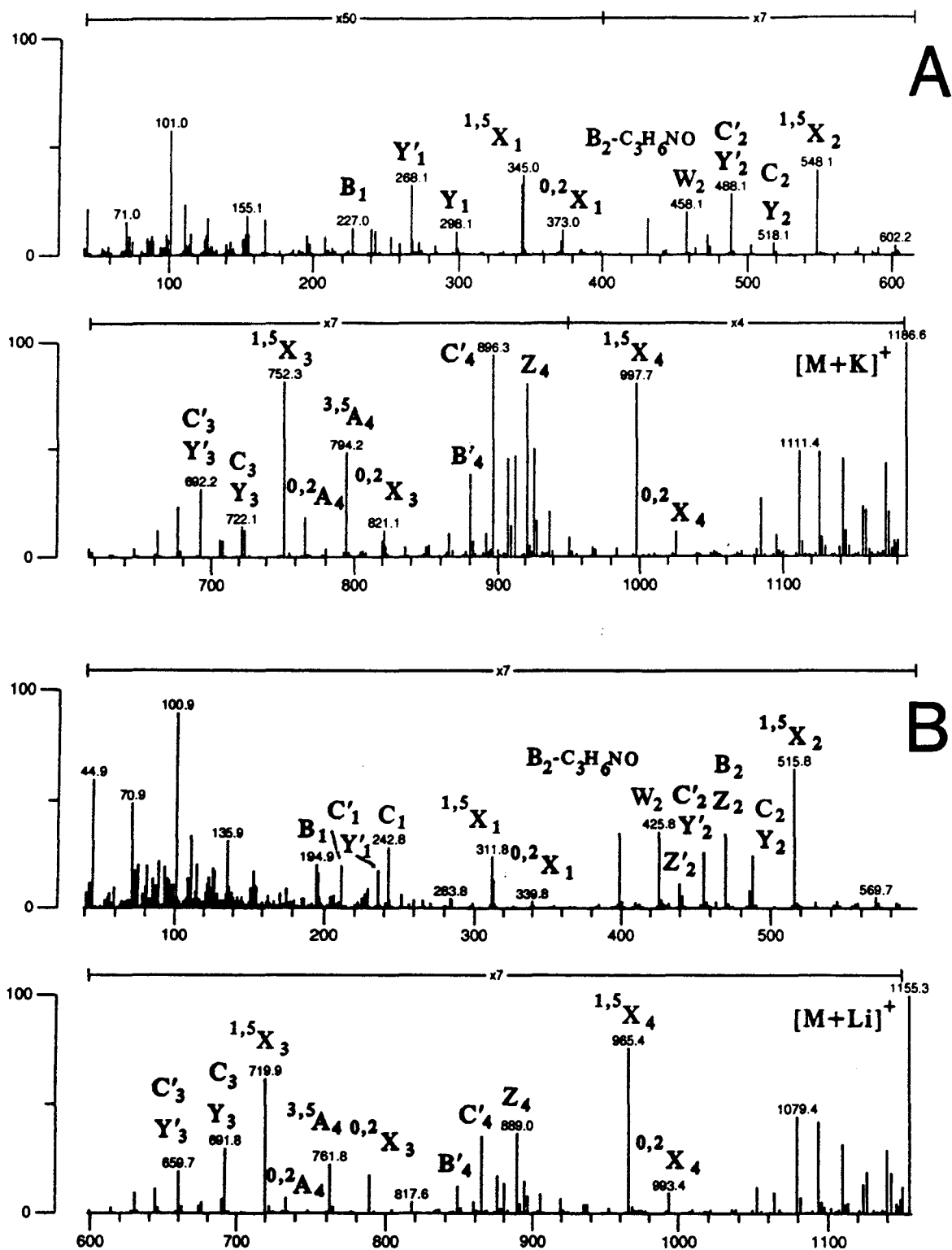


Figure 27 : Spectres de CAD des ions précurseurs  $[M+K]^+$  (A) et  $[M+Li]^+$  (B) de l'isomère D perméthylé obtenus à 4 keV d'énergie de collision avec de l'argon comme gaz cible.

*II-3 Publication n°3*

De manière similaire nous avons évalué le potentiel analytique de la CAD des ions  $[M+Na]^+$  d'oligosaccharide-alditols obtenus par  $\beta$ -élimination de différentes mucines. Les résultats sont regroupés dans la publication (soumise) suivante :



COLLISION INDUCED DISSOCIATION TANDEM MASS  
SPECTROMETRY OF  $[M+Na]^+$  ION OF PERMETHYLATED  
O-GLYCAN-ALDITOLS : IDENTIFICATION OF THE 3,6  
BRANCHING POINTS AND OTHER LINKAGE POSITIONS.

Jérôme LEMOINE and Bernard FOURNET\*

Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Mixte de Recherches du  
C.N.R.S. n°111), Université des Sciences et Technologies de Lille,  
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

\* To whom correspondence should be addressed.

## SUMMARY

High energy collision induced dissociation tandem mass spectrometry was carried out on the  $[M+Na]^+$  ion of permethylated O-glycan-alditols released from hen ovomucin and swallow nest mucin by reductive  $\beta$ -elimination. The CID spectra exhibit exclusively sodiated product ions. Beside the classical ruptures at the glycosidic linkage, specific ions arising from cleavages of the N-acetylhexosaminitol residue allow to distinguish the 1-3 from the 1-6 branch. Moreover, other binding positions between the different constitutive monosaccharides may also be deduced according to diagnostic peaks originating from cleavages within the sugar ring.

## INTRODUCTION

The long lasting interest in the structural determination has been recently revived outside this specialized field when faced with the problem of glycan similarities of recombinant protein with those of the original protein.

NMR and mass spectrometry are today the methods of choice for such structural investigations. Concerning the latter, two techniques are mainly used : the GC-MS coupling for the analysis of the partially acetylated methyl ether derivatives which yields the substitution positions and the FAB ionization, combined or not with the tandem mass spectrometry, which gives the molecular weight as well as the sequence and branching pattern. In addition, many recent papers have related the use of MS-MS to identify the linkage positions in oligosaccharides, either native [1-7], native and alkali metal cationized [8-10], or derivatized [11-14]. An approach conjugating trifluoroacetylation, periodic oxidation and peracetylation by Lipniunas et al. gave also interesting results for the structural investigations of high mannose glycans [15].

In the last decade, many reseachers have reported the use of alkali metal ion in complexes of biological samples like fatty acids, prostaglandins, peptides to improve the structural informations in tandem mass spectrometry studies [on a review, see reference 16]. Similarly, the CID of the  $[M+Na]^+$  ion of permethylated oligosaccharides appears to be a powerful method to identify from a single spectrum many linkage positions on the basis of ions arising from cleavages within the sugar ring [17]. In addition, this method is especially attractive because of the marked increase of the molecular ion response obtained by enhancement of the solubility in the FAB matrix and the great stability of sodiated ions. So, even if the methylation procedure

is somewhat tedious, it cannot constitute an additional step since it is anyway necessary for the analysis of methyl ether monosaccharides by GC-MS.

In the present paper, we have applied this technique for the structural characterization of O-linked glycans released by reductive  $\beta$ -elimination from ovomucin and swallow nest mucin. Thus, ions originating from cleavages of the reduced HexNAc-ol allow to discriminate between the 1-3 and 1-6 branches. At the same time, other linkage positions, and through one example, the position of a sulfate group, may also be deduced from the CID mass spectrum.

The data and method described in this report will be applicable to all similar structural investigations performed on related materials.

## MATERIALS AND METHODS

Materials. The oligosaccharide-alditols were released from hen ovomucin and Collocalia swallow nest mucin by reductive  $\beta$ -elimination [18,19], then purified according to reference [20]. The O-glycans were permethylated according to the method of Ciucanu and Kerek [21]. The permethylated sulfated oligosaccharide was purified and desalted on a Sephadex LH 20 column using a chloroform/methanol 1:1 solvent. For each CID experiment, 5 $\mu$ g of permethylated sugar were mixed with approximately 2 $\mu$ l of 0.5 molar NaI in 1:1 thioglycerol/glycerol.

Oligosaccharide-alditols purified from hen ovomucin :

- NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc-ol (structure 1)
- Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc-ol (structure 2)
- NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)[GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol (structure 3)
- Gal( $\beta$ 1-3)[Gal( $\beta$ 1-4)(6SO<sub>3</sub>H)GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol (structure 6)

Oligosaccharide-alditol isolated from Collocalia swallow nest mucin :

- NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal[Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol (structure 4)
- NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol (structure 5)

Mass Spectrometry. The high energy CID spectra were acquired on a 4-sector Kratos Concept II HH mass spectrometer of EBEB geometry (Kratos Manchester, England). The ions were produced by 8keV Xenon atoms using an ion Tech FAB gun, then accelerated with a voltage of 8kV. The molecular ions were mass selected at unit mass resolution in MSI and subjected to collision with argon gas in the collision cell floating at 4kV above ground potential. The CID spectra were acquired by linked scanning of E<sub>2</sub> and B<sub>2</sub> under the control of the DS90 data system, each of them representing the average of 8 to 10 scans.

## RESULTS AND DISCUSSION

As previously mentioned by Dell [22,23], FAB-MS of derivatized oligosaccharides, by means of peracetylation or permethylation, offers many advantages in comparison to the native forms : greater sensitivity, unambiguous fragment ions that yields precious information on the sequence and branching pattern.

The fragmentation behavior of cationized molecular ions of permethylated oligosaccharides greatly differs from that of the protonated species, suggesting that different types of activation and binding interactions occurs as a result of the alkali metal attachment. We have especially shown [17] that under specific experimental conditions such as high energy CID and heavy collision gas like argon, the CID of sodiated molecular ion of reducing permethylated N-glycans leads to two distinct decomposition pathways within the sugar ring. Pathway A is predominant compared to B one (Fig. 1). It means that each type of linkage may be identified according to cationized "diagnostic" peaks.

The aim of the present work was to extend the method to methyl ether derivatives of branched O-glycans-alditols released from mucines in reducing alkaline conditions. For clarity, we will use the nomenclature of Domon and Costello to label the product ions [24], however with some additional modifications. The B', C', Y' and Z' labellings correspond to the B, C, Y and Z fragmentations with loss of a methoxyl group. The W ion, which has been previously described [17], originates from breaking between the C<sub>5</sub> and C<sub>6</sub> with a methoxyl elimination. The eliminated carbons from alditol part by Y and Z type cleavages are also precised (i.e. Y-C<sub>1</sub>C<sub>2</sub>).

The comparison between the CID spectra of the linear compound 1 (Fig.2) and the 3,6 branched compound 2 (Fig.3) gives us a starting point to describe the fragmentation behavior of the branched and reduced oligosaccharides. Since isomeric ions are produced by cleavage at the glycosidic linkage in this method, the  $^{1,5}X$  fragments constitute an unambiguous mark to get the sequence. On Figure 2, the  $^{1,5}X$  ions at  $m/z$  344 and 606 reveal a NeuAc-Hex-HexNAc-ol sequence whereas the occurrence in Figure 3 of  $^{1,5}X$  ions at  $m/z$  606 and 705 reflect an HexNAc-ol substituted by a Hex and a NeuAc respectively. Except the  $^{1,5}X_{1\alpha}$  and  $^{0,2}X_{1\alpha}$  fragments at  $m/z$  606 and 604, many ions originating from cleavages in the HexNAc-ol residue are present in the 540 to 670 mass range. Among these fragments, one is especially useful since it cannot be isomeric with any type of breakage occurring at the glycosidic linkage. This ion, here at  $m/z$  546, corresponds to the elimination of the C1 and C2 carbons of the reduced monosaccharide by loss of the C3 linked substituent to form a carbonyl ion. Thus, by difference of mass with the molecular ion, we get access to the structure of both the 6 and consequently the 3 branches. Since only 3,6 substitutions were described for the structure of O-linked glycans until now, we have obviously a powerful tool to discriminate between these two branching points.

The glycan 3 was similarly subjected to CID giving the spectrum presented in figure 4. We obtain at once the sequence from the  $^{1,5}X_{1\alpha}$  fragment at  $m/z$  589, characteristic of the HexNAc-ol substituted by an HexNAc on one branch, and from an intense  $^{1,5}X_{1\beta}$  ion at  $m/z$  909 that suggests, if correlated with the  $^{1,5}X_{2\alpha}$  product ion at  $m/z$  851, a branch carrying a NeuAc-Hex sequence. The occurrence of the previously described carbonyl ion at  $m/z$  430 indicates that the 6 branch corresponds to the HexNAc residue, and thereby locates the NeuAc-Hex on the 3 branch. Finally, two indications give us the

substitution position of the Hex by NeuAc. Like in all spectra presented here, we observe an intense  $C'_{1\alpha}$  (loss of a carboxymethyl group) ion at  $m/z$  356 for which we have already mentioned that it was greatly enhanced in the case of the 2-3 by comparison with the 2-6 linkage [25]. Moreover, we have to notice more especially the presence of a  $^{1,3}A_2$  diagnostic fragment at  $m/z$  472.

These kinds of diagnostic ions are also found on the CID spectrum of the pentasaccharide 4 (Fig. 5). Thus the  $^{1,3}A_{2\alpha}$  at  $m/z$  472 product fragment characterizes again a 2-3 linked sialic acid, whereas the  $^{3,5}A_{2\beta}$  ion identifies specifically the substitution at the C-4 position of HexNAc by a Hex. On the basis of these peaks, the determination of the branching pattern becomes easy since the  $^{1,5}X$  ions at  $m/z$  793 and 909 identify Hex-HexNAc-HexNAc-ol and NeuAc-Hex-HexNAc-ol sequences respectively. The carbonyl fragment  $Y_{1\alpha}-C_1C_2$  at  $m/z$  634 indicates that the Hex-HexNAc sequence is 6-branched and consequently the NeuAc-Hex sequence is 3 branched.

To finish with the sialylated O-glycans, we have applied the method to a disialylated hexasaccharide (structure 5) whose CID spectrum is given in figure 6. The occurrence of a  $^{3,5}A_{3\alpha}$  ion at  $m/z$  690 is here specific of a 4-linked NeuAc-Hex. The great intensity of the ion at  $m/z$  356 suggest to us that at least one sialic acid is 2-3 linked although we cannot detect with certainty any  $^{1,3}A_{2\alpha\text{or}\beta}$  fragment that would be characteristic of this linkage. On the other hand, we do not detect  $^{3,5}A_{2\alpha\text{or}\beta}$  ion at  $m/z$  486 nor  $W_{2\alpha}$  or  $W_{1\beta}$  fragment at 1268 that would be specific of 2-6 linkage as previously reported [17]. Nevertheless, the discrimination between the two branches appears unambiguous since the presence of a carbonyl ion at  $m/z$  995 reveals the NeuAc-Hex-HexNAc sequence linked on position 6. Consequently we may locate the NeuAc-Hex sequence deduced from the  $^{1,5}X_{1\alpha}$  at  $m/z$  909, on carbon 3.



One sulfated O-glycan (structure 6) was also studied by this technique except that, in this case, the disodiated molecular ion  $[M+2Na-H]^+$  was selected in the first mass spectrometer instead of the  $[M+Na]^+$  ion (Fig. 7). It means that the acidic oxygen of the sulfate group is not methyl esterified but cationized. Of course this difference does not affect the fragmentation behavior since this additional cation is closely located on the sulfate group. Thus, the  $^{1,5}X$  fragments may be the basis of the sequence determination, like the ion at  $m/z$  548 which is specific of an hexose on one branch. The fragment at  $m/z$  881 corresponds to a sulfated Hex-HexNAc-HexNAc-ol sequence if combined with the  $^{0,2}X_{1\alpha}$  ion at  $m/z$  617 : a shift of mass of 69 uma between  $^{1,5}X$  and  $^{0,2}X$  fragments is consistent with an HexNAc residue. Moreover, the sulfate is not located on the non reducing end Hex due to the presence of  $B_{1\alpha}$  ( $m/z$  241) or  $C_{1\alpha}$  ( $m/z$  259) corresponding to neutral Hex but on the HexNAc residue as proved by a  $C'_{2\alpha}$  fragment at  $m/z$  560. More precisely, the occurrence of a  $^{3,5}A_{2\alpha}$  ion at  $m/z$  417 demonstrates that this sulfate is linked to carbon 6, otherwise a 6 linked Hex to HexNAc would lead to a W fragment at  $m/z$  703.

## CONCLUSION

The method and applications described in this paper appears obviously as an interesting and alternative tool for those who are used to perform collision on  $[M+H]^+$  precursor ion since CID of the  $[M+Na]^+$  ion of permethylated oligosaccharides, not only gives the glycosidic sequence, but also provides informations on the linkage positions. Applied here to reduced O-glycans, it provides a powerful tool to discriminate between the 1,3 and 1,6-branching points as well as to identify the other binding positions. By comparison with other methods using native oligosaccharides, the use of permethylated cationized samples to perform CID displays not only higher sensitivity, but also a wider range of applications. Indeed, we have shown that this method was able to distinguish the Man(1-3)Man and Man(1-6)Man branches of the common core of the N-glycans. Compared to the technique describes by Lipniunas et al. [15] for high mannose glycans, we do not get partial degradation of sialic acid and the single derivatization step avoids too much loss of material and the possibility of unfully chemical reactions.

The use of tandem mass spectrometry is also really noticeable requiring less purification steps, as a single mass is selected in the first mass spectrometer

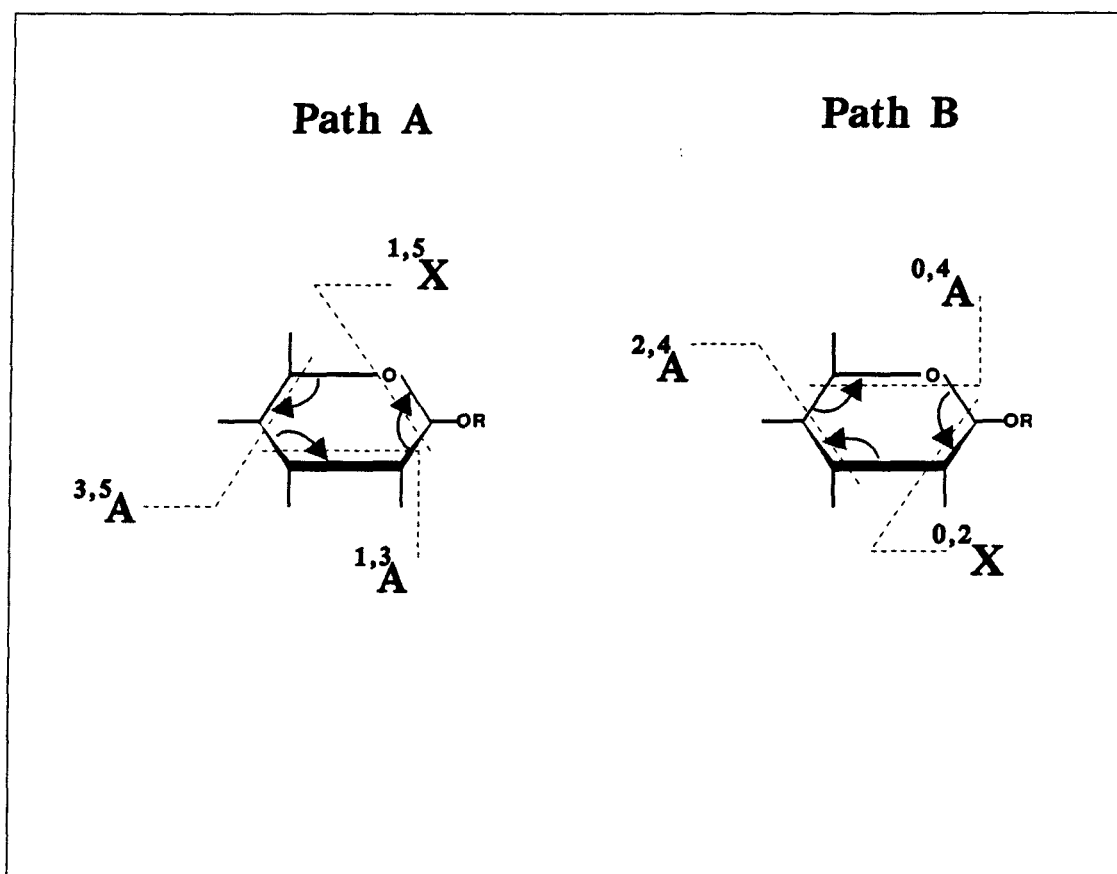
### **Acknowledgments**

This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité mixte de Recherche N°111, Directeur : Professeur A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille. The authors thank Doctor Gérard Strecker for providing the oligosaccharide samples, and Yves Leroy and Guy Ricart for skilfull help.

## REFERENCES

1. Carr, S.A.; Reinhold, V.N.; Green, B.N.; Hass, J.R. Biomed. Environ. Mass Spectrom. **1985**, 12, 288-295.
2. Gillece-Castro, B.; Burlingame, A.L. In Methods in Enzymology; McCloskey, J.A., Ed.; Academic Press : San Diego, California, **1990**, 193, p. 689.
3. Laine, R.A.; Pamidimukkala, K.M.; French, A.D.; Hall, R.W.; Abbas, S.A.; Jain, R.K.; Matta, K.L. J. Am. Chem. Soc. **1988**, 110, 6931-6939.
4. Garozzo, D.; Giuffrida, M.; Impallomeni, G.; Ballistreri, A.; Montaudo, G. Anal. Chem. **1990**, 62, 279-286.
5. Garozzo, D.; Impallomeni, G.; Montaudo, G.; Spina, E. Rapid Commun. Mass Spectrom. **1992**, 6, 550-552.
6. Laine, R.A.; Yoon, E.; Mahier, T.J.; Abbas, S.; De Lappe, B.; Jain, R.; Matta, K. Biol. Mass Spectrom. **1991**, 20, 505-514.
7. Laine, R.A. In Methods in Enzymology; Ginsburg, V., Ed.; Academic Press : San Diego, California, **1989**, 179, p. 157.
8. Orlando, R.; Bush, C.A.; Fenselau, C. Biomed. Environ. Mass Spectrom. **1990**, 19, 747-754.
9. Hofmeister, G.E.; Zhou, Z.; Leary, J.A. J. Am. Chem. Soc. **1991**, 113, 5964-5970.
10. Zhou, Z.; Ogden, S.; Leary, J.A. J. Org. Chem. **1990**, 55, 5444-5446.
11. Domon, B.; Müller, D.R.; Richter, W.J. Org. Mass Spectrom. **1989**, 24, 357-359.
12. Müller, D.R.; Domon, B.; Richter, W.J. In Advances Mass Spectrometry; Longevialle, P., Ed; Heyden & Son Ltd, London, **1989**, 11, p. 1309.

13. Domon, B.; Müller, D.R.; Richter, W.J. Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1990, 19, 390-392.
14. Richter, W.J.; Müller, D.R.; Domon, B. In Methods in Enzymology; McCloskey, J.A., Ed.; Academic Press : San Diego, California, 1990, 193, p. 607.
15. Lipniunas, P.; Angel, A.S.; Erlansson, K.; Lindh, F.; Nilsson, B. Anal. Biochem. 1992, 200, 58-67.
16. Teesch, L. M.; Adams, J. Org. Mass Spectrom. 1992, 27, 931-943.
17. Lemoine, J.; Despeyroux, D. Jennings, K.R.; Rosenberg, R.; De Hoffmann, E.; Fournet, B. J. Am. Soc. Mass Spectrom. in press.
18. Wieruszeski, J.M.; Michalski, J.C.; Montreuil, J.; Strecker, G.; Peter-Katalinic, J. Egge, H.; Van HalbeeK, H.; Mutsears, J.H.; Vliengenthart J.F. J. Biol. Chem. 1987, 262, 6650-6657.
19. Strecker, G.; Wieruszeski, J.M.; Martel, C.; Montreuil, J. Carbohydr. Res. 1989, 185, 1-13.
20. Strecker, G.; Wieruszeski, J.M.; Cuvillier, O.; Michalski, J.M.; Montreuil, J. Biochimie, 1992, 74, 39-52.
21. Ciucanu, I.; Kerek, F. Carbohydr. Res. 1984, 131, 209-217.
22. Dell, A. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1987, 45, 19-72.
23. Dell, A. In Methods in Enzymology; McCloskey, J.A., Ed.; Academic Press : San Diego, California, 1990, 193, p. 647.
24. Domon, B.; Costello, C.E. Glycoconjugate J. 1988, 5, 397-409.
25. Lemoine, J.; Strecker, G.; Leroy, Y.; Ricart, G.; Fournet, B. Carbohydr. Res., 1991, 221, 209-217.



*Figure 1 : Decomposition pathways leading to the observed ions arising from multiple bond cleavages within the sugar ring.*

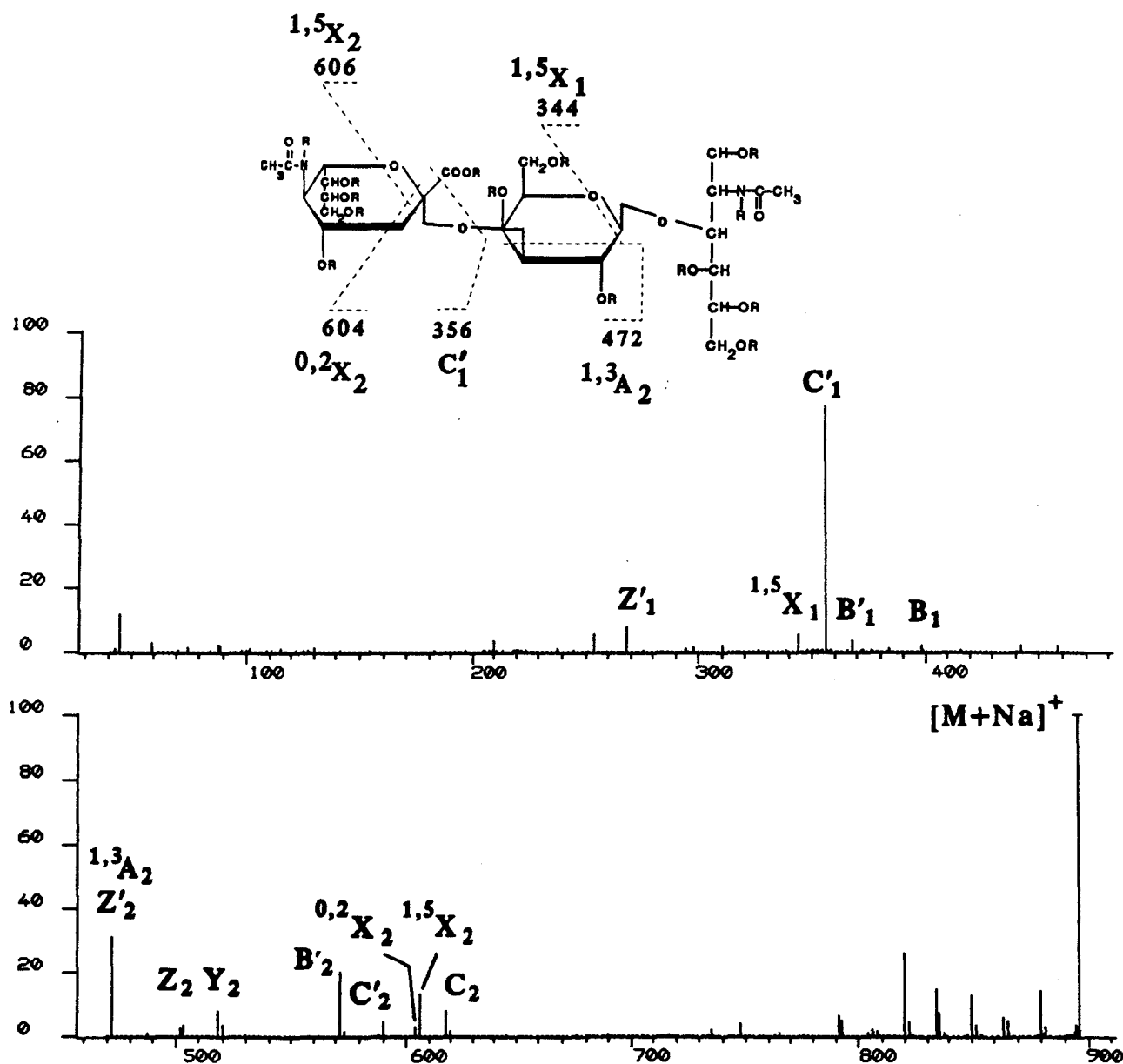


Figure 2 : CID spectrum of the  $[M+Na]^+$  ion of permethylated structure 1 obtained at 4 keV collision energy and with argon as the collision gas.

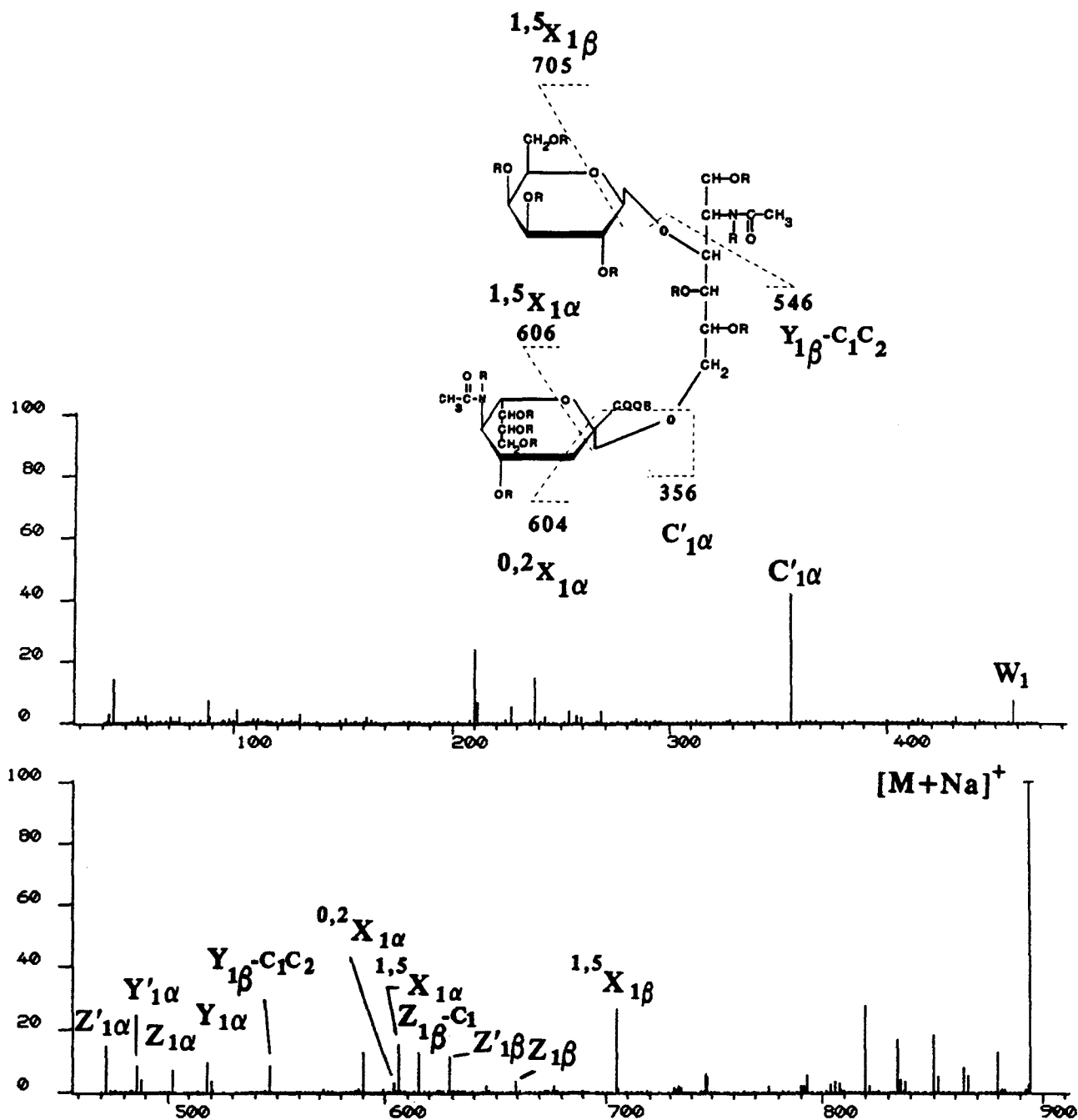


Figure 3 : CID spectrum of the  $[M+Na]^+$  ion of permethylated structure 2 obtained at 4 keV collision energy and with argon as the collision gas.



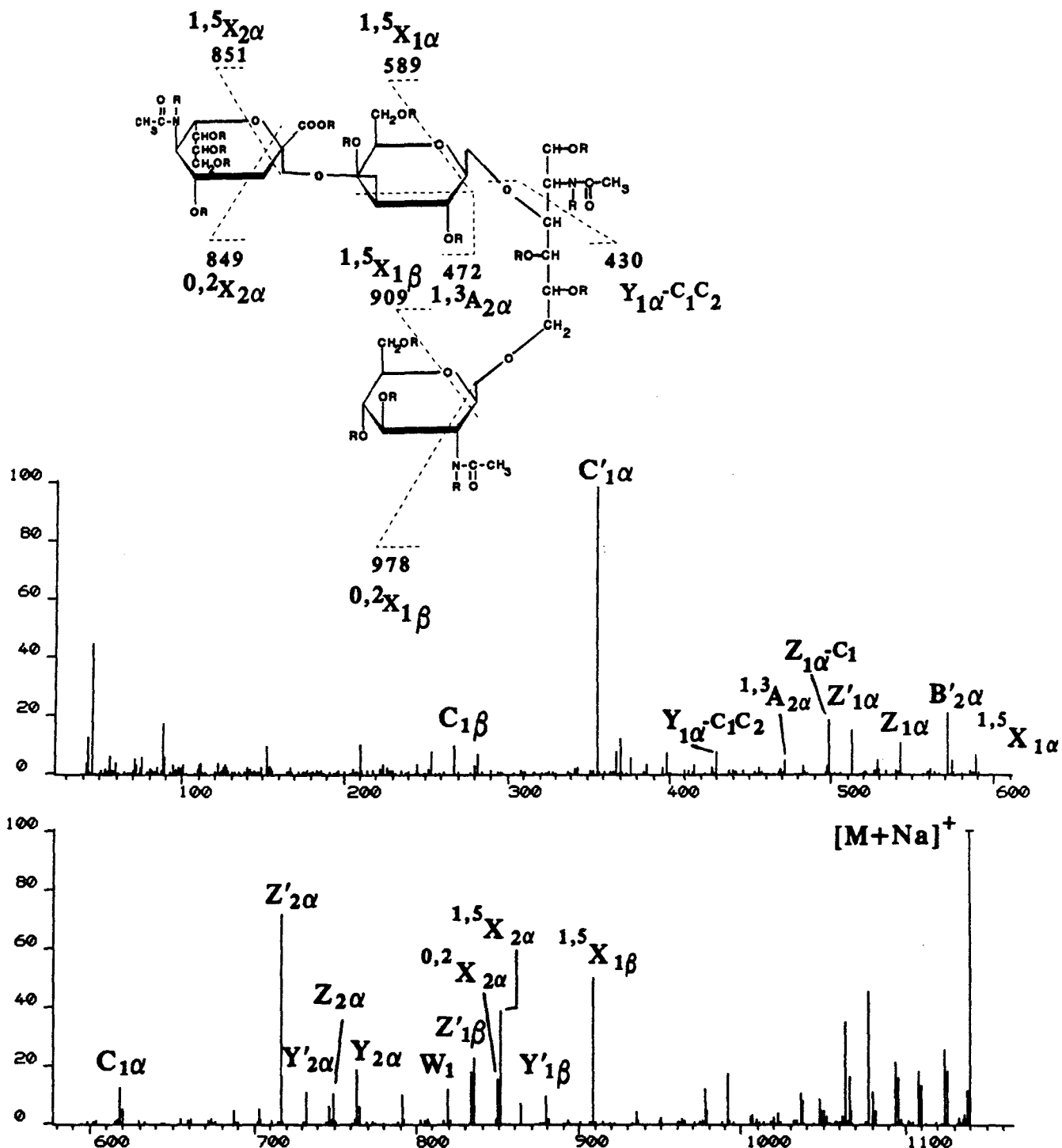


Figure 4 : CID spectrum of the  $[M+Na]^+$  ion of permethylated structure 3 obtained at 4 keV collision energy and with argon as the collision gas.

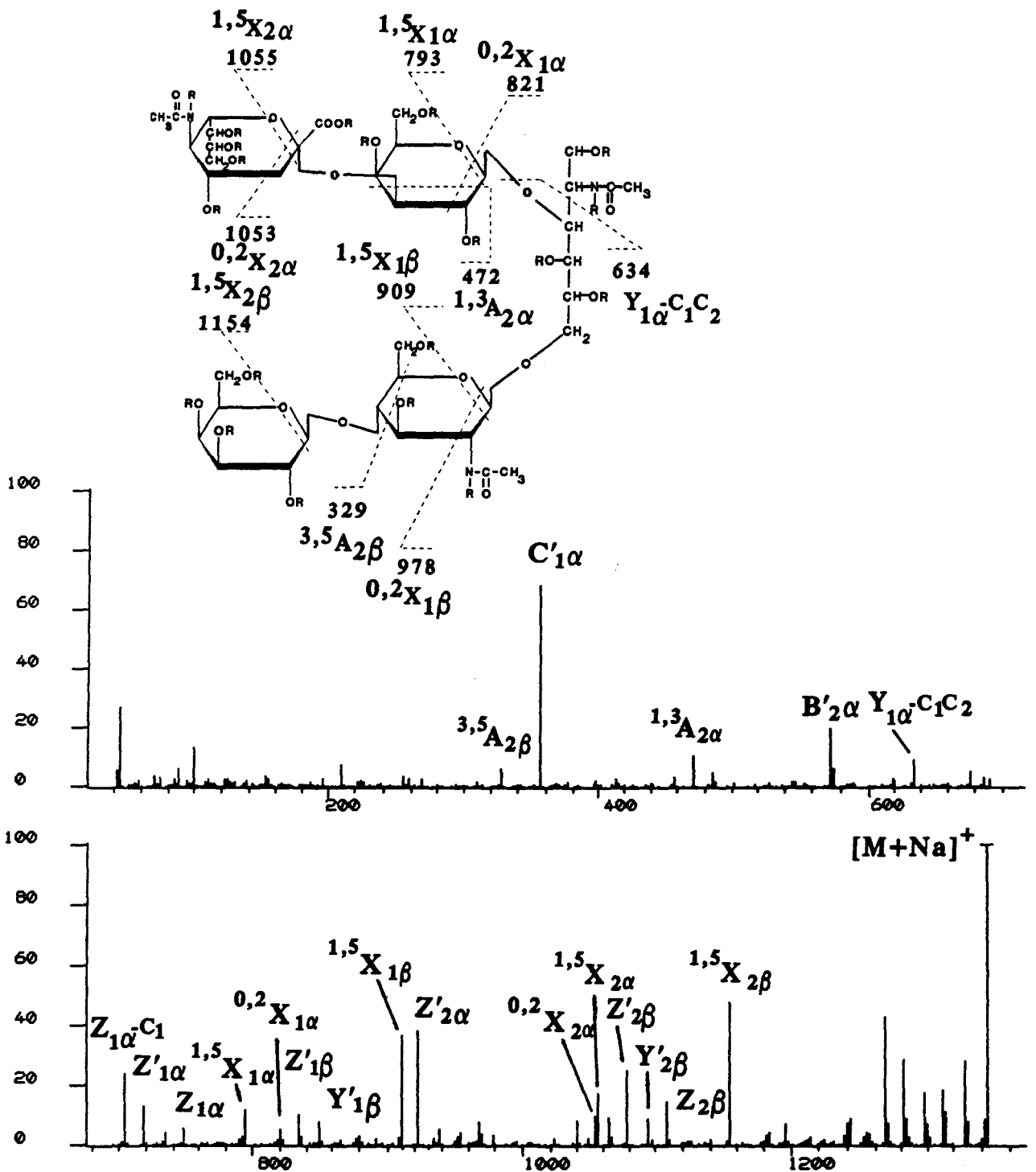


Figure 5 : CID spectrum of the  $[M+Na]^+$  ion of permethylated structure 4 obtained at 4 keV collision energy and with argon as the collision gas.

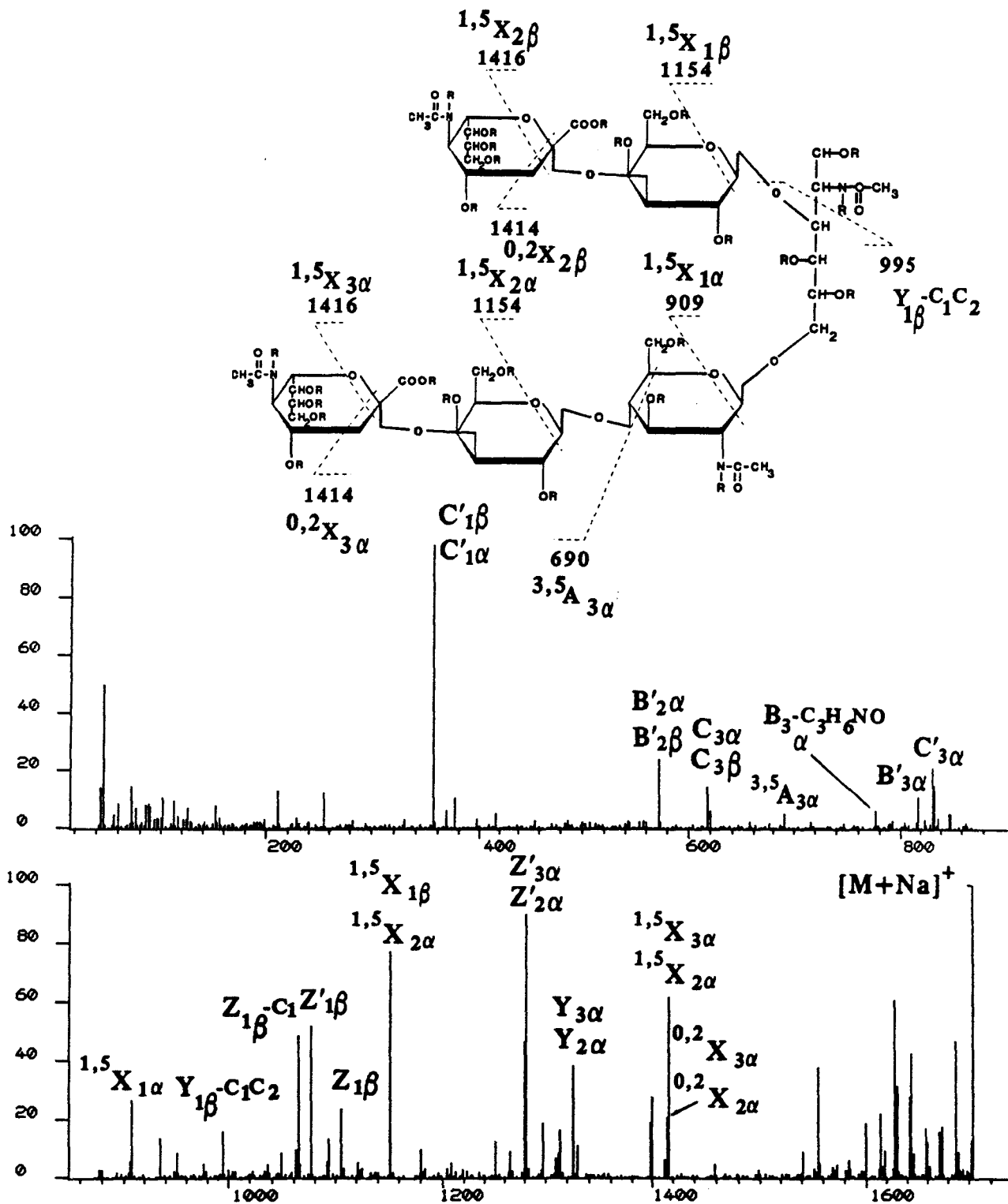


Figure 6 : CID spectrum of the  $[M+Na]^+$  ion of permethylated structure 5 obtained at 4 keV collision energy and with argon as the collision gas.

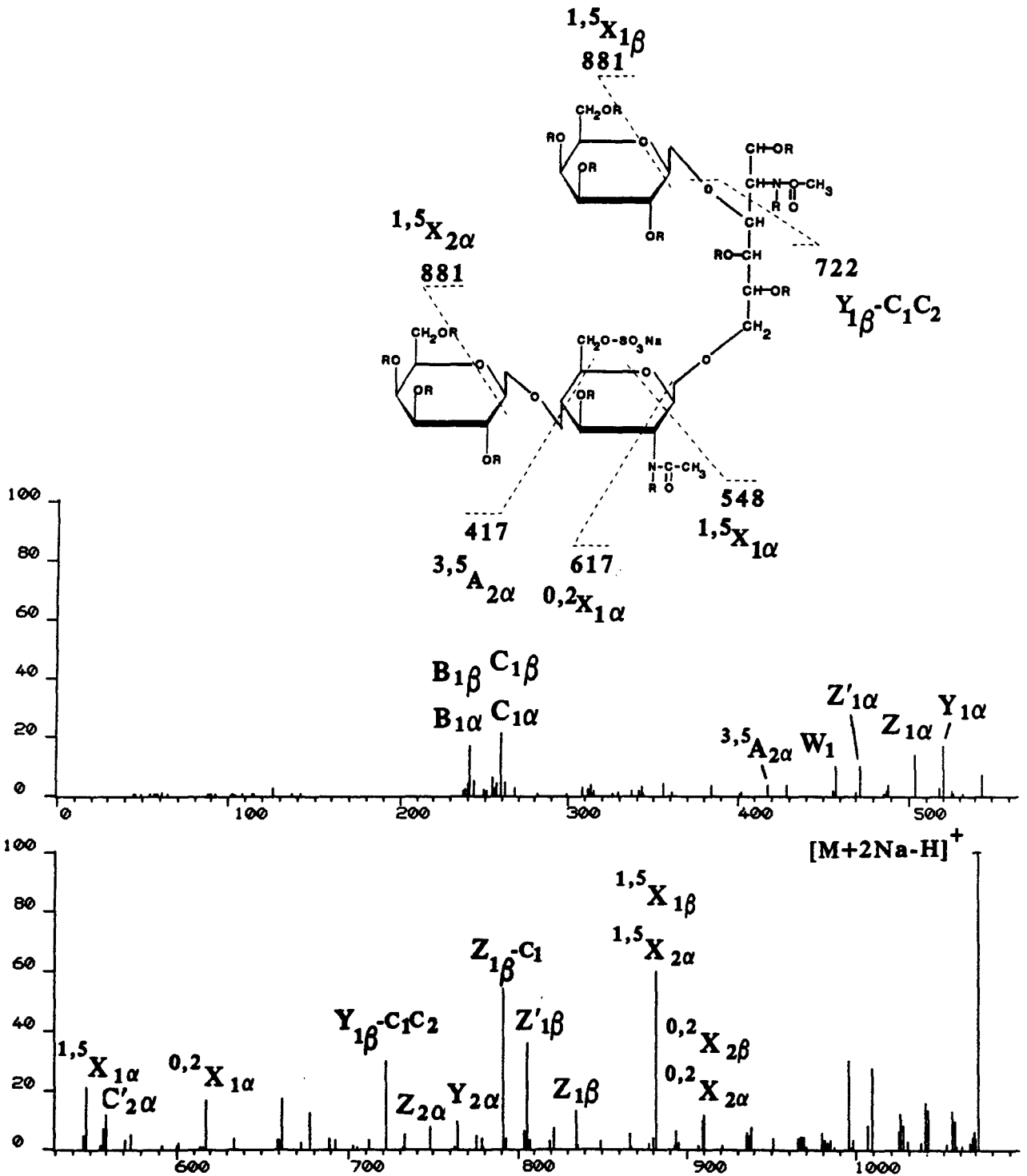


Figure 7 : CID spectrum of the  $[M+2Na-H]^+$  ion of permethylated structure 6 obtained at 4 keV collision energy and with argon as the collision gas.

## CONCLUSION GENERALE

A la lecture de ces travaux, nous espérons vivement avoir convaincu le lecteur de l'intérêt analytique que représente la dissociation activée par collision des ions  $[M + \text{métal alcalin}]^+$ , en raison des divers avantages qui auront pu être entrevus :

- l'abondance de l'ion pseudo-moléculaire augmente avec des oligosaccharides perméthylés et en présence d'ions  $\text{Na}^+$ .

- à haute énergie de collision, apparaissent des ions qui proviennent de clivages intra-cycliques et qui sont nettement favorisés par l'emploi de gaz de collision plus lourds que l'hélium tel que l'argon. Ces ions sont caractéristiques de l'isomérisation de liaison et nous permettent donc de distinguer les points de branchement 1-2, 1-3 (2-3), 1-4 et 1-6 (2-6). Par contre, la collision à basse énergie n'engendre pas ce type de fragmentation.

Concernant les mécanismes de dissociation, nous suspectons fortement qu'une fraction des ions produits par CAD seraient formés par charge remote fragmentation. A ce titre, une preuve formelle pourrait être apportée par des études de collision sur des ions de seconde génération en MS-MS-MS, ce que nous envisageons rapidement d'effectuer.

Nous avons par ailleurs démontré que les affinités relatives des cations étaient inversement proportionnelles à leurs tailles, et que pour un même cation, cette affinité était conditionnée par la structure spatiale de l'oligosaccharide. Ces résultats, il est vrai encore fragmentaires, laissent présager de sites de cationisation préférentiels, tributaires de l'organisation tridimensionnelle de la structure glucidique.

Dans cette optique, nous allons entreprendre des études de modélisation moléculaire et de résonance magnétique nucléaire afin d'établir, si possible, une corrélation avec les résultats de spectrométrie de masse.

*Références bibliographiques*

**Adams J. Gross M.L.**

*Energy requirements for remote charge site ion decompositions and structural information from collisional activation of alkali metal cationized fatty alcohols.*

J. Am. Chem Soc. 108 (1986) 6915-6921.

**Adams J.**

*Charge-remote fragmentations : analytical applications and fundamentals studies.*

Mass Spectrom. Rev. 9 (1990) 141-186.

**Angel A.S., Lindh F. and Nilsson B.**

*Determination of binding positions in oligosaccharides and glycosphingolipids by fast-atom-bombardment-mass spectrometry.*

Carbohydr. Res. 168 (1987) 15-31.

**Angel A.S. and Nilsson B.**

*Analysis of glycoprotein oligosaccharides by fast atom bombardment mass spectrometry.*

Biomed. Environ. Mass Spectrom. 19 (1990) 721-730.

**Angel A.S., Lipniunas P., Erlansson K. and Nilsson B.**

*A procedure for the analysis by mass spectrometry of the structure of oligosaccharides from high-mannose glycoproteins.*

Carbohydr. Res. 221 (1991) 17-35.

**Angyal S.J. and James K.**

*Oxidation of carbohydrates with chromium trioxide in acetic acid.*

Aus. J. Chem. 23 (1970) 1209-1221.

**Balasanmugam K. and Miller J.M.**

*Use of fast atom bombardment mass spectrometry for the characterization of nitroaromatic isomers.*

Org. Mass Spectrom. 23 (1988) 267-273.

**Baldwin M.A., Welham K.J., Toth I. and Gibbons W.A.**

*Hydride abstraction in fast atom bombardment.*

Org. Mass Spectrom. 23 (1988) 697-699.



**Baldwin M.A., Stahl N., Reinders L.G., Gibson B.W., Prusiner S.B. and Burlingame A.L.**

*Permethylation and tandem mass spectrometry of oligosaccharides having free hexosamine : analysis of the glycoinositol phospholipid anchor glycan from the scrapie prion protein.*

Anal. Biochem. 191 (1990) 174-182.

**Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D. and Tyler A.N.**

*Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry.*

Nature 293 (1981) 270-275.

**Blakeney A.B. and Stone B.A.**

*Methylation of carbohydrates with lithium methylsulfinyl carbanion.*

Carbohydr. Res. 140 (1985) 319-324.

**Bojesen G.**

*The order of proton affinities of the 20 common L-alpha-amino acids.*

J. Am. Chem Soc. 109 (1987) 5557-5558.

**Bordas-Nagy J., Despeyroux D. and Jennings K.R.**

*Comparison of helium and argon as collision gases in the high energy collision-induced decomposition of  $MH^+$  ions of peptides.*

J. Am. Soc. Mass Spectrom. 3 (1992a) 502-514.

**Bordas-Nagy J., Despeyroux D., Jennings K.R. and Gaskell S.J.**

*Experimental aspects of the collision-induced decomposition of ions in a four-sector tandem mass spectrometer.*

Org. Mass Spectrom. 27 (1992b) 406-415.

**Bosso C., Defaye J., Heyraud A. and Ulrich J.**

*Fast atom bombardment mass spectrometry for the characterization of cello- and malto-oligosaccharides.*

Carbohydr. Res. 125 (1984) 309-317.

**Boyd R.K.**

*Scan laws for tandem mass spectrometry using a floated gas collision cell.*

Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 75 (1987) 243-264.

**Carr S.A., Reinhold V. N., Green B.N. and Hass J.R.**

*Enhancement of structural information in FAB ionized carbohydrates samples by neutral gas collision.*

Biomed. Mass Spectrom. 12 (1985) 288-295.

**Carr S.A., Green B.N., Hemling M.E., Roberts G.D., Anderreg R.J. and Vickers R.**

*Sequence analysis of macromolecules by tandem magnetic deflection mass spectrometry.*

in Proceedings of the 35<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, (1987) p. 830.

**Chai W., Cashmore G.C., Stoll M.S., Gaskell S.J., Orkiszewski R.S. and Lawson A.M.**

*Oligosaccharide sequence determination using B/E linked field scanning or tandem mass spectrometry of phosphatidylethanolamine derivatives.*

Biol. Mass Spectrom. 20 (1991) 313-323.

**Childs R.A., Drickamer K., Kawasaki T., Thiel S., Mizuochi T. and Feizi T.**

*Neoglycolipids as probes of oligosaccharide recognition by recombinant and natural mannose-binding proteins of the rat and man.*

Biochem. J. 262 (1989) 131-138.

**Ciucanu I. and Kerek F.**

*A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates.*

Carbohydr. Res. 41 (1975) 235-239.

**Coles E., Reinhold V.N. and Carr S.A.**

*Fluorescent labeling of carbohydrates and analysis by liquid chromatography. comparison of derivatives using mannosidosis oligosaccharides.*

Carbohydr. Res. 139 (1985) 1-11.

**Cooks R.G. and Kruger T.L.**

*Intrinsic basicity determination using metastable ions.*

J. Am. Chem. Soc. 99 (1977) 1279-1281.

**Curtis J.M., Rong L.S., Milberg R.M. and Rinehart K.L.**

*The effect of collision gas and gas mixtures on daughter ion spectra of peptides using a tandem double-focusing mass spectrometer.*

in Proceedings of the 36<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Francisco, (1988) p. 147.

**Dallinga J.W. and Heerma W.**

*Reaction mechanism and fragment ion structure determination of deprotonated small oligosaccharides, studied by negative ion fast atom bombardment (tandem) mass spectrometry.*

Biol. Mass Spectrom. 20 (1991) 215-231.

**Darvill A.G., McNeil M. and Albersheim P.**

*Structure of plant cell walls*

Plant Physiol. 62 (1978) 418-422.

**Dawson P.H. and Douglas D.J.**

*Collisionally activated dissociation of low kinetic energy ions.*

in Tandem Mass Spectrometry, ed. F.W. McLafferty, John Wiley and Sons, (1983) p. 125.

**Dell A., Morris H.R., Egge H., Von Nicolai H. and Strecker G.**

*Fast atom bombardment mass spectrometry for carbohydrates structure determination.*

Carbohydr. Res. 115 (1983a) 41-52.

**Dell A., York W.S., McNeil M., Darvill A.G. and Albersheim P.**

*The cyclic structure of  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 2)-linked D-glucans secreted by Rhizobia and Agrobacteria.*

Carbohydr. Res. 117 (1983b) 185-200.

**Dell A. and Ballou C.E.**

*Fast atom bombardment, negative-ion mass spectrometry of the mycobacterial O-methyl-D-glucose polysaccharide and lipopolysaccharides.*

Carbohydr. Res. 120 (1983c) 95-111.

**Dell A., Dutton G. G. S., Jansson P.E., Lindberg B., Linquist U. and Sutherland I.W.**

*Absence of O-formyl groups in Klebsiella polysaccharides*

Carbohydr. Res. 122 (1983d) 340-343.

**Dell A., Oates J., Lugowski C., Romanowska E., Kenne L. and Lindberg B.**

*The enterobacterial common-antigen, a cyclic polysaccharide.*

Carbohydr. Res. 133 (1984) 95-104.

**Dell A. and Tiller P.R.**

*A novel mass spectrometric procedure to rapidly determine the position of O-acylated residues in the sequence of naturally occurring oligosaccharides*

Biochem. Biophys. Res. Commun. 135 (1986) 1126-1134.

**Dell A.**

*F.A.B. mass spectrometry of carbohydrates*

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 45 (1987) 20-71.

**Dell A., Carman N.H., Tiller P.R. and Thomas-Oates J.E.**

*Fast atom bombardment mass spectrometric strategies for characterizing carbohydrate-containing biopolymers.*

Biomed. Environ. Mass Spectrom. 16 (1988a) 19-24.

**Dell A., Rogers M.E., Thomas-Oates J.E., Huckerby T.N., Sanderson P.N. and Nieduszynski I.A.**

*Fast atom bombardment mass spectrometric strategies for sequencing sulphated oligosaccharides.*

Carbohydr. Res. 179 (1988b) 7-19.

**Dell A.**

*Preparation and desorption mass spectrometry of permethyl and peracetyl derivatives of oligosaccharides.*

Meth. Enzymol. 193 (1990a) 647-660.

**Dell A., Azadi P., Tiller P., Thomas-Oates J., Jennings H.J., Beurret M. and Michon F.**

*Analysis of oligosaccharide epitopes of meningococcal lipopolysaccharides by fast atom bombardment mass spectrometry.*

Carbohydr. Res. 200 (1990b) 59-76.

**De Pauw E.**

*Liquid matrices for secondary ion mass spectrometry.*

Mass Spectrom. Rev. 5 (1986) 191-212.

**De Pauw E., Agnello A. and Derwa F.**

*Liquid matrices for liquid secondary ion mass spectrometry-fast atom bombardment : an update.*

Mass Spectrom. Rev. 10 (1991) 283-301.

**Domon B. and Costello C.E.**

*A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS of glycoconjugates.*

Glycoconjugate J. 5 (1988) 397-409.

**Domon B., Müller D.R. and Richter W.J.**

*Identification of interglycosidic linkages and sugar constituents in disaccharides subunits of larger glycosides by tandem mass spectrometry.*

Org. Mass Spectrom. 24 (1989) 357-359.

**Domon B., Müller D.R. and Richter W.J.**

*High performance tandem mass spectrometry for sequence, branching pattern and interglycosidic analysis of peracetylated oligosaccharides.*

Biomed. Environ. Mass Spectrom. 19 (1990) 390-392.

**Domon B., Müller D.R. and Richter W.J.**

*Determination of interglycosidic linkages in disaccharides by high performance tandem mass spectrometry.*

Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 100 (1990) 301-311.

**Douglas D.J.**

*Mechanism of the collision-induced dissociation of polyatomic ions studied by triple quadrupole mass spectrometry.*

J. Phys. Chem. 86 (1982) 185-191.

**Dzidic I. and Kebarle P.**

*Hydration of the alkali ions in the gas phase. Enthalpies and entropies of reactions  $M^+(H_2O)_{n-1} + H_2O = M^+(H_2O)_n$ .*

J. Phys. Chem. 74 (1970) 1466-1474.

**Egge H., Dabrowski J. and Hanfland P.**

*Structural analysis of blood group ABH, I, i, Lewis and related glycosphingolipids. Application of FAB mass spectrometry and high resolution proton NMR.*

Pure Appl. Chem. 56 (1984) 807-819.

**Egge H. and Peter-Katalinic J.**

*Fast atom bombardment mass spectrometry for structural elucidation of glycoconjugates*

Mass Spectrom. Rev. 6 (1987) 331-393.

**Forsberg L. S., Dell A., Walton D.J. and Ballou C.E.**

*Revised structure for the 6-O-methylglucose polysaccharide of mycobacterium smegmatis.*

J. Biol. Chem. 257 (1982) 3555-3563.

**Fournet B., Strecker G., Leroy Y. and Montreuil J.**

*Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoproteins.*

Anal. Biochem. 116 (1981) 489-502.

**Fukuda M., Bothner B., Ramsamoj P., Dell A., Tiller P., Varki A. and Klock J.C.**

*Structures of sialylated fucosyl polylactosaminoglycans isolated from chronic myelogenous leukemia cells*

J. Biol. Chem. 260 (1985) 12957-12967.

**Garozzo D., Giuffrida M., Impallomeni G., Ballistreri A. and Montaudo G.**

*Determination of linkage position and identification of the reducing end in linear oligosaccharides by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry.*

Anal. Chem. 62 (1990) 279-286.

**Garozzo D., Impallomeni G., Montaudo G. and Spina E.**

*Structure of underivatized branched oligosaccharides by negative fast-atom bombardment mass spectrometry.*

Rapid Commun. Mass Spectrom. 6 (1992) 550-552.

**Gillece-Castro B.L. and Burlingame A.L.**

*Oligosaccharide characterization with high-energy collision-induced dissociation mass spectrometry.*

Meth. Enzymol. 193 (1990) 689-712.

**Goldstein I.J., Hay G.W., Lewis B.A. and Smith F.**

*Controlled degradation of polysaccharides by periodate cleavage oxydation, reduction, and hydrolysis.*

Meth. Carbohydr. Chem. 5 (1965) 361-370.

**Greco F., Liguori A., Sindona G. and Uccela N.**

*Gas-phase proton affinity of deoxyribonucleosides and related nucleobases by fast atom bombardment tandem mass spectrometry.*

J. Am. Chem. Soc. 112 (1990) 9092-9096.

**Gross M.L., Tomer K.B., Cerny R.L. and Giblin D.E.**

*FAB and tandem MS for structure determination of biomolecules : success to m/z 2000 and prospects for higher mass.*

in Mass Spectrometry in the Analysis of Large Molecules, ed. by C.J. McNeal, John Wiley and Sons, (1986) p. 171.

**Gross M.L.**

*Tandem mass spectrometry : multisector magnetic instruments.*

Methods Enzymol. 193 (1990) 131-153.

**Haddon W.F. and McLafferty F.W.**

*Metastable ion characteristics. Collision-induced metastables.*

J. Am. Chem. Soc. 90 (1968) 4745-4746.

**Hakomori S.I.**

*A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethylsulfoxyde.*

J. Biochem. 55 (1964) 205-208.

**Hanfland P., Kordowicz M., Niermann H., Egge H., Dabrowski U., Peter-Katalinic J. and Dabrowski J.**

*Purification and structures of branched blood-group-B-active glycosphingolipids from human erythrocyte membranes.*

Eur. J. Biochem. 145 (1984) 531-542.

**Hardy M.R. and Townsend R.R.**

*Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection.*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 3289-3293.

**Hase S., Ikenaka T. and Matsushima.**

*A highly sensitive method for analysis of sugar moieties of glycoproteins by fluorescence labeling.*

J. Biochem. 90 (1981) 407-414.

**Hase S., Ibuki T. and Ikenaka T.**

*Reexamination of the pyridylation used for fluorescence labeling of oligosaccharides and its application to glycoproteins.*

J. Biochem. 95 (1984) 197-203.

**Hayes R.N. and Gross M.L.**

*Collision-induced dissociation.*

Meth. Enzymol. 193 (1990) 237-263.

**Hemberger P.H., Laramée J.A., Hubik A.R. and Cooks R.G.**

*Angle-resolved mass spectrometry. Target effect upon energy deposition.*

J. Phys. Chem. 85 (1981) 2335-2340.

**Hemling M.E., Yu R.K., Sedgwick R.D. and Rinehart K.L.**

*Fast atom bombardment mass spectrometry of glycosphingolipids. Glycosphingolipids containing neutral sugars.*

Biochemistry 23 (1984) 5706-5713.

**Hernandez L.M., Ballou L., Alvarado E., Gillece-Castro B.L., Burlingame A.L. and Ballou C.E.**

*A new Saccharomyces cerevisiae mnn mutant N-linked oligosaccharide structure.*

J. Biol. Chem. 264 (1989) 11849-11856.

**Hofmeister G.E., Zhou Z. and Leary J.L.**

*Linkage position determination in lithium-cationized disaccharides: tandem mass spectrometry and semiempirical calculations*

J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 5964-5970.

**Hogeland K.E., Arbogast Jr.B. and Deinzer M.L.**

*Liquid secondary ion mass spectrometry analysis of permethylated, n-hexylamine derivatized oligosaccharides. Application to Baculovirus expressed mouse Interleukin-3.*

J. Am. Soc. Mass Spectrom. 3 (1992) 345-352.



**Holmes J.L.**

*Assigning structures to ions in the gas phase.*

Org. Mass Spectrom. 20 (1985) 169-183.

**John C.M. and Gibson B.W.**

*Amino and hydrazino alkyl benzoates as derivatizing agents for the separation and mass spectrometric analysis of oligosaccharides from bacterial lipooligosaccharides.*

Anal. Biochem. 187 (1990) 281-291.

**Kamerling J.P., Heerma W., Green B.N., Lewis I.A.S., Strecker G., Spik G. and Vliegenthart J.F.G.**

*Fast atom bombardment mass spectrometry of carbohydrates chains derived from glycoproteins.*

Biomed. Mass Spectrom. 10 (1983) 420-425.

**Kamisango K.I., Saadat S., Dell A. and Ballou C. E.**

*Pyruvylated glycolipids from Mycobacterium smegmatis.*

J. Biol. Chem. 260 (1985) 4117-4121.

**Kentämaa H.I. and Cooks R.G.**

*Tautomer characterization by energy resolved mass spectrometry. Dimethyl phosphite and dimethyl phosphonate ions.*

J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 1881-1886.

**Khoo K.H. and Dell A.**

*Assignment of anomeric configurations of pyranose sugars in oligosaccharides using a sensitive FAB-MS strategy.*

Glycobiology 1 (1990) 83-91.

**Kim M.S. and McLafferty F.W.**

*Efficiency of collisional activation of gaseous organic ions.*

J. Am. Chem. Soc. 100 (1978) 3279-3282.

**Kim M.S.**

*Energetics and kinetics of collision-activated decomposition of polyatomic ions at kiloelectronvolt translational energy.*

Org. Mass Spectrom. 26 (1991) 565-574.

**Kotchekov N.K. and Chizhov O.S.**

*Mass spectrometry of carbohydrates derivatives.*

Adv. Carbohdr. Chem. 21 (1966) 39-93.

**Kuo M.S., Mort A.J. and Dell A.**

*Identification and location of L-glycerate, an unusual acyl substituent in gellan gum.*

Carbohydr. Res. 156 (1986) 173-187.

**Laine R.A., Pamidimukkala K.M., French A.D., Hall R.W., Abbas S.A., Jain R.K. and Matta K.L.**

*Linkage position in oligosaccharides by fast atom bombardment, collision-activated dissociation, tandem mass spectrometry and molecular modeling.*

*L-fucosyl<sub>p</sub>-(1→X)-D-acetyl-D-glucosaminy<sub>p</sub>-(β1→3-D-galactosyl<sub>p</sub>-(β1→0-methyl) where X=3,4 or 6.*

J. Am. Chem. Soc. 110 (1988) 6931-6939.

**Laine R.A., Yoon E., Mahier T., Abbas S., De Lappe B., Jain R. and Matta K.**

*Non-reducing terminal linkage position determination in intact and permethylated synthetic oligosaccharides having a penultimate amino sugar : fast atom bombardment ionization, collisional-induced dissociation and tandem mass spectrometry.*

Biol. Mass Spectrom. 20 (1991) 505-514.

**Laramée J.A., Cameron D. and Cooks R.G.**

*Collision-induced dissociation mass spectrometry : target gas effect upon scattering and charge exchange.*

J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 12-17.

**Lawson A.M., Chai W., Cashmore G.C., Stoll M.A., Hounsell E.F. and Feizi T.**

*High-sensitivity structural analysis of oligosaccharides probes (neoglycolipids) by liquid-secondary-ion mass spectrometry.*

Carbohydr. Res. 200 (1990) 47-57.

**Levsen K. and Beckey H.D.**

*Collisional activation spectra of field ionised molecules.*

Org. Mass Spectrom. 9 (1974) 570-581.

**Levsen K.**

*Fundamental aspects of organic mass spectrometry.*

in *Progress in Mass Spectrometry*, vol.4 (1978), Verlag Chemie  
Weinheim-New York.

**Liou C.C. and Brodbelt J.**

*Determination of orders of relative alkali metal ion affinities of crown  
ethers and acyclic analogs by the kinetic methods.*

*J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3 (1992) 543-548.

**Lipniunas P., Angel A.S., Erlansson K., Lindh F. and Nilsson B.**

*Mass spectrometry of high-mannose oligosaccharides after trifluoroacetyl-  
olysis and periodate oxydation.*

*Anal. Biochem.* 200 (1992) 58-67.

**Maleknia S. and Brodbelt J.**

*Gas-phase selectivities of crown ethers for alkali metal ion  
complexation.*

*J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 4295-4298.

**Martin S.A.**

*Investigation of the fragmentation of peptides as a function of  
collision energy in a four-sector tandem mass spectrometer.*

in *Proceedings of the 37<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and  
Allied Topics, Miami Beach, (1989) p. 858.*

**Mazor M.H., McCammon J.A. and Lybrand T.P.**

*Molecular recognition in nonaqueous solvents. 2. Structural and  
thermodynamic analysis of cationic selectivity of 18-crown-6 in  
methanol.*

*J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 4411-4419.

**McLafferty F.W., Bente P.F., Kornfeld R., Tsai S.C. and Howe I.**

*Collisional activation spectra of organic ions.*

*J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 2120-2129.

**McLuckey S.A., Cameron D. and Cooks R.G.**

*Proton affinities from dissociations of proton-bound dimers.*

*J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 1313-1317.

**McLuckey S.A.**

*Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry.*

J. Am. Soc. Mass Spectrom. 3 (1992) 599-614.

**McNeil M., Darvill J., Darvil A.G., Albersheim P., Van Veen R.,  
Hooykaas P., Schilperoot R. and Dall A.**

*The discernible, structural features of the acidic polysaccharides  
secreted by different Rhizobium species are the same.*

Carbohydr. Res. 146 (1986) 307-326.

**Mizuochi T., Loveless R.W., Lawson A.M., Chai W., Lachmann P.J.,  
Childs R.A., Thiel S. and Feizi T.**

*A library of oligosaccharide probes (neoglycolipids) from N-glycosylated  
proteins reveals that Conglutinin binds to certain complex-type as well  
as high mannose-type oligosaccharide chains.*

J. Biol. Chem. 264 (1989) 13834-13839.

**Müller D.R., Domon B., Raschdorf F. and Richter W.J.**

*Application of tandem mass spectrometry in the structure determination  
of complex biomolecules. Direct stereochemical assignment of mono- and  
disaccharide sub-units in larger glycosides by low energy collision  
dissociation.*

Adv. Mass Spectrom. 11B (1989) 1309-1325.

**Müller D.R., Domon B., Blum W., Raschdorf F. and Richter W.J.**

*Direct stereochemical assignment of sugar subunits in naturally occurring  
glycosides by low collision induced dissociation. Application to  
Papulacandin antibiotics.*

Biomed. Environ. Mass Spectrom. 15 (1988) 441-446.

**Nilsson B. and Svensson S.**

*A new method for degradation of the protein part of glycoproteins :  
isolation of the carbohydrate chains of asialofetuin.*

Carbohydr. Res. 72 (1979) 183-190.

**Nilsson B. and Svensson S.**

*A new method for N-deacetylation of 2-acetamido-2-deoxy sugars.*

Carbohydr. Res. 62 (1978a) 377-380.

**Nilsson B. and Svensson S.**

*Studies of the stability of reducing sugars towards trifluoroacetylation : a method for specific elimination of 2-acetamido-2-deoxyhexose residues at reducing ends of oligosaccharides.*

Carbohydr. Res. 65 (1978b) 169-171.

**Orlando R., Bush A. and Fenselau C.**

*Structural analysis of oligosaccharides by tandem mass spectrometry : collisional activation of sodium adduct ions.*

Biomed. Environ. Mass Spectrom. 19 (1990) 747-754.

**Ouverkerk C.E.D., McLuckey S.A., Kistemaker P.G. and Boerboom A.J.H.**

*Pressure and target gas effect in the collision-induced dissociation of methane molecular ions.*

Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 56 (1984) 11-23.

**Paz Parente J., Cardon P., Leroy Y., Montreuil J., Fournet B. and Ricart G.**

*A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion.*

Carbohydr. Res. 141 (1985) 41-47.

**Poulter L., Earnest J.P., Stroud R.M. and Burlingame A.L.**

*Structure, oligosaccharide structures and posttranslationally modified sites of the nicotinic acetylcholine receptor.*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 6645-6649.

**Poulter L. and Burlingame A.L.**

*Desorption mass spectrometry of oligosaccharides coupled with hydrophobic chromophores.*

Meth. Enzymol. 193 (1990) 661-689.

**Poulter L., Karrer R. and Burlingame A.L.**

*n-alkyl p-aminobenzoate as derivatizing agents in the isolation, separation, and characterization of submicrogram quantities of oligosaccharides by liquid secondary ion mass spectrometry.*

Anal. Biochem. 195 (1991) 1-13.

**Prakash C. and Vijay I.K.**

*A new fluorescent tag for labeling of saccharides*  
Anal. Biochem. 128 (1983) 41-46.

**Promé D., Promé J.C., Puzo G. and Aurelle H.**

*Mass spectrometry of oligosaccharides by chloride-attachment reactions :  
the origin of fragment loss.*  
Carbohydr. Res. 140 (1985) 121-129.

**Qureshi N., Takayama K. and Ribí E.**

*Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained  
from the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium.*  
J. Biol. Chem. 257 (1982) 11808-11815.

**Reason A.J., Dell A., Romero P.A. and Herscovics A.**

*Specificity of the mannosyltransferase which initiates outer chain  
formation in Saccharomyces cerevisiae.*  
Glycobiology 1 (1991) 387-391.

**Richter W.J., Müller D.R. and Domon B.**

*Tandem mass spectrometry in structural characterization of  
oligosaccharide residue in glycoconjugates.*  
Methods Enzymol. 193 (1990) 607-623.

**Rinehart K.L.**

*Fast atom bombardment mass spectrometry.*  
Science 218 (1982) 254-260.

**Rosenfeld L. and Ballou C.E.**

*Acetolysis of disaccharides : comparative kinetics and mechanism.*  
Carbohydr. Res. 32 (1974) 287-298.

**Rosenstock H.M., Wallenstein M.B., Wahrhaftig A.L. and Eyring H.**

*Absolute rate theory for isolated systems and the mass spectra of  
polyatomic molecules.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38 (1952) 667-678.

**Schwartz R.N., Slawsky Z.I. and Herzfeld K.F.**

*Calculation of vibrational relaxation times in gases.*  
J. Chem. Phys. 20 (1952) 1591-1599.

**Stellner K., Saito H. and Hakomori S.I.**

*Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. Aminosugar linkages of ceramide pentasaccharides of rabbit erythrocytes and of Forssman antigen.*

Arch. Biochem. Biophys. 155 (1973) 464-472.

**Sunner J., Kulatunga R. and Kebarle P.**

*Secondary ion currents in fast atom bombardment of preionized liquids.*

Anal. Chem 58 (1986) 2009-2014.

**Sunner J., Morales A. and Kebarle P.**

*Kinetic modeling of fast atom bombardment spectra of glycerol-diethanolamine mixtures.*

Anal. Chem. 60 (1988) 98-104.

**Teesch L.M. and Adams J.**

*Fragmentations of gas-phase complexes between alkali metal ions and peptides : metal ion binding to carbonyl oxygens and other neutral functional groups.*

J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 812-820.

**Teesch L.M. and Adams J.**

*Metal ions as special reagents in analytical mass spectrometry.*

Org. Mass Spectrom. 27 (1992) 931-943.

**Tip L., Versluis C., Dallinga J.W. and Heerma W.**

*N-formyl-2-aminoethanol as a matrix for fast atom bombardment mass spectrometry of non-polar biomolecules.*

Anal. Chim. Acta 241 (1990) 219-225.

**Todd P.J., Warmarck R.J. and McBay E.H.**

*The angular distribution of fragment ions produced from polyatomic ion collisions.*

Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes. 50 (1983a) 299-313.

**Todd P.J. and McLafferty F.W.**

*Collisionally activated dissociation of high energy ions*

*in Tandem Mass Spectrometry, ed. by F.W. McLafferty, John Wiley and Sons, (1983b) p. 149.*

**Tsai P., Dell A. and Ballou C.E.**

*Characterisation of acetylated and acetolysed glycoprotein high-mannose core oligosaccharides by fast atom bombardment mass spectrometry.*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1986) 4119-4123.

**Wang W.T., LeDonne N.C., Ackerman Jr.B. and Sweeley C.C.**

*Structural characterization of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography, fast-atom bombardment-mass spectrometry, and exoglycosidase digestion.*

Anal. Biochem. 141 (1984) 366-381.

**Webb J.W., Jiang K., Gillece-Castro B.L., Tarentino A.L., Plummer T.H., Byrd J.C., Fisher S.J. and Burlingame A.L.**

*Structural characterization of intact, branched oligosaccharides by high performance liquid chromatography and liquid secondary ion mass spectrometry.*

Anal. Biochem. 169 (1988) 337-349.

**Wipff G., Weiner P. and Kollman P.**

*A molecular mechanics study of 18-crown-6 and its alkali complexes : an analysis of structural flexibility, ligand specificity, and the macrocyclic effect.*

J. Am. Chem. Soc. 104 (1982) 3249-3258.

**Wysocki V.H., Kenttämaa H.I. and Cooks R.G.**

*Internal energy distributions of isolated ions after activation by various methods.*

Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 75 (1987) 181-208.

**Wysocki V.H., Bier M.E. and Cooks G.G.**

*Internal energy requirements for remote site fragmentation.*

Org. Mass Spectrom. 23 (1988) 627-633.

**Yamaoka H., Đông P. and Durup J.**

*Energetics of the collision-induced dissociations  $C_2H_2^+ \rightarrow C_2H^+ + H$  and  $C_2H_2^+ \rightarrow H^+ + C_2H$ .*

J. Chem. Phys. 51 (1969) 3465-3476.



**Yost R.A. and Boyd R.K.**

*Tandem mass spectrometry : quadrupole and hybrid instruments.*

Meth. Enzymol. 193 (1990) 154-200.

**Zhou Z., Ogden S. and Leary J.A.**

*Linkage position determination in oligosaccharides : MS/MS study of lithium-cationized carbohydrates.*

J. Org. Chem. 55 (1990) 5444-5446.

